組織培養法による泌尿器悪性腫瘍の fibrinolysis の研究

金沢大学医学部泌尿器科学教室 内 藤 克 輔
(主任: 黒田恭一教授)

FIBRINOLYTIC ACTIVITY OF IN VITRO CULTIVATED HUMAN UROLOGIC CANCEROUS TISSUES

Katsusuke Naito

Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University

(Director: Prof. K. Kuroda)

In order to estimate fibrinolytic activity produced by human urologic malignant cells, surgical specimens from the malignant and normal tissues have been studied by a monolayer culture method. The fibrinolytic activity yielded into the supernatant medium and fibrin degradation products (FDP) resulted from coagulum lysis present in the system were determined by using a fibrin plate method and FDP assay Kit (Wellcome Reagents Ltd.), respectively. The localization of fibrinolytic activity in the cultivated cells was studied by a histochemical fibrin slide technique with a slight modification.

The results obtained were as follows:

1. An active growth of epithelial cells was observed in 11 renal cell carcinomas, a Wilms' tumor, an angioleiomyolipoma, 2 transitional cell carcinomas of the renal pelvis, and 4 transitional cell carcinomas of the bladder.

2. In the case of normal tissues, the active growth was observed in the cortex of 17 kidneys and the medulla of 4 kidneys. No active growth was observed in mucous membranes from a renal pelvis and 5 bladders.

3. Using the fibrin plate method, no fibrinolytic activity was detected in supernates from the renal cell carcinomas, the transitional cell carcinomas of the bladder, and HeLa cells.

4. The cortex and medulla released a potent plasminogen activator into the supernates; 0.20–25.36 and 1.88–5.00 CTA units/ml/ 1.0×10^4 cells, respectively. The plasminogen activator was identified immunologically as urokinase type.

5. No FDP was detected in cultures from a transitional cell carcinoma of the bladder and HeLa cells after 4 day cultivation, whereas, a considerable amount of FDP in cultures from the cortex of 4 kidneys and a renal cell carcinoma in the same cultivation period; the levels were 7.5–38.6 and 4.1. $\mu\text{g/ml}/1.0 \times 10^4$ cells, respectively.

6. Using the fibrin slide technique, epithelial cells from the cortex of 4 kidneys in the same cultivation period showed a marked lysis of fibrin membranes in 30 minute-incubation time. The cells from a renal cell carcinoma showed less fibrinolytic activity. No lysis of fibrin membranes was observed in the cells from a transitional cell carcinoma of the bladder and HeLa cells in 180 minute-incubation time.

The physiologic and clinical significances of these findings are discussed with special reference to the combined use of urokinase and anticancer agents for urologic cancers.

緒 言

1958年 O'Meara¹⁾は癌組織の詳細な組織学的研究を行い、癌細胞周辺に認められる fibrin 沈着は癌組織の有する cancer coagulative factor と関連性を有し、さらに彼はこの fibrin 網の形成は癌の浸潤性発育に際し有

利な足場を提供すると推論した。またこの fibrin 沈着は癌周辺の正常組織の線溶活性を低下せしめ、その結果沈着 fibrin の安定化を得るとも述べている²⁾。すでにこの時代から癌の発育、進展と線溶の関連が注目されており、またヒト癌組織の局所線溶、とりわけ tissue

plasminogen activator の存在についても古くから Clifton & Grossi³⁾ (1955) により検討されている。

当教室の膀胱癌と線溶に関する一連の研究をはじめとして、いくつかの研究において癌患者の血液や癌組織の線溶活性は一般に低下、抑制されているとの報告が多い^{4)~7)}。このような線溶系の特徴から、最近では主として癌の発育、進展、転移形成を中心とした臨床的研究が進められ、一方では癌組織や癌細胞、血液その他の臓器のもつ凝固・線溶能の生物学的意義を明らかにする努力が払われてきた¹⁾²⁾⁸⁾。これらの研究の目的はもちろん癌治療へのアプローチの一環として行われてきており、各種臓器の癌病巣における局所線溶の動態を明らかにすることにより、抗癌剤効果増強を目的とした plasmin 系薬剤の併用が試みられている。すなわちヒト尿中に生理的に含まれる plasminogen activator の1つである urokinase や、その他の線溶活性亢進剤の併用投与である。この方法は抗癌剤の癌組織内移行を高める⁵⁾⁹⁾と共に、plasmin が lysosome labilizer の作用を有することが抗癌作用に役買つているとされている¹⁰⁾¹¹⁾。

膀胱癌についての当教室の局所線溶の研究成績^{12)~20)}を総括すると、癌患者の血液や癌組織には urokinase inhibitors が増量しており、それは癌進行度と関連のあることを示している。すなわちこれら症例では fibrinolysis inhibitor dominant の状態であり、このような線溶の動きに対し当教室では膀胱癌の再発防止法として thio-TEPA (N-N'-N''-triethylene thiophosphoramidate) と urokinase の膀胱内併用注入療法を施行し好成績を得ている²¹⁾²²⁾。以上のような実験的、臨床的成績を背景にして、in vivo における癌組織や癌細胞の線溶活性、そしてそれに対する宿主側の反応、すなわち線溶の動態について充分明らかにすることはきわめて重要と考えられるが、目下のところ細胞の線溶系物質の産生に関しては組織培養法による以外良い方法は見当らず、その応用、検討は興味あるところである。特にこの種の研究の成績が、臨床的に urokinase の投与量やその他の有用な情報を提供してくれるならば誠に幸いである。

著者の知りえた範囲では、組織培養法を用いたヒト泌尿器悪性腫瘍細胞の線溶活性の研究は少なく、Laug et al.²³⁾, Pearlstein et al.²⁴⁾の膀胱癌での成績が散見されるにすぎない。

当教室の膀胱腫瘍研究班においては、1972年以来泌尿器悪性腫瘍細胞や正常細胞の閉鎖式静置単層培養を試みてきたが、著者はこれらの組織培養の結果得られた培養

液上清や、培養細胞の線溶活性の研究を行い、2, 3の興味ある知見を得たので報告する。

研究材料および研究方法

1. 閉鎖式静置単層培養

1) 培養液および塩類溶液

Eagle MEM 培地(日本製薬株式会社, 東京)を滅菌蒸留水にて溶解しセルローズナイトレートフィルター(0.3 μ , Sartorius-Membranfilter GmbH, Germany)にて濾過滅菌後, 56°C, 30分間加温して非動化した胎児牛血清(Grand Island Biological Co. N.Y. U.S.A.)を20%となるよう添加した(EF-20と略す)。

Ham F12培地(日本製薬株式会社, 東京)を, EF-20と同様に溶解, 濾過後, 非動化された仔牛血清(医学生物学研究所, 名古屋)を20%の濃度になるよう添加した(FC-20と略す)。

EF-20, FC-20ともに pH 調整には7% NaHCO₃液(メイロン, 大塚製薬株式会社, 東京)を用い, pH 6.8~6.9に調整した。抗生剤として Kanamycin sulfate (KM), および Sodium Cephalothin (CET)を最終濃度として50 γ /ml となるよう加えた。両液ともに調整後-20°Cに保存し, 1ヵ月以内に使用した。

Hanks 然(H-BSS と略す)や Dulbecco リン酸緩衝塩類溶液(PBS と略す)は遠藤ら²⁵⁾の方法に従って調整し, H-BSS には抗生剤 KM および CET を50 γ /ml となるよう添加した。調整後-20°Cに保存し, 1ヵ月以内に使用した。

2) EDTA

PBS に溶解された0.02%disodium ethylenediamine tetraacetate dihydrate (和光純薬工業株式会社, 大阪)液を120°C, 30分間高圧滅菌し, -20°Cに保存した。

3) プロナーゼ

PBSにプロナーゼ®(科研化学株式会社, 東京, 750,000単位/g)および無水ブドウ糖(和光純薬工業株式会社, 大阪, C₆H₁₂O₆)をそれぞれ0.1%となるように溶解し Sartorius-Membranfilter にて濾過したあと, -20°Cに保存した。

4) trypan blue 液

PBS に溶解された0.5%の trypan blue (Chroma-Gesellschaft Schmidt & Co. Germany) 液を濾紙にて濾過し使用した。

5) urokinase

ウロキナーゼ(ミドリ十字株式会社, 大阪)は0.005 Mリン酸緩衝液(pH7.5)にて100 CTAunits/ml の濃度

に溶解し、目的に応じて適宜希釈して用いた。

6) plasmin

プラスミン—ミドリ（ミドリ十字株式会社，大阪）は 0.005 M リン酸緩衝液（pH7.5）にて 1.0 casein units/ml の濃度に溶解し、目的に応じて希釈した。

7) 培養瓶

初代培養には培養角瓶141 D（日沼型，池本理化器械株式会社）を用いた。固定細胞標本や染色標本の作製時には培養角瓶小141（池本理化器械株式会社）に cover slip（12×32mm）を入れ培養した。また培養瓶内に fibrin clot を作製する時にもこの培養角瓶小141を用いた。

8) 培養法

外科的に得られた膀胱癌組織片や腎組織片は病理組織診断用として一部を切除後，H-BSS にて2回洗浄し血液や脂肪などを洗い落とす。膀胱癌では膀胱粘膜および腫瘍基底部組織を完全に除去したあと，また腎細胞癌では腎被膜を剥離し癌組織，腎皮質および腎髄質に区別したあと，それぞれの組織をハサミにて細分した。ひきつづき EDTA とプロナーゼの混合液により細胞分散を行った。十分に細胞が分散されたあと，trypan blue 液にて染色し，青染しない生細胞数を算出した。膀胱癌では 50×10^4 /ml，腎細胞癌，腎皮質および腎髄質では $20 \sim 50 \times 10^4$ /ml の細胞浮遊液として培養瓶に 5 ml あて注入し，密栓して 37°C に静置培養した。培養開始後 3～4 日目に第1回の培養液交換を行った。初代培養には培養液として EF-20 を用い，継代 3～4 代にて培養細胞の生育状態に応じて FC-20 に変更した。

継代培養は EDTA とプロナーゼの混合液にて細胞を分散し， $5 \sim 10 \times 10^4$ /ml の細胞数にて培養を続けた。

9) 形態学的観察

Nikon MSD 型倒立顕微鏡を使用し，写真撮影を行った。

2. 予備実験

著者が実験に用いた培養細胞は初代培養細胞または継代 2～3 代目の培養細胞であつたため，血清を含まない培養液にて培養することはほとんど不可能であつた。すべての実験には血清添加培養液を用いたので，用いられた血清や血清添加培養液の線溶活性を知る目的で次の実験を行った。

実験法

検体として胎児牛血清（FCS と略す），仔牛血清（CS と略す）をそれぞれ蒸留水に 20% の濃度に混合したも

の，EF-20 および FC-20 をそれぞれ 37°C に 3，4 および 5 日間 incubation したものをを用いた。さらに血清を含まない Eagle MEM および Ham F12 培養液も検体として用いた。これらの検体と標準 urokinase 溶液（100，50，25，12.5，6.25，3.125 CTA units/ml）および標準 plasmin 溶液（1.0，0.5，0.25，0.125 casein units/ml）をそれぞれ等量に混合したものを作製し，bovine plasminogen-rich fibrinogen（第一化学薬品株式会社，Type1）および free fibrinogen（第一化学薬品株式会社，Type 2）を用いた fibrin plate 法にて線溶活性を測定した。すなわち 0.03 ml の 0.25% fibrinogen 液を底面の平坦な直径 8.5 cm のシャーレ中に 8.0 ml あて分注し，これに bovine thrombin 液（20 NIH units/ml，Thrombin，Topical，Parke Davis & Co.，Detroit，Mich.）0.2 ml を泡の立たぬよう混合し水平面上に 30 分間静置して fibrin 薄膜を作製した。この fibrin plate 上に上記混合液をそれぞれ 0.03 ml あて正確に滴下，室温に 10 分間静置後， 37°C ，18 時間 incubation し，fibrin 薄膜の溶解窓の長径と短径とを計測し，その積をもつて（ mm^2 ）線溶活性として表わした。

3. 培養液上清の線溶活性測定

一般的に in vitro で細胞が増殖，發育し，継代を重ねるうちに原組織の enzyme pattern が変化するとされているので²⁸⁾，この研究における線溶活性の測定はすべて初代もしくは 2～3 代までの培養について検討した。

1) fibrin plate 法

上皮細胞の發育の認められた場合には，その培養液を初代培養細胞の継代時に採取し，1000rpm，5 分間遠心後，上清を Sartorius-Membran filter にて濾過し -20°C に保存し，1 カ月以内に実験に供した。また培養細胞は継代培養が続けられ，死細胞の百分率は trypan blue 染色により求め，T.B. 率（%）として表わした。

凍結保存された上清の線溶活性は，bovine plasminogen-rich fibrinogen および free fibrinogen を用いた fibrin plate 法（前記）にて測定した。上清は 0.03 ml あて正確に fibrin plate 上に滴下し 37°C ，18 時間 incubation した。対照として培養細胞に接していない新鮮な培養液を用いた。それぞれの結果は標準 urokinase 線溶活性曲線を用いて CTA units/ml で表わした。

2) plasminogen activator の免疫学的同定

純化ヒト urokinase を家兎皮下に注射して得られた antiserum（京都大学若山雄次先生の御厚意により提供さ

れた²⁷⁾を用いて、培養液上清中の plasminogen activator 活性の免疫学的同定を行つた。

plasminogen activator 活性を示した上清および各標準 urokinase 液 (100, 50, 25, 12.5, 6.25 CTA units/ml) は、それぞれ 1 : 1000 の濃度に antiserum および正常家兎血清を含む plasminogen-rich fibrin plate 上に 0.03 ml あて滴下し、37°C, 18時間 incubation した。上清中の plasminogen activator の antiserum による特異的中の結果は percentage neutralization として表わした。

3) FDP 測定法

培養液上清中の線溶活性は、培養瓶の中にあらかじめ作製された fibrin clot が、培養液中に細胞より産出された plasminogen activator により溶解され、fibrin 分解体 (FDP) として上清中に認められるのを FDP kit (Thrombo-Wellcotest, Wellcome Reagents Ltd.) にて測定した。この成績は fibrin plate 法の結果と比較された。

Åstedt ら²⁸⁾の方法に準じ、0.5ml の 1% human plasminogen-rich fibrinogen (ミドリ十字株式会社、大阪) を培養瓶に注入後、0.02ml の human thrombin (50 NIH units/ml, ミドリ十字株式会社、大阪) を混合し、培養瓶を約30度傾斜して室温に30分間静置した。fibrin clot が充分に完成されたあと、培養細胞を $2.7 \times 10^4 \sim 10.0 \times 10^4$ /ml の濃度にて 5ml あて注入し密栓をして、37°C にて静置培養した。24時間ごとに培養液を採取しその FDP を測定した。同時に fibrin clot が作製された瓶に細胞を含まない対照培養液を 5ml 注入し、比較実験を行つた。

4. 培養細胞の線溶活性の組織化学的観察

この実験には継代 2~3 代目の培養細胞が用いられた。継代培養開始後、培養細胞が cover slip に付着し増殖を始めるのを確認し、プラートに達する前の時期に cover slip を取り出し、リン酸緩衝液 (pH 7.1)²⁹⁾ にて洗浄した。Bernik & Kwaan³⁰⁾ の modified histochemical fibrin slide technique に準じて線溶活性の局在の観察を行つた。

取り出した cover slip 上に 10 μ l の human thrombin (20 NIH units/ml) と 50 μ l の 0.7% human plasminogen-rich および free fibrinogen を滴下し、ガラス棒にて迅速に混合した。湿潤箱中にて室温に10分間静置後、37°C の湿潤箱に移し 37°C incubation (30, 60, 90, 120 および 180 分) を行つた。incubation 後は 10% ホルマリン液にて固定し、Harris の hematoxylin 液にて染色し、

fibrin 膜の溶解を顕微鏡的に観察した。実験はいずれも duplicate にて行つた。

5. 培養液上清の urokinase inhibitory activity の測定

fibrinolysis inhibitors の検討に際し、antiplasmin 値測定の重要性は当然であるが、われわれが入手しえた標準 plasmin は urokinase の混在があり、しかもその濃度は標品により一定でないため、この研究においては urokinase activated fibrinolysis に対する検体の inhibitory activity をもつて代表せしめた。

fibrin plate 法にて線溶活性を示さなかつた培養液上清および対照としての新鮮な培養液は、標準 urokinase 溶液 (50, 25, 12.5, 6.25 CTA units/ml) と等量に混合した。この混合液を 0.03ml あて plasminogen-rich fibrin plate 上に滴下し、37°C, 18時間 incubation した。上清の urokinase inhibitory activity は対照に比し fibrin 膜の溶解窓が縮小することで決定し、その値は標準 urokinase 活性曲線を用いて CTA units/ml で表わした。

成 績

1. 培養成績

1 回以上の継代培養に成功したもの、または 2 週間以上培養細胞が顕微鏡的に生着したものを培養成功とすると、表 1 に示したごとくである。腎実質腫瘍は 20 例について培養を試みたが、そのうち 14 例に成功し、そのうち主として上皮細胞の発育が認められたものは 13 例であつた (図 1, 図 2)。膀胱、尿管および腎盂移行上皮癌では 75 例の培養を試みたが、成功率は 17.3% と低く、上皮細胞と思われる細胞の発育は 6 例のみに認められた。特に膀胱移行上皮癌では 64 例の培養を試み、上皮細胞と思われる細胞は、わずかに 4 例 (6.3%) にしか認められなかつた。

正常組織では、腎皮質 19 例、腎髄質 5 例に培養を試み、それぞれ 17 例、4 例に上皮細胞由来と考えられる培養細胞が認められた (図 3, 図 4)。また腎盂粘膜 1 例、膀胱粘膜 5 例に培養を試みたが、上皮細胞と思われる培養細胞は得られなかつた。

今回得られた上皮細胞の継代数を表 2 に示した。一般的に継代 2~3 代目までは細胞の増殖は良好であるが、さらに継代を重ねるにしたがつて増殖力は著明に低下する傾向が認められた。継代 10 回を重ねた腎細胞癌の 1 例は感染により培養を中止した。膀胱移行上皮癌の 1 例は 48 代 (395 日) まで継代し、現在 ひきつづき培養中で、細胞株として樹立したものとみなされた³¹⁾ (図 5, 図 6)。

图1 肾细胞癌 (DK10-K11) 由來培養細胞 $\times 100$,
倒立顯微鏡

图2 肾细胞癌 (KK21-K28) 由來培養細胞 $\times 100$,
HE 染色

图3 正常肾皮質 (KK10-K19) 由來培養細胞
 $\times 100$, 倒立顯微鏡

图4 正常肾皮質 (KK19-K25) 由來培養細胞
 $\times 200$, HE 染色

图5 膀胱移行上皮癌由來上皮細胞 (KB2-B1)
 $\times 100$, 倒立顯微鏡

图6 膀胱移行上皮癌由來上皮細胞 (KB2-B1)
 $\times 200$, HE 染色

表 1 培養成績

培養組織	例数	培養成功例 (%)	培養細胞像	
			上皮細胞	線維芽細胞
A) 腫瘍組織				
腎実質腫瘍	20	14 (70.0)	13	1
腎細胞癌	18	12	11	1
Wilms 腫瘍	1	1	1	0
血管筋脂肪腫	1	1	1	0
腎盂移行上皮癌	8	3 (37.5)	2	1
尿管移行上皮癌	3	0 (0)	—	—
尿管ポリープ	1	0 (0)	—	—
膀胱移行上皮癌	64	10 (15.6)	4	6
小 計	96	27 (28.1)	19	8
B) 正常組織				
腎実質	24	21 (87.5)	21	0
腎皮質	19	17	17	0
腎髄質	5	4	4	0
腎盂粘膜	1	1 (100)	0	1
膀胱粘膜	5	0 (0)	—	—
小 計	30	22 (73.3)	21	1
総 計	126	49 (38.9)	40	9

2. 予備実験

EF-20および FC-20には 線溶活性は認められなかつた。

EF-20は urokinase 6.25 CTA units/ml と等量に混合した場合、urokinase 活性を完全に抑制するが、urokinase 50 CTA units/ml と等量に混合した場合には抑制効果を示さなかつた。EF-20の urokinase 活性に対する抑制効

果は5日間の incubation 後も変化しなかつた (図7)。20% FCS にも EF-20と同様の抑制効果が認められた。

FC-20は urokinase 3.125 CTA units/ml と混合すると urokinase 活性を軽度抑制するが、urokinase 12.5, 25 および50 CTA units/ml と混合すると urokinase 活性を増大した。FC-20の urokinase に対する効果は5日間の incubation にも変化しなかつた (図8)。20% CS にも urokinase に対する同様の効果が認められた。

図 7 Inhibitory activity of EF-20 against urokinase (bovine plasminogen-rich fibrin plate)

表 2 上皮細胞の継代数

培養組織	例数	継 代 数												48回
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
A) 腎実質腫瘍														
腎細胞癌	11		2	4	1	1	1		1		1			
Wilms 腫瘍	1		1											
血管筋脂肪腫	1			1										
B) 腎盂移行上皮癌	2	1			1									
C) 膀胱移行上皮癌	4	2		1									1	
D) 正常腎														
腎皮質	17		1	4	3	4	3	2						
腎髓質	4		2	1		1								

図8 Inhibitory activity of FC-20 against urokinase
(bovine plasminogen-rich fibrin plate)

図9 Fibrinolytic activity of mixture of the media
and urokinase solutions (bovine plasminogen-free
fibrin plate)

EF-20およびFC-20と urokinase との混合液を plasminogen-free fibrin plate に滴下すると, plasmin 活性が認められ, urokinase 100 CTA units/ml と混合されたときのそれぞれの値は36mm², 30mm² であった。すな

わち両培養液は plasminogen を含んでいることが認められた(図9)。20% FCS や20% CS にも同様の結果が認められた。

用いた urokinase が25 CTA units/ml 以上の高単位になると, 検体および基質中の plasminogen が高度に活性化され阻止系の作用が不明確となるが, 低単位の urokinase を用いた時の FCS および CS の urokinase activated fibrinolysis の抑制はそれぞれ約6.25 CTA units/ml および1.0 CTA units/ml に相当するものと考えられた。血清を含まない Eagle MEM および Ham F12 培養液について検討してみると, urokinase 抑制効果は認められなかった。

標準 plasmin 溶液に対する EF-20および FC-20両培養液の抑制効果を plasminogen-free plate を用いて検討すると, いずれも著明な抑制効果が見られ, それぞれ 0.71 casein units/ml, 0.62 casein units/ml であった。一方 FCS および CS を含まないものについてそれぞれ検討すると, plasmin 抑制効果は認められなかった。

以上をまとめると, EF-20, FC-20にはそれ自体 plasmin 活性を示さず, 含有する FCS および CS 中に plasminogen と antiplasmin の存在が認められ, urokinase inhibitor の存在も推定された。

3. 培養液上清の線溶活性

1) fibrin plate 法

培養液上清を採取できた腎細胞癌11例, 腎盂移行上皮癌1例, 腎血管筋脂肪腫1例, 膀胱移行上皮癌3例, 腎皮質14例, 腎髓質3例および HeLa 細胞について線溶活性を測定した。対照として用いた新鮮な培養液 EF-20 および FC-20は, 予備実験で示したと同じように線溶活性を示さなかった。

表3に示したように, 腎皮質由来の8例, 腎髓質由来の3例の培養細胞から得られた培養液上清は plasminogen-rich fibrin plate にて線溶活性を示し, plasminogen-free plate では活性を示さなかった。すなわちこれらの上清は plasminogen activator による線溶活性を示し, その力価はそれぞれ 0.20~25.36 CTA units/ml/1.0 × 10⁴ cells, 1.88~5.00 CTA units/ml/1.0 × 10⁴ cells であった。腎皮質由来の6例の細胞培養液上清は plasminogen-free plate において線溶活性を示し, それらの力価は 0.09~0.50 casein units/ml に相当した。これらの活性は前述した予備実験とあわせ考えると, 培養液中の血清に含まれる plasminogen が培養細胞により産生された plasminogen activator により plasmin に活性化さ

表 3 培養液上清の線溶活性（正常組織由来）

培養組織：記号	Plasminogen activator 活性 (CTA units/ml)	Plasminogen activator 活性 (CTA units/ml/ 1.0×10^4 cells)	Percentage neutralization of plasminogen activator 活性 (%)	Plasmin 活性 (c. u./ml)	T. B 率 (%)	生細胞数 ($\times 10^4$ /ml)	培養液
腎皮質 DK 4-K 1	6.2	0.20	100	0	5.2	30.7	EF-20
DK 6-K 7	34.3	1.83	100	0	9.6	18.7	EF-20
DK11-K12	11.1	2.47	100	0	4.6	4.5	EF-20
DK16-K33	47.0	6.44	100	0	5.0	7.3	FC-20
DK18-K35	39.5	11.97	100	0.09	5.0	3.3	EF-20
KK10-K19	41.0	1.76	84.9	0.30	10.0	23.3	EF-20
KK12-K21	86.0	3.08	88.1	0	2.0	27.9	EF-20
KK13-K23	16.5	3.30	100	0	5.0	5.0	EF-20
KK15-K24	41.0	8.20	100	0	5.0	5.0	FC-20
KK16-K26	35.5	25.36	100	0	5.0	1.4	EF-20
KK19-K25	46.5	2.02	89.3	0.50	2.1	23.0	FC-20
KK20-K31	70.0	3.47	100	0.18	4.9	20.2	FC-20
KK22-K32	51.0	2.71	84.3	0.19	5.0	18.8	EF-20
KK 8-K17	18.0	2.17	100	0.13	10.0	8.3	EF-20
腎髄質 DK 7-K 8	14.5	1.88	100	0	19.2	7.7	EF-20
DK 9-K10	18.0	4.39	100	0	7.5	4.1	EF-20
DK12-K13	13.0	5.00	100	0	2.0	2.6	EF-20

表 4 培養液上清の線溶活性（腫瘍組織由来）

培養組織：記号	Plasminogen activator 活性 (CTA units/ml)	Plasminogen activator 活性 (CTA units/ml/ 1.0×10^4 cells)	Percentage neutralization of plasminogen activator 活性 (%)	Plasmin 活性 (c. u./ml)	T. B 率 (%)	生細胞数 ($\times 10^4$ /ml)	培養液
腎細胞癌 DK 2-K 3	0	0	—	0	15.1	3.4	EF-20
DK 3-K 2	0	0	—	0	23.5	1.4	EF-20
DK 5-K 6	0	0	—	0	4.5	1.8	EF-20
DK 8-K 9	0	0	—	0	2.3	6.9	EF-20
DK10-K11	0	0	—	0	9.1	1.6	EF-20
DK17-K36	0	0	—	0	0	8.3	EF-20
KK 2-K 4	0	0	—	0	4.4	9.0	EF-20
KK 6-K15	0	0	—	0	0	1.2	EF-20
KK 9-K18	0	0	—	0	2.7	17.8	EF-20
KK11-K20	0	0	—	0	1.0	11.0	EF-20
KK21-K28	0	0	—	0	1.0	5.1	FC-20
腎盂移行上皮癌 KB 9-B 4	17.8	3.24	100	0	20.0	5.5	FC-20
腎血管筋脂肪腫 KK24-K37	24.3	2.01	100	0	3.0	12.1	EF-20
膀胱移行上皮癌 KB 2-B 1	0	0	—	0	5.1	76.7	FC-20
KB23-B 5	0	0	—	0	5.0	21.1	EF-20
KB25-B 7	0	0	—	0	5.0	5.0	EF-20
HeLa 細胞	0	0	—	0	2.1	42.2	FC-20

れたものと考えられた。

腫瘍組織由来の細胞培養液上清の線溶活性は表4に示したごとくである。腎細胞癌、膀胱移行上皮癌および HeLa 細胞よりのすべての培養液上清は、plasminogen-rich および feer fibrin plate にて線溶活性を全く示さなかつた。腎盂移行上皮癌 (KB9—B4) 由来の培養細胞の上清は plasminogen activator 活性を示したが、培養開始時に癌組織とともに正常腎組織の混入が疑われ、移行上皮癌由来の線溶活性とは決定できなかった。良性腫瘍の一種である腎血管筋脂肪腫由来の細胞は一見腎細胞癌由来の細胞に似るが、その上清は plasminogen activator 活性を示した。

2) plasminogen activator の免疫学的同定

図10に示すように、抗 urokinase 家兎血清を1000倍の

図10 Percentage neutralization of urokinase

濃度に含有する fibrin plate を用いた場合、標準 urokinase 溶液 12.5 CTA units/ml の活性は完全に抑制され、抗 urokinase 家兎血清による percentage neutralization は 81.8% であった。各培養液上清に認められた plasminogen activator の percentage neutralization は表 3、表 4 に示したように 84.3% ないし 100% であった。標準 urokinase における percentage neutralization と比較してみると、正常腎皮質や髄質由来の細胞の培養液上清に認められた plasminogen activator は、免疫学的に urokinase type とみなされた。

3) FDP 測定法

腎細胞癌 1 例、膀胱移行上皮癌 1 例、腎皮質 4 例および HeLa 細胞の培養液上清について測定した。対照として細胞と接触せしめなかつた培養液 FC-20 および EF-20 を 4 日間、37°C に incubation したものについて検討したが、それらの上清中には FDP の存在は認められなかつた。

図 11 に示したように培養 4 日後の膀胱移行上皮癌 (KB2-B1) および HeLa 細胞においては、培養細胞数はそれぞれ $5.0 \times 10^4/\text{ml}$ より $10.5 \times 10^4/\text{ml}$ 、 $5.0 \times 10^4/\text{ml}$ より $6.4 \times 10^4/\text{ml}$ と培養開始時に比し増殖したが、いずれの上清中にも FDP は認められなかつた。一方腎細胞癌 (KK 21-K28) では、培養時間の延長とともに上清中の FDP 値は徐々に上昇し、培養 4 日後には $4.1 \mu\text{g/ml}/1.0 \times 10^4$ cells に至つた。この KK 21-K28

図11 FDP in the supernates of cultures

図12 FDP in the supernates of cultures

の FDP 測定中、顕微鏡的観察では細胞の増殖が認められた。

正常腎皮質 4 例では図 12 に示したように、培養日数とともに FDP 値の増加が認められ、培養 4 日後には 7.5

図13 正常腎皮質 (DK4-K1) 由来培養細胞× 200, fibrin slide 法, incubation 60分

図15 膀胱移行上皮癌由来上皮細胞 (KB2-B1) × 100, fibrin slide 法, incubation 120分

~38.6 μ g/ml/1.0 $\times$ 10⁴cells であつた。この時の顕微鏡的観察では細胞の増殖が認められ、細胞数の増加、培養日数とともに FDP 値が上昇する傾向が認められた。

4. 培養細胞の線溶活性の組織化学的観察

FDP を測定しえた培養細胞について組織化学的方法すなわち fibrin slide technique により検討した。図13に示すごとく、正常腎皮質由来の培養細胞では incubation 30分でこれらの細胞を中心とした fibrin 膜の溶解が認められ、60分ではさらにこの fibrin 膜の溶解は明瞭となつた。これに比し図14に示すごとく、腎細胞癌由来の培養細胞では incubation 60分後にも fibrin 膜の溶解は認められず、incubation 120分でもようやく一部の細胞周囲に溶解が認められた。膀胱移行上皮癌由来の培養細胞では、壊死に陥つたと思われる細胞構造の不明瞭なもの周囲にのみ fibrin 膜の溶解が認められたが(図15)、染色上 intact な構造を示す cell sheet の細胞では incubation 180分でも fibrin 膜の溶解は認め

図14 腎細胞癌 (KK21-K28) 由来培養細胞× 100, fibrin slide 法, incubation 120分

られなかつた。一方 HeLa 細胞においても発育良好な cell sheet を示す細胞は incubation 180分でも fibrin 膜の溶解を示さなかつた。これらの fibrin 膜の溶解はいずれも plasminogen—rich fibrinogen を用いたときのみ認められ、plasminogen—free fibrinogen を用いた場合には溶解は認められなかつた。従つて、これらの fibrin 膜溶解は plasminogen activator の作用によるものと考えられた。

5. 培養液上清の urokinase inhibitory activity の測定

表5に示したごとく腎細胞癌7例、膀胱移行上皮癌3例および HeLa 細胞について urokinase inhibitory activity を測定した。腎細胞癌の urokinase inhibitory activity は 1.21~26.43 CTA units/ml/1.0 $\times$ 10⁴ cells であ

表5 Urokinase inhibitory activity of the supernates of cultures from cancerous tissues

Tissue : No.	Urokinase inhibitory activity	
	CTA units/ml	CTA units/ml/ 1.0 $\times$ 10 ⁴ cells
Renal cell carcinoma		
DK 3—K 2	37.0	26.43
DK 5—K 6	8.0	4.44
DK 8—K 9	36.5	5.29
DK10—K11	18.0	11.25
KK 2—K 4	21.5	2.39
KK 9—K18	21.5	1.21
KK11—K20	47.0	4.27
Bladder cancer (transitional cell carcinoma)		
KB 2—B 1	26.5	0.35
KB23—B 5	18.5	0.88
KB25—B 7	0	0
HeLa cells	5.0	0.12

り、膀胱移行上皮癌に比し明らかな高値を示す傾向が認められた。この inhibitory activity は HeLa 細胞のそれに比していずれも高値を示した。

考 按

組織培養，ビールス学，組織化学，免疫学および電子顕微鏡などを導入しての癌の研究には著しい進歩がみられる。特に組織培養に関しては，1952年に Gey が HeLa 株を樹立して以来，ヒトの悪性腫瘍細胞の培養，細胞株の樹立は数多く報告され，その数は3けたを越す。報告数のみをみると細胞株の樹立は，いかにも技術的に容易であるかにみえるが，実際には非常な技術上の困難性がつきまとう³²⁾。ことにヒトの泌尿器悪性腫瘍細胞の培養，株化はきわめて困難とされており，その報告は数少ない。1955年 Cobb et al.³³⁾はヒト尿沈渣中の泌尿器腫瘍細胞の培養を試み，その後 Bregman & Bregman³⁴⁾の泌尿器腫瘍の培養成功例に引き続き，Jones³⁵⁾は腎細胞癌14例中4例に上皮性細胞の培養細胞を得た。その4例のうち1例は11カ月間に及ぶ17回の継代に成功している。また Shore et al.³⁶⁾は15例中13例において腎細胞癌の組織培養に成功し，癌患者の血清がその培養細胞に与える影響について検討している。本邦におけるヒトの腎細胞癌の培養は小松原ら³⁷⁾および Katsuoka et al.³⁸⁾によつて報告されている。しかしまだ細胞株の樹立されたという報告はみられない。著者らは腎細胞癌18例中11例に上皮細胞の発育を得ており，11例中1例は約4カ月間に及ぶ10回の継代に成功したが，真菌の混入により培養を中止した。閉鎖式静置単層培養という最も簡単な培養方法を用いたが，培養成功率は前記報告者達の成績とほぼ同様であつた。

1970年，Rigby & Franks³⁹⁾は器官培養によりヒトの膀胱移行上皮癌が細胞株として樹立されたと報告しているが，単層培養を用いたものは Cobb et al.³³⁾，Bregman & Bregman³⁴⁾，Jones³⁵⁾，本邦においては近藤⁴⁰⁾⁴¹⁾，矢島⁴²⁾⁴³⁾らの報告がみられる。矢島は34例中11例に上皮細胞の培養に成功し，そのうち1例は継代培養30代，920日を経過したという。著者らは64例に単層培養を試み，4例にのみ上皮細胞の増殖が得られた。この4例のうち1例は1977年2月現在77代の継代培養を重ねている。矢島の成績に比し著者らの培養成功率が低い理由として，手術前にすでに尿路感染を伴つた検体が多く，検体の選択に問題があつたと思われた。

組織培養において，腫瘍細胞は正常細胞よりも早くガラス面に付着し³³⁾，良性組織よりも悪性細胞は早く成育

するとされている³⁴⁾。著者らは正常腎実質24例中21例に上皮細胞の増殖が得られた。これは腎実質腫瘍に比し良好な成績であつた。しかし，正常な膀胱移行上皮組織は5例について培養を試みたが全例失敗に終つた。腎盂移行上皮粘膜1例に線維芽細胞の発育が認められた。膀胱移行上皮細胞の培養成績の悪い理由として 1)手術材料を用いているため検体が非常に少量であること，2)上述のごとくすでに組織内の感染が認められることなどが考えられた。

全体として126例の培養を試み，40例に上皮細胞の増殖を認めた。腎実質腫瘍や正常腎実質の培養成功率はそれぞれ70.0%，87.5%と高率であつたが，膀胱移行上皮癌や正常膀胱粘膜の培養成功率はそれぞれ15.6%，0%ときわめて低率であつた。前二者と後二者の培養成功率の相違の理由として，感染のほかは腎実質細胞と移行上皮細胞との間にガラス表面への付着力の相違，および培養液中での発育力または生活力の相違などが存在すると思われる。摘出標本の病理組織学的検査において，小円形細胞や多核白血球などの浸潤の著明な症例が多く，検体の約50%にこのような所見が認められたことにより，術前の感染防止の重要性が痛感された。

線溶の研究において腎は urokinase との関連においてきわめて興味深い研究対象の1つである。ヒトその他の哺乳動物の腎組織における組織化学的線溶活性の局在は，弓状，葉間血管を中心とした強い plasminogen activator 活性によるもので，Myhre-Jensen⁴⁴⁾によると vasa recta, peripelvic lobar arteries が最も強い線溶活性を示し，ついで arcuate vessels, interlobular vessels であると述べている。久住ら⁴⁵⁾はラット腎の分離糸球体を作製し，凍結切片を用いた組織化学的方法では認められない強い plasminogen activator 活性の出現することを報告し，特に urokinase 産生についての研究上有用な材料になりうる可能性を示唆した。Åstedt⁴⁶⁾はヒトの分離糸球体は組織培養法により強い plasminogen activator 活性を示すことを認めている。もちろんこのほか組織培養法を用いた腎組織の線溶系酵素の産生についての研究もとりあげられ，この方面の仕事は Bernik & Kwaan³⁰⁾⁴⁷⁾により主として研究されている。彼らは成人や胎児の種々の正常組織を組織培養法により検討し，培養中の発育細胞からは免疫学的に urokinase type とみなされる plasminogen activator が培養液中に産生され，一方 tissue type と彼らの呼ぶ plasminogen activator が細胞の死とともに放出されることを報告した。さらに興味深いこと

はこの両者に対する fibrinolysis inhibitors も産生または放出され、この両者の比率は用いた臓器により異なり、成人の腎の初代培養ではその上清中に plasminogen activator 産生が多く、しかもこの activator のほとんどが免疫学的に urokinase type であったと述べている。腎が urokinase type の activator に富んだ臓器であるとともに、腎のみならず全身の各臓器の細胞が urokinase 産生の能力を有することを示唆している。一方肺や膀胱の初代培養では上清中に plasminogen activator の産生は認められず、urokinase に対し選択的抑制を示す阻止系の強い活性が検出されたと報告している。著者の単層培養を用いた実験でも、正常腎皮質および腎髄質由来の培養細胞は上清中に urokinase type とみなされる plasminogen activator が検出された。培養細胞数当りの上清中 plasminogen activator の値については皮質、髄質間に有意差は認められず、部位別の意味は求められなかった。また Åstedt⁽⁴⁹⁾は胎児の腎皮質、髄質、大静脈および大動脈の器管培養を行い、その上清中の FDP 産生を検討した。彼は著者と同様皮質、髄質両者において上清中に FDP 値の上昇することを認めた。Andrassy et al.⁽⁵⁰⁾は cortical urokinase は尿中 urokinase と免疫学的に同種であるが、medullary urokinase は異なるものであると主張している。著者の実験では免疫学的に皮質、髄質産生 plasminogen activator はいずれも urokinase type であり両者間に差異ある結果は得られなかった。

組織培養法による悪性腫瘍細胞、あるいは oncogenic transformation に伴う細胞の線溶発現は plasminogen activators によるもので、腎や肺の場合を除きそれらの組織の counterpart に比較するとその活性は顕著であるとされている。そしてそれが今日組織培養法における悪性細胞としての1つの有用な付加的指標とさえ考えられている^{(23) (51) ~ (54)}。Peterson et al.⁽⁵⁵⁾ (1973) はヒトの悪性腫瘍から分離した新鮮な単一細胞に線溶活性を認めており、またヒト悪性腫瘍から由来した数種の細胞株に強い線溶活性の存在が Laug et al.⁽²³⁾ (1975) により報告されている。Pearlstein et al.⁽²⁴⁾ はヒト膀胱癌由来の3細胞株について、¹²⁵I-fibrinogen を用いた fibrin plate 法により線溶活性を測定した。彼らはこの3株のうち1株に線溶活性を認めたと報告し、この線溶活性は細胞株における1つの分化した機能で、膀胱癌細胞そのものの生物学的機能とは認めたいと述べている。Hisazumi et al.⁽⁵⁶⁾ も膀胱移行上皮癌由来の3株 (T24, RT4, MANO) のうちの1株に plasminogen activator の産生

を認めた。著者らの成績は細胞株についての成績ではないが、培養悪性細胞における線溶活性の発現をそれが悪性であることの criteria の1つとして断定するにはかなり無理があるものと考えられた。

腎細胞癌由来の培養細胞の線溶活性について述べた報告は今のところまだ見当たらず、著者の成績ではそれらの培養液上清中に線溶活性を認めることができなかった。このことは腎細胞癌由来の細胞が fibrinolysis inhibitor dominant な性格を有するための結果か、あるいは activator dominant の性格を有してもその産生量が少なく、用いられた培養液中に含まれる胎児牛血清中の fibrinolysis inhibitors の存在の結果かどうかは不明確である。しかし一般に用いられた胎児牛血清の urokinase inhibitory activity は約6 CTA units/ml と低値であることから、この培養細胞は inhibitor producer であると考えたほうが妥当であろう。特に正常腎組織由来の培養細胞が顕著な plasminogen activator 活性を示したのに対し、腎細胞癌由来のそれが線溶活性を示さず、むしろ inhibitor dominant に変化している点は注目すべきである。これらの成績は主として初代培養に関する成績であるから、当然癌細胞以外に間質や血管系の細胞の混在が考えられ、それらの細胞の産生する線溶系物質の総和として表現されることを見逃すことはできない。Åstedt⁽⁴⁹⁾ は器官培養法を用いた口腔内悪性腫瘍の線溶活性を測定し、その線溶活性は組織内の悪性細胞よりも、その中に存在する血管系成分に左右されるだろうと推論している。ヒト静脈、毛細血管の内皮細胞が plasminogen activator を有することは古くから知られている^{(57) (58)}。またヒト動脈壁内に fibrinolysis inhibitors の存在することが組織化学的に Noordhoek & Brakman⁽⁵⁹⁾ により証明されている。腫瘍血管が主として平滑筋の欠陥から adrenergic drugs に対する収縮性反応を欠如して、それが pharmacangiography として臨床的に応用されているが、このような解剖学的、生理学的変化に伴う腫瘍血管の線溶系の変化も当然考慮されるべきであろう。従つて株化癌細胞の場合と異なり、器官培養や初代培養の場合には癌組織としての線溶系の動きを反映させることが可能であろう。

組織培養上の metabolizing cell よりの urokinase type の activator 産生と異なり、損傷あるいは死亡した細胞からは組織化学的に膀胱癌由来の培養細胞において tissue type といわれる activator の存在が証明されたが、久住⁽¹²⁾ は同様の所見を膀胱癌細胞塗抹標本について

も認めている。著者の組織化学的検討による成績は、いずれも培養液上清の FDP 測定による線溶の成績と一致するものであつた。しかし種々の細胞が混在し、それらの線溶活性を示した細胞を同定することは不可能であつた。

腎細胞癌の場合と同様に、膀胱移行上皮癌においてもその上清中に FDP 測定、fibrin plate 法の両者において線溶活性を認めることはできなかつた。著者の膀胱移行上皮癌由来の培養細胞 KB2—B1の上清を用いて urokinase inhibitory activity を測定してみると、26.5 CTA units/ml であつた。ここで用いられた培養液 FC—20の有する urokinase inhibitory activity は約1.0 CTA units/ml であり、urokinase inhibitors の産生のあつたことも明確であり、KB2—B1は inhibitor producer と考えられた。Hisazumi & Fukushima¹⁵⁾は BBN (N—butyl—N—butanol (4) —nitrosamine) を用いた実験的ラット膀胱癌を作製し、その局所線溶を検討したが、彼らは癌の発生とともに癌組織中の plasminogen activator 量の増加と平行して、さらに顕著な fibrinolysis inhibitors の増加を来とし、inhibitor dominant の状態に移行することを示した。当教室のヒト膀胱癌の局所線溶の研究も urokinase に対し選択的な抑制を示す inhibitor の増加のあることを示しており、著者の KB2—B1の成績もそれに一致するものである。この KB2—B1の継代22代において再び線溶活性を測定したが、初代培養時と全く同様の結果であつた。この線溶系の態度を細胞株として樹立した後も維持するかどうか、あるいは activator producer に変化するかどうかは、きわめて興味あるところである。

Clifton & Grossi³⁾はヒト扁平上皮癌組織には線溶活性はほとんど認められなかつたと述べているが、著者の HeLa 細胞の培養液上清に線溶活性を全く認めることはできなかつた。田中ら^{9,11)}は肺癌、子宮頸癌および胃癌組織の組織化学的線溶の検討から、非癌組織に比し癌塊内における線溶活性の低いことを強調し、癌組織における線溶活性は主として血管内皮細胞に由来し、癌塊内の血管中心性に認められる線溶活性が低下していると報告している。このような状態は癌塊周辺に fibrin 沈着を助長し、これは間質に増殖性反応、間質形成を促進するとともに、癌塊内に血栓形成が発生しやすく、血管内腔の閉塞により癌組織の壊死発生や、抗癌剤の組織内到達を妨害していると推論している。著者の腎細胞癌や膀胱移行上皮癌についての成績は田中らの見解を支持する

ものであろう。

先にも述べたごとく、Bernik & Kwaan⁴⁷⁾の論文は線溶系の研究に組織培養法を導入し、組織や細胞のもたらす fibrinolysis の検討の可能性を示した点ですぐれたものである。しかし、あらかじめ培養液中に含有される血清成分の存在は、明確な分析を困難にする重大な問題を含んでいる。株化細胞の場合には serum free での培養も短時間では可能であるため、この種の条件下での2、3の報告が見られるが、初代培養では不可能である。著者らは初代、2～3代の継代培養を用い、得られた培養液上清の生化学的検討や細胞の組織化学的検討から、腎、膀胱の癌組織由来の培養細胞は inhibitor producer として、一方正常腎組織のそれは activator producer としての態度をとることを明らかにした。この成績と多くの悪性細胞が activator producer であると考えられている点との不一致^{23), 51) ~ 54)}は、株化細胞を用いていないこと、組織の種類や継代培養中における各種細胞の population の変動、またそれら細胞の生物学的性格の変動に由来するものと考えられる。このような意味から著者の成績は、これまで株化細胞を用いた研究成績よりも、より生体に近い結果かもしれないし、これまで報告された癌組織の局所線溶の成績を支持するものといえよう。ただここで得られた成績は組織培養という in vitro における人為的条件下であり、また腫瘍組織は局所線溶に対し影響を与える種々の組織構成成分から成つていて、これらが腫瘍の発育とともに宿主側としての反応を伴っていることは充分考えられ、それは当然酵素産生の点でも質的、量的に変動することが考えられている。かかる観点からすると単一な癌細胞株の示す成績に比して、初代培養の成績がさらに臨床的に有用かもしれない。

当教室においては膀胱癌再発防止法として urokinase と抗癌剤の併用膀胱内注入療法を施行してきたが、より有効な urokinase の投与量の決定には腫瘍のもつ inhibitor level を決定することが必要であろうと考えられる。しかし目下のところ、その簡便かつ正確な方法は見出しえず、また膀胱移行上皮癌由来の細胞株の線溶活性を調べてみても、細胞株の間ですら線溶系の態度が異なるなど問題は複雑で、今後の研究に残されるところが多である。

結 語

ヒト泌尿器悪性腫瘍および正常組織の単層培養を行い、それらの培養液上清の線溶活性を fibrin plate 法、

および培養瓶中に fibrin 塊を作製した後の上清中の FDP 測定により検討した。また培養細胞における線溶活性の局在は histochemical fibrin slide 法により検討した。

得られた結果は次のとおりであつた。

1. 腫瘍組織における上皮細胞の発育は、腎細胞癌11例, Wilms 腫瘍1例, 腎血管筋脂肪腫1例, 腎盂移行上皮癌2例および膀胱移行上皮癌4例に得られた。

2. 正常組織由来の上皮細胞は、腎皮質17例および髓質4例に得られた。正常移行上皮由来の上皮細胞の発育は得られなかつた。

3. fibrin plate 法による培養上清の線溶活性測定において、腎細胞癌, 膀胱移行上皮癌由来の細胞および HeLa 細胞の培養液上清には線溶活性は認められなかつた。

4. 腎皮質および腎髓質では、すべての培養液上清に fibrin plate 法にて線溶活性が認められ, plasminogen activator による活性であつた。その力価はそれぞれ $0.20 \sim 25.36$ CTA units/ml/ 1.0×10^4 cells, $1.88 \sim 5.00$ CTA units/ml/ 1.0×10^4 cells であつた。またこれらの plasminogen activator は免疫学的に urokinase type であつた。

5. 膀胱移行上皮癌由来細胞および HeLa 細胞では、培養4日後にも上清中に FDP は認められなかつた。腎皮質由来の4例では培養4日後に $7.5 \sim 38.6 \mu\text{g/ml}$ / 1.0×10^4 cells の FDP が認められ、腎細胞癌では、 $4.1 \mu\text{g/ml}$ / 1.0×10^4 cells であつた。

6. histochemical fibrin slide 法では、腎皮質由来の4例の培養細胞で incubation 30分後に fibrin 膜の溶解窓が認められた。腎細胞癌由来の細胞では弱い線溶活性が認められた。膀胱移行上皮癌由来細胞および HeLa 細胞では180分後にも生細胞部での溶解窓は認められなかつた。

7. 標準 urokinase を用いた時の fibrinolysis に対する培養液上清の inhibitory activity を検討すると、腎細胞癌のそれは8.0ないし47.0 CTA units/ml であつた。これらの培養細胞は inhibitor producer であろうと考えられた。また膀胱移行上皮癌由来の培養細胞 KB2-B1 も inhibitor producer と考えられた。

初代または2～3代の継代培養を用い、腎、膀胱の癌組織由来の培養細胞は inhibitor producer として、一方正常腎組織のそれは activator producer としての態度をとることを明らかにした。さらに泌尿器悪性腫瘍に対す

る urokinase と抗癌剤の併用療法に関して、これらの所見の生物学的および臨床的重要性を述べた。

擧筆するに当り終始御懇篤な御指導、御校閲を賜つた恩師黒田恭一教授に深謝致します。実験について貴重な御助言、御指導を頂いた久住治男助教授をはじめ、膀胱腫瘍研究班の諸兄、教室員各位、田中耕一文部技官らの御厚意に感謝します。また組織培養に関して御指導、御助言を頂いた本学がん研究所ウイルス部波田野基一教授、ならびに本学薬学部放射薬品化学堀川正克教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は第65回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) O'Meara, R.A.Q.: Irish, J. Med. Sci., **394**, 474, 1958.
- 2) O'Meara, R.A.Q.: Thromb. Diath. Haemorrh. Suppl., **28**, 137, 1968.
- 3) Clifton, E.E. and Grossi, C.E.: Cancer, **8**, 1146, 1955.
- 4) 阿部恒男, 井上 宏, 今井珍彦, 大淵重敏: 癌の臨床, **15**, 785, 1966.
- 5) 山本政勝: 最新医学, **26**, 365, 1971.
- 6) 田中健蔵: 東京医科大誌, **26**, 571, 1968.
- 7) 田中健蔵, 児玉好史, 甲賀 新: 血液と脈管, **3**, 1025, 1972.
- 8) Peterson, H.I.: Acta Chir. Scand. Suppl., **394**, 1968.
- 9) 藤井節郎, 須見洋行: 基礎と臨床, **7**, 2745, 1973.
- 10) 下山正徳, 仁井谷久暢, 谷口 猛, 稲垣治郎, 木村禮代二: 医学のあゆみ, **65**, 349, 1968.
- 11) 仁井谷久暢: 最新医学, **28**, 912, 1973.
- 12) 久住治男: 日泌尿会誌, **62**, 519, 1971.
- 13) Hisazumi, H., Naito, K. and Misaki, T.: Invest. Urol., **11**, 28, 1973.
- 14) Hisazumi, H.: Invest. Urol., **11**, 258, 1973.
- 15) Hisazumi, H. and Fukushima, K.: Urol. Research, **1**, 186, 1973.
- 16) 久住治男, 打林忠雄, 内藤克輔, 三崎俊光: 日泌尿会誌, **65**, 488, 1974.
- 17) 久住治男, 内藤克輔: 日泌尿会誌, **65**, 500, 1974.
- 18) Hisazumi, H., Naito, K., Misaki, T. and Kosaka, S.: Urol. Research, **2**, 137, 1974.
- 19) Hisazumi, H.: Acta Urol. Jap., **21**, 731, 1975.
- 20) 小島 明: 日泌尿会誌, **66**, 753, 1975.
- 21) Hisazumi, H., Uchibayashi, T., Naito, K., Misaki, T. and Miyazaki, K.: J. Urol., **114**, 394, 1975.
- 22) 久住治男, 打林忠雄, 内藤克輔, 三崎俊光, 宮

- 崎公臣, 黒田恭一: 泌尿紀要, **21**, 735, 1975.
- 23) Laug, W.E., Jones, P.A. and Benedict, W.F.: J. Natl. Cancer Inst., **54**, 173, 1975.
- 24) Pearlstein, E., Hynes, R.O., Franks, L.M. and Hemmings, V.J.: Cancer Research, **36**, 1475, 1976.
- 25) 中井準之助, 岡本道雄, 山田正篤, 井上幸重, 小川和朗, 堀川正克: 組織培養, 1 版, p. 39, 朝倉書店, 東京, 1964.
- 26) Levintow, L. and Eagle, H.: Ann. Rev. Biochem., **30**, 605, 1961.
- 27) 若山雄次, 佐竹喜三雄, 恒松徳五郎, 深瀬政市: 尿管学, **14**, 581, 1974.
- 28) Åstedt, B., Pandolfi, M. and Inga Marie Nilsson: Experientia, **27**, 358, 1971.
- 29) 浜島義博, 安田健次郎: 蛍光抗体法・酵素抗体法, 1 版, p. 43, 医学書院, 東京, 1974.
- 30) Bernik, M.B. and Kwaan, H.C.: J. Clin. Invest., **48**, 1740, 1969.
- 31) 田谷 正, 小林徹治, 塚原健治, 打林忠雄, 内藤克輔, 久住治男, 黒田恭一: 日泌尿会誌投稿中.
- 32) 三宅清雄: 医学のあゆみ, **90**, 35, 1974.
- 33) Cobb, J.P., Kiefer, J.H. and Wood, F.H.: J. Urol., **73**, 1039, 1955.
- 34) Bregman, R.U. and Bregman, E.T.: J. Urol., **86**, 642, 1961.
- 35) Jones, G.W.: Cancer, **20**, 1893, 1967.
- 36) Shore, B., Wise, G.J., McBride, R.A. and Brendler, H.: J. Urol., **103**, 554, 1970.
- 37) 小松原秀一, 坂田安之輔, 浜路政博: 日泌尿会誌, **66**, 180, 1975.
- 38) Katsuoka, Y., Baba, S., Hata, M. and Tazaki, H.: J. Urol., **115**, 373, 1976.
- 39) Rigby, C.C. and Franks, L.M.: Brit. J. Cancer, **24**, 746, 1970.
- 40) 近藤義雄: 名古屋市立大学医学会雑誌, **16**, 912, 1966.
- 41) 近藤義雄: 名古屋市立大学医学会雑誌, **17**, 103, 1966.
- 42) 矢島暎夫: 日泌尿会誌, **59**, 128, 1968.
- 43) 矢島暎夫: 日泌尿会誌, **61**, 805, 1970.
- 44) Myhre-Jensen, O.: Lab. Invest., **25**, 403, 1971.
- 45) 久住治男, 中嶋和喜, 三崎俊光: 日泌尿会誌, **68**, 152, 1977.
- 46) Åstedt, B.: Thromb. Diath. Haemorrh., **34**, 338, 1975.
- 47) Bernik, M.B. and Kwaan, H.C.: J. Lab. & Clin. Med., **70**, 650, 1967.
- 48) Bernik, M.B. and Kwaan, H.C.: Amer. J. Physiol., **221**, 916, 1971.
- 49) Åstedt, B.: Thromb. Diath. Haemorrh. (Stuttg.), **34**, 644, 1975.
- 50) Andrassy, K., Buchholz, L., Seidel, D., Ritz, E. and Bleyl, U.: European Society for Clinical Investigation, **4**, 362, 1974.
- 51) Jones, P. and Benedict, W.: Cell, **5**, 323, 1975.
- 52) Ossowski, L., Unkeless, J.C., Tobia, A., Quigley, J.P., Rifkin, D.B. and Reich, E.: J. Exp. Med., **137**, 112, 1973.
- 53) Unkeless, J.C., Tobia, A., Ossowski, L., Quigley, J.P., Rifkin, D.B. and Reich, E.: J. Exp. Med., **137**, 85, 1973.
- 54) Unkeless, J., Danø, K., Kellermann, G.M. and Reich, E.: J. Biol. Chem., **249**, 4295, 1974.
- 55) Peterson, H.I., Kjartasson, I., Korsan-Bengtsson, K., Rundenstam, C. and Zettergren, L.: Acta Chir. Scand. Suppl., **219**, 1973.
- 56) Hisazumi, H., Andersson, L. and Collins, P.: Urol. Research in press.
- 57) Todd, A.S.: J. Path. Bact., **78**, 281, 1959.
- 58) Kwaan, H.C.: Fed. Proc., **25**, 52, 1966.
- 59) Noordhoek, H.V. and Brakman, P.: Nature, **248**, 75, 1974.

(1977年5月16日受付, 特別掲載)