



Title	ヒト悪性線維性組織球腫由来培養細胞の生物学的特性
Author(s)	杉山, 勝
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/33924
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

ヒト悪性線維性組織球腫由来
培養細胞の生物学的特性

大阪大学歯学部口腔外科学才1
講座

杉山 勝

言　　語

悪性線維性組織球腫 (MFH) は、軟部組織又は骨に発生する未分化な多形型の肉腫である。

MFH の名称を用い、比較的まとまった1つの腫瘍として総括される様になったのはごく最近のことであるが、本腫瘍の概念は1960年代に入り Stout^{1,2)} 一派によって初めて報告された。するゝ彼らは、組織球性と思われる腫瘍と組織球腫と線維性黄色腫とに分け、さらにこれを良性と悪性とに分けた。それ以来、storiform または cartwheel 様増殖様式とする悪性腫瘍は、広く MFH と呼ばれる様になった。

1978年 Weiss と Enzinger³⁾ は本腫瘍と、腫瘍細胞が主として組織球あるいは線維芽細胞の形態を示し、貪食作用、コラーゲン産生以外に特異な分化方向を示さない未分化腫瘍と広く定義づけた。その後多くの病理学者の注目を集める腫瘍となり、今までの間葉系腫瘍材料が再検討されるに至った。その結果現在では、中高齢者に生ずる肉腫の中で最も発生頻度の

高い因腫ぶあると考えられている。

本腫瘍の一般的な組織学的特徴は、以下の
ごとくである。腫瘍細胞は主として組織球様
あるいは線維芽細胞様形態ととり、時折これ
らの細胞に加えて、奇怪な (bizarre) 多核巨細胞
や重造腫細胞が組織内に見られる。また、腫
瘍細胞の中に、赤血球、血鉄素などとり込
む貪食像や、種々の程度の炎症性細胞浸潤が
見られる。さらに本腫瘍は、紡錘形の細胞が
花むしろ状に増殖する storiform pattern としほし
ば形成するのが特徴的である。しかしこれら
の組織像は、同一腫瘍内でも採取部位あるい
は摘出時期によつて異なるので、類似腫瘍と
の鑑別診断は極めて困難である。さらに上記
の多彩な組織学的特徴に加えて、他の特徴と
有する MFH もありうるとして、Weiss と Enzinger^{4, 5)}
は本腫瘍を、1) 通常型の storiform-pleomorphic type,
2) 粘液変性の強い myxoid type, 3) 巨細胞の出現
が著なる giant cell type, 4) 炎症性細胞の著なる
inflammatory type, 5) 血管新生の著明な angiomatoid

type の 5 つの subtype に分類している。また⁶⁾ Hadju は、MFH を fibroblastic, histiocytic, pleomorphic の 3 部に分け、fibroblastic の中に Dermatofibrosarcoma protuberans, Fibrous xanthoma, Myxoid fibrous histiocytoma を、histiocytic の中に Malignant histiocytoma, Malignant giant cell tumor of soft tissues, Round cell sarcoma, Pseudosarcomatous reticulo histiocytosis, Xanthomatous giant cell tumor, Nevoxanthoendothelioma と、pleomorphic の中に Malignant xanthoma, Fibroxanthosarcoma, Xanthosarcoma, Histiocytic sarcoma を含めるとしている。しかし病理学者の中には、この様な伝不解釈に批判的な者も少なくない。

一般的に腫瘍を分類する場合、その組織起源をもとに考えるのが通案であると思われる。

MFH は初め、Stout 一派により組織球に由来した腫瘍として報告された。しかし最近ではこの説は否定されつつあり、代って未分化間葉細胞がその起源^{5~7)}であると考えられる者が多くを占める様になった。事実 Weiss と Enzinger⁵⁾ や Hadju⁶⁾ は、MFH が未分化間葉細胞に由来するという説を信じ、MFH を分類しているが、この仮説は事

実の裏付けに乏しく、推測の域を出ていない。

上記の点とく MFH が我々と混乱させる原因は、腫瘍組織像の多彩性にあると思われる。

いわゆる通字型の場合でさえ、storiform pattern の形成が著しい症例とこれに乏しい症例が見られ、同腫瘍の特徴である血球貪食像や巨細胞出現数も、症例によつてかなりの差が認められる。以上の理由から現在でも、全ての病理学者が納得する様な組織学的診断基準が定められておらず、どの程度の組織像の匪型までを MFH としとるという点について結論が出ていない。

この様に、MFH は多くの問題を含む莫然とした腫瘍として放置された状態に、病理学的分類のみが先行しているのが現状である。故に、腫瘍の特性、組織由来など腫瘍の本体を明らかにし、適確な診断マーカーを見出すことが必要であると思われる。

そこで著者は、種々の細胞が混在した多彩な組織像を特徴とする MFH の複雑な状態を単

純化するため、腫瘍組織から単一細胞をin vitro
に分離し、その性状を解析することにより、
本腫瘍の診断マーカーおよび組織由来等につ
いて考察を加えた。

実験材料及らびに実験方法

1. 実験材料

本研究に使用したヒト悪性線維性組織腫(MFH)組織は、以下の患者から得た。

患者は38才の男性で、右側上顎臼歯部の腫脹および違和感と主訴として、昭和50年4月2日に本院を受診した。口腔内所見として、761頰側素肉に潰瘍形成と認め、右側犬窩から上顎結節にかけて約3cm幅の弾性硬の腫瘍と認めた。右側顎下リンパ節は約1cm径に腫脹していたが、可動性で圧痛は認められなかった。口腔内潰瘍形成部を中心として試験切除を行った結果、悪性線維性組織球腫(MFH)の診断が得られたので、上顎部郭清術および上顎骨部分切除術を施行した。なお手術により得られた顎下リンパ節は、病理組織学的にMFH転移巣であった。約3ヶ月後、右側眼窩下部に腫瘍の局所再発と認めたため、眼球を含めた腫瘍摘出術を施行し、術直後よりドキシソルビン塩(ADM, アドリアシン[®], 協和

醗酵製) 投与による化学療法を開始した。しかし約2ヶ月後には、内眼角部に腫瘍の再発を認めると共に、肝リンパ節への転移が認められた。その後、ADMに加えてビンクリスチン硫酸塩(VCR, オンコビン[®], 塩野義製薬製), シクロホスファミド(CTX, エンドキワン[®], 塩野義製薬製), プレドニソン(P, プレドニン[®], 塩野義製薬製)を用いたVEP療法を行ったが効果が得られず、初診日より約1年後に患者は死亡した。

2. 細胞培養に用いた培養方法

才1回目の手術により、得られた上顎洞部のMFH組織を用いて、初代培養を行った。

すなわち、手術摘出物中より無菌的に採取した腫瘍組織を約1mm角に細切し、60mm径ペトリ皿上に室温で2時間静置した。その後10%仔牛血清(阪大微生物病研究会製), 2mM L-グルタミン(和光純薬工業製)を含むEagleのMEM(日本製薬製)を増殖培養液として5ml加え、5%炭酸ガス培養器中で37℃にて培養した。なお培養液の交換は、4日から6日毎に行った。

約50日間の培養の後、細胞はほぼ飽和状態に達した。この時、最終濃度0.08%トリプシン(阪大微生物病研究会製)、1.4%エタレンジアミン四酢酸ニトリウム(EDTA, 石津製薬製)、0.05%コラゲナーゼ(Type I, Sigma 製, U.S.A.)を含む Ca^{2+} , Mg^{2+} と含まないリン酸緩衝液(PBS(-), PH 7.2)に37°Cで10分間処理し、細胞を採取した。次に200×gで10分間遠沈することにより得られた細胞沈渣を、MEMで3回洗浄した後、増殖培養液に 10×10^4 個/mlの割合に浮遊させたものを、60mmあるいは90mm径のペトリ皿に入れ、5%炭酸ガス培養器中で37°Cにて培養した。なお細胞継代は、通常5日から8日間隔で行った。

対照として用いた線維芽細胞は、上頸部郭清時に得た同一患者顎下唾液腺組織と、線維腫瘍発生時に得た正常顎粘膜組織とを、組織培養することにより得た。なお、実験には継代3代目までの細胞を用いた。

また、ヒト口腔底扁平上皮癌由来 KB 細胞、当教室で樹立したヒト唾液腺多形性腺腫由来

8)

HPA 細胞⁹⁾, さらにヒト唾液腺由来 HSG
細胞¹⁰⁾と実験に使用した。

3. 寒天培養液中でのコロニー形成能の算定

30 mm 径ペトリ皿に寒天 (Special Agar Noble, Difco Laboratories 製, U S A) と, 最終濃度 0.6% の割合に含む増殖培養液 2 ml を入れ硬化させた後, 寒天と 0.3% の割合に含む増殖培養液 1 ml に細胞を 10^3 個または 10^4 個混入し, 先に硬化させた寒天培養液上に重層した。上層の寒天培養液を硬化させた後, 5% 炭酸ガス培養器中で 37°C に培養した。培養 20 日後に, 8 個以上の細胞からなる細胞集団を 1 コロニーとし, 顕微鏡下でその数を算定した¹¹⁾。

4. マウスでの造腫瘍性の検索

培養細胞の造腫瘍性を検索するために, 3~4 週齢のマウス (BALB/cAJcl-nu, 日本クレア) を用いた。EDTA, トリプシン, コラゲナーゼを含む PBS(-) にて採取した細胞 10^3 個を, 0.2 ml の MEM に浮遊させ背部皮下に接種した。腫瘍が形成

これに後長期間経過すると、腫瘍中心部に壊死が生じるため、原則として細胞接種後1ヶ月以内に、腫瘍を摘出した。

5. 光学顕微鏡による形態観察

腫瘍組織の形態観察は以下の様に行った。

腫瘍組織を10%ホルマリン液(PH 7.3)にて固定後、パウフィンと理を行い、組織切片を作製した。切片にハマトキシリン・エオシンの染色を施した後、光学顕微鏡(Nikon製)にて形態観察を行った。

さらに特殊染色として、periodic-acid SCHIFF (PAS), アルミナニ青, ステイン黒B, オイル赤O, 渡銀, VAN GIESON染色を行い、アルミナニ青染色については、ヒアルロニダーゼによる消化試験も行った¹²⁾。なお、PAS, アルミナニ青染色においては、カルノア液(エタノール60 ml, フロロホルム30 ml, 氷酢酸10 ml)を固定液としたが、他の染色については10%ホルマリン液を用いた。ただし脂肪染色に際しては、凍結切片作製後10%ホルマリン液にて固定した

ものについて、染色を行った。

培養細胞の染色は以下の様に行った。すなわち 30×10^4 個の細胞を、 24×24 mm クバーガラス (松浪硝子工業製) を入れた 30 mm 径ペトリ皿で、3 日間 37°C で培養した後、クバーガラス上の単層培養細胞を PBS(-) で洗浄した。その後 99.5% メタノールにて固定し、10% ギムザ溶液 (PH6.8) で染色した標本について、形態観察を行った。さらに培養細胞についても、組織に用いたのと同様の手法で特殊染色を行った。

6. 酵素染色法

腫瘍組織、培養細胞について、acid phosphatase (ACPase), α -naphthyl acetate esterase (NAEase), naphthol AS-D acetate esterase (NAS-DEase) 染色を行った¹²⁾。

組織の場合は、新鮮腫瘍組織をスライドガラス (松浪硝子工業製) 上にスライスする：ことにより、細胞と培養液をこけた後、室温で約 20 分間乾燥させた。その後冷アルコールに固定したものと、標本として用いた。

培養細胞の場合は、ギムザ染色の場合と同

様に、フバーグラストに増殖させた細胞を冷ト
ルマリン液にて固定したものを、標本として
用いた。

ACPase 染色の場合は 0.2M 酢酸緩衝液 (PH 5.8)
15 ml に、naphthol AS-TR phosphoric acid (Sigma 製, U S A)
5 mg と fast red violet LB salt (Sigma 製, U S A) 30 mg と
含む蒸留水 15 ml を加えた浸漬液に切片を入れ、
37 °C で 1 時間浸漬した。

NAEase 染色の場合は 0.1M リン酸緩衝液 (PH 7.4)
20 ml に、 α -naphthyl acetate (Sigma 製, U S A) 10 mg,
fast blue B salt (Sigma , U S A) 50 mg を加えた浸漬液
中に細胞を、37 °C で 15 分間反応させた。

NAS-DEase 染色の場合は 0.1M リン酸緩衝液 (PH 7.4)
30 ml に naphthol AS-D acetate (Sigma 製, U S A) 5 mg,
garnet GBC salt (Sigma 製, U S A) 20 mg を加えた浸漬液
を用い、細胞を 37 °C で 1 時間浸漬した。

石灰阻害試験のため、ACPase については、
L-酒石酸（和光純薬工業製）100 mM と、NAEase, NAS-DEase
についてはフッ化ナトリウム (NaF, 和光純薬
工業製) 10 mM を加えた浸漬液を用いた。

7. 電子顕微鏡による観察

腫瘍組織を電子顕微鏡にて観察するため、腫瘍組織片を 0.005 M 塩化カルシウム (CaCl_2 , 和光純薬工業製) と加えた 0.1 M リン酸緩衝液 ($\text{pH } 7.3$) の最終濃度 4% になるよう調整したグルタールアルテヒド (信洋製薬製) 溶液で、2時間固定した。その組織片を、上記のリン酸緩衝液で充分洗浄後、残存するグルタールアルテヒドを除去するため、緩衝液に浸漬し 4°C に一晩放置した。次に、 4°C の 2% 四酸化オスmium液 (OsO_4 , Merck 製, USA) の2時間固定を行い、通電により冷エタノール系で脱水を行った。その後組織片を、プロピレンオキサイド (信洋製薬製) に浸漬させた後、Luft 法によりエポキシ樹脂 (応研商事) を埋めたものとし、 37°C , 45°C , 60°C の恒温器中で順次20時間ずつ加熱重合した。

培養細胞は以下の様に処理した。すなわち 5% 炭酸ガス培養器中で 37°C に培養するににより、 90 mm 径ペトリ皿上に形成された単層

培養細胞を、ラバーポリスチレンを用いて採取し、200×gで5分間の遠沈を行った。得られた細胞沈澱を、25%のグルタールアルデヒドと含ピリン酸緩衝液で固定後、前述の腫瘍組織と同様の過程を経てエポキシ樹脂包埋した。

包埋ブロックからウルトラーム (LKB 製) で 600 ~ 800 Å の超薄切片を作製し、4% 酢酸ウーニールならびに水酸化鉛の二重染色を行った。観察には日立電子顕微鏡 HU-12A 型を用い、倍率 1500 倍から 60000 倍で観察し、写真撮影には富士顕微鏡フィルム FG を使用した。

8. 酵素抗体法による観察

腫瘍組織あるいは、培養細胞のリンザーム、 α -AT リゾミニ (α -AT) の局在を探索するため、酵素抗体法を用いた。^{B14)}

標本作製は以下のごとく行った。すなわち、腫瘍組織を 10% ホルマリン液にて固定後、パラフィン包埋した。その後、通常により作製した組織切片をスライドガラス上に載せ、伸張盤上で充分に貼り付けたものを標本として

同い、切片のスライドガラスからの遊離を防いだ。培養細胞の場合は前述の染色の場合と同様、カバーガラス上に増殖させた細胞を10%ホルマリン液で固定したものと標本として用いた。なおこの場合も細胞のカバーガラスからの遊離を防ぐため、ホルマリン液固定後、4℃にて放置し、細胞をガラスに充分に付着させた。

脱パラフィン処理を行った後の腫瘍組織標本と、培養細胞標本は共に PAP キット (Dako patts A/S 製, Denmark) を用いて染色された。

まず標本を D-PBS にて洗った後、内活性ペルオキシダーゼを非活性化するために3%過酸化水素水にて5分間処理した。その後冷 D-PBS にて5分間洗い、次に正常ブコ血清で20分間処理した。続いて適当に希釈した抗ヒトリゾラーム家兎イムノグロブリン (Dako patts A/S 製, Denmark) あるいは、抗ヒト α_1 -AT 家兎イムノグロブリン (Dako patts A/S 製, Denmark) を一次抗体として用い、37℃の湿温箱中で処理した。その後

ホイルノグロブリンを除くため20分間冷D-PBS
で洗った後、抗家兔ノグロブリンブタ血清と
二次抗体として37°Cで20分間反応させた。次
に、冷D-PBSで洗った後、horse radish peroxidase
とその抗体である anti-horse radish 家兔イムノグ
ロブリンの複合体である PAP complex(soluble horse
radish peroxidase-anti horse radish peroxidase complex)で
20分間処理した。処理された標本を冷D-PBSで
洗った後、過酸化水素水とAEC(3-amino-9-ethyl
carbasole)に調整した基質液で発色させた。

この操作の結果、抗原部に対して特異的に結合した
ペルオキシダーゼがAECを酸化することにより、
抗原部に赤褐色の発色と認めた。なお対
比染色は、マイヤー・ハマトキシリンを用い
る所い、封入はグリセリンゼリーにを行った。

9. FCレセプター-併有細胞の同定

FCレセプター-併有細胞の同定のためにEAに
セット法を用いた¹⁵⁾。なお感作羊赤血球標品の
作製は以下のごとく行った。血球と抗体との
混合によつては凝集と起こらない濃度の2倍

約1,500倍)に希釈した抗羊赤血球ウサギ IgG 抗体(日本抗体工業製) 0.4 ml と, 0.1 ml の gelatin veronal buffered saline (GVB⁺⁺) に羊赤血球(日本抗体工業製) 10^8 個を浮遊させたものを, 37°C で 30 分間反応させた。その後 D-PBS に 3 回洗浄したものを, 抗体感作羊赤血球標品とした。

EA ロゼット形成法は以下のごとく行った。まず, スライドガラス上に増殖させた培養細胞 20×10^4 個に対し, 上記の抗体感作羊赤血球標品を 500×10^4 個の割合で加え, 4°C で 1 時間混合培養した。反応後 D-PBS に 5 回細胞を 5 回洗った後, D-PBS 中でスライドガラスと 1 時間倒立することにより, 未反応の抗体感作羊赤血球を除去した。その後 4% グルutaral アルデヒド溶液で 1 時間固定し, ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。その結果, 抗体感作羊赤血球が 5 個以上付着した細胞を, Fc レセプター保有細胞と同定した。

10. C3 レセプター保有細胞の同定

C3 レセプター保有細胞の同定のために EAC

ロゼット法を用いた¹⁰⁾。その実験には、以下の操作により作製された日本抗体工業製のヒト補体感作牛赤血球を用いた。すなわち、 10^9 個/mlの割合で GVB^{++} に浮遊させた牛赤血球 1 ml に、至適濃度赤血球を凝集しない希釈濃度のゆ)のウリギ IgM 抗体 1 ml を加え、 37°C で 30 分反応させた。 GVB^{++} を 3 回洗浄した、上記の感作血球と再び 1 ml の GVB^{++} に浮遊させたものに、 GVB^{++} 12 ml と、 AB 型健康人ヒト補体 (血清分離後 4°C で 2 ~ 8 時間放置したものに冷却遠心を行い、分離した血清) 2 ml を加え、 37°C で 15 分間反応させた。その後 GVB^{++} を 3 回洗浄し、再び 1 ml の GVB^{++} に浮遊させたものと、ヒト補体感作牛赤血球標品とした。

EAC ロゼット形成法は、前述の EA ロゼット法に順じて行った。

11. 負食能測定法

負食能の測定には、インデアニン¹¹⁾、羊赤血球、ラックフラズ (LJ, Sigma 製, U.S.A) を用いた。インデアニンをスライドガラスに塗布

し乾燥させたものに、培養細胞を 10^4 個/ml に含む培養液を1滴を下し、カバーガラスにて被った。その状態のまま 37°C で1時間放置した後、細胞周囲のインクを細胞管にとり込んだ像を示す細胞を、陽性細胞と判定した。

感作あるいは非感作羊赤血球 5×10^6 個と、スライドガラス上に増殖させた 2×10^5 個の培養細胞を 37°C で1時間反応させた。その後ロゼット形成法の場合と同様に D-PBS で5回洗い、スライドガラスと D-PBS 中で1時間劇化するこにより未反応の血球を除去した。

ラテックス粒子の場合は、細胞 2×10^5 個に対し粒子 1×10^6 個を加えた以外は羊赤血球の場合と同様の過程で処理した。

羊赤血球の場合は、上記の標本をヘマトキシリン・エオジンにて染色したのち、ラテックス粒子の場合は無染色で標本を検鏡し、羊赤血球又はラテックス粒子を細胞内に、5個以上含むものを陽性細胞と判定した。

12. コラーゲン合成能測定法

Douglas らの方法¹⁷⁾に準い、 ^3H -プロリンのコラーゲン蛋白質の取り込み量と指標として、コラーゲン合成能を測定した。

細胞を 10×10^4 個/ml の割合で含んだ増殖培養液を 1 ml あつて 24 穴マルチウエル (Corning 製, U.S.A.) に入水, 37°C に 2 週間培養した。その後 D-PBS にて細胞を洗浄後, 28 日牛血清, $50 \mu\text{g/ml}$ のプロリン酸 (和光純薬工業製), $50 \mu\text{g/ml}$ の β -amino propionitrile fumarate (Sigma 製, U.S.A.) と含む培養液に交換し, 12 時間培養した。ついで同培養液に $5 \mu\text{Ci}$ の L-[2,3- ^3H] プロリン (Specific activity 27.3 Ci/mmol, New England Nuclear 製, U.S.A.) と加えて 4 時間培養した。その後培養液のコラーゲン蛋白質量を測定するため, 上清をパーフューズドポイントにて採取し保存した後, 細胞を 1 mM L-プロリン (和光純薬工業製) と含む D-PBS にて再度洗浄し, ラバーポリスマンで細胞を採取した。採取した細胞をソニケーター (Ultrasonic disrupter, ミニ-精工製) に破砕したものと, 先に保存し

培養液をえきおられ、1 mM L-7°Dリノと1.7 mM
 phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma, U.S.A.) と混合し D-PBS
 中で、24 時間透析を行った。その後、透析処
 理を行った試料 0.3 ml に、100 mM HEPES (N-2-Hydroxyethyl
 piperazine-N-2-ethanesulfonic acid, Sigma 製, U.S.A.) 緩衝
 液 0.08 ml に、32 mM 塩化カルシウム (CaCl_2), 16 mM
 N-ethylmaleimide (Sigma 製, U.S.A.), 1 mg/ml Bovine Serum Albumin
 (B.S.A., Sigma 製, U.S.A.) を加えた HEPES mixture と、
 250 mM HEPES 緩衝液 0.2 ml に、75 mM CaCl_2 , 5 mg/ml コウ
 ゲン - B (Activity 24 IU/mg, Calbiochem-Behring Corp. 製,
 U.S.A.) を加えた collagenase solution と同一試験管
 内に入れ 37°C で 2 時間処理した。その後、0.5%
 トリニクロ酸 (和光純薬工業製) と混合し 10%
 Trichloroacetic acid (TCA, 和光純薬工業製) 0.4 ml
 を加えて反応を停止させた後、4°C に 2 時間
 静置した。ついで 350 x g で 10 分間遠心を行い、
 その上清を、先にトリニクロ酸 - ニヨンバイアル
 に分注したトリニクロ酸 - ニヨン液 10 ml に溶解し
 た。次に試料の放射活性量を LKB 製液体トリニ
 クロ酸 - ニヨンカウンター (Rackbeta, U.S.A.) で測定し

た。なお上記の反応混合液から collagenase solution
 を除き、代りに同量の HEPES mixture を加えた液
 中、同様に処理した試料の放射活性量をも対
 照として測定し、コラゲナーゼ処理試料とコ
 ラゲナーゼ未処理試料との差を Collagenase
 Digestible Protein (CDP) とした。又、コラゲナー
 ゼ処理後の沈渣を 0.1 N 水酸化ナトリウム (石津
 製薬製) に溶解したものと、ニコウレーニョ
 ン液 10 ml に溶解した後、1 N 酢酸 (石津製薬製)
 0.1 ml を加えて試料の pH を酸性に調整した。こ
 の後 CDP の場合と同様に液体ニコウレーニョ
 ンカウンターで測定し、Noncollagenous protein
 (NCP) とした。なおコラーゲン蛋白 1 mol につき
 プロリンは 5.4 mol 含まれることから、% コラーゲ
 ン値を以下の式により算定した。⁽⁸⁾

$$\% \text{コラーゲン} (\%) = \frac{\frac{\text{CDP}}{5.4}}{\frac{\text{CDP}}{5.4} + \text{NCP}} \times 100$$

13. 各種薬剤に対する感受性の検索

細胞を 10×10^4 個/ml の割合で含んだ増殖培養液を 24穴マルチウェルに 1 mlずつ入れ、 37°C に 24時間培養した後、各種濃度に調整した薬剤を加え 37°C で4日間培養した。その後、EDTA トリプシン、フウケフービと含む PBS(-) で10分間処理し単離細胞としたものを、ニグロシン排除テストを用いて生細胞数を算定した。なお生存細胞率は次式により算定した。

$$\text{生存細胞率}(\%) = \frac{\text{薬剤処理群生細胞数}}{\text{対照処理群生細胞数}}$$

生存細胞率が50%になる薬剤濃度を50%増殖抑制濃度 (ID_{50}) とし、各種薬剤に対する感受性の評価を行った。

薬剤としては以下のものを用いた。すなわち、MFH の治療に比較的有効であると考えられているイリノテカン[®]、アドリアニン[®]、協和醗酵製)、ビンクリスチン硫酸塩 (VCR、アベコビシ[®]、塩野義製薬製)、メトトレキサート (MTX、メソルメタレート[®]、日本

レダリー^A製)に加えて、マイトマイニンC (MMC, マイトマイニン[®], 協和醗酵製), 硫酸ペプ
ロマイニン (PEP, ペプロ[®]オ, 日本化薬製) と
用いた。

実験結果

1. 実験に使用した悪性線維性組織球腫
の形態学的および組織化学的所見

手術により切除した上顎洞部のMFHと、組織培養に使用した腫瘍組織の近接部位を含む、種々の部位から病理標本と作製し、観察した。それらの組織像は、WeissとEnzinger⁴⁵⁾の言うstoriform-pleomorphic typeのうち、storiform patternの形式が著明なMFHであった。すなわち病理組織標本全体に、紡錘形とした線維芽細胞様細胞が花びら状に増殖する、いわゆるstoriform patternが見られた(図1-a)。この様に腫瘍構成細胞の殆んどは、線維芽細胞様細胞で占められていたが、その中に波状形態をした細胞膜と、凹凸不整の核を持つ、組織球様細胞が少数の割合で認められた(図1-b)。その他の細胞として、少数の重層性腫細胞と炎症性細胞が認められた。MFHの組織学的特徴として、比較的よく見られる血管新生は中程度で、多核巨細胞は検索した限り見られなかった。患者が

牙期状態になつた時に採取した組織においては、腫瘍中心部の環毛巣が著明であつた。なお、腫瘍組織の採取時期、部位にかかわらず、血球貪食像は稀であつた。

従来より MFH の鑑別診断に利用されてゐる特殊染色の結果は、以下のごとくであつた。

VAN GIESON, 液銀染色により各々膠原線維、好銀線維が染みこれ、それらの線維によつて包圍された細胞が包圍される處が觀察された。特に、液銀染色によつて細胞の走行は著明になり、storiform pattern が明瞭となつた(図2)。腫瘍組織中に PAS 陽性細胞は認められなかつたが、アルミアン青染色によつて一部の細胞が、陽性として染色された。オイル赤O, ゴッゲン黒B染色を行つと、大部分の細胞に小脂肪滴の存在と認められたが、細胞形態と染色能度の相関は検索できなかった。

腫瘍組織をマウスイドグウスの上で、スタンピンがするこゝによつて得られた細胞について、 α -naphthyl acetate esterase (NAEase) と acid phosphatase

(ACPase) 活性を調べた。NAEase については、染色性に程度の差はあるものの、約 40% の細胞が陽性活性を示した。なお 10 mM のフッ化ナトリウム添加により、その活性は 100% 阻害された。ACPase 染色では、ほぼ 100% の細胞が陽性活性を示した。さらに腫瘍組織のパラフィン切片について、酵素抗体法を用いてリゾチームと α_1 -抗トリプシン (α_1 -AT) の局在を調べた。その結果、約 5% の細胞がリゾチーム陽性、約 20% の細胞が α_1 -AT 陽性を示した。

さらに、培養に用いた近所の腫瘍組織を電子顕微鏡にて観察すると、大多數の細胞は線維芽細胞様の形態を有していた。その他、よく分化したあるいは未分化な組織球様細胞、黄色腫細胞などの細胞が観察された(図 3-a, b)。

短紡錘形とした線維芽細胞様細胞は、骨うがな細胞膜を有し、細胞突起は殆んど認められなかった。そして細胞質内には、よく発達した粗面小胞体と中程度量の糸状体が散在して

いた。線維芽細胞様形態を示す一部の細胞に、細胞膜に沿って集合する40 Å位の微細線維が観察された。組織球様細胞は、ライソゾームと不整形の核を持つことにより、同定された。細胞質内には粗面小胞体、ゴルジ装置、糸状体、微細線維、遊離リボゾームが認められたが、その数は細胞によりそれぞれ異っていた。中でも、よく分化した組織球と考えられる細胞は、糸状偽足を保持した波状形態とした細胞膜と、電子密度の異なる多く⁷⁾のライソゾーム顆粒を持ち、細胞質内には小胞体、ゴルジ装置、微細線維を含んでいた。なお、Fu⁷⁾が未分化間葉細胞として指摘した細胞は、小型の細胞で、卵円形あるいは不整形の核を有し、細胞質内にしばしばゴルジ装置、糸状体、遊離リボゾームを含み、細胞により、未熟なライソゾームと考えられるものを含んでいた(図3-a)。以上の所見から、この様な細胞を未分化な組織球様細胞と見なした。黄色腫細胞は組織球様細胞と同様に、凹凸不整の核と

持つことが多く、細胞膜は、糸状偽足を含めて多数の突起を有していた。細胞質は多くの種々の空胞によって占められ、他の小器官は殆んど認められなかった(図3-b)。

又、細胞外には64 nm幅の周期性縞紋を有する膠原線維に加えて、無定形では細線維状を示す基質が豊富に認められた(図3-a,b)。

2. 初代培養細胞の形態とその動態

1) 腫瘍組織からの細胞の増殖

組織片培養開始後7日目には、腫瘍組織片から細胞の遊離が始まり、培養14日目頃にはMFH⁽¹⁾など組織球系腫瘍初代培養に特徴的な、ameboid migration⁽¹⁾像はより明瞭となった。すなわち、腫瘍組織片より糸を引く様に遊離した細胞が、その後円形又は多角形態となり、単独でもしくは2,3の細胞が隣接する様に存在する像が観察された(図4)。その後培養を続けると、多角形細胞と円形細胞が密に配列する単層培養状態となり、培養約50日目には、ほぼ細胞飽和状態に至った(図5)。

2) 初代培養細胞からの腫瘍細胞の分離

組織片培養法を用いて得られた、初代単層培養細胞の中から、確実に腫瘍細胞と分離する目的で、軟寒天中でのコロニー形成法と利用した。

初代数2代目になるに3代目の細胞を、軟寒天培養液中で増殖させると、約15%、145%の割合でコロニーを形成する細胞が含まれていることがわかった(表1)。そこで細胞散布後に、顕立顕微鏡にて単一細胞があることを確認したのち、その細胞から形成されたコロニーを、パスツールピペットにて採取し、再び単層培養に戻した。その結果、安定した増殖を示す4株のクローンを得た。

3. コロニーから分離した培養細胞の性状

コロニーから分離した4株のクローンを、継代初期に電子顕微鏡にて観察すると、4株は全く同様の組織球様構造を有していた。すなわち同細胞は不整形を示し、多数の長い糸

状偽足を有する細胞膜と、よく発達した多数の細胞小器官と有することと、大きな特徴としていた(図6-a)。

細胞の音明なものは月形の核は、1,2の核小体と持ち、異染色質塊と合むことが多く、細胞によつては、核内封入体と有するものも見られた。豊富な粗面小胞体、糸状体、遊離リボゾームは、細胞質内にはほぼ均等に分布していたが、よく発達したゴルジ装置は、核周囲に見られることが多かった。細胞によつて程度の差はあるものの、電子密度の異なるライソゾーム、脂肪顆粒と有していた。それに加え、殆どどの細胞は、約240 Å径の微細管と約40 Å径の微細線維と有し、中には微細線維が集塊状をとるものもあった。又、糸状偽足が発達した細胞では、飲食小胞と多数有するものも認められた。

細胞外には、無定形または微細線維状の基質が存在し、細胞を長期(10日間以上)培養すると、約100 nm幅の周期性横紋と有する long-spacing

20, 21)
collagen が見られた (図 6-b)。一方患首組織に見
られた 64 nm 幅の周期性横紋を有する膠原繊維
は認められなかった。

4. 培養腫瘍細胞培養種によりヌードマウスに 形成された腫瘍の形態学的観察

分離された 4 株のクローンの, in vivo での造
腫瘍性につき検索するため、 10^7 個の細胞を
ヌードマウス背部皮下に接種した。その結果
は 4 株とも互いに同様の組織像を示す MFH と
形成した。すなわち、細胞培養種 8 日目頃から
腫瘍の形成が認められる様になり、接種 20 日
目頃には直径約 12 mm の腫瘍となった。

その腫瘍は、淡黄色で実質性とし、触
知すると弾性硬であった。それらの組織像は
患首腫瘍組織に比較して、組織環様細胞の割
合が多く認められる多形性の強い MFH であ
った (図 7)。そのためか、storiform pattern は著明で
なく、部位により多彩な像を示した。また、
腫瘍辺縁部に僅かに炎症性細胞を認めた。

さらに、患者腫瘍組織で見られるか、たゞ核巨細胞が、割合は低いものの移植腫瘍に認められた。

特殊染色の結果は、アルミアニ青染色で陽性活性を示す部位が、患者腫瘍組織に比較して広く見られる以外、患者組織のそれと同様の所見を示した。

マードマウス腫瘍組織と電子顕微鏡にて観察すると、ほとんどの腫瘍細胞の超微形態は接種した培養細胞のそれに類似した組織球様構造を示し、細胞小器官が発達していた(図8)。

しかし、それら細胞のサイズは多少不同であり、特に単核巨細胞が多く見られた。また、小型で円形の未分化様細胞も混在していた。

さらに特記すべきこととして、細長く紡錘形に変化した細胞が認められた。それらの細胞の一部は、患者腫瘍組織中に見られた線維芽細胞様細胞と、類似の構造を示していた。なお、首の腫細胞の割合は少なかった。また、細胞外には、膠原線維を含む基質が豊富に認

められた。

5. MFH-S 細胞の生化学的特性

4 株のウリーニについて解析と進めた結果はほぼ同様の所見が得られたため、その中の 1 株 MFH-S 細胞の結果について以下に述べる。

1). 酵素組織化学的性状

MFH-S 細胞が、組織様形態を示すことはすでに述べた。そこで本細胞が、組織球関連酵素と併存しているかどうかについて吟索を行った。

まず非特異的エステラーゼ活性について調べるため、 α -naphthyl acetate esterase (NAEase), naphthol AS-D acetate esterase (NAS-DEase) 染色を行った。その結果、培養状態、染色条件により多少の差があるものの、NAS-DEase 染色では約 60% の細胞が、その反応がより鋭敏である NAEase 染色ではほぼ 95% 以上の細胞が陽性活性を示した。そして局在性に際する NAS-DEase 染色でその陽性部位は、細胞管内にほぼ均一に分布する小

顆粒として染色された(図9-a, 10-a)。

なお以上2種の反応は、顆粒球等においても認められるので、フッ化ナトリウム(NaF)による阻害試験を行った。図9-b, 10-bに示した様に10 mM NaFを、浸漬液に添加することにより、エステラーゼの活性は100%阻害された。このことより、MFH-S細胞が組織球系細胞であることが同定された。

す、貪食作用を持った細胞で、細胞内消化系の主要的部分とされているのはライソゾームであり、その中に多くの酸性水解酵素を含有していることはよく知られている。そこで各種酵素のうち、acid phosphatase (ACPase) について検索すると、陽性顆粒が全この細胞の細胞管内に、ほぼ均一に小顆粒として染色された(図11)。次にライソゾーム性 ACPase の阻害剤であるL-酒石酸処理を行った場合、その活性は一部残存することがわかった。このことは、同細胞が非ライソゾーム性 ACPase ももっており、このことを示している。

さらに抗原作用を持つことが知られている、リゾチームの活性について調べるため、酵素抗原法を用いて染色すると約20%の細胞が陽性に染色された(図12)。

2)、貪食作用と Fc, C3 レセプター

組織球が貪食作用活性が高いことは、よく知られている。MFH-S細胞は、形態的に多数の偽足突起とライソゾームを有し、ACPase リゾチーム活性を有することはすでに述べた。そこで細胞の貪食作用機能を検索するため、インディアニウム、羊赤血球、あるいはラテックス粒子との混合培養を行った。その結果、継代2代目の細胞を用いた場合、約15%の細胞が上記3種の物質を貪食する活性を示すことがわかった(図13-a, b)。

従来より、旺盛な貪食作用を持つ単核細胞とその前駆細胞と一括し、単核貪食細胞系として捕え、線維芽細胞などの様に抗体または補体の非存在下で、偶発的に貪食作用を営む細

胞と区別されてきた。²²⁾ 組織球はその単核食細胞系に含まれ、IgGに誘導されるFcレセプター媒介性貪食作用を示し、その貪食作用は、C3レセプターによりその反応が助けられる。

そこで、MFH-S細胞のFc、C3レセプターおよびFcレセプター媒介性貪食作用について検索した。MFH-S細胞は、抗体感作羊赤血球と4℃で1時間反応させると、約60%の細胞がロゼットを形成し、⁽¹⁴⁻¹⁴⁾ 37℃で培養した場合には、約40%の割合で血球が細胞管内に取り込まれる像が観察され、非感作赤血球に比べ約3倍の貪食活性を有することがわかった(図16)。

又、補体感作赤血球を加えた場合は、反応1時間後に約60%の細胞が、IgG抗体で感作した場合と同様のロゼットを形成した⁽¹⁶⁾以上より、MFH-S細胞は、単核食細胞系の細胞に類似した貪食作用を有していることがわかった。

3) α_1 -抗トリプシン(α_1 -AT)の産生

α_1 -ATは肝臓のクーパー細胞で陽性であることから、最近組織球系腫瘍の鑑別診断に利用

これ、その有用性が認められつつある糖蛋白^{23・26)}である。そこで、MFH-S細胞がα-ATを有しているかどうかと、酵素抗体法を用いて検索した。その結果、培養条件に関係なく、ほぼ全ての細胞が陽性活性を示した(図17)

4) コラーゲン蛋白の産生

前述のごとく、MFH-S細胞は組織球としての性状を強く有していた。さてMFHの1つの特徴である多量の膠原線維は、線維芽細胞様細胞間に主として認められることから、同細胞が、その産生に携わっていると一般的に考えられている。in vitroに分離された、組織球様性状を強く有するMFH-S細胞が、コラーゲン蛋白産生能を有しているかは興味のあつた問題がある。

電子顕微鏡にて本細胞をよく観察すると、前述のごとく組織球様形態とした細胞外に膠原線維に加えて、無定形の又は微細線維状の基質の存在が観察された(図6-b)。さらに、単層培養状態のMFH-S細胞に渡銀染色を行つと、

細胞間に細胞状に配列する好銀線維が染まされた(図18)。さらに同細胞のコラーゲン蛋白の合成能を Douglas らの方法に準¹⁹⁾じて測定し、% コラーゲン値を求めた。その結果、表2に示したごとく MFH-S細胞はその値が26%であった。この値は、対照として用いた線維芽細胞のそれ(46%)より低値であるが、ヒト唾腺腺上皮細胞 HSG と比べると数倍高い値であった。

5) 糖染色所見

MFH がしばしば粘液腫様形態をとり、粘液腫状を呈する部分で、アルミニウム青にて染色される酸性ムコ多糖を合成することは、一般的によく知られている。^{5,27,28)}

本研究に用いた腫瘍組織は、粘液腫状部の少ない storiform-pleomorphic type の MFH であったが、一部アルミニウム青染色に陽性を示す部位が認められた。この様に、酸性ムコ多糖産生能の低い MFH に由来した不成熟細胞が、この性格を有するかどうかについて検討した。

MFH-S 細胞を、アルミニウム青にて染色を行うと、全ての細胞が同染色陽性物質を細胞質内に含んでいた(図19)。なおこの物質は、ヒアルロニダーゼ処理によつて、その染色性は強く阻害された。

6). MFH-S 細胞の形態変化とそれに伴う性状の変化

MFH-S 細胞は、培養初期においては組織球様形態をよく保っていたが、数代の継代培養を経た時、約5~10%の割合で多核巨細胞の出現が見られた(図21-a)。さらに、不培養細胞中に、細胞質内に多数の空胞が充満している黄色腫細胞、あるいは泡沫細胞と呼ばれる細胞と合致様になった(図21-a,b)。なお、この細胞の出現率は、通常の継代培養状態では、5%程度であった。しかし培養液の交換を遅らせることによつて、この黄色腫細胞の割合は増加する傾向を示した。なおこれらの細胞の割合は、長期の継代培養によつて変化しなかった。

多核巨細胞と黄色腫細胞と含む様になつた。培養細胞を用いて、前述の諸性質について再度検索を行つた。その結果、両細胞は組織球形形態を示す細胞と、ほぼ同様の性質を有していた(表-3)。

黄色腫細胞を電子顕微鏡にて観察すると、その細胞質内に限界膜を有する多数の空胞、すなわち二次ライソゾーム様顆粒と、脂肪顆粒が含まれていた(図20-b)。

一般に MFH 組織において、腫瘍細胞がオイル赤O、スザン黒B染色により染められる脂肪顆粒を含むことはよく知られており、他の腫瘍との鑑別診断に用いられて²⁷⁾いる。そこで MFH 細胞に両脂肪染色を行つた。その結果、顆粒数に差はあるものの、黄色腫細胞のみならず、全ての細胞が細胞質内に、脂肪顆粒を含んでいた。ただし、その染色パターンは全くと顆粒状を呈し(図21-a, b)、脂肪因腫に見られる様な大きな脂肪滴としては染色されなかった。

6. MFH-S 細胞の長期培養による形態変化とそれに伴う性状の変化

軟寒天中ぐ単一細胞が形成したコロニーから分離した組織球様細胞 (MFH-S) の培養は、初期において前述のごとく、黄色腫細胞、多核巨細胞を含むことがわかった。しかし元の腫瘍組織あるいは、細胞を接種することによって形成されたマウス腫瘍に見られる様な、線維芽細胞様形態を示す細胞は、約1年間培養した後も観察されなかった。

前者は培養初期から、倒立顕微鏡を用いて単層培養細胞の観察を続けると共に、ほぼ継代10代毎に、電子顕微鏡を用いた形態観察を行った。その結果、単層培養状態では殆ど変化が認められず、継代30代以後ぐ細胞が若干扁平化し、その輪郭が不明瞭になる程度であった。しかし電子顕微鏡を用いた観察では、継代30代頃から紡錘形とした細胞が見られる様になった。紡錘形を呈する細胞の一部のものは、組織球に見られる細胞突起を持たず、

細胞質内にはよく発達した粗面小胞体と少数の糸状体と、時折細胞膜に沿って束を形成する線維と有する、in vivo で観察された線維芽細胞様細胞と類似の超微構造と有していた(図22)。また紡錘形細胞の一部には、偽足様突起と少数のラインゾーム顆粒を含むものもあった。この種の細胞は、組織球様細胞と線維芽細胞様細胞との移行型と考えられる。さらに、細胞ペレットより作製したパラフィン切片に、ハマトキシリン・エオジン染色と施した標本の観察を行った所、継代60代では約70%の細胞が線維芽細胞様形態を示していることがわかった。以上の様に MFH-S細胞は、約2年間の培養の後(継代約60代)、形態学的に約20%の組織球様細胞と70%の線維芽細胞様細胞と、数%の多核巨細胞と黄色腫細胞を含む細胞分布を示した。

そこで形態変化を受けたこれらの細胞が、単一の組織球様細胞として分離した初期の性質を、どの程度保持しているかについて検討し

た。その結果、MFH-Sの細胞増殖能には変化が見られないことがわかった。すなわち、細胞の倍加時間は培養初期から継代毎代に至るまで、常に48~56時間の細胞は常に安定した増殖を続けるといえる。また軟寒そ中でのコロニー形成率は、初期から現在に至るまで常に1~2%の間にあり、長期継代による影響は見られなかった。又、形成されるコロニーのスキームも殆ど変化は認められなかった。MFH-S細胞は、現在までヌードマウスにおける造腫瘍性と常に有している。

NAEase, NAS-DEase, ACPase, リゾチームの4種酵素マーカーのうち、ACPaseは、線維芽細胞様細胞への形態変化が見られる様になったのも、100%の細胞が酵素染色に陽性活性を示した。一方組織球に特異性が強いNAEase, NAS-DEase, リゾチームは、線維芽細胞様への形態変化に伴い陽性細胞数が減少し、継代毎代ではそれぞれ20%, 5%, 5%であった(表3)。

インデアンイック、羊赤血球、ラテンクス

稚子に対する貪食活性は、継代10代を過ぎる頃から低下が見られる様になり、継代20代では約5%の細胞が貪食活性を有するのみで、その後継代を経るに従い同活性は低下した。その結果、継代60代では約2%の細胞が貪食活性を有するのみであった(表3)。

又、Fcレセプター-保有細胞数も貪食作用に続いて低下したため、それに伴ってFcレセプター-媒介性貪食作用も低下した。すなわち、継代30代では、約10%の細胞がFcレセプター-媒介性貪食作用を有するのみであり、その後継代を経るに従い同活性は低下し、継代60代ではその割合は5%になつた(表-3)。一方、Fc, C3レセプター-保有細胞数は継代60代では、各々20、20%に減少していった。

α_1 -AT は培養初期から継代60代に至るまで、90%以上の細胞が陽性活性を示し、長期継代による影響は認められなかつた(表3)。又、陽性顆粒の細胞内分布にも、殆ど変化は認められなかつた。

線維芽細胞様形態への移行を示す様になつた細胞に渡銀染色を行った所、好銀線維の染色状態は培養初期のそれとほぼ同様であつた。しかし、Douglas らの方法⁷⁾でコラーゲン蛋白含量を測定すると、コラーゲン値が11.5%となり、同時に付いた線維芽細胞のそれ(11.6%)とほぼ同様の値を示した。

培養初期から現在に至るまで、ほぼ100%の細胞がアルニアン青、オイル赤O、ズタン黒B染色により陽性反応を示し、その染色パターンにも変化は認められなかった。

7. MFH-S 細胞の各種薬剤に対する感受性

MFH-S細胞を用い、各種薬剤に対する感受性を検索した。

現在、比較的MFHに有効であると考えられているドキソルビニン塩酸塩(ADM, アドリアシン[®], 協和薬製), ビンブリスチン硫酸塩(VCR, フロロウビン[®], 塩野義製薬), メトトレキワート(MTX, メソトレキロー[®], 日本レカソー製)の仲間、MTX

に對しては50%抑制濃度(ID_{50})が $1.5 \times 10^{-3} \mu g/ml$ と他の細胞株(KB細胞で $1.5 \times 10^{-2} \mu g/ml$, HPA細胞では $2 \times 10^{-1} \mu g/ml$)に比べ高い感受性を示した。一方, VCR, ADM に對してはKB細胞が最も高い感受性を示し, MFH-S細胞は唾液腺腫瘍 HPA細胞と同程度の感受性を示した。現在 MFH 治療に用いられることの多いマイトマイシン C (MMC, マイトマイシン[®], 協和醗酵製), 硫酸ペブロマイシン (PEP, ペブレイオ[®], 日本化薬製) に對しても, KB細胞が最も高い感受性を示し, 以下 MFH-S 細胞, HPA 細胞の順であった(表4)。

8. 線維芽細胞における組織球様性状の有無
組織球様性状を有する培養細胞から, 線維芽細胞様に形態変化した細胞の性状についてはいさぐに述べた。これらの細胞と形態的に類似性を示す線維芽細胞との性状と比較する目的で, 同一患者から得た線維芽細胞について, MFH-S細胞と同様に性状を検索した。その結果, 約10%の細胞が負負能を有するとともに

に、約2%の細胞が ACPase 陽性であった。一方、Fc, C3 レセプター、非特異的エステラーゼ、リゾチーム、 α -AT を検出するとはできなかった。なおこの所見は、他の患者の正常顎粘膜より得られた線維芽細胞においても同様であった。

考 察

悪性線維性組織球腫 (MFH) に対する研究は、
 組織培養を行うことによつて初めて、その腫
 瘍概念が明らかになった。すなわち、Ozzello,
 Stout, Murray⁽¹⁹⁾ は、病理組織学的に悪性組織球腫、
 フは線維性肉腫と診断したさるゝの症例につ
 いて組織培養を行った。その結果、両腫瘍の
 組織片から最初、組織球様形態を示す細胞の
 ameboid migration が見られたが、しばらくして
 細胞が線維芽細胞様形態に変化することを見
 つけた。この事から、彼らは両腫瘍が組織球
 由来であると述べ、線維芽細胞様に形態変化
 した細胞を facultative fibroblast と呼んだ。しか
 しながら、上記の初代培養のみで得られた実
 験結果で、直ちに MFH が組織球由来であると
 する考えに、最近の病理学者は同意しないも
 のが多い。例えば M. H. は、炎症性細胞を合
 成する細胞の混在した腫瘍とあるのど、Ozzello⁽¹⁹⁾
 の報告で組織片から増殖して来た細胞が、
 真の腫瘍細胞であったか否かについても疑問

が持たれてゐる。また培養細胞の観察も、単に位相差顕微鏡による形態観察のみで、他の解析は全く行われてゐない。最近 Fu⁶⁾らは、組織培養と電子顕微鏡的観察とを組み合わせた研究を行った。すなわち、まず MFH 組織と電子顕微鏡にて詳細に観察した結果、組織球様細胞、線維芽細胞様細胞、黄色腫細胞と未分化間葉細胞の少くとも4種の細胞を認めた。その組織を *in vitro* で培養すると、最初、組織球様細胞の *ameboid migration* が見られ、それらの細胞と電子顕微鏡で観察すると、組織球様細胞、線維芽細胞様細胞、黄色腫細胞の存在を認めた。しかし未分化間葉細胞は *in vitro* で存在しなかつたことから、この細胞が黄色腫瘍の幹細胞であり、その細胞が組織球様細胞と線維芽細胞様細胞との2方向に分化する性質を有すると結論づけた。

MFH が未分化間葉細胞に由来するというこの説は、現在広く認められてゐる。⁶⁾しかし、過去に報告された両者の実験は、初期培養細胞

にフ、いこの簡単な解析であり、観察これに細胞が腫瘍細胞であったのか、またどの様な性質を有した細胞であったのかは、全く不明である。そこで本実験では、確実に単一の腫瘍細胞を *in vitro* に分離し、その細胞の性状を解析することにより、MFH と考えようとした。

猶言て述べた様に、MFH は多彩な組織像を呈する腫瘍であり、最近その概念を以てして解釈する病理学者が多い。^{5,6)} そこで前者は、実験材料として storiform pattern の多い通常型の MFH 組織を用いた。あなわろこの症例は、Weiss と Enzinger の分類^{3,5)} の storiform-pleomorphic type に属するものである。

その MFH 組織を、ペトリ皿上に静置し培養すると、約14日目頃から過える報告と同様な、ameboid migration と呼ばれる組織球系腫瘍の初代培養に特徴的な増殖 pattern を示した。増殖した細胞の中から、確実に腫瘍細胞コロニーを分離する目的で、軟寒天中⁷⁾ のコロニー形成法を用いた。この方法は、細胞の腫瘍原

性と最も相関する実験法であることがよく知られており、最近 Salmon²⁹⁾ は、腫瘍組織から stem cell と分離する一つの有効な方法として、このコロニー形成法が利用できると述べている。数週間中に単一細胞から形成されたコロニーを採取することによって、造腫瘍性を示す4種のコロニーと分離した。4種の細胞は全て、組織球としての機能を有すると共に、多数の偽足突起とよく発達した細胞小器官を有する、組織球に類似した超微形態を有していた。しかし細胞分離初期において、単一の組織球様超微形態を示した細胞の一部は、黄色腫細胞あるいは多核巨細胞に変化すると共に、経代30代を過ぎる頃から、その組織球様細胞の一部は、線維芽細胞様に形態変化した。

in vitro において見られたこれらの現象は、培養初期の均一な超微形態を示す組織球を、マウスに接種することによって形成された腫瘍組織においても観察された。すなわち、フードマウス腫瘍は組織学的に多形性の強い

MFH 像を示し、電子顕微鏡による観察において、組織球様細胞のみならず、線維芽細胞様細胞、黄色腫細胞、多核巨細胞が認められた。

分離された造腫瘍性組織球が、MFH 組織中に見られる種々の細胞(黄色腫細胞、多核巨細胞、線維芽細胞様細胞)に形態変化しうることを示した本培養および、移植実験結果は、Ozzello¹⁹⁾らによつて最初に提唱された MFH の組織球起源説を強く支持するものである。一方、最近の大多數の病理学者は、前述のごとく Fu²⁰⁾らの説を支持しており、本腫瘍が未分化間葉細胞から生じると考えている。そこで著者は、彼らの説の是非を知るため、患者の MFH 組織と広く電子顕微鏡にて検索したが、未分化間葉細胞と判断しうる細胞と見い出すことができなかった。

Fu²⁰⁾らは、MFH と稽式する他の細胞に比較して小さく、細胞小器官の発達に乏しい円形細胞と、未分化間葉細胞と呼んでいる。しかしこれらの細胞は、組織球によく見られるラインゾー

ム顆粒やゴルジ装置, アクラン様微細線維と
 細胞管腔にしばしば含み, 未分化な組織球と
 見なすことができる。さらにこれらの細胞は,
 組織球様細胞とヌードマウスへ移植すること
 により生じた腫瘍組織中にも, 観察すること
 ができる。また高橋ら^{30, 31)}は, 皮下軟部組織の成
 体発生学的研究を行った結果, 未分化間葉細
 胞から線維芽細胞への分化が起こる前に, そ
 の局所に未熟な胎生組織球が存在するという
 事実を見つけた。このことから, 未分化間葉
 細胞から組織球への分化方向はないと述べ,
 二つの説¹⁾を否定している。結論として彼らは,
 未分化間葉細胞からは線維芽細胞様細胞が,
 胎生組織球からは組織球様細胞が生じると考
 えている。しかし組織球様細胞から線維芽細
 胞様細胞への分化の移行があることは本実験
 で示したのに加え, 多くの MFH 症例におい
 ても両者の移行型細胞が観察されることによ
 り強く示唆される。MFH が組織球に由来した腫
 瘍であることと示唆した研究は, 最近湯本ら⁽³¹⁾

によ¹こ行われた。する²わ³彼⁴ら⁵は、SV₄₀ ウイルスによ¹こ transform させたマウスマウロファージと同系⁶マウスに接種すると、ヒトの MFH に類似した腫瘍が形成されたと報告した。

MFH の腫瘍発生に関する研究は、上記の湯本らの実験が唯一のものがある。ヒト MFH の発生因子については、癌治療のため放射線照射を受けた患者に MFH が新たに発生したとする報告^{3,32,33)}や、また外傷を受けた部位の骨に MFH が多く発生するとの報告^{19,34)}が散見される程度で、未だ明らかにされていない。

腫瘍細胞は、一般に母組織あるいは母細胞の形質の一部を保持していることが多い。それ故、分離された細胞の形態、機能などの諸性質と検索することは、その母地あるいは細胞分化を理解する上で非常に役立つ。

そこで本実験で得られた組織球様構造を有する細胞について、組織球が有する NAEase, NAS-DEase, ACPase, リゾチム, α-AT, Fc, C3 レセプター負着作用の各種組織球マーカーについて検索

した。その結果、組織球様形態を示した培養初期の細胞は、検索した全この性質を有していた。レカレリゾチーム活性を有する細胞は、培養初期から20%であった。この事實は、MFH組織中のリゾチームを検索した過去の報告と一致する。すなわち、Meister²³⁾は組織学的にMFHと診断された多くの症例で、リゾチーム活性が陰性であったと報告している。さらにIssacson²⁶⁾は、組織球系腫瘍であるhistiocytic lymphoma症例においても、リゾチーム活性が陰性を示すことが多いと述べ、この酵素は良性反応性マクロファージの良きマーカーとなりうるが、悪性マクロファージのマーカーとしては適切でないと結論している。以上の事から、リゾチーム活性は、腫瘍化することによつてその性質が脱離し易い酵素であると考えられる。

又、遠城寺³⁵⁾らは6例のMFHについて、NAEase, ACPase, β -glucuronidase (β -Gase)等の組織球関連酵素を検索した結果、NAEase, ACPaseの2酵素は、6例

全ににおいて陽性であったと報告している。
 本実験においては、NAEase, NAS-DEase, ACPaseについ
 て調べた。その結果、2種類の非特異的エステ
 ラーゼは培養初期の粗織球様細胞に高い割
 合に含まれていたが、線維芽細胞様に形態変
 化した細胞においては認められなかった。一
 方、ACPase活性は形態変化するいは長期培養に
 おいても影響を受けない、常に大多數の細胞が
 陽性を示した。

貪食作用に関して培養細胞は、最も早期
 にその活性を失い、その後、FcとC3のミレ
 プター保有細胞数が、形態変化するに伴い減少す
 る傾向が見られた。上記の細胞膜ミレプターの
 方が、Fcミレプター媒介は貪食作用よりも、
 その活性消失度が低かったことは、貪食作用
 の方が、より複雑な機能があることと意図し
 ていると思われる。例えば永田³⁶⁾は、M1細胞か
 らマクロファージへの分化誘導における阻害
 試験で、RNA合成阻害剤、蛋白合成阻害剤や
 マイクロフィラメント破壊剤により貪食能誘

導は阻害されるが、Fc レセプター誘導は阻害されないと述べられている。

又、負食作用はアクトミニニンの分配を受けた現象であることはよく知られているが、Hoffman³⁷⁾らはMI細胞を用いた実験を行い、負食活性の誘導と共にアウチン合成量が著しく増加すると報告している。それに対し永田³⁶⁾は、負食活性の誘導に伴いアウチン合成量は増加するものの、それよりはむしろ質的変化が重要であると述べられている。すなわち、アウチンが、ミニニンと異なって機能するには、モノマーであるGアウチンからポリマーであるFアウチンへの重合が必要であることが知られており、MI細胞の系における負食作用誘導でもそれと同様の過程が存在していると述べられている。

α_2 -ATは血中の主要なプロテアーゼインヒビターであり、血清蛋白の α_2 -グロブリン分画に属し、トリプシンを阻害する物質という意味でそう命名された。臨床的に注目される様になったのは、慢性閉塞性肺疾患³⁸⁾と肝疾患³⁹⁾に

α -AT を主成分が関係していることが報告されることがある。又、組織球系腫瘍のマーカーとして使用される様になる、たゞこの場合は、肝臓での α -AT を主成分の検索時に、クッパー細胞に同活性が陽性であることが見い出されて以来である。²⁴⁾

その後、組織球系腫瘍の診断マーカーとしての有益性が指摘される様になる、^{23,25,26)} Meister ²³⁾ は MFH 症例において、典型的な組織球様形態を示さない紡錘形とした細胞も同活性を示しているけれども、泡沫細胞(黄色腫細胞)、多核巨細胞は同活性を持たないことを述べている。しかし本実験では、泡沫細胞(黄色腫細胞)、多核巨細胞においても陽性活性を示した。事実、黄色腫細胞では空胞形成著明で、染色性は低く、その判定は困難であったが、細胞密度を疎に調整した単層培養細胞で観察することにより、同細胞が陽性活性を示すことを確かめた。この様に α -AT は腫瘍化、あるいは環境変化などに対しても、その形質が失われにくい糖蛋白の一つと考えることが出来る。

著者は、 α_2 -AT 産生腫瘍を持つ患者では、血清中のこの糖蛋白質量が増加しているのではないかと考え、以下の実験を行った。すなわち、MFH 患者、扁平上皮癌患者、非胆癌健康者をそれぞれ2名の血清中の α_2 -AT を single radial immunodiffusion (SRID)⁴⁰⁾ 法により測定した。その結果は表5に示したごとく、MFH 患者の血清中 α_2 -AT 量は、非胆癌健康者のそれにくらべて約3倍の高値 (633.0, 544.0 mg/dl) を示した。この血清を用いる検査が、MFH 患者の診断、治療、予后判定に有効かどうかについては、今後多くの症例を集めて検討して行こうと考えている。

前述のごとく MFH は貪食能を代表される組織球としての機能と、線維芽細胞様細胞が携わると考えられている膠原線維形成能を特徴とする肉腫である。一般的にこの二つの機能は、細胞の異なった方向への分化を示すものがあると考えられている。この two independent cell lines の概念⁴¹⁾は、本実験により完全に否定された。すなわち、in vitro に分離した貪食活性

を有する腫瘍性組織球は、膠原線維と結合基
 質を産生しうる：ことが明らかにになった。前者
 は本実験の当初、細胞の形態変化がコラーゲ
 ン蛋白産生能に対して強く影響を与えると考え
 え、種々の分化誘導薬剤 (Dexamethasone, Retinoic
 acid, 12-O-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate, Sodium butyrate,
 Dimethyl sulfoxide) を用いて組織球様形態と有する
 細胞と処理し、コラーゲン合成能と細胞形態
 の変化と観察した。その結果、2 mM の Sodium
 butyrate と細胞に作用させると、細胞は長紡錘
 形に形態変化した。コラーゲン合成能には
 全く変化のないことがわかった。また、検討
 した他の薬剤に対して、細胞は形態、コラー
 ゲン合成能の両者に影響を受けなかった。
 一方、本培養細胞が線維芽細胞様形態をとる
 様になった培養後期において、細胞は線維芽
 細胞とほぼ同程度のコラーゲン値を示した。
 この結果は、培養初期の組織球様細胞が、線
 維芽細胞様に形態変化したことによるものと
 も解釈されるが、細胞培養時期が異なるうえ

に、lot 番号の異なるコウゲア-ゼミ使用しているのに加え、電子顕微鏡および渡銀染色所見をも考慮すると、この現象が単純に形態変化によるものがあると結論づけることはできない。

負食能と膠原線維形成以外に特異な分化方向を示さない未分化な腫瘍と定義づけられた MFH と最近、拡大して解釈する傾向にあることはすでに緒言で述べた。例えば、骨、類骨、軟骨組織などの出現に伴う MFH の報告も見られる⁴¹⁾。また、通常型の MFH においてもよく見られる筋線維芽細胞(myofibroblast)様の細胞の解釈として、筋細胞への分化を示唆するものがあると報告している者もある。⁴²⁾ しかし、本腫瘍を組織球由来だと考えるならば、細胞質内にアラジン様の微細線維や飲食空胞を含む上記の細胞が、筋細胞への分化を示唆するものではないと理解することができる。

最近 MFH の粘液産生に対して興味を持たれており、Weiss と Enzinger⁵⁾ は粘液腫状部が、腫瘍

全体の $\frac{1}{4}$ 以上占めるものを, myxoid type と分類
 した。その診断には, アルミアニ青が有効と
 あるとされている。しかし, 各種構成細胞の
 アルミアニ青染色性について記されたものは
 少く, 著者が知る範囲では橋本の報告²⁹⁾のみが
 ある。するがう彼は, MFH 組織中の泡沫細胞
 (黄色腫細胞) は, ヒアルロニダーゼで消化さ
 れるアルミアニ青陽性物質を含むことにより,
 脂肪芽細胞と鑑別しうると述べている。事実,
 本研究に用いたこれらの細胞について, アルミ
 アニ青陽性物質を有しているか否かの判定を
 試みたが, 極めて困難であった。そこで培養
 細胞についての検索を行うと, 黄色腫細胞は
 染色性が低かったが, 組織球様細胞, 多核
 巨細胞に加えて線維芽細胞様形態を示す様
 になった細胞も, 全てアルミアニ青陽性を示し
 た。又, 竹内ら²⁹⁾は in vitro に分離した MFH 培養細
 胞をスプレッドマトリックス上で培養すること
 により, 細胞外に多量の酸性ムコ多糖を産出
 し得たと報告している。

以上より首肯は、ヒアルロニダーゼで消化しうる酸性ムコ多糖の産生は、MFH 腫瘍細胞の蓄存した能力であると考えられている。一方、Weiss⁵⁾らは、myxoid type の MFH が他の type に比較して腫瘍増殖が速く、臨床的に予後の良い MFH であるの故、腫瘍の増殖が速くなる、分化の一表現として、粘液基質を豊富に産生する様になると考えられている。

組織球が血液単球のみに由来するのが、またそれ以外の由来があるかについては、まだ明らかになっていないけれども、以上述べた様に MFH は組織球系の腫瘍であると結論づける。さらに MFH の組織学的多彩性は、腫瘍性組織球の多能性を意味するものであると、分化程度の異なる細胞が混在することによって起きていると思われる。しかし、先に述べた骨、軟骨組織などの分化能をも、本組織球様細胞が有するか否かについては、現時点ではわからない。本実験では少なくとも、組織球様から線維芽細胞様の形態変化を認めた。変化し

た細胞は、一部組織球としての機能を維持し
 たり、実験対照として用いた線維芽細胞と
 は異なるといった。すなわち、顎下唾液腺結合組
 織あるいは、口腔粘膜由来の線維芽細胞は、
 ACPase と中程度の貪食活性を有するものの、他
 の組織球マーカーを持たない。しかし、
 最近、サイトメガロウイルスを感染させたヒ
 ト線維芽細胞に FC^{43,44)} セプターを、また二倍体
 正常線維芽細胞に C3⁴⁵⁾ セプターを有してい
 るとの報告もある。なお本培養細胞におい
 て、形態変化、長期培養に關係なく最も安定
 した機能を示したのは α -AT であるが、この
 糖蛋白と線維芽細胞が差を有しているとの報告
 は見えない。現在着目している形態変化が
 通常の培養芽肉で不可逆的に起こったもの、
 MFH の細胞分化機構を理解するため、細胞を
 種々の分化誘導薬剤で処理することにより、
 形態的、又は機能的に組織球様に後戻りさせ
 うるかについて探索を行っているといる。例えば 2
 mM Sodium butyrate で細胞を処理すると、細胞形

態は長紡錘形になるものの、FCレセプター-産
有細胞数は増加する所見を得ている。この現
象が何を意味するかについては、今後の研究
が必要である。

猶言²⁾述べた様に、MFHの解釈に問題を残
しているものの、本腫瘍は中高齢者の中で最
も頻度の高い肉腫で、50~70才に好発すると
報告されている。小児や若年者に発生する
MFHは稀で、人種別には黒人、黄色人種に比
べると白人に好発し、性別では約3/4が男に発
生する⁵⁾。発生部位に関しては橋本²⁷⁾、遠城寺²⁸⁾らは
130例のMFHを検索した結果、大腿部および臀部
(34.6%)、上腕および肩(13%)、後腹膜および
腸間膜(11.5%)の順に多く見られ、頭部で見
られた11例(8.4%)中5例が副鼻腔および鼻
腔のものであったと報告している。

本腫瘍は、臨床的に無痛性の増殖速度の遅
い腫瘤として原発し、その予後は極めて不良
であり、しばしば遠隔転移を要す。治療法
として、外科手術による腫瘍切除のみが有効

とこれというが、術後、本症例の様に局所再発や遠隔転移をしばしば見る。従って手術療法と補助する治療法を確立しなくては行かなければならぬ。

現在まで、腫瘍再発末期患者に化学療法を用い、延命を図ることができたとの報告⁴⁶⁾や、骨に生じた MFH に対し補助化学療法を行い、好成績を得たとの報告⁴⁷⁾があり、MFH の化学療法については、多くの関心が寄せられている。なお上記の報告における薬剤の種類、および使用法は以下の通りであった。すなわち、前者はシクロホスファミド (CTX)、ビンクリスチン硫酸塩 (VCR)、ドキソルビニン塩酸塩 (ADM)、5-(3,3-dimethyl-1-triazeno) imidazole-4-carboxamide (DIC) の併用療法あるいは CTX, VCR, ADM, アラキノマイシン D (ACM) の併用療法を用いており、後者は VCR, メトトレキサート (MTX), ADM の併用療法を用いていた。

化学療法の感受性について検索する場合、標準細胞としてコロニ-形成細胞を使用する

のが通率とされている。これに、胚寒元中ぐ
 コロニー形成する細胞は、regrowth, metastasis
 能など、in vivo²⁾で見られる腫瘍の悪化度と決
 定する能力を有する細胞とあると考える Salmon
 の説²⁾が、基となる、という。本実験では、胚
 寒元中ぐ形成させたコロニーから分離した単
 層培養細胞を用い、薬剤に対する感受性を検
 察した。その結果本培養細胞は、対照として
 用いた扁平上皮癌細胞、唾液腺腫瘍細胞に比
 較して MTX に対し強い感受性を示した。しか
 しこの結果は、1 症例の MFH を用いて得たも
 のであるので、全ての MFH に対し適応しうる
 かどうかについては、わからない。今後 MFH の
 細胞分化とも考慮した腫瘍特異性を基にした
 治療法について検討したいと考えている。

結 語

ヒト上顎洞粘膜に発生した悪性線維性組織球腫 (MFH) と組織培養することにより, in vitro に腫瘍細胞と分離した。その細胞は以下の性質を有していた。

- 1). MFH 組織片から増殖した細胞は, 組織球系腫瘍初代培養に特徴的な ameboid migration が見られた。
- 2). 継代2代目らびに3代目の細胞の, 軟寒天中でのコロニー形成率はそれぞれ1.5%、1.45%であった。
- 3). 軟寒天中での単一細胞から形成されたコロニーを再び単層培養に戻すことにより、4株のクローンを得た。
- 4). 得られた4株の細胞は, 全て同様の組織球様構造を有していた。すなわち、不整形を呈する同細胞は、多数の糸状偽足を持ち、多数の微細線維やライソゾームなどの良く発達した細胞小器官を有することと、大きな特徴としていた。

5). 組織球様形態をした4種の細胞は, NAEase, NAS-DEase, ACPase, リゾチーム, Fc, C3レセプター, 貪食作用, α -ATなどの組織様性状を強く有していた。

6). 本培養細胞は, 酸性ムコ多糖, コラーゲン蛋白産生能を有し, 細胞質内には脂肪顆粒と含んでいた。

7). 4種の細胞は, 全てマウスへの移植によって多形性の強い storiform-pleomorphic type の MFH を形成した。すなわち, 組織球様細胞に加えて, 多核巨細胞や線維芽細胞様細胞などの多種多様の細胞で, 腫瘍が形成されていた。

8). 細胞の形態変化は, in vitro においても見られた。すなわち, 本培養細胞の中に継代初期から黄色腫細胞と多核巨細胞とを数%の割合で含む様になったのに加えて, 継代30代を過ぎる頃から, 紡錘形に伸長した細胞が観察される様になった。その結果, 継代60代では線維芽細胞様細胞が, 全体の約

70% を占める様になつた。

9). 長期培養の結果、線粒体細胞様に形態変化した細胞は、呼吸活性などいくつかの組織球としての形質を失つた。その中、 α -AT と ACPase には変化なく、殆どの細胞が陽性活性を保持していた。

以上の結果は、MFH が組織球に由来した多形性の腫瘍であることと示唆しており、診断マーカーとしては、本腫瘍細胞において常に陽性を示した α -抗トリプシンが最も有用となると考えられる。

稿を終えるにあたり、本研究課題と与えられ、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オ-講座白砂兼光講師に、心から謝意を表します。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、口腔外科学オ-講座の教室員の方々に感謝致します。

Isolation and characterization of the neoplastic cultured
cells derived from a human malignant fibrous histiocyoma

Masaru Sugiyama

The First Department of Oral and Maxillofacial Surgery

Osaka University Faculty of Dentistry

1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Key words: malignant fibrous histiocyoma (MFH)

tissue culture, histogenesis

cell markers, histiocyte

The malignant fibrous histiocytoma (MFH) is a type of pleomorphic sarcoma occurring in the soft part or bone, and composed of histiocyte- and fibroblast- like cells which are arranged in storiform pattern as the most conspicuous feature. The histogenesis of the MFH remains controversial.

To isolate neoplastic clones in vitro from a MFH arising in the membrane of the maxillary sinus, the tumor was prepared for morpho-histochemical study and tissue culture work. Electron micrographs of the tumor revealed a large number of fibroblast-like cells, small number of histiocyte-like cells including both immature and mature types, and xanthomatous cells. Initially, cell propagation from the tissue fragments showed an unique outgrowth pattern suggesting ameboid migration, which was followed by a contiguous sheet containing various shaped cells. Four clones were prepared by isolating colonies formed in semi-solid agar medium. All clones were demonstrated morphologically to be only one type of cells having fine structures similar to histiocyte with multiple long filopodia, numerous microfilaments and lysosomes. These cells carrying Fc and C3 surface receptors showed a marked immuno-

phagocytosis. They were positive for acid phosphatase, alpha-naphthyl acetate esterase, naphthol AS-D acetate esterase and alpha-1-antitrypsin. These neoplastic histiocytes were also able to display the potential for productions of collagen matrix and hyaluronidase-sensitive acid mucopolysaccharide. Inoculations of the four clones into nude mice resulted in productions of a MFH containing morphologically histiocyte-like cells, fibroblast-like cells, multinucleated giant cells and xanthomatous cells. These morphologic alterations of the cloned histiocyte into fibroblast-like cell, xanthomatous cell and multinucleated giant cell were also observed in the four clones in vitro. The above mentioned fibroblast-like cells also retained some histiocytic functions such as production of alpha-1-antitrypsin, suggesting merely conformational alteration of the neoplastic histiocyte. These findings suggest that the histiocytic clones carrying pluripotentiality are progenitor cells of MFH.

参考文献

- 1) Kaufman, S.L., and Stout, A.P. (1961): Histiocytic tumors (fibrous xanthomas and histiocytomas) in children. Cancer, 14, 469-482.
- 2) Stout, A.P., and Lattes, R. (1967): Tumors of the soft tissues. Fascicle I. Atlas of Tumor Pathology, 2nd series. Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C.
- 3) Weiss, S.W., and Enzinger, F.M. (1978): Malignant fibrous histiocytoma. Analysis of 200 cases. Cancer, 41, 2250-2266.
- 4) Enzinger, F.M. (1977): Management of primary bone and soft tissue sarcomas. Year Book Medical Publishers Inc., Chicago.
- 5) Enzinger, F.M., and Weiss, S.W. (1983): Soft tissue tumors. The C.V. Mosby Co., St. Louis, 165-198.
- 6) Hadju, S.I. (1979): Pathology of soft tissue tumors. Lea Febiger, Philadelphia, 57-164.
- 7) Fu, Y.S., Gabbian, G., Kaye, G.I., and Lattes, R. (1975): Malignant soft tissue tumors of probable histiocytic origin (malignant fibrous histiocytomas); general consideration and electron microscopic and tissue culture

- studies. *Cancer*, 35, 176-198.
- 8) Eagle, H. (1955): Propagation in fluid medium of a human epidermal carcinoma, strain KB. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 89, 362-364.
- 9) Shirasuna, K., Sato, M., and Miyazaki, T. (1980): A myo-epithelial cell line established from a human pleomorphic adenoma arising in minor salivary gland. *Cancer*, 45, 297-305.
- 10) Shirasuna, K., Sato, M., and Miyazaki, T. (1981): A neoplastic epithelial cell line established from irradiated human salivary gland. *Cancer*, 48, 745-752.
- 11) Macpherson, I., and Stoker, M. (1962): Polyoma transformation of hamster cell clones an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virol.*, 16, 141-151.
- 12) 佐野豊 (1972): 組織学研究法, 4版. 南山堂, 東京. 昭和 47.
- 13) Sternberger, L.A., Hardy, P.H., Jr., Cuculis, J.J., and Meyer, H.G. (1970): The unlabelled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horse-radish per-

oxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. J. Histochem. Cytochem., 18, 315-320.

14) 東海大学医学部病理学教室 東海大学光栄研
和胞生物 (1979): 酵素抗体法 (渡辺孝一編).
学際企画社, 東京, 昭和 56.

15) Griffin, F.M., Jr., Bianco, C., and Silverstein, S.C. (1975):
Characterization of the macrophage receptor for com-
plement and demonstration of its functional independence
from the receptor for the Fc receptor of immunoglobulin
G. J. Exp. Med., 141, 1269-1277.

16) Bianco, C., Griffin, F.M. Jr., and Silverstein, S.C. (1975):
Studies of macrophage complement receptor. J. Exp. Med.,
141, 1278-1288.

17) Douglas, M.S., Neil, G.K., and Cohn, D.V. (1980): Collagen
synthesis in cultured osteoblast-like cells. Arch.
Biochem. Biophys., 201, 384-391.

18) Chen-Kiang, S., Cardinale, G.J., and Udenfriend, S. (1978):
Expression of collagen biosynthetic activities in
lymphocytic cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 1379-1383.

- 19) Ozzello, L., Stout, A.P., and Murray, M.R. (1963): Cultural characteristics of malignant histiocytomas and fibrous xanthomas. *Cancer*, 16, 331-343.
- 20) Daroczy, J., and Haust, M.D. (1979): Long-spacing collagen in dermal disorders. *Acta Morphologica Acad. Sci. Hung*, 27, 265-271.
- 21) Kajikawa, K., Nakanishi, I., and Yamamura, T. (1980): The effect of collagenase on the formation of fibrous long spacing collagen aggregates. *Lab. Invest.*, 43, 410-417.
- 22) van Furth, R. (1980): Mononuclear phagocytes (van Furth, R. ed.). Martinus Nijhof, Hague, 1-30.
- 23) Meister, P., and Nathrath, W. (1981): Immunohistochemical characterization of histiocytic tumors. *Diag. Hithopathol.*, 4, 79-87.
- 24) Isaacson, p., Jones, D.B., Millward-Sadler, Judd, M.A., and Payne, S. (1981): Alpha-1-antitrypsin in human macrophages. *J. Clin. Pathol.*, 34, 982-990.
- 25) du Boulay, C.E.H. (1982): Demonstration of alpha-1-antitrypsin and alpha-1-antichymotrypsin in fibrous histiocytomas using the immunoperoxidase technique. *Am. J. Surg.*

Pathol., 6, 559-564.

26) Isaacson, P., Wright, D.H., and Jones, D.B. (1983): Malignant lymphoma of true histiocytic (monocyte/macrophage) origin. Cancer, 51, 80-91.

27) 橋本洋 (1979): 悪性線維性組織球腫の臨床病理学的研究, 福岡医誌, 70, 585-613. 昭和 54.

28) 竹内純, 祖父江三津子, 内塚典保, 築館一男, 五島岸子, 中島伸夫 (1981): 悪性線維性組織球腫 (MFH) のグリコワシノグリカン産生について, オ40 回日本癌学会総会抄録, 306, 昭和 56.

29) Salmon, S.E., Hamburger, A.W., Soehnlen, B., and Durie, B.G.M., Alberts, D.S., and Moon, T.E. (1978): Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anti-cancer drugs. N. Engl. J. Med., 298, 1321-1327.

30) Takahashi, K., Sakuma, H., Natio, M., Yaginuma, Y., Takahashi, H., Asano, S., Hojo, H., and Kojima, K. (1980): Cytological characters, transformation, and oncogenesis of dermal histiocytes and fibroblasts of rats. Acta Pathol. Jpn., 30, 743-766.

- 31) Yumoto, T., and Morimoto, K. (1980): Experimental approach to fibrous histiocytoma. *Acta Pathol. Jpn.*, 30, 767-778.
- 32) Gonzalez-Vitale, J.C., Slavin, R.E., and McQueen, D.J. (1976): Radiation-induced intracranial malignant fibrous histiocytoma. *Cancer*, 37, 2960-2963.
- 33) Tsuneyoshi, M., and Enjoji, M. (1980): Postirradiation sarcoma (malignant fibrous histiocytoma) following breast carcinoma: An ultrastructural study of a case. *Cancer*, 45, 1419-1423.
- 34) Michael, R.H., and Dorfman, H.D. (1976): Malignant fibrous histiocytoma associated with bone infarcts. *Clin. Orthop.*, 118, 180-183.
- 35) Enjoji, M., Hashimoto, H., and Iwasaki, H. (1980): Malignant fibrous histiocytoma: A clinicopathologic study of 130 cases. *Acta Pathol. Jpn.*, 30, 727-741.
- 36) 永田和宏 (1978): 骨髓性白血病細胞の分化, *化学と生物*, 4, 807-813. 昭和 53.
- 37) Hoffman, B.L., and Sachs, L. (1978): Regulation of actin and other proteins in the differentiation of myeloid leukemic cells. *Cell*, 14, 825-834.

- 38) Laurel, C.B., and Erikson, S. (1963) : The electrophoretic-globulin pattern of serum in α_1 -antitrypsin deficiency. J. Clin. Lab. Invest., 15, 132-140.
- 39) Erikson, S. (1965) : Studies in α_1 -antitrypsin deficiency. Acta Med. Scand., 177, 1-6.
- 40) Diez, A.A. (1974) : Measurement of alpha-1-antitrypsin in serum, by immunodiffusion and by enzymatic assay. Clin. Chem., 20, 396-401.
- 41) Katenkamp, D., and Stiller, D. (1981) : Malignant fibrous histiocytoma of bone. Light microscopic and electrone microscopic examination of four cases. Virchows Arch. (Pathol Anat), 391, 323-335.
- 42) Lagace, R., Schürch, W., and Seemayer, Th.A. (1980) : Myofibroblasts in soft tissue sarcomas. Virchows Arch. (Pathol Anat), 389, 1-11.
- 43) Keller, R., Peitchel, R., Goldman, J.V., and Goldman, M. (1976) : An IgG-Fc receptor induced in cytomegalovirus-infected human fibroblasts. J. Immunol., 116, 772-777.
- 44) Westmoreland, D., Joer, S.St., and Rapp, F. (1976) : The development by cytomegalovirus-infected cells of

binding affinity for normal human immunoglobuline.

J.Immunol.,116,1566-1570.

45) Ueki,A., Fukushima,Y.,and Kimoto,T.(1976) :C3b and C3d
receptor sites on human diploid fibroblasts. Virchows
Arch B-Cell Pathol.,21,13-15.

46) Leit,C., Goodman,W.,Sinkovics,J., Baker,L.H.,and
Benjamin,R.(1977) :Chemotherapy of malignant fibrous
histiocyoma. Cancer, 40, 2010-2014.

47) Weiner,M., Sedlis,M., Johnstone,A., Dick,H.M.,and
Woff,J.A.(1983) : Ajuvant chemotherapy of malignant
fibrous hiasticytoma of bone. Cancer, 51, 25-29.

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、才40回日本歯学会総会(昭和56年10月、札幌)および才36回日本口腔科学学会総会(昭和57年5月、名古屋)に於て一部発表した。

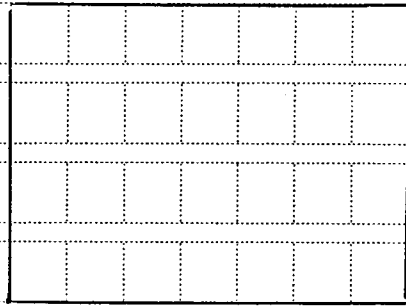


図 1 - a

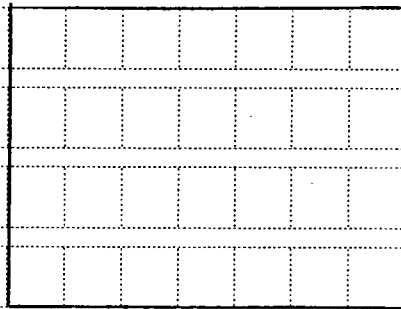


図 1 - b

図 1 実験に使用したヒト MFH 組織像

a) 本腫瘍は多くの部位にわたって、図の様な組織像を示した。すなわち図は、線維芽細胞様細胞が形成した特徴的な storiform pattern 像を示している。(H.E 染色倍率 50 倍)

b) また他の部位では、線維芽細胞様細胞の中に、少数の組織球様細胞が観察される。

(H.E 染色倍率 200 倍)

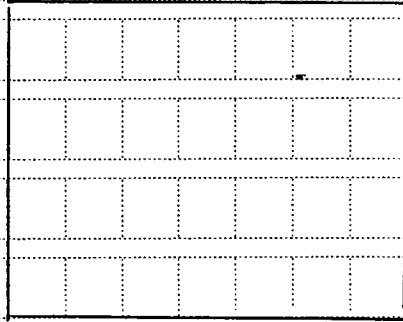


図2 実験に使用したヒトMFHの渡銀染色像
が銀線維により包囲された細胞が包囲され、
storiform pattern はより明瞭となる。

(倍率100倍)

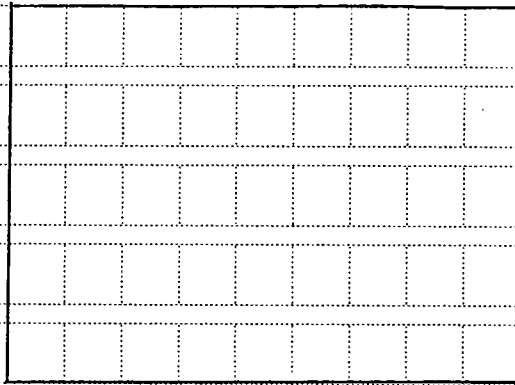


図 3-a

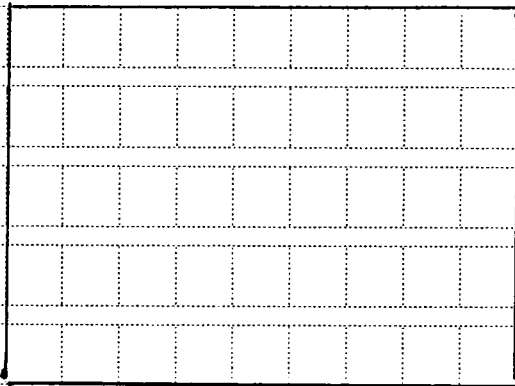


図 3-b

図 3 MFHの超微構造

超微形態から見て、組織球様細胞と線維芽細胞様細胞と黄色腫細胞との少くとも3種の細胞が確認された。

a)多数の紡錘形と呈する線維芽細胞様細胞に加えて、不整形の核を有する組織球様細胞が観察される。なお図中央の細胞小器官に乏しい細胞は、未分化間葉細胞と見なされ

る、

(倍率 7000 倍)

ト細胞質内に多くの空腔と認める黄色腫細胞が見られ、細胞外には多数の膠原線維と線維性あるいは無定形物質と認める、

(倍率 3600 倍)

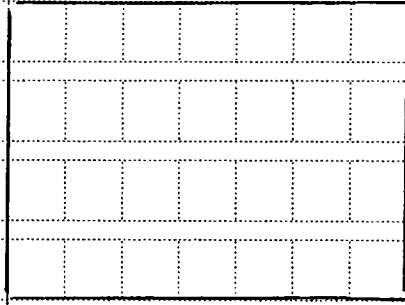


図4 MFH組織片からの細胞増殖像

組織片より増殖した細胞は, ameoboid migration
像を示す。 (倍率200倍)

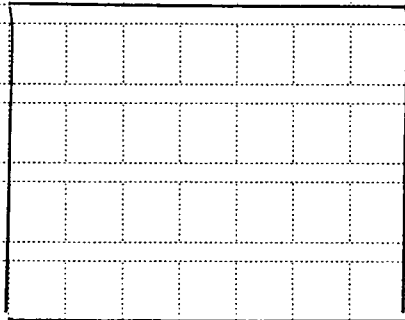


図5 MFH由来培養細胞の単層培養形態

組織片培養開始後約50日目に, 細胞はほぼ
飽和状態に達した。 (倍率80倍)

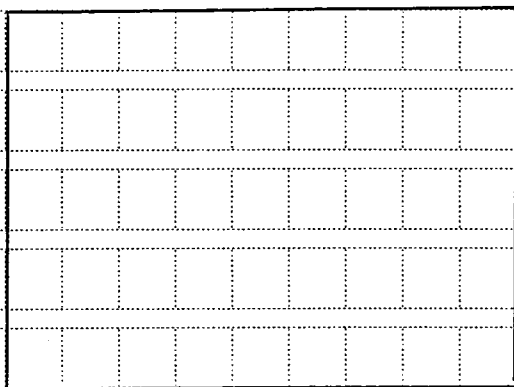


図 6-a

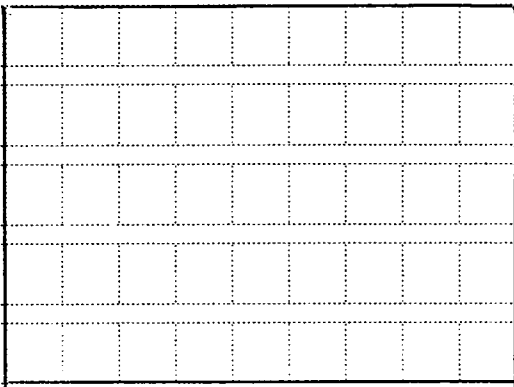


図 6-b

図 6 軟寒天中で形成されたコロニーから分離した MFHS 細胞の培養初期の超微形態

コロニーから分離した細胞は、全 2 図の様分組織球様形態を示した。

a) 細胞は多数の糸状偽足とよく発達した細胞小器官を有する。 (倍率 2000 倍)

b) 細胞を 10 日間以上培養すると細胞外に、無

定形をたは、細線維状の基質に加えて、約
100 nm 幅の周期性縞紋を有する long-spacing collagen
が観察される。(倍率 24000 倍)

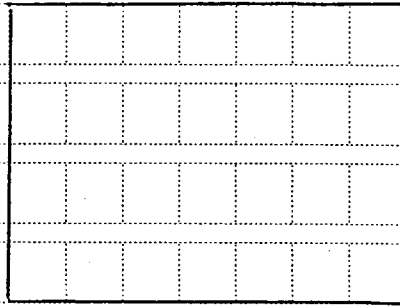


図 7 MFH-S 細胞をヌードマウスへ移植する:

とにより形成された腫瘍の組織像

10^7 個の細胞をマウスに移植すると、約 20 日後には 12 mm 径の腫瘤を形成した。その組織像は、少数の多核巨細胞と大小不同の組織破壊細胞を含む多形性の強い MFH 像を示した。

(HE 染色倍率 100 倍)

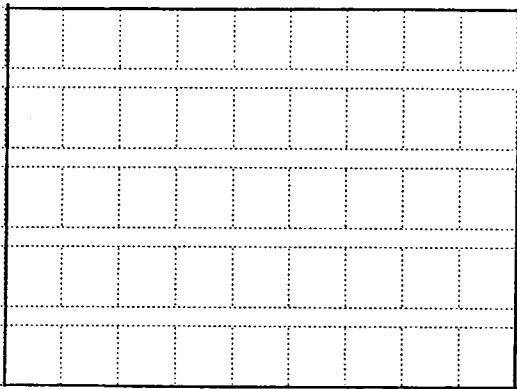


図8 フードマウスに形成された腫瘍の超微形態。
単一の組織球様細胞をマウスに接種したにもかかわらず、形成された腫瘍はその超微構造においても、多形性を示した。栄養細胞と類似の形態をとる細胞に加えて、小円形の未分化細胞、紡錘形の線維芽細胞様細胞が見られる。(倍率4500倍)

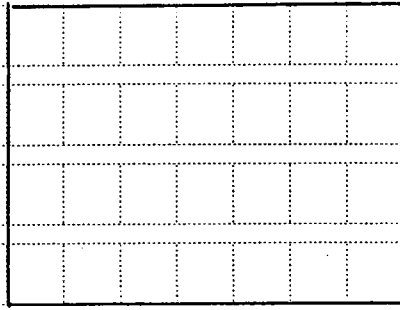


図 9-a

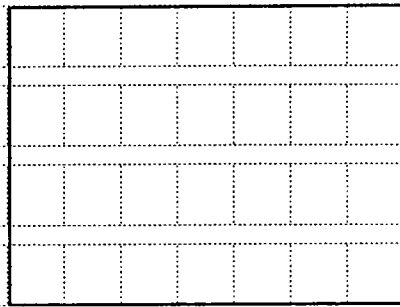


図 9-b

図 9 MFH-S 細胞の NAEase 染色像

a) 細胞質内に淡青色の陽性顆粒が見られる。

(倍率 100 倍)

b) 10 mM NaF に より NAEase 活性は 100% 阻害され

る。

(倍率 100 倍)

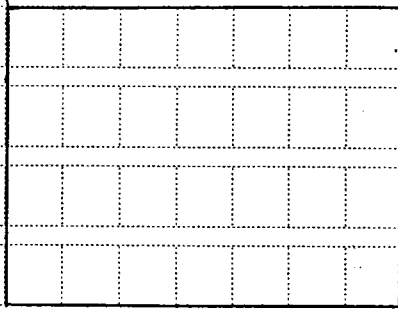


図 10-a

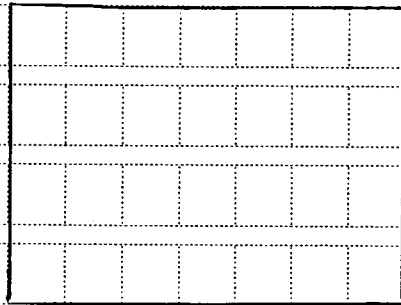


図 10-b

図 10 MFH-S 細胞の NAS-DEase 染色像

a) 細胞質内に赤褐色の陽性顆粒が見られる。
(倍率 200 倍)

b) 10 mM NaF に より NAS-DEase 活性は 100% 阻害
される。
(倍率 200 倍)

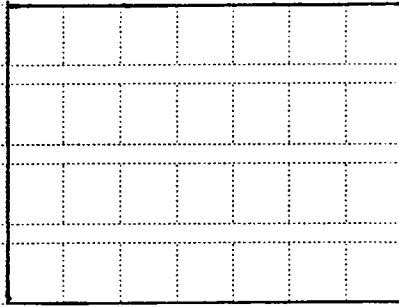


図 11 MFH-S 細胞の ACPase 染色像

細胞質内に赤色陽性顆粒が見られる。

(倍率100倍)

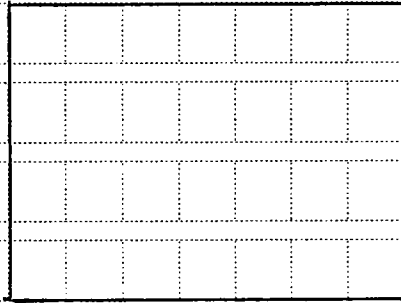


図 12 MFH-S 細胞のリゾウム染色像

陽性細胞は、細胞質内に赤褐色の陽性顆粒を含む。

(倍率100倍)

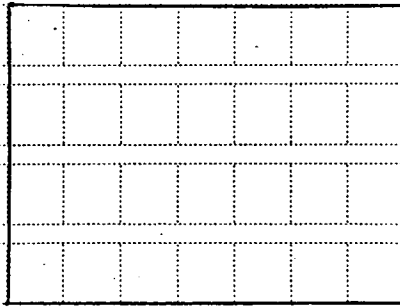


図 13-a

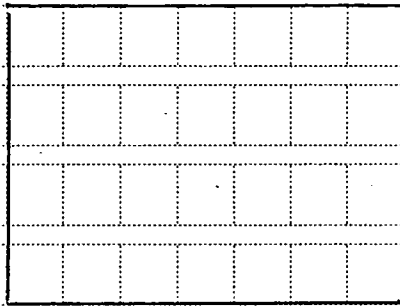


図 13-b

図 13 MFH 3 細胞の食食像

a) 標的として羊赤血球を用いた。(倍率 400 倍)

b) 標的としてラテックス粒子を用いた。

(倍率 400 倍)

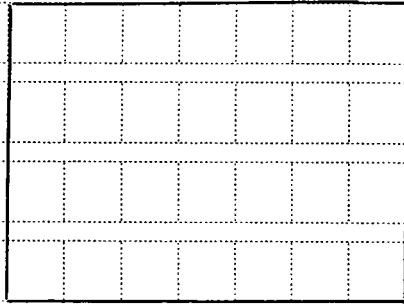


図14 MÄH-S細胞のEAD波の像

(倍率200倍)

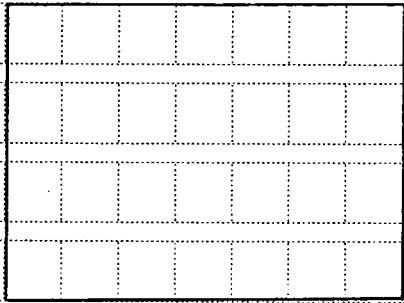


図15 MÄH-S細胞のEAC波の像

(倍率200倍)

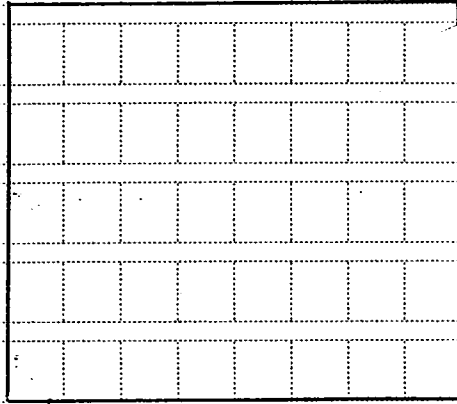


図16 MFH-S細胞の感作あるいは非感作羊赤血球に対する貪食能を示す

MFH-S細胞(2×10^5 個)と感作あるいは非感作羊赤血球(5×10^6 個)と 37°C にく混合培養した。

その後50以上の血球がとり込まれこいる細胞を貪食細胞と判定し、200個の細胞中におけるその割合を算定した。

羊赤血球 ●—●, 抗体感作羊赤血球 ○—○

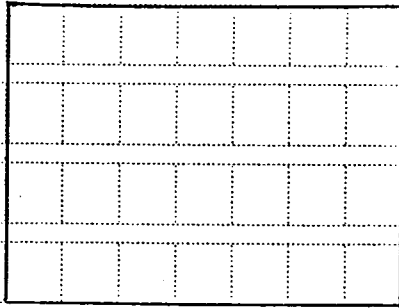


図 17 MFH-S 細胞の α -AT 染色像

細胞質内に赤褐色の陽性顆粒が見られる。

(倍率400倍)

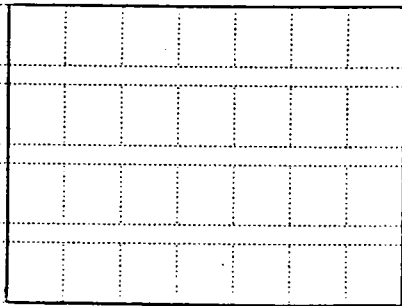


図 18 MFH-S 細胞の渡銀染色像

細胞間には網状に配列する好銀線維が観察される。

(倍率100倍)

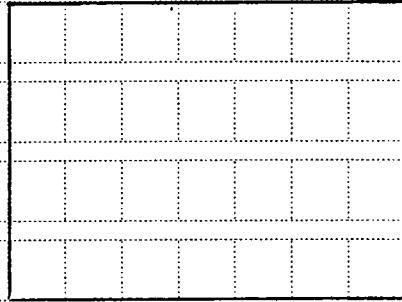


図19 MFH-S細胞のアルミアニ青染色像
 この染色性はヒアルロンダーゼ処理に
 よって低下する。(倍率 100倍)

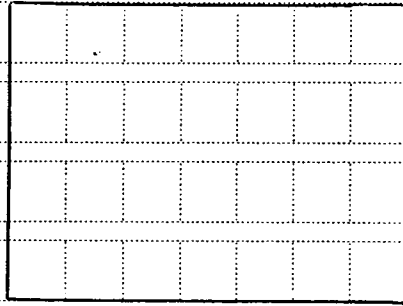


図 20 - a

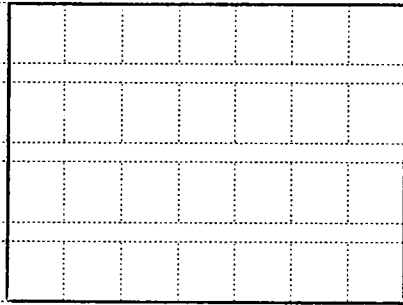


図 20 - b

図 20 MFH-S 細胞を継代するに よ っ て 出
現した黄色腫細胞

a) 光顕像

(倍率 200 倍)

b) 細胞管内に、限界膜を有する多数の空胞
が見られる、

(倍率 500 倍)

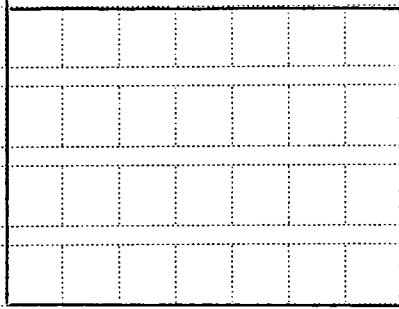


図 21-a

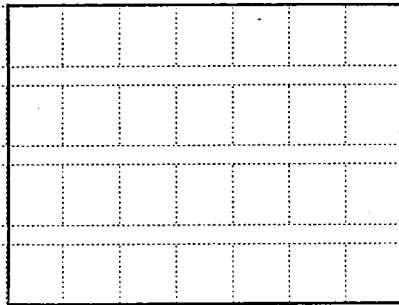


図 21-b

図 21 MFH-S 細胞の脂肪染色像

a) オイル赤染色像

(倍率 400 倍)

b) スヂーニ黒 B 染色像

(倍率 200 倍)

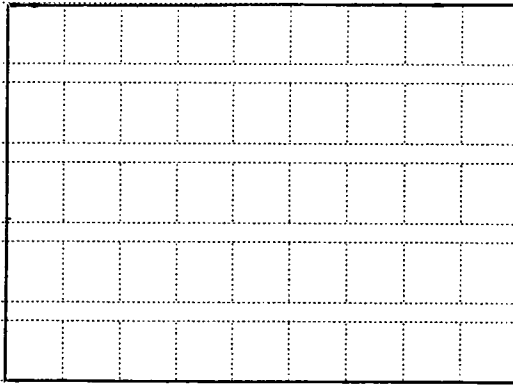
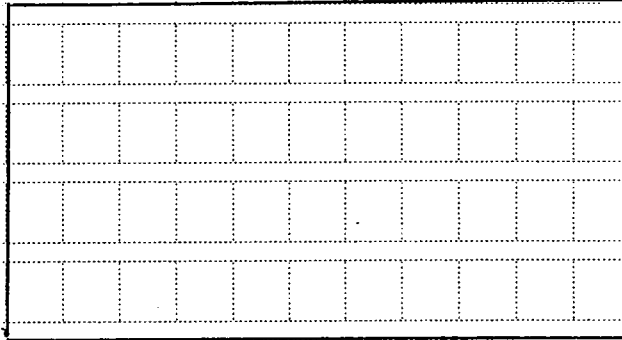


図 22 組織培養によつて紡錘形に形態変化した MFH-S 細胞の超微形態

細胞継代数 10 代目頃には細胞分布として約 70% の細胞が線維芽細胞様に変化した。しかし一部の細胞は少数の偽足突起、ライソゾームなどの組織球様形態を残し、細胞膜に沿つて集合する微細線維を有する筋線維芽細胞様細胞も見られる。(倍率 15000 倍)

表1. MAH 由来培養細胞の耐寒性中のコロニー形成能



実験1では細胞継代2代目、実験2では3代目の細胞を使用した。

培養細胞を23%寒天増殖培養液中で20日間培養したのち、80以上の細胞からなるコロニー数を算定した。

なお、単一細胞が形成したコロニーを選び、ハスツールピペットで分離した細胞を実験に用いた。

表 2. 各種培養細胞のコラーゲン合成能



コラーゲン合成能の測定は、実験方法と述べた様に Douglass の方法に準じて行ない、% コラーゲン値は以下の式により求めた。なお MFH-S 細胞は継代 15 代目の細胞と、Fibroblast は正常頬粘膜組織より得た 2 代目の細胞を用いた。

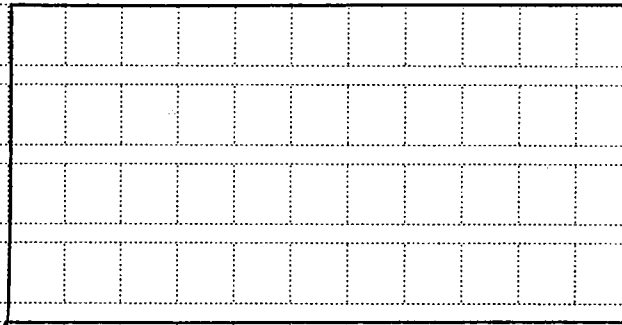
$$\% \text{コラーゲン} = \frac{\frac{\text{CDP}}{5.4}}{\frac{\text{CDP}}{5.4} + \text{NCP}} \times 100$$

表 3	MFH-S 細胞の継代培養に伴う性状の变化
化	

[illegible]

実験方法に記した方法に従い細胞を検索した。それぞれの数値は、200個の細胞における陽性率を示している。なお、コラーゲン合成能については%コラーゲン値を用いた。

表 4. 各種培養細胞の薬剤に対する感受性



各種培養細胞 (10×10^4 個) を、各種濃度の薬剤で 4 日間処理した後、生細胞数を算定し、薬剤処理群生細胞数との比により、50% 増殖抑制率 ID_{50} と算定した。

表 5. レット血清中の α_1 -抗トワプミニン値

[illegible]

血清中 α -AT 値の測定は SRID 法による。

* は本症例番号の値を示す.

なお、この方法を用いた正常人血清中の
A7値は $192-264 \text{ mg/dl}$ とこれこいる。

MFH-S 細胞の貪食活性

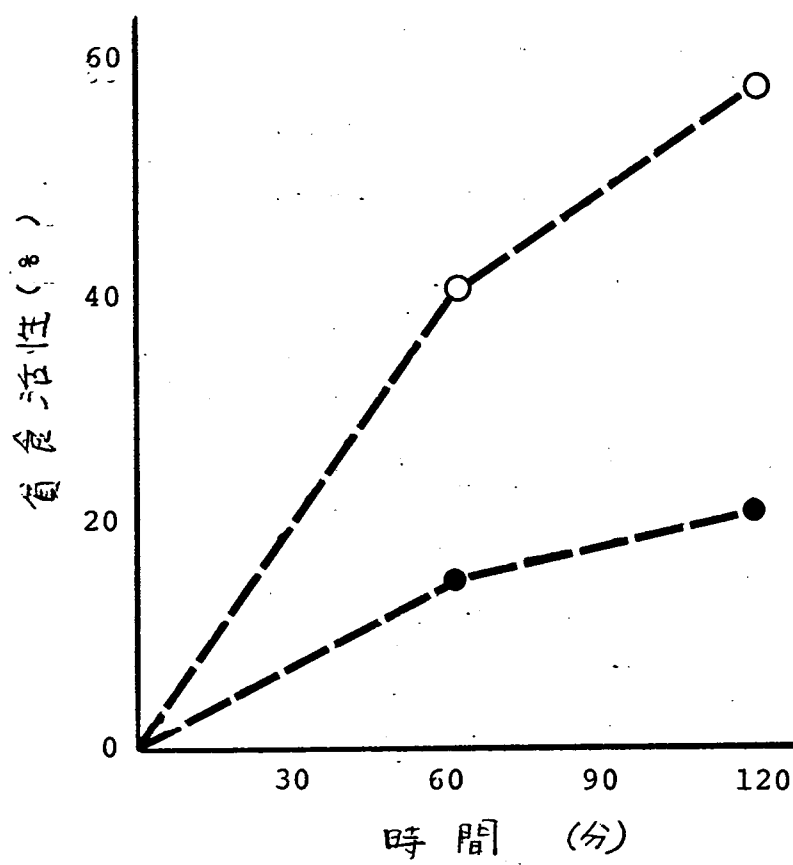


表 1.

実験番号	細胞数	コロニー数	コロニー形成率
1	10^3	9, 11	1.15%
	10^4	113, 147	
2	10^3	12, 14	1.45%
	10^4	148, 172	

表 2.

培養細胞名	C.D.P.	N.C.P.	% コラーゲン
MFH-S cell	18160 ₊ 452	41022 ₊ 2932	7.6%
Fibroblast	26330 ₊ 378	25493 ₊ 2387	16.0%
HSG cell	270 ₊ 60	14469 ₊ 1740	0.3%

培養細胞の性状	細胞世代数		
	5 代	20 代	60 代
Histiocyte-like cell	94 %	92 %	20 %
Multinuclear giant cell	5 %	5 %	5 %
Xanthomatous cell	1 %	3 %	5 %
Fibroblast-like cell	0 %	0 %	70 %
α -naphthyl acetate esyerase	95 %	95 %	20 %
naphthol AS-D acetate esterase	80 %	80 %	5 %
acid phosphatase	100 %	100 %	100 %
lysozyme	20 %	10 %	5 %
Fc receptor	60 %	30 %	20 %
C3 receptor	60 %	30 %	20 %
Phagocytosis	15 %	5 %	2 %
Immuno-phagocytosis	40 %	12 %	5 %
α_1 -antitrypsin	95 %	95 %	90 %
Alcian blue	100 %	100 %	100 %
Oil red O	100 %	100 %	100 %
Sudan black B	100 %	100 %	100 %
Collagen percentage of total protein synthesis	7.6 %	7.8 %	11.5 %

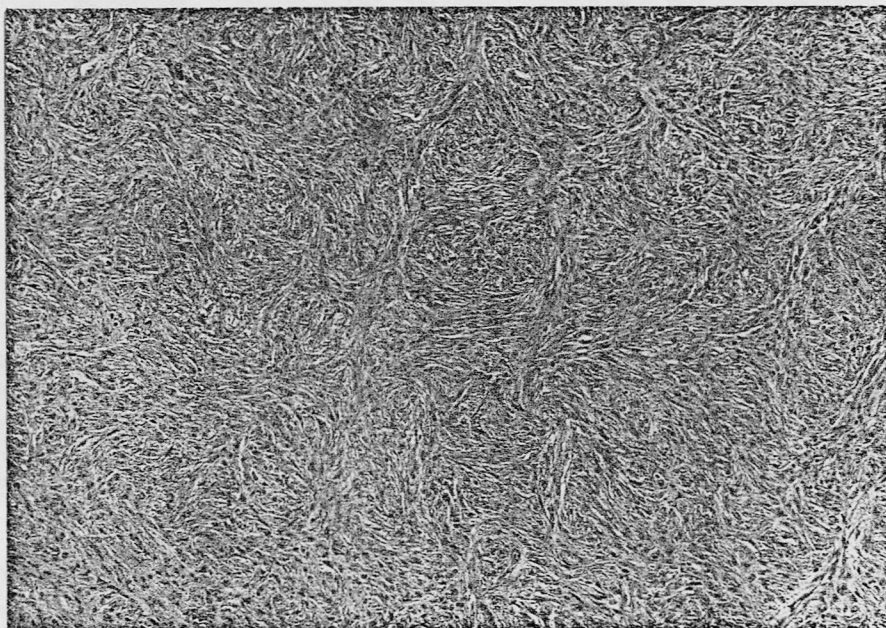
表 4.

藥劑名	50% 增殖抑制濃度 $ID_{50}(\mu\text{g/ml})$		
	KB cell	MFH-S cell	HPA cell
Adriamycin (ADM)	1.5×10^{-3}	1.5×10^{-2}	2×10^{-2}
Vincristine (VCR)	2.5×10^{-3}	5.5×10^{-3}	6.5×10^{-3}
Methotrexate (MTX)	1.5×10^{-2}	1.5×10^{-3}	2×10^{-1}
Pepleomycin (PEP)	1.2	3.5	10
Mitomycin C (MMC)	5.5×10^{-3}	3.5×10^{-3}	5×10^{-3}

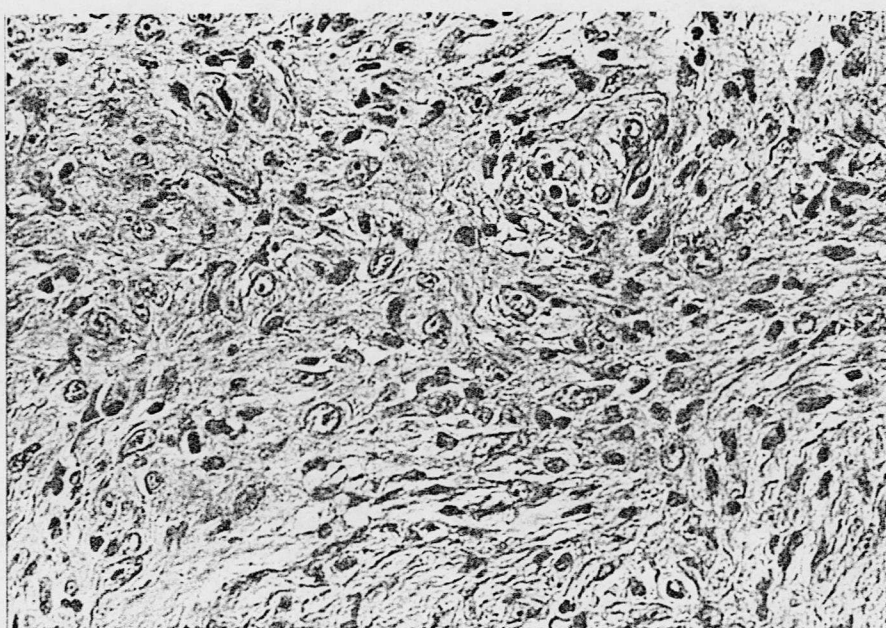
表 5.

血清中 α_1 -AT (mg/dl)

MFH 患者	554.0	633.0
高平上肢患者	283.0	306.0
非阻塞性患者	195.0	220.0



四-1a



四-1b

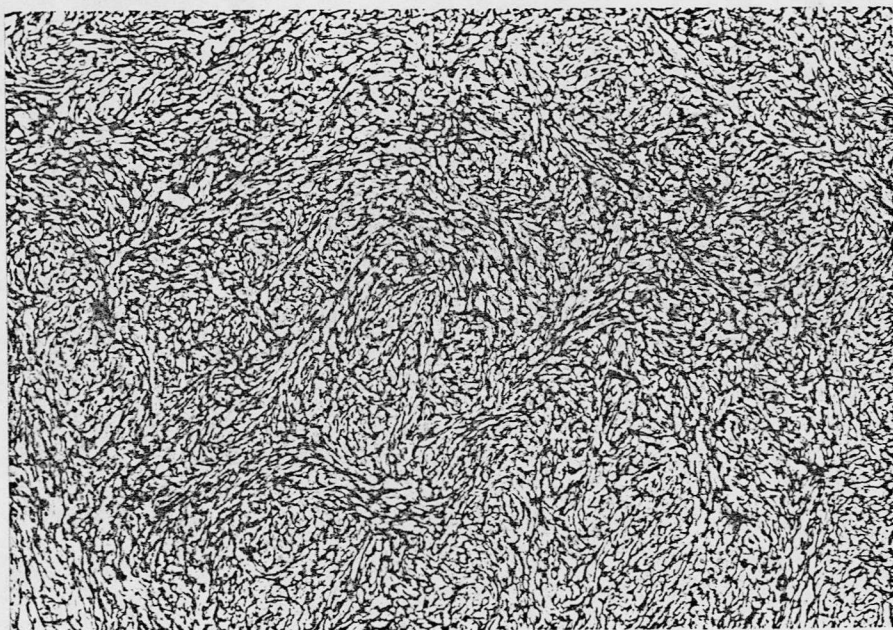


图 2



图 3-a

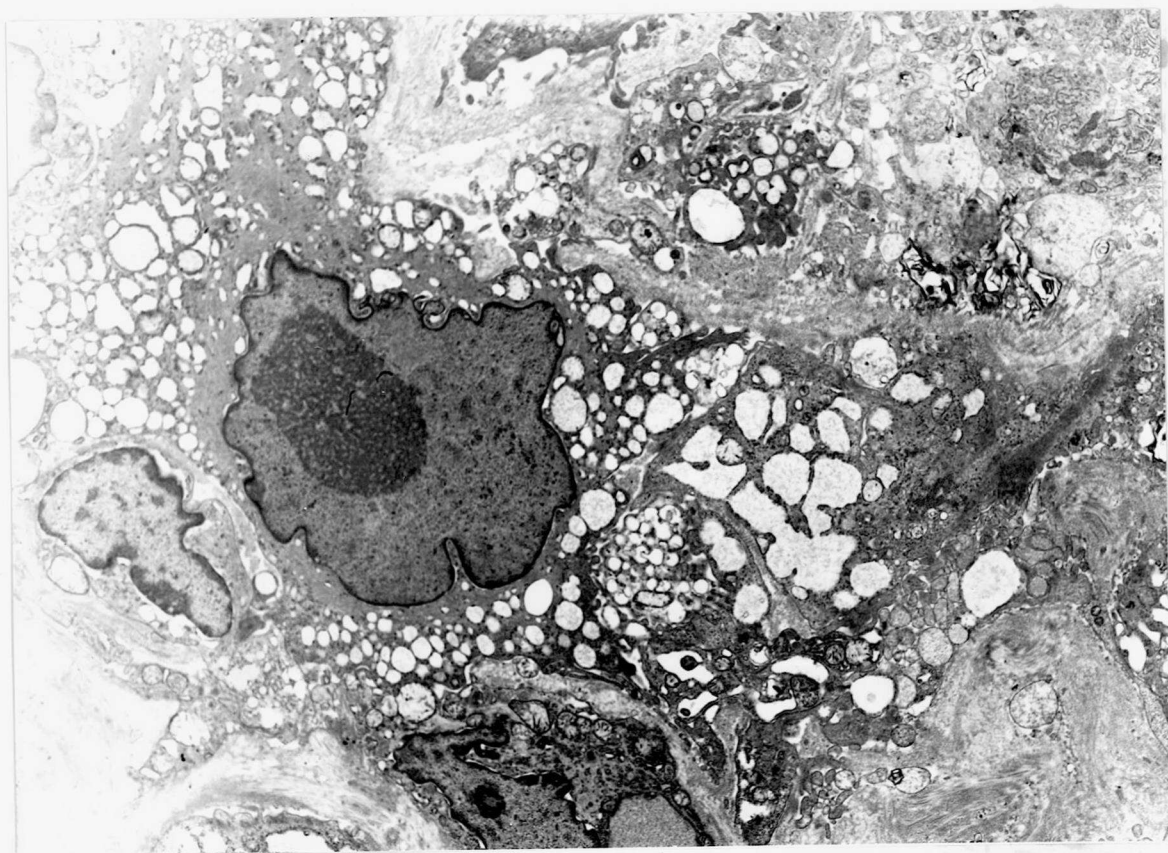


图 3-6

43d、

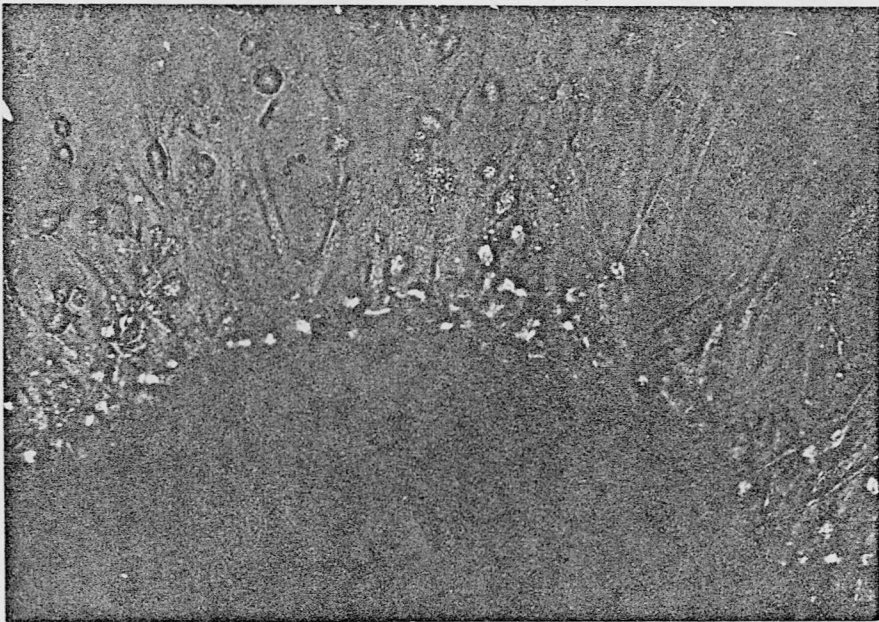


图 4

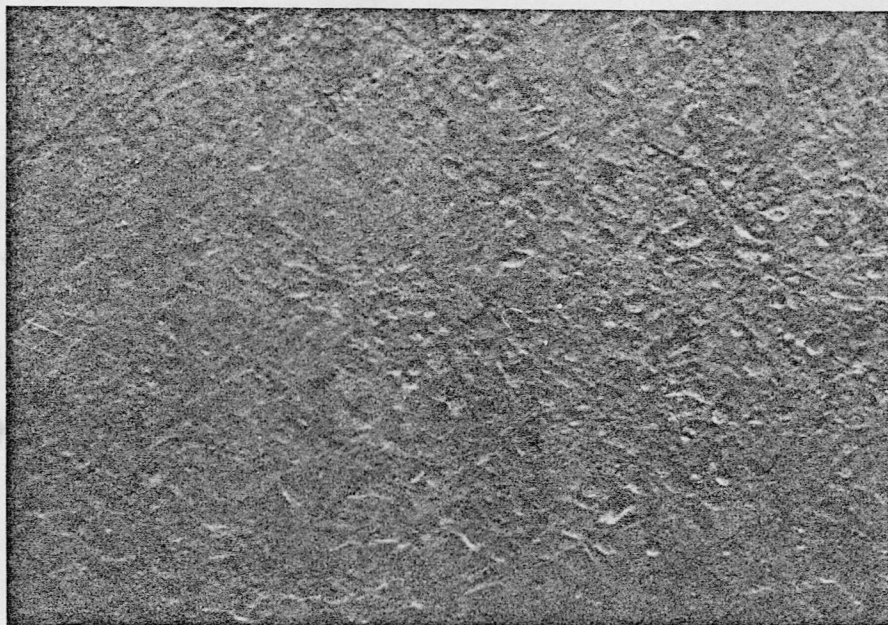
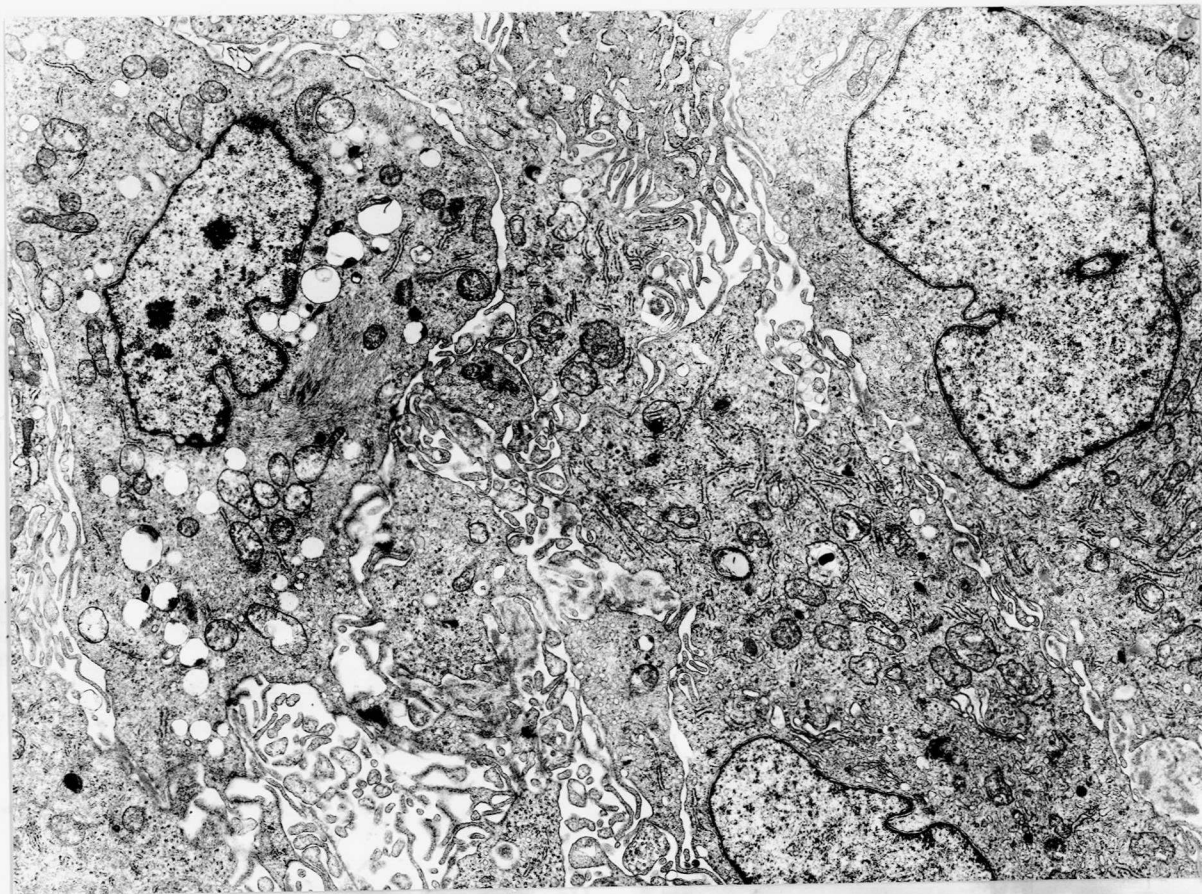
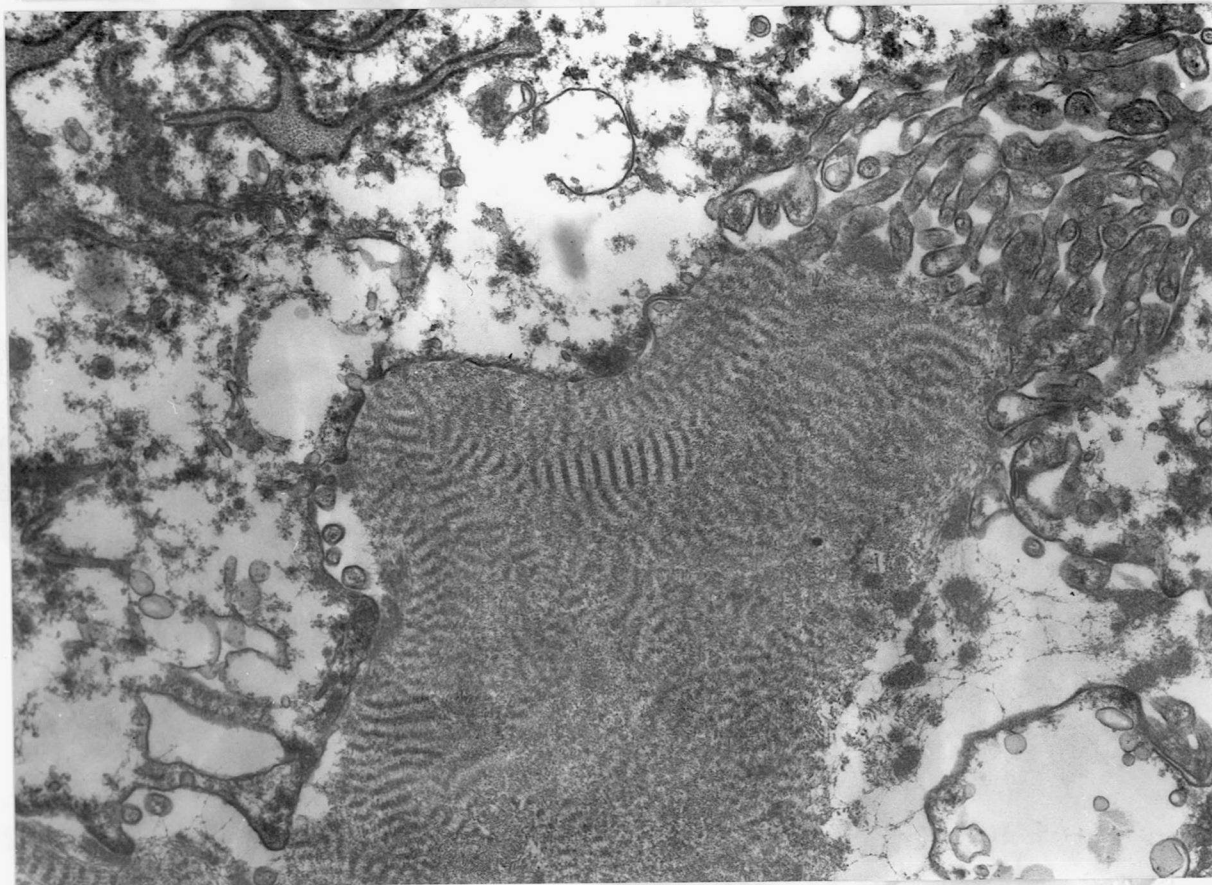


图 5



6-a



6-b

1257

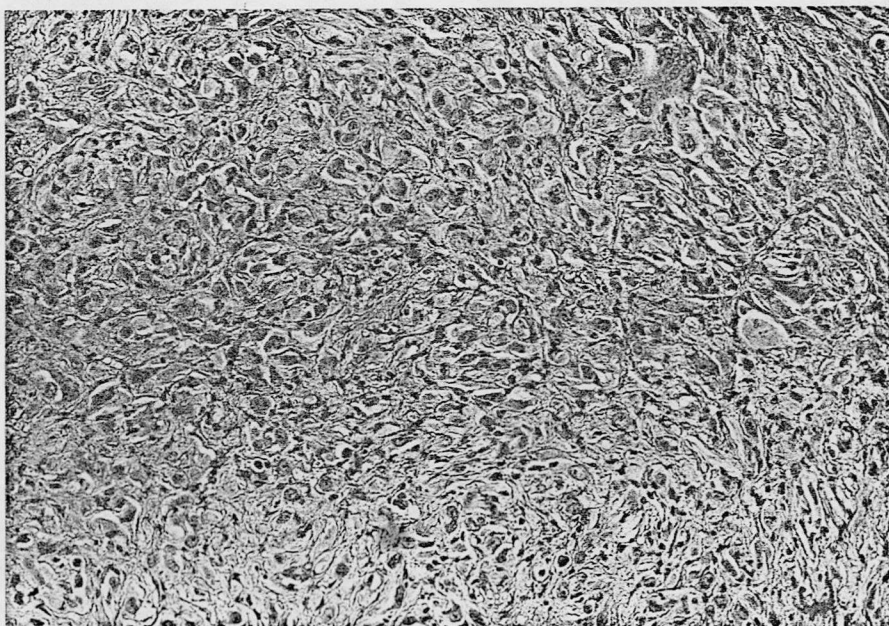
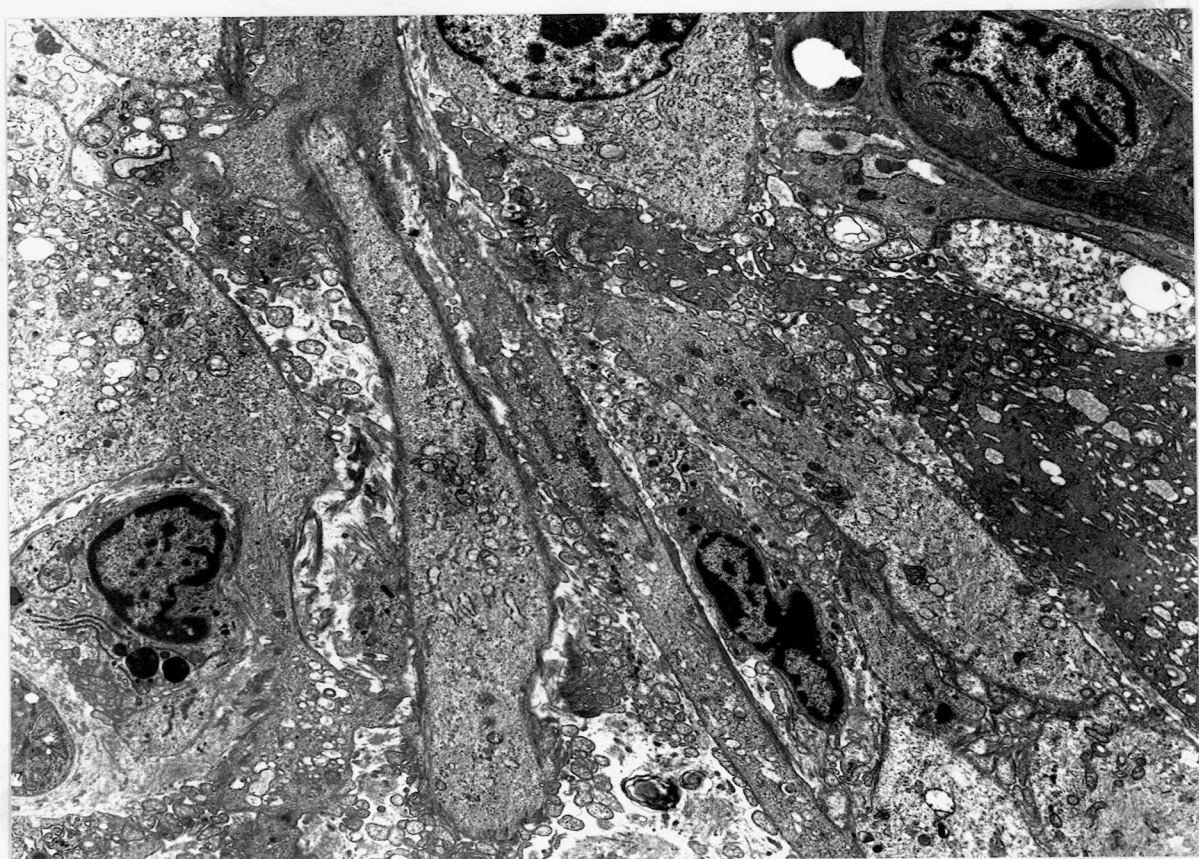
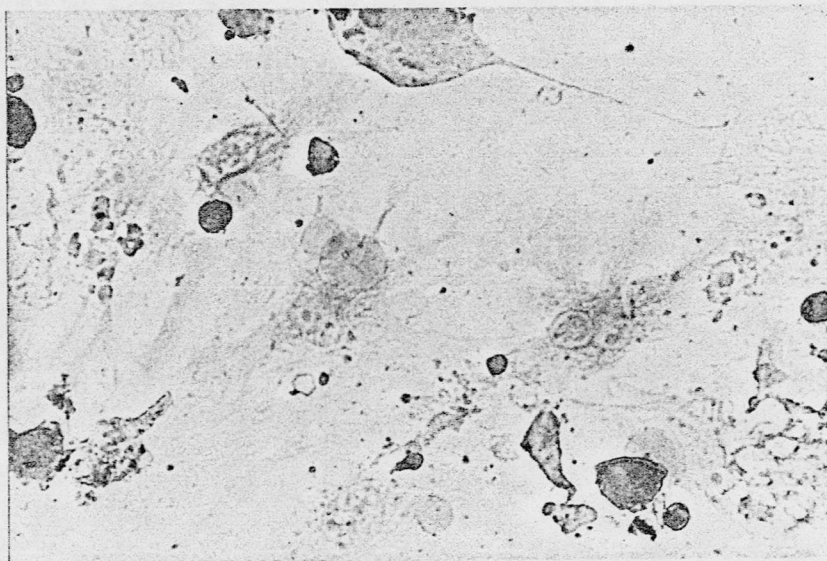


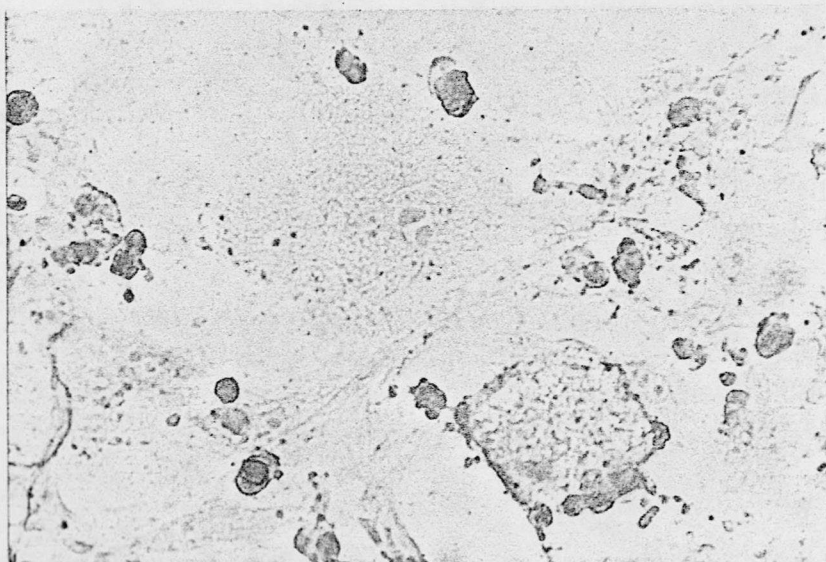
图-9

434





四-9a



四-9b

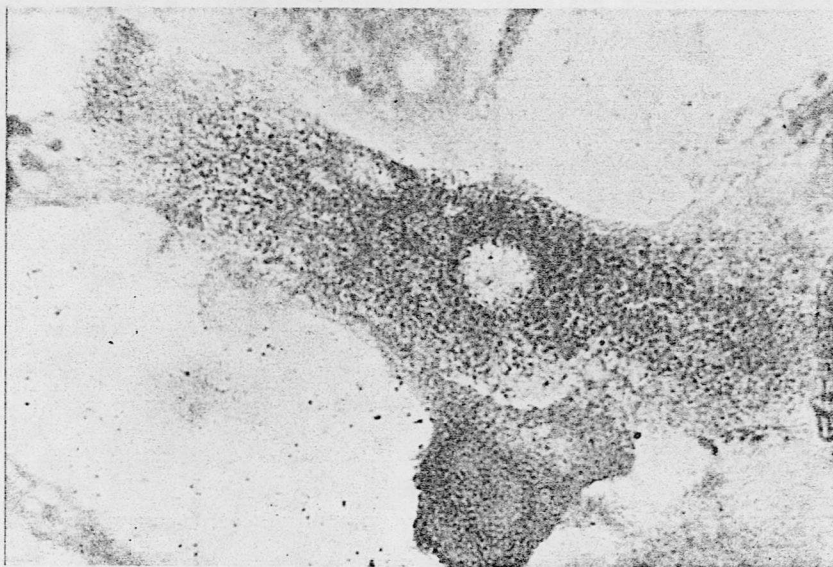


图-10a

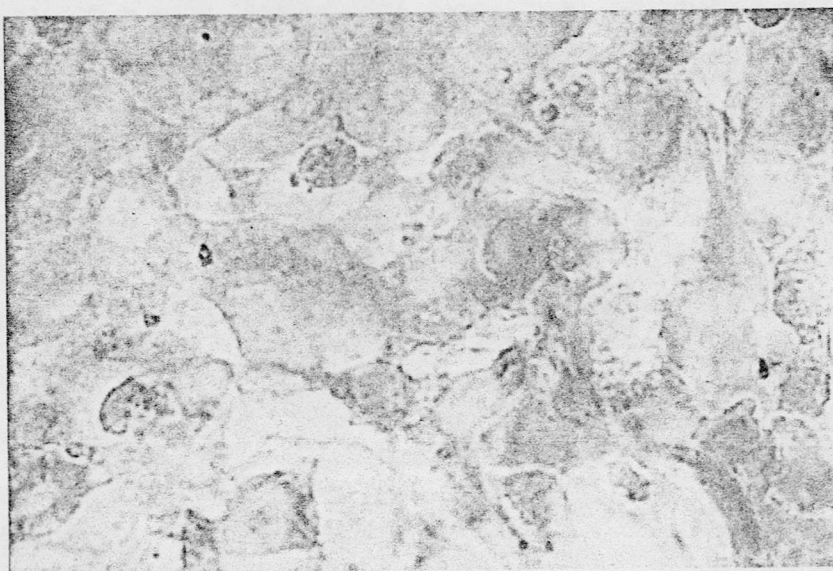


图-10b

43d

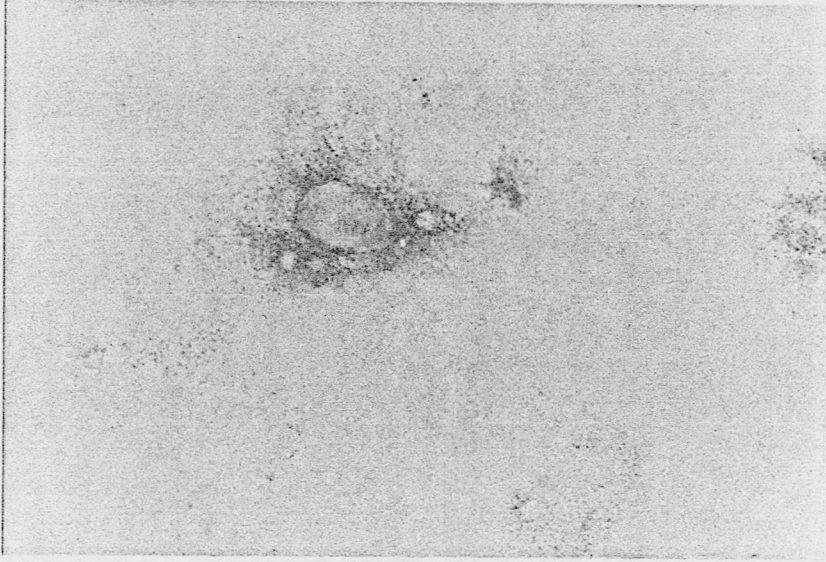


图-11

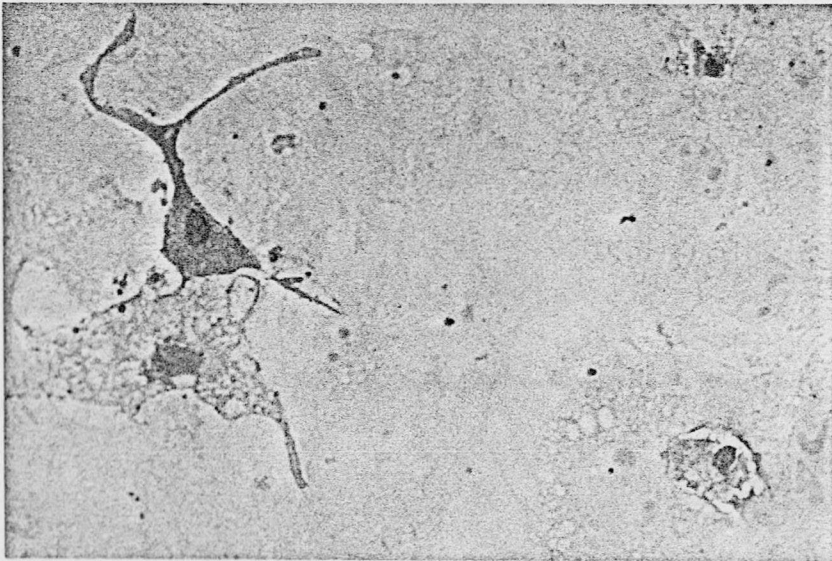
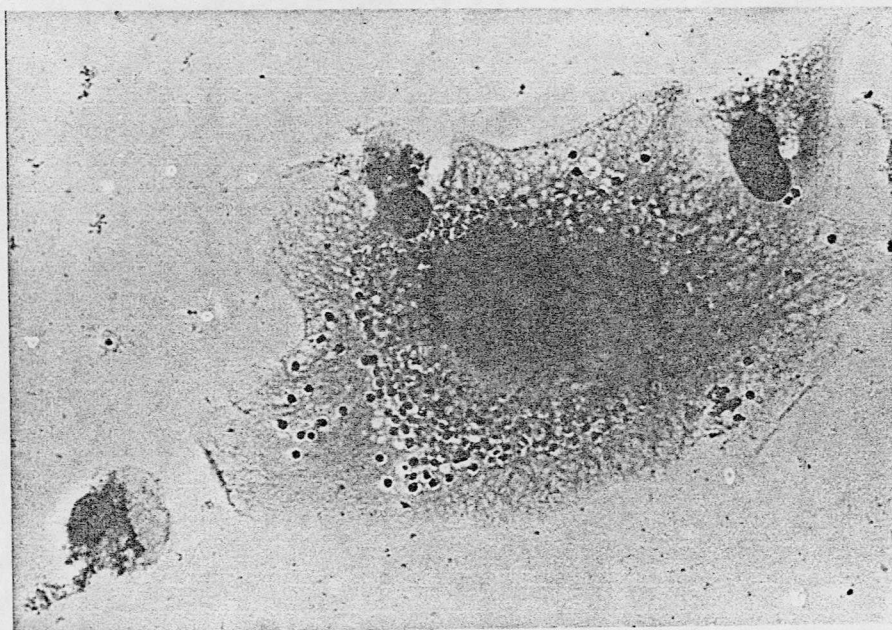


图-12



130 - 13a



130 - 13b

1301

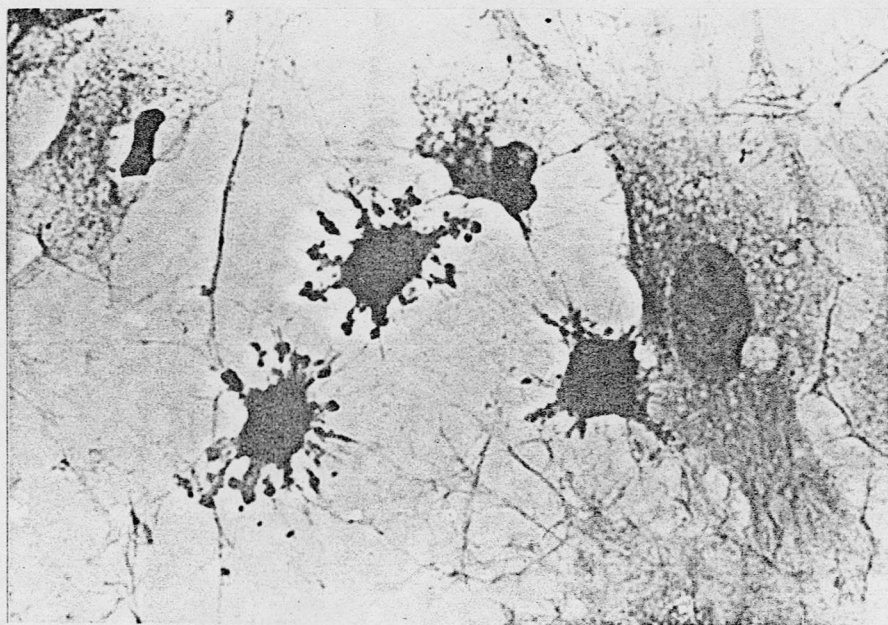


图-14

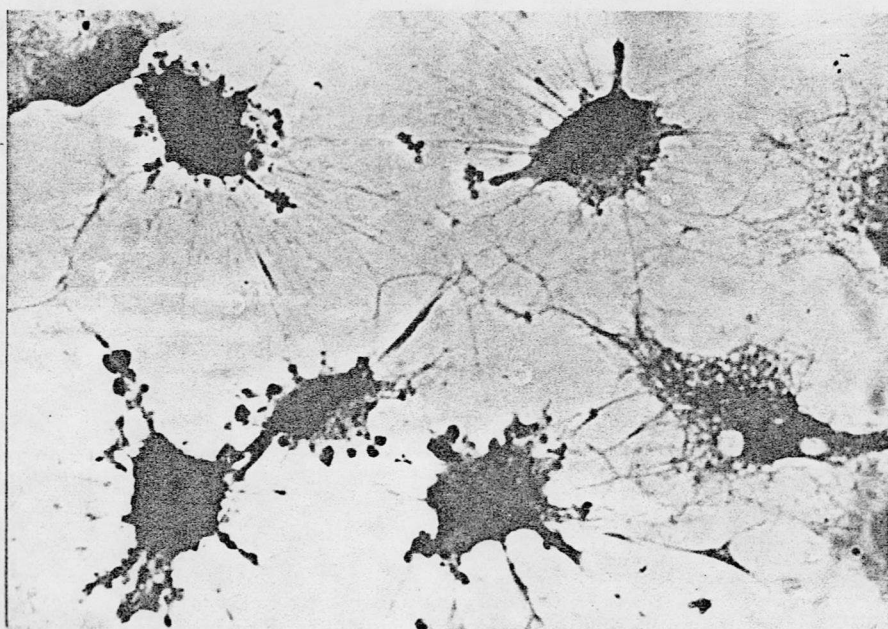


图-15

134

13215

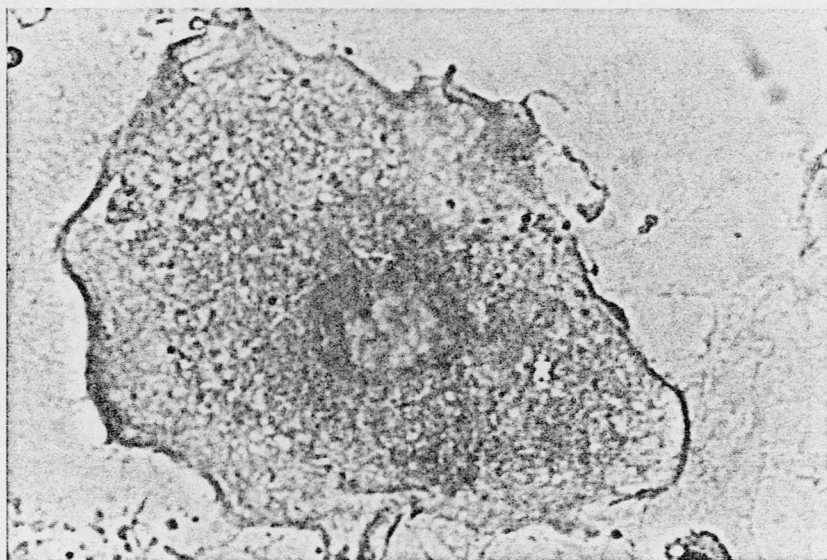
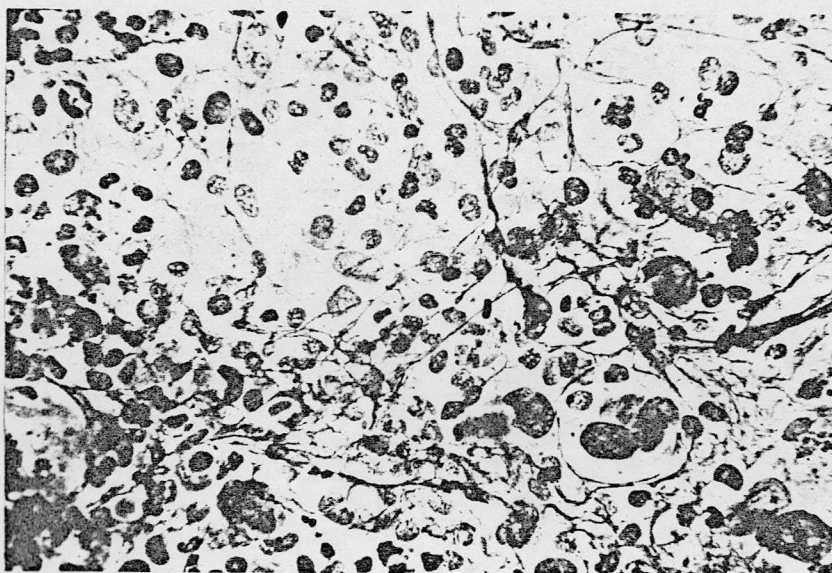


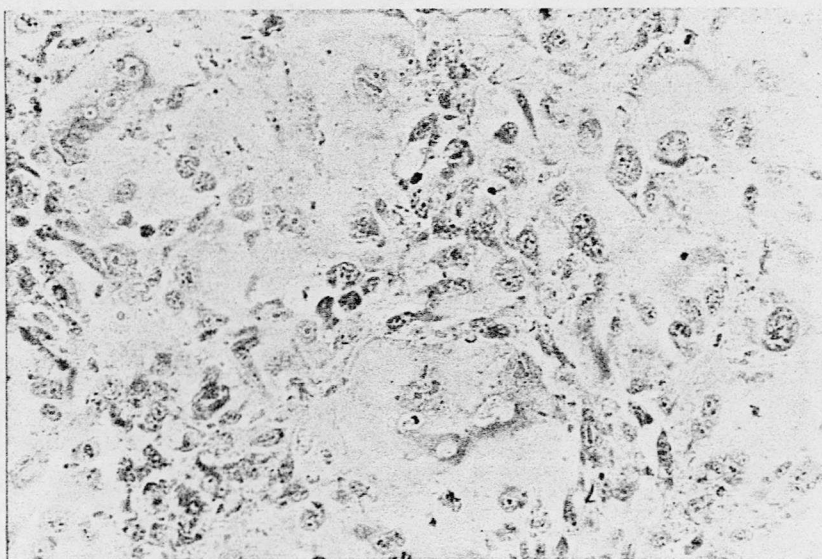
图-17

43 d1



137-18

1347



137-19

73 d1



图-20a



图-20b

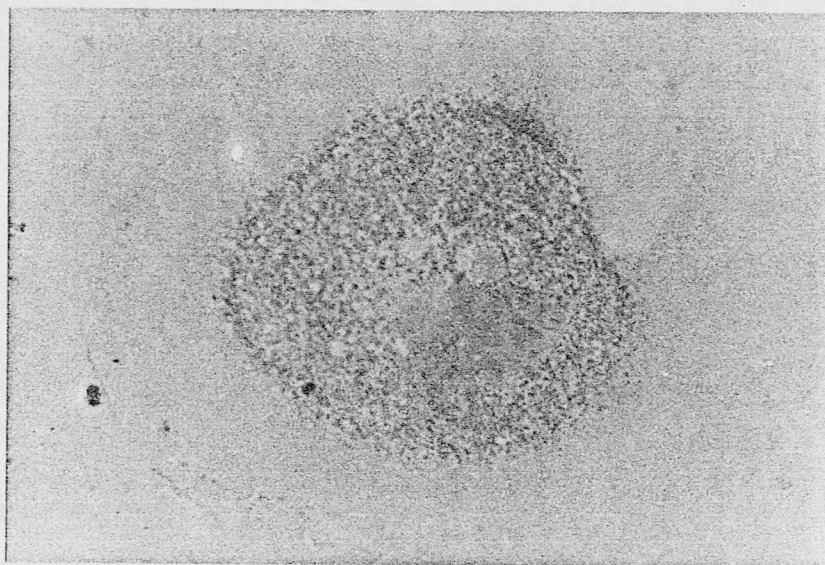


图 -21a

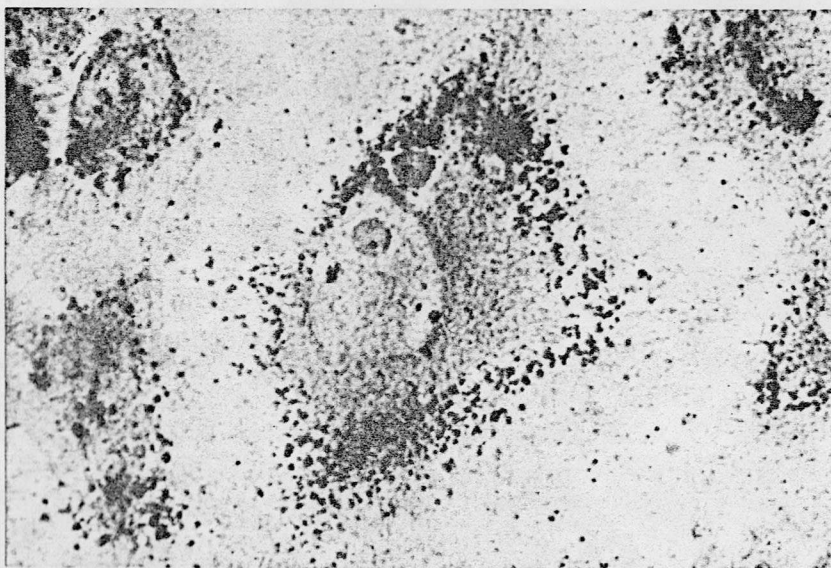


图 -21b

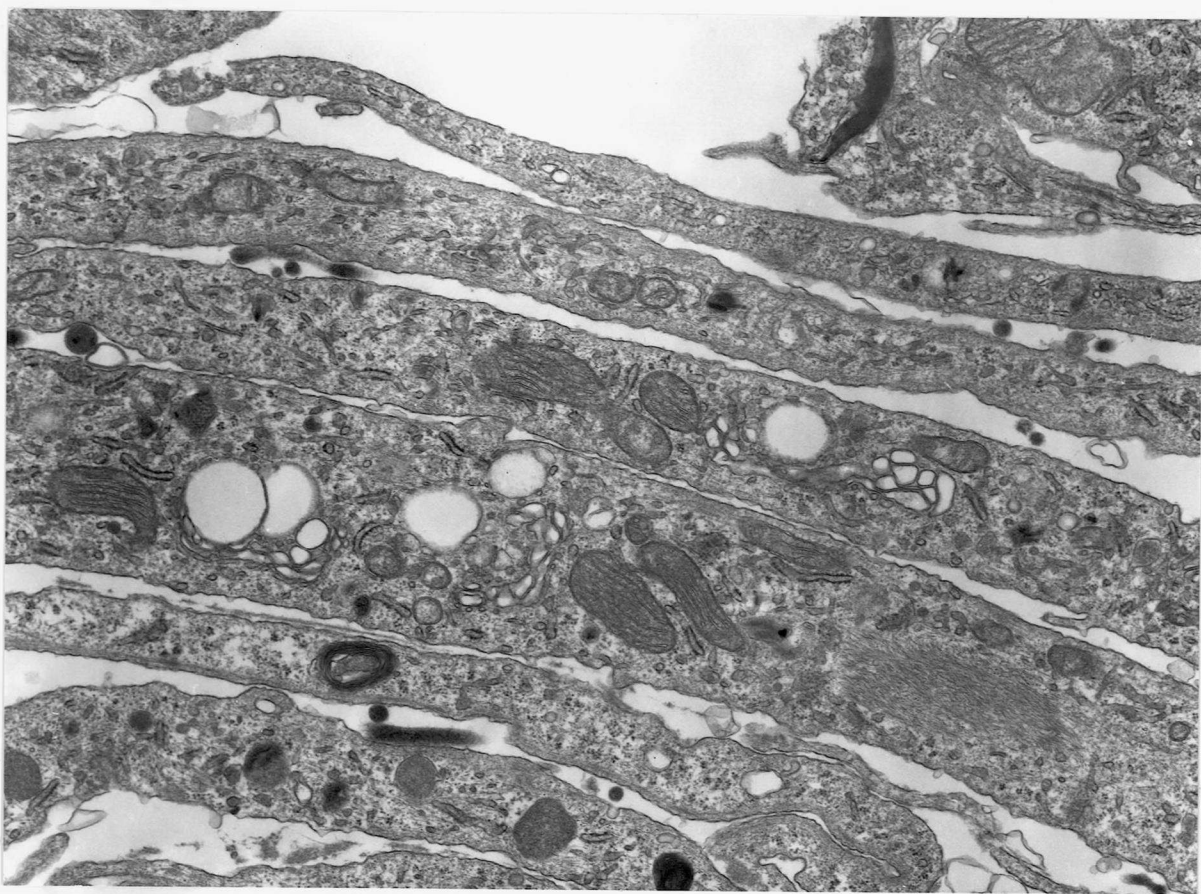


图 22