

ヒト線維性腫瘍の細胞培養による 生物学的特性の研究

秋 山 純 一

信州大学医学部皮膚科学教室

(主任: 高瀬 吉雄教授)

A Study to Analyze the Biological Specificity of Human Histiocytic Tumors and Fibroblastic Tumors by Cell Culture

Junichi AKIYAMA

Department of Dermatology, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Yoshio TAKASE)

Fibrous histiocytic tumors (FHT) are formed in many types of cells such as histiocyte-like cells, fibroblast-like cells and others. There are many pathological classifications of FHT. The histogenesis of FHT remains controversial.

To study the derivation of FHT (malignant fibrous histiocytoma (MFH), dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP), malignant giant cell tumor of bone (MGCT), giant cell tumor of tendon sheath (GCT), multicentric reticulohistiocytosis (MR), dermatofibroma (Df)), the cell lines of these tumors were proliferated in tissue culture *in vitro*. Furthermore, to compare different types of fibrous tumor (epithelioid sarcoma (ES), desmoid tumor (DT) and normal fibroblast), their cell lines were proliferated in the same way. These cell lines were investigated morphologically (special stain, enzyme histochemistry, immunohistochemistry, collagen synthesis, DNA synthesis, limiting number of subcultures).

The FHT cell lines (MFH, DFSP, MGCT, GCT, MR, Df) were different from ES, DT and normal fibroblasts in several aspects: 1) FHT cell lines had some characteristics in common with histiocytes, 2) Except for Df, FHT cell lines had Fc receptors, 3) ES and DT had many Golgi vesicles on electron microscopical observation, 4) FHT cell lines had more intensive contact inhibition than ES, DT and normal fibroblasts. They were considered to originate from histiocytes, and ES and DT from primitive fixed mesenchymal cells. *Shinshu Med. J.*, 37: 63-96, 1989

(Received for publication September 14, 1988)

Key words: specificity of fibrous histiocytic tumors, derivation of fibrous histiocytic tumor, histiocyte-like cell, fibroblast-like cell, cell culture

線維性組織球性腫瘍の特性, 線維性組織球性腫瘍の由来起源, 組織球様細胞, 線維芽細胞様細胞, 細胞培養

I 緒 言

ヒト線維性組織球系腫瘍は病理組織学的に組織球様細胞、巨細胞、泡沫細胞、ときには上皮様細胞、また storiform pattern 構造を形成する線維芽細胞様細胞など、細胞の多形性を特徴とする。そして、しばしば赤血球、ヘモジデリン、細胞片、脂肪滴などの貪食像が見られることも特徴である。これらの点から、腫瘍構成細胞の増殖様態の違いにより、この線維性組織球系腫瘍の分類に含まれる疾患として、種々の病名がつけられている。

線維性組織球系腫瘍の組織に、組織球性細胞と線維性細胞の両者の増殖を伴うことより、1969年 Stout と Lattes¹⁾ によって fibrous histiocytic tumor (以下 FHT と略す) のカテゴリーに分類された。それ以降、本腫瘍分類に関連した論文²⁾⁻⁵⁾ が報告されてきた。そして、この腫瘍細胞が多形性を示すことから、FHT 細胞の発症由来細胞について種々の説が出されている。その中で有力なものは、組織球由来とする説であり、Ozzello ら⁶⁾ は短期の細胞培養で FHT 腫瘍細胞が機能的に貪食能をもつことを見出し、組織球由来説を提唱した。その後もこの説を支持する報告⁷⁾⁻⁹⁾ がいくつか見られる。

これに対し、主として FHT 腫瘍組織の電子顕微鏡的所見から、未分化間葉系細胞の存在することを重視し、FHT 細胞の本体は組織に存在した未分化間葉系細胞由来ではないかとの報告¹⁰⁾⁻¹²⁾ もある。このように、FHT の発生由来細胞について上記 2 説以外にも若干の論議があり、その本態についての統一見解は出されていない。

著者は、FHT 分類系に属すると一般に認められている 6 種の腫瘍、すなわち悪性線維性組織球腫、隆起性皮膚線維肉腫、骨悪性巨細胞腫、腱鞘巨細胞腫、多発性細網組織球腫、皮膚線維腫、および対照として線維芽細胞近縁の細胞由来の説が示唆される 2 種の腫瘍、類上皮肉腫と類腱腫の 8 種の腫瘍組織より細胞培養を試み、継代培養が可能な培養細胞株を樹立した。これらの各種腫瘍由来培養細胞株が樹立されるまでの過程において、その細胞のもつ性質を細胞形態学、collagen 産生能、増殖能、細胞継代培養可能回数などにより検討、また FHT 分類系として予想される種々の特性を、酵素組織化学、細胞特異抗原、膜表面 receptor、免疫貪食能試験などにより比較検討し、各腫瘍の発生由来細胞について検索を行った。

II 実験材料ならびに実験方法

A 症 例

各腫瘍生検組織を、中性 10% ホルマリン固定、脱水、パラフィン包埋を行い、薄切の後、hematoxylin eosin (HE) 染色を行って、光顕観察を行った。細胞培養に用いた各腫瘍の組織所見は以下の通りである。

1 悪性線維性組織球腫 (malignant fibrous histiocytoma, 以下 MFH と略す) 2 症例。

症例 I は 71 歳男性 MFH (I) の左下腿皮下に、症例 II は 77 歳女性 MFH (II) の左肩部皮下に生じた腫瘍。組織所見は両者とも Enzinger と Weiss¹³⁾¹⁴⁾ の言う storiform pleomorphic type であり、紡錘形をした線維芽細胞様細胞の storiform pattern 様構造や、泡沫細胞、巨細胞を認める典型的な MFH である (図 1)。

2 隆起性皮膚線維肉腫 (dermatofibrosarcoma protuberans, 以下 DFSP と略す) 2 症例。

症例 I は 69 歳女性 DFSP (I)、症例 II は 64 歳男性 DFSP (II)。両症例とも腹部皮下に生じた境界明瞭な腫瘍。腫瘍部中心では、明瞭な storiform pattern を示し、その中に大型の核をもつ組織球様細胞が多数見られる (図 2)。

3 骨悪性巨細胞腫 (malignant giant cell tumor of bone, 以下 MGCT と略す) 1 症例。

症例は 17 歳の男性で、右下肢の腓骨に生じた腫瘍。MFH のそれと酷似した組織所見で、類円型細胞と線維芽細胞様細胞よりなる間質細胞の間に多数の多核巨細胞と異型組織球様細胞が見られ、膠原線維の増殖を伴う MGCT である (図 3)。

4 腱鞘巨細胞腫 (giant cell tumor of tendon sheath 以下 GCT と略す) 2 症例。

症例 I は 34 歳男性 GCT (I) で右手背の尺骨の周囲に、症例 II は 15 歳男性 GCT (II) で右大腿骨下部周囲に生じた腫瘍。腫瘍中心部では組織球様細胞の集塊、破骨細胞型の巨細胞、多数の泡沫細胞とヘモジデリンの沈着が見られる (図 4)。

5 多発性細網組織球腫 (multicentric reticulo-histiocytosis, 以下 MR と略す) 1 症例。

症例は 15 歳の女性で両手の指関節に発生した再発性、小結節の境界明瞭な腫瘤。大型の核とすりガラス様に見える広い胞体をもつ組織球様細胞と線維芽細胞様細胞の増殖を伴う (図 5)。

6 皮膚線維腫 (dermatofibroma, 以下 Df と略

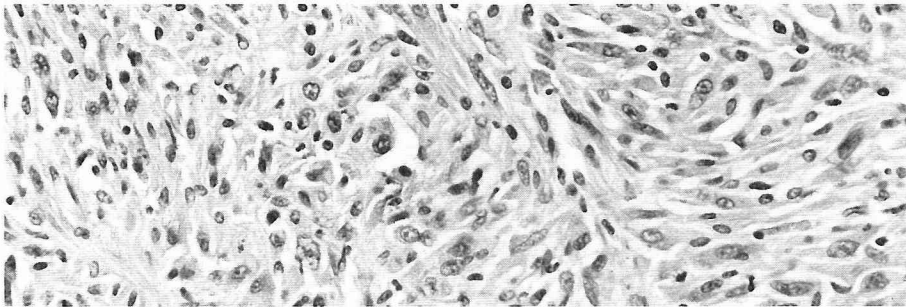


図1 MFH（症例Ⅰ）の生検腫瘍組織，光顕写真×100，ホルマリン固定，パラフィン包埋，H.E. 染色：紡錐型をした細胞が錯綜，storiform pattern を形成し，その間に泡沫細胞や巨細胞が見られる。核の大小不同が顕著である。

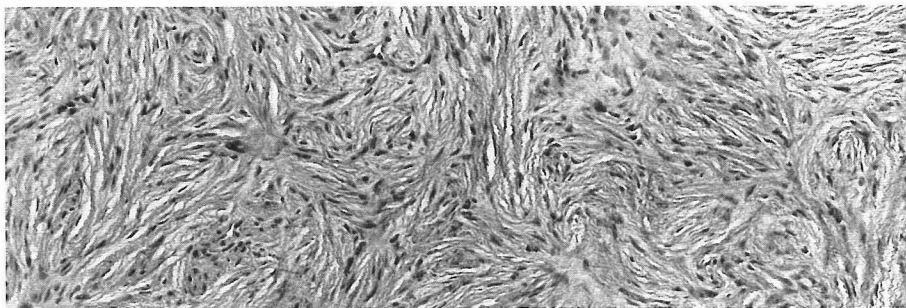


図2 DFSP（症例Ⅰ）の生検腫瘍組織，光顕写真×40，ホルマリン固定，パラフィン包埋，H.E. 染色：紡錐型をした細胞が錯綜し，膠原線維が豊富で，その間に組織球様細胞が見られる。核の大小不同が軽度見られる。

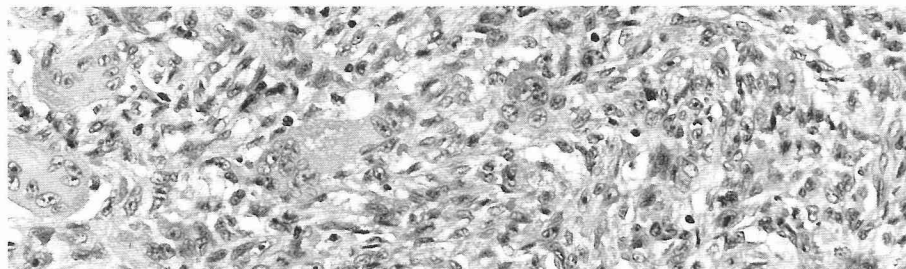


図3 MGCT の生検腫瘍組織，光顕写真×100，ホルマリン固定，パラフィン包埋，H.E. 染色：組織球様細胞が集塊し，破骨細胞型の多核巨細胞，泡沫細胞よりなる。核の大小不同が顕著である。

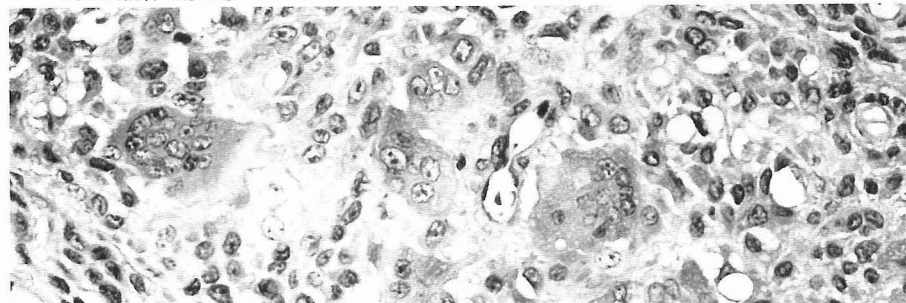


図4 GCT（症例Ⅱ）生検腫瘍組織，光顕写真×120，ホルマリン固定，パラフィン包埋，H.E. 染色：組織球様細胞が集塊し，骨細胞型の多核巨細胞，泡沫細胞よりなり，ヘモジデリンの沈着も見られる。

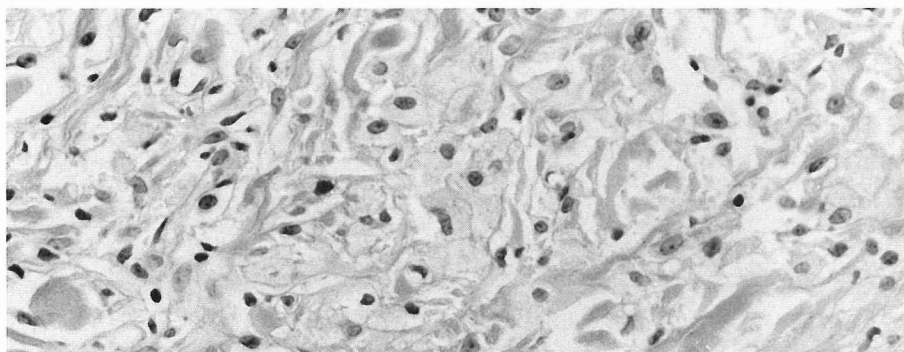


図5 MR の生検腫瘍組織，光顕写真×100，ホルマリン固定，パラフィン包埋，H.E. 染色：大型の核とすりガラス様の細胞質をもつ組織球様細胞と線維芽細胞様細胞が疎に見られる。

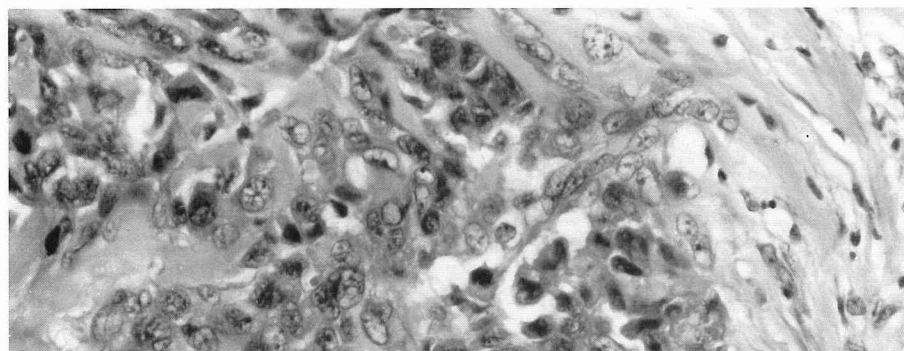


図6 ES の生検腫瘍組織，光顕写真×200，ホルマリン固定，パラフィン包埋，H.E. 染色：紡錐型をした細胞が錯綜する中に大型の核をもつ類上皮細胞様細胞が集塊して増殖し，組織球様細胞も多数見られる。

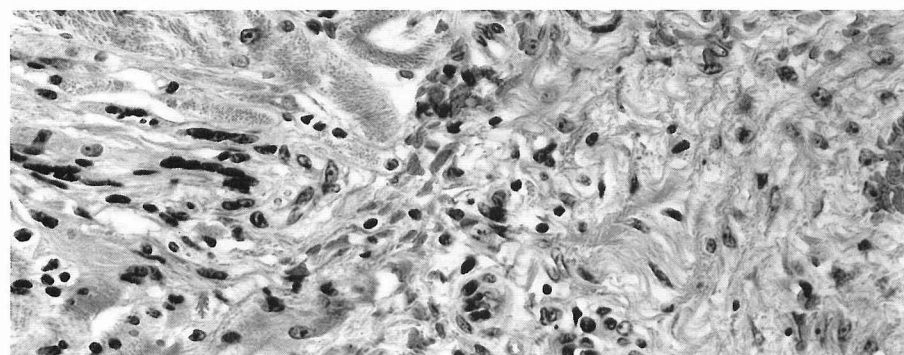


図7 DT の生検腫瘍組織，光顕写真×100，ホルマリン固定，パラフィン包埋，H.E. 染色：濃染される大型で楕円形の核をもつ紡錐型の細胞が増殖し，筋層内への浸潤も見られる。核の大小不同が軽度見られる。

す) 2 症例。

症例 I は 49 歳男性 Df(I) で左膝関節部皮下に、症例 II は 42 歳男性 Df(II) で、右膝関節部皮下に生じた腫瘍。症例 I は膠原線維の増殖と単一の線維芽細胞様細胞がその主体で、Lever¹⁵⁾ の言う fibrous type の Df で、症例 II は線維構造中にヘモグデリンの食食像が見られ、同じく Lever のいう cellular type の Df であった。

7 類上皮肉腫 (epithelioid sarcoma, 以下 ES と略す) 1 症例。

症例は 55 歳の女性、右手背に生じた皮下腫瘍。類円型の胞体と大型の核をもつ類上皮細胞様の細胞が集塊状に増殖し、錯綜した膠原線維中に紡錘形細胞が不規則に混在する腫瘍である (図 6)。

8 類腱腫 (desmoid tumor, 以下 DT と略す) 1 症例。

症例は 17 歳男性、左肩部皮下に生じた腫瘍。非限局性であり、大型で橢円形の核をもち、異型性の少ない紡錘形の腫瘍細胞の増殖が主体で、筋腱膜由来の線維性組織と筋層内へも腫瘍細胞の浸潤像が見られる (図 7)。

9 正常線維芽細胞

MFH (I), DFSP (I), GCT (II), および MR の 4 例の切除腫瘍の周辺部一見健康皮膚真皮組織より線維芽細胞の培養を行い、腫瘍周辺対照細胞として用いた。また、年代の異なる健康人皮膚真皮より線維芽細胞の培養を行い、非腫瘍者対照細胞として用いた。

B 細胞培養

各腫瘍の中心部および健康真皮より、無菌的に切除した組織片を抗生物質 (penicillin, 10 units/ml : streptomycin, 600 µg/ml : amphotericin B, 10 µg/ml) を添加した培養液 Eagle MEM (autoclavable tissue culture medium powder No. 1 : 日本製薬) に 4°C にて 1 時間浸漬後、ウシ胎児血清 (GIBCO, Grand Island) 中で約 0.5 mm³ 大に細切し、培養皿 (culture dish Falcon #3002 : Becton Dickinson, Oxnard) に数個ずつ置き、20% ウシ胎児血清添加 Eagle MEM 中で空気 95%, CO₂ 5%, 37°C 飽和水蒸気の条件下、炭酸ガス培養器 (Water-Jacketed Incubator : Forma Scientific, Marietta) により初代培養を行った。組織片より細胞遊出の盛んになった 10~20 日頃より、1 週間に 1 回の培地の交換を行い、位相差顕微鏡 (Nikon MD, 位相差対物レンズ DLL : 日本光学) により、生態観察を行い、均一の十分な細

胞の遊出が見られた培養シャーレより移植組織片を除き、増殖性の高い均一な colony を選び、0.02% EDTA/0.25% trypsin 処理により約 10² 個~10⁴ 個の細胞を単離、初代継代培養を行い、以後同様に継代を繰り返した。本実験では、すべてウシ胎児血清添加 Eagle MEM で継代培養した、継代回数 3~6 代目の細胞を用い、形態学的観察および機能的検討を行った。

C 培養細胞の形態学的検索

1 光学顕微鏡的観察

スライド型培養器 (chamber slide Lab-Tek : Miles, Napeville) 上に単層培養した細胞を中性 10% ホルマリン固定の後、hematoxylin eosin (HE) 染色、Azan Mallory 染色、鍍銀染色、Sudan black B 染色および PAS 染色を行って観察した。

2 酵素組織化学的検索

スライド型培養器 (chamber slide Lab-Tek : Miles, Napeville) 上に増殖させた各細胞を 2% paraformaldehyde (PFA)/8% sucrose/0.1M cacodylate 緩衝液、pH 7.2 で 4°C にて 60 分間固定、Brunk と Ericsson¹⁶⁾ の方法により、lysosome の marker enzyme の 1 つである acid phosphatase (AcPase) 染色を行った。単球系の細胞に特に強い活性がある、カルボン酸エステルの加水分解触媒酵素 esterase を検討するため、 α -naphthylacetate を用いて、Leder¹⁷⁾ の方法により、nonspecific esterase (NSEase) 染色を行った。各染色は、いずれも、対照として基質を除いた染色液での処理標本を同時に作成、非特異的な発色のないことを確認し、陽性反応であると判定した。

3 免疫組織化学的検索

組織球系腫瘍細胞が特異的に持つといわれる糖蛋白、 α_1 -antitrypsin (α -AT) の各培養細胞の保有を検索するため、免疫染色 kit (ICC-kit Milab, Malmö) を用いて、 α -AT の抗体 (和光純薬) の免疫染色を行った。また同種の糖蛋白である α_1 -antichymotrypsin (α -ACT) についての検討を、免疫染色 kit (PAP kit : Immunon, Troy) を用いて行った。組織球系の細胞が持つ水解酵素の 1 種である, lysozyme の保有について、lysozyme 免疫染色 kit (ICC-kit : Milab, Malmö) を用いて検討した。神経系の細胞等がもつ抗原である S-100 につき、S-100 免疫染色 kit (ICC-kit : Milab, Malmö) を用いて行い、また血管系の細胞がもつ抗原 factor VIII につき、factor VIII 免疫染色 kit (PAP kit : Dako, Santa Barbara) を用い、それぞれ各培養細胞について検討した。

間葉系細胞が持つ intermediate filament の1種である vimentin の保有について、vimentin 免疫染色 kit (A/BA kit: Immunon, Troy) を用い、MFH (I) を除く各培養細胞で検討した。筋細胞由来細胞がもつ intermediate filament の1種である desmin の保有につき、desmin 抗体 (Labsystems, Helsinki) と免疫染色 kit (Vectastain: Vector, Burlingame) を用い、DFSP (II), GCT (II), DF, ES, 正常線維芽細胞で検討した。また、上皮系細胞の intermediate filament を構成する線維成分である keratin につき、keratin 免疫染色 kit (PAP kit: Immunon, Troy) を用い、その抗原の保有を MFH (I), DFSP (II), DF (II), ES, DT, 正常線維芽細胞について検討した。すべての有核細胞がもつといわれる microfilament 成分の1種である actin について、actin 免疫染色 kit (PAP kit: Immunon, Troy) を用い、その密度について MFH (I) を除く全培養細胞について検討した。

Macrophage の膜表面抗原に 特異的であるとされる、抗体 Mo2 (Coulter colone, Hialeah) について、免疫染色 kit (Vectastain: Vector, Burlingame) を用い、膜抗原の保有を全培養細胞について検討した。

方法は、スライド型培養器 (chamber slide Lab-Tek: Miles, Naperville) 上に培養した各培養細胞をアセトン、エタノール (3:1) で30秒間固定を行って後、0.3% 過酸化水素メタノール溶液にて室温30分処理し、内因性の peroxidase の完全に blocking されていることを予備試験にて確認の後、各免疫染色を行った。 α -AT, α -ACT, lysozyme, S-100, Factor VIII, actin, keratin については peroxidase-anti-peroxidase を用いた PAP 法で、vimentin, desmin, Mo2 については avidin と biotin を結合させた horseradish peroxidase (HRP) を用いた ABC 法にて行い、3-amino-9-ethyl-carbazole (AEC) を基質溶液として HRP を発色させ、hematoxylin による核染の後、光顕観察を行った。各染色ではすべて対照として、一次抗体の代わりに一次抗体が作られた種の正常血清/0.025% ウシ血清アルブミン/0.05M Tris-HCl 緩衝液 pH7.6 を用いた標本を同時に作成、非特異的な発色反応がないことを確認し、陽性反応であると判定した。

4 電子顕微鏡的観察

a 透過型電子顕微鏡

培養びん (culture flask Falcon #3024: Becton

Dickinson, Oxnard) に培養した細胞を rubber policeman で剝離し、遠沈して集め、細胞浮遊液とし、Millonig の0.1M pH7.2 リン酸緩衝液を用いた2% グルタルアルデヒド溶液にて4°C、2時間前固定し、同緩衝液を用いた1% 4酸化オスミウム溶液にて4°C 1時間の後固定を行い、Howatson¹⁸⁾の方法により4% 寒天 (agar noble: Difco, Detroit) 4% に分散包埋して細切の後、上昇エタノール系列による脱水、アセトンによる置換、エポン樹脂 (Luveak-812: ナカライテスク) に包埋した。超ミクローム (ULTRA-CUT: Reichert-Jung, Vienna) を用い、ガラスナイフにより超薄切片、厚さ 0.8 μ m を作製、酢酸ウラン、クエン酸鉛の二重染色後、透過型電子顕微鏡 (日立 HU-11A, 日立 H-700), 加速電圧75~200kV にて観察し、写真撮影を行った。

b 走査型電子顕微鏡

スライド型培養器 (chamber slide Lab-Tek: Miles, Naperville) 上に培養した各細胞を Millonig のクエン酸緩衝液を用いた2.5% グルタルアルデヒド溶液にて4°C で2時間前固定、1% 4酸化オスミウム溶液にて4°C で1時間の後固定の後、上昇エタノール系列により脱水、酢酸イソアミルに置換し、臨界面乾燥器 (HCP-2: 日立) で乾燥、ionspatter (Hummer II型: Technics Inc.) で白金蒸着を行い、走査型電子顕微鏡 (JSM-S1: 日本電子) にて写真撮影を行い観察した。

D 細胞機能の検索

1 膜表面 receptor

培養細胞についてリンパ球、単球および組織中の組織球が保有する膜表面 receptor である Fc receptor および C3b receptor を Griffin ら¹⁹⁾の方法により検索した。すなわち、ヒト IgG 感作ウシ赤血球 [OX-EA] とヒト補体感作ウシ赤血球 [OX-EAC] (日本抗体) を用い、rosette 形成法により保有を検討した。継代培養数2~4代目の各細胞株をスライド型培養器 (chamber slide Lab-Tek: Miles, Naperville) で72時間培養した後、培養液を血清無添加の Eagle MEM で置換し、24時間後に各 chamber へ両感作赤血球と無感作対照赤血球を 2×10^6 個/ml の浮遊液 0.05ml を添加、室温で約300 \times g にて5分間遠心した後、30分間37°C に静置した。その後、0.1M の phosphate-buffered saline (PBS) 溶液中にて静かに転倒して非付着性の血球を除き、0.1M PBS/0.1% グルタルアルデヒド液により固定、0.2% brilliant

cresyl blue (Merck, Darmstadt) 溶液で染色し、抗体感作赤血球が5個以上付着した細胞をロゼット形成細胞としてその数を測定した。また各細胞の赤血球に対する貪食能について検討を行うため、同じく赤血球を加えたスライド型培養器をさらに37°Cにて2時間の培養を行い、同固定、同染色の後、観察を行った。

2 免疫貪食能

単球および組織球性細胞がもつ生物学的機能の特徴である微生物に対する免疫貪食能について検討した。

使用した微生物は *Candida albicans* (*C. albicans*) と *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) の2種である。各培養細胞株をスライド型培養器 (chamber slide Lab-Tek: Miles, Naperville) に培養し、pre-confluent の状態の培養細胞の培養液を実験の48時間前に Neuman and Tytell 無血清培地 (GIBCO, Grand Island) に置きかえ、実験に用いた。試験はO型血液のヒト血清10%含有 Eagle MEM を加えた chamber および対照として無血清培地を新しく加えた chamber へ細胞約 10^4 個に対して約100倍量 10^6 個/ml の菌体に加え、 200×8 にて5分間遠心、37°Cで60分間の培養の後洗浄、中性10%ホルマリン溶液で固定し、*C. albicans* の標本は PAS 染色、*S. aureus* の標本は Löffler メチレンブルー染色を行い、ヒト血清添加による免疫貪食能について検討した。

3 collagen 産生能

培養細胞が *in vitro* において培養液中に産生する collagen 量を MR を除く各細胞株について検討した。

培養皿 (culture dish Falcon #3001: Becton Dickinson, Oxnard) に増殖させ confluent の状態になった細胞を用い、triplicate samples で行った。

培養液は Eagle MEM に透析ウシ胎児血清 (GIBCO, Grand Island) 5%, アスコルビン酸 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ および β -aminopropionitrile (β -Apn) $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加したものをを用い、24時間の炭酸ガス培養器で培養した後、新しく同培養液に L-[2,3- ^3H] proline 比放射能 $20 \sim 40 \text{Ci}/\text{mmol}$ (NEN) $2 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ を加えた液と交換、さらに24時間の培養を行った。Collagen の測定は Peterkofsky と Diegelmann²⁰⁾ および Hata ら²¹⁾ の方法を部分改良して行った。すなわち、各培養皿より培養液を3mlずつ回収し、0.3% carrier collagen (高研) 溶液 $100 \mu\text{l}$ を添加し、冷 trichloroacetic acid (TCA) 10%溶液にて酸不溶性 collagen の回収、1M Tris-HCl 緩衝液 pH7.5 に再溶解、冷エタノールによる再回収を行い、0.2M NaOH で可溶化、0.15

M HCl で中和し、collagen の消化サンプルに用いた。酵素消化は *Clostridium histolyticum* 由来の collagenase (Form III: Advance Biofactures, Lynbrook) を用い、37°C 90分間行い、アルブミン ($5 \text{mg}/\text{ml}$) $20 \mu\text{l}$ を添加の後、0.5%タンニン酸を含む5%冷 TCA にて酵素抵抗性の不溶性非collagen性タンパクと上清の消化 collagen 性タンパク部分に分離し、不溶性タンパクは0.1M Tris-HCl 緩衝液 pH7.5/5mMジチオスレイトール/0.5%ラウリル硫酸ナトリウム溶液を加え、沸騰水中で5分間加熱溶解させ、scintillation spectrometer (TRI-CAB-3255: Packard, Downers Grove) により測定し、次の計算式で collagen の相対合成活性を算出した²¹⁾。

$$(C\%) = \frac{CP}{CP + 5.4 \times NCP} \times 100$$

C% : 全タンパク質の合成量に対する collagen の相対合成活性。

CP : Collagen タンパクに取り込まれた放射活性。

NCP : 非 collagen 性タンパクに取り込まれた放射活性。

Collagen のイミノ酸 (proline, hydroxyproline) 含量が他のタンパク質の平均値より5.4倍高いことより、その補正係数を含む。

本実験系は、collagen 分子の架橋阻害剤である β -Apn の添加により、不溶性化 collagen の細胞層中への沈着を抑制し、培養液中に放出される collagen 産生量について測定したものである。

4 DNA 合成率

各培養細胞の増殖能の違いについての検討を目的とし、 $[^3\text{H}-6]$ thymidine 比放射能 $21 \text{Ci}/\text{mmol}$ (Amersham) の取り込みにより検討した。0.02% EDTA/0.25% trypsin で単離した継代培養数3代目の confluent に増殖した各培養細胞を血球計算板 (Bürker-Türk) により細胞数を計測し、 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 個/ml の細胞浮遊液を調整、各細胞の $[^3\text{H}]$ thymidine による細胞核の DNA 合成標識率を測定した。

方法は培養皿 (culture dish #153066: Nunclon, Roskilde) に入れた滅菌カバーガラス $13 \text{mm}\phi$ (松浪硝子、厚さ0.13~0.17mm) に10%ウシ胎児血清添加 Eagle MEM により調整した細胞浮遊液 $200 \mu\text{l}$ を分注し、6時間炭酸ガス培養器で培養後、Eagle MEM を2ml 添加、24時間培養、続いて $0.5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ $[^3\text{H}]$ thymidine 添加同培地を加え、さらに24時間の培養

を行った。カバーガラス上に着床し、増殖した細胞を冷 Carnoy 液で5分間固定、5% TCA にて除タンパクを行い、水、エタノールで洗浄後、ラジオオートグラフ乳剤 (NR-M2 : サクラ) の水等量希釈溶液にて dipping を行い、4°C 7日間の露出、現像液 (コニドール : サクラ)、定着液 (コニフィックス : サクラ) によりラジオオートグラフィーを行った。HE 染色後、100 倍の顕微鏡写真を作成し、全細胞数に対する核中に5個以上銀粒子をもつ細胞の割合を計測し、全細胞数200~300個に対する標識率 labelling index (LI) を求めた。

5 継代培養可能回数

各培養細胞の継代可能回数の測定と細胞株の樹立を目的として継代培養を繰り返した。培養びん (culture flask #152094 : Nunc, Roskilde) を用い、約2週間ごとに細胞を0.02% EDTA/0.25% trypsin で単離後1/3の split に分割し、継代培養を行った。また同様に種々の年齢の異なる健康人真皮より線維芽細胞の継代培養を行い、継代培養可能期間を比較検討した。継代培養可能回数終期の確認は、培養液の交換を繰り返し、その2週間後においても、まったく増殖が見られなくなった細胞を継代培養末期であると判定した。

III 実験結果

A 培養細胞の顕微鏡観察

1 初代培養および継代培養細胞の位相差顕微鏡観察

(1) MFH : explant culture にて増殖した細胞は、類円形細胞・紡錐形細胞・樹枝状細胞・多核巨細胞の多形性に富む大小不同細胞からなり (図8)、特に類円形細胞の活発な ameboid migration が見られた。初代単層培養細胞中の増殖能の高い紡錐形細胞のコロニーを Puck と Marcus²²⁾ の小金属シリンダー法により分離して、MFH 由来細胞株とした。

MFH cell line は同継代培養回数の線維芽細胞と比較し、円形のより大きい核をもつ短紡錐形の細胞であり、継代培養可能回数は MHF (I) は28回、MFH (II) は21回であった。

(2) DFSP : explant culture にて増殖した細胞は、正常線維芽細胞と比べ細胞質のやや広い紡錐形細胞が大半で、一部に類円形細胞、多核巨細胞も見られた。DFSP cell line の走向 pattern は confluent 増殖で通常の線維芽細胞の流線形走向 pattern と比較し、より複雑な多極性走向を示し、storiform pattern を

思わせるものであった (図9)。継代培養可能回数は、DFSP (I) は19回、DFSP (II) は32回であった。

(3) MGCT : explant culture にて増殖した細胞は MFH の細胞と酷似し、多形性に富んだものであった (図10)。Confluent となると増殖性の高い細胞は方射状の colony を作る特徴が見られ、この colony を小金属シリンダー法により分離して継代培養を行い MGCT cell line とした。Confluent の状態で agglutination を起こす特徴は、継代を繰り返しても維持されており、継代培養可能回数は23回であった。

(4) GCT : explant culture にて増殖した細胞は類円形、多核巨細胞および上皮細胞様の形態をした細胞であり (図11)、位相差顕微鏡観察により、MFH と同じく高い ameboid migration が特徴として見られた。

Confluent の状態での増殖状態は、培養器全面の均一な増殖は見られず、網目状のシートを形成する特徴が見られた。継代培養は、増殖性の上皮細胞様細胞の colony を小金属シリンダー法より分離し、GCT 細胞株として継代培養を行い、継代培養可能回数は GCT (I) は7回、GCT (II) は4回であった。

(5) MR : explant culture にて増殖した細胞は大半が大形の核と樹枝状の突起と豊富な細胞質をもつ大型の細胞であり (図12)、この細胞は、健康部より培養した線維芽細胞 (図13) のような一定の走向は明らかでなく、ほぼ単細胞層に全面に密に増殖した。Confluent の状態では、重層性の増殖を示さないため分裂した細胞が球状となり、浮遊細胞となって見られ、この球状となった細胞は新しい培養器へ移すとすみやかに着床し、増殖を再び開始し、これは MR cell line のもつ特徴的な性質であり、継代培養可能回数は77回であった。

(6) Df : explant culture にて増殖した細胞は、大半が単一の二極性の紡錐形細胞で、対照の正常線維芽細胞と酷似していたが、相異点として、橢円形の核に見られる核小体が不鮮明であり、confluent の状態での走向 pattern はより複雑な流線形であり、最も顕著な相異点は重層性増殖をまったく示さない点であった。この線維芽細胞様細胞を Df cell line として継代培養を行った (図14)。継代培養可能回数は Df (I) は66回、Df (II) は45回であった。

(7) ES : explant culture にて増殖した細胞は、大型の明瞭な核小体と線維性の構築が見られる広い細



図8 MFH（症例Ⅱ）初代培養7日目，光顕写真×66，ホルマリン固定，H.E. 染色：類円形細胞や紡錘形細胞，また樹枝状細胞の増殖があり，ameboid migration が見られる。



図9 DFSP（症例Ⅱ）初代培養12日目，光顕写真×66，ホルマリン固定，Giemsa 染色：大小不同の紡錘形をした細胞が主体で，産生された線維物質が多数見られる。

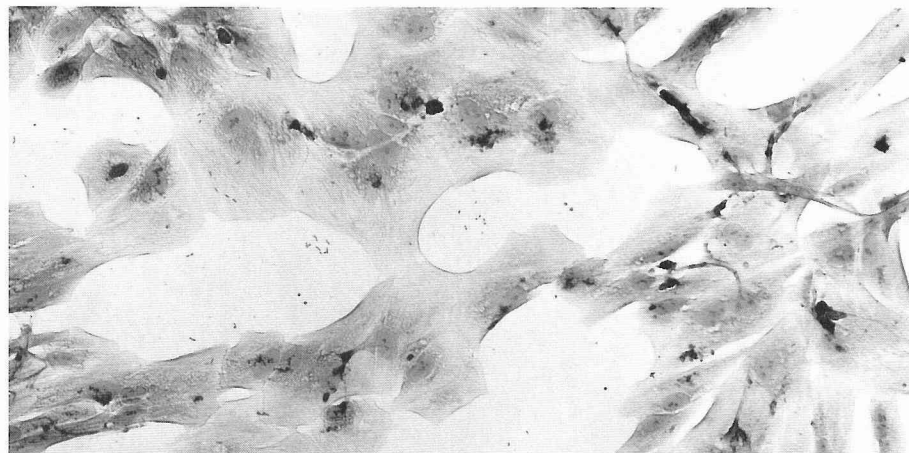


図10 MGCT 初代培養10日目，光顕写真×100，ホルマリン固定，H.E. 染色：大型の核をもつ類円形細胞と紡錘形細胞よりなる。

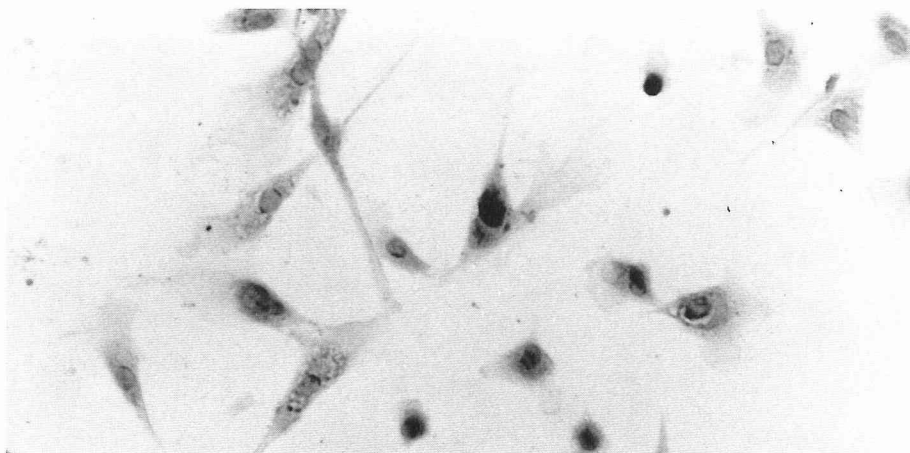


図11 GCT(症例I) 初代培養7日目, 光顕写真×80, ホルマリン固定, H.E. 染色: 小型の類円形細胞や紡錘形細胞, また多核巨細胞よりなり, 活発な ameboid migration が見られる。

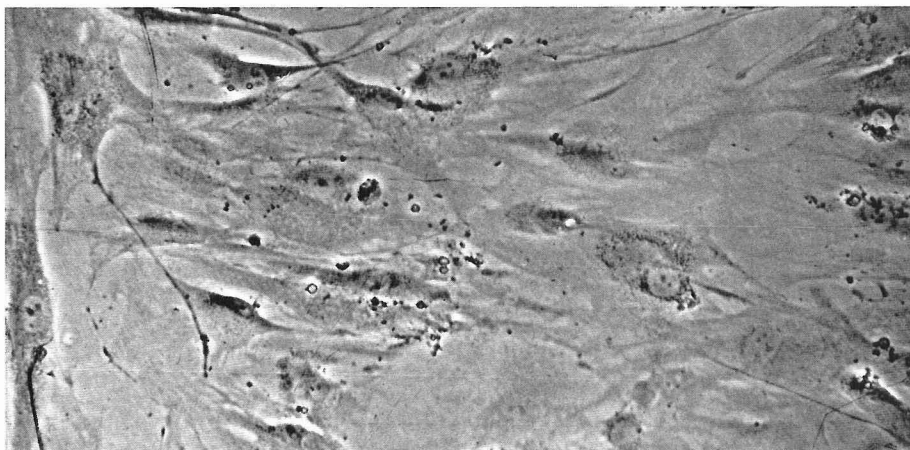


図12 MR 初代培養7日目, 位相差顕微鏡写真×50: 大きめの核と広い細胞質をもち, 樹枝状突起を有するもつ細胞よりなり, 多核細胞も見られる。

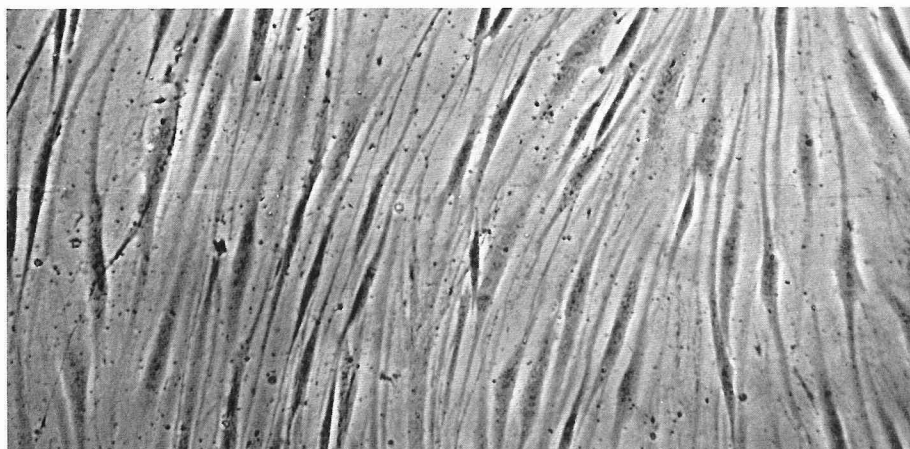


図13 MR 腫瘍周辺健常部 初代培養7日目, 位相差顕微鏡写真×50: 二極性の単一の紡錘形細胞よりなり, 一定の走向性を示す。

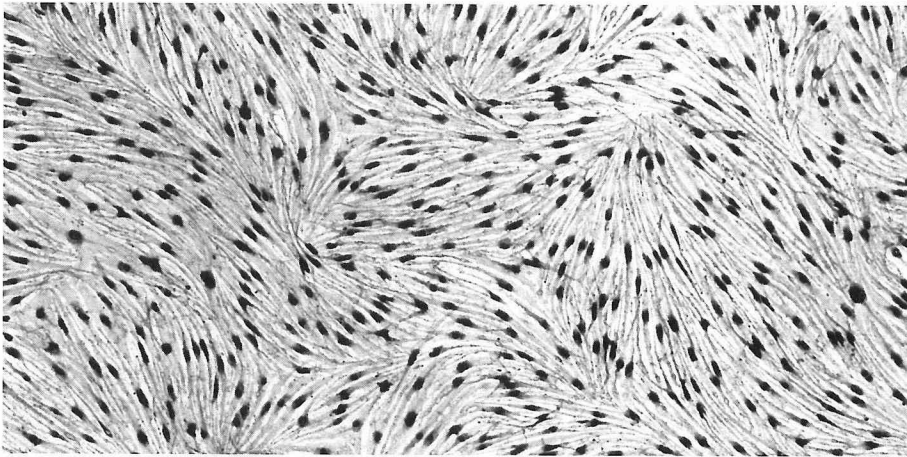


図14 Df (症例 I) 初代培養14日目, 光顕写真×20, ホルマリン固定, Giemsa 染色: 単一の紡錘形の線維芽細胞様細胞が増殖し, 流線形の走向を示す。

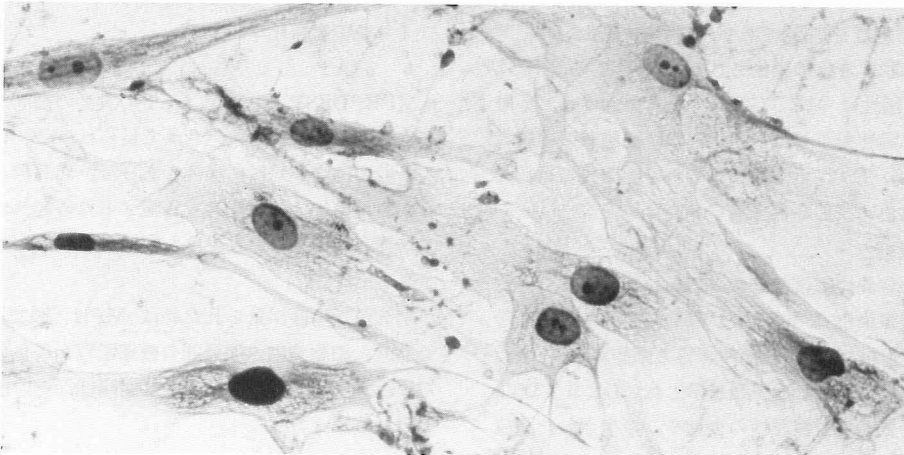


図15 ES 初代培養7日目, 光顕写真×120, ホルマリン固定, Giemsa 染色: 大型の核, 広い細胞質, 樹枝状の突起をもつ細胞の増殖が見られる。



図16 DT 初代培養7日目, 光顕写真×66, ホルマリン固定, Giemsa 染色: 大小不同の紡錘形の細胞の増殖が見られる。

胞質および、樹枝状の突起をもつ多極性の細胞であった(図15)。Confluentの状態では重層した集塊性のcolonyを作る特徴が見られ、このcolonyより細胞を分離し、ES cell lineとして継代培養を行った。継代培養可能回数は26回であった。

(8) DT: explant cultureにて増殖した細胞は、少数の明瞭な核小体をもつ細胞で、短い紡錘形をした大小不同の細胞であった(図16)。Confluentの状態では、重層したシートを形成する特徴が見られ、この重層シートより細胞を単離してDT cell lineとして継代培養を行った。継代培養可能回数は14回であった。

2 光顕特殊染色による形態

a Azan Mallory 染色

本染色による比較でアニリン青の深青色に強陽性を示したものはMFH(図17)、MGCT、Df、ES、DTおよび正常線維芽細胞であり、細胞質内および細胞周囲が線維状に青色に染色された。中程度の陽性はDFSP、弱陽性はMR、GCTであった。また、酢酸フクシンに陽性を示したものは、Df細胞質の線維状構造と、ES、DT、正常線維芽細胞の細胞質の顆粒の一部で赤紫色に染色されて見られた。

b 鍍銀染色

細胞内の好銀性線維成分および顆粒を検討する目的で行った鍍銀染色でMFH、DFSP(図18)、MGCT、MRの細胞株は細胞突起部の線維と細胞質中の多数の顆粒が陽性に見られる特徴を示した。Df(Ⅱ)、DT、正常線維芽細胞でも線維性の突起や、産生された線維構造が一部線維状に陽性であった。

c Sudan black B 染色

FHTの組織中において組織球系の細胞が細胞質内に、しばしば多量の脂肪滴を持つ泡沫細胞として見られることより、各培養細胞の脂肪滴の量を検討した。その結果、ほとんどすべての各細胞に陽性の顆粒が見られ、その中で数が多いものはMFH、MGCT(図19)GCT、MRであり細胞質中に大型の脂肪滴の存在を認めた。通常の線維芽細胞の細胞質にもしばしば脂肪滴が認められ、培養条件によっても大きくその数は変化するといわれている。本染色はこの点に特に留意して、同一培養条件下で比較したが、顕著にその数は異なっていた。

d PAS 染色

大部分の各培養細胞は陰性または弱い陽性を示すのみであったが、ES、DT(図20)は明らかに細胞質内に顆粒状に陽性を示し、線維芽細胞近縁細胞に由来す

るとされる、2種の腫瘍の特徴として見られた。

3 酵素組織化学

a AcPase 染色

本染色では細胞質の顆粒が黒褐色に染色されて見られ、その染色性が強陽性を示したものはMFH、MGCT(図21)、GCTであり、中程度陽性はDFSP、MRであった。またDf、ES、DTは対照の正常線維芽細胞と同程度の弱陽性を示した。

b NSEase 染色

この染色では細胞質の核周囲が瀰漫性に赤褐色調に染色されて見られた。反応強陽性を示したものはMFH、DFSP、MGCT、GCT(図22)であり、中程度陽性はMR、Dfで、弱陽性を示した細胞はES、DTであり、対照の正常線維芽細胞も一部の細胞が弱陽性を示したが、大半は陰性であった。

4 免疫組織化学

a α -AT

MFH、DFSP、MGCT、GCTの大半の細胞が陽性で、細胞質内に瀰漫性に染色されて見られ、ES、DTでも約半数の細胞が同様に陽性であった。培養液血清中の α -AT抗原による偽陽性を否定するため、無血清培地で培養した細胞での本染色も同様に陽性であった。

b α -ACT

明らかな陽性が見られたのはMFH(図23)、GCTであり、細胞質内の核周囲の微細顆粒が染色されて見られた。DFSP(Ⅱ)とESは弱陽性、その他は陰性であった。

c Lysozyme

明らかな陽性を示した細胞はGCTのみであり、MFH、MRで一部が弱陽性であり、いずれも、細胞質の顆粒が染色された。

d S-100

すべての培養細胞が陰性であった。

e Factor VIII

正常線維芽細胞で集塊をなした細胞の細胞質が瀰漫性に一部弱陽性を示したのみで、その他の培養細胞はすべて陰性であった。

f Vimentin

MFH(Ⅱ)、MGCTの大半の細胞が陽性、ESと正常線維芽細胞の約1/3が陽性でDTが弱陽性であり、いずれも細胞質が細胞内に見られる線維状構造の流れにそって染色されて見られた。その他の培養細胞はすべて陰性であった。

g Desmin

Dfのみが明らかに2症例とも細胞質の中央部分が

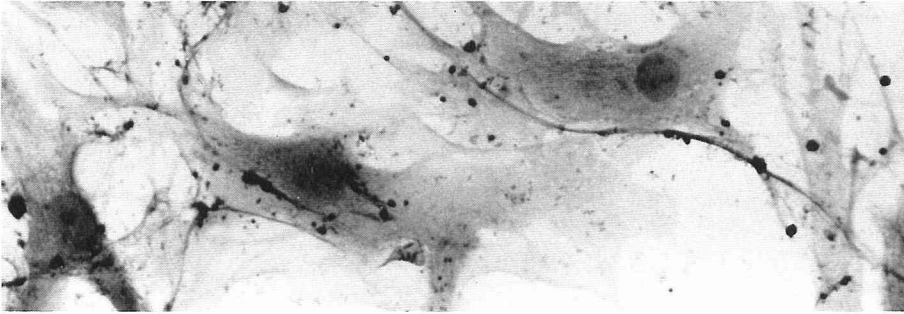


図17 MFH (症例 I) 継代培養数 3 代目, 光顕写真×200, ホルマリン固定, Azan Mallory 染色: 細胞質と細胞周囲が細かく線維状に染色されて見られる。

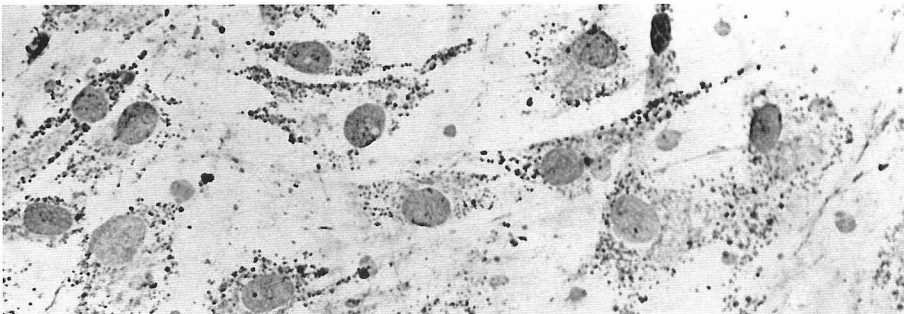


図18 DFSP (症例 I) 継代培養数 3 代目, 光顕写真×100, ホルマリン固定, 鍍銀染色: 細胞周囲の細線維と細胞質の顆粒が好銀性であり, 陽性に見られる。

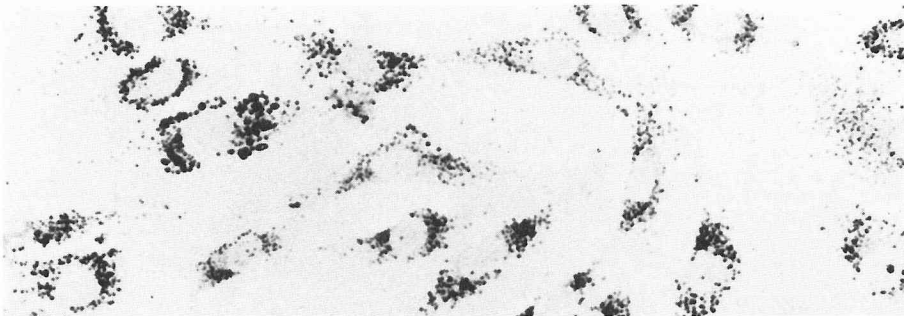


図19 MGCT 継代培養数 3 代目, 光顕写真×100, ホルマリン固定, Sudan B.B. 染色: 細胞質中に多数大型の陽性顆粒が見られる。

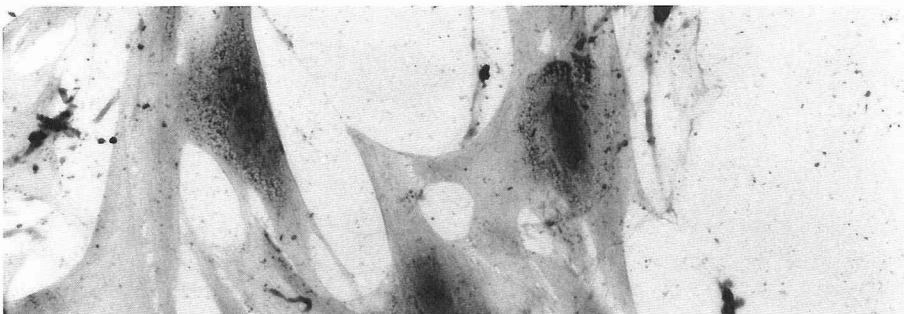


図20 DT 継代培養数 4 代目, 光顕写真×200, ホルマリン固定, PAS 染色: 核周囲の細胞質が瀰漫性に陽性を示し, また細胞質内の顆粒も陽性を示す。

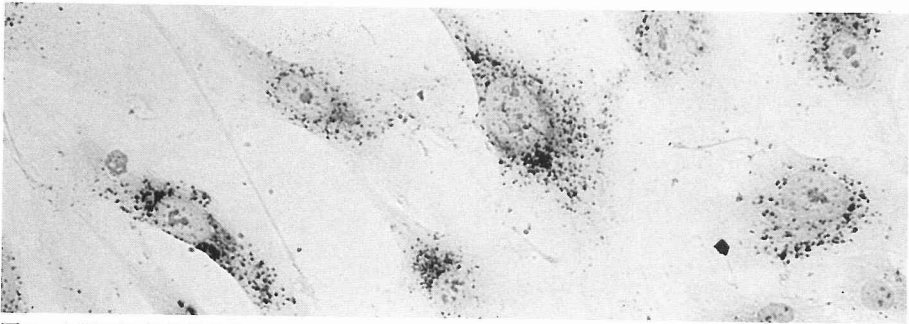


図21 MGCT 継代培養数3代目, AcPase 染色, 光顕写真×120:細胞質内核周囲に多数の陽性顆粒が見られる。



図22 GCT (症例Ⅱ) 継代培養数3代目, NSEase 染色, 光顕写真×80:細胞質内の全体が瀾漫性に濃染されて見られる。

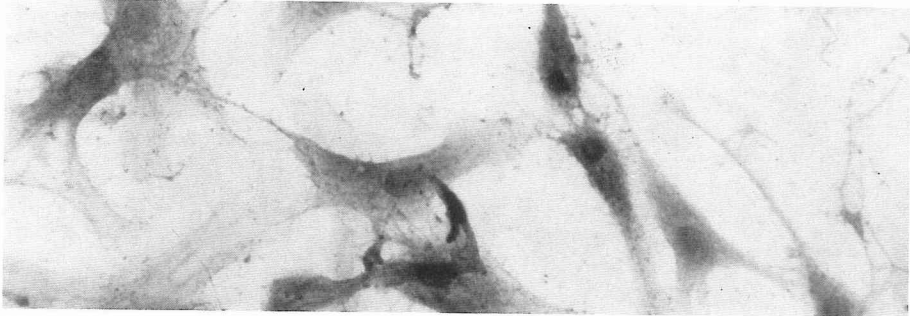


図23 MFH (症例Ⅱ) 継代培養数6代目, α -ACT 染色, 光顕写真×100:大部分の細胞が陽性を示し,細胞質全体が染色されて見られる。

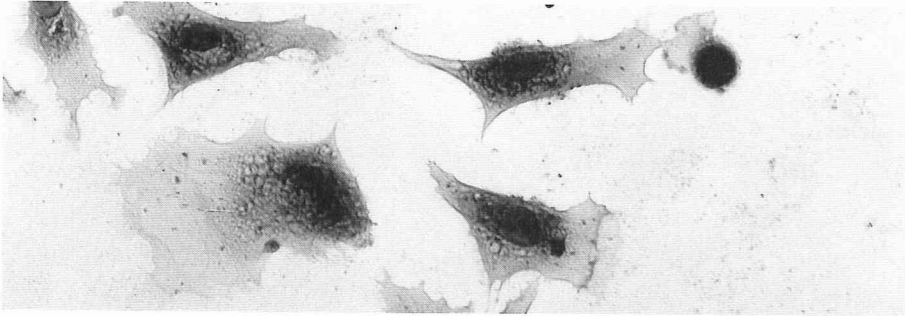


図24 GCT (症例Ⅰ) 継代培養数2代目, Mo2 染色, 光顕写真×80:大部分の細胞の特に核周囲が陽性に見られる。

線維性腫瘍の細胞培養

表1 培養細胞の特殊染色・酵素組織化学・免疫組織化学による光顕観察結果

Cells Items	MFH		DFSP		MGCT	GCT		MR	Df		ES	DT	Fibro.
	case I	case II	case I	case II		case I	case II		case I	case II			
	t. n.	t.	t. n.	t.		t. n.	t.		t.	t.			
Special stainings													
Azan Mallory	++ ++	++	+ ++	+	++	± ++	±	± ++	++	++	++	++	++
Silver	+ +	+	+ +	+	+	± +	±	+ +	±	+	±	+	+
Sudan B.B	++ ±	++	± ±	+	++	++ ±	++	++ ±	±	+	±	±	±
PAS	± ±	±	- ±	-	±	- -	±	- -	-	-	+	++	±
Enzyme cytochemistry													
AcPase	++ ±	++	+ ±	+	++	++ ±	++	+ ±	±	±	±	±	±
NSEase	++ ±	++	++ ±	++	++	++ ±	++	+ ±	±	+	±	±	±
Immunocytochemistry													
α-AT	+ -	+	+ ±	+	+	+ -	+	± -	±	±	+	+	±
α-ACT	+ -	+	- -	±	-	+ -	+	- -	-	-	±	-	-
Lysozyme	± -	±	- -	-	-	+ -	+	± -	-	-	-	-	-
S-100	- -	-	- -	-	-	- -	-	- -	-	-	-	-	-
Factor VIII	- -	-	- -	-	-	- -	-	- ±	ND	-	ND	-	±
Vimentin	ND ND	+	- +	-	+	- ±	-	- +	-	-	+	±	+
Desmin	ND ND	ND	ND ND	-	ND	ND ND	-	ND ND	+	+	-	ND	±
Keratin	- -	-	ND ND	ND	ND	ND ND	ND	ND ND	ND	-	+	-	-
Actin	ND ND	+	+ +	+	+	+ +	+	+ +	±	±	+	+	+
Mo2	± -	-	+ -	±	-	+ -	-	+ -	-	-	-	-	-

t. : tumor region n. : normal region

(+): much or many (+): moderate (±): small or little (-): scarce or not observed

ND : not done

特に濃く線維状に陽性であり、正常線維芽細胞も一部に陽性、その他の細胞は陰性であった。

h Keratin

表皮の whole keratin に対する抗原は、ES で一部の細胞が保有しており、細胞質内が細線維構造様に染色され、その他は陰性であった。

i Actin

MFH(Ⅱ), MGCT, DFSP, GCT, MR, DT, ES, 正常線維芽細胞は、細胞質全体が漸進的に濃染されて陽性を示したが、Df のみ弱陽性であった。

j Mo2

GCT(Ⅰ)の細胞質の核周囲部が染色されて見られ、最も高い陽性を示し(図24)、次いで同様に DFSP(Ⅰ), MR が、MFH(Ⅰ) DFSP(Ⅱ)の一部に陽性細胞が見られた。その他の細胞はすべて陰性であった。

以上特殊染色、酵素化学染色および免疫染色の光顕的な観察の特徴を表1にまとめて示した。

B 培養細胞の電顕観察

1 透過電顕

各培養細胞の核の形態を観察すると、不整形の切れ込みが MFH(Ⅰ), MGCT, Df, 正常線維芽細胞を除く全細胞に見られた。核の染色質の分布では GCT(図25), Df(図26), DT(図27)は異染色質が多い核の細胞が主体であり、その他の細胞は正染色質の多い核の細胞が主体であった。核小体と糸粒体は DFSP(図28)が特に発達がよく、Golgi 装置の特に発達のよい細胞は DFSP(図28), ES(図29), DT(図27), 線維芽細胞であり、細胞質内に Golgi 由来の分泌顆粒と思われるものが明らかに多数見られたものは ES(図29), DT(図27)であった。粗面小胞体の特に発

表2 培養細胞の電顕観察結果

Cell Line Cell Organelle	MFH		DFSP		MGCT	GCT		MR	Df		ES	Dt	fibro.
	case I	case II	case I	case II		case I	case II		case I	case II			
nuclear membrane	long oval	irregular (indent.)	irregular (indent.)	irregular (indent.)	long oval	irregular (indent.)	irregular (indent.)	irregular (indent.)	long oval	long oval	irregular (indent.)	irregular (indent.)	oval
chromatin	eu-chromatin	eu-chromatin	eu-chromatin	eu-chromatin	eu-chromatin	hetero-chromatin	hetero-chromatin	eu-chromatin	hetero-chromatin	hetero-chromatin	hetero-chromatin	hetero-chromatin	eu-chromatin
nucleus	small	large	large	common	common	large	common	common	small	common	large	small	common
mito-chondria	±	±	±	±	+	+	+	+	±	+	+	+	+
Golgi apparatus	±	±	±	±	+	±	±	+	±	±	±	±	±
Golgi vesicle	±	±	±	±	±	±	-	+	±	±	+	±	+
rough ER	+	+	±	±	±	+	±	+	±	±	±	±	±
lysosome	±	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±	+	±
myelin figure	±	-	±	+	±	+	±	±	-	-	±	±	-
ribosome	±	±	+	±	±	±	+	+	±	±	+	±	±
cytoplasmic filament	±	+	±	±	±	+	±	±	±	±	±	±	±

(++) : much or many (+) : moderate (±) : small or little (-) : scarce or not observed

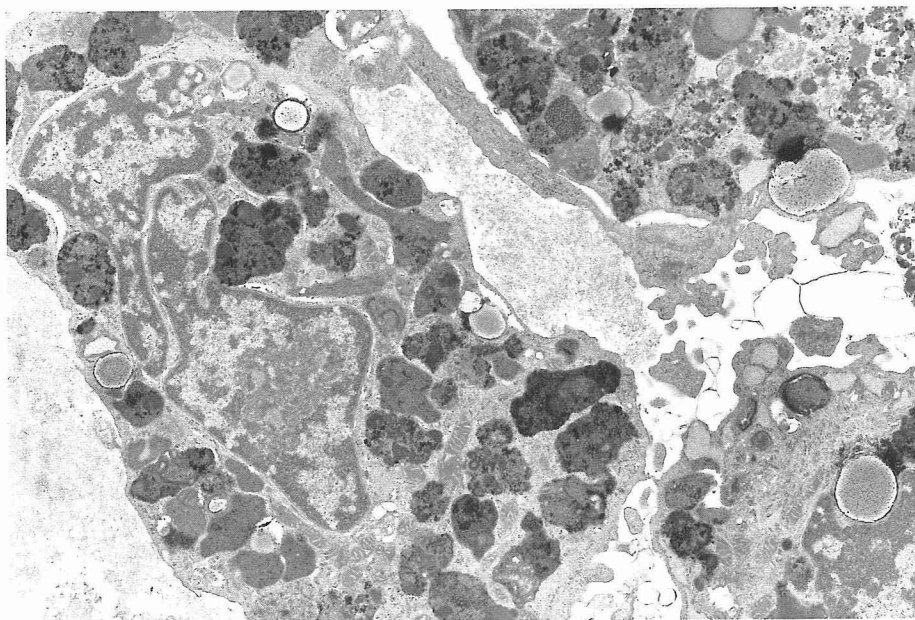


図25 GCT（症例Ⅰ）継代培養数3代目，透過電顕写真×6,500：核は不規則に切れ込み，細胞質に顆粒が充満している。

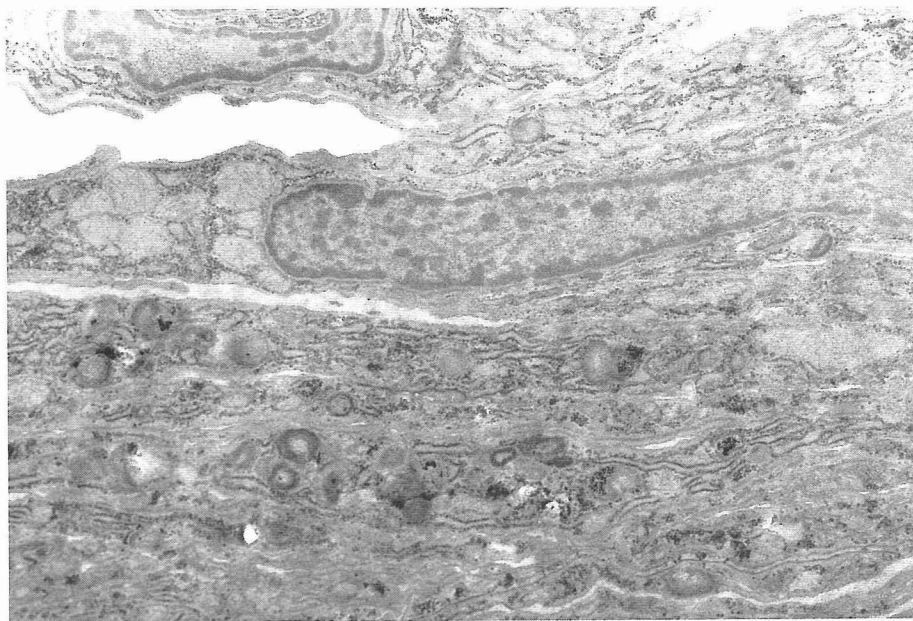


図26 Df（症例Ⅱ）継代培養数3代目，透過電顕写真×14,000：紡錘形の細胞が多く，核は桿状で細胞質に粗面小胞体が発達している。

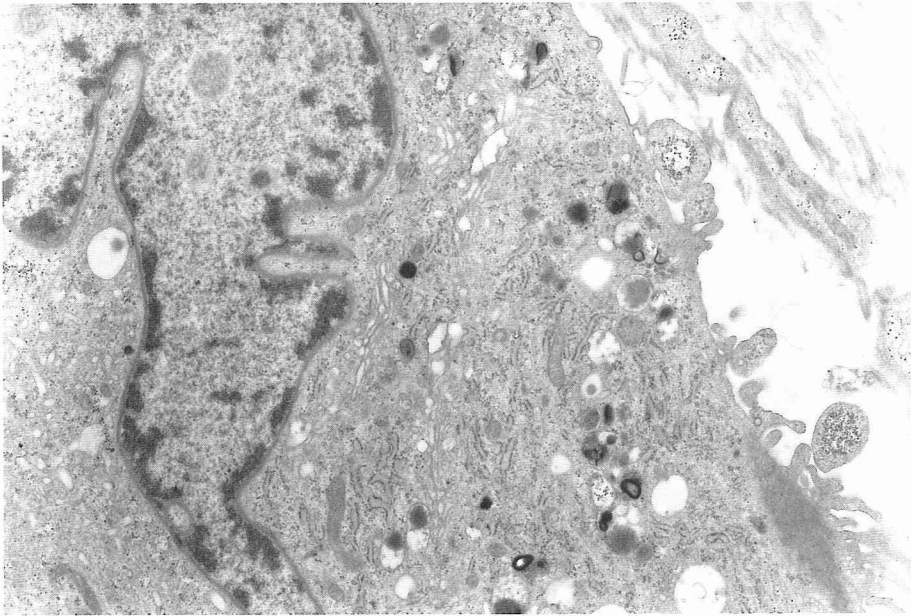


図27 DT 継代培養数4代目，透過電顕写真×13,000：核は不規則形，細胞質に Golgi 装置，粗面小胞体が発達している。

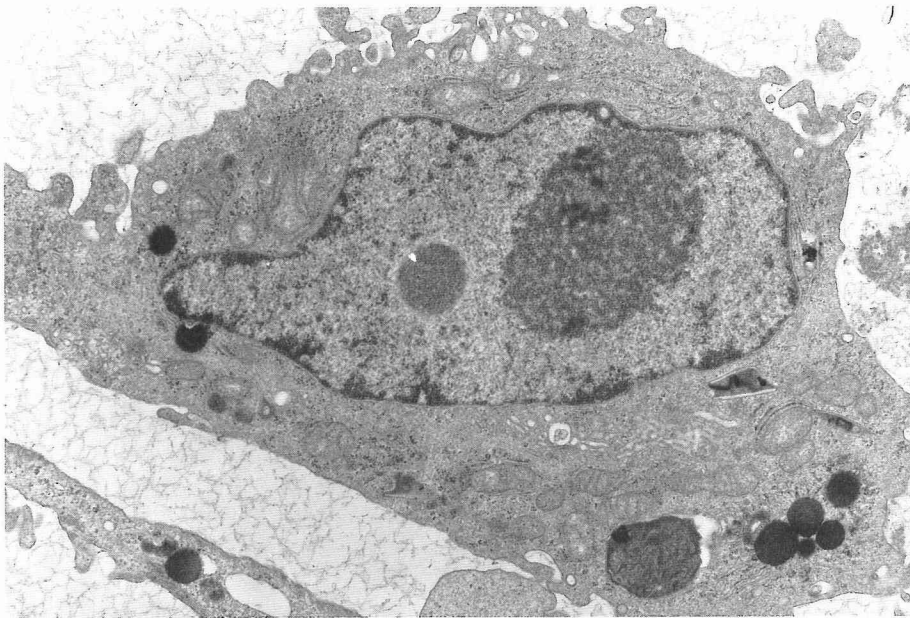


図28 DFSP (症例Ⅱ) 継代培養数6代目，透過電顕写真×9,000：核は不規則形，細胞質に Golgi装置，糸粒体が多い。

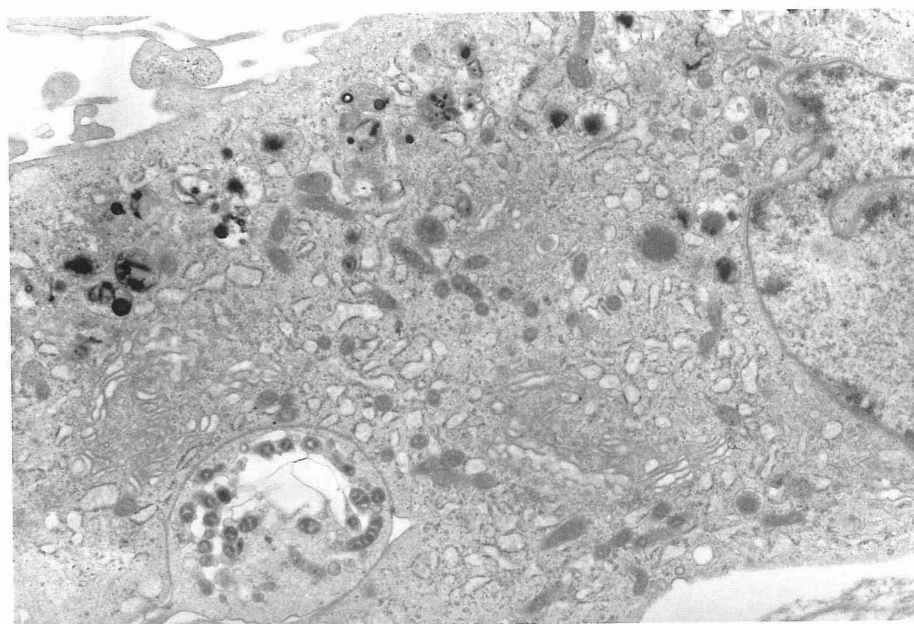


図29 ES 継代培養数 5 代目，透過電顕写真×15,000：核は不規則形，細胞質に Golgi 装置，粗面小胞体が多い。

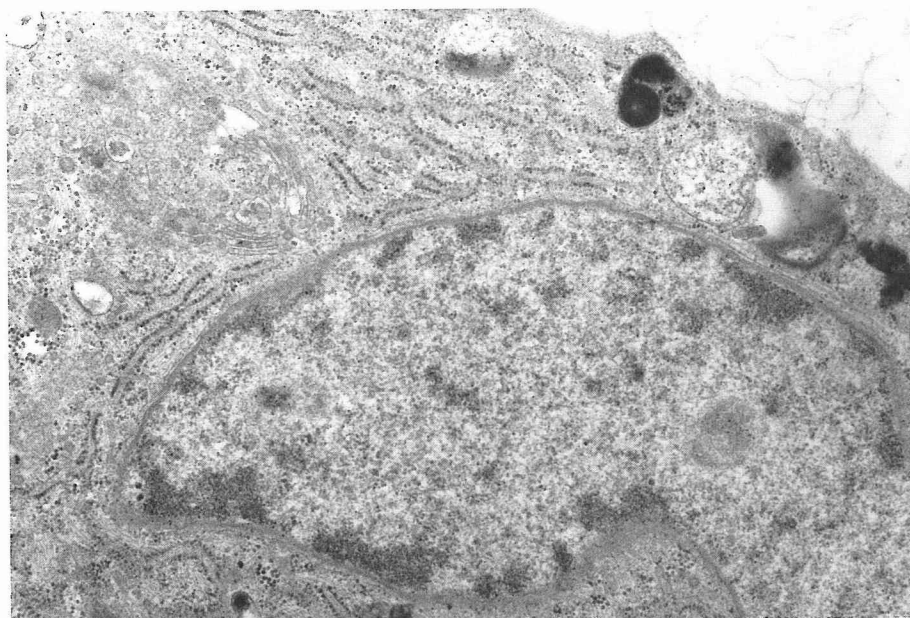


図30 MGCT 継代培養数 6 代目，透過電顕写真×20,000：核は不規則形，細胞質に粗面小胞体が発達している。

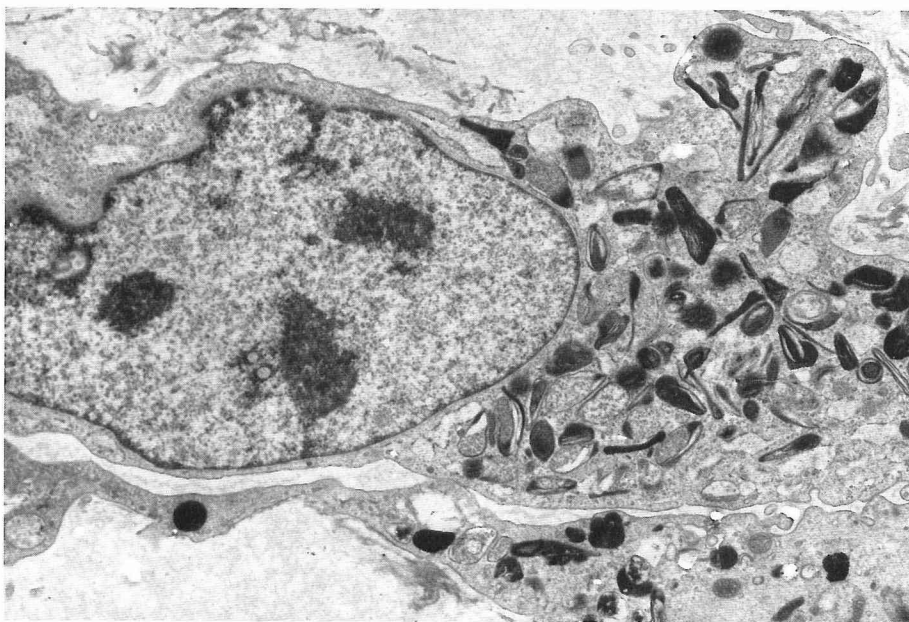


図31 MR 継代培養数4代目，透過電顕写真×20,000：核は不規則形，細胞質に水解小体が多い。

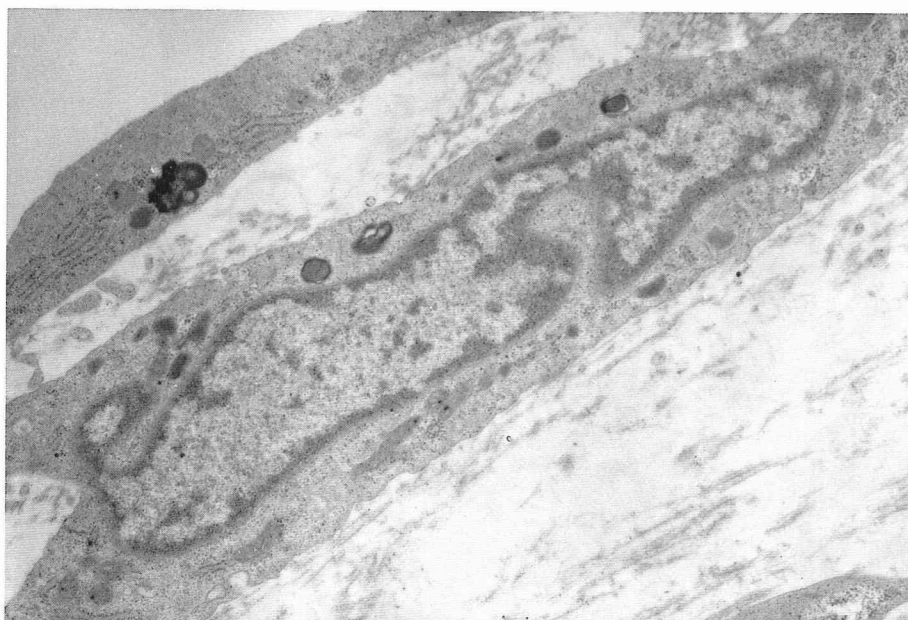


図32 MFH（症例Ⅱ）継代培養数5代目，透過電顕写真×10,000：核は桿状で切れ込みが多く，細胞質に粗面小胞体とリボソームが発達し，細胞間に膠原線維が多い。

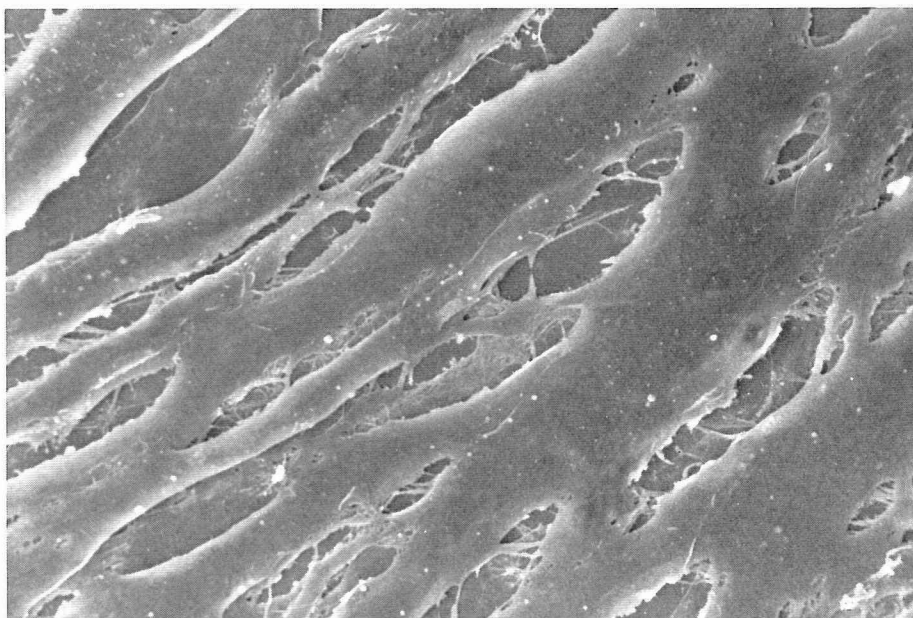


図33 正常線維芽細胞 継代培養数3代目，走査電顕写真×1,100：一定の走向を示し，膜面は平滑で糸状足が見られる。

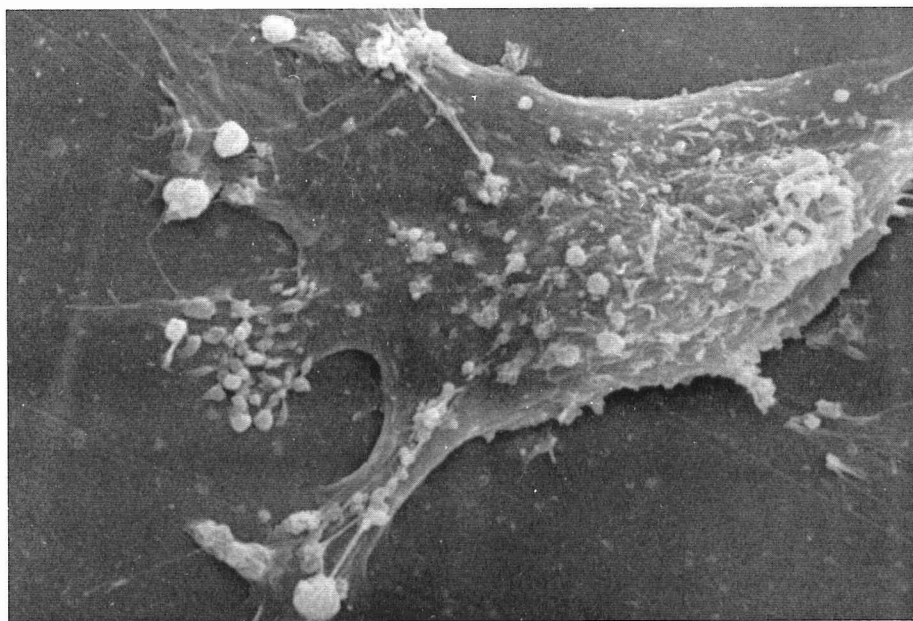


図34 MR 継代培養3代目，走査電顕写真×4,200：層状足がガラス面に薄く伸び，表面に微絨毛と水疱が多数見られる。

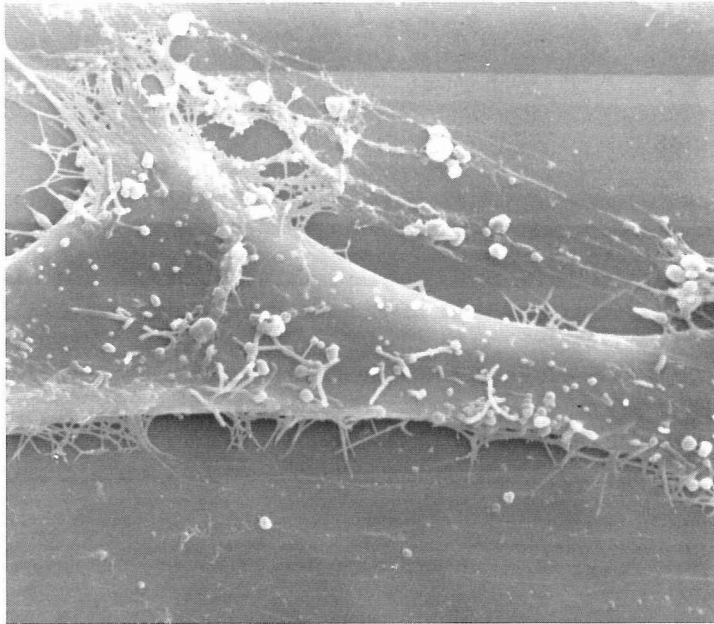


図35 MFH（症例Ⅱ）継代培養数4代目，走査電顕写真×4,600：表面に突出した微絨毛と多数の水疱と糸状足が見られる。

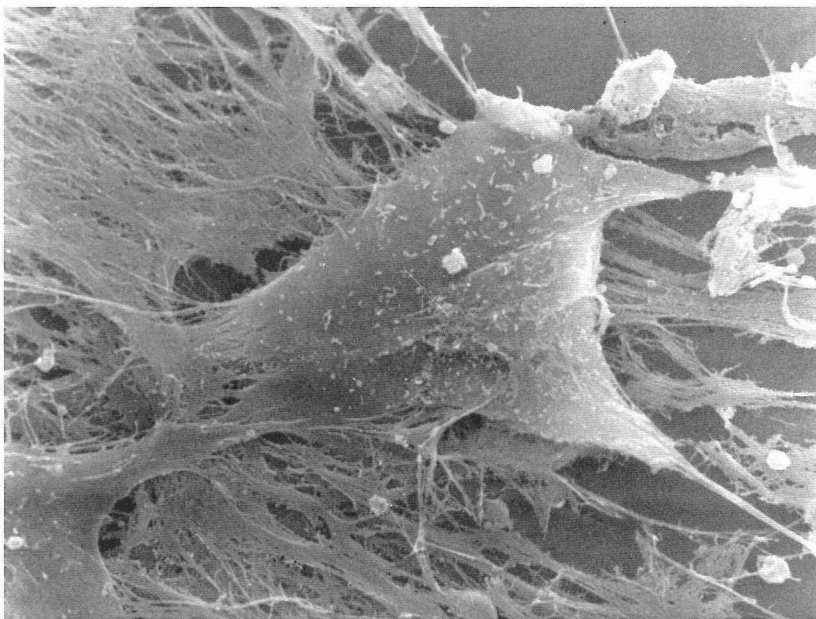


図36 MGCT 継代培養数6代目，走査電顕写真×4,000：膜表面に少数の微絨毛をもち，周囲に糸状足と線維状構造が豊富に見られる。

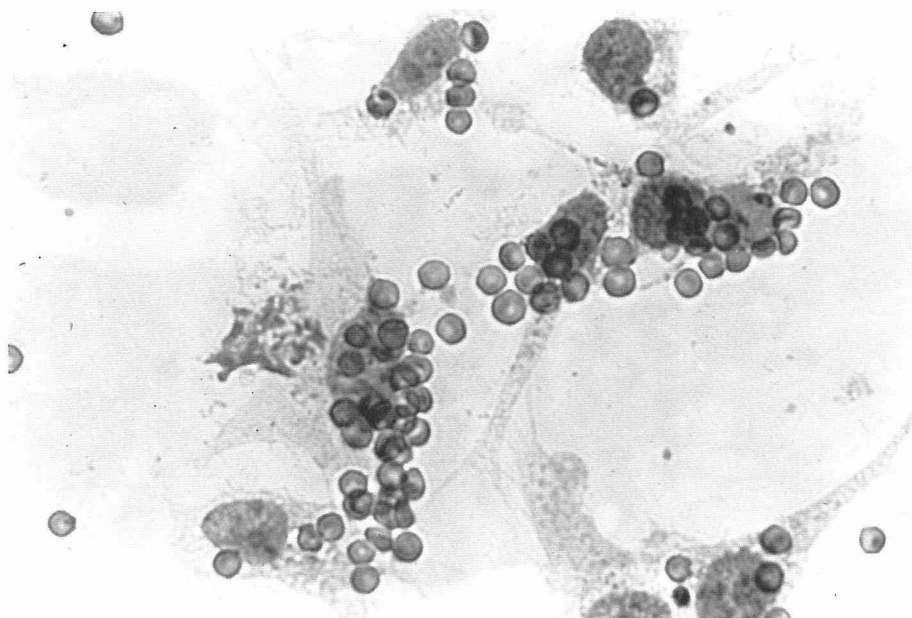


図37 DFSP（症例Ⅰ）継代培養数2代目，EAC rosette 試験，光顕写真×200：細胞膜面に感作赤血球が付着し，rosette 形成が見られる。

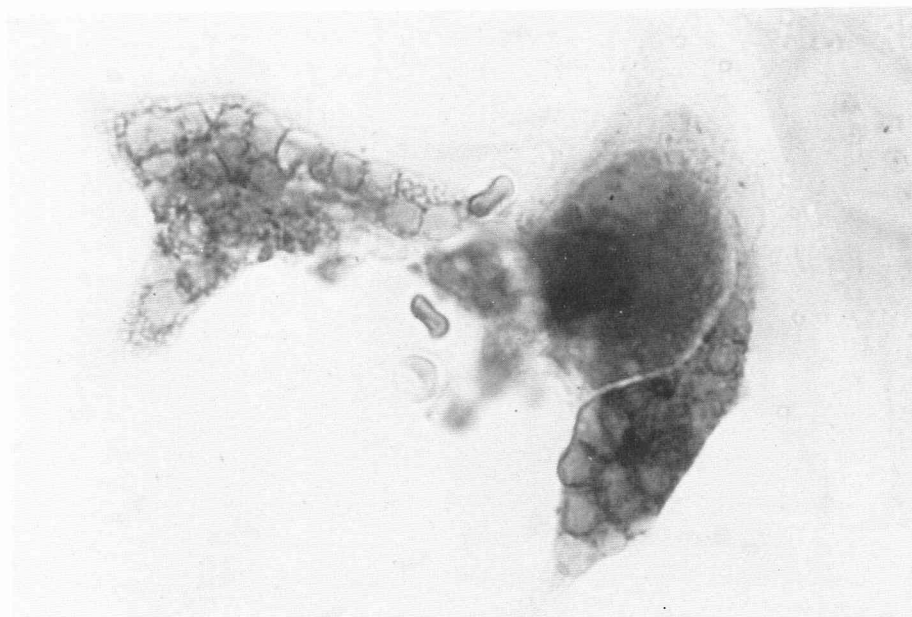


図38 MFH（症例Ⅰ）継代培養数6代目，赤血球貪食試験（EA rosette）光顕写真×200：細胞質内に貪食された感作赤血球が多数見られる。

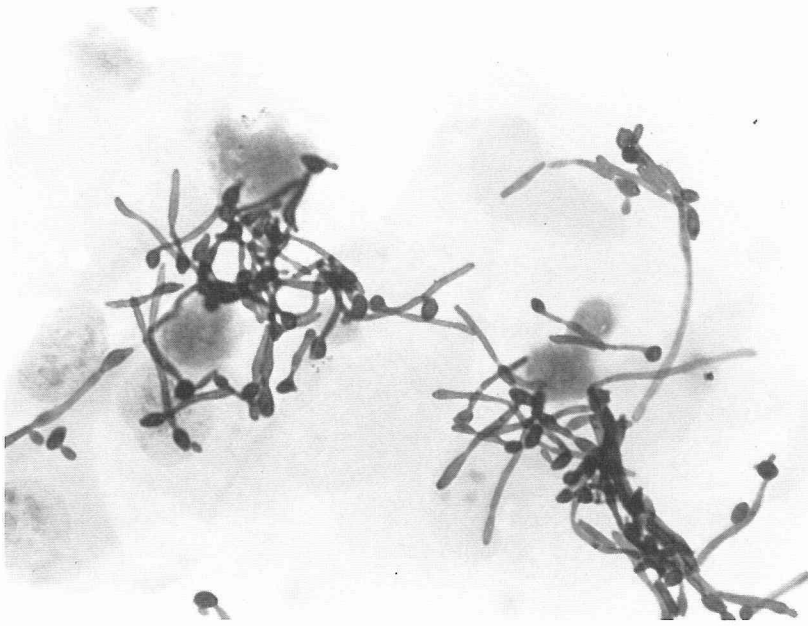


図39 MR 継代培養数5代目, *C. albicans* 貪食試験, ホルマリン固定 PAS 染色, 光顕写真
×200: 細胞が偽菌糸を貪食し, 細胞質内の貪食部分が円形に染色されて見られる。

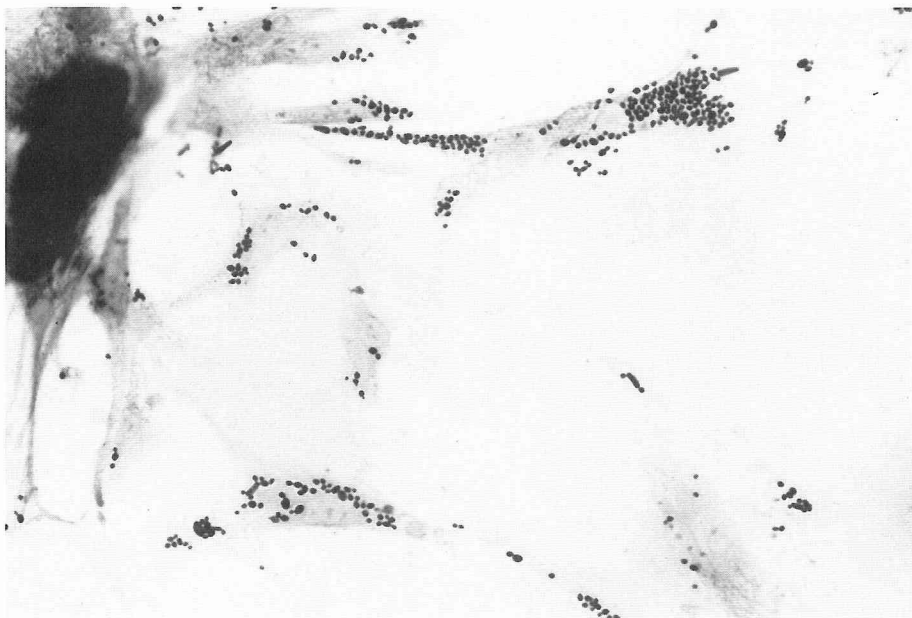


図40 ES 継代培養数4代目, *C. albicans* 貪食試験, ホルマリン固定 PAS 染色, 光顕写真
×80: 細胞が孢子を貪食しているが, 消化された像はみられない。

達のよいのは、MGCT (図30), Df (図26), ES (図29), DT (図27), 正常線維芽細胞であった。Lysosome 由来の顆粒, myelin figure とともに多く見られた培養細胞は DFSP (I), GCT (I), MR であり, 特に MR (図31) は多数の著しい lysosome 由来顆粒が見られた。細胞質中の ribosome の量の比較では, MFH (図32), DT (図27), 正常線維芽細胞に特に多量に見られ, 少ない細胞は DFSP (II) (図28), Df (I) であった。

Cytoplasmic filament の量の比較では, MFH (図32), MGCT (図30), Df (図26), ES (図29), DT (図27), 正常線維芽細胞に多い傾向が見られた。

各培養細胞の電子顕微鏡による観察結果のまとめを表2に示した。

2 走査電顕

a 正常線維芽細胞

長軸に沿って合い重なりつつ一定方向の増殖性を示し, 細胞膜は平滑で走向に沿って細い糸状足を有していた (図33)。

b GCT, MR

各腫瘍培養細胞は, 細胞膜構造においても異なった特徴を保持し, 単球に特徴的である突起が見られた細胞は MR (図34) と GCT であり, 層状足がガラス面に薄く伸び, 微絨毛と水泡が細胞表面に多数観察された。

c DFSP, MFH, MGCT

これらの培養細胞は膜表面に小数の微絨毛と多数の糸状足をもち, 互いに交錯して網目状の構造を形成する特徴が見られた (図35, 36)。

d Df

正常線維芽細胞と走向性は酷似したが, confluent の状態での細胞シートはやや凹凸に富み, 小数の微絨

毛が表面に見られた。

e ES, DT

両細胞は confluent の状態での細胞シートは正常線維芽細胞よりも, より平坦で滑らかであり, 細胞膜表面は無構造で滑らかである特徴が見られた。

C 機能的検索

1 膜表面 receptor

Fc receptor (EA rosette) および C3b receptor (EAC rosette) の陽性率は, 表3に示す通りであった。Fc receptor の陽性率の高い順序は MGCT > DFSP (図37) > GCT > MFH, MR であり, Df, ES, 正常線維芽細胞は無感作対照赤血球と同じく1%以下で陰性であった。

C3b receptor の陽性率の高い順序は MR > DFSP > MFH, MGCT > Df, 正常線維芽細胞であり GCT, ES も一部陽性細胞が見られた。

2 赤血球貪食試験

Rosette 試験と同時にに行った約2時間放置による赤血球貪食試験で, 特に MFH (図38), GCT に, 高い貪食能を有する細胞が特徴として観察された。

3 免疫貪食能

特に高い貪食能を示したものは MFH, MGCT, GCT, MR (図39) であり, 約35%の細胞に明らかな貪食能が見られた。DFSP, ES (図40), DT については約5~10%の細胞に貪食能があったが, ES, DT では細胞質の菌体の消化像はまったく見られなかった。Df は貪食能が約3%の細胞に見られ, 消化像も一部に観察された。正常線維芽細胞では明らかな貪食能は見られなかった。

4 Collagen 産生能

[³H] proline の取り込みと, 細菌性 collagenase 消化による各培養細胞 (MFH, DFSP, MGCT, GCT,

表3 培養細胞の SURFACE RECEPTOR の陽性率

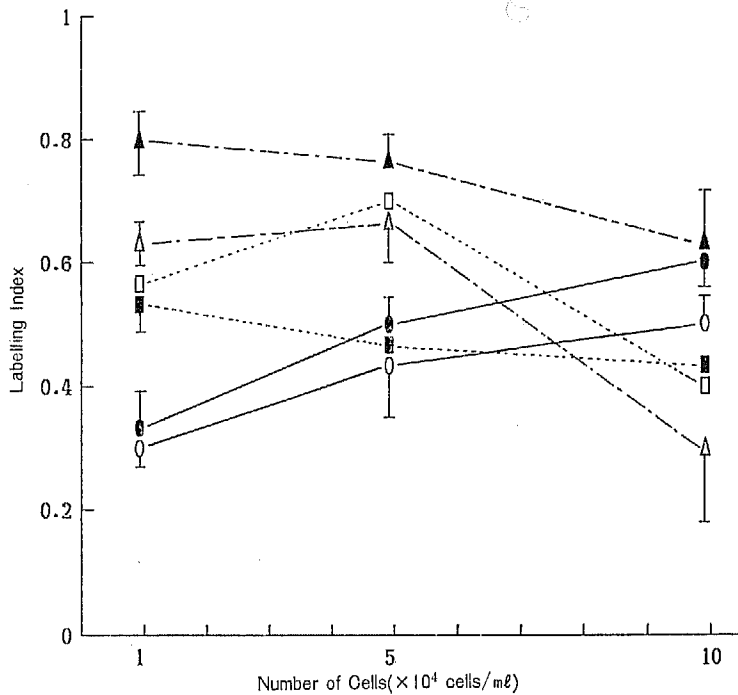
Cell Line	MFH		DFSP		MGCT	GCT		MR	Df		ES	fibro.
	case I	case II	case I	case II		case I	case II		case I	case II		
EA (Fc receptor) (mean±S. D. %)	11±1	10±2	27±5	14±3	46±8	12±3	16±4	7±2	1<	1<	1<	1<
EAC (C3b receptor) (mean±S. D. %)	34±10	19±6	45±10	34±8	29±7	6±1	5±2	59±11	17±5	14±6	8±3	15±2

(S. D. は triplicate samples での standard deviation を示す)

表 4 培養細胞の collagen 産生能の測定結果

Cell Line Data (mean±S. D.)	MFH		DFSP		MGCT	GCT	Df		ES	DT	Fibro.		
	case I	case II	case I	case II			case I	case II			case I	case II	case III
Collagen (cpm/10 ⁵ cells)	178 ±21	222 ±35	348 ±24	251 ±49	269 ±15	101 ±16	329 ±35	402 ±45	325 ±19	559 ±62	489 ±31	391 ±27	422 ±40
Noncollagenous protein (cpm/10 ⁵ cells)	264 ±43	377 ±31	1314 ±81	887 ±60	448 ±60	497 ±77	813 ±64	996 ±73	892 ±41	1430 ±93	1174 ±89	979 ±108	933 ±61
Collagen synthesis Ratio (%)	11.1	9.8	4.7	5.0	10.0	3.6	7.4	6.7	6.3	6.8	7.2	6.9	7.7

(S. D. は triplicate samples での standard deviation を示す)

図41 培養細胞の DNA 合成標識率測定 (³H]thymidine)

MFH Cells ■.....■ MR Cells ▲---▲ Fibroblast ●——●
 Df Cells □.....□ DFSP Cells △---△ ES Cells ○——○

(barはtriplicate samples での standard deviation を示す)

Df, ES, DT, 正常線維芽細胞)の培養液に放出された collagen 産生能の比較を表 4 に示した。

一定細胞数 (1 × 10⁵個) 当たりの collagen 産生能の比較で, 高い値を示したものは DT, 線維芽細胞, Df(II)であった。Collagen の相対合成活性の最も高

い値を示したものは MFH であり, 次いで MGCT であった。

Df, ES, DT は control の線維芽細胞とはほぼ同程度の相対合成活性値を示したが, GCT は単位細胞当たりの collagen 産生絶対量も最も少なく, 線維芽細胞

線維性腫瘍の細胞培養

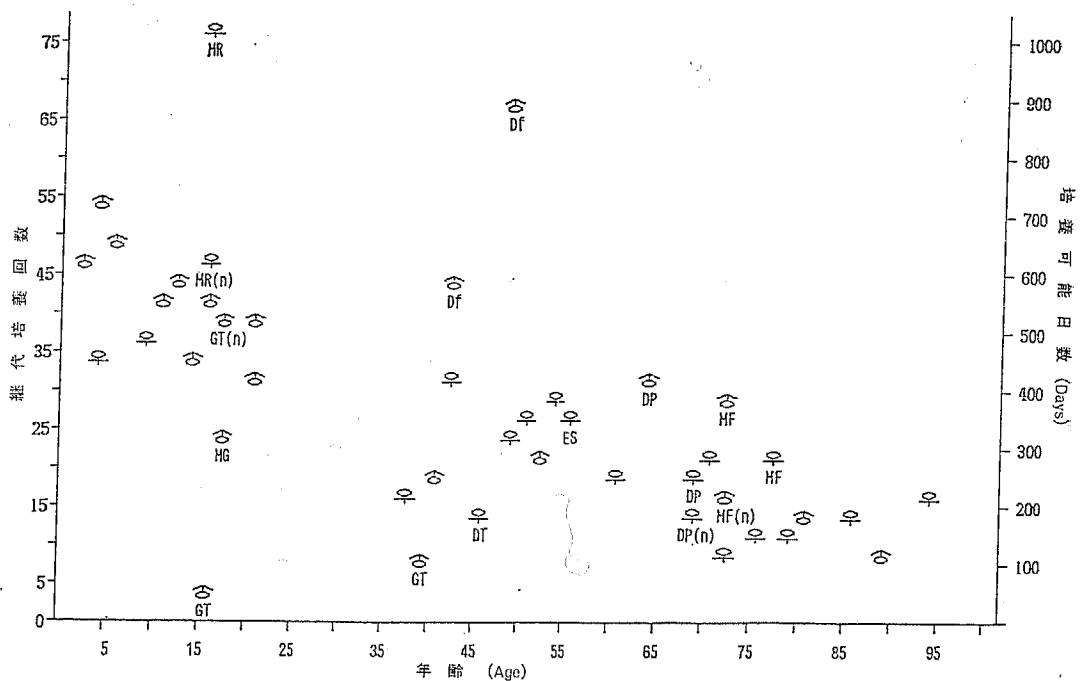


図42 培養細胞継代可能日数 (Life span)

MF : malignant fibrous histiocytoma
 MG : malignant giant cell tumor of bone
 DP : dermatofibrosarcoma protuberans
 GT : giant cell tumor of tendon sheath
 MR : multicentric reticulohistiocytosis
 Df : dermatofibroma
 ES : epithelioid sarcoma
 DT : desmoid tumor
 (n) : normal region
 (t) : tumor region

の約 1/2 の低い相対合成活性を示すものであった。

5 DNA 合成率

各培養細胞 (MFH, DFSP, MR, Df, ES, 正常線維芽細胞) につき, $[^3\text{H}]$ thymidine の取り込みによる radioautography を行い, labelling index (DNA 合成標識率) を測定, その比較を図41に示す。

正常線維芽細胞および ES はカバーガラス上で confluent の状態である 1×10^5 個/ml の細胞数でも DNA 合成標識率が上昇を示した。これに対し, MFH, DFSP, MR, Df では, 細胞密度の上昇とともに, DNA 合成標識率が低下する傾向を示し, すなわち, 培養器中で細胞が一定密度に達すると増殖が急激に低下する, より強い細胞密度依存性の増殖抑制作用をもつことが見られた。

6 継代可能回数

種々の年代の健常部位真皮深層部より線維芽細胞の培養を行い, 継代培養を繰り返し継代可能回数を測定した。その結果, donor の年齢に相関して, 高年齢

者のものほど継代可能回数が減少することを認めた。種々の年代のヒト真皮線維芽細胞と各腫瘍細胞との継代可能回数との比較を図42に示す。

各腫瘍由来培養細胞の継代培養を繰り返した細胞の内, DFSP (II) の細胞の一部は安定した増殖性をもつ, いわゆる樹立細胞株となり, 現在約 6 年継代培養を行っている (樹立細胞株となった細胞は, 継代回数測定細胞からは除いた)。

長期間継代が可能であった腫瘍由来培養細胞も末期と思われる時期になると, 拡張した細胞質に多数の空胞と, 核萎縮が見られ, 培養液を交換しても増殖は停止した。

各腫瘍細胞の継代可能回数による同年代の線維芽細胞との比較で, MR と Df は継代可能期間が著しく長期間であり, GCT, DT は逆に短期間であるという傾向が見られた。MFH, DFSP, ES は, 各年代の線維芽細胞とはほぼ同様の継代可能回数を示した。

IV 考 察

腫瘍細胞は一般にその形態や機能に、その発症由来細胞の何らかの性質を保持していることが多く、腫瘍より分離培養された細胞の性質を調べることは、その発症母細胞を検索する上で重要な意味をもつと思われる。本実験は、各腫瘍の発症由来細胞についての検討を目的とし、各腫瘍から培養した細胞のもつ特性と機能の関連性について検討した。これら各腫瘍組織より組織培養した増殖性のある細胞に注目し、継代を繰り返して、その培養細胞のもつ種々の特性について比較検討した。線維性腫瘍の分類において、本研究で検討した腫瘍は次の通りである。

悪性線維性組織球腫 (MFH)
隆起性皮膚線維肉腫 (DFSP)
骨悪性巨細胞腫 (MGCT)
腱鞘巨細胞腫 (GCT)
多発性細網組織球腫 (MR)
皮膚線維腫 (Df)
類上皮肉腫 (ES)
類腱腫 (DT)

MFH, MGCT, DFSP, GCT は腫瘍の分類において、線維性組織球性肉腫のカテゴリー⁵⁾に、MR は組織球の腫瘍性増殖というよりはむしろ組織球の反応性増殖症²³⁾ではないかと考えられているがその結論は出されていない。

通常、真皮や臓器の間質を培養すると紡錘型をした細胞が増殖し、一般的にこの細胞は線維芽細胞 (fibroblast) と呼ばれている。この細胞は結合組織間質中にある細胞で、間葉系細胞の起源をもち、種々の細胞間物質を合成する多潜能未分化細胞であり、その起源は血管周囲にあると考える報告²⁴⁾⁻²⁸⁾が多く出されている。そして、線維芽細胞の近縁細胞として筋線維芽細胞 (myofibroblast)、滑膜芽細胞 (synovialblast) 等があり、ES は Enzinger²⁹⁾ により、DT は Moschella と Hurley³⁰⁾、Lever³¹⁾ により、これらに属する細胞が腫瘍の原因由来細胞ではないかと、組織学的に検討されている。しかし、通常の典型的な線維芽細胞との関係については、未だ十分に解明されていない。

本実験での FHT に分類される腫瘍の各種特殊染色での特徴は、Sudan black B 染色の所見において ES, DT および線維芽細胞と比べて陽性顆粒がより多くみられたことである。MFH, GCT, MR が特に多く、

この所見は MFH 培養細胞で本染色で陽性顆粒が見られたと報告している、杉山³²⁾と同様の実験結果であった。組織球様細胞には生理的狀態においても脂肪滴を多くもつ性質があり、環境の変化や何らかの因子が加わるにより、その量が増大し、泡沫細胞を形成すると考えられる。

PAS 染色において注目すべき点は、ES, DT の HFT に分類されない二者が明らかに陽性を示した点であり、通常、線維芽細胞や近縁細胞は粘液多糖類を合成するといわれるが、この陽性所見は両腫瘍の発症母細胞の機能的な面より、糖類の合成能が高い線維芽細胞に近い起源をもつものであることを示唆し、HFT に属するとされる腫瘍培養細胞で明らかな陽性が見られない点を考え合わせると、それらの発症母細胞が異なることを考える根拠の1つとなるであろう。

Macrophage は活発な貪食能を発揮するという共通の性質を持ち、そのため多数の lysosome 由来の酵素活性をもつといわれる。本実験での酵素組織化学的染色のうち AcPase, NSEase では、各腫瘍で FHT に属するとされる腫瘍で MFH, DFSP, MGCT, GCT が特に強い陽性を示し、AcPase と NSEase の陽性所見とは両者とも共通するものであり、両者一体として保有される特徴があると思われる。両酵素活性は ES, DT, 正常線維芽細胞でも、陽性を示す細胞が部分的に見られたが、その量は FHT グループに分類される培養細胞と比べると、明らかに少ないものであり、この量的な違いは発生由来細胞の起源が異なることを示唆しているとも考えられる。免疫組織化学による染色の各培養細胞の各種抗原の保有の検討で、肝臓の Kupffer 細胞で陽性であることから、組織球腫瘍の marker として有用であるとされる³³⁾⁻³⁵⁾糖タンパク α_1 -antitrypsin (α -AT) は FHT グループと ES, DT および対照として用いた正常線維芽細胞でも一部明らかに陽性であった。この事実より、 α -AT は *in vitro* で培養された細胞に非特異的に発現されやすい抗原であって、培養細胞の α -AT 陽性所見だけでもとの腫瘍が FHT 分類系に属すると断定することは、困難であると思われる。

同じく組織球系腫瘍の marker で α -AT と同種の糖タンパク抗原である³³⁾ α_1 -antichymotrypsin (α -ACT) は、MFH と GCT に陽性、DFSP(II) と ES で弱陽性その他は陰性であった。この点より、 α -AT よりもむしろ α -ACT が FHT 培養細胞が特異的に発現する可能性の高い marker の1つではないかと

考えられる。

糖タンパクの水解酵素で、活性化された培養 macrophage には、大量の lysozyme が分泌されるといわれている³⁶⁾³⁷⁾。lysozyme は、GCT が陽性で MFH, MR が一部陽性であった。Isacson ら³⁸⁾や Meister と Nathrath³⁴⁾は、組織球系腫瘍組織においても lysozyme 活性は陰性を示すことが多いと報告している。線維芽細胞系とされる腫瘍において、まったく陽性は見られず、本酵素の陽性を示す腫瘍細胞は、組織球性の性質をもつことを強く示唆するといえるが、逆に陰性所見が組織球性起源を否定することは困難であると思われる。

神経系の腫瘍や Langerhans 細胞由来腫瘍などで陽性を示すとされる S-100蛋白による検討で、各腫瘍すべて陽性所見は見られず、DFSP など組織の電顕的な観察から、神経系に発症細胞の起源を持つのではないかとする Hashimoto ら³⁹⁾の報告を支持する所見や、MR の起源は Langerhans 細胞ではないかとする Ebner と Gebhart⁴⁰⁾の説を肯定する所見は得られなかった。

血管系の細胞がもつ抗原である Factor VIII についての検討で、各腫瘍細胞とも陰性であり、血管系の細胞に発症母細胞をもつ可能性も否定的である。線維芽細胞およびその近縁細胞の起源を血管内皮細胞説²⁴⁾⁻²⁸⁾とするなら、今回検討した各腫瘍すべて、その血管系細胞に起源をもつ可能性を示唆する所見は得られなかった。

細胞内の線維成分の検討で、線維芽細胞、内皮細胞および非筋肉性の間葉細胞等に含まれ、細胞の収縮や運動に参与する microfilament である actin filament⁴¹⁾⁻⁴³⁾では、本実験で検討した腫瘍中、Df のみが弱陽性である以外すべて陽性を示した。この結果より、Df は細胞内の線維成分の分類上やや異なると考えるべきである。一般に、上皮性細胞になく、間葉系細胞に広く分布している intermediate filament の構成成分である vimentin⁴⁴⁾についての検討で、MFH, MGCT, ES, 線維芽細胞が明らかに陽性であったが、DFSP, GCT, MR, Df は陰性であった。このことは、同じく間葉系の起源をもつ細胞であっても、腫瘍性の変化をすることにより、その発現の有無が左右されやすい細胞内線維成分であると考えられるべきであろう。

筋細胞由来細胞が特異的に持つとされている intermediate filament の構成成分である desmin⁴⁴⁾

についての検討で、Df が明らかに陽性であったことは、Df の腫瘍細胞の他の FHT 分類系腫瘍にない注目すべき特徴であると思われ、線維芽細胞の近縁細胞である筋線維芽細胞類似の性質をもつことを示唆するものである。

Keratin filament は、上皮性の細胞が特異的にもつ intermediate filament⁴⁵⁾であるとされ、本実験で ES にのみ陽性所見が見られた。Chase ら⁴⁶⁾の報告で、ES の組織は keratin も70%程度陽性であり、かつ α -AT, α -ACT, vimentin も高率に陽性で、S-100 蛋白も陽性的場合があるとされる。このことを考え合わせると、ES の発症母細胞は、多潜能性の未分化な幹細胞由来であろうことが推察される。

ヒト macrophage の膜表面抗原に特異的である⁴⁷⁾抗体 Mo2 による検討で、陽性を示した細胞は DFSP (I), GCT (I), MR であり、弱陽性を示したものは MFH (I), DFSP (II) であった。陽性を示す所見が FHT group 以外の細胞にはまったく見られないことより、本抗原の陽性所見が組織球性細胞の発症起源母細胞を強く示唆すると考えられる。

細胞膜 receptor の検討においては、C3b receptor は近年、正常線維芽細胞も保有するとの報告も見られ⁴⁸⁾、本実験でも対照とした正常線維芽細胞でも一部明らかに陽性であり、C3b receptor の保有は結合組織中に存在する種々の細胞も、環境に応じて発現する能力をもつ receptor であると考えられる。

Fc receptor についての検討で、Df を除く FHT 分類系腫瘍のみに保有が確認され、Fc receptor を保有する腫瘍は組織球性の性質をもつことを示唆する重要所見の1つであると考えられる。

電子顕微鏡による観察で FHT には線維芽細胞様細胞がしばしば存在し、その超微細構造は、正常な部位に存在する線維芽細胞と同一であるといわれている⁴⁹⁾。本実験で増殖させた各腫瘍培養細胞は、典型的な線維芽細胞と思われる細胞はほとんど見られず、形態的に多様性を示すものであった。

FHT 分類系培養細胞の中の電顕観察での比較で Df が lysosome の発達も悪く、myelin figure がまったく見られず、粗面小胞体がよく発達し、かつ cytoplasmic filament が多く見られた点は、他の FHT とやや異なることを示唆するものであった。

各腫瘍培養細胞の観察で、FHT 分類系以外の腫瘍細胞の共通していた点は、ES, DT にはより多くの Golgi 小胞が存在しており、PAS 染色陽性所見と合

わせて考えると、多糖類の分泌が推察され、線維芽細胞近縁細胞の腫瘍培養細胞の重要な特徴の1つではないかと思われる。

ヒト正常血清添加による免疫食能試験で FHT 培養細胞中、Df が弱陽性以外は明らかに食能が確認された。ES でも食能試験が一部陽性であったが、FHT 分類系培養細胞のものと異なる点は、FHT では細胞質中に取り込まれた菌体が陽性に染色される以外、細胞質内でも菌体が消化されて淡く陽性に見られた。一方、ES、DT 培養細胞でも菌体を多く細胞質中に取り込んだ像が一部観察されたが、その消化された像は全く見られなかった。この相違点は本来、未分化な線維芽細胞系細胞と組織球系の細胞の両者がもつ機能の「食能」と「食能殺菌消化能」の一見同一に見られる性質の明らかな違いを示すものではないかと考えられる。細胞の持つ食能は actomyosin filament に関与するものであり、食能作用について Hoffman と Sachs⁵⁰⁾は、actin filament 合成量と共に食能も増加すると報告している。本実験の免疫組織化学染色で actin は Df では明らかに陽性は見られず、この事実と Df が弱い食能活性しか見られなかった点と明らかに関連があると思われる。

Collagen 合成能の比較実験で、collagen タンパク産生量と相対合成活性量ともに FHT グループ中 Df が最も高く、ES、DT、線維芽細胞に相当するものであり、Df の特異性を示す結果であった。他の FHT 分類系腫瘍培養細胞の collagen 産生の絶対量は全体的に少ない傾向を示した。また GCT と悪性度の高い MGCT の collagen 相対合成活性の比較で MGCT がより高く、DFSP とより悪性度の高い MFH との比較でも同じく MFH が明らかに高い傾向が見られ、FHT グループの悪性度の高い腫瘍は、より高い collagen の相対合成活性をもつことを示唆する結果であった。

[³H] thymidine の取り込みによる DNA 合成標識率の測定における、FHT グループ分類腫瘍培養細胞と、ES、DT および線維芽細胞の増殖状態の違いは、一定の細胞数密度に達すると FHT では標識率が急激に低下する傾向が見られたことである。黒木⁵¹⁾は培養細胞同志の接触により細胞の運動、増殖の阻止が起きるという接触阻止 (contact inhibition) を提案している。この接触阻止能は、本実験の結果から、FHT 培養細胞がその腫瘍の悪性度とは無関係に FHT 培養細胞全部がもつ特徴であることが推察された。

Hayflick と Moorhead⁵²⁾は、ヒト肺の正常2倍体線維芽細胞を培養して、その倍加可能回数を測定し、その donor の年齢が高齢者ほど、倍加可能回数が減少することを報告している。本実験でも種々の年代の異なる健康人皮膚真皮より、正常2倍体線維芽細胞の培養を行い、その継代可能回数を測定した。

その結果、皮膚真皮の培養細胞も donor の年齢が高齢者ほど継代可能回数が減少する傾向が見られた。この結果と FHT 培養細胞の継代可能回数を比較するため各腫瘍由来細胞の継代培養を繰り返し培養細胞の継代可能回数を比較した。その結果、GCT、DT は明らかに継代可能回数が少なく、また逆に MR、Df、は長期間の継代が可能であった。

本実験で検討した DNA 合成率と継代可能回数との相関は認められなかったが、注目すべき両細胞の共通点は、Fc receptor が他の腫瘍と比べて低い点であり IgG 抗体に対する反応性が細胞の継代可能回数と関連する可能性も示唆されると思われる。その他の培養細胞は、ほぼ年代と相関しており、この点、腫瘍化して一見その本来の性質と正常な適応性から逸脱していると思われる腫瘍由来の培養細胞も、継代可能回数に限界があり、いわゆる寿命をもつことは興味深いと思われる。

1961年 Kauffman と Stout⁵³⁾は、組織球性腫瘍の中に組織球が組織環境に応じて、線維芽細胞様の形態をとり、機能として線維形成作用を示している細胞があり、これを facultative fibroblast (条件的線維芽細胞)と呼ぶことを提唱した。1967年に Stout と Lattes¹⁾が線維性組織球腫の起源は組織球に由来し、腫瘍を構成する紡錘型細胞はこの facultative fibroblast であろうとの説を唱えた。1970年 Ackerman と Rosai⁵⁴⁾も FHT の発生由来細胞について3つの仮説を出している。その第1説は、多潜能性の未分化間葉細胞の組織球と線維芽細胞の両者に分化する能力をもつ細胞に由来する。第2説は、元来、線維芽細胞に由来する腫瘍であるが、一部が組織球に変化する。第3説は、組織球の一部が facultative fibroblast に変化するであろうとするもので、Ackerman と Rosai⁵⁴⁾は、第3説である組織球由来説を支持する考えを出している。

1972年 van Furth ら⁵⁵⁾は、慢性炎症反応、肉芽腫性炎症反応でその主役である単核食細胞 mononuclear phagocyte (macrophage, histiocyte) はすべて骨髄中の前駆細胞に由来するとの発生一元説 mon-

onuclear phagocyte system (MPS 説) を提唱し、また、1980年⁵⁶⁾には MPS の個体発生について総説し、macrophage, histiocyte はすべて単球由来であると主張している。1973年に湯本⁵⁾は FHT に属するとされる腫瘍など、すべて組織球に由来し、各疾患はそれらが若干異なる分化をしたものであるとして、fibrous histiocyctoma group の概念でまとめている。

1975年 Fu ら⁷⁾や1979年 Hadju ⁵⁷⁾は、短期の組織培養と電子顕微鏡的な FHT の研究を行って、組織中に未分化間葉細胞が存在するが、培養した細胞中にはその細胞は存在しないことより、組織中に見られる未分化間葉細胞が線維芽細胞と組織球への2方向へ分化する過程において腫瘍化するとの説を主張している。

1980年 Yumoto と Morimoto⁵⁸⁾は、SV40 virus を用いて transform させたマウスの peritoneal macrophage を同系マウスに接種し、ヒトの FHT と類似した腫瘍が形成されたと報告している。

1980年 Takahashi ら⁵⁹⁾は、ラットを用いて皮下に FHT 類似の腫瘍を発症させ、その発生学的研究を行い、未分化間葉細胞から線維芽細胞様細胞の増殖が見られる以前に、その局所に幼若な組織球が存在するという現象を見つけて、未分化間葉細胞からの組織球への移行を否定し、未分化間葉細胞は線維芽細胞様細胞へ移行し、胎生組織球から組織球様細胞が生じるであろうと結論づけている。

1985年 Roholl ら¹²⁾は malignant histiocytosis と MFH および FHT 以外の軟部腫瘍を組織化学と機能面より比較検討し、線維芽細胞の性質と共通点が多く、組織球としての性質が少ないことより、未分化間葉系細胞から線維芽細胞への分化する段階で発症した腫瘍ではないかと主張している。

このように FHT およびその関連腫瘍について種々の検討がされてきたにもかかわらず、その本態について未だに十分に究明されていないのが現状である。

V 結 語

FHT グループに分類される腫瘍 (MFH, DFSP, MGCT, GCT, MR, Df) 由来培養細胞、線維芽細胞近縁細胞起源とされる腫瘍 (ES, DT) 由来培養細胞、そしてまた正常真皮由来線維芽細胞の生物学的特性について比較検討し、文献的な考察を加えた。本研究結果より次の結論を得た。

1 FHT グループに分類される腫瘍由来培養細胞は、次の特徴を有する。

(1) 免疫食能試験において、高率に食能性を示し、さらに、菌体の強い消化能力をもつ細胞である。
(2) Collagen 産生能の比較において、より悪性度の高い腫瘍 (MFH, MGCT) ほど、高い collagen の相対合成活性をもつ傾向を示す。また Df 由来培養細胞は、正常真皮由来培養細胞とはほぼ同程度の合成能をもつ細胞である。

(3) 継代培養可能回数の比較で MR, Df 由来細胞は長期の継代可能期間を、また逆に GCT 由来細胞は短期の継代期間である傾向を示す。

2 線維芽細胞起源に分類される腫瘍由来培養細胞は次の特徴を有する。

(1) PAS 染色により強い陽性を示し、電顕観察で細胞質内に Golgi 由来の小胞が多数見られる特徴を示す。

(2) Collagen 産生能の比較において、正常真皮由来培養細胞とはほぼ同程度の合成活性を示す。

3 FHT グループに分類される腫瘍由来培養細胞と線維芽細胞近縁腫瘍由来の培養細胞は、両者の比較において、次の特徴を有する。

(1) 組織球系腫瘍に特異性を示すと言われている抗原 α -AT は、培養細胞において FHT 分類系以外の腫瘍由来細胞でも、陽性を示すことが多く、 α -AT と比較し α -ACT の方がむしろ組織球系腫瘍に特異性の高い抗原である。

(2) 細胞膜 C3b receptor は FHT に分類される腫瘍、線維芽細胞近縁腫瘍、および正常線維芽細胞でも保有が認められ、種々の間葉系由来細胞に非特異的に発現される receptor である。

(3) FHT グループに分類される腫瘍由来培養細胞は、正常線維芽細胞および線維芽細胞近縁腫瘍由来の培養細胞と比べ、細胞密度が上昇すると DNA 合成が急激に低下し、強い接触増殖阻止能をもつ特徴を示す。

4 各腫瘍と正常線維芽細胞についての種々の比較検討結果により、MFH, DFSP, MGCT, GCT および MR 由来細胞は、組織球が腫瘍性変化を受け、線維芽細胞に近い性質を、同じ間葉系細胞の由来において発現したと考えられる。

5 FHT に分類される Df 由来細胞は、他の FHT グループ由来培養細胞とは、やや異なった性質を示し、かつ線維芽細胞近縁腫瘍由来の培養細胞、正常線維芽細胞とも異なった性質を示す。Df が FHT 由来培養細胞と同様な増殖特性 (接触抑制) をもち、

desmin 免疫染色で陽性を示すことより、他の FHT と同じ組織球に由来し筋線維芽細胞に近い性質を発現した細胞と考えられる。

- 6 ES, DT 由来細胞は、FHT グループに分類される腫瘍由来培養細胞と種々の性質が異なり、正常線維芽細胞に近い性質を示すことから、結合組織間質を構成する細胞に起源をもつ、未分化間葉細胞より発生した腫瘍と考えられる。

稿を終えるにあたり、終始変わらぬご指導を頂いた高瀬吉雄教授、進藤泰子講師、斎田俊明助教授、本研究課題のご指導を賜った第1解剖学教室 永田哲士教

授、生化学教室 橋本 隆教授、また生検材料をご提供くださった相沢病院整形外科 中田和義先生、電顕標本作成・観察にご協力くださった総合研究室 市川良治技官、亀谷清和技官、また本研究についてご配慮とご協力を頂いた皮膚科教室員の方々に深謝致します。

本論文の要旨は、第47回日本皮膚科学会東日本学術大会(1983年,東京),第84回日本皮膚科学会学術大会(1985年,岡山),第86回日本皮膚科学会学術大会(1987年,横浜),および第87回日本皮膚科学会学術大会(1988年,熊本)において発表した。

文 献

- 1) Stout, A.P. and Lattes, R. : Tumors of the soft tissues. Atlas of tumor pathology. 2nd ed., pp.38-52, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, 1967
- 2) Enzinger, F.M., Lattes, R. and Torloni, H. : Histological typing of soft tissue tumors. 1st ed., pp.1-44, Wld. Hlth. Org, Geneva, 1969
- 3) Kempson, R.L. and Kyriakos, M. : Fibroxanthosarcoma of the soft tissue : A type of malignant fibrous histiocytoma. Cancer, 29 : 961-976, 1972
- 4) 小島 端 : 黄色腫症の概念. 最新医学, 21 : 522-536, 1966
- 5) 湯本東吉 : 線維性組織球腫について. 臨床整形外科, 18 : 693-713, 1973
- 6) Ozzello, L., Stout, A.P. and Murray, M.R. : Cultural characteristics of malignant histiocytomas and fibrous xanthomas. Cancer, 16 : 331-344, 1963
- 7) Fu, Yao-Shi, Gabbiani, G., Kaye, G.I. and Lattes, R. : Malignant soft tissue tumors of probable histiocytic origin (malignant fibrous histiocytomas) : General considerations and electron microscopic and tissue culture studies. Cancer, 35 : 176-198, 1975
- 8) Merkow, L.P., Frich, J.C., Slifkin, M., Kyreages, C.G. and Pardo, M. : Ultrastructure of a fibroxanthosarcoma (malignant fibroxanthoma). Cancer, 28 : 372-383, 1971
- 9) Yoshida, H., Yumoto, T., Furuse, K. and Maeyama, I. : The ultrastructural features of fibroxanthosarcoma. Yonago Acta Med, 18 : 36-49, 1974
- 10) Harris, M. : Differential diagnosis of spindle cell tumors by electron microscopy : Personal experience and a review. Histopathology, 5 : 81-105, 1981
- 11) Katenkemp, D. and Stiller, D. : Cellular composition of the so-called dermatofibroma (Histiocytoma cutis). Virchows Arch [A], 367 : 325-336, 1975
- 12) Roholl, P.J.M., Kleijne, J., Van Basten, C.D.H., Van der Putte, S.C.J. and Unnik, J.A.M. : A study to analyze the origin of tumor cells in malignant fibrous histiocytomas. A multiparametric characterization. Cancer, 56 : 2809-2815, 1985
- 13) Enzinger, F.M. : Recent developments in the classification of soft tissue sarcomas, management of primary bone and soft tissue sarcomas. 1st ed., pp.66-72, Year Book Medical Publishers Inc., Chicago, 1977
- 14) Enzinger, F.M. and Weiss, S.W. : Soft tissue tumors. 1st ed., pp.165-198, C.V. Mosby Co., St. Louis, 1983
- 15) Lever, W.F. : Histopathology of the skin. 6th ed., pp.597-600, J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1983
- 16) Brunk, U.T. and Ericsson, J.L.E. : Electron microscopical studies on rat brain neurons. Localization of acid phosphatase and mode of formation of lipofuscin bodies. J Ultrastruct

Res, 38 : 1-15, 1972

- 17) Leder, L. D. : Der Blutmonocyt. 1st ed., pp.223-225, Springer Berlin Heidelberg, New York, 1967
- 18) Howatson, A.F. : Fundamental Techniques in Virology, 1st ed., pp.505, Academic Press, New York, 1969
- 19) Griffin, F.M., Jr., Bianco, C. and Silverstein, S.C. : Characterization of the macrophage receptor for complement and demonstration of its functional independence from the receptor for the Fc receptor of immunoglobulin G. J Exp Med, 141 : 1269-1277, 1975
- 20) Peterkofsky, B. and Diegelmann, R. : Use of a mixture of protease-free collagenase for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. Biochemistry, 10 : 988-994, 1971
- 21) Hata, R., Ninomiya, Y., Nagai, Y. and Tsukada, Y. : Biosynthesis of interstitial types of collagen by albumin-producing rat liver parenchymal cell (hepatocyte) clones in culture. Biochemistry, 19 : 169-176, 1980
- 22) Puck, T.T. and Marcus, P.I. : A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture : The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. Proc Natl Acad Sci USA, 41 : 432-437, 1955
- 23) 高橋 潔, 内藤 真, 高橋 博 : 組織球性腫瘍ならびに増殖症の電顕病理学的解析, 細胞, 13 : 319-326, 1981
- 24) McDonald, R.A. : Origin of fibroblasts in experimental healing wounds : Autoradiographic studies using tritiated thymidine. Surgery, 46 : 376-382, 1959
- 25) Hadfield, G. : The tissue of origin of the fibroblasts of granulation tissue. Br J Surg, 50 : 870-881, 1963
- 26) Crocker, D.J., Murand, T.M. and Geer, J.C. : Role of the pericyte in wound healing. An ultrastructural study. Exp Mol Pathol, 13 : 51-65, 1970
- 27) Franks, L.M. and Wilson, P.D. : Origin and ultrastructure of cells *in vitro*. Int Rev Cytol, 48 : 55-139, 1977
- 28) 大井章史 : 創傷治癒における線維芽細胞の超微構造的変化, 十全医学会誌, 91 : 923-938, 1982
- 29) Enzinger, F.M. : Epithelioid Sarcoma. Cancer, 26 : 1029-1041, 1970
- 30) Moschella, S.L. and Hurley, H.J. : Dermatology. 2nd ed., pp.1165-1166, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1985
- 31) Lever, W.F. : Histopathology of the skin. 6th ed., pp.614-615, J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1983
- 32) 杉山 勝 : ヒト悪性線維性組織球腫由来細胞の生物的特性. 阪大歯学雑誌, 29 : 175-200, 1984
- 33) Isaacson, P., Jones, D.B., Millward-Sadler, Judd, M.A. and Payne, S. : Alpha-1-antitrypsin in human macrophages. J Clin Pathol, 34 : 982-990, 1981
- 34) Meister, P. and Nathrath, W. : Immunohistochemical characterization of histiocytic tumors. Diagn Hithopathol, 4 : 79-87, 1981
- 35) Du Boulay, C.E.H. : Demonstration of alpha-1-antitrypsin and alpha-1-anti-chymotrypsin in fibrous histiocytomas using the immunoperoxidase technique. Am J Surg Pathol, 6 : 559-564, 1982
- 36) Gordon, S. and Werb, Z. : Secretion of macrophage neutral proteinase is enhanced by colchicine. Proc Natl Acad Sci USA, 73 : 872-876, 1976
- 37) Heise, E.R. and Myrvik, Q.N. : Secretion of lysozyme by rabbit alveolar macrophages *in vitro*. J Reticuloendothel Soc, 4 : 510-523, 1967
- 38) Isaacson, P., Wright, D.H. and Jones, D.B. : Malignant lymphoma of true histiocytic (monocyte/macrophage) origin. Cancer, 51 : 80-91, 1983
- 39) Hashimoto, K., Brownstein, M.H. and Jacobiec, F.A. : Dermatofibrosarcoma protuberans. A tumor with perineural and endoneural cell features. Arch Dermatol, 110 : 874-885, 1974

- 40) Ebner, H. and Gebhart, W. : Zur Ultrastruktur der Multizentrischen Reticulohistiocytose. Arch für Dermatologische Forschung, 240 : 259-270, 1971
- 41) Becker, C.G. and Murphy, G.E. : Demonstration of contractile protein in endothelium and cells of heart valves, endocardium, intima, arteriosclerotic plaques and Aschoff bodies of rheumatic heart disease. Am J Pathol, 66 : 97-110, 1969
- 42) Becker, C.G. : Demonstration of actomyosin in mesangial cells of renal glomerulus. Am J Pathol, 66 : 97-110, 1972
- 43) Goldman, R.D. : The use of heavy meromyosin binding as an ultrastructural cytochemical method for localizing and determining the possible functions of actin-like microfilaments in non-muscle cells. J Histochem Cytochem, 23 : 529-542, 1975
- 44) Franke, W.W., Schmid, E., Osborn, M. and Weber, K. : Different intermediate-sized filaments distinguished by immuno-fluorescence microscopy. Proc Natl Acad Sci USA, 75 : 5034-5038, 1978
- 45) Lazarides, E. : Intermediate Filaments : A chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. Ann Rev Biochem, 51 : 219-250, 1982
- 46) Chase, D.R., Enzinger, F.M., Weiss, S.W. and Langloss, J.M. : Keratin in epithelioid sarcoma. An immunohistochemical study. Am J Surg pathol, 8 : 435-441, 1984
- 47) Todd, R.F. and Schlossman, S.F. Analysis of antigenic determinants on human monocytes and macrophages. Blood, 59 : 775-786, 1982
- 48) Ueki, A., Fukushima, Y. and Kimoto, T. : C3b and C3d receptor sites on human diploid fibroblasts. Virchows Archiv [Cell Pathol], 21 : 13-15, 1976
- 49) Taxy, J.B. and Battifora, H. : Malignant fibrous histiocytoma. An electron microscopic study. Cancer, 40 : 254-267, 1977
- 50) Hoffman, B.L. and Sachs, L. : Regulation of actin and other proteins in the differentiation of myeloid leukemic cells. Cell, 14 : 825-834, 1978
- 51) 黒木登志夫 : 試験管内のなかの癌細胞 (接触阻止のメカニズムをめぐって). 東京医学, 83 : 194-202, 1975
- 52) Hayflick, L. and Moorhead, P.S. : The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res, 25 : 585-621, 1961
- 53) Kauffman, S.L. and Stout, A.P. : Histiocytic tumors (fibrous xanthoma and histiocytoma) in children. Cancer, 14 : 469-482, 1961
- 54) Ackerman, L.V. and Rosai, J. : Surgical pathology. 7th ed., pp.1420-1425 Mosby Co., St. Louis, 1974
- 55) van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Specter, W.G. and Langevoort H.L. : The mononuclear phagocyte system : A new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells. Bull wld Hlth Org, 46 : 845-849, 1972
- 56) van Furth, R. : In Mononuclear Phagocytes. Functional Aspects. Part I. van Furth, R. ed., Cells of the mononuclear phagocyte system, 1st ed. pp.1-40, Martinus Nijhoff Publishers, Hague Boston London, 1980
- 57) Hadju, S.I. : Pathology of soft tissue tumors. 1st ed., pp.57-164, Lea Febiger, Philadelphia, 1979
- 58) Yumoto, T. and Morimoto, K. : Experimental approach to fibrous histiocytoma. Acta Pathol Jpn, 30 : 767-778, 1980
- 59) Takahashi, K., Sakuma, H., Naito, M., Yaginuma, Y., Takahashi, H., Asano, S., Hojo, H. and Kojima, K. : Cytological characters, transformation, and oncogenesis of dermal histiocytes and fibroblasts of rats. Acta Pathol Jpn, 30 : 743-766, 1980

(63. 9. 14 受稿)