

ヒト正常腎に由来する培養上皮様細胞の性質について

大阪大学医学部泌尿器科学教室（主任：園田孝夫教授）

松田 稔・長船 匡男・石橋 道男

中野 悦次・高羽 津・園田 孝夫

大阪大学医学部第3内科学教室（主任：山村雄一教授）

波田 寿一・渡辺信一郎・東野 一彌

大阪大学医学部第2内科学教室（主任：垂井清一郎教授）

平 岡 諒

大阪大学医学部老人科学教室（主任：熊原雄一教授）

森 本 茂 人

CHARACTERIZATION OF EPITHELIAL MONOLAYER CELLS
DERIVED FROM HUMAN NORMAL RENAL CORTEX TISSUE

Minoru MATSUDA, Masao OSAFUNE, Michio ISHIBASHI,

Etsuji NAKANO, Minato TAKAHA and Takao SONODA

*From the Department of Urology, Osaka University Hospital**(Chief: Prof. T. Sonoda)*

Toshikazu HADA, Shinichiro WATANABA and Kazuya HIGASHINO

*From the Third Department of Medicine, Osaka University Hospital**(Chief: Prof. Y. Yamamura)*

Akira HIRAOKA

*From the Second Department of Medicine, Osaka University Hospital**(Chief: Prof. S. Tarui)*

Shigeto MORIMOTO

*From the Department of Geriatrics, Osaka University Hospital**(Chief: Prof. Y. Kumahara)*

Nornal human renal cortex surgically obtained from eight patients were dispersed by trypsin and cultured *in vitro* using Eagle's minimum essential medium supplemented with antibiotics and heat inactivated fetal calf serum (20%) under humidified air with 5% CO₂ at 37°C. The results of these procedures and morphological or biochemical characterization of propagated cells were summarized as followings:

1. Monolayer sheets mainly composed with epithelial cells were successfully obtained from all of 8 cases, and the cells grew rapidly for about 7 weeks. Under the light microscopy, the monolayer cells showed marked morphological heterogeneity. In the course of maintenance, transformation of the cellular appearance was recognized, which included the swelling of cells, development of vacuoles or granules in the cytoplasm and loosed intercellular junction. Electron microscopic observation on the cells in the 3rd generations revealed cells with surface structures resembling

microvilli, or desmosome-like structure between neighboring cells.

2. Population doubling time was estimated about 46 hours with the cells in the 3rd weeks and about 90 hours at the 6th week of cultivation.
3. Alkaline phosphatase activity, which was detected highly in normal renal proximal tubular cells, was markedly decreased in cultivated renal cells and only detectable in multilayered fibroblastic cells histochemically.
4. The activity of γ -glutamyl transpeptidase in cultured cells was also decreased to a fifth in comparison with that of the normal kidney cortex. The electrophoretic mobility of this enzyme was different from that of normal renal tissues, but not the same with that of a novel isozyme detected in renal cell carcinoma tissues.
5. Lactate dehydrogenase activity was preserved in monolayer cells, but the isozyme pattern showed predominance of LDH-4 and LDH-5, which was a completely inverted pattern of normal kidney enzyme.
6. After the treatment with 10 ng/ml parathyroid hormone, the intracellular cyclic AMP level of cultivated cells was increased 33 folds within 2 minutes. This finding strongly suggested that the monolayers included cells derived from proximal tubular cells, and also implied the preservation of differentiated biochemical function in the cultivated cells.
7. The detection of a estrogen binding protein in cultivated cells was unsuccessful, which might indicate a disappearance of a biochemical character in normal renal tissues.

With brief review of literatures concerning the cultivation of renal cells derived from human or experimental animals, the significance of the morphological and biochemical transformation noted in cultivated cells was discussed, and it was emphasised that the biological process of this transformation did not mean a simple "fetalism" nor "dedifferentiation", but a rather complicated phenomenon.

は じ め に

近年、正常臓器あるいは悪性腫瘍の細胞の生物学的、生化学的性質を研究するために組織培養が導入され、一応の発展と成果をみせている。しかしながら周知のごとく、培養細胞を利用した研究において最も危惧を抱く点は、*in vitro* でみられる細胞の性質と、*in vivo* に存在し、組織を構築している細胞の性質とがどの程度にまで一致するものであろうかという疑問であろう。著者の教室ではすでにヒト腎細胞癌由来の OUR-10 cell line を樹立し²⁰⁾、これを用い、現在この腫瘍の生物学的性質を多方面より検討しているが、上に述べた危惧はいつも払拭しきれないままに残されていた。そこで、このような細胞培養を用いた癌細胞の研究の対照として、ヒト正常腎細胞が *in vitro* でどのような性質を示すものか明確とし、これを比較対比することから、培養腎癌細胞の特異的な性質を明らかにすることができるのではないかと考え、最近数例のヒト正常腎よりえた細胞の単層培養を試みてきた。本稿では、このヒト正常腎に由来する培養細胞の形態学的、生化学的性質につき報告する。

材料および方法

1. 培養に供した正常腎組織

Table 1 に培養に供した腎組織の由来をまとめて示した。男子 4 例、女子 4 例、年齢 42~64 歳であり、原疾患は腎血管性高血圧症 3 例、腎結石 3 例、腎腫瘍での明らかな正常部分 2 例である。

Table 1. Origin of the cultured normal kidney cells.

Case No.	Age	Sex	Renal lesion
1	27	f	renovascular hypertension (R)
2	46	m	renal tumor (R)
3	64	m	renovascular hypertension (L)
4	52	m	renal stone (L)
5	53	m	renovascular hypertension (L)
6	47	m	renal tumor (R)
7	58	f	renal stone (L)
8	24	f	renal stone (L)

2. 培養方法

線維被膜を除去した腎皮質組織を径約 3 mm 大に細切し、これを Ca^{++} , Mg^{++} を含まない、Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS (-)), または Hank's

balanced salt solution にて洗滌し、できるだけ血球成分を除去する。この組織片を約 10 ml の 0.25% trypsin in PBS (－) を容れた エレンマイヤーフラスコに移し magnetic stirrer にて室温で約 30 分間攪拌し、分散細胞浮遊液を採取する。残った組織片に対しこの trypsin 処理を数回くり返すと、腎皮質組織はほぼ完全に分散できる。細胞浮遊液を 1,500 rpm, 5 分の遠沈にて分離し pellet となった細胞を PBS (－) にて数回洗滌、最終的に Eagle's minimum essential medium (MEM) (penicillin 100 u/ml, streptomycin 100 µg/ml および非動化ウシ胎児血清 (FCS) 20% を添加) に細胞数を約 1×10^7 /ml に浮遊せしめ、ガラス培養瓶 (TD40, 池本理工工業) または petri dish (Falcon 3003) に約 10 ml を分注し、5% 炭酸ガス存在下 37°C にて静置培養をおこなった。継代培養は底面に付着した細胞を 0.25% trypsin in PBS (－) にて剝離せしめ、軽く pipetting をおこない分散後、細胞を遠心分離し培養液に浮遊せしめて 2 つの培養器にほぼ等量に分割継代した。

3. 光顕の観察

培養細胞はそのまま倒立 (位相差) 顕微鏡にて観察、あるいはスライドグラス上に増殖せしめフォルマリン固定後 Giemsa または hematoxylin-eosin にて染色し観察した。

4. 電顕の観察

培養器底面に付着した細胞層を 7.3% sucrose を含む 50 mM cacodylate buffer, pH 7.2 で数回洗滌後、2% glutaraldehyde (in 50 mM cacodylate buffer, pH 7.2) にて 4°C, 約 60 分間固定。rubber policeman にて細胞層を剝離したのち 2,000 rpm, 15 分の遠沈をおこない、得られた cell pellet を細切する。これを 1% 四塩化オスミウム (in 50 mM barbital buffer pH 7.2) にて 4°C, 約 60 分間固定、エタノール系列にて脱水後 Epon 包埋し薄切、クエン酸鉛、酢酸ウランにて後染色し観察した。

5. 細胞増殖速度

培養液に 5×10^4 個/ml に調整した細胞浮遊液を 2.5 cm petri dish (Falcon 3001) に 2 ml ずつ分注し培養開始。培養液交換は隔日に施行、triplicate にて 24 時間毎に底面に付着している細胞を 0.25% trypsin in PBS (－) にて剝離し細胞数をかぞえ、片対数グラフにプロットし、対数増殖期にある細胞の倍加時間を測定した。

6. 酵素化学的検討

6-1. alkaline phosphatase (Alp)

正常腎組織および培養細胞より Morton の方法³²⁾により酵素を抽出、すでに詳述した方法²⁸⁾により精製し、また酵素活性の測定をおこなった。

6-2. γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP)

正常腎組織および培養細胞より bromelain 処理にて酵素を抽出、活性測定をおこない、またポリアクリルアミドディスク電気泳動によりアイソザイムの性質を検討した。これら方法の詳細はすでに述べたとおりである¹⁵⁾。

6-3. lactate dehydrogenase (LDH)

正常腎組織および培養細胞を 1 mM EDTA, 1 mM thioglycerol を含む 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 とともに homogenize し、4°C にて 1×10^4 rpm, 30 分の遠沈をおこない上清を得た。酵素活性測定は Cabaud and Wroblewski の方法による LDH-B test kit® (和光純薬工業) を使用しおこない、またアイソザイムは 0.8% は寒天ゲルを用いた LDH-Isozyme test kit® (和光純薬工業) にて分離し、島津 CS-210 クロマトスキャナーにて 550 nm で densitometry をおこない LDH-1~LDH-5 のおのおのの活性を分離測定した。

7. 酵素組織化学的検討

シャーレ、またはスライドグラス上に付着増殖した細胞を氷冷中性緩衝フォルマリンにて固定し、Alp は Burstone 法⁴⁾により、 γ -GTP は Rutenberg et al.³⁷⁾ による方法を多少改変しておこない、また LDH は 森の方法³¹⁾ を多少改変して染色し、光顕的に観察した。

8. parathyroid hormone (PTH) に対する反応性

当院第 4 内科大西博士より提供された PTH (c 末端 1-34 peptide, Daiichi Chemicals) を使用し以下の測定をおこなった。full sheet の状態にある細胞層を 5 mM theophyllin, 1 mg/ml bovine serum albumin を含む MEM とともに 10 分間培養したのち PTH (最終濃度 10 ng/ml) を添加、2 分後に培養液をのぞき、氷冷無水エタノールを加えて 24 時間のアルコール抽出をおこない、1,500 rpm, 15 分遠沈、上清を減圧乾固したのち適量の水に溶解し、これに含まれる cyclic AMP を RIA にて測定した。遠心沈渣には 5% トリクロル酢酸を加えて加温し上清の DNA をジフェニルアミン法により測定した。

9. estrogen binding protein

培養細胞層を FCS を含まない培養液とともに24時間培養したのち細胞を回収。培養細胞 0.8 g に 1.5 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol を含む 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 (TED buffer) 4 ml を加えホモジナイズし, 1×10^5 g, 1 時間の超遠心をおこないその上清を cytosol とする。cytosol 150 μ l に 3 H-estradiol-17 β (44 Ci/m mol, 0.45~15 nM in TED buffer) 50 μ l と TED buffer 50 μ l を加えた群と, cytosol 150 μ l に 3 H-estradiol-17 β 50 μ l と非標識 estradiol-17 β (0.4 μ M in TED buffer) 50 μ l を加えたものを, おのおの duplicate にて18時間 4°C にて incubation をおこなった。その後 dextran coated charcoal (1% Norit A, 0.01% dextran in TED buffer) 100 μ l を加え 0°C にて 30 分間振盪し, 非結合 estradiol を収着させ, 2°C, 800 $\times$ g, 20 分間遠沈し, 上清 175 μ l をとりその radioactivity を液体シンチレーションカウンターにて測定した。 3 H-estradiol と buffer 加えた群は total binding を示し, 過剰の非標識 estradiol を加えたものは non-specific binding を示しておりこの差より specific binding の有無を検討した。

結 果

1. 細胞培養

8 例のことなった正常腎皮質の培養結果はいずれもほぼ同様の経過を示した。培養開始後48時間目には一部の細胞が底面に付着, 増殖をはじめ, 約1週間後には full sheet の状態となる。形態学的には次項に述べる変化を示しつつ7週を過ぎるころより増殖は緩徐となり継代間隔も2~3週となる。約12週目にはほぼ増殖を停止するが, この状態でも培養液の pH の変化をみると代謝は十分におこなわれており, 死滅しているわけではないが, 著者はこの段階で培養継続を中止している。

2. 形態学的観察

primary culture にもちこまれた細胞の中には腎を構成するさまざまな細胞が含まれているが, 培養細胞の形態もまたこれを反映してか, かなりの不均一性を示し, また時間の経過とともに細胞の形態も変化してくる。3 週目頃までにみられる細胞には大別して2種類の細胞があり, 1 つは円形または多角形で数核様に配列する上皮様細胞であり, 他は紡垂形で渦巻状あるいは層状に配列する細胞である。後者は fibroblast に類似するが刷毛ではいたような感じで薄く増殖する

fibroblast とは実際にはかなり異なった印象を与えるいずれも位相差顕微鏡で細胞はかなり厚く, 細胞質内にはわずかに顆粒がみられるにすぎない。またいずれも単核であり, 大部分は複数の核小体を有する (Fig. 1, 2)。3 週目以降になると症例によっては fibroblast が目立つようになり, 一部ではこれが重層状に増殖する (Fig. 3)。また前述した上皮様細胞の細胞質内には空胞や顆粒が目立つようになり, また細胞間の接合もやや粗となる。6~7 週目, 上皮様細胞の増殖がほぼ停止した状態での形態を Fig. 4 に示した。

3. 電顕的観察

培養開始3週目の細胞につき観察したところ, 光顕所見に一致してすべての細胞が同一の微細構造を示したわけではないが, 細胞表面の一部には microvilli に類似した構造の認められる細胞や, 隣接細胞との間に desmosome あるいは tight junction を思わせる接合構造を有した細胞が多数認められた (Fig. 5A, 5B)。

4. 増殖速度

症例7の培養開始後3週目(継代3代目)を用い測定したところ細胞数倍加時間約46時間であり, また6週目には, 測定値のバラツキが目立ったが約90時間と測定された。

5. 酵素組織化学的所見

症例6に由来する4週目の細胞の所見を示す。Alp は上皮様細胞にはほとんど認められず, ところどころに重層して増殖する線維芽様細胞にきわめて弱い活性がみられるに過ぎなかった (Fig. 6)。 γ -GTP は上皮様および線維芽様細胞のいずれにも活性が認められるが, 特に大型の紡垂型細胞にその活性が高いようである (Fig. 7)。LDH は多少の強弱はあるが大部分の細胞に認められ, また重層状に増殖する部分で活性が高いようである (Fig. 8)。

6. 酵素化学的性質

Table 2 に正常腎, 培養腎細胞の Alp, γ -GTP および LDH の酵素活性ならびにアイソザイムの性質をまとめて示した。Alp は正常腎組織にはきわめて高い活性がみられるにもかかわらず培養細胞では極端な低値を示す。組織化学的にみても上皮様細胞にこの活性がみられないことは前述したとおりである。電気泳動に必要なだけの酵素を得られず, アイソザイムは未検討のままに残されている。 γ -GTP も培養細胞では正常腎に比し活性値は著明に低下する。この酵素の電気泳動における性質は Fig. 10 に示したが, 非常に興味ある結果を示し, 正常腎にみられる γ -GTP と, 波

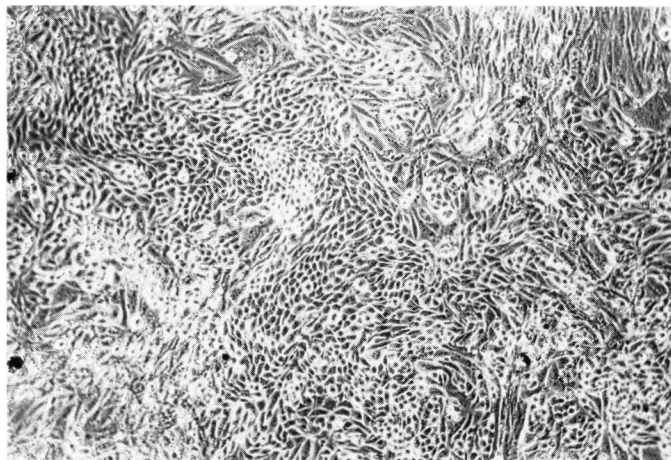


Fig. 1. Primary culture, 倒立位相差顕微鏡 (×100).

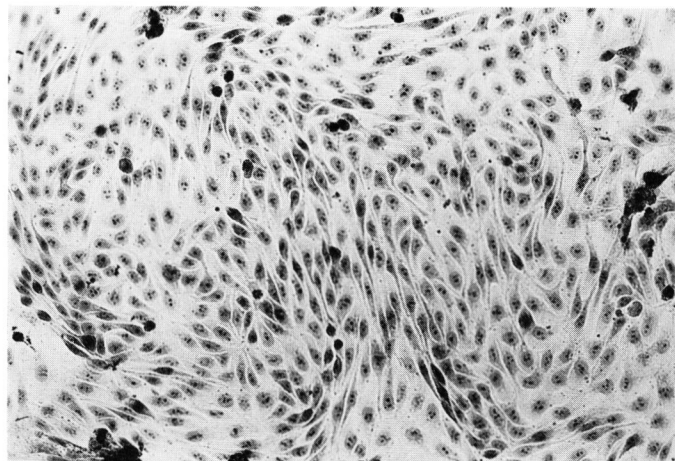


Fig. 2. Primary culture, hematoxylin-eosin 染色 (×200).

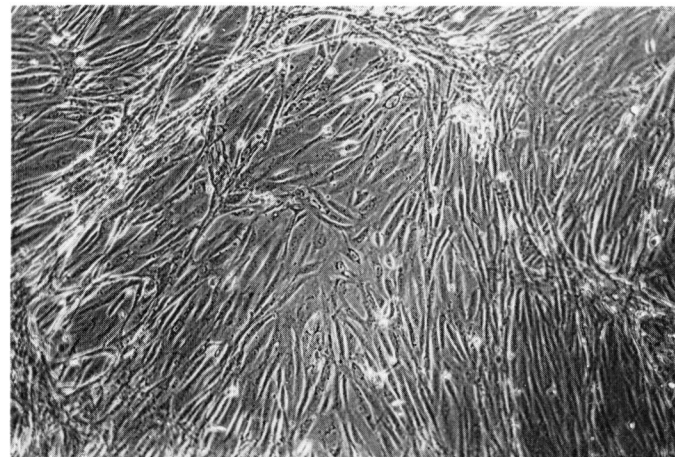


Fig. 3. 培養開始後3週目, fibroblastic cell が多くみられる部分, 倒立位相差顕微鏡 (×100).

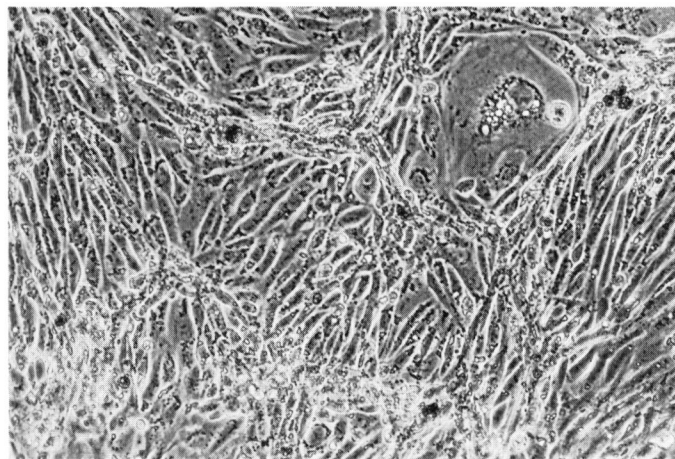


Fig. 4. 培養開始後7週目, 上皮様細胞が優位を占めるが, これら細胞内には空胞, 顆粒が多い, 倒立位相差顕微鏡 (×100).

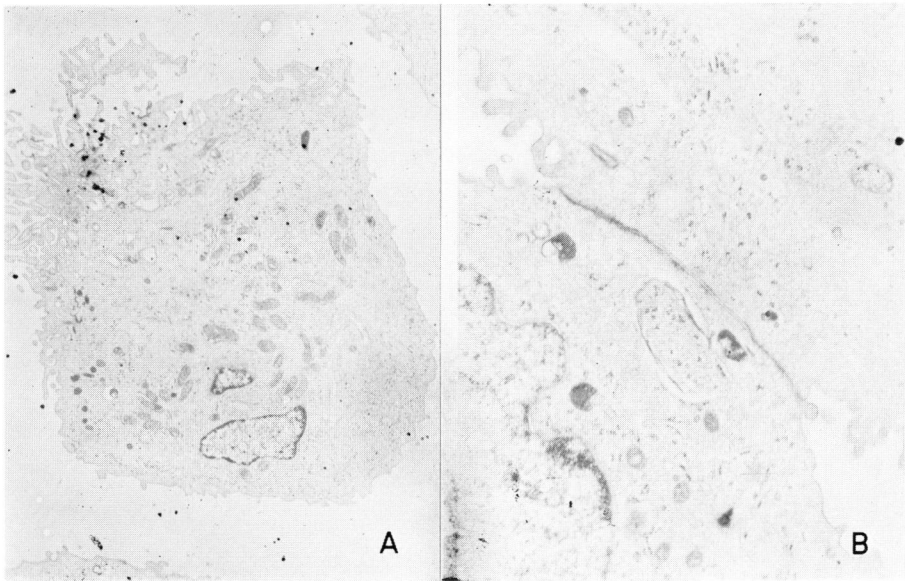


Fig. 5. A. 細胞表面に microvilli に似た形態を有する細胞 ($\times 2,500$).
B. 隣接する細胞間に認められる desmosome に類似した構造 ($\times 8000$).

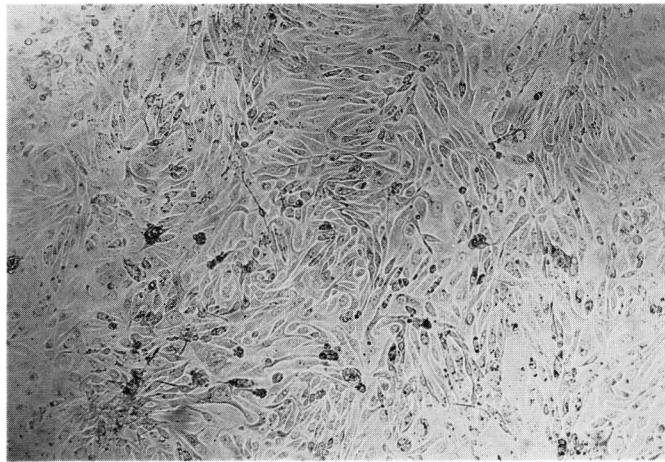


Fig. 6. alkaline phosphatase の酵素組織化学. 活性はほとんど認められない ($\times 100$).

田ら^{14,15)}により報告されたヒト腎細胞癌組織に見出される特異な γ -GTP との中間に泳動される性質を示した (Fig. 9). LDH 活性値は正常腎組織の活性とほぼ同様であるが、アイソザイムの分析では、正常腎では LDH-1~LDH-2 が大部分を占めるのに反し、培養細胞では LDH-4~LDH-5 が大部分を占め、アイソザイムパターンのはほぼ完全な逆転が観察された (Table 3).

7. PTH に対する応答性

培養細胞内 cyclic AMP 含量は、対照が 158.6 pmol/mg DNA であるのに対し、PTH 添加2分後に

は 5237.0 p mol/mg DNA とほぼ 33倍の著明な上昇を示した。

8. estrogen binding protein

Fig. 10 に示すように estradiol-17 β の cytosol protein に対する total binding と non-specific binding の間には全く差がみられず、培養細胞の中には estrogen に対する specific binding protein は認められないものと判定した。

小 括

ヒト正常腎皮質を trypsin にて細胞分散し、静置培

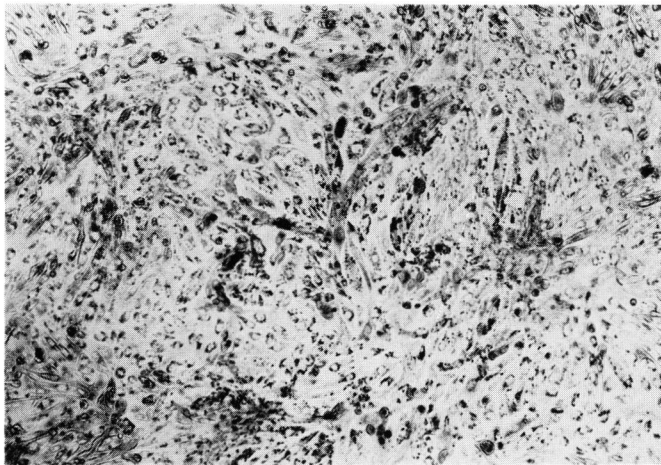


Fig. 7. γ -glutamyl transpeptidase の酵素組織化学. 大部分の細胞に活性がみられるが, 紡垂型細胞に高く認められる ($\times 100$).

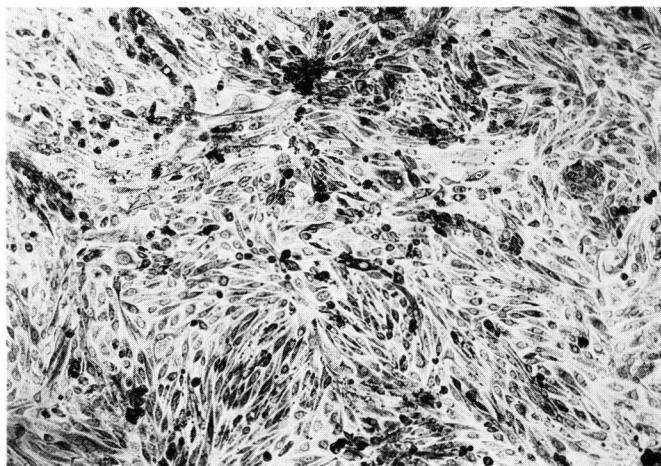


Fig. 8. lactate dehydrogenase の酵素組織化学. すべての細胞に高い活性が認められる ($\times 100$).

Table 2. Enzymatic properties of cultured renal epithelial cells in comparison with normal kidney.

	enzymatic activity	
	in normal kidney	in cultured cells
alkaline phosphatase (mU/mg protein*)	680	trace
γ -glutamyl transpeptidase ($\mu mol/min/mg$ protein)	0.875	0.166
lactate dehydrogenase (Wroblewski unit/ mg protein)	4000	3944

Protein was determined by the method of Lowry et al (25)

養をおこなったところすべての例で上皮様細胞を含む単層細胞層が得られ、この活発な増殖は約7週間つづいた。光顕ならびに電顕的にみてこの細胞には線維芽様細胞の混入もみられるが、上皮性細胞の性質を具備しているものが多く、microvilli の存在より尿細管に由来する細胞も明らかに含まれているものと考えられ

Table 3. Analysis of LDH isozyme.

	LDH isozyme (%)				
	1	2	3	4	5
normal kidney	40.7	33.6	17.4	6.6	1.7
cultured cells	(-)	3.3	20.2	38.5	37.9

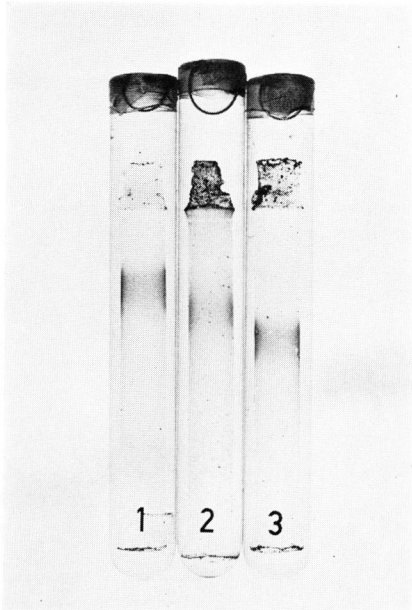


Fig. 9. γ -glutamyl transpeptidase の電気泳動。
1; 正常腎 γ -GTP, 2; 培養腎細胞より抽出された γ -GTP, 3; 腎細胞癌 γ -GTP.

る。しかしながら正常腎近位尿細管に高い活性のみられる Alp は培養上皮様細胞にはほとんど検出されず、また γ -GTP はその活性低下とともに電気泳動易動度の変化が観察された。LDH 活性はほぼ維持されるが、アイソザイムのパターンは正常腎皮質のパターンとは全く逆に LDH-4~LDH-5 の優位を示した。またこの単層培養細胞は PTH に対し細胞内 cyclic AMP の著明な上昇という反応を示し、近位尿細管の生化学的性質の一部を保持していると考えられるが、estrogen に対する specific binding protein は検出されなかった。

考 察

各種実験動物の正常腎（成熟動物あるいは胎児に由来）の細胞培養はかなり長い歴史をもち、比較的容易に培養可能であることから、多くの細胞学的研究やウイルス学的研究に利用されてきた^{8,9)}。これらの実験動物由来腎細胞のうちのいくつかの細胞は株化さえされており^{9,10,12,16,17,19,22,27,39,44)}、そのなかには腎の生理との関連において非常に興味深い antidiuretic hor-

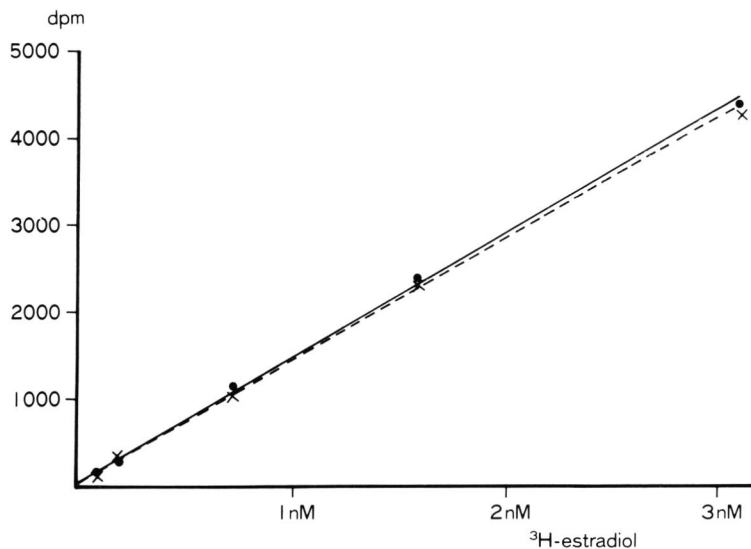


Fig. 10. estrogen binding protein の dextran coated charcoal assay.
●—●; ^3H -estradiol-17 β +TED buffer
×---×; ^3H -estradiol-17 β +excess cold estradiol-17 β

me 感受性を示す細胞や^{12,19,40)}, fluid transport をおこなっていることが示唆される細胞²²⁾, PTH に対し応答性を示す細胞¹⁹⁾, カルチトニンに反応する細胞¹²⁾, あるいは高浸透圧に抵抗して増殖する細胞³⁹⁾などがあることも知られている。またやや特殊な方法を用いれば糸球体のみに由来する細胞の培養が可能であることも報告されている^{18,26,30,41)}。

しかしながら、ヒト正常腎に由来する細胞の培養の結果や、得られる細胞の性質についての研究はいまだ不十分なままに残されているようであり、Stone et al.⁴³⁾ による培養成績の報告、Williams et al.⁴⁶⁾ による培養正常腎細胞での CEA 様物質発現に関する研究、あるいは Ueda et al.⁴⁵⁾ による培養正常腎細胞の抗原性に関する研究⁴⁵⁾などを見るに過ぎない。これらの報告を要約すると、培養はもちろん可能であるが、CEA 様物質の産生はみられず、また培養をおこなっても培養腎癌細胞と同じ抗原性を保持するには至らないとの3点にまとめられ、これ以外の諸性質については明確にされていないのが現状であろう。このような時点においてヒト正常腎由来培養細胞の性質を明確にすることの必要性はすでに緒言において述べたが、またさらにヒト腎の生理学的研究に資するものも多いのではないかと考えられる。

さて筆者の方法によりヒト正常腎より、64歳の高齢者に由来する細胞も含め100%の成功率で上皮様細胞を主とする単層細胞が得られた。このように正常細胞を培養系に移した場合には一般的には“胎児化”あるいは“先祖がえり”の現象が起きるとされているが、ここに示した正常腎由来細胞の形態学的、生化学的性質などのように理解されるべきかにつき簡単に考察してみたい。形態学的な特徴は上皮様細胞を多く含みはするが、光顕的にみてもかなりの heterogeneity を示すことが第1に挙げられよう。正常腎を構成する細胞が糸球体、尿細管系、血管系、結合組織あるいは内分泌に関与する細胞など本来不均一性を持つことからみて当然のこととも思われるが、逆にこれら構成細胞の多くのものが培養可能であることを示唆しているとも考えられる。ところが、単離糸球体より得られる培養細胞においてさえ形態的、機能的あるいは生化学的にも heterogeneity を示すことが報告されており⁴¹⁾、多様であるからといってただちにすべての構成細胞を含むと言いがたい。しかし電顕的にみて desmosome 類似の細胞間接合と microvilli を思わせる細胞膜の構造をもつ細胞の存在はこれら培養細胞の中に尿細管由来細胞が含まれていることを強く示唆しており、同時に *in vitro* でも分化した構造の一部がある程度保持され

ていることを示している。生化学的にみると培養細胞には酵素の活性あるいはそのアイソザイムの著しい変動が観察されることはすでに述べた。本来正常腎近位尿細管細胞には Alp 活性の非常に高く、また電気泳動により3~4本のアイソザイムをもつことが報告されている^{20,29)}。しかし培養細胞では重層状に増殖するわずかな線維芽様細胞の部分を除き、その活性がほとんど消失してしまっている。この現象はすでに Lieberman and Ove²⁴⁾ によりおこなわれたウサギ腎細胞の培養においてみられた結果とよく一致するが、本来この酵素は近位尿細管細胞のうちでも brush border に多く分布しており、電顕的にみて培養細胞にこれに類似する構造が一部維持されているにもかかわらず、酵素活性が消失してしまっているのは何故であろうか。細胞の機能的分化と密接な関係をもつ Alp の消失は電顕的にみられる形態学的特長の維持が、機能的には無意味な構造に変化してしまっていることを暗示しているのかもしれない。培養にともなう γ -GTP の活性低下とアイソザイムの変化は非常に興味ある所見と考えられる。すでに報告したように腎細胞癌組織内では γ -GTP 活性は正常腎に比較して低値であるが、検討された腎細胞癌組織の約半数に正常腎、胎児腎あるいは正常肝にみられるアイソザイムとは異なった γ -GTP が見出される^{14,15)}。ところが培養細胞では活性値の低下とともに γ -GTP の電気泳動易動度が、正常腎 γ -GTP と腎細胞癌にともなう γ -GTP との中間的な易動度をもつように変化していた。この変化は胎児腎の γ -GTP が正常腎 γ -GTP と同じ易動度を示すことから¹⁴⁾、単に胎児化と理解することはできず、また簡単に悪性細胞との中間的な性質を示すと考えることも不合理であろう。最も妥当な考え方、あるいは研究方法としては各種の臓器の γ -GTP の構成を調べ、この培養細胞が示した γ -GTP と一致する細胞を見出すことであり、もしこれが可能となった時には、この現象は培養にともなう他臓器細胞の生化学的形質の獲得と理解されるかもしれないが、まったく今後の研究課題である。

一般に細胞を培養した際にみられる LDH の活性ならびにアイソザイムパターンの変動はよく検討されており、培養に移すと LDH-4, LDH-5 というM型 LDH 部分が高値を示すこと²⁾、あるいはこのM型 LDH の合成が低酸素環境のもとでは増加することが知られている^{5,13,42)}。また例外も多いが、一般に LDH アイソザイムは細胞の悪性化にともないM型優位への shift がみられるとされており^{11,21,33,35)}、筆者らの観察した培養腎細胞の LDH に関する性質もこれらの事実と

よく一致する。しかしながらこれを細胞の“胎児化”と理解するには、胎児腎では LDH-1~LDH-3 が高値を示すという Pfeleiderer and Wachsmuth³⁶⁾ の報告とくい違いが生ずる。むしろ単に培養環境に応じた適応と考えるのが無難かもしれないが、LDH アイソザイムの生理的意義についてはいまだ議論も多く、どのような環境因子がこの LDH アイソザイムの変動を招いたものか不明というほかはない。

さて腎は estrogen の標的臓器と考えられ、またラット⁶⁾、マウス³⁾、ハムスター²³⁾ およびヒト^{1,34)} 正常腎には estrogen receptor が存在することもすでに報告されている。しかし培養腎細胞にはこの estrogen receptor は検出されず、この点は分化した生化学的性質、機能の消失と考えられる。なおヒト腎細胞癌組織内には estrogen receptor の検出される場合が約20%にみられるが、これらの検出される腫瘍の大部分が病理組織学的にみて low grade に分類されるものであることは興味深い³⁴⁾。

以上のべてきたように培養腎細胞は形態学的な多様性ととも、生化学的にもかなり多岐にわたる変化をきたしていることを示している。ところが一方、電顕的観察よりこれら細胞の中には尿管管に由来する細胞が含まれていることが示唆されはしていたが、PTH に対し、明らかに強い応答性を示す細胞が存在することは、生化学的にこれを証明するとともに、PTH receptor という分化した機能構造が十分に維持されていることを示している。

このような様々な性質およびすでに報告されているように、培養腎細胞では CEA 様物質が産生されないこと⁴⁶⁾、腎細胞癌の特異抗原を持つにいたらないこと⁴⁵⁾などを考え合わせると、培養という系に細胞を移すことによりみられる変化は決して“胎児化”、“先祖がえり”というような単純なものではなく、ある marker よりみれば分化した機能の維持であり、他の marker よりみれば、胎児化、未分化細胞と同様のあるいはこれらとの中間的な形質への転換とも推測され、また他の marker よりみると他種臓器の形質の新たな獲得が想像される場合もある。単に培養環境への適応と思われる変化もみられている。しかしながらここで重要なことは決して悪性腫瘍細胞の形質に類似した方向へばかり変化するのではないことであり、この点は今後このような細胞を培養腎癌細胞との比較の対照として用いることが非常に有意義であることを物語っているといえよう。

最後に以上のような複雑な変化が観察された大きな理由として、由来細胞の不均一性が十分に考慮されな

ければならないことを強調したい。今後の課題の1つとして、すでに動物腎についておこなわれているよう³⁸⁾に細胞分散処理法を工夫したり、培養条件を変化せしめることにより、できるだけ単一の由来細胞による培養をおこない、その性質を検討することが必要かもしれないが、かなり困難な点も多いと思われる。このため、ここに報告したヒト全腎由来細胞は、詳述したような性質を十分理解したうえで使用すれば、今後の *in vitro* におけるヒト腎細胞癌の研究や、その他腎移植における免疫反応解析の標的細胞としてなど多方面の研究に有用なものと思われる。

結 語

ヒト正常腎皮質に由来する細胞の培養を8例につきおこない、その培養成績および得られた細胞の性質を形態学的、生化学的に検討した結果を報告した(小括参照)。さらに文献的考察とともに *in vitro* に移した細胞にみられる変化は、いわゆる“胎児化”や“先祖がえり”と表現されるような単純なものではなく、marker により大きく異なることおよび決して悪性腫瘍の有する形質と一致するように変化するものではないことを述べ、この培養細胞が今後の腎および腎細胞癌に関する多方面の研究に有用であろうことを述べた。

本論文の要旨は第68回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Bojar, H., Dreyfurst, R., Maar, K. and Staib, W.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 15: 319, 1977.
- 2) Blanco, A., Rife, U. and Lanson, B. L.: Nature, 214, 1967.
- 3) Bullock, L. P. and Bardin, C. W.: Endocrinology, 97: 1106, 1975.
- 4) Burstone, M. S.: J. Histochem. Cytochem., 9: 146, 1960.
- 5) Cribbs, R. N. and Klein, E. S.: J. Cell Physiol., 78: 59, 1971.
- 6) DeVries, J. R., Ludens, J. H. and Fanestil, D. D.: Kidney Int., 2: 95, 1972.
- 7) Drew, R. M.: Science, 126: 747, 1957.
- 8) Dulbecco, R. D. and Vogt, M.: J. Exp. Med., 99: 167, 1954.
- 9) Enders, J. F.: J. Immunol., 69: 639, 1952.
- 10) Gaush, C. R., Hard, W. L. and Smith, T. F.:

- Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **122**: 931, 1966.
- 11) Goldman, R. B., Kaplan, N. O. and Hall, T. C.: *Cancer Res.*, **24**: 389, 1964.
- 12) Goldring, S. R., Dayer, J.-M., Ausiello, D. A. and Krane, S. M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**: 434, 1978.
- 13) Goodfriend, T. C., Sokol, D. M. and Kaplan, N. O.: *J. Mol. Biol.*, **15**: 18, 1966.
- 14) Hada, T., Higashino, K., Yamamoto, H., Yamamura, Y., Matsuda, M., Osafune, M., Kotake, T. and Sonoda, T.: *Clin. Chim. Acta*, **85**: 267, 1978.
- 15) 波田寿一・東野一彌・山本英雄・渡辺信一郎・松田 稔・長船匡男・宇佐美道之・古武敏彦・園田孝夫：泌尿紀要，**24**: 631, 1978.
- 16) Hull, R. N., Cherry, W. R. and Tritch, O. J.: *J. Exp. Med.*, **115**: 903, 1968.
- 17) Hull, R. N., Cherry, W. R. and Weaver, G. W.: *In Vitro*, **12**: 670, 1976.
- 18) 石川康弘・和田孝雄・坂口 弘：医学のあゆみ，**109**: 263, 1979.
- 19) Ishizuka, I., Tadano, K., Nagata, N., Niimura, Y. and Nagai, Y.: *Biochem. Biophys. Acta*, **541**: 467, 1978.
- 20) Korngold, L.: *Int. Archs. Allerg. appl. Immun.*, **54**: 300, 1977.
- 21) Lee, C., Oliver, L., Coe, E. L. and Oyasu, R.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **62**: 193, 1979.
- 22) Leighton, J., Estes, L. W., Mansukhani, S. and Brada, Z.: *Cancer*, **26**: 1022, 1970.
- 23) Li, J. J., Talley, D. J., Li, S. A. and Villee, C. A.: *Cancer Res.*, **36**: 1127, 1976.
- 24) Liberman, I. and Ove, P.: *J. Biol. Chem.*, **233**: 634, 1958.
- 25) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- 26) Mandel, P., Helwig, J. J. and Bollack, C.: *Exp. Cell Res.*, **83**: 414, 1973.
- 27) Madin, S. H. and Darby, N. B., Jr.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **98**: 574, 1958.
- 28) 松田 稔・長船匡男・宇佐美道之・古武敏彦・園田孝夫・波田寿一・渡辺信一郎・大河内寿一・東野一彌：泌尿紀要，**24**: 619, 1978.
- 29) 松田 稔・長船匡男・中野悦次・石橋道男・古武敏彦・園田孝夫・波田寿一・大河内寿一・東野一彌・山村雄一・平岡 諒：泌尿紀要，**26**: 253, 1980.
- 30) 三崎俊光：日泌尿会誌，**70**: 144, 1979.
- 31) 森 昌彦：in 小川和朗・武内忠男・森富編，新組織化学，p. 183~207, 朝倉書店，東京，1975.
- 32) Morton, R. K.: *Biochem. J.*, **57**: 593, 1954.
- 33) 永原 篤・生駒文彦：日泌尿会誌，**58**: 484, 1967.
- 34) 中野悦次・松田 稔・長船匡男・園田孝夫・佐藤文三・古武敏彦：日泌尿会誌，in press.
- 35) Oliver, J. A., Elhilali, M. M., Belitsky, P. and MacKinnon, K. J.: *Cancer*, **25**: 863, 1970.
- 36) Pfeleiderer, G. and Wachsmuth, E. D.: *Biochemische Zeitschr.*, **334**, 1961.
- 37) Rutenberg, A. M., Kim, H., Fishman, J. W., Hanker, J. S., Wasserkug, H. L. and Seligman, A. M.: *J. Histochem. Cytochem.*, **17**: 517, 1969.
- 38) 佐藤温重：核酸蛋白質酵素，**23**: 1322, 1978.
- 39) Sato, A. and Ozawa, K.: *Yokohama Med. Bull.*, **27**: 51, 1976.
- 40) Sato, A., Ozawa, K. and Itoh, H.: *Jap. J. Pharmacol.*, **24**: suppl. 47, 1974.
- 41) Scheinman, J. I. and Fish, A. J.: *Amer. J. Pathol.*, **92**: 125, 1975.
- 42) Schroeder, J., Upson, R. and Chvapil, M.: *Exp. Cell Res.*, **94**: 227, 1975.
- 43) Stone, K. R., Paulson, D. F., Bonar, R. A. and Reich, C. F.: *Urol. Res.*, **2**: 149, 1975.
- 44) Takaoka, T., Katsuta, H., Endo, M., Sato, K. and Okumura, H.: *Jap. J. Exp. Med.*, **32**: 351, 1975.
- 45) Ueda, R., Shiku, H., Pfreundshuh, M., Takahashi, T., Li, L. T. C., Whitmore, W. F., Oettgen, H. F. and Old, L. J.: *J. Exp. Med.*, **150**: 564, 1979.
- 46) Williams, R. D., Bronson, D. W., Myl, A. D., Vandevoorde, J. P. and Elliott, A. Y.: *Cancer Res.*, **39**: 2447, 1979.

(1980年5月21日受付)