電顕酵素抗体法によるヌードマウス移植腎細胞癌とその初代 単層培養における Erythropoietin 産生細胞の検討

国立栃木病院泌尿器科 萩原 正 通
(現所属: 栃木県立がんセンター泌尿器科)

ULTRASTRUCTURAL IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDIES ON ERYTHROPOIETIN— PRODUCING CELLS IN A HUMAN RENAL CARCINOMA GROWN IN ATHYMIC NUDE MICE AND PRIMARY MONOLAYER CULTURES

Masamichi Hagiwara

Department of Urology, National Tochigi Hospital, Utsunomiya, Japan

The present studies were carried out to characterize the morphology of erythropoietin (Ep)-producing cells in a human renal carcinoma from a patient with erythrocytosis which grew in athymic nude mice and in primary monolayer cultures.

The renal carcinoma cells in mice, when examined under transmission electron microscopy, showed microvilli, tight junctions and a cytoplasm with scattered glycogen particles, a few lipid droplets, abundant free ribosomes and sparse rough endoplasmic reticulum. Their nuclei showed marked invaginations and heterochromatin. The renal carcinoma-bearing mice did not develop erythrocytosis. Serum Ep measured by radioimmunoassay was not elevated in the renal carcinoma-bearing mice compared to control mice. Homogenates of the renal carcinoma in mice did not contain detectable levels of Ep.

The renal carcinoma cells in primary monolayer cultures retained the ultrastructural features similar to those in vivo. However, the domes, which developed after the renal carcinoma cell cultures reached confluency, contained a distinct type of cells with a cytoplasm of markedly low electron density (LED cells). LED cells contained abundant and dilated rough endoplasmic reticulum in the cytoplasm and showed less prominent microvilli and an oval nucleus with euchromatin. Neither the spent media nor homogenates of cultured renal carcinoma cells in semiconfluency contained significant levels of Ep. However, after the cultured cells reached confluency, Ep levels in their spent media and homogenates showed a marked exponential increase in parallel with the increase in number of the domes.

The intense Ep-like immunoreactivity was localized only in the LED cells with the peroxidase-antiperoxidase method utilizing rabbit antiserum to human Ep.

These data support our hypothesis that LED cells are responsible for Ep production in human renal carcinoma. However, further studies are needed to elucidate the mechanism of development of LED cells in the renal carcinoma.

要旨: 赤血球増多症を呈した患者由来のヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌とその初代単層培養における erythropoietin (Ep) 産生細胞を電顕酵素抗体法を用いて検討した。

ヌードマウス移植腎細胞癌は、光顕的には胞巣状に増殖する未分化な腫瘍細胞からなり、透過型電顕により観察すると、細胞質には散在性のグリコーゲン顆粒、少数の脂肪滴、豊富な遊離リボソーム、比較的未発達な粗面小胞体を認め、核は核膜の陥入が著明で、heterochromatin の状態を呈し、細胞接着面にはtight junction を、細胞表面には微絨毛を認めた。本腫瘍は初代単層培養で培養細胞の分泌・輸送機能を示すと考えられる dome を形成し、この dome を形成する細胞群のなかに粗面小胞体の発達した、電子密度の低い細胞(LED 細胞)が認められた。LED 細胞は微絨毛が少なく、核は卵円形で euchromatin の状態を呈した。

本腫瘍は、ヌードマウス移植系では明らかな Ep 活性を産生しないが、単層培養系では高値の Ep 活性を産生し、Ep 産生と dome 形成との間には密接な相関が認められた。

抗 Ep 抗血清を用いた酵素抗体法により Ep の局在を検討したところ、ヌードマウス移植腫瘍には明らかな陽性染色が認められず、培養細胞にのみ陽性染色が認められた。この Ep 陽性細胞は主に dome に局在し、電顕観察の結果、LED 細胞と判明した。

以上の結果は LED 細胞がヒト腎細胞癌における Ep 産生細胞であることを強く示唆するものであるが、LED 細胞の発生については今後の検討が必要と思われた。

結 言

腎細胞癌患者において、赤血球増多症を伴い、血中および尿中 erythropoietin (以下 Ep と略す) 活性の上昇が確認された症例が報告されている^{1)~7)}。腫瘍の切除により赤血球増多症が寛解し、腫瘍抽出液中に Ep 活性が存在する事実は、この腫瘍が Ep 産生能を有することを強く示唆するものである。そして、1976年、Sherwood and Goldwasser⁸⁾が単層培養されたヒト腎細胞癌の培養液中に Ep 活性の存在を証明した報告は腎細胞癌による Ep 産生の直接証拠となった。その後、同様の報告^{9)~11)}が相次ぎ、現在、腎細胞癌による Ep 産生はほとんど疑う余地のない事実となっているが、腎細胞癌のなかの Ep 産生細胞の形態学的特徴については現在全く不明である。今回、著者は、赤血球増多症を呈した患者由来のヌードマウス可移植性腎細胞癌とその初代単層培養における Ep 産生細胞を電顕酵素抗体法を用いて検討したので報告する。

実験材料と方法

1. 腎細胞癌のヌードマウス移植

1974年、慶応義塾大学医学部において、赤血球増多症を呈した腎細胞癌患者の肺転移巣がヌードマウスに移植され、移植された腫瘍の Ep 産生能は Toyama ら⁷⁾により確認された。このヌードマウス可移植性腎細胞癌はその後凍結保存されたが、その一部が再度ヌードマウスに移植され、1980年 Tulane 大学医学部薬理学教室に供与された。同教室における腫瘍の継代法は既報¹⁰⁾の通りで、本実験では第20~22継代後の腫瘍を材料として用いた。移植腫瘍を摘出する際に、心穿刺により採血を行ない、ヘマトクリットを測定するとともに、血清を分離し、Ep 測定のため-76℃に凍結保存した。

2. ヌードマウス移植腎細胞癌の初代培養

ヌードマウス移植腎細胞癌の初代培養は既報¹⁰⁾のごとく行なった。すなわち、ヌードマウスより無菌的に切除した腫瘍を細切後、100メッシュのステンレス網で濾過、さらに19~25Gの注射針を通し細胞を分散した。これを Okabe ら¹³⁾の方法により作成した抗ヌードマウス抗血清で処理し、トリパンブルー染色法により生

細胞数を算定、25cm²の組織培養用プラスチックフラスコ (Falcon, Oxnard, CA) に各フラスコ0.5×10⁶個ずつ植込み、37℃、5%CO₂-airの条件下で静置培養した。なお、培養液は、10%牛胎児血清 (Flow Laboratories, Rockville, MD)、0.1mM 非必須アミノ酸 (GIBCO, Grand Island, NY)、1mM ビルビン酸ナトリウム (GIBCO)、100μg/ml ストレプトマイシンおよび100U/ml ペニシリンを加えた Eagle's MEM (GIBCO) を用いた。培養液は3日毎に交換した。Ep 測定に供する培養液は-76℃に凍結保存した。細胞密度は、Trypsin-EDTA (GIBCO) 処理による細胞分散後、生細胞数を算定することにより測定した。

3. 培養細胞のヌードマウス移植

36日間培養後の細胞を Trypsin-EDTA 処理により回収、生細胞数を算定し、4匹のヌードマウス背部皮下にそれぞれ2×10⁷個ずつ移植した。

4. ヌードマウス移植腫瘍および培養細胞の形態観察

ヌードマウス移植腫瘍は、まず3%グルタルアルデヒドで12時間固定し、さらに2%オスミウム酸で30分間後固定した。エタノール系列による脱水の後、プロピレンオキシドとエポン混合液の1:1混合液を浸透、引き続きエポン混合液を浸透させ、60℃にて48時間加熱しエポン樹脂を硬化させた。光学顕微鏡による観察には Sorvall 社製超ミクロトームを用いて厚さ0.5μmの切片を作製し、トルイジンブルーで単染色した。電子顕微鏡による観察には厚さ80nmの超薄切片を作製し、酢酸ウラニールおよびクエン酸鉛による2重染色を行ない、日本電子社製 JEM 100B 透過型電子顕微鏡により超薄切片の観察および写真撮影を行なった。

培養細胞は、オリンパス社製倒立位相差顕微鏡により観察するとともに、電顕観察のため、単層培養の状態で3%グルタルアルデヒド2時間固定、2%オスミウム酸で30分間後固定を行ない、エタノール系列による脱水、エタノール・エポン混合液の1:1混合液の浸透、さらにエポン混合液の浸透を行なった。60℃、48時間加熱により硬化した樹脂を包埋された培養細胞

とともにフラスコから機械的にはがし、観察したい部位をブロックとして切り出した。光顕による観察には厚さ $0.5\mu\text{m}$ の切片を作製し、トルイジンブルーによる単染色を行ない、電顕による観察には厚さ 80nm の超薄切片を作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛による二重染色を行なった。

5. ヌードマウス移植腫瘍および培養細胞のhomogenate作成

ヌードマウス移植腫瘍を切除し、重量を測定後細切、組織 1g あたり 5ml の 0.01M PBS (pH 7.3) を加え、 4°C で90秒、Potter-Elvehjem型 glass homogenizerを用いて組織をhomogenizeした。さらに、このhomogenateを氷片中で1分間、Sonifier Cell Disrupter (Branson Sonic Power Co., Plainview, LI, NY)を用いて、 20KC で音波処理を行なった。

培養細胞は、Trypsin-EDTA処理により回収し生細胞数を算定、 1×10^7 個あたり 1ml のPBSを加え、上述の音波処理により細胞破碎を行なった。

これらのhomogenateは 4°C で $2,300 \times \text{g}$ 、30分間遠沈し、その上清をEp測定のため -76°C で凍結保存した。

6. Ep測定法

radioimmunoassayによりEpの測定を行った。われわれが用いたradioimmunoassayの詳細は既に報告¹⁴⁾した通りで、標準物質として高純度ヒトEp ($70,400\text{U}/\text{mg}$ protein)を用いた。測定感度は $6.6\text{mU}/\text{ml}$ であった。

7. 酵素抗体法

1) 抗Ep抗血清

家兎にまず週1回、4週にわたり総量 256U のヒトEp ($69\text{U}/\text{mg}$ protein)を静脈内に投与し初回免疫を行なった。12カ月後に 40U の高純度ヒトEp ($70,400\text{U}/\text{mg}$ protein)でbooster shotを行ない血清を採取した。この抗血清は 1ml で 100U のEpを中和する力価を示した。

2) 固定

固定液を選択するにあたり、ヌードマウス移植腎細胞癌の単層培養液中に検出されたEp活性に対する各種固定液の影響を検討した。まず高単位のEp活性を含む培養液 1ml を凍結乾燥し、これに 1ml の蒸留水または各種固定液を加え1時間incubate後、 4°C で24時間、PBSに対し透析を行なった。以上の処理後に残存するEp活性をradioimmunoassayにより測定したところ、Periodate-Lysine-Paraformaldehyde (PLP)処

Fig. 1 Effects of fixatives on erythropoietin (Ep) activity in spent culture medium of human renal carcinoma cells. One ml of the spent medium was lyophilized and treated with 4% paraformaldehyde (PFA), periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP), 0.4% glutaraldehyde (GA) or 4% PFA containing 0.05% GA for 1hr at 4°C . Following 24-hr dialysis against 0.01M phosphate-buffered saline (pH 7.3) at 4°C , the spent medium was assayed for Ep via radioimmunoassay. Freeze-drying (FD) and dialysis (D) had no effects on Ep activity. Ep activity was best preserved in the spent medium treated with PLP.

理で最もEp活性の低下が少なかったが、PLPでは培養細胞の固定が不十分で、酵素抗体染色の操作中に細胞が剥離してしまうため、PLPの次にEp活性に対する影響が少ない4%パラホルムアルデヒドを固定液として用いた (Fig. 1)。

ヌードマウス移植腫瘍は 1mm^3 に細切し、4%パラホルムアルデヒドで 4°C 、4時間固定、その後8%ショ糖加PBSで 4°C 、24時間固定液の洗浄を行なった。酵素抗体染色施行にあたっては、クリオスタットを用いて厚さ $20\mu\text{m}$ の切片を作製した。

培養細胞は、単層培養の状態で、4%パラホルムアルデヒドで 4°C 、1時間固定し、引き続き8%ショ糖加PBSで 4°C 、24時間洗浄した。さらに、酵素抗体染色に用いる抗体、試薬などの細胞内浸透を容易にするため、Eldredら¹⁵⁾の方法に従い、培養細胞のfreeze-

thawing, エタノール処理を行なった。

3) 酵素抗体染色

Sternberger ら¹⁶⁾の peroxidase-antiperoxidase 法を用いて Ep の局在を検討した。まず標本を 1% 過酸化水素を加えた 80% メタノールで 20 分間処理し内在性 peroxidase 活性を除去, 引き続き PBS で 2,000 倍に希釈した抗 Ep 抗血清または正常家兎血清と 4℃ で 48 時間 incubate した。次に, 50 倍希釈抗家兎 IgG 山羊抗体 (Miles Laboratories, Elkhart, IN) と 37℃ で 2 時間 incubate し, 引き続き 100 倍希釈の peroxidase-rabbit antiperoxidase soluble immune complex (Miles Laboratories) と 37℃ で 2 時間 incubate した。2.5% グルタルアルデヒドで 4℃, 30 分間固定後, 0.05% 3, 3'-diaminobenzidine-4 HCl および 0.03% 過酸化水素を加えた 0.05M トリス緩衝液 (pH 7.6) で約 10 分間 incubate し, peroxidase の発色を行なった。まず光顕的に標本の染色状態を観察し, 次に電顕による観察のため, 2% オスミウム酸固定, エタノール系列により脱水, エポキシ樹脂包埋を前述のごとく行なった。厚さ 80nm の超薄切片を作製し, 無染色で電顕観察を行なった。

結 果

1. ヌードマウス移植腎細胞癌の形態

ヌードマウス移植腎細胞癌は, 光顕的にはトルイジンブルーに濃染する N/C 比の大きな多角形~卵円形の細胞が胞巣状に増殖し, 細胞質は PAS 染色陽性であった。電顕的には, これらの細胞の細胞質には, 散在性のグリコーゲン顆粒, 少数の脂肪滴, 比較的多数のミトコンドリアを認め, 遊離リボゾームが豊富で, 粗面小胞体は比較的多数の未発達であった。核は heterochromatin の状態を呈し, 核膜の陥入が著明であった。細胞接着面には tight junction を認め, 細胞表面には微絨毛を認めた。

2. 培養細胞の形態と増殖

既報¹⁰⁾¹²⁾のごとく, 培養細胞は単層に, コロニー様の集落を作りながら増殖し, 植込み後約 12 日でフラスコ壁は敷石状に配列した細胞により隙間なく被われた状態 (confluency) となった。この状態での細胞密度 (confluent density) は約 13×10^4 個/cm² であり, 倍加時間は約 3.5 日であった (Fig. 2)。培養細胞は confluency に達してからも pile up しながら増殖し, 約 36 日で細胞密度は飽和状態となった。このときの細胞密度 (saturation density) は約 50×10^4 個/cm² であった。confluency に達した培養細胞は, 既報¹⁰⁾¹²⁾のごと

Fig. 2 Time course of cell growth (○), erythropoietin (Ep) production (□) and dome formation (△) in primary monolayer cultures of human renal carcinoma cells. Note the parallel increase in the number of domes and Ep activity (radioimmunoassay) in the 3-day spent media after the cultures reached confluency (approx. 13×10^4 cells/cm²).

く, hemicyst または dome を形成し, その数は時間とともに対数的に増加し, 培養 30 日で plateau に達した (Fig. 2)。

12 日間培養し confluency に達した細胞を電顕により観察すると, その微細構造はヌードマウス移植腎細胞癌に類似し, 細胞質には散在性のグリコーゲン顆粒, 少数の脂肪滴と比較的多数のミトコンドリアを認め, 遊離リボゾームは豊富であるが粗面小胞体は比較的多数の未発達であった。核は heterochromatin の状態を呈し, 核膜の陥入が著明であった。細胞接着面には tight junction を認め, 培養液に接する細胞表面には微絨毛を認めた。

confluency に達してからさらに長期間培養を継続すると dome が出現することは前述したが, この dome を構成する細胞群のなかに独特の形態学的特徴をもった細胞の混在が明らかとなった。既報¹²⁾のごとく, この細胞は電子密度の低い細胞質によく発達した粗面小胞体を含み, その核は euchromatin の状態を呈し, 核膜の陥入がほとんどなく, 明瞭な核小体を認めた。微絨毛は少ないが, 細胞接着面には tight junction を認めた。この細胞を LED 細胞と命名したが, この

Table 1 Erythropoietin (Ep) production by human renal carcinoma (RC) grown in nude mice and in primary monolayer cultures. Ep levels, as determined by radioimmunoassay (RIA), were significantly elevated only in the 3-day spent media and homogenates of cultured RC cells maintained for a prolonged period of time after reaching confluency at 12 days of cultivation. Results are expressed as Mean $\pm$ SEM.

Group	n	Hct(%)	Erythropoietin(RIA)	
			Serum or medium (mU/ml)	Homogenates of tumor or cultured cells (mU/g tissue or mU/10 ⁷ cells)
Control nude mice	4	46.5 $\pm$ 1.2	22.2 $\pm$ 9.5	—
RC-bearing nude mice	4	41.5 $\pm$ 2.6	19.5 $\pm$ 8.1	not detectable
Nude mice inoculated with RC cell cultures	4	41 $\pm$ 4.6	19.6 $\pm$ 2.6	not detectable
Control culture media	4	—	7.2 $\pm$ 0.47	—
Cultures maintained for 9 days	4	—	9.5 $\pm$ 0.96	not detectable
Cultures maintained for 36 days	4	—	546.2 $\pm$ 9.8	244.2 $\pm$ 16.5

LED細胞は、トルイジンブルーに淡染することから、他の細胞と容易に判別できた。LED細胞はフラスコ壁に付着した細胞層にはほとんど認められず、主に dome、とくにその頂部に、数個ずつのグループをつくり局在する傾向を示した。

3. 培養細胞のヌードマウス移植により形成された腫瘍の形態

培養細胞を移植されたヌードマウス背部皮下には4匹すべてに腫瘍が形成され、5週後には直径1cm以上となった。この腫瘍は、顕微鏡および電顕の観察により、培養細胞が由来したヌードマウス移植腎細胞癌に極めて類似の形態学的特徴を示すことが確認されたが、LED細胞に類似した細胞は認められなかった。

4. 血清、培養液および homogenate 上清中の Ep 活性

本研究で使用した腎細胞癌移植ヌードマウスのヘマトクリット値および血清 Ep 活性は、対照とした非担癌ヌードマウスと比較し、いずれも有意の差を示さなかった。また、ヌードマウス移植腎細胞癌の homogenate 上清にも Ep 活性を検出しえなかった (Table 1)。

6日間培養でいまだ confluency に達していない細胞の培養液中 Ep 活性は10mU/ml 以下で、対照培養液中の Ep 活性と比較し有意の上昇を示さないが、培養細胞が confluency に達した12日以降の培養液中には有意に高い Ep 活性が検出され、その Ep 活性は、時間

とともに対数的に上昇し、培養36日には500mU/ml 以上に達した (Fig. 2)。なお、Ep 測定に供した培養液は、対照培養液を除き、すべて、培養細胞と3日間 incubate 後のものであり、これら培養液中の Ep 活性は、過去3日間に培養細胞が培養液中に分泌した総 Ep 活性を反映するものと言える。さらに、9日間培養された細胞の homogenate 上清には Ep 活性を認めなかったが、36日間培養された細胞の homogenate 上清には高値の Ep 活性が検出された (Table 1)。

36日間培養した細胞の移植により腫瘍が形成されたヌードマウスのヘマトクリット、血清 Ep 活性は、対照非担癌ヌードマウスと比較し、有意の上昇を示さず、腫瘍の homogenate 上清の Ep 活性も測定感度以下であった。

5. 酵素抗体法による Ep の局在

ヌードマウス移植腎細胞癌および培養細胞のヌードマウス移植により形成された腫瘍には Ep の局在を示す陽性染色が全く認められなかった。6日間および12日間培養された細胞では、Ep 弱陽性と思われる細胞を認めるものの、その数は少なく、かつ散在性であった。一方、24日間および30日間培養された細胞では、Ep 陽性細胞が、主に dome、とくにその頂部にグループをつくり局在した (Fig. 3)。また、すべての dome に Ep 陽性細胞が認められた。なお、抗 Ep 抗血清を2,052.6U/mg protein の純度のヒト Ep で吸収すると陽性染色は完全に消失した。

Fig. 3 Immunocytochemical (peroxidase-antiperoxidase method) studies to localize erythropoietin (Ep) in cultured human renal carcinoma cells grown for 30 days. Light micrographs illustrating control staining with normal rabbit serum (a) and staining with rabbit anti-Ep antiserum (b, c and d). Note the intense cytoplasmic staining with the anti-Ep in some of the cells forming domes. Bars: $50\mu\text{m}$.

Ep 陽性細胞を電顕により観察すると、この細胞が LED 細胞であることが判明し (Fig. 4a), さらに、陽性染色は、細胞質内の小胞、粗面小胞体の一部に局在することが判明した (Fig. 4b).

考 察

本研究で使用したヌードマウス移植腫瘍は、赤血球

増多症を呈した腎細胞癌患者の肺転移巣に由来し、ヌードマウス継代初期には高単位の Ep 産生が確認された⁷⁾が、凍結保存と長期継代を経た現在、Ep 産生を思わせる所見は全くみられない。すなわち、本腫瘍移植ヌードマウスのヘマトクリット、血清 Ep 活性は、非担癌ヌードマウスと比較し有意差がなく、腫瘍の

Fig. 4 Ultrastructural immunocytochemistry (peroxidase-antiperoxidase method) to localize erythropoietin (Ep) in cultured human renal carcinoma cells grown for 30days. Low power electron micrograph of an ultrathin section of a dome (a) revealing LED cells (LED) exhibiting Ep-like immunoreactivity, which was localized in the small cytoplasmic vesicles of LED cells (b, arrows). Bars, a=2 μ m ; b=0.5 μ m.

homogenate 上清にも Ep 活性を検出しえなかった。しかしながら、既報¹⁰⁾¹²⁾¹⁷⁾のごとく、本腫瘍を単層培養すると、生物学的活性をもった高単位の Ep が培養液中に検出され、さらに、今回、培養細胞の homogenate 上清にも Ep 活性が認められたことから、本腫瘍単層培養細胞が Ep を産生することは疑う余地のないところと思われる。

Ep 産生とともに、本腫瘍培養細胞の興味ある特徴は dome を形成することである。dome 形成は分泌・吸収上皮由来の培養細胞において観察される現象であり、培養細胞の分泌・輸送機能のあらわれと考えられている^{18)~23)}。本腫瘍培養細胞において、dome を形成する細胞群のなかに、独特の形態学的特徴をもった細胞、すなわち LED 細胞が認められた。この LED 細胞は、dome を形成していない細胞層にはほとんど認められず、さらに、よく発達した粗面小胞体からみて高い分泌機能を有しているものと推測されることなどから、dome の形成に重要な役割をもった細胞と考えられた。

本腫瘍培養細胞においてさらに興味ある現象は、Ep 産生と dome 形成との密接な相関である。すなわち、confluency に達する前の培養細胞には Ep 産生も dome 形成も認められないが、confluency に達して後は、両者は平行して、対数的に増加した。この Ep 産生と dome 形成との相関から、dome を構成する LED 細胞が Ep 産生細胞であり、dome 形成は LED 細胞の Ep 分泌機能を反映したものではないかという仮説が導き出された¹²⁾。

今回、LED 細胞が Ep 産生細胞であるという仮説をさらに支持する知見が得られた。すなわち、ヌードマウス移植腎細胞癌、その初代単層培養および培養細胞をヌードマウスに移植し形成された腫瘍の Ep 産生能を血清、培養液および homogenate 上清中の Ep 活性を測定することにより検討したところ、LED 細胞が存在する confluency 後の培養細胞にのみ Ep 産生が認められ、LED 細胞が発見されなかったヌードマウス移植腎細胞癌、confluency 前の培養細胞および培養細胞ヌードマウス移植腫瘍には Ep 産生が認められなかった。さらに、電顕酵素抗体法により、Ep の局在を示す陽性染色が LED 細胞にのみ認められた。著者が今回行った酵素抗体染色は、用いた抗血清が Ep に monospecific とは言い難いこと、そして、陽性染色の細胞内分布が主に細胞質内小胞であることから、LED 細胞による Ep 産生を結論づけるものではない。しか

しながら、Ep 活性が明らかに残存するような細胞固定法を用いて LED 細胞のみが陽性に染色されたということは、本腫瘍細胞系における Ep 産生細胞は LED 細胞以外にはないということを示すものである。陽性染色が粗面小胞体内腔ではなく細胞質内小胞に分布した理由としては、粗面小胞体では Ep 前駆物質が産生され、分泌の過程で Ep 前駆物質が Ep に変化するという膵ラングハンス島 β 細胞のインスリン分泌に類似の分泌機構も考慮に入れなければならないが、Ep の産生分泌機構はいまだ不明な点が多く²⁴⁾、今後の検討が必要である。

本腫瘍が何故細胞培養系でのみ Ep を産生するのかは興味深い疑問点である。この現象の説明として2つの仮説が成り立つ。第1の仮説はクローン選択説で、Ep を産生するクローンは単層培養で選択的に増殖するという考え方である。第2の仮説は分化説であり、本腫瘍幹細胞は、ヌードマウスに移植された状態では Ep 産生細胞へ分化しないが、細胞培養系ではこの分化がおこるという考え方である。最近、著者らは本腫瘍培養細胞からいくつかの Ep 産生クローンを分離した²⁵⁾²⁶⁾。これらのクローンは単層培養系において LED 細胞への分化と Ep 産生を示すが、これらのクローンをヌードマウスに移植すると LED 細胞への分化もおこらず、Ep 産生を示す所見も認められなかった。このことは、本腫瘍幹細胞が、単層培養系では Ep 産生細胞への分化を示すものの、ヌードマウス移植系ではこの分化がおこりにくくなっていることを示すものである。著者らは、本腫瘍培養細胞の分化機能発現機序につきいくつかの検討を加えてきたが¹²⁾¹⁷⁾²⁷⁾²⁸⁾、今後、これらの Ep 産生、非産生クローンを用いて本腫瘍幹細胞の分化につきさらに検討する予定である。

稿を終えるにあたり、御指導をいただいた Tulane 大学医学部解剖学教室 I-Li Chen 助教授および薬理学教室 Jamen W. Fisher 教授、御校閲をいただいた慶応義塾大学医学部泌尿器科学教室田崎 寛教授に深謝します。

References

- 1) Thorling, E.B.: Paraneoplastic erythrocytosis and inappropriate erythropoietin production. A review. *Scand. J. Haematol.*, Suppl. 17, 16—39, 1972.
- 2) Waldmann, T.A., Rosse, W.F. and Swarm, R. L.: The erythropoiesis-stimulating factors produced by tumors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 149, 509—515, 1968.
- 3) Hammond, D. and Winnick, S.: Paraneoplas-

- tic erythrocytosis and ectopic erythropoietins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 230, 219—227, 1974.
- 4) Murphy, G.P., Kenny, G.M. and Mirand, E.A.: Erythropoietin levels in patients with renal tumors and cysts. *Cancer*, 26, 191—194, 1970.
 - 5) Burk, J.R., Lertora, J.J. L., Martinez, R. Jr. and Fisher, J.W.: Renal cell carcinoma with erythrocytosis and elevated erythropoietic stimulatory activity. *South. Med. J.*, 70, 955—958, 1977.
 - 6) Sufrin, G., Mirand, E.A., Moore, R.H., Chu, T. M. and Murphy, G.P.: Hormones in renal cancer. *J. Urol.*, 117, 433—438, 1977.
 - 7) Toyama, K., Fujiyama, N., Suzuki, H., Chen, T. P., Tamaoki, N. and Ueyama, Y.: Erythropoietin levels in the course of a patient with erythropoietin-producing renal cell carcinoma and transplantation of this tumor in nude mice. *Blood*, 54, 245—253, 1979.
 - 8) Sherwood, J. and Goldwasser, E.: Erythropoietin production by human renal carcinoma cells in culture. *Endocrinol.*, 99, 504—510, 1976.
 - 9) Sytkowski, A.J., Richie, J.P. and Bicknell, K. A.: New human renal carcinoma cell line established from a patient with erythrocytosis. *Cancer Res.*, 43, 1415—1419, 1983.
 - 10) Hagiwara, M., Chen, I., McGonigle, R., Beckman, B., Kasten, F.H. and Fisher, J.W.: Erythropoietin production in a primary culture of human renal carcinoma cells maintained in nude mice. *Blood*, 63, 828—835, 1984.
 - 11) Okabe, T., Urabe, A., Kato, T., Chiba, S. and Takaku, F.: Production of erythropoietin-like activity by human renal and hepatic carcinomas in cell culture. *Cancer*, 55, 1918—1923, 1985.
 - 12) Hagiwara, M., McNamara, D.B., Chen, I. and Fisher, J.W.: Role of endogenous prostaglandin E_2 in erythropoietin production and dome formation by human renal carcinoma cells in culture. *J. Clin. invest.*, 74, 1252—1261, 1984.
 - 13) Okabe, T., Suzuki, A., Ohsawa, N., Kosaka, K. and Terashima, T.: Immune elimination of host fibroblasts for the cultivation of human tumors transplanted into nude mice. *Cancer Res.*, 39, 4189—4194, 1979.
 - 14) Rege, A.B., Brookins, J. and Fisher, J.W.: A radioimmunoassay for erythropoietin: Serum levels in normal human subjects and patients with hemopoietic disorders. *J. Lab. Clin. Med.*, 100, 829—843, 1982.
 - 15) Eldred, W.D., Zucker, C., Karten, H.J. and Yazula, S.: Comparison of fixation and penetration enhancement techniques for use in ultrastructural immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 31, 285—292, 1983.
 - 16) Sternberger, L.A., Hardy, P.H. Jr., Cuculis, J.J. and Meyer, H.G.: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-anti-horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, 18, 315—333, 1970.
 - 17) Hagiwara, M., Chen, I. and Fisher, J.W.: Erythropoietin production in long-term cultures of human renal carcinoma cells. The role of cell population density. *Exp. Cell Res.*, 154, 619—624, 1984.
 - 18) Leighton, J., Estes, J.W., Mansukham, S. and Brada, Z.: A cell line derived from normal dog kidney (MDCK) exhibiting qualities of papillary adenocarcinoma and of renal tubular epithelium. *Cancer*, 26, 1022—1028, 1970.
 - 19) Smith, R.E., Ellis, L.F. and Hull, R.N.: Light, scanning, transmission electron microscopy of "dome like" structures in a continuous pig kidney cell strain. *J. Cell Biol.*, 63, 322a, 1974.
 - 20) Misfeldt, D.S., Hammoto, S.T. and Pitelka, D. R.: Transepithelial transport in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 1212—1216, 1976.
 - 21) Dulbecco, R. and Okada, S.: Differentiation and morphogenesis of mammary cells in vitro. *Proc. R. Soc. Lond.*, B208, 399—408, 1980.
 - 22) Mullin, J.M., Weibel, J., Diamond, L. and Kleinzeller, A.: Sugar transport in the LLC-PK₁ renal epithelial cell line: Similarity to mammalian kidney and influence of cell density. *J. Cell Physiol.*, 104, 375—389, 1980.
 - 23) Rizzino, A., Gonda, M.A. and Rapp, U.R.: Dome formation by a retrovirus-induced lung adenocarcinoma cell line. *Cancer Res.*, 45, 1881—1907, 1982.
 - 24) Fisher, J.W., Nelson, P.K., Beckman, B. and Burdowski, A.: Kidney control of erythropoietin production. In *Renal Endocrinology* (edited by M.J. Dunn), p. 142—180, Williams & Wilkins, Baltimore, 1983.
 - 25) Hagiwara, M., Chen, I. and Fisher, J.W.: Renal carcinoma cell production of erythropoietin. In *Kidney Hormone*, Vol. III (edited by J.W. Fisher), p. 585—604, Academic Press, London, 1986.

- 26) Hagiwara, M., Chen, I. and Fisher, J.W.: Isolation and characterization of erythropoietin-producing human renal carcinoma clones. Submitted for publication, 1986.
- 27) Hagiwara, M., Pincus, S.M., Chen, I., Beckman, B. and Fisher, J.W.: Effects of dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate on erythropoietin production in human renal carcinoma cell cultures. *Blood*, 66, 714—717, 1985.
- 28) Hagiwara, M., Nagakura, K. and Fisher, J.W.: Effects of phorbol ester and diacylglycerol on erythropoietin production and dome formation in human renal carcinoma cell cultures. Submitted for publication, 1986.

(1986年7月1日受付)