

培養肝細胞の 3'-Me-DAB 処理による 細胞悪性度の増強に関する研究

第 1 編

3'-Me-DAB 処理細胞の生物学的性状の検討

岡山大学医学部癌研病理部（主任：佐藤二郎教授）

西 山 正 一

Key words：動物復元実験

3'-Me-DAB

S 15 mixture

（昭和56年11月2日受稿）

緒 言

培養ラット肝細胞を用いた DAB あるいは 3'-Me-DAB などのアミノアゾ色素による癌化機構の解明を目的とした研究は我々の研究室を中心として今日まで多数発表されて来ている^{1)~14)}。それらの報告の多くは一般に復元動物に対して腫瘍性を示さない正 2 倍体性の染色体構成を有する培養細胞を使用しての実験であった。これらの実験ではアミノアゾ色素で癌化させるのにかなりの長時間を要すると同時に、細胞培養の長期化につれて発癌剤で処理していない対象群の細胞も自然癌化し造腫瘍性を獲得する為に、発癌剤で処理した実験群の細胞が癌化し造腫瘍性を獲得したとしてもこれが、自然癌化によるものなのか、又は発癌処理によるものなのか、あるいはその両方の作用によるものなのか明らかにし難いという問題点を含んでいた。本論文ではこのような自然癌化の問題をさける為に、すでに癌細胞ではあるが腫瘍性の弱い、培養内で比較的安定な形質を保持する細胞を利用し、悪性度の増強という観点から、動物復元実験をもとに in vitro の指標を加味して実験をすすめた^{15)~18)}。

一方、一般に成熟型肝細胞は培養され難く培養細胞株は多くのもので未分化なものである。このことは発癌剤の代謝活性化酵素の消失、減

弱等を予想させその影響も無視できない。種々の論文^{19)~29)}にも見られるように薬物代謝酵素を含む肝臓マイクロゾーム分画（いわゆる S 15 fraction）を添加すると培養液中の発癌剤が効率よく活性化されることが知られている。著者は本論文においてもマイクロゾーム分画を添加した実験系を作製しこの可能性を追求した。

実験方法および材料

1. 細胞および培養方法

(1)細胞：CL 20。本細胞の由来は以下の通り。まず成熟呑竜系ラットに191日間 DAB を食べさせた。そして肝に生じた腫瘍結節部をとり出しこれより初代培養を作製し、数回の継代培養後、細胞株 dRLa-74 を得た⁸⁾。この細胞を更に単個培養し、細胞集団を均一化したのがこの細胞 CL-20 である¹²⁾。

(2)培養方法：Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) に 56°C、30 分間非働化した、Bovine Serum (BS) を 20% になるように加えた培地を用いた。培地には 100 units/ml のペニシリン G カリウム（明治製薬株式会社）と 100 µg/ml の硫酸ストレプトマイシン明治（明治製薬株式会社）を添加した。継代は 7 日目ごと。継代時細胞播種は 60 mm のプラスチックシャーレ（Falcon 社）に細胞数が 10 万ヶ/ml となるように調整した。培養は開放系（37°C、CO₂ 5%、Air 95%）で行な

った。

2. 薬剤の処理方法, これは Fig. 1 に示す通りである。

(i) 使用した薬剤とその濃度

- ① DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma 社)
- ② 3'-Me-DAB (3'-methyl-4-dimethylamino-azobenzene, 東京化成工業株式会社)
- ③ S 15 mixture, S 15 は 0.1% Phenobarbital (Na) 溶液をラットに飲料水として 7 日間投与し最後の 2 日間, 40mg/kg の Methlcholanthere の Olive oil 懸濁液を腹腔投与後肝臓をホモゲナイズ (0.15 M, KCl 溶液中にて) し, 10,000×g を 10 分間, さらに 15,000×g を 20 分間高速遠心して得られた上清である。タンパク濃度は 43.2mg/ml であった。

S 15 mixture は以下の様な組成である。
S 15; 0.2ml, MgCl₂·6H₂O; 0.1ml (8 mM), Earle's BSS; 0.4ml, NADPH; 0.1 ml (1 mM) H₂O; 0.2ml, total 1.0ml.

④ 実験においては上記の薬剤を 5 時間処理するわけであるが処理の仕方として以下の 6 通りに分けた。

処理 [A]; DMSO (1%)

処理 [B]; DMSO (1%) + S 15 mixture

処理 [C]; DMSO (1%) + 3'-Me-DAB (8μg/ml) *

DMSO (1.0%)

S15 mix. alone

3'-Me-DAB (8μg/ml)

3'-Me-DAB (8μg/ml)
+ S15 mix.

3'-Me-DAB (400μg/ml)

3'-Me-DAB (400μg/ml)
+ S15 mix.

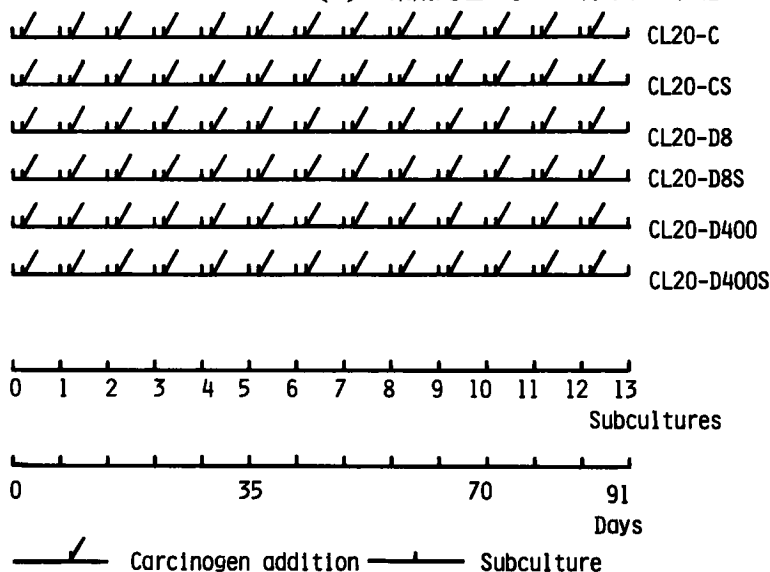


Fig. 1 Summary of the experimental design. DMSO, Dimethyl sulfoxide; 3'-Me-DAB, 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene; S 15 mix., S 15 mixture

処理 [D]; DMSO (1%) + 3'-Me-DAB (8μg/ml) * + S 15 mixture

処理 [E]; DMSO (1%) + 3'-Me-DAB (400μg/ml) **

処理 [F]; DMSO (1%) + 3'-Me-DAB (400μg/ml) ** + S 15 mixture

* 培地遠心後のアゾ色素測定値は 1.5μg/ml.

** 培地遠心後のアゾ色素測定値は 34.9μg/ml.

(ii) 実験

Fig. 1 に示す如く継代は 7 日目ごと。継代時 60mm シャーレあたり 30 万ヶ細胞を播種した。継代後 24 時間目に薬剤を 5 時間処理した。処理後 PBS でよく洗い MEM + 20% BS と置換した。この操作を 13 回おこない実験用の細胞を得た。

3. 実験法

(1) 動物復元実験 (Back-transplantation) の検討: 生後 24 時間以内の新生児呑竜系ラットを使用し [A] ~ [F] の薬剤処理で得られた細胞についてそれぞれ細胞数 100 万ヶ/匹を皮下接種し 90 日間観察した。30 日目と, 60 日目には皮膚の上から腫瘍の大きさを測定した。90 日目にはすべてのラットをエチルエーテルで屠殺し腫瘍を形成しているものに関してはこれを取り出し大きさと重さを測定した。

(2) PCM (位相差顕微鏡写真) の検討: 上記 [A] ~ [F] の薬剤処理によって得られた細胞の形態

Table 1 The incidence of tumors produced in rats after back-transplantation of CL 20 cells treated with and without 3'-Me-DAB in the presence or absence of S 15 mixture

Cells	Size(mm) of tumors observed at			Weight(gr.) of tumors observed at 90th. day
	30th. day	60th. day	90th. day	
CL20-C	0 x 0 0 x 0 0 x 0 0 x 0	0 x 0 0 x 0 0 x 0 0 x 0	0 x 0 x 0 0 x 11 x 8 15 x 13 x 8 22 x 9 x 8	0.0 2.7 2.8 2.8
CL20-CS	0 x 0 0 x 0 0 x 0	0 x 0 6 x 6 12 x 6	13 x 12 x 9 {38 x 20 x 20} {22 x 19 x 12} {30 x 15 x 11} {15 x 15 x 12}	1.2 16.5 7.7
CL20-D8	0 x 0 0 x 0 0 x 0 0 x 0	23 x 15 18 x 15 18 x 15 15 x 2	{32 x 20 x 14} {25 x 14 x 9} {27 x 24 x 17} {53 x 23 x 17} {26 x 26 x 16} {26 x 12 x 15}	11.7 13.7 26.7 23.5
CL20-D8S	0 x 0 0 x 0 0 x 0 0 x 0 0 x 0 0 x 0	58 x 23 50 x 23 48 x 40 48 x 22 50 x 17 dead	91 x 51 x 22 dead dead dead dead dead	82.8
CL20-D400	0 x 0 0 x 0 0 x 0 0 x 0	18 x 12 30 x 12 28 x 17 15 x 10	{20 x 17 x 11} {25 x 25 x 15} {25 x 25 x 15} {26 x 20 x 12} {60 x 30 x 15} {54 x 34 x 16}	11.4 23.7 36.0 22.5
CL20-D400S	0 x 0 0 x 0 0 x 0 2 x 1	30 x 18 34 x 17 41 x 20	{54 x 31 x 20} {33 x 16 x 16} {57 x 33 x 20} {28 x 28 x 15} {58 x 32 x 19} {33 x 19 x 19}	33.5 27.7 45.7

学的差異は最終継代後3日目に位相差顕微鏡写真として記録した。

(3)コロニー形成率 (Plating efficiency)の検討:

[A]~[F]の薬剤処理で得られた細胞についてこれを細胞数200ヶ/60mmシャーレに成る様に播種した。播種後4日目に培地更新し、8日間培養した後メタノールで固定、ギムザ染色し、コロニー数をカウントした。

(4)細胞飽和密度 (Saturation density)の検討:

[A]~[F]の薬剤処理で得られた細胞についてこれを細胞数2.5万ヶ/35mmシャーレに成る様に播種した。2日ごとに培地更新しながら細胞数をカウントし増殖曲線を描いてその曲線が定常状態に達した時点の細胞数をもって細胞飽和密度を算出した。

(5)旋回培養実験(Rotation culture)の検討:[A]

~[F]の処理で得られた細胞をシリコンでコートされたマイヤーフラスコに細胞数30万ヶ/フラスコとなるように播種し48時間、旋回培養をおこなった。24時間目と48時間目に位相差顕微鏡にてかたまり (Aggregates) を写真撮影し形態

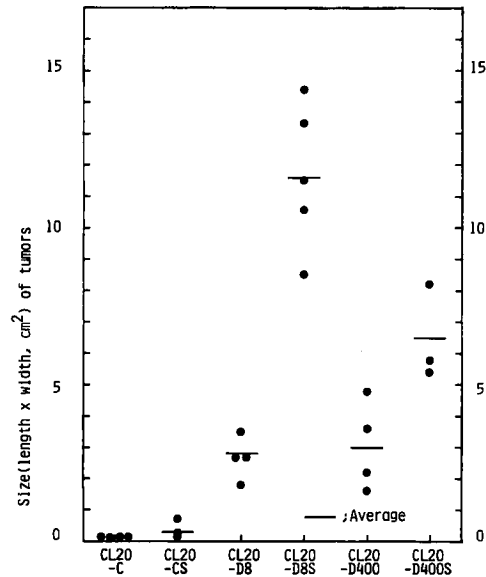


Fig. 2 The size of tumors produced in rats at 60 days after back-transplantation of CL20 cells treated with and without 3'-Me-DAB in the presence or absence of S 15 mixture.

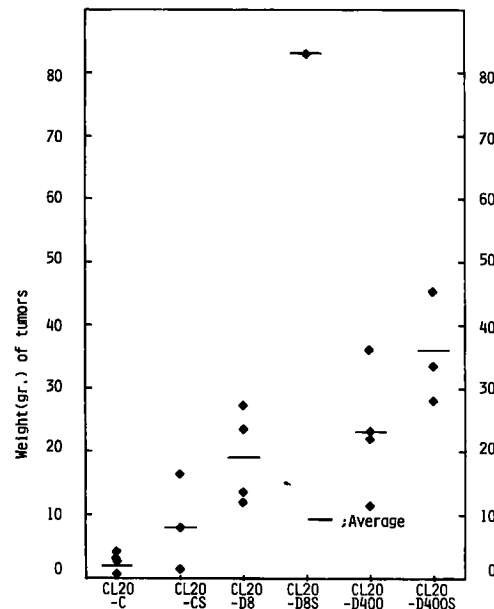


Fig. 3 The weight of tumors produced in rats at 90 days after back-transplantation of CL 20 cells treated with and without 3'-Me-DAB in the presence or absence of S 15 mixture.

Table 2 The plating efficiency in liquid medium of CL 20 cells treated with and without 3'-Me-DAB in the presence or absence of S 15 mixture

Cells	No. of colonies per dish*	Mean $\pm$ SD	Plating efficiency (%)	Relative plating efficiency(%)
CL20-C	92,107,97	98.7 $\pm$ 7.64	49.3	100
CL20-CS	87,102,112	100.0 $\pm$ 12.6	50.2	102
CL20-D8	75,77,73	75.0 $\pm$ 2.0	37.5	76
CL20-D8S	179,167,156	167.3 $\pm$ 11.5	83.7	170
CL20-D400	190,180,189	186.3 $\pm$ 5.51	93.2	189
CL20-D400S	185,196,195	192.0 $\pm$ 6.08	96.0	195

*200 cells were inoculated

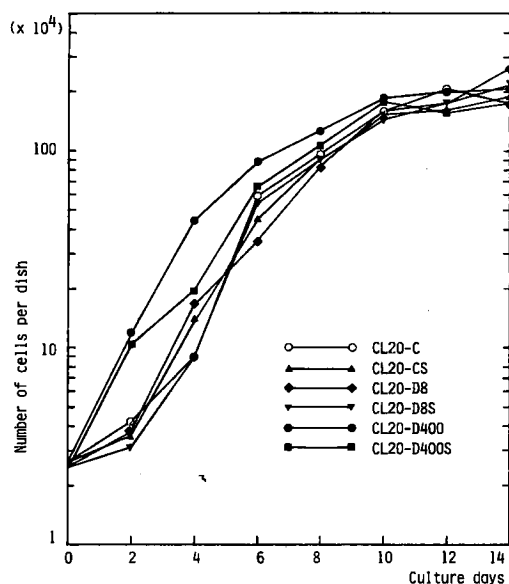


Fig. 4 The growth curves of CL 20 cells treated with and without 3'-Me-DAB in the presence or absence of S 15 mixture.

の観察と大きさの測定をおこなうと同時に組織学的検索をおこなった。

(6)発癌剤に対する細胞の抵抗性 (Susceptibility of cells to the carcinogen) の検討: [A]~[F]の薬剤処理で得られた細胞を2.5万ヶ/35mmシャーレとなるように播種し、48時間培養した後、下記の薬剤で5時間処理し、処理後 MEM+20% BS で置換して4日目における細胞数をカウントした。

薬剤 ① DMSO (1%)

薬剤 ② DMSO (1%)+3'-Me-DAB (8 μ g/

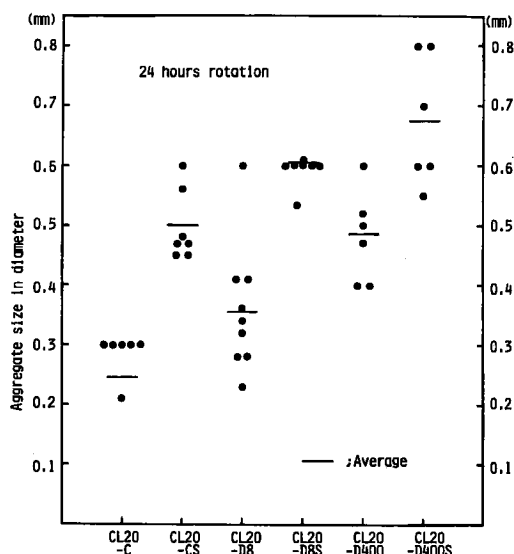


Fig. 5 The size distribution of aggregates in rotation culture.

ml)

薬剤 ③ DMSO (1%)+3'-Me-DAB (8 μ g/ml)+S 15 mixture

薬剤 ④ DMSO (1%)+3'-Me-DAB(400 μ g/ml)

薬剤 ⑤ DMSO (1%)+3'-Me-DAB(400 μ g/ml)+S 15 mixture

実験成績

(1)動物復元実験 (Back-transplantation) の検
(i)腫瘍の大きさに関する検討 (Table 1 & Fig. 2)

大きさについては生後24時間以内の新生児ラ

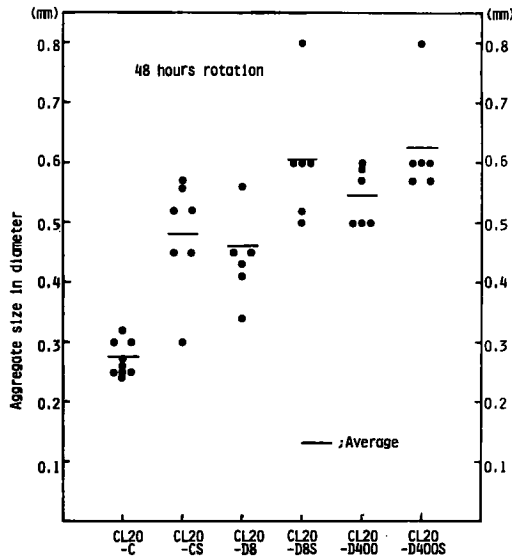


Fig. 6 The size distribution of aggregates in rotation culture.

ットに細胞播種後90日間観察した。本論文においては60日目の腫瘍の大きさを比較したがこの理由は90日目の時点においては動物が一部において腫瘍の為、死亡しており一律に測定できないことによる。結果は処理〔A〕ならびに処理〔B〕の対照群にくらべ3'-Me-DABを添加している、処理〔C〕ならびに処理〔E〕の方が、又これに更にS15 mixtureを添加した処理〔D〕ならびに処理〔F〕の方がラットに形成した腫瘍の大きさは大であった。この時、3'-Me-DABの濃度の効果に関しては、むしろ3'-Me-DABの低濃度処理+S15 mixtureの方が3'-Me-DABの高濃度処理+S15 mixtureよりも大きな腫瘍を形成した。この点に関しては将来検討の余地がある。

(ii) 腫瘍の重さに関する検討 (Table 1 & Fig. 3.)

これについては生後24時間以内の新生児ラットに細胞播種後、90日目に屠殺しラットに形成された腫瘍をとり出し重量を測定した。腫瘍重量に関する結果は前の腫瘍の大きさの結果とほぼ同じ傾向を示した。即ち対照群（処理〔A〕ならびに処理〔B〕）にくらべ3'-Me-DABを添加した方（処理〔C〕ならびに処理〔E〕）が腫瘍重量は大であった。またこれに更にS15 mixtureを添加した場合（処理〔D〕ならびに処理

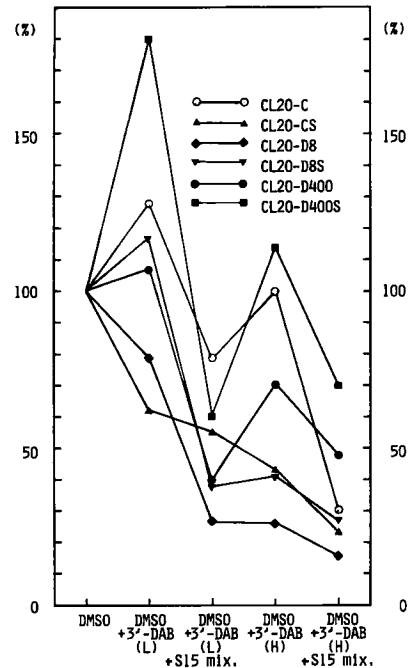


Fig. 7 The susceptibility of cells to the carcinogen. 3'-DAB (L), 3'-Me-DAB (8- μ g/ml); 3'-DAB (H), 3'-Me-DAB (400 μ g/ml)

〔F〕はこの傾向は更に著明であった。又この時60日目における腫瘍の大きさに関する検討の結果と同様、3'-Me-DABの低濃度処理+S15 mixtureの方が3'-Me-DABの高濃度処理+S15 mixtureよりも重い腫瘍を形成したがこれに関しても今後検討の余地がある。

(2) PCM (位相差顕微鏡写真)の検討: Fig. 1の実験方式に従って実験開始後94日目（最終継代後3日目）に写真撮影したものについて検討した。

〔A〕(コントロール, DMSO) 処理細胞は以下のものにくらべコロニー辺縁は比較的平滑で細胞は比較的そろっており多核細胞等も少ない(写真1, 2)。

〔B〕(DMSO + S15 mixture) 処理細胞は上記のものとあまり変わらない。(写真3, 4)。

〔C〕(DMSO + 低濃度 3'-Me-DAB) 処理細胞では中心部にやや多く、辺縁部にやや少なく巨細胞の出現がみられる。(写真5, 6)。

〔D〕(DMSO + 低濃度 3'-Me-DAB + S15 mixture) 処理細胞ではコロニー構成細胞の大小不同がみられ細胞質には神経突起様構造物が多見される。コロニー中心部には核分裂像と多核巨

細胞がみられる。細胞の大小不同及び異型性がかなり著しく Piling-up もみい出される。又遊離したような細胞もみられる。(写真7, 8)。

[E](DMSO + 高濃度 3'-Me-DAB) 処理細胞はコロニー辺縁部の大小不同が著しく細胞質において神経突起様構造物が見られる。コロニー中心部は処理細胞と同様、核分裂像と多核巨細胞が見い出される。又、細胞質の大小不同も著しい。(写真9, 10)。

[F](DMSO + 高濃度 3'-Me-DAB + S 15 mixture) 処理細胞はコロニー辺縁部には核分裂像が見られ神経突起様の細胞質をもつ細胞が多く、コロニー中心部には核分裂像と多核巨細胞がみい出される。Piling-up も多見され細胞質内顆粒も豊富である。(写真11, 12)。

結果として一般的に認められる現象は3'-Me-DAB 添加量の多いものでは異型性や大小不同の現象がみられ 3'-Me-DAB + S 15 mixture 添加群では更に遊離性及び Piling-up 現象が累加的にみとめられた。

(3)コロニー形成率(Plating-efficiency)の検討 (Table 2): 対照群の細胞にくらべ高濃度の3'-Me-DAB を添加した細胞、ならびに高濃度の3'-Me-DAB + S 15 mixture を添加した細胞においてコロニー形成率の増大がみられた。

(4)細胞飽和密度(Saturation density)の検討 (Fig. 4): 処理 [A]~[F]の細胞のすべてを検討してみたが薬剤処理の相違にもとづく細胞飽和密度の変化はあまり見られなかった。因みに継代初期の立ち上りで見える限り 3'-Me-DAB 高濃度添加の2例は他のものにくらべてよかった。

(5)旋回培養実験 (Rotation culture) について (Fig. 5, 6) & 写真 13, 14, 15, 16。

旋回培養によって形成された細胞の Aggregates の大きさを測定した結果、対照群の細胞の Aggregates の大きさに比べ 3'-Me-DAB を処理した細胞の Aggregates の大きさの方が大であった。この傾向は S 15 mixture を同時に添加したものの方が更に 3'-Me-DAB の濃度の高いものの方がより著明であった。しかしながら S 15 mixture の添加によって Aggregates の大きさはかなり強く影響を受けている。この点は今後の検討が必要であろう。一方、旋回培養開

始後、24時間目と48時間目の Aggregates の大きさの比較では大きな差はみられなかった。

(6)発癌剤に対する細胞の抵抗性(Susceptibility of cells to the carcinogen)の検討: この結果は Fig. 7 に示す通りである。すなわち高濃度3'-Me-DAB 処理細胞 (CL 20-D 400)ならびに高濃度 3'-Me-DAB + S 15 mixture 処理細胞 (CL20-D400S) などのものにおいては一部、高濃度 3'-Me-DAB + S 15 mixture のみにやや抵抗性がみられたが一般的にはコントロールに比して抵抗性の減弱がみられた。このことは使用した CL 20 (dRLa-74 由来である。)がすでに高い3'-Me-DAB に対する抵抗性をもつことに起因するのかもしれない。

考 案

動物復元実験で見える限り腫瘍の大きさならびに重さ、即ち動物体内での増殖速度は CL 20-D8S が最も高く、次いで CL 20-D 400S である。従って 3'-Me-DAB 及び S 15 mixture の添加によって腫瘍性の一部(転移等に関しては第2編にのせる。)に増強が見られることは明らかである。しかしながら 3'-Me-DAB の濃度の効果については今後更に検討の余地があると考ええる。

一般に本実験においては in vitro において比較的安定な悪性度増強の指標として考えられている実験系を用い、それが発癌剤又は、発癌剤 + S 15 mixture を導入することによってどのように悪性度が増強するかも検討した。その結果、旋回培養実験や位相差顕鏡を用いた形態学的観察、コロニー形成率は 3'-Me-DAB ならびに S 15 mixture の効果が、発癌剤の濃度に関する吟味は後であるが、認められた。しかし細胞増殖曲線や発癌剤に対する細胞の抵抗性等に関しては一部分を除いて 3'-Me-DAB および S 15 mixture の効果は著明ではなかった。従来、培養上の反応としては、形態学的変化・旋回培養実験・Plating efficiency・細胞増殖速度・発癌剤に対する細胞の抵抗性・軟寒天内でのコロニー形成能など、種々のものがあるが、これらは使用する細胞・各種実験条件等によって動物復元性と相関 (Parallel)するものもあるが、そうでないものもある。

また、考えられる悪性度の増強を示す他の指標、例えば動物復元実験によって形成された腫瘍の病理組織学的検索、更にその腫瘍の他臓器への転移形成の有無、好発転移部位（転移の部位によっては特に *in vivo* の場合、生存期間の長短に大きな差がある。）などについても、更に検討を要すると思われる。又悪性度の増強を検索する上においてそれらの腫瘍の α -fetoprotein あるいは CEA (carcino embryonic antigen) の産生の程度を知る事も重要かもしれない。

一方、Carl Barrett らは悪性度の増強の *In vitro* での指標として、線維芽細胞を用い①軟寒天における細胞のコロニー形成能②液体培地中でのコロニー形成率③細胞の成長に必要な血清要求性の減少④細胞間アクチンの減少⑤培養細胞線維素溶解能の増強⑥細胞飽和密度⑦形態学的変化などをあげており、培養細胞の悪性度が増強するごとにこれらの指標が相関的に増強することを示している。上記実験において使用した細胞は線維芽細胞であり我々の使用した上皮系細胞とは異なっている。又、この論文では細胞の stage を normal stage, preneoplastic stage, neoplastic stage に分けて考察しているが我々の論文では、benign neoplastic stage から malignant neoplastic stage への腫瘍原性というものを考察している点で相異点があるものの、しかし細胞の悪性度の stage を種々の実験パラメーターを使って 1 ヶ 1 ヶ 吟味している点で我々の論文と共通点があり今後の実験方向を suggestion するという意味で参考となろう。

我々の実験系においては S 15 mixture によって 3'-Me-DAB が代謝され悪性度の増強が誘導されたわけであるがこのことについては、S 15 mixture によって 3'-Me-DAB が具体的にどういう方向に代謝されたのか、つまり 3'-Me-DAB は S 15 mixture によって ④ Ultimate type の carcinogen の方向に代謝された。⑤ Ultimate type の carcinogen までに進まないにしてもそれに近い状態にまで代謝された。⑥ 全く別の方向の解毒の方向へ代謝された。⑦ あるいは予想できない未知の方向へ代謝された。など種々の点について考えなければならない。又、この代謝物自体の培養中における物理的・化学的・生

物学的安定性ということも S 15 mixture を添加した 3'-Me-DAB の培養細胞への効果を考える上で重要である。

又、一部の例において高濃度の 3'-Me-DAB + S 15 mixture 処理細胞の悪性度の値よりも低濃度の 3'-Me-DAB + S 15 mixture 処理細胞の悪性度の値の方が高い値を示す場合があった。この理由は明らかではないが、高濃度の 3'-Me-DAB が、溶解度という点において実際の培養液中で、その過飽和の状態であった為に、3'-Me-DAB の効果に逆の作用があらわれたのかもしれない。又、3'-Me-DAB が培養液中で高濃度の場合には殺細胞的に作用したという可能性もありうる。又、抗原性の異種性の発生のために動物体内での増殖が難しくなったとも考えられ、今後の検討を要すると考える。

結 語

ラットに 191 日間、DAB 飼育をおこない、肝に生じた腫瘍結節部を体外に取り出し、培養系に移し細胞株 dRLa-74 を得た。この細胞を更に単個培養し細胞集団を均一化させた。これが今回実験に使った細胞 CL 20 である。この細胞はすでに癌細胞ではあるが腫瘍性は弱く、かつ培養内では比較的安定な形質を保持するという特長を持つ。この細胞に発癌剤 3'-Me-DAB と S 15 mixture (薬物代謝酵素を含む肝臓マイクロゾーム分画) を作用させ、*in vivo* ならびに *in vitro* における細胞悪性度の増強を検索し、もってアミノアゾ色素による癌化機構の解明をこころみた。

in vivo の実験に関して、コントロールならびに処理細胞の動物復元によって形成された腫瘍の大きさ、重さ、すなわち動物体内での増殖速度に関しては 3'-Me-DAB と S 15 mixture の効果がみられた。すなわち、これらの薬剤処理により腫瘍性の一部に増強がみられた。*in vitro* の実験に関して、旋回培養実験や位相差顕微鏡を用いた形態学的観察、コロニー形成率の実験では上記薬剤の効果がみられた。しかし細胞増殖曲線や発癌剤に対する細胞の抵抗性等に関しては上記薬剤の効果は一部分を除いて著明ではなかった。これに関して、今日迄の多くの論文

からも明らかなように、培養上の反応としては、形態学的変化・旋回培養実験・軟寒天内でのコロニー形成能など、種々のものがあるがこれらは使用する細胞・各種実験条件等によって動物復元性と相関するものもあるが、そうでないものもある。

又、3'-Me-DAB の濃度の効果、および S 15 mixture の代謝等に関しては、更に詳細な検討

の余地がある。

尚本論文の要旨は第40回日本癌学会総会（札幌）において発表した。

稿を終るにあたり本研究の御指導・御校閲を賜った佐藤二郎教授に謹んで感謝の意を表します。又、直接御指導を受けた常盤孝義講師には心から感謝の意を表します。

文 献

1. 白石昌之：単個培養された2倍体性肝細胞の3'-Me-DABによる試験管内癌化。岡医誌，91，407—414，1979.
2. 星加輝毅：アゾ色素短期飼育ラット肝から培養された5細胞株の性状について。岡医誌，90，1377—1391，1978.
3. Katsuta, H. and Takaoka, T.: Cytobiological transformation of normal rat liver cells by treatment with 4-dimethyl aminoazobenzene after NAGISA culture. In *Cancer Cells in Culture*, ed. H. Katsuta, Tokyo, Univ. Tokyo press, pp. 321—334, 1968.
4. Katsuta, H. and Takaoka, T.: Carcinogenesis in tissue culture II. Proliferation-inducing effect of 4-dimethyl aminoazobenzene on normal rat liver cells in culture. *Jpn. J. Exp. Med.* 35, 209—230, 1965.
5. Katsuta, H. and Takaoka, T.: Carcinogenesis in tissue culture III. Effect of the second treatment on DAB-induced proliferating liver cells of normal rats in culture. *Jpn. J. Exp. Med.* 35, 231—248, 1965.
6. Sato, J.: Carcinogenesis in tissue culture IV. Proliferation inducing effect on DAB and 3'-Me-DAB on liver cells from normal Donryu rats in culture. *Jpn. J. Exp. Med.* 35, 433—444, 1965.
7. Sato, J. and Yabe, T.: Carcinogenesis in tissue culture V. Effects of long-term addition of 4-dimethyl aminoazobenzene and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene on liver cells in culture. *Jpn. J. Exp. Med.* 35, 445—462, 1965.
8. Sato, J. and Yabe, T.: Carcinogenesis in tissue culture VI. Tissue culture of liver cells from DAB-feeding rats. *Jpn. J. Exp. Med.* 35, 491—511, 1965.
9. Sato, J.: Malignant transformation in culture of rat liver cells treated with and without 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. In *Cancer Cell in Culture*, ed. H. Katsuta, Tokyo, Univ. Tokyo press, pp. 335—350, 1968.
10. Miyahara, Y., Namba, M. and Sato, J.: Carcinogenesis in tissue culture 22. Malignant transformation of cloned rat liver cells treated in culture with 4-dimethyl aminoazobenzene and properties of the transformed cells. *Acta Med. Okayama* 28, 99—109, 1974.
11. Tokiwa, T., Nishi, M. and Sato, J.: Effects of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene and 4-aminoazobenzene on plating efficiency, mitotic index, and macromolecular synthesis of cultured liver cells. *Acta Med. Okayama* 30, 303—309, 1976.
12. Tokiwa, T. and Sato, J.: Effect of long term administration of 4-dimethylaminoazobenzene on liver cell line derived from rat fed this chemical. *Gann* 67, 879—883, 1976.
13. Tokiwa, T., Nishiyama, S., Yoshimoto, J. and Sato, J.: Cytological alteration of cultured rat liver cells by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene with special reference to chromosome changes, changes of

- growth patterns at a colony level and α -fetoprotein production. *Acta Med. Okayama* **34**, 161—168, 1980.
14. Williams, G.M.: The use of liver epithelial cultures for the study of chemical carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* **95**, 739—753, 1976.
 15. Barrett, J.C.: A preneoplastic stage in the spontaneous neoplastic transformation of Syrian hamster embryo cells in culture. *Cancer Res.* **40**, 91—94, 1980.
 16. Barrett, J.C., Crawford, B.D., Mister, L.O., Schechtman, L.M., Paul, O.P., Ts'o, and Pollack, L.: Correlation of *in vitro* growth properties and tumorigenicity of Syrian hamster cell lines. *Cancer Res.* **39**, 1540—1560, 1979.
 17. Barrett, J.C. and Ts'o, P.O.P.: Evidence for the progressive nature of neoplastic transformation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3761—3765, 1978.
 18. Barrett, J.C., Crawford, B.D., Grady, D.L., Hester, L.D., Jones, P.A., Benedict, W.F., and Ts'o, P.O.P.: Temporal acquisition of enhanced fibrinolytic activity by Syrian hamster embryo cells following treatment with Benzo (a) pyrene. *Cancer Res.* **37**, 3815—3823, 1977.
 19. Umeda, M. and Saito, M.: Mutagenicity of dimethylnitrosamine to mammalian cells as determined by the use of mouse liver microsomes. *Mut. Res.* **30**, 249—254, 1975.
 20. Nishi, Y. and Inui, N.: Detection of mutagens required for metabolic activation in tissue culture. *Tissue Culture* **5**, 148—161, 1979. (in Japanese).
 21. Krahn, D.F. and Heidelberger, C.: Liver homogenate-mediated mutagenesis in Chinese hamster V 79 cells by polycyclic aromatic hydrocarbons and aflatoxins. *Mut. Res.* **46**, 27—44, 1977.
 22. Kuroki, T., Drevon, C. and Montesano, R.: Microsome mediated mutagenesis in V 79 Chinese hamster cells by various nitrosamines. *Cancer Res.* **37**, 1044—1050, 1977.
 23. Krahn, D.F., and Heidelberger, C.: Microsome mediated mutagenesis in Chinese hamster cells by chemical onchogens. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **16**, 74, 1975.
 24. Huberman, E., and Sacks, L.: Cell-mediated mutagenesis of mammalian cells with chemical carcinogens. *Int. J. Cancer* **13**, 326—333, 1974.
 25. Arcos, J.C., Bryant, G.M., Venkatesan, N., and Argus, M.F.: Repression of dimethylnitrosamine-demethylase by typical inducers of microsomal mixed-function oxidases. *Biochem. Pharmacol.* **24**, 1544—1547, 1975.
 26. Chu, E.H.Y., and Mallin, M.V.: Mammalian cell genetics II. Chemical induction of special locus mutations in Chinese hamster cells *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **61**, 1306—1312, 1968.
 27. Kato, R., Shoji, H., and Tanaka, A.: Metabolism of carcinogenic compounds. I. Effect of phenobarbital and methylcholanthrene on the activities of N-demethylation of carcinogenic compounds by liver microsomes of male and female rats. *Gann* **58**, 467—469, 1967.
 28. Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y.: Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. *Cancer Lett.* **1**, 91—96, 1975.
 29. Mondal, S., Brankow, P.W. and Heidelberger, C.: Two-stage chemical oncogenesis in cultures of C3H/10 T1/2 cells. *Cancer Res.* **36**, 2254—2260, 1976.

写 真 説 明

写真はすべて位相差顕微鏡写真を示す。

写真1, 2: CL 20-C 細胞。コロニー辺縁は比較的平滑で細胞は比較的そろっている。コントロール。(×200)

写真3, 4: CL 20-CS 細胞。これは上記のものとあまり変わらない。(×200)

写真5, 6: CL 20-D 8 細胞。巨細胞が中心部にやや多く辺縁部にやや少なくみられる。(×200)

写真7, 8: CL 20-D 8S 細胞。核分裂像が多数みられ細胞の大小不同が著しい。Piling-up の像もみられる。
(×200)

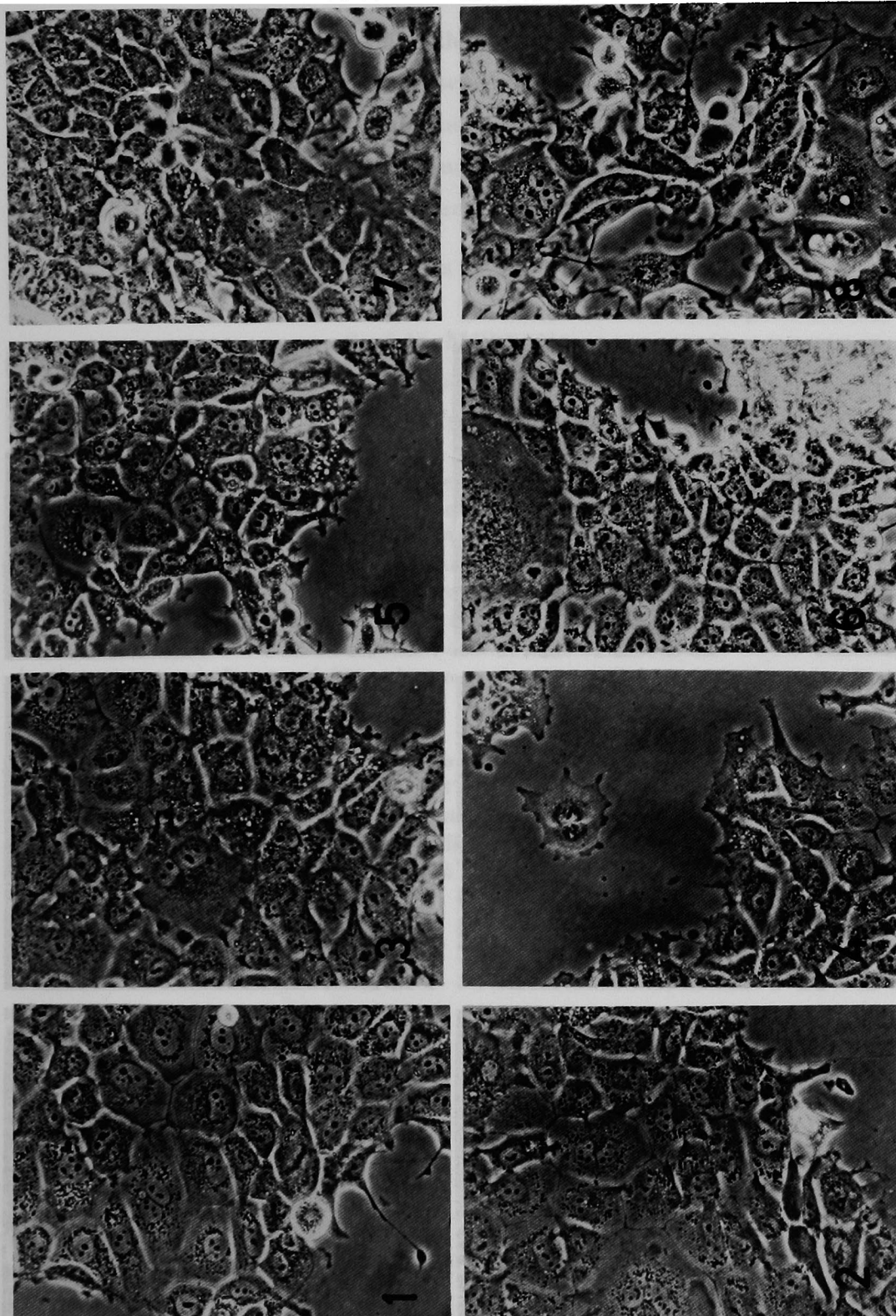
写真9, 10: CL 20-D 400細胞。多核巨細胞と核分裂像をみることができる。(×200)

写真11, 12: CL 20-D 400S 細胞。多核巨細胞がみられ核分裂像も多見される。細胞の大小不同が著明でPiling-up もみられる。(×200)

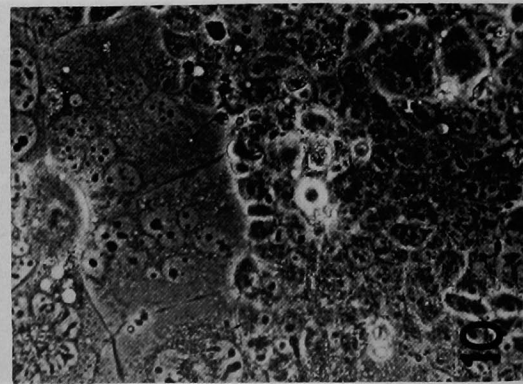
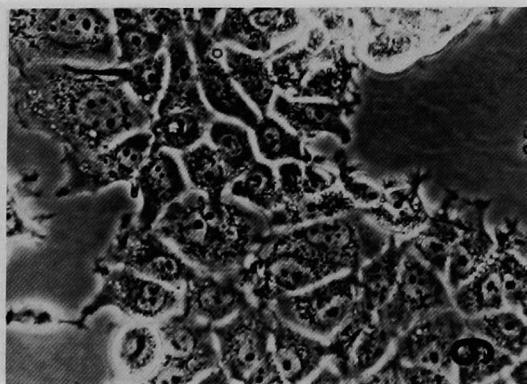
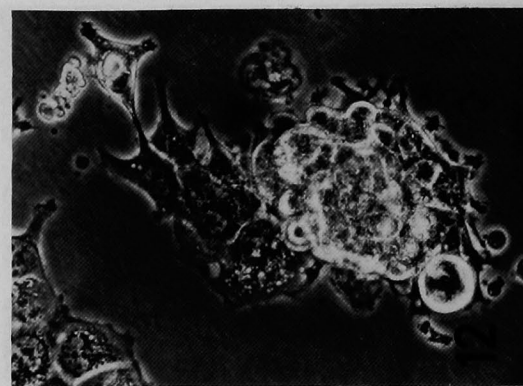
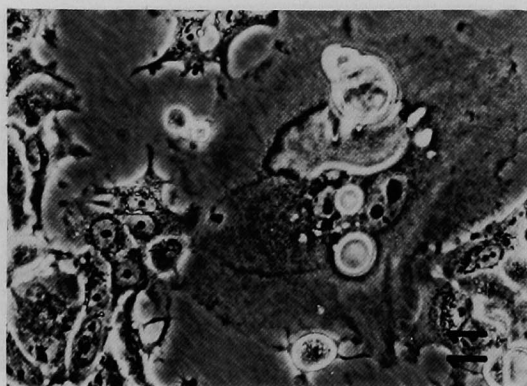
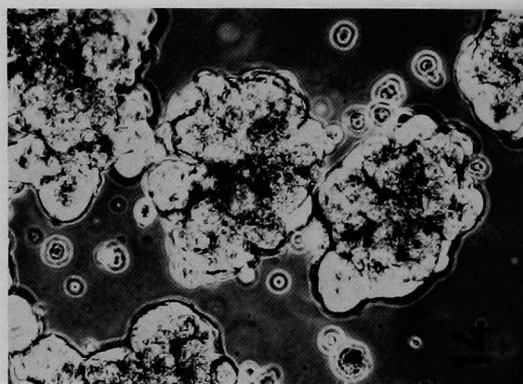
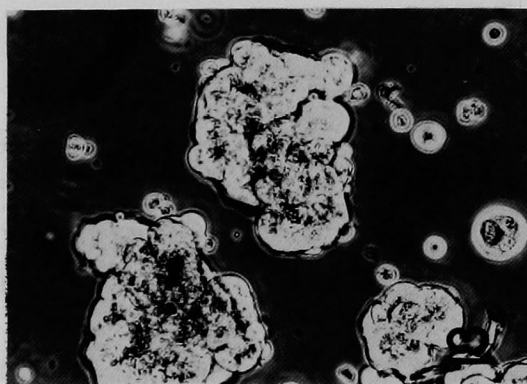
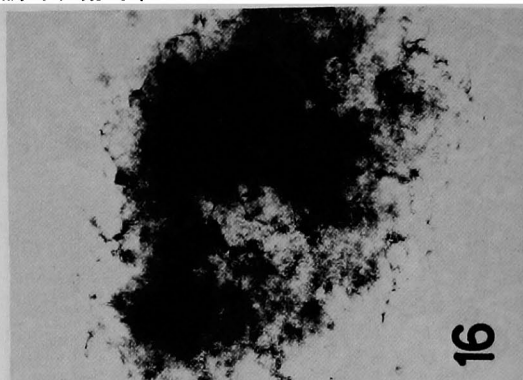
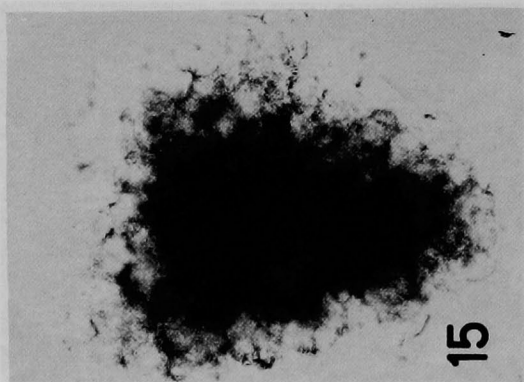
写真13, 14: CL 20-C 細胞の細胞塊の像。コントロール。(×100)

写真15, 16: CL 20-D 400S 細胞の細胞塊の像。CL 20-C 細胞の細胞塊にくらべCL 20-D 400S 細胞の旋回培養によって形成された細胞塊はかなり大きい。又、後者のそれはもりあがっている像を呈する。
(×100)

西山正一論文附図



西山正一論文附圖



**The effect of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-Me-DAB)
in the presence or absence of liver microsomes
(S15 mixture) on cloned liver cell line derived
from a rat fed 4-dimethylaminoazobenzene
Part 1**

Some biological properties of 3'-Me-DAB treated cells.

Syoichi NISHIYAMA

Division of Pathology, Cancer Institute Okayama University Medical School

(Director: Prof. J. Sato)

A cloned strain, CL20, which was derived from the liver of rats fed 4-dimethylaminoazobenzene had low tumor-producing capacity, but had high tumor producing capacity after treatment of the cells with 3'-Me-DAB in the presence or absence of S15 mixture. The size of tumors produced at 60 days after back-transplantation of the cells treated with 3'-Me-DAB in the presence or absence of S15 mixture was larger than that of the non-treated control cells. Similar results were obtained for the weight of tumors produced at 90 days after back-transplantation. Treatment of the cells with 3'-Me-DAB in the presence or absence of S15 mixture produced morphological changes of cells in vitro.

The plating efficiency and the size of aggregates formed by rotation culture were higher in treated cells than in control cells. A few differences in growth patterns and in the resistances to the toxic effects of 3'-Me-DAB in the presence or absence of S15 mixture were found between treated and control cells.

These findings suggested that cell malignancy was promoted by the treatment of 3'-Me-DAB in the presence or absence of S15 mixture.