膀胱腫瘍の単層培養 第2報

慶応義塾大学医学部泌尿器科学教室 矢島 暎 夫
(主任: 大越正秋教授)

MONOLAYER CULTURE OF HUMAN URINARY BLADDER TUMORS:II

Teruo Yajima

From the Department of Urology, School of Medicine, Keio University, Tokyo

(Director: Prof. M. Ohkoshi)

1. Culture cells originated from human bladder carcinoma tissue, (transitional cell carcinoma Grade 3) have continued active proliferation over 920 days passing 30 times of subcultures since the preliminary report which described the successful culture of the cells as they passed 12 months.
2. The cells are stable and tend to be more monomorphic by passing subcultures.
3. Colonies of the cells are larger and thinner than that of HeLa cells cultured in the same conditions.
4. Mean generation time of the cells was 36 hours by the growth curve.
5. Activities of β -glucuronidase determined by histochemistry on the cells showed high in the primary cultures but gradually decreased by passing subcultures. The enzyme activities in HeLa cells were lower and diffuse. There was no remarkable differences in lactic dehydrogenase and succinic dehydrogenase activities.
6. Diacetylglucarodilactone, an inhibitor of β -glucuronidase affects on the primary culture cells but not on the cells after passing subcultures. The degree of degeneration was severer than on the HeLa cells in the same conditions.
7. Activities of β -glucuronidase in culture with chemically determined media remained high in the primary cultures but lowered by passing subcultures. The enzyme activities in HeLa cells were lower than in the cells.
8. By electron microscopy several morphological characteristics of transitional cells, microvilli on the surface, intercellular connections, and intracellular compressive vesicles were observed in the cells.
9. Tetracycline fluorescence of the cells was strongly observed than the HeLa cells under ultraviolet fluorescence microscope.

I 緒 言

著者は、膀胱腫瘍の単層培養を試み、得られた細胞を用いて細胞における膀胱腫瘍の研究を行なっているが、その1部はすでに日本泌尿器科学会雑誌第59巻第2号に第1報として発表した。

現在まで、50例以上におよぶ膀胱腫瘍の単層培養を試みたが、このうち移行上皮癌第Ⅲ度の1例は、1966年12月24日に初代培養を試み、1969年7月10日現在、継代培養30代、920日を経過し、なお、この上皮様細胞は活発な増殖を続けている。このような長期間の膀胱癌由来の上皮様細胞が、単層培養により継持されている例は、本邦はもちろん、外国文献においても最初の報告である。細胞を組織より生体外にとり出し *in vitro* で培養し、

発育してくる諸種細胞を、生物学的に、あるいは形態学的に観察するとともに、組織化学、あるいは細胞化学的方法を用いて検索することの重要性は言うまでもない。

著者は、第I報に述べた方法によつて、長期間単層培養した膀胱癌由来細胞の発育、増殖の状態を述べるとともに、この細胞を形態学的、酵素学的に検討し、又、電子顕微鏡学的にも観察した。細胞化学的特性については、HeLa細胞と比較検討し若干の結果を得たのでここに報告する。

II 研究材料並びに研究方法

1. 単層培養の方法

膀胱腫瘍の単層培養の手技および培養結果に関しては、第1報に詳細に報告した。すなわち、培養液として

10~20%仔牛血清（千葉血清）を加えた Eagle 氏液を使用し、材料からの細胞遊離では、トリプシン消化法を用いず、鈍針による mince 法にて行ない、37°C pH 7.4 の条件下で培養した。なお、培養液の交換は、原則として4日に1度行ない、培養液のpHの変化の激しい時には、2~3日で交換した。

培養瓶としては、一般には TD15 フラスコを使用し、多量の細胞を必要とする時にのみ TD40 フラスコにて培養した。

なお、初代培養では、著者の経験から、pH 6.2~7.0 位の酸性傾向とし、仔牛血清は10%以下の添加の方が、20%のものよりガラス面への附着性が良い。

初代培養時は、4日間は絶対に静置し、不必要な震動は禁忌である。培養瓶は新しいものよりも、数回使用されたものの方が、ガラス面への附着性が良い。新しい培養瓶を使用する時には、滅菌後、培養液の無菌テストを兼ねて、7日間、培養液のみを入れて培養器に保存し、その後初めて本培養に使用した。

継代培養の方法：TD 15 フラスコ内で作られた cell sheet を柔かいゴム片でこすり取りピペット操作で細胞を分散させる方法で行なつた。ゴム片でこすり取つた時には、かなりの大きさの細胞塊として剥れてくるが、培養液中で、静かにピペット操作を繰り返すことにより、細胞はかなり細かく分散される。顕微鏡下で観察すると、最大の細胞群でも4~10個の細胞より成り、単一細胞の方が多い。

継代時の細胞数は、 10^5 個/mlの割合で、この際にも4日間の絶対静置を厳守する。又、初代培養時と同様pHは酸性傾向で、6.5~7.0。仔牛血清添加は5%が成功率が高い。

継代培養の時期については、48時間で培養液のpHが1.0以上酸性化する場合、すなわち、細胞数で言えば、TD 15 フラスコ内で $6 \sim 8 \times 10^5$ 個以上になつた時である。ちなみに、TD 15 フラスコの底面積は、 15cm^2 、使用する培養液量は 2.0ml である。

又、継代培養時の培養液の温度は、30~38°Cの 때가最も成功率が高く、これは、初代培養時の10~38°Cの時に比較して、かなり敏感である。

2. 細胞の発育速度の測定法

培養細胞の発育、増殖速度を判定するには種々の方法があるが、著者は培養細胞を直接数え、その増殖曲線を求めた。

TD 15 フラスコより TD 40 フラスコに継代転移培養

し、多数のコロニーを作らせた後トリプシンを加えて、30分間37°Cで培養する。500回転10分間遠沈後、上清を捨て新鮮な培養液で3回遠沈、洗浄を行なう。静かなピペット操作で、細胞浮遊液とし、一部を採取して核染色を行ない、生存細胞と壊死細胞との比率を観察し、生存細胞 10^5 個/mlの割合で数本の TD 15 フラスコに継代培養し、48時間毎にトリプシン消化法を用い、細胞数の計算は Thoma Zeiss 血球計算板によつた。

培養液交換は Harris 法に基づき、24時間毎に培養液の50%を交換した。

3. 培養細胞の酵素組織化学的観察法

i) 材料

材料としては、膀胱腫瘍組織より直接凍結切片としたもの、初代単層培養後7日目のもの、継代培養28代目のもの、および HeLa 細胞を使用した。単層培養の細胞は、いずれも培養液交換後、24時間目のものを使用した。大部分の材料は Leighton 管内のカバースリップ上に転移培養し、カバースリップごと固定、染色、観察を行なつた。一部のものは、TD 15 フラスコに培養のまま、固定、染色、培養を行なつた。

著者は以上の材料を使用して、 β -グルクロニダーゼ、乳酸脱水素酵素 (LDH) およびコハク酸脱水素酵素 (SDH) 等の活性を染色、観察した。

尚、 β -グルクロニダーゼ活性を抑制する diacetylglucarodilactone の Na 塩 (SLNA と略す) を培養液中に 100 γ /ml で添加し、膀胱腫瘍由来細胞を HeLa 細胞と比較検討した。

ii) β -glucuronidase 活性染色法

著者は naphthol AS-BI glucuronide 法 (同時 AZO 結合法) により染色を行なつた。すなわち単層培養標本 (カバースリップ) を新鮮培養液で洗浄後、生食水にて2回洗浄する。4%フォルマリンに1%の塩化カルシウムを含んだ formol calcium 液で4°C、2時間固定を行なう。水洗することなく、0.88M 蔗糖液に1%の gum acacia 含有の hypertonic gum succrose medium に4°C、2時間入れる。基質液は、28mg の naphthol AS-BI glucuronide を 1.2ml の 0.05M sodium bicarbonate に溶解し、0.2N 醋酸緩衝液 (pH 5) を加えて 100 ml とする。Pararosanilin 液は、1mg の pararosanilin hydrochloride を 20ml の 蒸留水に溶解、更に 5 ml の 1N-HCl を加え、冷却、濾過する。反応液としては、pararosanilin 液 0.3ml に硝酸ソーダ液 (4%) 0.3 ml を加え、1分後に基質液 10ml を加える。IN-NaOH

でpH 5.2に調整し、蒸留水を加え総量を20ml とする。37°Cで5～10分反応させ methyl green で核染色を行なった。染色後のカバースリップは、アルコール脱水後、キシロールを通し封入した。

SLNA の添加方法

β -glucuronidase 活性阻害物質と云われている diacetylglucarodilactone Na 塩 (SLNA) を培養液中に添加反応させた後、膀胱腫瘍単層培養細胞および HeLa 細胞について β -glucuronidase 活性を染色し、それぞれ比較検討した。

SLNA 100 γ /ml を培養液に加え、37°C、2時間培養した。

iii) 乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性染色法

この系の脱水素酵素群は、すべて助酵素 NAD を必要とする。基質の濃度は Sodium lactate 0.5M を 4 ml, 磷酸緩衝液 0.1M, pH 7.4 を 11ml, nitro-BT solution (50mg/3 ml) を 3 ml, NAD₂ (98%) 2.5ml, KCN 0.1M を 2 ml, HCl (0.5M) 5 滴を順番に溶解混和し、最後に pH 7.2～7.4 に調整した。37°C で 10 分間反応させた。

iv) コハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性染色法

SDH は助酵素を必要としない。この場合は染色前に固定を行なうと酵素活性を低下させるため、標本を生食水で洗浄し、培養液を落すのみとした。

Sodium succinate 0.2M を 5 ml, 磷酸緩衝液 0.2M, pH 7.6 を 5 ml, nitro-BT solution (1 mg/ml) 10ml を溶解混和し、37°C、10分間反応させた後、10%フォルマリンで固定した。

4. 培養液中の酵素活性の生化学的測定法

培養液交換前後の培養液組成を生化学的に測定した。検体として培養液交換後 4 日目のものを使用した。又、各酵素活性の単位は、各細胞 10⁵ 個当りの数字で表現した。

i) 培養液中の β -glucuronidase 活性測定の方法

著者は W.H. Fishmann 法に基づき β -glucuronidase 活性を測定した。すなわち、0.01M, pH 5.0 の PMG (phenol phthalein mono glucuronide) を 0.1ml, 0.1M, pH 4.5 の醋酸緩衝液を 0.8ml, および検体の培養液 0.1ml を混和し、37°C で 24 時間 incubate する。その後、0.1M, pH 9.6 の glycine NaOH 緩衝液 2.5 ml を加え、5% TCA で除蛋白し、蒸留水 6.0ml を加え 550m μ の吸光度を測定した。

ii) 培養液中の SDH 活性測定法

0.1M KCN 0.6ml, 0.01M K₃Fe(CN)₆ 0.6ml, 0.2 M sodium succinate 0.4ml, 0.1M Tris 緩衝液 4.4 ml, 検体である培養液 0.1ml を混和し、次いで、400 m μ の吸光度の変化を 15 秒毎に 3 分間測定し K₃Fe(CN)₆ の酸化度より活性をみた。対照としては、sodium succinate を除き、同量の緩衝液を加えたものを使用した。

iii) 培養液中の LDH 活性測定法

検体の培養液 0.1ml に蒸留水 0.5ml を加えた後、基質液 (焦性ブドウ酸リチウム) 1.0ml, NADH₂ 1 mg を混和、37°C で 30 分間 incubate する。次いで、呈色液 (2,4 dinitro phenyl hidradin) 0.1ml を加え、室温に 20 分間放置、0.4N, 10.0ml を加え、室温に 5 分間放置後、500m μ の吸光度を測定した。

5. 培養細胞の電子顕微鏡的観察の方法

移行上皮癌由来細胞の継代培養 28 日目の細胞を使用した。直径約 0.8～1.5cm のコロニーに形成された cell sheet を柔らかいゴム片で TD15 フラスコより原型を崩さないように cell sheet のまま剝離し、新鮮な培養液中に浮遊させる。細かい組織化学用のネットで cell sheet を掬い、ネットのままオスミウム酸で 20 分間固定した。次いで cell sheet をペニシリン瓶に移し、脱水操作を行なった。

予め水平面を持つた epon block を作製しておき、この水平面に固定、脱水した cell sheet をカミソリで細断して、1 滴の epon と共に載せ包埋する。この結果、細胞は単層の cell sheet を形成したまま水平に包埋されたわけである。このブロックをマイクロームで伸展した細胞の水平面での切片標本とした事により、単層培養細胞間の関係などが、より明確に観察することができた。

6. Tetracycline による培養細胞の蛍光観察法

膀胱移行上皮癌由来細胞の培養継代 28 日目の細胞および HeLa 細胞を Tetracycline 10 γ /ml の割合で加えた培養液で、24 時間培養後、新鮮な培養液で洗滌し、培養瓶ごと両細胞の蛍光発色をニコン蛍光顕微鏡で観察した。この場合、培養液の pH は 6.0～6.5 位で最も良い成績を得た。この pH の培養液では、24 時間の培養が限度である。又、著者は、培養前の膀胱腫瘍細胞の蛍光発色も検討した。すなわち McLeay に準じ Tetracycline の血中濃度が 5～10 γ /ml になるように膀胱腫瘍患者に Tetracycline 500mg を 6 時間毎に経口的に 4 日間投与し、12 時間の休業時間で、正常組織より Tetracycline を排除し、膀胱腫瘍組織にのみ残存せしめた。その後、

手術的に膀胱腫瘍を切除し mince 法にて組織を細断し、その蛍光発色を観察した。

III 研究結果

1. 長期間単層培養された膀胱移行上皮癌由来細胞の形態的観察

著者は、1966年12月に58才男子の膀胱腫瘍患者より採取した移行上皮癌細胞 grade III の初代培養を試みたが、この例は1969年6月30日迄 900日30代の継代培養に成功している。

i) 増殖状況からの経過からみた観察

初代培養時、発育良好で、原細胞塊を中心に、多角形、扁平な上皮様細胞が敷石状に配列し colony 周辺では、多数の活発な増殖を示す偽足がみられた（第1図）。初代培養から第2代目に継代するのに約30日間要したが、第3代目より第10代目に至る、約1年間の細胞の増殖速度は極めて遅く、継代培養は困難を極めた。第12代目継代時より、細胞増殖速度は次第に早くなり、20代目以後では、ほぼ14日に1度の割合で継代培養可能となった。尚、継代培養の時期判定については、継代培養の方法の項で詳細に述べたので省略する。

ii) Colony の観察

この例における単層培養細胞のcolonyは、HeLa細胞のcolonyに比較して極めて大である。すなわち HeLa細胞のcolonyは著者の培養条件下においては、最大4～5mm直径のcolonyを作り、それ以上大きくならない。そして、colony 中心部は、過剰増殖著明で、萎縮し重層した細胞群が見られる。周辺部においては単層細胞が発育を続け、隣接colonyと融合して行くが、決してcolonyの直径そのものは大きくはならない。又 HeLa細胞においては、中心部の過剰増殖の部分が脱落することはない。肉眼的に観察すると、中心部の過剰増殖の部分が白濁して見えるのみで、colony 周辺部の単層細胞の部分は、光学的にはじめて見える程度である（第2図）。

これに反して、移行上皮癌由来細胞の単層培養colonyの直径は、極めて大で、最大約3cm直径のものが認められた。しかし、1.5～2.0cmのcolonyが最も多く、この大きさで、中心部がガラス面より脱落し、肉眼的にリング状を呈する事が多い。この中心部を検鏡すると萎縮し、顆粒の多い細胞が敷石状に、充実性に配列しているが、重層化することは極めてまれである。

又、肉眼的にcolonyを観察すると、白濁したcolonyの境界は鮮明で、この点 HeLa細胞のcolonyとは全

く異つた印象を受ける。このことは、後にも述べるが HeLa細胞に比較して、細胞1個の大きさには差はないが、原形質内の顆粒が、膀胱腫瘍より採取した細胞の方に、明らかに多量であるために、肉眼的確認が可能であると思われる。

iii) 細胞の形態的観察

初代培養時の細胞は、明らかな敷石状配列を示す cell sheet を形成しているが、個々の細胞を観察すると、その形態は一様ではなく、三角形を呈するもの、紡錘形を呈するもの、多角形を呈するものが混在する。しかし、大多数の細胞は多角形を示し、胞体は大きく、核内は明るく1～2個の核小体が見られる。これは、明らかに上皮性細胞と思われ、発育帯周辺の細胞は偽足を出しているのが見られる。尚、著者は、膀胱腫瘍の他の例において、明らかに、非上皮性と思われる細胞の培養に成功したが、これは胞体の小さい紡錘形の細胞で長軸方向に伸展しているのが見られる（第3図）。

形態学的にのみ考えれば、前者は、明らかに上皮性、後者は線維芽細胞と思われる。

継代5代目頃、細胞は漸次単一性となり、初代培養時に比較して、その配列の仕方もむらのない敷石状を呈するようになる。継代を繰り返すことにより、細胞の単一性は一層著明となり（第4図）、紡錘形を呈することはほとんどなくなり、多角形で胞体は大きく、1～2個の核小体を有する核内は明るい。胞体内の細胞膜周辺には、大きさの揃った顆粒が多く見られ（第5図）、位相差顕微鏡下で観察していると、この顆粒はかなり活発に動いている。Cell sheet 周辺部の細胞は、偽足を盛んに出し、かなり長いもの迄観察できる。同じ条件で培養中の HeLa細胞と比較すると HeLa細胞では周辺の細胞が偽足を出すことはまれであり紡錘型を呈することが多い。継代30回のもものでは細胞の単一性は更に著明となる。

2. 発育速度の測定結果

膀胱移行上皮癌由来の培養細胞 890日目の増殖曲線を求めた。すなわち、細胞数 $0.13 \sim 0.16 \times 10^6$ 個/mlで培養を開始した。培養後、48時間目では、 $0.36 \sim 0.44 \times 10^6$ 個/ml、96時間では、 $1.23 \sim 1.51 \times 10^6$ 個/ml、144時間では、 $2.74 \sim 2.99 \times 10^6$ 個/ml、192時間では、 $4.76 \sim 5.42 \times 10^6$ 個/ml、240時間では、 $5.78 \sim 6.38 \times 10^6$ 個/ml、と増殖した。

これを曲線であらわすと、（表1）の様になる。縦軸は細胞を logarithm で表現し、横軸は培養時間で48時

表1 Growth Curve Monolayer Culture Cells of Human Bladder Tumor

間毎に測定した。

この増殖曲線より平均世代時間を求めると、36時間となる。

3. 酵素組織化学的観察結果

i) 膀胱移行上皮癌由来細胞の β -glucuronidase 活性

a) 初代培養 7 日目の細胞

種々の型の細胞がみられるが、原形質内にかなり大きな円形の β -glucuronidase 活性を示す赤褐色顆粒がみられ、その活性は強度で、境界鮮明なものが多い。活性顆粒は原形質内に偏在し、その大きさは種々であるが、数は1細胞あたり1個である。しかし、少数ではあるが、細胞全体に彌蔓性に強度の活性がみられる細胞があり、特に多角形の細胞に多くみられる。

又、colony 周辺の発育帯の細胞に、より強い活性が見られる。

b) 長期間培養（継代24代）の移行上皮癌由来細胞

初代培養細胞に比較して、明らかに β -glucuronidase 活性は低下しているが、各細胞においてその程度差があり、依然として強い活性顆粒を有する細胞があり、その顆粒は、やはり偏在している。原形質に、ビマン性に中等度の活性を示す細胞が多くみられ、特に核分裂を起している細胞に、強陽性の活性が見られた（第8図）。

c) SLNA を作用させた膀胱腫瘍初代培養 7 日目の細胞

小組織片を中心として敷石状の cell sheet を作っていた細胞は、SLNA を2時間作用させたことにより、大部分の細胞はガラス面から遊離し、又、残った細胞にも、強度の萎縮変性、空胞変性が見られた。しかし

β -glucuronidase活性は、かなり強度に残存していた。

d) SLNAを作用させた長期間培養（継代24代）移行上皮癌由来細胞

全体的に SLNA を作用させないものに比較して、明らかに β -glucuronidase 活性低下が見られた。Colony 周辺部発育帯の細胞に、中等度陽性の活性顆粒が比較的多く見られた。

又、初代培養細胞に比較して、細胞の萎縮変性、空胞変性などはほとんど認められない。しかし、SLNA を12時間作用させた場合には、細胞変性は強度で β -glucuronidase 活性はほとんど陰性化し、大部分の細胞はガラス面よりcell sheet を形成したまま剝離していた。

i 附) HeLa 細胞の β -glucuronidase 活性

a) 継代培養後 7 日目の HeLa 細胞

膀胱腫瘍の単層培養細胞と比較してみると明らかに β -glucuronidase 活性は低下し、又、各細胞における程度差もあまりみられない。活性顆粒も明確でなく、原形質全体にわたってビマン性に低い活性がみられる（第9図）。

b) SLNA を作用させた HeLa 細胞

SLNAを2時間は勿論のこと、12時間作用させても、膀胱腫瘍単層培養細胞に比較して細胞変性はほとんど認められず、ガラス面からの剝離は全くなかつた。又、SLNAを作用させない細胞に比較して β -glucuronidase 活性値はほとんど変化がなく、むしろ上昇の傾向が認められた。そして SLNA を作用させる前には原形質内にビマン性に存在していた活性は、境界は不鮮明ではあるが、原形質内に偏在する顆粒として観察出来る細胞がかなり出現した。

上記の結果を要約すると次の様になる。

すなわち (1) β -glucuronidase 活性は、HeLa 細胞に比較しと移行上皮癌由来細胞に高値に認められた。

(2) 移行上皮癌由来細胞においては、初代培養時にその活性が最も強く認められ、又、その活性部位は、顆粒状に見られるのが特徴的であつた。長期間培養するに従い、 β -glucuronidase 活性は次第に低下の傾向を示すが、その活性顆粒の特徴は維持されていた。(3) SLNA は培養後間もない移行上皮癌由来細胞ほど強く作用し、細胞変性を与えるが β -glucuronidase 活性にはほとんど影響を与えない。しかし、長期間培養細胞ではSLNA を2時間作用させても、培養後間もない細胞程、強い細胞変性はみられないが、 β -glucuronidase 活性値は明らかな低下を示す。

(4) HeLa 細胞にSLNAを2時間では勿論のこと12時間作用させても、移行上皮癌由来細胞に比較してほとんど細胞変性を起こさない。又、 β -glucuronidase 活性値の低下は全くみられず、前述したように SLNA 作用以前に比較して、むしろ上昇の傾向を示した。

ii) 膀胱移行上皮癌由来細胞の LDH 活性

a) 初代培養7日目の細胞

原形質全体にわたって、強度の活性が見られ、特に細胞膜周辺部に著明であつた。明瞭な活性顆粒としては認められず、ビマン性であつた。各細胞についての活性の差は明瞭でない。

b) 移行上皮癌由来の継代24代目の培養細胞

各細胞間の活性の程度差は全く見られず、又、その活性は、原形質の一部の細胞膜周辺に局限している(第10図)。

ii 附) HeLa 細胞

移行上皮癌由来培養細胞、継代20代目の細胞の場合の活性と、ほとんど差はないが、各細胞の程度差があり、やはり、一部の細胞膜周辺に局限している。

iii) コハク酸素脱水酵素 (SDH) の活性

a) 膀胱移行上皮癌初代培養4日目の細胞

移行上皮癌由来細胞では一般に軽度陽性で一部に強陽性を示す細胞がある。

b) 移行上皮癌由来、継代24代目の細胞

Colony 周辺部発育帯附近に、かなり高い活性を示す細胞が見られ、これに反して colony 中心部では SDH 活性はほとんど認めない(第11図)。

iii 附) HeLa 細胞

原形質全体に強い活性を示す細胞が点在し細胞間の程度差は著明である。おおよそ、40~60個に1個の割合で活性を示す細胞が見られる。SDH 活性においては、HeLa 細胞と膀胱移行上皮癌由来細胞との差は、明らかではない(第12図)。

4. 培養液の生化学的分析結果

前述した通り、著者が使用している培養液は Eagle氏液に5%の仔牛血清および100 γ /mlのSM、100万単位/mlのPCを添加し、pH 6.8~7.4に調整したものである。仔牛血清濃度およびpHは培養方法、細胞の状態で随時最適のものとした。

i) 培養液の電解質その他

10%仔牛血清を添加し、pH 7.4に調整した時の使用前の培養液、移行上皮癌由来の継代25代目の cell sheet で細胞数はおおよそ、6.2 $\times 10^6$ 個の細胞を4日間培養

表2 培養液の電解質その他

	使用 前	使 用 後	
		膀胱腫瘍細胞	HeLa
総蛋白 (%)	0.6	0.6	0.6
尿素窒素mg/dl	ほとんど 0	ほとんど 0	ほとんど 0
尿酸 mg/dl	測定不能	測定不能	測定不脈
Cl mEq/l	132.2~ 132.7	140.2~ 140.6	140.2~ 140.7
Na //	137.4~ 138.1	139.6~ 140.8	140.4~ 141.0
K //	6.1~ 6.3	6.3~ 6.4	6.5~ 6.6
Ca //	4.61~ 4.64	4.62~ 4.64	4.63~ 4.64
無機磷 //	2.25~ 2.30	2.34~ 2.36	2.12~ 2.19
磷脂質 mg/dl	24~25	37~39	21~23
CO ₂ 含有量 Vol %	26.8~ 26.9	12.3~ 12.7	12.4~ 12.7

した後のもの、および 6.0 $\times 10^6$ 個の HeLa 細胞の cell sheet を4日間培養した後のものの電解質その他を測定し、比較検討した(表2)。

これによると、10%仔牛血清を添加した使用前の培養液の総蛋白量は0.6%で、これは、膀胱移行上皮癌由来細胞、HeLa 細胞共に使用後も0.6%で4日間の培養においてはその消費はない。

尿素窒素、尿酸は、いずれも使用前、後で変化はない。

Cl は、使用前に比して両細胞共に使用後に著明に増加し、両細胞間には、差はほとんどない。

Na は使用前に比して両細胞共に上昇し、特に HeLa 細胞においてその増加は著明である。Kにも同様の傾向がみられた。

Ca は、使用前後に於いて両細胞とも変化はほとんどない。

無機磷については、膀胱移行上皮癌由来細胞において、使用後に軽度の増加がみられ、逆に HeLa 細胞では軽度の減少がみられた。

磷脂質をみると、膀胱移行上皮癌由来細胞では、使用前に比較して明らかな使用後の増加がみられ、逆に減少が見られる HeLa 細胞とは、はつきりした差が出ている。

CO₂含有量は、使用後では明らかな酸性化が見られ、これは培養液の黄変およびpH測定でも証明される。

ii) β -glucuronidase 活性

膀胱移行上皮癌由来細胞 培養 7 日目の細胞を 4 日間培養後の培養液中の β -glucuronidase は、0.203～0.285単位/ml で最高値を示し、この細胞に 2 時間、100 γ /ml の SLNA を作用させた後のものでは、0.108～0.147単位/ml と、著明な活性低下をみた。膀胱移行上皮癌由来細胞、初代培養後 14 日目のものでは、0.117～0.121単位/ml で、同様の SLNA 作用後は、0.062～0.068単位/ml、移行上皮癌由来、継代 28 代目のものでは、SLNA 作用前では 0.075～0.089単位/ml で、作用後は 0.017～0.027単位/ml と、いずれもかなりの β -glucuronidase 活性の低下がみられた。

これに対して HeLa 細胞は SLNA 作用前では 0.053～0.062単位/ml で、SLNA 12 時間作用後 0.045～0.051単位/ml と、移行上皮癌由来細胞に比較して、その活性低下の程度が極めて低い。

iii) LDH 活性

膀胱移行上皮癌由来細胞、初代培養 7 日目の細胞を 4 日間培養後の培養液中の LDH 活性値は 120,000～140,000単位/ml、同 14 日目のものでは 70,000～80,000単位/ml、同継代培養 28 代目のものは 20,000～30,000単位/ml、HeLa 細胞では 30,000～35,000単位/ml であった。

iv) SDH 活性

膀胱移行上皮癌由来細胞、初代培養 7 日目の細胞を 4 日間培養後の培養液中の SDH 活性は、150単位/ml、同 14 日目のものでは 60単位/ml、同継代培養 28 代目のものでは 10単位/ml、HeLa 細胞では 30単位/ml であった(表 3)。

5. 電子顕微鏡的観察結果

Cell sheet を形成して増殖している移行上皮癌由来細胞のうち、colony 周辺の細胞は、第 13 図に示す通りである。表面に microvilli(mv)が認められる。上部の

細胞は、胞体内の小器官の発達も良好で、活発な増殖力をおもわせる。糸粒体(M)、滑面小胞体(SER)、ribosome(R)、小顆粒の発達は良好である。又 compressed vesicle(c) 由来と思われる大きな空胞が散在している。下の細胞は、変性脱落の状態にあるものと思われ、multivesicular body(MB)が著しく多数認められる。第 14 図は cell sheet 中間部の細胞で、核は大型で、表面は平滑、細胞間の結合は tight の所と loose の所があり、間隙の広い部分では microvilli も認められる。胞体内小器官の発達は良好で Golgi 装置も見られるが、内面にわずかな凹凸を持つ compressed vesicle の大型のものが散在するのが目立つ。

第 15 図の細胞は、有糸核分裂像である。胞体内小器官は周辺に圧排されているが、特に滑面小胞体の発達は良好である。内面凹凸の compressed vesicle も散在している。細胞は全体として円型に近い。周辺には広い細胞間隙があり ribosome 変性顆粒を認める。

6. Tetracycline による蛍光について

継代中の移行上皮癌由来細胞の培養液中に 10 μ g/ml の oxy tetracycline を加えて 2 時間後に蛍光顕微鏡 S-F 型(ニコン)で観察した結果は、第 16 図に示した通りで、多数の細胞が蛍光を発している。蛍光の存在部位は、核か原形質内かは明らかでない。

第 17 図は HeLa 細胞を全く同様の条件下で観察した結果で、蛍光はほとんど認められない。

IV 考 按

既に、第 I 報¹⁾で述べたごとく、膀胱腫瘍細胞の単層培養は、極めて困難であるとされ、ほかに Cobb²⁾、Bergman and Bergman³⁾、近藤⁴⁾の報告が文献上に見られるのみであるが、最近、Jones⁵⁾は膀胱の epidermoid carcinoma の 1 例を 20 か月、25 回の継代に成功したことを報告している。

表 3 使用後培養液中の酵素活性

	β -Glucuronidase 単位/ml.	2 時間 S L N A 作用後	L D H 単位/ml.	S D H 単位/ml.
初代培養 7 日目	0.203～0.285	0.108↓0.147	120,000～140,000	150
〃 14 日目	0.217～0.121	0.062～0.068	70,000～80,000	60
継代培養 28 代	0.075～0.089	0.017～0.027	20,000～30,000	10
HeLa 細胞	0.053～0.062	12時間 S L N A 作用後 0.045↓0.051	30,000～35,000	30

著者は、第1報で34例の膀胱腫瘍症例から移行上皮癌の単層培養を行なつて、18例にガラス面に cell sheet を得た旨報告し、主として形態学的に検討し、15例は上皮性であると判定した。又、一部は ^3H -thymidine による in vitro autoradiography でこれらの細胞の増殖を検討し発表した。

第I報において既に8回の継代に成功し、12カ月以上にわたつて増殖を続けた移行上皮癌第Ⅲ度由来の細胞は(第19例, E.Y. 58才男子症例)その後も順調な発育で、内外のどの報告に見られるよりも長期間の培養、すなわち 920日、30回の継代に成功しており、その安定した増殖状態からほとんど株化したものと思われる。

今回の第II報では、この移行上皮癌由来細胞について、形態学的ならびに細胞生物学的に詳しく検討を加えた。

1. 形態学的観察について

Bergman and Bergman は、13例の膀胱癌組織を培養し、内5例に形態学的に上皮性細胞の増殖を得、その1例を4カ月間維持することに成功したが、その後の報告は見当らない。近藤は、血漿包埋法で最高90日間、上皮性細胞を維持したと報じている。

又、最近の Jones の報告では、3例の膀胱癌組織を培養して、1例に20回の継代、約600日の維持に成功しているが、細胞の大部分は fibroblast-like で、その間に少数の上皮様細胞が散在していると述べている。

著者の維持している、移行上皮癌由来細胞は、これらの報告のうち最長の Jones の600日をはるかに上廻るばかりか、細胞は光学顕微鏡下で、観察する限りでは、上皮性細胞が均一性である点で、内容的に全く意義が異ると云える。

人癌組織を試験管内で培養し、安定した株を得ようとする試みは、古くから行なわれている。すなわち Carrel and Burrows⁶⁾, Fisher⁷⁾, Gey and Gey⁸⁾ などによつて試みられ、これらのうちで Gey が発表した HeLa 細胞は、最も安定した上皮性の細胞株として受継がれている。しかし Dobrynin⁹⁾ は167例の人癌を培養して、3例が株化したとしている様に、人癌の培養は困難なことである。しかも、培養細胞が純粋に上皮性である場合は少なく、前述の Jones の例もほとんどは fibroblast-like の細胞であつた。又、Dobrynin の株化せしめた3例のうちでは、膀胱癌由来の1株のみ純粋に上皮性細胞より成り、他の2株(胃癌および乳癌由来細胞)は初期の数カ月間、トリプシンによつて線維芽細胞を除去す

ることを必要とした。Jones は、大部分を占める fibroblast-like の細胞をトリプシン消化によつて除去しようと努力を重ねている。著者の維持している細胞は、初代培養から、均一性に上皮様細胞であり、トリプシン処理を必要としなかつたことが、この様な長期間の培養に成功した要因の一つと考えられる。

形態学的に著者の移行上皮癌由来細胞は、多角形、扁平で、HeLa 細胞と比較して著しい差はないが、原形質内の顆粒は明らかに前者に多量であつた。又、HeLa 細胞では、周辺部の細胞に偽足が見られないが、著者の細胞ではこれが著明であつた。Bergman, Jones らの報告では、この点に言及していない。

しかしながら、長期間培養された人癌由来の細胞が、果して癌としての特徴を、どの程度に維持しているかについては問題になる点が多い。

形態学的観察のみでは、長期間培養された細胞では、次第に単一化し、通常の病理組織学での癌概念は失われていくのが普通である¹¹⁾。

従つて、個々の細胞の細胞株間の差は、多少存在しても、形態のみではその起源迄決定することは、困難である。Eagle¹²⁾ は、増殖能、栄養要求、Lieberman¹³⁾ らは酵素活性度について各細胞株間に明らかな差を認めないことを報告している。Berman¹⁴⁾, Hsu¹⁵⁾, Levan¹⁶⁾ らは正常細胞と癌細胞の差を、染色体の異数性(Heteroploid)で比較したが、正常組織由来の細胞でも継代しているうちに、異数性の細胞が出現することを認めている。

培養癌細胞の移植性については、Ehrlich 癌(JTC-12, 佐藤)¹⁷⁾や吉田肉腫(黒木)¹⁸⁾で検討され、悪性度の検討に応用されており Sanford¹⁹⁾ は移植能は動物継代を行なうことによつて上昇することを報告している。

しかし著者の細胞では未だ可移植性を検討する段階には至っていない。

勝田²⁰⁾は、培養細胞での腫瘍の悪性と良性について述べているが、その中で、生体内におけると同様に、試験管にて正常細胞と腫瘍細胞の共存の場を再現し、特に双子試験管を用いて検討している。

又、勝田²¹⁾らによれば、5度傾斜した試験管の培養液の“なごさ”の部分に、変異細胞の出現を認めており、悪性と良性の中間の細胞が存在しうること示唆している。従つて、培養細胞の悪性については、正常細胞あるいは、その中間にある細胞などの共存の場を作り動的にその性状を検討することの重要性が、今後の方向として強

第1図 膀胱腫瘍単層初代培養17日目の細胞。小組織片を中心に細胞が単層に増殖伸展しているのがみられる。核内は明るく1〜2個の核小体がみられる。上皮性の細胞と思われる。発育帯の端の細胞は偽足を出している。位相差顕微鏡写真 10×10

第3図 乳頭状癌第Ⅱ度のもので初代培養後24日を経過し cell sheet を作っている。胞体の小さい紡錘型で非上皮性のものと思われる細胞が長軸方向に伸展しているのがみられる。位相差顕微鏡写真 10×10

第5図 第7図の強拡大で核小体及び胞体内の顆粒がよくみえる。位相差顕微鏡写真 10×20

第2図 Bは膀胱移行上皮癌由来細胞のコロニー。Hは HeLa 細胞のコロニーでコロニーの大きさ cell sheet の厚さの差が明瞭である。

第4図 移行上皮癌第Ⅲ度継代培養24代目の cell sheet で、ますます細胞の単一性が明らかである。初代培養時の上皮性の細胞が引継がれ核内は明るく2—3の核小体がみられる。初代培養時に比較して、胞体内の顆粒が増加している。10×10

第6図 移行上皮癌第Ⅲ度継代培養30代目の cell sheet で、この頃になると細胞は全く単一化したと云える。胞体はより明るく、大きくなっている。位相差顕微鏡写真 10×10

第7図 胞体の顆粒は核膜周囲に著明にみられるようである。位相差顕微鏡写真 10×20

第9図 HeLa 細胞の β -glucuronidase 活性染色で膀胱腫瘍細胞にみられた活性顆粒も明確ではない。核分裂を起している細胞に最も強い活性がみられる。(矢印) 10×20

第11図 コロニーの中心部の写真で、ここではほとんどSDH活性はみられない。10×10

第8図 継代24回目の移行上皮癌由来細胞で β -グルクロニダーゼ活性顆粒は胞体内の一側に偏位し、その境界は比較的明らかなである。細胞の中には全くその活性を示さないものもみえる。核分裂を起している細胞にもその活性がみられる(矢印) 10×20

第10図 移行上皮癌Ⅲ度継代培養24代目の細胞のLDH活性染色で各細胞間の差は全くみられない。写真はコロニー中心部のもので単一性の細胞が敷石状に配列している。LDH活性は胞体の一侧で細胞膜周辺に強くみられる。10×20

第12図 HeLa 細胞のSDH活性染色で、強い活性を示す細胞が数個みられる程度で全くその活性をみないものが多い。10×10

第13図 コロニー周辺部の細胞。上部の細胞は糸粒体(M) 滑面小胞体(SER) compressed vesicle(c) など胞体内小器官の発達は良好。核は(N)やや表面不正形を呈す。表面には microvilli (mv) がある。核に近く均一の density の高い部分があり球形の小体(cp) が認められる。下の細胞は変性傾向にある。

第14図 Cell sheet 中間部の細胞. 核(N)の表面は平滑, 明瞭な核小体(NI)も存在する. 胞体内小器官のうち compressed vesicle (c) が目立つ. Golgi 装置(G)も見られる.

第15図 有糸核分裂を示す細胞で染色体(ch)が上下方向に分裂しつつある像が認められる。胞体内の小器官の発達は良好, compressed vesicle (c) も散在する。Density の高い顆粒(GR)と脂肪滴(L)がみられる。

第16図 移行上皮癌由来継代30回の細胞の tetracycline による蛍光 蛍光顕微鏡 10×10

調される次第である。

2. 発育速度について

移行上皮癌由来の細胞は、継代の途中何回かの緩徐増殖期を経て、12回目の継代から次第に発育速度が早くなつて来ている。20回目の継代を過ぎてからは、14日目毎の継代が可能となつた。

発育速度の測定には、面積計算法、重量測定法、直接細胞カウント法、DNA 合成からの算出法などがある。著者は Harris²²⁾ の方法によつて発育速度を測定した。最近では、自動血球計算器による測定法も行なわれているが、著者の細胞では、大きさの均一性の点で使用困難と考えられた。

初代培養から 890日現在の増殖曲線を、全く同じ条件下で培養している HeLa細胞と比較すると、この時点では著者の細胞の平均世代時間36時間に対して、HeLa 細胞では48時間であつた。これは、人癌由来の細胞としては、非常に活発な増殖を続けていることを示している。

コロニーの面積算出法は、Fischer²³⁾ により始められた classic な方法であるが、著者の移行上皮癌由来細胞では、継代後コロニーの直径が15~20mmになると、次第に中心部が壊死になつて脱落し、リング状を呈するのでこの方法の応用は困難であると判定した。これに比較し HeLa 細胞では中心部の壊死は起こらず、コロニーの直径は4~5mm迄である。

この点で考えられることは、著者の移行上皮癌由来細胞では、ガラス面への接着力が弱く、重層化するに従い、この接着力は更に低下する。一方の HeLa 細胞では、重層化の傾向が強く、重層化してもガラス面への接着力の低下は起こらないと考えられる。この相異点が

第17図 HeLa 細胞に tetracycline を作用させたが、16図に比して殆んどその蛍光を見ない。蛍光顕微鏡 10×10

originalの組織が、一方は移行上皮、一方は扁平上皮であることに関係があるか否かは不明である。

3. 酵素組織化学的特徴について

膀胱腫瘍の発生については Boyland²⁵⁾ は tryptophan 代謝の過程における β -glucuronidase の意義を重視している。事実、膀胱は 2-naphtylamin benzidin などが発癌に関係している場合があるが、尿中の β -glucuronidase活性が常に上昇しているとは限らない²⁵⁾。又、膀胱腫瘍組織内の β -glucuronidase 活性は高いと云われているが²⁶⁾、Moris²⁷⁾ らによれば、一般に上皮性腫瘍中の同酵素の活性は、組織化学的に、非上皮性部分に比較して遙かに高い。従つて腫瘍細胞の破壊過程にある場合は、尿中に上昇する可能性は高い²⁸⁾²⁹⁾。 β -glucuronidaseが膀胱腫瘍細胞に特異的とは、いずれにせよ云い切れないので、培養細胞について、細胞化学的に証明することの意義は疑問がある。しかし、対照として初代培養の細胞をとり、又、他の人癌由来細胞として HeLa 細胞を同じ条件で染色し、著者の移行上皮癌由来細胞の活性を比較することは意味があると考えた。又、 β -glucuronidase の inhibitor である glucarolactone の各々の細胞に対する影響を検討した。結果は著者が長期間維持している移行上皮癌由来細胞の β -glucuronidase 活性は、初代培養細胞にはおよばないが HeLa 細胞より強く、初代培養細胞より SLNA の影響を受け易いと云うことになつた。同酵素の活性は、減少しながらも長期に亘つて維持されている点、又、Moris の云うように上皮由来細胞により活性が高いとするならば著者の細胞は膀胱癌の特性を或る程度受け継いでいることが想定される。

一方 LDH, SDH については, β -glucuronidase 程膀胱癌との関連性は強くないが³⁰⁾³¹⁾, 一応比較の意味で組織化学的に検討した. 結果は, 前述の3者について明らかな差を認めず, この点では著者の維持している移行上皮癌由来細胞が 'original' の特性を受け継いでいるか否かを言及することはできない. 森³²⁾は, 膀胱腫瘍細胞で SDH 活性は, 原形質の辺縁に沿って認められるとしているが, 初代培養ではこの傾向が見られ長期継代したものでは消失していた. 従って著者の移行上皮癌由来細胞の癌としてSDHに関する限り, その特性はHeLa細胞の場合と同様失われていると考えられる.

4. 培養液の生化学的分析結果について

培養前後の電解質の生化学的分析では, 著者の膀胱移行上皮癌由来細胞と HeLa 細胞とを比較したところ, 使用前に比して Na, K 共に上昇し, 無機磷は両者共に減少している. 磷脂質に限り著者の細胞で著明な上昇を示したが, その原因について過去に報告がなく説明することはできない. しかし, 著者の移行上皮癌由来細胞で原形質内の顆粒が著しく多いことと関連が示唆される.

又, 培養液の β -glucuronidase の生化学的活性については, 初代培養細胞, 著者の長期継代培養細胞(28代)および HeLa 細胞について比較検討し, いずれにおいても培養後著しく上昇を示したが, それは, 初代培養4日目に最も著明であつた. しかし, 長期継代の移行上皮癌由来細胞でもHeLa細胞より可成り高く, この点では膀胱癌の特性の継承を思わせる. SLNAの影響は, 3者共に受けており比較は困難であつた. これらの結果の解釈については, 今後の検討を待つ以外にない.

5. 電子顕微鏡の所見について

培養細胞の電子顕微鏡的観察の必要性は, 培養細胞をウイルス学的に研究する方法が開発されてからである. 一層に生えている培養細胞を機械的に剝離し, 遠沈して集め, pellet を作つて超薄切片にする方法は, 技術的に容易なので一般に行なわれているが著者は生きている細胞を剝がし, 細胞化学で用いる net の上にのせてそのままオスミウム酸で固定, 脱水, epon 包埋, 薄切する方法³³⁾を用いた. net を使用することにより, 単層培養の細胞をそのままの形でガラス面と平行に薄切が可能であるが操作に可成りの熟練を要した.

尿路の移行上皮の微細構造については, Walker³⁵⁾, 飯田³⁵⁾が実験動物について報告しており, 人の正常膀胱粘膜および腫瘍の構造については, Battifora³⁶⁾³⁷⁾, 柏井³⁸⁾³⁹⁾があり, 又最近酒徳⁴⁰⁾が詳しく報告している.

正常の移行上皮は表面に桿状の microvilli を持ち, 細胞相互の結合は特に中間層では粗で相対する細胞から触手状に突出した microvilli で接しており, 広い間隙を有する場合が多い. この結合様式は伸縮を必要とする膀胱の機能と関係あるものと思われるが, 移行上皮癌となつても悪性度の低いものでは認められる.

胞体内の所見としては Golgi 体, 滑面小胞体, 糸粒体が良く発達し, 粗面小胞体の他, Walker の云う compressed vesicle も認められる. 又, 表層に近い細胞では tonofilament と呼ばれる微細な細繊維束が核に接して認められることが多い. この tonofilament は可成り特徴的で悪性度の低い癌でも認められることが多い.

培養された尿路上皮細胞および移行上皮癌については未だ嘗つて報告はないので, 文獻的に考察することはできない. しかし, 著者の維持している移行上皮癌由来細胞の微細構造を検討すると, 細胞全体の形態, 表面の microvilli の存在には上皮性の特徴が見られ, 又細胞間の結合は比較的 tight ではあるが間隙の広い部分では, microvilli による粗な結合様式の名残りを思わせる所見が存在した.

Tonofilament の明らかなものは確認できなかつたが, 酒徳は悪性度の高い膀胱癌では, tonofilament は発見できないと述べており, 著者の細胞の origin は移行上皮癌の第Ⅲ度であるから, 存在しなくても癌細胞由来でないとは云えない. しかし, この問題は今後更に径時的に検討の必要がある.

核, 核小体, 胞体内小器官, 特に大きな compressed vesicle や ribosome の発達は上皮性の特徴を十分に具備していると云える. しかし超微細構造から癌としての特徴は, 他の長期培養細胞に於けると同様認めることはできなかつた.

6. Tetracycline 蛍光観察について

Rall⁵¹⁾ は tetracycline が腫瘍組織に特殊なる親和性を有して蛍光を発することを報告し, McLeay⁵²⁾ は結腸癌など11例に tetracycline を投与し, 紫外線照射下にオレンジ黄色の蛍光を発することを発表した. 又, 高山⁴³⁾らも同様に. 乳癌に対し手術の適応を決める手段として応用している.

泌尿器科領域では, Whitmore and Bush⁴⁴⁾ が, 膀胱癌患者に tetracycline を内服させ, 膀胱癌細胞に蛍光を発するところを紫外線膀胱鏡で観察し, 腫瘍か炎症か鑑別診断に応用した. 又, Malis and Cooper⁴⁵⁾ もこの方法の有用性を確認し, Kunin and Cooper⁴⁶⁾ はこ

れに先立つて尿沈渣で蛍光を観察しうることを発表。その技術を紹介した。

著者は、この特性を著者の継代している細胞に応用することを試み、5—10 μ g/ml の濃度に培養液中に oxy-tetracycline を加えて2時間培養後蛍光を認めた。尚、この濃度以上の tetracycline を加えると培養液のpHに変化を来し、細胞変性のために観察が不能となる。

HeLa 細胞と比較すると、著者の継代している移行上皮癌由来細胞に明らかに強い蛍光を認めた。この点からも著者の細胞が、膀胱癌としての特性を継承していることが想定される。

V 結 語

1. 第I報において既に8回の継代に成功し、12カ月にわたって増殖を続けた移行上皮癌第Ⅲ度由来の細胞はその後順調な発育を続け、1969年7月10日現在で、内外のどの報告に見られるよりも長期間の培養、すなわち920日、30回の継代に成功しており、その安定した増殖状態からほとんど株化したものと思われる。

2. 上記の細胞について長期間培養する事によって形態学的に細胞が単一化する事を認めた。

3. 移行上皮癌由来細胞と HeLa 細胞の colony について肉眼的に観察比較検討した。前者のコロニーは後者に比して大きく、重層しない。

4. 移行上皮癌由来細胞24回継代培養したものの発育速度を Harris 法を用いて測定し発育曲線で表わした。尚、平均世代時間は36時間であつた。

5. 膀胱移行上皮癌由来細胞の初代培養7日のもの、同細胞継代24回のもの、および、HeLa 細胞の3者につき、 β -glucuronidase, LDH, SDH など、染色法により酵素組織化学的に観察し比較検討した。

β -glucuronidase は、膀胱移行上皮癌由来細胞初代培養7日目のものに最も高い活性がみられ、その活性顆粒は明確で原形質の一側に偏在した。同細胞継代24回のものでは、前者に比してその活性は明らかに低下し、細胞間の差が出て来るが、依然として強い活性顆粒を残しているものが多く見られた。

HeLa 細胞では、前2者よりも、その活性は更に低下しているが、細胞間の差はあまり見られず、ビマン性に原形質内に認められ、活性顆粒は著明ではない。

LDH に関しては3者共に大きな差はなく、その活性は細胞膜周辺に高く認められた。

SDH は、膀胱移行上皮癌由来細胞初代培養7日目のものの一部に強陽性を呈したが、継代24回のものではそ

の活性は低下し、周辺部にのみ、活性を示す細胞がみられた。

HeLa 細胞では、40—60個の細胞に1個の割合で活性を示す細胞が点在したにすぎない。

6. β -glucuronidase 活性阻害物質である diacetyl-glucarodilactone (SLNA) を前3者に作用させその活性の変化を検討した。すなわち、SLNA は培養後間もない移行上皮癌由来細胞ほど強く作用し、細胞変性を与えるが β -glucuronidase 活性にはほとんど影響を与えない。しかし長期間培養細胞では SLNA を2時間作用させても培養後間もない細胞ほど強い細胞変性は見られないが、 β -glucuronidase 活性は明らかな低下を示す。HeLa 細胞に SLNA を2時間では勿論のこと12時間作用させても前者に比較してほとんど細胞変性を起さない。又、 β -glucuronidase 活性の低下は全くみられず、SLNA 作用以前に比較してむしろ上昇の傾向を示した。

7. 膀胱移行上皮癌由来細胞および HeLa 細胞を4日間培養した後の培養液について生化学的に分析した。すなわち、総蛋白量は0.6%でこれは2者の細胞共に使用前のものと同じでその消費はない。Cl は使用前に比して両細胞共に使用後に著明に増加し、両細胞間には差はほとんどない。Na は使用前に比して両細胞共に上昇し特に HeLa 細胞においてその増加は著明である。K にも同様の傾向が見られた。Ca は使用前後において、両細胞共に変化はほとんどない。無機磷については膀胱移行上皮癌由来細胞において、使用後に軽度の増加が見られ、逆に HeLa 細胞では減少が見られた。磷脂質では前者では使用後に明らかな増加が見られ、逆に減少が見られた HeLa 細胞とは明らかな差が出た。

培養液中の β -glucuronidase 活性は、膀胱移行上皮癌由来細胞初代培養7日目のものの使用後の培養液中に最も高く、同14日目、継代30回と次第にその活性の低下をみる。HeLa 細胞では、更に低くなる。上記の4細胞に SLNA を作用させ培養後の培養液中の β -glucuronidase 活性は、前3者において著者なる低下を示したが HeLa 細胞においては低下の程度が極めて少ない。

培養後の培養液中の LDH 活性は、膀胱移行上皮癌由来細胞では培養日数に比例してその低下をみるが、上記細胞の継代28回のは、HeLa 細胞の活性よりやや低かつた。

SDH 活性においても同様の結果を得た。

8. 膀胱移行上皮癌由来細胞継代28回のを、電子

顕微鏡的に観察した。すなわち、細胞全体の形態、表面の microvilli の存在、核、核小体、胞体内小器官特に大きな compressed vesicle や ribosome の発達は、上皮性の特徴を十分に具備していると云える。

9. 膀胱移行上皮癌由来細胞の tetracycline による蛍光を HeLa 細胞のものと比較検討した。前者にかなり強い蛍光を見た。

稿を終るにあたり、御校閲を賜った大越正秋教授および御指導を戴いた田崎寛講師に厚く御礼申し上げます。さらに御協力を戴いた尾関全彦、松永重昂、河村信夫、木村茂三諸先生に感謝致します。電子顕微鏡技術に関して御協力戴いた小松遼至氏に謝意を表します。最後にこの研究に御援助を賜った故早原武三氏並びに飾磨慈恵会に対し深謝致します。

文 献

- 1) 矢島暎夫：日泌尿会誌, **59**, 128, 1968.
- 2) Cobb, J.P.: J. Urol., **73**, 1039, 1955.
- 3) Bergman, U.R. and Bergman, E.T.: J. Urol., **86**, 642, 1961.
- 4) 近藤義雄：名古屋市立大学医学会雑誌, **16**, 912, 1966.
- 5) Jones, G.W.: Cancer, **20**, 1893, 1967.
- 6) Carrel, A. and Burrows, M.: J. Exp. Med., **13**, 571, 1911.
- 7) Fischer, A.: Z. Krebsforsch, **25**, 89, 1927.
- 8) Gey, G. and Gey, M.: Amer. J. Cancer, **27**, 45, 1963.
- 9) Dobrynin, Y.V.: J. Nat. Cancer Inst., **31**, 1173, 1963.
- 10) Weiss, L.: Exp. Cell. Res., **17**, 499, 1959.
- 11) 山田正篤：科学, **29**, 641, 1959.
- 12) Eagle, H.: Science, **122**, 501, 1955.
- 13) Lieberman, I.: J. Biol. Chem., **233**, 634, 1958.
- 14) Berman, L.: Cancer Res., **17**, 668, 1957.
- 15) Hsu, T.C.: J. Nat. Cancer Inst., **18**, 463, 1957.
- 16) Levan, A.: Cancer Res., **9**, 648, 1956.
- 17) 佐藤二郎：日本組織培養学会第15回研究会シンポジウム, 1963.
- 18) 黒木登志夫：同上.
- 19) Sanford, K.K.: J. Nat. Cancer Inst., **23**, 1061, 1959.
- 20) 勝田甫：癌の臨床, **12**, 428, 1966.
- 21) 勝田甫：日本癌学会記事, **23**, 11, 1965.
- 22) Harris, M.: Cancer Res., **19**, 1020, 1959.
- 23) Fischer, A.: Gyldendal. Copenhagen, 1946.
- 24) Boyland, E.: The biochemistry of bladder cancer, Thomas, C.C., Springfield, 1963.
- 25) 白石恒雄：泌尿紀要, **15**, 143, 1969.
- 26) 園田孝夫：日泌尿会誌, **50**, 163, 1959.
- 27) Monis, B.: Cancer, **13**, 386, 1960.
- 28) 今村一夫：日泌尿会誌, **53**, 613, 1962.
- 29) 三矢英輔：日泌尿会誌, **57**, 961, 1966.
- 30) Piper, D.W.: Cancer, **18**, 1055, 1965.
- 31) Goldman, R.D.: Cancer Res., **24**, 389, 1964.
- 32) 森昌彦：腫瘍酵素組織化学, 351, 1966.
- 33) Heyner, S.: Stain Tech., **38**, 335, 1963.
- 34) Walker, B.E.: J. Ultra Str. Res., **3**, 345, 1960.
- 35) 飯田収：日泌尿会誌, **55**, 333, 1964.
- 36) Battifora, H.: Inv. Urol., **1**, 354, 1964.
- 37) Battifora, H.: J. Urol., **93**, 217, 1965.
- 38) 柏井浩三：日泌尿会誌, **52**, 908, 1961.
- 39) Kashiwai, K.: Urol. Inst., **15**, 22, 1963.
- 40) 酒徳治三郎：西日泌尿, **31**, 145, 1969.
- 41) Rall, D.P.: J. Nat. Cancer Inst., **19**, 79, 1957.
- 42) McLeay, J.F.: Amer. J. Surg., **96**, 415, 1958.
- 43) 高山担三：診療, **14**, 1776, 1961.
- 44) Whitmore, W.F. and Bush, I.M.: J. Urol., **95**, 201, 1966.
- 45) Malis, I. and Cooper, J.F.: J. Urol., **99**, 183, 1968.
- 46) Kunin, S.A. and Cooper, J.F.: J. Urol., **98**, 397, 1967.

(昭和45年1月16日受付)