

ヒト正常乳腺, 良性および悪性乳腺上皮細胞の 短期培養と Concanavalin A-mediated Hemadsorption による細胞膜の変化

川崎医科大学 内分泌外科学教室 (指導教授: 妹尾亘明教授)

平塚 正弘

(昭和56年8月31日受付)

Short Term Culture of Human Normal, Benign and Malignant Mammary Epithelial Cells and Molecular Changes of Their Cell Membranes by Concanavalin A-mediated Hemadsorption

Masahiro Hiratsuka

Department of Endocrine Surgery, Kawasaki Medical School

(Accepted on Aug. 31, 1981)

1. 培養法の改良は, コラゲナーゼ消化法の最適条件と **differential sedimentation** の考案で間質成分と上皮成分 (**organoids**) を容易に分離することができ, ヒト乳腺上皮細胞培養が可能となった。

2. コンカナバリン A (Con A) 凝集反応では, Con A で処理した指示赤血球と **sparse culture** をした細胞とを反応させる方法が最良である。

3. Con A 凝集反応は良性乳腺疾患上皮細胞は正常上皮細胞と同じで反応の程度が弱く, 一方, 乳癌は強く, 著しい差をしめした。

1. An improved short-term culture technique of human mammary epithelial cells was developed, using optimal condition of collagenase digestion and differential sedimentation. This technique enabled to separate epithelial cell clusters (organoids) from stromal components.

2. Concanavalin A-mediated hemadsorption assay on sparse-cultured cells was the best method for concanavalin A agglutinability.

3. The concanavalin A reactivity of the epithelial cells in human benign mammary diseases was weak, same as that of normal epithelial cells. On the other hand, the reactivity of cancer cells was very remarkable.

はじめに

近年細胞膜性状の解析研究は著しく進歩したが, ことに癌化に伴う細胞膜表層糖蛋白質の変化が注目されつつある。Inbar ら¹⁾ が悪性化し

た線維芽細胞がコンカナバリンAによりよく凝集することを報告して以来, 種々の癌についても報告がある^{2,3)}。しかし, 動物やヒトの乳癌についての報告はまだ2, 3にすぎない。それはヒト正常乳腺上皮細胞の培養が困難であったから

である。そこで、1. 正常乳腺上皮細胞の培養法を改良した。2. そして本法を使用し、乳癌を含む各種乳腺疾患上皮増殖像における細胞膜性状を Con A 凝集反応から観察するとともに病変の病理学的所見を対比し考察した。

材料と方法

1) 材料

検討症例は正常乳腺2例、思春期過形成1例、乳腺症12例、線維腺腫8例、授乳期腺腫4例、乳癌10例の計37例である。正常乳腺は乳癌および線維腺腫病変からの遠隔部で組織学的にも正常像をしめした部位を用いた。

2) 初代単層培養法

詳細はすでに報告した⁴⁾が、ヒト生検材料を無菌的に0.5~1g採取し、30mlのダルベッコ変法イーグル培地(DMEM; 日水製薬)+10% fetal calf serum (FCS; Flow Laboratories, USA)+10 µg/ml インシュリン(Sigma Chemical Co., USA)+100 units/ml ペニシリンに入れ、4°Cで6時間まで保存する。コラゲナーゼ(Sigma, Type 1, 180 U/mg)をPBSに20 mg/mlに溶き濾過滅菌して、この1mlにDMEM 8.25 mlとFCS 0.75 mlを加えて2 mg/ml コラゲナーゼ液10 mlをつくる。組織をDMEMで2回洗滌し60 mm シャーレに移す。1 mlのコラゲナーゼ液を加えて組織の乾燥を防ぎながら、約1 mm³に細切し、その一部はH・E組織標本として組織学的検討に供する。細切後9 mlのコラゲナーゼ液を加え、その組織浮遊液を37°C、5% CO₂ フラン器で16~18時間インキュベートする。その後10回程度ピペティングをして組織片を分散させる。その細胞浮遊液を80メッシュ白金網(池本, No. 135)で濾過し、未消化の大きな組織片や結合組織をとり除く。濾液を15 ml 遠沈管(Corning, USA)に入れ、120 gで10分間遠心する。1グラムの乳腺から平均0.1 mlの沈渣が得られる。上清を捨てて10 mlの培養液(DMEM + 15% FCS + 10 µg/ml インシュリン)を加えて軽くピペティングした後、試験

管立てに垂直に静置する。15分後、血球と線維芽細胞のみを含む上清9 mlを静かに吸引し(S-1)、分離する。残りの沈渣に5 mlの培養液を加え、ピペティングした後、10分間立てておく。ついで上清5 mlを静かに吸引し、S-2分画とする。この分画は上皮細胞と線維芽細胞との混合よりなる。培養すると線維芽細胞の方が増殖が速いので、これも本実験には用いない。ついで再び5 mlの培養液を沈渣に加えてピペティング後立てておく。5分後、上清5 mlを吸引し60 mm プラスチックシャーレ(Falcon Plastics, USA)にまく(S-3分画)。この分画はほとんどが上皮細胞であるが、線維芽細胞も若干含まれる。最後に残る沈渣をS-4分画とするが、これは完全に消化しきれていない終末乳管や腺房の形態をしめす organoids からなる(Fig. 1)。1グラムの乳腺から得た

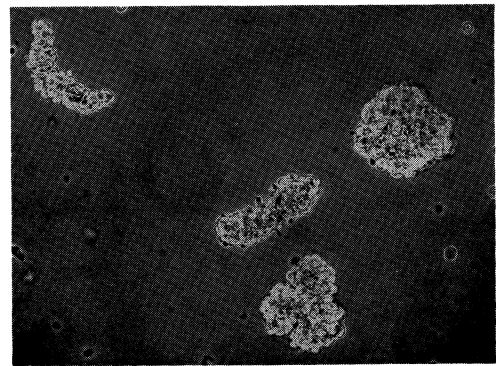


Fig. 1. Organoids collected in the S-4 fraction. The organoids show ductal or alveolar-like structures. Phase contrast, ×200.

S-4分画はふつう60 mm シャーレ2枚にまく。各シャーレは37°C、5% CO₂ フラン器で培養し、24時間後に2 mlの培養液を加え、48時間後に debris を除く目的で培地更新をする。癌細胞の培養は Lasfargues⁵⁾ の spillout technique だけでも可能であるが、研究上同一条件の培養における細胞が必要であるので、すべての組織をコラゲナーゼ消化による培養法で行なった。また、細胞膜への影響を考慮して、アミノ配糖体系の抗生物質は使用せず、培地作製時

にペニシリンを混入しただけである。それでこの影響も無菌テスト後の使用時には不活性になっていると思われる。

3) Test cell の準備

培養4日目にS-3分画とS-4分画から培養した細胞を各々鏡検し, どちらの細胞を用いるかを決定する。すなわちS-4分画が上皮細胞のみからなる場合はS-3分画を用いる。なぜならこの培養法は上皮細胞培養のために改良した方法で, ほぼ上皮細胞のみを分離することが可能であるが, 本実験にはネガティブコントロールとして線維芽細胞への赤血球凝集反応を比較するためにその混在が必要だからである。

4日間初代単層培養した細胞から培地を除き, CMF-PBS (Ca^{2+} -and Mg^{2+} -free phosphate-buffered saline; 8g/l NaCl, 0.2g/l KCl, 1.15g/l Na_2HPO_4 , 0.2g/l KH_2PO_4)で洗滌し, 0.02% EDTA (0.2g/l Ethylene-diamine Tetraacetic Acid+CMF-PBS)を1回作用させ, 再びCMF-PBSで洗滌後, 0.2%トリプシン液5mlを加えて1分間静置し, シャーレにトリプシン液0.5mlだけ残して37°Cで数分間インキュベートする。細胞が剥がれはじめたら培養液を加えてピペティングをくり返して単個細胞にし, 5×10^4 コ/wellになるように調整して, 径17mm培養孔をもつマルチウエルプレート (Falcon, No. 3008)のA列とB列の合計12個の培養孔に細胞をまいて, 37°C, 5% CO_2 フラン器でさらに2日間培養する。このように初代培養から数えて6日目の細胞を全例で実験に用いた。

4) Concanavalin A-mediated hemadsorption assays

Furmanskiら⁶⁾の方法を一部改変した。ヒトO型Rh(+)血液を使用直前に3mlヘパリン採血し, ただちに45ml PBS (phosphate buffered saline; 8g/l NaCl, 0.2g/l KCl, 1.15g/l Na_2HPO_4 , 0.2g/l KH_2PO_4 , 0.1g/l CaCl_2 , 0.1g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)に浮遊させ250gで5分間遠沈して上清を捨てる。再びPBSに浮遊し, 同じく遠沈により3回洗滌をくり返

す, コンカナバリンA (Con A; Sigma, Type IV)をPBSに溶解し, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の5群の2倍希釈液を作る。洗滌した赤血球浮遊液を遠沈管6本に分注し, 遠沈して上清を捨て, 2% Htになるように5群のCon A溶液とコントロールとしてCon Aを含まないPBSを加えてピペティングしたのち, 37°Cのウォータースバス中に10分間静置する。250gで5分間遠沈して上清を捨て, 再びPBSに浮遊し, 3回洗滌をくり返して赤血球に結合していないCon Aをとり除く。そして再び2% HtになるようにPBSに浮遊して指示赤血球とする。

マルチウエルプレートから培地を除き, 各培養孔を完全に満たすようにPBSを注ぎ, 数分間放置して吸引し, 再びPBSを注ぐ。このようにして洗滌を4回くり返して培養液中のグルコースやFCSを完全に除く。A列とB列の1番から6番までの孔に6群の指示赤血球を0.5mlずつ分注し, 37°C, 5% CO_2 フラン器に10分間インキュベートしてTest cellと赤血球との凝集反応をさせる。反応後ただちに大量のCMF-PBSを入れた容器に静かにプレートを入れて逆にし, ゆっくり回転して凝集していない指示赤血球をプレートから除く。この操作で全培養孔の反応を一瞬に止めることができる。プレートを丁寧にとり出し, PBSで1回洗って鏡検し, 細胞のないところに余分な赤血球が残っていないかどうか確かめる。ほとんどの場合以上の操作で十分であるが, 赤血球が残っている場合はさらに1~2回PBSで洗えばよい。メタノール固定後ギムザ染色をする。指示赤血球は全例において同一人から採血した。Con AはLot No. 79C-7010を使用し, このLot No.の糖特異性はSigma社より以下の如く報告されている。64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Con Aによる赤血球凝集反応の各種糖による抑制試験ではマンノースが最も特異的で, わずか156 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で凝集を抑制し, 次いでフルクトースが312 $\mu\text{g}/\text{ml}$, グルコースが625 $\mu\text{g}/\text{ml}$, グルコサミンが1250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で各々抑制し, ガラクトサミン, ガ

ラクトース, ラクトース, シュークローズは 10,000 $\mu\text{g/ml}$ でも抑制しない。

5) 判定方法

ギムザ染色をしたマルチウエルプレートのA列, B列の各6群の反応を鏡検し, 各培養孔の周辺の上皮細胞を100個, 中心部の上皮細胞を100個観察し, 指示赤血球を4個以上凝集している上皮細胞が200個中にいくつ存在するかを計算して百分率で表わし, A列とB列の平均値をとった。なお10個以上の細胞からなるコロニーは4日目のsubcultureの時にトリプシン処理が不完全であったために生じたもので, 本実験はsparse cultureでの判定のため除外した。

判定結果を左右する重要な因子としての指示赤血球の作り方が適正であったか, また反応前

のTest cellの洗滌が十分であったかをチェックする。すなわち以下の条件をすべて満足する場合のみ判定有効とした。ポジティブコントロールとしてリンパ球は1.56 $\mu\text{g/ml}$ Con Aの指示赤血球を凝集していること。ネガティブコントロールとしてCon A処理をしていない指示赤血球は上皮細胞と5%以上凝集していないこと。線維芽細胞は0~12.5 $\mu\text{g/ml}$ Con Aまで5%以上血球凝集していないこと。血管内皮細胞は0~25 $\mu\text{g/ml}$ Con Aまで5%以上血球凝集していないこと。

各培養細胞は形態的に判定した^{7,8)}。すなわち線維芽細胞は紡垂形であるかhead 1つにtail 1つをもつものであり, 筋上皮細胞とは区別できない。上皮細胞はギムザ染色では細胞質がやや濃染し, 多角形, 立方状あるいは少し長

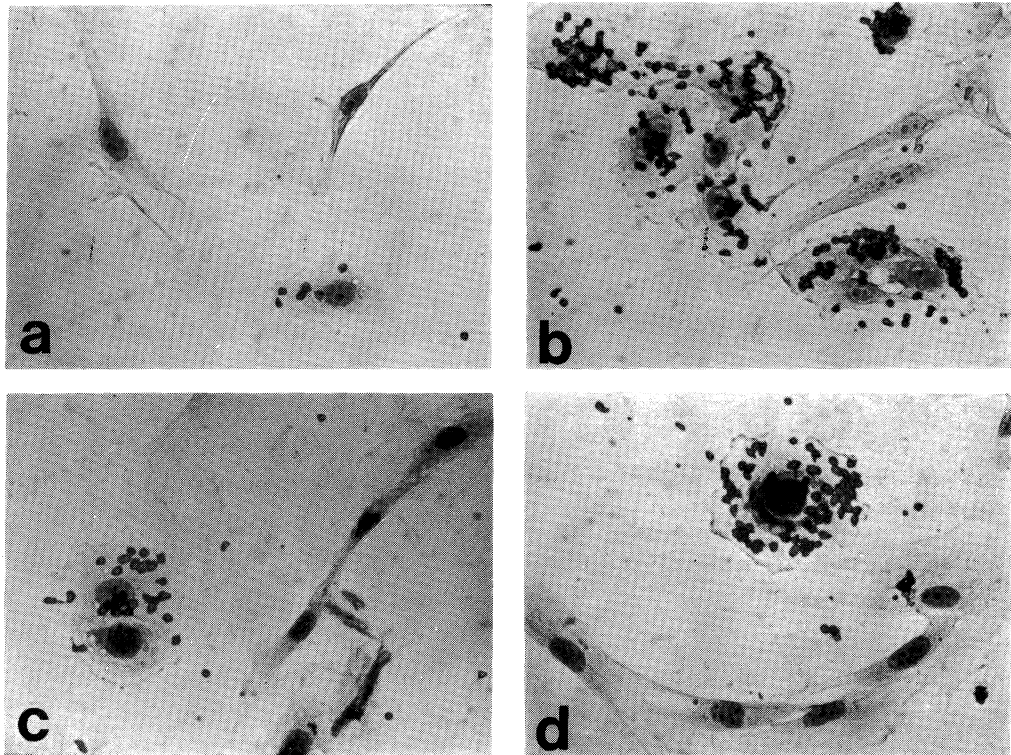


Fig. 2. Adherence of Con A coated indicator RBC to human mammary epithelial cells. Giemsa stain, $\times 200$.

- a; Fibrocystic disease (case no. 18), 25 $\mu\text{g/ml}$ Con A
- b; Fibrocystic disease (case no. 21), 12.5 $\mu\text{g/ml}$ Con A
- c & d; Cancer (case no. 8), 6.25 $\mu\text{g/ml}$ Con A

いだ円形のように見えるが head が 2 つあるもの。血管内皮細胞は初代培養では上皮細胞と同じくらいの大きさのものもあるが, subculture すると一般に大きく, 不整四角形をしめすことが多く, 細胞質が淡染し, その中にほうきではいたような直線がいくつもみられることである。以上の基準によって質的に鑑別した。

Fig. 2 は指示赤血球の上皮細胞への凝集をしめたもので, 線維芽細胞には凝集していない。**Fig. 2-a** は乳腺症 (症例 18) で 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Con A 処理赤血球である。上皮細胞に 4 個以上の赤血球が凝集し, 陽性細胞として判定されたものである。**Fig. 2-b** は乳腺症 (症例 21) で 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Con A 処理で, このように多数の上皮細胞が集っている場合は判定に慎重を要し, 細胞と細胞との境界を注意深く観察しなければならない。**Fig. 2-c** は乳癌 (症例 8) で 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Con A の反応で, 2 個の上皮細胞

のうち 1 個は強反応をしめしているが, 他は赤血球が 2 個しか凝集していないように見える。しかし核と赤血球が重なっており, このような場合, 核小体と赤血球との区別がつきにくいこともあるので注意を要する。**Fig. 2-d** は **c** と同症例であるが, このような細胞は判定が容易である。

結 果

Fig. 3 は横軸に指示赤血球を処理した Con A 濃度を, 縦軸に凝集陽性と判定された上皮細胞の百分率をしめしてあり, 5%以下と 95%以上は凝集反応の性質上意味がなく, グラフが繁雑となるので各々 5%, 95%として表わした⁹⁾。癌症例は実線で, 癌以外を点線でしめしてある。癌は全例低濃度の Con A で強く反応しているが, 癌以外のものは症例毎にかなり差がみられる。この差をもっとわかりやすくするため

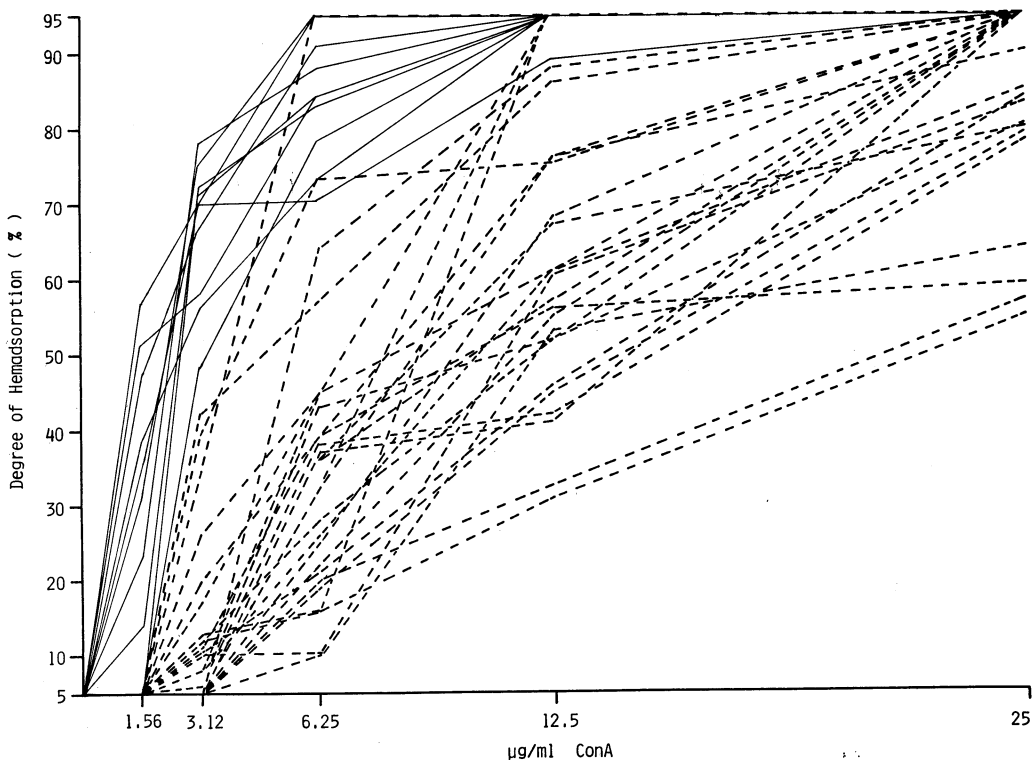


Fig. 3. Degree of adsorption of indicator erythrocytes to human mammary epithelial cells.

(----); normal and benign human mammary epithelial cells
(—); malignant human mammary epithelial cells

Table 1. Con A reactivity of human mammary epithelial cells.

[Con A] 1/2 max values present the Con A concentration at which 50% of the test cells adsorbed indicator RBC.

Case	Origin of the test cells	[ConA]1/2max μg/ml	% ^a
1	Medullary tubular carcinoma	1.5	70
2	Medullary tubular carcinoma	2	70
3	Medullary tubular carcinoma	2	67
4	Medullary tubular carcinoma	2.5	56
5	Papillotubular carcinoma	2	75
6	Papillotubular carcinoma	2.5	72
7	Papillotubular carcinoma	2.5	78
8	Scirrhus carcinoma c̄ signet ring cell ca.	3.5	48
9	Scirrhus carcinoma	2.5	71
10	Metastatic adenocarcinoma of the lymphnode	1.5	58
11	Lactating adenoma	7	26
12	Lactating adenoma	4	34
13	Fibroadenoma with lactating breast	6	5 >
14	Lactating breast (involution)	11	8
15	Blunt duct adenosis	4	39
16	Blunt duct adenosis	10	5 >
17	Blunt duct adenosis	9	5 >
18	Blunt duct adenosis	9	5 >
19	Duct papillomatosis	8	5 >
20	Sclerosing adenosis	14	10
21	Slightly epithelial hyperplasia	12	12
22	Slightly epithelial hyperplasia	11	8
23	Slightly epithelial hyperplasia	9	12
24	Slightly epithelial hyperplasia	14	5 >
25	Fibrosis	15	5 >
26	Fibrosis	8	5 >
27	Fibroadenoma	15	6
28	Fibroadenoma	10	11
29	Fibroadenoma	12	5 >
30	Fibroadenoma	10	11
31	Fibroadenoma	8	20
32	Fibroadenoma	21	5 >
33	Fibroadenoma	5	42
34	Fibroadenoma	22	13
35	Puerty hypertrophy	12	5 >
36	Normal	7	17
37	Normal	11	10

^aDegree of hemadsorption(%) with 3.12μg/ml ConA

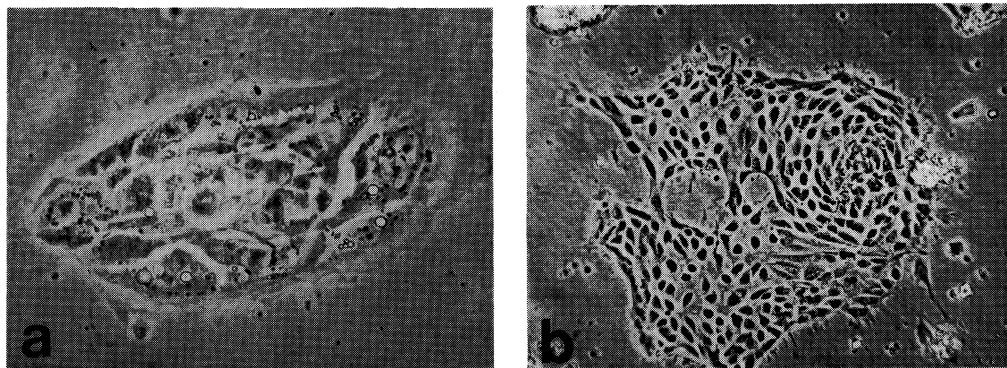


Fig. 4. a; Epithelial cells from lactating adenoma. 3 days in culture, Phase contrast, $\times 600$.
b; Epithelial cells from puerty hypertrophy. 2 days in culture, Phase contrast, $\times 200$.

に, このグラフから 50% の上皮細胞と血球凝集反応をおこさせるのに必要な Con A 濃度を求め, その値を [Con A] 1/2 max とした.

Table 1. は各症例の組織診断と [Con A] 1/2 max および $3.12 \mu\text{g/ml}$ Con A での凝集陽性細胞の百分率をしめたものである. 癌細胞は [Con A] 1/2 max が $1.5\sim 2.5 \mu\text{g/ml}$ のものがほとんどで, ムチン産生乳癌である症例 8 のみが $3.5 \mu\text{g/ml}$ でやや弱い反応であった. その他のものは癌組織型間における差はない. 症例 10 の乳癌リンパ節転移巣内の癌細胞は症例 1 (原発巣乳癌) と [Con A] 1/2 max が同じで, むしろ $3.12 \mu\text{g/ml}$ ConA での反応は他の原発巣よりも弱かった.

授乳期乳腺は退縮期の症例 14 を除いてすべて強反応をしめしている. とくに, 症例 12 は症例 8 の乳癌と類似している. 乳腺症は症例 15 以外は [Con A] 1/2 max が $8\sim 15 \mu\text{g/ml}$ である. 症例 15 は閉塞性乳管腺症であるが, 強い反応をしめしている. 線維腺腫は [Con A] 1/2 max が $5\sim 22 \mu\text{g/ml}$ であり, 最も幅広い分布をしめしている. 思春期過形成は成熟婦人正常乳腺より反応は少し弱い.

Fig. 4-a は授乳期腺腫 (症例 12) の培養細胞で細胞表面に多数の小滴がみられ, 小さいものは位相差顕微鏡的に黒い粒子として, またやや大きいものは白い球状物質としてみられる. これらはおそらく分泌された乳汁と思われる¹⁰⁾.

Fig. 4-b は過形成 (症例 35) の培養細胞であるが授乳期と異なり細胞表面に顆粒は見られない.

考 察

Con A が試験管内で癌化した細胞をとくによく凝集するという事は Inbar ら¹¹⁾により発見された. レクチンによる細胞凝集反応は一般に浮遊細胞を用いて行なわれており, その場合, すべての細胞が均一であることが必要で, 初代培養のように上皮細胞だけでなく線維芽細胞, 血管内皮細胞および血球などが含まれているものでは不可能であった. Furmanski ら⁶⁾ は hemadsorption assay を用いることにより, シャーレに付着伸展している細胞での実験を可能にした. しかしこの場合, confluent culture と sparse culture の両者間では結果が異なるし, また test cell を Con A で処理するか, あるいは赤血球を Con A で処理するかもまったく異なる. まず test cell を Con A で処理する場合, 結合していない Con A を洗滌する操作に 20~30 分を要し, その間に結合した Con A と細胞表面レセプターとの移動が各細胞で異なるために結果にばらつきが生じやすい欠点がある. これに反して, 赤血球を Con A で処理する方法では Con A は赤血球膜のバンド 3 蛋白に対応する膜内粒子 (膜貫通性糖蛋白質) と結合し, クラスタリー再配置をおこす.

一方、結合していない Con A を除くための洗滌操作に約 30 分かかり、その間に Con A と結合したレセプターの再配置は不可逆的になるといわれる¹¹⁾。そのようにして作った指示赤血球を test cell に一定時間反応させてその後大量の緩衝液中で一瞬に Con A 反応を止める方法の方が理想的である。

つぎに confluent culture と sparse culture での Con A 反応の差について考察する。まず confluent culture についてみると、Voyles ら¹²⁾ は乳癌細胞コロニーにおいて中心部の反応は弱く、コロニー辺縁部だけで判定したと述べ、判定の不正確さを指摘している。一方、癌細胞に限らず sparse culture に比べて confluent culture では一般に Con A 反応は弱く、マウス乳腺上皮細胞においても同様な現象がみられている¹³⁾。このような Con A 反応の程度差についての理由の一つとして接触抑制という現象が考えられるが、上皮細胞ことに腺上皮では接触抑制がかかりにくくコロニー中心部の細胞でも DNA 合成が行なわれている¹⁴⁾ といわれることから接触抑制は否定しえられる。つぎに両培養法での差が microvilli の性状と関係があるかについてみると、Willingham ら¹⁵⁾ は線維芽細胞では Con A 反応と相関があると述べているが、Reddy ら¹⁶⁾ はラット臍上皮細胞で microvilli に種々の変化をおこさせ検討した結果、その数と大きさに相関がないと述べている。したがって confluent culture と sparse culture との間で乳腺上皮細胞の microvilli の変化があっても Con A 反応には差がないといえる。つぎにこの差について細胞膜表層糖蛋白質の癌化に伴う蛋白質変化がとりあげられている。すなわちこれは癌化により細胞表層から消失する一種の高分子糖蛋白質であろうといわれる。Gahmberg ら¹⁷⁾ と Hynes¹⁸⁾ が同時にこの蛋白質を発見した。すなわちこの物質は正常線維芽細胞で存在するが悪性化で消失するという。この物質は後にフィブロネクチンと呼称された。フィブロネクチンはその後線維芽細胞以外に乳腺上皮細胞にも見られている¹⁹⁾。Chen ら²⁰⁾ によれば、フィブロネクチン

は正常細胞では細胞表面全体に分布し癌細胞では消失しているが、confluent culture の場合は癌細胞と癌細胞の接触部分にフィブロネクチンがみられ、条件によって必ずしもすべての癌細胞で消失するとはかぎらないことをしめした。したがって confluent culture ではこの物質が増加し、糖鎖を隠蔽している可能性を示唆している。Nicolson²¹⁾ は、正常線維芽細胞でもトリプシン処理をすると悪性化した線維芽細胞と同様に Con A で凝集することを発見し、また Gahmberg ら¹⁷⁾ はトリプシン処理でフィブロネクチンが分解することを発見している。このことを合せ考察すると正常線維芽細胞ではフィブロネクチンが大きく Con A 反応に影響を与えていることが考えられる。しかし、Voyles ら¹³⁾ によるとマウス乳腺上皮細胞ではトリプシンとコラゲナーゼ処理ではいずれにも影響を受けず、ヒアルロニダーゼ処理により正常細胞が Con A を凝集するという。このヒアルロニダーゼによる高 Con A 凝集性についてはすでに Burger ら^{22, 23)} も報告しており、また小島ら²⁴⁾ も肝癌細胞表面ではヒアルロン酸を含む層が減少していることを報告している。以上から乳腺細胞の Con A 反応性とフィブロネクチンとは直接関係がないと考えられるが、細胞膜表層にあるヒアルロン酸を含むある種の蛋白質が細胞接触でしめしたフィブロネクチンの増加現象のように confluent culture では癌細胞でも増加する場合のあることが推定される。したがってこのことが confluent culture と sparse culture との反応差に結びつくと考えられ、Con A 反応には sparse culture が優れている。

次にフィブロネクチンは環境条件によって影響を受けることがしめされている。例えば、Chen ら²⁵⁾ によればフィブロネクチンを産生する培養癌細胞を生体に接種するとそれが消失することをしめし、Smith ら¹⁹⁾ は継代培養によってフィブロネクチンを産生してくる癌細胞があることをみている。このことから Asch ら²⁶⁾ がマウス乳腺組織から細胞分散直後の suspension assay で Con A 凝集性を調べた場合は正

常と Hyperplastic Alveolar Nodule (HAN) および乳癌の間で差がみられたが, 培養した細胞を Con A で処理し無処理の赤血球との凝集反応をみた場合は3者とも反応が弱く差がなかったというのは上記の *in vivo* と *in vitro* の差に関係しているのかもしれない。しかし, 彼らは Con A を Hanks 緩衝液に溶解しており, この液のグルコース量では Con A 反応は抑制されるので不適であり, Asch の成績については問題点が残されている。

以上考察した諸点を十分考えると著者の方法, すなわち赤血球をまず Con A で処理しておく, その指示赤血球と sparse culture での培養細胞とを反応させる方法が最もよいと結論しえる。また, この方法の利点として 1. subculture により マクロファージを除くことができる。

2. 個々の細胞を形態的に観察するのが容易である。3. 細胞周期のうちで M 期の細胞は正常細胞でも癌と同じ細胞表面の性質をしめす²⁷⁾ のでこれを除く必要がある。本法は何回もの洗滌を行なう方法であるから M 期の細胞が自然に除外できることなどである。

本研究の Con A 反応は生検材料からの培養によるので同時に一部の組織を病理組織学的に検討した。Con A 反応と病変像の対比観察の研究は現在までまだない。

Table 1. にしめしたように乳癌細胞のすべてはいずれも反応が強く, [Con A] 1/2 max は 3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下をしめし, 良性疾患の過形成との間に, 2, 3 の例外をのぞき著しい差が認められている。悪性細胞と良性細胞の細胞膜性状の変化が推定された。また癌の組織型と Con A 反応の程度との間には関係がないと考える。乳腺上皮細胞についての Con A 反応の報告は極めて少なく, Voyles ら¹³⁾ と Asch ら²⁶⁾ がマウスについて, ヒトでは Voyles ら¹²⁾ の報告がありほぼ同じ傾向であった。しかし Voyles らはヒト正常乳腺上皮としての材料は離乳後の乳汁に含まれる遊離細胞を使用している。これは脱落細胞であって二次的变化を受けている可能性が推定される。また授乳期乳腺上皮は正常乳腺上皮と形態学的にも機能的にも異なるもの

である。ことに離乳期での腺房細胞の形態は後述するように退行変化が混在してみられることが特徴であり正常細胞としての対象にはなりにくい。そこでこれらの鑑別に著者らの改良した正常乳腺培養法を用いて検討した結果, 正常乳腺上皮と離乳期乳腺上皮の間にはあまり差がみられていない。すなわち Con A 反応に関与する細胞膜蛋白は形態や機能が異なってもほぼ同じ性状であることが立証しえる。

各疾患の症例数が少ないことから各疾患群に多少のばらつきや, Con A 反応が強くあたかも癌と同じ値をしめすものがごく少数にみられた。すなわち授乳期乳腺の腺腫 (症例 12), 乳腺症の症例 15, 線維腺腫の症例 33 の 3 例である。症例 12 と授乳期乳腺腺腫の他の症例とを形態学的に比較した場合, 基本的形態は異なっていない。症例 14 は授乳期であっても時期的に離乳時のもので組織学的にも分泌機能のみられない退行期の像を含んでいるのが特徴であった。症例 13 は線維腺腫を合併し, その一部の腫瘍細胞のみが乳汁分泌像をしめしている。授乳期腺腫の像は一般に間質に乏しく腺上皮で占められる単一像であるので部位による変化が少なく, Con A 反応にも適していると考えられるが, 退行像を伴う時期では部位による差がでてくる可能性がある。症例 12 の Con A 反応は癌と同じ値をしめしているがその解釈は不明である。この症例では **Fig. 4-a** にしめす乳汁分泌粒子が多数認められているが, 乳汁の糖質に Con A が強く反応したとも考えられるが, 乳腺症などにみられる分泌との関係については検討していないのでその機序についてはなお今後の検討にまたねばならない。なお乳汁分泌は培養においても Russo ら¹⁰⁾ によると乳汁に含まれる上皮細胞の培養で 10 日目まで機能を維持しえたという。

乳腺症における Con A 反応のうち反応の弱い症例 20 は硬化腺症で上皮細胞は腺房性性格をしめす細胞であり, 病巣は変性期過程にあるものであった。症例 15 は Con A 反応が強く癌に近い反応をしめしているが, 形態学的には乳管腺症 (閉塞性乳管腺症) でほとんど密集する

のう胞像をしめす退行性変化を主体とする像をしめしたが、一部に乳頭腫症像をしめす部分が見られ Con A 反応と一見矛盾がみられる。これは Con A がどの単位病変の細胞に反応したか、また培養した細胞が形態的観察をした材料部位と異なる可能性もありえよう。乳腺症という病変は一般に千化万別像の構成であるのが特徴であるから、培養された細胞がどの病変にあたるかの正確な同定は困難な面を含んでいる。乳頭腫症や腺症の乳管上皮増殖の著しい症例が本実験には十分含まれていないので今後このような過形成上皮の検討がなお必要である。症例 21~24 は乳腺症病変とするよりも部分的に小葉の軽度過形成をしめすもので正常乳腺に近い性状をしめして、一名 mastoplasia として分類されることがありこれに相当するが、ここでは乳腺症としてとりあげた。

線維腺腫は腺房細胞ではなく乳管上皮細胞がほとんど増殖する性質をしめす腫瘍であり、症例 33 をのぞいて [Con A] 1/2 max は 10 μ g/ml 前後である。症例 32 と 34 はとくに反応が弱い。これは病変像に上皮細胞の退行像をまじえているためであろう。他の線維腺腫症例は上皮増殖が形態的に均一な増殖像をしめしている。この腫瘍は増殖時期により、すなわち発育度(腫瘍の大きさ)によって増殖病変と退行性病変が混在するもので病変程度は必ずしも症例により均一ではない。

乳腺肥大症における病変は 1 例のみであるが、ほぼ線維腺腫に準ずる変化であり、Con A 反応も線維腺腫と同じ値をしめしている。

以上、Con A 反応からみた乳腺上皮過形成像をしめす疾患群で、癌細胞と良性疾患の間にはほとんどの場合著しい差がみられる。症例の例外については培養上、材料採取部位の相異などの因子が考えられ形態学的像との関連を十分検討することは困難であるが、癌化に伴う細胞膜蛋白質の変化はヒト乳腺の短期培養で、明らか

にみられることが立証しえた。Voyles ら¹²⁾ のヒト乳癌からの初代培養では線維芽細胞と上皮細胞が重なりあって Con A 反応の判定が困難であると想像しえるが、著者が選択した sparse culture ではより確実に判定しえ結果はより正確である。

ヒト乳腺上皮の癌化、増殖過程の性状について、小山²⁸⁾ は細胞核 DNA 量のヒストグラムから検討し DNA 量を ploidy 値からみて、正常上皮細胞、過形成(乳腺症-乳頭腫症、腺症、癌境界領域像)では diploid であったが、癌では aneuploid²⁹⁾ をしめすと述べた。癌化に至る過程で形態学的に良性の細胞増殖はどのような増殖形態変化をしめしても、正常の diploid 性状をよく維持しながら増殖が営まれるのが特徴であり、一方、癌化ではまったく異なる性質をしめすことを認めている。このような現象は細胞膜蛋白質の変化を観察した本実験からみても同様の傾向がみられ、良性疾患の多くは正常細胞とほぼ同じ性質をよく維持し、癌化に伴い性状を異にする点など興味深い。乳癌への上皮増殖過程においてことに形態学的に前癌性病変のような乳腺症のうちで増殖の著しい乳頭腫症や腺症およびその合併像での核 DNA ヒストグラムは分布幅が広く、形態学的には上皮細胞異型性は軽度であっても aneuploid をしめすものもあり癌化への移行を示唆している。一方、マウス乳癌の前癌病変は Hyperplastic Alveolar Nodule (HAN) があげられている^{30,31)}。Voyles ら¹³⁾ は HAN と癌とでは Con A 反応が同じで強いという。マウスの前癌病変はそのままヒト乳腺の癌化過程にあてはまらないけれども、ヒトにおけるこの方面の Con A 反応は今後にのこる重要な問題である。

稿を終るにあたり御指導、御校閲を頂いた妹尾巨明教授 および 実験病理学 木本哲夫教授に深謝いたします。組織培養法の改良にあたり実験病理学難波正義助教授の御助言に感謝いたします。

文 献

- 1) Inbar, M. and Sachs, L.: Interaction of the carbohydrate-binding protein concanavalin A with normal and transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63: 1418-1425, 1969

- 2) 木本哲夫， 妹尾左知丸： がんの細胞膜. 寺山宏編： 細胞膜系と物質移動……がん細胞膜の特性と関連して. 東京， 南江堂. 1969, pp. 139—162
- 3) 大本哲夫， 横村英一， 藤原千代： SV 40 DNA によるヒト胎児細胞の試験管内発癌と細胞膜変化. 細胞化学シンポジウム20 : 97—110, 1969
- 4) 平塚正弘， 妹尾亘明， 木本哲夫， 難波正義： 乳腺上皮細胞の培養， ヒト乳腺を中心にして. 組織培養 7 : 431—437, 1981
- 5) Lasfargues, E. Y.: Tissue culture, methods and applications. ed. by Kruse, P.F. Jr. and Patterson, M. K. Jr., New York, Academic Press, 1973, pp. 45—50
- 6) Furmanski, P., Phillips, P. G. and Lubin, M.: Cell surface interactions with concanavalin A, determination by microhemadsorption. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 140 : 216—219, 1972
- 7) Stampfer, M., Hallows, R. C. and Hackett, A. J.: Growth of normal human mammary cells in culture. In Vitro 16 : 415—425, 1980
- 8) Easty, G. C., Easty, D. M., Monaghan, P., Ormerod, M. G. and Neville, A. M.: Preparation and identification of human breast epithelial cells in culture. Int. J. Cancer 26 : 577—584, 1980
- 9) Glenney, J. R. Jr., Hixson, D. C. and Walborg, E. F. Jr.: Inhibition of concanavalin A-induced agglutination of Novikoff tumor cells by cytochalasins and metabolic inhibitors, role of cell-surface morphology and the distribution of concanavalin A receptors. Exp. Cell Res. 118 : 353—364, 1979
- 10) Russo, J., Furmanski, P., Bradley, R., Wells, P. and Rich, M. A.: Differentiation of normal human mammary epithelial cells in culture, an ultrastructural study. Am. J. Anat. 145 : 57—78, 1976
- 11) Nakajima, M., Tamura, E., Irimura, T., Toyoshima, S., Hirano, H. and Osawa, T.: Mechanism of the concanavalin A-induced change of membrane fluidity of chicken erythrocytes. J. Biochem. 89 : 665—675, 1981
- 12) Voyles, B. A., Kirkland, W. L., Furmanski, P. and McGrath, C. M.: Concanavalin A-mediated hemadsorption by normal and malignant human mammary epithelial cells. Cancer Res. 38 : 1578—1583, 1978
- 13) Voyles, B. A. and McGrath, C. M.: Markers to distinguish normal and neoplastic mammary epithelial cells in vitro, comparison of saturation density, morphology and concanavalin A reactivity. Int. J. Cancer 18 : 498—509, 1976
- 14) Medina, D. and Oborn, C. J.: Growth of preneoplastic mammary epithelial cells in serum-free medium. Cancer Res. 40 : 3982—3987, 1980
- 15) Willingham, M. C. and Pastan, I.: Cyclic AMP modulates microvillus formation and agglutinability in transformed and normal mouse fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 : 1263—1267, 1975
- 16) Reddy, J. K., Rao, M. S., Warren, J. R. and Minnick, O. T.: Concanavalin A agglutinability and surface microvilli of dissociated normal and neoplastic pancreatic acinar cells of the rat. Exp. Cell Res. 120 : 55—61, 1979
- 17) Gahmberg, C. G. and Hakomori, S.: Altered growth behavior of malignant cells associated with changes in externally labeled glycoprotein and glycolipid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 : 3329—3333, 1973
- 18) Hynes, R. O.: Alteration of cell-surface proteins by viral transformation and by proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 : 3170—3174, 1973
- 19) Smith, H. S., Riggs, J. L. and Mosesson, M. W.: Production of fibronectin by human epithelial

- cells in culture. *Cancer Res.* 39 : 4138—4144, 1979
- 20) Chen, L. B., Gallimore, P. H. and McDougall, J. K.: Correlation between tumor induction and the large external transformation sensitive protein on the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 : 3570—3574, 1976
 - 21) Nicolson, G. L.: Topography of membrane concanavalin A sites modified by proteolysis. *Nature New Biol.* 239 : 193—197, 1972
 - 22) Burger, M. M.: A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62 : 994—1001, 1969
 - 23) Burger, M. M. and Martin, G. S.: Agglutination of cells transformed by Rous sarcoma virus by wheat germ agglutinin and concanavalin A. *Nature New Biol.* 237 : 9—12, 1972
 - 24) Kojima, K. and Maekawa, A.: A difference in the architecture of surface membrane between two cell types of rat ascites hepatomas. *Cancer Res.* 32 : 847—852, 1972
 - 25) Chen, L. B., Summerhayes, I., Hsieh, P. and Gallimore, P. H.: Possible role of fibronectin in malignancy. *J. Supramolecular Structure* 12 : 139—150, 1979
 - 26) Asch, B. B. and Medina, D.: Concanavalin A-induced agglutinability of normal, preneoplastic and neoplastic mouse mammary cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 61 : 1423—1430, 1978
 - 27) Gahmberg, C. G. and Hakomori, S.: Organization of glycolipids and glycoproteins in surface membranes, dependency on cell cycle and on transformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59 : 283—291, 1974
 - 28) 小山博記: 乳腺症, 乳癌組織の核 DNA 量に関する顕微分光測光法による研究. *大阪大学医学雑誌* 17 : 105—116, 1965
 - 29) Izuo, M., Okagaki, T., Righart, R. M. and Lattes, R.: Nuclear DNA content in hyperplastic lesions of cystic disease of the breast with special reference to malignant alteration. *Cancer* 28 : 620—627, 1971
 - 30) Medina, D.: Preneoplastic lesions in murine mammary cancer. *Cancer Res.* 36 : 2589—2595, 1976
 - 31) Gullino, P. M.: Considerations on the preneoplastic lesions of the mammary gland. *Am. J. Pathol.* 89 : 413—430, 1977