

新	制
理	
377	
京大附図	

学位申請論文

宇野賀津子



京大附図

分化能の異なるマウステウーマ胚様体株の

in vitro および *in vivo* における分化の研究

—腔形成能とよのあとにつづく分化との相関関係—

宇野 賀津子

分化能の異なるマウステラトーマ胚様体株の in vitro および in vivo における分化の研究

— 腔形成能とそのあとにつづく分化との 相関関係

宇野 賀津子

要旨

腹水型胚様体としてマウス腹腔内で継代移植されている OTT6050 マウステラトーマから、分化能の大きく異なる 7 種類の胚様体株を分離した。これらの株を用いて次のような 3 つの異なる条件における分化能の発現過程を追跡し、その過程が各株間でどうちがっているかを比較した。

- 1) 短期間の腹腔内培養期間中における腔形成能（腔とはマウス初期胚にみられる前羊膜腔に相当する腔所をさす）。
- 2) 短期間の腹腔内培養後、in vivo 条件へ移したときの心筋分化能。
- 3) 腹腔内組織に接着してできた固形腫瘍の

分化能についてである。

これら7つの胚様体株は、その心筋分化能について3つのグループに分けることができた。そして分化能の高いグループでは、高率で腔所形成が観察され、つづいて一部の胚様体では原条様構造域から中胚葉が形成されているのが観察された。すなわち胚様体の腹腔内での分化過程はマウス胚の初期発生過程に酷似していた。一方分化能の低い株のグループでは、腔所形成はほとんどみられず、中程度のグループでは両者の中間にあった。

また高分化能を示すグループは、非常によく分化した固形腫瘍を形成し、一方低分化能を示すグループでは大部分が未分化の胚性ガン腫細胞からなる腫瘍を形成、中程度の分化能を示すグループでは、固形腫の分化能についても両者の中間にあった。このように心筋の分化能と、腔形成能、さらに固形腫瘍の分化能の間には大きな相関関係がみられた。

また腹腔内培養期間を変えて胚様体を回収

し、in vitro条件で培養を続けることにより、腹腔内では胚孫体は、腔形成さらには中胚葉形成の段階にまで分化が進行すること
| ながらこれ以上は腹腔内培養期間を延長し
| ても進行せず。in vitro条件へ移されてはじめて
| 律動する心筋の分化をはじめ種々の分化が進
| 行することが明らかとなった。

A. 序論

テラトカルシノーマは、*in vitro* および *in vivo* 条件のもとで、心筋をはじめとして種々の組織へと分化する(1, 2, 3)。特に心筋細胞へは、PCC4 胚性ガン腫細胞 (embryonal carcinoma cell) 株(4)、および SEBⅢ *in vitro* 胚様体 (embryoid body) 株(5) から、比較的高率で分化することが報告されている。SEBⅢ株においては、数日間腹腔内培養した後、*in vitro* 条件へ移したときのみ、自律的に律動する心筋への分化が進行すること。またこの系においては、最初の腹腔内培養が必須条件であることが明らかにされている。それでは、このような胚様体株は、腹腔内に移植されている間に、どのように変化するのでしょうか。また心筋は腹腔内と *in vitro* 条件を経て、どのようにして分化してくるのでしょうか。これを明らかにするために、心筋への分化能において大きな差のある7種類の胚様体株を分離し、これらの株を使って腹腔内における分化能の高い株と低い株の分化の過程

を比較することによって、心筋の最終的分化に先立つ過程の奥態を明らかにすることができると考える。

また、種々の期間の腹腔内培養の後に胚様体を取り出し、*in vitro*へ移した時における心筋細胞の出現頻度の対応のパターンから、心筋分化と腹腔内培養期間との関係を明らかにした。そして心筋の分化能と腹腔内における分化の程度、その中でもとくにめだった特徴である腔形成の程度（腔とはマウスの初期胚にみられる前羊膜腔に対応するものである）と、固形腫瘍としての分化の程度との間には大きな相関関係があることが明らかになった。

B. 材料と方法

I. *in vitro* 胚様体株の樹立

胚様体株は天野等(5)によつて報告されている方法にしたがつて樹立した。培養液にはイーグルMEM培地(白水)に0.2mMのL-グルタミンと10%牛胎児血清を加えたものを使用した。まず、マウスの腹腔内から回収したOTF6050胚幹を60mmのペトリ皿(Falcon, 3002)内で数ヶ月間培養を続けた。培養液は一日おきに少量ずつ交換した。ここから胚様体株を樹立するには、次の方法を用いた。すなわち活発に増殖している胚様体から一個の胚様体ととり出して、それを30mmの新らしいペトリ皿(Falcon 3001)に移す。この一個の胚様体は、数日間培養を続けると、十数個の胚様体からなる巨大胚様体となる(Fig. 1a,b)。ついでこの巨大胚様体を、軽いピペッテ、シグによつて個々の胚様体に分離し、その中の一個の胚様体と、再び新らしいペトリ皿へ移す。この操作を5回以上くり返すことにより、多数の*in vitro*胚様体株を樹

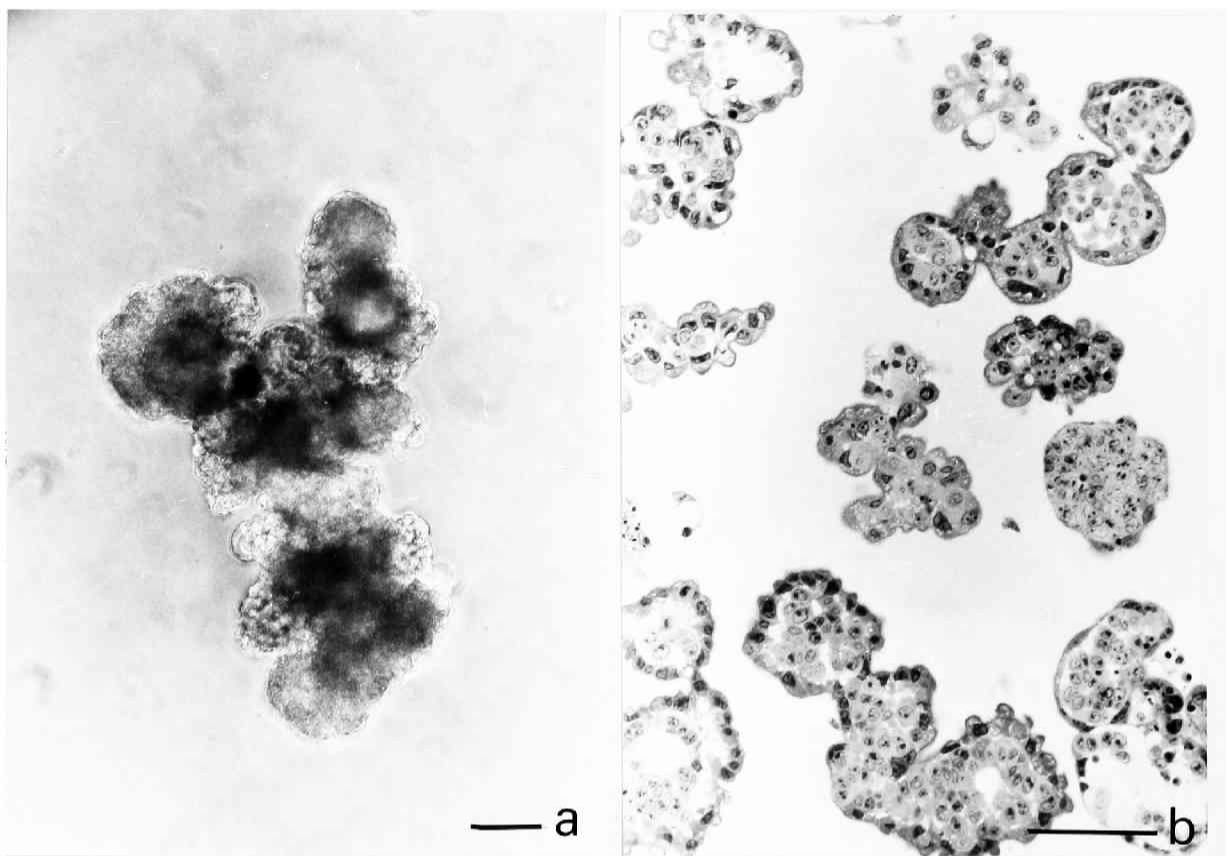


図1、SKEB株の位相差像(a)と切片像(b)。

- a、*in vitro* 胚様体株は全て小さな胚様体が連なった巨大胚様体として、継代維持されている。
- b、切片像に示されるように、巨大胚様体はいくつかの胚様体が連なって構成され、個々の胚様体は、内部の胚性ガン腫細胞とそれと包む一層の内胚葉性の細胞から構成されている。

とした。そしてその中から、いづれも増殖能は高いが分化能の大きく異なる SKEB, SSEB, SEBⅢ, TSEB, ASEB, OCEB, ODEB の 7 種の株を研究対象として選び、その分化能を比較検討した。SEBⅢ株は 1975 年に腹腔内で継代してこの OTT6050 より分離した。SKEB, SSEB, TSEB, ASEB 株は SEBⅢ株を一旦腹腔内培養した後、増殖してきた胚様体の中から 1978 年にそれぞれ分離した。ODEB, OCEB 株は 1978 年に腹腔内で継代してこの OTT6050 より、あらに分離した。1975 年と 1978 年の時点での OTT6050 は同様の、非常によく分化した固形腫を形成した。

2. 短期間の腹腔内培養による分化誘導と

in vitro での分化

上述の胚様体の $3.0 \sim 5.0 \times 10^3$ 個を $10/50$ マウスの腹腔内へ注射し (各株毎に 4 匹以上のマウスを使用)、種々の期間後に回収した。回収した胚様体を、コラーゲンで底面をコート

17 おいた 60 mm のペトリ皿へ、一枚当り 1500-2000 個注入し、(各4枚のプレートを用意した) *in vitro* における分化の観察に供した。コラーゲンコートの方法は、天野等によって報告されている方法(5)にしたがった。残りは、形態的観察のために固定・包埋した。

培養は、一日おきに少量の培養液を交換した。適時、ペトリ皿の全面を裏面から微立位相差顕微鏡($\times 100$)で、ステージを少しづつ動かしながら調べ、律動しているコロニーと、明らかに心筋以外の何らかの組織に分化していると思われるコロニーに、ペトリ皿の底面からサランペンで印と番号をつけた。さらに律動しているコロニーについては、律動開始日と停止した日を記録し、その出現パターンを調べた。

心筋分化率は、ペトリ皿にまかれた胚様係数当りの、培養開始後14日間以内に律動を開始したコロニー数をもって表わした。

心筋以外に分化した組織については、位相

差像を撮影すると共に、可能なものについては Epon 包埋をして、切片による観察を行った。Epon 包埋法は、大野等 (5) によつてすでに報告されている方法に | したがった。

3. 腹腔内での胚様体の分化の形態学的観察

腹腔内へ移植した *in vivo* 胚様体と、適時に回収し、血清を含まない培養液で洗った後、0.1M カコジル酸塩緩衝液で希釈した 2.5 % グルタルアルデヒドで固定した。胚様体のサイズを測定するためには、固定胚様体の位相差像 ($\times 50$) を撮影した。胚様体と回転した円体とみなし、その長軸と短軸の相加平均を計測によつて求めた。各サンプル毎に無作為に撮影した、3~4枚の写真を選び写っている全ての胚様体 (計 200 個以上) についてそのサイズを計測した。

写真撮影後、固定サンプルを 0.1M カコジル

酸塩緩衝液で希釈した1%オスニウム酸でさらに固定し、アルコール系列で脱水後、Spurr液(6)におきかえ包埋した。この際、巾7mm、長さ13mm、深さ2mmの包埋板に胚様体が一層となるように広げた。60℃に2日間おいて重合させた後、約3×7mmのブロックを作製、底面より1μmの連続切片を作製した。これらの切片は1%トリイジンブルーで染色観察した。

- 10 嚢形成率を測定するためには、この連続切片の中から適当な間隔をあけて3枚の切片を選び、写真と撮影(×40)した。そして3枚の写真に写っている各胚様体について同一の胚様体に対応させると共に、3枚のうちの一枚にでも嚢形成がみとめられた時には、嚢形成のみられる一個の胚様体として数えた。嚢形成の有無については、通常、写真と対応させつつ、切片を直接100倍あるいは200倍で観察することにより判定した。胚様体のうちの15%には、胚嚢が腫細胞が、一つある

いは数個の細胞塊を形成し、その細胞塊の中心部に、1~数個の細胞の壊死のみられるものを、腔形成の開始の初期段階と判定し、カウントした。さらに胚体外外胚葉の発達したものの、中胚葉の形成されているものについても、それぞれカウントした。| それにより、腔所構造のみられない、均一様様の細胞のみからなる胚様体については除外した。腔所形成率は写真に写っている胚様体数当りの腔所形成のみられる胚様体数とした。

同様にして血球島の分化についても調べた。分裂頻度は胚様体内部の胚性ガン腫細胞当り(1,000個以上)の分裂中期にある細胞数の比で表わした。その際、外側の内胚葉性の細胞は除外した。

4. 固形腫における分化度の算定

約 1000 個の ~~in vitro~~ 胚様体を、129/Sv マウスの腹腔内へ移植し、28日後に腹腔内の脂肪組織に接着している固形腫を回収し、ブアン液にて固定、アルコール系列にて脱水後、パラフィンに包埋、7μの切片を作製した。脂肪組織へは、胚様体と移植した後いちばん早く胚様体が接着して固形腫瘍を形成しはじめると報告されている(7)。切片はヘマトキシリン-エオシンにて染色した。

分化度の算定は Evans の方法(8)にしたがった。一個の固形腫の中から無作為に5枚の切片を選び、組織を100倍で観察して、未分化の胚性がん腫細胞からなる部分、分化した組織である間充織、神経組織、軟骨、骨組織、筋肉組織、上皮組織部分に分類し、方眼対物マイクrometerにより、各組織毎の面積を求めた。そして全組織面を100として、各組織の面積と比であらわした。

C 結果

1 分離した胚様体株と心筋分化能

胚様体株を短期間の腹腔内培養の後に、*in vitro*に移すと、その数日後から律動しはじめるコロニーが出現する。この律動するコロニーは、電子顕微鏡でみると、筋細胞どうしは融合しておらず、隣接する細胞と細胞の間に介在板 (intercalated disc) が存在することから、心筋であることが明らかにされている (5)。

分離した全ての株について、腹腔内培養7日後に *in vitro* に移し、さらに14日間の追加培養の間に出現した律動するコロニーを数えた。

分離した7つの株についての心筋分化能を表1に示す。

表1に示した結果から、分離した株は以下の心筋分化能により3グループに分けることができた。それらは高分化能を示す株であるSKEB・SSEB・SEB株、中程度の分化能を示す株であるASEBとTSEB株、ほとんど分化しない株であるODEBとOCEB株である。

表 1. 7種の胚様体株の心筋分化率.

(7日間の腹腔内培養の後 辺縁でさらに培養を
 続ける 14日間以内に出現した律動コアを1数に
 算入した.)

Embryoid body lines	Frequency of pulsating foci per plated embryoid bodies (%).	
	Mean $\pm$ S.D.	
SKEB	0.62 $\pm$ 0.46	
SSEB	0.61 $\pm$ 0.19	
SEB III	0.27 $\pm$ 0.13	
TSEB	0.008 $\pm$ 0.007	
ASEB	0.003 $\pm$ 0.004	
ODEB	0	
OCEB	0	

しかし腹腔内培養する前の段階、すなわち *in vitro* で継代培養している段階ではこれらの株の間に形態的な差はほとんどみられない。

2. 心筋分化.

2-1. 7日目の腹腔内培養後の心筋出現パターン

7日目の腹腔内培養の後に、*in vitro* に移した SEB Ⅲ株について、律動開始日と停止した日を記録して図示に示した。新らしく律動を開始したコロニーは、101 個のうち 21 個の例外を除くと、通常は 3 日目頃から出現しはじめ、その数急速に増加した後、すぐに減少する。全律動コロニー数は 7~9 日目で最大となる。7日目になると一部には律動を停止するコロニーもあり、これは日がつにつに増えて徐々に増加する。しかしながら 14 日目もなお多くのコロニーが律動している。しかし、14 日目以後、新らしく律動を開始するコロニー

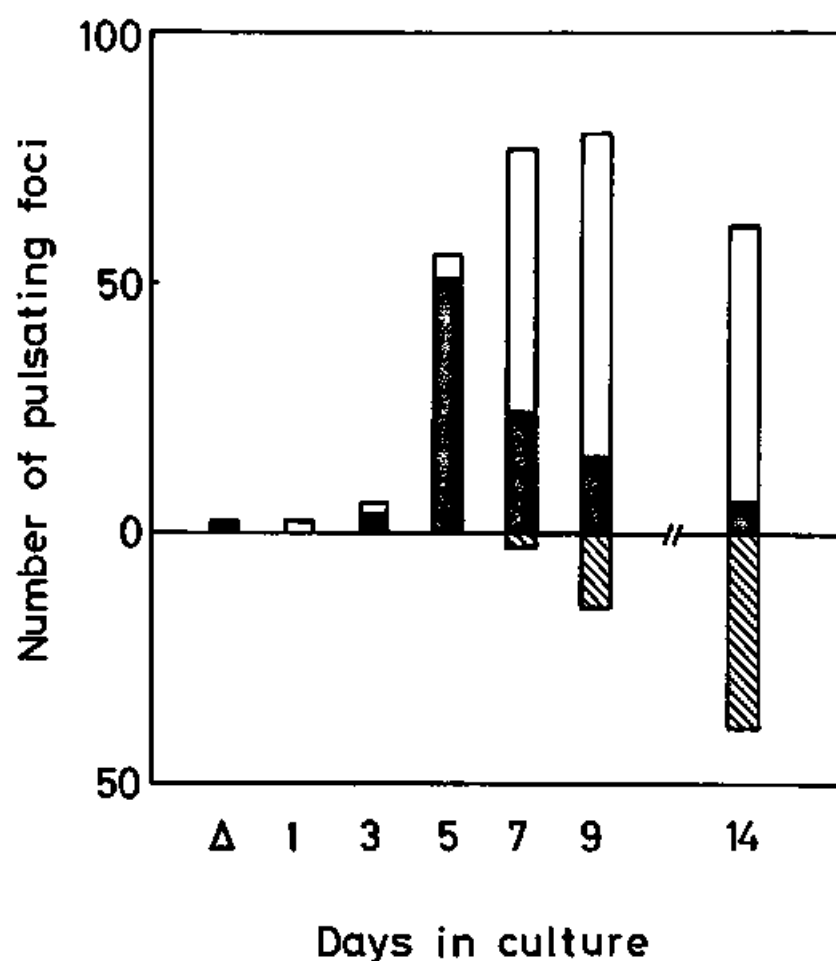


図8. SEBⅢ株を7日間腹腔内培養の後 とり出して 追加条件で培養を続けた時にみられる 律動するコロニーの分化状況.

- グラフに示されている日に律動を開始したコロニー数
- グラフに示されている日の全律動コロニー数
- ▨ 律動を停止したコロニー数
- Δ SEBⅢをマウスの腹腔内から回収してペトリ皿へ移した日

ほとんどのない。個々のコロニーについてみると、律動日数はわずか一日と短いものから2週間以上におよぶ長いものまでさまざまである。

この出現パターンについては、SEB株、SEB株、SEB株の3つについてはほぼ同じであった。ASEB株、TSEB株については、分化率は低かったが、出現したコロニーは、やはり3日目頃から9日目頃の間に律動を開始し、同様の出現パターンを示した。

2-2. 心筋分化と腹腔内培養期間の相関

腹腔内培養期間を変えると心筋分化率と心筋分化パターンはどのように変化するだろうか。これらの関係を明らかにするためにSEB株と腹腔内で3日、7日、14日培養した後回収し、*in vitro*での心筋コロニー出現率を調べた(表2, 図3)。表2から明らかになようにわずか3日間の腹腔内培養でも率は低いがある程度の心筋分化が認められる。そして

表2. SEBⅡ株の腹腔内培養期肉と心筋分化率の相関

Days in peritoneal cavity	Number of plated embryoid bodies	Number of pulsating foci	Frequency of cardiac muscle differentiation*
3	3.1×10^4	7	0.01 - 0.05
7	3.6×10^4	101	0.25 - 0.31
14	2.8×10^4	79	0.25 - 0.32

* Based on the assumption that the appearance rate of pulsating foci complied with Poisson distribution (confidence limit 95 %).

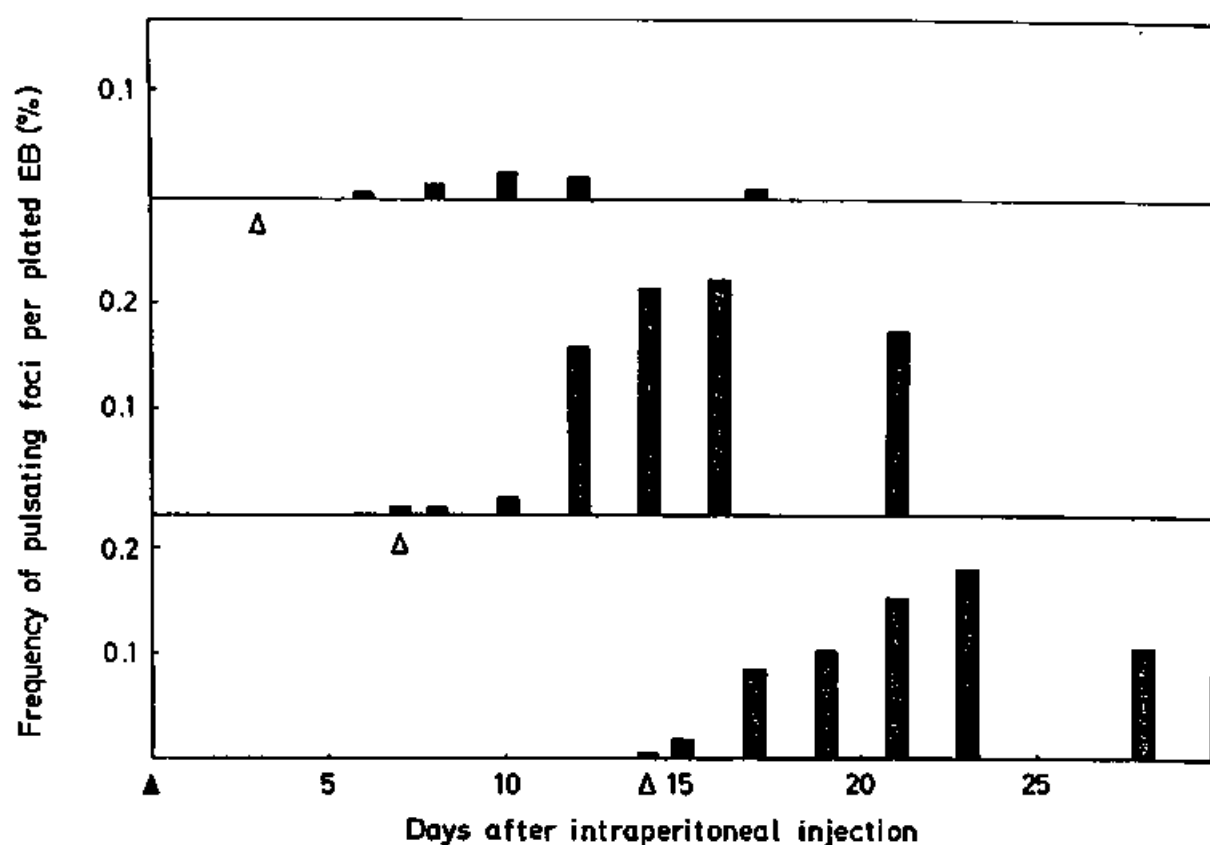


図3. SEB胚株を3日、7日、14日と腹腔内培養の期間を変えてとり出した後、*in vivo*条件へ移した時の心筋コロニーの分化状況

■ はグラフに示されている日の全心筋コロニーの分化率を示している。

▲ *in vivo* で培養しているSEB胚株をマウスの腹腔内へ移植した日。

△ SEB胚株様体を、マウスの腹腔内より回収して、*in vivo* 条件で培養を開始した日

の出現パターンは、やはり7日内の腹腔内培養の場合と同じく、3日目から出現しはじめ7日目で最大となり、その後減少する。また14日内の腹腔内培養の後 *in vitro* 培養した時には、*in vitro* で培養を開始して3日目以前に一部例外的に律動を開始するものもみられるが大部分は、特に分化が早くなるということもなく、7日内の腹腔内培養の場合と同じく、3日目から出現しはじめ7日目で最大となるパターンをとる。また7日内と14日内の腹腔内培養期間内の心筋分化率を比較すると、両者の間に有意の差はみとめられなかった。14日以上の上長期間にわたる腹腔内培養では、むしろ心筋分化率は低下した。

SKEB株については、腹腔内培養期間をさらに細かく変えて心筋分化率を調べた(図4)。図に示されるように、腹腔内培養期間を5~7日間にすると心筋分化率が最も高い。心筋分化率とSEBII株とSKEB株とを比較してみるとSKEB株は7日内の腹腔内培養後にはSEBII株の

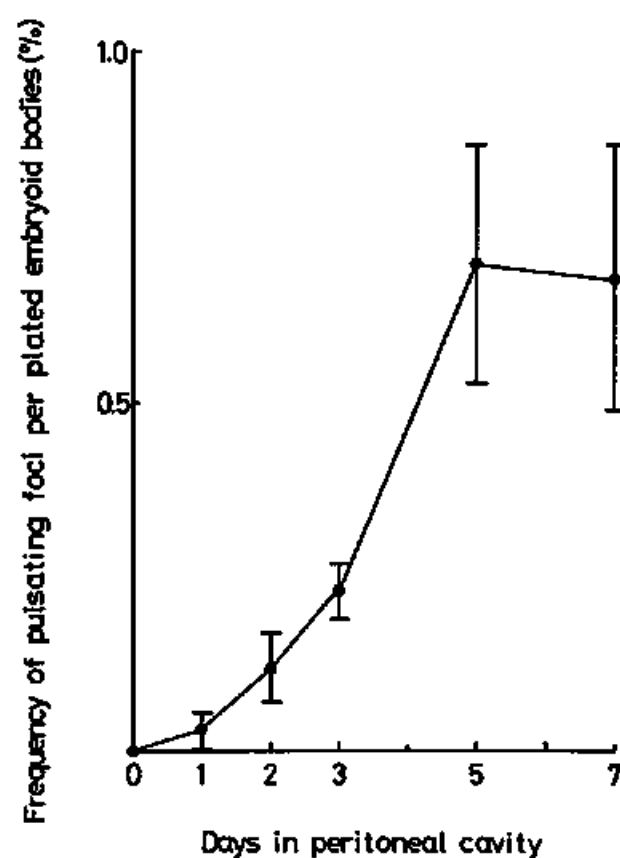


図4. SKEB株をグラフに示されている期間腹腔内培養した後回収して、in vitro条件でさらに14日間培養を続けに肉に出現した、全心筋コロニーの出現率

約2倍、3日肉では約5倍以上の分化率を示している。SKEB株はSEBⅢ株よりも分化能が高いことがわかる。また図からあきらかなように、わずか1日肉の腹腔内培養でも、わずかながら心筋が分化した。しかしながら、このSKEB株においても、SEBⅢ株と同様(5)、腹腔内での培養なしには、心筋分化は起こらなかった。

3-1. *in vitro*における心筋コロニーの形態的観察

図5 a, b, cに代表的な心筋コロニー像および切片像を示す。心筋コロニーは切片像に示されているように、基本的には3種のタイプの細胞から構成されている。すなわち、間充織細胞、外側の一層の内胚葉性の細胞、そして心筋細胞である。心筋細胞の塊は間充織細胞にとりかこまれて存在し、さらにその外側を一層の内胚葉性の細胞がとり囲んでいる。

ときには間充細胞を含んでいないコロニーや、心筋細胞のみからなるコロニーも観察される。また特に大きなコロニーでは、この3種の細胞の他に、胚性ガン腫細胞の塊を含んでいるのがしばしば観察される。また後述する心筋以外に分化した組織と心筋細胞とが同じコロニー内に隣接して存在する場合もある。

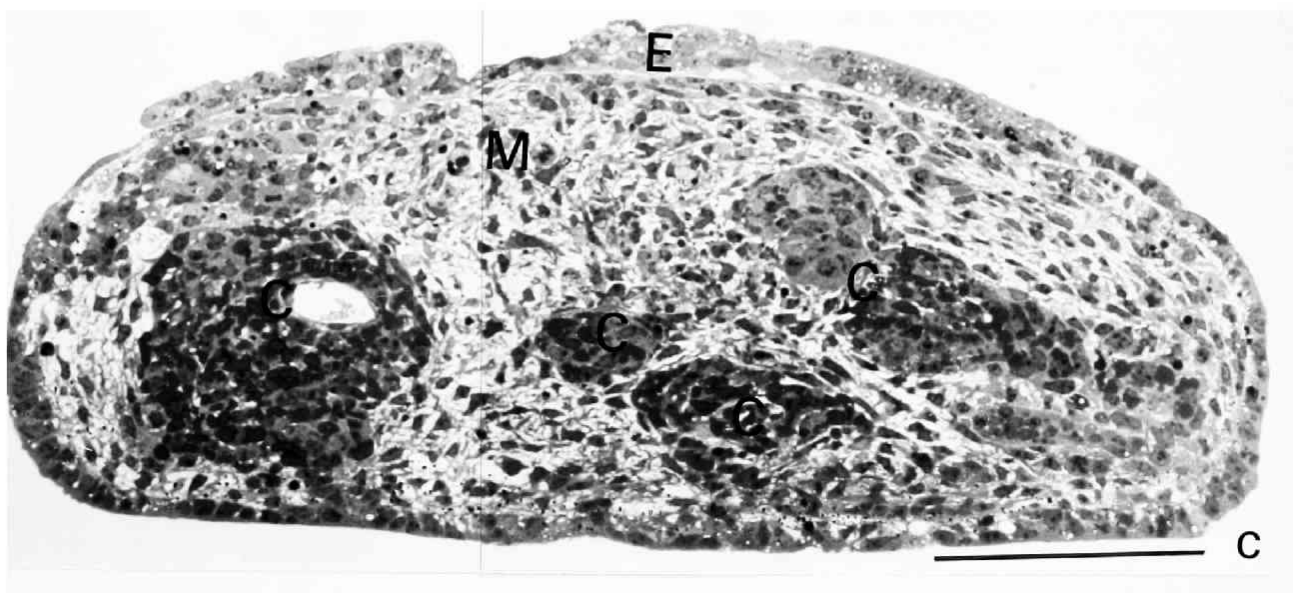
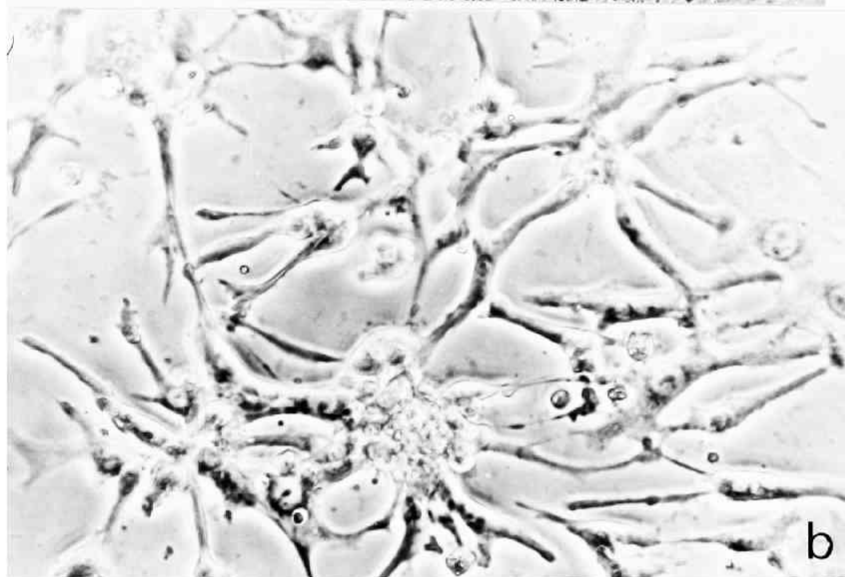
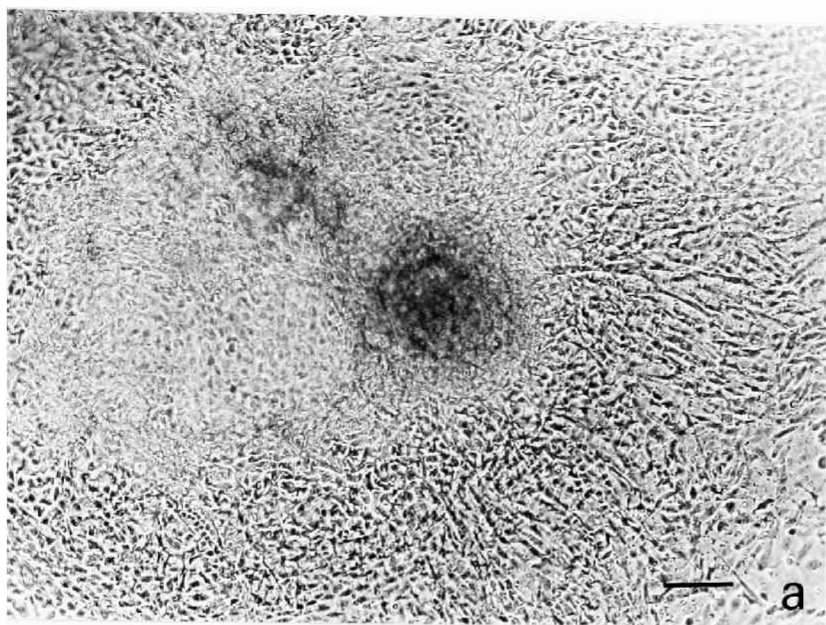
3-2 *in vitro*における種々の組織への分化とその形態

短期間の腹腔内培養後コラーゲン処理をしたペトリ皿へ胚様体を移すという分化系において、心筋のみならず他の種々の組織への分化も観察される。特にSEBⅢ, SKEB, SSEB株においては、心筋と同様他の組織への分化もまた、さかんに行っている。

まず *in vitro* へ移して3日目頃から14日目以降にいたるまで、長期間にわたって出現す

図5 心筋コロニー像。バー 100 μ

- a 位相差像。7日間の腹腔内培養の後回収して in vitro 条件でさらに培養を続けた時に出現した心筋コロニーの一例
(in vitro 培養9日目)
- b、位相差像。aと同じ条件下で出現した、心筋コロニー
ほとんど全ての細胞が同調して律動している。
- c 律動しているコロニーの切片像の一例。
4つの島状の心筋細胞(c)が同充織細胞(m)に囲まれている。さらにこの外側を一層の内胚葉性の細胞が囲んでいる。



par 100μ

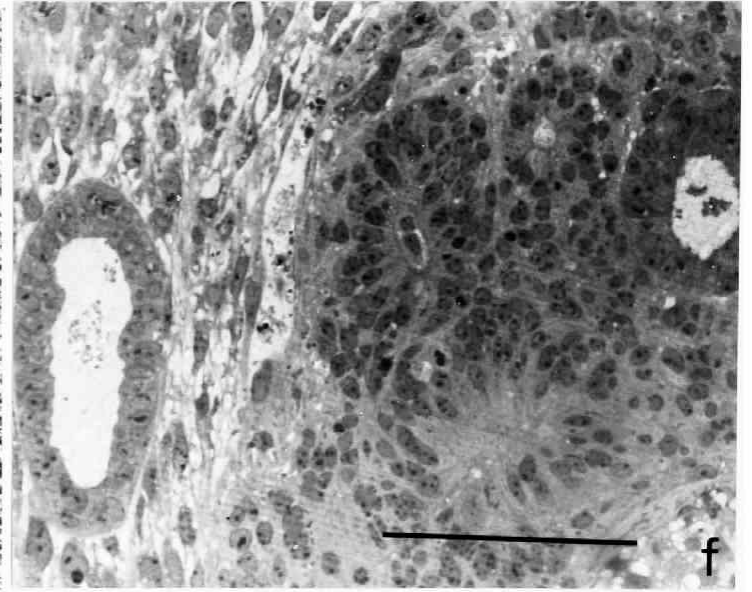
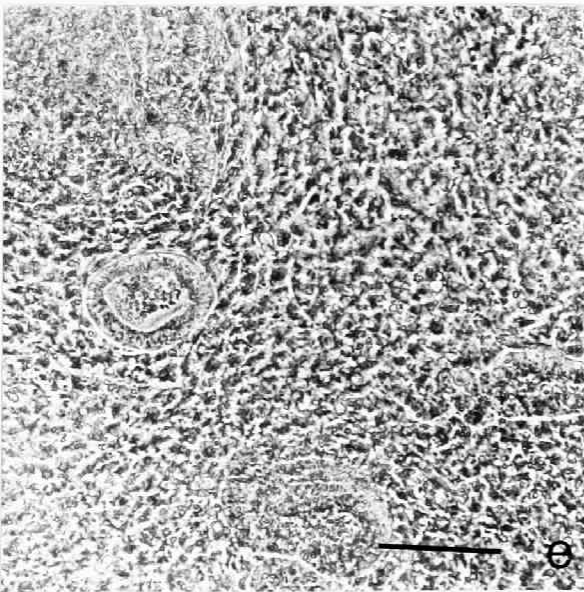
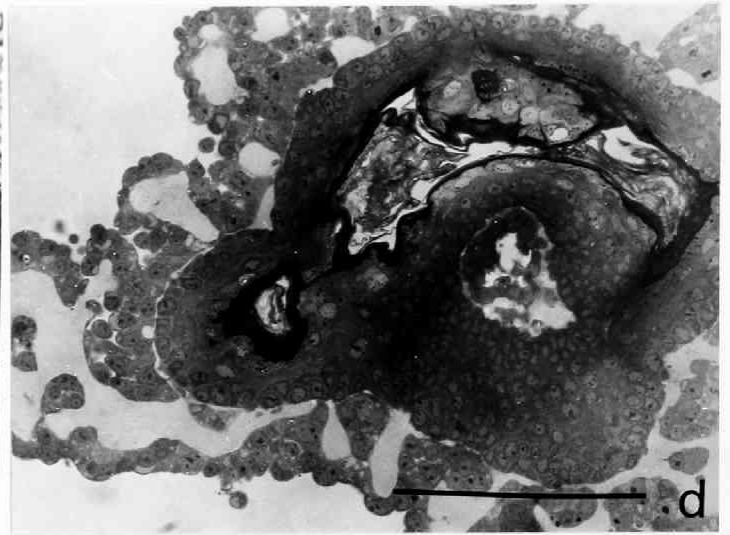
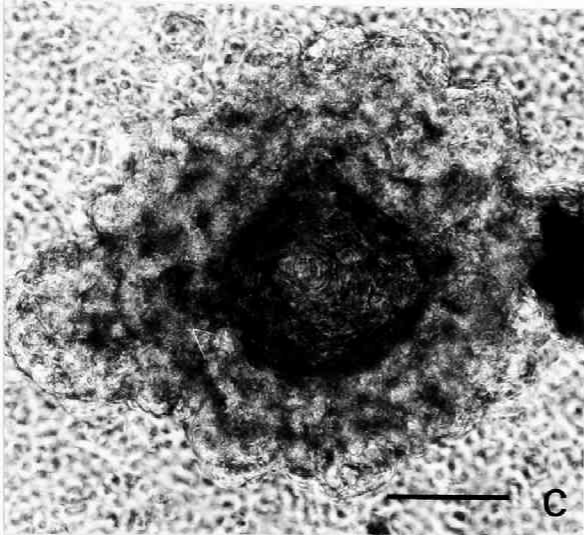
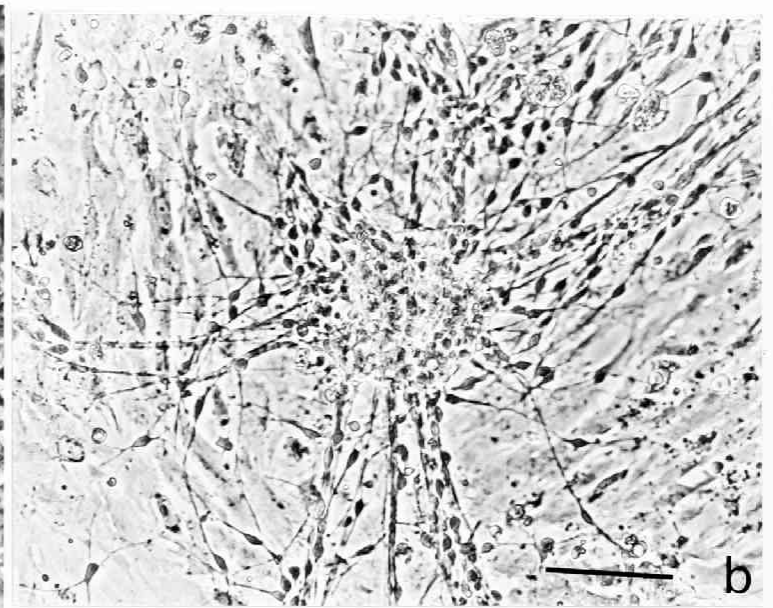
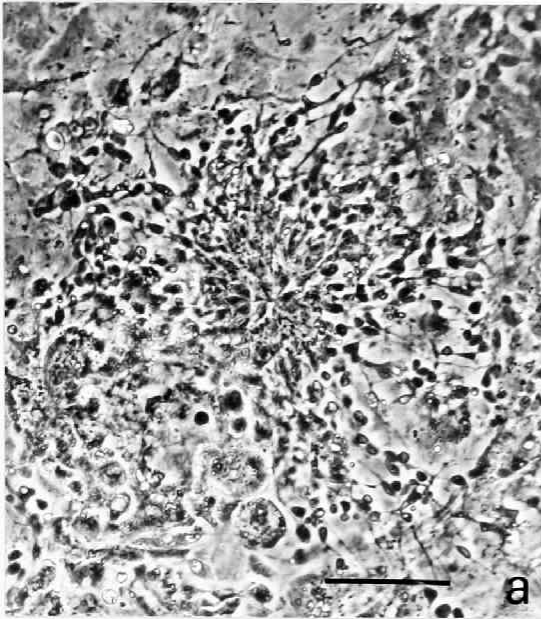
るのは神経組織である。神経管様ロゼット構造の出現につづいて、その数日後には神経突起をのばした構造がみられる(図6 a, b)。神経突起の伸長、維持には特に特別なロットの牛胎児血清の使用が必要であった。これらの神経組織は鍍銀染色法によりよく染色された。

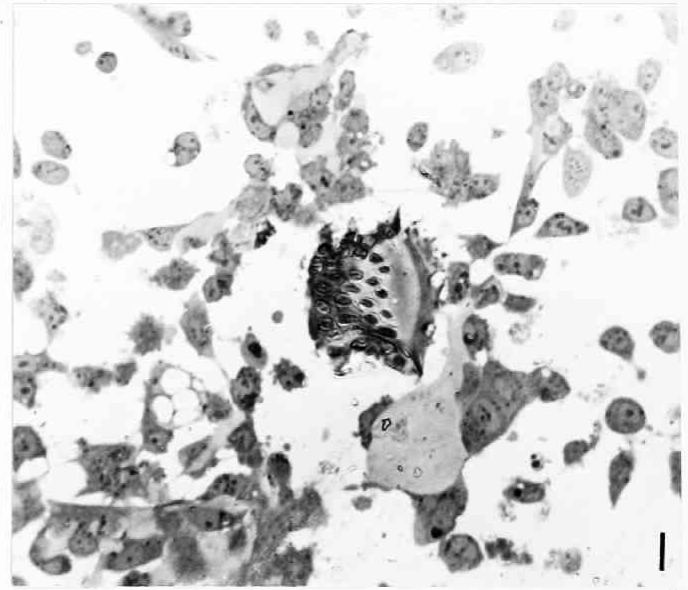
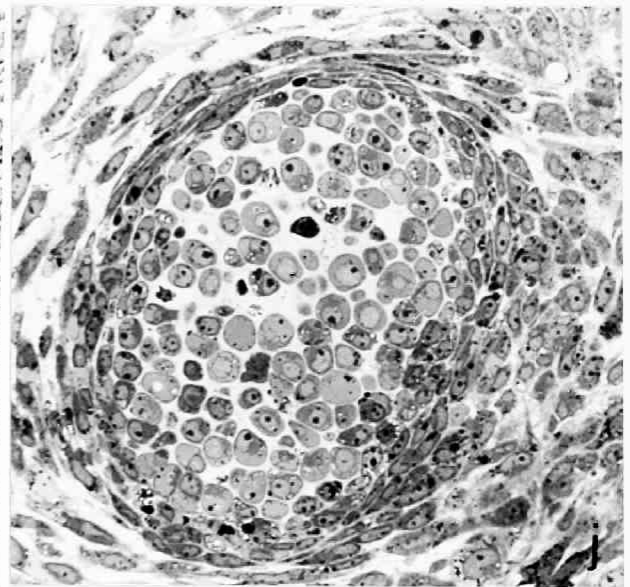
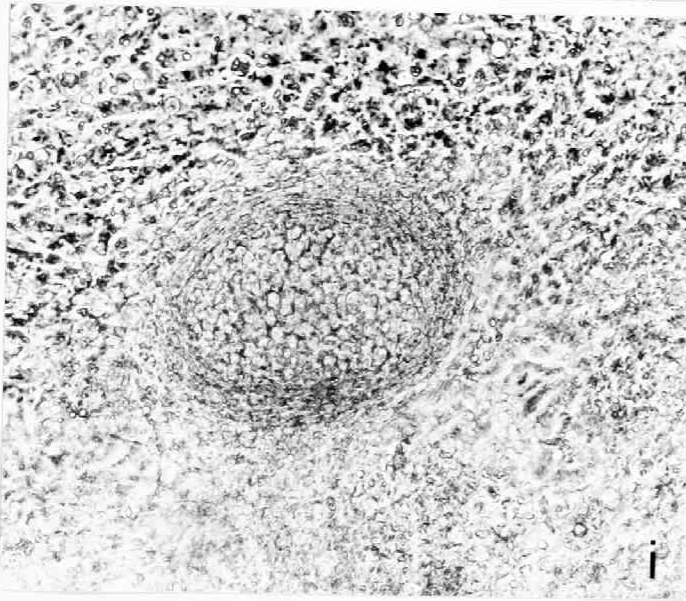
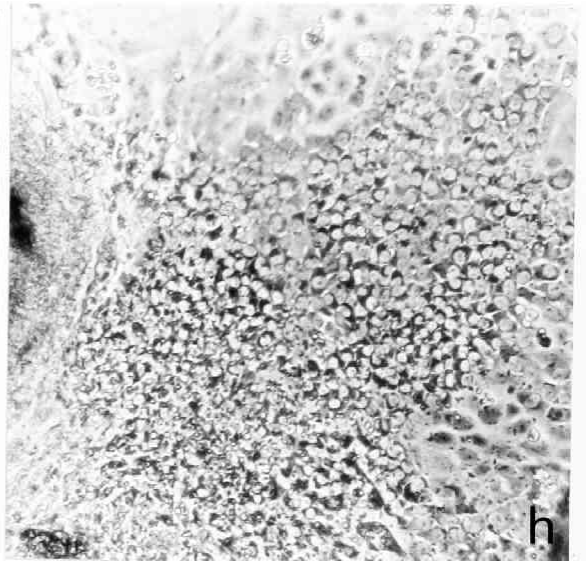
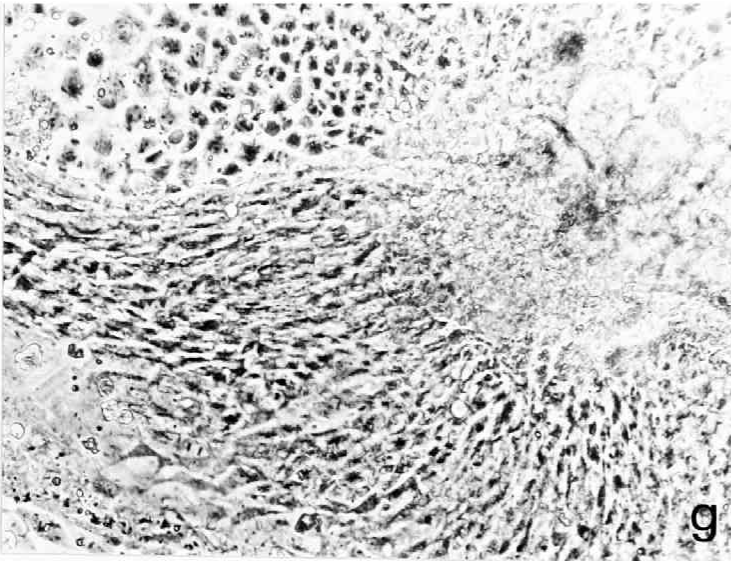
またケラチン上皮(図6 c, d)、単層上皮様構造(図6 e, f)もしばしば出現した。また線毛を動かしている線毛上皮(図6 g)、色素をもった色素上皮(図6 h)が時には分化した。

また、in vitroに移してから新しく分化したと思われる血球島がコロニーの周辺部に、培養10日目頃から出現した。切片を切ってみると肉充織様細胞にかこまれて、中に血球系の多数の細胞が観察された(図6 I, J)。
その他硬骨(図6 k, l)等が分化した。

図6. 数日肉の腹腔内培養の後、in vitro へ移した時に分化した種々の組織。 $\text{bar } 100 \mu$.

- a. 神経管様口ゼット (位相差像)
- b. 神経線維 (位相差像)
- c. ケラチン上皮 (位相差像)
- d. ケラチン上皮 (切片像)
- e. 単層上皮 (位相差像)
- f. 単層上皮 (切片像)
- g. 線毛上皮 (位相差像) 写真真ん中より下の細胞が線毛を動かしている。
- h. 色素上皮 (位相差像)
- i. 血球島 (位相差像)
- j. 血球島 (切片像)
- k. 硬骨 (位相差像)
- l. 硬骨 (切片像)





4 胚様体株の腹腔内における分化

前述の結果は、*in vivo*における心筋をはじめとする種々の組織への分化には、腹腔内培養が必須であること、予め腹腔内に一定期間（5-7日）おいたのちはじめて起こることを示している。では腹腔内で培養されている数日間の間に、胚様体にはどのような変化が起こっているのであろうか。そのような腹腔内での変化は、分化能の大きく異なる株内ではどのようにちがいのたろうか。このような観察を、SKEB株とODEB株について調べた。

4-1. SKEB株の腹腔内における分化

SKEB株は腹腔内移植24時間以内に、移植前は巨大胚様体の形を呈していたものが、何々の胚様体に分離したシンフル胚様体（*simple embryo body*；胚性ガン腫細胞と外側一層の内胚葉性の細胞とのみから構成される胚様体）となり、といる（図7a, b）。そして移植前には小胞の多い内胚葉性の細胞で構成されていた胚様、

図 7.2.b. 腹腔内培養一日後にとりだした SK EB. 巨大胚様体は
 白くバウバウの胚様体となっている。

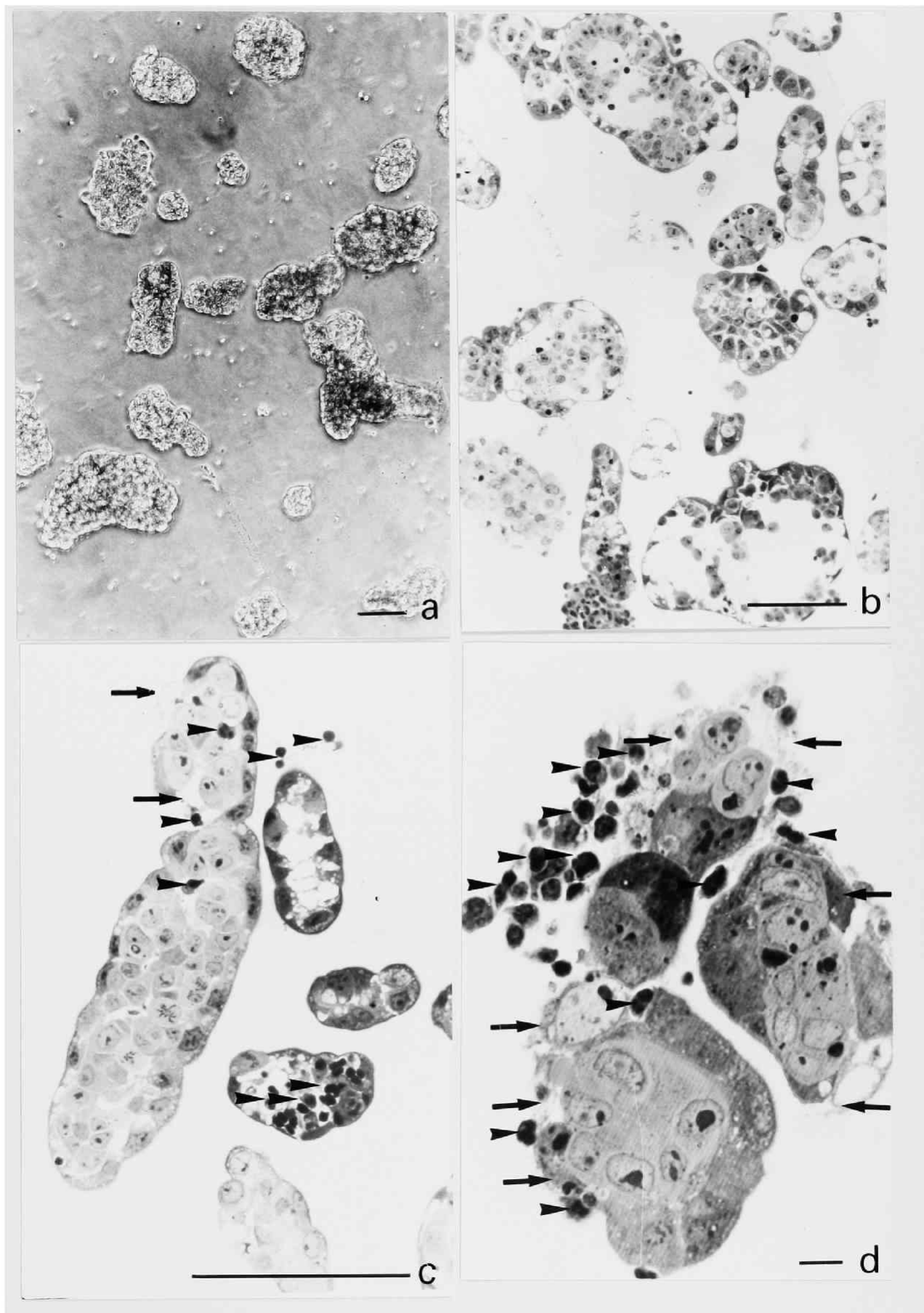
(a) 位相差像

(b) 切片像。

c, d. 腹腔内培養 12 時間後にとり出した SK EB. 多数の好
 中球(→)の浸潤がみられる。また内胚葉性の細胞の
 塊状もみられる(→)。

a-c bar. 100 μ

d bar 10 μ



Bar, a, b, c 100 μ
d. 10 μ

体の外側の細胞層は、表層のなめらかな、小胞の少ない細胞へと大きく変化した。またこれらの胚様体の中には多くの好中球浸潤がみられた。好中球の浸潤は腹腔内培養開始後6時間後にはすでに胚様体の周辺部に観察される。そして12時間後頃までに増大し、多くの胚様体内部に浸潤していた。そして胚様体の外側の内胚葉細胞が一部破壊されている像がしばしば観察された(図7.c.d)

移植後2-3日にかけて、中の胚性ガン腫細胞に、多くの分裂像が観察される。

3日目になると多くの胚様体においては中の胚性ガン腫細胞が胚様体の中いっぱいになり、増殖。さらにつづいて胚様体の中いっぱいになった胚性ガン腫細胞が数個の細胞塊に、グループ化しているのが観察される(図8a-d)。さらに分化がやや進行していると思われる胚様体においては、グループ化した細胞塊の中心の一部、また小さい胚様体においてはその中心部に、わずかなデブリをもった腔所

図8 3日間の腹腔内培養のあととり出しF-SKEB

a. 位相差像

b. 切片像

c. 内部の胚性ガン腫細胞が活発に増殖中の胚様体 分裂中の細胞(→)がみられる。

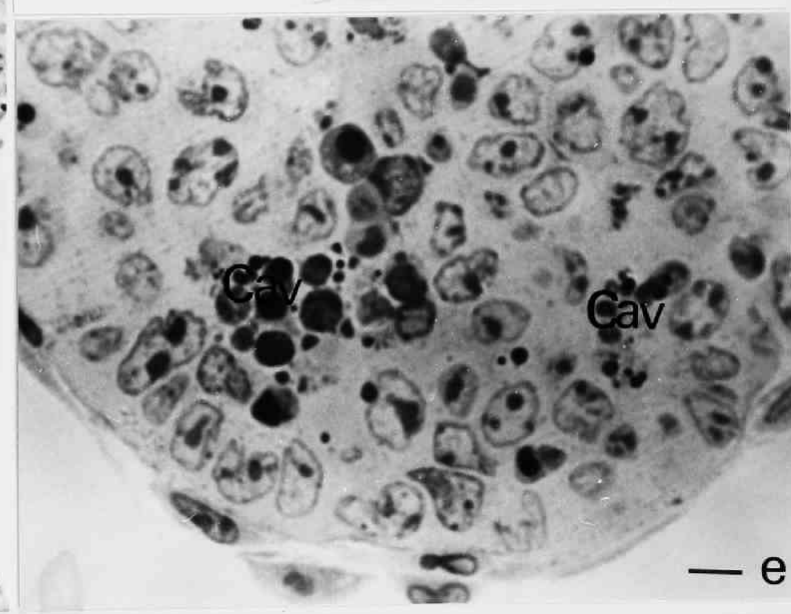
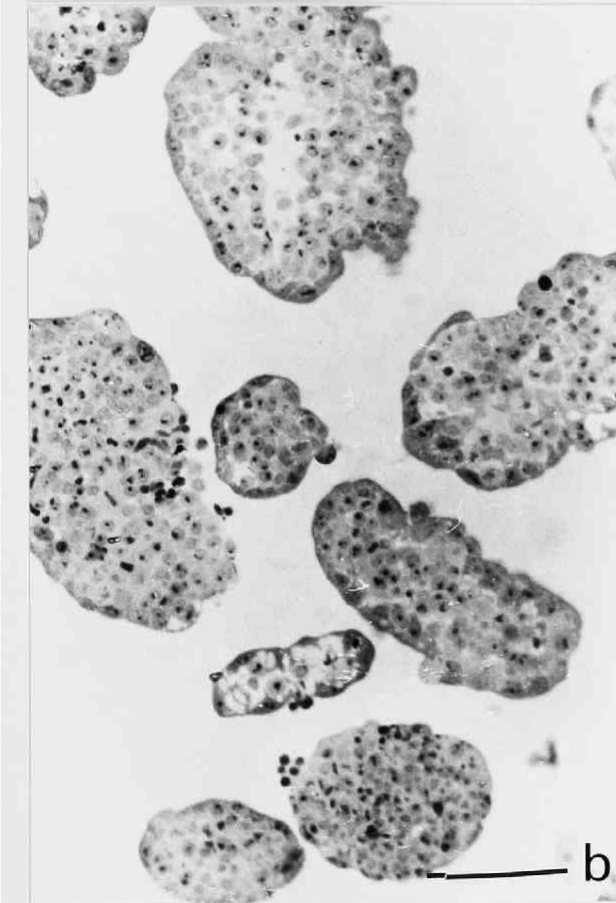
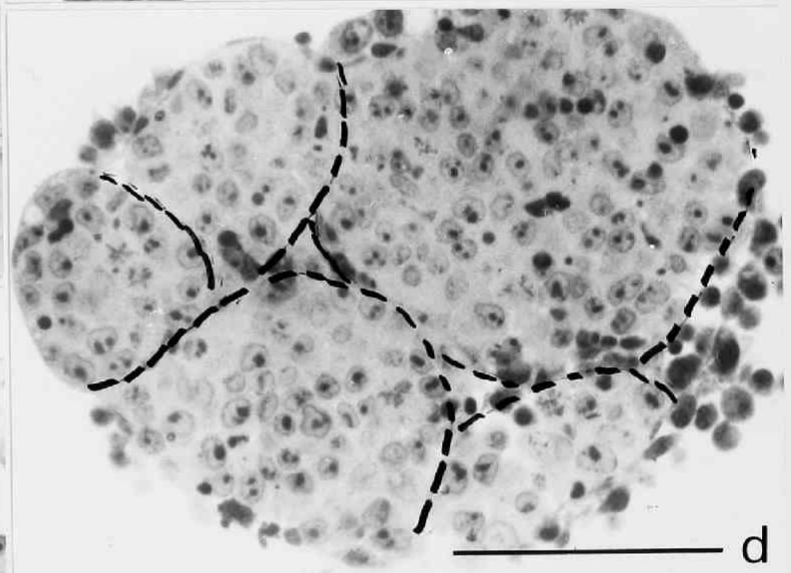
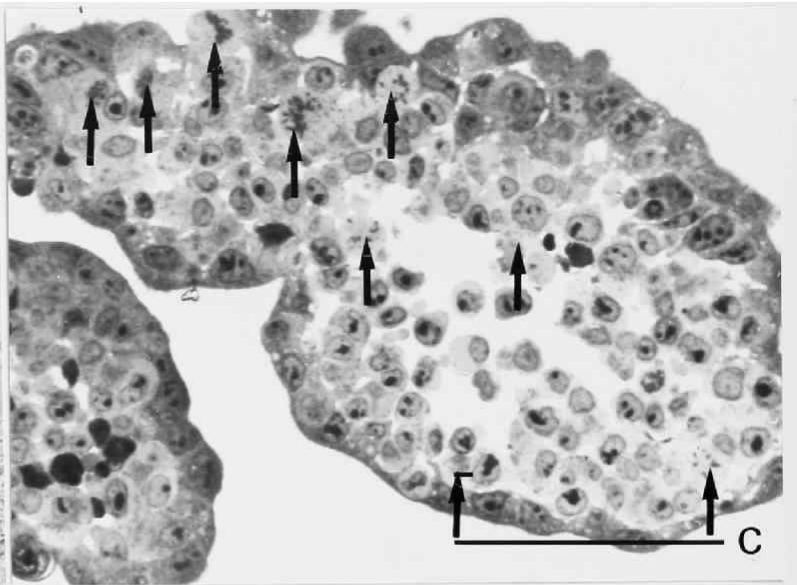
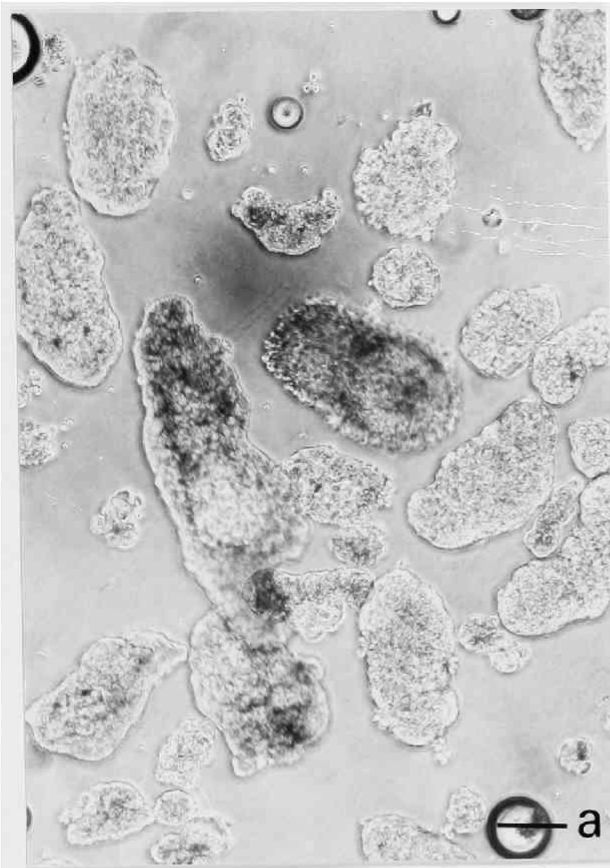
d. 数個のグループに1細胞塊の形成されている胚様体。
(各グループの境界を点線で示してある)

e. 細胞のデグリーでいっぱいの中所のみられる胚様体の一部
腔所(Cav.)

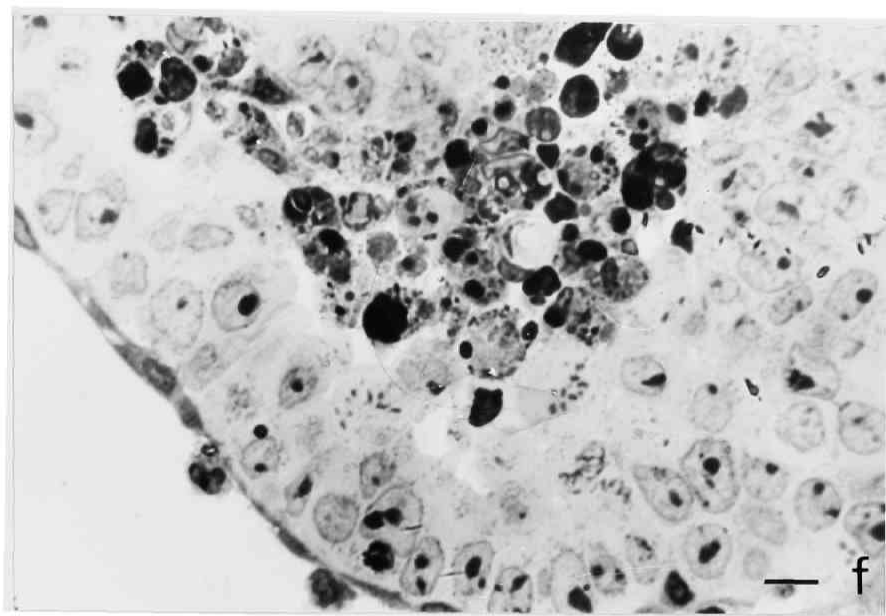
f. マクロファージ様細胞が腔所にみられる。

bar a-d 100 μ

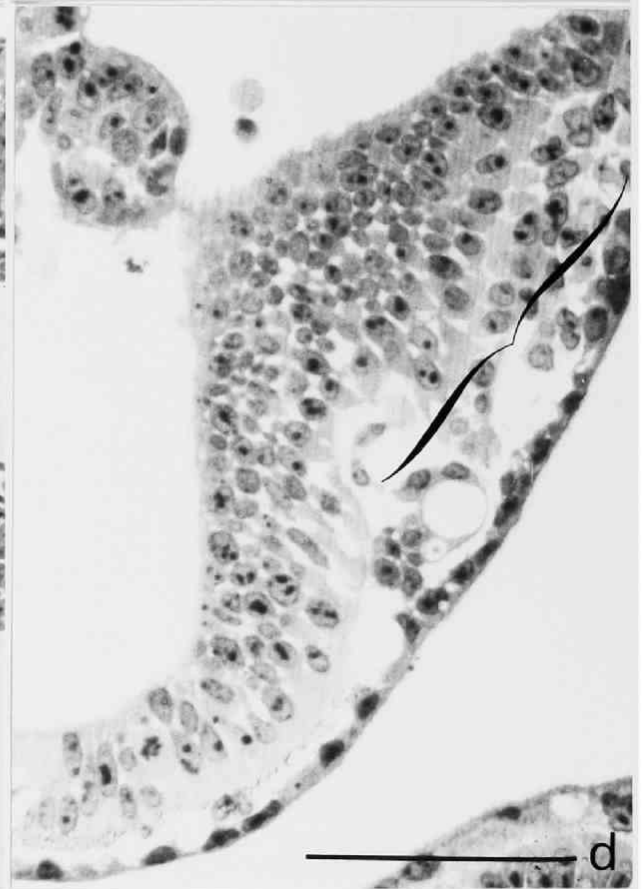
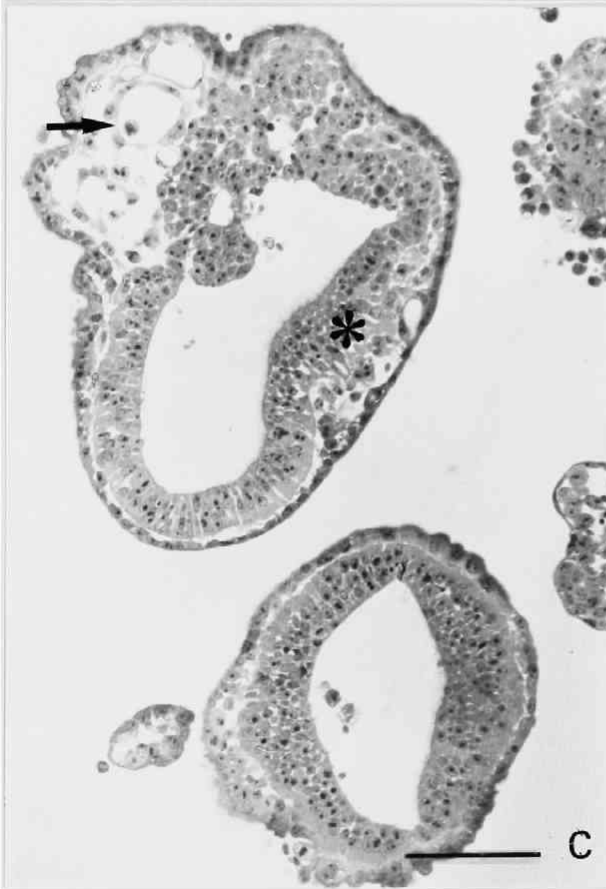
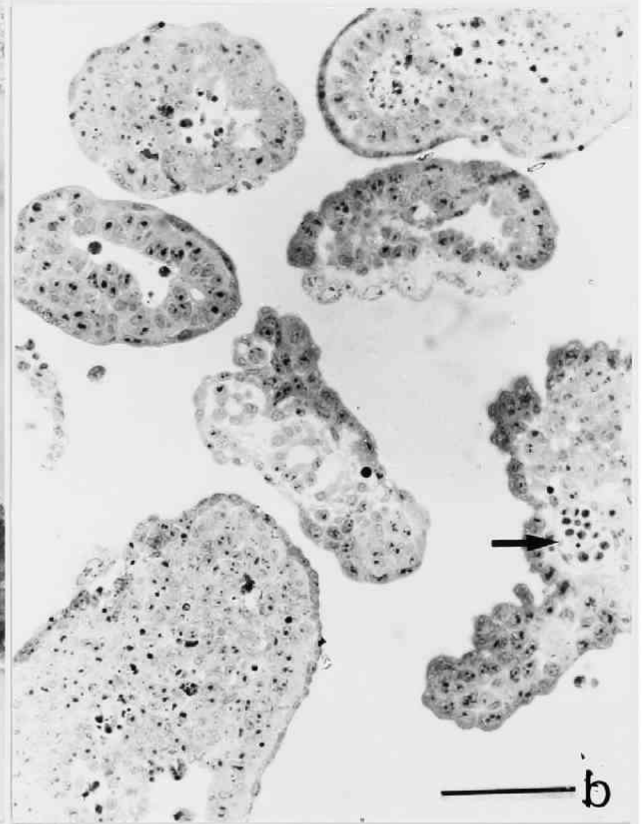
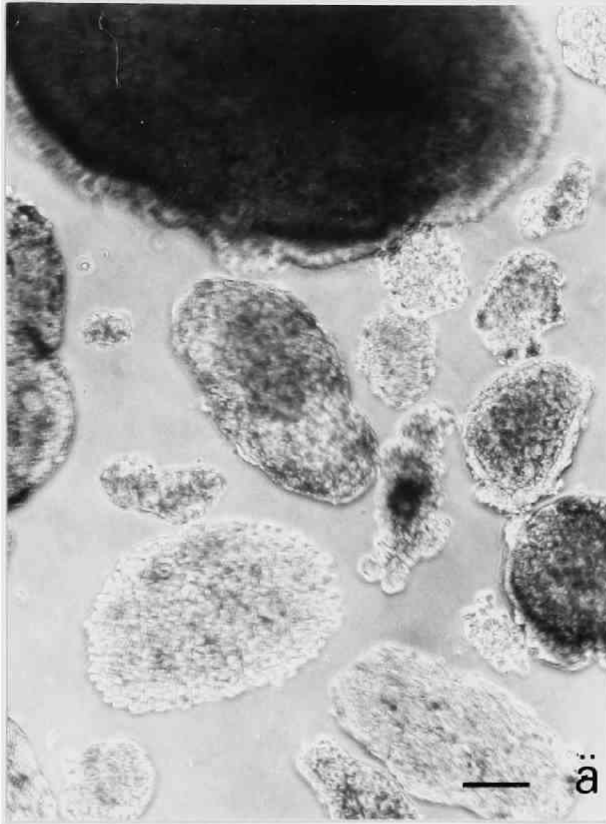
e, f 10 μ



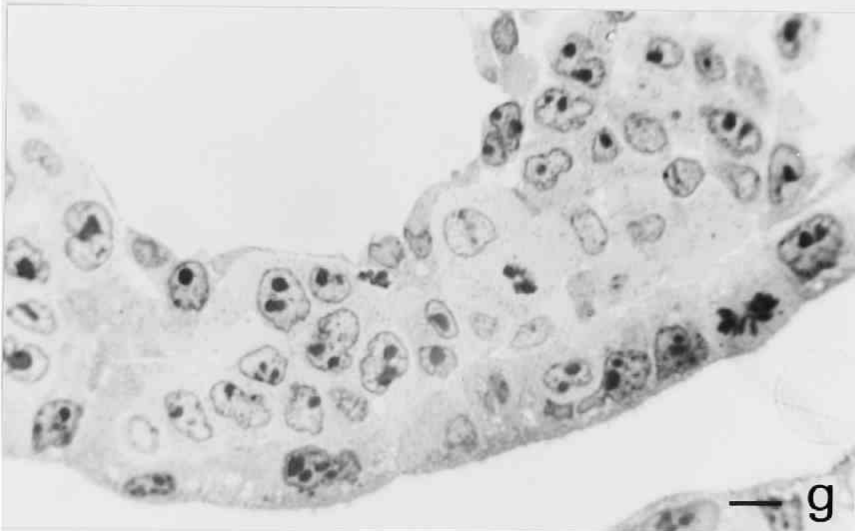
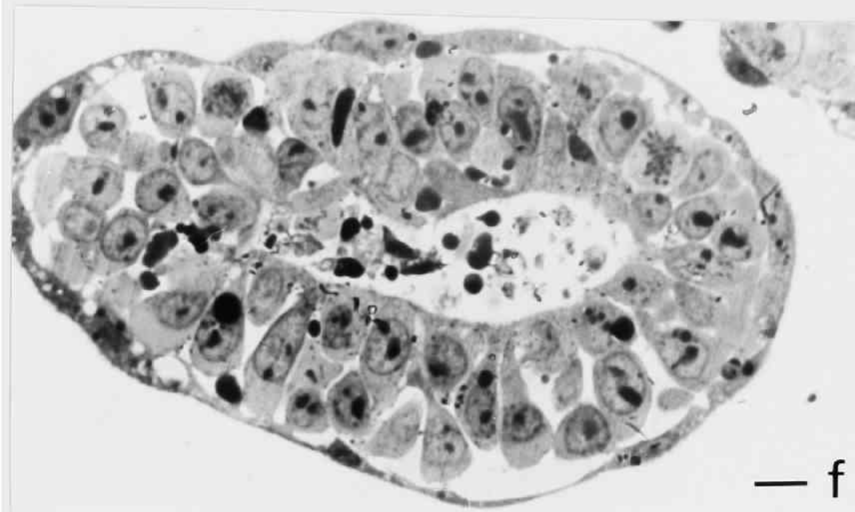
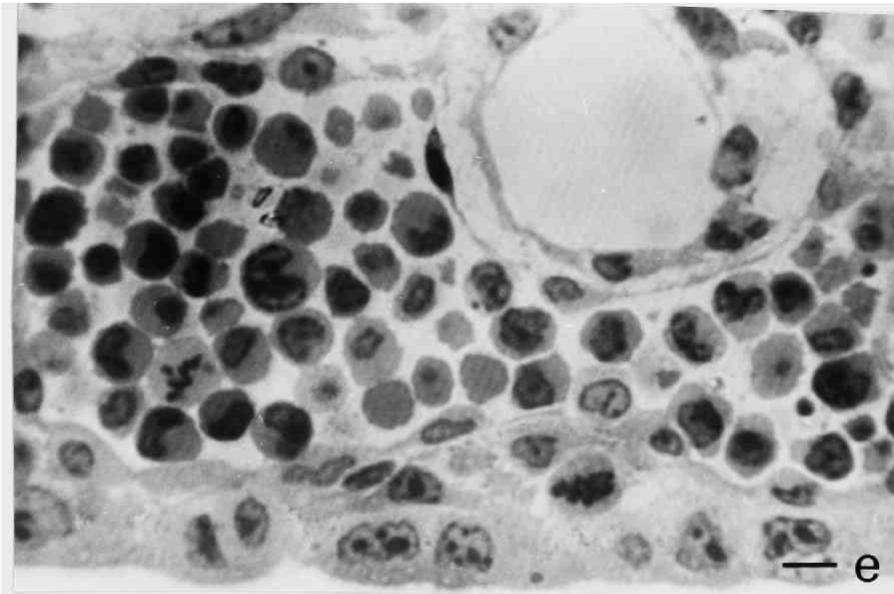
bar. a-d 100 μ
e 10 μ



f. par 10 μ .



1001



bar e-g 10 μ

れたが、一部には明らかに visceral タイプ様のものも観察された。

移植後 7 日目になると (図 9a-d) 腔所の形成は 34.7% の胚様体において観察された (表 3)。図 8e と 9c にみられるように、最初は球状の細胞が腔所をとり囲んでいたのが腔所の発達につれて柱状となり、胚体外胚葉に匹敵する構造へと発達する。小さな胚様体においては胚様体一個あたり一個の腔所が形成されるが、200 μ m 以上の大きな胚様体においては 2 個〜数個の腔所が形成される。

これらの腔所の中で特に大きく発達し胚体外外胚葉を形成している胚様体においては 3 の細胞層が胚体外外胚葉と内胚葉の細胞層の間に出現しているが観察された (7~14%)。3 の細胞層は胚体外外胚葉の一部から内胚葉の細胞層との間の空間へ、葉裂移動しているのが観察される。これは初期発生過程における原系から中胚葉形成に相当する。この原系様構造からの中胚葉の形成は、5 日目頃

から観察されはじめ 7 日目にかけて増大する (図 9 c, d)。

血球島は図 9 b, c, e と表 3 に示されるように胚体外外胚葉と内胚葉の間の層に、細長い、固ろ織様細胞にとりかこまれて観察される。中には血球系の細胞がみられ、その中の一部にはペンチニン(+)の細胞が存在する。

この時点では、胚様体の外側の細胞層は、parietal タイプ様 (図 9 f) と visceral タイプ様 (図 9 g) の両方の型が観察される。またどちらとも判定しがたい中間型も存在する。一組一組の胚様体についてみると、どちらかのタイプの細胞層から構成されているが、時には、両方のタイプが混じっている胚様体も観察される。

4-2. SKEB 株以外の腹腔内での分化。

ODEB 株については、腹腔内培養開始 24 時間後の時点では、SKEB 株と同様、巨大胚様体が

ら、個々の胚様体は、分離したシンブル胚様体となる。また、好中球の浸潤と同様に観察された。しかしながら ODEB 株では、移植後 2 ~ 3 日目になると SKEB 株と大きく異なってくる。ODEB 株では、中の胚性がん細胞の増殖はごくわずかであり、腔所の形成率も 7 日目で 0.4 % とごくわずかであった (図 10, 2b, 表 3)。また ODEB 株の外側の内胚様性の細胞層は全て parietal タイプ様であり、visceral タイプ様は全く観察されなかった。

一方 ASEB 株では腔所の形成率は 3.4 % (7 日目) と、SKEB 株と ODEB 株の間にあった。

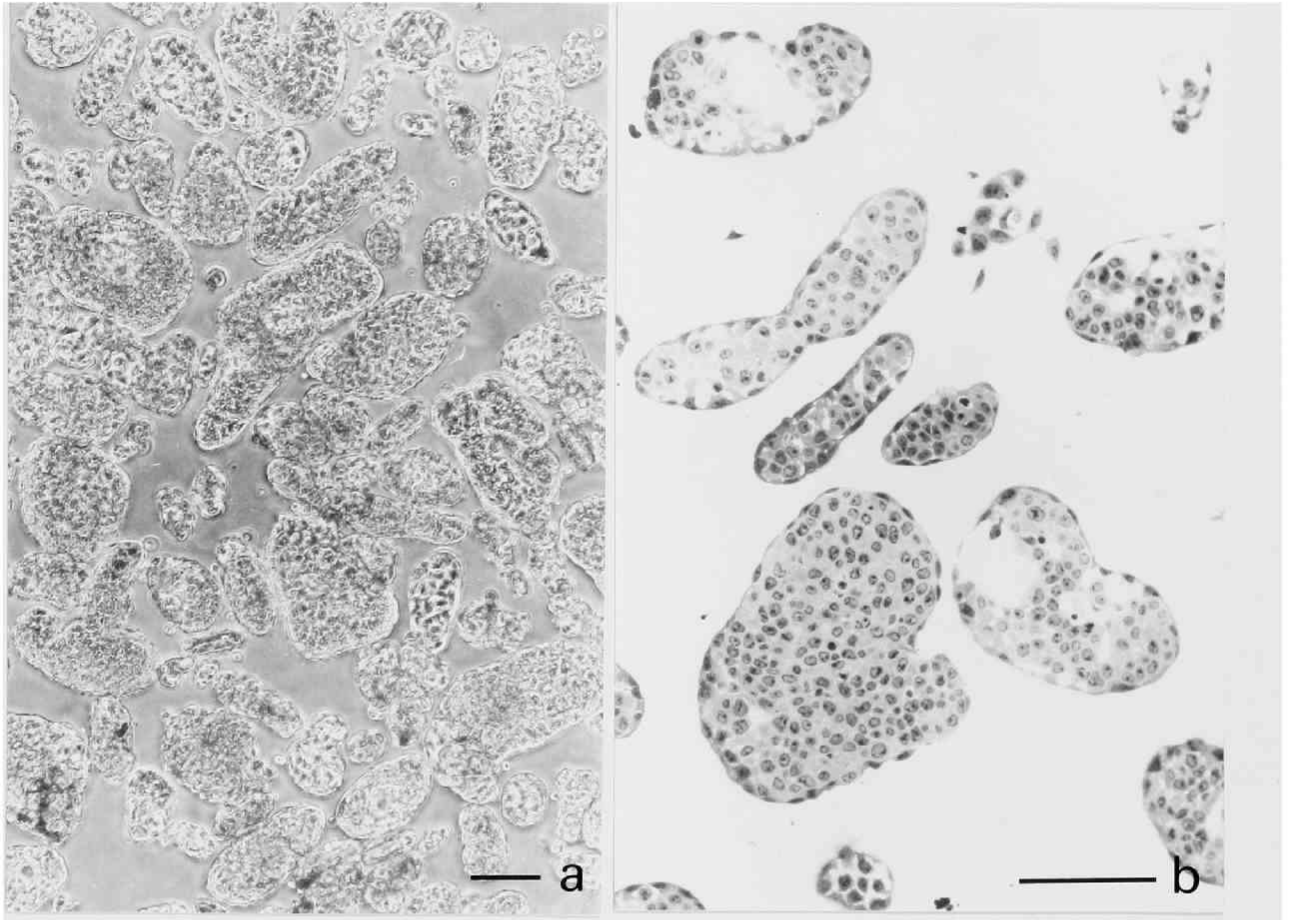


図10 7日肉の腹腔内培養の後にとり出したODEB胚様体、

a、位相差像

b、切片像 胚様体の内部に胚体外胚葉および腔の形成はほとんどみられない。内胚葉のタイプは parietal タイプ様である

5. 腹腔内における胚様体の成長と分裂頻度

SKEB株の胚様体の大きさは、腹腔内移植後徐々に増大する。一方ODEB株の胚様体は3日目まではやや増大するが、その後7日目までにはその大きさはむしろ小さくなる(表4)。

腹腔内培養7日目における胚様体のサイズの分布は、図11に示されているように、SKEB株では数日ニクロンに及ぶ大きな胚様体を含む中広い分布を示す。一方、ODEB株の方は70~120ニクロンの間に均一化する傾向がある。

分裂頻度の変化はまた、SKEB株とODEB株の内で大きくちがっている(図12)。SKEB株においては分裂頻度は、腹腔内培養2日目に最大となる。それはin vitroにおける継代培養時の約2倍の値である。その後分裂頻度は減少する。これは腔形成の進行に平行して起こっていると考えられる。一方ODEB株の胚様体においてもやはり腹腔内培養2日目に最大となるが、その値はあまり大きくない。

表4. 腹腔内培養期間中に示した胚様体の成長.

Embryoid body line	Days in peritoneal cavity	Size of the embryoid bodies (micron) Mean $\pm$ S.D.
SKEB	1	140 $\pm$ 64
	3	163 $\pm$ 82
	7	187 $\pm$ 123
ODEB	1	120 $\pm$ 41
	3	159 $\pm$ 78
	7	118 $\pm$ 47

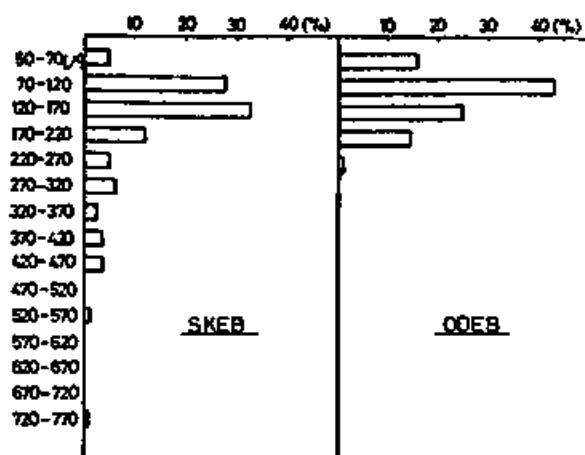


図. 11. 7日間の腹腔内培養後、とり出した胚様体のサイズ分布

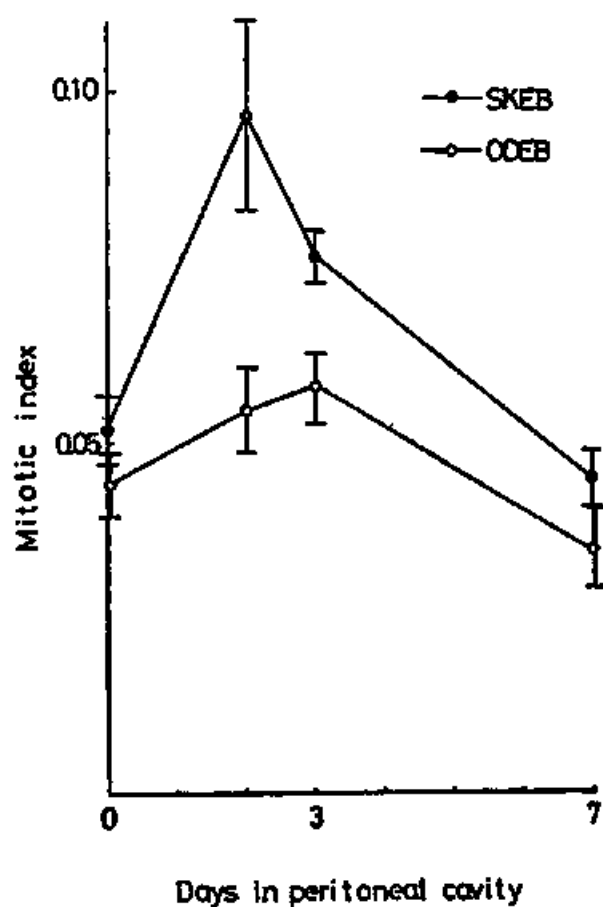


図. 12. 腹腔内培養期間中における SKEB 株と ODEB 株の分裂頻度の変化。

6. 固形腫における分化度

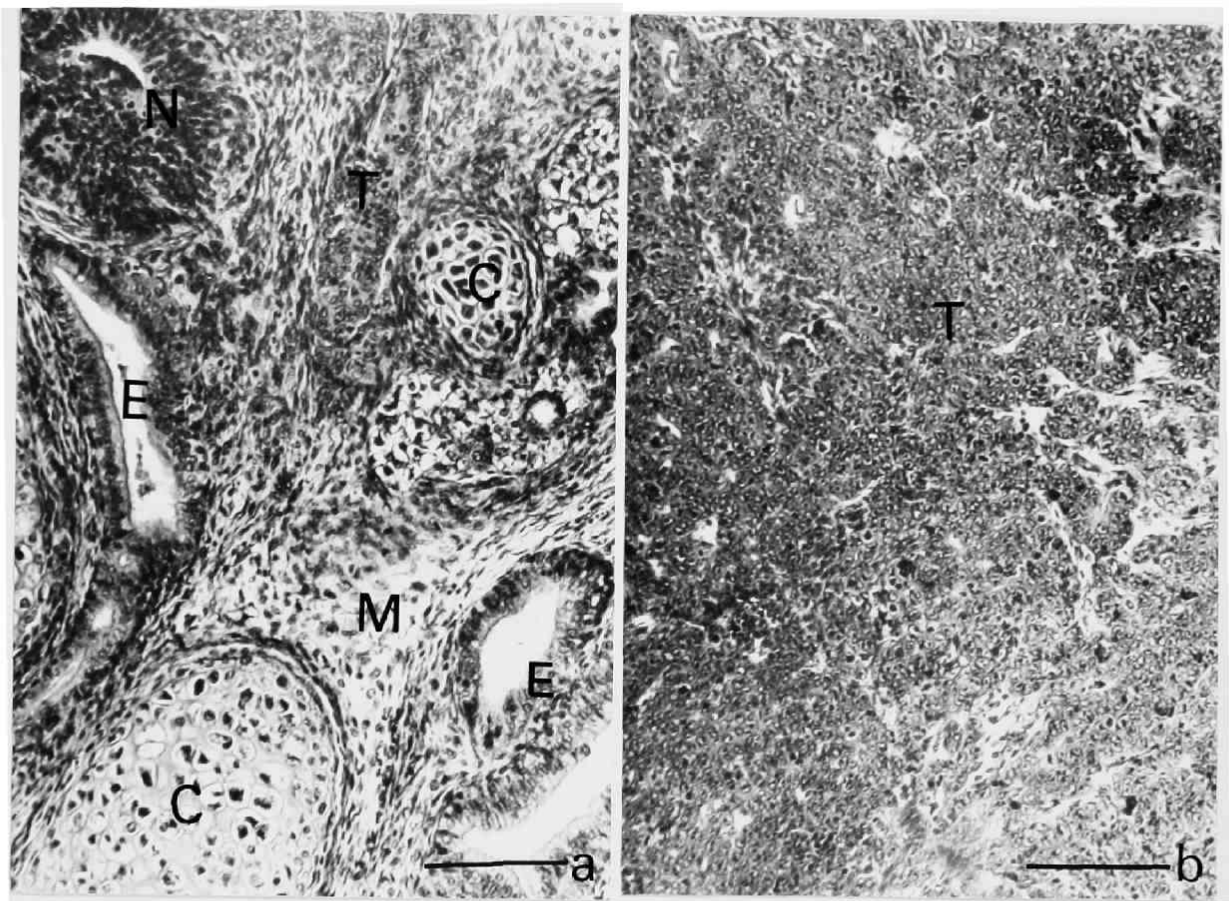
図13および表5に示されるように、生体内における固形腫の分化度もまた、株によって大きく異なっている。

SKEB株では、固形腫の切片の85-98%が、間充織、軟骨、骨、筋肉、上皮などの分化した組織によって占められている。一方ODEB株では三胚葉由来のさまざまなタイプの組織が分化はするが、固形腫の切片の75%以上が未分化の胚性がん腫細胞からなっている。たとえ移植後長期間おいたものであっても、固形腫の分化度は変わらない。

SSEB、SEBⅢ株由来の固形腫もまた、SKEB株とほぼ同様であり、分化した組織の占める割合が85%におよぶ固形腫を形成する。

一方OCEB株由来の固形腫は、ODEB株由来の固形腫とほぼ同様であり、大部分が未分化の胚性がん腫細胞よりなる固形腫を形成する。

ASEB株由来の固形腫は、SKEB株とODEB株の間にあって、約75%が分化した組織が占めて



- 図13. 腹腔内に出来た大きな固形腫の切片像(28日後).
- a. SK-EB株由来の固形腫. 軟骨(C) 絨毛上皮(E) 肉芽
織(M) 神経管(N) 奇形ガン腫細胞(T) 等がみられ
る
 - b. ODEB株由来の固形腫. 大部分が奇形ガン腫細胞から形
成されている.

表5 腹腔内に形成された固形腫の分化率(%)

Embryoid body line	Embryonal carcinoma cell	Mesenchyme cell	Neural tissue	Cartilage and bone	Muscle	Epithelium
SKEB No.1	14.5	14.5	14.5	43.6	9.1	3.6
	4.8	33.7	31.3	3.6	15.1	11.4
	1.6	44.4	19.0	22.2	6.3	6.4
ASFB No.1	34.5	25.4	23.2	1.4	2.1	13.4
	26.8	24.9	24.1	4.7	1.6	17.9
	12.8	34.2	11.1	10.3	18.8	12.8
ODEB No.1	78.6	11.9	-	-	7.1	2.4
	78.4	10.3	3.1	1.0	7.2	-
	76.9	6.6	11.0	-	2.2	3.3

いる。TSEB株についてもほぼ同様である。

固形腫瘍において分化した組織の占める割合について、各株の順位をつけると、 $SKEB \geq SSEB \geq SEB \geq TSEB \geq ASEB > OCEB \geq ODEB$ となり、心筋分化率とほぼ平行している。

D 考察

I 腔所形成能とその後につづく分化との
相関。

数種の分化能の異なる胚様体株の分化能および分化に至る過程の比較から、*in vivo* において胚様体で起る腔所の形成能とその後につづく、*in vitro* および、*in vivo* における分化のあいだには大きな相関関係があることが明らかとなった。*in vitro* において高い心筋分化能を示す SKEB 株の胚様体は、腹腔内において高い腔所形成率を示す。腔所の形成過程と、マウスの初期発生過程との比較から、マウス胚で 5 日目頃から形成され始める前羊膜腔に相当すると考えられる。またこの SKEB 株の胚様体は、腹腔内組織に接着して、数日後には、非常によく分化した固形腫を形成する。一方 *in vitro* においてほとんど分化しない OEGB 株の胚様体は、*in vitro* 培養に先行する腹腔内へ移植された条件下で腔所形成がほとんどみられないし、またあまり分化していない固形腫を形成する。

ASEB 株の分化能は通常、心筋分化能、腔所形成能、固形腫の分化能において、SKEB 株と ODEB 株の間にある。

このように心筋の分化能、腔所形成能、固形腫における分化した組織の比率の内には大きな相関があることが明らかにされた。

奇形がん腫細胞の分化能を定量化するのは容易ではない。Martin 等 (11, 12) は各分化能をもつ株を Type I と Type II の 2 つのカテゴリーに分類している。Type II 株は胚様体を形成した後さらに浮遊培養条件下で、システム胚様体を形成するが、Type I の方は同様条件下で、シンプル胚様体のままだ。また Type III の方が、Type II の株よりも、*in vitro* においても *in vivo* においてもより多くの種類の組織を分化すると共に分化した組織の割合の多い組織を分化する。

2. 胚様体の分化過程

今回の研究は、分化能の高い SKEB 株等の胚様体を使って、胚様体の腹腔内での分化過程を明らかにした。すなわち、その過程は、

- 1) 外側の内胚葉性細胞の形態的変化、
- 2) 中の胚性ガン腫細胞の増殖とグループ化
- 3) 各グループ毎からの腔所の形成と、胚体外胚葉の分化発達、
- 4) 胚体外外胚葉と内胚葉性の細胞層の間の層へ、原糸様の構造域からの、中胚葉の葉裂、移動。

以上大きく4つの段階に分けられる。

Martin 等 (13) はシステック胚様体 (胚様体) の中の細胞が、シスト様構造を形成したり、何らかの分化した組織を形成している胚様体形成能をもつ、分化能の高い株の *in vitro* での分化過程の観察から、胚性ガン腫細胞の分化過程は、中胚葉形成期以前まではマウスの初期発生の過程に非常によく似ていると報告している。しかしながら彼女等の *in vitro* での分

化系では、原条様構造域からの中胚葉層の形成はごく例外的にしか観察されず、多くの場合は中胚葉は、胚体外外胚葉の細胞層のものが細長くなって形成されている。しかしながら、腹腔内培養の系では、胚体外外胚葉のものが細長くなって中胚葉となる像は、観察されていないので中胚葉は大部分、原条様構造域から、正常発生過程と同様、分化していくと考えられる。

また胚様体の静脈注射によって形成された肺コロニーにおいても、3つの段階が固定されている(14, 15)。1) 外層の内胚葉性の細胞層の消失、2) 内部の胚性ガン腫細胞の増殖とグループ化、3) 分化する前段階である管状構造の出現(これは腔所形成に相当する)。

これらの結果は胚様体の胚性ガン腫細胞が、直接軟骨や心筋といった細胞へ分化することではなく、先についくっかの分化過程さらには組織内相互作用を経過して、分化が進行していくということ、さらにその分化

過程というのは 基本的にはマウスの正常発生過程とほぼ同じであるということを示唆している。

また特に SKEB株と ODEB株の分化能の比較により、腔所形成過程は、胚性ガン腫細胞の分化によって必要欠くべからざる過程であることが推測される。

SKEB株において腹腔内移植後2日目に見られる高分裂頻度で特徴づけられる時期は、胚性ガン腫細胞が活発に増殖している時期あるいは増殖した細胞がグループ化する時期である。そしてその後の分裂頻度の低下は、腔所の発達分化と共に進行する。ODEB株では分裂頻度の増加はわずかであるがこれは低腔所形成能と関連している。すなわち、腔所形成のためには、先だつ活発な増殖が要求されると考えられる。

では何が腹腔内で分化を誘導する要因となるのだろうか

diffusion chamberに胚様体を入れて腹腔内培養

しとも分化は誘導されない(5)。このこと
 から、単に腹水の factor が分化誘導物質とは
 考えられず、むしろ、^{癌分子} 腹腔内の細胞あるいは
 癌分子物質の可能性が考えられる。切片によ
 る詳細な観察から、腹腔内癌種は6~12時間
 後には多数浸潤してくる好中球が、直接ある
 いは間接的に何らかの分化への刺激要因とな
 っている可能性が考えられる。特に、癌種は
 12時間前後に、胚様体の外側の内胚葉性の細胞
 が壊死し、除去されている像が観察されて
 いる。そしてまた新しく胚性ガン腫細胞か
 ら、内胚葉性の細胞が分化しつつある像も観
 察されている。これらの観察結果から、好中球
 のものが胚性ガン腫細胞に直接働いてい
 る可能性や、^{癌の}内胚葉性の細胞の破壊→再生の
 過程が胚様体の分化の要因となっている可能
 性などが考えられるが現在までのところ推測
 の域を出不ない。また3日目から7日目にか
 けて多数観察されるマクロファージ細胞に
 よる腔所のデブリの貪食もまた、腔所の形成

発達に、一役買っていると考えられる。いずれにせよ、腹腔内培養による胚様体の分化誘導の過程では、腹腔内細胞の果たす役割は重大であると考えられる。

3. 心筋分化

心筋エロニーの分化パターンの解析と腹腔内における胚様体の分化過程の追跡から、腹腔内で腔形成あるいは中胚葉形成の段階にまで^{approx}進行していることが、その後 *in vitro* に移したときに分化の起こるための必要な前段階ではないかと仮定できる。しかしながら腹腔内では分化はそれ以上には進行せず、律動する心筋細胞の分化が実現するためには、さらに *in vitro* 条件へ移されることが必要であるらしい。

脊椎動物における正常発生過程では、心筋は内臓中胚葉から分化し(16)、一部は周血管細胞(17)から分化する。そして、妊娠期間の長短にかかわらず、心筋は、胚体外外胚

葉が浮遊分化して原系が形成されたすぐあとから、律動が開始する(18)。マウス胚では原系が形成されるのは妊娠7日目であり、心筋が律動を開始するのは8日目である。腹腔内移植期間中に胚体外外胚葉形成、さらにはいくつかの胚様体においては、中胚葉の形成がなされているので、*in vitro*に移した後さらに少し分化して律動する心筋が分化してくると思われる。すなわち腹腔内移植後 *in vitro* 条件では、中胚葉→心筋、あるいは胚体外外胚葉→中胚葉→心筋の分化過程が進行していると考えられる。これが腹腔内移植期間の長短にかかわらず、心筋の律動という心筋の形質発現には3-7日の日数が要求される一つの理由であると考ええる。

では何故 腹腔内で、中胚葉形成期以上に分化が進行しないのであろうか。マウス内部細胞塊の培養で、浮遊培養と比べるとマウスの2.5日胚位までしか分化は進行しないが、ピペリンにより、胚の構造をこわして基質に接着させると、

3-5 日後の心筋をばいめとして種々の組織が分化してくると報告されている(17)。また心筋の分化には内胚葉と中胚葉との相互作用が要求されると、両生類では報告されている(20)。一方、鳥類においては内胚葉との相互作用は必須ではないが、内胚葉が存在しないと心筋の形質発現が大きく低下すると報告されている(18)。腹腔内からとり出した胚様体はまれに浮遊状態で律動する(180個のうち5個は浮遊状態で律動、表2参)ことから、心筋分化にとって基質への接着は必須条件ではないと考えられる。むしろ基質に接着することにより、細胞の再配列がおこり、細胞間の相互作用が新たに進行し、心筋が分化するという可能性が考えられる。

REFERENCE

1. Pierce, G.B., 1967. Current Topics in Developmental Biology, 2, p.223-246, Academic press.
2. Stevens, L.C., 1967. Advances in Morphogenesis, p.1-31, Academic press.
3. Martin, G.R., 1975. Cell, 5. 229-243.
4. Chung, A.E., L. Estes, H. Shinozuka, J. Braginski, C. Lorz and C.A. Chung, 1977. Cancer Res., 37, 2072-2081.
5. Amano, S., K. Uno and A. Hagiwara, 1978., Develop., Growth and Differ., 20, 41-47.
6. Spurr, A.R., 1969. J. Ultrastruct. Res. 26, 31-43.
7. Amano, S. and A. Hagiwara, 1976. Develop., Growth and Differ., 18, 95-103.
8. Evans, M.J., 1972 J. Embryol. Exp. Morph 28, 163--173.
9. Pierce, G.B. and E.L. Verney, 1961, Cancer 14, 1017-1029.
10. Wiley, L.M. and R.A. Redersen, 1977. J. Exp. Zool. 200, 389-402.
11. Martin, G.R. and M.J. Evans, 1975. In Roche symposium on teratomas and differentiation. Academic Press, New York, p.167 - 187.
12. Evans, M.J. and G.R. Martin, 1975. In Roche symposium on teratomas and differentiation. Academic Press, New York, p.237 - 250.
13. Martin, G.R., L.M. Wiley and I. Damjanov, 1977. Develop. Biol. 61, 230-244.
14. Ishikawa, T. and A. Hagiwara, 1977. Develop. Growth and Differ., 19, 329-335.

15. Ishikawa,T. 1979. Develop.Growth and Differ., 19, 329-335.
16. Manasek,F.j., 1968. J.Morphol. 125, 329-366.
17. Virach,S. and C.E.Challice, 1973. J.Ultrastruct.Res. 42, 1-24.
18. Manasek,F.J., 1978. The Cell Surface,I. North-Holland
Publishing Company. p.545-598.
19. Hogan,B. and R.Tilly. 1978. J.Embryol.Exp.Morph. 45, 107-121.
20. DeHaan,R.L., 1965. Organogenesis, Holt,Rinehart and Winston,
New York. p.377-419.