無血清培養下における正常口腔粘膜上皮細胞唾液腺 上皮細胞ならびに口腔癌細胞の脂質代謝

新木 恒猪・岡本 哲治・高田 和彰

Lipid metabolisms of normal epithelial cells and cancer cells derived from oral region in serum-free culture

Tsuneo SHINKI・Tetsuji OKAMOTO・Kazuaki TAKADA

Abstract: We have previously reported that sensitivity to various antitumor drugs on squamous carcinoma cells is different from that on adenocarcinoma cells. Furthermore, the difference is well correlated with the ability of the cells to incorporate drugs by passive transport. These results suggest the possibility that the accumulation of the drug was closely associated with lipid composition and/or conformation which is thought to be an important factor to determine hydrophobicity of the cell membrane.

Generally, serum-contained medium was used to study lipid metabolism in cultured cells. Since lipid metabolism is dependent upon the presence of external lipoproteins, we have studied lipid metabolism of normal epithelial and cancer cells in serum-free culture to evaluate intrinsic lipid metabolism in the cells.

[2-¹⁴C] acetate was incorporated almost exclusively into phospholipids in oral epithelial cells cultured in a low calcium medium. However when the concentration of calcium was changed from 0.03 mM to 1.12 mM to induce terminal differentiation of the cell, a definite amount of radioactive acetate was incorporated into free cholesterol and incorporation into phospholipids was decreased. The extent of the incorporation into free cholesterol was increased at least until 48 hrs after inducing differentiation and the ratio of free cholesterol over phospholipids were constantly increased in this period, indicating that accumulation of free cholesterol is concomitant with the differentiation of the cell. Furthermore, it may be suggested that the ratio of free cholesterol over phospholipid could be an indicator for terminal differentiation of epithelial cells. Squamous cell carcinoma cells which showed a decreased capacity to differentiate exhibited increased incorporation into phospholipids and decreased incorporation into neutral lipids. On the other hand, adenocarcinoma cells showed marked differences in lipid metabolism compared to squamous carcinoma cells, i.e., increased incorporation into neutral lipids and decreased incorporation into phospholipids.

From the results obtained, it is clear that a close relationship exists between lipid metabolism and the ability of cells to differentiate. Furthermore, it may be suggested that hydrophobicity of the cell membrane in squamous carcinoma cells might be higher than that in adenocarcinoma cells.

Key words: cancer cells (癌細胞), lipid metabolism, (脂質代謝), serum-free culture (無血清培養)

広島大学歯学部口腔外科学第1講座
(主任: 高田和彰教授)
Department of Oral and Maxillofacial Surgery I,

Hiroshima University, School of Dentistry (Chief:
Prof. Kazuaki Takada)

受付日: 平成3年9月24日

緒 言

われわれはすでに口腔由来扁平上皮癌細胞と唾液腺由来腺癌細胞の種々の抗癌剤に対する感受性に大きな差があること、さらにその差は膜の受動輸送による抗癌剤の細胞内への取り込み能の差を反映していることをあきらかにしてきた^{1,2)}。これら癌細胞における薬剤の取り込みの差は、細胞膜の脂質構造の違いに基づく細胞膜の疎水性の差を反映している可能性が考えられる。

従来、培養細胞における脂質合成能の検索は、血清を含む培地を用いて行われている。血清中にはリポ蛋白を中心とした脂質や未知の因子が存在しており³⁾、これらはまた血清のロットによっても変化する。このような培養条件では細胞が本来持つ脂質合成能を正確に検索することは不可能である。

一方、D. Barnes および G.H. Sato ら^{4,5)}は血清の主な役割は細胞の増殖にとって必要なホルモン、細胞増殖因子を細胞に供給することであるという仮説のもとに、基礎培地に既知の細胞増殖因子やホルモンを加えた無血清培地を用いて、動物細胞の増殖のみならず機能をも維持することに成功し、無血清培養法を確立した。したがって脂質を含まない無血清培地を用いることにより細胞が本来もつ脂質合成能の検索が可能となると考えられる。今回、われわれは当科で開発した無血清培地⁶⁾を用いて口腔粘膜由来並びに唾液腺由来正常上皮細胞および口腔癌細胞の培養を行い、それらの脂質合成能を [2-¹⁴C] acetate の脂質画分への取り込みを指標として検索を行った。

研究材料と方法

1. 培養細胞

癌細胞として、ヒト外陰部由来扁平上皮癌細胞株 A 431 由来の無蛋白無脂質培地で増殖可能な AJC クローン⁷⁾、当科で樹立したヒト口腔由来扁平上皮癌細胞株 UE^{8,9)}、KA¹⁰⁾、NA^{8,11)}、ヒト唾液腺由来腺癌細胞株 HSY¹²⁾、HSG¹³⁾ (徳島大学歯学部口腔外科学第2講座佐藤光信教授より供与)、正常上皮細胞としてヒト口腔粘膜由来上皮細胞およびヒト唾液腺由来上皮細胞を用いた。

2. 培養液

RPMI 1640 medium (極東製薬) と Dulbecco's modified Eagle medium (極東製薬) を 1 : 1 に配合した培地⁶⁾ (以下、RD と略す) または、modified-MCDB 153 medium¹⁴⁾ (m'-MCDB 153, 極東製薬) を基礎培地として、脱イオン化および逆浸透により純化した水 (Milli-Q. Milli-pore) を用いて sodium pyruvate 110 mg/L、(片山化学)、sodium bicarbonate は RD に 2 g/L、m'-

MCDB 153 に 1.2 g/L (和光純薬)、N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethane sulfonic acid 15 mM (HEPES, 同人化学)、kanamycin sulfate 90 mg/L、aminobenzylpenicillin 90 mg/L (以上、明治製薬) を加え pH 7.4 に調整し、0.2 μ m フィルター (Acrocap; Gelman Science Inc.) を用いて濾過滅菌したものを使用した。さらに、crystalline bovine insulin 10 μ g/ml, human transferrin 5 μ g/ml, 2-aminoethanol 10 μ M (以上、Sigma Chemical Co., USA)、2-mercaptoethanol 10 μ M, sodium selenite 10 nM (以上、片山化学) (以上 5 factors, 以下 5 F と略す)、fatty acid-free bovine albumin (Pentax Miles Laboratories Inc., USA) 500 μ g/ml を加えて使用した。培地中の Ca²⁺ 濃度は、RD が 1.12 mM、m'-MCDB 0.03 mM であった。growth factor として epidermal growth factor (mouse EGF, Receptor Grade, Collaborative Research, Inc., USA) および、fibroblast growth factor (FGF は、牛脳抽出液より当科で精製した¹⁵⁾) を用いた。

3. 正常細胞の分離培養方法

1) ヒト口腔粘膜由来上皮細胞

外来小手術時に切除した口腔粘膜より分離培養した。切除した口腔粘膜から結合組織を可及的に除去後、0.02 % ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 片山化学) を含む Dulbecco's Ca²⁺ Mg²⁺-free phosphate buffered saline (CMF-PBS, NaCl 8.0 g, Na₂HPO₄ 1.15 g, KCl 0.2 g, KH₂PO₄ 0.2 g/L, pH 7.2) 中で 30 分間処理し、0.05 % trypsin (Difco, USA) を含む CMF-PBS 中で 4°C 下一昼夜作用させた後、0.1 % trypsin inhibitor (type II s, Sigma Chemical Co., USA) を含む m'-MCDB 153 培地中で、実体顕微鏡 (オリンパス, K.K. Xr) 下に自家製ブラシを用いて基底細胞を分離した¹⁶⁾。分離した基底細胞は、Type I コラーゲン (cell matrix type I-a 新田ゼラチン) コートした 60 mm 径のプラスチックプレート (住友ベークライト K.K.) を用いて m'-MCDB 5F に FGF 1nM を添加した条件で初代培養を行った。

2) 唾液腺由来上皮細胞

悪性腫瘍患者の手術時に摘出した病理組織学的に正常な顎下腺より分離した。摘出した唾液腺組織を 70 % エタノールにて消毒後、CMF-PBS にて洗浄後細切し、コラーゲンコートした 60 mm 径プラスチックプレートをを用いて、RD 5F に fatty acid-free albumin を加えた RD 6F に EGF 1nM または FGF 1nM を添加した条件で初代培養を行った¹⁷⁾。

4. 脂質代謝の検索

コラーゲンコートした 60 mm 径または 100 mm 径プラスチックプレートに無血清培地を用いて各種細胞を RD 6F の条件で植込み 3 日間培養後、[2-¹⁴C] acetate, sodium salt (Amersham. U.K., 1.94 GBq

/mmol, 7.40 MBq/ml) を 18.5 KBq/ml の濃度で添加し、一定時間培養後、冷却した CMF-PBS で 3 回細胞を洗浄した。次にラバーポリスマンにて細胞を採取し遠心後、沈査を試料とした。同試料のタンパク定量は Bradford¹⁸⁾の方法を用いて行った。

培養は、TE-HER 型インキュベーター (平沢製作所) 内にて、5% CO₂ 37°C の条件下で静置培養を行った。

5. 総脂質の抽出方法

総脂質の抽出は Bligh & Dyer 法¹⁹⁾ に準じて行った。4. で得た試料に蒸留水 5 ml を加え、超音波破砕器 (UR-200P, トミー精工) にて粉碎後、メタノール 10 ml, クロロホルム 5 ml を加え 15 分間振とうした。ついでクロロホルム 5 ml を再度加え、10 分間振とう後蒸留水 5 ml を加え、さらに 5 分間振とうした。1,000×g にて 5 分間遠心後、下層のクロロホルム層を回収した。さらに残液にクロロホルム 10 ml を加え、15 分間振とうし 1,000×g にて 5 分間遠心後、下層のクロロホルム層を再度回収し、先に得られたクロロホルム画分とともにエバポレーターにて濃縮乾燥後、クロロホルム 1 ml を加え試量とした。

同試料の一部を液体シンチレーター (シンチゾール EX-H, 和光純薬) と混和後その放射活性を液体シンチレーションカウンター (ALOKA, LSC-900) にて計測し全放射活性を得た。

6. 脂質画分の分離法および放射活性の測定法

5. で抽出した脂質を薄層クロマトグラフィー (TLC) 法を用いて分離分析した。Phospholipids (PL) と free cholesterol (FCh), free fatty acid (FFA), triglyceride (TG), cholesterol ester (ChE) などの neutral lipids (NL) の分離には、順相系 TLC (silica gel 60, Merk) plate を用い、hexane/diethyl ether/acetic acid (80:20:1)²⁰⁾ の溶媒系を用いて分離した。sphingomyeline (SM), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE) などの PL の分離には high-performanced TLC (silica gel 60, Merk) plate を、溶媒系として、chloroform/methanol/acetic acid/water (100:60:6:4)²¹⁾ を用いた。分離後各画分の放射活性をラジオクロマタイザー (ALOKA) にて測定した。

7. 培養正常上皮細胞の脂質代謝の検索

1) 正常口腔粘膜細胞はコラーゲンコートした 60 mm 径のプラスチックプレートをを用い低 Ca²⁺ 培地 MCDB 5F に 1nMFGF を添加した条件で継代培養を行った。検索には 4~6 代の細胞を用いた。subconfluent に達した細胞を 24 時間 FGF 非存在下で培養し、さらに MCDB 5F に培地交換後、[2-¹⁴C] acetate を 18.5 KBq/ml の濃度で添加し 24 時間培養後の脂質代謝を検索した。

2) 唾液腺由来上皮細胞は 1) と同様にコラーゲンコートしたプラスチックプレートをを用い RD 5F に fatty acid-free albumin を加えた RD 6F に 1nM の EGF あるいは 1nM の FGF を添加した条件で培養を行った。検索には 2 代目の細胞を使用した。subconfluent に達した細胞を RD 5F のみで 24 時間培養後、さらに RD 5F に培地交換し、[2-¹⁴C] acetate を 18.5 KBq/ml の濃度で添加し 24 時間培養後の脂質代謝を検索した。

8. 培養癌細胞における脂質代謝の検索

コラーゲンコートした 100 mm 径のプラスチックプレートに、RD 6F の条件で各種癌細胞を植え込み、3 日間培養後 subconfluent に達した細胞を RD 5F の条件で 18 時間培養を行い、[2-¹⁴C] acetate を 18.5 KBq/ml の濃度で添加後 6 時間培養し脂質代謝を検索した。

9. ヒト口腔粘膜由来上皮細胞の分化誘導に伴う脂質代謝の変化

正常口腔粘膜上皮細胞をコラーゲンコートした 60 mm 径のプラスチックプレートをを用いて低 Ca²⁺ 培地 m⁻MCDB 5F+FGF (1nM) で培養し subconfluent に達した細胞を FGF 非存在下で 24 時間培養後、RD 5F およびコントロールとして m⁻MCDB 5F に培地交換を行った。交換後および 24 時間後に [2-¹⁴C] acetate を 18.5 KBq/ml の濃度で添加後それぞれ 24 時間培養し脂質代謝を検索した。

結 果

1. 正常上皮細胞の脂質代謝の検索

正常口腔粘膜上皮細胞では、PL 合成能が 59.9% と最も高く、つづいて FCh 17.5%, TG 16.8%, FFA 3.4%, ChE 1.4% であった。唾液腺由来上皮細胞では、PL 合成能が 57.0%, つづいて FCh 27.0%, TG 10.4%, FFA 3.0%, ChE 1.3% であった。

2. 培養癌細胞の脂質代謝の検索

扁平上皮癌細胞 AJC, NA, KA, UE ではいずれも合成された脂質の大部分は PL であり、その比率は 70% 以上であった。また FCh の合成能は 13% から 17%, FFA 合成能は 1.8% から 6.9%, TG 合成能も 1.2% から 4.9% とわずかに認められた。しかし、ChE の合成能はほとんど認められなかった。一方、唾液腺由来腺癌細胞 HSG, HSY では PL 合成能が HSG で 36.5%, HSY で 38.9% と全脂質合成能の内では最も高かったものの他の細胞と比較して低い比率を示し、TG は HSG で 26.1%, HSY で 17.9%, FCh は HSG で 19.9%, HSY で 16.8%, FFA は HSG で 6.9%, HSY で 20.4%, ChE は HSG で 8.9%, HSY で 5.2% であり扁平上皮癌細胞と比較して PL に対する NL の合成能の亢進が認められた (表 1)。

PL 合成能に対する NL 合成能の比率 (以下 NL/PL と

表 1 各種培養細胞における [2-¹⁴C] acetate の phospholipids および各 neutral lipid への取り込み率 (%)

	KC	SE	NA	UE	KA	AJC	HSG	HSY
PL	59.9	57.0	71.2	78.9	78.6	74.1	36.5	38.9
FCh	17.5	27.0	13.9	13.2	17.0	16.4	19.9	16.8
FFA	3.4	3.0	6.9	6.3	2.3	1.8	6.9	20.4
TG	16.8	10.4	3.7	1.9	1.2	4.9	26.1	17.9
ChE	1.4	1.3	±	±	±	1.7	8.9	5.2

PL: phospholipid FCh: free cholesterol FFA: free fatty acid
TG: triglyceride ChE: cholesterol ester

表 2 各種培養細胞における [2-¹⁴C] acetate の各 phospholipid への取り込み率 (%)

	KC	NA	UE	KA	AJC	HSG	HSY
SM	3.1	4.8	7.2	7.6	10.5	7.4	8.6
PC	50.9	54.0	60.7	56.3	69.8	63.1	45.1
PS+PI	14.4	14.8	13.3	11.7	10.3	14.0	17.2
PE	31.6	26.4	19.3	26.0	9.5	15.6	30.0

SM: sphingomyelin PC: phosphatidylcholine PS: phosphatidylserine
PI: phosphatidylinositol PE: phosphatidylethanolamine

略す)は、正常口腔粘膜細胞では0.65、正常唾液腺上皮細胞では0.73であった。一方、扁平上皮癌細胞では UE が0.4、NA が0.36、KA が0.26、AJC が0.33と低値を示し、唾液腺癌細胞 HSG では1.69、HSY では1.56と高値を示した(図1)。このように NL/PL は、扁平上皮癌細胞では正常上皮細胞より低値を、腺癌細胞では正常上皮細胞より高値を示すことがあきらかとなった。

3. 各種培養細胞における各 PL 合成能の検索

今回検索したすべての培養細胞において、合成された PL のうち PC 合成能が最も高くつづいて PE であった(表2)。正常細胞と癌細胞間で、あるいは、扁平上皮癌細胞と腺癌細胞間であきらかな差を認めなかった。

4. ヒト口腔粘膜由来上皮細胞の分化誘導に伴う脂質代謝の変化

分化を抑制した条件では、PL が59.9%と最も高く、つづいて FCh 17.5%、TG 16.8%、FFA が3.4%認められた。通常濃度の Ca²⁺ を含む RD 5F 培地で分化を誘導すると、分化誘導後24時間では、FCh 合成能が40.9%と著明に増大し、PL および TG は48.1%および6.8%とともに低下した(表3)。培地交換後48時間後でも同様に、FCh 合成能の増大と PL および TG の低下を認めた。分化抑制条件と分化誘導条件での NL/PL を比較すると、分化抑制条件では24時間後0.65、48時間後0.62、分化誘導条件では24時間後1.05、48時間後1.01であり、分化に伴い NL/PL 値が上昇することが

表 3 培養正常口腔粘膜上皮細胞の分化誘導に伴う [2-¹⁴C] acetate の phospholipids および各 neutral lipid への取り込み率 (%)

	24 h		48 h	
	MCDB	RD	MCDB	RD
PL	59.9	48.1	60.6	48.9
FCh	17.5	40.9	22.6	34.4
FFA	3.4	2.9	2.6	5.3
TG	16.8	6.8	12.5	9.8
ChE	1.4	±	0.7	±

MCDB:Ca²⁺, 0.03 mM RD: Ca²⁺, 1.12 mM

あきらかとなった(図2)。

考 察

われわれは癌細胞の組織型の違いによりその細胞内への種々の抗癌剤の取り込みに差があることを、また、その薬剤感受性に差があること^{1,2)}をあきらかにしてきた。つまり、親水性の抗癌剤であるシスプラチンや 5-FU は、扁平上皮癌細胞に比較し腺癌細胞に高濃度に取り込まれ、抗腫瘍効果も腺癌細胞に対して高いこと²⁾を、ま

図1 各種培養細胞における NL/PL

図2 培養正常口腔粘膜上皮細胞の分化誘導に伴う NL/PL の変化

た、疎水性の光感受性色素であるヘマトポルフィリン誘導体やフェオフィバインド-a は、腺癌細胞に比較し扁平上皮癌細胞に高い濃度で取り込まれ、抗腫瘍効果も扁平上皮癌細胞に対して高いこと¹⁾を、さらに、これら薬剤の細胞内への取り込みは、細胞膜の受動輸送によること^{1,2)}をあきらかにしてきた。これら癌細胞における薬剤の取り込みの差は細胞膜の脂質構造の違いに基づく細胞膜の疎水性の差を反映していると考えられる。一方、培養細胞における脂質合成能や脂質組成の検索^{21~23)}は従来、血清存在下で行われている。血清中にはリポ蛋白を中心とした脂質や未知の因子が存在し、また血清のロット間でこれら脂質の組成や量が異なるため、血清存在下では細胞が本来持つ脂質合成能や脂質組成を正しく検索することはできない。そこで本研究では、脂質をまったく含まない当科で開発した無血清培地⁶⁾を用いて各種培養細胞の脂質合成能の検索を行った。

口腔粘膜由来正常上皮細胞および唾液腺由来上皮細胞では PL 合成能が最も高く、つづいて FCh, TG を認め、口腔粘膜由来上皮細胞と唾液腺由来上皮細胞はほぼ同様の脂質合成能を示した。NL/PL は口腔粘膜由来上皮細胞が0.65、唾液腺由来上皮細胞が0.73であった。Ponccら²¹⁾は血清添加培地を用いて表皮由来keratinocyteの脂質代謝を検索し、PL 合成能が最も高く、つづいて TG, ChE が認められ、FCh はごくわずかししか認められなかったと報告している。われわれの無血清培地での結果では17.5%の FCh 合成を認めた。彼らとわれわれの結果ではこのように FCh 合成能に大きな差が存在するが、これは由来組織の差はあるものの血清中のコレステロールにより keratinocyte のコレステロール合成の律速酵素である HMGCoA Reductase²⁴⁾の活性が抑制された結果であると考えられ、彼らは細胞本来ではなく血清中の脂質に修飾された脂質合成能をみていていると考えられる。

扁平上皮癌細胞 UE, NA, KA および AJC では、合成された脂質の70%以上は PL で、FCh, FFA, TG などの NL もわずかに認め、NL/PL は0.26~0.40と低い値を示した。一方、腺癌細胞 HSG, HSY では、PL 合成能は扁平上皮癌細胞と比較して低下し、FCh, TG, FFA, ChE の増大を認めた。NL/PL は HSG が1.69, HSY が1.56と中性脂質合成能の割合が大きくなり、扁平上皮癌細胞と腺癌細胞間では脂質代謝に大きな差があることがあきらかとなった。Poncc²¹⁾らは、血清添加培地を用いて検索を行い、分化度の低い表皮由来扁平上皮癌細胞ほど PL 合成能が高く、また、いずれの扁平上皮癌細胞も NL/PL が0.5以上であったと報告している。本研究に用いた扁平上皮癌細胞間では分化度の差による脂質合成能の差は認められなかった。

動物細胞の基本的な細胞膜を構成する PL は、主に PC, PS, PI, PE, SM の5種類と考えられている²⁵⁾。

今回検索した培養細胞では合成された PL の大部分は PC で、つづいて PE であった。正常細胞と癌細胞間で、あるいは、癌細胞の組織型によってその PL 合成能に特徴的な差は認められなかった。Poncc²¹⁾も合成された PL の多くは PC、つづいて PE であり、また、表皮由来 keratinocyte と表皮由来扁平上皮癌細胞で差を認めていない。また、正常細胞と癌細胞の脂質合成能を比較すると、扁平上皮組織では、分化度の高い口腔粘膜由来上皮細胞が扁平上皮癌細胞よりも中性脂質合成能が高かった。このように正常細胞と扁平上皮癌細胞で NL/PL に大きな差を認めた。さらに、口腔粘膜由来上皮細胞の分化誘導に伴い著明な Fch の増大と PL, TG の減少を認め、NL/PL は分化とともに24時間では0.65から1.05, 48時間後では0.62から1.01とあきらかに増大した。

従来、培養表皮 keratinocyte の分化の指標としては、ケラチン²⁶⁾、インボルクリン²⁷⁾などのタンパク質マーカーが用いられてきた。

一方、Hennings²⁸⁾により *in vitro* においてマウス表皮 keratinocyte の増殖と分化が培地中の Ca^{2+} 濃度により制御されていることが報告されて以来、培地中の Ca^{2+} 濃度調節による表皮 keratinocyte の分化誘導に伴う脂質代謝や脂質組成の研究も行われている。Okamoto²⁹⁾は分化に伴い cholesterol 合成の中間代謝物である lathosterol の合成が亢進することをあきらかにし、また Poncc²¹⁾らは分化に伴い NL/PL 値が上昇することをあきらかにしている。しかし、それらはいずれも10%血清添加培地を用いた検索結果であり、血清中の脂質による影響を受けていることを否定できない。われわれの結果から NL/PL とりわけ FCh/PL 値は正常上皮細胞の分化の指標となり得ることが、また癌化に伴い分化度の低下とともに同値の低下をきたすことがあきらかとなった。

今回われわれは、全細胞の脂質合成能について報告したが、遠心分画法により細胞内の各構成成分における脂質合成を検索した結果、細胞膜への新たに合成された脂質の取り込みと全細胞の脂質合成能との間に差を認めなかった(未発表データ)。したがって今回検索した脂質合成能が細胞膜の脂質組成を反映しており、腺癌細胞と比較して扁平上皮癌細胞の膜の疎水性はより高いと考えられ、親水性の抗癌剤が腺癌細胞に取り込まれやすく、疎水性の抗癌剤が扁平上皮癌に取り込まれやすいという結果を説明することができる。これらのことから癌細胞膜の脂質組成に応じたリポゾームを作成し、リポゾーム-抗癌剤複合体あるいは癌細胞膜の疎水性に応じた抗癌剤を選択することにより、薬剤の癌細胞内濃度を選択的に上昇させることが可能となり、高い治療効果が期待できると考えられる。

結 語

著者らは無血清培地を用いて口腔粘膜由来ならびに唾液腺由来正常上皮細胞および口腔癌細胞の培養を行い、[2-¹⁴C] acetate の脂質画分への取り込みを指標として各細胞の脂質合成能を検索し以下の結果を得た。

1. 口腔粘膜由来正常細胞では PL 合成能が最も高くつづいて FCh, TG, FFA, ChE が認められた。唾液腺由来上皮細胞においても口腔粘膜由来正常細胞とほぼ同様な脂質合成能を認めた。
2. 扁平上皮癌細胞ではいずれも合成された脂質の大部分は PL で、FCh, FFA, TG もわずかに認められた。しかし、ChE は認められなかった。また、NL/PL は低値を示した。
3. 唾液腺癌細胞では PL 合成能は扁平上皮癌細胞よりも低下し、FCh, FFA, TG, ChE の増大を認め、NL/PL は高値を示した。
4. すべての培養細胞において合成された PL のうち PC 合成能が最も高く、つづいて PE であった。正常細胞と癌細胞間で、また、扁平上皮癌細胞と腺癌細胞間で合成された PL の組成にあきらかな差を認めなかった。
5. ヒト口腔粘膜由来上皮細胞の分化誘導に伴い FCh 合成能の増大と PL, TG の低下を認めた。分化に伴い NL/PL, とりわけ FCh/PL は上昇した。

以上の結果から正常上皮細胞の分化の指標として NL/PL が有用であること、癌化に伴い同値が低下することがあきらかとなった。また扁平上皮癌細胞は腺癌細胞と比較して膜の疎水性が高いことが示唆された。

引 用 文 献

- 1) 虎谷茂昭, 岡本哲治, 他: フェオフォバイドールを用いた光力学療法の基礎的研究. 第50回日本癌学会総会記事 428 1991.
- 2) 古江美保: 腫瘍細胞におけるシスプラチン耐性の温熱による克服. 日口外誌 37: 1217-1233 1991.
- 3) Spector, A., Mathur, S., et al.: Lipid nutrition and metabolism of cultured mammalian cells. Prog Lipid Res 19: 155-186 1981.
- 4) Barnes, D. and Sato, G.: Serum-free cell culture: a unifying approach. Cell 22: 649-655 1980.
- 5) Barnes, D. and Sato, G.: Methods for growth of culture cells in serum-free medium. Anal Biochem 102: 255-270 1980.
- 6) Myoken, Y., Okamoto, T., et al.: An alternative method for the isolation of NS-1 hybridomas using cholesterol auxotrophy of NS-1 mouse

- myeroma cells *In vitro Cell Dev Biol* 25: 477-480 1989.
- 7) Myoken, Y., Kayada, Y., et al.: Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) produced by A-431 human epidermoid carcinoma cells and identification of VEGF membrane binding sites. *Proc Natl Acad Sci* 88: 5819-5823 1991.
 - 8) Miyauchi, S., Moroyama, et al.: Malignant tumor cell lines produce interleukin-1-like factor. *In vitro Cell Dev Biol* 24 :753-758 1988.
 - 9) 宮内 忍, 諸山隆正, 他: 頬粘膜扁平上皮癌由来細胞株による インターロイキン-1 様物質の産生. *日口外誌* 34: 7-14 1988.
 - 10) Dianging, Wu., Mikio, Kan, et al.: Characterization and molecular cloning of a putative binding protein for heparin-binding growth factors *J Biol Chem* 266 1991. (in press)
 - 11) 宮内 忍, 諸山隆正, 他: 人口腔癌由来細胞株 (Ueda-1) の樹立. *日口外誌* 31: 1347-1351 1958.
 - 12) Yanagawa, T., Hayashi, Y., et al.: Generation of cells with phenotypes of both intercalated duct-type and myoepithelial cells in human parotid gland adenocarcinoma clonal cells grown in athymic nude mice. *Virchows Arch [B]* 51: 187-195 1986.
 - 13) Shirasuna, K., Sato, M., et al.: A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. *Cancer* 48: 745-752 1981.
 - 14) Tsao, M.C., Walthall, B.J., et al.: Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. *J Cell Physiol* 110: 219-229 1982.
 - 15) Crabb, J.W., Armes, L.G., et al.: Characterization of multiple forms of prostatropin from bovine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 136: 1155-1161 1986.
 - 16) Yuspa, S.H. and Harris, C.C.: Altered differentiation of mouse epidermal cells treated with retinyl acetate *in vitro*. *Exp Cell Res* 86: 95-105 1974.
 - 17) 尾崎輝彦, 岡本哲治, 他: 口腔由来正常上皮細胞および口腔癌細胞の無血清培養下での増殖に及ぼす EGF, FGF の影響ならびにこれら細胞における受容体解析. *日口外誌* 37: 1454-1465 1991.
 - 18) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254 1976.
 - 19) Bligh, E.G. and Dyer, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917 1959.
 - 20) Anders, P. and Armand, G.: Solvents for thin layer chromatography of blood serum lipids. *Nature* 212: 402-403 1966.
 - 21) Ponc, M., Kempenaar, J., et al.: Regulation of lipid synthesis in relation to keratinocyte differentiation capacity. *Biochim Biophys Acta* 921: 512-521 1987.
 - 22) Williams, M.L., Rutherford, S.L., et al.: Density-dependent variations in the lipid content and metabolism of cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 91: 86-91 1988.
 - 23) Ponc, M., Weerheim, A., et al.: Differentiation of cultured human keratinocytes: Effect of culture conditions on lipid composition of normal vs malignant cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 25: 689-696 1989.
 - 24) Joseph, L.G. and Michael, S.B.: The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann Rev Biochem* 46: 897-930 1977.
 - 25) Alberts, B., Brey, D., et al.: Molecular biology of the cell. 2nd Ed, Garland Publishing Inc. New York & London, 1989, p 280.
 - 26) Fuchs, E. and Green, H.: Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell* 25: 617-625 1981.
 - 27) Watt, F.M. and Green, H.: Stratification and terminal differentiation of cultured epidermal cells. *Nature* 295: 434-436 1982.
 - 28) Hennings, H., Michael, P., et al.: Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell Cell* 19: 245-254 1980.
 - 29) Okamoto, T., Moroyama, T., et al.: Differentiation of cultured epidermal keratinocytes related to sterol metabolism and its retardation by chemical carcinogens. *Biochim Biophys acta* 805: 143-151 1984.