

Title	放射線照射を受けたヒト顎下唾液腺からの造腫瘍性細胞の分離
Author(s)	菱田, 市和
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/33795
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

放射線照射を受けたヒト顎下唾液腺
からの造腫瘍性細胞の分離

菱 田 市 和

脚注

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座（主任；宮崎 正教授）

本論文の要旨は，昭和56年10月第26回および昭和58年9月第28回の日本口腔外科学会総会，また昭和58年10月第42回日本癌学会総会において一部発表した。

緒 言

発癌研究の最終目的はヒト発癌機構についてよく理解し、発癌を予防することにあると思われる。しかしヒトで発癌実験を試みることは勿論許されないので発癌に関する研究はその殆んどが実験動物を用いて行なわれている¹⁾。また、現在ヒト発癌機構を研究するための適当な実験システムは確立されていない。そのため、ヒト発癌の原因に関する研究は歴大な疫学調査および間接的な臨床研究を中心に進められている²⁾。その結果、ヒト発癌の多くは我々をとりまく種々の環境物質に起因し、それらの環境物質はヒト発癌過程に発癌因子あるいは促進因子として強く関与していると推察されている³⁾。

発癌に関与する多くの環境因子の中で、放射線が腫瘍を誘発したと考えられる事実は1) 原子爆弾被爆生存者、2) 放射性物質を取り扱った人々、3) 診断上のX線照射や放射線治療を受けた患者などについての疫学調

査によってすでに示されている⁴⁾。さらに上記の疫学的調査結果は、放射線照射による腫瘍発現の感受性が各種臓器によって異なることも指摘している。その中で、唾液腺は骨髄、甲状腺について放射線照射に対して腫瘍化しやすい臓器の一つとしてあげられている⁵⁾。すなわち、唾液腺腫瘍の発生は原爆被爆者群が非被爆者対照群に比べて有意の数で多いことが報告されている⁶⁾。また頭頸部の放射線治療後に新たに唾液腺腫瘍の発生がしばしば見られることも多くの研究者によって明らかにされている^{7,8)}。

この様な疫学的報告から、著者は多量の放射線照射を受けた患者の唾液腺においては腫瘍化が開始されているのではないかと考えた。

本実験は、口腔癌治療のため放射線照射を受けたヒト顎下唾液腺から造腫瘍性細胞を *in vitro* に分離することにより放射線照射後における唾液腺の腫瘍化過程を明らかにしようとしたものである。

実験材料ならびに実験方法

1. 実験材料

この実験に使用したヒト顎下唾液腺組織は26名の患者から外科的手術によって得た。すなわち昭和54年度から昭和57年度にかけて大阪大学歯学部附属病院第一口腔外科を受診した口腔悪性腫瘍あるいは腺体内唾石症と診断された患者から摘出された顎下唾液腺を実験材料とした。16例の顎下唾液腺は、手術前にそれぞれの口腔癌治療のため2800 radsから5800 radsのコバルト60外部照射を顎下唾液腺を含む領域に受けた患者から上頸部あるいは全頸部廓清手術時に同時に摘出されたものを用い、これを照射唾液腺とした(表-1)。一方、術前にコバルト60外部照射を上頸部に受けなかった口腔癌患者7例および唾石症患者3例から採取した顎下唾液腺10例を非照射

唾液腺対照として実験に供した(表-2)。

なお照射群の年齢分布は38才から72才また性別は男性12例女性4例であった。また非照射対照群の年齢分布は47才から70才また性別は男性8例女性2例であった。

なおヒト肝臓, 膵臓, 前立腺および乳腺は, 死後約3時間以内に摘出され, 成人病センター一病理部石黒医学士より提供された。

2. 細胞分離ならびに培養法

照射唾液腺および非照射唾液腺から細胞を *in vitro* に分離するために組織片培養法を用いた。初代培養を次の様に行なった。まず摘出された顎下唾液腺からリンパ節を除き, 腺体中央部の組織を無菌的に採取しペトリ皿に入れ, 1000 units/ml のペニシリン G を含む Eagle の最少必須培養液 (MEM, 日水製薬社製, 大阪) にて3回洗浄した。その組織をハサミで約2mm立方の大きさに細切したのち, 細切片の一部を60mm径プラスチック皿上に約20分間静置した。細切片が皿底面に充

分付着したことを確認したのち、5 mlの増殖培養液を添加、5%炭酸ガス培養器中37℃にて培養を行なった。なお増殖培養液としてEagleのMEM培地に10%仔牛血清（阪大微生物病研究所・大阪）と、2 mM L-グルタミンを加えたものを使用した。培養初期では培養液の交換は10日毎に行ない増殖してきた細胞数が増すに従い培地交換の頻度を多くし、細胞がsubconfluentになった約30日後には4日間隔で培地を交換した。培養開始40日から50日経過した時期に細胞はconfluentの状態になった。この時期に最終濃度0.08%トリプシン（阪大微生物病研究所）および、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（EDTA、石津製薬社製、大阪）を含むCa⁺⁺、Mg⁺⁺を含まないリン酸緩衝液PBS(-) (pH. 7.2) にて1分間室温で処理し、細胞を採取した後に、200 xgで10分間遠沈した。

その細胞沈渣をMEMにて3回洗浄した後、上記増殖培養液に 2×10^5 個/mlの割合で浮

遊させたものを60mm径あるいは90mm径ペトリ皿に入れ、5%炭酸ガス培養器中で37℃にて5日から10日間隔で継代培養を行なった。なお照射唾液腺由来の細胞をR-2からR-17、また非照射唾液腺由来の細胞をnc-1からnc-10と、それぞれ略記した。

また、ヒト羊膜由来のFL細胞⁹⁾、ヒト子宮頸部癌由来のHeLa細胞¹⁰⁾、当教室で樹立した照射唾液腺由来のHSG細胞¹¹⁾、ならびにヒト多形性腺腫由来のHPA細胞¹²⁾、ヒト歯肉癌由来のGK-sq細胞¹³⁾、を共に実験に供した。

3. 試 薬

12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (Sigma社製, Saint Louis, MO, U.S.A., 以下TPAと略記する) と Retinoic Acid (Sigma社製, Saint Louis, MO, U.S.A., 以下R.A.と略記する) は Dimethyl Sulfoxide (石津製薬社製, 以下DMSOと略記する) にて溶解した後, 試験管に分注し, -20℃にて保存した。

4. 軟寒天中でのコロニー形成能の算定¹⁴⁾

60mm 径 ペトリ皿上に寒天 (Special agar Noble, Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.) を最終濃度 0.6% の割合に含む増殖培養液を 3 ml 入れ硬化後, 寒天を 0.3% の割合に含む増殖培養液 2 ml に細胞を 10^3 , 10^4 または 10^5 個混入し, 先に硬化した寒天上に重層した。次にこの細胞を 5% 炭酸ガス培養器中で 37°C にて培養を行い, 培養 20 日後に形成された 10 個以上の細胞集団を 1 コロニーとして顕微鏡下で倍率 40 倍にてその数を算定した。

細胞のコロニー形成能に対する TPA あるいは R.A. の影響について調べるため, それぞれの濃度に調整したこれらの試薬を下層の軟寒天培養液中に混入した。なお, TPA および R.A. の熱変性, および細胞に対する温度障害を除くために, 混和の際, 寒天培養液の温度を 40°C 前後に保った。

5. 培養細胞の倍加時間および細胞飽和密度
細胞増殖速度の算定は以下のように行なった。すなわち, 6×10^5 個の細胞を増殖培養

液 3 ml に浮遊させたものを 30mm 径ペトリ皿に入れ, 5% 炭酸ガス培養器中 37℃ にて培養した。その後, 経時的に各々ペトリ皿上の細胞数を算定し片対数グラフで倍加時間を求めた。細胞飽和密度は細胞増殖が停滞期に達した時の細胞数を算定した。

なお細胞数の判定には Nigrosin exclusion test を使用した。

6. 細胞の DNA 合成測定法

増殖培養液にて 2.5×10^4 個/ml に調整した細胞を 24 穴 cell-well (Corning 社製, New York, U.S.A.) に 1 ml ずつ入れ, 37℃ にて培養した。細胞が subconfluent に増殖した時期に増殖培養液を除いて, 100 ng/ml の濃度に調整した TPA を含むあるいは含まない増殖培養液 1 ml で処理を行ない, DNA 合成測定は次のようになった。すなわち, 各種薬剤を含む培地で 20 時間培養後, その培養液を吸引除去し, 1μ Ci/ml に調整した 6-H³チミジン (RCC Amersham Specific Activity 20μ Ci/mmol) で 60 分間 pulse-label

を行なった。4℃のDulbeccoのリン酸緩衝液（D-PBS pH 7.2）にて3回洗浄したのち5% Trichloroacetic acid（TCA，石津製薬社製）で酸不溶画分を沈殿させた。1mlの0.5N NaOHでその不溶画分を溶解してその0.1mlを0.5NのHClで中和後，シンチレーションカクテルに溶解した。その放射活性を液体シンチレーションカウンター（Aloka社製，LSC-673）で測定した¹⁵⁾。

7. 細胞のヌードマウスへの移植

培養細胞の造腫瘍性を検討するために3～4週齢ヌードマウス（Balb/C AJC-nu，日本クレア）を用いた。EDTA-トリプシンにて採取した細胞を0.1mlのMEMで細胞数 10^6 あるいは 10^7 個に調整したものを背部皮下に接種した。接種後約3ヶ月まで，腫瘍が形成されるか否かを判定した。

なお腫瘍の形成を見た場合，腫瘍の大きさが小指頭大になった時にそれを無菌的に切除し，組織学的観察を行うとともに，さらに腫

瘍から細胞を得るため組織片培養法を行なった。

8. 光学顕微鏡による観察

正常および腫瘍組織の一部を10%ホルマリ
ン溶液 (pH 7.3) にて固定後, 通法により組
織切片を作製し, ヘマトキシリン-エオジン
染色を施した。観察には日本光学社製生物顕
微鏡L型を用いた。

培養細胞の観察には日本光学社製倒立顕微
鏡 Type AFX-II を用いた。

9. 電子顕微鏡による観察

90mm 径ペトリ皿上で形成された培養細胞
をラバーホリスマンを用いて採取し, 200 xg,
5 分間遠沈した。次いでこの細胞を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%になるよう
調整したグルタールアルデヒド (石津製薬社
製) 溶液中で1時間固定した。

その後, グルタールアルデヒドを完全に除
去するために上記リン酸緩衝液で十分洗浄後,

同緩衝液中 4℃にて一夜放置した。次に 2% 四酸化オスミウム溶液 (OsO_4 , Merk 製) 中 4℃ で 2 時間固定後, 冷エタノール系で脱水した。プロピレンオキシド (石津製薬社製) に浸透させ Luft 法¹⁶⁾ によりエポキシ樹脂 (応研商事) 包埋したものを 20 時間ずつ 37℃, 45℃ ならびに 60℃ 恒温器中で順次加熱重合した。

また, 細胞の接種により生じたヌードマウス腫瘍をリン酸緩衝液にて最終濃度 4% となるように調整したグルタルアルデヒド溶液中で約 2 mm 立方に細切し, 同溶液中で 2 時間固定した。その後, 前述の培養細胞と同様の過程を経てエポキシ樹脂包埋を行なった。包埋ブロックは LKB 製ウルトラトームで 600~800 Å の超薄切片を作製し, 4% 酢酸ウラニールならびに水酸化鉛の二重染色¹⁷⁾ を施した。

観察には日立電子顕微鏡 HU-12A 型を使用し倍率 3,000 倍から 15,000 倍で観察, 写真撮影を行った。

10. 抗ヒト全唾液家兔抗血清の作製法

1) ヒト唾液抗原の調製

5人の健常成人男子（血液型O）から採取した混合唾液を、3,000 r.p.m./分20分間遠沈した。さらに細菌などの不純物を除くため、得られた上清をミリポアーメンブラン（東洋ろ紙、大阪、TM-2型、孔径 $0.45\mu\text{m}$ ）に通過させた後、滅菌蒸留水で一夜透析した。次いで凍結乾燥後、得られた試料を -20°C にて保存した。

2) 抗ヒト全唾液家兎血清の作製

上記の過程を経て得た凍結乾燥試料を滅菌蒸留水で 50mg/ml に調整したものと Freund's complete adjuvant (Difco Laboratories) とを等量ずつ混和後、超音波処理を行ない均質な油中水型エマルジョンとした。

免疫動物として家兎（オス、体重 3kg ）を用いた。上記のエマルジョンの 0.5ml ずつを四肢に4ヶ所筋肉内注射を10日間隔で4回行なった。次いで15日間隔で濃縮唾液 1ml ずつの皮下注射を3回行なった。毛細管法で沈降

線の確認後に家兎から採血を行ない抗血清とした。得られた抗血清は、 -20°C にて保存した。

11. 酵素抗体法¹⁸⁾

上記の抗ヒト全唾液家兎血清として作製した標品が唾液腺組織に特異的な抗体を有するか否かを判定するために酵素抗体法を用いた。

唾液腺，乳腺，前立腺，肝臓および膵臓をホルマリン固定後，通法に従いパラフィン包埋した。厚さ $4\mu\text{m}$ 切片を作製し，アルブミンスライドグラスに貼りつけた。

キシレンにて脱パラフィン処理を行なった後，DAKO社のPAPキット（Dako patts, A/S製，Denmark）を使用し染色した。まず内在性ペルオキシダーゼ活性を破壊するために切片を3%過酸化水素水にて5分間処理後， 4°C D-PBSで5分間洗浄した。次いで免疫グロブリンが持つ荷電，あるいは何らかの物理化学的性質により，組織中の蛋白体と非特異的に反応するのを防止するためあらかじめ正常ブ

タ血清にて20分間切片を前処理した後，2倍あるいは4倍にD-PBSで希釈した抗ヒト全唾液家兎抗血清を一次抗体として用い，37℃の湿温箱中にて切片を一夜処理した。20分間D-PBSで洗浄後，二次抗体として抗家兎 γ -グロブリンブタ血清と20分間37℃で反応させた後，冷D-PBSで洗浄した。2つのウサギイムノグロブリン分子と3つのペルオキシダーゼで構成されるペンタメリックなPAP complex (soluble horseradish peroxidaseantihorseradish peroxidase complex) を切片の抗原局在部に先に結合させたブタ・イムノグロブリンに結合させるために20分間処理した。ついで過酸化水素水と3-amino-9-ethyl carbazole (AEC) を加えて抗原局在部に特異的に結合したペルオキシダーゼによる酸化反応を行い，水溶性の赤褐色色素で発色させた。

マイヤーヘマトキシリンにて1分間対比核染色を行なったのち，グリセリン緩衝液にて封入した。なお免疫前に採取した家兎抗血清

を本実験の対照抗血清として用いそれぞれの切片を染色した。

抗ヒト全唾液家兎血清の臓器特異性を調べる目的で、ヒト唾液、ヒト血球（血液型O）ヒト肝組織のそれぞれのホモジネートを抗原として、抗血清の吸収試験を行なった。すなわち蛋白濃度 5 mg/ml から 5 μ g/ml に希釈した各種抗原 1 ml と各濃度に希釈した（ $\times 1$, $\times \frac{1}{2}$, $\times \frac{1}{4}$ ）抗血清 1 ml とを混合後、4 $^{\circ}$ C にて一夜放置した。次いで 7,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C で 20 分間遠沈後の上清を一次抗体として用い、唾液腺を酵素抗体法にて染色した。

12. 螢光抗体法

培養細胞のヒト全唾液抗原の有無を間接螢光抗体法を用いて検討した。

細胞を 24 \times 32mm カバーグラスを入れた 60mm 径ペトリ皿に 5 \times 10⁵ 個入れ 37 $^{\circ}$ C で培養した。3 日後培養細胞を 4 $^{\circ}$ C の D-PBS (pH. 7.1) で 3 回洗浄した後 4 $^{\circ}$ C のアセトンで 10 分間固定し、空気中に放置してアセトンを除

去した。ついで D-PBS で細胞を浸漬し，前述の抗ヒト全唾液家兎抗血清と 37℃ 湿温箱中で 1 時間反応させた。なお対照として，免疫前の家兎血清を一次血清として用いた。未反応抗血清成分を除くため標本を振とうしながら D-PBS で 1 時間洗浄した。次に FITC を結合させた抗家兎 γ -グロブリンブタ血清 (Dako patts, A/S 製, Denmark) とさらに 1 時間，37℃ にて反応させた。再度，D-PBS で 1 時間洗浄したものを 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後，螢光顕微鏡装置 FL 型 (日本光電工業社製) を用いて UV 励起下で検鏡し，写真撮影した。

13. 培養細胞の染色体分析法¹⁹⁾

培養細胞を 1×10^4 個/ml に調整したものをカバーガラスを入れた 60mm 径ペトリ皿に入れ，3 日後に以下の方法で染色体標本を作製した。

コルヒチン (石津製薬社製) $0.05 \mu\text{g/ml}$ を含む増殖培地で 37℃ にて 12 時間，処理を行な

った。培養液を除去後，3 ml 低張液（0.075M KCl 2 容量と，0.06% NaCl 1 容量との混合液）で15分間37℃に放置した。次いでカルノア原液（メタノール3容量と酢酸1容量との混合液）を加え15分間室温で放置し，さらにカルノア原液の溶液交換をして15分間固定した。このように固定したカバーガラス上の培養細胞を室温で2日から5日間放置し，10%ギムザ溶液で20分間染色後カナダバルザムで封入した。観察には油浸レンズを使用して1,000倍に拡大し分裂中期の染色体を写真撮影した。

14. 蛋白定量

Lowryらの方法²⁰⁾に準じて行なった。

実験結果

1. 実験に使用した顎下唾液腺の組織像

実験に使用した顎下唾液腺26例すべてを，まず光学顕微鏡で観察した。その結果，全て

の切片において腫瘍化を思わせる組織像はみられなかった。

非照射顎下唾液腺は腺構造に破壊は少なくほぼ正常所見を有していた（図-1A）。

照射顎下唾液腺での組織像は、すでに報告されている照射唾液腺の形態的研究結果と一致する所見を示した²¹⁾。すなわち推定吸収線量および摘出までの期間に比例して、腺組織の破壊と線維化が進行する傾向がみられた。

3000 rads 前後の照射を受け約 2 ヶ月後摘出された顎下唾液腺では漿液細胞の外形の多様化と縮少がみられたのに対し、粘液細胞および導管細胞は比較的構造を保っていた。しかし摘出時期が 3 ヶ月後に及んだり、また 5,000 から 6,000 rads の照射を受けた唾液腺では粘液細胞および導管細胞にも破壊が進んでいた。

しかし一部の導管細胞および筋上皮細胞はその構造を比較的保持していた（図-1B）。

2. 細胞形態およびその動態

26 例すべてにおいて培養開始 4 日から 7 日

にかけていくつかの組織片から細胞増殖がみられた。それらの細胞は形態的に多角形または立方形を示す上皮様細胞と、細長い二極性の線維芽様細胞との混在したものであった(図-2)。さらに、これらの細胞を約40日から50日間培養することによって上皮様細胞と線維芽様細胞からなる単層培養細胞が得られたので、EDTA-トリプシンにて細胞を採取することによって継代培養を行い実験に用いた。

それぞれの細胞について *in vitro* での transformation の一つの指標である軟寒天中でのコロニー形成能の有無²²⁾について調べた。その結果、継代初期(継代数3から5代)においてコバルト60外部照射を受けた唾液腺由来の培養細胞16例中7例(R-4, R-5, R-8, R-9, R-11, R-14, R-17)にコロニー形成能を有する細胞が存在することがわかった(図-3)。一方、放射線照射を受けなかった対照群由来の培養細胞では、いかなる細胞継代時

期においてもコロニーを形成する細胞は存在しなかった。なお，上記照射唾液腺由来の7例のコロニー形成率は1.0%以下と極めて低い率であった(図-3)。この培養初期のコロニーをパスツールピペットで採取し，細胞のクローニングを試みたが，安定した増殖を示すクローン細胞を分離することができなかった。そこで，種々の細胞が混在した状態で継代培養をつづけた。その結果，殆んど培養例においてその細胞分布は過増殖を示した線維芽様細胞で占られた。この様に線維芽様細胞の過増殖を示したものは，培養初期に軟寒天中でコロニー形成能を有したR-4, R-9, R-11, R-17でさえもその能力を消失するとともに細胞継代数6代から12代でその細胞増殖を停止した(表-3)。

しかし，R-5, R-8, R-14は継代を重ねるにつれて細胞分布として上皮様細胞の割合を増すとともに徐々に軟寒天中のコロニー形成率が増加した。さらに細胞が10%前後のコロ

ニ一形成率を示した時（すなわち R-5 では継代 35 代，R-8 では継代 37 代，R-14 では継代 13 代）に形成されたコロニーから分離された細胞は，各々ヌードマウス移植により造腫瘍性を有することがわかった。そこでこれらの造腫瘍性を有するクローン細胞を R-5_{sn}，R-8_{sn}，R-14_{sn} と名づけ以後の実験に用いた。

3. 顎下唾液腺由来培養細胞のコロニー形成能における TPA の効果

上記のごとく照射唾液腺培養細胞中 3 例からヌードマウス移植で造腫瘍性を示す細胞を分離することができた。しかし培養初期においては，この性質を有しておらず，造腫瘍性を獲得するまでには 13 代から 37 代の継代培養を要した。

さて，動物発癌実験において，種々の発癌因子によって潜在的腫瘍細胞となった細胞は，TPA で処理することによって速やかに腫瘍細胞になることがよく知られている²³⁾。もし，TPA がヒト潜在的癌細胞に対して高い発癌

プロモーター活性を示すならば，また照射唾液腺由来の培養細胞中にいわゆる潜在的癌細胞が含まれるならば，その細胞をTPAにて処理することによって速やかに造腫瘍性細胞に transfrom させることが可能と考えた。

先ず継代2代のR-14の軟寒天中でのコロニー形成能に対するTPA効果を知るために最終濃度0 ng/mlから200 ng/mlに調整したTPAを軟寒天培養液中に加えてR-14を培養した。その結果，R-14のコロニー形成能はTPA処理によって促進し，その効果は100 ng/mlの濃度において最大活性（未処理対照と比較して約14倍）を示すことがわかった。なお非照射顎下唾液腺由来のnc-8はいかなる濃度のTPAで処理してもコロニーは形成しなかった（図-4）。

さらにTPA処理によって形成されたこれらのコロニーから分離したクローン細胞をヌードマウスへ移植した時，各々のクローン細胞は造腫瘍性を有していることがわかった。

そして、このような細胞をR-14_{cn}と名づけた。

すでに述べた様に、R-14は細胞継代を重ねるごとに徐々に軟寒天中でのコロニー形成率が上昇し、継代13代目で自発的に造腫瘍性を獲得する動態をとった。そこで培養初期にみられたTPAによるコロニー形成促進効果が継代を重ねたR-14においてもみられるか否かについて調べるため、各継代毎の細胞についてTPA効果を判定した。その結果、TPAの効果は継代を重ねるにつれて低下し、造腫瘍性を示すクローンを分離できた時（継代13代）には、そのTPA効果はみられなかった（図-5）。

次にR-17に対するTPAの影響について調べた。R-17は培養初期において少数の上皮様細胞と多数の線維芽様細胞の混在した細胞分布からなり2代目で0.014%の細胞が軟寒天中でコロニーを形成していたが、継代をくり返すにつれて大多数の培養細胞が線維芽様細胞となりその細胞増殖が停止する動態をと

ったことはすでに述べた。R-17に対するTPAの影響は以下のごとくである。少数の上皮様細胞が混在した継代2代から4代目において、R-17の軟寒天中でのコロニー形成率をTPA (100 ng/ml) は未処理対照と比較して約400倍に上昇させた(図-6)。TPA未処理の母細胞は継代9代目にその増殖を停止したのに対し、上記のTPA処理により形成されたコロニーから分離したクローン細胞R-17_{tn}はヌードマウス移植により造腫瘍性を示した。

以上、照射唾液腺培養細胞(R-14, R-17)中にはTPA処理によってコロニー形成能が促進される上皮様細胞が含まれていたことを示した。しかし、R-14培養系で示したようにTPAのこの効果は造腫瘍性を有するようになった時期にはみられなくなった。このことを確認するために、ヌードマウス移植によってすでに造腫瘍性を有している培養細胞に対するTPAの影響を調べた。その結果、表

— 4 に示した様に R-14_{tn}, および R-14_{tn} をヌードマウスに接種することによって形成された腫瘍から in vitro に分離された nuR-14_{tn}, および HSG 細胞のコロニー形成率は TPA 処理によって促進されなかった。

次に, 非照射顎下唾液腺由来の培養細胞中に TPA 処理によって軟寒天中でのコロニー形成能が誘発される細胞が存在するか否かについて調べた。その結果, nc-8 および nc-9 は培養初期に少数の上皮様細胞が含まれていたが, それらの細胞は TPA 処理によってもコロニーを形成し得なかった (表-4)。

以上の実験結果から, 照射唾液腺には TPA の promoter 効果に反応する細胞, すなわち initiation の段階にある上皮様細胞が存在していたことが示唆された。

4. TPA のコロニー形成促進作用に対する R. A. の抑制効果

TPA の promoter 効果に対して拮抗的に作用すると考えられている Vitamin A の誘導体の一

種である R. A. を， TPA (100 ng/ml) を含んだ軟寒天中に添加することによってその TPA 効果が抑制されるか否かについて検討した。その結果，上記の R-14 の継代 4 代目にみられた TPA のコロニー形成促進効果は，添加された R. A. の濃度が増加するにつれて減少し， $10^{-5}M$ の濃度での R. A. は TPA を含まない時のコロニー形成率にまで細胞のコロニー形成能を抑制した (図-7)。

さらに R-17 の継代 4 代目の細胞を使用しても R-14 と同様に R. A. の添加によって， TPA のコロニー形成促進効果が抑制されることもわかった。

5. 細胞飽和密度および DNA 合成における TPA の影響

TPA は培養初期における照射唾液腺由来の培養細胞 R-14, R-17 の軟寒天中でのコロニー形成能を上昇させることがわかった。この TPA が細胞増殖の他のマーカーである細胞飽和密度および DNA 合成に関しても同様

な促進効果がみられるか否かについて検討した。細胞が subconfluent に増殖した時, 100 ng/ml の TPA で細胞を処理すると, R-14 (細胞継代数 4) の細胞飽和密度は 1.95 倍, DNA 合成は 1.91 倍に未処理対照と比較し上昇した。しかし, ヌードマウスでの造腫瘍性を示した R-14_{tn}, R-5_{sn}, HSG 細胞では TPA による上記の効果はみられなかった (表-5)。

以上の実験結果から initiation 段階にあるヒト唾液腺培養細胞は TPA によって軟寒天中でのコロニー形成能が促進されるだけでなく, DNA 合成能および細胞飽和密度をも促進されることがわかった。

6. 造腫瘍性細胞株の性質

上記の実験過程を経て放射線照射を受けた 16 名の患者の唾液腺から 5 株の造腫瘍性細胞を分離し得た。それらは継代培養を重ねることにより自発的に造腫瘍性細胞となった R-5_{sn}, R-8_{sn} および R-14_{sn} と, また TPA 処理することにより得た R-14_{tn}, R-17_{tn} であった。これ

らの細胞は現在40代から200代の継代培養によっても安定した増殖を示す，いわゆる株化細胞である。

1) R-5_{sn} 細胞

形態的所見；細胞は多角形を呈しペトリ皿上で比較的散布性に増殖し，比較的密な単層を形成する。なおこの細胞は他の4株に比べpile-up傾向が少ない（図-8A）。

これらの細胞を電子顕微鏡で観察すると，多くの細胞は楕円形の単純な細胞形態をなすが，部分的に微細絨毛がみられた。細胞間嵌合（intercellular digitation）像は見られないが接合部には接着斑（desmosome）と閉鎖小帯（tight junction）がみられた（図-8C）。楕円形の核は細胞質に比較して大きく，2-3個の核小体を含み，細胞質には比較的豊富な小器管を有し，楕円形の糸粒体（mitochondria）遊離リボゾーム，少量の粗面小胞体とゴルジ装置が散在していた。

1×10^7 個の細胞をヌードマウス背部皮下に

接種すると約2ヶ月後に大豆大の腫瘤が形成された。その組織所見は以下のごとくであった。紡錘形または立方形を呈する細胞が一定方向を示す配列像や微小管腔を形成する部分もみられたが、全体としては図-8Bに示した様に未分化癌様構造を示した。超微形態的には、細胞は不正円形を示し、不正円形あるいは楕円形の核は、細胞質の中心に位置していた。細胞内小器管の発達は中等度で、ゴルジ装置、糸粒体および粗面小胞体は細胞質内に散在していた。また直径が40Åの筋線維に類似した微細線維がみられた。そして細胞間には、閉鎖小帯および接着斑が観察された。

染色体数 ; 52 (図 - 13)

細胞倍加時間 ; 36時間

細胞飽和密度 ; 35.4 ($\times 10^4$ 細胞/cm²)

2) R-8_{sn}細胞

形態的所見 ; 多角形の細胞が散在性に増殖する先のR-5_{sn}細胞に類似した形態を示す(図 - 9A)。その超微形態もR-5_{sn}のそれと同様

に楕円形の単純な細胞形態を示した。また細胞質にはよく発達したゴルジ装置とともに分泌顆粒を有する細胞も存在した。さらに直径が40Åの筋線維に類似した微細線維が一定方向に配列する像もみられた。細胞間には接着斑がよく発達していた(図-9C)。

1×10^7 個の細胞をヌードマウス背部皮下に接種すると約50日後に大豆大の腫瘤が形成された。その腫瘍を組織学的に観察すると、R-5_{sn}細胞のそれに類似した未分化癌像を示した(図-9B)。すなわち立方形または紡錘形の細胞配列にはあまり極性を認めなかった。超微形態的に腫瘍組織を観察すると、培養細胞のそれと類似した構造を示すが、40Åの筋線維に類似した微細線維は腫瘍組織の方がより著明にみられた(図-9D)。

染色体数 ; 53 (図-13)

細胞倍加時間 ; 30時間

細胞飽和密度 ; $32.0 (\times 10^4 \text{細胞}/\text{cm}^2)$

3) R-14_{sn}細胞

形態的所見；立方形の細胞は単層に増殖して敷石状を呈し，定形的な上皮細胞配列を示し（図-10 A），集団の中心部では pile-up focus を形成する。R-14_{sn} 細胞を電子顕微鏡で観察すると，唾液腺介在部導管上皮細胞に類似した構造を有していた（図-10 C）。細胞は円錐形を呈し，核は細胞質に比し大きく中心に位置しており，1～3個の核小体はしばしばマトリックスを形成していた。細胞表面は凹凸をなし，細胞質には比較的多くの楕円形または円形の糸粒体，粗面小胞体，ゴルジ装置および多量のリボゾームがみられた。この培養細胞の特徴的な所見は，隣接細胞間の接合部にみられた。すなわち接着斑および閉鎖小帯がみられるとともに，細胞質の小突起がループ状構造を呈する腺上皮の一つの特徴である細胞間嵌合像を有していた。

R-14_{sn} 細胞をヌードマウスに接種20日後に形成された腫瘤を組織学的に検索をおこなった。腫瘍の組織像は立方形あるいは多角形の

細胞が梁状に配列する trabecular pattern を示す腺癌像を呈した。しかし細胞の異形性，核分裂は著明でなかった（図-10 B）。

超微形態所見は以下のごとくであった。立方形を呈する腫瘍細胞は互いに密に配列し，閉鎖小帯が多くみられた。接着斑はみられるが培養細胞に比べると著明でなく，また細胞間嵌合像も少かった。核は培養細胞と同様に大きく中央に位置しており，1-3個の核小体を有していた。細胞内小器管は *in vitro* と同様に比較的よく発達し，ゴルジ装置と糸粒体が見られた（図-10 D）。

染色体数；55（図-13）。

細胞倍加時間；26時間

細胞飽和密度；43.6（ $\times 10^4$ 細胞/cm²）

4) R-14_{tn}細胞

形態的所見；R-14_{tn}細胞はR-14_{sn}と比較しやや細長い多角形の細胞形態を示す（図-11 A）。超微形態的にはR-14_{sn}とほぼ類似した形態を有していたが，細胞内小器管の発達は

乏しく遊離リボゾーム，糸粒体に加えて少数の小胞体を認めるのみであった。さらに，R-14_{sn}に認めなかったtonofilamentが散見された（図-11C）。

1×10⁷個の細胞をヌードマウス背部皮下に接種15日後に形成された大豆大の腫瘤の組織像は，R-14_{sn}細胞に類似した梁状の腺癌を示した（図-11B）。その超微形態もR-14_{sn}のそれに類似していた（図-11D）。

染色体数；56（図-13）

細胞倍加時間；25時間

細胞飽和密度；62.7（×10⁴細胞/cm²）

5) R-17_{tn}細胞

形態的所見；R-17_{tn}細胞はR-14_{tn}と類似した紡錘形の細胞形態を呈する（図-12A）。その超微形態所見においては，細胞は著しい紡錘形を呈し，表面は平滑であり微絨毛の発達は弱い。しかし細胞間には少数であるが接着斑がみられ，また腺上皮の一つの特徴である細胞間嵌合像を有していた。核の切れ込み

は少なく平滑で、クロマチンは核内に均等に分布し、1個ないし2個の核小体がみられた。細胞質には比較的よく発達した小器管を有し、円形または楕円形の糸粒体、ゴルジ装置および粗面小胞体が見られた。また R-14_{tn} と同様に少数の tonofilament が観察された (図-12 C)。

1×10⁷ 個の細胞をヌードマウス背部皮下に接種30日後に形成された大豆大の腫瘤を切除し形態観察を行なった。腫瘍は部分的には梁状構造を示すものの全体としては未分化な腺癌像を示した (図-12 B)。その超微形態像では in vitro でみられた tonofilament を認めなかった (図-12 D)。

染色体数 ; 55 (図-13)

細胞倍加時間 ; 28時間

細胞飽和密度 ; 72.5 (×10⁴細胞/cm²)

以上のように全ての細胞株は、介在部導管細胞に類似した形態を有した。その中で R-14_{tn} と R-17_{tn} は扁平上皮化を受けた導管細胞

であることが示唆された。R-5_{sn}, R-8_{sn} は細胞質に筋線維様の微細線維を含むことから筋上皮としての性質を有しているのかもしれない。

7. 抗ヒト全唾液家兎抗血清の組織特異性およびその局在性

上記のごとく照射唾液腺から分離された造腫瘍性株の形態的所見から、それらの細胞が唾液腺介在部に由来した細胞であることが示唆された。このことをさらに他の面から確かめる必要があると考えられるが、現在ヒト唾液腺介在部上皮細胞であることを同定するための適当な指標は確立されていない。白砂¹²⁾はかつてヒト多形性腺腫由来の培養細胞（介在部導管上皮細胞と筋上皮細胞とを含む）が唾液産生能を有していたことを報告した。そこで本研究で得られた培養細胞にも唾液抗原を検出できるか否かについて検索するため、抗ヒト全唾液家兎抗血清を作製した。まず作製された抗血清の特異性を確かめるため、抗ヒ

ト全唾液家兔抗血清を用いて酵素抗体法（PAP法）により各種組織を染色した。その結果、唾液腺以外では膵臓の外分泌腺に非常に弱い抗原がみられるのみで他の乳腺、肝臓、前立腺は染色されなかった。唾液腺組織における抗原の局在部をみると、介在部導管細胞、腺房細胞、あるいは筋上皮細胞の3種類の細胞にのみその抗原の局在性がみられ、他の導管および間葉系由来の細胞には染色性がみられなかった（図-14，表-6）。

以上の結果は本実験で作製した抗血清が唾液腺終末部上皮細胞および介在部導管上皮細胞に特異的な抗原に対する抗体を含んでいることを示している。

8. 培養細胞におけるヒト唾液成分産生能の有無

樹立された細胞は、それぞれ唾液腺上皮細胞の形態を有していたが、機能的にも唾液腺由来の上皮細胞としての特性を有しているか否かを検索するため、上記の抗ヒト全唾液家

兎抗血清を用い間接螢光抗体法により，細胞のヒト唾液抗原の有無について調べた。

その結果，唾液腺由来の上皮細胞すなわち本実験から分離された R-5_{sn}，R-8_{sn}，R-14_{sn}，R-14_{tn} および R-17_{tn} 細胞，介在部由来の HSG 細胞，そしてヒト多形性腺腫由来の HPA 細胞の細胞質内にその特異螢光を認めた。一方，唾液腺間葉組織由来の線維芽細胞，ヒト子宮頸部癌由来の HeLa 細胞，ヒト羊膜由来の FL 細胞，およびヒト歯肉癌由来の GK-sq 細胞では，まったくその特異螢光は認められなかった。(図-15，表-7)

以上の実験結果は，本実験系で樹立された造腫瘍性株が，ヒト唾液成分の一部を保有しており，介在部導管上皮細胞に由来した細胞であることを示唆している。

考 察

発癌に関する研究は多くの実験動物を用いて進められ、その結果、発癌過程には initiation と promotion との少なくとも2つ以上の段階が含まれることが明らかにされている。すなわち二段階発癌説の基礎は、1947年 Berenblum, I. のマウス皮膚発癌実験系²⁴⁾により確立された。そのなかで彼は、それ自身では殆ど腫瘍を形成しないような少量の発癌物質、benzo(a)pyrene を一度マウス皮膚に塗布した後、それ自身では発癌性のないクロトン油を何回も塗布すると、腫瘍を誘発することを明らかにした。この事実と同様の過程は他の動物あるいは他の臓器においても見られることが明らかとなり、発癌過程の初期に作用する物質を initiator, クロトン油のように後期に、それを癌にまで発展させる物質を promoter と呼ぶようになった^{25, 26)}。

ヒト発癌においても同様に多段階の発癌過程が存在し、それらの過程に種々の環境因子

が働くこと推察されている。ヒトにおける多因子、多段階発癌説は歴大な疫学的調査結果から示唆される。たとえば、Doll, R.らはタバコと肺癌の関係を探るために、喫煙をやめたヒト集団と喫煙を続けているヒト集団の2群に分け統計処理を行なった。その結果、喫煙継続者の肺癌発生率は加齢とともに増加するのに対し、中止群では肺癌発生率の増加はみられず、非喫煙者のそれに近づいていると報告した^{27,28)}。この事実は喫煙が肺癌発生の直接因子 (initiator) として働くよりも promoter として作用しているのであろうと考えられる。同様に、胆汁酸が腸癌²⁹⁾の、phorbol esterが食道癌³⁰⁾の、ニッケルが鼻腔癌³¹⁾の、そして estrogenが子宮癌³²⁾の後期発癌過程において promoter として働くことが示唆されている。また口腔粘膜癌の誘発因子として、喫煙とアルコールとが挙げられている^{33,34)}。

一方、細胞培養技術の導入によって、動物実験などから発癌性が疑われる因子をヒトか

ら *in vitro* に分離された細胞に作用させること
によって, transformation が生ずるか否かにつ
いて検索が行なわれている。Kakunaga, T.³⁵⁾ ら
はヒト口唇から分離された線維芽細胞 (KD)
を標的細胞として, 化学発癌物質の一種であ
る 4-NQO (4-nitroquinoline-1-oxide) で, KD 細
胞を処理することにより, 軟寒天中でのコロ
ニー形成能およびヌードマウスでの造腫瘍性
を有する細胞に形質転換することを報告した。
上記の方法は発癌物質とヒト細胞との関係,
すなわち発癌剤の細胞内での代謝³⁶⁾ と高分子
への結合³⁷⁾ あるいは発癌物質の変異原性の検
定²²⁾ などの研究にすぐれた方法と考えられる。
しかし, 発癌の予防を考えた場合, initiator
として働く直接発癌因子の検定も重要である
が後期発癌過程に働く物質, いわゆる
promoter の検索はより重要であると思われる。
すなわち, ある既知の initiator に曝露してし
まった場合でも promotion の過程を抑制するよ
うな処置を施すことにより, 発癌を防止する

ことは理論的に可能と考えられる。

この意味からも、ヒト後期発癌過程を解析するためのシステムを確立することは、非常に重要なことと考えられる。

最近、Shirasuna, K.⁽¹¹⁾らは口腔底癌治療のためコバルト60外部照射を受けた顎下唾液腺を培養することによって、造腫瘍性を有する上皮細胞をin vitroに分離し得たことを報告した。この事実は放射線照射を受けた唾液腺には、少なくともinitiationを受けた細胞を含んでいたことを示唆している。しかし、この報告は一例の患者からの事実のみであり、再現性が疑われるとともに培養初期の細胞動態について述べられていない。もし照射を受けた唾液腺由来の細胞がinitiationの段階にあることが証明されれば、この実験系は後期発癌過程を観察するための有効な手段になると考えられる。

上記の理由から、また放射線照射を受けた患者に唾液腺腫瘍が多くみられるという疫学

的事実^{7,8)}との接点を探るために、口腔癌治療の目的で放射線治療を受けた症例の顎下唾液腺から造腫瘍性を有する細胞をin vitroに分離する過程を観察しようとした。

本実験において細胞の分離のため組織片培養法を用いた。これは細切された組織片から増殖してきた細胞を得る比較的簡便な方法であり、かつ再現性にすぐれていると考えられている。他の方法、例えばトリプシンやコラーゲナーゼなどの様な酵素処理によって培養細胞を得る場合、これらの酵素によって上皮細胞の障害が著しくみられる³⁸⁾ことから唾液腺から上皮細胞を得るためには適さないと考えた。本法によると一般的に、上皮様細胞と線維芽様細胞が混在して増殖する像が観察される。

Knowles, M. A.³⁹⁾らもマウス顎下唾液腺から細胞を分離するため、同様な組織片培養法(explant culture)を用いている。その報告のなかで彼らは組織片から増殖した上皮様細胞

を線維芽様細胞から分離するために、線維芽様細胞のみをラバーホルスマンで除いたところ、その除く時期が早すぎると上皮様細胞の増殖が停止するとのべている。このことは *in vitro* での上皮様細胞の増殖には、特にその初期において、線維芽細胞の混在が必要であることを示しているのかも知れない⁴⁰⁾。

本実験においても上皮様細胞と線維芽様細胞が混在して増殖する初代培養像がみられた。これらの中に *transform* している細胞が存在するか否かについて検討を行なった。*in vitro* で正常線維芽細胞や上皮細胞はシャーレのような固形物の支持を得て増殖するが *transform* している細胞は軟寒天中の様なゲルに浮遊させた状態でも増殖しコロニーを形成する (*anchorage-independence*)^{35, 41-44)} ことが知られており、この *in vitro* での性質の変化はヒト腫瘍組織から分離された培養細胞の造腫瘍性と最もよく相関すると言われている^{41, 42)}。故に培養細胞の *transformation* の指標として軟寒天中で

のコロニー形成能の有無について検索した。その結果，照射群16例中7例の継代初期の細胞はコロニー形成能を有していた。しかし，この形成率は1.0%以下であり，形成されたコロニーからはヌードマウスでの造腫瘍性を示す細胞を分離することができなかった。また培養初期において安定した増殖を示す上皮様細胞のみを分離することもできなかったのので上皮様細胞と線維芽様細胞の混在した状態で継代培養を行なった。その結果，細胞分布として過増殖した線維芽様細胞で占められた培養細胞群では，継代初期においてコロニー形成能を有した細胞をも含めて，すべてその増殖を停止した。一方，安定した増殖を示す上皮様細胞が維持された培養群（R-5，R-8，R-14）では，継代をくり返すことによって，徐々にコロニー形成率が上昇するとともに細胞増殖様式において接触阻止作用の消失，pile-up focusなどがみられた。そしてコロニー形成率が10%前後になった時期に，それらの

コロニーから細胞をクローニングすることにより安定した増殖を示す上皮様細胞が得られ、それらをヌードマウスに接種すると腫瘍を形成した。

この培養結果は次のように考察される。すなわち放射線照射を受けたいくつかの唾液腺中には、発癌の initiation の段階にある上皮様細胞（潜在的癌細胞, dormant transformed cell⁴⁴⁾）が存在しているが癌細胞にまで発達していない。その後、それらの細胞のいくつかは、継代培養によって癌細胞としての能力を徐々に獲得したと考えられる。この考えは、ウイルスあるいは化学発癌による細胞の transformation には初代培養後の数代にわたる継代培養が必要であったとする Fisher, P. B. ら^{45, 46)} の in vitro 実験系からも支持される。

上記の仮説すなわち培養初期における照射唾液腺は、いわゆる initiation の段階にあることを確かめるためにさらに実験をすすめた。

さて化学発癌実験系で確立された前述の 2

段階説は initiation を放射線とした場合でも、また in vitro の系を用いた場合においても認められる。即ち Kennedy, A.R.^{47,48)} はマウス C3H/10T 1/2 clone 8 細胞 (継代 7 から 14 代) を使い、殆ど transformation を誘発しない低い線量の X-ray (50-100 rads) を照射後、クロトン油より精製した TPA を処理することにより高頻度の transformed foci が出現することを明らかにした。

そこで照射唾液腺初代培養細胞のなかに、initiate された潜在的癌細胞が存在することを確かめるために、強力な promoter 効果を有すると考えられている TPA⁴⁹⁻⁵³⁾ を用いて培養細胞への影響について調べた。その結果、継代初期の R-14, R-17 のコロニー形成率は、TPA 処理により著しく増加するとともに、それらのコロニーからは造腫瘍性を有する R-14_{tn}, R-17_{tn} を分離することができた。一方、TPA によるコロニー促進効果は、ヌードマウスでの造腫瘍性を有している細胞においては認め

られなかった。また、非照射唾液腺由来の細胞では、TPA処理によって軟寒天中でのコロニー形成能が誘発されなかった。

上記の結果は組織片から増殖してきた限られた細胞のみを使用したものであるが、組織全体の細胞の動態については不明である。そこで組織を細切後、EDTA-トリプシン、次いでコラーゲナーゼを用いて単一細胞を分離し、軟寒天中でのコロニー形成能に対するTPA効果を検索した。その結果、非照射唾液腺細胞ではTPAに反応する細胞が含まれないのに対し、照射唾液腺由来の細胞のコロニー形成率は未処理対照と比較して約3倍に上昇させる結果を得た(表-8)。しかし、上記の方法で完全な単一細胞を得ることは困難であることに加えて、この方法は細胞障害が強いので、実験結果の信頼性が薄いと考えた。またこの方法で安定した増殖を示す培養細胞を得ることができなかった。

ともあれ、培養細胞のTPAに対する反応

結果は、照射唾液腺の中に、潜在的癌細胞が存在していることを強く示唆しているとともに、放射線照射後におけるヒト唾液腺細胞の腫瘍化には少なくとも initiation および promotion の 2 つ以上の過程が存在することを示していると思われた。

さて、本実験系で用いた代表的な promoting agent である TPA は潜在的腫瘍細胞のコロニー形成率を上昇させるだけでなく、plasminogen activator (protease) の誘導^{54,55)}、polyamine 合成酵素 (ornithine decarboxylase) の誘導⁵⁶⁻⁵⁸⁾、fibronectine の消失⁵⁹⁾、リン脂質合成の促進⁶⁰⁾、プロスタグランジンの合成促進⁶¹⁾、DNA 合成促進⁶²⁾、細胞飽和密度の増加⁶³⁾等の癌特異形質の誘導が動物細胞において知られている。細胞飽和密度と DNA 合成能に対する TPA の影響については結果で述べた。一方 TPA の生物活性の一つとして、終末分化 (terminal differentiation) や癌細胞の正常細胞への分化阻止が知られている。例えば、培養正常細胞

の分化実験系として、マウス 3T3 fibroblast の脂肪細胞への分化阻止がみられる⁶⁴⁾。また培養癌細胞の再分化として Friend 赤芽系白血病細胞の DMSO による赤血球への分化が TPA により阻止される⁶⁵⁾。この様に promoter 作用の強い TPA には発癌促進作用とともに分化阻止作用がみられるが、一方、promotion 作用のない他の phorbol 系の phorbol-diacetate にはそのような作用はみられない⁶⁵⁻⁶⁷⁾。したがって TPA のこれらの作用は発癌過程と細胞分化異常という観点から発癌を解析するために今後もさらに研究をすすめていかなければならない物質の一つである。本実験過程のなかで、TPA 処理によって誘発されたコロニーから分離された R-14_{tn}, R-17_{tn} を超微形態的に観察すると TPA 未処理で得られた R-5_{sn}, R-8_{sn}, R-14_{sn} 細胞にはみられなかった tonofilament を有していた。このような扁平上皮化生は、上皮細胞の癌化過程にある段階を示す形態的变化と考えられており、したがって TPA によ

る細胞分化異常を示しているのかも知れない。

ヒト細胞に対するTPAの影響をみた実験は少ない。in vivoにおいて環境因子によるinitiationを受けたと思われるヒト細胞を対象としてTPAの効果をみたものは本実験が初めてと思われるが癌になりやすい遺伝的疾患を有するヒトから得た培養細胞を用いてTPAの影響をみたとする実験系はすでに報告されている。すなわちKepelovich, L.⁶⁸⁾らはHereditary adenomatosis of the colon and rectumの症例からin vitroに分離された線維芽細胞は、TPAのみの処理によりすみやかに軟寒天中でのコロニー形成能を有し、かつヌードマウスでの造腫瘍性を示す細胞にtransformすることを明らかにした。その結果、彼らは分離された細胞がすでに発癌のinitiationの時期にある細胞であると考えている。

ヒト発癌を予防するためには、後期発癌過程にpromoterとして働く因子あるいはそれを抑制する因子について検索を加えることの重

要性は先に述べた。本実験系はヒト唾液腺細胞の後期発癌過程に働く上記因子を検討するための一つの有効な手段になると考えられる。

Colburn, N. H.⁶⁹⁾らはマウス由来の線維芽細胞 (JB-6) を分離した。このJB-6は軟寒天中で殆んどコロニーを形成せずヌードマウスでの造腫瘍性を示さないが、TPAに対する感受性を有することから潜在的癌細胞と考えている。つまり、TPAをJB-6に作用させると、コロニーを形成し、さらに造腫瘍性細胞に形質転換することを明らかにした。さらに、Vitamin Aの誘導体の一種であるRetinoic Acidは上記のTPAによるpromoter作用を抑制させると述べている。

Retinoic Acidのこの抑制効果はin vivoの実験系においてもよく知られている⁷⁰⁾。

本実験系においても、照射唾液腺細胞に対するTPAのpromoter効果はRetinoic Acidを添加することにより抑制された。すなわちR-14, R-17のTPAによるコロニー形成促進効果は、

10^{-5} MのR.A.を加えた結果，未処理対照のレベルまでTPA効果は低下し，そのコロニーからは安定した増殖を示す細胞を分離することができなかつた。さらに，Vitamin Aがヒト発癌の抑制因子として働くことは，口腔癌症例中の血中Vitamin A濃度が低下していたとする疫学的報告からも示唆される^{71,72)}。

このR.A.によるTPAへの抑制作用は膜レセプターへのTPA結合を阻止する結果だと考えられている⁷³⁾が，現在詳細は不明である⁷⁴⁾。ともあれ，放射線照射の結果発生する唾液腺腫瘍は，その後期発癌過程を阻止するR.A.のような物質により，その発生を予防することが理論上可能であると思われる。今後，本実験系を用いて，promotionに対する抑制物質を検討する必要があると考えている。

本実験において術前にコバルト60外部照射を受けたヒト顎下唾液腺から5株の造腫瘍性細胞を得ることができた。これらの細胞株は全て軟寒天中のコロニーから分離された細胞

である。最近 Salmon, S. E.⁷⁵⁻⁷⁸⁾らは腫瘍組織から細胞を分離する方法として軟寒天コロニー形成法を用い、これを human stem cell cloning assay と呼んでいる。この腫瘍 stem cell は regrowth 能および metastasis 能などその腫瘍の特性あるいは悪性度を決定するための最も適当な細胞であると考えられている。

故にこれらの細胞について特性を解析することは照射後における唾液腺腫瘍を組織発生の観点から理解するために重要であると思われる。

本実験過程から樹立した5株に加えさきに分離された HSG 細胞の生物学的特性から、これらの細胞は唾液腺介在部上皮細胞に由来したものであると判断した。すなわち、全ての細胞はそれぞれ形態的に多少の差異があるにせよ、HSG と同様に比較的介在部上皮細胞としての微細構造をよく保っていた。これらの細胞を正常唾液腺の腺房細胞ならびに介在部導管細胞とが特異的に染色される抗ヒト全唾

液家兔抗血清を用いて染色すると、すべての細胞の細胞質内にその特異抗原をみとめた。なお用いた抗血清は全唾液を抗原として作製されたものであるので、正常唾液腺上皮細胞と培養細胞とにおいてどのような物質が染色されているかについては不明である。この抗血清でヒト腭臓外分泌腺が軽度に染色されていることから全ての細胞についてアミラーゼ産生能の有無について検討したが、現在維持されている状態ではその能力を有さないと思われた。最近、正常腭臓導管より分離されたムチンが、腭癌培養細胞においても検出されることが報告されており、さらにその分離されたムチンはヒト顎下唾液腺にも存在することも明らかにされている⁷⁹⁾。正常唾液腺上皮細胞と腫瘍細胞とに共通してみられる蛋白として、lactoferine, C E A (carcino-embryonic antigen) などが知られている^{80, 81)}。

ともあれ、樹立された培養細胞は、唾液中に含まれている物質で腺房細胞および介在部

導管上皮細胞とに共通する特異抗原を有することが示唆された。

唾液腺腫瘍の発生母地を明らかにしようとする研究は従来より数多くみられる。例えば Eversole, L. R.⁸²⁾らは組織発生の学的研究によって唾液腺腫瘍をとらえようとした。すなわち彼らは胎生期のヒト口蓋粘膜を光学顕微鏡で観察した結果、外分泌前駆細胞 (EDRC) が介在部導管前駆細胞 (IDRC) に分化、次いで腺条部、腺房部または筋上皮の各細胞に分化すると考え、各種唾液腺腫瘍はその類似性から EDRC または IDRC 由来であると考えている。また多形性腺腫、腺様嚢胞癌などの唾液腺腫瘍が介在部上皮細胞に由来するという考えは、腫瘍の病理組織学的及び電子顕微鏡的検索の結果からも示唆されている⁸³⁻⁸⁶⁾。

このように唾液腺腫瘍の発生母地として介在部導管細胞を重要視する論文が存在する一方で、筋上皮細胞を支持する説もみられる。その中で Hübner, G.⁸⁷⁾らは、唾液腺腫瘍を超微

形態的に観察した結果，myofibrilのみならず多数の ergastoplasm を有するいわゆる“active myoepithelial cell”の存在をみとめた。また Shirasuna, K.¹²⁾らはヒト多形性腺腫組織中には，active myoepithelial cell が含まれており，それらの細胞をヌードマウスに接種すると筋上皮腫が形成されることを示した。このように筋上皮細胞は唾液腺腫瘍の増殖および構成に重要な役割を有していると考えられている。筋上皮細胞を細胞分化の面からみると，未分化な pale cell がその stem cell とする報告もみられる。すなわち Carolyn, J. P.^{88, 89)}はいわゆる pale cell 様の立方形的上皮細胞が筋上皮細胞へと分化する stem cell と考えている。著者は，両者の細胞が互いに分化・移行しあうことが可能と考えている。すなわち，軟寒天中のコロニーからクローン化した立方形的 HSG 細胞（介在部導管細胞）を長期間継代培養すると（約 80 代）細胞分布として少数ではあるが多角形あるいは紡錘形の細胞が混在しているのを認めた。

そこで単一細胞のクローニングを数回くり返すことにより筋上皮様細胞株を分離することに成功したが、この紡錘形細胞を継代培養することにより数%の細胞が、元の立方形の細胞にあと戻りすることを認めている（未発表）。また、R-5_{sn}、R-8_{sn}細胞をヌードマウスに移植するとそれぞれの腫瘍細胞質内に多数の筋線維が認められる細胞に変化した。介在部導管上皮細胞の中間細胞は唾液腺発生初期に^{88,90)}、あるいは多くの唾液腺組織中にみられる⁹¹⁾ことがすでに報告されている。

さらに照射唾液腺から分離した造腫瘍性細胞が介在部導管上皮由来の細胞であった事実は、すでに報告されている放射線照射後の唾液腺組織の形態的変化の所見を考えあわせるとよく理解することができる。すなわち照射により最も障害を受ける細胞は腺房細胞であり、導管上皮細胞は長期間その形態を保ち続ける。そして、照射により変性を受けた唾液腺組織は主として線維化することにより修復

されるが、腺構造が回復する場合その生存している介在部上皮細胞が増殖、あるいは腺房細胞へ細胞分化することにより再生されると報告されている²¹⁾。また上記の修復過程において唾液腺は腺腫様構造をとることが、Cherry, C. P.⁹²⁾によって報告されている。本実験系で得られた細胞は放射線照射によっても生存し増殖する修復能の高い細胞と推察される。

以上述べてきた様に唾液腺介在部導管上皮細胞は、唾液腺の腫瘍発生、あるいは修復過程において growth point となる重要な細胞、すなわち唾液腺の幹細胞 (stem cell) であると考えられる。

結 語

1. 手術によって得た26名の患者の顎下唾液腺を組織培養した。内16例は術前にコバルト60外部照射を受けたもの、10例はうけていないものである。

2. 照射唾液腺16例中7例の初代培養に軟寒天中でコロニー形成能を有する細胞が存在した。

3. 照射唾液腺16例を長期間継代培養することによってR-5_{sn}, R-8_{sn}, R-14_{sn}の造腫瘍性株を分離することができた。造腫瘍性株となるまでそれぞれは細胞継代数35, 37, 13代を要した。

4. 照射唾液腺の軟寒天中でのコロニー形成能は培養初期においてTPA添加によって促進され、それらのコロニーからすみやかに造腫瘍性細胞(R-14_{tn}, R-17_{tn})を分離することができた。TPA効果は100ng/mlの濃度で最大活性を示した。

5. 上記のTPAによる効果は 10^{-5} MのRetinoic acidの添加によって抑制された。

6. TPAによるコロニー形成促進効果はすでに造腫瘍性を獲得している細胞に対しては認められなかった。

7. 非照射唾液腺由来培養細胞はTPAで処理しても軟寒天中でのコロニー形成能を示さなかった。

8. 全ての造腫瘍性株は介在部導管上皮細胞に類似した超微形態を有した。

9. これらの造腫瘍性細胞を正常唾液腺の腺房細胞，介在部導管上皮細胞および筋上皮細胞に特異的な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染色を行なった。その結果，全ての細胞の細胞質内に特異抗原をみとめた。

以上の実験結果から放射線照射を受けたヒト顎下唾液腺中には，発癌 initiation の段階にある細胞がすでに存在しており，照射後の唾液腺腫瘍の発生には介在部導管上皮細胞がその発生母地として強く関与していることが示唆された。

文 献

- 1) 太田邦夫, 杉村 隆, 菅野晴夫 (1979) : ヒトの癌と動物実験モデル; 癌の科学. 第1版, 南山堂, 東京, 第4巻, 昭和54年.
- 2) 伊東信行, 広瀬雅雄 (1979) : 前癌病変; 環境と発癌 (太田邦夫, 山本 正, 杉村 隆, 菅野晴夫編) 第1版, 南山堂, 東京, 第2巻, 昭和54年.
- 3) 廣畑富雄 (1979) : ヒトの発癌の疫学的考察; 環境と発癌 (太田邦夫, 山本 正, 杉村 隆, 菅野晴夫編) 第1版, 南山堂, 東京, 第2巻, 昭和54年.
- 4) 広瀬文雄 (1979); 放射線による発癌; 環境と発癌 (太田邦夫, 山本 正, 杉村 隆, 菅野晴夫編) 第1版, 南山堂, 東京, 第2巻, 昭和54年.
- 5) Storer, J.D. (1975): Radiation carcinogenesis. In Cancer 1. etiology, chemical and physical carcinogenesis. (Becker, F.F. editor) Plenum Press, New York, 454-462.

- 6) Takeichi, N., Hirose, F. and Yamamoto, T. (1976): Salivary gland tumors in atomic bomb survivors. *Cancer.*, 38, 2462-2468.
- 7) Modan B, Bardatz. (1974): Radiation induced head and neck tumors. *Lancet.*, 1, 277.
- 8) Arther B, Schneider. and Murray J, Favus. (1977): Salivary gland neoplasms as a late consequence of head and neck irradiation. *Annals of Internal Medicine.*, 87, 160-164.
- 9) Fough, 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.
- 10) 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.
- 11) Shirasuna, K., Sato, M. and Miyazaki, T. (1981): A neoplastic epithelial cell line established from irradiated human salivary gland. *Cancer.*, 48, 745-752.
- 12) Shirasuna, K., Sato, M. and Miyazaki, T. (1980): A myoepithelial cell line established from a human pleomorphic adenoma arising in minor salivary gland. *cancer.*, 45, 297-305.

13) 白砂薫光, 杉山勝, 菱田市和, 浦出雅裕
 浜田傑, 綿谷和也, 宮崎正 (1982): ヒト由来培養上皮細胞, in vitro の 3 次元構造 日口外

- 誌, 28, 987-991. 昭和57年.
- 14) Macpherson, I. and Stoker, M. (1962): Polyoma transformation of hamster cell clones an investigation of genetic factors affecting cell competence. virol., 16, 141-151.
- 15) Kato, Y. and Nomura, Y., Tsuji., Watanabe, R. and Suzuki, F. (1980): A factor in conditioned medium of rabbit costal chondrocytes stimulates their synthesis of sulfated glycosaminoglycans, RNA and DNA. Biochem. Int., 1, 319-324.
- 16) Luft, J.H. (1961): Improvement in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 409-414.
- 17) Millonig, G. (1961): A modified procedure for lead staining of thin section. J. Biophys. Biochem. Cytol., 11, 736-739.
- 18) 東海大学医学部病理学教室, 東海大学共利研細胞生物(1979): 酵素抗体法~理論・手技解説と応用. 第1版, 学際企画, 東京, 昭和54年.
- 19) 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.
- 20) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- 21) 磯野和秀 (1977): 人顎下唾液腺, 超微形態

的觀察—特に口腔領域恶性肿瘤患者放射線治療の影響について—*大阪歯学誌*, 22, 46-70, 昭和52年

22) 角水武夫 (1982): 化学物質による transformation; 体細胞遺伝学 (小根績, 岡田善雄, 堀川正克, 黒木登志夫編), 第1版, 理工学社, 東京, 305-327 昭和57年.

23) Weinstein, I.B. and Troll, W. (1977): National cancer institute workshop on tumor promotion and cofactors in carcinogenesis. *Cancer Res*, 37, 3461-3463.

24) Berenblum, I. (1941): The mechanism of carcinogenesis. A study of the significance of carcinogenic and related phenomena. *Cancer Res.*, 1, 807-814.

25) Wigley, C.B. (1983): TPA affects early and late stages of chemically induced transformation in mouse submandibular salivary epithelial cells in vitro. *Carcinogenesis.*, 4, 101-106.

26) Greiner, J.W., Dipaolo, A.J., and Evans, C.H. (1983): Carcinogen-induced phenotypic alterations in mammary epithelial cells accompanying the development of neoplastic transformation. *Cancer Res.*, 43, 273-278.

- 27) Doll, R. and Peto, R. (1974): Mortality in relation to smoking: 20 year's observation on male British doctors. *Br. Med. J.*, 2, 1525-1536.
- 28) Doll, R. (1978): An epidemiological perspective of the biology of cancer. *Cancer Res.*, 38, 3573-3583.
- 29) Wynder, E.L., Hoffman, D., McCoy, G.D., Cohen, L.A. and Reddy, B.S. (1978): In mechanisms of tumor promotion and cocarcinogenesis (Slaga, T.J., Sivak, A., Boutwell, R.K., editor), Raven Press, New York, 31.
- 30) Weber, J. and Hecker, E. (1978): Cocarcinogenesis of the diterpene ester type from crotonflavene and esophageal cancer in Carçao. *Experimentia.*, 34, 679-682.
- 31) Day, N.E. and Brown, C.C. (1979): Multistage models and primary prevention. *J. Natl. Cancer Inst.*, 48, 513-521.
- 32) Jick, H., Watkins, R.N., Hunter, J.R., Dinan, B.J., Madsen, S., Rothman, K.J. and Walker, A.M. (1979): Replacement estrogens and endometrial cancer. *New Engl. J. Med.*, 300, 218.
- 33) Tuynus, A.J. (1970): Cancer of the esophagus: Further evidence of the relation to drinking habits in France. *Cancer*, 5, 152-156.
- 34) Rathman, K. and Keller, A. (1972): The effect of joint exposure to alcohol and tobacco. *J. Chro. Dis.*, 25, 711-716.
- 35) Kakunaga, T. (1977): The transformation of human diploid cells by chemical carcinogen. In *Origin of Human Cancer*. (Hiatt, H.H. editor) Cold Spring Harbor Lab., New York,

1537-1548.

36) 根本信雄 (1979): 癌原物質の代謝; 環境と発
 癌; 癌の科学 (大田邦夫, 山本正, 杉村隆,
 菅野晴夫編) 第1版, 南山堂, 東京, 第2巻
 122-145, 昭和54年.

37) 林健志 (1979): 癌原物質と生体物質との相互
 作用; 環境と発癌; 癌の科学 (大田邦夫, 山
 本正, 杉村隆, 菅野晴夫編) 第1版, 南山堂
 東京, 第2巻, 146-158, 昭和54年.

38) Jensen, F.C., Gwatkin, R.B.L. and Biggers, J.O. (1964):

A simple organ culture method which allows simultaneous
 isolation of specific types of cells. *Exp. Cell Res.*, 34,
 440-447.

39) Knowles, M.A. and Franks, L.M. (1977): Stages in neoplastic
 transformation of adult epithelial cells by 7,12-

Dimethylbenz(a)anthracene in vitro. *Cancer Res.*, 37,

3917-3924.

40) Dawe, C.J. (1972): Epithelial-mesenchymal interactions
 in relation to the genesis of polyoma virus-induced tumors
 of mouse salivary glands. In *Tissue Interactions in*

Carcinogenesis. (Tarin, D. editor) Academic Press, Inc.,

New York., 305-358.

- 41) Kakunaga, T. (1978): Neoplastic transformation of human diploid cells by chemical carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1334-1338.
- 42) Kakunaga, T. (1981): Approaches towards the development of human transformation assay system, Advances in environmental toxicology. In Mammalian Cell Transformation by Chemical carcinogens. (Mishra, N.K., Dunkel, V. and Mehlman, M.A. editor) Senate Press, Princeton Junction, 358-382.
- 43) Milo, G.E. and Takaoka, T. (1978): Neoplastic transformation of human diploid cells in vitro after chemical carcinogen treatment. Nature., 275, 130-132.
- 44) Thomasson, D.G. and DeMars, R. (1982): Clonal analysis of the stepwise appearance of anchorage independence and tumorigenicity in CAK, a permanent of mouse cells. Cancer Res., 45, 4054-4063.
- 45) Fisher, P.B. (1979): Tumor promoters enhance anchorage independent growth of adeno-virus transformed cells without altering the integration pattern of viral sequence. Nature., 281, 591-594.
- 46) Bereblum, I. (1978): Established principles and unresolved problems in carcinogenesis. J. Natl. Cancer Inst., 60, 723-726.
- 47) Kennedy, A.R., Mandal, S., Heidelberger, C. and Little, J.P. (1978): Enhancement of X-ray transformation by 12-O-tetradec-

canoyl-phorbol-13acetate in a cloned line of C3H mouse embryo cells. *Cancer Res.*, 38, 439-443.

48) Kennedy, A.R., Murphy, G. and Little, J.B. (1980): Effect of time and duration of exposure to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on X-ray transformation of C3H 10T1/2 cells. *Cancer Res.*, 40, 1915-1920.

49) Saffiatti, V. and Schubic, P. (1963): Studies on promoting action in skin carcinogenesis. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 10, 489-507.

50) Hecker, E. (1971): Isolation and characterization for cocarcinogenic principles from Croton Oil. In *Method in Cancer Research*. (Busch, H. editor). Academic Press, Inc., New York. 358-413.

51) Baird, W.H. and Boutwell, R.K. (1971): Tumor promoting activity of phorbol and four diesters of phorbol in mouse skin. *Cancer Res.*, 31, 1071-1079.

52) Wigler, J.B. (1973): Dose-response studies with a pure tumor-promoting agent, phorbol myristate acetate. *Cancer Res.*, 33, 2166-2172.

53) Driedger, D.E. and Blumberg, P.H. (1977): The effect of phorbol diesters on chicken embryo fibroblasts. *Cancer Res.*, 37, 3257-3265.

54) Wigler, M. and Weinstein, I.B. (1976): Tumor promoter induces plasminogen activator. *Nature*, 259, 232-233.

- 55) Wigler, M., De Feo, D. and Weinstein, I.B. (1978):
Induction of plasminogen activator in cultured cells by
macrocylic plant agents related to tumor promotion. *Cancer
Res.*, 38, 1434-1457.
- 56) O'Brien, T.G. (1976): The induction of ornithine decarbo-
xylase as an early, possibly obligatiry, event in mouse skin
carcinogenesis. *Cancer., Res*, 36, 2644-2653.
- 57) Yuspa, S.H., Lichti, U. and Ben, T. (1976): Phorbol esters
stimulate DNA synthesis and ornithin decarboxylase activity
in mouse epidermal cell cultures. *Nature.*, 262, 402-404.
- 58) Verma, A.K., Shapes, B.G., Rice, H.M. and Boutwell, R.K.
(1979): Correlation of the inhibition by retinoids of a
tumor ptomoter-induced mouse epidermal ornithine decarboxy-
lase activity of skin tumors. *Cancer Res.*, 39, 419-425.
- 59) Blumberg, D.M., Driedger, P.E. and Rossow, P.W. (1976):
Effect of a phorbol ester on a transformation-sensitive
surface protein of chick fibroblast. *Nature.*, 264,
446-447.
- 60) Suss, R., Kreibich, G. and Kinzel, V. (1972):
Phorbol esters as a tool in cell reserch
Eur. J. Cancer., 299- 304.
- 61) Levine, L. and Hassid, A. (1979): Effect of phorbol-12-13
diesters on prostaglandin production and phospholipase
activity in canine kidney (MDCK) cells

Biochem. Biophys. Res. Commun., 79, 477-484.

62) Yuspa, S.H., Ben, T., Patterson, E., Michael, D., Elgjo, K. and Hennings, H. (1976): Stimulated DNA synthesis in mouse epidermal cell cultures treated with TPA.

Cancer Res., 36, 4062-4068.

63) Driedger, P.E. and Blumberg, P.M. (1977): The effect of phorbol diesters on chicken embryofibroblasts.

Cancer Res., 37, 3257-3265.

64) Diamond, L., O'Brien, J.G. and Rovera, G. (1970): Inhibition of a dipose conversion of 3T3 fibroblasts by tumor promoters. Nature., 269, 247-249.

65) Yamasaki, H., Fibach, E., Nudel, E., Weinstein, I.B., Rifkind, R. and Marks, A. (1977): Tumor promoters inhibit spontaneous and induced differentiation of murine erythro-leukemia cells in culture. Proc. Natl. Acad. Sci., 74,

3451-3452.

66) Siskin, E.E. and Barret, J.C. (1981): Inhibition of terminal differentiation of hamster epithelial cells in culture by phorbol ester 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate.

Cancer Res., 41, 593-603.

67) Cohen, R., Pacific, M. and Rubin, N. (1977): Effect of a tumor promoter on myogenesis. Nature., 266, 538-540.

68) Kopelovich, L., Bias, N.E. and Helson, L. (1979): Tumor promoter alone induces neoplastic transformation of

fibroblasts from humans genetically predisposed to cancer.
Nature, 282, 619-620.

69) Dion, L.D., De Luca, L.M. and Colburn, N.H. (1981): Phorbol ester-induced anchorage independence and its antagonism by retinoic acid correlates with altered expression of specific glycoproteins. *Carcinogenesis*, 2, 951-958.

70) Sporn, M.B., Dunlop, N.H., Newton, D.L. and Smith, J.M. (1976): Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoid). *Fed. Proc.*, 35, 1332-1338.

71) Ibrahim, K. and Jafarey, N. (1979): Plasma vitamin A and carotene levels in squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Clin. Oncol.*, 3, 203-207.

72) Abdulla, M., Björklund, A. and Mathur, A. (1979): Zinc and copper levels in whole blood and plasma from patients with squamous cell carcinoma of head and neck. *J. Surg. Oncol.*, 12, 107-113.

73) Bolmer, S.D. and Wolf, G. (1982): Retinoid and phorbol esters alter of fibronectin from enucleated cells. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 79, 6541-6545.

74) Dion, L.D. (1981): Phorbol ester-induced anchorage independence and its antagonism by retinoic acid correlates with specific glycoprotein. *Carcinogenesis*, 2, 951-958.

75) Hamburger, A., Salmon, S.E. (1977): Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 197, 461-463.

- 76) Hamburger, A.W., Salmon, S.E., Kim, M.B. (1978): Direct cloning of human ovarian carcinoma in agar. *Cancer Res.*, 35, 3438-3443.
- 77) Salmon, S.E. and Buick, R.N. (1976): Preparation of permanent slides of intact soft agar colony cultures of hematopoietic and tumor stem cells. *Cancer Res.*, 39, 1133-1136.
- 78) Bradley, E., Von Hoff, D.D. and Casper, J. (1980): Direct cloning of human neuroblastoma cells in soft agar culture. *Cancer Res.*, 40, 3591-3597.
- 79) Gold, D.V., Hollingsworth, P., Kremer, T. and Neisen, D. (1983): Identification of a human pancreatic duct tissue-specific antigen. *Cancer Res.*, 43, 235-238.
- 80) Caselitz, J., Seifert, G. and Jaup, T. (1981): Presence of carcinoembryonic antigen (CEA) in the normal and inflamed parotid gland. An immunohistochemical study of 31 cases. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 100, 205-211.
- 81) Caselitz, J., Seifert, G. and Jump, T. (1982): Tumor antigens in neoplasms of the human parotid gland. *J. Oral Pathology*, 11, 374-386.
- 82) Eversole, L.D. (1971): Histologic classification of salivary tumor. *Arch. Path.*, 92, 433-443.
- 83) Azzopardi, J.G. and Smith, O.D., (1950): Salivary gland tumors and mucinus. *J. Path. Bact.*, 77, 131-136.

- 84) Regezi, J.A. and Batsakis, J.G. (1977): Histogenesis of salivary gland neoplasms. *Oto. Clin. North Am.*, 10, 297-307.
- 85) Batsakis, J.G. (1980): Salivary gland neoplasia: An outcome of modified morphogenesis and cytodifferentiation. *Oral Surg.*, 49, 229-232.
- 86) Mazur, M.T. (1982) : Adenoid cystic carcinoma—a comparative pathologic study of tumors in salivary gland, breast, lung and cervix. *Human Pathology*, 916-923.
- 87) Hübner, G., Klein, H.J. and Kleisasser, O. (1972): Role of myoepithelial cells in the development of salivary gland tumors. *Cancer*, 27, 1255-1251.
- 88) Radnor, C.J.P. (1972): Myoepithelial cell differentiation in rat mammary glands. *J. Anat.*, 111, 381-398.
- 89) Cutler, L.S. and Chaudhry, A.P. (1973): Intercellular contacts at epithelial-mesenchymal interface during the prenatal development of the rat submandibular gland. *Develop. Biol.*, 23, 229-240.
- 90) Tadler, B. (1952): Ultrastructure of the human submaxillary gland. III Myoepithelium. *Z. Zellforsch.*, 68, 852-859.
- 91) Kierszenbaum, A.L. (1968): The ultrastructure of human mixed salivary tumors. *Lab. Investigation*, 18, 391-396.
- 92) Cherry, C.P. and Glucksman, A. (1959): Injury and repair following irradiation of salivary glands in male rats.

No.

Brit. J. Radiol., 32, 596-608.

Isolation and Characterization of the Cultured Cells
drived from Human Irradiated Salivary Glands

Ichikazu Hishida

The first Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Osaka University Dental School, 1-8 Yamada-oka, Suita,
Osaka 565, Japan.

The accumulative epidemiologic evidence indicates an increased prevalence of salivary gland neoplasms in patients receiving therapeutic irradiation for orofacial carcinoma, as compared with non-irradiated controls, suggesting that the processes to neoplastic transformation are primed in irradiated salivary glands. Therefore, in vitro cultivation of the irradiated salivary gland might be useful method to study the processes of human carcinogenesis.

Thus, human submaxillary salivary gland were cultured by employing explant outgrowth method. The sixteen specimens were obtained from patients who received radiation therapy with cobalt 60. Ten of salivary glands from patients with no radiation therapy were also used in this study.

In all cases, cell propagations composing of a mixture of epithelial and mesenchymal cells were observed from the tissue fragments.

These primary cultured cells were screened for colony formation in semi-solid agar. Of 16 cultures of irradiated salivary glands, seven cultures (R-4, R-5, R-8, R-9, R-11, R-14 R-17) were found to have a low colony forming ability in agar medium, whereas all of ten from non-irradiated specimen failed to grow in agar medium in any cell passages. At late passages, three cell lines (R-5, R-8, R-14) spontaneously acquired a high ability of colony formation and tumorigenicity, although other cultures could not be serially transferred beyond twelve passages. The acquisition of the tumorigenicity

,although other cultures could not be serially transferred beyond twelve passages . The acquisition of the tumorigenicity in R-5,R-8 and R-14 required several passages,35,37 and 13 passages,respectively.

It is well known that 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) is active as promoter of neoplastic transformation in rodent cells initiated by chemical carcinogens or X-ray irradiation. Thus,the cultured cells prepared in this study were examined for colony formation in response to TPA. As consequence, colony forming efficiency of primary cultured cell(R-14,R-17) from irradiated specimens in semi-solid agar was enhanced with an exposure to TPA. This enhancement by TPA was reduced by simultaneous exposure in agar to retinoic acid. Moreover,inoculation of subclone of R-14 and R-17 isolated from agar containing TPA resulted in production of adenocarcinoma. On the other hand,colony forming cells were not observed in nc-8 and nc-9 from non-irradiated specimens, even treated with TPA. The neoplastic cells carrying tumorigenicity showed no detectable response to TPA. These findings suggest that the preneoplastic cells initiated by cobalt 60 exist in human salivary glands.

Ultrastructure of all neoplastic cells established resemble that of intercalated duct cell of salivary gland.

Moreover,material reacting with antihuman whole salivary anti-serum was localized in acinar and intercalated duct cell of normal human salivary gland,and then this material was

found in all of established cell lines.

These findings suggest that these neoplastic cell lines were arising from the intercalated duct.

図 1 実験に使用したヒト顎下唾液腺

(A) 非照射ヒト顎下唾液腺 (症例 2)

(HE 染色, 倍率 $\times 100$ 倍)

(B) 照射ヒト顎下唾液腺 (症例 15)

(HE 染色, 倍率 $\times 100$ 倍)

組織の一部を培養し, 得た細胞を実験に供した。

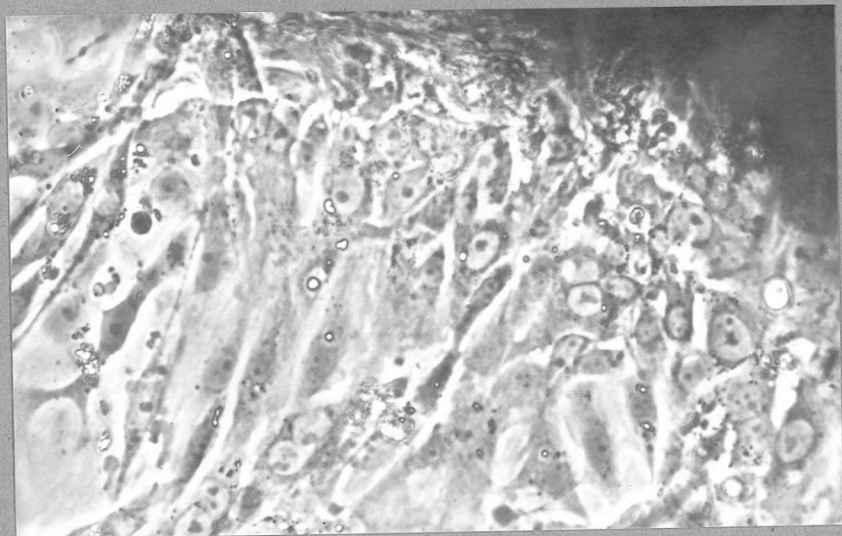


図 2 組織片より増殖した細胞の位相差

顕微鏡像（倍率×200倍）

単層培養形態は，線維芽様細胞および上皮様細胞で占められた。

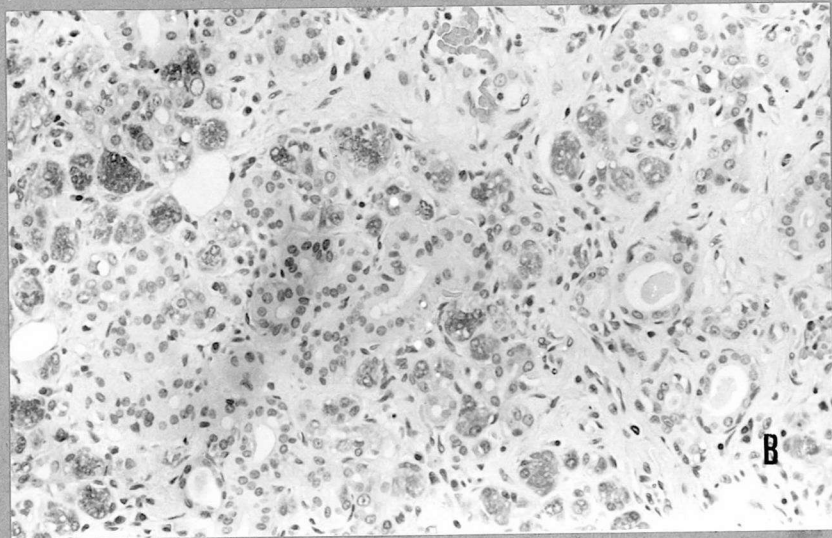
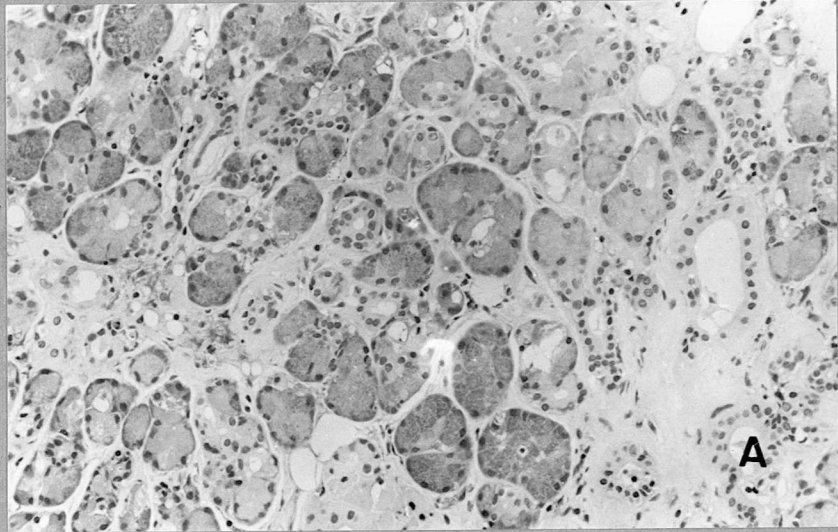
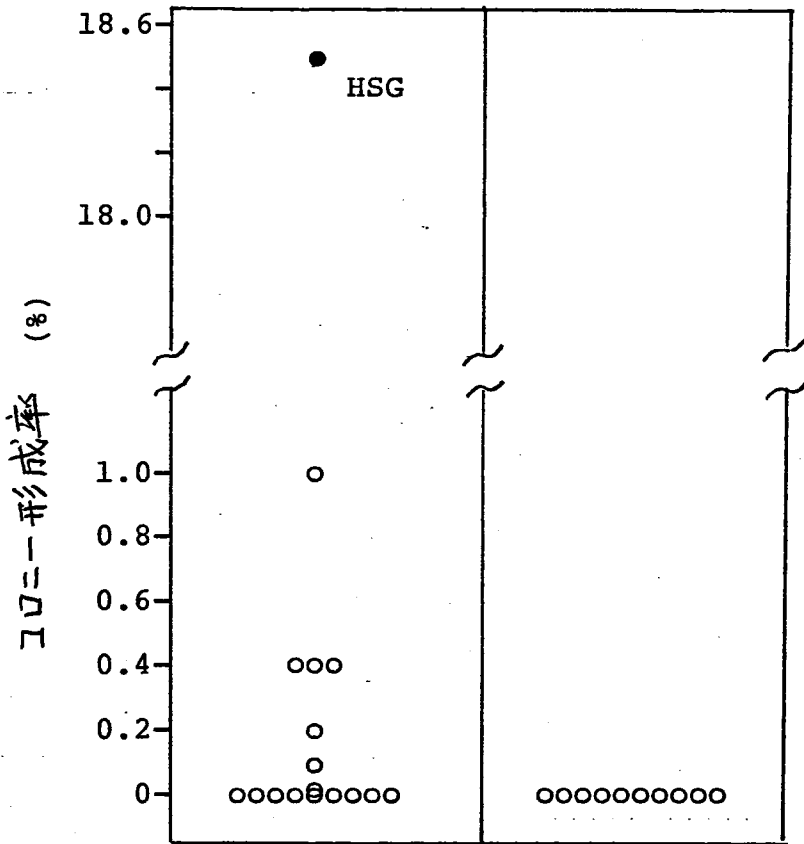


図-3

照射および非照射唾液腺由来培養細胞の
コロニー形成率



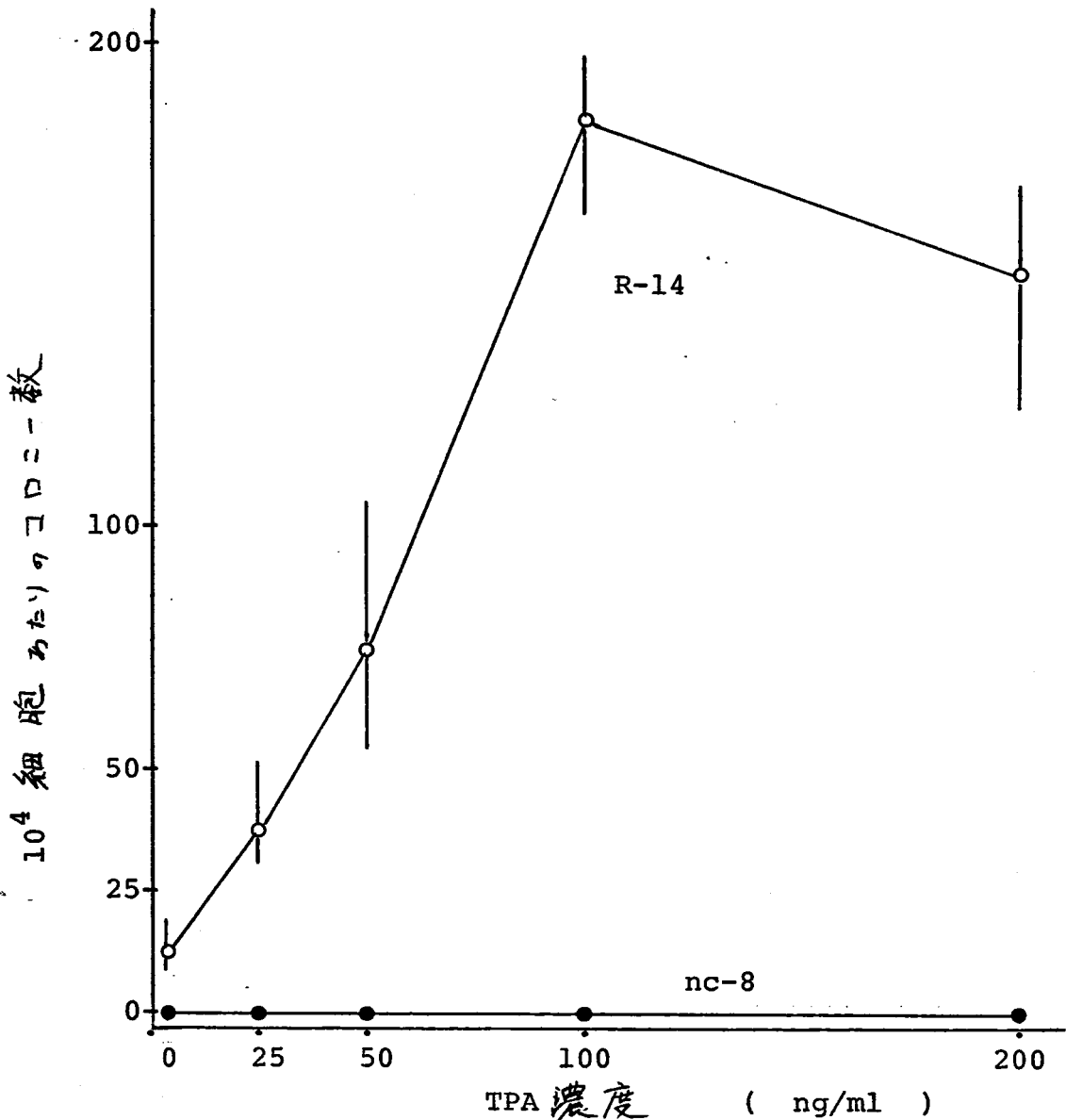
16 症例 (照射唾液腺) 10 症例 (非照射唾液腺)

$10^3, 10^4$ または 10^5 個に調整した細胞を 0.3

※ 寒天培養液に混入後、先に硬化した 0.6% 軟寒天
 の上に重層した。20 日間培養後コロニー数を算定
 した。コロニー形成率は 6 このペトリ皿中でのコロニー
 数の平均率から 100 分率をもとめた。なお、実験には
 継代数 3 代目を用いた。

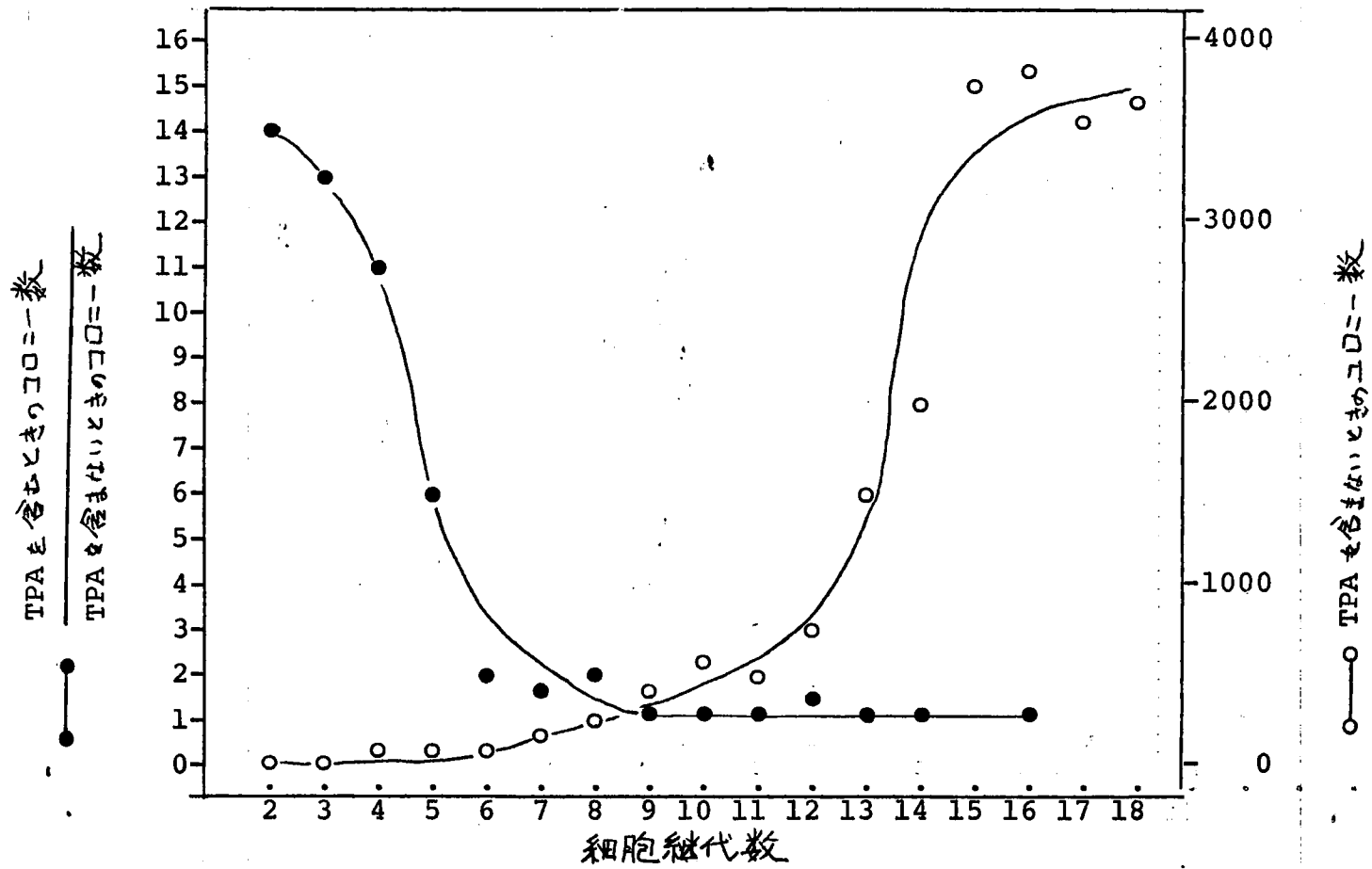
四-4

唾液腺由来培養細胞のコロニー形成能における
TPA 濃度の影響



R-14 (○—○), nc-8 (●—●) はそれぞれ継代2代目の細胞を用いた。

1×10^4 個の細胞を0.3%軟寒天中に混入後、先に硬化した0.6%軟寒天上に重層した。TPAおよびDMSOは、0.6%軟寒天中に混合した。TPAにより誘発されたコロニーからはヌードマウスでの造腫瘍性を有するR-14_{tn}細胞を分離することにできた。



各継代毎に 10^4 個の細胞をTPA(100ng/ml)を含むまたは含まない軟寒天中に入れコロニー数を算定した。継代初期ではTPA処理の結果、コロニー数は未処理のそれと比較して10倍以上増加したが、継代を経ると徐々にTPAのpromoter効果は低下し、ヌドマウスで造腫瘍性を有する72-細胞を分離した13代では、TPAのpromoter効果はみられなかった。

図-6

R-17細胞のコロニー形成能に及ぼすTPAの効果

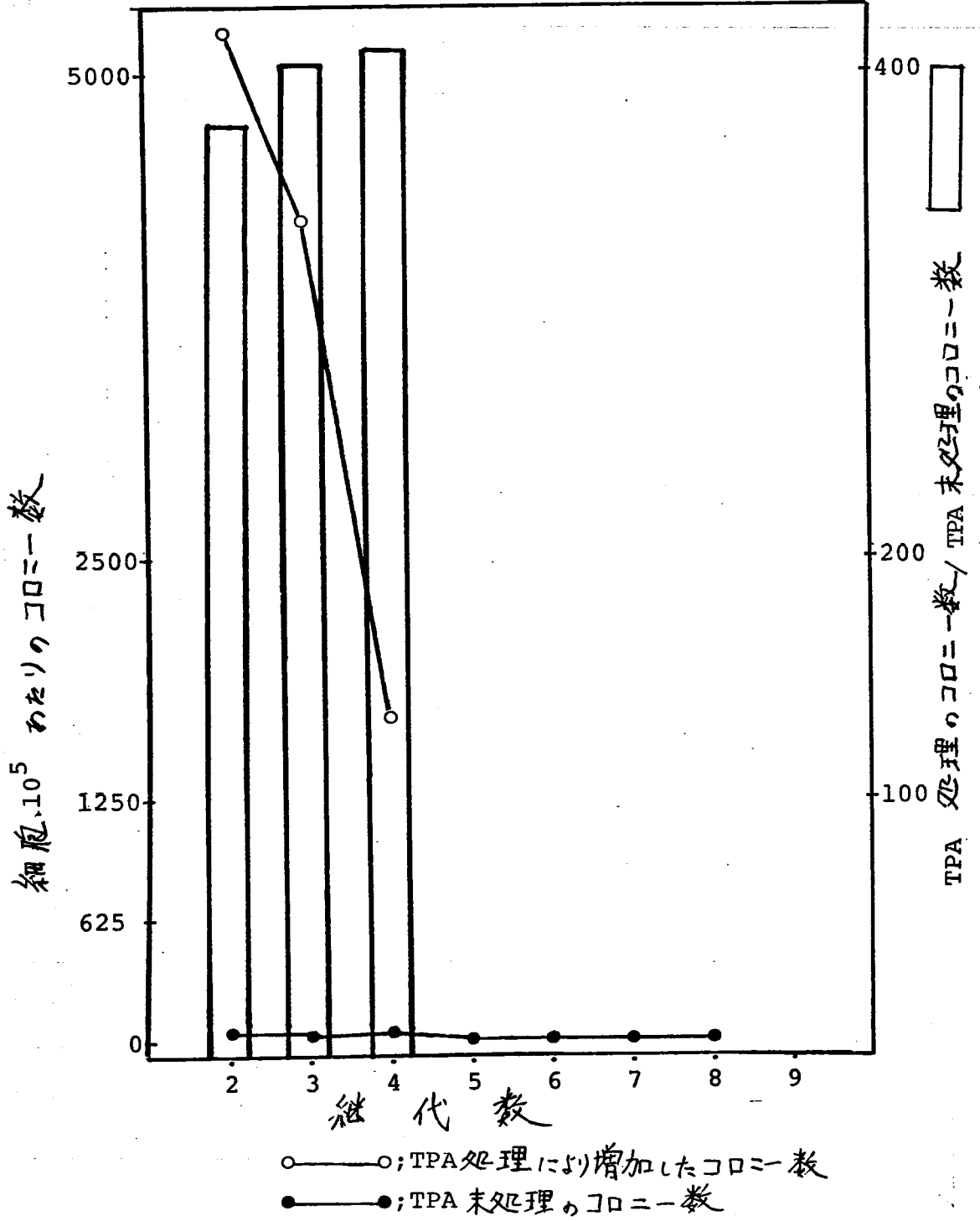
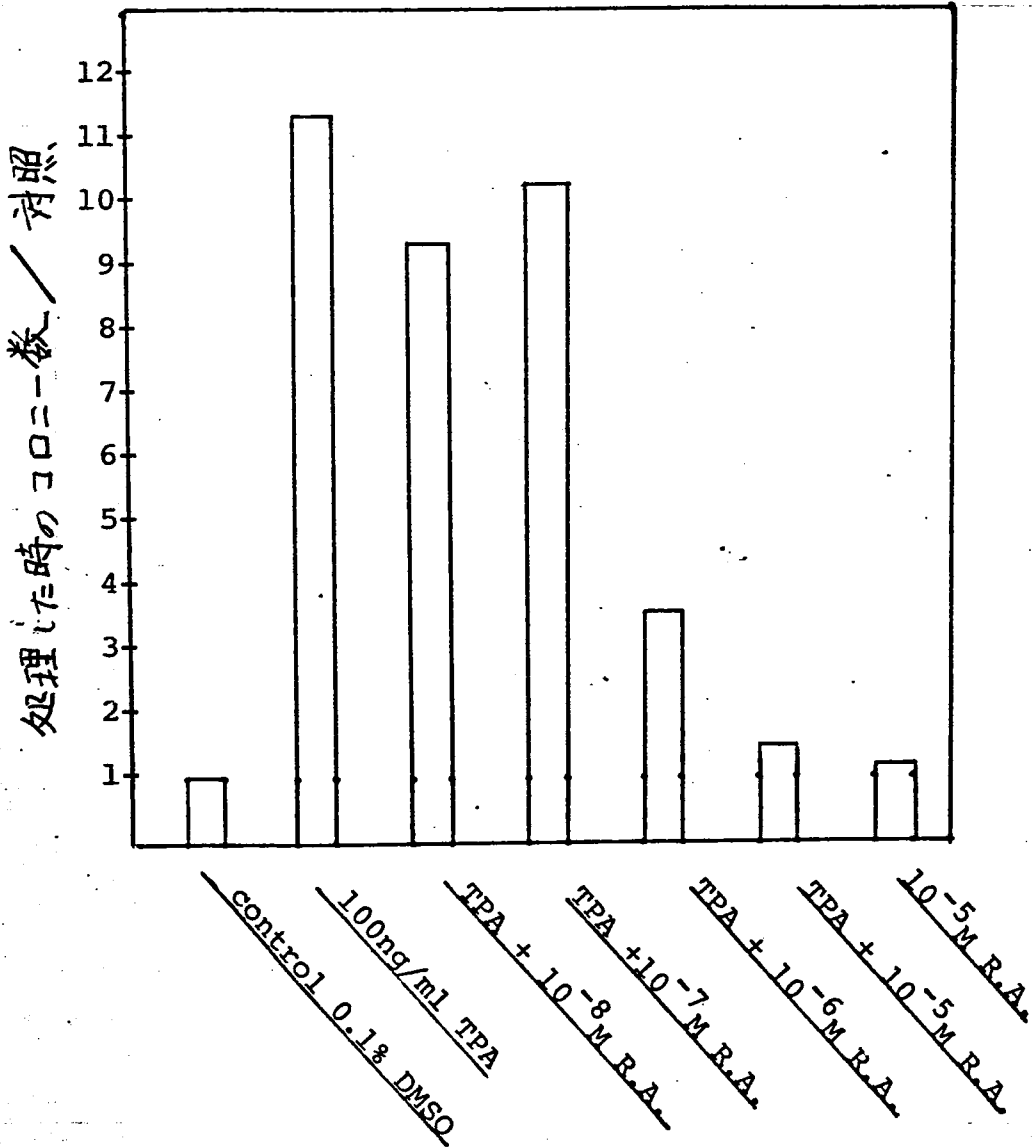


図-7

TPA R-14 細胞コロニー形成促進効果における
Retinoic Acid の拮抗作用



TPA 処理により約11倍増加したコロニーは R.A. の
添加により抑制された。(継代数 4 代)

図 - 8

R-5_{sn} 細胞の形態的特徴

A ; 培養細胞の位相差顕微鏡像

細胞は多角形の上皮様形態を示す。(倍率100倍)

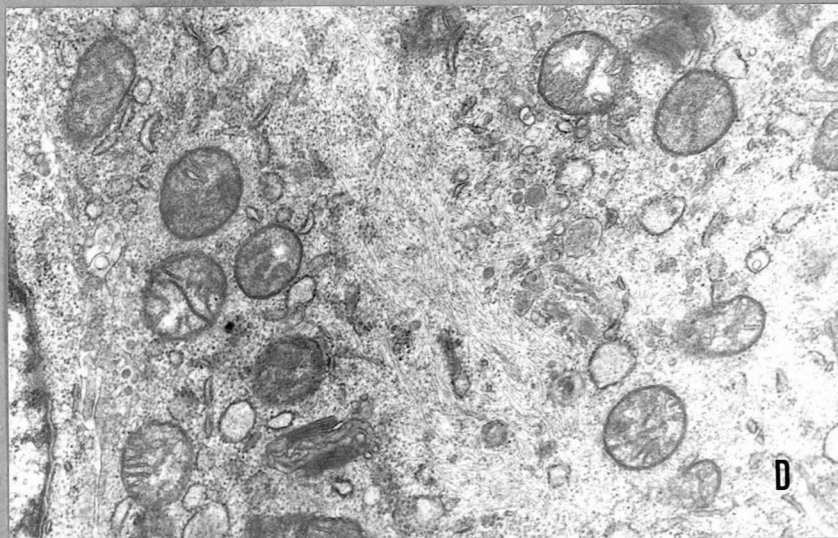
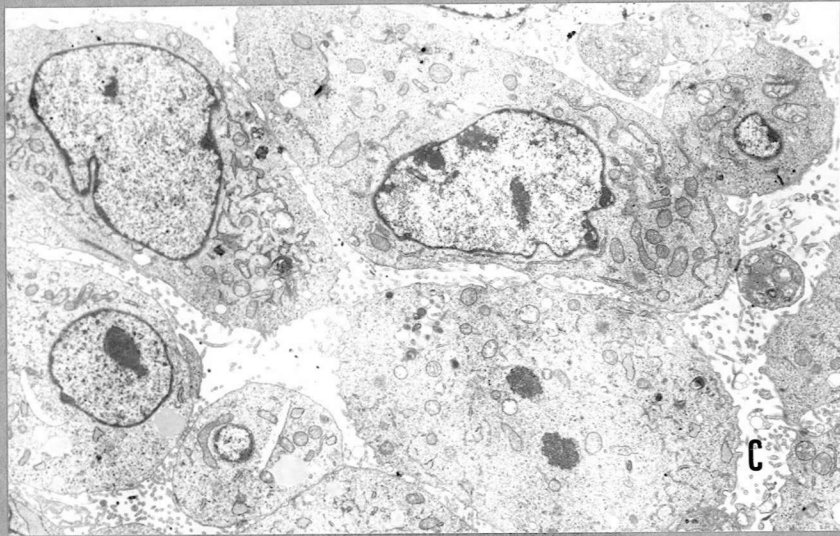
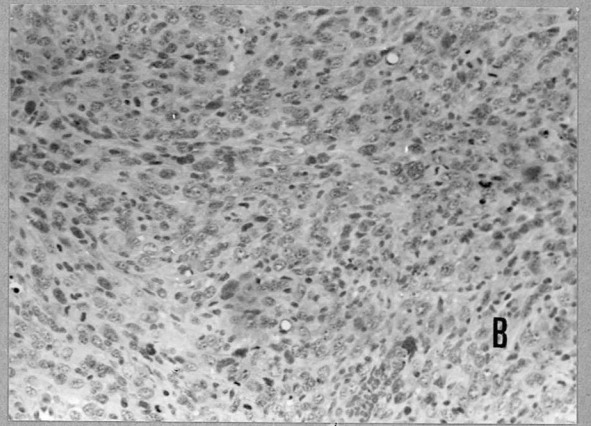
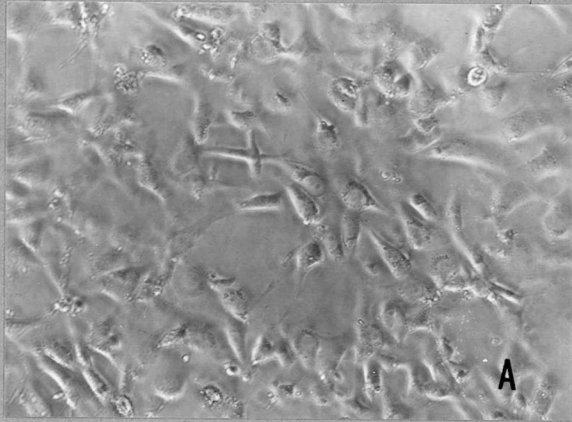
B ; 細胞の接種によってヌードマウス皮下に形成された腫瘍の組織像は、未分化癌様構造を呈する。(倍率100倍)

C ; 培養細胞の電子顕微鏡所見

多くの細胞は楕円形をなし、豊富な細胞内小器管を有する。細胞表面には、微絨毛および接着斑がみられる。(倍率2000倍)

D ; ヌードマウス腫瘍の電子顕微鏡像

直径が40 Åの微細線維を有している。(倍率8000倍)



☒ - 9

R-8_{sn} 細胞の形態的特徴

A ; 培養細胞の位相差顕微鏡像

R-5_{sn} 細胞と類似した所見を示す。(倍率
100倍)

B ; ノードマウス腫瘍の組織像

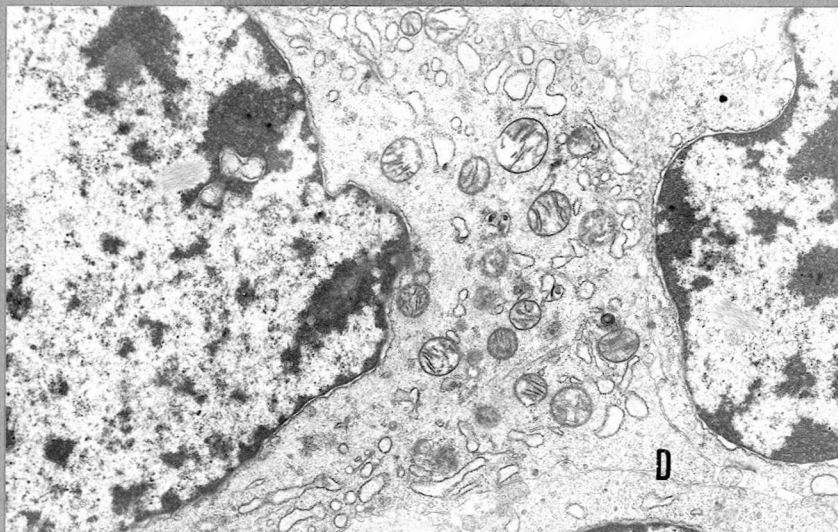
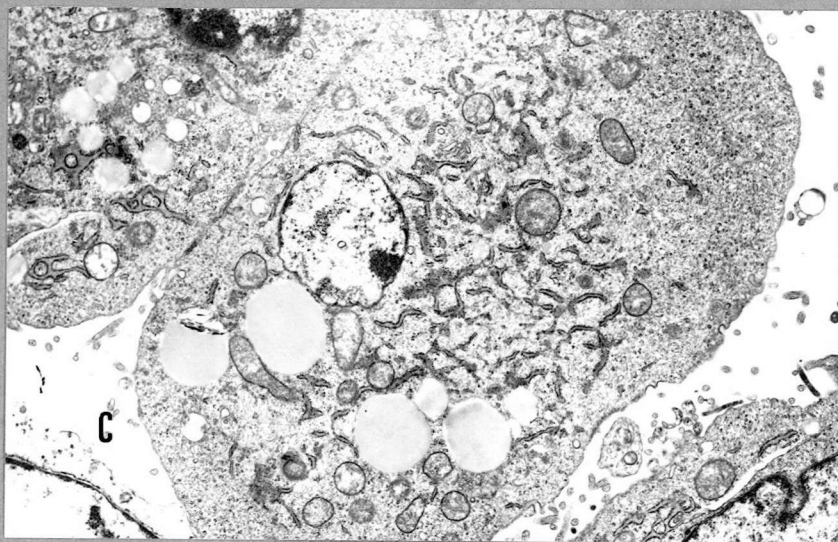
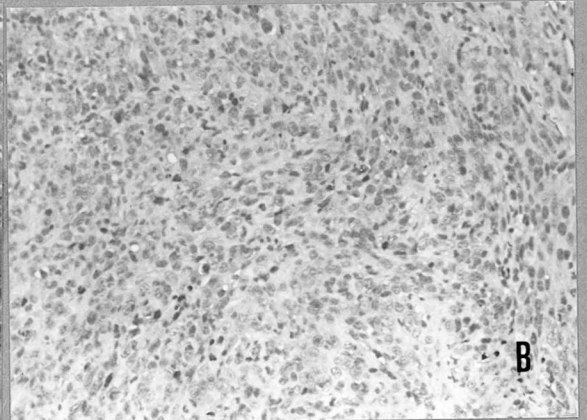
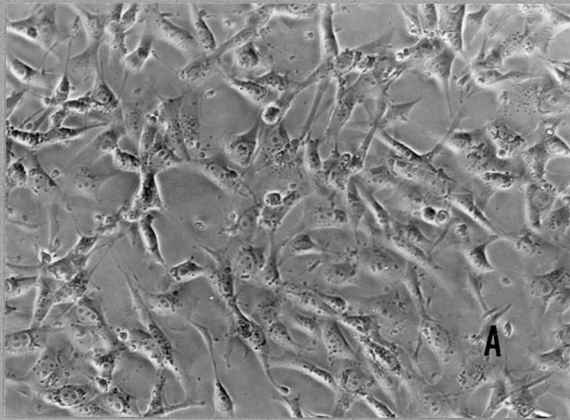
未分化癌様構造を示す。(倍率100倍)

C ; 培養細胞の電子顕微鏡像

分泌様顆粒および直径40 Åの微細線維をそ
の細胞質に含む。(倍率3000倍)

D ; 腫瘍の電子顕微鏡像

R-5_{sn} 細胞と同様な所見がみられ、直径40
Åの微細線維を含む。(倍率5000倍)



☒ - 10

R-14_{sn} 細胞の形態的特徴

A ; 培養細胞の位相差顕微鏡像

立方形の細胞が敷石状に配列する上皮様細胞所見を示す。(倍率100倍)

B ; ノードマウス腫瘍の組織像

梁状配列をなす腺癌像を呈する。(倍率100倍)

C ; 培養細胞の電子顕微鏡像

細胞間には腺上皮の一つの特徴である細胞間嵌合像を有する。(倍率4000倍)

D ; 腫瘍の電子顕微鏡所見

培養細胞に比べ接着斑および細胞間嵌合像の発達は弱いですが、多数の細胞内小器管を有する。(倍率2000倍)

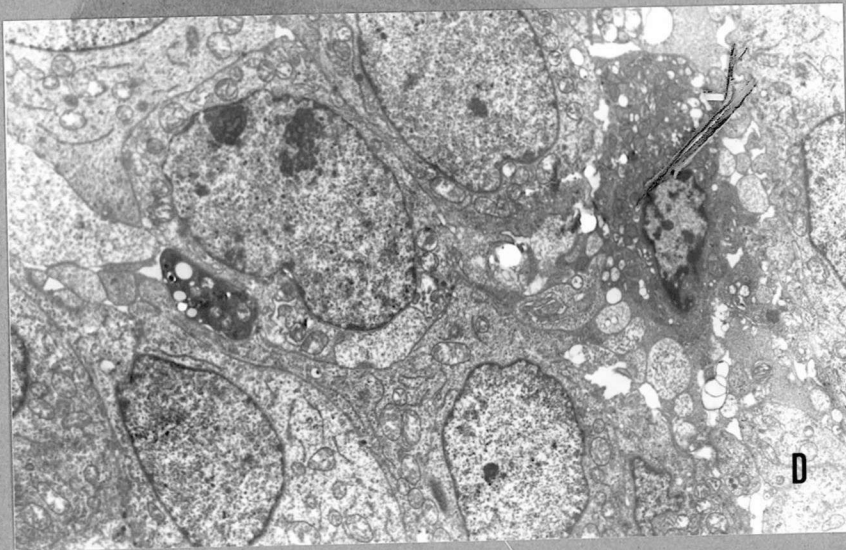
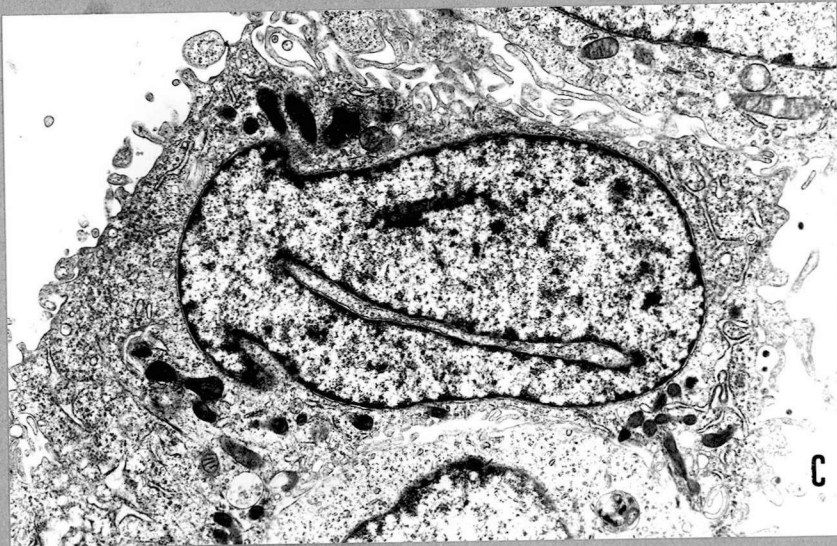
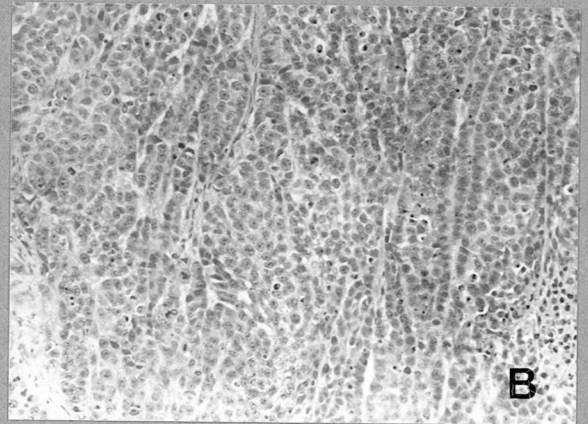
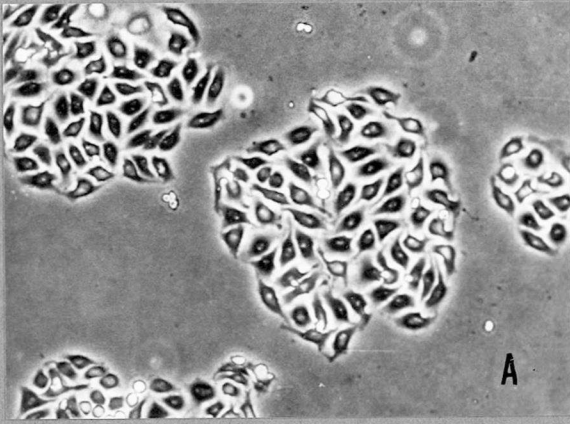


図 - 1 1

R-14_{tn} 細胞の形態的特徴

A ; 培養細胞の位相差顕微鏡像

R-10_{sn} 細胞と比較し、やや細長い細胞がみられる。(倍率100倍)

B ; ノードマウス腫瘍の組織像

R-14_{sn} 細胞と同様に腺癌像を示す。(倍率100倍)

C ; 培養細胞の電子顕微鏡所見

発達の悪い tonofilament がみられる。(倍率5000倍)

D ; 腫瘍の超微形態所見

培養細胞にみられた tonofilament はみられず R-14_{sn} に類似した形態を示す。(倍率2500倍)

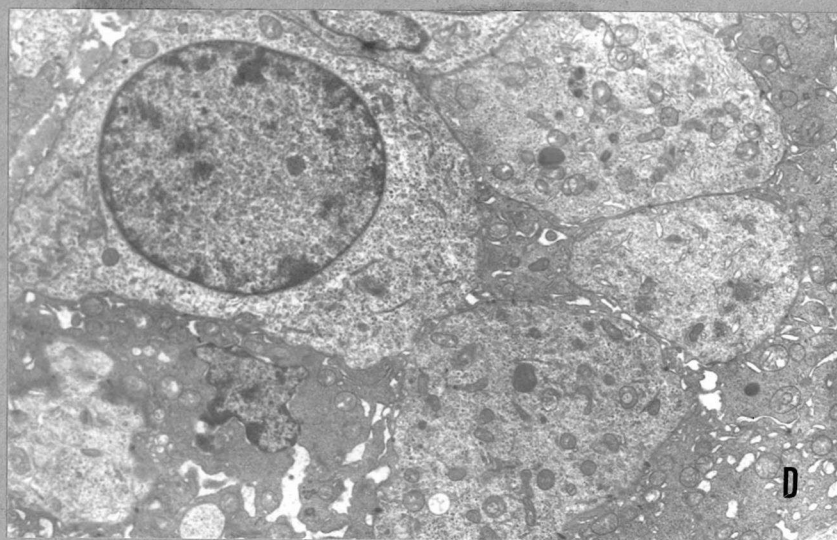
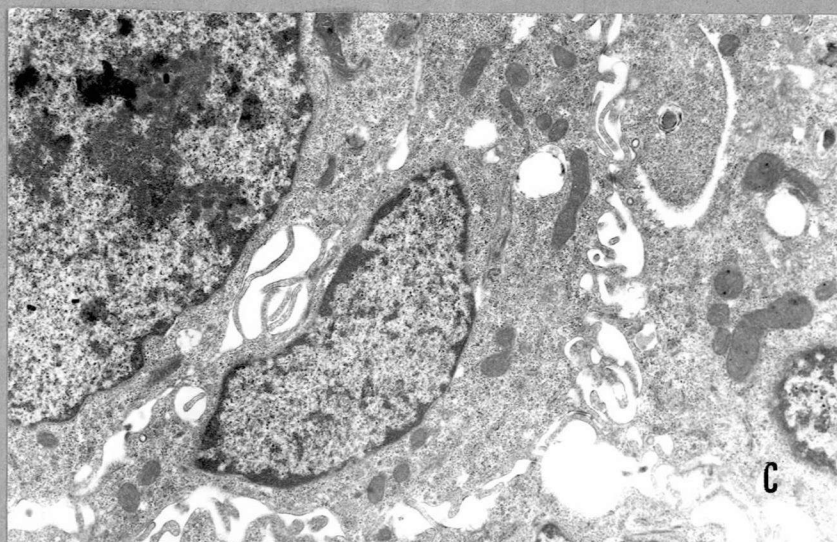
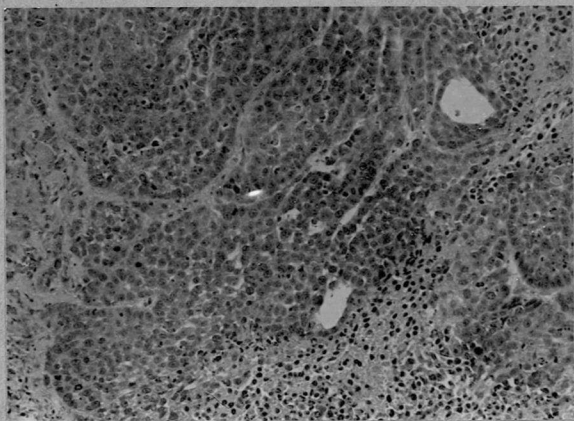
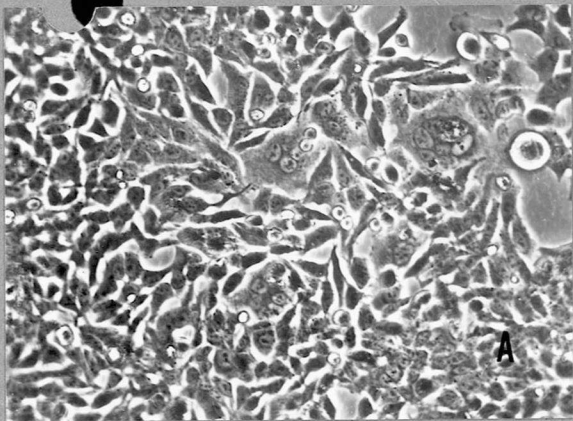


図 - 12

R-17_{tn} 細胞の形態的特徴

A ; 単層培養の位相差顕微鏡像

R-14_{tn} 細胞と類似した形態を示す。(倍率
100倍)

B ; 腫瘍の組織像

未分化腺癌様構造を示す。(倍率200倍)

C ; 培養細胞の電子顕微鏡像

R-14_{tn} 細胞と同様に tonofilament を有する。(倍
率2500倍)

D ; 腫瘍の電子顕微鏡像

R-14_{tn} 細胞のそれに近似した構造を呈する
(倍率3500倍)

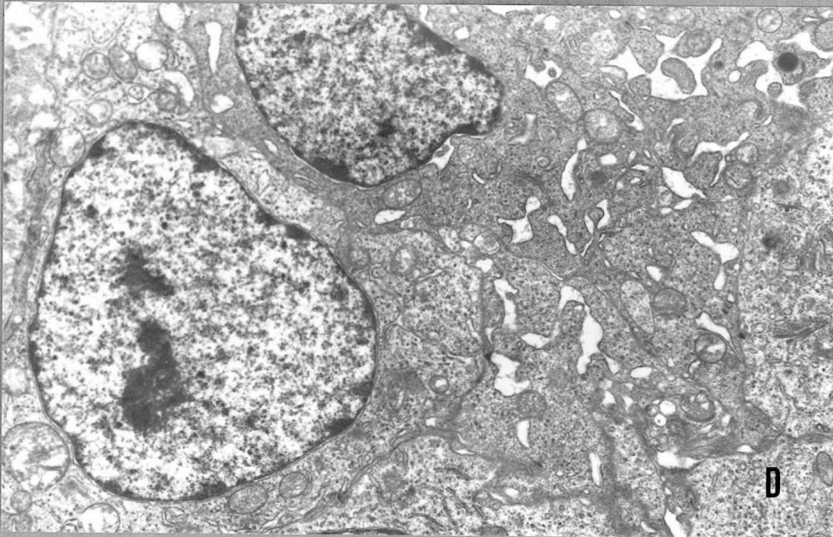
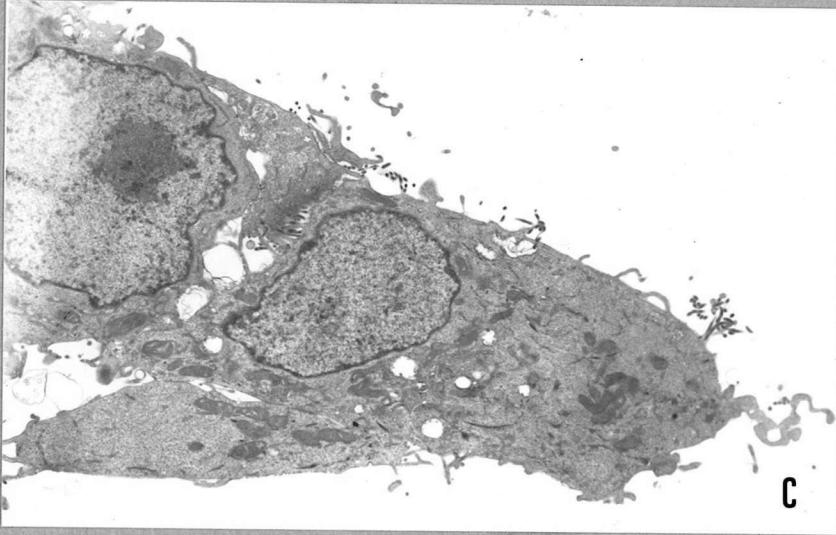
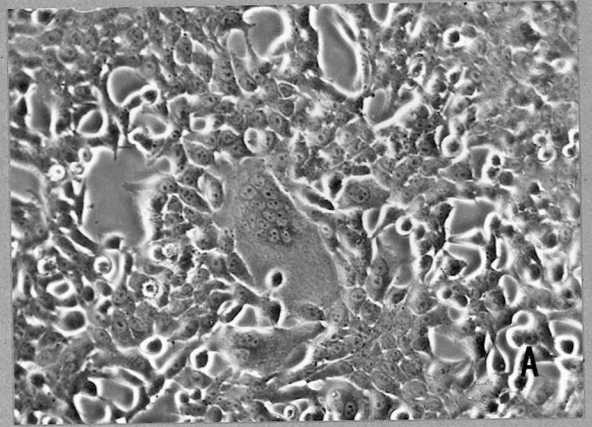
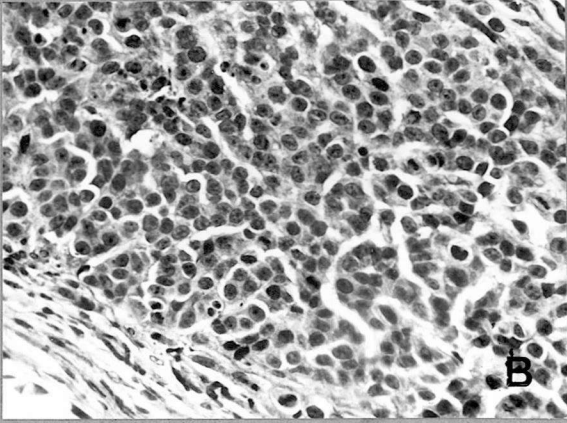
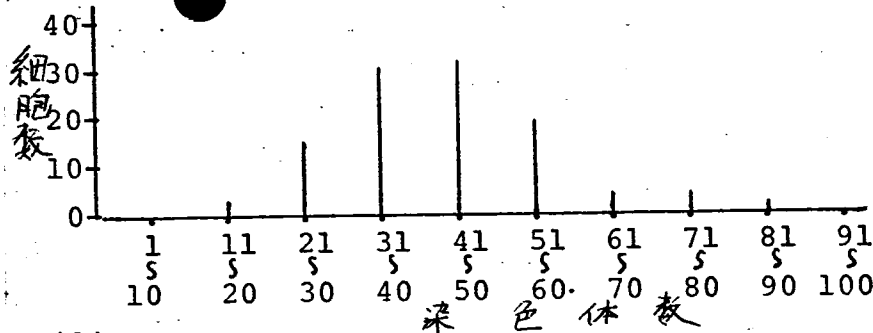
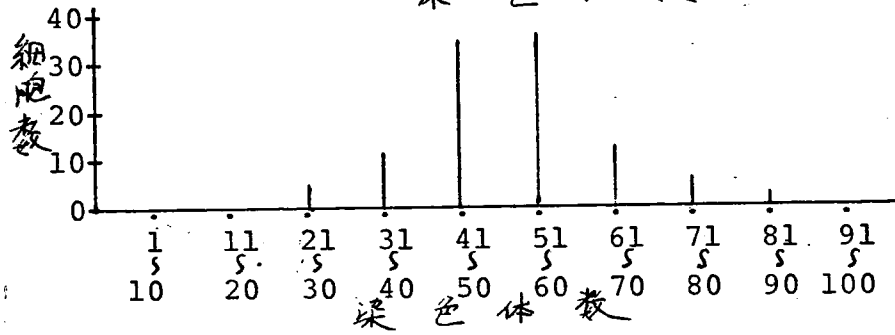


图-13

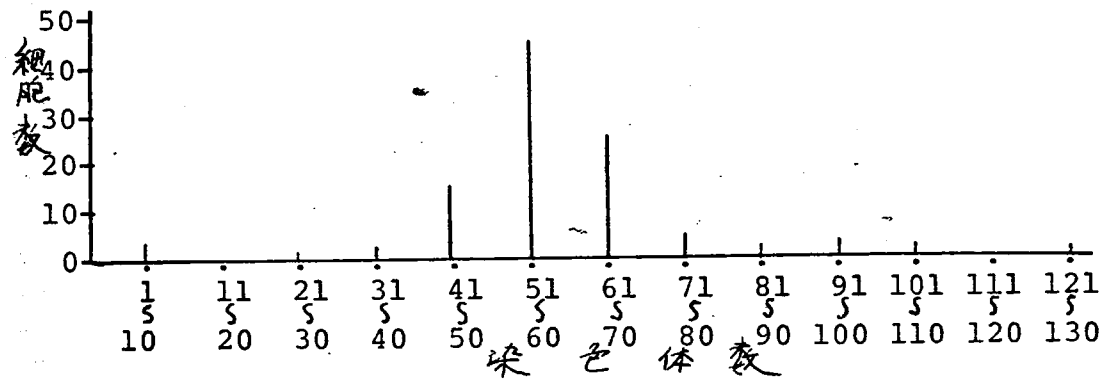
染色体数



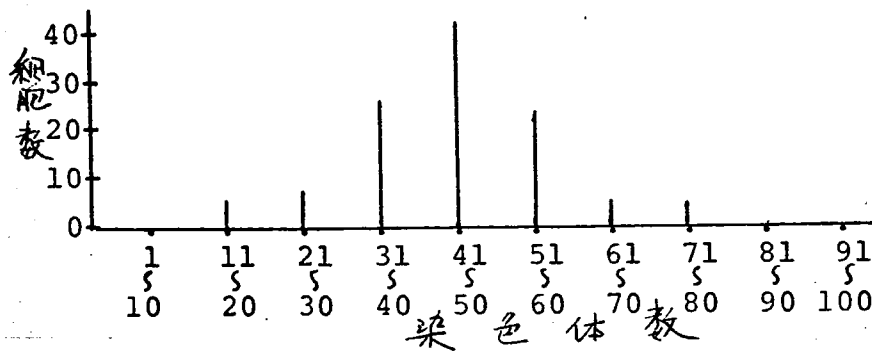
R-5_{sn}



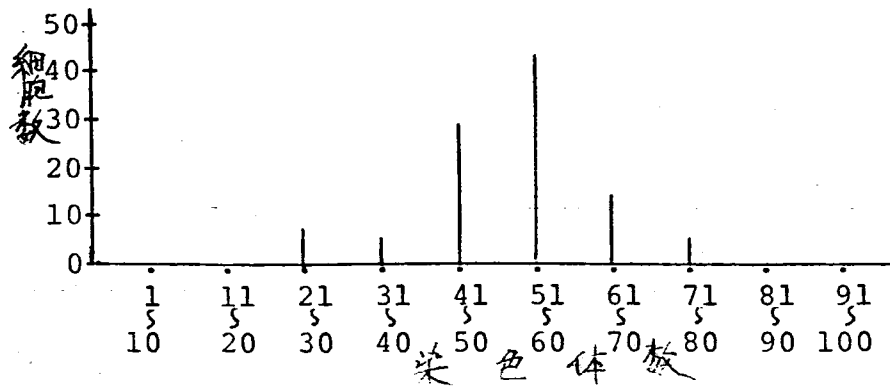
R-8_{sn}



R-14_{sn}



R-14_{tn}



R-17_{tn}

図14 抗ヒト全唾液家兎抗血清の組織特異性および局在性 (PAP法)

A ; コントロール (倍率100倍)

唾液による免疫前の家兎より血清を採取し、一次血清として使用した。

B ; 正常ヒト顎下唾液腺を抗ヒト全唾液家兎抗血清を用い染色した。(倍率200倍)

腺房細胞, 介在部導管細胞および筋上皮細胞にその局在性がみられる。

C ; 正常ヒト膵臓を抗ヒト全唾液家兎抗血清を用い染色した。(倍率200倍)

外分泌腺に弱い抗原の局在がみられる。

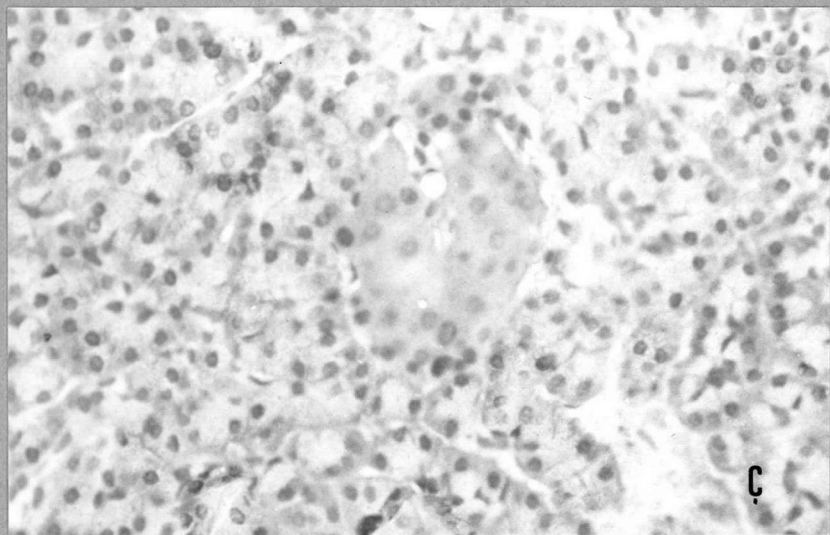
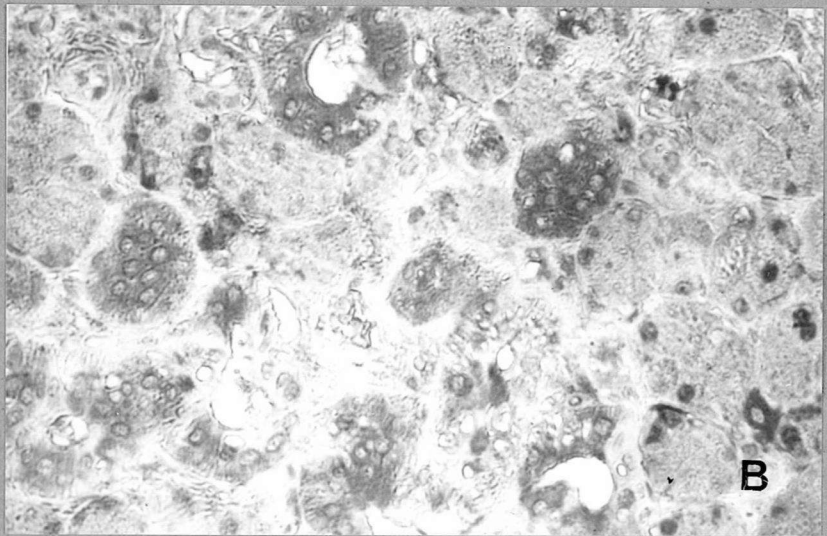
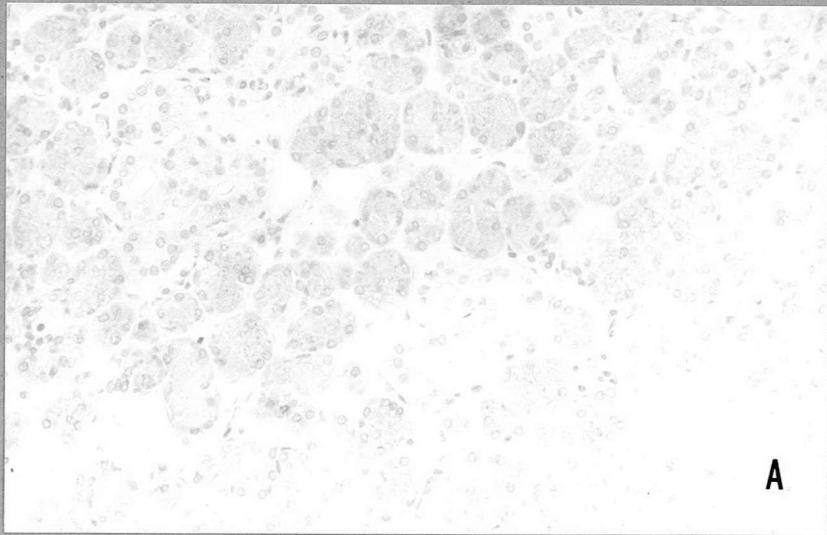


図 - 15 R-14_{sn} 細胞および R-5_{sn} 細胞におけるヒト唾液成分の存在

(A) : R-5_{sn} 細胞 (倍率 × 200 倍)

(B) : R-14_{sn} 細胞 (倍率 × 100 倍)

(C) : HeLa 細胞 (倍率 × 100 倍)

抗ヒト全唾液家兎抗血清と FITC を結合した抗家兎 γ -グロブリンブタ血清を用いて間接蛍光抗体法で唾液成分の抗原を検索した。

(A), (B) : R-5_{sn}, R-14_{sn} の細胞質に特異蛍光がみられる。

(C) : HeLa 細胞ではその蛍光を全く認めない。

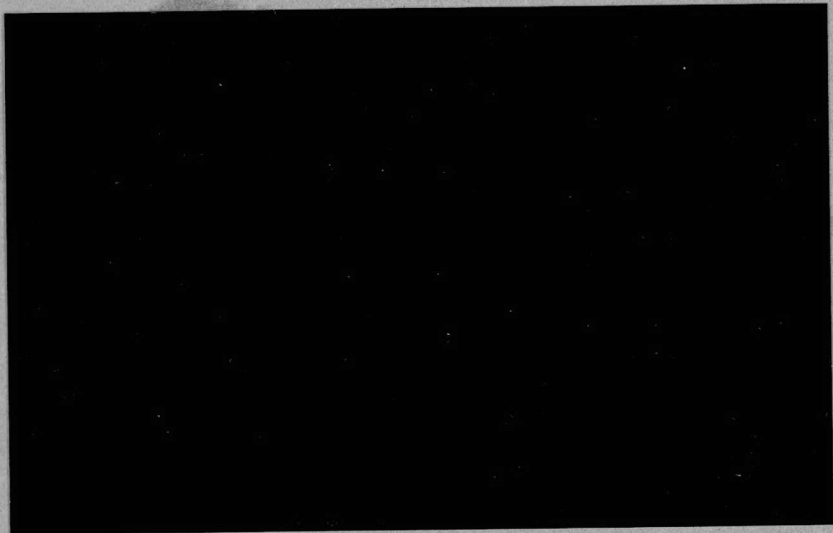
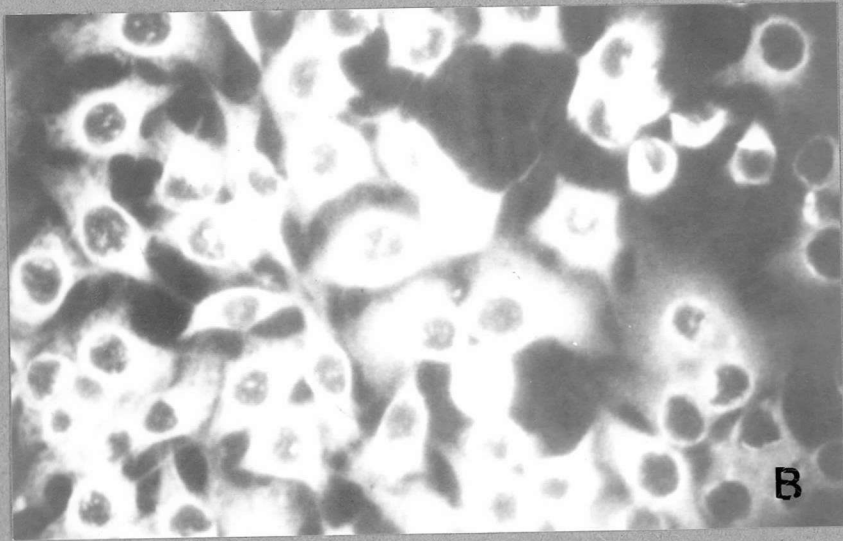
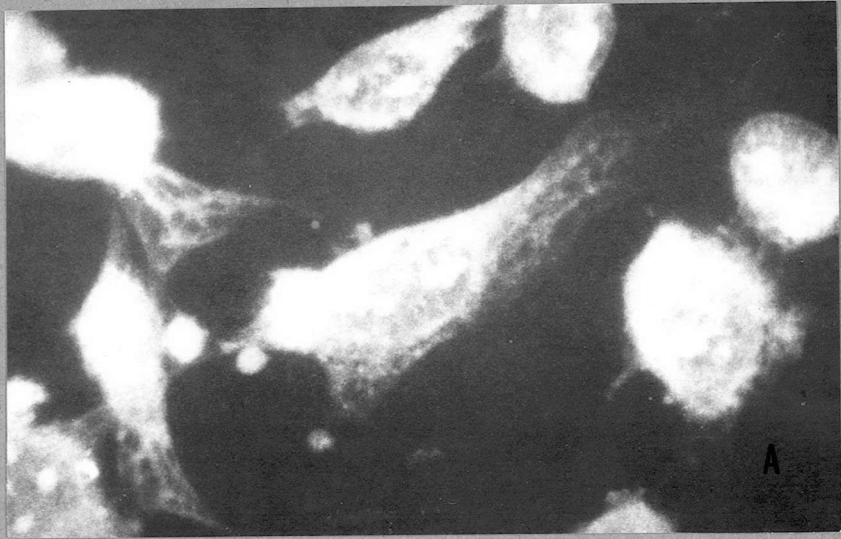


表-1

実験材料(照射顎下唾液腺)

症例番号	名前	性別	年齢	臨床診断名	線量 ^①	期間 [*]	細胞名
1	H.K.	男性	54	口腔底癌	3000	42	HSG
2	H.I.	男性	61	下顎歯肉癌	3000	61	R-2
3	M.Y.	女性	56	舌癌	3000	83	R-3
4	M.E.	男性	61	下顎歯肉癌	3200	24	R-4
5	D.N.	男性	51	下顎歯肉癌	3000	32	R-5
6	S.O.	女性	57	下顎歯肉癌	4000	140	R-6
7	Y.O.	男性	57	下顎歯肉癌	3000	28	R-7
8	T.O.	男性	69	下顎歯肉癌	2800	30	R-8
9	M.W.	女性	72	舌癌	3000	30	R-9
10	M.S.	男性	38	口腔底癌	3000	56	R-10
11	T.T.	男性	55	舌癌	5000	56	R-11
12	S.S.	男性	57	口腔底癌	3400	337	R-12
13	Y.U.	男性	59	下顎歯肉癌	5200	120	R-13
14	T.W.	男性	45	舌癌	2800	60	R-14
15	Y.M.	男性	71	口腔底癌	5800	72	R-15
16	Y.S.	女性	66	下顎歯肉癌	2800	62	R-16
17	K.M.	男性	62	頬粘膜癌	3000	56	R-17

①: 顎下唾液腺への推定吸収線量 (doses)

*: 外部照射終了時から抽出までの期間(日)

実験に用いた照射唾液腺由来の培養細胞は、上記17名の口腔扁平上皮癌患者から得た。これらの患者は、手術前にとりおきの線量のエクソルト 60 外部照射と上頸部を受けていた。この症例 2 から 17 に由来した細胞をそれぞれ R-2 から R-17 と名づけた。

表-2

実験材料 (非照射顎下唾液腺)

症例番号	名前	性別	年齢	臨床診断名	細胞名
1	U.T.	女性	69	唾石症	nc-1
2	T.N.	男性	57	下顎腫瘍	nc-2
3	T.A.	男性	47	唾石症	nc-3
4	K.Y.	女性	49	唾石症	nc-4
5	S.I.	男性	53	上顎洞癌	nc-5
6	M.O.	男性	67	舌癌	nc-6
7	G.K.	男性	61	口腔底癌	nc-7
8	S.I.	男性	70	上顎歯肉癌	nc-8
9	S.M.	男性	49	上顎歯肉癌	nc-9
10	T.O.	男性	48	上顎歯肉癌	nc-10

上頸部に放射線照射を受けていない

患者10名の顎下唾液腺から得た培養

細胞をそれぞれ nc-1 から nc-10 と名づ

け非照射対照として実験に用いた。

表-3

照射顎下唾液腺由来培養細胞のコロニー形成率における継代変化

細胞名	コロニー形成率 (%)			
	実験.1	実験.2	実験.3	実験.4
R-2	0	0	/	/
R-3	0	/	/	/
R-4	0.2	0	/	/
R-5	0.3	2.5	4.8	9.8
R-6	0	0	/	/
R-7	0	/	/	/
R-8	1.0	3.3	7.2	12.5
R-9	0.3	0	/	/
R-10	0	0	/	/
R-11	0.3	0	0	/
R-12	0	0	/	/
R-13	0	/	/	/
R-14	0.14	6.1	38.2	43.8
R-15	0	/	/	/
R-16	0	0	/	/
R-17	0.014	/	/	/

実験1は継代3から5代, 実験2は継代8から13代, 実験3は継代24から27代, 実験4は継代33から37代に行なった。R-4, R-9, R-11, R-17は, 継代初期にコロニー形成能を有したが, 継代を継るに従いその能力を消失し, 最終的に細胞の増殖は停止した (/)。しかし, R-5, R-8, R-14細胞は継代を重ねるにつれてコロニー形成率が増加し, R-5細胞は35代, R-8細胞は37代, としてR-14細胞は13代でマウスへの造腫瘍性を有する R-5_{sn}, R-8_{sn}, R-14_{sn}細胞を軟寒天中のコロニーからそれぞれ分離することができた。

表一

各種細胞におけるTPAの軟寒天のコロニー促進効果

細胞 10^4 個あたりのコロニー数

細胞名	TPA (+)			TPA (-)			TPA (+) TPA (-)
@nc-8	0,	0,	0,	0,	0,	0,	/
@nc-9	0,	0,	0,	0,	0,	0,	/
#R-14	212,	184,	192,	10,	14,	17,	14.3
\$R-14 _{sn}	1760,	1360,	1444,	1240,	1612,	1844,	1.0
cR-14 _{tn}	920,	880,	852,	736,	644,	816,	1.4
&nuR-14 _{tn}	616,	820,	716,	880,	840,	920,	1.2
*HSG	5768,	4264,	5016,	5396,	4824,	5964,	1.1

@: 非照射顎下唾液腺由来の細胞(継代2代)

#: 照射顎下唾液腺由来の細胞(継代2代)

\$: R-14 細胞(継代13代)の軟寒天中のコロニーから分離したクローン細胞。

c: R-14 細胞(継代2代)をTPA処理することにより誘発されたコロニーから分離したクローン細胞。

&: R-14_{tn} (継代3代)をマウスに接種、形成された腫瘤からin vitroに分離した細胞。

*: 軟寒天中のコロニーから分離した造腫瘍性クローン細胞。

表1

各種細胞における細胞飽和密度および DNA 合成への TPA 効果

細胞	継代数	① 細胞飽和密度 ($\times 10^5$ cells/cm ²)			② 細胞への ³ H-thymidine の取り込み (dpm/well)		
		TPA (+)	TPA (-)	TPA (+) / TPA (-)	TPA (+)	TPA (-)	TPA (+) / TPA (-)
R-14	4	5.7	2.9	1.95	12505	6522	1.91
R-14 _{sn}	16	4.8	5.1	0.94	7411	7650	0.97
R-14 _{tn}	4	6.7	6.3	1.06	8429	8538	0.99
HSG	5	4.1	4.5	0.91	6598	6931	0.96
R-5 _{sn}	84	2.7	2.8	0.96	3298	3111	1.06

細胞を 24 穴の multi-well に 2.5×10^4 個/ml の細胞を入れ、4日間培養後、細胞を MEM 2 回洗浄した。ついで TPA (100ng/ml) を含む、または TPA を含まない増殖培養液を添加した。

①: 細胞飽和密度は、細胞増殖が停滞期に達した時期の細胞数を算定した。

②: TPA 処理 20 時間後に、³H-thymidine (1 μ ci/ml) で 60 分間ラベル後、細胞の酸不溶画分を測定した。

表-6

各種組織におけるヒト唾液成分の存在

組 織	反 応
顎下唾液腺	
腺房細胞	+
介在部導管細胞	+
腺条部導管細胞	-
筋上皮細胞	+
間葉系細胞	-
乳 腺	-
睪 腺(外分泌腺)	±
肝 臓	-
前立腺	-

抗ヒト全唾液家兎血清を用い、酵素抗体法(PAP法)

により各組織を染色した。

+; 特異抗原陽性を示す。

±; 特異抗原弱陽性を示す。

-; 特異抗原陰性を示す。

表-7

各種ヒト培養細胞における
ヒト唾液成分の産生

細胞名	反応
<u>(1) 唾液腺由来</u>	
HSG	+
R-5 _{sn}	+
R-8 _{sn}	+
R-14 _{sn}	+
R-14 _{tn}	+
R-17 _{tn}	+
HPA	+
線維芽細胞	-
<u>(2) 他臓器由来</u>	
HeLa	-
FL	-
GK-sq	-

抗ヒト全唾液家兎抗血清と FITC を結合した
抗家兎γ-Globulin血清を用いて間接蛍光
抗体法で唾液成分の抗原を検索した。

- + は特異蛍光陽性を示す。
- は特異蛍光陰性を示す。

表-8

照射顎下唾液腺由来培養細胞(継代1代)に
 かけた TPA および R.A. のコロニー形成能への影響
 (症例番号 12)

treated	細胞10 ⁴ 個あたりのコロニー数			treated / control
control (0.1% DMSO)	7	8	12	100
TPA (100ng/ml)	38	20	24	303
TPA + R.A. (10 ⁻⁵ M)	5	6	13	89
TPA + R.A. (10 ⁻⁷ M)	25	28	31	311
TPA + R.A. (10 ⁻⁹ M)	28	35	20	276

組織を細切後, 0.1% EDTA で 20 分間処理し EDTA
 を遠心 (3000 r.p.m. 5分) し除去, 0.125% トリプシンにて 60 分間
 37°C で消化した。CMF 培地 (NaCl, 8.0g. KCl, 2.0g. Na₂HPO₄ (
 Na₂HPO₄ · 12H₂O), 11.5g (29.0g). KH₂PO₄, 2.0g) で洗浄後, 0.2%
 「インゲン」 (type. I crude) を使い 37°C で処理した。3回 10% 仔牛血清
 で洗浄後, 得られた細胞を軟寒天培地中で培養し, 10 個以上
 の細胞集団を 1 コロニーとして算定した。