

Title	ヒト唾液腺多形性腺腫由来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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

原著

ヒト唾液腺多形性腺腫由来の
上皮細胞の生物学的特性

白砂兼光

緒言

唾液腺多形性腺腫¹⁾は唾液腺腫瘍の中で最も類度の高い腫瘍であり、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いる。そのため、従来よりこの腫瘍の発生母地について種々の論議があったが、近年ではこの腫瘍は上皮性細胞に由来しているという考え方が一般的に認められていた。すなわ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⁴⁻¹⁴⁾と報告するものが多い。

またこの腫瘍は臨床的に約103%の割合で癌化すると云われ、¹⁵⁻¹⁸⁾さらにその癌化の割合は腫瘍を長期間生体に放置することによって著明に増加すると云われている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た細胞、あるいは癌化する能力を保有している細胞が存在していることを示唆している。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

がなされているが、^{15-18, 20)}癌化の機構、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的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は *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。さらに transform した細胞を分離し、生物学的特性を解析することによって、得られた所見はこの腫瘍の発現機構のほかにその発生母地を明らかにする上に、役立つと考えられる。

著者はヒトの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。

実験材料のほかに実験方法

1) 細胞のほかに培養法

この実験に使用した唾液腺由来の細胞はヒト口蓋小唾液腺部に発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。摘出した組織を無菌的にハサミで約1mm立方の大きさに細切し、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附着するのを待って、約1mlの増殖培養液を入れ、5%酸素ガス培養器中で37°Cにて培養した。増殖培養液にはEagleのMEM²²⁾培地(白水製薬社製)に20%仔牛血清(阪大微生物病研究所製)、2mM L-グルタミンを加えたものを使用した。培養3日目より増殖培養液を1mlづつ2日おきに追加し、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(阪大微生物病研究所製)及び、1.4%エチレンジアミン四酢酸ナトリウム(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

、細胞を採取したのち、200x g で10分間遠沈した。その細胞沈渣をMEM で3回洗ったのち、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 及び37°C にて4-5 日間隔で継代培養した。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顎下腺部に生じた腺様嚢胞癌、ならびに手術中に得た乳癌口唇部組織より上記と同様の方法で初代培養を行ない、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腎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単層培養細胞を EDTA-トリポン溶液にて室温で3分間処理し

たのうち、その細胞を採取し MEM での洗浄後、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 個/ml に調整した細胞浮遊液の 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 日間隔で上記した方法で行った。

2) 軟寒天培養液中でのコロニー形成能の算定

30 mm 径ペトリ皿に増殖培養液に寒天 (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% の割合に含む寒天増殖培養液 1 ml に細胞を 100 個または 1000 個混入し、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 あるいは 37°C にて培養した。培養 20 日後に形成されたコロニー数を顕微鏡下 (40倍) にて算定した。
25)

3) ウイルスほうびにウイルスの検出法

実験には Herpes simplex virus (Hf 株²⁶⁾, (HSV-I)

Vesicular stomatitis virus (インデアチ株, (VSV)²⁸⁾)

を使用した。これらのウイルスは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させた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5000xg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。なお実験に依するまじ-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価を測定した。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径ペトリ皿に入れた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倍階段希釈したウイルス0.1mlを接種し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

と重層し、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時間後に、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倍に調整したニユートラル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) インターフェロン様物質の検索

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、低速遠心により細胞残渣を除去したのち、 $100,000 \times g$, 2時間超遠心 (Martin Christ オメガ型超遠心機) し、その上清をインターフェロン (IF) 様標品として使用した。

この IF 標品の力価は以下に述べる様に測定した。 10×10^5 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 単層培養細胞を上記の IF 様標品 1ml で20時間、 34°C で処理した。その後、IF 処理 FL 単層培養

細胞を MEM で3回洗株した後、適当に希釈した VSV 溶液 0.1ml を接種することにより形成されたプラック数を算定した。なお FL 単層培養細胞を IF 株標品の代わりに MEM で同様に処理したものを対照とした。また VSV 溶液は対照とした FL 単層培養細胞にて約 100 個のプラックを形成する様に調整した。

IF 株標品のカ価はこの標品で処理した FL 単層培養細胞での VSV のプラック数と対照のものと比較し、その減分率で表現した。

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⁾ の変法により施行した。

CF 抗原としては HPA 細胞 (10^7 個) を 3ml のブロナール緩衝液 (PH 6.8) に浮遊させ、ドライアイス-アセトンを用いて3回凍結融解を行なった後 5000x 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¹⁵⁾ 32倍のCF抗体価を保有するヒト妊婦血清 (大阪府立公衆衛生研究所、高須賢一医学士より) 分与された

もの)を標準血清として使用した。

抗原 20 μ l をベロナル緩衝液で2倍階段希釈したものに、4倍の CF抗体価と示すように希釈した標準血清 20 μ l と 40 μ l の補体(2単位)を加えて 4 $^{\circ}$ C にて一晩放置した。この反応混合液に感作血球を 40 μ l 加え 37 $^{\circ}$ C で1時間反応させた。この場合溶血を阻止した抗原溶液の最大希釈倍数をもってサイトメガロウイルスの補体結合抗原価とした。なお感作血球は 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 $^{\circ}$ C , 30分間非活化した後、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と間接蛍光抗体法を用いて検討した。

HPA 細胞を 24x32mm カバーガラスを入れた 60mm 径ペトリ皿に 50×10^4 個入れ、37 $^{\circ}$ C で培養した。3日後カバーガラス上に形成された単層培養細胞を 4 $^{\circ}$ C の D-PBS (PH 7.1) で 3回洗滌

10

し、そのらアセトンにて 4°C で 10 分間固定し、
さらに 1 時間空気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 γ -グロブリン (広島大学
歯学部細菌学教室, 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。以上のように処理した標本を未
反応抗血清成分を除去するため D-PBS で振とうし
ながら 1 時間洗滌した。次に蛍光色素フルオ
ロセンス・イソイシアネート (FITC) と
結合させた抗家兎 γ -グロブリンブタ血清 (Dakopatts A/S 製, Denmark) とさらに 1 時間, 37°C
にて反応させた。再び D-PBS で洗滌を 1 時間
繰返し、未反応抗血清成分を除去したものと
0.5M 炭酸緩衝液 (PH 9.5) で 90% に調整したグリ
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ならびに口唇粘膜

びこの命題を精製ウイルス標品とした。

8) 逆転写酵素対ラビに 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 Green¹³⁰ 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 (デオキシシトシン-3-リン酸 (dCTP), デオキシグアノシン-3-リン酸 (dGTP), デオキシアデノシン-3-リン酸 (dATP), Sigma chemical Co., St. Louis, U.S.A.), 10 μ Ci ³H-チミジン-3-リン酸 (³H-TTP, specific activity は 18.9 Ci/m mol, New England Nuclear, Boston, U.S.A.)。ウイルス標品はこの基質と混合したのを 37°C の恒温槽で 1 時間反応させた。反応は 1 N 過塩素酸 (PCA) 150 μ l を加えて氷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 生じた沈澱を 0.2 N NaOH 100 μ l に溶解した。未反応の $^3\text{H-TTP}$ を除去するため 1N 過塩素酸と 0.2 N NaOH を用いて、それぞれ沈澱を溶解を二回繰り返したのち 3 ml の 10% トリクロル酢酸 (TCA) により再び沈澱を形成させた。この沈澱をミリポア・メンブランフィルター (HA 型 Pore size 0.45 μ) とに集め、Bray³⁾ の溶液 10 ml と加えて溶解した。 ^3H 放射活性は Aloka (日本無線医学研究所) 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³⁹⁾には反応混合液に鎖型 DNA として 10 μ g 仔牛胸腺 DNA (Sigma chemical Co., St. Louis, U.S.A.) を加えた。

また精製ライルス標品のリボヌクレアーゼ (RNase) 処理は次の様に行った。精製ライルス標品 20 μ l に最終濃度 0.01% Triton X-100 と 5mM dithiothreitol を加えたのち、0.1 mg RNase A (Sigma chemical Co., St. Louis, U.S.A.) を加え、0 $^{\circ}$ C、7 時間反応させた。この標品についても同様

に逆転写酵素活性を測定した。

なお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

標本の作製の次の様に行つた。 10×10^5 個の細

- 胞を 24x32mm カバーグラスを入れた 60mm 径ペトリ皿に入れ、3日間 37°C で培養したのちカバーグラス上に形成された単層培養細胞を 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% ギムザ溶液 (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

腫瘍組織片を 0.005M 塩化カルシウム (CaCl_2) を加えた 0.1M リン酸緩衝液 (PH 7.3) で最終濃度 4% になる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 2mm 立方に細切して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、さらに残存するグ

ルタールアルデヒドを除去するための緩衝液中に浸漬し 4°C にて一晩放置した。次に 2% 四酸化オスミウム溶液 (OsO_4 , Merck 製) 中 4°C で 2 時間固定を行なった。通常により冷エタール系で脱水後, フロビレキサシド (石井製薬社製) に浸透させ Luft ⁽³⁴⁾ 法によりエポキシ樹脂 (応研商事) を埋めたものを 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。まずはら 90 mm 径ペトリ皿あるいは 8 オンス培養角ビンにて 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単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, ラバーホリスマンを用いて細胞を採取し 200x 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を経てエポキシ樹脂を埋めた。包埋ブロックは LKB 製ウルトラトーム (ultratome) で 600 ~ 800 Å の超薄切片を⁽³⁵⁾ 作製し, 4% 酢酸ウラニールならびに水酸

硫酸³⁶⁾の二重染色を施した。

培養液中のウイルス粒子の観察は次の様に行なった。あらかじめ精製ウイルス標品をコロジオン膜にカーボン蒸着した銅メッシュ上に滴下したのを室温にて乾燥後2%リンタンゲステン酸 (PH 7.2)にて3分間染色した。

観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 倍で観察し、写真撮影には富士電子顕微鏡フィルム FG を使用した。

1) 単層培養細胞の染色体分析法

HPA 細胞の染色体標本は Rothfels⁽²³⁾ の変法により作製した。あらかじめ 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 をカバーグラスと入れた 60mm 径ペトリ皿にて 37°C で2日間培養したのち、培養液中に最終濃度 10^{-6} M となる様に調整したコルヒチン(石津製薬社製)溶液を加えた。コルヒチン処理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ない、さらに 0.2% 生理食塩水中

び20分間砥強液処理と行なった。この標本の固定は蒸留水で1/100に希釈したカルノア液（メチルアルコールの容量と氷酢酸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分間固定を行なった。この標本は室温にて乾燥させたのち10%ギムザ液で20分間染色を行ない、空气中で乾燥させたのちカナダバルサムで封入した。観察には日本光学社製生物顕微鏡L型を用い、100倍油浸レンズを使用し、1000倍に拡大し分裂中期の染色体と写真撮影し分析を行なった。

実験結果

1) 実験に使用した唾液腺の^{腺性}形腺腫の形態的観察

ヒト口蓋小唾液腺に発生した^{腺性}形腺腫を摘出後、その腫瘍組織の約2/3を組織培養するための採取した。この採取した組織の一部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腺腺多形性腺腫であった。すなわちエオジンに淡染する分泌物様物質とヒアリン様構造を呈する多くの肉質組織に囲まれて、橢圓形あるいは紡錘形の上皮細胞が集団を形成し(図1)、またこれらの上皮細胞は徐々に索状配列を示し、粘液腫様の肉質部へ移行していた。この切片には骨石灰質に軟骨様組織の形成は見られなかった。さらに、ここ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った。

さらに採取した組織を電子顕微鏡にて観察した結果、この腫瘍は2種類の細胞から成り立っていることがわかった。すなわち、その1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圓形を呈し、約80Å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、細胞膜付近では一部、細胞膜に垂直に走る部分も見られた。細胞質

りボゾーム (free ribosome) は乏しく、糸粒体 (mitochondria) 粗面小胞体は細胞周囲辺部に局在していた。この形態と異なる一部の細胞には発達した Golgi 装置が見られた。

もう一つの細胞は分泌管上皮細胞に由来した細胞と思われる。あるいはこの細胞は不規則な橢圓形を呈し、核はその細胞形態に類似していた。細胞内には鮮明な細胞膜を有する約 0.8μ 大の顆粒を持ち、粗面小胞体、mitochondria、小胞体、free ribosome は細胞内全体に散在していた (図 10-b)。また細胞膜は分泌管細胞特有の層状に折り込まれた細胞膜 (basal infolded membrane) の形態を残していた。

また間質中には粘多糖質から成ると思われる無構造物質、微細粒子あるいは微細線維 (コラーゲン線維) が見られた。

2) 多形性腺腫由来の培養細胞の形態とその動態

この腫瘍腺由来の多形腺腫組織より得た培養細胞 (HPA 細胞) は継代数10代までは多角形の細胞と紡錘形の細胞が存在していた。さらに継代を重ねると巨細胞が数多く見られるようになった。しかし、細胞継代数20代を過ぎるとほとんどの多角形の細胞形態を示す上皮様細胞で統一され、その単層培養細胞は敷石状配列を示した (図2)。

この HPA 細胞を電子顕微鏡にて観察すると培養継代数初期においては3種類の細胞が存在していた。一つは筋上皮細胞に類似した細胞で、細胞質内には約 80 \AA 径の微細線維を豊富に有し、リボソーム、小胞体、mitochondria を含んだ短紡錘形の細胞であった (図11-a)。なおこの細胞は継代数15代ごろで見られなくなった。

もう一つの細胞はその細胞質内に分泌顆粒を有し (図11-b)、培養継代初期では短紡錘形の単細胞細胞形態を示し、植円形の核状細胞

中央部に位置していた細胞継次致を増すと細胞形態は多角形に近くなり、核はやや偏位の傾向を示した。細胞内には $0.5 \sim 1 \mu\text{m}$ 大の指袋様の顆粒を有し相面小胞体, mitochondria は細胞内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。

さらにもう一つの細胞は前述した二種類の細胞形態を共有するいわゆる合の細胞であった(図12a, b)。すなわち細胞内には 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泌顆粒を保有する細胞である。細胞継次致を重ねると、この合の細胞の割合が著明に増加した。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た。またこれらの細胞の隣接細胞間の結合部には接着板 (desmosome) , 肉鎖小帯 (tight junction) 等が見られた。

3) HPA 細胞におけるヒト唾液成分の産生

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査するため、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られた。なお対照として使用したヒト腺様嚢胞癌、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った。以上の実験結果より、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。

さらに HPA 細胞に存在する唾液成分はこの細胞の遺伝子情報により産出されているか否かを確認するため、以下に述べるごとくアクトノマイシン 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った。

50×10^4 個の HPA 細胞をカバーグラスを入れた 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間接蛍光抗体法を行った。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 個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 個であった。

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 細胞の軟骨肉中でのコロニー形成能

HPA 細胞の transformation の有無を検査する

ため、軟寒天培養液中で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代目ならびに9代目の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ことによってコロニー形成率は低下することを示された。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に示す如くであった。

34°Cならびに37°Cと培養温度条件を変化させることにより、HPA細胞は異なり、そのコロニー形成能を示したことは培養温度の変化によって細胞の増殖率が異なっている可能性もあるため、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総細胞数を算定した。図6に示した様に

培養温度 34°C , 37°C と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 細胞に対する 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寒天中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 の機構を解析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 より粗ウイルス標品 1 ml 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 $1.17\text{g}/\text{cm}^3$ の所に 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、酸不溶性分画への $^3\text{H-TMP}$ の取り込みを検索

あると、3056 cpm の値を示した。また鑄型 DNA として 10 μ 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と認められた。さらにこの逆転写酵素の鑄型としてウイルスの RNA が働いていることと確認するため、反応基質にウイルス標品と Triton X 代わりに RNase (0.1 mg) を加え、0 $^{\circ}$ C にて 1 時間反応させたのち、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 H-TMP の取りこみは 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 型ウイルスは逆転写酵素活性のために 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鑄型として働いていることが明らかとなった。また 34 $^{\circ}$ C にて HPA 細胞を培養した培養上清についても同様に実験を行った結果、培養上清中のウイルス

又量り方々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った。

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査した。その結果、HPA 細胞の細胞質内及び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 $110\text{m}\mu$ 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 で軟寒天中でコロニー形成能に相異を示した。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かった。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、形態的に唾腺腺ウイルスであるサイトメガロウイルス (Cytomegalovirus, CMV) 粒子に類似していたので、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婦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 抗原カ価を有していたので、このヘルパス型のウイルス粒子は 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 細胞にお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 抗原カ価は 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ため、この単層培養細胞での他のヘルペスウイルス群の一つとして Herpes simplex virus (HSV-I) の感受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 単層培養細胞では、 1.46×10^5 pfu/ml のカ価を示す HSV-I ライス標品を用いても 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。この実験事実から、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。

ケ) HPA 細胞のインターフェロン様物質の産生

HPA 細胞には C 型ウイルスに加えて 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。そのため 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る Vesicular stomatitis virus (VSV)²⁸⁾を用いて、HPA 単層培養細胞でのプラック形成能を調べた。その結果、表5に示す様に継代数28代目の HPA 細胞を対照として用いた FL 単層培養細胞では 1.45×10^3 pfu/ml のカ価を示す VSV 標品を用いても全くそのプラックの形成を認めなかったが、39 代目の HPA 細胞では FL 単層培養細胞では VSV の感受性にはほとんど差を認めなかった。

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 様物質を産生していることが示唆されたので、HPA 細胞の培養液から調整した IF 様標品を FL 単層培養細胞で処理し VSV の感受性を検討した。表6に示す様に、34°C ならば 37°C での HPA 細胞培養液中には対照と比べて VSV のプラック形成率を各々 85.3%、75.5% に抑制する物質が存在すること証明された。以上の実験事実から、細胞継代数28代目の HPA 細胞は IF 様物質を産出していることが示唆された。

8) 軟寒天中で形成されたコロニーに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型腫瘍ウイルスが検出されて、また形態学的にも種の細胞が存在していることが確認された。

故に in vitro において transform した細胞が有する軟寒天培養液中でのコロニー形成能を利用して HPA 細胞のクローニング⁴³⁾を行ない、そのクローンについて生物学的性状を解析した。

すなわち HPA 細胞のクローニングは次の様に行なった。HPA 細胞、継代数 5 代目で軟寒天培養液中で形成されたコロニーをパスツールピペットで採取した。この細胞塊はピペッティングにより単一細胞とし、そのうち、30mm 径ペトリ皿にまき、3 ml の増殖培養液中で 20 日間培養した。増殖して来た細胞を EDTA-トリプシン処理により採取し継代培養を行なった。なおクローンとして得られた細胞を確立し以下の検索を行なった。

親株細胞である HPA 細胞は多角形の上皮様

細胞形態をとっていたが、そこからクローニングして得た3株の細胞は、全て少し小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。すなわち細胞質内に約 80\AA 径の微細線維を有するとともに、発達の良い Golgi 装置と粘液様の分泌顆粒を有する細胞であった。この細胞は細胞継代数を重ねると核は幾分偏位の傾向を示し、また細胞質迎縁部には約 150\AA 径の線維の出現が見られた。また一部の細胞集団は腺腔を形成するかの様に配列し、その隣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。

さらにこれらクローニング細胞にも腫瘍成分の産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した。

考 察

ヒト唾液腺由来の多形腺腫組織を組織培養し、得られた細胞の生物学的活性を解析しようとする試みは従来より行われてきた。すなわち Kondo⁽¹⁾ 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な desmosome 結合を有することと認め、さらにこの細胞をハイスターの頬袋に接種することにより腫瘍が形成されたので、Nagoya-78 細胞は多形腺腫由来の腫瘍細胞であるとともにその細胞の発生原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活性の一つとして、^(40, 41) ヒト多糖類の産生がよく知られている事実であるが、Takeuchi⁽³⁾ 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、それ以外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ト多糖類の産生と認められた。さらにこれらの培養細胞を ⁽⁴²⁾ sponge matrix を使用して培養するとその細胞

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、組織培養を行うことにより得た細胞はそれぞれ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 でそれぞれの細胞が transform している可能性を直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 のマーカーの一つとして重要である。この実験手法を利用して、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、充塞性あるいは腺房状の胞巣を作り、また間質部は粘液腫様、線維腫様または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に由来するという考え方が一般的である。⁴⁻¹⁴⁾

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、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⁾ により報告されている。さらに Mylius⁹⁾ は多形性腺腫は筋上皮細胞が多量に存在する分泌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⁾ 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、腫瘍組織内には導管と上皮細胞の割合が反例的

に増加することから、この腫瘍は導管上皮細胞から発生することと示唆している。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、組織像としてこの腫瘍は多形性を示しているが、超微構造のレベルではこの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分泌管上皮細胞であった。

これらの報告されている実験結果に加えて、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敷石状に配列する上皮様細胞であり、上皮細胞に特有な接着板結合部が見られた。さらに細胞内に分泌顆粒を有し膜構造の発達も良く、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は肝臓、脾臓、甲状腺あるいは

は絨毛上皮などに原発した腫瘍で行われている。これらの腫瘍より分離された細胞はそれぞれ特有な物質の産生があり肝細胞ではアルブミン^{46,47)}, α -fetoprotein⁴⁸⁾, 膵細胞ではインシュリン⁴⁹⁾を, 絨毛上皮腫細胞ではゴナドトロピン⁵⁰⁾の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ことが上皮細胞であることを確認する重要な手段となっている。

故に HPA 細胞についてもこの細胞がヒト唾液腺の形腺腫より分離されたため、HPA 細胞のヒト唾液成分産生能の有無について検討した。抗ヒト全唾液家兔血清を用いて蛍光抗体法によりその抗原を HPA 細胞について検索した結果、HPA 細胞の細胞質には特異蛍光を認められるにもかかわらず対照として用いたヒト由来の培養細胞で全くその蛍光を認めないこと、HPA 細胞をアクリノマイシン D 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が同定された。なお用いた抗血清は抗ヒト全唾液腺上皮血清であるため HPA 細胞の細胞核で特異蛍光を示した物質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、線維芽細胞のみが増殖し上皮細胞は得られなかった。Jensen⁵⁾ら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瘍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いいわゆる explant outgrowth method を利用する方法がより適した手法であると考えられる。それ故にこの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がないヒト腺様癌細胞癌3例についても、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)のみが増殖し上

皮細胞は得られなかった。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成能を保有せず、また軟寒天中でのコロニー形成能を有する細胞は存在しなかった。トリプシン処理を加えた場合でも、全て線維芽細胞のみが増殖した。この実験結果から、*explant outgrowth method* を利用して唾液腺腫瘍から皮細胞を分離する場合でも実験手技的に限界があり、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を示唆している。

HPA 細胞には *transform* した細胞が存在してい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う過程で、2種類のウイルス粒子の存在を認められた。その一つは形態学的にはC型腫瘍ウイルス粒子であった。さらにその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された。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)

現在までの数報告されていることを考へると、HPA 細胞においても viral transformation の可能性を強く示唆しているものと考へられる。

また他のウイルス粒子としてサウトメガロウイルス (CMV) の存在を確認した。CMV は従来、唾腺ウイルスと呼ばれ非常に高い頻度で唾腺上皮細胞に潜存しているウイルスである。^{57, 58)} 唾腺腫瘍由来の HPA 細胞にも CMV が持続感染し、その発現が温度感受性であることは 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。さらに HPA 細胞の軟寒天中での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ることが強く示唆された。すなわち HPA 細胞に持続感染している 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 が発現しているかも知れない。現在、ヒト CMV の発癌性について

は不明な臭成多いが一部には白血病の原因ウ
 イルスではないかと考えられている。すなわ
 ち Stulberg⁵⁹⁾ らまた Diosi^{60, 61)} らは CMV がしばしばヒ
 ト白血球に潜伏感染していると報告し、Hanshon⁶²⁾
 らは CMV が Epstein-Barr ウィルス (EBV) との重
 感染により伝染性単核球症 (infectious mononucleosis
) が発症した場合、白血病に移行する割合が
 高いと報告している。さらに小児白血病患者
 あるい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、そこからウィルスを分離したと
 報告されている。⁶³⁾ さらに Albrecht⁶⁴⁾ と Rapp はヒ
 ト CMV でハムスター胎児由来の線維芽細胞⁶⁵⁾
 transform させたことを報告している。Cunningham ら
 はマウス CMV をマウス唾液腺に接種すること
 により唾液腺腫瘍発現を述べている。以上の
 おでに報告された実験結果より CMV もまた発
 癌に関与していることは強く示唆されるが、
 HPA 細胞は CMV の transformation の関与の有無
 を解析する好適な実験系にたり得ると考えら

れる。また CMV の HPA 細胞の transformation の関与という事については軟寒天中で形成されたコロニーとクローニングした実験からも示唆される。すなわちクローン細胞は全て筋と皮細胞と分枝幹管と皮細胞との超微構造を共有した場合の子形態を示した。CMV には細胞融合能が存在することはすでに知られた事実であるので⁶⁶⁾上記した2種の細胞を in vitro にて継代培養を重ねる過程で融合したという可能性が考えられる。このことは HPA 細胞の継代を重ねるに従い、場合の子細胞が増加したことはまた細胞継代数30代目の 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)とヒト染色体数(46)の2倍の値に近づいていることからも示唆される。

また筋と皮細胞と幹管と皮細胞との構造を共有する場合の子細胞に相似した細胞は in vivo においても観察され、その生物学的意義についてはその細胞の分化過程について¹²⁾議論がなされている。すなわち Kierszenbaum は transitional

cell, 吉田は中間型細胞と名づけ, 上記の二者の細胞が分化過程において互いに移行することと示唆している。著者も in vitro にて transform している細胞がこの合の子細胞であることと確認したので, 今後, in vivo における合の子細胞の出現の意義と細胞分化過程とを考慮した上でさらに検索する必要があると考へる。

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 している細胞を得ることができたので, 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 単層培養細胞は多角形の細胞が敷石状に配列する上皮様細胞であり, 超微構造的には3種類の細胞が認められた。一つは筋上皮細胞に類似した細胞で, 他は発達の古い膜構造と分泌顆粒とを有する細胞であり, さらに上記二者の細胞形態を共有する“いわゆる合の子細胞”であった。こ

これらの細胞は継代を重ねると倍の子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は接着板結合が見られた。

HPA 細胞が唾液産生能を保有していることと抗ヒト全唾液家兔血清を用いて、間接蛍光抗体法で確認した。以上のことより HPA 細胞は唾液腺由来の上皮細胞であることが明らかになった。

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た。この事実はこのウイルス遺伝子が HPA 細胞の transformation の発現ならびにその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、ならびに HPA 細胞の軟骨芽中でのコロニー形成能は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た。

稿を終えるにあたり、本研究課題と与えられ
れご指導を賜った宮崎 正教授、本研究の実
施に際し、終始かわらぬご指導をいただいた
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。ご校閲をいただいた口腔細菌
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田正義助教授に深謝致
します。また研究の円滑な進展のために特別
のご配慮をいただいた口腔外科学第一講座の
教室員のみなさんに深謝致します。なおこの研究
の実施にあたり、抗ヒト全唾液γ-Gロブリ
ンを供与された広島大学歯学部口腔細菌学講座
福井良雄博士、CMDに対する抗血清を供与さ
れた大阪府立公衆衛生研究所高須賢一医学士
に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 cultured 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) Eneroth, 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. Bacteriol., 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.
愛媛大学誌, 13卷, 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) 馬場謙分, 鷺津玲雄, 海花原敏, 小野勇, 下里卓雄, 竹田于星 (1973): 唾液腺腫瘍 - その組織像と予後 -. 癌の臨床, 第19巻, 第9号, 893-910.
- 22) Eagle, H. (1959): Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130, 432-437.
- 23) Gay, G., Coffman, W., and Kubicek, M. (1952): Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12, 264-265.
- 24) Vaeheri, 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.

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. Biophys. 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 Kääriäinen 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. *Virology* 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 myelogenous 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

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 Sullinvan, 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.

大阪大学歯学部外科学第一講座(主任; 宮崎 正教授)

本論文の要旨は昭和51年11月 第29回
日本細胞生物学会大会において一部発表した。

表1. アクテノマイシン D 処理による HPA 細胞
 唾液産生能の阻害

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, 間接蛍光抗体法
 を用いて抗ヒト全唾液腺免疫血清に対する反応を検討した.

+ は 時 間 蛍 光 陽 性 を 示 す.

- は 時 間 蛍 光 陰 性 を 示 す.

表2. 34°C ならびに 37°C における HPA 細胞の軟骨形成能
コロニー形成能

実験番号	細胞数	34°C		37°C	
		コロニー数	平均コロニー数	コロニー数	平均コロニー数
1	10^3	165, 194,	179.5 (15.7%)	26, 21	23.5 (1.9%)
	10^2	12, 15,	13.5	0, 3,	1.5
2	10^3	238, 257,	247.5 (22.8%)	56, 60,	58.0 (5.6%)
	10^2	17, 25,	21.0	4, 7,	5.5

実験 1 での細胞継代 5 回目, 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% 炭水化物増殖培養液に混合して、34°C あるいは 37°C にて 5% 炭酸ガス培養器中で培養した。20 日後, 形成されたコロニー数と算定した。

表3. HPA 細胞の C 型 ウィ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 H-TMP の取り込み (cpm)
ウィルス	3,506
ウィルス + RNase A* (100μg)	701
ウィルス + DNA** (10μg)	19,638

* Triton X にてウィルス粒子を破壊し RNase A 100μg 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。
 ウィルスタンパク量として 5.3μg を使用した。

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

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 のプラック形成能を FL 細胞における同ウイルスのプラック形成能と比較した。34℃にて培養して形成された HPA 細胞に FL の単層培養細胞に MEM で 10 倍希釈したウイルス溶液を接種し、6 日後に形成されたプラック数を算出した。

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

実験番号	ウイルス希釈	細胞			平均		
		HPA	平均	FL			
1	10^{-1}	0	0	133	168	150.5	
	10^{-2}	0	0	14	15	14.5	
2	10^{-4}	判定不能	判定不能	判定不能	判定不能	判定不能	
	10^{-5}	31	54	42.5	123	135	129.5
	10^{-6}	3	9	6.0	15	16	15.5

実験1では細胞継代数28代目、実験2は39代目のHPA細胞と使用した。
 HPA細胞におけるVSVのプラック形成能とFL細胞における同ウイルスのプラック形
 成能と比較した。それぞれ単層培養細胞に10倍希釈したVSV溶液
 を接種し、6日後に形成したプラック数と算出した。

表6 HPA細胞のインターフェロン様物質の産生

処理	プラック数		平均 プラック数	プラック形成 抑制率(%)
対照	133	167	150.0	—
IF (34) *	17	27	22.0	85.3
IF (37) **	28	45	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得た。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のプラック形成能を測定した。

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

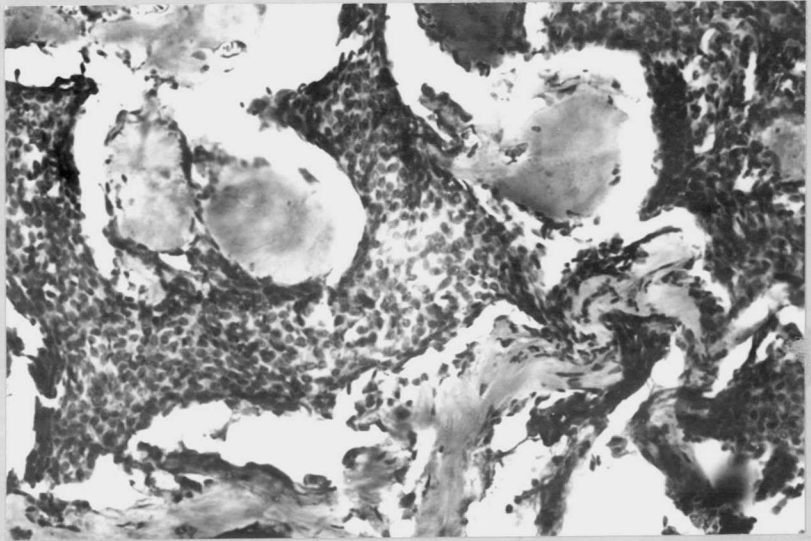


図1 実験に使用したヒト唾液腺
多形性腺腫の組織像

この腫瘍はヒト口蓋部小唾液腺部に
原発した。この組織の一部を組織培養し
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
単層培養細胞 (HPA細胞)

単層培養細胞は数層に配列をとり、細胞は
多角形の上皮様細胞形態を呈する。図は細胞
継代数25代目の細胞を示す。(ギムザ染色, X100)

図 3 ヒト腺様嚢胞嚢腫由来の単層培養細胞

この腫瘍由来の単層培養細胞は互に形態的に腺様嚢
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, X100)

图2

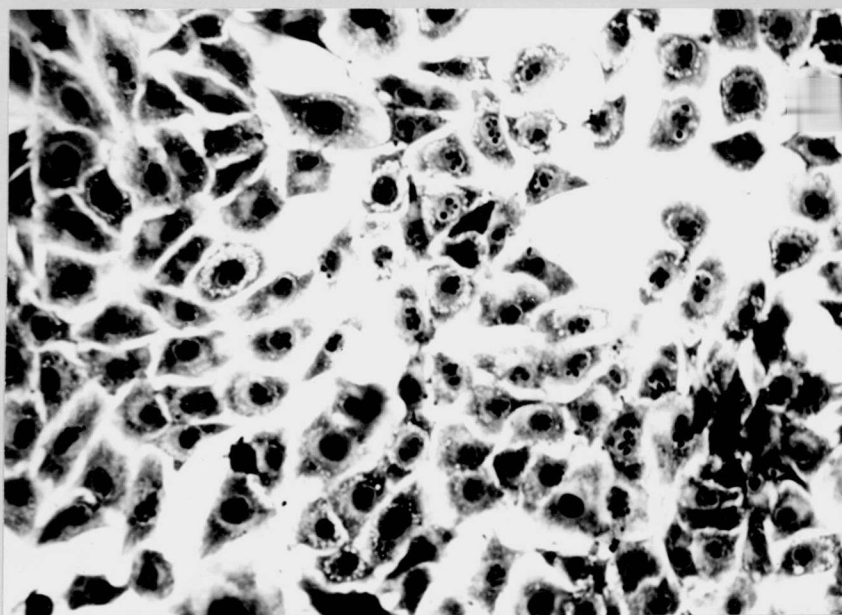
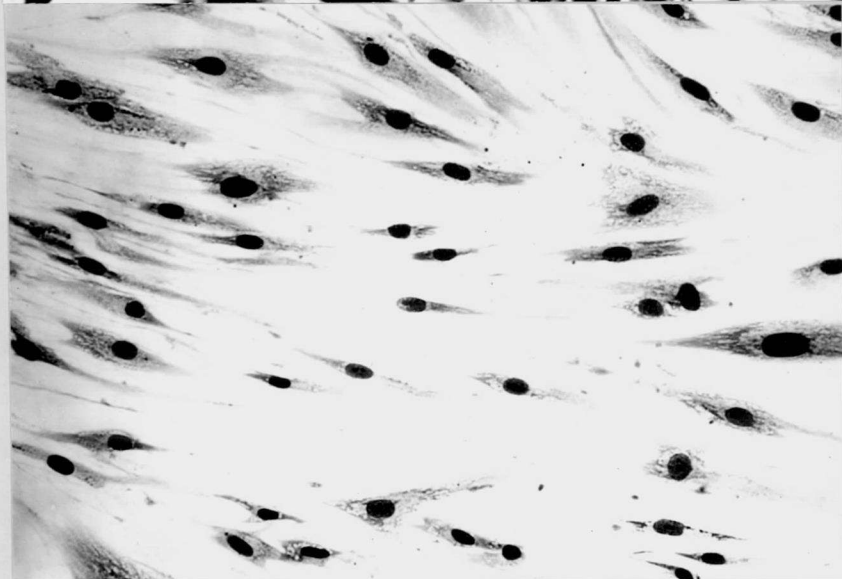


图3



a.



b.

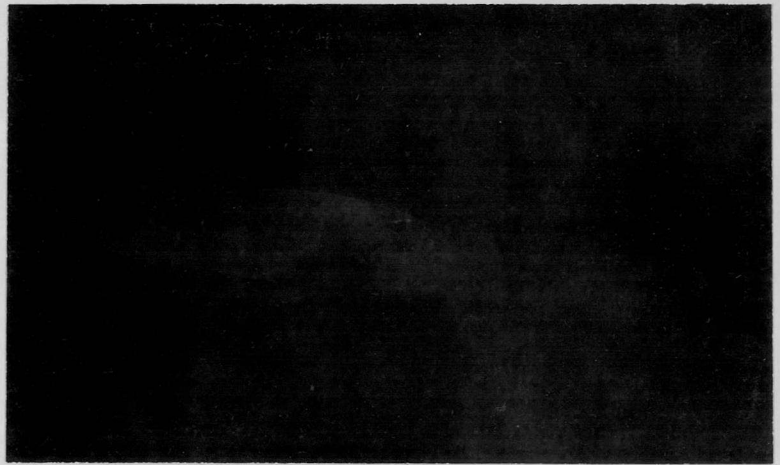


図-4 HPA細胞におけるヒト唾液成分の存在

抗ヒト唾液家兎 γ -グロブリンとFITCに結合した
抗家兎 γ -グロブリンブタ血清を用いて間接免疫抗球法
により検査した。

a. HPA細胞の細胞質に特異蛍光を認められた。(X200)

b. ヒト腺様細胞癌由来の細胞(線維芽細胞)では
特異蛍光を全く認めなかった。(X200)

図5

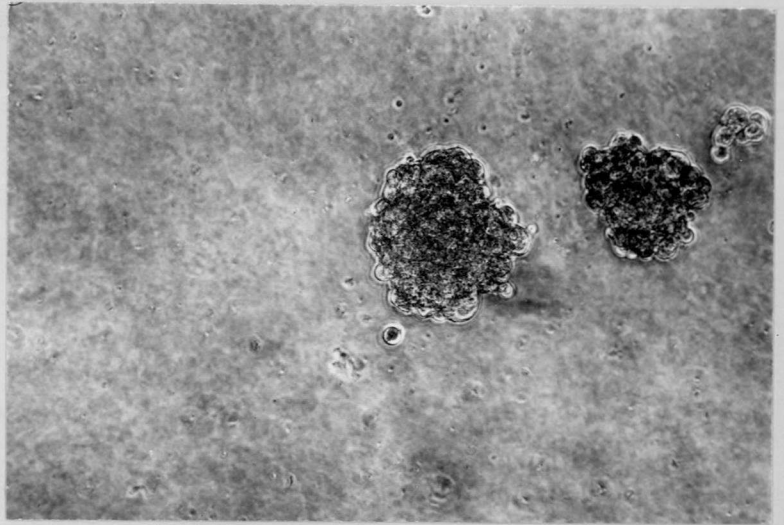


図7

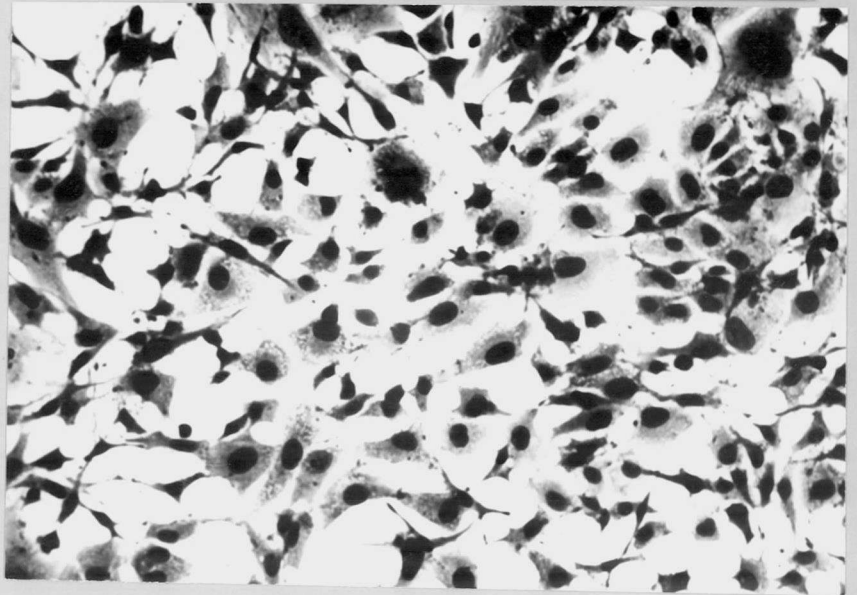
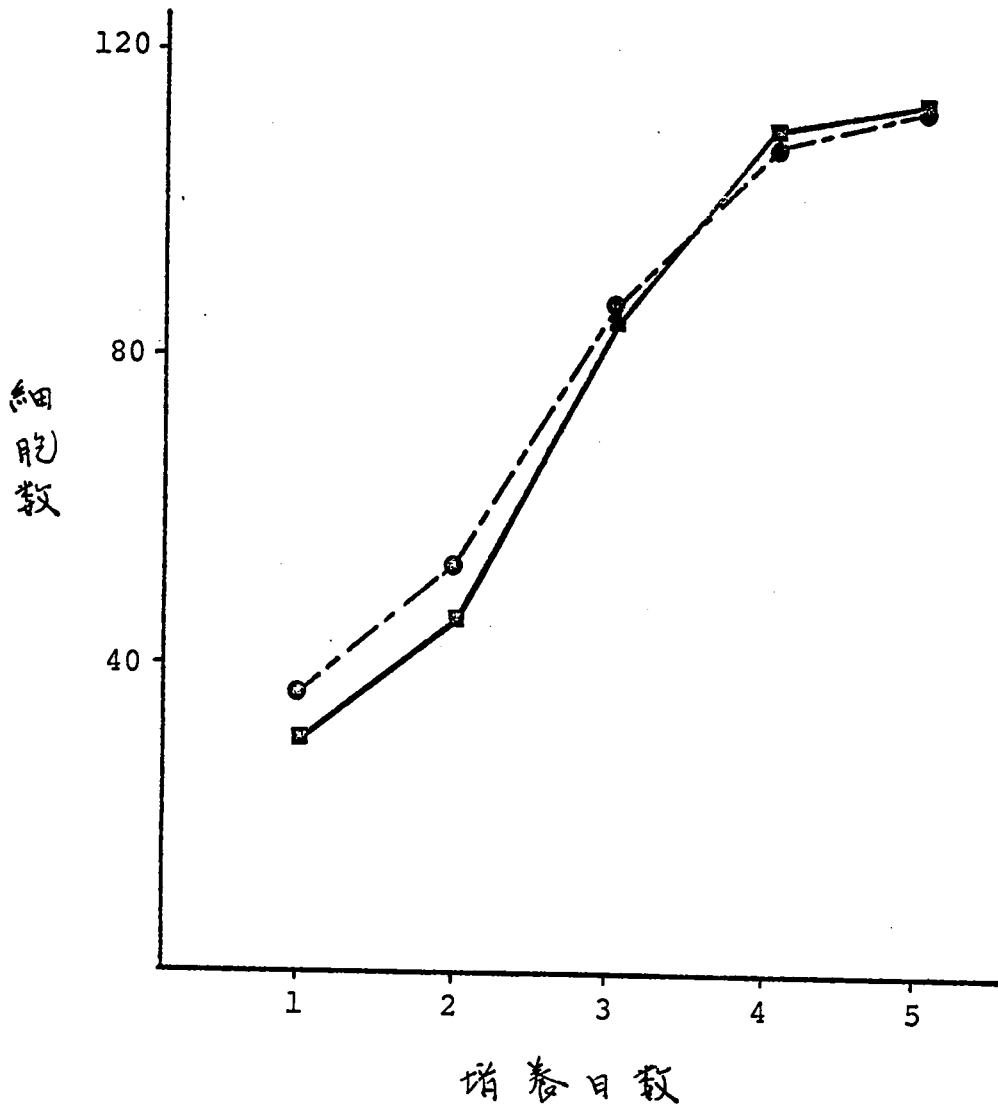


図5 軟寒天中で形成された HPA 細胞のコロニー
細胞継代後5代目の HPA 細胞を軟寒天中、34°C で
20日間培養した。(X100)

図7 軟寒天中で形成されたコロニー由来の
単層培養細胞。この細胞は鶏株細胞である
HPA 細胞に比較して小型の星状細胞形態を示した。
図5の継代5代目の HPA 細胞が形成したコロニーを採取
後、6回継代培養したもの。(ギムザ染色 X100)

図6. HPA細胞の34°Cより37°Cにおける
増殖曲線



培養温度 ■—■ 34°C, ●---● 37°C.

HPA細胞 (60×10^4) を 30mm 径ペトリ皿に入れ、34°C
より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。死滅細胞の判定には Nigrosin exclusion
test を使用した。

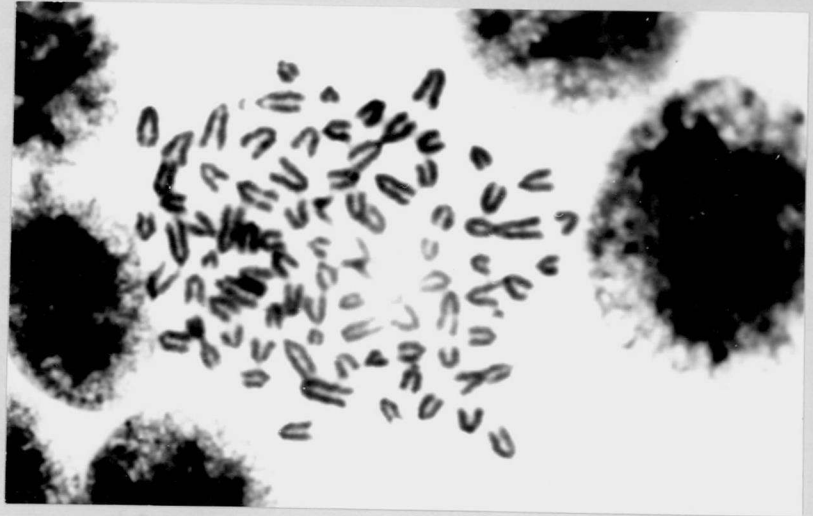


図-8 HPA細胞の染色体

細胞継代数30代目において HPA細胞の染色体数は83
にピークを有する分布を示す。(ギムザ染色 × 1,000)

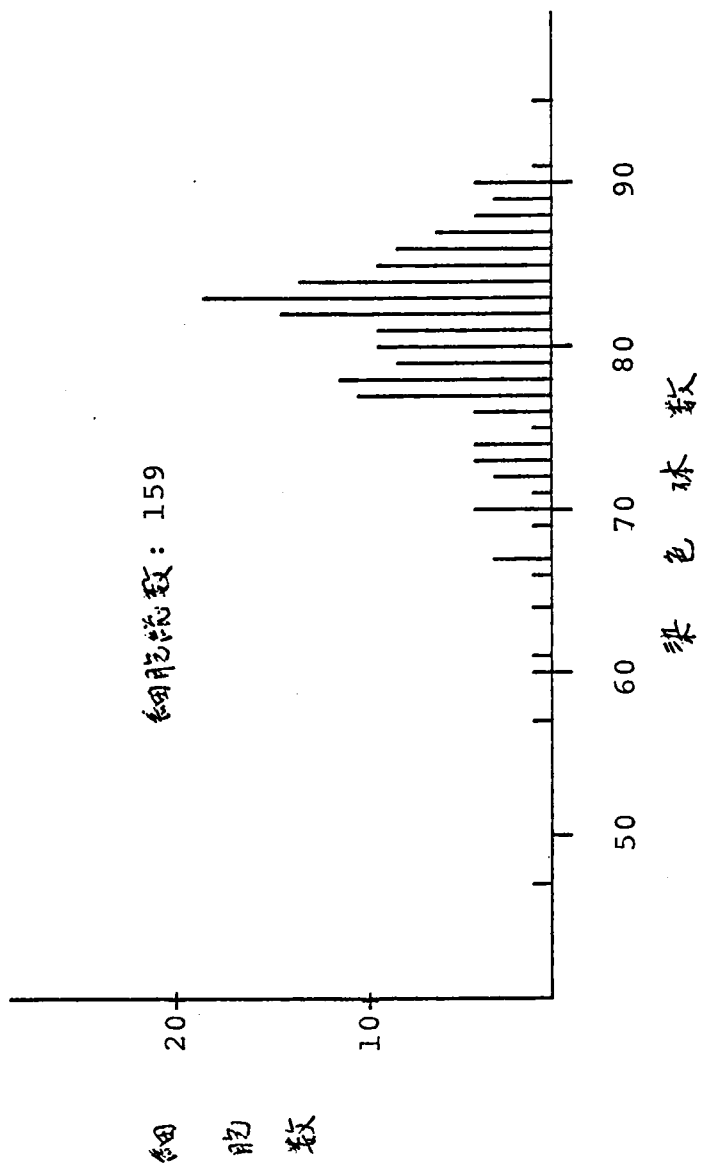


图9. HPA 細胞(總数 30 枚目)の
染色体数の分布

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。すなわち、

a-、約80Å径微細線維が核周囲から細胞質全体に散在し、
ミトコンドリア、粗面小胞体は細胞質周辺部に存在する筋上皮
細胞に類似した細胞。一部の細胞には飛送した golgi
装置を認める。(X 12,000)

b-、0.8μmの顆粒を有し、細胞膜には basal infolded membrane
の形態を残している。存在が筋上皮細胞と同定できる。
(X 9,000)

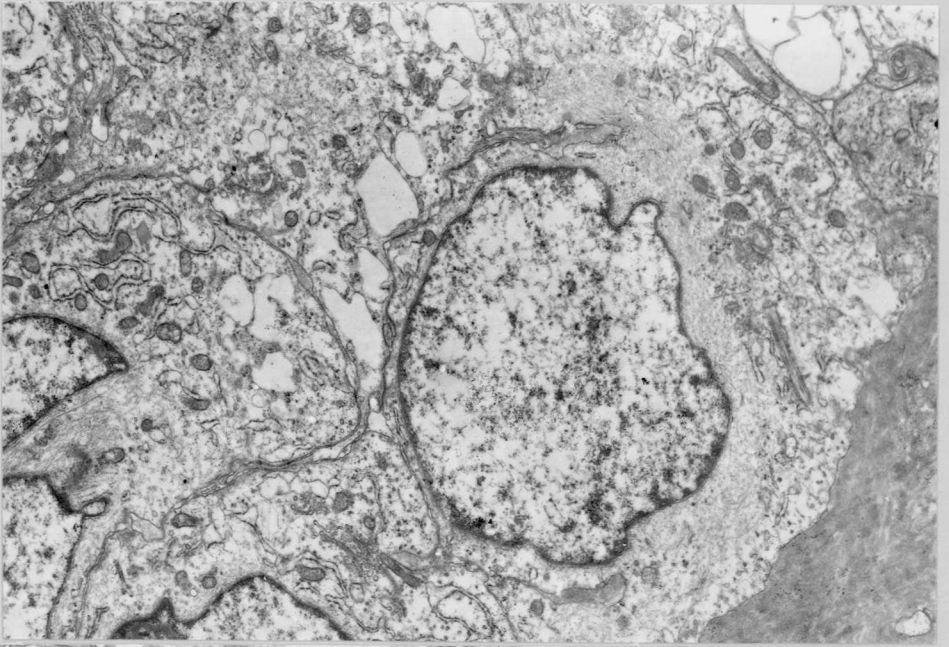


图-10a

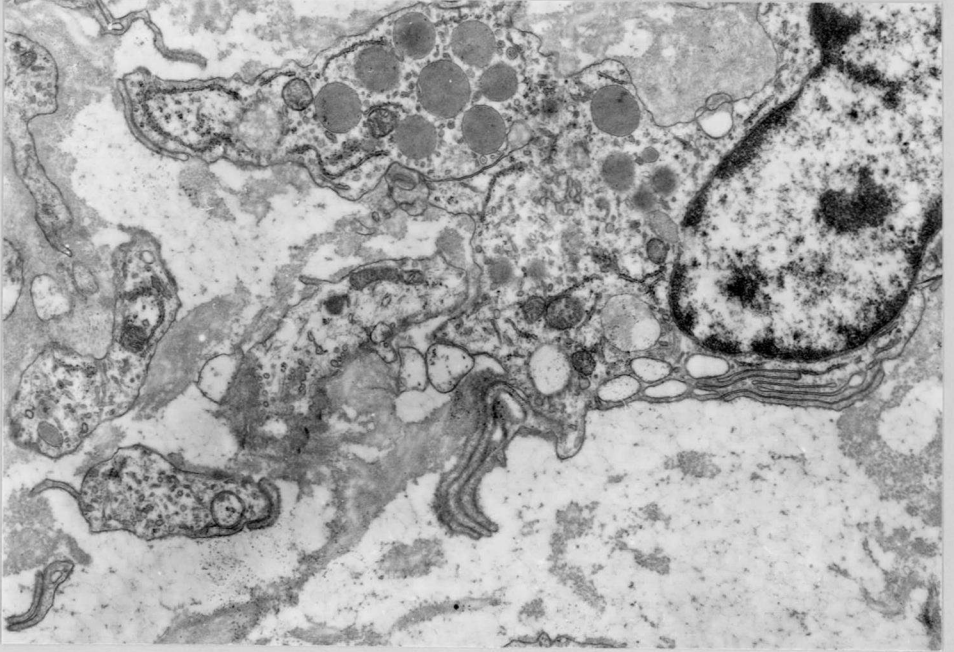
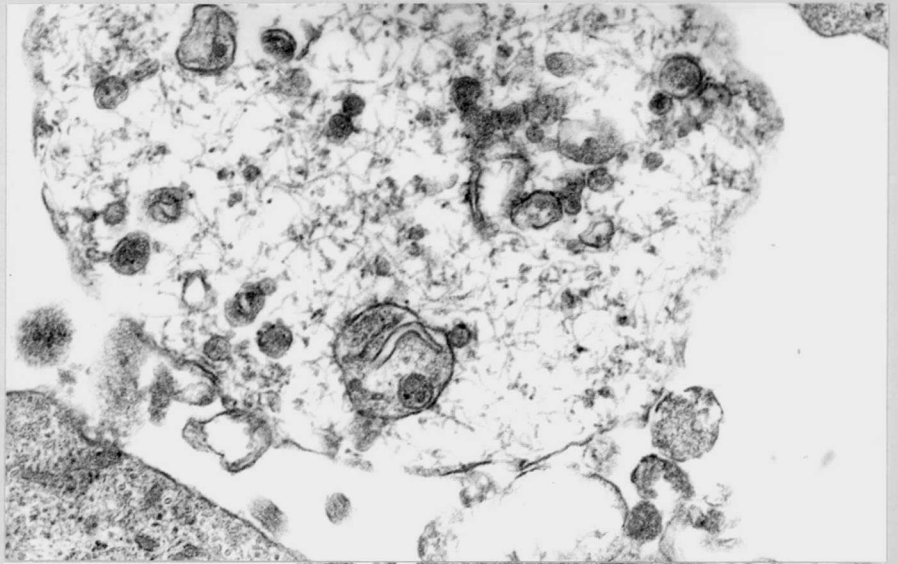


图-10b

a



b

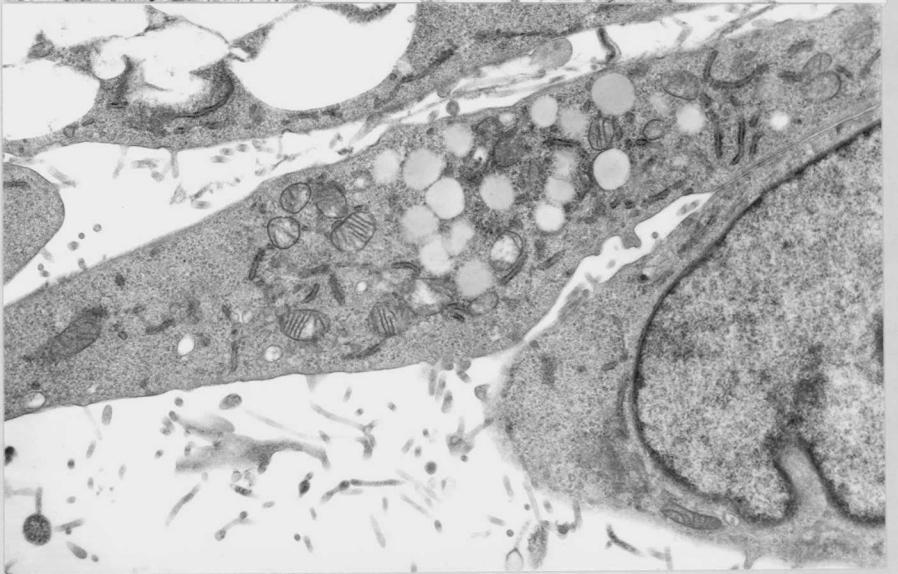
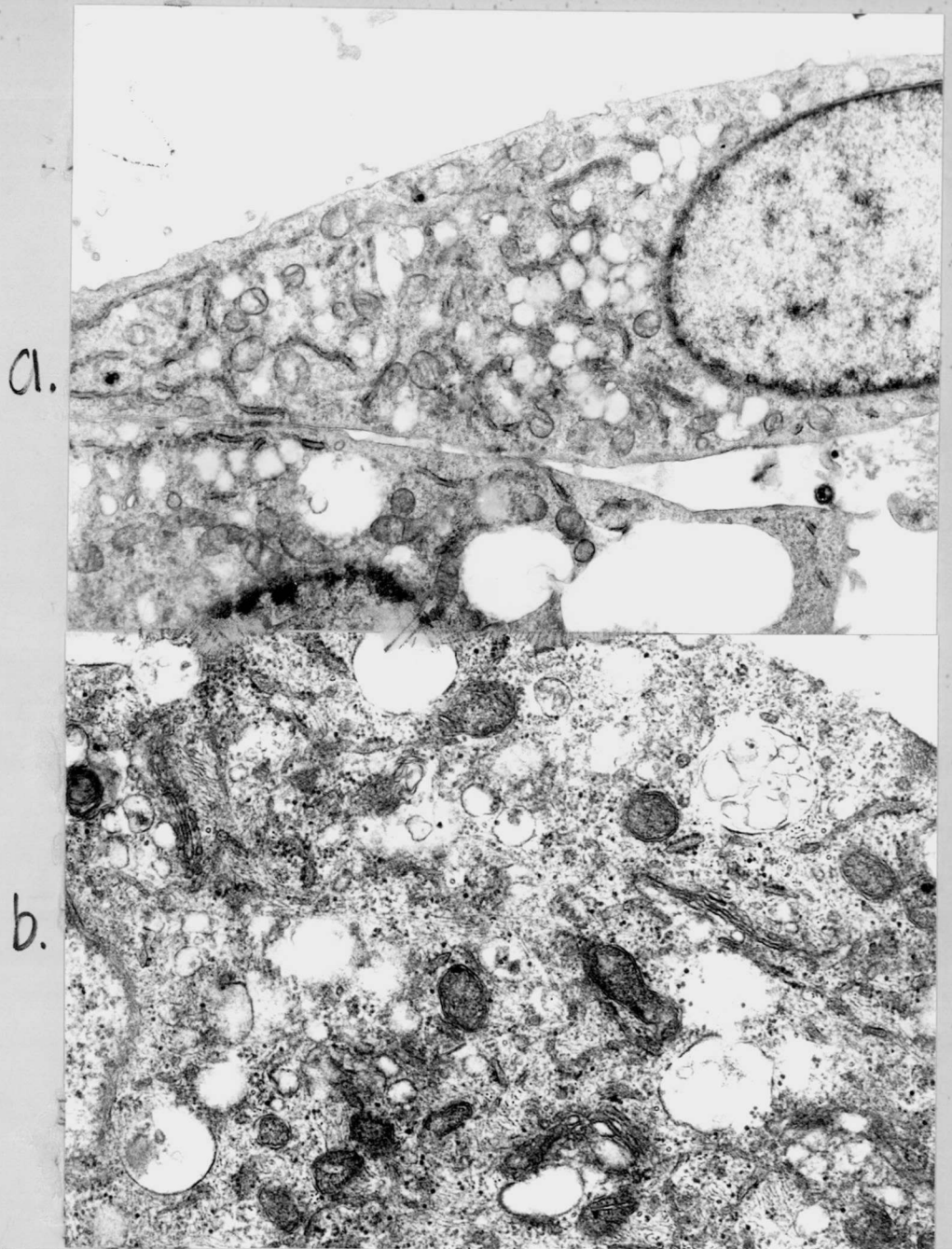


図-11 HPA細胞の超微構造

HPA細胞は細胞継代数初期において *in vivo* と同様の形態と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 80\AA 径の微細繊維を有している。(継代10代目の細胞を 37°C で培養したもの。 $\times 40,000$)
- b. もう1つは分泌管上皮細胞に由来した細胞と考えられる。粘多糖の顆粒を保有し、粗面小胞体、糸状体は細胞質全体に散在している。(継代16代目の細胞を 37°C で培養したもの。 $\times 11,000$)



四-12 HPA細胞の超微構造

HPA単層培養には前記の2種類の細胞形態と共有する
 点の細胞が存在した。分泌顆粒を有するとともに微細線維
 を含んでいる。隣接細胞との接合部には接着板が見られる。

a- 細胞継代数26代目のHPA細胞を37℃にて培養した。(低倍率。
 x 10,000) b- その高倍率を示す (x 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、7日間培養した。その上清
から蔗糖密度勾配法で精製した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。
均一核と二重外膜を保有している。
(ウラニル、水酸化鉛染色, $\times 80,000$)

図-14 HPA細胞に持続感染しているCMV
粒子の発現

HPA細胞を34°Cにて培養したのち、電子顕微鏡
にて観察すると、多数のCMV粒子と認められた。
顆粒状の核と外膜が halo 状構造と呈する。
(ウラニル、水酸化鉛染色 $\times 70,000$)

图-13a.

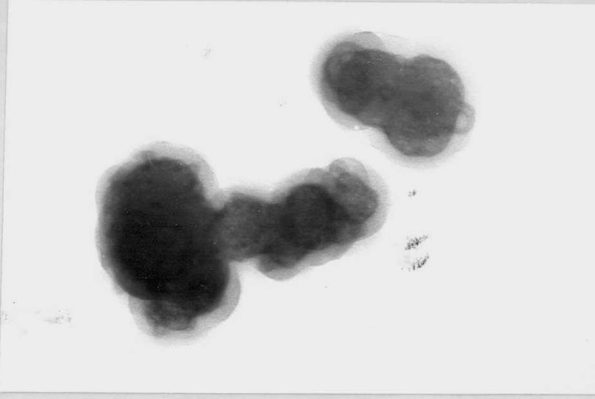


图-13b

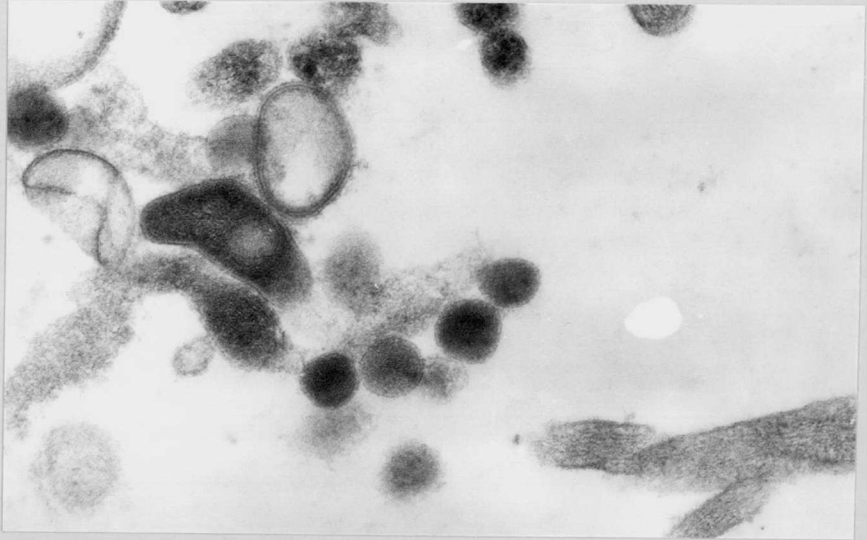
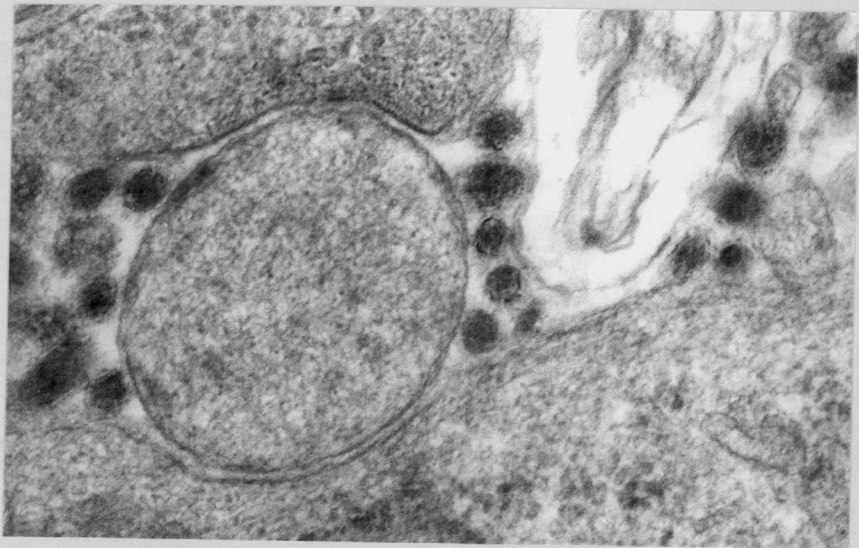
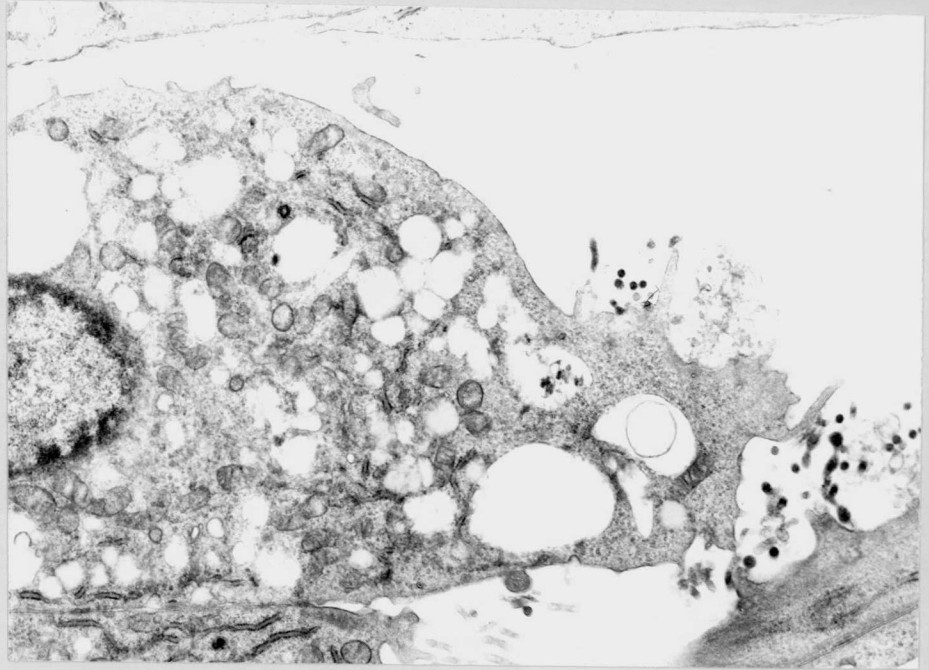


图-14





四-15 軟骨文中で形成されたコロニーに
 由来する培養細胞の超微構造。

クローニングされた細胞は前記の含の子形態と呈した。
 約80Å径の微細繊維、発達の良いgolgi装置、分泌顆粒
 と細胞質内に保有している。細胞膜付近には約150Å径の
 線維が見られるとともに、隣接細胞との接合には接着板が
 観察される。細胞間には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。(×12,000)