

イヌの可移植性性器腫瘍の生物学的研究

新 妻 勲 夫

イヌの可移植性性器腫瘍の生物学的研究

新 妻 勲 夫



# 目 次

I	緒 言	1
II	実験材料および実験方法	6
1	実験材料	6
1.	供試材料	6
2.	移植動物	6
3.	抗癌剤	6
2	実験方法	6
1.	C T V T の移植継代方法	6
1)	イヌでの移植継代法	6
2)	異種動物への移植および細胞培養による継代方法	7
(1)	ヌードラットへの移植法	7
(2)	鶏胚への移植法	7
(3)	腫瘍細胞培養法と継代について	7
(4)	培養条件の検討方法	8
3)	移植腫瘍の同一性の確認方法	8
(1)	染色体検査法	8
(2)	C T V T 細胞に対するモノクローナル抗体の作製と 酵素抗体法による腫瘍細胞の同一性の確認法	9
2.	移植継代腫瘍の観察方法	16
1)	スタンプ標本による細胞学的観察法	16
(1)	イヌおよびヌードラットへ移植したC T V T 細胞の組織 化学染色法	16
(2)	イヌおよびヌードラットへ移植したC T V T 細胞の組織 染色法	16
2)	病理組織学的検査方法	16
(1)	C T V T の肉眼的および光顕的観察法について	16
(2)	C T V T の電顕的観察法について	17

3) C T V Tの立体構築、特に血管構築の観察法-----	1 7
(1) Whole mount (透明) 標本の作製-----	1 7
(2) 連続組織標本の作製-----	1 7
(3) 樹脂鑄型標本の作製と走査型電子顕微鏡標本の作製-----	1 7
4) 鶏胚移植腫瘍の観察法-----	1 8
(1) 腫瘍細胞の形態-----	1 8
(2) 腫瘍細胞の発育-----	1 8
(3) 腫瘍内血管構築-----	1 8
(4) 抗癌剤による腫瘍の変化-----	1 9
5) 細胞骨格蛋白の免疫組織化学的観察方法-----	1 9
(1) 免疫組織化学的観察法-----	1 9
(2) C T V T細胞骨格電顕観察法-----	2 0
III 研 究 結 果-----	2 1
1. C T V Tの継代移植成績-----	2 1
1) 野外例C T V Tのイヌでの継代移植結果-----	2 1
2) 異種移植による継代実験結果-----	2 2
(1) ヌードラットへの移植成績-----	2 2
(2) 鶏胚への移植成績-----	2 2
3) 細胞培養による継代実験成績-----	2 3
(1) 培養条件の検討結果-----	2 3
4) 移植腫瘍の同一性の確認成績-----	2 4
(1) 染色体の検査成績-----	2 4
(2) C T V T細胞に対するモノクローナル抗体の作製と 酵素抗体法による腫瘍細胞の同一性の確認成績-----	2 5
2. 移植継代腫瘍の観察結果-----	2 6
1) ヌードラット継代C T V Tのスタンプ標本による細胞学的 観察所見-----	2 7
2) 病理組織学的観察所見-----	2 7
(1) 野外例C T V Tおよび移植例C T V Tの病理学的所見-----	2 7



	(2) 電顕的所見	2 8
3)	C T V T の立体構築、特に血管構築とその特徴	2 9
	(1) 組織所見	2 9
	(2) Whole mount 標本の所見	3 0
	(3) 樹脂鑄型標本の所見	3 0
4)	鶏胚移植 C T V T の観察結果	3 1
	(1) C T V T 細胞の形態組織所見	3 1
	(2) C T V T の漿尿膜上の発育成績	3 2
	(3) 鶏胚移植 C T V T の血管構築	3 2
	(4) 鶏胚移植 C T V T の抗癌剤投与による変化	3 2
5)	C T V T の組織化学的および免疫組織化学的観察結果	3 5
	(1) イヌ移植 C T V T およびヌードラット移植 C T V T の組織化学的染色所見	3 5
	(2) イヌ移植 C T V T およびヌードラット移植 C T V T の免疫組織化学的所見	3 5
	総 括	3 6
IV	考 察	3 9
V	要 約	4 5
VI	謝 辞	4 7
VII	文 献	4 8
	付 図	5 6
	付 表	6 1
	写真説明	6 4

イヌの可移植性性器腫瘍 Canine Transmissible Venereal Tumour (以下、CTVTと省略する) [23,27,41,48,61,67] は、伝染性性器腫瘍または、性器肉腫[26]、性器肉芽腫、伝染性リンパ肉腫、組織球腫[53,63]、あるいはSticker[78]肉腫等の種々の名称で呼ばれて来た。この腫瘍は感受性のあるイヌが交尾をすることによって伝染[29]すると考えられている特殊な腫瘍である[73-75]。CTVTはほとんど世界中に広がっていると考えられ、現在までにソビエト連邦、ドイツ、イギリス、フランス、イタリア、デンマーク、南アフリカ、ジャワ、ニューギニア、南アメリカ、アメリカ合衆国等で報告されている[74]。

CTVTは19世紀初頭より知られているいわば古典的な腫瘍で、雌雄のイヌに発生し、雌イヌでは外陰部から膣にかけて、雄イヌでは包皮あるいは陰茎先端より陰茎根部にかけて見いだされる事が多い。感染初期には雌イヌでは膣あるいは膣前庭に、雄イヌは陰茎あるいは包皮に1個または数個の直径1mm位の薄赤い顆粒が隆起し、しだいに発育して、1個ないし多発性の顆粒状の小腫瘍となり、さらに大きな腫瘍となり、雌では膣全域に広がり筋層に浸潤してポリープ状となる。潰瘍を形成して出血あるいは壊死を生じ拳頭大になる事もある。腫瘍は細菌感染をきたしていることが多く膣腫瘍表面または包皮の先端から血様、漿液性あるいは化膿性の悪臭のある分泌物を出すようになる。雄では包皮の皮膚が肥厚して内部の腫瘍が露出し、あるいは陰茎根部から陰嚢内に広く浸潤していく症例もある[7,22,44,51,52,86,93]。



この腫瘍は1876年頃は普通にどこでも見られ、また腫瘍細胞を非経口的に接種することにより、同種宿主への移植が可能[68]なことから多くの学者の興味を引き19世紀後半にロシアのNovinsky[56]が初の移植に成功して以来、数多くの追試がなされている[71, 77]。一般に移植は腫瘍細胞、浮遊液の注射あるいは腫瘍片の埋没によって皮下、生殖器粘膜下、腹腔内、睾丸内などに行われている。皮下に注射した場合は1～2ヵ月で腫瘍塊を形成し、その後縮小して消失する事が多いが、まれに全身転移を起こす事がある[72]。Sticker[78]は12代にわたり継代移植を行い腹腔内、生殖器粘膜下、眼窩内、硬脳膜内腔、脛骨内および口腔粘膜などに移植を成功させたが、濾液や遠沈上清液あるいは損傷した細胞を用いては移植不可能で、移植が成功するためには移植される腫瘍細胞が、損傷されずに生きている事が必要条件であった。また、Monbreun[45]は皮下、腹腔静脈内にC T V T細胞を注射して移植に成功し、皮下移植陽性で肝臓、脾臓、甲状腺全身の皮膚および骨格筋への転移を認めた。

白須[73]は腹腔内に腫瘍細胞浮遊液を注射し腹壁の注射部位、各内臓表面に結節を発生させたが、腫瘍材料を乾燥、凍結あるいは機械的障害や熱を加えた場合の移植は陰性であったと述べている。Dozza およびTorlone[13](1960年)は腫瘍細胞を挫細しトリプシン処理をした細胞片浮遊液で移植に成功し、Thiery[82]は1匹の子イヌの脳脊髄液中にC T V Tの培養上清を接種をすることによって注入部に腫瘍を発生せしめたという。

異種移植についてSticker[78]は3頭のキツネの皮下および腹腔にC T V Tを移植して2頭に腫瘍の成長を認め、Wade[90]も2頭

の子ギツネの皮下移植に成功している。白須等[73]はコーチゾン処理の有無にかかわらずハムスターの頬袋内への異種移植に成功し70～80日頃には大きいものは雀卵大になりハムスター移植CTVTのイヌへの逆移植も可能であったと述べている。

CTVTの転移経路については、Higgins [25], 白須[75]は血行性に転移し、柴内等[72]はリンパ道性に転移するものと報告している。さらに柴内等はヒアルロニダーゼ加CTVT乳剤を直接イヌの鼠蹊或は顎凹リンパ節に接種し、体の上部および下部より体中央に向けてCTVTの移行を実験した結果、リンパ管より胸管、さらに血行路を経て内臓に転移すること、両鼠蹊リンパ節に移植したCTVTが頭部、頸部、胸部、背部の皮膚、皮下織、肋間筋腹筋、眼窩、眼球、肺臓、心臓、肝臓、脾臓、膵臓、腸骨下リンパ節などに直径0.2～5.0 cmの転移結節を生じたと報告している。

藤永等[19]は正常イヌの培養白血球の染色体標本を作製し、G-, Q-, C-およびN-バンド染色を施してバンドパターンを解析し、雌イヌの正常染色体は38対・76本の端部着糸型染色体とXおよびYの性染色体の合計78本からなることを証明した。阿部等[2], 江島[16] 牧野等[40], Nielsen 等[54] Weber 等[93]はCTVT細胞の染色体構成すなわち核型(Karyotypes)分析法を実施して詳細に検討した結果染色体数は59で一定であることを認めている[54]。

Abbott[1], Ajello[3], Carteaud[9], Drommer[14], Lombard[39], 白須[75]等はCTVTを電子顕微鏡学的に超微構造を明らかにし、またAjello[3], Lombard[39]等は腫瘍細胞および基質中の線維芽細胞にウイルス様粒子を認めたと報告している。

CTVTの由来細胞については今牧[30], 松山[42], 津村[85]等



の円形細胞肉腫説、Monbreunおよび Goodpasture等[45]のリンパ球説、Mulligan[49]の未分化細胞網細胞説ならびに組織球説などがあるが由来細胞については不明の点が多い。

細胞骨格蛋白では、細胞のアクチンは有核細胞のすべてに偏在し筋肉細胞において筋収縮運動の本体を担う主収縮性タンパク質であり、細胞のミオシンは筋肉細胞のみならず非筋細胞における存在も報告がある。また、細胞骨格要素とくに中間径フィラメントの蛋白質の発現は複雑であるが細胞特異な蛋白質の発現能はよく保たれており、これを利用して腫瘍細胞の同定や腫瘍細胞の起源の決定に実用化されつつある[47,59,60,92]。

著者は動物の腫瘍の中で最初に可移植性が証明されたCTVTについて、今だに腫瘍の由来や細胞の性格など解明されていないことに注目し、研究材料の安定的確保のためにイヌからイヌへのCTVTの同種移植、イヌ移植CTVTをヌードラットへ、さらに鶏胚へと異種移植を試み、近年激減したCTVTを保存することを目的として比較検討を行った。また、CTVT細胞を用いて組織培養[78]を試み、その継代培養について検討した。CTVTの継代過程で腫瘍細胞の性質に変化のないことを確認する目的で、光顕的、電顕的検索に加えて染色体数を検査して異種移植したCTVTの染色体、核型(Karyotypes)の同一性の確認を行った。

Birrer[6], Cepko[10], Dippold[12], Giraudon[20], 広橋[28], Johnson[33], Kohler, Milstein[34], Koprowski[36], Lake[37], Mcfarlin[43], Russel[64]等の方法を応用してCTVTに特異的なモノクローナル抗体[81,95]を作製し、免疫組織化学的染色による同一性の確認を行った。

腫瘍の血管系については、C T V Tについても血流調節機能[35, 46, 69, 70, 79, 80]、intra-arterial cushion (以下 I A C と略す) およびその他種々の構造的な特徴を詳細に調べた。

Murphy [50]や佐々木[66]の方法を応用してC T V Tを鶏胚の漿尿膜に移植し卵黄嚢に抗癌剤を注入し[31]、C T V Tと対照としたC T V T以外の腫瘍とについて腫瘍組織の変化を観察した。

C T V Tの起源については、従来より行われている光顕的、電顕的検索に加えて、細胞骨格蛋白成分の中間径フィラメント即ち、デスミン、ビメンチン、ケラチン等の細胞骨格[5, 18, 47, 83, 84, 87, 88]について市販の抗体を用いて検索を行った。

このように本論文では研究材料としてのC T V Tの効果的な維持保存方法の確立とその過程で明らかになったC T V Tの腫瘍細胞の生物学的特徴を記述し、若干の考察を加えた。



## II 実験材料および実験方法

### 1 実験材料

#### 1. 供試材料

移植材料として、イヌ（雑種）雌8才の膣に発生したCTVT（野外例）、および北海道大学獣医学部家畜外科学教室から分与されたCTVTイヌ移植株96代目（北大株）を用いた。

#### 2. 移植動物

1) イヌ：3ヵ月齢の雄5頭、雌4頭を用いた。

2) ノードラット：生後5～6週齢のRowette nude rat (rnu) 90匹、F334/Njcl-rnu 6匹を実験に供した。

3) 11日胚の有精鶏卵：移植用に201個、抗癌剤試験用に147個を用いた。

#### 3. 抗癌剤

注射用硫酸ビンクリスチン（オンコピン：シオノギ製薬）および注射用アスパラギナーゼ（ロイナーゼ：協和醗酵工業）を用いた。

### 2 実験方法

#### 1. CTVTの移植継代方法

##### 1) イヌでの移植継代法

CTVTが発生したイヌに、塩酸ケタミン（ケタラール50：三共k.k.）25mg/Kgを筋注し、全身麻酔後、外科手術により野外例の膣に発生したCTVTを摘出した。そのCTVTをカナマイシン加Phosphate buffered saline, Ph7.65（以下PBSと略す）で3回洗浄後細胞懸濁液にして1頭当たりCTVTの細胞数 $1 \times 10^7$

個／mlにPBSで調整し、3ヵ月令のイヌの背部皮下に接種した。約3～4ヵ月後、増殖した腫瘍の一部を再びイヌに継代した。

## 2) 異種動物への移植および細胞培養による継代方法

### (1) ノードラットへの移植法

イヌに移植した野外例のCTVTを細胞懸濁液とし、1匹当たりCTVTの細胞数 $3 \sim 5 \times 10^6$  個／mlにPBSで調整して生後5～6週齢のRowette nude rat (rnu)さらにF344/Njcl-rnuの両系の各背部皮下に接種した。約2ヵ月後背部皮下に増殖したCTVTの一部を再びノードラットに継代し、増殖曲線を作製した。

### (2) 鶏胚への移植法

0日胚の有精鶏卵を温度37°C、湿度70%の孵卵器に移し、11日間孵卵し、11日胚の鶏卵を取り出し鶏卵にライトにより光りを照射、漿尿膜上の血管の位置を確認した。気室部分の卵殻にドリルを用いて1mmの穴を開け、開口部に人工気室を作った。開口部より、漿尿膜上にノードラットCTVTを1mm角に細切したものを移植した。

### (3) 腫瘍細胞培養法と継代について

ノードラットCTVTの一部を無菌的に摘出し、カナマイシン加Phosphate buffered saline(以下、PBSと略す)で3回洗浄後、3% Fatal calf serum(以下、FCSと略す)(Gibco)加RPMI1640(Gibco)中でSingle cell suspensionとした。1000rpm5分間遠心後CTVT細胞をGrowth mediumに再浮遊させ0.5%Trypanblue溶液を用い、生細胞数の算定を行い $1 \times 10^6$ /mlに調整した。細胞浮遊液中に多量の赤血球が混入した場合はTris-Hcl-Buffer(PH.7.65)を用いて赤血球を溶血させ培養に供した。Growth mediumは、RPMI1640

にL-Glutamine (Gibco)2mM. Pyruvic acid (Sigma)1mM, 2-Mercaptoethanol (Sigma)  $5 \times 10^{-5}$ M, Spectinomycin (Gibco)0.1%, 7%NaHCO<sub>3</sub> 0.5%, FCS 12 ~ 15% を加えたものを用い37°C, 5%CO<sub>2</sub>下にて静置培養を行った。以後培養液の交換は2 ~ 3 日に1 回実施した。

#### (4) 培養条件の検討方法

培養液の種類としては、RPMI1640、Eagle's MEM, 無血清MediumであるエスロンASF (味の素)を用い、各10% FCS を加え、試験を行った。Condition mediumは、ヌードラット胎盤培養上清、Interleukin 2を用い、10%FCS加RPMIに10% 加え、試験に供した。尚、ヌードラットの胎盤上清は、妊娠15~18日目のヌードラットより、子宮を無菌的に採り、子宮内の胎盤を切除してPBS でよく洗浄し、1mm<sup>3</sup>角に細切、これを10% FCS 加Eagle's MEM に浮遊させ1週間培養後、上清を0.45μm のフィルターを通し、保存したものを用いた。また、Interleukin 2 は、イヌ脾細胞を $4 \times 10^6$ /mlに調整し、Phytohemagglutinin P (BACTO)0.2%, Phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma) 10ng/ml, 1% FCS 加RPMI1640で48時間培養しその上清にニワトリ赤血球を1%となるように混合し、遠心後、同じく0.45μm のフィルターで濾過滅菌したものを用いた。Feeder layerとしては、イヌ皮膚培養細胞、イヌ扁平上皮癌由来樹立細胞、イヌ精巣培養細胞、イヌ骨髓細胞およびイヌ腹腔内液中の細胞を用いCTVT細胞と混合培養を行い、それぞれ生細胞数を数えた。

### 3) 移植腫瘍の同一性の確認方法

#### (1) 染色体検査法



C T V T細胞の核型 (Karyotypes) の観察方法ではイヌおよびヌードラットに移植、増殖した腫瘍塊をSingle cell suspensionとし、コルセミド (Gibco) の最終濃度が  $0.2 \mu\text{g/ml}$  となるようにGrowth medium 内に添加し、18時間ペトリ皿で培養した。ペトリ皿から試験管に移し、1000rpm 5 分間遠心し、 $37^{\circ}\text{C}$  に加温した  $0.075\text{M}$  塩化カリウム液を加え、細胞を浮遊させ、15分間  $37^{\circ}\text{C}$  の恒温槽に置き、1000rpm 5 分間遠心、上清を除いた。次いで、カルノア固定液 (純メタノール : 氷酢酸 = 3 : 1) を加え、10分間放置し、これを3回繰り返した。最終遠心後沈渣に少量の固定液を入れ、ぬれた布の上に並べたスライドグラスにパスツールピペットで、高い位置から固定した細胞を1滴落とした。そのまま風乾し、 $0.005$  キナクリン・マスタード液にて染色をした。染色し封入したスライドを蛍光顕微鏡で観察し、染色体の蛍光パターンを検索した。(1986. 腫瘍染色体アトラスを参考とした。)

(2) C T V T細胞に対するモノクローナル抗体の作成と酵素抗体法による腫瘍細胞の同一性の確認法について

#### モノクローナル抗体の作製方法

##### ① BALB/Cマウスへの免疫方法

ヌードラットから摘出したC T V T細胞を  $1.5 \times 10^7$  個/mlに調整し、生後8週令の雌、BALB/Cマウスの腹腔内に接種した。接種は2週間ごとに5回おこない免疫した。

##### ② 血中抗体価の測定方法

4回目の免疫終了後、BALB/Cマウスの血中抗体価が上昇しているか確認するためCytotoxic testをおこなった。 $7\text{mm}$  の小試験管を氷中内に入れ、RPMI1640を  $0.05\text{ml}$  ずつ加え、第1管にC T V T細胞を

免疫したBALB/Cマウスの抗血清0.05mlを入れ、最終管を除いて次々に希釈を行った。そこへ、生細胞95%以上のCTVT細胞を $5 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、全試験管に0.05mlずつ加えた。さらに補体としてRPMIで4倍に希釈したモルモット血清を第2管目から入れ、37°C、45分間反応後、再び水中に戻した。第1管には補体を加えることなくAntibody controlとし、最終管は抗血清を加えず、Complement controlとした。これらに、0.5% Trypanblue 溶液0.1ml 加え、青く染色された細胞を顕微鏡下で算定した。

### ③ ミエローマ細胞の培養方法

細胞融合を行うほぼ1週間前に、凍結保存したミエローマ細胞P3-X63-Ag8-U1(以下、P3-U1と略す)を37°Cの恒温槽においてすみやかに解凍し、8-Azaguanin 50 $\gamma$ 、FCSを10%加えたRPMI1640で継代維持、融合前RPMI 1640で3回洗浄し、細胞数の算定を行った。

### ④ Feeder cell の調整方法

BALB/Cマウスをエーテル麻酔下で腋窩放血し、解剖台に仰臥位に固定し、消毒用アルコールを用いて腹部を十分に消毒し、注射器でPBS 10mlを腹腔内に注入し、腹部を軽くマッサージした。次いで、開腹し、腹腔内のPBSを無菌的に回収後、同液を1000rpm.5分間遠心し、腹腔内液の細胞を生細胞数 $2 \sim 5 \times 10^4/\text{well}$ にて96穴マイクロプレート(Techniclone international)に播き込み、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で12時間培養し、Feeder cellとした。

### ⑤ 脾細胞の調整方法

抗体価の上昇が認められたBALB/Cマウスは最終免疫3日後にエーテル麻酔下で腋窩の動脈より採血し、血清分離を行った。採血後、脾臓を無菌的に摘出、脂肪等余分な組織をとり除き、さらに3% FCS

加 RPMI 1640 で Single cell suspension とし、RPMI 1640 で 3 回洗浄後、生細胞数を算定した。

#### ⑥ 細胞融合の方法

RPMI 1640 で洗浄した P3U1 細胞  $2.5 \times 10^6$  個/ml とマウス脾細胞  $1.7 \times 10^7$  個/ml を試験管内で混和し、1000rpm 5 分間遠心後、その上清を完全に吸引除去し、試験管の底を軽くたたいて細胞を充分にときほぐした。Polyethylenglycol 4000 (Sigma) (以下、PEG 4000 と略す) 1ml, RPMI 1640 1ml, Dimethyl Sulfoxide (以下、DMSO と略す) 1ml を混合し、37°C 加温後、その 1ml を静かに重層、試験管をゆっくり回転しながら 60 秒間、反応させた。次いで 37°C, RPMI 1640 を 0.5ml とり、30 秒間かけて dropwise した。さらに、この操作を 17 回繰り返し、最終量を 10ml とした。その後同液を 1000 rpm, 5 分間遠心し、上清を除き、37°C に加温した培養液を加え、先に述べた Feeder cell の播いてある 96 穴プレートに 1 well 当たり  $5 \times 10^5$  個となるように播き込んだ。尚、RPMI 1640 に L-Glutamine 2mM, Pyruvic acid 1mM, 2-Mercaptoethanol  $5 \times 10^{-5}$ M, Spectinomycin 0.1%, 7% NaHCO<sub>3</sub> 0.5%, FCS 10%, Aminopterin (Sigma)  $4 \times 10^{-7}$ M, Thymidine (Sigma)  $1.6 \times 10^{-5}$ M, Hypoxanthine (Sigma)  $1 \times 10^{-4}$ M を加えたもの (以下、HAT Medium という) を Growth medium として用いた。2 ~ 3 日に 1 回各 well の半分の Medium を交換した。融合細胞の増殖が認められた Well については HAT Medium から Aminopterin を除いた Medium (以下 HT Medium という) に徐々にかえ、次いで、HT Medium から通常の Growth medium に移行した。

#### ⑦ 抗体産生スクリーニングの方法



ELISA 用ソフトプレート 96 Well (住友) に  $50 \mu\text{g/ml}$  Poly-L-Lysine (Sigma) を  $100 \mu\text{l/well}$  加え、30 分間、室温で処理した後、蒸留水でよく水洗、乾燥させた。そのプレートに、抗原となる細胞を  $1 \times 10^5/\text{well}$  播き込み、 $1000\text{rpm}$ , 5 分間遠心を行った。上清をすて 0.1% グルタルアルデヒド、PBS において 10 分間固定し、PBS で 3 回洗浄後、 $100\text{mM}$  グリシン加 1% Bovine serum albumin from fraction V (以下、BSA と略す), PBS を加えて、室温にて 30 分間ブロッキングを行った。次に、再び PBS で 3 回洗浄し、0.1% BSA, PBS を  $100 \mu\text{l}$  加え、 $-80^\circ\text{C}$  で凍結保存した。抗原として用いた細胞はヌードラットから摘出した CTVT 細胞の外、ブタリンパ性白血病由来樹立細胞株 1 株および Ficoll-Paque により分離したイヌ末梢血中のリンパ球を用いた。使用に際し、プレートを融解後、PBS で 3 回洗浄し、融合細胞が増殖してきた Well の培養上清を一次抗体として  $100 \mu\text{l}$  ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$ , 1 時間反応させた。(なお、対照として陽性コントロールは、CTVT 細胞を免疫した BALB/C マウス血清を、陰性コントロールとして正常 BALB/C マウス血清を、それぞれ 500 倍に希釈したものをを用いた。) 続いて 0.02% Tween 20, 1%ゼラチン加 PBS で 3 回洗浄し、二次抗体はペルオキシダーゼ標式抗マウス IgG ヤギ抗体 (Cappel) を 1% BSA、PBS で 1500 倍に希釈し  $100 \mu\text{l}$  ずつ加え、 $25^\circ\text{C}$  30 分間反応させた。再び 0.02% Tween 20, 1%ゼラチン加 PBS で 3 回洗浄後、O-フェニレンジアミン (以下、OPD と略す)  $20\text{mg}$ ,  $0.1\text{M}$  クエン酸  $25\text{ml}$ ,  $0.2\text{M}$  リン酸ナトリウム  $20\text{ml}$  を混和し  $\text{H}_2\text{O}_2$   $10 \mu\text{l}$  を加え、各 Well に  $100 \mu\text{l}$  ずつ入れ、遮光し、 $25^\circ\text{C}$  20 分間感作した。次いで、 $3\text{N}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  で反応を停止させ、直ちに ELISA 用リーダーを用いて O.D. 値を測定するか、もしくは発

色の色調により肉眼で判定を実行した。

#### ⑧ クローニングの方法

スクリーニングによって抗体産生が確認されたWell内の細胞の限界希釈法を行った。クローニングする前日に、細胞融合を行ったときのFeeder cellと同様に、腹腔内液の細胞を $2 \sim 5 \times 10^4/\text{Well}$ , 96穴プレートに播き込んだ。抗体陽性細胞の増殖が認められたWellの生細胞数を算定し、1 Well当たり、1 個、2 個、5 個となるよう多段階に希釈し、Feeder cellを培養してあるプレートに播いた。その後、2 ~ 3 日に1 回、37°Cに加温したGrowth mediumを半分ずつ交換した。細胞の増殖の認められたWellについては再度スクリーニングを行い、抗体産生を確認した陽性株の増殖細胞はさらにクローニングを2回行った。

#### ⑨ 酵素抗体（間接）法について

3 回のクローニング後、2 日目の培養上清を用いて酵素抗体間接法を行った。C T V T細胞をCell suspensionし、正常BALB/Cマウス血清で洗浄後、Poly-L-Lysine 処理、スライドグラスに付着させた。また、イヌおよびヌードラットから切除した腫瘍塊はOCT Compound（マイルス三共）を用い、ドライアイス、エタノール中で急速凍結包埋を行い、凍結切片を作製した。両者を室温で30分間、乾燥させ、0.1%グルタルアルデヒド、PBSで10分間固定し、0.02% Tween 20, 1%ゼラチン加PBSで3 回洗浄した。10% 正常ヤギ血清、PBSで10分間、ブロッキングし、一次抗体としてモノクローナル抗体を産生している細胞株の培養上清を用い、4°C、overnight, 湿潤箱内にて反応させた。尚、陰性コントロールには、特異抗体を産生していないハイブリドーマの培養上清を用いた。3 回洗

浄後、再び10% 正常ヤギ血清、PBS で10分間ブロッキングし、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG ヤギ抗体を500 倍に希釈し、室温で3 時間反応させた。3 回洗浄後、3,3-ジアミノベンチジン4HCL( 和光純薬) (以下、DAB と略す) 20mgに0.05M トリスHcl Buffer75mlを溶解した反応液(以下、DAB 溶液と略す)に20分間次いで、DAB 溶液75mlにH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>原液を17 $\mu$ l 加えた反応液(以下、DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液と略す)に5 分間反応させた。終了後、直ちに蒸留水で反応を止め、メチルグリーン、もしくは、ヘマトキシリンで核染色し、型通り脱水、透徹、封入を行った。

⑩ 免疫電子顕微鏡法によるモノクローナル抗体に対する抗原決定基(epitope)の確認方法について

ヌードラットで増殖したCTVT細胞をPBS で Single cell suspensionとし、0.1%グルタルアルデヒド、PBS で4°C, 30 分間固定を行った。10% Sucrose, 0.01mol/l PBS(PH 7.4)で4°C, 10 分間、3 回、次いで20% Sucrose, 0.01mol/l PBSで、さらに30% Sucrose, 0.01mol/l PBSで、各4°C, 10 分間、3 回繰り返した。OCT Compoundを用い、ドライアイス、エタノール中で迅速凍結包埋した後クリオスタットにて凍結切片を作製し、30分間風乾した。再び4°C の10% Sucrose, 0.01 mol/l PBS で洗浄し、10% 正常ヤギ血清PBS で4°C, 10 分間ブロッキングを行い、前記、第⑨項の酵素抗体(間接)法と同様に一次抗体としてモノクローナル抗体を産生している細胞株の培養上清を用い、4°C, Over night で反応させた。10% Sucrose 0.01mol/l PBS, 10% 正常ヤギ血清、PBS と4°C で行い酵素、二次抗体として希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG ヤギ抗体(Amersham)を4°C, Over night 反応させ、10% Sucrose



0.01mol/l PBS で洗浄した。0.1%グルタールアルデヒド PBSで、4°C, 10分間再固定し、洗浄後、DAB 溶液、室温で、20分間、次に、DAB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液、4 分間反応後、10% Sucrose 0.01mol/l PBSで10分間洗浄した。2%オスミウム酸 Phosphate buffer(以下、PBと略す)で2時間後染色し、常法に従い、脱水、包埋し、超薄切片を作製、尚、HRP の反応産物がオスミウム酸と反応してオスミウムブラックとなり、電顕下で観察可能な電子密度を持つ物質となるため無染色にて電顕観察を行った。

#### ⑩ SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた Western Blotting の方法

ヌードラットに移植、増殖した C T V T 細胞を乳バチに入れ、液体窒素を加え、攪拌し塩酸グアニジン 15.28g, 0.5M Tris-Hcl Buffer (PH 7.5) 4ml, 2-Mercaptoethanol 2ml を蒸留水を加えて、20ml とした抽出液を入れ、乳棒で十分に混合した。次いで、材料を透析膜に移し、尿素 126g, 2-Mercaptoethanol 0.5ml ナトリウムピロリン酸 1.34g, 20% ノニデット P40、30ml, 蒸留水で 300ml とした透析液で透析を行った。4°C、1時間ごとに透析液を交換し、合計 8 時間行った。透析完了後、12% SDS-ポリアクリルアミドゲルを調整し材料を 30  $\mu$ l 入れ、常法に従い電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に転写した。1% BSA, PBS で 4°C, Over night ニトロセルロース膜をブロッキングし、第⑨、⑩項と同様に Sample, 陰性コントロール共に、1 時間ニトロセルロース膜を浸した。0.05% Tween20 PBS で充分洗浄し、同じく標識二次抗体の溶液中に入れ、1 時間反応後 DAB 反応を行い、流水水洗後、乾燥させた。尚、マーカーを泳動したニトロセルロース膜はクマシーブリリアントブルー R-250 を用

い染色した。

## ⑫ ハイブリドーマの増殖と凍結の方法

クローニングが終了し、第⑧項から⑪項までの数々の試験によってC T V T細胞に対して特異的なモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマは大量培養を行い、培養上清および細胞株の保存をした。すなわち、Growth medium にて増殖させ、生細胞数  $4 \times 10^6$  個以上を1 アンプルとし、氷中で0.75ml FCS 細胞浮遊液に、20% Sucrose 加 RPMI 1640 を0.15ml, さらにDMSO 0.1mlを加え、全量を1ml とし、徐々に温度を下げ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結した。

## 2. 移植継代腫瘍の観察方法

### 1) スタブ標本による細胞学的観察法

(1) イヌおよびヌードラットへ移植したC T V T細胞の組織化学染色法：摘出したイヌおよびヌードラットの腫瘍塊は、Single cell suspension とし、スライドグラスへ塗抹後、ペルオキシダーゼ染色、アルカリホスファターゼ染色、酸性ホスファターゼ染色を施しグリセリン・ゼラチンで封入後、光顕観察した。

(2) イヌおよびヌードラットへ移植したC T V T細胞の組織染色：(1)と同様にスライドグラスへ塗布後、ライト・ギムザ染色およびズダン黒B染色は乾燥、PAS染色はバルサムで封入、オイルレッドO染色はグリセリン・ゼラチンで封入後光顕観察した。

### 2) 病理組織学的検査方法

#### (1) C T V Tの肉眼的および光顕的観察法

摘出した腫瘍は肉眼的観察の後、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定を行い、常法に従い2～4  $\mu$  のパラフィン切片を作製し、ヘマト

キシリン・エオジン (H・E) 染色を行い、光顕観察を行った。

## (2) C T V T の電顕的観察法

腫瘍を $1\text{mm}^3$ 角に細切後、2.5%グルタルアルデヒド0.1mo 1/1 リンサン緩衝液 pH7.4 に室温で2～3時間固定した後1%オスミウム酸で後固定し、以下型通りにエポキシ樹脂包埋、重合し、超薄切片を作製して電顕観察を行った。

## 3) C T V T の立体構築、特に血管構築の観察法

血管系の検索には、ヌードラットの背部皮下に移植後4～5ヵ月で腫瘍が鶏卵大以上の大きさに達したものを使用した。

(1) Whole mount (透明) 標本の作成：エーテル麻酔下でヌードラットを仰臥の位置で胸骨に沿って2cm程切開し胸腔を開き、右心室より放血、左心室よりヘパリン加リンゲル液(37°Cに加温)で全身を灌流した。灌流は右心室より流れる血液が透明になるまで行った。次に、10%ゼラチン加墨汁を注入し、腫瘍塊が黒染して右心室から墨汁が流出するまで注入を行なった。腫瘍塊をヌードラットの体より摘出して10%ホルマリンで固定した。固定された組織片をクライオスタットで100～150  $\mu$ の厚さで薄切した。この切片を上昇アルコールで脱水後、ベンゾールで透徹(血管周囲の組織が透明になる)してバルサムでスライドガラスに封入し、鏡見した。

(2) 連続組織標本の作製：(1)の標本に使用した組織の一部を10%ホルマリンで固定した。アルコールで脱水した後、ベンゾールで血管周囲の組織を透徹してからパラフィンで包埋し、包埋ブロックを4  $\mu$ の連続切片を作成しH・E染色を施し立体的に観察した。

(3) 樹脂鑄型標本の作成と走査型電子顕微鏡標本の作製：別



のラットを左心室よりリンゲル液で全身を灌流した。次に、メタアクリル酸メチルエステルモノマーを用意しこのモノマーに過酸ベンゾールを1%、ジメチルアニリンを1%、加塑材としてジブチルフタレートを15%、各々加えた注入材を注入した。樹脂の硬化が注入後20分で完了した。注入した樹脂の総量は約4 ml~10mlであった。さらに別の担癌ヌードラットには上記の樹脂に顔料としてクロムフタルレッドを混入し、肉眼観察が容易になるように着色樹脂を注入した。注入後、樹脂が完全に硬化してからこれらのラットを20%苛性ソーダに漬け組織を溶解し、12時間水洗して鋳型標本を得た。得られた標本を乾燥させ、肉眼的に、次に実体顕微鏡で観察した。さらに詳細な観察を走査型電子顕微鏡を用いて3次元的に行なった。走査型電子顕微鏡用に、まず観察部位をハサミで細切して、金を蒸着して導通性を与えてから走査型電子顕微鏡で観察した。

#### 4) 鶏胚移植腫瘍の観察法

(1) 腫瘍細胞の形態：漿尿膜を卵殻より剥離し、10%のホルマリンで固定し、腫瘍部分を摘出した。常法にしたがってパラフィン切片を作製し、H・E染色を施し、バルサムで封入して鏡見した。

(2) 腫瘍細胞の発育：11日目の鶏胚の漿尿膜にイヌおよびヌードラットから無菌的に摘出した腫瘍を1mm角に細切後移植し、その後7日間孵卵しながら腫瘍の生着状態を肉眼的に観察。その後、漿尿膜を卵殻から剥離し、シャーレ内の純アルコールに入れ漿尿膜上の腫瘍の増殖状態を倒立顕微鏡において観察した。

(3) 腫瘍内血管構築：(2)の方法と同様にシャーレ内の漿

尿膜上の腫瘍に求心性に新生した毛細血管について倒立顕微鏡下で詳細に観察した。また、血管系には墨汁を注入し、コントロールと抗癌剤を投与したものについて腫瘍周囲の微細血管を比較観察した。

(4) 抗癌剤による腫瘍の変化：14日胚の鶏卵の漿尿膜に生着した腫瘍に対して卵黄嚢内に抗癌剤を0.1mg/kg投与して、抗癌剤投与4日後、18日胚時に腫瘍の退縮状態および変色等について、肉眼的および倒立顕微鏡下で観察。コントロールと比較後、常法によりパラフィン切片を作製し、H・E染色を施し鏡見した。

抗癌剤を投与したことによる腫瘍に新生した毛細血管の変化については内径10mmの薄い透明プラスチックの輪をスライドガラスの上に載せて腫瘍片に到達した血管についてのみを観察した。

#### 5) 細胞骨格蛋白の免疫組織化学的観察方法

(1) 免疫組織化学的観察：イヌおよびヌードラットから摘出したCTVTは、10%中性緩衝ホルマリン液および4% Periodate Lysi-ne Paraformaldehyde (以下、PLP と略す) に固定し、ホルマリン固定材料は型通り処理し、パラフィン切片を作製した。また一晚、4%PLP 液に固定した材料は10% しょ糖加、0.01mol / l 磷酸緩衝液 (pH 7.4)、20% しょ糖加同緩衝液、30% しょ糖同緩衝液の順に各々に2～3時間浸せきし、OCT Compound (三共マイルス) にドライスエタノール中で迅速凍結包埋した後クリオスタットで、6μの凍結切片を作製し、免疫組織化学的検索に用いた。免疫組織化学的検索は、酵素抗体法の間接法を応用し、細胞骨格蛋白成分であるケラチン、デスミン、ビメンチン、ミオシン、アクチン、チューブリ

ンなどの細胞内分布を検索した。パラフィン切片はケラチン、デスミン、ビメンチン、ミオシンの検索に、凍結切片はアクチン、チューブリンの検索にそれぞれ用いた。

酵素抗体（間接）法は、一次抗体に、抗ケラチン家兎血清（DAKO JAPAN）、抗デスミン家兎血清（Bio - Science）、抗ビメンチンマウスモノクローナル抗体（DAKO JAPAN）、抗 $\alpha$ チューブリンマウスモノクローナル抗体（Amersham）、抗ミオシン家兎血清（Transformation Research）、抗アクチンマウスモノクローナル抗体（Amersham）などを用いた。また、標識二次抗体には、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体（Amersham）、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体（Amersham）を用いた。抗原抗体反応後、H R Pの酵素組織化学染色には、3,3'-D A B（Graham karnovsky法）反応を行った後、メチル緑による核染色を行った。

（2）C T V T細胞骨格電顕観察法：C T V Tを $1\text{mm}^3$ 角に細切後、細胞小器官を除いて細胞骨格の観察をしやすいするため、4%タンニン酸加2.5%グルタルアルデヒド0.1Mリンサン緩衝液に、室温で2～3時間固定した後、1%オスミウム酸で後固定し、以下、型通りにエポキシ樹脂包埋、重合し、超薄切片を作製して、電顕観察を行った。（東海大学医学部法）

### III 研 究 結 果

#### 1. C T V T の継代移植成績

##### 1) 野外例 C T V T のイヌでの継代移植結果

イヌの背部皮下における3代にわたる移植率は、1代目2/4(50%)  
2代目4/4 (100%), 3代目0/1(0%)であった(表1)。

尚、1代目は4頭に移植したが、移植2日目にイヌNo.3、また  
8日目にNo.4が肺炎となり死亡した。2代目は4頭に移植し、移植  
後100日で2頭を剖検したところNo.6には転移がなく、No.5では肝  
臓への転移が見られた。さらに、イヌNo.5では移植C T V Tの腫瘍  
の重さは300gに達した(写真2)。移植後200日で剖検したNo.7で  
は眼窩、下顎、背部皮下に転移が観察された。移植後250日で剖検  
したNo.8のC T V Tでは200日で剖検したものに比較して背部皮下  
の腫瘍塊に退縮が見られた。転移をおこしたNo.7では、移植背部皮  
下に4 × 5cm (鶏卵大)の腫瘍の増殖が見られた他、頭部において  
は左眼瞼に2 × 3cm (拇指頭大)の腫瘍結節ができ、その後潰瘍化  
を生じ、眼球は腫瘍塊の圧迫のためやや萎縮していた。その他、頭  
頂に4 × 6cm (小児拳大)、下顎に1.8 × 2.4cm (拇指頭大)、眼  
窩に2.1 × 1.5cm (小指頭大)、耳下部に2.5 × 3cm (ピンポン玉  
大)等の腫瘍塊を認めた。その他の臓器には転移巣は認められなか  
った。

小括

C T V Tは本来の宿主である、イヌでの継代移植では転移例もあっ  
たものの、継代数は3代どまりであった。



## 2) 異種移植による継代実験結果

### (1) ノードラットへの移植成績

Rowette nude rat (rnu) 90 匹、F334/Njcl-rnu 6 匹への野外例 C T V T 細胞の背部皮下移植成績：継代 1 代目より 8/9 (89%), 7/8 (88%), 13/14 (93%), 7/7 (100%), 21/21 (100%), 11/11 (100%), 3/3 (100%), 3/3 (100%), 4/4 (100%), 2/2 (100%), 2/2 (100%), 5/5 (100%), 3/3 (100%) 以上、移植率は 1 代目から 3 代目は平均 90%、4 代目から 12 代目は 100%であった。尚、1 代目では背部皮下接種例の他、腹腔内接種例では 4/4 (100%) であった (表 2)。

ノードラット No.5 では C T V T 移植して生着後、2ヵ月では親指大に増殖した (写真 3)。No.11 では移植後、4ヵ月を経過する頃より腫瘍は鶏卵大となり、表面には痂皮が形成され割面に出血、壊死が認められるようになり灰白色ないし暗赤色を呈した (写真 4)。No.38 では5ヵ月後にはほぼ鶏卵大となり、割面は白色を呈し数個の腫瘍が寄り合い、急激に増殖を示すものの、肉眼的には出血、壊死は認められなかった (写真 5)。

尚、イヌおよびノードラットに移植した C T V T 細胞の腫瘍増殖曲線を示すと (図 1 の如くであった)。

### (2) 鶏胚への移植成績

ノードラット移植 C T V T を 11 日胚の漿尿膜に移植したところ、3 日目の 14 日胚の時点で腫瘍に向かって放射状に新生血管が配列され、移植時に 1 mm<sup>3</sup> 角であった腫瘍が約 1.5 ~ 3 倍に増殖していたが、鶏胎児は元気であった (写真 6)。

C T V T の鶏胚移植成績では 41/50 例が陽性 (移植率 82%) 対照としたイヌ扁平上皮癌は 40/50 例陽性 (移植率 80%)、ラット線維肉

腫は44/50 例陽性（移植率88%）、マウス乳腺癌は46/51 例陽性（移植率90%）であった。

11日鶏胚移植 C T V T では18日胚のコントロール例のものは移植時の約3 倍に増殖するが、21胚で誕生したヒヨコを剖検したものでは C T V T の所在を確認することは出来なかった。尚、鶏胚移植 C T V T による継代移植は腫瘍が継代に適する大きさに増殖せず、出来なかった。

### 3 ) 細胞培養による継代実験成績

ヌードラット No.38 移植 C T V T 細胞の培養経過：培養開始直後では、類円形の浮遊細胞集団がシャーレ内に存在して観察された（写真7）。その後、約一週間経過すると浮遊して増殖した円形ないし類円形の細胞群とシャーレの底にシート状に付着して増殖した線維芽細胞様タイプの両細胞群が共存して認められた（写真8）。さらに培養を継続すると、浮遊細胞は集塊を形成し、線維芽細胞様のタイプでシート状に増殖した細胞の上に、類円形の細胞が付着した様な状態で培養が維持継続された。その後徐々に類円形細胞は減少し培養開始約30日頃にはほとんど死滅した。最後には線維芽細胞様タイプの細胞のみとなった。浮遊細胞の継代培養は、ほぼ8代目まで可能であった。また、浮遊細胞のみを分離して同様に培養を試みたところ、線維芽様タイプの細胞と共存していたグループに比較して約70%の生存率の低下が認められた。

#### （1）培養条件の検討結果

各培養液の種類について検討した結果 Eagle'S MEM、エスクロンおよびASF などの各培養液はRPMI1640で培養を行ったものに比較

して細胞の増殖態度が極めて悪かった。すなわち培養開始5日目で生細胞数は播き込み細胞数の約50%に減少し、7日目ではほとんど零に近づいた。一方、RPMI 1640は培養開始10日目まではやや増殖する傾向を示唆するも、それ以降徐々に減少し30日目ではほとんど零に近い成績となった。

#### 小括

C T V Tはイヌ由来であるが、無胸腺のヌードラットにおける継代移植で良い成績が得られ、移植継代率もほぼ100%であり、実験材料としてのC T V Tを確保することが出来た。

11日鶏胚の漿尿膜にC T V Tおよび対照として移植した腫瘍は平均約85%と高い移植率を示した。また、この実験によって鶏胚の漿尿膜には異なった腫瘍の移植が可能であることが示唆された。

C T V T細胞の培養は、細胞培養時には浮遊細胞と線維芽細胞様の細胞とが共存している方が良い結果であった。

#### 4) 移植腫瘍の同一性の確認成績

##### (1) 染色体の検査成績

C T V Tの染色体数と核型 (Karyotypes) : イヌNo.6移植C T V Tの核型を分析した結果17本のBiarm chromosomesと、42本のAcrosentric chromosomesの59本の染色体が観察され、Biarm chromosomesの一番大きな染色体には異常凝縮が認められた(図2)。

ヌードラットNo.22移植C T V T細胞の染色体についても同様に検索を行い、分裂中期の算定可能な細胞50個を観察した結果、染色体数56~61本が認められ、染色体数59本を示すものが一番多かった

( 図 3 ) 。尚、染色体標本 7 例の Biarm Chromosomes と Acrocentric chromosomes の検索を行った結果、17～20本の Biarm chromosomes と 39～42本の Acrocentric chromosomes が認められた ( 図 4 , 5 ) 。

## ( 2 ) C T V T 細胞に対するモノクローナル抗体の作成と酵素

### 抗体法による腫瘍細胞の同一性の確認成績

#### ヌードラット継代 C T V T に対するモノクローナル抗体の作成

① 細胞融合に関する成績：融合開始 5 日目より Well 内にコロニーを確認できるようになり、2 週間後から 3 週間後に 348 well 中、114 well において融合細胞の増殖がみられ、ほぼ 30% の Well でスクリーニングを行うことができた。ELISA による培養上清のチェックを行い、抗体産生の確認された Well は 2 回のクローニングで 60 Well を数えたが、最終的には 1 クローンとなった。

② 作製したモノクローナル抗体の性状についての成績：抗体産生クローンの培養上清を一次抗体として、正常イヌリンパ球との交叉試験 また、ヌードラットに移植した C T V T 細胞の Cell suspension および凍結切片を用いて酵素抗体 ( 間接 ) 法を行ったところ正常なイヌのリンパ球は陰性であった ( 写真 9 , 10 ) 。ヌードラットに移植した C T V T 細胞については Cell suspension および凍結切片の両者ともに陽性を呈した ( 写真 11, 12～14 ) 。さらに、北海道大学獣医学部家畜外科学教室より分与されたイヌ皮下移植継代株の C T V T 細胞についても同様の所見が得られた ( 写真 15 ～ 17 ) 。尚、対照として各一次抗体に 10% FCS 加 RPMI 1640 を用いたグループは、全て陰性の結果が得られた ( 写真 18, 19 ) 。

得られたクローンの培養上清を用いて SDS-ポリアクリルアミドゲ



ルを用いたWestern Blottingを行い、モノクローナル抗体の分子量測定を試みた結果、分子量14,100から20,100の間に2本のバンドが認められ、それらの分子量は各々、ほぼ15,000と20,000であった尚、特異抗体を産生していないハイブリドーマの培養上清を一次抗体として用いたものについてはバンドが検出されなかった。(写真20)。

③ 抗CTVTモノクローナル抗体で検出された構造物の免疫電顕による確認：ヌードラット継代CTVTの凍結切片を一次抗体とし、二次抗体にはペルオキシダーゼ(HRP)標識抗マウスIgGを反応させ、0.1%グルタルアルデヒド・PBSで再固定し、2%オスミウム酸で染色後、超薄切片を作製して電顕観察を行った結果、CTVT細胞の細胞膜および粗面小胞体に反応産物(抗原決定基)を観察した(写真21, 22)。

#### 小括

CTVTは本来の宿主である異なる染色体数を持つイヌからヌードラットに移植されても染色体数は59本で、一定しており同じKaryotypesであることが確認出来た。

抗CTVTモノクローナル抗体は、正常イヌ成熟リンパ球とは反応せず、ヌードラット移植CTVTおよび北大株CTVTを染色したところ細胞膜が陽性であった。また、免疫電顕で、抗CTVTのモノクローナル抗体で認識される部位が細胞膜および粗面小胞体であることが確認出来た。

## 2. 移植継代腫瘍の観察結果

## 1) ヌードラット継代 C T V T のスタンブ標本による細胞学的観察所見

ライト・ギムザ染色では腫瘍細胞は密集し、(10~12 $\mu$ )で多角形あるいは楕円形で組織球様の細胞であり、核(6~8 $\mu$ )には微細なクロマチン顆粒と1~2個の明瞭な核小体が観察されるものもあった(写真23)。

## 2) 病理組織学的観察所見

### (1) 野外例 C T V T および移植例 C T V T の病理学的所見:

共にほぼ同様な形態で、核は多少不規則な形を示し、結節が増大するに伴い、細胞は多面形となり、核は大きさを増し、円形、楕円形であった。腫瘍細胞は通常、H・E染色では、大きさ、形態が大体一様で細胞の大きさは10 $\mu$ 内外、核は6~8 $\mu$ で、境界不明瞭な原形質はわずかに青色を帯び、封入体は認めなかった。核は微細なクロマチン顆粒と明瞭な仁を持っていた。初期像および成長の盛んな部分では、細胞は密集して細胞間の線維成分がはなはだ乏しく多数の核分裂像が認められた。また、他の部位では腫瘍細胞が線維にそって一列に束状に配列する疎な構造も見られた。古くなると間質結合組織線維の増加で基質が明瞭となり、炎症像のある部位によっては、顆粒球、組織球、リンパ球、肥胖細胞、などが散見された。古い腫瘍でとくに表面が潰瘍化した腫瘍においては、炎症細胞の他に炎症肉芽の新生や出血を認めた。以後退縮傾向の進行にともない腫瘍内の大小の壊死部が新生した肉芽組織により器質化され瘢痕収縮して線維化した組織となった。以上のように本腫瘍においては、発生の初期、中期および退縮期の組織像がそれぞれ異なり、同一腫瘍

内でも部位により炎症性変化も加わって、組織所見が異なっていた（写真24,25）。

移植例においても、数ヵ月経過すると腫瘍細胞間に線維成分が増加して基質が明瞭となり、小型円型細胞の浸潤が目立ち、潰瘍部には出血や肉芽組織の形成が認められた。好銀線維は血管周囲、間質中に多く認められたが、個々の腫瘍細胞の全てを囲んではいなかった。ヌードラットに移植した腫瘍でも、組織球様の腫瘍細胞として観察され、イヌ同様に腫瘍細胞間に線維成分が増生することによって基質が明瞭となって観察された（写真26）。

（2）電顕的所見：腫瘍細胞は楕円形ないし（ $15\sim 18\mu$ ）多角形で明るく、細胞は密接し、相互の結合は小突起のinter digitationによったり、あるいは単に平面的に接触し、滑らかな接触面となることもあった。ほぼ円形ないし楕円形で径8~10の核を有し核内のほぼ中央に円形で径約 $2\mu m$ の明瞭な仁が認められた。核膜は時に外層が剥離し空胞状となることもあるが、一般に二重構造は良く保たれていた。細胞質内にはリボゾームが豊富で、び慢性に胞体内に分布していた。またゴルジ装置、ミトコンドリアは胞体内に散在し、大小不同で軽度の膨化を示し、基質は淡明であった。野外例では、異形を認めたが、移植例との区別はつけ難かった。イヌ移植CTVT細胞の電顕像では、胞体内にはオルガネラが散在し、明瞭な核小体も認められた（写真27）。ヌードラット移植CTVT細胞の電子顕微鏡像では、明瞭な核小体と、細胞の周囲には、発達したMicro villiが観察された（写真28）。また胞体内にはorganellesが散在性にみられ、核小体も明瞭であった（写真29）。

その他、Microvilli interdigitationが認められた。胞体内全体に



交錯する中間径フィラメント像が、また細胞膜に接して密集してマイクロフィラメント像が認められた。また、マイクロフィラメントは胞体内全域に均一に分布し、中間径フィラメント間を走行しているのが認められた。ゴルジ装置の中心部にマイクロチュブルスが密集し、同部位に高電子密度の微細顆粒状または細線維状構造物の集合像が認められた（写真30）。Virus粒子は認められなかった。

#### 小括

光顕的所見では野外例CTVT、イヌ移植CTVTおよびヌードラット移植CTVT共に病理組織学的にはほぼ同様な形態を示した。腫瘍細胞は多角形あるいは楕円形（10～12 $\mu$ ）で組織球様細胞として密集していた。

電顕的所見ではCTVT細胞は楕円形ないし多角形（15～18 $\mu$ ）で明るく、細胞は密接し、相互の結合は小突起のinterdigitationによったり、あるいは単に平面的に接触し、滑らかな接触面となることもあった。その他、胞体内全体に交錯する細胞骨格である中間径フィラメント、細胞膜に接して密集してマイクロフィラメント、ゴルジ装置の中心部にマイクロチュブルスが認められた。

### 3) CTVTの立体構築、特に血管構築とその特徴

（1）組織所見：腫瘍より遠位にある動脈は正常構造を保っており、内膜、中膜、外膜いずれも明瞭であった。中膜は2～3層の平滑筋細胞で構成されており、異常所見は認められなかった（写真31）。内弾性板も明瞭に認められた。腫瘍に進入する手前の腫瘍血管では、中膜を構成する平滑筋細胞の退行性変化が認められた（写真32）。血管は腫瘍に近づくにつれ、その退行性変化が著しくなる



傾向が認められた。腫瘍内部の血管は、退行変性が著しく、平滑筋細胞の空胞化、線維化が認められ本来の血管壁構造が消失していた（写真33）。また、腫瘍内の毛細血管は一層の内皮のみで構成されていた。

（2）Whole mount 標本の所見：腫瘍実質中の毛細血管はきわめて細く、5～8  $\mu$  できめの細かい網目を形成していた（写真34, 35）。血管新生を示す毛細血管は短い盲端あるいはスパイク状の突起を持つ毛細血管として見られた（写真36）。

（3）樹脂鋳型標本の所見：腫瘍を潤す血管は腋動脈の一枝、肩峰肩甲動脈であった。この動脈は腋動脈から分枝すると鎖骨下を走り外頸静脈のわきを通り頸背部に向い腫瘍に進入していた。この動脈は太く、その走行は直線的であった。動脈の表面には血管の長軸に沿って微細なヒダが認められた（写真37）。このヒダは血管内腔に突出した内皮細胞の核によるものであった。この微細なヒダは血管が腫瘍に近づくにつれ次第にその輪郭が不明瞭になり腫瘍内では血管の表面は平滑で、こうしたヒダは完全に消失していた（写真38）。intra-arterial cushionは腫瘍より遠くはなれた位置にある動脈には明瞭に認められた。またintra-arterial cushionは樹脂鋳型走査型電顕所見では分枝部をリング状に取り囲む圧痕として観察された（写真37）。intra-arterial cushion は腫瘍に近くなるとともに輪郭が不明瞭になり、腫瘍深層の動脈にはこの構造は認められず、腫瘍内部の動脈では intra-arterial cushion は存在しないことが示唆された（写真38）。腫瘍に進入した動脈は数多くの小動脈（径40～60  $\mu$ ）に分枝するが、分枝パターンには規則性がなく腫瘍内部でランダムな分岐を繰り返していた（写真39）。さ

らに分枝を繰り返して毛細血管となっていた。毛細血管は互いに吻合して不整多角形の網目となり密な毛細血管網を形成していた（写真40, 41）。C T V Tでは血管新生を思わせる盲端に終わる毛細血管（budding capillaries）は多くは認められなかった。一方、壊死組織に接する部位では血管系も崩壊していた（写真42, 43）。静脈はこれらの毛細血管を集め次第に太くなり腫瘍の表層に出て動脈に伴走していた。

#### 小括

C T V Tの血管組織所見では腫瘍より遠位にある動脈は正常構造を保っており、内膜、中膜、外膜のいずれも明瞭であったが、腫瘍内部の血管は退行変性が著しく、平滑筋細胞の空胞化および線維化が認められた。

C T V Tの血管透明標本所見では腫瘍実質中の毛細血管はきわめて細く、5 ～ 8 $\mu$ できめの細かい網目を形成し、血管新生を示す短い盲端あるいはスパイク状の突起が認められた。

C T V Tの血管樹脂鋳型標本所見ではイヌ移植C T V T、ヌードラット移植C T V Tとも腫瘍内の動脈においては、正常組織内の動脈に存在している血流調節機能であるintra-arterial cushionが欠如していた。

#### 4) 鶏胚移植C T V Tの観察結果

(1) C T V T細胞の形態組織所見：イヌ移植C T V T、ヌードラット移植C T V Tと同様の所見で、腫瘍細胞は円形あるいは楕円形（10～12 $\mu$ ）で、組織球様腫瘍細胞として密集または散在していた。核は6 ～ 8 $\mu$ の円形で核質は明るく、微細均一でほぼ中央に

1 ～ 2個の明瞭な核小体を認めた。

(2) C T V T の漿尿膜上の発育成績：漿尿膜上に移植した  $1\text{mm}^3$  角の腫瘍は移植後、3 日目には漿尿膜上の血管を求心性に呼び込み、約 1.5 ～ 3 倍の大きさに増殖し、みずみずしかった。

(3) 鶏胚移植 C T V T の血管構築：C T V T を移植した漿尿膜上では腫瘍移植以前より存在していた毛細血管とは異なった毛細血管が新生され、これらの新生毛細血管は腫瘍に向かって放射状に新生された。腫瘍に到達した血管系に墨汁を注入したものではスムーズに墨汁が腫瘍内に注入出来た。

(4) 鶏胚移植 C T V T の抗癌剤投与による変化：コントロールでは、新しく造成された新生毛細血管が漿尿膜上に移植された腫瘍に向かって星状もしくはスポーク状に入り込んでいる求心性の血管分布像を示し、その 1本 1本の新生毛細血管からは、木の芽状に新しい毛細血管の枝分かれが認められた (写真44)。抗癌剤投与例では、腫瘍組織への新生毛細血管の入り込みがコントロールと比較して著しく減少していた (写真45)。尚、コントロール例、抗癌剤投与例共に18日胚の鶏胎児は大部分生存し、活発に運動しているのが確認された。また、生着した個々の腫瘍については、抗癌剤を投与後 4日目、18日胚の鶏卵の漿尿膜上の C T V T は褐色をおび形状を縮小し、よび込んだ毛細血管も縮小、血管数の減少が認められた (写真45)。イヌ扁平上皮癌はやや黄色に変化し、呼び込みの毛細血管数の減少と、漿尿膜の不透明感が認められた (写真46)。マウス乳腺癌のコントロールでは、他の腫瘍に比較してかなり太い毛細血管を呼び込む様子が認められたが、この時点では腫瘍の増殖はあまり良くなかった (写真47)。抗癌剤を投与したマウス乳腺癌の移



植腫瘍ではやや光沢のある白色を呈していたが呼び込んだ毛細血管が後退し、かなり縮小、血管数の減少が認められた（写真48）。

①抗癌剤の硫酸ビンクリスチンおよびアスパラギナーゼによる影響：14日胚の鶏卵の漿尿膜に生着した腫瘍に抗癌剤を投与して4日目、18日胚で変化のあったもの、硫酸ビンクリスチン投与成績は、C T V T 16/18 例、イヌ扁平上皮癌 15/19 例、ラット線維肉腫 12/18 例、マウス乳腺癌 17/19 例に変化が見られた。また、アスパラギナーゼ投与成績は、C T V T 11/18 例、イヌ扁平上皮癌 12/18 例、ラット線維肉腫 12/19 例、マウス乳腺癌 6/18 例に変化が見られた（表3）。

## ②鶏卵移植腫瘍の組織所見

H・E染色並びに墨汁注入により検索：C T V Tを移植した漿尿膜上の毛細血管の血管系に墨汁を注入したものではやはりコントロールに比較して抗癌剤を投与した方が細く認められた（写真49）。また、抗癌剤を投与した鶏卵の漿尿膜上のC T V Tでは多角形あるいは楕円形の組織球様の腫瘍細胞が認められ、細胞質には空胞化変性がおこり、多くの核濃縮が認められた（写真50）。

抗癌剤を投与した漿尿膜上のイヌ扁平上皮癌では細胞の縮小と角化亢進像および著明な癌真珠の形成が認められた（写真51）。

抗癌剤を投与した漿尿膜上のラット線維肉腫では漿尿膜が粗造となり、紡錘形の細胞は変性をおこし、より長形で細胞数の減少と核濃縮が認められた（写真52）。

マウス乳腺癌を移植した漿尿膜上の毛細血管でコントロールのものでは、毛細血管は太く認められ、毛細血管の新生が確認された。抗癌剤を投与したものでは新生毛細血管の縮小と、細胞の核の濃染



が認められた（写真53）。コントロールのマウス乳腺癌の漿尿膜上の移植腫瘍には新生毛細血管が呼び込まれ木の芽状（budding）の毛細血管が多数認められた（写真54）。また、抗癌剤を投与した漿尿膜上のマウス乳腺癌では腫瘍に呼び込まれる新生毛細血管は少なく空胞変性した漿尿膜と変性壊死した腫瘍細胞および癌真珠が認められた（写真55）。

#### 小括

C T V T細胞の形態：鶏胚の漿尿膜上に移植したC T V T細胞はイヌ移植C T V T、ヌードラット移植C T V Tとほぼ同様の組織球様の類円形の腫瘍細胞で（ $10 \sim 12 \mu$ ）であった。核は（ $6 \sim 8 \mu$ ）円形で核質は明るく、微細均一、ほぼ中央に1～2個の明瞭な核小体を認めた。

C T V Tの発育：腫瘍細胞は求心性で放射状に新生した毛細血管網により増殖を続け、移植時の約1.5～3倍の大きさとなった。

C T V Tの血管構築：新生毛細血管が移植腫瘍に放射状に新生され、血管系に墨汁を注入したところスムーズに注入出来た。

抗癌剤による腫瘍の変化：抗癌剤投与例では腫瘍組織への新生毛細血管の入り込みがコントロールと比較して著しく減少し、C T V Tでは抗癌剤投与によって、褐色をおび形状を縮小し、放射状の新生毛細血管も縮小して血管数の減少も認められた。

鶏卵移植腫瘍の組織所見：コントロールは漿尿膜上の腫瘍への毛細血管は太く認められ、毛細血管の新生が、抗癌剤を投与したものでは新生毛細血管の縮小と、細胞の核の濃染が認められた。抗癌剤投与の鶏胚移植C T V Tでは多角形あるいは橢円形の組織球様の細胞が認められるたが、細胞質には空胞化変性があり、核濃縮が認め

られた。

#### 5) C T V T の組織化学的および免疫組織化学的観察結果

(1) イヌ No.5 移植 C T V T およびヌードラット No.38 移植 C T V T の組織化学的染色所見

ペルオキシダーゼ染色、アルカリホスファターゼ染色、酸性ホスファターゼ染色の酵素染色およびズダン黒 B 染色、PAS 染色はイヌ C T V T、ヌードラット C T V T はともに陰性であった。オイルレッド O による脂肪染色は両者ともに陽性を呈した (表 4, 写真 56)。

(2) イヌ No.5 移植 C T V T およびヌードラット No.38 移植 C T V T の免疫組織化学的所見

イヌ移植 C T V T およびヌードラット移植 C T V T はサイトケラチン染色、いずれも陰性であった (写真 57)。アクチン染色標本では、イヌおよびヌードラットのいずれも細胞質内が褐色に染色され陽性像が認められた (写真 58)。心筋、平滑筋に存在するミオシン染色標本では、イヌおよびヌードラットのいずれも細胞質内が褐色に染色され陽性像が認められた (写真 59)。抗ビメンチン抗体ではイヌおよびヌードラットのどちらも核周囲が褐色に染色され陽性像が認められた (写真 60)。デスミンに対してはイヌおよびヌードラット移植 C T V T のいずれでも細胞質内全体が褐色に染色され陽性像が認められた (写真 61)。また、ヌードラット移植 C T V T の微小管のチューブリンは細胞質全体に陽性像が認められた。

以上の免疫組織化学的所見についてはケラチンは陰性、アクチンは陽性、ミオシンとビメンチンは陽性、デスミンは陽性を示した。

これにより、アクチン、ミオシン、ビメンチン、デスミンの共存が証明された。

#### 小括

C T V T の起源を追求するためにイヌおよびヌードラットに移植した C T V T を用いて各種細胞骨格成分について免疫組織化学的に検索したところ、細胞骨格蛋白成分の中間系フィラメントを検索して、上皮細胞に存在するケラチンが陰性、筋細胞に存在するデスミンが陽性、間葉系細胞に存在するビメンチンが陽性を確認した。

#### 総括

##### 1) C T V T の移植について

野外例 C T V T のイヌへの移植では全身転移例があったにもかかわらず、継代数は 3 代であった。

しかし、ヌードラットによる継代移植ではほぼ 100% の移植率が得られ、実験材料としての C T V T を確保出来た。また、鶏胚移植 C T V T は平均約 85% と高い移植率を示した。鶏胚漿尿膜は異なった腫瘍の移植が可能であることを示唆した。

##### 2) C T V T 細胞の培養について

培養の継続では線維芽細胞様細胞の上に類円形細胞が付着して維持継続され、線維芽様細胞を分離して類円形細胞のみ培養では約 70% の生存率の低下が認められた。

##### 3) 移植 C T V T の同一性について

C T V T は異なる染色体数を持つイヌおよびヌードラットへ移植されても染色体数は 59 本で、一定しており同じ Karyotypes であることが確認出来た。

抗 C T V T モノクローナル抗体：正常イヌリンパ球とは反応せ



ず、ヌードラット移植 C T V T および北大株 C T V T の染色では細胞膜が陽性であり、免疫電顕では抗 C T V T のモノクローナル抗体での認識部位が細胞膜および粗面小胞体であることが確認出来た。

#### 4) 移植継代腫瘍の観察所見について

ヌードラット移植 C T V T スタンブ標本の光顕所見は野外例 C T V T、イヌ移植 C T V T、ヌードラット移植 C T V T 共に病理組織学的にはほぼ同様な形態を示した。腫瘍細胞は多角形あるいは楕円形 (10~12 $\mu$ ) で組織球様腫瘍細胞で密集または散在していた。電顕的所見では C T V T 細胞は楕円形ないし多角形 (15~18 $\mu$ ) で明るく、細胞は密接し、相互の結合は小突起の inter digitation により、あるいは単に平面的に接触し、滑らかな接触面となった。その他、胞体内全体に交錯する細胞骨格である中間径フィラメント、細胞膜に接して密集してマイクロフィラメント、ゴルジ装置の中心部にマイクロチュブルスが認められた。

#### 5) C T V T の立体構築、特に血管構築とその特徴について

C T V T の血管組織所見は腫瘍より遠位の動脈は正常構造を保っており内膜、中膜、外膜が明瞭であり、腫瘍内部の血管は退行変性が著しく、平滑筋細胞の空胞化および線維化が認められた。血管透明標本所見は血管新生を示す短い盲端あるいはスパイク状の突起が認められた。C T V T の血管樹脂鑄型標本所見ではイヌ移植 C T V T、ヌードラット移植 C T V T とともに正常組織内の動脈に存在している血流調節機能の intra-arterial cushion が欠如していた。

#### 6) 鶏胚移植 C T V T 細胞の観察所見について

漿尿膜上に移植した C T V T 細胞はイヌ移植 C T V T、ヌードラット移植 C T V T とほぼ同様の多角形あるいは楕円形の組織球様の



細胞（ $10\sim 12\mu$ ）であった。核は（ $6\sim 8\mu$ ）円形で核質は明るくほぼ中央に1～2個の明瞭な核小体を認めた。C T V Tの発育は腫瘍は求心性で放射状に新生した毛細血管網により移植時の約1.5～3倍の大きさとなった。

C T V Tの血管構築：新生毛細血管が移植腫瘍に放射状に新生され、血管系に墨汁を注入したところスムーズに注入出来た。

抗癌剤による腫瘍の変化：抗癌剤投与例では腫瘍組織への新生毛細血管の入り込みがコントロールと比較して、著しく減少していた。C T V Tでは抗癌剤投与によって、褐色をおび形状を縮小し、放射状の新生毛細血管も縮小、血管数の減少および細胞の核の濃染が認められた。

#### 7) C T V Tの組織化学的および免疫組織化学的観察

C T V Tの起源を追求するためにイヌ移植C T V Tおよびヌードラット移植C T V Tを用いて各種細胞骨格成分について免疫組織化学的に検索したところ、細胞骨格蛋白成分の中間系フィラメントを検索して、上皮細胞に存在するケラチンが陰性、筋細胞に存在するデスミンが陽性、間葉系細胞に存在するビメンチンが陽性を示す事を確認した。

#### IV 考 察

Novinsky (1976年) [56] によって初めて可移植性が証明された動物性腫瘍はC T V Tであるといわれる。以来、現在まで多数の研究業績を認めるも、この腫瘍の由来や細胞の性格などについては、いまだ十分な説明がなされていないのが現況であった。

しかしイヌの係留飼育が一般化し、イヌの自然交尾の機会が無くなった都市部ではC T V Tは極端に減少し、研究材料の確保さえも困難になって来ている。そのため研究材料としてのC T V Tの効果的な保存法を確立することによって、C T V Tの細胞の生物学的特徴についての説明を試みた。

イヌからイヌへの継代移植においては材料としてのイヌの確保が難しく、十分な例数の実験が行えなかったことから、異種移植実験を計画して、ヌードマウスおよびヌードラットを使用したものであった。

また、鶏胚の漿尿膜上への腫瘍の移植[66]についてはC T V Tを含むほとんどのイヌの腫瘍が移植可能であったが、移植腫瘍の生着期間があまりにも短期間であるため次代への移植に適する大きさにまで増殖することはなかった。イヌからヌードラットへの異種移植では一般に、約40日前後で接種部位の皮膚の硬結を認め、約2ヵ月で小結節を触知出来る状態となった。その後急激な増殖を示し、約4～5ヶ月後には最大73gになった。3代目までは平均90%、4代目以後12代目まで100%の移植率を示し、これからのC T V Tの研究に大いに意義あるものと考えられる。

C T V Tの細胞の培養では、浮遊する類円形細胞と、シャーレの底に付着して増生する線維芽細胞様細胞が見られた。浮遊細胞をイ

ヌに接種すると C T V T の発生が見られることが確認された。またシャーレの底にシート状に付着した細胞を接種した場合は腫瘍は形成されず、浮遊する類円形細胞が腫瘍細胞であることが確認された。また、C T V T 細胞は培養開始後約一週間までは類円形で浮遊しており、一見リンパ球様に見えた。浮遊状態の C T V T 細胞は約 2 ～ 4 週間は維持出来、増殖して類円形細胞が団子状となった。培養細胞はさらに数回の継代を実施、2 ～ 3 週間程度であれば *in vitro* でも充分に実験が可能である事が明瞭となったが、株化は不成功に終わった。共存する線維芽細胞様タイプの細胞を除いて、類円形細胞のみを単独で培養すると明らかに類円形細胞の生存率が低下した。これらの結果から線維芽細胞様の細胞を Feeder cell として使用することがより効果的で本腫瘍細胞増殖因子に関係を持つものではないかと示唆された [76]。

C T V T 細胞の染色体数について、検索したところ野外例、イヌ移植 C T V T、ヌードラット移植 C T V T、共に 59 本であった。C T V T を移植されたイヌの染色体数 78 本、ヌードラットの染色体数 42 本であることにより、C T V T は異なる染色体数を持つ個体に移植されても、染色体は同一のものと考えられる。

抗 C T V T モノクローナル抗体は、正常イヌのリンパ球とは反応せず、ヌードラット移植 C T V T および北大株 C T V T のを染色したところ細胞膜に抗原決定基が見られ (写真 15, 16)、陽性像を呈したことから、他の C T V T に対しても本腫瘍の診断液として用いることが可能である事実が示唆された。

腫瘍内の血管の性状を調べる方法として、墨汁を注入してから周囲の組織を透明化して血管系を観察する方法 [4, 38, 57, 89]、ハムス



ターの頬袋に腫瘍を移植してチャンバーを通して血管系の発達を *in vivo* で観察する方法 [15, 91]、造影剤を注入して X 線観察を行なう方法 [8, 11, 32, 62]、連続切片を作成して顕微鏡下で再構築像を求める方法 [17] 等があるが、こうした従来の方法の限界を補うためには樹脂鑄型標本を走査型電子顕微鏡で観察する方法を用いた [55]。樹脂鑄型法による腫瘍血管の観察で腫瘍血管の病態生理学的な特徴を裏付ける血管の構造的な特徴をいくつか確認することができた。正常な血管の分岐部には *intra-arterial cushion* が存在し [21]、樹脂鑄型法ではこの *intra-arterial cushion* はリング状の圧痕として認められ、腫瘍血管にはこうした *intra-arterial cushion* は認められなかった。この *intra-arterial cushion* が存在しないことにより腫瘍組織内の血液の分配が効果的に行われ得ないことと思われる。

11日鶏胚の漿尿膜に C T V T および対照とした、イヌ扁平上皮癌、ラット線維肉腫、マウス乳腺癌を移植したところ、平均 85% の移植率であった。これにより、鶏胚の漿尿膜には種々の腫瘍が移植可能であると思われる。また、漿尿膜に生着した腫瘍は鶏胚の卵黄嚢に抗癌剤を投与することによって、毛細血管の縮小、消失あるいは腫瘍の縮小、変色および漿尿膜が不透明になる等の変化が現れる。これも、抗癌剤の種類、腫瘍の種類によって異なっている。これらのことから、腫瘍細胞への影響とともに抗癌剤の有効性が考えられる。

これまで C T V T の起源については、Monbreum のリンパ球説 [45]、今牧，松山，津村の円形細胞肉腫説 [30, 42, 85]、Mulligen の未分化細網細胞説ならびに組織球説 [49] 等の諸説があ



るが十分に解明されたとは考えられない。

著者はCTVTの起源を追求する手掛りとして、イヌ移植CTVT、ヌードラット移植CTVT、鶏胚移植CTVTに対してモノクローナル抗体を作製して検索した結果は、本腫瘍細胞の細胞膜上に抗原決定基 (epitope) の存在を確認した。

病理組織学的に見るとCTVT細胞は類円形で一見リンパ球様に見える場合もあるが、細胞質は大型リンパ球様、組織球様の像を呈していた。しかし、組織球様に見られた細胞でも食作用を示す像は見ることはできなかった。電顕観察ではCTVTの細胞は楕円形ないしは多角形のものがほとんどで、類円形でリンパ球様の細胞はほとんど観察されなかった。これらの形態からはリンパ球様細胞とはみなされず、むしろ組織球様あるいは未分化な細胞様の形態として観察された。

Ajello [3]、Lombard 等 [39] がCTVT細胞内にウイルス様粒子を見たと言う報告があるが、ウイルス粒子を検出したと言う報告にとどまり、ウイルスを接種してCTVTを再現したと言う報告はない。著者の観察においてはCTVT細胞にウイルス粒子を見る事は出来なかった。

以上、これら診断の難しい腫瘍あるいは起源不明の腫瘍の検索には光顕的レベルあるいは電顕的レベルの形態学的観察に加えて免疫学的検索が行われるようになり細胞骨格成分の組織化学的染色が出来るようになって来た。

多くの高等真核細胞質には、直径約10nmのフィラメントからなる線維系があり、さらにアクチンフィラメント (直径6nm) および微小管 (直径25nm) などが細胞骨格を形成し、これら線維サイズの対

比から中間径フィラメント (intermediate filament; 以下 IF と略す) とも呼ばれている。また、これら中間サイズの線維は上皮細胞では cytokeratin、非上皮細胞では vimentin がこれに属する [84]。また、さらに最近の生化学的研究および特異抗体を用いた蛍光抗体法の結果などによって IF がその他の線維系と組成的に異なることが明らかとなり、さらに IF 自体にも数種類あることがわかった [47]。IF は異なるサブユニットタンパク質から成り、また異なる型の細胞に分布している。典型的な例は、上皮細胞のケラチンフィラメント、ニューロンのニューロフィラメント、グリア細胞のグリアフィラメント、筋細胞のデズミンフィラメント、間葉由来細胞のビメンチンフィラメントなどである [84]。

人体腫瘍の病理診断においてはケラチンは上皮細胞および中皮細胞とその腫瘍、ビメンチンは間葉系細胞とその腫瘍、デズミンは筋肉系細胞とその腫瘍の勝れたマーカーであるとされている報告がある [88]。また、Sandusky (1987年) 等 [65] はイヌ腫瘍の皮膚の円形細胞腫瘍の免疫組織化学的鑑別を試み、C T V T はサイトケラチン陰性で、ビメンチンが陽性に染色されたと報告している。

C T V T を人間の病理診断に用いられているマーカーとくに細胞骨格の中間系フィラメントを検索 [5, 24, 65] するためにケラチン、ビメンチン、デズミンなどについて染色を試みたのであった。

結果として得られたものはケラチンは染色されず、ビメンチンは C T V T 細胞の核周囲に、デズミンが細胞質全体に染色される事を確認出来た事にとどまり、今回の検索のデータみでは C T V T の起源について証明する事の出来る免疫組織化学的検索にまでは至らなかった。

今後の問題としては、イヌの自然交尾の機会が年々減少し、実験材料としてのCTVTの入手が困難になってきている中で、ヌードラット継代移植によるCTVTの確保がいかにスムーズに行われて行けるか、また、現在ヌードラット継代移植CTVTの染色体数はKaryotypes 59本で同一であるが、そのままの状態で維持して行けるものであるかについて検討し、また、CTVT細胞の起源についても今後さらに詳細に検討する事が課題となった。

1. C T V T の移植継代についてはイヌからイヌへの継代移植による方法よりも無胸腺のヌードラットによる継代移植による方法の方が生着率も高く、継代移植率もほぼ100%であった。日本国内においては近年イヌの係留飼育によりきわめて減少してきているC T V Tを実験材料として確保するための方法が無胸腺のヌードラットに腫瘍を継代移植することにより確立出来た。

2. C T V T細胞の培養では、浮遊して増殖している組織球様タイプで類円形の腫瘍細胞とシャーレの底に付着してシート状に増殖した線維芽細胞様タイプの両細胞が共存していた。両細胞の継代培養によって、8代目まで継代培養が可能であり、実験材料としてのC T V T細胞の保存が出来た。また、培養条件の検討では培養液の種類によって増殖態度に約2～3倍の差があり、RPMI1640の培養液での培養方法が良い結果であった。

3. 野外例C T V Tの染色体数、イヌ移植C T V Tの染色体数、ヌードラット移植C T V Tの染色体数も共に59本であった。C T V Tは異なる染色体数を持つイヌおよびヌードラットへ移植されても染色体数は59本で一定しており、同じKaryotypesであることを確認した。

4. 作製に成功した抗C T V Tのモノクローナル抗体では、正常イヌリンパ球とは反応せず、ヌードラットに移植したC T V Tおよび北大株C T V Tのみと反応して陽性像となった。また免疫電顕の結果から細胞膜系に抗原決定基(epitope)が証明されたことから本モノクローナル抗体はC T V T細胞に有効なマーカーと成り得た。



5. C T V T の血管透明標本所見では腫瘍実質中の毛細血管はきわめて細く、血管新生を示す短い盲端あるいはスパイク状の突起が認められた。C T V T の血管樹脂鋳型標本所見ではイヌ移植 C T V T、ヌードラット移植 C T V T とともに腫瘍内の動脈においては、正常組織内の動脈の分岐部にある血流調節機能である intra-arterial cushion が欠如しており、正常血管に比較して血流調節に欠陥のあることを確認した。

6. 鶏胚の漿尿膜には C T V T および対照とした腫瘍の移植率は平均約 85% であった。ゆえに漿尿膜には異なった腫瘍の移植が可能であることを確認出来た。また、腫瘍の生着した鶏胚の卵黄嚢に抗癌剤を投与したところ、新生毛細血管の縮小、消失、組織所見では細胞質には空胞化変性、核濃縮が認められ、腫瘍の種類、抗癌剤の種類によって異なることが判明した。

7. C T V T 細胞の起源の追求では、光顕的には細胞質の変形しているものが多く、多角形あるいは楕円形 ( $10\sim 12\mu$ ) で組織球様の腫瘍細胞として観察されたが、細胞の食作用は見られなかった。電顕的には組織球様または未分化な細網細胞様の形態として観察された。また、ウイルス粒子は認められなかった。C T V T の細胞骨格蛋白成分の検討から中間系フィラメントのケラチンには染色されず、ビメンチンおよびデスミンに染色されることが確認出来た。今回の検索データのみでは C T V T の起源について証明するまでには至らなかった。

## VI 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導と論文のご校閲を賜った麻布大学教授中村経紀博士に敬意を表するとともに、実験のご指導と論文のご校閲を賜った麻布大学教授江口保暢博士、同教授野村靖夫博士、同教授上屋新男博士、同助教授二宮博義博士に深甚の謝意を表します。また、ご協力とご指導を賜った麻布大学助教授岸川正剛博士、同萩原喜久美助手の各位に衷心より謝意を表します。また、本研究にご協力頂いた北里研究所、長峯 隆博士並びに実験動物学教室、環境病理学教室の室員各位に謝意を表します。

1. Abbott, P. 1966. Venereal transmissible tumor on eyel of dog. Aust Vet. J. 42: 12-18.
2. 阿部達生, 谷脇雅史, 龍野辰郎 1982. 固形腫瘍と染色体. 医学のあゆみ 121(9): 699-707.
3. Ajello, P. 1947. Primi risultati di culture in tubi rotanti del tumore di Sticker. Arch. Vet. Ital 7:411-453.
4. Algire, G. H., and Legallis, F. 1947. Growth rate of tranplantable tumor in relation to latent period and host vascular reaction . Cancer Res. 7:724.
5. Andreasen, C. B., Mahaffey, E. A., and Duncan, J. R. 1988. Intermediate filament staining in the cytologic and histologic diagnosis of canine skin and soft tissue tumors. Vet. Pathol. 25:343-349.
6. Birrer, M. J., Bloom, B. R., and Udem, S. 1981. Characterization of measles polypeptides by monoclonal antibodies. Virology. 108:381-390.
7. Boscos, C. 1989. 犬の可移植性性器肉腫, 臨床所見および治療. Animalis Familiaris. 1:14-19.
8. Breedis, C., and Young, G. 1954. The blood supply of neoplasms in the liver. Am. J. Pathol. 30: 969-985.
9. Carteaude, M., and Lagneau, R. 1963. Contribution à l'étude cytologique de Lathyrus viciae du chien (Sarcome de Sticker). Societe de Dermatologie et de syphiligraphie. 12.:793-799.
10. Cepko, C. L., Changelian, P. S., and Sharp, P. A. 1981. Immunoprecipitation with Two-Dimensional pools as a hybridoma screening technique: Production and characterization of monoclonal antibodies against adenovirus 2 Proteins. J. Virol. 110:385-401.
11. Cudkowics, L., and Armstrong, J. B. 1953. The blood supply of malignant pulmonary neoplasms. Thorax 8: 152-157.
12. Dippold, W. G., Lloyd, K. O., Li, L. T. C., Ikeda, H., Oettgen, H. F., and Old, L. J. 1980. Cell surface antigens of human malignant melanoma: Definition of



- six antigenic system with mouse monoclonal antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (10):6114-6118.
- 1 3. Dozza, G., and Tarlone, V. 1960. Experimental reproduction of Stickers' Sarcoma by inoculating trypsinized cells and cell fractions into dogs. Vet. Ital 11.:647-658.
  - 1 4. Drommer, W., und Schulz, L. Cl. 1969. Vergleichende licht und elektronen mikroskopische untersuchungen am bertragbaren venerischen. Sarkom und histiozytom des hundes pathologia Vet. 6:273-286.
  - 1 5. Eddy, H. A., and Casarett, G. W. 1973. Development of the vascular system in the hamster malignant neurilemmoma. Microvas. Res. 6: 63-82.
  - 1 6. Ejima, Y., Sasaki, M. S., Utumi, H., Kaneko, A., and Tanaoka, H. 1982. Radiosensitivity of fibroblasts from patients with retinoblastoma and chromosome 13 anomalies. Mutation Res.:177-184.
  - 1 7. Falk, P. 1978. Two methods for threedimensional examination of the pattern of vasculature in tumors. Micro. Res. 15: 83-91.
  - 1 8. Farrel, P. H. O. 1975. Intermediate filament. J. Biol. Chem. 250:4007-4015.
  - 1 9. Fujinaga, T., Yamashita, M., Yoshida, M., Mizuno, S., Tajima, M., Okamoto, Y., and Otomo, K. 1989. The banding patterns of canine chromosomes. Jpn. J. Vet. Sci. 51(2): 294-299.
  - 2 0. Giraudon, P., and Wild, T. F. 1981. Monoclonal antibodies against measles virus. J. gen. Virol. 54:325-332.
  - 2 1. Gorgas, K., and Bock, P. 1975. Studies on intra-arterial cushions; 1 Morphology of the cushions at the origins of intercostal arteries in mice. Anat. Embryol. 148: 59-72.
  - 2 2. 橋本伸也, 角谷孝志, 中杉敏郎, 前田泰一, 山県哲哉 1970. 雄犬のポリープの新しい手術法について. 日臨床学誌. 166:40.
  - 2 3. 幡谷正明 1952. 犬のポリープ. 獣畜報. 88:498.
  - 2 4. Hellmem, E., and Lindgren, A. 1989. The expression of intermediate filaments in canine mammary glands and their tumors. Vet. Pathol. 26:420-428.
  - 2 5. Higgins, L. 1966. Observations on the canine transmissible venereal tumour

- as seen in the Bahamas. The Vet. Rec. 79 (3):67-71.
26. Hill, D.L., Yang, T.J., and Wachtel, A. 1984. Canine transmissible venereal sarcoma: Tumor cell and infiltrating leukocyte ultrastructure at different growth stages. Vet. Pathol. 21:39-45.
  27. Hilton, A.S., and Thomas, C.J. 1960. The canine transmissible venereal tumor. Vet. Path. :220-222.
  28. 広橋説雄 1986. モノクローナル抗体の作製と応用上の問題点. 免疫組織化学. 病理と臨床. (5):42-47.
  29. 本所久男, 菅沼保治 1957. 転移性・多発性ポリープの症例. 日獣会誌10:117.
  30. 今牧甲子男 1932. 可移植性円形細胞肉腫に関する知見. 犬腫瘍の比較病理第三報. 癌. 26:29-56.
  31. 井上雄弘 1982. 制癌剤感受性試験. 癌治療・今日と明日. 4(6):27-30.
  32. Inoue, T., Inokuchi, M., and Shimizu, K. 1984. Interstitial vascular reaction of naturally occurring mammary adenocarcinoma in old C3H/HeJ female mice. Exp. Anim. 33: 151-157. (in Japanese with English summary)
  33. Johnson, J.P., Dimmer-Dieckmann, M., Meot., Hadam., M.R. and Riethmiller, G. 1981. Surface antigens of human melanoma cells defined by monoclonal antibodies, I. Biochemical characterization of two antigens found on cell lines and fresh tumors of diverse tissue origin Eur. J. Immunol. 11: 825-831.
  34. Kohler, G., and Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. MRC Laboratory of Molecular Biology. 256: 495-497.
  35. Konishi, T., Kitamura, M., Suzuki, T., Mori, T., Awane, Y., and Kosaki, G. 1985. Intra-arterial infusion therapy with angiotensin 2 for gastric carcinoma. Jpn. J. Cancer Chemother 12: 1905-1914. (in Japanese with English summary)
  36. Koprowski, H., Steplewski, Z., Herlyn, D., and Herlyn, M. 1978. Study of antibodies against human melanoma produced by somatic cell hybrids. Proc. Natl. Sci. USA. 75(7): 3405-3409.

37. Lake, P., Clark, E. A., Khorshidi, M., and Sunshine, G. H. 1979. Production and characterization of cytotoxic Thy-1 antibody-secreting hybrid cell lines. Detection of T cell subsets. *Eur. J. Immunol.* 9:875-886.
38. Lewis, W. H. 1927. The vascular patterns of tumors. *Bull. Johns. Hopkins. Hosp.* 41: 156-162.
39. Lombard, T., and Cabanie, P. 1967. Virus like particles in cells of Sticklers' sarcoma. *Ecole Nat. Vet. Toulouse.* 6:81-84.
40. Makino, S. 1963. Some epidemiologic aspects of venereal tumors of dogs as revealed by chromosome and DNA studies. *Annals of The New York Academy of Sciences.* 108 (3): 1106-1122.
41. 松葉重雄, 広江 巖 1965. 犬の生殖器系統に発する悪性腫瘍所謂息肉の本性に就て. *中央獣会誌.* 5: 405-426.
42. 松山森一 1956. 犬の性器に発生する肉腫の臨床および病理組織学的観察. *日獣会誌.* 9:10-11.
43. Mcfarlin, D. E., Bellini, W. J., Mingioli, E. S., Behar, T. N., and Trudgett, A. 1980. Monospecific antibody to the haemagglutinin of measles virus. *J. gen. Virol.* 48: 425-429.
44. 宮本佐市, 宮本海雄 1964. 犬の腫瘍. 特にポリープ (外陰部肉腫) の生物学的性状に基づく新治療について. *獣畜報.* :69-70.
45. Monbreun, W. A. De., and Goodpasture, E. W. 1934. An experimental investigation concerning the nature of contagious lymphosarkoma of dogs. *Amer. J. Cancer.* 21: 295-321.
46. Morfat, D. B. 1959. An intra-arterial regulating mechanism in the uterine artery of the rat. *Anat. Rec.* 134: 107-124.
47. 森永正二郎, 中島 孝, 下里幸雄 1987. 中間径フィラメント, 病理と臨床 54: 385-394.
48. Moulton, J. E. 1961. Transmissible venereal tumor of dog. *Tumors in domestic animals.* : 164-168.
49. Mulligan, R. M. 1948. Neoplastic diseases of dogs. II. Mast cell sarcoma, histiocytoma. *Arch. Path.,* 46:477-492.



50. Murphy, J.B. 1912. Transplantability of malignant tumors to the embryos of a foreign species. Jour. Am. Med. Assoc. 59: 874-875.
51. 長倉義夫 1962. 犬のポリープの悩み. 獣畜報. 331: 819.
52. 長倉義夫 1964. 犬ポリープの治療. 獣畜報. 368: 157.
53. Nielsen, S.W., and Cole, C.R. 1958. Canine mastocytoma-A report of one hundred cases. Veterinary Pathology at the Ohio State University.:417-432.
54. Nielsen, S.W., and Kennedy, P.C. 1990. Transmissible venereal tumor of the dog. Venereal tumor adenohypophysis, brain dog. 7:498-517.
55. Ninomiya, H., and Nakamura, T. 1987. Vascular patterns of a rat mammary tumor, Fibroadenoma: Scanning electron microscopy of resin casts. Jpn. J. Vet. Sci. 49(2): 303-312.
56. Novinsky, M. 1876. Zur Frage ber die krebsigen Geschwulst. Zentralbl. f. D. Med. Wissensch. 14: 790.
57. Ogilvie, R.W., Blanding, J.D. Jr., Wood, M.L., and Knisely, W.H. 1964. The arterial supply to experimental metastatic VX2 and XY tumors in rabbit lungs. Cancer Res. 24: 1418-1431.
58. Okamoto, Y., Fujinaga, T., Tajima, M., Hoshi, N., Otomo, K., and Koike, T. 1988. Isolation and cultivation of canine transmissible sarcoma cells. Jpn. J. Vet. Sci. 50(1): 9-13.
59. 大倉久直 1990. 1. 腫瘍マーカーの臨床的意義. 病理と臨床. 8: 4-11.
60. Osborn, M., and Weber, K. 1983. Biology of disease. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: A novel tool for surgical pathology. Lab Invest 48: 372-394.
61. Paff, B., and Noback, I. 1951. The Transmissible Venereal Tumor of the dog. Am. J. of Pathology. 2(7):119-139.
62. Papadimitriou, J.M., and Woods, A.E. 1975. Structural and functional characteristics of the microcirculation in neoplasms. J. Path. 116: 65-72.
63. Parihar, N.S. 1964. A case of histiocytoma in the nasal cavity of a dog. The Indian Vet. J. 41: 728-730.



64. Russel, W.C., Patel, G., Precio, B., Sharp, I., and Rardner, P.S. 1981. Monoclonal antibodies against adenovirus Type 5: Preparation and Preliminary Characterization. *J. gen. Virol.* 56: 393-408.
65. Sandusky, G.E., Carlton, W.W., and Wightman, K.A. 1987. Diagnostic immunohistochemistry of canine round cell tumors. *Vet. Pathol.* 24: 495-499.
66. 佐々木琢磨 1989. 鶏卵法の抗癌剤感受性試験への応用. 金沢大学. 癌研究所化学療法部. : 1-2.
67. Sastry, G.A., Narayana, J.V., Rao, P.R., and Christopher, J. 1965. A case of metastatic venereal tumour in a bitch. *The Indian Vet. J.* 42: 658-660.
68. Satoh, T., and Kawaguchi, T. 1985. Enhancement of anti-cancer effect by increased injection pressure of a single shot in intraarterial chemotherapy The advantages of using noradrenalin in intraarterial chemotherapy. An experimental study. *Jpn. J. Cancer Chemother.* 12: 1510-1512.
69. Satoh, T., Katsumi, T., and Kawaguchi, T. 1985. Intra-arterial chemotherapy results improved of using noradrenalin mixed anticancer agents experimental and clininical study (No contraction tumor vessels by noradrenalin has the possibility of enhancing delivery into the tumor tissue and thus improving the anti-cancer effects). *Jpn. J. Cancer Chemother.* 12: 1915-1921.
70. Shanklin, W., and Azzam, N. 1963. A study of valves in the arteries of the rodent brain. *Anat. Rec.* 147: 407-413.
71. 柴内大典, 北 昂, 兎沢正春, 高橋 貢 1957. 犬のポリープ (可移植性腫瘍) に関する研究. I. 継代移植に就いて. 麻布大研究報告. 4: 109-131.
72. 柴内大典, 北 昂, 兎沢正春, 高橋 貢 1958. 犬のポリープ (可移植性腫瘍) に関する研究. 人工移植による転移とその経路. 麻布大研究報告. 5: 37-47.
73. 白須泰彦, 川瀬 清, 臼井和哉, 幡谷正明 1957. 犬の息肉腫 (ポリープ) に関する研究Ⅲ. ハムスターへの移植実験. *日獣学誌.* 59 (学会号) : 89.
74. 白須泰彦 1958. 犬のポリープ. *日獣会誌.* 11(6) : 245-251.
75. 白須泰彦, 臼井和哉, 幡谷正明 1967. 犬の息肉腫 (ポリープ) に関する研究. IV. 腫瘍細胞の微細構造について— 電子顕微鏡による観察. *日獣学誌.* 45 (学

会記事) : 304.

76. Snell, G.D. 1948. Methods for the study of histocompatibility genes. J. Genetics. 49: 87.
77. Snell, G.D. and Jackson, R.B. 1953. The genetics of transplantation. J. Nat. Cancer Inst. 14: 691.
78. Sticker, A. 1906. Transplantables Rundzellensarkom des Hundes. Zschr. f. Krebsforsch. 4: 227-314.
79. Suzuki, M., Hori, K., Abe, I., Saito, S., and Sato, H. 1978. Characteristic blood circulation in tumor tissue with references to cancer chemotherapy. Jpn. J. Cancer Chemother. 5 (supplement 1): 77-80. (in Japanese)
80. Takayanagi, T., Rennels, M., and Nelson, E. 1972. An electron microscopic study of intimal cushions in intracranial arteries of the cat. Am. J. Anat. 133: 415-430.
81. 谷口 克 1980. 動物細胞融合. モノクローナル抗体によるがん抗原の解析  
がん診断. 治療への応用. 千葉大医学部免疫研究部. : 149-162.
82. Thiery, G. 1950. b. Pouvoir canc rig neder thymonucle-otrot ines  
extraitesdu sarcome de Sticker. Comptes rendus Soc. Biologie. 64: 745-747.
83. 東京化学同人1989. 細胞骨格の構造と機能 (上) 6 日本生化学会編. : 3-15.
84. 東京化学同人1989. 細胞骨格の構造と機能 (下) 6 日本生化学会編. : 333-382.
85. 津村 巖, 安藤金文, 佐々木博一, 前田 勉 1956. 犬の陰部息肉腫の臨床及び  
細胞学的研究. 日獣学誌. 42 (学会号) 18: 113.
86. 土江義雄, 幡谷正明 1941. 犬の可移植性腫瘍の生物学的治療に関する実験的  
研究. I. 日獣会誌. 3: 631-649.
87. 堤 寛 1986. モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学とその病理診断への応  
用. 細胞 9. 18(10): 322-328.
88. 堤 寛 1987. 病理学への応用: ケラチン, ビメンチン, デスミン, 病理と臨  
床. 5(4): 445-456.
89. Urbach, F., and Graham, J. 1962. Anatomy of human skin tumour capillaries.  
Nature 194: 652-654.

90. Wade, H. 1908. An experimental investigation of infective sarcoma of the dog with a consideration of its relationship to cancer. *J. Path. and Bact.* 12: 384-425.
91. Warren, B.A., and Shubik, P. 1966. The Growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch. *Lab. Invest.* 15: 464-478.
92. Weber, K., and Osborn, M. 1985. The molecules of the cell matrix. *Scientific American*. 253: 110-120.
93. Weber, W.T., Nowell, P.C., and Hare, W.C.D. 1965. Chromosome studies of a transplanted and a primary canine venereal sarcoma. *J. natn. Cancer Inst.* 35: 537-547.
94. 吉田信雅, 吉田 誠 1989. 犬の可移植性性器肉腫の硫酸ビンクリスチン単独投与による治療. *小動物臨床*. 45 (症例報告) : 73-76.
95. Zagury, D., Phalente, L., Bernard, J., and Buttin, G. 1979. Anti-peroxidase antibody-secreting hybridlinines I. Identification, cloning and cell characterization. *Eur. J. Immunol.* 9: 1-6.

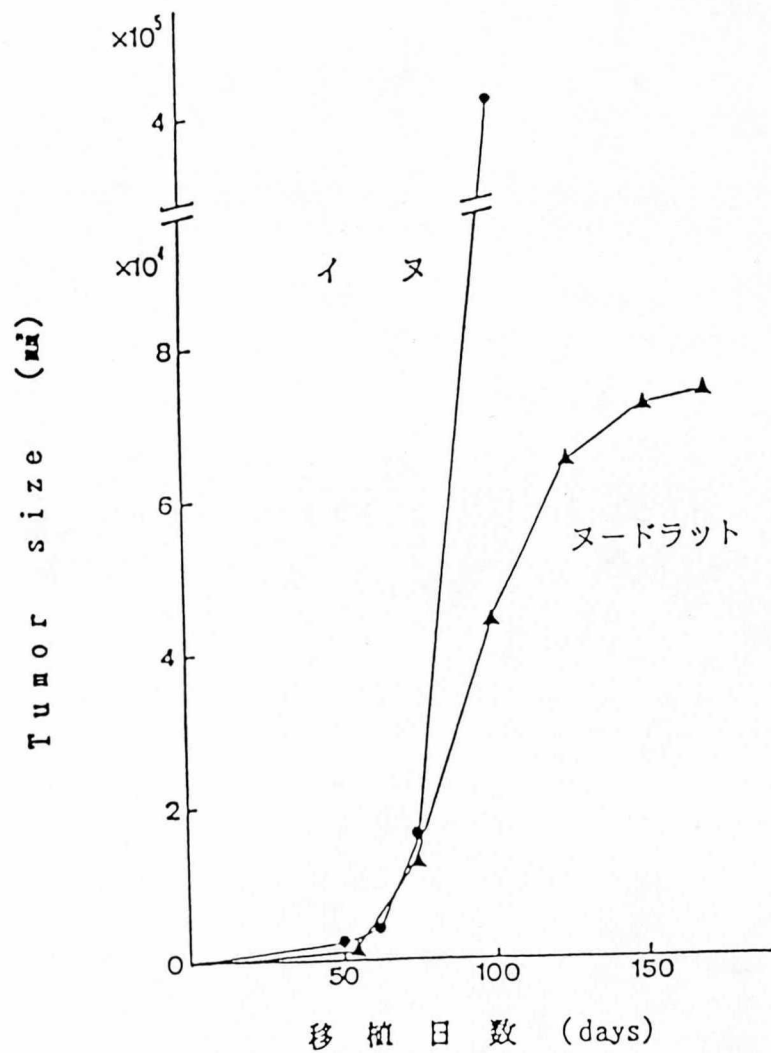


図 1 イヌおよびヌードラットへの  
C T V T細胞の移植における腫瘍の増殖曲線



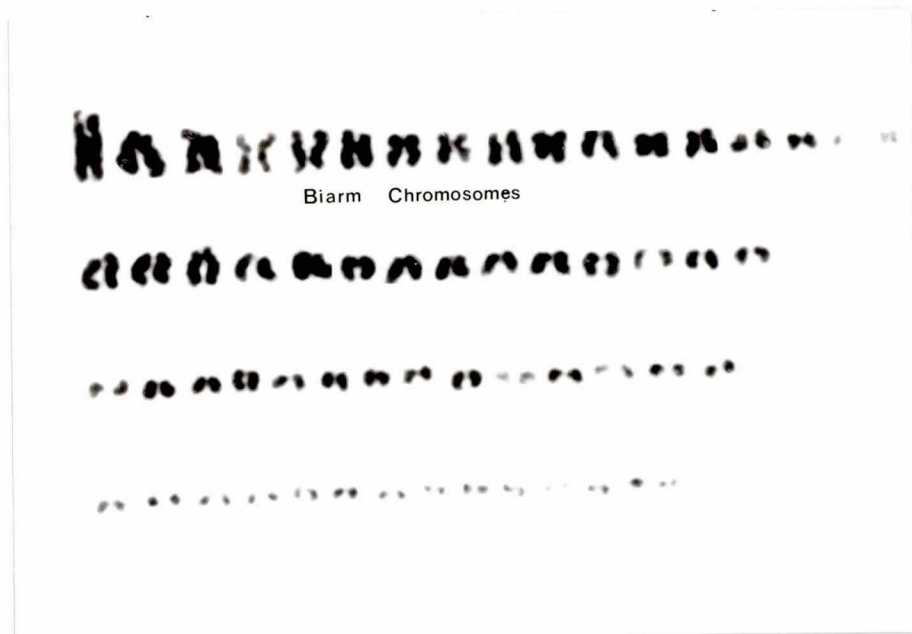


図2 イヌに移植したCTVT細胞のKaryotype

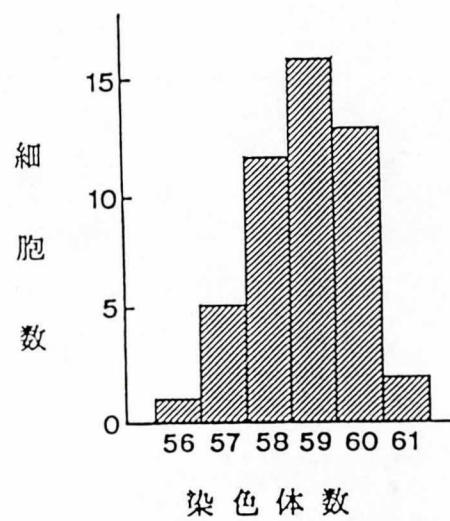


図 3 ヌードラットに移植CTVT細胞における染色体数の分布

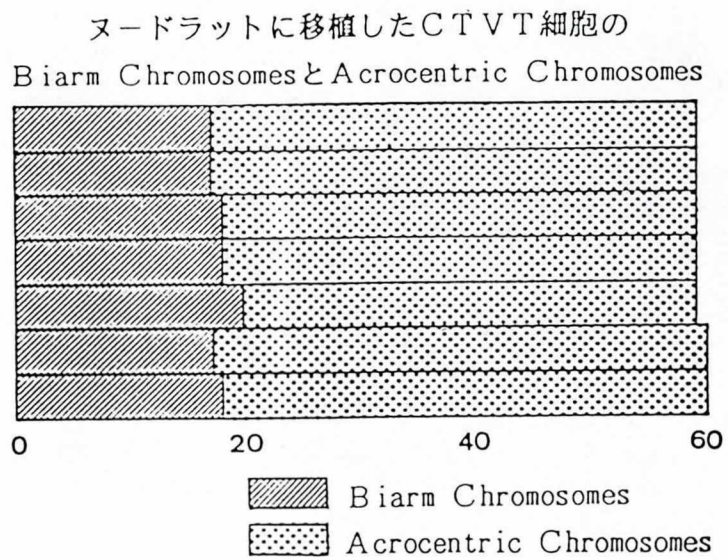


図 4 CTVT細胞の核型 (Karyo types)

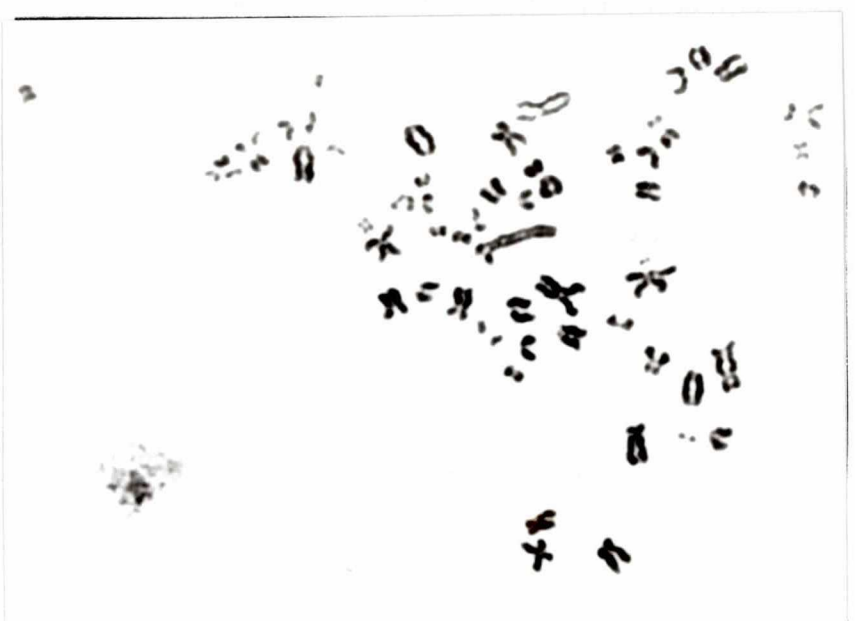


図5 ノードラットに移植したCTVT細胞のKaryotype



表1 イヌに移植したCTVT細胞の移植成績

イヌNo.	継代数	接種部位	細胞数	生着	備 考
1	1代目	背部皮下	$1 \times 10^7$ /匹	○	
2	〃	背部皮下	$1 \times 10^7$ /匹	○	
3	〃	背部皮下	$1 \times 10^7$ /匹	×	接種2日目死亡
4	〃	背部皮下	$1 \times 10^7$ /匹	×	接種8日目死亡
5	2代目	背部皮下	$1 \times 10^7$ /匹	○	接種約100日後解剖 肝臓に転移
6	〃	背部皮下	$1 \times 10^7$ /匹	○	接種約100日後解剖
7	〃	背部皮下	$1 \times 10^7$ /匹	○	接種約200日後解剖 眼窩、下顎、 背部皮下に転移
8	〃	背部皮下	$1 \times 10^7$ /匹	○	接種約250日後解剖 接種部位の腫 瘍の退縮
9	3代目	背部皮下	$1 \times 10^7$ /匹	×	

移植率(%) : 1代目 50%

2代目 100%

3代目 0%

表2 ノードラットに移植したCTVT細胞の移植成績

ラットNo.	継代数	接種部位	細胞数	接種匹数	生着数	移植率 %	備 考
1～9	1	背部皮下	$3 \times 10^6$ /匹	9	8	89	Rowette nude (rnu)
10～13		腹腔内	$5 \times 10^6$ /匹	4	4	100	〃
14～21	2	背部皮下	$5 \times 10^6$ /匹	8	7	88	〃
22～35	3	背部皮下	$5 \times 10^6$ /匹	14	13	93	〃
36～42	4	背部皮下	$5 \times 10^6$ /匹	7	7	100	〃
43～63	5	背部皮下	$5 \times 10^6$ /匹	21	21	100	〃
64～73	6	背部皮下	$5 \times 10^6$ /匹	10	10	100	〃
74		背部皮下	1mm <sup>3</sup> 角/匹	1	1	100	〃
75～76	7	背部皮下	$2 \times 10^7$ /匹	2	2	100	〃
77		背部皮下	$1 \times 10^7$ /匹	1	1	100	〃
78	8	背部皮下	$1 \times 10^7$ /匹	1	1	100	〃
79		背部皮下	$4 \times 10^6$ /匹	1	1	100	〃
80		背部皮下	$1.5 \times 10^7$ /匹	1	1	100	〃
81	9	背部皮下	$1 \times 10^7$ /匹	1	1	100	F334/NJcl-rnu
82		背部皮下	$1.5 \times 10^7$ /匹	1	1	100	Rowette nude (rnu)
83～84		背部皮下	$1 \times 10^7$ /匹	2	2	100	〃
85～86	10	背部皮下	$2 \times 10^7$ /匹	2	2	100	〃
87～88	11	背部皮下	$2 \times 10^7$ /匹	2	2	100	〃
89～93	12	背部皮下	$1 \times 10^7$ /匹	5	5	100	F334/NJcl-rnu
94～96		背部皮下	$2 \times 10^7$ /匹	3	3	100	Rowette nude (rnu)

ラットNo. 9 : 接種71日後、細菌感染により死亡

No.17 : 接種58日後、細菌感染により死亡

No.25 : 接種14日後、細菌感染により死亡

表3 抗癌剤による影響：（陽性卵数／対照卵数）

	CTVT	イヌ扁平 上皮癌	ラット 線維肉腫	マウス 乳腺癌
硫酸ピンク リスチン	16／18	15／19	12／18	17／19
アスパラギ ナーゼ	11／18	12／18	12／19	16／18

表4 イヌおよびヌードラット移植CTVT細胞の組織化学染色所見

	イヌ No.5	ヌードラット No.38
ペルオキシダーゼ染色	－	－
アルカリホスファターゼ染色	－	－
酸性ホスファターゼ染色	－	－
ズダン黒・B染色	－	－
PAS染色	－	－
オイルレッドO染色	＋	＋

## 写 真 説 明

### 写真 1

イヌ（雑種）雌 8才の腔に発生した C T V T（野外例）。

### 写真 2

野外例 C T V T をイヌ No.5 の背部皮下に移植し、約 100 日経過したものの。

### 写真 3

ヌードラット No.6 背部皮下に移植後約 2 ケ月経過し、拇指頭大になったものの。

### 写真 4

ヌードラット No.11 の背部皮下に移植後約 4 ケ月経過し、鶏卵大となり表面に痂皮を形成している。

### 写真 5

ヌードラット No.38 に移植、増殖し、鶏卵大となった C T V T の割面。数個の腫瘍が寄り合い急激な増殖を示すものの、内部は充実し、出血、壊死は認められない。

### 写真 6

C T V T 移植後 3 日目、14 日胚の鶏卵で腫瘍の生着を認め毛細血管を呼び込み、漿尿膜内の胎児は活発に運動している。

### 写真 7

ヌードラット No.38 、移植 C T V T を初代培養した位相差顕微鏡像：C T V T 細胞がパール様に光沢を持って多数瀰漫性に散在しているのが認められる。



## 写真 8

写真 7 と同検体：培養開始後約 1 週間経過した位相差顕微鏡像で、浮遊した本腫瘍細胞が部分的に密集し、またシャーレの底にシート状にのびた線維芽様細胞が共存している培養像である。

## 写真 9

イヌ正常リンパ球を用い、一次抗体として C T V T fusion の培養上清を使用し、酵素抗体法、間接法を施した標本で陰性。（矢印で示した黒褐色に染色されて、強陽性像を示すのは好中球由来内因性 Peroxidase である。） × 40.

## 写真 10

写真 9 の強拡大で、陰性像が明瞭に認められる。 × 100.

## 写真 11

ヌードラット No.70 移植 C T V T 細胞を cell suspension 後、P B S を一次抗体として C T V T fusion の培養上清を使用したもので細胞質が黒褐色に染まり、陽性を示している。 × 200.

## 写真 12

継代数が 10 代目のヌードラット No.85 の C T V T の凍結切片に一次抗体として C T V T fusino の培養上清を使用したもので細胞質が黒褐色に見られる。陽性を示している。 × 100.

## 写真 13, 14

写真 12 の強拡大で、細胞質が黒褐色に染色されているのが明瞭に認められる。 × 200.

## 写真 15

北大株 C T V T の凍結切片に一次抗体として P B S を使用したものの。（黒褐色に染色され、強陽性を示すのは好中球由来内因性 Per-

oxidase である)  $\times 100$ .

#### 写真 16

写真 15 の切片に一次抗体として C T V T fusion の培養上清を使用したもので細胞質が黒褐色に染色され、陽性である。  $\times 100$ .

#### 写真 17

写真 16 の強拡大で、リンパ球様細胞には、核小体も明瞭に認められる。細胞質が黒褐色に染色され、陽性である。  $\times 200$ .

#### 写真 18

継代数 6 代目ヌードラット No. 70 移植 C T V T 細胞を cell suspension 後 P B S を一次抗体としたもので細胞質が黒褐色に染色されず、陰性を示している。  $\times 200$ .

#### 写真 19

継代数 10 代目ヌードラット No. 85 移植 C T V T の凍結切片に一次抗体として P B S を使用したもの。陰性を示している。  $\times 100$ .

#### 写真 20

培養上清を用い、Western blotting を行いモノクローナル抗体の分子量測定を試みた結果、分子量 14100 から 20100 の間に 2 本のバンドが認められ、それらの分子量は各々、ほぼ 15000 と 20000 (矢印) である。

#### 写真 21, 22

C T V T の抗モノクローナル抗体で検出した免疫電顕像では本腫瘍細胞膜および粗面小胞体に反応産物が見られる。下線は  $1 \mu m$ 。

#### 写真 23

ヌードラット No. 38 に移植、増殖した C T V T のスタンプ標本で  $10 \sim 12 \mu$  で楕円形あるいは類円形で組織球様の細胞であり、核は

6 ~ 8  $\mu$  で微細なクロマチン顆粒と1 ~ 2 個の明瞭な核小体が見られる。 Wright giemsa 染色  $\times 400$ .

#### 写真 24

イヌ No. 6 移植例で接種後約 1 ヶ月して接種部の腫瘍結節をバイオプシーしたもの、核は大きく、1 ~ 2 個の明瞭な核小体を認める。

H · E 染色  $\times 100$ .

#### 写真 25

A はイヌ No. 1、B は継代数 3 代目ヌードラット No. 31 に移植した C T V T 細胞像で、どちらも同様に楕円形の組織球様の細胞が認められる。 H · E 染色  $\times 40$ .

#### 写真 26

継代数 4 代目ヌードラット No. 38 の C T V T 細胞で、大小不同の組織球様の細胞が認められ、細胞間に線維成分が増加して、基質が明瞭となる。 H · E 染色  $\times 100$ .

#### 写真 27

イヌ No. 5 に移植した C T V T 細胞の電顕像で、胞体内にオルガネラが散在。明瞭な核小体も認められる。 下線は 4  $\mu$  m 。

#### 写真 28

イヌ No. 6 に移植した C T V T 細胞の電顕像で、明瞭な核小体と細胞の周囲には発達したマイクロビライ（矢印）が観察される。

下線は 2  $\mu$  m 。

#### 写真 29

ヌードラット No. 38 に移植した C T V T 細胞の電顕像で、胞体内にはオルガネラが散在し、明瞭な核小体も認められる。  $\times 20000$ .

### 写真30

ヌードラット No.38 に移植した C T V T 細胞の電顕像で、高電子密度の微細顆粒状物を見る。 × 20000.

### 写真31

ヌードラット No.43 移植 C T V T で遠位にある血管では内膜、中膜、外膜いずれも明瞭で、中膜は2～3層の平滑筋細胞で構成されており異常所見は認められない。 H・E 染色 × 200.

### 写真32

写真31と同検体で腫瘍に進入する手前の腫瘍血管では、中膜を構成する平滑筋細胞の一部に細胞形質融解を思わせる退行性変化（矢印）が認められる。 H・E 染色 × 200.

### 写真33

写真31と同検体で腫瘍内部の血管は、退行変性が著しく、平滑筋細胞の空胞化、線維化が認められ本来の血管壁構造が消失している。 H・E 染色 × 200.

### 写真34,35

ヌードラット No.44 移植 C T V T の Whole mount 標本では、腫瘍実質中の毛細血管はきわめて細く（5～8 μ）きめの細かい網目を形成している。 × 100.

### 写真36

写真34と同検体で血管新生を示す毛細血管は短い盲端あるいはスパイク状の突起を持つ毛細血管として出現する。 × 200.

### 写真37

ヌードラット No.45 移植 C T V T の樹脂鋳型標本では、動脈の表面には血管の長軸に沿って微細なヒダが認められる。また、



intra-arterial cushion は分枝部をリング状に取り囲む圧痕として観察される（矢印）。 ×100.

#### 写真38

写真37と同検体で微細なヒダは血管が腫瘍に近づくにつれ次第にその輪郭が不明瞭になり、また intra-arterial cushion は腫瘍に近くなるとともにその輪郭は不明瞭になり、腫瘍深層の動脈にはこの構造は認められない。 ×100.

#### 写真39

写真37と同検体で腫瘍に進入した動脈は数多くの小動脈（径40～60 $\mu$ ）に分枝するが、正常な血管の様に分枝パターンには規則性はなくランダムな分枝を繰り返し腫瘍内部を走行している。 ×100.

#### 写真40,41

写真37と同検体で毛細血管は非常に細くその口径は2～6 $\mu$ であり、毛細血管は互いに吻合して不整多角形の網目となり密な毛細血管網を形成している。また、盲端に終わる血管（矢印）も見られる。 写真40：×100. 41：×300.

#### 写真42,43

写真37と同検体で腫瘍の毛細血管には血管新生を示す盲端に終わる血管（budding capillaries）が無数認められるが、このCTVTではそうした血管新生を思わせる毛細血管は多くは認められず、壊死組織に接する部位では血管系は崩壊しており、表層で認められたような血管構築は認められない。写真42：×100. 43：×1000.

#### 写真44

線維肉腫移植後3日目、14日胚の鶏卵の漿尿膜に腫瘍が生着したものの。腫瘍は毛細血管を呼び込みみずみずしく増殖している。

#### 写真 45

抗癌剤を投与後 4 日目、18 日胚の鶏卵の漿尿膜上の C T V T は褐色をおび形状を縮小し呼び込んだ毛細血管も縮小、血管数の減少が観察される。

#### 写真 46

抗癌剤を投与後 4 日目、18 日胚の漿尿膜上のイヌ扁平上皮癌はやや黄色に変化、呼び込みの毛細血管数の減少と、漿尿膜の不透明感が観察される。

#### 写真 47

マウス乳腺癌移植後 3 日目、14 日胚の鶏卵の漿尿膜に腫瘍が生着し、他の腫瘍に比較してかなり太い毛細血管を呼び込む様子が観察されるが、この時点では腫瘍の増殖はあまり良くない。

#### 写真 48

抗癌剤投与後 4 日目、18 日胚の漿尿膜上のマウス乳腺癌はやや光沢のある白色を呈している。呼び込んだ毛細血管が後退し、かなり縮小、血管数の減少が観察される。

#### 写真 49

C T V T を移植した漿尿膜上の微細血管で血管系に墨汁を注入したもので左はコントロール、右は抗癌剤を投与したものである。抗癌剤を投与したものでは毛細血管が、より細く観察される。×10.

#### 写真 50

抗癌剤を投与した鶏卵の漿尿膜上の C T V T では類円形のリンパ球様の細胞が見られるものの、細胞質には空胞化変性がおこり、多くの核濃縮が認められる。H・E 染色 ×100.

#### 写真 51

抗癌剤を投与した漿尿膜上のイヌ扁平上皮癌では細胞の縮小と角化亢進像、著明な癌真珠形成が認められる。H・E染色 ×100.

#### 写真 52

抗癌剤を投与した漿尿膜上のラット線維肉腫では漿尿膜が粗造となり、紡錘形の細胞は変性をおこし、より長形で細胞数の減少と核濃縮が認められる。H・E染色 ×40.

#### 写真 53

マウス乳腺癌を移植した漿尿膜上の毛細血管で左はコントロールのもので、毛細血管は太く認められ、血管壁も正常である。右は抗癌剤を投与したもので、血管腔の縮小が認められる。H・E染色 ×20.

#### 写真 54

コントロールのマウス乳腺癌の漿尿膜上の移植腫瘍に新生毛細血管が呼び込まれ、木の芽状 (budding) (矢印) が多数認められる。H・E染色 ×10.

#### 写真 55

抗癌剤を投与した漿尿膜上のマウス乳腺癌では腫瘍に呼び込まれる新生毛細血管は少なく、空胞変性した漿尿膜と変性壊死した腫瘍細胞および癌真珠 (矢印) が認められる。H・E染色 ×100.

#### 写真 56

継代数4代目ヌードラットNo.38のCTVT細胞で細胞質が陽性を呈している。オイルレッドO染色 ×400.

#### 写真 57

DはイヌNo.5移植CTVT細胞、RはヌードラットNo.38移植C

T V T細胞の所見で、上皮細胞のケラチン中間フィラメントが、いずれも陰性を示している。                      ケラチン染色    ×200. (以下、

写真61まではイヌ、ヌードラット共に同一の検体を用いた)

#### 写真58

有核細胞のすべてに偏在し、筋肉細胞において筋収縮運動の本体を担うアクチンが、イヌ、ヌードラットのいずれも細胞質内に陽性像を認める。                      アクチン染色    ×200.

#### 写真59

筋肉細胞、非筋細胞の特有な多種多様のミオシンが、イヌ、ヌードラットのいずれも細胞質内に陽性像を認める。

ミオシン染色    ×200.

#### 写真60

種々の間葉系細胞に含まれているビメンチンが、イヌ、ヌードラットのどちらも細胞質に陽性像、特に核周囲に陽性像を認める。

ビメンチン染色    ×200.

#### 写真61

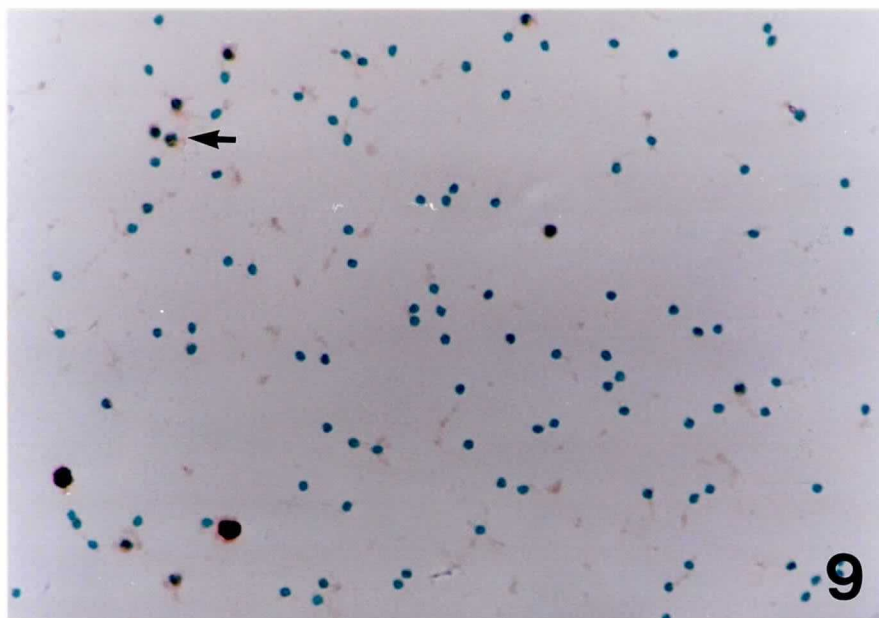
筋原性腫瘍あるいは平滑筋腫瘍、横紋筋肉腫等の腫瘍マーカーのデスミンが、イヌ、ヌードラット共、いずれも細胞質内に陽性像を認める。                      デスミン染色    ×200.

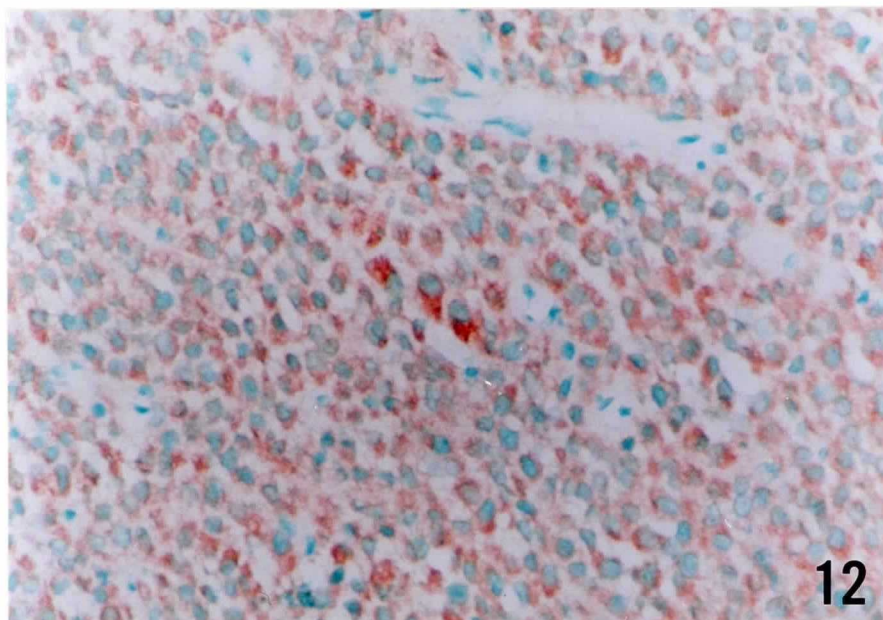
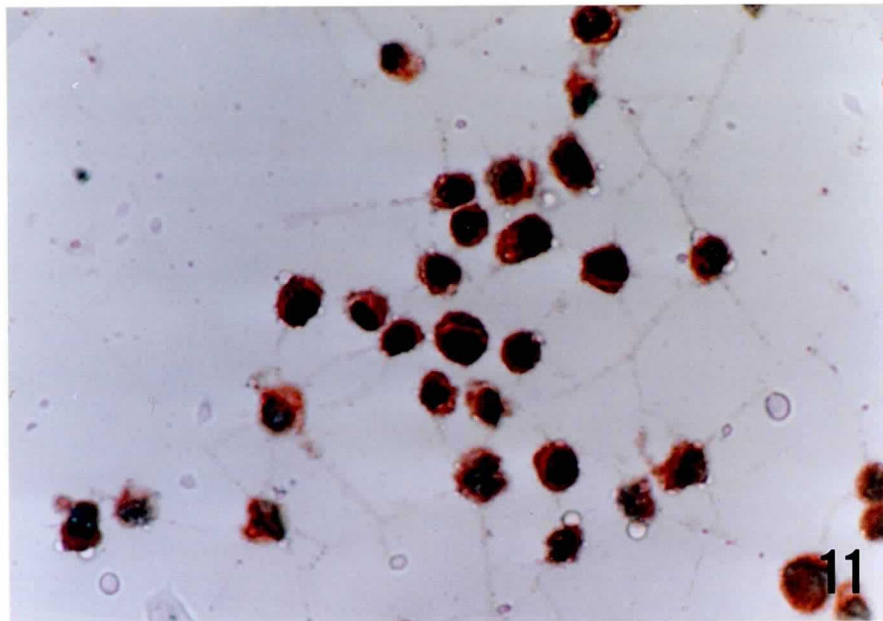




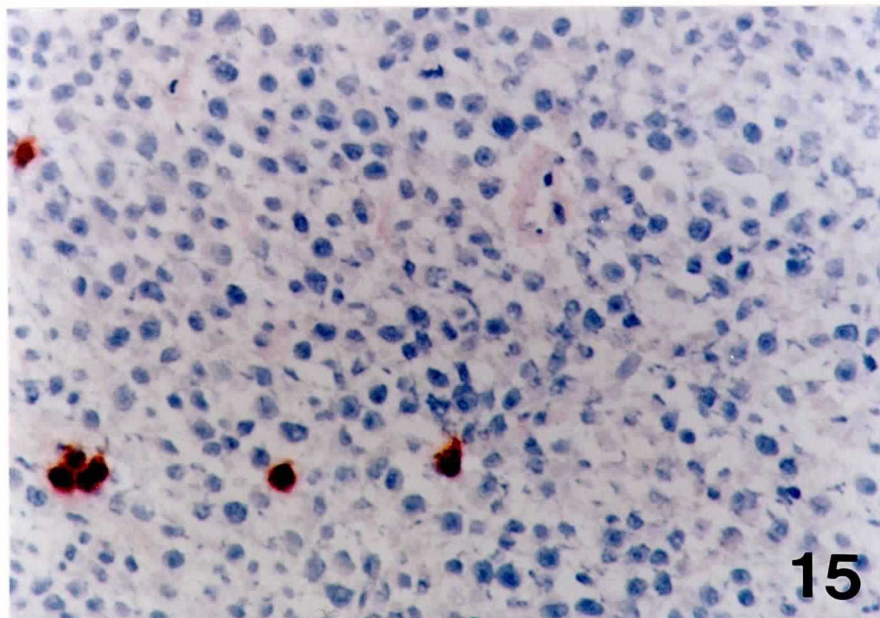
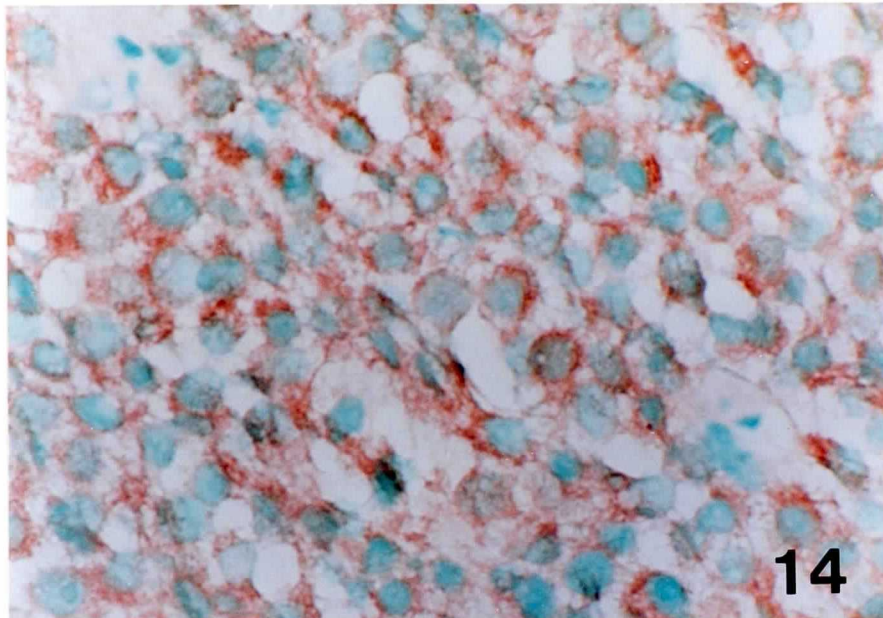
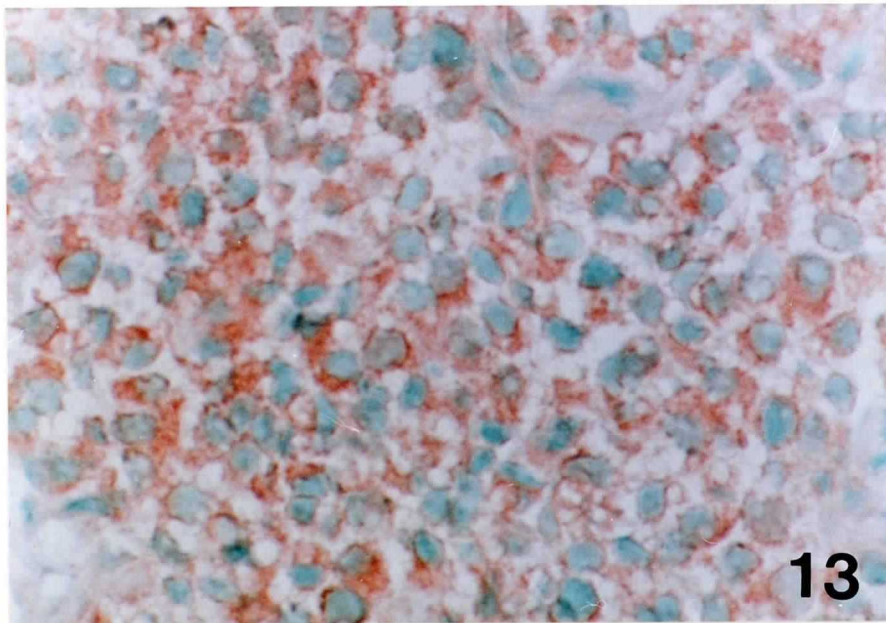


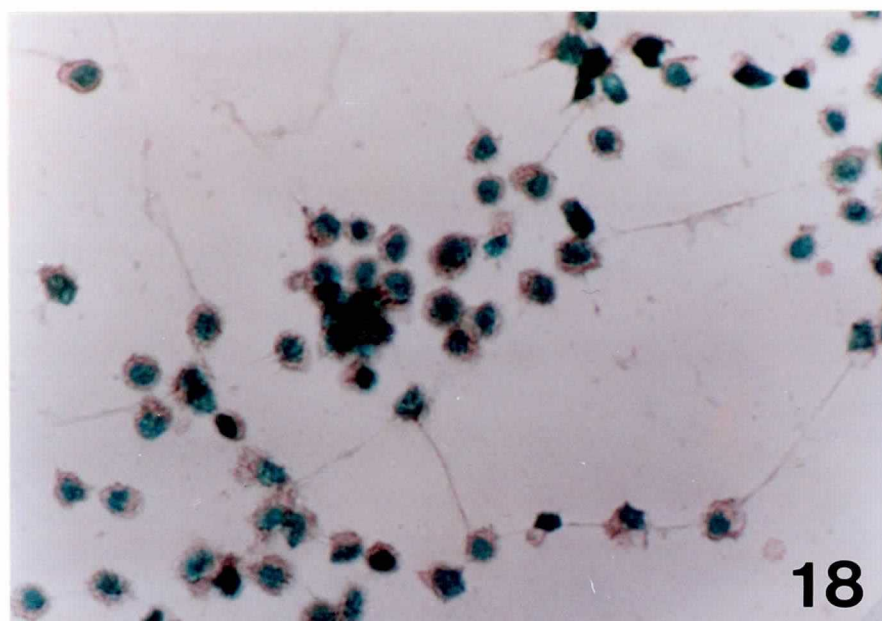
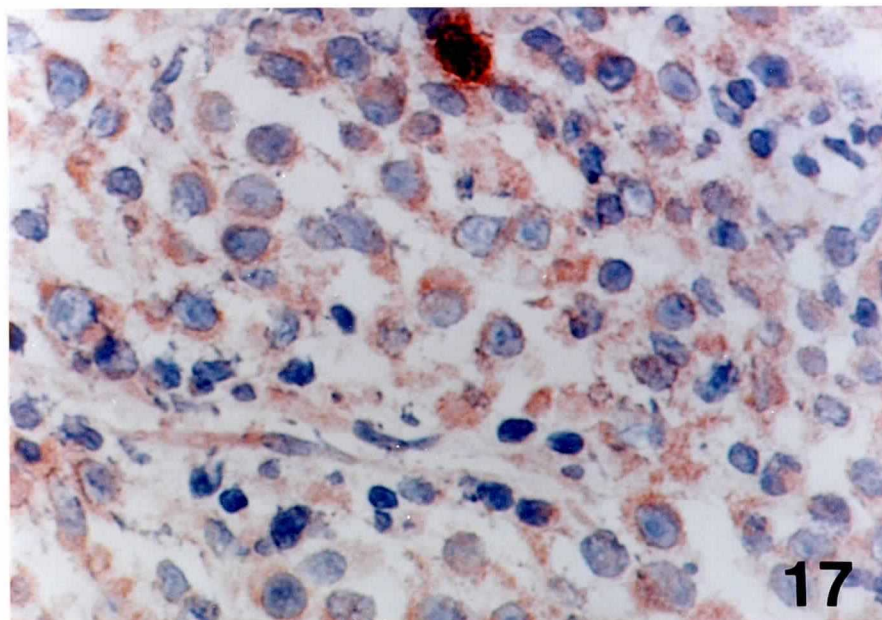
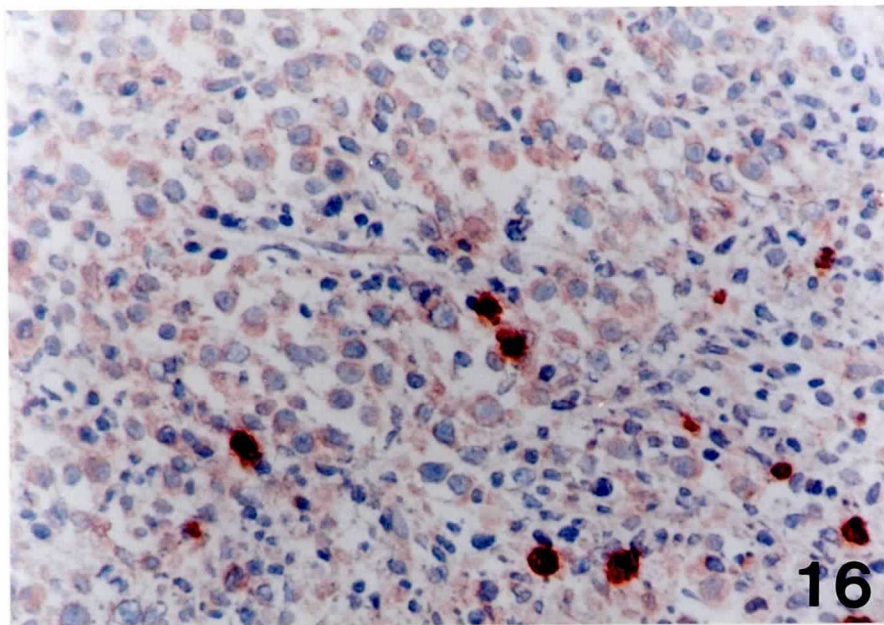




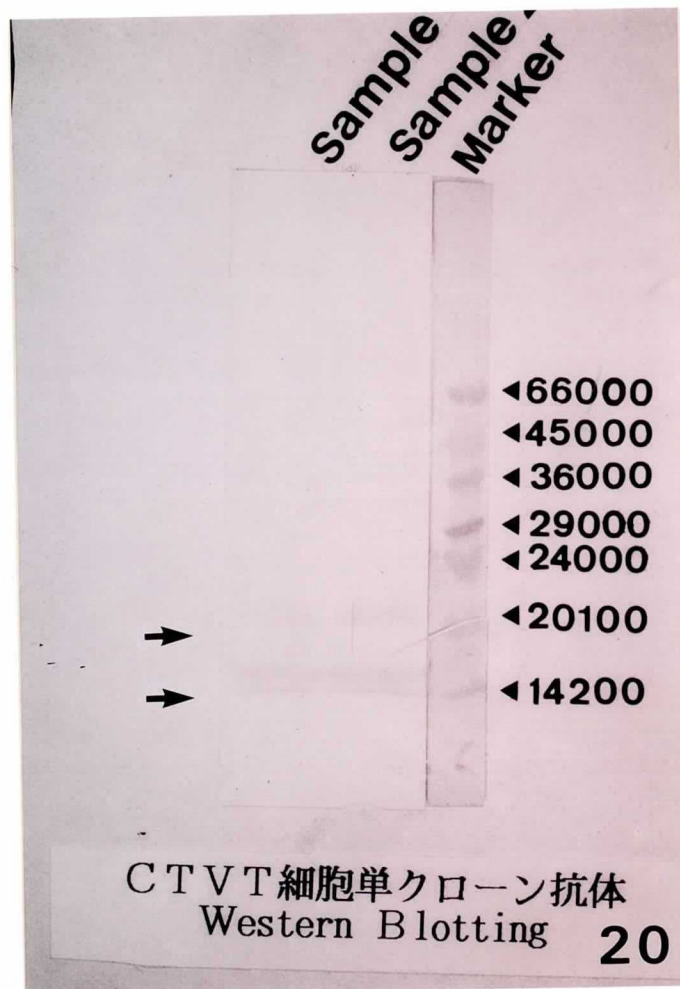
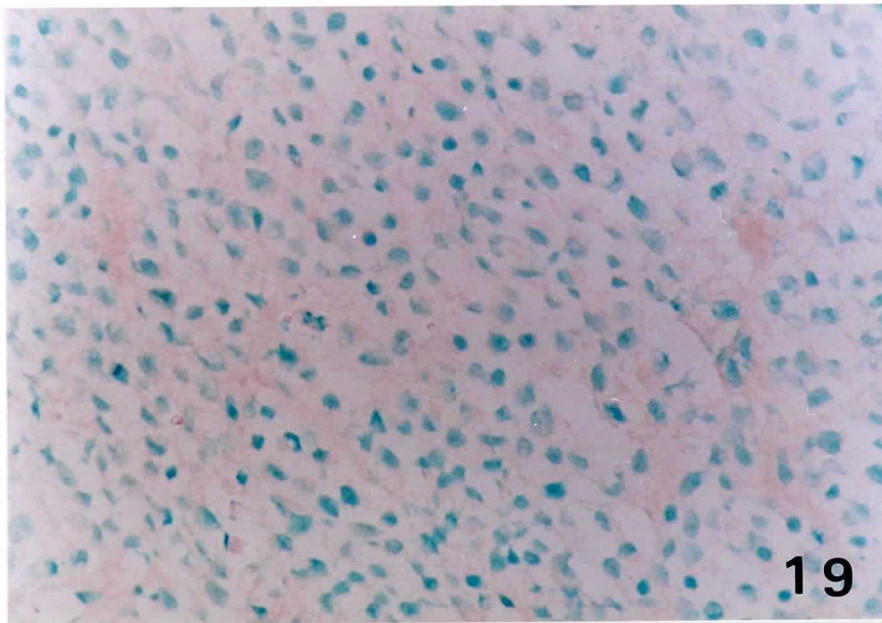


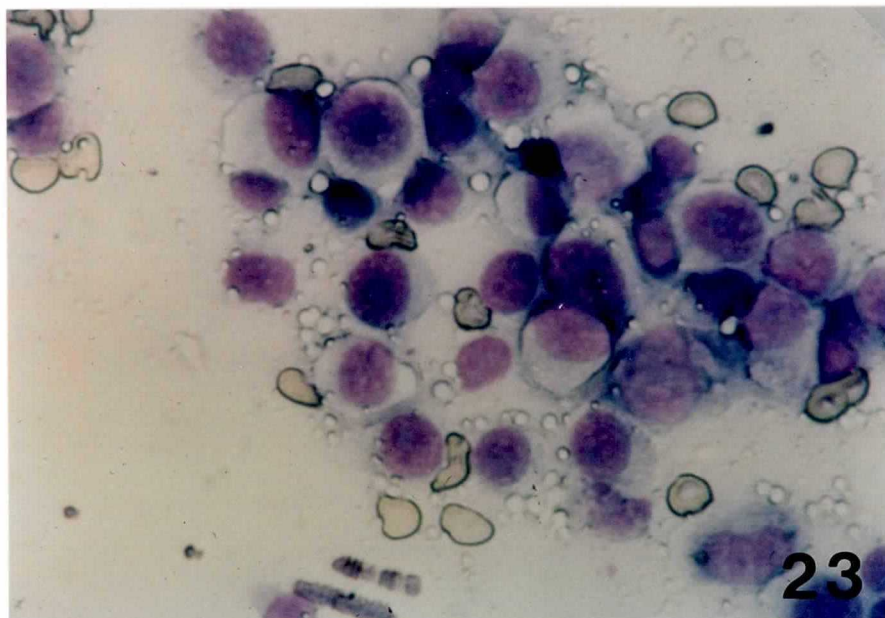
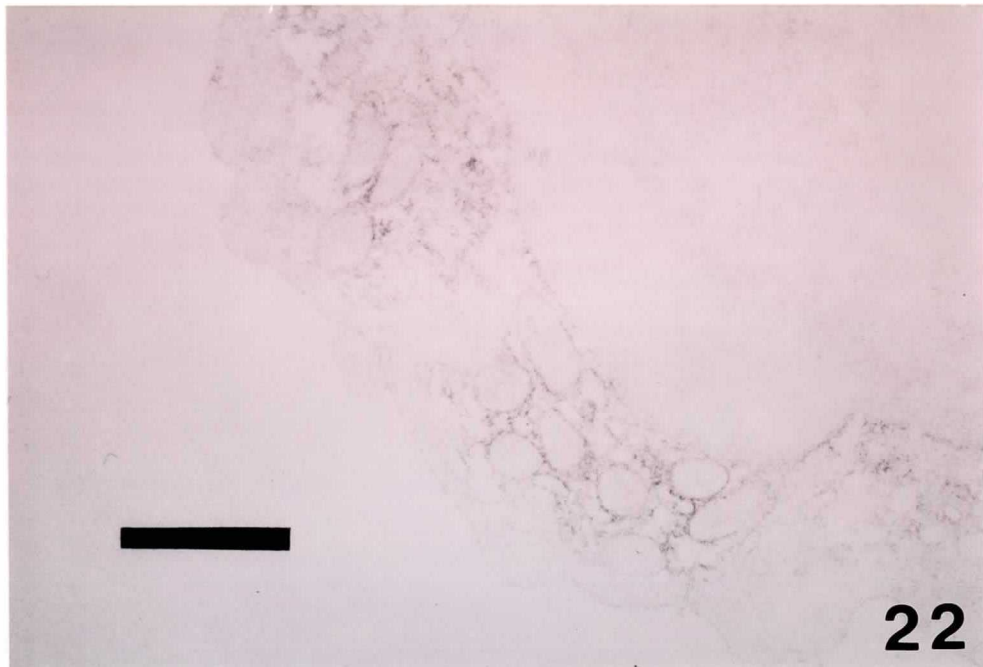
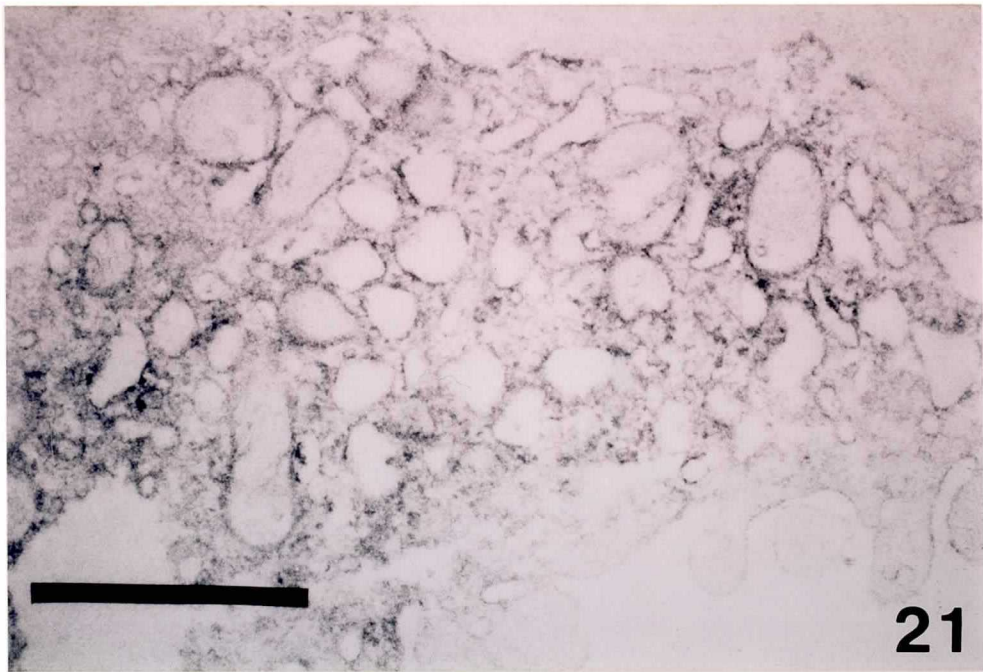




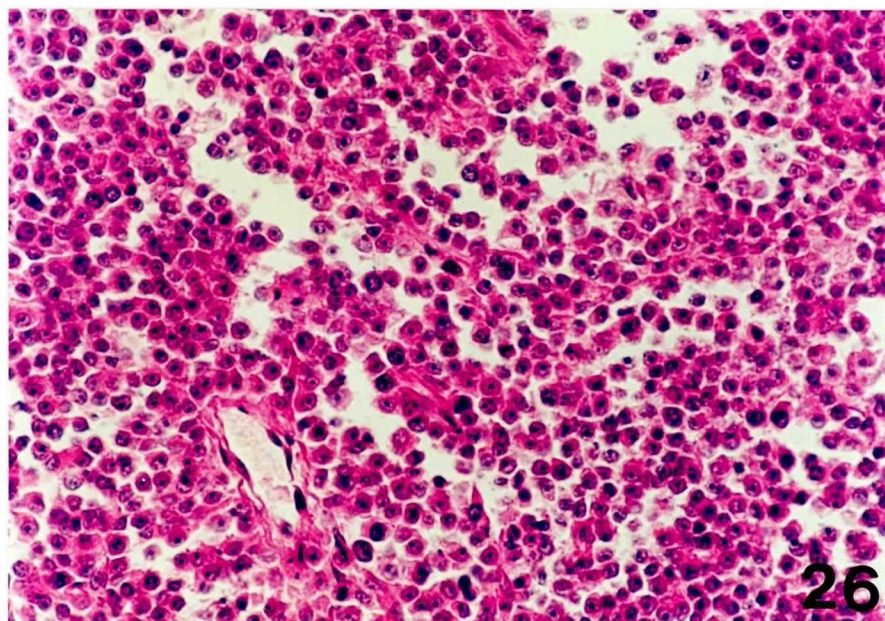
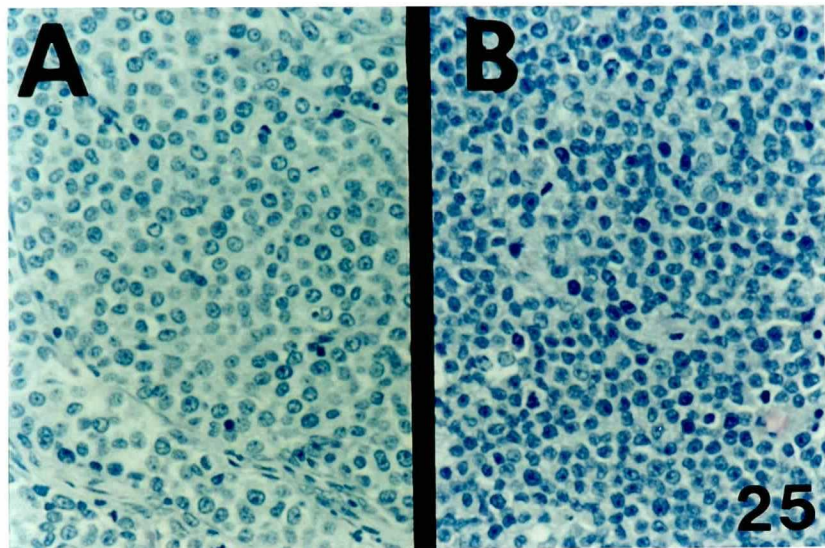
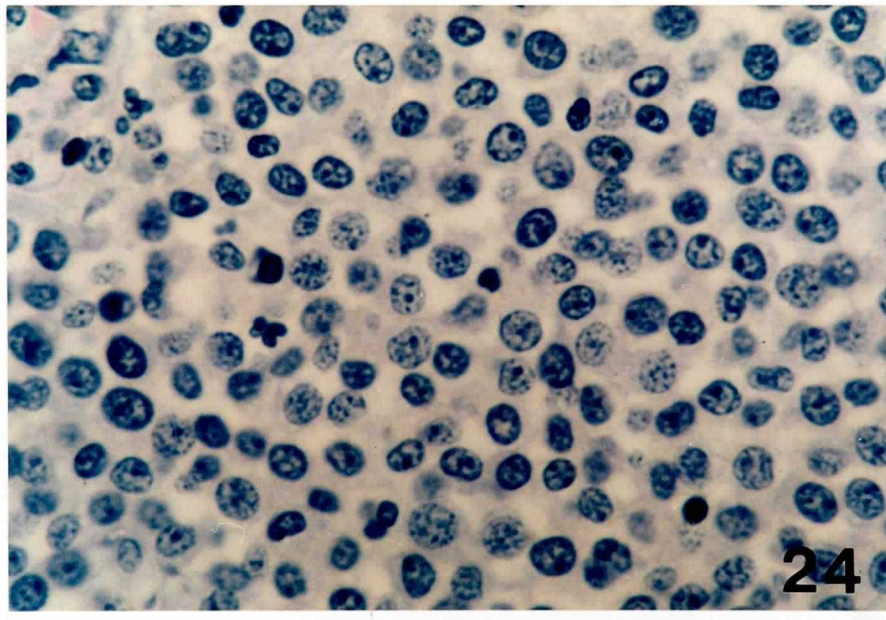




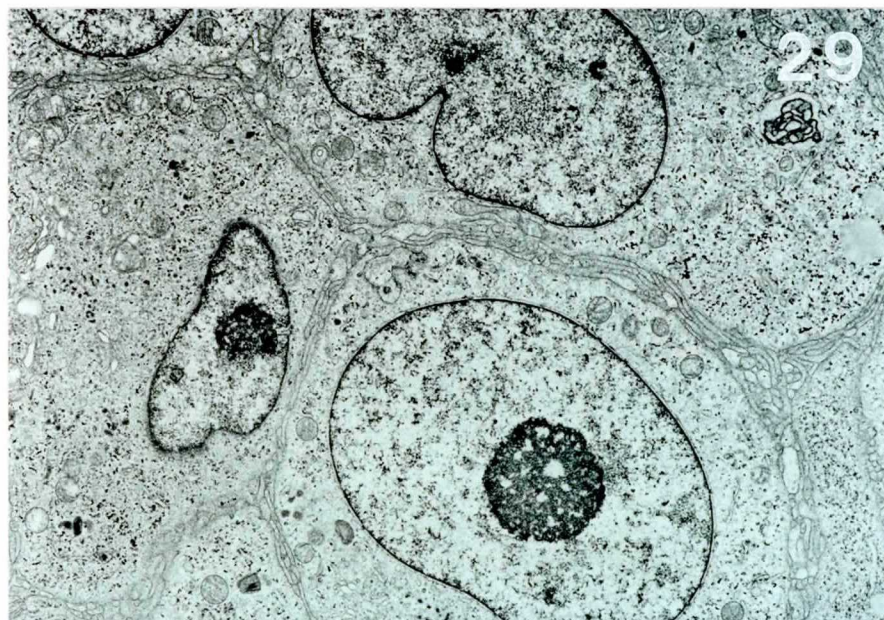
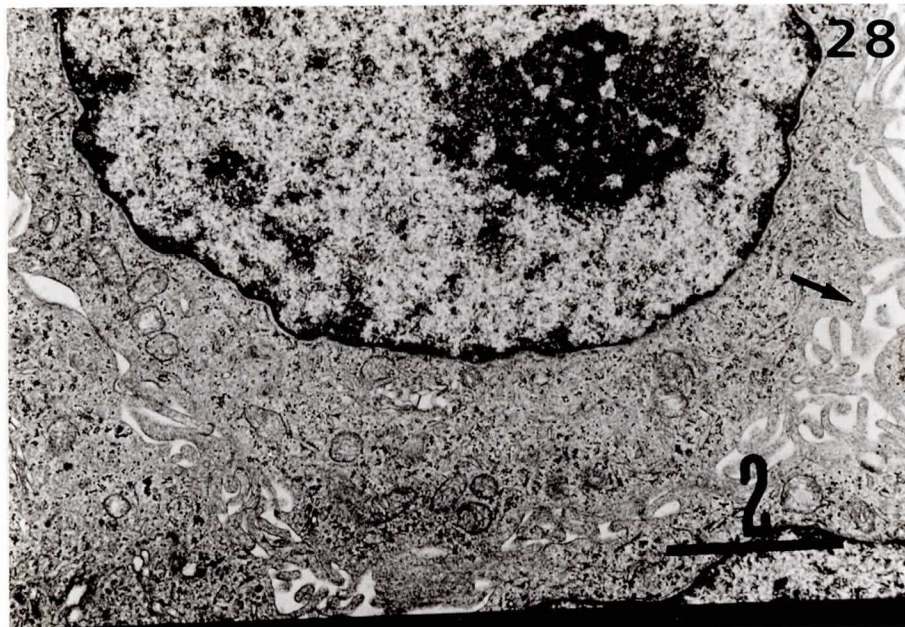
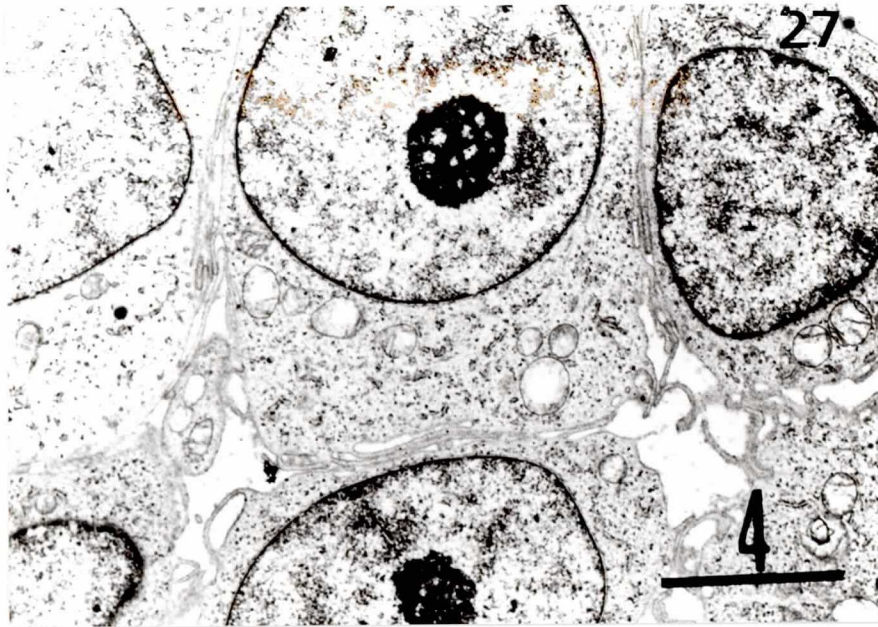




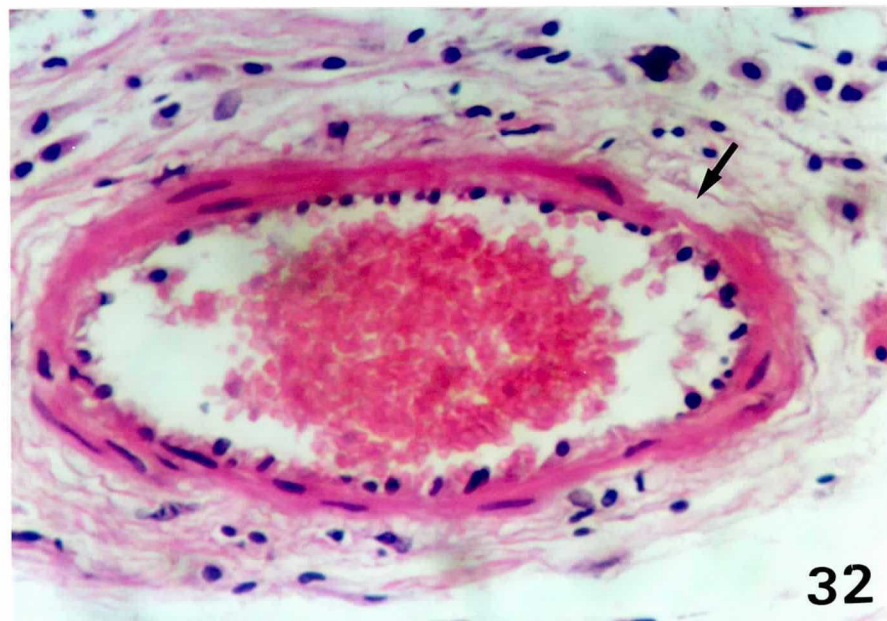
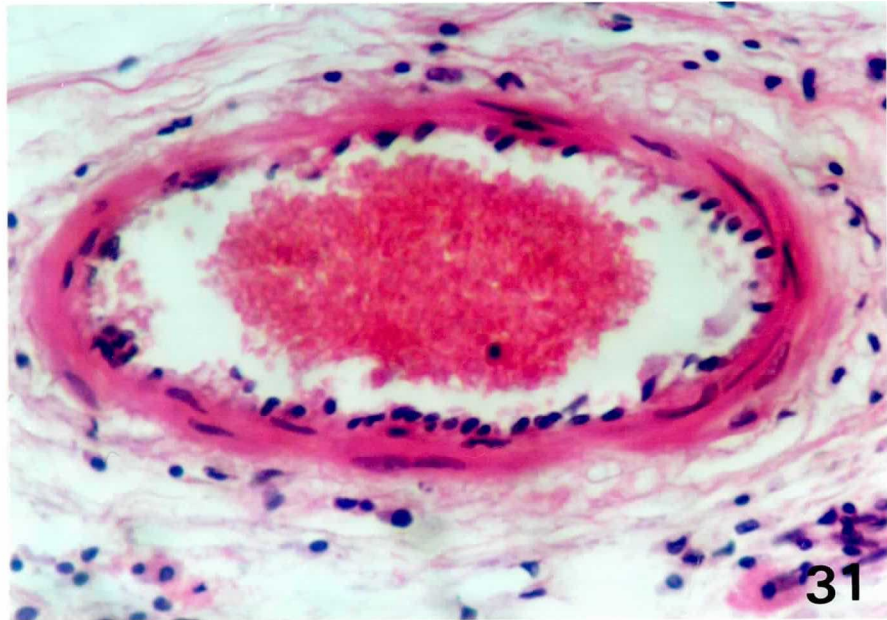
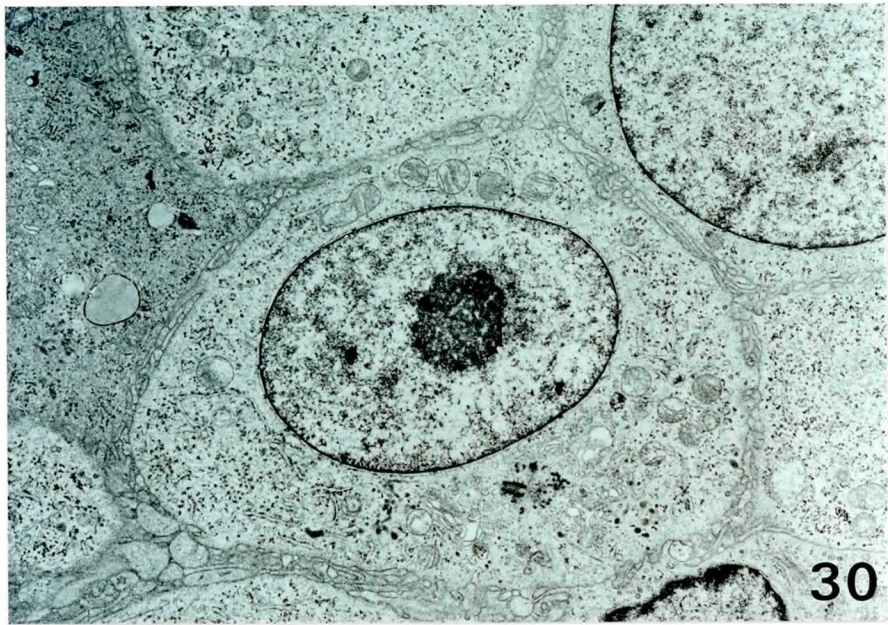


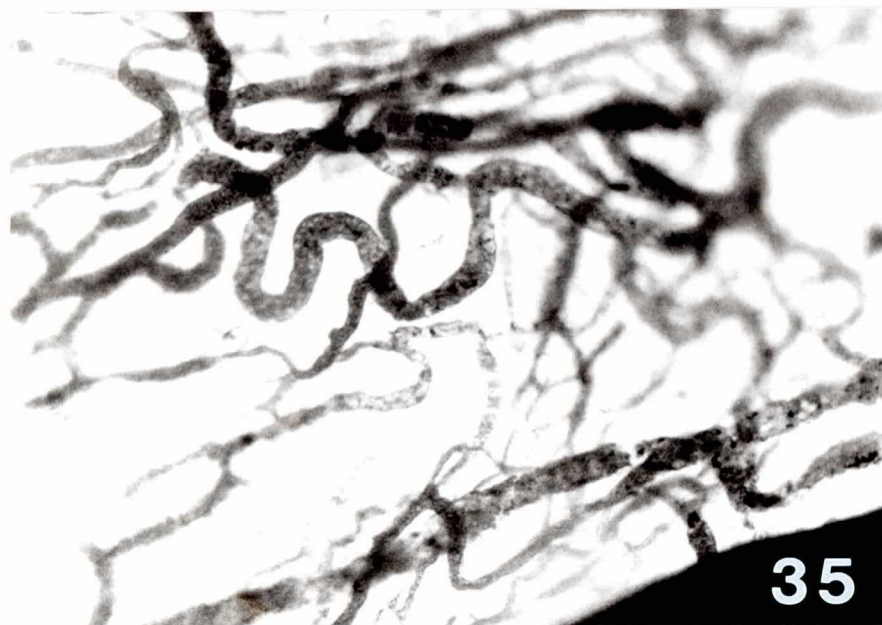
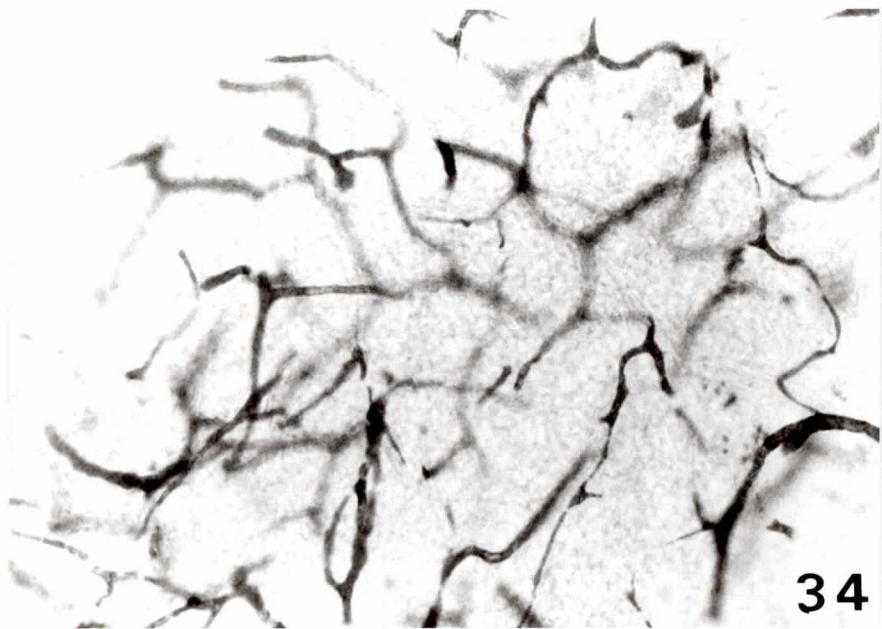
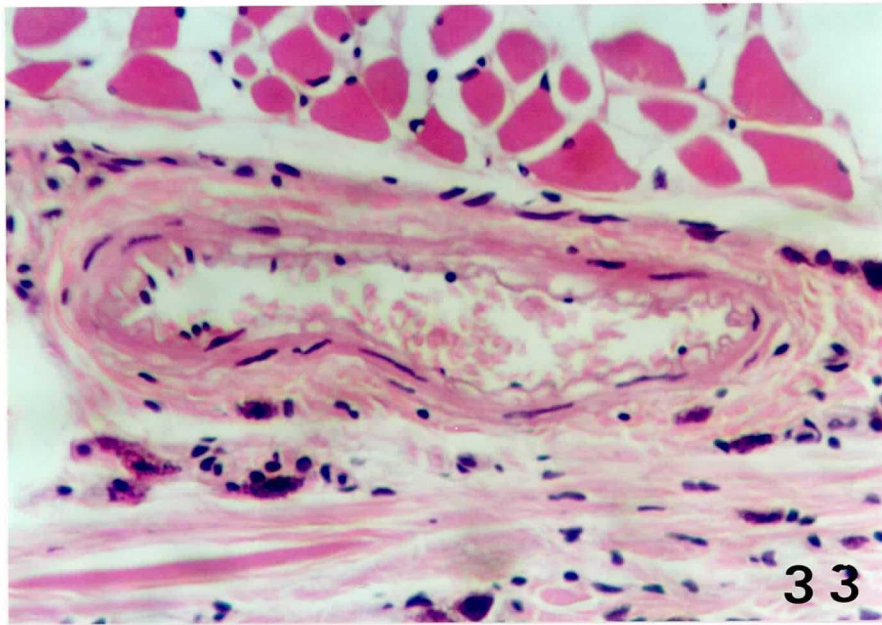










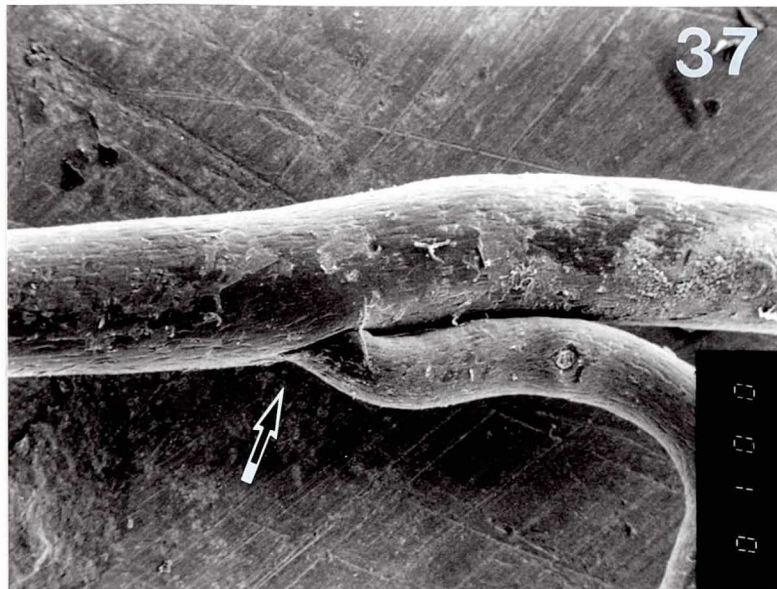




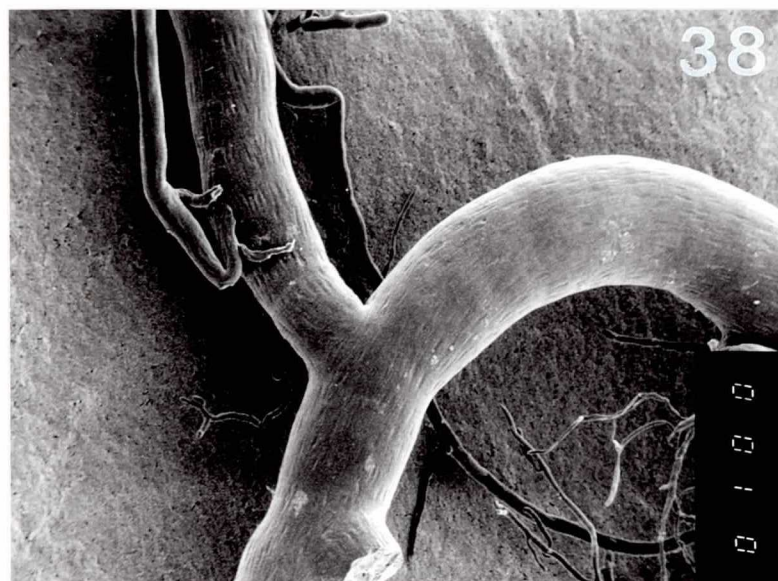
36

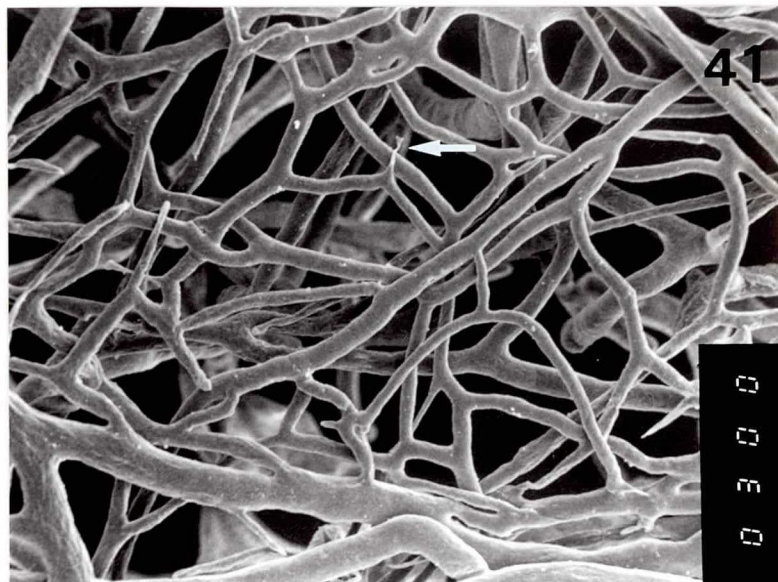
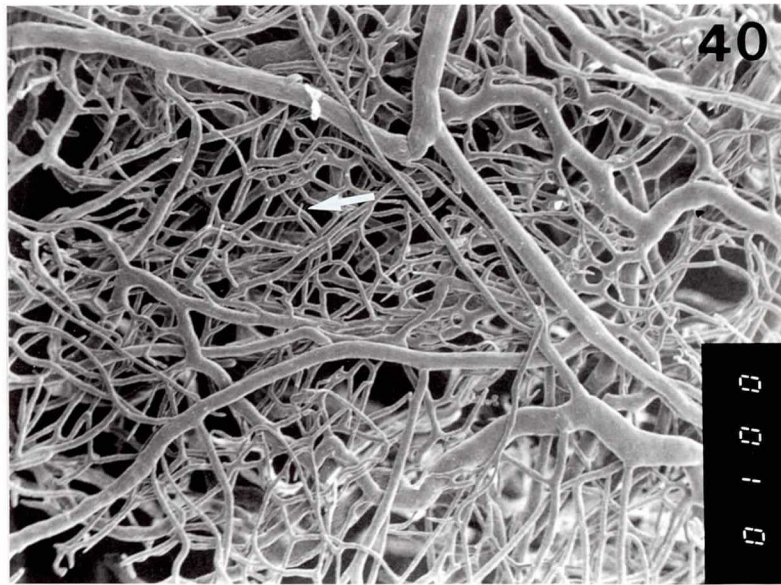
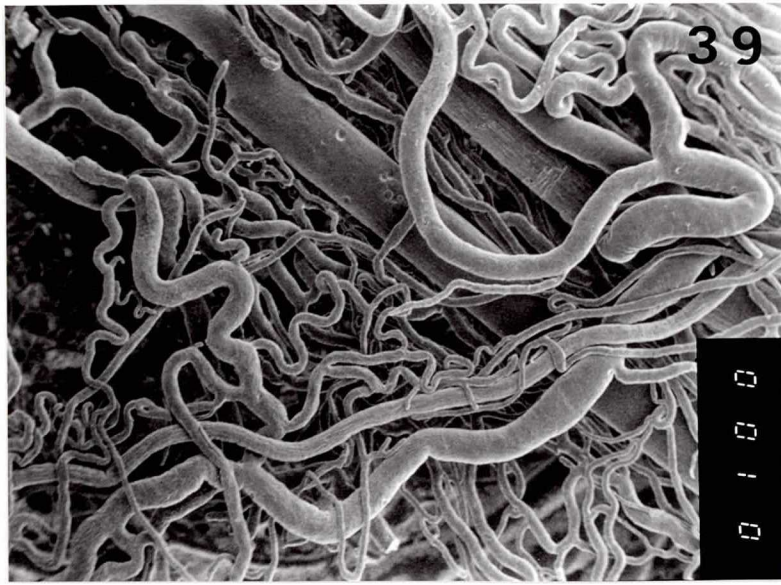


37

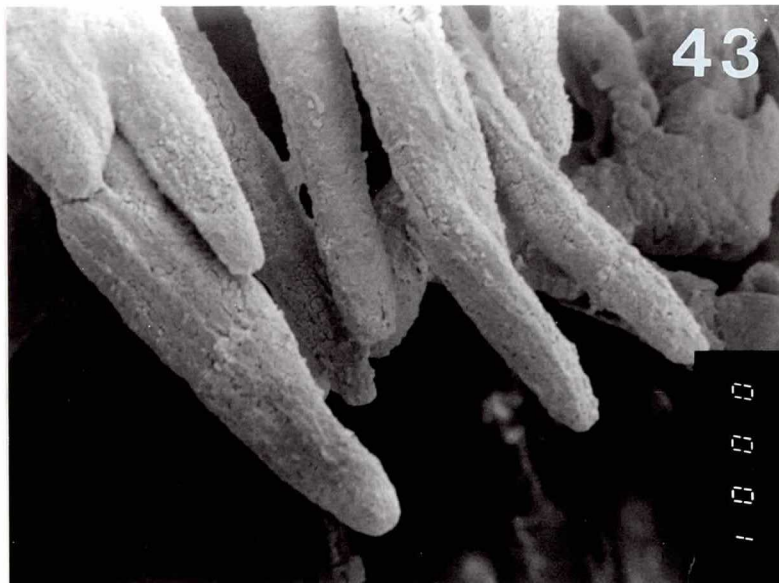
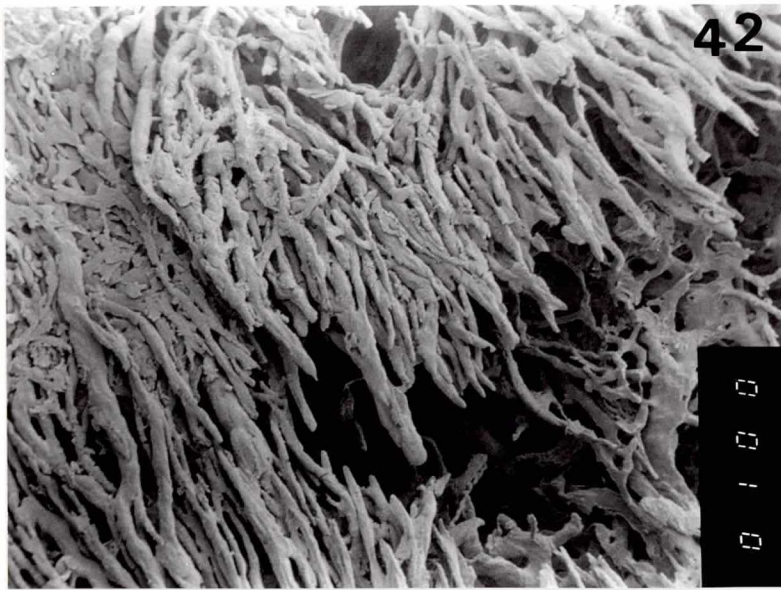


38

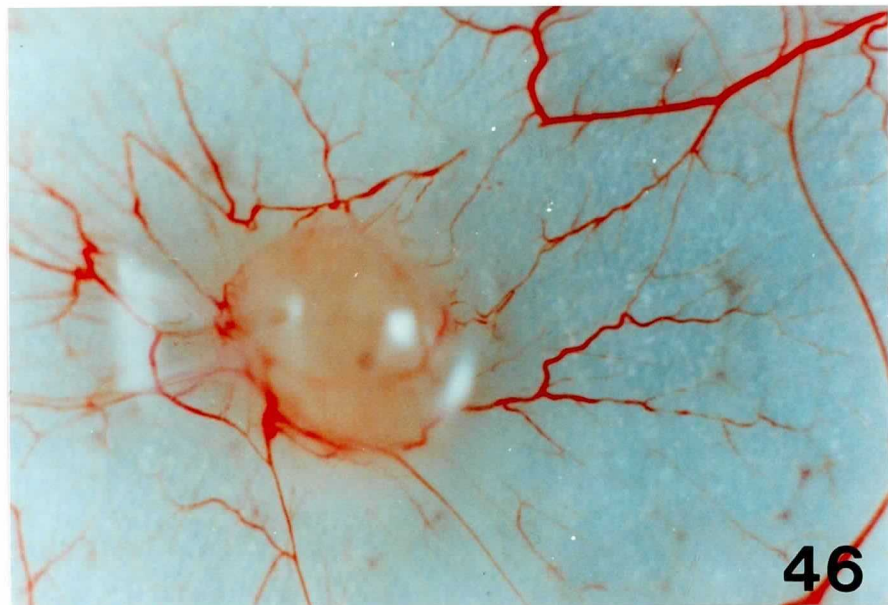


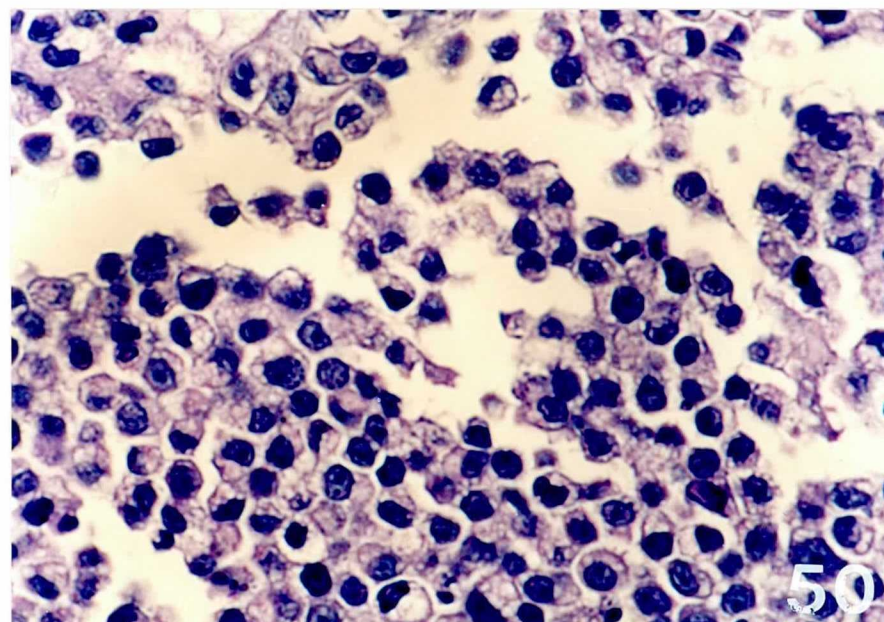
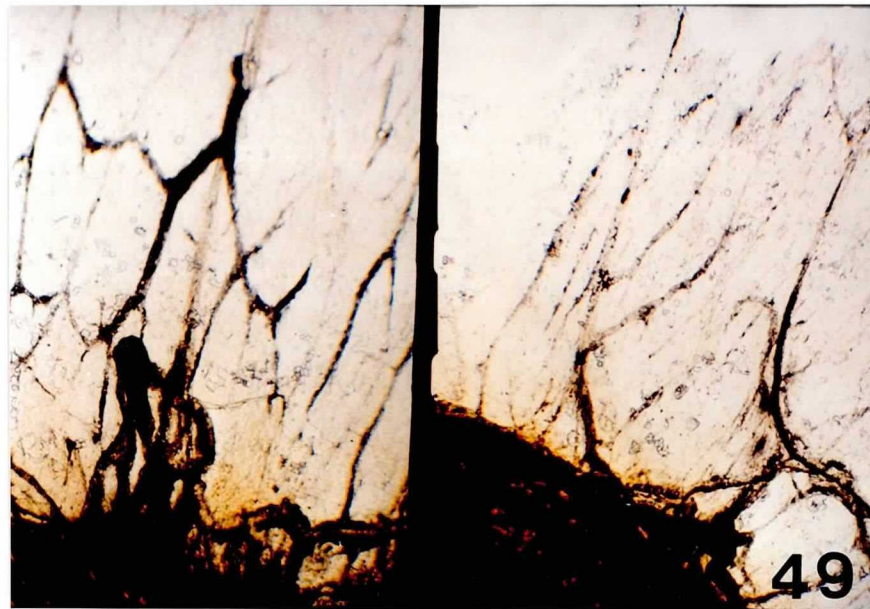




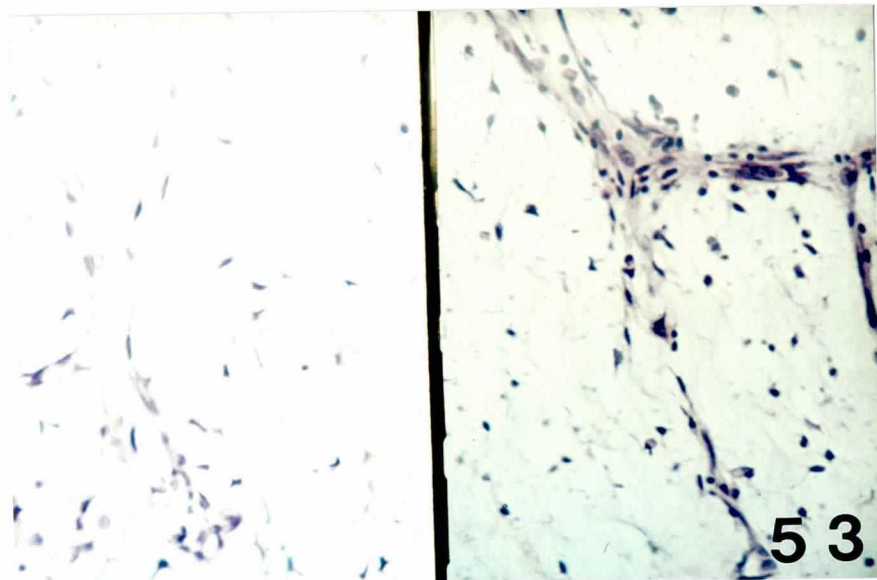
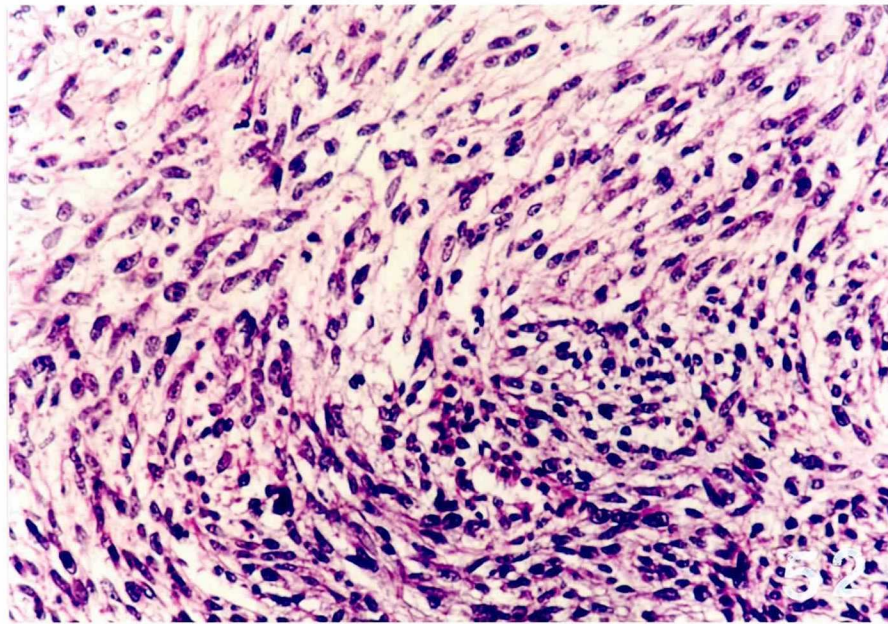
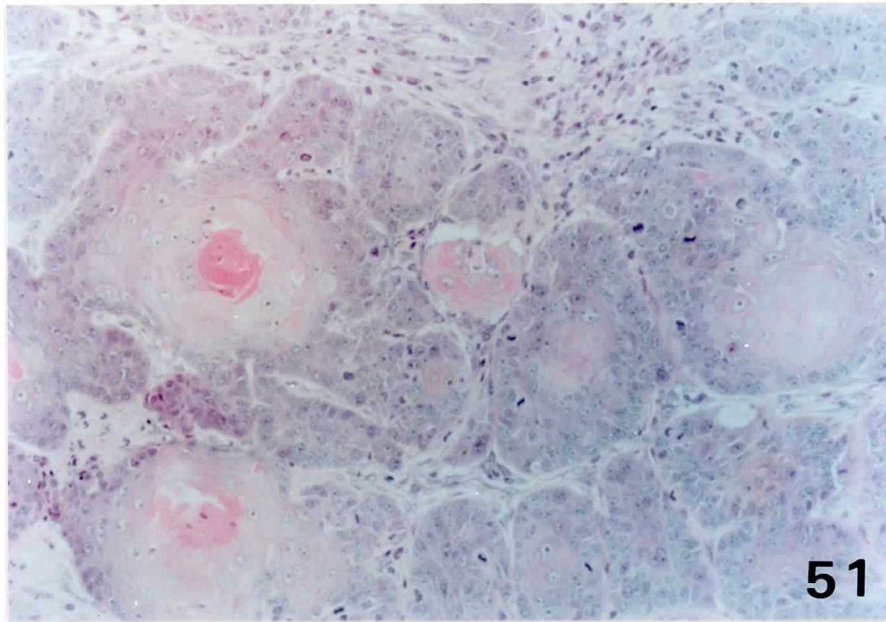




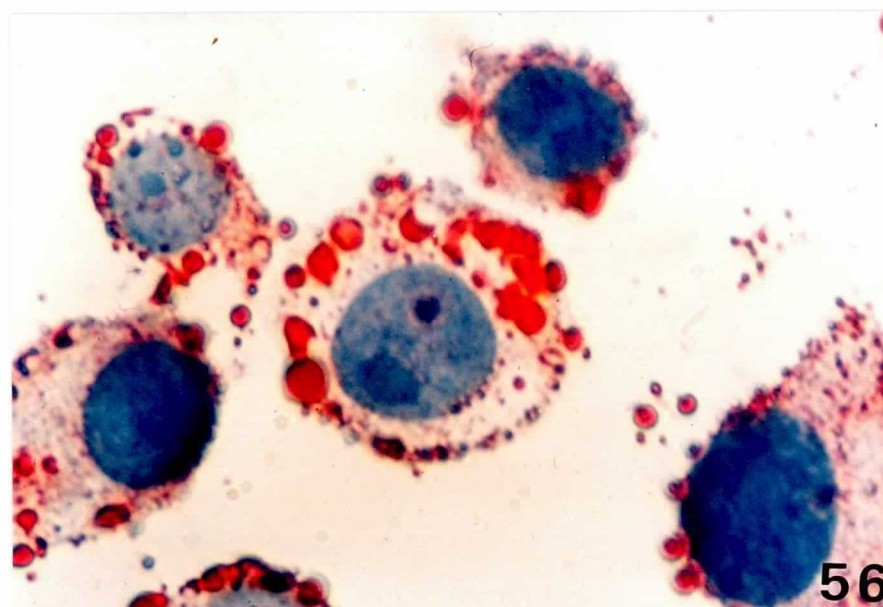
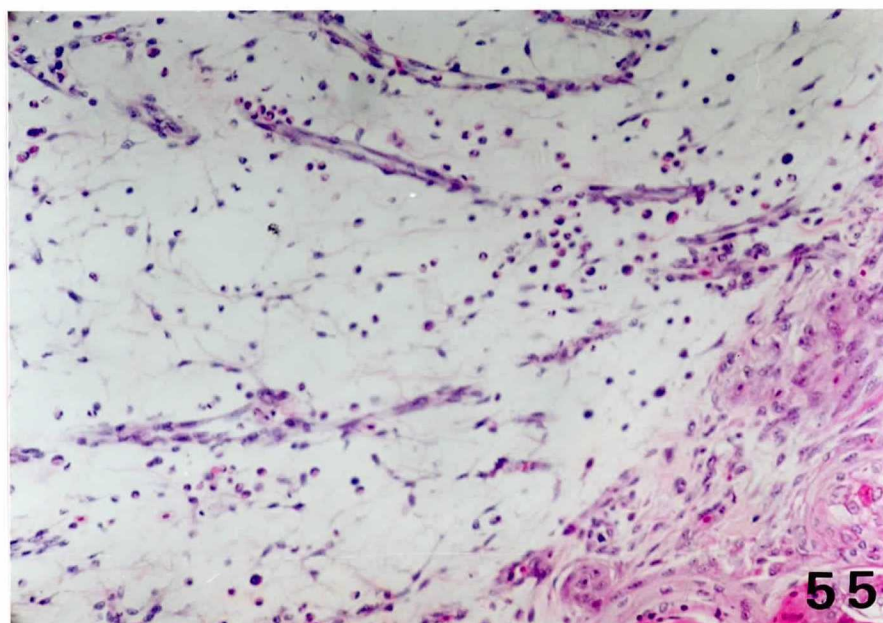
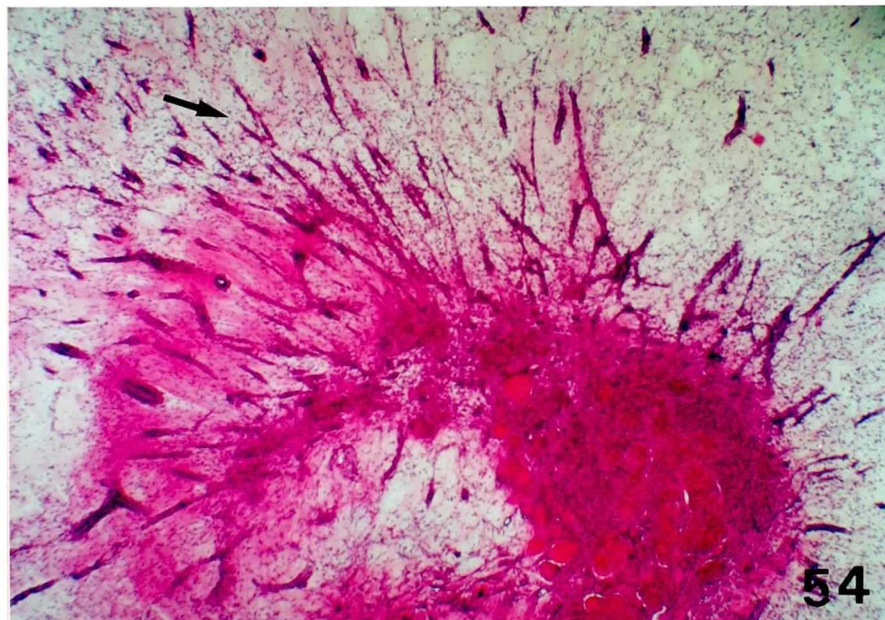


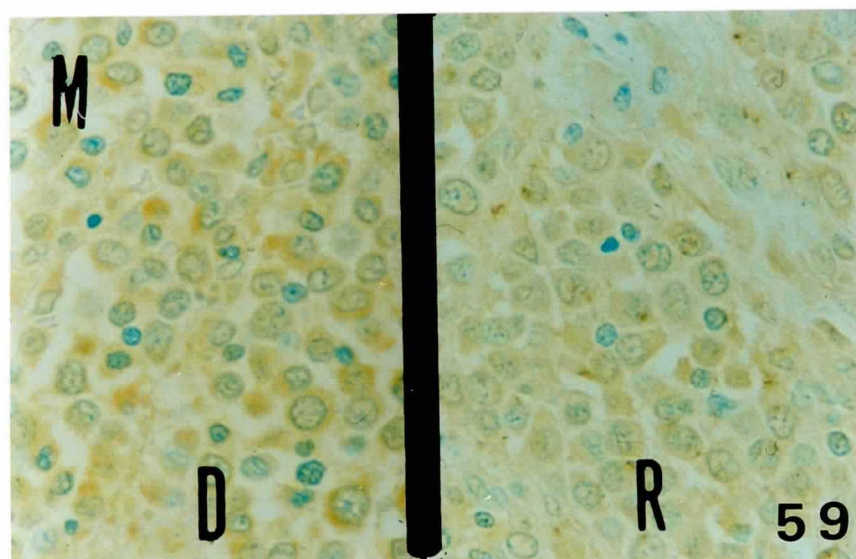
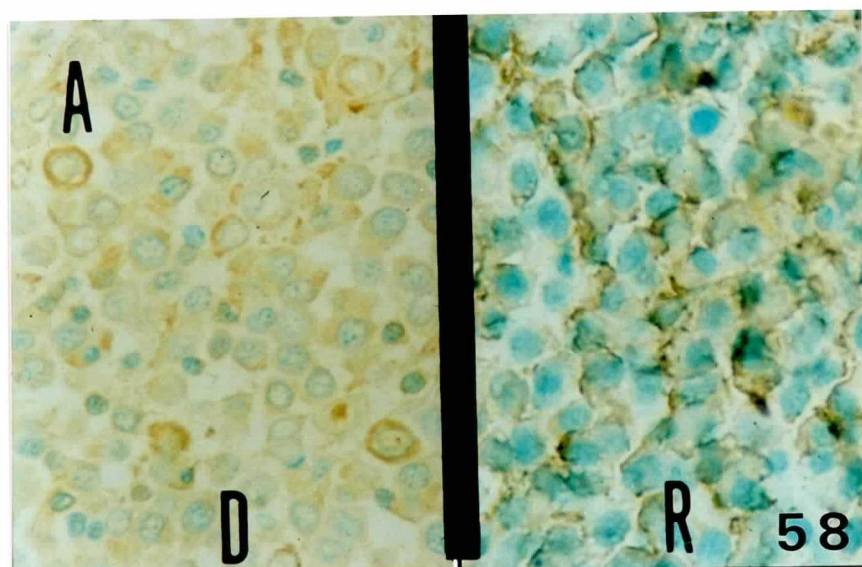
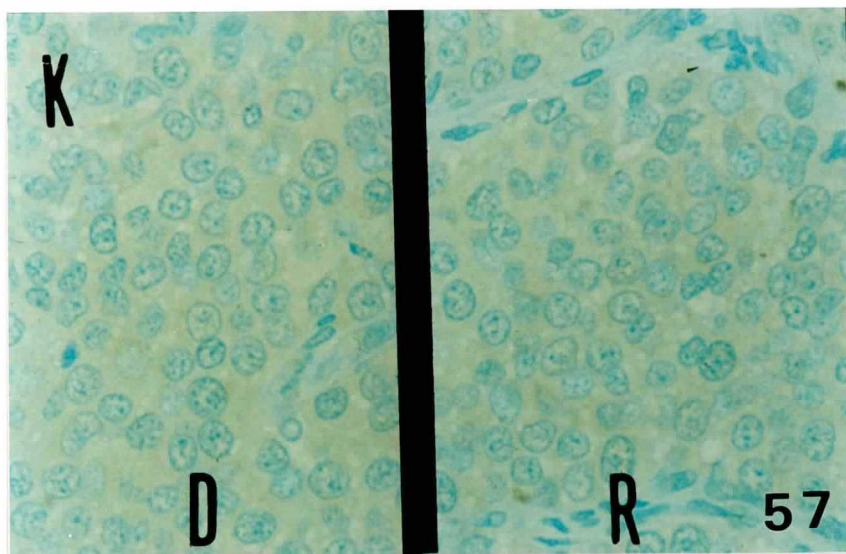




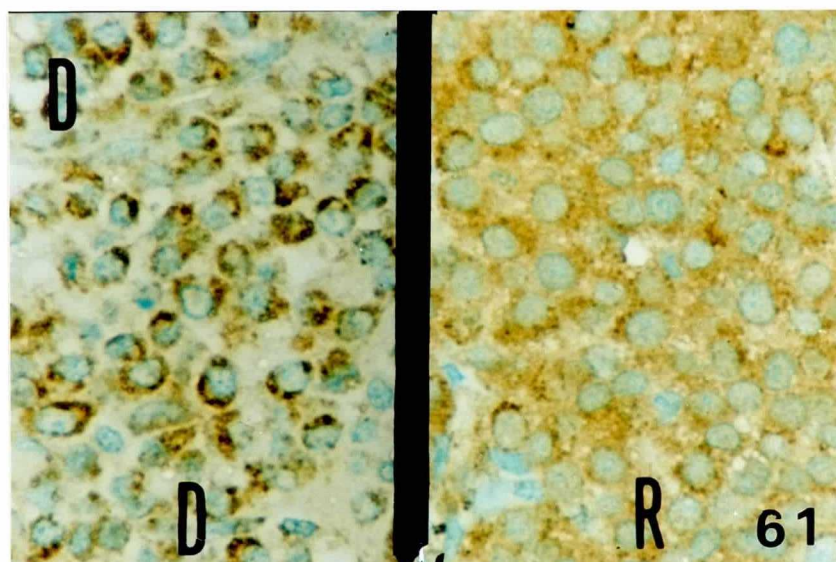
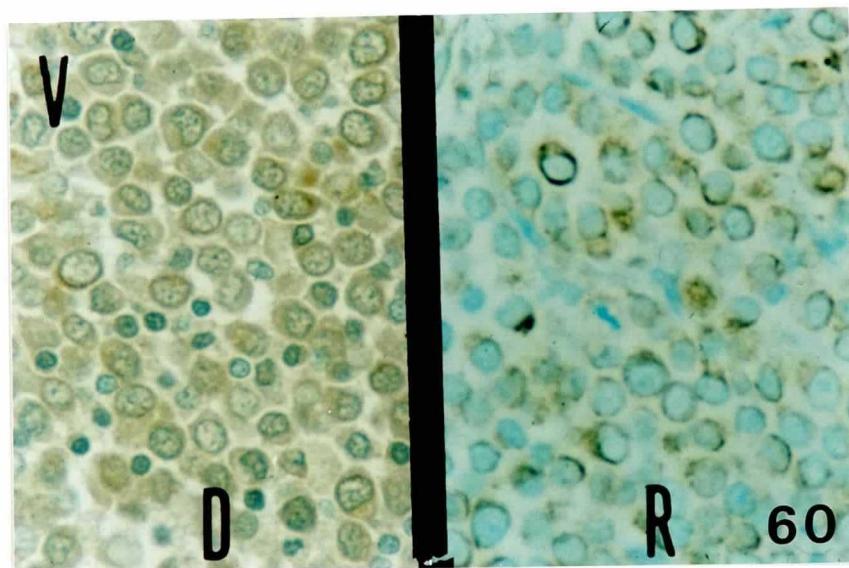














Biological Studies on Canine  
Transmissible Venereal Tumor

I s a o      N i i z u m a

Canine Transmissible Venereal Tumour (hereafter abbreviated as CTVT) is a tumor which develops on the outer reproductive organs of both males and females. It is spread during sexual contact among receptive animals. Much has been learned about this disease since the first successful experimental transmission. At present, however, many details remain unclear. For example, there are a variety of theories about derivative cells, lymph nodes, histocytes, reticular cells and so forth. There is also no fixed opinion on the mode of transmission, there being cell movement and viral theories. Reports to this point have been based only on simple transmission experiments, and observations through optical and permeating electron microscopes. In recent years, however, developments in the technology of transmission have been made, and through the use of mice and hairless rates, and through modern cell culture technology and cell engineering research, more advanced research methods are now available. This author has used these new research methods to undertake a complete experimental reevaluation of the unclear aspects of CTVT. The main objects of this research are: 1. Verify research materials and clarify results through experiments on transmission; 2. Test the development of CTVT cell stocks. 3. fix Karyo types from tissue cultures; 4. Develop CTVT monocurounaru antibodies; 5. Explain the details of blood vessel structures in CTVT tumors; 6. Test possible application of anti-cancer drug sensitivity tests and transmission tests through the transfer of CTVT to the embryonic membranes of chick ken eggs. 7. Clarify derivative cells through chemical examination of immune structures and morphological studies;

(Materials and Methods)

1. CTVT Transmission: Naturally developed CTVT were extracted from the vaginal mucous membranes of lab animals. These CTVT samples (Hokudai Strain) were obtained from the domestic animal laboratory of The University of Hokkaido Department of Veterinary Science. From  $3 \times 10^6$  to  $5 \times 10^6$  living cells were prepared using a single cell suspension. These were then injected subcutaneously into the various parts of the abdominal cavities of nine three month old dogs and 96 five to six week old hairless rats. After about three or four months, the succeeding generation was again transmitted to dogs and hairless rats.

2. CTVT cell culture: Portions of tumors were extracted in a sterile environment. These were then rinsed three times in PBS with kanamycin added. The tumor cells were then re-suspended in a growth medium. The conditions of the culture were:  $1 \times 10^6$ /ml living cells controlled at 37 C with 5% CO<sub>2</sub>.

3. CTVT cell Karyo types: A single cell suspension was formed of extracted tumors, and the growth medium was supplemented in the usual fashion to produce a final korsemido density of 0.2ug/ml. This was dyed with giemsa and observed under an optical microscope.

4. Production of monocurounaru antibodies: Portions of tumors were extracted using sterile methods. A mixture of  $1.5 \times 10^7$  cells was prepared, and introduced through inoculation into the stomach cavities of eight week old balb/c mice. Immunization was conducted five times. After the final



immunization, and following standard procedures, HAT selection method, ELISA method and (indirect) enzyme antibody methods were carried out.

5. Observation of tumors by optical microscope: Extracted tumors were treated in the usual manner, and sections were dyed with H.E dye, Watanabe silver dye, Azanmarorie dye, etc., and examined through an optical microscope.

6. Observation of tumors by electron microscope: Extracted tumors were treated in the usual manner, ultra-thin sections were produced, and electron microscope examinations undertaken.

7. CTVT blood vessel structures: After transmission to hairless rats, the tumors were allowed to develop for from four to five months. Rats with tumors the size of a hen's egg were then used. Blood was released from the right ventricle, and the entire body was irrigated with Ringer's solution with heparin added. they were then injected with merucokkus resin. The rats were liquified in a solution of 20% caustic soda, and the specimens were examined by microscope. A scanning electron microscope was used.

8. Testing of anti-cancer drug sensitivity through introduction into hen's eggs: Extracted CTVT and other tumors were transplanted into the embryonic membranes of hen's eggs which had been in the embryo stage for eleven days. Tumors developed after three days. The newly emerged blood vessels were examined, and then anti-cancer drugs were introduced into the yolk of the egg. Four days later the growths were dissected and blood vessels counted, with particular attention

being paid to tumors.

9. Chemical examination of the immune structures of transmitted tumors: Extracted tumors were treated in the usual manner, and the cell protein components of the inner cells were examined. Optical microscopic observations of methyl green dyed nuclei were made. For paraffin sections, keratin, desumin, bimenchin and mioshin were used, and for forzen sections, actin chuburin.

## Results

1. Results of CTVT transmission: There is to this point in transmission to dogs through subcutaneous introduction of the tumors. This has extended through three generations. For hairless rats, the subcutaneous transmission success rate is 100%, extending over twelve generations.

2. Observation of CTVT cell cultur: As the culture developed, suspended cells formed clusters with sprout like strands of cells, maintaining the condition of attached circles of cells. As the circles of cells diminished, so the cultures died off about thirty days after having been started. However it was possible to continue suspended cell cultures through eight generations.

3. CTVT cell karyo types: CTVT cell chromosomes transplanted into dogs were examined for karyo types, the result being the observation of seventeen Biarm chromosomes and forty two Acrosentric chromosomes from a total number of fifty nine chromosomes examined for karyo types. Fifty cells were examined from hairless rats, and the presence of 56-61

chromosomes was confirmed. The peak was confirmed as fifty nine.

4. Results of the production of monoclonal antibodies: Colonies within wells were confirmed, and from two to three weeks later fused cells were seen to propagate in 114 wells out of 348. Screening was accomplished for almost 30% of the wells. The cultures were checked for purity following accepted methods. Sixty wells which were confirmed to be producing antibodies were cloned twice, and the final result was to obtain one clone. Though it was very feeble, it was positively confirmed through electron microscope examination to have cell membranes.

5. Findings of optical microscopic examination of tumors: Naturally developed and artificially transmitted tumors showed almost identical formation in terms of tumor cell size (10-12um), and circular or elliptical shape. The tumor cells resembled large lymph nodes. Bloodletting and the development of granulation structures in ulcerated sections were confirmed.

6. Findings of electron microscopic examination of tumors: Tumor cells were seen to be many cornered rather than truly elliptical, and it was very difficult to find distinctions between naturally developed and transplanted tumors. Also, microfilaments were distributed uniformly throughout the cell body, and it was determined that mid-diameter filaments traveled throughout the cell. Virus corpuscles were not seen.

7. CTVT blood vessel structures: In normal arteries, branching in the intra-arterial cushion can be confirmed. As



a tumor is approached, the contours of the intra-arterial cushion become less clear, and they do not exist in the arteries inside the tumors. Also, in terms of histology, artery walls within the tumors show changes, and the presence of fibers can be verified.

8. Testing of anti-cancer drug sensitivity through introduction into hen's eggs: The rate of transplantation of CTVT and other tumors to the embryonic membranes of hen's eggs was approximately 85%. The average rate of effectiveness of anti-cancer drugs on tumors produced on embryonic membranes a rate of decrease of production of new blood vessels was determined as an effect.

9. Chemical examination of immune structures of transplanted cells: Kerachin dye reacted negatively, desumin dye had a very strong positive reaction throughout the inside of the cell, bimenchin dye; low to moderate positive reaction, akuchin dye; positive reaction with mid-level permeation, mioshin dye; uniform positive reaction of low to mid levels.

#### Summary

There is a high rate of success in experimental transfer of CTVT to dogs and hairless rats. This suggests that CTVT has a use as a research material for studies of tumors in general.

Observation of CTVT cell culture: As the culture developed, suspended cells formed clusters with sprout like strands of cells, maintaining the condition of attached circles of cells. As the circles of cells diminished, so the

cultures died off about thirty days after having been started. However it was possible to continue suspended cell cultures through eight generations.

As concerns CTVT cell karyo types, this study confirms previous reports that chromosomes number 59 in dogs. Hairless rats show 56-61, with a peak visible at 59.

Manufactured CTVT monokurounaru antibodies were used, and positive reactions were seen when both the current tumor cells and Hokudai strains were dyed. This indicates that the present monokurounaru antibodies can be an effective marker for these tumor cells.

The modulation of blood flow which is normally observable in the intra-arterial cushions is not confirmed in the blood vessel systems of CTVT. Artery walls show changes, and the structure can be thought to be missing the ability of automatic contraction. It may also be thought that the special characteristics of this type of blood vessel construction are related closely to the peculiar blood flow patterns inside tumors.

With respect to the transplantation of tumors to the embryonic membranes of eggs, the focus is on the development of new blood vessels. Doses of anti-cancer drugs inhibit this blood vessel development, and the total number of blood vessels is reduced.

Observations of CTVT tumor cells by optical and electron microscope reveals that almost all cells have a roundish shape, and this conforms to previous research reports.

To seek the origins of CTVT cells in immune histochemical observation, we can note that they are Kerachin negative and

desumin and bimenchin positive. This points to the non-epidermal cell character, and in particular suggests that the origins are in immature muscle cells. The previous lymph node explanations, histological explanations, reticular cell explanations, nerve cell explanations and epidermal cell explanations are not supported by this examination. It would appear that a new examination of this problem is in order.

Looking at the evidence from CTVT cell cultures, we see that although cultures die off after about thirty days, the continuation of eight generations is possible through cell suspension.