

氏名(本籍)	ニ 新 フマ 妻 イ 勲 マ 夫 （東京都）
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第298号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題目	イヌの可移植性性器腫瘍の生物学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 中村 経紀 (副査) 教授 江口 保暢 教授 野村 靖夫 教授 土屋 新男 助教授 二宮 博義

論文内容の要旨

イヌの可移植性性器腫瘍 (Canine Transmissible Venereal Tumour, 以下CTVTと省略する) は雄の外部性生殖器に発生する腫瘍で、感受性のあるイヌが交尾することによって伝染する腫瘍である。また、実験的に移植が成功した最初の腫瘍といわれ、多数の業績が報告されている。しかし、詳細については不明の点の多いのが現状である。例えば、由来細胞についてもリンパ球、組織球、細網細胞等と諸説があり、伝染様式についても、細胞移植説やウイルス説等があり一定していない。これまでの報告は単純な移植実験や光学顕微鏡、電子顕微鏡の観察によるものであった。近年、移植技術の向上、ヌードマウス・ラットの使用、細胞培養技術の進展および細胞工学的な研究手段も普及してきている。そこで、著者はこうした最新の研究手段を用い、不明の点の多いCTVTについて改めて総合的に検索することにした。研究の主体は、①移植実験により研究材料の確保と移植成績を明らかにし、②CTVT細胞の組織培養を試み、③移植CTVTの染色体、核型 (Karyotypes) の同一性を確認し、④CTVT細胞のモノクローナル抗体を作成、⑤CTVTの血管の特徴を明かにし、⑥CTVTを鶏胚の漿尿膜に移植、移植成績と抗癌剤投与による影響について観察し、⑦CTVT細胞の起源を明かにするために免疫組織化学的および超微形態学的に検索し、由来細胞について検討することである。

(材料と方法)

1. CTVTの移植：腫に発生したCTVT (野外例)、北海道大学獣医学部、家畜外科学教室から分与されたCTVT (北大株) を摘出、Single cell suspension とし、生細胞数 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ / 匹に調整、イヌ9匹、3ヶ月齢。ヌードラットは無胸腺のもの96匹、生後5～6週齢の皮下または腹腔内に接種した。約3～4ヶ月後、イヌおよびヌードラットに継代移植した。さらにヌードラット移植CTVTを1mm角に細切後、11日鶏胚の漿尿膜に移植した。

2. CTVT細胞の培養：腫瘍の一部を無菌的に摘出、カナマイシン加PBSで3回洗浄後、腫瘍細胞をGrowth medium に再浮遊させ、生細胞数 1×10^6 / ml に調整し37°C、5% CO₂ 下にて静置培養を行った。

3. CTVT細胞の核型 (Karyotypes)：摘出した腫瘍をSingle cell suspension としコルセミドの最

終濃度が0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように Growth medium 内に添加し、常法により Giemsa 染色を施し光顕観察した。

4. モノクローナル抗体の作製：腫瘍の一部を無菌的に摘出、細胞を 1.5×10^7 /匹に調整、生後8週齢の BALB/c マウスの腹腔内に接種した。免疫は5回行い、最終免疫終了後、常法に従って処理し、HAT 選択法、ELISA 法、酵素抗体法（間接法）を施した。

5. CTVT の光顕的観察：摘出した腫瘍は常法に従い処理し、切片の染色には H・E 染色、ライト・ギムザ染色、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 染色等を行い光顕観察した。

6. CTVT の電顕的観察：摘出した腫瘍を常法に従い処理し、通常観察には 2.5% グルタルアルデヒドを、細胞骨格の観察には細胞骨格を見よくするために 4% タンニン酸加 2.5% グルタルアルデヒドを用いて固定し、超薄切片を作製して電顕観察した。

7. CTVT の血管系：ヌードラットに移植して、移植後 4~5 ヶ月で腫瘍が鶏卵大のものを使用した。右心室より放血し左心室よりヘパリン加リンゲル液で全身を灌流後、メルコックス樹脂を注入した。ヌードラットを 20% 苛性ソーダで溶解し標本を実体顕微鏡および走査型電子顕微鏡で観察した。

8. 鶏胚移植 CTVT および対照腫瘍の抗癌剤投与による観察：腫瘍移植後 3 日目、鶏胚の漿尿膜に腫瘍が着生したものの卵黄嚢に抗癌剤（注射用ビンクリスチンおよび注射用アスパラギナーゼ）を注入し、4 日後に剖検して腫瘍の変性および血管の変化を肉眼的および光顕的に観察した。

9. 移植 CTVT 細胞の免疫組織化学的観察：摘出した腫瘍を常法に従い処理し、細胞骨格の細胞内分布の検索にパラフィン切片ではケラチン、デズミン、ビメンチン、ミオシン、凍結切片ではアクチン、チューブリンを用い、メチルグリーン核染色を行い光顕観察した。

（結果）

1. CTVT の移植成績：イヌ継代移植においては実験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ず継代 3 代目、無胸腺ヌードラット皮下移植では移植率約 100% で継代 12 代目で実験を打ち切った。鶏胚の漿尿膜への移植は CTVT および対照の腫瘍を含めて約 85% の移植率であったが、腫瘍が継代に適する大きさに増殖しなかった。

2. CTVT 細胞の培養所見：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細胞の上に、類円形細胞が付着状態で維持、類円形細胞は減少し、培養開始約 30 日頃には死滅したが、浮遊細胞の継代培養はほぼ 8 代目まで可能であった。

3. CTVT 細胞の核型 (Karyotypes)：イヌおよびヌードラット移植 CTVT 細胞の染色体について分析した結果、17本の Biarm chromosomes と、42本の Acrosentric chromosomes が観察された。また、染色体数の検索では双方とも 59 本であった。

4. モノクローナル抗体の作製：常法により培養上清のチェックを行い、抗体産生の確認がされ、作製したモノクローナル抗体の培養上清を一次抗体として、イヌのリンパ球、ヌードラット移植 CTVT 細胞、北大株 CTVT 細胞を染色したところ、イヌのリンパ球は陰性、ヌードラット移植 CTVT 細胞および北大株 CTVT 細胞は陽性であった。また、免疫電顕で、抗 CTVT 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。

5. CTVTの光顕的所見：野外例CTVT，イヌ移植CTVT，ヌードラット移植CTVTおよび鶏胚移植CTVT共に，ほぼ同様な形態を示し，腫瘍細胞は10 μ 内外，核は6～8 μ で多角形または楕円型で密集していた。

6. CTVTの電顕的所見：野外例，移植例共に，核の中央部に明瞭な核小体が1個存在し，細胞内小器官の発達は中等度で，ミトコンドリア，リボゾーム，粗面小胞体などが胞体内全体に均一に認められた。また，細胞質内には束状の中間系フィラメントが，細胞小器官の間に多数錯走して認められ，それらの間に微小管が認められた。

7. CTVTの血管系：正常の動脈では血流調節機能である（intra-arterial cushion）が分岐部に認められた。腫瘍に近くなるとともに intra-arterial cushion の輪郭は不明瞭になり，腫瘍内部の動脈では存在しなかった。さらに，組織学的には腫瘍の動脈壁に変性や線維が認められた。

8. 鶏胚移植CTVTおよび対照腫瘍の抗癌剤投与による所見：腫瘍は褐色あるいは黄色に変化し，形状は縮小し，漿尿膜は不透明となり，呼び込んだ毛細血管も縮小し，投与前に比較して毛細血管の数も減少した。

9. 移植CTVT細胞の免疫組織化学的所見：細胞骨格成分の中間系フィラメントの検索では，上皮細胞および中皮細胞とその腫瘍等にあるケラチンは陰性の所見で，間葉系細胞とその腫瘍等にあるビメンチンがCTVT細胞の核周囲に，筋肉細胞とその腫瘍等にあるデズミンが細胞質内全体に見いだされ，陽性所見であった。また，微小管のチューブリンは細胞質全体に，アクチンフィラメントのアクチンは腫瘍細胞の境界部に，ミオシンは細胞質全体に陽性像が認められた。

（結論）

1. CTVTは無胸腺ヌードラットで約100%の移植率であり，これを継代することで実験材料としてのCTVTの効果的な保存方法を確立出来た。

2. CTVT細胞の培養は，浮遊細胞による継代が可能で，実験材料としてのCTVT細胞の保存が出来た。

3. CTVTの染色体は，イヌおよびヌードラットに移植されても染色体数は59本で，同じKaryotypesであることが確認出来た。

4. 作製したCTVTのモノクローナル抗体を用いて，ヌードラットCTVTおよび北大株の染色では陽性像であったことから，本モノクローナル抗体はCTVT細胞に有効なマーカーと成り得た。

5. CTVT内部の動脈の血管分岐部には，intra-arterial cushion が存在せず，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CTVT他，対照とした腫瘍の移植が可能であることが確認出来たことと，抗癌剤投与によって新生毛細血管の縮小，消失が腫瘍の種類，抗癌剤の種類によって異なることが判明した。

7. CTVT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，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。CTVTの細胞骨格蛋白成分の中間系フィ

ラメントのケラチンは染色されず、ヒメンチンおよびデズミンが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CTVTの起源について証明するまでには至らなかった。

論文審査の結果の要旨

イヌの可移植性性器腫瘍 (CTVT) は、医学、獣医学および生物学の領域で最も古くから世界各国の研究者によって興味を持たれ、移植実験が遂行されて来た腫瘍の一つである。CTVTの由来細胞、生物学的性状、さらに転移の問題においても不可解な事実が存在している。また、一方、我が国においては、この腫瘍の発生頻度が過去において、他の腫瘍と比して甚だ高度であったが、公衆衛生行政の発展に伴い、野犬の数が減少するに従って著しい減少を示し、本腫瘍の研究材料を確保することさえ非常に困難な状態となって来ているのが現状である。そこで著者は、近年発達した研究手法を用いて、この腫瘍の異種移植実験を試みたところ本研究材料を高度に維持保存出来る異種移植動物がヌードラットである事を証明し得たのであった。また、著者は免疫学的手法を駆使して、本腫瘍細胞の単クローン抗体を作出し、この同抗体を使用して免疫組織化学的染色を実施して、従来のH・E染色に対して多少なりとも科学性、客観性あるいは正確性を付与したものであった。さらにまた、本腫瘍細胞を含む四種類の動物悪性腫瘍を材料として用いて、鶏胚の漿尿膜を利用した抗癌剤の感受性試験を試みたところ、その結果は非常に良好であった。

以下、各項の結果について記載すれば下記の通りであった。

1. 異種移植に関する研究

著者のヌードラットへの異種移植実験では継代数12代目までに96匹の陽性を示し、その経過は移植3代目まで約90%、移植4代目から12代目までは100%と高率で、無胸腺ヌードラットが本腫瘍の継代維持に最適であることが証明出来たのであり、さらに現在まで実験を続行中である。また、これら移植腫瘍の発育では約4~6ヶ月前後で最大重量が73グラムに達し、その大きさは鶏卵大となった例もあり、やがてヌードラットは削瘦して腫瘍死するか、あるいは日和見感染をおこして死の経過をたどる例などが存在した。また、同移植腫瘍の自然退縮例は現在まで観察されなかった。

2. CTVT細胞の培養に関する研究

イヌの可移植性性器腫瘍の細胞培養株樹立を目的として行った研究では、約3~4週間前後の経過で生細胞数が減少して株化は不成功であったが、短期間培養では十分に研究材料として使用出来ることが明瞭となった。この細胞はイヌおよびヌードラットに生着した。また、両細胞の分離培養では、浮遊細胞は本腫瘍細胞の実質細胞とみなされ、ヌードラット移植は陽性であったが、シート状に付着して増殖した細胞群は本腫瘍の基質細胞でヌードラット移植は陰性となった。しかし、約1ヶ月後(継代培養数8代目)の頃から、浮遊細胞は死滅してシャーレの底のシート状の細胞群のみとなった。

3. CTVT細胞の染色体、核型、同一性の確認

本腫瘍細胞の染色体数については、イヌおよびヌードラットに移植された腫瘍細胞ともに同数で牧野によって報告されたごとく、その染色体数は59本であり、同様の核型であったことを証明し得た。

4. CTVT細胞に対する単クローン抗体について

ヌードラット移植の本腫瘍細胞を、生後8週齢BALB/cマウスの腹腔内に接種した。免疫は5回行い、最終免疫終了後、マウス脾細胞とミエローマ(P3-U1)細胞を用い、さらに、融合剤はポリエチレングリ

コール (42.5% PEG 4000) を使用して実施した。また、腹腔内マクロファージを Feeder cells として、HAT 選択法を用いた。抗体産生細胞のスクリーニングは本腫瘍細胞を抗原として ELISA 法および酵素抗体法は間接法を用いた。特異抗体産生が確認された融合細胞株については限界希釈法にて 3 回クローニングを行った。得られた単クローン抗体を持って、イヌの正常リンパ球および本腫瘍細胞などと酵素抗体(間接)法を用いて行った結果は、正常イヌリンパ球は陰性、本腫瘍細胞 2 株は陽性を呈した。

以上のこれらの所見から、本単クローン抗体はイヌの本腫瘍細胞に対して有効なマーカーと成り得る事が示唆された。

5. CTVT の血管系に関する研究

CTVT に分布する血管系について鋳型標本を作製して走査型電子顕微鏡で詳細に観察した結果、腫瘤周辺には豊富に血管を認めた。腫瘍の血管系には正常の動脈に見られるところの血流調節機能である intra-arterial cushion が無いことが示唆された。また毛細血管には、出芽毛細血管が頻繁には観察されないという特徴があった。

6. CTVT 細胞の鶏胚漿尿膜を用いた抗癌剤の感受性試験についての研究

CTVT を含む動物の悪性腫瘍、4 種 (CTVT, イヌ扁平上皮癌, ラット線維肉腫, マウス乳腺癌) を用い、これらの腫瘍塊を鶏胚の漿尿膜に移植を試みたところ、これら腫瘍組織の活性と血管新生反応が移植腫瘤を中心として車軸状におこり着生が認められ、好成績が得られたので、抗癌剤を移植 3 日目に卵黄嚢内に注入して孵卵を続行し、さらに抗癌剤投与後 4 日目に効果判定を行った。即ち、腫瘍を中心に新生した血管の縮小、減少度合いおよび組織学的に腫瘍細胞が変性、壊死の像を示したものを陽性(抗癌剤の影響あり)とした。この結果は、当試験法が従来テスト法に比べて簡便であり、高率的の判定効果が示唆された。

7. 本腫瘍細胞の免疫組織化学的および電子顕微鏡法による検索について

本腫瘍細胞の細胞骨格に関する免疫組織化学的研究の光顕レベルでは、ケラチン陰性、ビメンチンは陰性ないし弱陽性、デズミンは顆粒状強陽性、アクチン、ミオシンは弥漫性陽性像を認めた。電顕レベルでは、本腫瘍細胞の胞体内合面に交錯した中間系フィラメント像を、また、細胞膜に接して密集したマイクロフィラメント像が確認された。また、マイクロチュブルスは胞体内全域に均一に分布して認められ、中間系フィラメント間を走行していた。また、さらに発達した Multiple Golgi 装置の中心部にマイクロチュブルスが密集し、同部に電子密度の高い微細顆粒状または細線維構造物が認められた。以上のごとく、細胞の癌化に伴ってマイクロチュブルスが変化するという説、あるいは癌化しても微小管には変化が示されないとする報告などがあり、今後の課題となり決定は困難であったが免疫電顕法による検討では、本腫瘍細胞の膜系にこの単クローン抗体が反応をおこす抗原決定基 (epitope) が存在している事が確認できた。

以上、イヌ可移植性性器腫瘍の生物学的研究において、CTVT の異種移植実験動物がヌードラットで CTVT が高率に生着して維持継代出来ることを証明出来た。また、本腫瘍細胞の組織培養法による検討では *in vitro* で短期培養が可能であり、さらに本培養細胞が研究材料として使用出来ることが明確となった。

本腫瘍細胞に対する単クローン抗体の作出および免疫組織化学的研究では、当モノクローナル抗体を利用した酵素抗体(間接)法にも陽性を示したことから、本単クローン抗体は本腫瘍細胞のマーカーと成り得た。従って、本腫瘍の診断にさらに正確性が加えられた事は著者の業績の一つとなった。また、鶏胚の漿尿膜を

利用した本腫瘍の移植実験でも好成績が得られ、簡便で適正な新評価法の開発の可能性が出てきた。

以上、本研究は学術的にも、また臨床的にも非常に価値ある論文として高く評価でき、博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしいものである。