



Title	ヒト唾液腺多形性腺腫由來の上皮細胞の生物学的特性
Author(s)	白砂, 兼光
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/31984
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

原著

ヒト唾液腺の形態学的腫瘍由来の
上皮細胞の生物学的特性

白砂義光

緒 言

唾液腺多形性腺腫は唾液腺腫瘍の中で最も頻度の高い腫瘍であり^{2,3)}、その腫瘍組織は上皮性成分と間葉性成分とにより構成されてゐる。そのため、従来ドリニの腫瘍の発生母地について種々の論議があつたが、近年ではこの腫瘍の上皮性細胞に由来しているという考え方⁴⁻¹⁴⁾が一般的に認められてゐる。すなはち唾液腺導管上皮細胞あるいは筋上皮細胞が、この腫瘍形成に関与していると報告するものが多々。

またこの腫瘍は臨床的に約1~3%の割合で癌化すると云われ、さうに多くの癌化の割合は腫瘍を長期間生体に放置することによつて著明に増加すると云われてゐる。¹⁹⁾この臨床的事実は唾液腺多形性腺腫にはすでに癌化して細胞、あるいは癌化する能力を保有してゐる細胞が存在していることを示唆してゐる。この腫瘍の悪性度を検索する観点からもまた本腫瘍の癌化の potentiality について病理組織学的検討

15-18, 20)

がなまかれて いるが、癌化の構構、また癌化した細胞の生物学的性質については不明である。

ともあれ細胞分化の観察に立って唾液腺多形性腺腫を見ると、種々の分化過程を示す細胞が存在していると推察される。故にこの腫瘍組織から in vitro において transform してい る細胞を得ることが可能であると考えられる。さうして transform した細胞を分離し、生物学的特性を解析することができるれば、得られた行見はこの腫瘍の発現構構などをその発生母地を明りかにする上に、役立つと考えられる。

著者はヒト口蓋小唾液腺に発生した多形性腺腫組織を組織培養することにより in vitro で transform してい る細胞を得たので、その細胞について生物学的特性を解析した。

実験材料ならびに実験方法

1) 細胞ならびに培養法

二の実験に使用した唾液腺由來の細胞はヒト口蓋小唾液腺部に發生した多形性腺腫組織から得た。

初代培養は次の様に行なった。掏出した組織を直ちにハサミで約1mm立方の大きさに細切り、その組織片を60mm径ペトリ皿に入れ、2時間室温中で静置した。組織片がペトリ皿底面に十分に付着するのを待って、約1mlの増殖培養液を入れ、5%炭酸ガス培養器中で37°Cにて培養した。増殖培養液にはEagleのMEM²²⁾培地(日本製薬社製)に20%仔牛血清(日本微生物病研究会製), 2mM L-グルタミンを加えしたものを使用した。培養3日目より増殖培養液を1mlづつ2月おきに追加し、培養12日目で培養液を交換した。約3週間後、組織片辺縁より増殖してきた細胞を最終濃度0.08%トリプシン(日本微生物病研究会製)及び1.4%エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA, 石津製薬社製)を含む Ca^{++} , Mg^{++} を含まないリン酸緩衝液(PBS (-), pH 7.2)にて室温で5分間処理し

、細胞を採取したから、 $200 \times g$ で 10 分間遠心し
た。その細胞沈渣を MEM で 3 回洗ったから、
上記の増殖培養液に 20×10^4 個 / ml の割合に細
胞を浮遊したものを 60 mm � 径あるいは 90 mm 径ペ
トリ皿に入れ、5% 炭酸ガス培養器中で 34°C か
ら 37°C にて 4-5 日間隔で組織培養した。なお
このヒト唾液腺多形性腺腫 (Human Pleomorphic
Adenoma) 由来の培養細胞を HPA 細胞と略記す
る。

ヒト口蓋小唾液腺部あるいは頸下腺部に生
じた腺様囊胞癌、ならびに手術中に得た乳児
口唇部組織より上記と同様の方法で初代培養
を行はれ、得た細胞を実験に使用した。

またヒト羊膜由来の株化細胞である FL 細胞²⁷⁾
, ヒト子宮頸癌由来の株化細胞である HeLa 細
胞²³⁾ならびにハムスター脾由来の株化細胞である BHK 21/ WI-2 細胞²⁴⁾を実験に使用した。これら
の細胞は以下の様に組織培養を行なった。90
mm 径ペトリ皿に形成された单層培養細胞を
EDTA-トリプシン溶液にて室温で 3 分間処理し

代のち、その細胞を採取し MEM で 3 回洗浄し、トリプシンを除去した。この細胞を 10% 仔牛血清を含む Eagle の増殖培養液にて 20×10^4 体 / ml に調整し 代細胞培養液の 10 ml を 90 mm 径ペトリ皿に入れ、5% 炭酸ガス培養器中、37°C にて培養した。なお継代培養は 3-4 日間隔で上記レバ方法で行なった。

2) 敷雲天培養液中のコロニー形成能の算定

30 mm 径 \pm 10% 皿に寒天培養液を敷き (Special agar noble, Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.) を最終濃度 0.6% の割合に含む寒天培養液を 2 ml 入れ硬化後、寒天を 0.3% の割合に含む寒天培養液 1 ml (細胞) を 100 ㌢あたり 1000 倍混入し、先に硬化した寒天培養液上に重層した。この細胞は 5% 炭酸ガス培養器中で 34°C のるいに 37°C にて培養した。培養 20 日後には形成されたコロニーを顕微鏡下 (40 倍) にて算定した
25)

3) ランダムサンプリングによるウイルス力価測定法

実験には Herpes simplex virus (Hf 種²⁶⁾, (HSV-I))
Vesicular stomatitis virus (インデアナ株, (VSV²⁸⁾))

を使用した。これら2つのウイルスは 34°C で2日間
培養することにより形成された BHK 21 / WI-2
単層培養細胞にて増殖。セウイルスの細胞変
性効果が単層培養細胞の 70~80% に出現した時
、培養液を採取し $5000\times g$ で 1 時間遠心するこ
とにより細胞残渣を除去したものを種ウイル
スとして使用した。なお実験に供するまで -70°C
に保存した。

HSV-I ならびに VSV はそのプラック形成能
を利用して感染力値を測定した。すなわち HPA
細胞または FL 細胞を増殖培養液で 20×10^4 個/ml
の細胞浮遊液にしたものの 5ml を 60mm 径ペト
リ皿に入れて 34°C で培養した。2日後密に形成
された単層培養細胞に MEM で 10 倍倍増希釈し
たウイルス 0.1 ml を播種し 34°C で 1 時間吸着させた。
その後未吸着ウイルスを除去するため
MEM で単層培養細胞を 1 度洗い、増殖培養液
に最終濃度 1% の割合に寒天を含む培養液 5ml

巨重層し、室温で寒天を硬化させたのち、5%
炭酸ガス培養器で34°Cにて培養した。VSVでは培養36時間後、HSV-Iでは6日間培養後、
形成されたプラックをDulbeccoのリン酸緩衝食
塩水(PH 7.2, D-PBS)で300倍に調整した=2
-トライレッド溶液をペトリ皿当たり0.2ml加え
て、3時間染色し、プラック数を算定した。
²⁹⁾

4) インターフェロン標物質の検索

HPA細胞を34°Cあるいは37°Cにて72時間培
養した培養上清を採取し、高速遠心により細
胞残渣を除去したのち、100,000×g、2時間短
遠心(Martin Christオメガ型遠心機)し、その
上清をインターフェロン(IF)標標品とし
て使用した。

このIF標品の活性は以下に述べる様に測
定した。10×10⁵個のFL細胞を増殖培養液に浮
遊させたものを60mm径ペトリ皿に入れ、34°C
で培養した。2日後、密に形成されたFL單
層培養細胞を上記のIF標標品1mlで20時間、
34°Cで処理した。その後、IF処理FL單層培養

細胞を MEM で 3 回洗浄したのち適当に希釈して VSV 液波 0.1ml を播種することにより形成されたアラック数を算定した。また FL 单層培養細胞を IF 標標品の代りに MEM で同様に処理したものと対照とした。また VSV 液波は対照として FL 单層培養細胞にて約 100 伯のアラックを形成する様に調整した。

IF 標標品の効価は二の標品で処理した FL 单層培養細胞での VSV のアラック数と対照のものと比較し、その減半率で表現した。

5) サイトメガロウイルスの補体結合反応
サイトメガロウイルス (CMV) の補体結合反応 (CF) は Klemola³⁸⁾ の方法により施行した。

CF 抗原としては HPA 細胞 (10^7 伯) を 3ml のベロナール緩衝液 (pH 6.8) に浮遊させ、ドライアイス-アセトンを用いて 3 回凍結融解を行は、その後 5000×g, 30 分間遠心して得た上清を使用した。CMV に対する抗血清³²倍の CF 抗体価を保有するヒト妊娠血清 (大阪府立公衆衛生研究所、高須賀一医学士より分与) を用いた。

もの) を標準血清として使用した。

抗原 $20\mu\text{l}$ をベロナール緩衝液で 2 倍希釈したものに、4 倍の CF 抗体価を示すように希釈した標準血清 $20\mu\text{l}$ と $40\mu\text{l}$ の補体 (2 単位) を加えて 4°C にて一晩放置した。この反応混合液に感作血球を $40\mu\text{l}$ 加え 37°C で 1 時間反応させて、この場合溶血を阻止しない抗原溶液の最大希釈倍数でもってサイトメガロウイルスの補体結合抗原価とした。すなわち感作血球は 2% 羊赤血球と 2 単位の溶血素を等量混合し室温で 30 分間静置することにより作製した。標準血清は 56°C 、30 分間非加熱した後、実験に供した。

6) 蛍光抗体法

HPA 細胞のヒト全唾液成分産生の有無を間接蛍光抗体法を用いて検討した。

HPA 細胞を $24 \times 32\text{mm}$ カバー ガラスを入れて 60mm 径ペトリ皿に 50×10^4 個入れ、 37°C で培養した。3 日後カバー ガラス上に形成された單層培養細胞を 4°C の D-PBS (pH 7.1) で 3 回洗浄

レウカチアセトンにて 4°C で 10 分間固定し、
さらにも 1 時間室温中に放置することによりア
セトンを除去した。次に D-PBS で細胞を浸漬
し、抗ヒト全唾液マーグロブリン（広島大学
医学部細胞生物学室、福井良雄博士より分与さ
れた）にて 37°C の湿度 100% の容器内で 1 時間
反応させた。以上のようなく処理した標本と未
反応抗血清成分を除去ため D-PBS で振とうし
ながら 1 時間洗浄した。次に蛍光色素フルオ
レッセンス・イソチオシアネート (FITC) を
結合させた抗家兔マーグロブリン IgG 血清 (Dakopatts A/S 製, Denmark) とさらにも 1 時間, 37°C
にて反応させた。再び D-PBS で洗浄し 1 時間
継続し、未反応抗血清成分を除去したものと
0.5M 磷酸緩衝液 (pH 9.5) で 90% に調整してグ
リセリン溶液で封入し、蛍光顕微鏡装置 FL 型
(日本光学工業社製) を用いて UV 励起下で倍
率 200 倍で検鏡した。写真撮影には Kodak high
speed ektachrome のフィルムを使用した。

またヒト腺様嚢胞癌組織及びヒト舌粘膜

組織より得た初代培養細胞（形態的に線維芽細胞）及び HeLa 細胞についても同様に间接免疫抗体法を用いて抗ヒト唾液における抗原性を検討した。

7) ワイルス精製法

HPA 細胞を 34°C から 37°C で 7 日間培養し、その培養上清を各々上部採取し 4°C で $5000 \times g$ 、1 時間遠心し細胞残渣を除去したのち、 $100,000 \times g$ 、2 時間超遠心した。得られた沈殿を 0.5ml の $1/100\text{M}$ トリス-塩酸緩衝液に懸濁してワイルス粗製標品とした。さらに精製ワイルス標品を得るために、ニトロセルロースチュード（5ml 容、ベックマン社製）中へ $1/100\text{M}$ トリス-塩酸緩衝液で調整した $15\sim60\%$ (W/W) の蔗糖密度勾配溶液に粗製ワイルス標品 0.5ml を重層し、Martin Christ オメガ型超遠心機のスイングローターを使用し $62500 \times g$ 、2 時間遠心した。遠心後、管底より 4 滴ごつ 20 管に分画し、その分画の各々を電子顕微鏡にて観察し、後後 1.17 の行に潜むワイルス粒子を認めた。

で二の分画を精製ウイルス標品とした。

8) 逆転写酵素活力による DNA 依存性 DNA 合成酵素活性の測定法

逆転写酵素活性の測定は Green⁽³⁰⁾ らの方法に準じて行った。

精製ウイルス標品 20 μ l に反応混合液 80 μ l を加えて反応させた。この反応混合液は次の様に調整した。 0.01 M トリス塩酸 (pH 8.0), 5mM dithiothreitol (Sigma chemical Co., St. Louis, U.S.A.), 0.01% Triton X-100 (石津製薬社製), 30mM NaCl, 5.0mM MgCl₂, 0.1mM のデオキシリボヌクレオチド (デオキシチトシン-3-リノ酸 (dCTP), デオキシグアノシン-3-リノ酸 (dGTP), デオキシアデノシン-3-リノ酸 (dATP), Sigma chemical Co., St. Louis, U.S.A.), 10 μ Ci ³H-チミジン-3-リノ酸 (³H-TTP, specific activity は 18.9 Ci/m mol, New England Nuclear, Boston, U.S.A.)。ウイルス標品は二の基質と混合し、うち 37°C の恒温槽で 1 時間反応させた。反応は 1N 過塩素酸 (PCA) 150 μ l を加え、冰浴中にて急冷して停止させ、次に反応

液に仔牛胸腺 DNA 100 μ g を担体として加え、生じた沈殿を 0.2 N NaOH 100 μ l に溶解して、未反応の 3 H-TTP を除去するため 1N 過塩素酸と 0.2 N NaOH を用いて、それを水沈液と溶解を二回繰り返したのち 3 ml の 10% トリクロル酢酸 (TCA) により再び沈殿を形成させた。この沈殿をミリポア・メンブランフィルター (HA 型 Pore size 0.45 μ) 上に集め、Bray ³¹⁾ の溶液 10 ml と加えて溶解して。 3 H 放射活性 ³²⁾ Aloka (日本亜線医理学研究所) の液体シンチレーションカウンターを使用して測定した。なお DNA 依存性 DNA 合成酵素活性の測定には反応混合液に酵型 DNA として 10 μ g 仔牛胸腺 DNA (Sigma chemical Co., St. Louis, U.S.A.) を加えた。

また精製ウイルス標品カリボスウレア-ウ (RNase) 处理の次の様に行なう。精製ウイルス標品 20 μ l に最終濃度 0.01% Triton X-100 を 5 mM dithiothreitol を加え、0.1 mg RNase A ³³⁾ (Sigma chemical Co., St. Louis, U.S.A.) を加え、0°C, 7 時間反応させた。この標品についても同様

△逆転写酵素活性を測定した。

本実験に使用したウイルスのタンパク量は Lowry⁽³²⁾ の方法によつて定量した。

9) 光学顕微鏡による観察

標本の作製は次の様に行つた。10 \times 10⁵ 1PF の細胞を 24 \times 32mm カバーガラスを入れた 60mm 径のトリ皿に入れ、3 日間 37°C で培養したのちカバーガラス上に形成された单層培養細胞を D-PBS で洗滌した。その後 99.5% メタノールにて 10 分間室温中で固定したのち 10% ギムザ液（pH 6.8）で 20 分間室温にて染色した。この標本は室温にて乾燥させたのちカナダバルサムにて封入した。

10) 電子顕微鏡による観察

腫瘍組織液を 0.005M 塩化カルシウム (CaCl₂) を加えた 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.3) で最終濃度 4% にした様に調整したグルタールアルデヒド⁽³³⁾（石津製薬社製）溶液中で約 2 mm 立方に細切り 2 時間固定した。その後上述したリン酸緩衝液で十分に洗滌後、さらに残存するゲ

グルタールアルデヒドを除去するため上記の緩衝液中に浸漬し 4°C にて一起放置して、次に 2% 四酸化オスミウム溶液 (OsO_4 , Merck 製) 中 4°C で 2 時間固定を行はる。通常はヨリ冷エタノール系で脱水後、プロピレノキシド（石津製薬社製）に浸透させ ⁽³⁴⁾ Luft 法にヨリエボキシ樹脂（大府商事）包埋したものと 37°C , 45°C ならびに 60°C の恒温器中で順次各 20 時間ずつ加熱重合した。

HPA 細胞は次の様に処理した。すなはち 90 mm 径ペトリ皿の上に 8 オンス培養用ビンにて 34°C , 37°C あるいは 38.5°C で 3 日間培養することにより形成された單層培養細胞をリン酸緩衝液 2% グルタールアルデヒド溶液にて 1 時間固定後、ラバーホリスマント用にて細胞を採取し $200 \times g$, 5 分間遠沈した。その後、前述した腫瘍組織と同様の過程とへてエボキシ樹脂包埋した。包埋ブロックは LKB 製ウルトラトーム (ultratome) で $600 \sim 800 \text{ \AA}$ の超薄切片を作製し、4% 酢酸ウラニル ⁽³⁵⁾ ならびに水酸

化金³⁶⁾の二重染色を施した。

培養液中カラーラス粒子の觀察は次の様に行なった。すなわち精製カラーラス標本をコロジオニ膜にカーボン蒸着した銅メッシュ上に滴下したうち室温にて乾燥後2%リンタングス・テン酸(PH 7.2)にて3分間染色した。

觀察には日立電子顕微鏡HU-12 A型を用い、直接倍率1,500倍～60,000倍で觀察し、写真撮影には富士電子顕微鏡フィルムFGを使用した。

11) 单層培養細胞の染色体分析法

HPA細胞の染色体標本は Rothfels⁽²³⁾ らの変法により作製した。すなわち HPA細胞を増殖培養液に 10×10^4 個/mlの割合に浮遊したものを 5 ml をカバー グラスを入れた 60mm 径ヘトリ皿にて 37°C で 2 日間培養した後、培養液中に最終濃度 10^{-6} M となる様に調整したユルヒテン(石津製薬社製)溶液を加えた。ユルヒテン処理 2 時間後、培養液を捨て 0.7% 生理食塩水中で 1 分間、次に 0.5% 生理食塩水中で 1 分間低張液処理を行はし、さらに 0.2% 生理食塩水中

で20分間脱脂処理を行なつた。この標本の固定は蒸留水で $1/100$ に希釈したカルノア溶液（メチルアルコール3容量と冰酛酸1容量の混合液）で1分間、次に $1/10$ に希釈したカルノア液で1分間、さらにカルノア原液で20分間固定を行なつた。この標本は室温にて乾燥させたのち 10% ギムザ溶液で20分間染色を行ない、空気中で乾燥させたのちカナグバルサムで封入した。観察には日本光学社製生物顕微鏡E型を用い、100倍油浸レンズを使用して1000倍に拡大し分裂中期の染色体を写真撮影し分析を行なつた。

実験結果

1) 実験に使用した唾液腺の形態学的性質

ヒト口蓋小唾液腺に発生した~~肉形性腫瘍~~を摘去後、その腫瘍組織の約 $2/3$ を組織培養するため採取した。この採取した組織を一端より病理組織標本を作製し、観察した。

その組織像は全体的に粘液腫様部分の多い唾液腺多形性腺腫であつた。すなわちエオジンに淡染する分泌物様物質ヒアリン様構造を呈する多くの間質組織に囲まれて、橢円形あるいは紡錘形の上皮細胞が集団を形成して(図1),またこれらの中皮細胞は徐々に索状配列を示し、粘液腫様の間質部へ移行していく。この切片には骨及び軟骨様組織の形成は見られなかつた。又しに、二二で得られた組織標本について悪性像を示す部位を検索したが、その様子は見られなかつた。

さうに採取した組織を電子顕微鏡にて観察した結果、二の腫瘍は2種類の細胞から成り立つてゐることがわかつた。すなわち、その一つは筋上皮細胞に類似した細胞である。核は円形あるいは橢円形を呈し、約80 \AA 径の微細線維(microfibril)が核周囲から細胞質全体に散在し(図10-a),その配列は一般に核膜に平行して走行するが、細胞膜附近で一部、細胞膜に垂直に走る部分も見られた。細胞質

りボリューム (free ribosome) は全くなく、糸粒体 (mitochondria)、粗面小胞体は細胞質周辺部に局在していく。この形態を呈する一部の細胞には発達した Golgi 装置が見られる。

もう一つの細胞は分布在導管上皮細胞に由来した細胞と思われる。すなわちこの細胞は不規則な橢円形を呈し、核以外の細胞形態に類似していく。細胞質内には鮮明な限界膜を有する約 0.8μ 大の顆粒を持ち、粗面小胞体、mitochondria、小胞体、free ribosome は細胞質全体に散在していく (図 10-b)。また細胞膜の導管部細胞特有の層状に嵌合した細胞膜 (basal infolded membrane) の形態を残していく。

また間質部には半透明物質から成ると思われる画構造物質、微細粒子あるいは微細線維 (コラーゲン線維) が見られる。

2) 多形性腺腫由来の培養細胞の形態とその動態

この唾液腺由来の多形腺癌組織より得た培養細胞 (HPA 細胞) は細代数10代までは多角形の細胞と紡錘形の細胞が混在していくが、さらに細代を重ねると巨細胞が数多く見られるようになり、ついで細胞細代数20代を過ぎるとほとんど多角形の細胞形態を示す上皮様細胞で統一され、その单層培養細胞は敷石状配列を示す (図2)。

この HPA 細胞を電子顕微鏡にて観察すると培養細代数初期においては3種類の細胞が混在していく。1つは筋上皮細胞に類似した細胞で、細胞膜内には約80Å径の微細線維を豊富に有し、リボソーム、小胞体、mitochondriaを含む短紡錘形の細胞である (図11-a)。ほかにこの細胞は細代数15代ごろで見られなくなる。

もう1つの細胞はその細胞膜内に分泌顆粒を有し (図11-b)、培養細代初期では短紡錘形の单純な細胞形態を有し、橢円形の核の細胞

中央部に位置して、大型細胞構成歯を備え、
細胞形態は多角形に近く、核膜やや偏位
の傾向を示した。細胞質には $0.5 \sim 1 \mu\text{m}$ 大の粒胞
様の顆粒を有し粗面小胞体、mitochondria
は細胞質全体に散在していた。またこの細胞
では著明に発達したゴルジ装置が核周辺部に
局在していた。

さらにもう1つの細胞は前述した2種類の
細胞形態を有するいわゆる合の子細胞であ
った(図12a,b)。すなわち細胞質内に 80 \AA 径の
微細線維を有するとともに著明に発達したゴ
ルジ装置と分段顆粒を保有する細胞であ、
この細胞構成歯を重ねると、この合の子細胞の表
面成著明に増加した。また微細絨毛(microvilli)
が徐々に発達し複雑な多角形の細胞形態を示
すとともに一部の細胞には細胞膜付近に約 150
 \AA の線維の出現が見られ、また二つの細
胞の隣接細胞間の結合部には接着斑(desmosome)
、閉鎖小帶(tight junction)が見られた。

3) HPA 細胞におけるヒト唾液成分の產生

HPA 細胞は上皮様形態を示すとともに分泌顆粒を保有するなど唾液腺細胞としての形態を有しているが、機能的にも唾液腺腫瘍由来の細胞としての特性を有しているか否かを検索するため、抗ヒト全唾液家兔抗血清を用いて間接蛍光抗体法により、HPA 細胞のヒト唾液成分の存在の有無を調べた。その結果、図4-a に示すごとく HPA 細胞の細胞質にその特異蛍光を認めた。なお対照として使用したヒト腺様細胞癌、乳児口唇部組織より得た初代培養細胞（形態的に線維芽細胞）ならびに HeLa 細胞では全くその特異蛍光は認められなかつた。以上より実験結果より、HPA 細胞にはヒト唾液成分が存在していることが確認された。

次に HPA 細胞に存在する唾液成分はこの細胞の遺伝子情報をより産出されてからか否かを確認するため、以下に述べるごとくアクチノマイシン D (Actinomycin D, ACD) で処理した細胞についても上記と同様の実験を行つた。

50×10^4 份の HPA 細胞をカバーガラスを入れた
60mm 径ペトリ皿にて 37°C で 2 日間培養したの
ち、形成された単層培養細胞を増殖培養液で
種々の濃度に調整した ACD (Sigma chemical Co., St.
Louis U.S.A.) により 37°C にて 18 時間処理した。

この ACD 処理 HPA 細胞について上記の用法
・ 光抗体法を行ひた。その結果、表 1 に示し
た様に $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度の ACD で処理した HPA
細胞ではその特異蛍光を認めることができなか
った。なお同様に ACD で処理した HPA 細胞
を蛍光抗体法施行時にニグロシンにて染色す
ることにより生細胞数を算定した結果、 $3\mu\text{g}/\text{ml}$
の濃度では 32×10^4 份の細胞が生存していた。
なお未処理単層培養の生細胞数は 70×10^4 份で
あつた。

これらの実験結果より、HPA 細胞はヒト唾
液成分を産出する機能を保有していることが
示唆された。

4) HPA 細胞の軟葉天中でのコロニー形成能
HPA 細胞の transformation の有無を検索する

ため、軟寒天培養液中のコロニー形成能を調べた。その結果、表2に示した如く細胞継代数5代目からびべく9代目までHPA細胞を34°Cの軟寒天培養液中で培養すると各々15.7%, 22.8%の細胞がコロニーを形成した。一方、37°Cで培養すると5代目で1.9%, 9代目で5.6%の細胞がコロニー形成能を有していた。すなわちHPA細胞は34°Cの培養温度では比較的高いコロニー形成能を示すが、培養温度を高くするとことによってコロニー形成率は飛躍的に減少することが示された。なお軟寒天中に形成されたHPA細胞のコロニーの形態は図5に示す如くであつた。

34°Cからびべく37°Cと培養温度条件を変化させてみると、HPA細胞は異なり、たゞコロニー形成能を示したことは培養温度の変化によつて細胞の増殖率が異つてゐる可能性もあるので、30mm径ペトリ皿に 60×10^4 個のHPA細胞を入れ、34°Cあるいは37°Cで培養し経時的にその細胞数を算定した。図6に示した様に

培養温度 34°C , 37°C を変化させても細胞の増殖速度には差を認めず、両者共培養4日目で細胞数は約4倍に達した。

5) HPA 細胞における C型腫瘍ウイルスの発現

HPA 細胞には transform した細胞が存在していることはこの細胞が軟骨天でコロニーを形成することから明らかになったが、この細胞の transformation の代償を解釈する一つの手段として、C型腫瘍ウイルスの存在の有無について検索した。HPA 細胞を 7 日間、 37°C にて培養した培養上清 500 ml を シリカ 1 ml にて ウイルス 標品を得、そのウイルス標品を 蔗糖密度勾配法 により分画すると浮遊密度 1.17g/cm^3 の時に C型ウイルス粒子の存在を電子顕微鏡による観察で確認した(図 13-a)。この分画を精製ウイルス標品として逆転写酵素活性を測定した。表 3 に示した様に、ウイルスタンパク量 $5.3\mu\text{g}$ を用いて 37°C で 1 時間反応させたのち、酸不溶性部分への $^{3}\text{H-TMP}$ の取り率を検索

すると、3056 cpm の値を示した。また酵型 DNA として $10\mu\text{g}$ の DNA を反応基質に加え、DNA 依存性 DNA 合成酵素活性も同時に測定した結果、精製したウイルス粒子が同酵素の高い活性を保有していることを認めた。さりにこの逆転写酵素の酵型としてウイルスの RNA が切ってあることを確認するため、反応基質にウイルス標品と Triton X 404 に RNase (0.1 mg) を加え、 0°C にて 1 時間反応させた後、逆転写酵素活性を測定した。その結果、酸不溶性画分への $^3\text{H-TMP}$ の取り込みは 701 cpm であり、RNase 未処理群と比較して約 1/4 に低下した。

これらのことから、HPA 細胞に存在する C 型ウイルスの逆転写酵素活性は、404 に DNA 依存性 DNA 合成酵素活性を保有し、このウイルスの RNA が逆転写酵素活性の酵型として切ってあることが明らかとなり、また 34°C にて HPA 細胞を培養した培養上清についても同様の実験を行な、た結果、培養上清中のウイル

又量りびにその酵素活性の値は、37°C のものと比較して差を認めなかつた。

この様に HPA 細胞には逆転写酵素活性を有する C 型ウイルスの発現が確認されたので、HPA 細胞を電子顕微鏡にて検索した。その結果、HPA 細胞の細胞質りびに細胞間に二重膜構造を有し、その中央に均一な核 (core) を持つ 110 μ 大の C 型ウイルス粒子 (図 13-b) の存在を認めた。

6) HPA 細胞におけるサイトメガロウイルスの持続感染

HPA 細胞は 34°C あるいは 37°C で軟寒天上でウロニー形成能に相異を示さないが、両者の温度で培養した HPA 細胞の C 型ウイルス粒子の産生量には相異を示さない。ところが 34°C にて培養した HPA 細胞では、前述の C 型ウイルス粒子とは形態を全く異にするヘルペス型のウイルス粒子が多数存在していることを認めた。このウイルス粒子は顆粒状の核 (core) と外膜 (envelop) が暈状 (halo 状) の形

態を示す 90-120 μm 大の粒子（図14）で、形態的に唾液腺ウイルスであるサイトメガロウイルス（Cytomegalovirus, CMV）粒子に類似していくので、CMV 抗原を検索した。すなわち 34°C にて培養した HPA 細胞を凍結、融解を 3 回繰返したもののは上清について CMV の補体結合（Complement Fixation, CF）抗原を CMV に対する CF 抗体を保有するヒト妊娠血清を用いて検討した。その結果、4 倍の抗体価を有する標準抗血清に対し、HPA 細胞から上記の様に調整した標品は 128 倍の CF 抗原価値を有していくので、このヘルペス型ウイルス粒子は CMV 粒子であることが示唆された。またこの CMV 粒子は 37°C で培養した HPA 細胞について電子顕微鏡で見られなかった。さらに 38.5°C で培養した HPA 細胞の CMV の CF 抗原価値は 34°C のものに比較して 16 倍に低下した。

これらの実験結果から、CMV が HPA 細胞に持続感染しており、その CMV の増殖は温度依存性であることが判明した。

HPA 細胞には CMV が持続感染しているので、この单層培養細胞での他のヘルペスウイルス群の1つとして Herpes simplex virus (HSV-I) の感應性とプラック形成能を示標として検討した。その結果、対照として使用した FL 单層培養細胞では、 1.46×10^5 pfu/ml のカ価を示す HSV-I ウィルス標品を用いても HPA 細胞では全くそのプラックの形成を認めることはできなかった。この実験結果から、HSV-I の増殖は HPA 細胞において干渉されていることが示唆された。

② HPA 細胞のインターフェロン様物質の産生

HPA 細胞には C 型ウイルスに由来して CMV が持続感染していることを述べた。一般にウイルス感染により宿主細胞より産生されるインターフェロン (IF) が HPA 細胞でも産生されていると考えられる。そこで HPA 細胞の培養液について IF 様物質の存在の有無について検討した。

先ず IF によりその増殖が非常によく阻害さ

れることが知られていて Vesicular stomatitis virus (VSV)²⁸⁾を用いて、HPA 单層培養細胞でのアラツク形成能を調べた。その結果、表5に示す様に継代数28代目の HPA 細胞での对照として用いた FL 单層培養細胞では 1.45×10^3 pfu/ml の力値を示す VSV 標品を用いても全くアラツクの形成を認めなかつたが、39代目の HPA 細胞では FL 单層培養細胞では VSV の感受性にはほとんど差を認めなかつた。

これらの実験結果から少なくとも HPA 細胞28代目までは IF 様物質が産生されていることが示唆されたので、HPA 細胞の培養液を調整して IF 様標品が FL 单層培養細胞を処理し VSV の感受性を検討した。表6に示す様に、34°C までは 37°C での HPA 細胞培養液中の对照と比べて VSV のアラツク形成率を各々 85.3%, 75.5% へ抑制する物質が存在することが明らかとなつた。以上の実験事実から、細胞継代数28代目の HPA 細胞が IF 様物質を産出してゐることが示唆された。

8) 軟寒天中で形成されたユロニー由来する細胞の生物学的性状

HPA 細胞には逆転写酵素活性を有する C 型腫瘍ウイルスが発現して、また形態学的 3 種の細胞が存在していることが確認された。故に *in vitro* について transform した細胞が有する軟寒天培養液中のユロニー形成能を利用して HPA 細胞のクローン化を行はし、そのクローンについて生物学的性状を解析した。⁴³⁾ すなわち HPA 細胞のクローン化は次の様に行はれ。 HPA 細胞、継代数 5 番目で軟寒天培養液中で形成されたユロニーをパスツューラビットで採取して。この細胞塊はピペッチャングにより單一細胞といふのち、30mm � 径でトリ皿にまき、3 ml の増殖培養液中で 20 日間培養して主たる細胞を EDTA-トリプシン処理により採取し継代培養を行はれ。 4 つから 1 ローンとして 3 枚の細胞を確立し以下の検索を行はれ。

親株細胞である HPA 細胞は多角形の上皮様

細胞形態をとつていて、そこからクローニングして得た3株の細胞は、全てチャート型の星状細胞様形態を示し、細胞突起が著明に認められた（図7）。このクローニングした細胞を電子顕微鏡にて観察すると、3株とも前述の合の子の形態（図15）を呈していただ。すなはち細胞質内に約80Å程度の微細線維を有するとともに、急速の多様なGolgi装置と粘液様の分泌顆粒を有する細胞であつた。この細胞は細胞総代数を重ねると核は幾分偏位の傾向を示し、また細胞質近縁部には約150Å程度の線維の出現が見られた。また一部の細胞集団の腺腔を形成するかの様に配列し、その下接接細胞との接合部には接着板が見られ、腺腔側の細胞膜には微細絨毛が観察された。

さらにこれら3株の細胞にも腫瘍成分の產生を認めるとともに、C型腫瘍ウイルスならびにサイトメガロウイルス粒子の存在を確認하였다。

考 索

ヒト唾液腺由來の多形腺腫組織と組織培養し、得られた細胞の生物学的活性を解析しようとする試験は従来より行なわれてきた。すなわち Kondo¹¹⁾ らはヒト多形性腺腫より Nagoya-78 と名づけられた株化細胞を確立し、その細胞の形態学的検索により上皮細胞に特有の desmosome 結合を有することを認め、さらにこの細胞をハムスターの頸嚢下腫種することにより腫瘍が形成されたので、Nagoya-78 細胞は多形腺腫由來の腫瘍細胞であるとともにその細胞の発生学基は上皮細胞であると述べている。また多形性腺腫の有する特徴的な生物学性の一つとして、ヒコ多糖類の産生はよく知られている事^{40, 41)} が知られるが、Takeuchi¹²⁾ らはその多糖類組成比を 5 例の摘出組織について解析するとともに、それらの腫瘍組織から得た培養細胞でも各々の母組織と類似した組成比を有するヒコ多糖類の産生を認め⁴²⁾ た。さらにこれらを培養細胞を sponge matrix⁴³⁾ を使用して培養するとその細

胞培養の三次元的構造が母組織の構造に類似していることから、組織培養を行なうことにより得た細胞はそれが他の多形性腺腫の腫瘍細胞に由来したものであることを示唆している。しかしこれらすでに報告されている実験結果からは、*in vitro* でそれが他の細胞が transform している可能性を間接的に推測しうるにすぎない。そこで、多形性腺腫由来の HPA 細胞が transform して いるか否かを *in vitro* において検討した。一般に transform している細胞は軟寒天中でも増殖し、コロニーを形成することはよく知られ、この現象は細胞の transformation のマーカーの 1 つとして重要なものである。この実験手技を利用して、HPA 細胞の軟寒天培養液中でのコロニー形成能について検索した。その結果、HPA 細胞（継代 5 代目のもの）では 15.7% の細胞にコロニー形成能を有することから、この細胞が *in vitro* において transform していることを認めるとともに多形性腺腫由来の腫瘍細胞であることを強く示唆している。

唾液腺の多形性腺腫の腫瘍組織は病理組織学的に上皮性細胞成分と間葉性成分により構成されている。その成分の割合は種々であり、上皮細胞は腺管状、円柱腫状、充実性あるいは腺房状の胞巣を作り、また間質部は粘液腫様、線維腫様また軟骨腫様組織が認められるなど、その組織像は多種多様である。故にこの腫瘍の組織由来について多くの検討が加えられてきたが、現在ではこの腫瘍は上皮性細胞由来するという考え方⁴⁻¹⁴⁾が一般的である。すなわち、唾液腺組織を構成している細胞成分の1つである筋上皮細胞は軟骨組織をも含めた間葉性組織を誘導しうる multipotential な活性を保有していることが Doyle⁸⁾ らにより報告されている。さらに Mylius⁹⁾ らは多形性腺腫の筋上皮細胞が多量に存在する少粒部導管上皮細胞から形態学的研究から示唆しており、また Chisholm¹⁰⁾ らは正常唾液腺組織と多形性腺腫組織に存在する細胞種の割合を比較して、腫瘍組織内に少導管上皮細胞の割合が圧倒的

に増加することから、ニウ腫瘍の導管上皮細胞から発生することを示唆している。著者も5例の口蓋小唾液腺部に生じた多形性腺腫組織を電子顕微鏡にて観察した結果、組織像としてニウ腫瘍は多形性を示しているが、超微構造のレベルではニウ腫瘍組織を構成している細胞は2種類であることを認めた。すなわち筋上皮細胞と今在部導管上皮細胞である。

二水らの報告をもって、この実験結果に加えて、著者の実験成績より、HPA細胞も外胚葉原基に由来する細胞であると考えられる。すなわち HPA細胞は多角形の細胞が歯石状に配列する上皮様細胞であり、上皮細胞に特有の接着板結合部が見られる。さらに細胞質内に分泌顆粒を有し膜構造の飛逸も多く、形態的に分泌細胞を有する上皮細胞の特性を示した。

すでに唾液腺以外の臓器から上皮細胞を *in vitro* にて確立し、その生物学的性質を解析しようとする試みの肝臓、脾臓、甲状腺ある。

は絨毛上皮細胞に発達した腫瘍で行はれて
いる。これらの腫瘍より分離された細胞はそ
れぞれ時有する物質の産生があり肝細胞であれ
ばアルブミン^{46, 47)}、 α -fetoprotein⁴⁸⁾、肺細胞では不
ンシユリン⁴⁹⁾、絨毛上皮腫細胞ではゴナドトロ
ビン⁵⁰⁾が産生が報告されており in vitro において
これらの産生された物質を同定するが上皮細
胞であることを確認する重要な手段となるで
いる。

故に HPA 細胞につてもこの細胞がヒト唾
液腺多形腺腫より分離されたので、HPA 細胞
のヒト唾液成分産生能の有無につけて検討し
た。抗ヒト唾液家畜血清を用いて免疫染
色法によりその抗原を HPA 細胞につけて検索し
た結果、HPA 細胞の細胞質には特異蛍光を認
めたにもかかわらず対照として用いたヒト由
來の培養細胞で全くその蛍光を認めないこと
、HPA 細胞をアクトリマイシンで処理する
ことによりその蛍光が消失すること、さらに
細胞質内に分泌顆粒を保有していることから

HPA 細胞は唾液腺上皮細胞であることを同定された。なお用いた抗血清は抗ヒト全唾液腺
児血清であるため HPA 細胞の細胞膜で特異反
応を示したが何であるかは断定できなか
った。また HPA 細胞にはアミラーゼの産生能
は保有していないかった。

HPA 細胞を分離した同一の多形腺腫組織を
トリプシン処理することにより初代培養を行
なうと、線維芽細胞の増殖が増殖し上皮細胞は得
られなかつた。Jensen⁵¹⁾ も組織をトリプシン
処理すると、上皮様細胞の損傷が線維芽細胞の
それと比較して大きいことを指摘している
ので唾液腺腫より上皮細胞を分離する場合も
トリプシン処理を行わなければ、いわゆる explant
outgrowth method を利用する方がより適した手
法であると考らわれるので、培養法
を利用して唾液腺上皮細胞を分離したという
報告はない。ヒト腺様嚢胞癌 3 例につけても、上
皮細胞の分離を目的として組織培養した。そ
の結果、線維芽細胞(図 3)の増殖し上

皮細胞は得られなかつた。すなわちその細胞は形態的に線維芽細胞であるとともに唾液腺生能を保有せず、また軟嚢天中でのコロニー形成能を有する細胞の存在しなかつた。まことにトリプシン処理をやむを得場合でも、全く線維芽細胞のが増殖せぬ。この実験結果から、explant outgrowth method を利用して唾液腺腫瘍から上皮細胞を分離する場合でも実験手技的に問題があり、その母組織の有する生物学的特性により大きく左右されることが示唆してゐる。

HPA 細胞には transform した細胞が存在してゐることは先に述べたが、この細胞の電子顕微鏡による形態学的研究を行なう過程で、2種類のウイルス粒子の存在を認めた。その1つは形態学的にはC型腫瘍ウイルス粒子であつた。さしにそのC型腫瘍ウイルスが逆転写酵素活性を保有していることも確認した。一般に transform している細胞には逆転写酵素活性を有する C型様腫瘍ウイルスが存在することが

52-56)

現在まで多數報告されていふことを考へると、
HPA 細胞においても viral transformation の可能
性を強く示唆していふものと考えられる。

また他のウイルス粒子としてサルメガロ
ウイルス (CMV) の存在を確認した。CMV は從
来、唾液腺ウイルスと呼ばれ非常に高い頻度
で唾液腺上皮細胞に潜伏していふウイルスで
ある。^{57,58)} 唾液腺腫瘍由來の HPA 細胞にも CMV が
持続感染し、その発現が温度依存性であるこ
とは CMV の補体結合反応ならびに電子顕微鏡
による観察から確認された。さうに HPA 細胞
の軟骨天牛コロニー形成能は温度依存性
であることから、CMV も transformation の調節機
構に付いていふことが強く示唆されて。すな
わち HPA 細胞に持続感染していふ CMV もまた
transforming gene あるいは細胞の transformation
の維持に必要な遺伝子を保有し、34°C ではそ
の遺伝子が発現され、C型ウイルスと協調して
HPA 細胞の transformation が発現していふかも
知れない。現在、ヒト CMV の発現性について

は不明な点が多いが、一方には白血病の原因ウ
イルスではないかと考えられていて、すなわ
ち Stulberg⁵⁹⁾ とまた Diosi^{60, 61)} は CMV がしばしばヒ
ト白血球に潜伏感染してると報告し、Hanshon⁶²⁾
らは CMV が Epstein-Barr ウィルス (EBV) との重
感染により伝染性单核球症 (infectious mononucleosis
) が発症した場合、白血病を進行する割合が
高いと報告している。さらに小児白血病患者有
るには免疫能が低下した白血病患者に CMV
巨細胞封入体 (Cytomegalic inclusion body) がしば
しば出現し、そこからウイルスを分離したと
報告されている。さらに Albrecht⁶³⁾ と Rapp⁶⁴⁾ はヒ
ト CMV でハムスター胎児由来の線維芽細胞⁶⁵⁾
transform させたと報告している。Cunningham⁶⁶⁾ は
はマウス CMV をマウス唾液腺に接種するとヒ
トより唾液腺腫瘍を観察述べていて、以上の
すべてに報告された実験結果より CMV もまた癌
に関与していることは強く示唆されるが、
HPA 細胞の CMV の transformation の関与の有無
を解析する好適な実験系(?)を得ると考えう

れる。また CMV の HPA 細胞の transformation の
関手とすることについては軟寒天中で形成さ
れたコロニーをクローニングした実験からも
示唆される。すなわちクローニング細胞は全て筋
上皮細胞と分在する導管上皮細胞との超微構造
を共存した合の子形態を示して。CMV には細
胞融合能が存在することはすでに知られて事
実である⁶⁶⁾ので上記した 2 種の細胞を in vitro で
て細胞増殖を重ねる過程で融合したと云う可
能性が考えられる。このことは HPA 細胞の細
胞増殖を重ねるに従い、合の子細胞が増加していく
とまた細胞増殖数 30 番目の HPA 細胞の染色体
数は 83 にピークを有する分布を示しており(図 8, 図 9) ヒト染色体数(46)の 2 倍の値に
近づいていることからも示唆される。

また筋上皮細胞と導管上皮細胞との構造を
共存する合の子細胞に相似した細胞は in vivo
においても観察され、その生物学的意義たり
びにその細胞の分化過程について論議がなさ
れている。すなわち Kierszenbaum¹²⁾ は transitional

cell, 吉田は中间型細胞と名づけ, 上記の二者の細胞が分化過程において互々に移行することを示唆している。著者も *in vitro* にて transform してある細胞がこの名の子細胞であることを確認したので, 今後, *in vivo* における名の子細胞の本態の意義を細胞分化過程を考慮した上でより検索する必要があると有る。

結 語

ヒト口蓋小唾液腺部に発生した唾液腺多形性腺腫組織を組織培養することにより *in vitro* にて transform してある細胞を得ることがでたので, 分離した細胞を HPA 細胞と名づけ, その生物学的特性を解析した。HPA 单層培養細胞は多角形の細胞が數石状に配列する上皮様細胞であり, 超微構造的には 3 種類の細胞が見られた。1 つは前上皮細胞に類似した細胞で, 他の発達の高い膜構造と分泌顆粒を有する細胞であり, これらに上記二者の細胞形態を共存する“いわゆる名の子細胞”である。ニ

これらの中の細胞は細胞を重ねると他の正常細胞の割合が著明に増加した。またこれらの細胞の隣接細胞との間に接着板結合が見られた。

HPA 細胞が唾液腺生細胞を保有していることと既ヒト唾液腺乳血清を用いて、間接蛍光抗体法で確認した。以上の二つより HPA 細胞は唾液腺由来の上皮細胞であることが明らかとなつた。

HPA 細胞には逆転写酵素活性を有する C型腫瘍ウイルスが発現している。この事実はこのウイルス遺伝子が HPA 細胞の transformation の発現にかかっており維持の機構に関与していることを示唆している。

また HPA 細胞に持続感染しているサイトメガロウイルスの増殖、なれば HPA 細胞の軟骨天牛でのコロニー形成能のともに温度依存性であるという事実から CMV 遺伝子もまた HPA 細胞の transformation の発現調節機構に関与していることも示唆される。

稿を終えるにあたり、本研究課題を手立ち
れど指導を賜った宮崎 正樹教授、本研究の実
施に際し、終始からゆき指導をいたばく大
口腔外科学第一講座佐藤光信博士に心から謝
意を表します。ジ校閲をいたばく大口腔細胞
学講座小谷尚三教授、口腔病理学講座八木俊
雄教授、生化学講座鈴木不二男助教授並びに
口腔外科学第一講座作用正義助教授へ深謝致
します。また研究の円滑な進展のために特別
の御配慮をいたばく大口腔外科学第一講座の
教室員の々々に深謝致します。ながくの研究
の実施にあたり、抗ヒト全唾液アーグロブリン
を供与された広島大学医学部口腔細胞学講座
福井良雄博士、CMVに対する抗血清を供与さ
れて大阪府立公衆衛生研究所高須質一医学士
へ併せて感謝の意を表します。

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE EPITHELIAL CELLS
DERIVED FROM HUMAN PLEOMORPHIC ADENOMA

Kanemitsu SHIRASUNA

The first Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Osaka University Dental School, 32, joan-cho, kita-ku,
Osaka, Japan

The study presented in this paper is designed to investigate the biological properties of the cells isolated from the human pleomorphic adenoma which occurred in minor salivary gland in the palate.

This tumor was cultured by employing explant outgrowth method and the cells isolated were designated as HPA cells.

Since HPA cells had a epithelioid type in shape, they were examined for the fine ultrastructures. Consequently, myoepithelial like cell as well as ductal like cell was demonstrated to be in HPA cell cultures. In addition, the morphological hybrid cell accompanying both ultrastructures of the above cells were found. The desmosomes were observed in the adjacent cytoplasmic membrane, indicating that these cells are epithelial cells in origin. Moreover, HPA cells were found to produce the human salivary components.

When HPA cells were test for transformation by using soft agar method, 15.7 % of the 5th passaged cells cultuerd at 34°C formed the colonies whereas the same cells cultured at 37°C exhibited 1.9 % of colony forming ability. These cells showed almost same growth rate at both temperatures. From these findings, it is indicated that the expression of transformation in HPA cells is temperature-sensitive.

In order to understand the mechanism of transformation of HPA cells, they were searched for an oncogenic virus as a possible agent. As a consequence, C type virus particles carrying reverse transcriptase and DNA dependent DNA polymerase activities were found in these cells. Moreover, cytomegalovirus particles also were observed and they were temperature-sensitive, unable to replicate at 38.5°C but not at 34°C.

From the data presented in this paper, let us to suggest that the expression of C type virus genome results in the transformation of HPA cells and that CMV functions as a regulator of the maintenance of the transformation.

参考文献

- 1) Willis,R.A. (1967): Pathology of tumor. 4th ed. Butterworth (London), 319-344
- 2) Eneroeth,C.M. (1966): Classification of parotid tumours. Proc. Roy. Soc. Med. 59, 429-431.
- 3) Chaudhry,A.P., Vickers,R.A., and Gorlin,R.J.(1961): Intraoral minor salivary gland tumors. An analysis of 1414 cases. Oral Surg., 14, 1194-1226.
- 4) Hubner, G. (1971): Role of myoepithelial cells in the development on salivary gland tumors. Cancer, 27, 1255-1261.
- 5) Azzopardi,J.G., and Smith,A. (1959): Salivary gland tumors. J. Pathol. Bacterial., 77, 131-140.
- 6) Welsh,R.A., and Meyer,A.T. (1968): Mixed tumors of human salivary gland. Arch. Path., 85, 433-448.
- 7) Ludwig,M.D., and Cyril,T. (1969): Mixed tumor of the parotid gland. Cancer, 24, 174-184.
- 8) Doyle,L.E., Lynn,J.A., Panopio,I.T., and Crass,G. (1968): Ultrastructure of the chondroid regions of benign mixed tumor of salivary gland. Cancer, 22, 225-233.
- 9) Mylius,E.A. (1960): The identification and the role of the myoepithelial cell in salivary gland tumours. Acta Pathol. Microbiol. (Suppl.139), 1-59.
- 10) Chisholm,D.M., Waterhouse, J.P., Kraucunas,E., and Sciubba, J.J. (1974): A quantitative ultrastructural study of the pleomorphic adenoma of human minor salivary glands. Cancer, 34, 1631-1641.
- 11) Kondo, T., Muragishi, H., and Imaizumi,M.(1971): A cell line from a human salivary gland mixed tumor. Cancer, 27, 403-410.

- 12) Kierzenbaum,A.L.(1968): The ultrastructure of human mixed salivary tumors. *Lab.Invest.* 18,391-396.
- 13) Takeuchi,J.,Sobue, M.,Yoshida,M.,Esaki,T.,and Katoh,. (1975): Pleomorphic adenoma of salivary gland,with special reference to histochemical and electron microscopic studies and biochemical analysis of glycosaminoglycans in vivo and in vitro. *Cancer*, 36,225-238.
- 14) 吉田正彦 (1975): 多形腺腫の病理学的研究.
癌大叢書, 13巻, 3号. 332-342.
- 15) Beahrs,O.H.,Woolner,L.B.,Kirklin,J.W.,and Devine,K.D. (1957): Carcinomatous transformation of mixed tumors of the parotid gland.*Arch.Surg.* (Chic.) 75,605-614.
- 16) Ackerman,L.V.,and del Regato,J.A.(1962): *Cancer.* Diagnosis,Treatment and Prognosis.3rd ed.C.V.Mosby Company, St.Louis.
- 17) Eneroth,C.M.,Blanck,C., and Jakobsson,P.A.(1968): Carcinoma in pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Acta Otolaryng.* (Stockh). 66,477-482.
- 18) Moberger,J.G.,and Eneroth,C.(1968): Malignant mixed tumor of the major salivary glands; special reference to the histologic structure in metastasis. *Cancer*, 21,1198-1211.
- 19) Eneroth,C.M., and Zetterberg,A.(1974): Malignancy in pleomorphic adenoma. *Acta Otolaryng.*, 77,426-432.
- 20) Foote,F.W.Jr.,and Frazell,E.L.(1953) Tumor of the major salivary glands. *Cancer*, 6,1065-1133.

- 21) 馬場謙介, 鶴津玲雄, 海老原敏, 小野勇,
下里幸雄, 竹田千星 (1973): 喘嗽眼腫瘍一例の
組織像と予後一. 癌の臨床, 第19卷, 第4号,
893-910.
- 22) Eagle,H.(1959): Amino acid metabolism in mammalian
cell cultures. Science 130,432-437.
- 23) Gay,G.,Coffman,W.,and Kubiceck,M.(1952): Tissue culture
studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma
and normal epithelium. Cancer Res. 12,264-265.
- 24) Vaheri,A.,Sedwick,W.D.,Plotkin,S.A.,and Maes,R.(1965):
Cytopathic effect of rubella virus in BHK21 cells and growth
to high titers in suspension culture. Virol. 27,239-241.
- 25) Macpherson,I., and Stoker,M.(1962): Agar suspension
culture for selective assay of cells transformed by polyoma
virus. Virol. 23,291-294.
- 26) Nii,S.,and Kamahora,J.(1961): Studies on the growth
of a newly isolated herpes simplex virus in vitro. Biken
J. 4,75-96.
- 27) Fogh,J., and Lund,D.O.(1957): Continuous cultivation
of Epithelial cell strain(FL) from Human amniotic membrane.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 94,532-537.
- 28) Wagner,R.R., and Huang,A. (1960) : Inhibition of RNA
and interferon synthesis in Kreb-2 cells infected with
vesicular stomatitis virus. Virol. 28, 1-10.
- 29) Dulbecco,R., and Vogt,M. (1954) : Plaque formation
and isolation of pure-lines with poliomyelitis viruses.
J.Exp. Med. 99, 167-182.

- 4
- 30) Green, M., Rokutanda, M., Fujinaga, K., Ray, R.K., Rokutanda, H., and Gurgo, C. (1970): Mechanism of carcinogenesis by RNA tumor viruses. I. An RNA-dependent DNA polymerase in murine sarcoma viruses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 385-393.
- 31) Bray, G.A. (1960): A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* 1, 279-284.
- 32) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 33) Sakatini, D.D., Bensch, K., and Barrnet, S.J. (1963): Cytochemistry and electron microscopy, The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* 17, 19-58.
- 34) Luft, J.H. (1961): Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophy. Biochem. Cytol.* 9, 409-414.
- 35) Watson, M.L. (1958): Staining of tissue section for electron microscopy with Heavy Metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 475-478.
- 36) Millonig, G. (1961): A modified procedure for lead staining of thin section. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11, 736-739.
- 37) Rothfels, K.H., and Siminovitch, L. (1958): An air-drying technique for flattening chromosome in mammalian cells growth in vitro. *Stain Technol.* 33, 73-75.
- 38) Klemola, E., and Kääräinen L. (1965): Cytomegalovirus as a possible cause of a disease resembling infectious mononucleosis. *Brit. med. J.* 2, 1099-1102.
- 39) Sato, M., Yamada, T., Yamamoto, K., and Yamamoto, N. (1976): Evidence for hybrid formation between rubella virus and a latent virus of BHK21/WI-2 cells. *Virol.* 69, 691-699.

- 40) Azzopardi,J.G.,and Smith,O.D.(1959): Salivary gland tumours and their mucins. *J.Pathol.Bacteriol.* 77,131-140.
- 41) Lovell,D.,Briggs,J.C., and Schorah,C.J.(1966): Chemical analysis of acid mucopolysaccharides of mixed salivary tumours. *Br.J.Cancer* 20,463-468.
- 42) Leighton,J.(1954): The growth pattern of some transplantable animal tumors in sponge matrix tissue culture. *J.Natl.Cancer Inst.* 15,275-293.
- 43) Macpherson,L.,and Montagnier,L.(1964): Agar suspension culture for selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virol.* 23,291-294.
- 44) Sanders,F.K., and Burford,B.O.(1964): Ascites tumors from BHK21 cells transformed in vitro by polyoma virus. *Nature* 201,786-789.
- 45) Clarke,G.,Stoker,M.,Ludlow,A.,and Thornton,M.(1970): Requirements of serum for DNA synthesis in BHK21 cells; Effect of density,suspension and virus transformation. *Nature* 227,798-811.
- 46) Diamand,L.,Mcfall,R.,Tashiro,Y.,and Sabatini,D.(1973): The WIRL-3 rat liver cell lines and their transformed derivatives. *Cancer Res.* 33,2627-2636.
- 47) Bissell,D.M.,and Tilles,J.G.(1971): Morphology and function of cells of human embryonic liver in monolayer culture. *J.cell Biol.* 50,222-231.
- 48) Le Guilly,Y.,Guillouzo,A.,Gueguen,C.,Ferrand,B.,Lenoir,P. and Bourel,M.(1971): Carcinogenesis in tissue culture — spontaneous neoplastic transformation of adult human liver cells in long-term cultures. *Digestion*. 5,350-351.
- 49) Malaisse,W.,Malaisse-Lagae,F.,Gerritsen,G.C.,Dulin,W.E., and Wright,P.H.(1967): Insulin secretion in vitro by the pancreas of the chinese hamster. *Diabetologia* 3,109-114.

- 50) Rattillo,R.A, and Gey,G.O.(1968): The establishment of a cell line of human hormone - synthesizing trophoblastic cell in vitro. *Cancer Res.*,28,1231-1236.
- 51) Jensen,F.C.,Gwatkin,R.B.L.,and Biggers,J.D.(1964): A simple organ culture method which allows simultaneous isolation of specific types of cells. *Exp.Cell Res.* 34, 440-447.
- 52) Lowy,D.R.,Rowe,W.P.,Teich,N., and Hartley,J.W.(1971): Murine leukemia virus, High frequency activation in vitro by 5-iododeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine. *Science* 174, 155-156.
- 53) Weinstein,L.B.,Gebert,R.,Stadler,U.C.,Orenstein,J.M., and Axel,R.(1972): Type C virus from cell culture of chemically induced rat hepatomas. *Science* 178,1098-1100.
- 54) Gallagher,R.E.,and Gallo,R.C.(1975): Type C RNA tumor virus isolated from cultured human acute mylogenous leukemia cells. *Science* 187,350-353.
- 55) McAllister,R.M.,Nelson-Rees,W.A.,Johnson,E.Y.,Rongey,R.W., and Gardner,M.B.(1971): Disseminated Rhabdomyosarcomas formed in kittens by cultured human rhabdomyosarcoma cells. *J. Nat.Cancer Inst.* 47,603-611.
- 56) Stewart,S.E.,Kasnic,G.,Draycott,C.,Feller,W.,Golden,A., Mitchell,E.,and Ben,T.(1972): Activation in vitro,by 5-iododeoxyuridine,of a latent virus resembling C-type virus in a human sarcoma cell line. *J.Nat.cancer Inst.* 48, 273-277.
- 57) Kanich,R.E.,and Graighead,J.E.(1966): Cytomegalovirus infection and cytomegalic inclusion disease in renal homotransplant recipients. *Amer.J.Med.*,40,874-882.
- 58) Bricout,F.(1970): Clinical virology - The evaluation and management of human viral infections. (Debré,R.,and

No. 7

Celers, J., editor) W.B. Saunders Co., Philadelphia London
Toronto, 281-283.

- 59) Stulberg, C.S., Zuelzer, W.W., Page, R.H., Taylor, R.E., and Brouch, A.J. (1966): Cytomegalovirus infections with reference to isolations from lymph nodes and blood. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123, 976-982.
- 60) Diosi, P., Moldovan, E., and Tomescu, N. (1969): Latent cytomegalovirus infection in blood donors. Brit. Med. J. 4, 660-662.
- 61) Perham, T.G., Caul, E.O., Conway, P.J., and Mott, M.G. (1971): Cytomegalovirus infection in blood donors-A prospective study. Brit. J. Haematol. 20, 309-320.
- 62) Hanshaw, J.B. (1969): Viruses in circulating lymphocytes. New Eng. J. Med. 280, 1353-1354.
- 63) Cangir, A., and Sullivan, M.P. (1966): The occurrence of cytomegaloviruses infections in childhood leukemia. J. Amer. Med. Assn. 195, 616-622.
- 64) Albrecht, T., and Rapp, F. (1973): Malignant transformation of hamster embryo following exposure to ultraviolet-irradiated human cytomegalovirus. Virol. 55, 53-61.
- 65) Cunningham, B.D., Sims, R.A., Zimmermann, E.R., and Byrd, D.L. (1957): Murine tumor induction by cytomegalovirus. Oral Surg. 40, 130-140.
- 66) Smith, M.G. (1956): Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland (SGV) disease. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 92, 424-430.

脚注.

大阪大学医学部外科学第一講義（主任；官崎正教授）

本論文の原稿は昭和51年11月 第29回
日本細胞生物学大会において一部発表した

表1. アクテノマイシンD 处理によるHPA 細胞
唾液產生能の阻害

アクテノマイシンD ($\mu\text{g/ml}$)	反 応
0	+
1	+
3	-
5	-
10	-

HPA 単層培養細胞を MEM で上記の濃度に調整した
アクテノマイシンDで37°C, 18時間処理後, 间接蛍光抗体法
を用いて玩�全唾液蛋白血清に対する反応を検討した。

+ は特異蛍光陽性を示す。

- は特異蛍光陰性を示す。

表2. 34°C または 37°C における HPA 細胞の軟化率を中心とした
コロニーリング能

実験番号	細胞数	コロニーリング能		コロニーリング能		平均加温=数
		34°C	37°C	34°C	37°C	
1	10^3	165,	194,	179.5	(15.7%)	26, 21
	10^2	12,	15,	13.5	0,	3, 1.5
2	10^3	238,	257,	247.5	56, 60,	58.0
	10^2	17,	25,	21.0	(22.8%) 4,	7, 5.5

実験1での細胞数は5代目、実験2は9代目のHPA細胞を使用した。

HPA細胞 (10^3 あるいは 10^2 個) と0.3%寒天増殖培養液にて温浴したのち、34°Cあるいは37°Cにて5%CO₂入り培養器にて培養した。20日後、形成されたコロニーリングを算定した。

表3. HPA細胞のC型ウイルス粒子の逆転写酵素
ならびにDNA依存性DNA合成酵素活性

反応系	$^3\text{H-TMP}$ の取り込み (cpm)
ウイルス	3,506
ウイルス + RNase A* (100 μg)	701
ウイルス + DNA** (10 μg)	19,638

* Triton X にてウイルス粒子を破壊し RNase A 100 μg を加え 0°C で1時間前処理した標品について逆転写酵素活性を測定した。なお RNase は 100°C, 10 分間、熱処理したものを使用した。

** 未処理仔牛胸腺 DNA を使用した。
酵素活性は1時間、37°C の温浴中で反応させ測定した。
ウイルスタンパク量として 5.3 μg を使用した。

表4. HPA 細胞における Herpes Simplex Virus の
アラック形成能

ウイルス希釈	細胞	
	HPA	FL
10^0	0	判定不能
10^{-1}	0	判定不能
10^{-2}	0	146

HPA 細胞における Herpes simplex virus のアラック形成能を FL 細胞における同ウイルスのアラック形成能と比較した。34°Cにて培養して形成された HPA および FL の单層培養細胞に MEM で10倍稀釈希釈したウイルス溶液を接種し、6日後に形成されたアラック数を算定した。

HPA 細胞の Vesicular Stomatitis Virus に対する感受性

実験番号	ウイルス希釈	HPA		FL		平均
		細胞	平均	細胞	平均	
1	10^{-1}	0	0	0	133	168
	10^{-2}	0	0	0	14	15
2	10^{-4}	判定不能	判定不能	判定不能	判定不能	14.5
	10^{-5}	31	54	42.5	123	135
	10^{-6}	3	9	6.0	15	16
						15.5

実験 1 では細胞継代数 28 番目、実験 2 は 39 番目の HPA 細胞を使用した。
 HPA 細胞における VSV のアラバマ形成能と FL 細胞における同ウイルスのアラバマ形成能を比較した。アラバマの单層培養細胞に 10 倍濃度希釈して FL 細胞を接種し、6 日後に形成されたアラバマを算定した。

表6. HPA細胞のインターフェロン様物質の产生

処理	プロラック数	平均 プロラック数	プロラック形成 抑制率(%)
対照	133	167	150.0
IF (34) [*]	17	22.0	85.3
IF (37) ^{**}	28	36.5	75.7

HPA細胞を34°Cにて72時間培養した培養液を100,000xg遠心し、その上清をIF様標品(IF(34)^{*})として使用した。IF(37)^{**}は37°CにてHPA細胞を培養したものを用いた。上記のIF様標品1 mLでFL単層培養を34°C, 20時間処理したのち、VSVのプロラック形成能を測定した。

なおプロラック形成抑制率は $(1 - \frac{\text{IF処理後のプロラック数}}{\text{対照のプロラック数}}) \times 100$ により求めた。

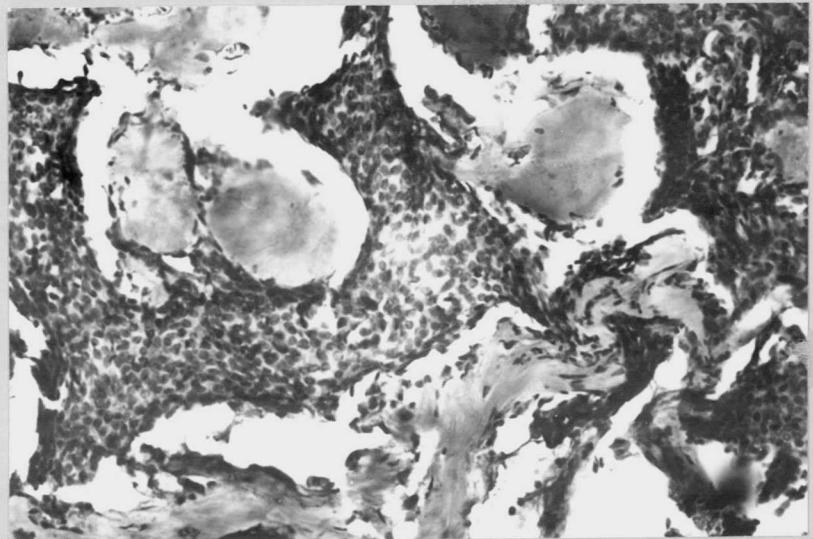


図1 実験に使用したヒト唾液腺
多形性腺腫の組織像

この腫瘍はヒト口蓋下小唾液腺部にて
採取した。この組織を一部を組織培養し
得た細胞 (HPA細胞) を実験に供した。

図 2 ヒト唾液腺多形性腺腫由来の

單層管状細胞 (HPA細胞)

單層管状細胞は散在性配列をなし、細胞は
多角形の上皮様細胞形態を有する。図の細胞
継代数は5代目の細胞を示す。(ギムザ染色, $\times 100$)

図 3 ヒト腮腺癌由来の單層管状細胞

ヒト腮腺由来の單層管状細胞は密で形態的に癌細胞
細胞を示す。図は継代数5代目のものを示す。
(ギムザ染色, $\times 100$)

図2

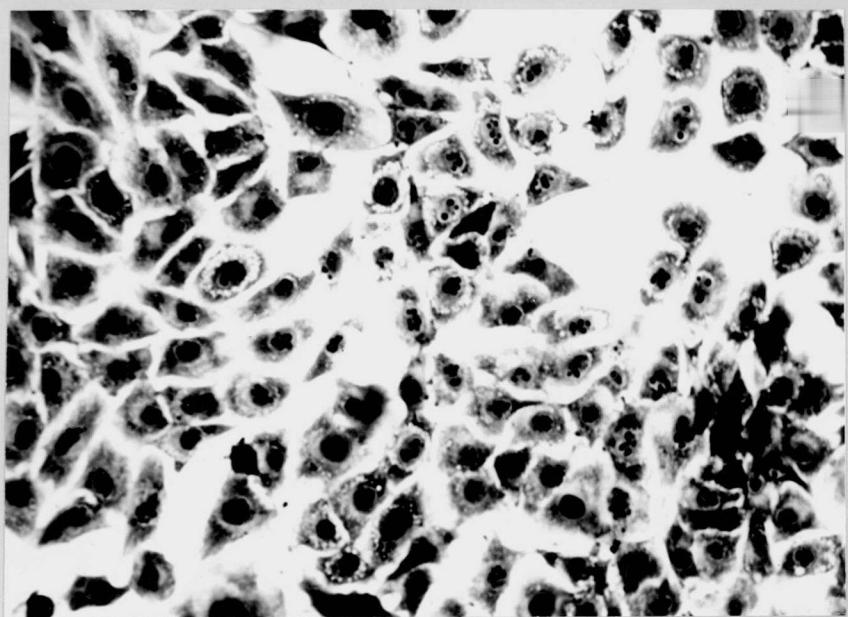
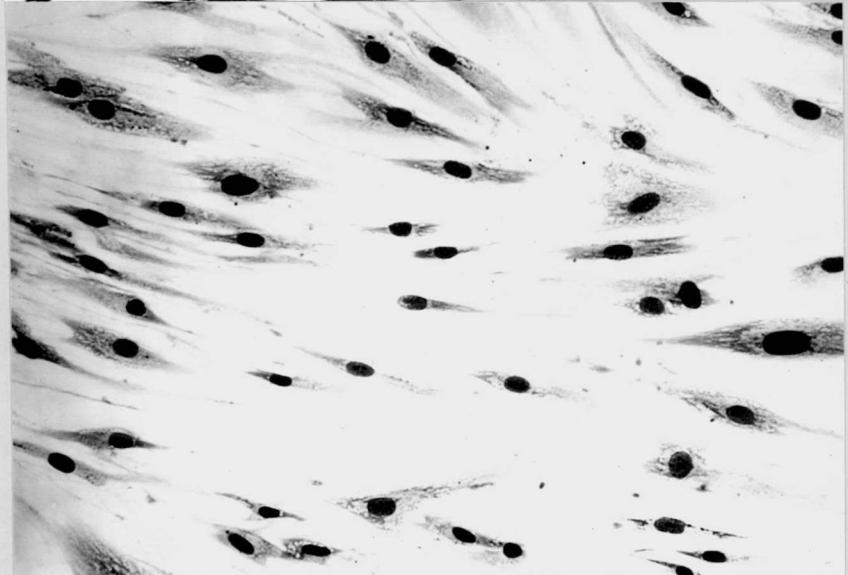


図3



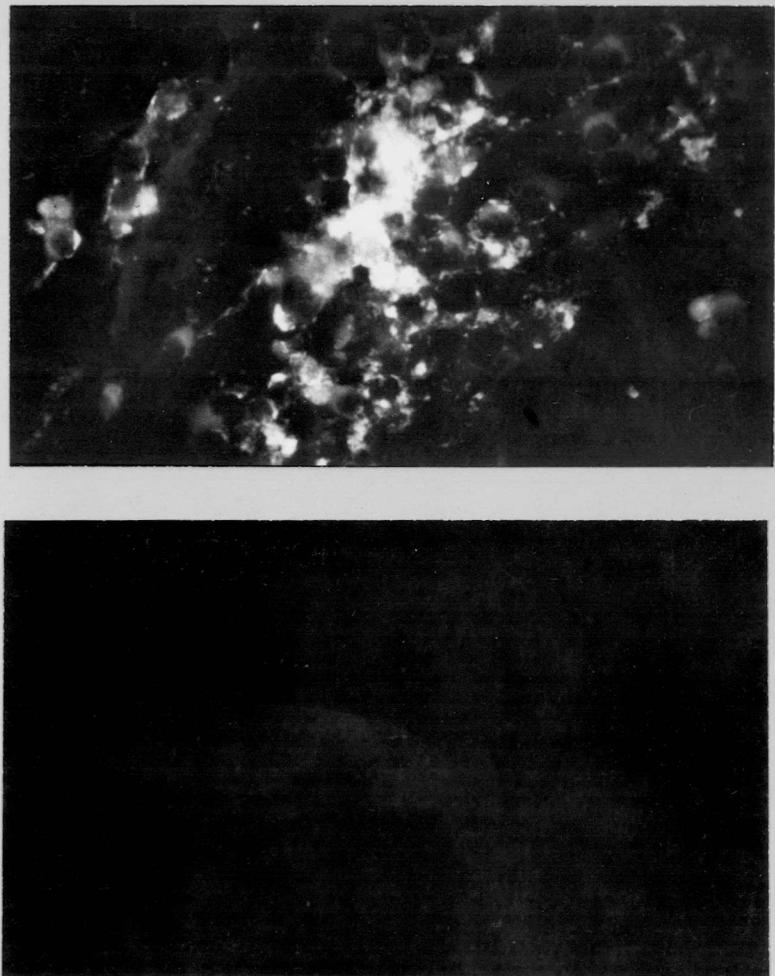


図-4 HPA細胞におけるヒト唾液成分の存在

抗ヒト唾液免疫Y-グロブリノンとFITCを結合した
抗免疫Y-グロブリノン+タ血清を用いて間接法を抗体法
にて検索した。

a. HPA細胞の細胞質に特異蛍光を認めた。(×200)

b. ヒト唾液細胞由来の細胞(線維芽細胞)では
特異蛍光を全く認めなかつた。(×200)

図 5

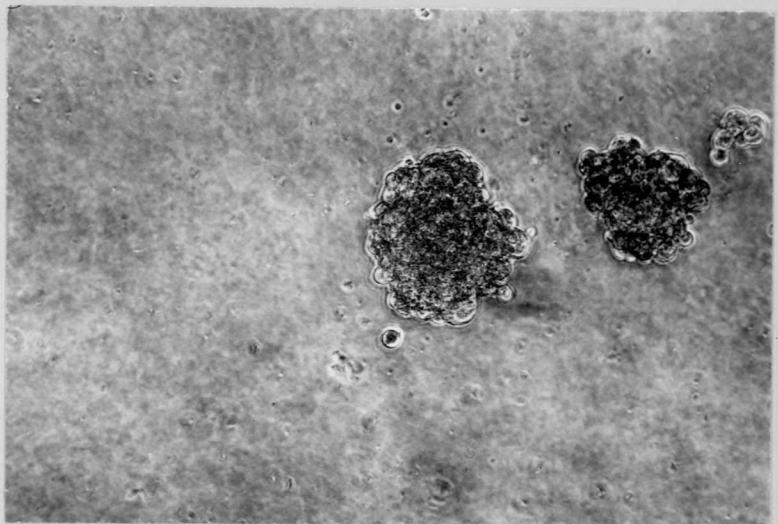


図 7

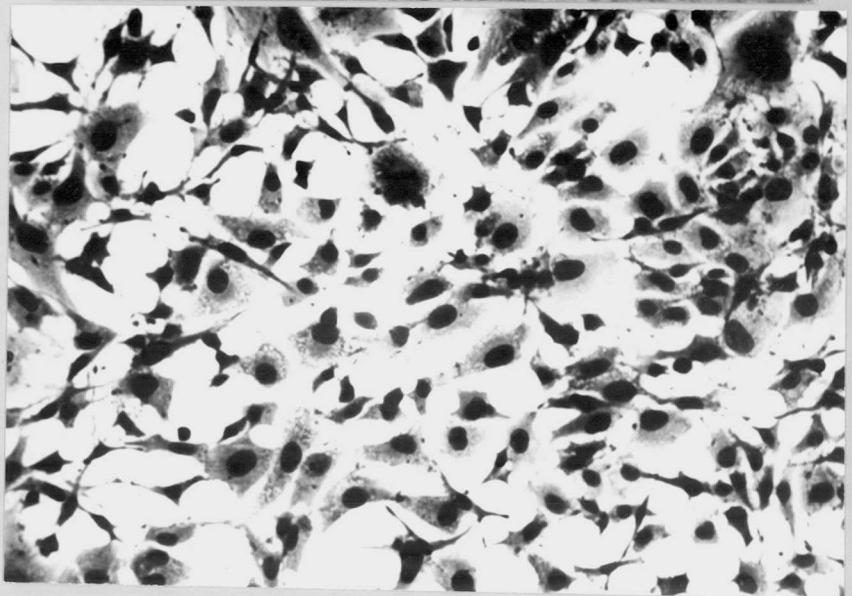
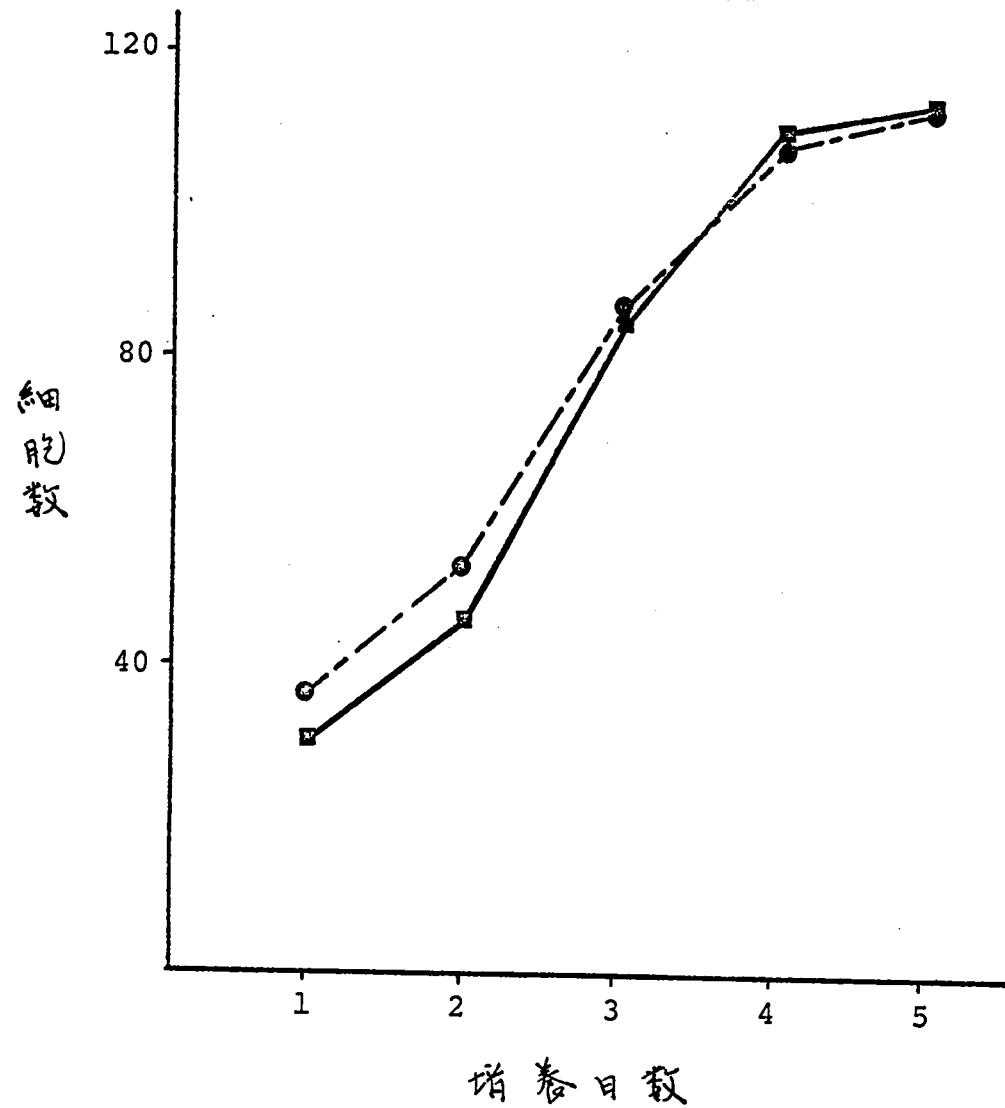


図 5 軟寒天中で形成された HPA 細胞のコロニー
細胞増殖数 5 代目の HPA 細胞を軟寒天中, 34°C で
20 日間培養した。 (×100)

図 7 軟寒天中で形成されたコロニーに由来する
單層培養細胞。この細胞は鶴株細胞である
HPA 細胞に比較して小型の星状細胞形態を示す。
図 6 繰代 5 代目の HPA 細胞が形成したコロニーを採取
後, 6 回 繰代培養したもの。 (ギムザ染色 ×100)

図6. HPA細胞の34°Cから37°Cにおける
増殖曲線



培養温度 ■—■ 34°C, ●—● 37°C.

HPA細胞(60×10^4 個)を30mm径ペトリ皿に入れ、34°Cから37°Cにて培養し、経時的に各々のペトリ皿中の細胞数を算出した。生存細胞の判定には Nigrosin exclusion test を使用した。



図-8 HPA細胞の染色体

細胞総代数30代目において HPA細胞の染色体数は83
ビーグルを有する分布を示す。 (ギムザ染色 $\times 1,000$)

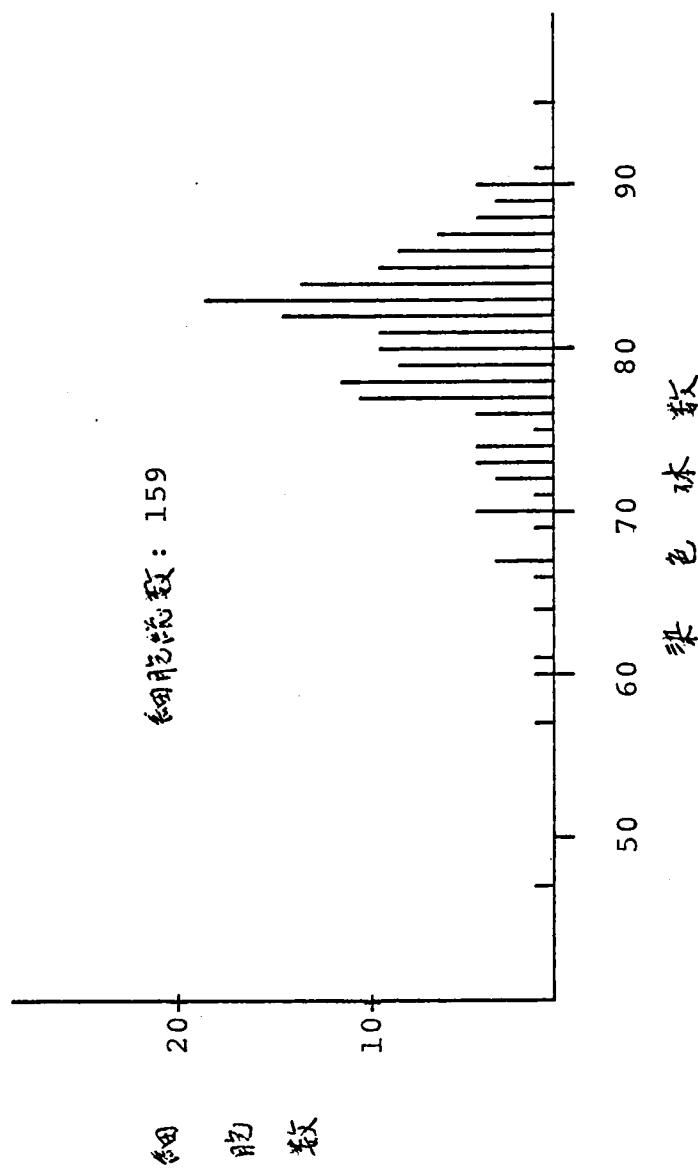


圖9. HPA細胞(經代30代)的
染色体数的分布

図-10 実験に使用した唾液腺多形腺腫の
電子顕微鏡像

この腫瘍は2種類の細胞から成り立っていた。すなはち、

a-, 約80A径の微細線維性の核周囲から細胞質全体に散在し、
赤粒体、粗面小胞体は細胞質周辺部に存在する前上皮
細胞に類似した細胞。一部の細胞には飛翔形golgi
装置を認める。($\times 12,000$)

b-, 0.8μmの顆粒を有し、細胞膜にbasal infolded membrane
の形態を有している。介在する基層上皮細胞と同定できる。
($\times 9,000$)

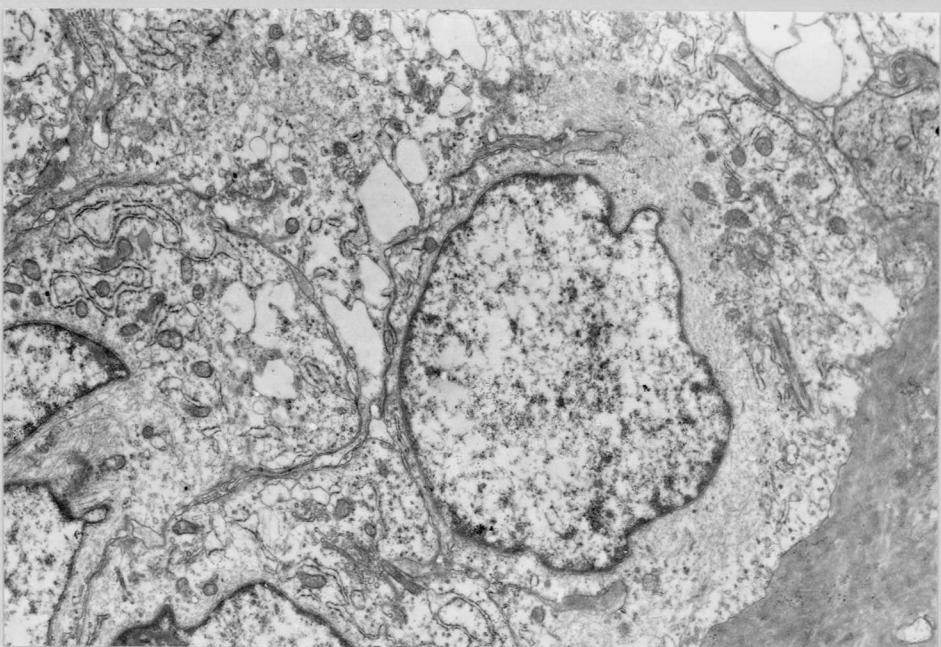


図-10 a

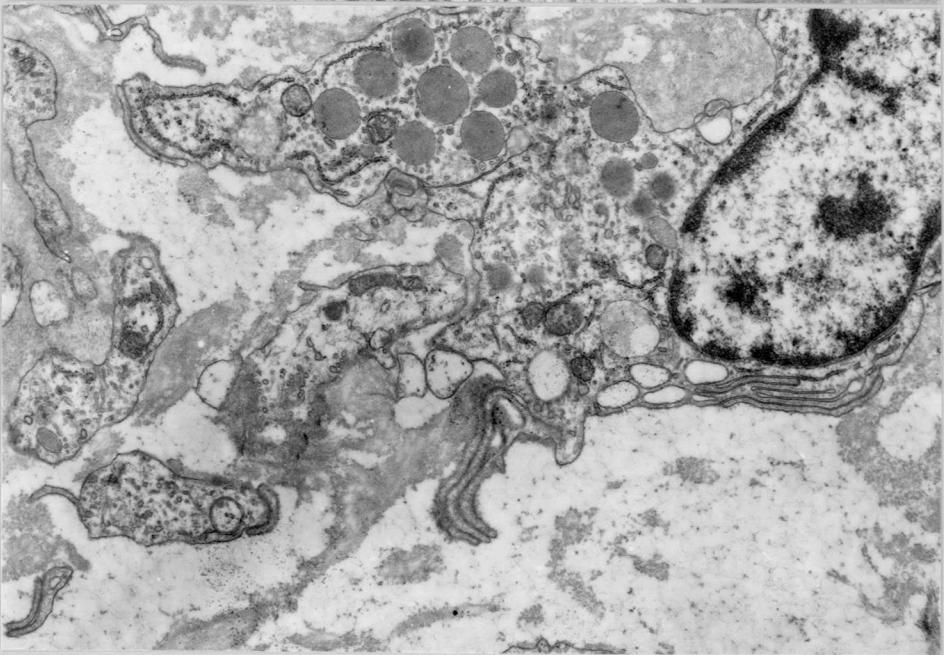


図-10 b

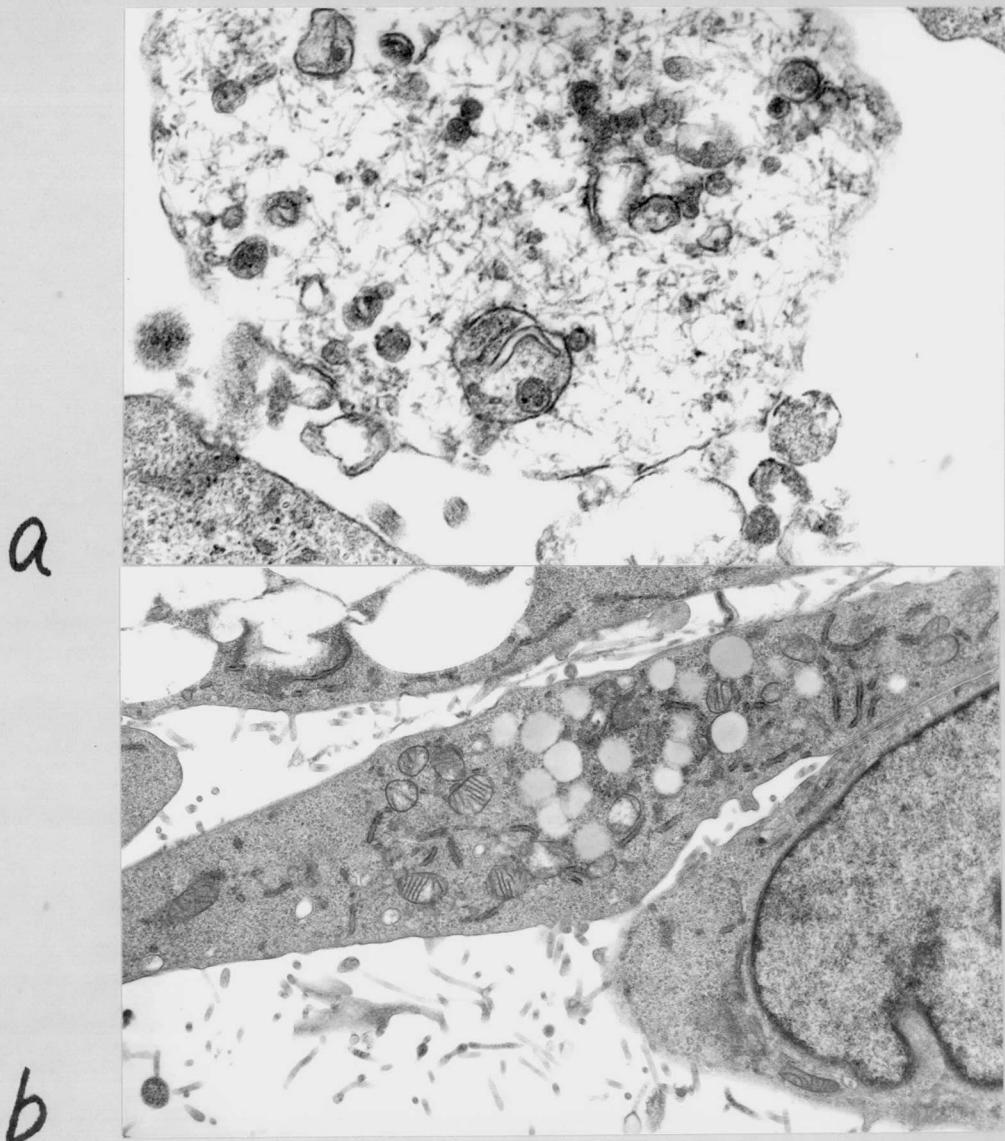


図-11 HPA細胞の超微構造

HPA細胞の細胞絆成数初期において in vivo と同様の形態を有する細胞が存在する。

- a. その1つは筋上皮細胞に類似した細胞で約80μ径の微細結構を有している。(絆成10代目の細胞を37°Cで培養したもの。 × 40,000)
- b. もう1つは介在導管上皮細胞に由来した細胞で、多孔性の、粘液様の顆粒を有し、粗面小胞体、粗粒体は細胞質全体に散在している。(絆成16代目の細胞を37°Cで培養したもの。 × 11,000)

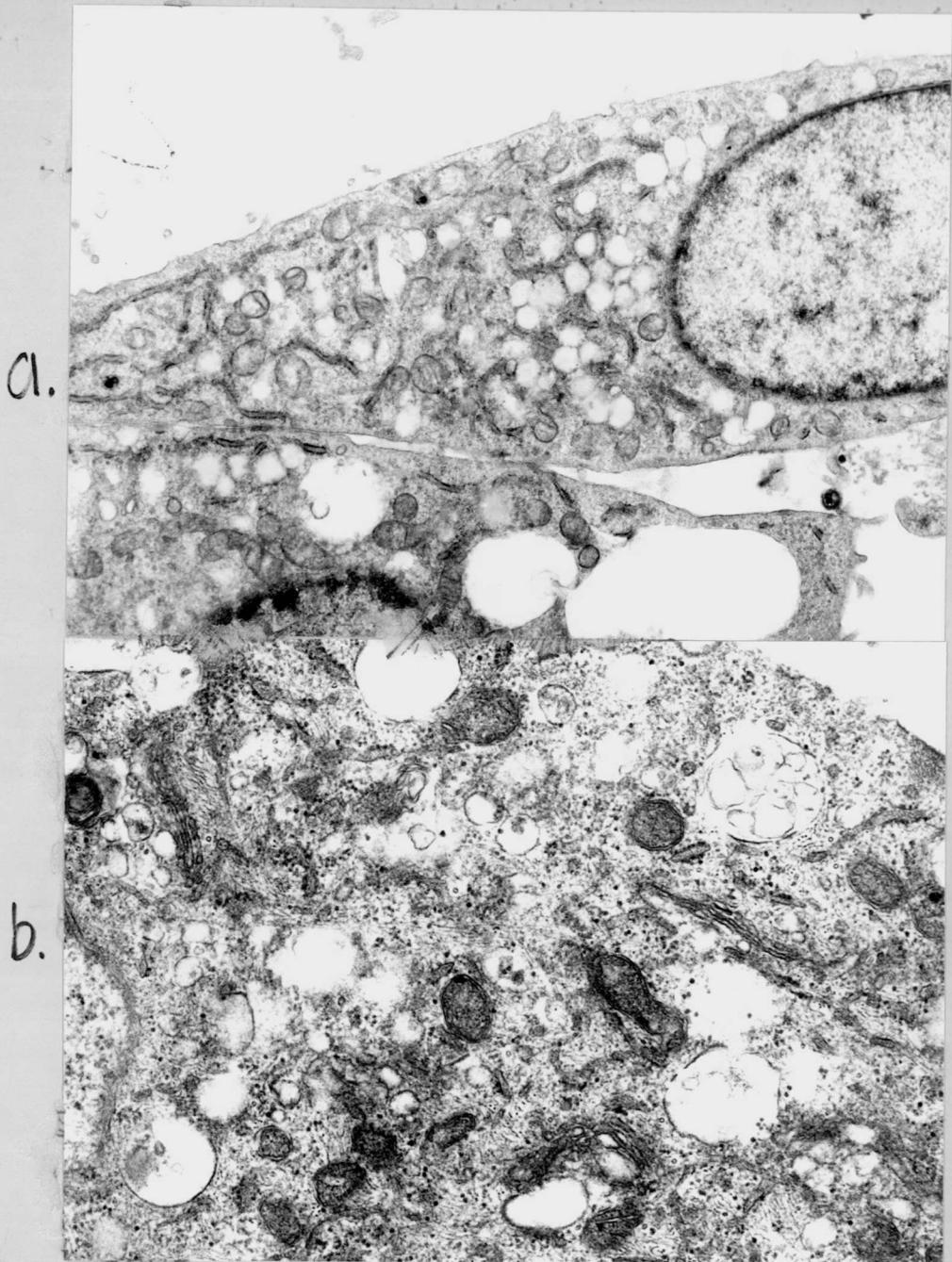


図-12 HPA細胞の超微構造

HPA单層培養には前記の2種類の細胞形態を共にする
2つの細胞が存在した。分泌顆粒を有するとともに微細線維
を含んでいた。博桿細胞との接觸部には接着板が見られる。

a- 細胞総代数26代目のHPA細胞を34°Cにて培養して。(低倍率。
×10,000) b- その高倍率を示す(×42,000)

(図)-13 HPA細胞から放出されているC型ウイルス粒子

- a). HPA細胞を37°Cにて、2ヶ月培養した。その上清から蔗糖密度勾配法で分離してC型ウイルス粒子 (PTA染色, $\times 280,000$)
- b). 34°Cにて培養したHPA細胞の超薄切片。HPA細胞から放出されたC型ウイルス粒子を示す。均一な核とコア外膜を保有している。
(ウラニル酸酸化鉛染色, $\times 80,000$)

(図)-14 HPA細胞に持続感染しているCMV粒子の観測

- HPA細胞を34°Cにて培養したのを、電子顕微鏡にて観察すると、多数のCMV粒子を認めた。颗粒状の核と外膜がhalo状構造を呈する。
(ウラニル酸酸化鉛染色 $\times 70,000$)



図-13a.

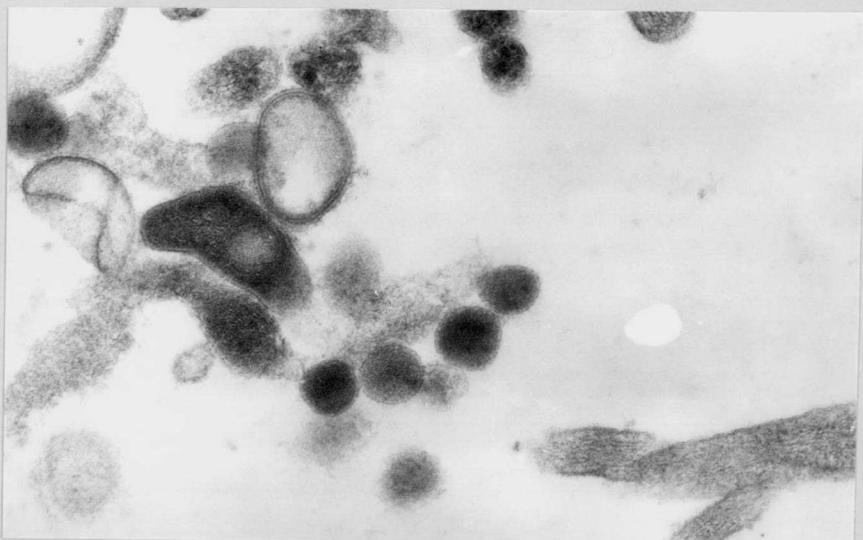


図-13b

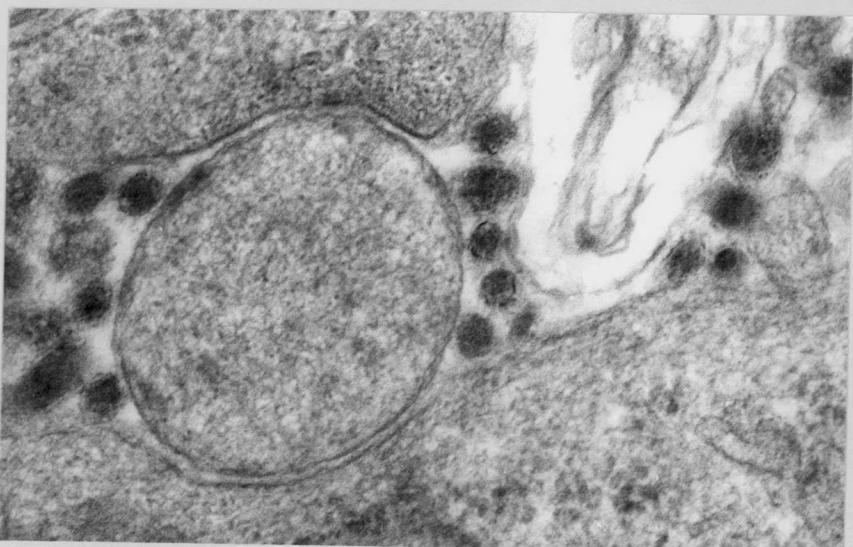


図-14

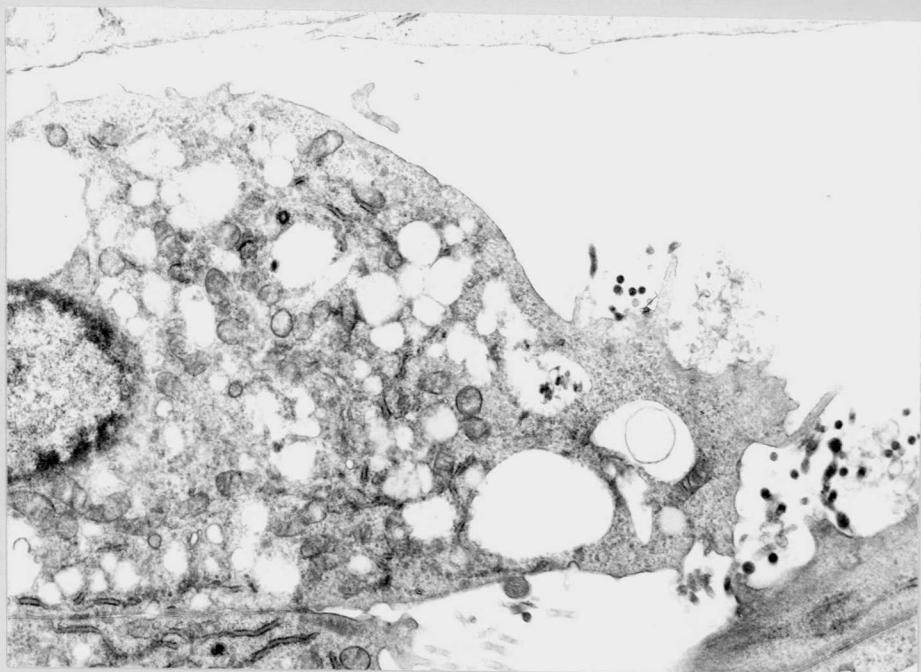


図-15 軟膜天中で形成されたコロニーに
由来する増殖細胞の超微構造。

ウロニング細胞は前記の合の子形態を呈した。
約80A径の微細線維、発達の良いgolgi器、分泌顆粒
巨細胞質内に保有している。細胞膜附近に約150A径の
線維が見られるとともに、隣接細胞との接合部には接着力が
観察される。細胞間にこの細胞から放出された多数の
ウイルス粒子が見られる。(X12,000)