

腎細胞癌の免疫組織化学的研究

第2編 腎癌細胞の細胞膜糖鎖ならびに近位尿細管上皮抗原に関する研究

筑波大学附属病院泌尿器科 (主任：小磯謙吉教授)	飯	泉	達	夫
帝京大学医学部泌尿器科 (主任：和久正良教授)	矢	崎	恒	忠
筑波大学臨床医学系泌尿器科 (主任：小磯謙吉教授)	加	納	勝	利
	小	磯	謙	吉
筑波大学臨床医学系内科 (主任：東條静夫教授)	小	山	哲	夫
	東	條	静	夫

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF RENAL CELL CARCINOMA

II. Studies on the Glycocompounds and Renal Tubular Antigens of Renal Cell Carcinoma

Tatsuo Iizumi

Department of Urology, Tsukuba University Hospital

(Director: Prof. K. Koiso)

Tsunetada Yazaki

Department of Urology, School of Medicine, Teikyo University

(Director: Prof. M. Waku)

Shori Kanoh and Kenkichi Koiso

Department of Urology, Institute of Clinical Medicine, The University of Tsukuba

(Director: Prof. K. Koiso)

Akio Koyama and Shizuo Tojo

Department of Internal Medicine, Institute of Clinical Medicine, The University of Tsukuba

(Director: Prof. S. Tojo)

腎細胞癌の免疫組織化学的研究

第2編 腎癌細胞の細胞膜糖鎖ならびに近位尿細管上皮抗原に関する研究

筑波大学附属病院泌尿器科 (主任: 小磯謙吉教授)	飯	泉	達	夫
帝京大学医学部泌尿器科 (主任: 和久正良教授)	矢	崎	恒	忠
筑波大学臨床医学系泌尿器科 (主任: 小磯謙吉教授)	加	納	勝	利
筑波大学臨床医学系内科 (主任: 東條静夫教授)	小	磯	謙	吉
	小	山	哲	夫
	東	條	静	夫

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF RENAL CELL CARCINOMA

II. Studies on the Glycocompounds and Renal Tubular
Antigens of Renal Cell Carcinoma

Tatsuo Iizumi

Department of Urology, Tsukuba University Hospital
(Director: Prof. K. Koiso)

Tsunetada Yazaki

Department of Urology, School of Medicine, Teikyo University
(Director: Prof. M. Waku)

Shori Kanoh and Kenkichi Koiso

Department of Urology, Institute of Clinical Medicine, The University of Tsukuba
(Director: Prof. K. Koiso)

Akio Koyama and Shizuo Tojo

Department of Internal Medicine, Institute of Clinical Medicine, The University of Tsukuba
(Director: Prof. S. Tojo)

A fluorescence study was performed on specimens from 20 primary and 2 metastatic renal cell carcinoma and tumors themselves of TSU-R1, our new cell line derived from renal cell carcinoma, grown in nude mice using 3 lectins, soybean agglutinin (SBA), peanut agglutinin (PNA), and wheat germ agglutinin (WGA), and antibodies to renal tubular antigens (RTA).

Anti-RTA reacted with carcinoma cells in all specimens of primary tumors, while SBA reacted in 9 (45%), PNA in 3 (15%) and WGA in 11 (55%). In carcinoma cells from metastatic sites, only SBA did not react with them. Although we observed the presence of RTA in the tumor of TSU-R1 transplanted to a nude mouse at the 10th passage, RTA could not be found in the tumor transplanted at the 50th passage. WGA reacted with the carcinoma cells in both passages of the tumors of TSU-R1, but SBA and PNA did not bind to either of them.

This fluorescence study seems to be a simple and useful method to investigate the characteristics of renal cell carcinoma. Since changes of glycocompounds may correlate to malignant potential of the carcinoma cells, further study with lectins will be necessary.

要旨: 我々は、20例の腎細胞癌組織、腎細胞癌転移組織、およびヌードマウス移植腎細胞癌由来組織 (TSU-R1) において、3種類のレクチン (soybean agglutinin; SBA, peanut agglutinin; PNA, wheat germ agglutinin; WGA) および抗近位尿細管上皮抗原抗体 (抗 RTA 抗体) を用い、蛍光抗体法およ

び蛍光染色を施行した。原発腫瘍組織においては、抗 RTA 抗体は全例で腫瘍細胞と反応したが、SBA は 9 例 (45%) PNA は 3 例 (15%)、WGA は 11 例 (55%) とのみ反応した。転移組織では、SBA のみが腫瘍細胞と反応を示さなかった。ヌードマウス移植組織においては、抗 RTA 抗体は継代数 10 代の時点で作製した組織の腫瘍細胞とは反応したが、継代数 50 代の組織では反応を示さなかった。WGA は継代数 10 代、50 代の移植組織の両者において腫瘍細胞と反応し、SBA、PNA は両者ともに反応を示さなかった。

我々が今回用いた蛍光抗体法および蛍光染色は、腎細胞癌個々の性質および特徴を概略的に把握するうえにおいて簡単でかつ有効な方法と考えられた。特に腫瘍細胞における glyco-compounds の変化はその腫瘍の臨床的悪性度を推測させる指標となる可能性もあり、レクチンを用いた蛍光染色は、今後更に検討する必要があると考えられた。

緒言

腎細胞癌は泌尿器悪性腫瘍の中でも手術療法以外の治療法には全く反応しない悪性腫瘍である¹⁾。放射線療法、化学療法、免疫(補助)療法などが無効である²⁾⁻⁴⁾ことは、この悪性腫瘍細胞の外で起こる現象が細胞内部へ伝達されないことも原因の一つと推定される。すなわち、この細胞膜表面での情報伝達に関する細胞機能の障害が問題となる。このような細胞膜の機能としては細胞膜の外側に存在し、様々な情報に対応出来る構造物が先ず上げられ、一般には細胞膜の糖鎖を含む脂質、蛋白質が当核物質と考えられている。従って腎細胞癌における細胞膜上のこれらの変化を追求することはひとり腎細胞癌の膜変化を検討するに止らず、疾患の臨床経過、予後を推定する上で極めて重要である⁵⁾⁶⁾。

一方、腎細胞癌の発生病理が論じられ、従来まで副腎迷入説が唱えられてきたが、その形態学的(電顕的)観察より近位尿細管起源であると考えられている。またその免疫学的反応性に関しても近位尿細管起源であると想定されている。従って腎細胞癌の heterogeneity を追求する目的で近位尿細管上皮抗原の検討は臨床的にも極めて重要である⁷⁾。

本研究はこの立場より腎細胞癌の細胞膜糖鎖をこれと反応する 3 種類のレクチンを用い、蛍光染色法により検討した。また同様に近位尿細管上皮抗原の検索も行い、若干の知見をえたので報告する。

研究対象および方法

1. 腎癌細胞組織および正常部腎組織

1982年12月より1985年3月までに筑波大学附属病院泌尿器科に入院し、腎細胞癌と診断され、腎全摘除術をうけた20症例よりえられた腎細胞癌組織である。その組織学的所見を表1に示す。その分類基準は「腎癌取り扱い規約」に準じた⁸⁾。腎細胞癌転移病巣は症例 No. 20よりえられたもので、肺並びに骨転移巣である。

表1 Histological findings of primary renal cell carcinoma

case	organization	cell type	grade	stage
1*	alv.	C	G1	T ₂ N ₀ M ₀
2	alv.	C	G1	T ₂ N ₀ M ₀
3	alv.	C>D	G1	T ₃ N ₀ M ₀
4	papil.	D	G1	T ₃ N ₀ M ₀
5	alv.-papil.	D	G1	T ₂ N ₀ M ₀
6	alv.	C	G1	T ₂ N ₀ M ₀
7	alv.	D>C	G1>G2	T ₂ N ₀ M ₀
8*	alv.	C	G1	T ₂ N ₀ M ₀
9	alv.	C>D	G1	T ₂ N ₀ M ₀
10	alv.	C	G1	T ₂ N ₀ M ₀
11	alv.	D	G1>G2	T ₃ N ₂ M ₀
12	alv.	C	G1	T ₂ N _x M ₁
13	alv.	C>D	G1	T ₂ N ₀ M ₀
14	alv.	C	G1	T ₂ N _x M ₁
15*	alv.-papil.	D>C	G2>G1	T ₃ N ₀ M ₀
16*	alv.	C	G1	T ₂ N ₀ M ₀
17	alv.	C	G1=G2	T ₂ N _x M ₁
18	papil.	D>C	G1	T ₃ N ₁ M ₀
19	alv.	C	G1	T ₃ N ₀ M ₀
20	alv.	C	G1=G2	T ₃ N _x M ₁

alv.=alveolar type, papil.=papillary type

C=clear, D=dark

*indicates case with postoperative metastases

対照とした正常腎組織は摘除腎のなかで腫瘍が比較的小さく、病巣より離れた部位より得た。尚、その一部の検索より組織学的にも正常組織と確認している。

2. ヌードマウス移植腎細胞癌由来組織

1) 腎細胞癌由来細胞株 TSU-R1の樹立

症例 No. 8 の腎摘出術後可及的速やかにかつ無菌的に腫瘍組織約1gを採取して実験に供した。採取した腎細胞癌組織をクリーンベンチ内において0.01Mリン酸緩衝食塩水(pH 7.4)(以後PBSと略す)、および0.02% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)、pH7.4にて十分に洗浄した後、滅菌プラスチック

シャーレに移し、これに0.25%トリプシン液3mlを加え組織を約30分間メスで細切した。これに増殖培地7mlを添加し、1分間静置後、上清を遠沈管に移し、300rpmで1分間遠沈した。この上清を3ないし4個の培養フラスコに分注し、増殖培地を加えて培養した。約2カ月後、癌細胞の増殖を認めた。その後、継代によって現在までにすでに60代を経過した。この腎細胞癌由来の培養細胞株をTSU-R1と呼んでいる。継代数50代における染色体分析では低四倍体で、染色体数は75から85のrangeをもっていた。またmode numberは80であった。トリプシン・ギムザ分染色による核型分析の結果、染色体数85の細胞はi(1q), i(1p), 3q-, i(7p), 11p+, 16p+の構造異常の染色体に加え、16個のmarker chromosomeを有していた。同継代数での増殖倍加時間は48時間であった。

2) TSU-R1ヌードマウス移植組織

腎細胞癌由来細胞株TSU-R1の生細胞数 1×10^6 個分をヌードマウス(BALB/C/nu/nu)の背部皮下に注入し、その移植状態を観察したところ注入後1から2カ月して直径2cm以上に腫瘍が増殖した。本実験では継代数10代および50代の時点での組織を研究対象とした。10代の時点での移植腫瘍は50代に比べ明るい胞体を有する細胞が多く、由来組織のclear cell typeにより近い像を呈しており、50代の腫瘍はかなり未分化な印象を受けた。

3. 組織の処理

各組織は採取後ただちに1cm角前後に細切し、アセトン・ドライアイス中にてヘキサン固定した。固定凍結された組織をクライオスタットにて厚さ 2μ に薄切し、封滅した後 -20°C に保存した。

4. レクチンおよびその他の抗体

レクチンはE.Y. Laboratories社(San Mateo, U.S.A.)のFITCラベルsoybean agglutinin(以後SBAと略す)、peanut agglutinin(以後PNAと略す)、wheat germ agglutinin(以後WGAと略す)を使用した。

5. FITCラベル抗RTA抗体

RTAの抽出は成清等の方法に準じた⁹⁾。すなわち、病理組織学上異常を認めない血液型O型剖検腎より皮質のみを採取し、生理食塩水で洗浄した後、100, 115, 170番の金属メッシュを順次通過させた。この皮質成分をブローナーゼで消化後、Sephadex G-200にてゲル濾過し、280nmにおける吸光度を測定してfraction curveを作成した。次に、家兎を最初のピーク(V_0)を用い

て免疫し、抗血清を得た。これを人血清蛋白および人liver powderにて十分吸収した後、1/3飽和硫酸塩析、DEAEセルロースを用いたカラムクロマトグラフィーにて抗RTA抗体のIgG分画を得た。この分画を透析法にてfluorescein isothiocyanate (FITC)をラベルしたが、Fluorescein/Protein比は2.7であった。

6. 蛍光抗体法および蛍光染色

FITCラベルレクチンおよびFITCラベル抗RTA抗体による直接法による蛍光染色は、先ず、非特異反応を減じる目的にて1%の割合でウシ血清アルブミンおよび0.1%の割合でTween-80を含んだ0.01MPBS, pH 7.2に前述の方法で作製した薄切切片を浸し、水とさせた。次に湿箱において切片をレクチンまたは抗RTAと反応させた後、前述のPBSにて十分洗浄した。切片にglycerin bufferを滴下し、カバーガラスをかけて蛍光顕微鏡下で観察した。

7. neuraminidase 処理

SBA, PNA, WGAの3種のレクチンに関しては、通常の未処理の切片に対する蛍光染色に加えて、neuraminidaseにて処理した切片に対しても蛍光染色を行った。neuraminidase処理は、neuraminidase (type V, SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)を0.02 U/mlとなる様に0.01M塩化カルシウムを含んだ0.05 M トリス緩衝食塩水, pH 5.5に溶解し、切片と室温にて1時間反応させた。

8. 結果の判定

蛍光抗体法および蛍光染色の結果は、陰性(-)、判定困難(±)、弱陽性(1+)、中陽性(2+)、強陽性(3+)の5段階に分類した。また、蛍光の特異性は抗RTA抗体に対してはRTA、レクチンに対してはそれぞれに対するinhibiting sugar (SBA=N-acetyl-galactosamine, PNA=galactose, WGA=N-acetylglucosamine, SIGMA Chemical Co. St. Louis, U.S.A.)を予め反応させることにより蛍光が消失することを確認している。また、これらの成績の統計学的判定は χ^2 (c)検定によった。

結 果

正常部腎組織

SBAは、特徴的な顆粒状の蛍光が糸球体、近位および遠位尿細管の上皮細胞辺縁、基底膜、間質組織に認められた(図1)。PNAは遠位尿細管の上皮細胞辺縁および基底膜と中等度に反応し、糸球体ボウマン嚢とも弱いながら反応を示した(図2)。WGAとSBAと

図1 Binding of lectins to normal kidney tissues. Peculiar granular staining pattern of SAB is seen.



図2 Binding of lectins to normal kidney tissues. PNA reacts predominantly with distal tubules but also faintly with Bowman's capsule.



ほぼ同様の部位に反応したが、蛍光は近位尿細管上皮細胞においてやや弱く、糸球体および遠位尿細管基底膜では他と比べ強い蛍光が認められた(図3)。一方、neuraminidase 処理切片におけるレクチンの反応性は、SBA では未処理および処理切片の間にほとんど差は認められなかったが、PNA では処理切片において糸球体、近位尿細管基底膜に蛍光が認められるようになった。これと対照的に、WGA では処理切片において糸球体の蛍光があきらかに減弱した。しかし、他の部位には変化は認められなかった(表2)。

抗 RTA 抗体は近位尿細管上皮細胞と強く反応したが、糸球体、遠位尿細管、間質組織とは反応しなかった(図4)。

腎細胞癌組織

1. 原発腫瘍組織

a) 腎癌細胞と間質細胞

図3 Binding of lectins to normal kidney tissues. WGA reacts predominantly with glomerular capillary walls but also with proximal and distal tubules.

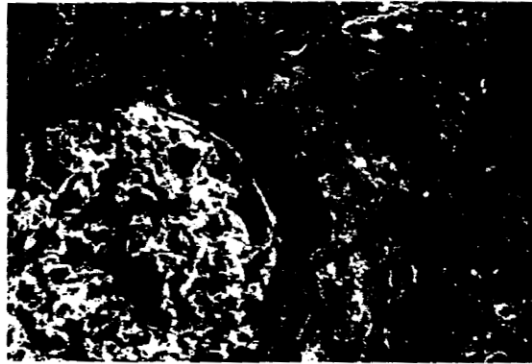


表2 正常腎におけるレクチン反応性

レクチン	ノイラミダーゼ処理	糸球体	近位尿細管	遠位尿細管
SBA	-	+	-	+
	+	-	+	+
PNA	-	+	-	+
	+	(○)	(○)	+
WGA	-	+	-	+
	+	(○)	-	+

図4 Distribution of renal tubular antigens in normal kidney tissue. Specific fluorescence is seen in proximal tubules.



腎細胞癌組織におけるレクチン反応性を検討すると表3の如くである。腎癌細胞ではSBA レセプター、WGA レセプターはほぼその半数に、PNA レセプターは15%に陽性であった。一方、腎細胞癌間質細胞では、SBA、WGA 全例に、PNA は20%に陽性であった(図5, 6, 7)。

表3 腎癌細胞におけるレクチン反応(陽性率)

レクチン	腎癌細胞	間質細胞
SBA	9/20 (45%)	20/20 (100%)
PNA	3/20 (15%)	4/20 (20%)
WGA	11/20 (55%)	20/20 (100%)

図5 Binding of lectins to primary renal cell carcinoma, SBA binding sites are observed at stromal tissue but not at carcinoma cells.

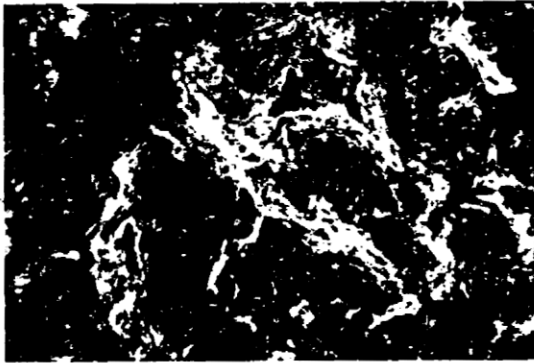


図6 Binding of lectins to primary renal cell carcinoma. Binding of PNA to carcinoma cells is seen in a small area.



一方, RTA はすべての症例で腎癌細胞に陽性に出たが, 間質細胞には認められなかった。

b) 腎細胞癌の細胞型

腎細胞癌の細胞型を明細胞型, 暗細胞型, およびその混合型に分けて検討した。その結果を表4に示す。SBAでは, 明細胞型で(+)以上5例, (±)1例, (-)5例であった。暗細胞型では(+)1例, (-)2例であった。混合型では(+)3例, (±)1例, (-)2例であった。PNAでは明細胞型11例中3例が陽性で他は陰性であった。暗細胞型, 混合型ともに(+), (±)

図7 Binding of lectins to primary renal cell carcinoma. WGA binding sites are observed at both carcinoma cells and stromal tissue.

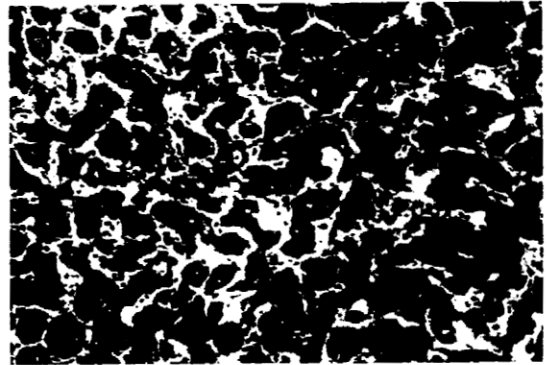


表4 腎癌細胞におけるレクチン反応性と細胞型

レクチン	細胞型			
	明細胞型	暗細胞型	混合型	
SBA*	-	5	1	3
	±	1	0	1
	-	5	2	2
PNA**	+	3	0	0
	±	0	0	0
	-	8	3	6
WGA***	+	6	1	4
	±	4	1	2
	-	1	1	0

*, **, ***: not significant (N.S.)

の症例はなかった。WGAは全体に(-)の症例が少ない傾向が伺えた。RTAは一定の傾向が認められなかった。

c) 腎細胞癌の分化度

腎細胞癌の分化度をG1およびG2(G1+G2)とに分けて検討した。

SBAではG1で陽性率が高かったがG2の5例では陽性を示した症例はなかった。

PNAでは, G1, G2とも陽性を示す症例より陰性を示す症例の頻度が高かった。

WGAでは, PNAと反対の傾向で, G1, G2とも陽性を示す症例が多かった(表5)。

RTAは一定の傾向を示さなかった。

d) 腎細胞癌のT分類

腎細胞癌のT分類をT2, T3に分けて検討した。

SBAの蛍光染色を+~±を陽性, -を陰性として検討すると, T分類が進むにつれてその染色性は低下す

表5 腎癌細胞におけるレクチン反応性と分化度

レクチン		分 化 度	
		G1	G2(G1-G2)
SBA*	+	9	0
	±	1	1
	-	5	4
PNA**	+	2	1
	±	0	0
	-	13	4
WGA***	+	9	2
	±	5	2
	-	1	1

* : significant, $\chi^2=12.89$, p less than 0.01

, * : not significant.

表6 腎癌細胞におけるレクチン反応性とT分類

レクチン		T 分 類	
		T2	T3
SBA*	+	6	3
	±	2	0
	-	5	4
PNA**	+	2	1
	±	0	0
	-	11	6
WGA***	+	5	6
	±	7	0
	-	1	1

*, **, *** : not significant

る傾向が伺えた(統計学的にはN.S.)。

PNA, WGA に関してはSBAの如き傾向は認められなかった(表6)。

RTAは一定の傾向を示さなかった。

以上a)~d)までの症例別一覧表を表7に示す。

e) neuraminidase 処理による腎癌組織のレクチン反応性

neuraminidase 処理切片におけるレクチンの反応性は、PNAが間質と弱いながら反応を示す様になったが、処理前にPNAと反応を認めなかった腫瘍細胞が処理後に陽性になるという所見は得られなかった。SBA, WGAの反応性はneuraminidase 処理後も変化は認められなかった。

2. 転移性腫瘍組織

SBAは原発巣と同様、腫瘍細胞との反応性は低かった。しかし、間質とも僅かに反応した。PNAは原発巣においては散在する少数の細胞と反応したが、転移組織においては間質および大半の細胞と反応を示した

表7 Fluorescence findings in primary renal cell carcinoma

case	aRTA	SBA	PNA	WGA
1	1-	-	-	±
2	1+	1-*	-	1+
3	1-	-	-	1+*
4	1-	1-	-	1+
5	1-	-	-	±
6	2-	1-*	-	1+
7	2+	±	-	±
8	1-	-	-	1+*
9	1-	1+	-	±
10	1-	-	-	±
11	1-	-	-	-
12	1+	±	1-*	-
13	1-	1-*	-	1+
14	1-	1-*	-	1+
15	1-	-	-	1+*
16	1-	1-*	1-**	±
17	1-	-	-	±
18	1-	1-*	-	1+
19	1-	1+	-	1+
20	1-	-	2-*	1+

aRTA=anti-renal tubular antigens

*indicates sparse fluorescence

**positive cells in a small area

図8 Binding of PNA to the metastatic lesion. Relatively strong fluorescence is observed at both carcinoma cells and stromal tissue.



(図8). WGAは原発巣と同様の反応を示し、腫瘍細胞および間質に蛍光が認められた。

転移組織における抗RTA抗体との反応は、非常に強く反応する細胞、弱く反応する細胞、ほとんど反応しない細胞が混在する様相を呈した(図9)。

3. TSU-R1ヌードマウス移植組織

ヌードマウス移植組織では、SBA, PNAは間質との

図9 Metastatic renal cell carcinoma stained with antibodies to renal tubular antigens. Mixed pattern of strong, weak and negative fluorescence at the carcinoma cells is seen.



み反応し、腫瘍細胞とは反応は示さず、WGA は間質組織に加え、腫瘍細胞とも弱いながら反応を示した。RTA の場合のみ継代数が10代と50代の組織間に異った蛍光所見が得られた。すなわち、10代においては、RTA は弱いながら陽性であったが、50代においては陰性であった。他は10代、50代とも同様の所見を呈した。

考 案

細胞の悪性変化に伴ない、細胞構成成分である glyco compounds (以後 GC と略す) の量、質等に変化が生じることは、多くの研究者の認めるところである¹⁰⁾⁻¹⁵⁾。特に細胞膜にその大半が存在する glycolipids (以後 GL と略す) に関しては多数の報告が認められ、これを要約すると、1) 起源細胞に認められる GL 合成の阻害およびその前駆物質の増加、2) 起源細胞には認められないかあるいは非常に少ない GL の増加、3) GL のある種の合成系路から別の合成系路への転換、4) 膜における GL の編成の変化、からなる4つの変化様式が認められている¹⁰⁾⁻¹⁵⁾。臨床的にも種々の悪性腫瘍における ABH 血液型物質の消失は、GL の合成阻害による変化の代表的な例として多数報告されている¹⁶⁾⁻¹⁹⁾。また最近、モノクローナル抗体により確認されたメラノーマや大腸癌特異抗原が GL であったとの報告もなされている²⁰⁾⁻²¹⁾。この様に、悪性腫瘍において GL を含む GC に関し検討することはその腫瘍の性格および特徴を知る上で重要であると考えられる。そこで我々は、ある種の糖残基とそれぞれ特異的に結合する3種のレクチンを用い、腎細胞癌における GC について蛍光染色にて検討したが、この方法は

GC の変化を概略的に把握することができる最も簡単な方法と思われる。SBA は、D-N-acetyl-galactosamine および D-galactose と結合し²²⁾、正常部腎組織においては糸球体、近位および遠位尿細管、間質と反応した。しかし、腎細胞癌における腫瘍細胞とは、原発腫瘍の9例にのみ反応し、そのうち6例においては反応細胞が散在していたという結果は、我々の原発腫瘍全例に RTA が認められ、近位尿細管上皮細胞由来である可能性が強いことからすると、その大半において正常の GC の合成が阻害されている可能性を示唆した。Hölthöfer 等は腎細胞癌の70%において SBA が腫瘍細胞と結合したと報告するとともに、刷子縁抗原は陽性であるがやや分化の悪い腫瘍において SBA のレセプターが欠損していたと報告している²³⁾。我々の症例では grade と SBA レセプターの有無との関係が推測されたのに加え、手術時に所属リンパ節あるいは遠隔転移が既に存在していた6症例に、手術後1年以内に転移が発見された4症例を加えた10例中7例において SBA レセプターが陰性あるいは判定困難であり、転移が存在しない10例中6例にレセプターが陽性であったことから、sensitivity と specificity は各々70%と60%となり、SBA レセプターが消失するに従い、転移が生じやすくなるという可能性も示唆された。この点に関しては今後更に検討する必要があると考えられる。転移巣およびヌードマウス移植組織においてレセプターが陰性であったことは、どちらの腫瘍細胞も grade が高く、低分化あるいは未分化ではあったが、由来組織の性格をそのまま引き継いだものと思われる。PNA は D-galactose およびその誘導体に特異的に結合し²⁴⁾、正常部腎組織においては遠位尿細管およびボウマン嚢とのみ反応し、近位尿細管とは反応しなかったが、原発腫瘍20例中3例において少数の腫瘍細胞と反応した。これは、この3例において RTA が陽性であったことから、この細胞が遠位尿細管上皮由来と考えるよりは、この細胞において正常の GC の合成が阻害され、前駆物質が増加したか、あるいは新しい GC が合成されていると考えた方が自然であると思われる。また、転移巣において大半の腫瘍細胞が PNA と反応した原因としては、由来組織の PNA レセプター陽性細胞が転移した場合と、PNA レセプター陰性細胞が転移し、増殖過程で変化した場合が考えられる。前者の場合、PNA レセプター陽性細胞がより転移を生じ易いのではないかという推測も成り立つ。事実、我々の症例ではレセプター陽性細胞を認

めた3例全例に転移巣が存在したが、現時点では症例数も少なく、今後症例数を加え、更に検討する予定である。一方、PNAはT(Thomsen-Freidenreich)抗原に特異的なレクチンとして、種々の悪性腫瘍において、T抗原またはneuraminidase処理により出現するcryptic T抗原の有無の検討がなされ報告されている^{25)~28)}。これらの報告からすると、我々の用いた組織はすべて組織学的悪性度が高い場合に多いとされるT抗原陽性あるいはcryptic T抗原陰性に分類される。しかしながら、他の腫瘍の場合、起源となる正常細胞はcryptic T抗原が陽性とされており、正常部腎組織において、近位尿細管上皮細胞がneuraminidase処理後もPNAと反応しなかったことからすると、腎細胞癌におけるPNAとの反応性の検討は、他腫瘍におけるT抗原の検討とは多少、意味が異なると思われる。WGAはD-N-acetylglucosamineおよびシアル酸と結合し²⁹⁾、正常部腎組織においてはSBAとほぼ同じ部位に反応した。neuraminidase処理切片においては、糸球体の蛍光のみが減弱し、他には変化が認められなかったことから、糸球体におけるWGAレセプターはシアル酸であり、他はD-N-acetylglucosamineと考えられた。また、WGAは腫瘍細胞とも55%に反応したが、その反応性と悪性度あるいは転移との関連性は認められなかった。

一般的に腎細胞癌はその大部分が近位尿細管上皮細胞由来であると考えられている。その根拠の一つとして、電子顕微鏡的に、腎細胞癌細胞と近位尿細管上皮細胞の間に刷子縁様のmicrovilliの存在、細胞膜の嵌入、多数の蛇行したミトコンドリアの存在などの類似点が認められることがあげられている^{30)~32)}。一方Wallace等は蛍光抗体法を用い、正常腎において近位尿細管上皮細胞に存在する刷子縁抗原が腎細胞癌にも存在することを証明することにより、その近位尿細管上皮由来説を支持している³³⁾。しかしながら、Wallace等は同時に、未分化な腫瘍において刷子縁抗原が認められなかったと報告し、未分化な腎癌細胞では刷子縁抗原が消失する可能性を示唆した。我々は成清等の方法⁷⁾⁹⁾に準じ得た可溶化したRTAにより抗RTAを作製し、直接蛍光抗体法を用いて腎細胞癌について検討したところ、原発腫瘍の全例にRTAの存在を認めた。これは、我々の検討した腫瘍が近位尿細管由来である可能性を強く示唆するものである。また、我々の症例は全例grade 1あるいはgrade 2の腫瘍であり、gradeの高い未分化な組織がなかったために全例にRTAが

認められたものと思われるが、ヌードマウス移植組織において継代数10代の時点ではRTAが存在し、50代におけるより未分化な組織ではRTAが認められなかったことは、やはり未分化腫瘍におけるRTAの消失の可能性を示しているものと考えられた。しかしgrade 2からgrade 3と原発腫瘍よりもgradeの高い細胞が大半を占めた転移組織において抗RTA抗体と強く反応した細胞と反応を示さなかった細胞が混在したことは、腫瘍細胞の増殖過程においてしばしば認められる性質の変化はすべてが同一方向に向うとは限らないことを推測させるものと思われる。

結 語

ヒト腎細胞癌20症例の原発性腫瘍組織およびその転移腫瘍組織、ヌードマウス移植腎細胞癌由来組織において、細胞表面糖鎖と反応する3種類のレクチン(soybean agglutinin; SBA, peanut agglutinin; PNA, wheat germ agglutinin; WGA)および抗近位尿細管上皮抗原抗体を用いて蛍光抗体法および蛍光染色法を施行した。その結果以下の成績をえた。

I) 3種類のレクチンの腎癌細胞における検討結果

1) 陽性頻度はSBA 45%, PNA 15%, WGA 55%であった。

2) 細胞型との関係では必ずしも一定の傾向が伺えなかった。

3) 分化度との関係では、分化度が進むと反応性が低下した(SBA)。

4) T分類との関係ではSBAでT₃になるとその反応性が低下する傾向が伺えた(統計学的にはN.S.)。

II) RTAの存在

すべての腎癌組織でその存在が認められたが、ヌードマウス、継代50代ではその抗原性が消失した。

以上の成績より、これらレクチン反応性、および尿細管抗原の存在をさぐる方法は腎細胞癌個々の性質、特徴ひいては悪性度を概略的に把握することが出来る有効な方法であると考えられた。

稿を終るにあたり染色体分析に於て多大なる御指導、御協力を賜った本学基礎医学系人類遺伝学近藤都子先生に深謝いたします。

本論文の一部は第73回日本泌尿器科学会総会(徳島1984)、第43回日本癌学会総会(福岡1984)、第27回日本腎臓学会総会(東京1984)において発表した。

なお本研究は、

- 1) 昭和58年度筑波大学学内プロジェクト一般研究助成
- 2) 昭和58年度財団法人ガン集学的治療研究財団助成

により行われたものである。記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) Robson, C.J., Churchill, B.M. and Anderson, W.: The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 101, 297-301, 1969.
- 2) Skinner, D.G., Colvin, R.B., Vermillion, R.C. and Leabetter, W.F.: Diagnosis and management of renal cell carcinoma. A clinical and pathological study of 309 cases. *Cancer*, 28, 1165-1177, 1971.
- 3) McNichols, D.W., Segura, J.W. and DeWeerd, J. H.: Renal cell carcinoma: Long-term survival and late recurrence. *J. Urol.*, 126, 17-23, 1981.
- 4) 里見佳昭, 高井修道, 近藤猪一郎, 岩崎孝史, 吉邑貞夫, 福島修司, 古畑哲彦, 石塚栄一: 腎細胞癌の stage 及び grade と予後. *日泌尿会誌*, 72, 278-287, 1981.
- 5) 船越育雄: ガン細胞膜のムチン型糖タンパク質. *生化学*, 55, 461-477, 1983.
- 6) 辻 勉, 恒久生子, 大沢利昭: 生体膜と薬物の相互作用. 第5回同シンポジウム講演要旨集, p. 36-39, 1982.
- 7) 成清卓二, 北村 深, 宮川侑三, 柴田整一: 可溶性ヒト尿管上皮抗原の pronase 消化による抽出及び membranous glomerulonephritis の immune deposits 中における存在について. *日腎誌*, 15, 217-222, 1973.
- 8) 日本泌尿器科学会, 日本病理学会, 日本放射線学会: 腎癌取り扱い規約. 第1版, 金原出版, 東京, 1983.
- 9) Naruse, T., Kitamura, K., Miyakawa, Y. and Shibata, S.: Deposition of renal tubular epithelial antigen along the glomerular capillary walls of patients with membranous glomerulonephritis. *J. Immunol.*, 110, 1163-1166, 1973.
- 10) Gahmberg, C.G. and Hakomori, S.: Chemical characterization of surface-labeled glycosphingolipids and a specific ceramide tetrasaccharide for transformants. *J. Biol. Chem.*, 250, 2438-2446, 1975.
- 11) Hakomori, S.: Structures and organization of cell surface glycolipids dependency on cell growth and malignant transformation. *Biochim. Biophys. Acta*, 417, 55-89, 1975.
- 12) Ogata, S., Muramatsu, T. and Kobata, A.: New structural characteristic of the large glycopeptides from transformed cells. *Nature*, 259, 580-582, 1976.
- 13) Warren, L., Buck, C.A. and Tuszynski, G.P.: Glycopeptide changes and malignant transformation. A possible role for carbohydrate in malignant behavior. *Biochim. Biophys. Acta*, 516, 97-127, 1978.
- 14) Tuszynski, G.P., Baker, S.R., Fuhrer, J.P., Buck, C.A. and Warren, L.: Glycopeptides derived from individual membrane glycoproteins from control and rous sarcoma virus-transformed hamster fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 253, 6092-6099, 1978.
- 15) Hakomori, S.: Tumor-associated glycolipid markers in experimental and human cancer. *GANN Monograph on Cancer Research* 29: 113-127, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, and Plenum Press, New York and London, 1983.
- 16) Davidsohn, I., Kovarik, S. and Lee, C.L.: A, B, and O substances in gastrointestinal carcinoma. *Arch. Pathol.*, 81, 381-390, 1966.
- 17) Davidsohn, I., Kovarik, S. and Ni, L.Y.: Isoantigens A, B, and H in benign and malignant lesions of the cervix. *Arch. Pathol.*, 87, 306-314, 1969.
- 18) Davidsohn, I.: Early immunologic diagnosis and prognosis of carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, 57, 715-730, 1972.
- 19) Emmott, R.C., Javadpour, N., Bergman, S.M. and Soares, T.: Correlation of the cell surface antigens with stage and grade in cancer of the bladder. *J. Urol.*, 121, 37-39, 1979.
- 20) Magnani, J.L., Brockhaus, M., Smith, D.F., Ginsburg, V., Blaszczyk, M., Mitchell, K., Steplewski, Z. and Koprowski, H.: A monosialoganglioside is a monoclonal antibody-defined antigen of colon carcinoma. *Science*, 212, 35-54, 1981.
- 21) Pukel, C.S., Lloyd, K.O., Travassos, L.R., Dippold, W.G., Oettgen, H.F. and Old, L.J.: GD3, a prominent ganglioside of human melanoma. *J. Exp. Med.*, 155, 1133-1147, 1982.
- 22) Lis, H., Sela, B.A., Sacks, L. and Sharon, N.: Specific inhibition by N-acetyl-O-galactosamine of the interaction between soybean agglutinin and animal cell surfaces. *Biochim. Biophys. Acta*, 211, 582-585, 1970.
- 23) Hölthöfer, H., Miettinen, A., Passivuo, R., Lehto, V.P., Linder, E., Alftan, O. and Virtanen, I.: Cellular origin and differentiation of renal carcinomas. A fluorescence microscopic study with kidney specific antibodies, antiintermediate filament antibodies and lectins. *Lab. Invest.*, 49, 317-326, 1983.
- 24) Lotan, R., Skutelsky, E., Danon, D. and Sharon, N.: The purification, composition and specificity of the anti-T lectins from peanut (*Arachis hypogaea*). *J. Biol. Chem.*, 250, 8518

- 8523, 1975.
- 25) Springer, G.F., Desai, P.R., Yang, H.J. and Murthy, M.S.: Carcinoma associated blood group MN precursor antigens against which all humans possess antibodies. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 7, 426—441, 1977.
- 26) Springer, G.F., Desai, P.R., Murthy, M.S., Yang, H.J. and Scanlon, E.F.: Precursors of the blood group MN antigens as human carcinoma-associated antigens. *Transfusion*, 19, 233—249, 1979.
- 27) Coon, J.S., Weinstein, R.S. and Summers, J.L.: Blood group precursor T-antigen expression in human urinary bladder carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, 77, 692—696, 1982.
- 28) Ghazizadeh, M., Kagawa, S., Izumi, K. and Kurokawa, K.: Immunohistochemical localization of T-antigen-like substance in benign hyperplasia and adenocarcinoma of the prostate. *J. Urol.*, 132, 1127—1130, 1984.
- 29) Bhavanandan, V.P. and Katlic, A.W.: The interaction of wheat germ agglutinin with sialoglycoproteins. *J. Biol. Chem.*, 254, 4000—4008, 1979.
- 30) Oberling, C., Riviere, M. and Haguenan, F.: Ultrastructure of the clear cells in renal carcinomas and its importance for the demonstration of their renal origin. *Nature*, 186, 402—403, 1960.
- 31) Seljelid, R. and Ericsson, J.L.E.: An electron microscopic study of mitochondria in renal cell carcinoma. *J. Microscopie*, 4, 759—770, 1965.
- 32) Seljelid, R. and Ericsson, J.L.E.: Electron microscopic observations on specialization of the cell surface in renal clear cell carcinoma. *Lab. Invest.*, 14, 435—447, 1965.
- 33) Wallace, A.C. and Nairn, R.C.: Renal tubular antigens in kidney tumors. *Cancer*, 29, 977—981, 1972.

(1985年11月11日受付, 特別掲載)