

第27回麻布環境科学研究会 一般講演8

イヌ組織球肉腫由来腫瘍細胞株の樹立と免疫学的性状

安野 恭平^{1,2}, 荻原喜久美¹, 納谷 裕子¹, 大木 翔平¹, 岸川 正剛¹¹麻布大・環境保健・病理, ²麻布大・生物研

【はじめに】

イヌの組織球系腫瘍は2002年に刊行された新WHO分類により4つに大きく分類され、中でも組織球肉腫は、発生頻度は低いが悪性度が非常に高いものとして注目されている。組織球肉腫は良性の組織球系腫瘍と異なり発症年齢は平均7歳と比較的遅く、進行は非常に早く、発症から短期間のうちに転移、あるいはDICなどの副腫瘍症候群でほぼ全例が死亡する。また本症では、ヒトと同様に食欲不振や体重減少といった非特異的な症状や発生臓器に関連した症状に加え、著しい血球貪食のため貧血、白血球減少症、血小板減少症がみられ、いわゆる血球貪食症候群の病態を示す。今回、組織球肉腫と診断されたイヌの皮下腫瘍、末梢血および骨髄の腫瘍細胞を培養・樹立し、その性状について検討したので報告する。

【実験材料および方法】

実験材料は、組織球肉腫に罹患した7歳齢、雌、フラットコートドレトリバーより、外科的に切除された皮下腫瘍、骨髄、末梢血を用いた。腫瘍塊は20%中性緩衝ホルマリン液で固定後、常法に従いパラフィン切片を作製し、Hematoxylin-eosin (HE) 染色、Berlin blue 染色を行った。また、2.5%グルタルアルデヒドに固定後、電子顕微鏡用切片を作製し、超微形態的に観察を行った。

初代培養は、皮下腫瘍塊より細胞を回収し、赤血球を tris HCl buffer を用いて溶血後、18% FBS 加 RPMI1640 にて 37℃、5% CO₂ 下で静置培養した。骨髄、末梢血は皮下腫瘍塊と同様に赤血球を溶血後、1000 rpm・10分間遠心し、buffy coat 中の細胞を回収して静置培養した。その後、位相差顕微鏡で細胞

を観察し、1週間に2回程度、継代培養を行った。これらの細胞株に May-Grünwald-Giemsa 染色、Peroxidase 染色、Acid phosphatase 染色、Nonspecific esterase 染色を行い、Nonspecific esterase 染色に関しては NaF による阻害試験を観察し、末梢血由来樹立細胞株について超微形態的検索を行った。また、GM-CSF receptor について酵素抗体法を実施し、フローサイトメーターにより CD4, CD8, CD11b, CD14, MHC class II について各解析を行った。腫瘍細胞の染色体数の検索は G バンド染色で観察した。さらに、3系の樹立腫瘍細胞株をヌードラットへ1匹当たり 1.0 × 10⁷ 個の腫瘍細胞を背部皮下に接種した。

【結果】

1. 皮下腫瘍の組織学的所見：皮下腫瘍組織は N/C 比が大きく核小体明瞭な大小不同の円形または多形細胞で占められ、多数の核分裂像が確認できた。また一部 Berlin blue 陽性の腫瘍細胞も観察され、腫瘍細胞による赤血球の貪食が行われていたことが示唆された。電顕所見では腫瘍細胞の核は組織球系細胞特有なくびれを示し、細胞質には mitochondria を中心とした豊富な細胞内小器官が観察された。
2. 樹立細胞株の培養所見：培養細胞は比較的大型で、ほとんどの細胞が円形であったが、中には紡錘状の細胞、多核巨細胞も観察された。細胞増殖曲線では3系の樹立細胞がほぼ同様の増殖曲線を示したが、倍加時間は皮下腫瘍組織由来と骨髄由来腫瘍細胞株で24時間、末梢血由来樹立細胞株では48時間であった。
3. 培養細胞の性状：May-Grünwald-Giemsa 染色では核小体明瞭で N/C 比の比較的小さいレース状の細胞質を伴った細胞が多数を占める中、N/C 比の高い濃

染した小円形の細胞や多核巨細胞も散見された。電顕所見では末梢血由来樹立細胞株は豊富な細胞質を有するN/C比の比較的小さい細胞として観察され、細胞質内には皮下腫瘍組織同様の豊富なmitochondriaや空胞などが観察された。また、樹立細胞の染色体数の検索では、正常なイヌの染色体数を有する樹立細胞は観察されず、染色体数は52本付近と104本付近を頂点とした二峰性のグラフを示した。酵素組織化学染色ではPeroxidase染色陰性、Acid phosphatase染色強陽性、Nonspecific esterase染色強陽性を示し、Nonspecific esterase染色はNaFによる強い阻害を示した。また、免疫組織化学的染色およびフローサイトメーターによりCD4、CD8陰性、CD11b、CD14、MHC class II、GM-CSF receptorが陽性を示した。酵母様真菌、モルモット赤血球を用いた貪食能試験では腫瘍細胞による活発な貪食が観察された。

4. 担癌ヌードラット移植所見：腫瘍細胞は対数的に増殖し40日ほどで $1.4 \times 10^4 \text{ mm}^3$ まで成長した。その組織像は皮下腫瘍組織に類似し、N/C比が大きく核小体明瞭な大小不同の円形または多形細胞で占められており、高頻度に核分裂像も確認された。また、腫瘍細胞の肺転移の所見が観察され、ヌードラットの肺に乳白色の転移塊が数個散在し、HE染色では正常な肺組織細胞に混じり核小体明瞭の中型のmacrophage様細胞が多数観察され、これらの細胞は免疫組織化学染色によりPCNA陽性を示した。こう

した腫瘍細胞のヌードラットへの生着は皮下腫瘍組織由来樹立細胞株、骨髓由来樹立細胞株、末梢血由来樹立細胞株の3系全ての細胞で観察され、肺転移所見に関しても同様に3系全ての細胞株で確認された。

【総括】

イヌの組織球肉腫の起源については現在までに様々な議論がなされており、未だ結論に至っていないが、おそらくヒトの組織球系腫瘍と同様にmacrophage由来あるいはmyeloid dendritic cell由来の腫瘍であるとされており、今回、組織球肉腫を疑われた腫瘍組織より樹立された細胞株は非特異的エステラーゼ染色陽性、CD4、CD8陰性、CD11b、CD14、MHC class II陽性であり、豊富な貪食能を有することからmacrophage由来であることが示唆された。また、腫瘍細胞の染色体検査ではイヌの正常染色体数である78本の染色体数を持つ細胞は観察されず、本疾患の腫瘍細胞は細胞分裂時の異常を伴うことが示唆された。ヌードラットへの腫瘍細胞の移植では3系全ての樹立細胞株で腫瘍細胞の生着が見られ、転移と思われる腫瘍細胞の肺への浸潤が観察された。

今後はmacrophageの重要な機能である抗原提示能、TNF- α 等のサイトカイン産生能等について検討を行い、またヌードラットへの移植で確認された肺転移所見については、肺転移腫瘍細胞株を樹立しその性状についてさらに詳しい検討を行う必要がある。