OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト唾液腺細胞のin vitroにおける増殖及び分化に関する研究
Author(s)	大倉, 正也
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3086267
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

ヒト唾液腺細胞のin vitroにおける増殖及び分化に関する研究

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座
大倉　正也

(1)

原著

論文表題

ヒト唾液腺細胞のin vitroにおける増殖及び分化に関する研究

所属

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座（主任：松矢篤三教授）

著者名

大倉　正也

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座

〒565　大阪府吹田市山田丘1番8号

06-876-5711　内線2257

緒　　言

唾液腺は発生学的には，原始口腔を形成する上皮組織の一部が間葉成分の中に突出状に増生し次第に枝分れし，終末部でそれぞれの機能を持つ細胞に分化することによって形成される．すなわち，口腔に開口部を持つ導管は枝分れし，小葉間導管（以下主導管と略す）から小葉を形成する終末部に移行する．唾液腺終末部は線条部導管，介在部導管と分泌能を有する腺房細胞とで構成され，介在部導管と腺房細胞の基底側には筋上皮細胞が存在する．この唾液腺の起源をなす細胞は原始口腔上皮由来の細胞で小型の特徴のない未分化な上皮細胞である．この未分化な上皮細胞からやがて分化した各種細胞へと形態変化しながら機能を獲得していくのであるが，それらの分化過程についての詳細は不明である．他の組織同様唾液腺の細胞分化や増殖は発育後も絶え間なく営まれており，これらの分化のある段階で腫瘍化することによって種々の唾液腺腫瘍が発生すると推察される．以

上のことから唾液腺細胞の分化過程を解明することは発生学的に大きな意義を持つとともに唾液腺腫瘍の発生母地を理解するためにも重要である．

細胞の増殖や分化機構を観察する1つの手段として，細胞培養法が広く用いられている．Shirasunaら[1]によって樹立されたヒト顎下腺由来の造腫瘍性株HSGは介在部導管上皮細胞の性状を有する細胞であり，細胞分化の研究に広く用いられている[2~4]．この腫瘍細胞で見られた現象が正常細胞の動態を表しているとは限らず，唾液腺の分化過程を解明するためには正常の唾液腺細胞の培養が不可欠である．しかし腫瘍細胞と異なり正常の唾液腺細胞を長期間培養することは非常に困難とされ，現在まで極めて短期間の培養報告があるのみである[5~9]．

本研究はヒト顎下腺細胞をin vitroで培養するための培地条件を確立することと，その細胞培養系を用いて細胞増殖と分化過程の解析を行なうことを目的として行った．

実験材料及び実験方法

1．実験材料

実験材料として，外科的手術前に放射線や化学療法を受けていない頭頸部癌患者から頸部郭清術時に切除されたヒト顎下腺組織を用いた．摘出した組織から，正常顎下腺組織を周囲の結合組織を可及的に除去した状態で無菌的に採得し，培養及び組織学的研究に用いた．患者は年齢46歳から76歳の成人で男性3名，女性5名であった．

2．唾液腺細胞の分離及び培養法

採得した顎下腺実質組織を合成ペニシリンとカナマイシンをそれぞれ100μg／ml添加したPBS(-)で洗浄した後細切し，60mm 径プラスチックシャーレ(Corning, NY., U.S.A.)上に10分間静置した後，種々の培養液を加えて37 ℃，5％炭酸ガス培養器中で培養した．

3．培養液

培地条件を検討するため血清添加あるいは無血清の種々の培養液を用いた．血清としてFBS(J. R.

Scientific INC., CA., U.S.A.)を使用し，培地としてDMEM（ニッスイ製薬，東京），RPMI 1640（ニッスイ製薬），MCDB 153（極東製薬，東京）を使用した．無血清培地としてMCDB 153とDMEMを9:1に配合し，25 mM HEPES（和光純薬，大阪），1.2 g/l $NaHCO_3$（和光純薬）を加え，pH 7.4に調整したものを基礎培地とし，この基礎培地に1 μg/ml INS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., U.S.A.), 10^{-6} M DEX (Sigma), 10 ng/ml human EGF(アース製薬，兵庫）を添加した培地（以下無血清9:1培地と略す）あるいはMCDB 153とDMEMを1:1に配合し，上記のホルモン，EGFを添加した培地（無血清1:1培地）を研究に用いた．

4．細胞増殖

1)増殖細胞数の算定

細胞増殖能の算定のために，5 x 10^4個の細胞を11.3 mm径の48穴 multi-well plate (Coster, Cambridge, Mass., U.S.A.)に分注し，培養した．生細胞数の算定は 最終濃度 0.08% トリプシン（阪大微生物病研究会製，大阪）と1.4% EDTA(和

光純薬，大阪）を含むPBS(-)で細胞を分散し，ニグロシン排除テストを行なった後，Burker-Turk型血球計算板を用いて生細胞数を算定した．

2)DNA合成能

DNA合成能は，[メチル-^{3}H]チミジンのTCA不溶画分への取り込みを指標として測定した．すなわち5 x 10^4個の細胞を11.3 mm径ウエルに分注し，4日間培養を行なった後，0.5 μCi/wellの[メチル-^{3}H]チミジン（ICN Biomedicals, specific activity 2.0 Ci/mmol)を添加し，3時間のパルスラベルを行なった．ラベル終了後，4℃のPBS(-)にて3回，5% TCA（和光純薬）にて3回，各々洗浄した．さらにエタノールとエーテルを3:1に配合した溶液で1回洗浄して，TCAを除去後，200μlの0.1 N NaOHに溶解し，液体シンチレーションカウンター（LKB-1215 RACK-BETA, Wallac, Finland)にて放射活性を測定した．

5．培養細胞の形態観察

培養細胞の観察には日本光学社製位相差顕微鏡ダイアフォトMDを用い，写真撮影を行なった．

6．免疫組織化学及び免疫細胞化学的検索

顎下腺組織及び顎下腺培養細胞におけるケラチン（Ker），Ⅳ型コラーゲン(Ⅳ-Col)，アミラーゼ(Amy)，ビメンチン（Vim)，single iso-form α-smooth muscle actin(SMA)，human epithelial membrane antigen(EMA)，EGF，EGF受容体（EGF-R)の局在をHsuら[10]のABC法（Vector Laboratories, INC., CA., U.S.A.)を用いて検索した．これらの抗原の局在を検索するため，抗Ker家兎血清（分子量 56,64 KDのKerに対する抗血清，Dako Corporation, CA., U.S.A.)，抗Ⅳ-Col家兎血清(アドバンス社製，東京)，抗Amy家兎血清(Nordic Immunological Laboratories, Tilberg, The Netherlands)，抗Vimモノクローナル抗体（Dakopatts, Glostrup, Denmark)，抗SMAモノクローナル抗体（Sigma)，抗EMAモノクローナル抗体(Dakopatts)，抗EGFモノクローナル抗体（Oncogene Science, INC., NY., U.S.A.)，抗EGF-Rモノクローナル抗体（Oncogene Science, INC.)，また増殖期の細胞に特異的に反応するモノクロー

ナル抗体Ki-67（Dakopatts）を一次抗体として用いた（表１）[3, 11~26]．

免疫組織化学的検索のために，未固定凍結顎下腺組織から４ μmの組織切片を作成し，ゼラチンスライドガラス上に貼布し，室温で２時間風乾した後，－20 ℃のアセトンにて組織を固定した．免疫細胞化学的検索のために，カバーガラス上で増殖させた培養細胞をPBS(-)で洗浄後，２ ％パラホルムアルデヒド溶液(pH 7.3)にて30分間固定した．

まず上記の組織切片ならびに培養細胞の内因性のペルオキシダーゼ活性の阻止のため，0.3 ％過酸化水素水添加メタノール溶液にて30分間処理後，PBS(-)で洗浄した．まず非特異的反応を防止するため一次抗体が家兎血清の場合は1.5 ％正常ヤギ血清，あるいはマウスモノクローナル抗体の場合は1.5 ％正常馬血清と20分間反応させた．その後，希釈した各々の一次抗体（表２）と30分間反応させた．次にPBS(-)で洗浄を行ない，二次抗体としてそれぞれ100倍に希釈したビオチン化抗家兎IgG

あるいはビオチン化抗マウスIgGと30分間反応させた．PBS(-)で洗浄した後，アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体と30分間反応させた．さらにPBS(-)で洗浄後，0.05 % DAB(同仁化学研究所，熊本）と0.01 %過酸化水素水を含む0.1 M Tris緩衝液（pH 7.2)で3分間発色させた．一次抗体としてKi-67抗体使用の場合，発色基質溶液としてアルカリホスファターゼ基質溶液（Vector）を使用した．全ての反応は室温で行なった．抗体の希釈には0.1 % BSA(Sigma) 添加PBS(-)を用いた．対比染色には1 %メチルグリーンを使用した．またそれぞれの対照試験として，正常家兎血清あるいはPBS(-)を一次抗体をとして使用した．

観察には日本光学社製生物顕微鏡オプチフォトXFを用い，写真撮影を行なった．

7．電子顕微鏡による観察

60mm径プラスチックシャーレ上に増殖した細胞を，ラバーポリスマンを用いて細胞を採取し遠沈した．遠沈した細胞を0.005 M塩化カルシウム(和光純薬）を加えた0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.3)で

最終濃度2.5 %に調整したグルタールアルデヒド(石津製薬，大阪)溶液を用いて2時間固定した．固定液を除去した後，2 % 四酸化オスミウム(Merck, Darmstadt, Germany)でさらに1時間固定を行った．冷エタノール系で脱水を行い，エポキシ樹脂（Schell Chemical, U.S.A.)に包埋した．ウルトラトーム（LKB製）を用いて500～700 Åの超薄切片を作製し，4 %酢酸ウラニール（半井化学，京都）と水酸化鉛を用いて二重染色し，透過型電子顕微鏡JEM2000EX(日本電子，東京）により観察し，写真撮影を行った．

8．EGF-Rの検索

Heldinら[27]らの方法に準じてEGF-Rの検索を行なった．すなわち，5 x 10^4個の細胞を 11.3 mm径ウエルに分注し，4 日間培養した後，培地をEGF無添加の無血清9:1培地に交換した．48時間培養後，氷冷下にて0.25 %BSA添加PBS(-)で2回洗浄した．0.25 % BSA添加無血清9:1基礎培地に異なる濃度の[^{125}I]EGF(ICN Radiochemicals, specific activity 115 μCi/μg)と1 μg/mlのEGFの

存在下（非特異的結合），または非存在下（全結合）で4℃でインキュベートした．その後，氷冷下にて0.25%BSA添加PBS(-)で3回洗浄し，上清を除き，細胞を400μlの0.1 N NaOHに溶解し，ガンマカウンター（LKB-Wallac 1282 CompuGamma, Wallac, Finland)で放射活性を測定した．[^{125}I]EGFとの結合の経時的変化を検討したところ4時間で最も特異的結合（全結合－非特異的結合）が最大となったため，実験の培養時間は4時間とした．測定結果をScatchard[28]解析した．

9．EGF-R合成能の検索

EGF-R合成能をみるために，Stoscheckら[29]の方法に準じた免疫沈降法を用いた．60 mm径プラスチックシャーレ上に 2.5 x 10^5個の培養細胞を入れ4日間培養後，50 μCi/mlの[^{35}S]メチオニン（ ICN Radiochemicals, specific activity 1138 Ci/mmole)で18時間ラベルし，1 mlのRIPA (1 % Triton X-100, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azideを含む 50 mM Tris緩衝液，pH 7.0)を加え，

ホモジナイズした．次いでホモジネートを1,500 x gで15分間遠心し，さらにその上清を12,000 x gで10分間遠心し，その上清を細胞膜分画として分離した．本試料と1 μgの抗EGF-Rマウスモノクローナル抗体を4℃で20時間反応させた後，RIPAで膨潤させたプロテインA Sepharose(Sigma)を20 μl加えさらに30分間反応させた．その後，RIPAで4回洗浄し，さらにpH 8.4に調整したRIPAで1回洗浄した．プロテイン A Sepharoseに結合した蛋白質をLaemmli[30]の方法に従いsample bufferで溶出した後，SDS-PAGEに展開し，コダックX-Omat XAR-5 フィルム上にてフルオログラフィを行なった．

結　果

1．顎下腺組織における特異抗原の局在

顎下腺各種構成細胞の指標となる抗原（表1）を検索するため，それぞれの抗原の局在をABC法にて免疫組織学的に検討し，その結果を表2にま

とめた．

中間繊維の1つであるKerは主導管，腺条部，介在部の各種導管細胞と筋上皮細胞に局在していた(図1-a)．Vimの局在は筋上皮細胞と間質細胞，また主導管基底細胞にも認められた(図1-b)．細線維のSMAは平滑筋細胞や筋線維芽細胞に存在する6つのactin iso-formの1つで[15]，筋上皮細胞に加えて主導管基底細胞にも本抗原が局在することが確認された（図1-c)．上皮細胞のマーカーであるEMAは顎下腺組織においては，各種導管の管腔側と粘液細胞の腺腔側に局在を認めた（図1-d)．Ⅳ-Colは基底膜に局在していた（図1-e)．Amy陽性細胞は漿液細胞のみに認められた（図1-f)．抗EGF抗体によって各種導管細胞，特に主導管細胞が強く染色され，腺房細胞にも弱い染色性を認めた（図1-g)．EGF-Rについては導管細胞の特に主導管の基底側細胞と介在部導管細胞が強い陽性反応を示したが，筋上皮細胞は陰性であった（図1-h)．G_0期以外のG1後期及びS，G2，M期のcell cycle，すなわち増殖細胞に特異性のあるモ

ノクローナル抗体Ki-67[14,26]で染色すると，主導管が強く染色された(図1-i)．

2．ヒト顎下腺細胞の分離及び培養

顎下腺初代培養細胞の増殖形態を位相差顕微鏡にて観察した．10％ FBS添加DMEMで顎下腺組織を初代培養すると，組織片より初めは類円形の上皮様細胞が増殖してきたが，その細胞は次第に紡錘形に形態変化した(図2-a)．継代を重ねると全ての細胞は紡錘形へと形態変化し，類円形の上皮様形態を維持しなかった（図2-b)．RPMI 1640やMCDB 153にFBSを添加した培地を用いた場合でもFBS添加DMEMと同様の形態変化を示した．またこれらの血清添加培地では一部に線維芽細胞の増殖も見られた．

MCDB 153とDMEMを9:1に配合した基礎培地にINS 1 μg/ml，DEX 10^{-6} MとEGF 10 ng/mlを添加した無血清9:1培地で顎下腺組織を培養すると均一な立方形細胞のみの増殖がみられた（図2-c)．この均一な立方形細胞はconfluentになるまで形態を維持しており，敷石状の単層を形成した（図2

-d)．この無血清9:1培地では線維芽細胞の増殖は認められなかった．また血清添加培地で増殖してきた線維芽細胞の培地を無血清9:1培地に交換すると細胞はシャーレより浮遊し，この培地では線維芽細胞を培養できないことがわかった．無血清9:1培地での均一な立方形細胞の増殖は再現性があり，培養を行なった8個体全ての顎下腺で同様の所見がみられた（図2-e,f)．なおこの増殖してきた立方形細胞は形態を維持した状態で3～8代の継代が可能であった．

3．顎下腺由来立方形細胞の増殖に対するホルモン，成長因子の影響

無血清9:1基礎培地に添加したホルモン及び成長因子の3つの成分の細胞増殖に対する影響を検索するため，それぞれの成分を単独あるいは種々の濃度にして組合せた培地で6日間培養した後，生細胞数を算定した．無血清9:1基礎培地にINS 1 μg/ml，DEX 10^{-6} MとEGF 10 ng/mlをそれぞれ単独添加したところ，EGFに強い増殖促進効果が認められ，またINS,DEXの順に増殖促進の傾向が

認められた．３つの成分の内２つを組合せて添加したところ，INSとEGFの組合せで相加作用が認められ，さらに３つの成分の添加によって顎下腺由来立方形細胞の増殖が最もよく促進されることがわかった（図３-A)．また各成分の至適濃度を検索するため，各成分の内一つの成分を種々の濃度にして組合せて添加したところ，INSの至適濃度は１μg/mlであり，DEXの至適濃度は10^{-6} Mであった（図３-B,C)．EGFは顎下腺由来立方形細胞の増殖に最も影響があり，その増殖はEGF濃度依存性で，10 ng/mlで最も高い増殖能を示した（図３-D)．

４．顎下腺由来立方形細胞の特異抗原の発現と超微形態

立方形細胞における特異抗原の発現をABC法で検討した．立方形細胞は細胞質にKerの抗原性を保持しており(図４-a)，Vimの線維を保有していた(図４-b)．SMA抗原も細胞質に認めた(図４-c)．さらに抗Ⅳ-Col抗体によって立方形細胞は染色され，本細胞がⅣ-Col産生能を持つことが示唆され

た（図４-d）．一方EMAやAmy抗原については陰性を示した（図４-e,f）．

無血清9:1培地で増殖させた立方形細胞が均一な細胞分布を示すことが上記の染色結果から示唆されたが，さらに電子顕微鏡観察によっても個々の細胞が同一の超微構造をもつことが確認された．すなわち立方形細胞の超微構造は細胞内小器官の発達が乏しく，少量のtonofilamentを持つ未分化な導管系細胞の形態を示した（図５）．なおこれらの細胞は筋上皮細胞に特有な微細線維を保持していなかった．以上の超微形態や抗原発現所見から立方形細胞は主導管基底細胞と一致した抗原を発現する未分化な細胞であると考えられた．

５．未分化立方形細胞から扁平上皮様導管細胞への分化

未分化立方形細胞が無血清9:1培地でconfluentになるまで均一な細胞分布を示すことを先に述べた（図２-d）．この状態でさらに培養を続けると，やがて多層構造をとる大きな扁平な細胞が散在性に出現した（図６-a～c）．この細胞はKerとEMA抗

原を強く発現していた(図6-b,c). 超微構造は細胞質に多量のtonofilamentをもつ扁平上皮様形態を示した. シャーレ面に対して垂直方向の切片を作製しその形態を観察すると, 細胞は重層扁平上皮と同様の構造をとっていることがわかった. すなわち上層に移行するに従い, 細胞はより扁平な形態をとり, 核のぬけ出した細胞も散見された(図6-d). これらの扁平上皮様細胞を継代培養によって維持することはできず, 未分化立方形細胞が扁平上皮様導管細胞に最終分化したことが示唆された.

6. 未分化立方形細胞の増殖に与える培地のCa^{++}濃度の影響

培地のCa^{++}濃度がヒト角化上皮細胞(keratinocyte)などの上皮細胞の増殖や分化に影響を与えることがよく知られている[31~34]. そこでまず低Ca培地の無血清9:1培地(Ca^{++}濃度 0.227 mM)に塩化カルシウムを添加して, 立方形細胞の増殖に対するCa^{++}濃度の影響について検討した. その結果, 未分化立方形細胞はCa^{++}濃度依存性に細胞増

殖傾向を示し，生理的濃度である1.015 mMで最も高い増殖を示した（図７）．また同じCa^{++}濃度である無血清1:1培地（Ca^{++}濃度 1.015 mM）で培養するとより高い増殖を示した．この無血清1:1培地での培養とCa^{++}濃度を上昇させた無血清9:1培地での培養と細胞の形態変化に同一所見が得られたので高Ca培地として無血清1:1培地を使用した．

７．Ca^{++}濃度上昇に伴う立方形細胞の分化

無血清9:1培地を無血清1:1培地に換えると散在性に増殖していた立方形細胞は全て特異な増殖形態をとった．すなわち，培地交換後１時間頃より細胞はまず互いに接触し，その後極性を持って一列に増殖し，その後樹枝状あるいは乳頭状構造をとった（図８-a）．

この一列に増殖する細胞を電子顕微鏡で観察したところ，細胞は介在部導管上皮細胞に類似した超微構造を示した．すなわち，一列に増殖する細胞は比較的発達した細胞内小器官やmicrovilliを有し，細胞間にはdesmosomeや細胞間嵌合がみられた（図８-b）．マーカー抗原の発現では，この細

胞はKerの強い抗原性と（図9-a），Vimの線維を持ち(図9-b)，細胞膜に近接した部位にSMA抗原を有していた（図9-c)．Ⅳ-Colも細胞質に認められた（図9-d)．未分化立方形細胞が保有していた上記の各種抗原に加えて，新たにEMA抗原の発現が認められた（図9-e)．なおAmy抗原は認められなかった（図9-f)．培地のCa^{++}濃度の上昇に伴って一列に増殖した立方形細胞は，介在部導管上皮細胞と類似した超微形態を有し，基底側細胞の抗原（SMA，Ⅳ-Col陽性)を保有していると同時に，管腔側細胞の特性（EMA陽性)も獲得していることがわかった．この様な細胞は介在部導管前駆細胞に相当する細胞と考えられた．また，この介在部導管前駆細胞は培地を低 Ca培地の無血清9:1培地に交換すると，細胞は散在性に増殖し未分化立方形細胞の形態をとった．

これらの介在部導管前駆細胞は最初樹枝状あるいは乳頭状に増殖するが（図8-a)，培養皿上で細胞が密になった部位では，細胞が重層し cell clusterを形成するようになった（図10-a)．この

時期の細胞を電子顕微鏡で観察すると，細胞は拡大した粗面小胞体や分泌顆粒等の著明に発達した細胞内小器官をもつ腺房細胞様形態を示した（図10-b）．さらに1ヵ月以上培養を続けるとこのcell clusterは大きな半球状のドームを形成した（図10-c）．このドームを垂直方向の切片でみると，数層の細胞からなり，ドームの内側に位置する細胞がAmy陽性を示した（図10-d）．以上のように未分化立方形細胞は培地のCa^{++}濃度を上昇させることによって一列に配列する介在部導管前駆細胞に分化し，さらに腺房細胞に分化することがわかった．そこでこの一連の形態変化の再現性の有無を検討するために，未分化立方形細胞をあらかじめカバーガラスを入れた培養皿上にいれ，培地を無血清1:1培地に交換した．その結果，すべてのカバーガラス上で一列に増殖する細胞集団の形成がみられた．次に，カバーガラス上に形成された一列に増殖する細胞集団を別の培養皿に移し，さらに培養を続けた．その結果，分離された細胞は上記と同様の形態変化を示した．この介在部導管前

駆細胞は継代培養が可能であったが，腺房細胞へ分化した細胞は継代培養不可能であった．以上の所見は介在部導管前駆細胞が腺房細胞に最終分化した事を示唆している．

継代培養を続けている介在部導管前駆細胞は継代5，6代目より徐々に紡錘形に形態変化した（図11-a）．この紡錘形細胞の出現の割合は継代を重ねるにつれて有意となり，さらに一部の細胞は大きさを増して（図11-b），KerとVimとSMAに染色される線維を細胞質に豊富に持つようになった（図11-c,d,e）．すなわち介在部導管前駆細胞が筋上皮細胞に分化したことが示唆された．

8．主導管基底細胞のEGF分泌の検索

顎下腺組織における免疫組織学的所見で主導管基底細胞にEGFの局在を認めた（図1-g）．そこで無血清9:1培地で分離培養できた未分化立方形細胞のEGF分泌について検討した．

無血清9:1培地（10 ng/ml EGFを含んでいる）に0.1μg/ml抗EGF抗体を添加後4日目の生細胞数を算定したところ，抗EGF抗体は未分化立方形細

胞の増殖を抑制する傾向を示し(図12-A-b)，その増殖はEGF無添加時の増殖(図12-A-c)と同程度であった．このことより外因性のEGF 10 ng/mlによる細胞増殖能を0.1μg/ml抗EGF抗体で中和できることが示唆された．次にEGF無添加培地に同量の抗EGF抗体を加えると未分化立方形細胞はほとんど増殖が認められなかった（図12-A-d）．さらに抗EGF抗体による細胞のDNA合成能の抑制効果は濃度依存性であったこと(図12-B)から，未分化立方形細胞の増殖における内因性EGFの関与が示唆された．

9．顎下腺由来立方形細胞のEGF-Rの検索

顎下腺由来立方形細胞の増殖促進に強く影響した因子はEGFであった（図3-A,D）．そこでこの立方形細胞のEGF-Rについて［^{125}I］EGFを用いたEGF binding assayを行なった．その結果をscatchard plot解析すると立方形細胞は高親和性と低親和性の2種の受容体を持っていることがわかった（図13）．解離定数Kdは高親和性5.6 x 10^{-10} M，低親和性2.9 x 10^{-9}Mで受容体数は細胞当りそ

れぞれ2.3 x 10^5個と8.4 x 10^5個であった．この細胞の受容体数はEGF-R高発現株である扁平上皮癌細胞A 431[35]よりは少ないが，ヒト正常角化細胞[36]やヒト乳腺上皮細胞[37]よりは多かった．

１０．顎下腺由来培養細胞の分化とEGF-R合成能

EGF-Rの合成能について免疫沈降法を用いて検討した(図14)．未分化立方形細胞はEGF-R高発現株のA 431細胞と同様分子量170 kDのEGF-Rの合成を認めた．さらに10 ng/mlのEGF添加によって両細胞とも合成蛋白のdown regulationを示したことより，このEGF-RはEGFと結合し細胞内部に取込まれ反応を示している事が示唆された．紡錘形に分化した筋上皮様細胞は未分化立方形細胞と比較して EGF-Rの合成が著明に低下し，EGF無添加時にわずかに合成を認める程度であった．この結果は顎下腺組織においてEGF-Rは主導管の基底側細胞に強い陽性所見を示したが，筋上皮細胞には認められなかった事実（図１-h)と一致するものであった．

考察

唾液腺は胎生期に口腔上皮が下層の間質に出芽することによって作られる．この出芽は胎生6週ごろから始るが，その形態は Thoma[38]やEvesole[39]によって報告されている．それによると，原始口腔を形成する上皮組織の一部より未分化な立方形の上皮細胞が2列になって下層の間質に陥入し，先端が樹枝状に枝分れし，分化して終末部を形成する．発育後も唾液腺細胞の増殖や分化が営まれていることは放射線照射などによって障害された成人の唾液腺が修復される事実からも明らかである．すなわち唾液腺の多分化能を有する細胞（stem cell）が増殖し，各種唾液腺構成細胞に分化することによって唾液腺が再生されると推察される．唾液腺腫瘍の発生母地を考えると，腫瘍は比較的分化した各種細胞で構成されていることから，多分化能を有するstem cellが腫瘍発生に深く関与していると思われる．Shirasunaら[1]は放射線照射を受けたヒト顎下腺より腫瘍原性を有

する介在部導管上皮細胞株(HSG)をin vitroに分離することに成功した．このHSG細胞は多分化能を有する細胞で，培養条件の変化や分化誘導剤によって筋上皮様細胞や腺房様細胞など種々の細胞に分化することが示されている[2~4]．しかし，唾液腺の分化過程を解析するためには，当然のことながら正常唾液腺細胞を用いる必要がある．

唾液腺の培養は古くから行なわれてきた．最初唾液腺原基全体の培養が試みられたが[40~43]，腺自体の成長に限界があり，この方法での唾液腺の機能や分化の研究は不可能であった．そこで，ある程度分化した唾液腺組織片の培養が試みられた[44~47]．しかし，組織である以上，そこに含まれる細胞は均一でなく，in vitroで唾液腺の維持できる期間も極めて短かった．Yang[6]や米田ら[5]はコラーゲンゲル内の包埋培養を用いて，マウス唾液腺上皮細胞の培養を試み，ゲル内で管腔形成をする上皮細胞を分離できることを報告した．しかしながら，上皮細胞をin vitroで維持できる期間は2～3週間程度であり，培養細胞の機能や分化

を解析することはできなかった．そこで，本研究ではまずヒト顎下腺細胞を長期間in vitroで維持できる培養条件の確立を目的として実験を行なった．血清添加培地を用いてヒト顎下腺組織を培養したところ，細胞は紡錘形に形態変化した（図2－a,b)．また，線維芽細胞の増殖能が高く，この紡錘形細胞では線維芽細胞と形態的に見分けることが困難であった．近年，無血清培地を用いたヒト正常角化細胞（keratinocyte)やヒト乳腺上皮細胞の培養が行われている．keratinocyteの無血清培養はBoyceとHam[31]によって試みられ，さらにWilleら[32]はMCDB 153を基礎培地とした keratinocyte growth medium（KGM）を開発した．Petersonら[14]はヒト乳腺上皮細胞の培養にDMEMとF12を1:1に配合した無血清培地を用いた．どちらもこれらの基礎培地にEGF,INS,ハイドロコーチゾン等を添加した増殖培地が用いられている．また，正常上皮細胞の培養において培地のCa^{++}濃度が重要な要素となり，keratinocyteの場合，至適Ca^{++}濃度は0.1 mMであり，細胞はCa^{++}濃度の上昇に伴

い分化し増殖能が低下する[31~34]．乳腺細胞も同様の報告がある[48]．さらに線維芽細胞はCa^{++}濃度0.5 mM以下では増殖し得ないことも知られている[34]．これらの報告事実をもとにMCDB 153とDMEMを組合せた基礎培地を用いて，顎下腺細胞の培養を試みた．その結果，低Ca培地の無血清9:1培地を用いることにより顎下腺組織から均一な立方形細胞が分離培養できることがわかった．

唾液腺は各種細胞により構成されているにもかかわらず，この培地で組織片から増殖する細胞は主導管基底細胞と一致した抗原を発現する立方形細胞のみの一種類であった．この理由の1つに，無血清9:1培地が選択培地であったことが挙げられる．すなわち，この培地に適する細胞のみが選択的に組織片から増殖したと考えられる．このことは立方形細胞がEGF-Rを強く発現し（図13），この細胞の増殖がEGF濃度依存性であり（図3-D），分化した細胞ではEGF-Rの発現低下に伴って増殖も低下した（図14）結果からも支持される．また増殖期細胞に特異性のある抗体Ki-67を用いて組

織を染色したところ，主導管細胞のみに反応を示したことより（図1-i），この細胞がin vitroでも高い増殖能を保持していたと考えられる．

この均一な立方形細胞が唾液腺のどの細胞の性状を有するかを検討するため唾液腺の各種構成細胞の抗原の特異性を検討した(表2)．この結果，唾液腺構成細胞はこれらの特異抗体を用いることにより個々の細胞に同定できることがわかった．しかし，実験に用いた抗体は腺条部導管上皮細胞と主導管細胞の管腔側細胞に対して同一の染色結果を示した．この二者はその超微構造で鑑別することができるが，抗原面からも二者を区別するための検討も必要と思われる．

無血清9:1培地で分離培養できた均一な立方形細胞は細胞質にKerとVimと SMA及びⅣ-Colを持ち（図4-a～d），基底側に位置する細胞の抗原性を示した．また，立方形細胞は高親和性と低親和性の2種のEGF-Rを持っていた(図13)．乳腺や唾液腺の筋上皮細胞は上皮細胞の特性（Ker陽性）と平滑筋細胞の特性（SMA陽性）の両者を持つ特異

な細胞であると報告されている[16~18]．最近唾液腺の主導管基底細胞にも両者の抗原を有する細胞があると報告されている[19]．本研究においても筋上皮細胞と主導管基底細胞に両者の抗原の局在を認めた（図1-a,c)．未分化立方形細胞に発現を認めた抗原は唾液腺組織において筋上皮細胞と主導管基底細胞にその局在がみられたが（図4，表2），EGF-Rは筋上皮細胞に認められず，主導管基底細胞に強く発現していた（図1-h)．以上の所見から，分離された立方形細胞は主導管基底細胞に相当する細胞であると考えられた．また立方形細胞は少量のtonofilamentと発達に乏しい細胞内小器官を保有する未分化な形態を示し(図5)，筋上皮細胞に特有の微細線維を持っていなかった．Dardick[49]は正常耳下腺の主導管基底側に細胞内小器官の発達に乏しい未分化細胞を電子顕微鏡によって認めたと報告している．また腫瘍においてもChaudhryら[50, 51]は腺様嚢胞癌や粘表皮腫における未分化細胞の存在を報告している．これらの細胞の超微形態は本研究で得た未分化立方形細

胞とよく類似している．以上の様に無血清9:1培地で顎下腺組織から増殖した細胞は主導管基底細胞に相当する未分化細胞であることが示唆された．

in vitroにおける細胞分化機構の研究は広く行われている．上皮細胞の中でもよく報告されているのが keratinocyteの分化である[31~34]．keratinocyteの場合，培地のCa^{++}濃度を生理的な濃度に上昇させることにより高分子のケラチンの割合が増え，角化したエンベロプが産生される．顎下腺細胞の場合，未分化立方形細胞から重層扁平上皮様細胞への分化細胞が密に増殖した点で認められた（図6-a～d）．また，培地のCa^{++}濃度を上昇させることにより未分化立方形細胞は特異な増殖形態をとった．すなわち，散在性に増殖している細胞は数時間で互に接触し，極性をもって一列に増殖する形態をとった（図8-a）．Ca^{++}濃度上昇に伴うこの変化は短時間でみられ再現性が高いことから，未分化立方形細胞は同一方向の分化能を持った均一な細胞集団であることが示唆された．この変化した細胞は介在部導管細胞に類似した超

微形態をもち，基底側（SMA, Ⅳ-Col陽性）と管腔側（EMA陽性）と両方のマーカー抗原を保有していた（図9-d, e）．基底，管腔側両者の抗原を有するこの細胞は介在部導管前駆細胞に相当すると考えられる．この細胞をさらに培養すると，細胞は腺房細胞に分化し，細胞が密に接する部位から細胞は多層となり，やがて細胞間に外分泌が起こることによりドームを形成した（図10-c）．この所見はHazen-Martinら[52]のよって報告されたヒト皮膚汗腺から得た細胞で認められたドームと同じ所見で，in vitroにおける分泌細胞の機能発現を示唆している．

また介在部導管前駆細胞から筋上皮細胞に最終分化する所見も得られた（図11）．紡錘形に分化した筋上皮様細胞は介在部導管前駆細胞と比べて明らかに増殖能の低下とEGF-R合成能の低下を示した（図14）．この所見は組織において介在部導管細胞に強いEGF-Rの発現を認め，筋上皮細胞にはEGF-Rの発現が認められなかったことと一致する（図1-h）．

唾液腺の発生については現在まで数々の仮説が提唱されている．1971年Evesole[39]は２つの仮説を提唱した．１つは pleuripotential unicellular theoryであり，主導管前駆細胞が唾液腺の全ての構成細胞である主導管細胞，腺条部導管細胞，介在部導管細胞，腺房細胞，筋上皮細胞それぞれに分化するという説である．もう１つは semi-pleuripotential bicellular theoryで，これは粘表皮腫や唾液腺由来扁平上皮癌が小葉外に発生し，腺様嚢胞癌，腺房細胞腫，オンコサイトーマそしてWartin腫瘍が小葉内に発生することより，主導管前駆細胞が扁平上皮導管細胞に最終分化する以外に，介在部導管前駆細胞になり，その後この介在部導管前駆細胞が腺条部導管細胞，腺房細胞，筋上皮細胞に分化するという説である．この第２の仮説は1977年，RegeziとBatsakis[53]によっても支持されたが，この仮説を示唆する事実は未だ報告されていない．本研究で得られた立方形細胞は主導管基底細胞の性状を有する未分化な細胞で，仮説上のpleuripotential stem cellに相

当する細胞であると思われる．この細胞は扁平上皮様導管細胞に最終分化するのに加えて，培地のCa^{++}濃度を上昇させることによって介在部導管前駆細胞になり，この介在部導管前駆細胞が腺房細胞や筋上皮細胞へ最終分化するという2つの分化過程をとることが示された．すなわち，本研究所見は semipleuripotential bicellular theoryをin vitroで支持する結果となった．

上皮系細胞の増殖や分化に周囲の間葉系細胞との相互作用が重要な役割を持つことがよく知られている[42,43]．例えば，Evesole[39]は介在部導管前駆細胞から腺房細胞や筋上皮細胞に分化する過程に間葉系細胞の関与の必要性を述べている．またShirasunaら[54]はヒト線維芽細胞培養上清中に唾液腺癌細胞の分化を誘導する液性因子が存在することを報告した．一方，上皮細胞単層培養系において線維芽細胞の混在は著しく上皮細胞の増殖を抑制することが知られている．事実，上皮細胞をin vitroで維持するためには線維芽細胞の過増殖を抑制することが重要な要素となる．そこで培

地条件を工夫することによって均一な上皮細胞をin vitroに分離し，それらの細胞についての機能や分化誘導の研究が行われている．最近，Petersonら[14]は無血清培地で分離した乳腺上皮細胞の筋上皮細胞への分化がホルモンや成長因子によって影響されると報告した．in vivoにおける上皮細胞の分化に間葉系細胞が関与しているとすれば，間葉系細胞によって産生される細胞外基質成分や液性因子がその一役を担っていると考えられるが，それらの調節機構についての詳細は今後の研究が必要である．本研究において唾液腺細胞の分化は線維芽細胞の関与やホルモン，成長因子を変化させることなしに観察された．主導管基底細胞から扁平上皮様細胞への分化は低Ca培地において細胞が互いに密に接触する部位に見られた．またCa^{++}濃度上昇に伴って介在部導管前駆細胞への分化が起こり，それに引き続き，腺房細胞や筋上皮細胞への分化も見られた．Henningsら[34]はCa^{++}濃度の変化に伴うkeratinocyteのDNA合成能，RNA合成能，蛋白合成能および細胞の形態変化について継

時的に観察した結果，Ca^{++}濃度を0.1 mMから1.2 mMにかえてから2時間で細胞と細胞の接触や細胞間にdesmosomeが認められるようになり，5～10時間後にDNA合成の低下が認められ，RNAと蛋白合成は12時間後より始ると報告した．Ca^{++}濃度の変化がいかなる機序で細胞分化を誘導するかについては不明ではあるが，keratinocyteの場合も唾液腺細胞の培養においても細胞と細胞との接触が分化誘導の開始因子として重要な役割を担っていると考えられる．

低Ca培地の無血清9:1培地を用い，細胞が約80％のconfluentの状態で継代すれば，主導管基底細胞を未分化な状態で3～8代の継代培養が可能であった．この条件下で細胞は未分化な状態で維持できるので，本培養系は各種ホルモン，成長因子やその他の細胞分化に対する影響など唾液腺細胞の分化の調節機構を今後解析するために有用な系になると思われる．

結論

本研究はヒト顎下腺細胞をin vitroで培養するための培地条件を確立すること，そしてその細胞培養系を用いて，細胞増殖と分化過程の解析を行なうことを目的として行った．その結果，以下の所見を得た．

1．MCDB 153とDMEMを9:1に配合した基礎培地にINS, DEX, EGFを加えた無血清9:1培地でヒト唾液腺組織から均一な上皮細胞を分離しえること，またその機能を維持させながら培養できることが分かった．

2．無血清9:1培地で得られた細胞は細胞内小器官の発達に乏しい未分化な形態を示し，Ker, Vim, SMAとⅣ-Colを持つ主導管基底細胞と一致した抗原を発現する細胞であった．

3．未分化立方形細胞はEGF-Rを強く発現しており，その増殖はEGFに依存していた．

4．この主導管基底細胞は扁平上皮様導管細胞に最終分化するのと，また培地のCa^{++}濃度を上昇さ

せると介在部導管前駆細胞になり，この介在部導管前駆細胞が腺房細胞や筋上皮細胞へ最終分化するという２つの分化過程をとることが分かった．

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えて頂き，御指導と御校閲を賜わった口腔外科学第一講座松矢篤三教授，本研究の実施に際し，終始変わらぬ御指導をいただいた口腔外科学第一講座白砂兼光助教授に心から謝意を表します．また，研究の円滑な進展のために特別の御配慮をいただいた口腔外科学第一講座の教室員の方々に深謝致します．

Growth and Differentiation of Human Salivary Gland Epithelial Cells in vitro

Masaya OKURA

The First Department of Oral and Maxillofacial Surgery Osaka University Faculty of Dentistry 1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Key words: human salivary gland cell, Cell differentiation, Immunochemical examination

Parenchymal tissues of human submandibular glands were cultured in a medium consisting of 1:9 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and MCDB 153 (final calcium concentration, 0.227 mM) supplemented with 10 ng/ml EGF, 10^{-6} M dexamethasone and 1 ug/ml insulin. The cultivation of the tissues in this medium resulted in propagation of homogeneous population of cuboidal cells with immunohistochemical makers of basal cells of interlobular duct and myoepithelial cells, which included vimentin, 56- and 64-KD keratin, α-smooth muscle actin (SMA) and type IV collagen. The propagated cells represented ultrastructually only one type of cells having an undifferentiated morphology which was different from that of myoepithelial cells. The cuboidal cells expressed EGF receptor and showed stringent requirement for EGF. Their homogeneous cell population was maintained at least until 90 % confluency, while several multilayered foci were developed on confluent monolayer. The multilayered cells were strongly positive for 56- and 64-kD keratin and human epithelial membrane antigen (EMA), which was a possible marker of luminal cells. Electron microphotographs of vertical sections through the foci showed stratified cell layers with a gradual transition from basal cells to squamous epithelial cells. When the cuboidal cells were cultured in a medium consisting of 1:1 mixture of DMEM and MCDB 153 containing with same supplements

(final calcium concentration, 1.015 mM), the all cells showed a characteristic feature of proliferating pattern; the cells lined up in a single row. Immunocytochemically, the cells that formed a line, retained the original antigens such as cytokeratin, vimentin SMA and type IV collagen, and newly expressed EMA. These cells had fine structure similar to intercalated duct cells. The morphology and expression of both basal and luminal markers may suggest that altered cells by change of medium is intercalated duct progenitor. The single rows multiplied with papillary epithelial proliferation, lay in close proximity to each other, and eventually aggregated. The aggregated cells had an ultrastucture similar to acinar cells of salivary glands. Further cultivation of the aggregates resulted in multiple formation of dome consisting of multilayered cells with amylase positive cells. At the same time a few of elongated cells were developed. These elongated cells increased in number with increasing cell passages and became to contain numerous filaments which were stained with antisera to keratin, vimentin and SMA, suggesting differentiation to myoepithelial cells. These observations strongly suggest that the cuboidal cells propagated from human submandibular glands are basal cells of interlobular duct which are a possible stem cell with capability to differentiate epidermoid cells and intercalated duct progenitor, which is able to display potential for acinar and myoepithelial differentiation.

参考文献

1) Shirasuna, K., Sato, M. and Miyazaki, T. (1981): A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. Cancer, 48, 745-752.

2) Shirasuna, K., Furusawa, H., Morioka, S., Watatani, K. and Matsuya, T. (1989) : Different contents of glycosaminoglycans in a human neoplastic salivary duct cell line and its subclone with a myoepithelial phenotype. Virchows Archiv(B) Cell Pathol., 57, 175-180.

3) Shirasuna, K., Watatani, K., Sugiyama, M., Morioka, S. and Miyazaki, T. (1986) : Isolation and characterization of different clones including myoepithelial-like variants from a clonal neoplastic epithelial duct line of human salivary gland origin. Cancer Res., 46, 1418-1426.

4) Sato, M., Azuma, M., Hayashi, Y., Yoshida, H., Yanagawa, T. and Yura Y. (1987) : 5-azacytidine induction of stable myoepithelial and acinar cells from a human salivary intercalated duct cell clone. Cancer Res., 47, 4453-4459.

5) 米田俊之，今本 公，作田正義 (1986) : コラーゲンゲルマトリックスを用いたマウス正常顎下腺上皮細胞の初代培養. Jpn. J. Oral. Bio., 28, 12-18.

6) Yang, J., Flynn, D., Larson, L. and Hamamoto, S. (1982) : Growth in primary culture of mouse submandibular epithelial cells embedded in collagen gels. In Vitro, 18, 435- 442.

7) 清信成一 (1989) : ヒト小唾液腺培養細胞から腺房細胞の樹立. Jpn. J. Oral. Bio., 31, 248-256.

8) Oliver, C. (1980) : Isolation and maintenance of differentiated exocrine gland

acinar cells in vitro. In Vitro, 16, 297-305.

9) Snowdowne, K. W., Rosenoer, L., Yu, E. and Cashman, J. R. (1989) : Eicosaniods evoke the release of amylase and increase cytoplasmic calcium in rat parotid cells. Biochem. Biophis. Res. Commun., 161, 379-384.

10) Hsu, S. M., Raine, L. and Fanger, H. (1981) : Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. : A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem., 29, 577-580.

11) Shirasuna, K., Watatani, K., Furusawa, H., Saka, M., Morioka, S., Yoshioka, H. and Matsuya, T. (1990) : Biological characterization of pseudocyst-forming cell lines from human adenoid cystic carcinomas of minor salivary gland origin. Can-

cer Res., 50, 4139- 4145.

12) Korsrud, F. R. and Brandtzaeg, P. (1982) : Characterization of epithelial elements in human major salivary glands by functional markers : Localization of amylase, lactoferrin, lysozyme, secretory component, and secretory immunoglobulins by paired immunofluorescence staining. J. Histochem. Cytochem., 30, 657-666.

13) Osborn, M., Debus, E. and Weber, K. (1984) : Monoclonal antibodies specific for vimentin. Eur. J. Cell Biol., 34, 137-143.

14) Peterson, O. W. and van Deurs, B. (1988) : Growth factor control of myoepithelial-cell differentiation in cultures of human mammary gland. Differentiation, 39, 197-215.

15) Kapanci, Y., Burgan, S., Pietra, G. G., Conne, B. and Gabbiani, G. (1990) : Modulation of actin isoform expression in alve-

olar myofibroblasts (contractile interstitial cells) during pulmonary hypertension. Am. J. Pathol., 136, 881-889.

16) Gugliotta, P., Sapino, A., Macri, L., Skalli, O., Gabbiani, G. and Bussolati, G. (1988) : Specific demonstration of myoepithelial cells by anti-alpha smooth muscle actinantibody. J. Histochem. Cytochem., 36, 659-663.

17) Skalli, O., Ropraz, P., Trzeciak, A., Benzonana, G., Gillessen, D. and Gabbiani, G.(1986) : A monoclonal antibody against α-smooth muscle actin : a new probe for smooth muscle differentiation. J. Cell Biol., 103, 2787-2796.

18) Srigley, J. R., Dardick, I., Warren, R., Harwick, J. and Klotz L. (1990) : Basal epithelial cells of human prostate gland are not myoepithelial cells. Am. J. Pathol., 136, 957-966.

19) Dardick, I., Parks, W. R., Little, J. and Brown, D. L. (1988) : Characterization of cytoskeletal proteins in basal cells of human parotid salivary gland ducts. Virchows Archiv(A) Pathol. Anat. Histopathol., 412, 525-532.

20) Hilkes, J., Buijis, F., Hilgers, J., Hageman, P., Calafat, J., Sonnenberg, A and van der Valk, M. (1984) : Monoclonal antibodies against human milk-fat globule membranes detecting differentiation antigens of the mammary gland and its tumors. Int. J. Cancer, 34, 197-206.

21) Peterson O. W. and van Deurs B.(1986) : Characterization of epithelial membrane antigen expression in human mammary epithelium by ultrastructural immunoperoxidase cytochemistry. J. Histochem. Cytochem., 34, 801-809.

22) Gusterson, B. A., Lucas, R. B. and Or-

merod, M. G. (1982) : Distribution of epithelial membrane antigen in benign and malignant lesions of the salivary glands. Vichows Archiv [Pathol. Anat.], 397, 227-233.

23) Tatemoto, Y., Kumasa, S., Watanabe, Y. and Mori, M. (1987) : Epithelial membrane antigen as a marker of human salivary gland acinar and ductal cell function. Acta Histochem., 82, 219-226.

24) Starkey, R. H. and Orth, D. N. (1987) : Radioimmunoassay of human epidermal growth factor (urogastrone). J. Clin. Endocr. Metab., 45, 1144-1153.

25) Kawamoto, T., Sato, T. D., Le, A. D., Polikoff, J. and Sato, G. H. (1983) : Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor : Identification of high affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal an-

tibody. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 1337-1341.

26) Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H. Schwab, U. and Stein, H. (1984) :Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody. J. Immunol., 133, 1710-1715.

27) Heldin, C.-H., Westermark, B. and Wasteson, A.(1979) : Desensitisation of cultured glial cells to epidermal growth factor by receptor down-regulation. Nature, 282, 419-420.

28) Scatchard, G. (1949) : The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci., 51, 660-672.

29) Stoscheck, C. M., Soderquist, A. M. and Carpenter, G. (1985) : Biosynthesis of the epidermal growth factor receptor in cultured human cells. Endocrinology, 116, 528-

535.

30) Laemmli, U. K.(1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.

31) Boyce, S. T. and Ham, R. G. (1983) : Calcium-regulated differenciation of normal human epidermal keratinocytes in chemically difined clonal cultures and serum-free serial cultures. J. Invest. Dermatol., 81, 33-40.

32) Wille, JR. J. J., Pittelkow, M. R., Shipley, G. D. and Scott, R. E. (1984) : Integrated control of growth and differentiation of normal human prokeratinocytes cultured in serum-free medium : Clonal analyses, growth kinetics, and cell cycle studies. J. Cell. Phisiol., 121, 31-44.

33) Pillai, S., Bikle, D. D., Hincenbergs, M. and Elias. P. M. (1988) : Biochemical

and morphological characterization of growth and differentiation of normal human neonatal keratinocytes in serum-free medium. J. Cell. Phisiol., 134, 229-237.

34) Hennings H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K. and Yuspa, S.H. (1980) : Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. Cell, 19, 245-254.

35) Haigler, H., Ash, J. F., Singer, S. J. and Cohen, S. (1978) : Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 3317-3321.

36) Boostra, J., Laat, S. W. D. and Ponec, M. (1985) : Epidermal growth factor receptor expression related to differentiation capacity in normal and transformed keratinocytes. Exp. Cell Res., 161, 421-433.

37) Bates, S. E., Valverius, E. M., Ennis, B. W., Bronzert, D. A., Sheridan, J. P., Stampfer, M. R., Mendelsohn, J., Lippman, M. E. and Dickson, R. B. (1990) : Expression of the transforming growth facter-α/epidermal growth factor receptor pathway in normal human breast epithelial cells. Endocrinology, 126, 596-607.

38) Thoma, K. H. (1919) : A contribution of the knowledge of the development of the submaxillary and sublingual salivary glands in human embryos. J. Dent. Res., 1, 95-143.

39) Evesole, L. R. (1971) : Histogenic classification of salivary tumors. Arch Path., 92, 433-443.

40) Spooner, B. S. and Faubion, J. M. (1980) : Collagen involvement in branching morphogenesis of embryonic lung and salivary gland. Develop. Biol., 77, 84-102.

41) Thompson, H. A. and Spooner, B. S. (1982) : Inhibition of branching morphogenesis and alteration of glycosaminoglycan biosynthesis in salivary glands treated with β-D-xyloside. Develop. Biol., 89, 417-424.

42) Banerjee, S. D., Cohn, R. H. and Bernfield, M. R. (1977) : Basal lamina of embryonic salivary epithelia-production by the epithelium and role in maintaining lobular morphology. J. Cell Biol., 73, 445-463.

43) Martinez-Hernandez, A., Nakane, P. K. and Pierce, G. B. (1974) : Intracellular localization of basement membrane antigen in parietal yolk sac cells. Am. J. Pathol., 76, 549-561.

44) Cohn, R. H., Banerjee, S. D. and Bernfield, M. R. : Basal lamina of embryonic salivary epithelia-nature of glycosaminoglycan and organization of extracellular materials. J. Cell Biol., 73, 464-478.

45) Blume, G. B., Koenig, H. and Goldstone, A. D. (1985) : Association of increased polyamine levels with isoproterenol stimulated mucin secretion in the rat submandibular gland. Biochem. Biophis. Res. Commun., 132, 118-125.

46) 井上秀夫，小西洋太郎，滝川啓子，上野明道，竹田義朗 (1982) : 培養ラット耳下腺のホルモン応答性に関する研究. 歯基礎誌, 24, 370-378.

47) Barka, T., Gubits, R. M. and van der Noen, H. (1987) : Accumulation of c-fos mRNA in slices of mouse submandibular gland incubated in vitro. Oncogene, 1, 297-300.

48) Soule, H. D. and Mcgrath, C. M. (1986) : A simplified method for passage and long-term growth of human mammary epithelial cells. In Vitro Cell. Dev. Biol., 22, 6-12.

49) Dardick, I., Rippstein, P., Skimming, L.,

Boivin, M., Parks, W. R. and Dairkee, S. H. (1987) : Immunohistochemistry and ultrastructure of myoepithelium and modified myoepithelium of the ducts of human major salivary glands: Histogenetic implicatons for salivary gland tumors. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 64, 703-715.

50) Chaudhry, A. P., Leifer, C., Cutler, L. S., Satchidanand, S., Labay, G. R. and Yamane, G. M.(1986): Histogenesis of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. Cancer, 58, 72-82.

51) Chaudhry, A. P., Cutler, L. S., Liefer, G., Satchidanand, S. and Yamane, G. M. (1989) : Ultrastructural study of the histogenesis of salivary gland mucoepidermoid carcinoma. J. Oral Pathol. Med., 18, 400-409.

52) Hazen-Martin, D. J., Spicer, S. S., Sens, M. A., Jenkins, M. Q., Westphal, M.C. and

Sens, D. A.(1987) : Tissue culture of normal and cystic fibrosis sweat gland duct cells I. Alterations in dome formation. Pediatr. Res.,21, 72-78.

53) Regezi, J. A. and Batsakis, J. G. (1977) : Histogenesis of salivary gland neoplasms. Otolaryngol. Clin. North Am.,10, 297-307.

54) Shirasuna, K., Morioka, S., Watatani, K., Hayashido, Y., Furusawa, H., Sugiyama, M., Okura, M. and Matsuya, M. (1988) : Growth inhibition and differentiation of human salivary adenocarcinoma cells by medium conditioned with normal human fibroblasts. Cancer Res., 48, 2819-2824.

脚注

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座（主任：松矢　篤三教授）

本論文の要旨は，第35回口腔外科学会総会（平

成2年10月，岡山），第45回日本口腔科学会総会（平成3年5月，京都）において一部発表した．

本論文で用いた略号を以下に示した．PBS(-)，Ca^{2+}とMg^{2+}を含まないリン酸緩衝液；FBS，牛胎児血清；DMEM，Dulbecco変法 Eagle最小必須培地；HEPES，N 2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesulfolic acid；INS，insulin；DEX，dexamethasone；EGF，epidermal growth factor；EDTA，エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム；TCA，トリクロロ酢酸；ABC法，avidin-biotin-peroxidase complex method；Ker，keratin；IV-Col，type IV collagen；Amy，amylase；Vim，vimentin；SMA，single iso-form α-smooth muscle actin；EMA，epithelial membrane antigen；EGF-R，EGF receptor；DAB，3，3'-diaminobenzindine tetrahydeochloride；BSA，牛血清アルブミン；SDS，sodium dodecyl sulfate

図の説明

図１：ヒト顎下腺組織における免疫組織化学的所見

顎下腺は抗Ker(a)，抗Vim(b)，抗SMA(c)，抗EMA(d)，抗Ⅳ-Col(e)，抗Amy(f)，抗EGF(g)，抗EGF-R(h)，Ki-67(i)の各抗体によって染色された(x 200)．
各抗原の局在分布を表２にまとめた．

図２：顎下腺組織より得られた培養細胞の位相差像

10 % FBS添加DMEMで培養した53歳男性の顎下腺組織から増殖した類円形の初代培養上皮細胞は次第に紡錘形に形態変化し(a, x100)，継代３代目では全ての細胞が紡錘形形態を示した（b, x 200)．同一組織を無血清9:1培地で初代培養すると，均一な立方形細胞の増殖が認められ（c, x 200)，confluentの状態まで均一な立方形細胞が維持されている(d, x 200)．46歳女性の顎下腺組

織より得られた継代5代目の培養細胞（e, x 200）や79歳男性より得られた継代3代目の顎下腺細胞も同一所見を示した（f, x 200）.

図3：立方形細胞の増殖に対するホルモン，成長因子の影響

無血清9:1培地に浮遊させた5 x 10^4個の細胞を11.3 mm径ウエルに分注し，24時間後培地を無血清9:1基礎培地にINS, DEX, EGFを単独あるいは組合せた培地に交換し，6日間培養した後，生細胞数を算定した.

値は各群3ウエルによる実験の平均値±標準偏差である.

*:非添加群との間に有意差を認めた（$p<0.01$）.

**:非添加群との間に有意差を認めた（$p< 0.001$）.

A：基礎培地に1 μg/ml INS, 10^{-6} M DEX, 10 ng/ml EGFを単独あるいは組合せて6日間培養した後の生細胞数．単独添加ではEGF添加により強い増殖促進効果が認められ，またINS, DEXの順に増殖促進の傾向が認められる．2成分の組合せ添

加ではINSとEGFの相加作用が認められる．また3つの成分の添加によって顎下腺由来立方形細胞の増殖が最もよく増殖促進されることがわかる．

B：10^{-6} M DEX，10 ng/ml EGFを含む基礎培地に種々の濃度のINSを添加した培地で培養した後の生細胞数．1 μg/ml INSで最も細胞が増殖している．

C：1 μg/ml INS，10 ng/ml EGFを含む基礎培地に種々の濃度のDEXを添加した培地で培養した後の生細胞数．10^{-6} M DEXで最も細胞が増殖している．

D：1 μg/ml INS，10^{-6} M DEXを含む基礎培地に種々の濃度のEGFを添加した培地で培養した後の生細胞数．EGFは顎下腺由来立方形細胞の増殖に対して強く影響を与え，その増殖は濃度依存性に促進され，細胞は10 ng/ml EGFで最も高い増殖を示した．

実験には継代3代目の培養細胞を用いたが，他の組織より得た顎下腺細胞や異なった継代数の培養細胞でも同様の所見が得られた．

図４：顎下腺由来立方形細胞の免疫細胞化学染色的所見

立方形細胞はKer(a), Vim(b), SMA(c)陽性で抗Ⅳ-Col抗体で細胞質が染色された(d). 一方, EMA(e)やAmy(f)は陰性所見を示した（a～f, x 200）. 実験には継代２～４代目の培養細胞を用いた.

図５：顎下腺由来立方形細胞の超微形態

立方形細胞は中央に核を有し, 細胞質に小量のtonofilament(矢印)と発達に乏しい細胞内小器官を持つ未分化な形態を示す. 細胞間にdesmosomeを認めない（x 4800）. 継代３代目の細胞を実験に用いた.

図６：無血清9:1培地で多層になった培養細胞の形態所見

位相差顕微鏡で立方形細胞単層上で多層になった大きな扁平細胞の存在を示している（a）. 扁平細胞は抗Ker抗体(b)と抗EMA抗体(c)によって強

く染色された（a～c, x 200）．多層になった細胞をシャーレ面に対して垂直方向に切片を作成すると，細胞は扁平形態を示し，細胞質には多数のtonofilament（矢印）が見られ，細胞の扁平化やtonofilamentの量は上層へ移行するにつれて著明となっている(d, x 4500)．実験には継代３～５代目の培養細胞を用いた．

図７：顎下腺未分化立方形細胞の増殖に対するCa^{++}濃度の影響

５ x 10^4個の継代３代目の細胞を種々の濃度の$CaCl_2$を添加した無血清9:1培地で６日間培養した後の生細胞数を算定した．立方形細胞はCa^{++}濃度の上昇に伴い増殖傾向を示し，1.015 mMで最も高い増殖能を示した．同じCa^{++}濃度である 無血清1:1培地で培養するとさらに増殖能が高いことがわかる．

値は各群３ウエルによる実験の平均値±標準偏差を示す．

*:Ca^{++}濃度0.227 mMでの培地との間に有意差を

認めた（$p < 0.05$）.

**:無血清1:1培地と無血清9:1培地との間に有意差を認めた（$p < 0.01$）.

図８：無血清1:1培地での顎下腺培養細胞の形態変化

培地交換後、１週間目の培養細胞の位相差像は細胞が一列に並び，樹枝状あるいは乳頭状構造をとりながら増殖していることを示している（a，x 200）.

同細胞の超微構造は比較的発達した細胞内小器官やmicrovilli(矢印）と細胞間のdesmosome(▲）を示している（b，x 4800）. 細胞は継代３代目の培養細胞を用いた.

図９：無血清1:1培地で一列に増殖した細胞の免疫細胞化学的所見

一列に増殖した細胞はKer(a)，Vim(b)，SMA(c)，Ⅳ-Col(d)陽性でEMA(e)をも細胞質に発現している．一方，Amy(f)は陰性所見を示した（a～f，x

200）．細胞は継代３～５代目の培養細胞を用いた．

図１０：無血清1:1培地で長期培養を続けた細胞の形態所見

培養細胞の位相差像は密に増殖した部位で細胞が重層していることを示している（a, x 100）．超微構造はよく発達した細胞内小器官と分泌顆粒（☆）を持つ腺房細胞構造を示している（b, x 4800）．さらに１ヵ月以上の培養によって形成されたドームのマクロ像（c, x 6）．ドームの垂直断面切片の抗Amy抗体による免疫染色によって内層の細胞が染色されている（d, x 80）．実験には継代３～５代目の培養細胞を用いた．

図１１：無血清1:1培地で継代培養した結果，出現した筋上皮様細胞

継代６代目の培養細胞の位相差像は立方形細胞と紡錘形細胞とが混在し(a)，同細胞の継代７代目の位相差像は紡錘形細胞が有意となり，紡錘形

細胞は大きくなり細胞質に線維を認める(b). 紡錘形細胞の細胞質にはKer線維（c), Vim線維（d), SMA線維（e)を認める（a～e, x 200）.

図１２：未分化立方形細胞の増殖に対する抗EGF抗体の影響

A：5 x 10^4個の継代４代目の細胞を分注し２日間培養後，培地をEGF無添加の無血清 9:1培地に交換し24時間培養した．この時点での細胞数は8.8 x 10^4個であった．この培地を無血清9:1培地(a)，無血清9:1培地に 0.1 μg/mlの抗 EGFモノクローナル抗体を添加した培地(b)，EGF無添加の無血清9:1培地(c)，EGF無添加の無血清9:1培地に抗EGFモノクローナル抗体を0.1 μg/ml添加した培地(d)で４日間培養した後の生細胞数を算定した．抗EGFモノクローナル抗体(b)は細胞の増殖を抑制する傾向を示し，その増殖はEGF無添加時(c)の増殖と同程度であることより，外因性の 10 ng/ml EGFによる細胞増殖作用が0.1 μg/mlの 抗EGFモノクローナル抗体によって中和されること

が示唆された．EGF無添加培地に同量の抗EGFモノクローナル抗体を添加すると細胞はほとんど増殖しなかった(d)．

B： 抗EGFモノクローナル抗体のDNA合成に与える影響．

5 x 10^4個の細胞を分注し4日間培養後，培地に各濃度の抗EGFモノクローナル抗体を添加し24時間培養後，0.5μCi/wellの［メチル-^{3}H］チミジンで3時間パルスラベルを行った．［メチル-^{3}H］チミジン取り込み量は対照培養液での取り込み量を100％とした割合で示されている．抗EGFモノクローナル抗体濃度依存性に培養細胞のDNA合成は抑制されている．

値は各群3ウエルによる実験の平均値±標準偏差を示す．

*:1 μg/mlの抗EGFモノクローナル抗体添加群と非添加群に有意差を認めた($p < 0.01$)．

図13：未分化立方形細胞の EGF-RのScatchard解析

未分化立方形細胞は高親和性と低親和性の２種の受容体を持ち，解離定数 Kd は高親和性 5.6 x 10^{-10} M，低親和性 2.9 x 10^{-9} Mで，受容体数はそれぞれ細胞当り2.3 x 10^{5} 個と8.4 x 10^{5} 個である．非特異的結合は添加した[^{125}I]EGFの１％未満であった。

図１４：培養細胞のEGF-R合成能の分析

細胞を 50 μCi/mlの[^{35}S]メチオニンでラベルし，抗EGF-Rモノクローナル抗体で免疫沈降した後，SDS-PAGEに展開し，フルオログラフィーを行った．

A 431細胞(lane A,B)は10 %FBS添加DMEMで，継代５代目の未分化立方形細胞(lane C,D)は無血清9:1培地で，継代６代目の紡錘形の筋上皮様細胞(lane E,F)は無血清1:1培地でそれぞれ培養した．lane A,C,Eは10 ng/mlのEGFを添加した培地，また，lane B,D,FはEGF無添加の培地で24時間培養した後のEGF-R合成能を示す．

A 431細胞は，170 kDのEGF-Rと93 kDのEGF-R前駆

体の合成能を持ち(lane A), EGF無添加の培地(laneB)と比較して分子量170kDのEGF-Rの合成量が少なく，添加したEGFによるEGF-R合成の down regulationを示している．未分化立方形細胞もA 431細胞と同様，170 kDのEGF-Rの合成を認め(lane C)，EGF添加によるEGF-R合成のdown regulationを認める．紡錘形に分化した筋上皮様細胞はEGF無添加時(lane E)のみわずかにEGF-Rの合成を示し，添加時(lane F)では認めない．

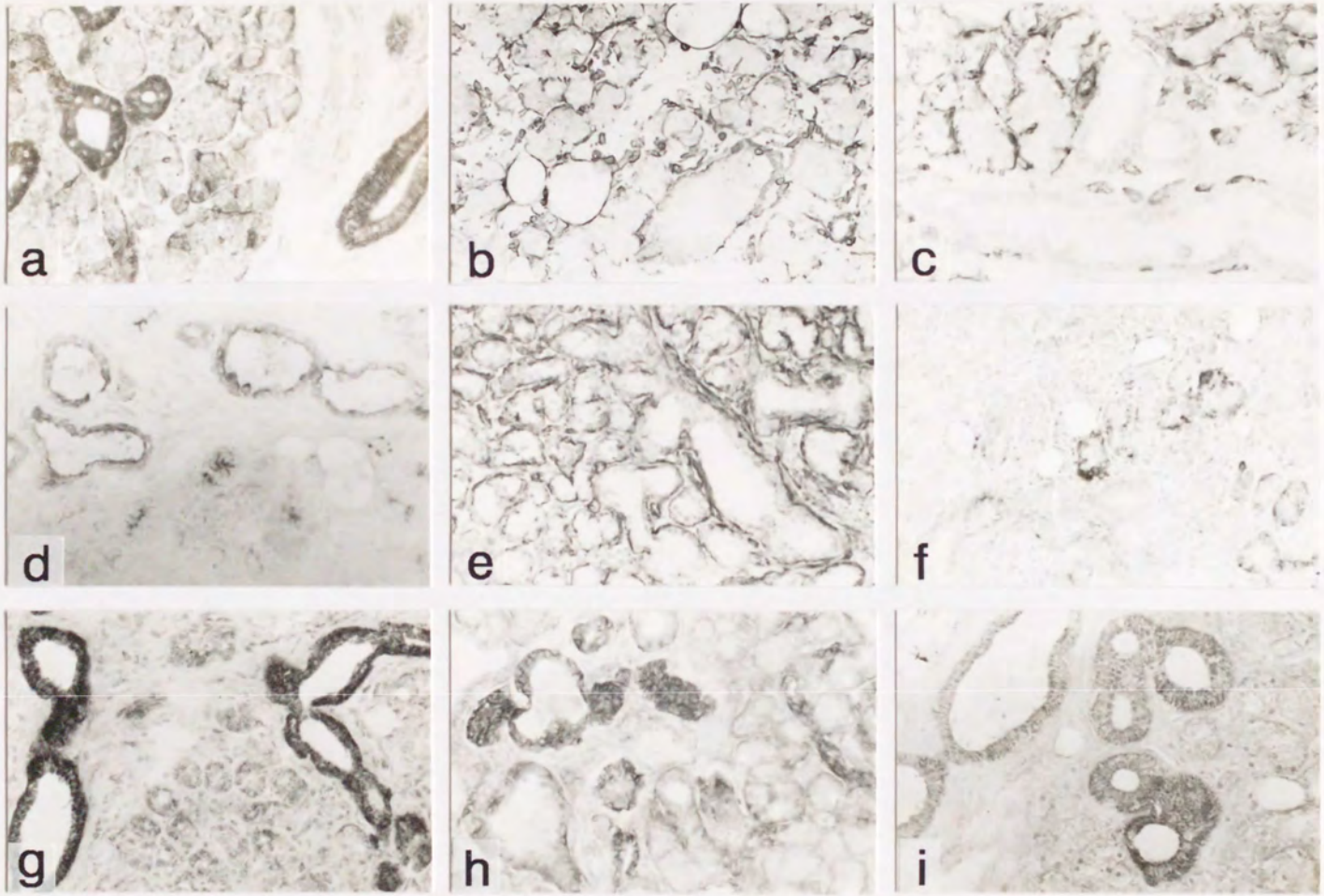


図1

図2

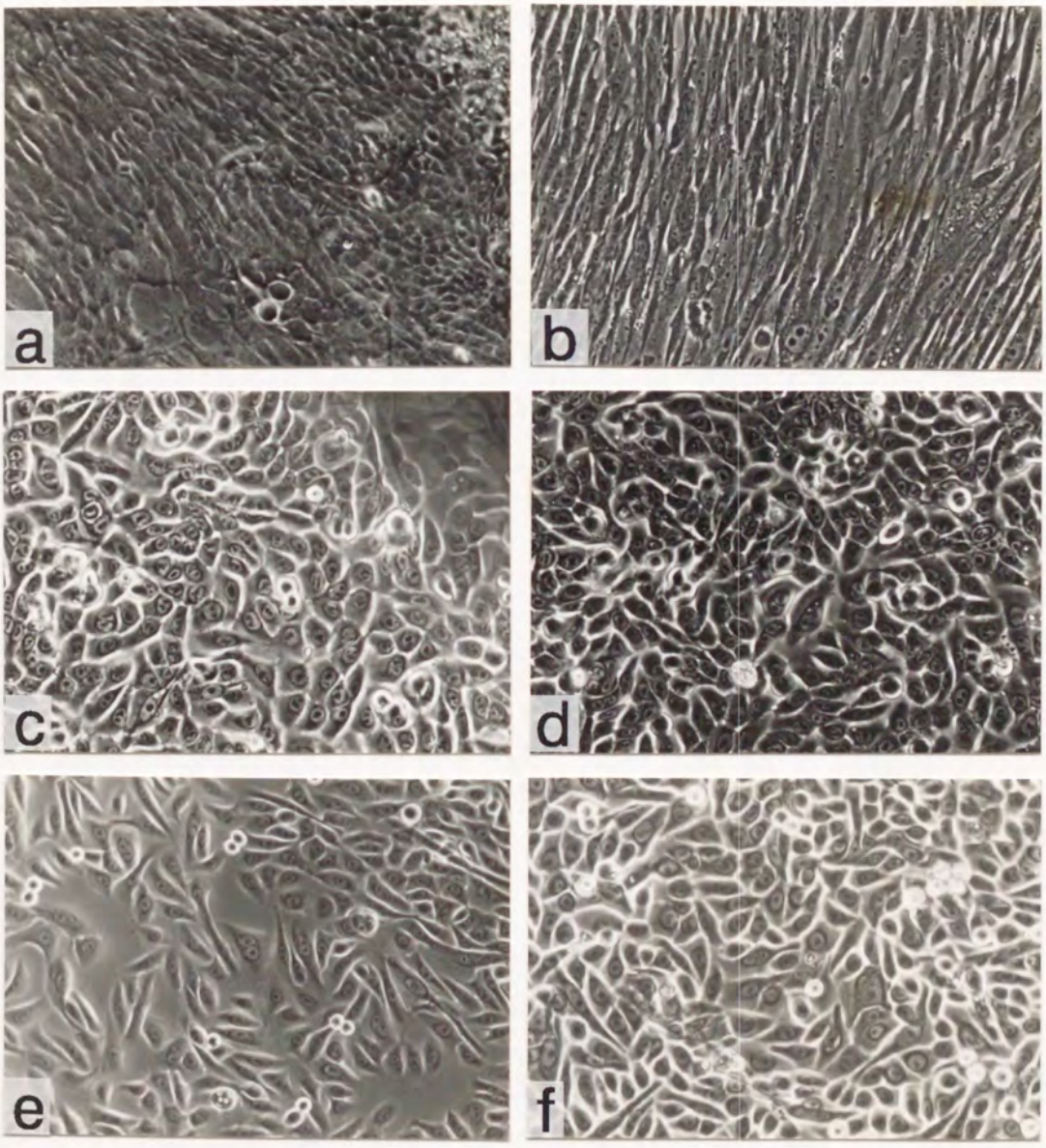


図3

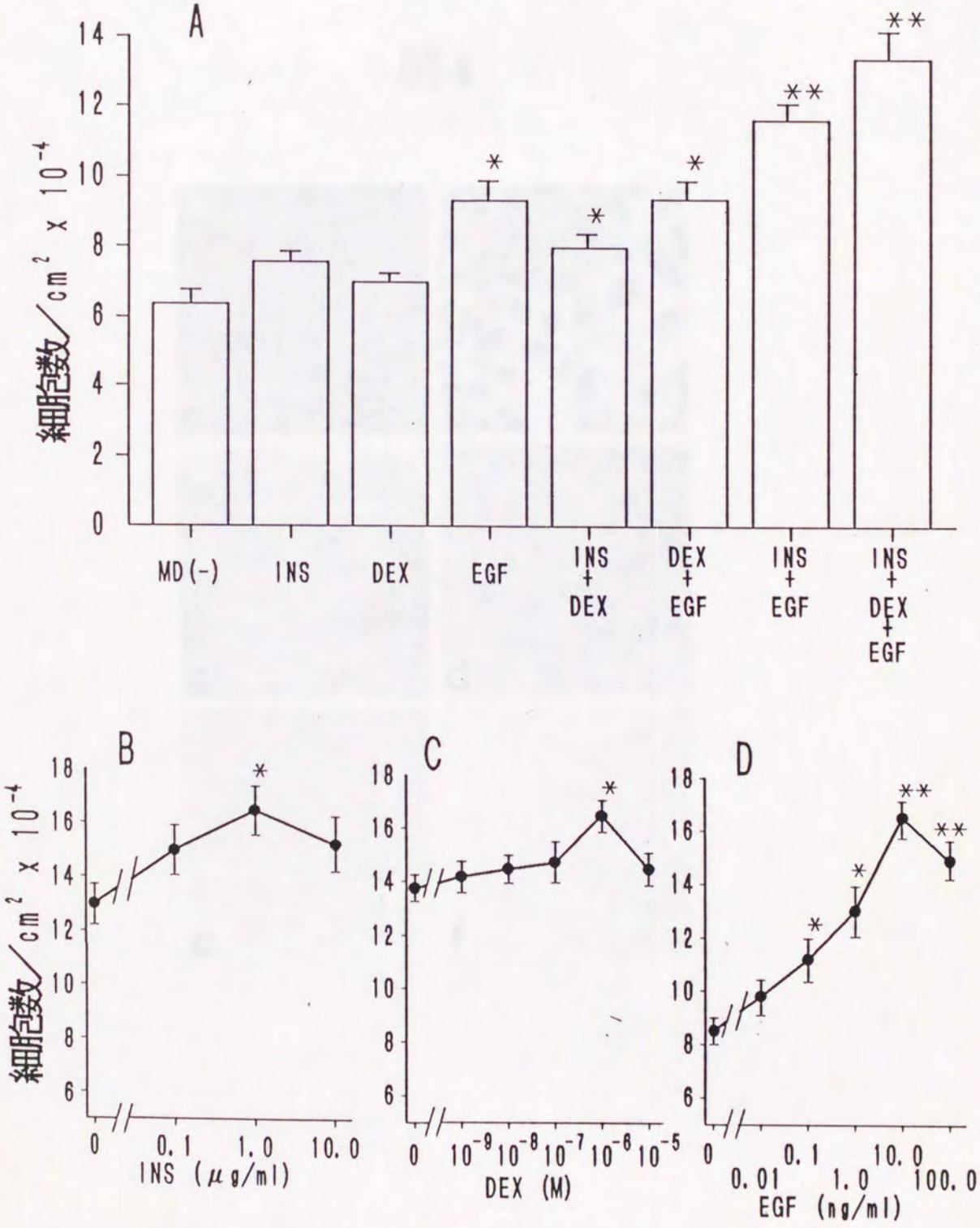
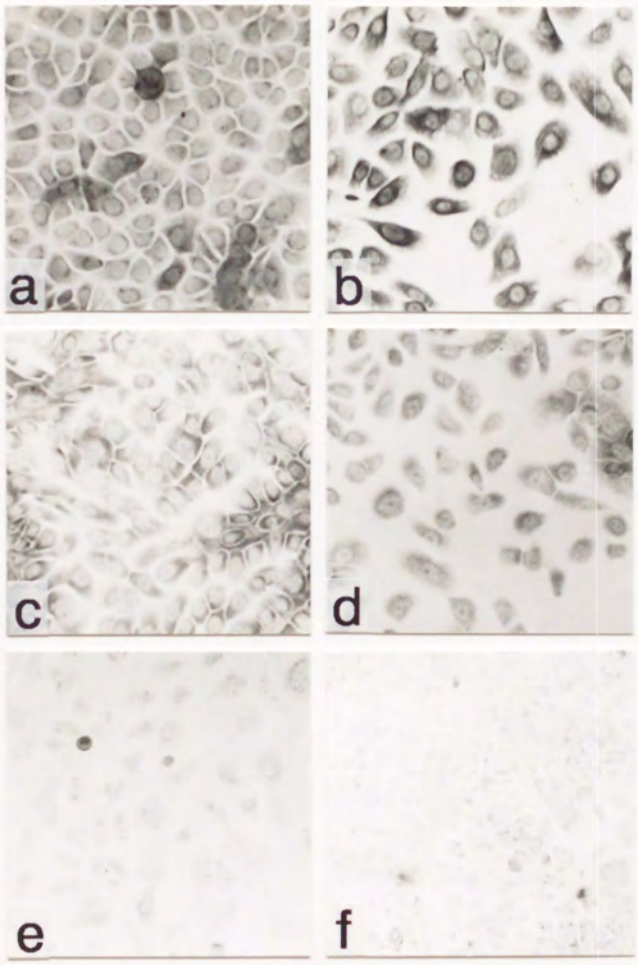

A
細胞数／cm² x 10⁻⁴
MD(-)
INS
DEX
EGF
INS + DEX
DEX + EGF
INS + EGF
INS + DEX + EGF
B
INS (μg/ml)
C
DEX (M)
D
EGF (ng/ml)

図4



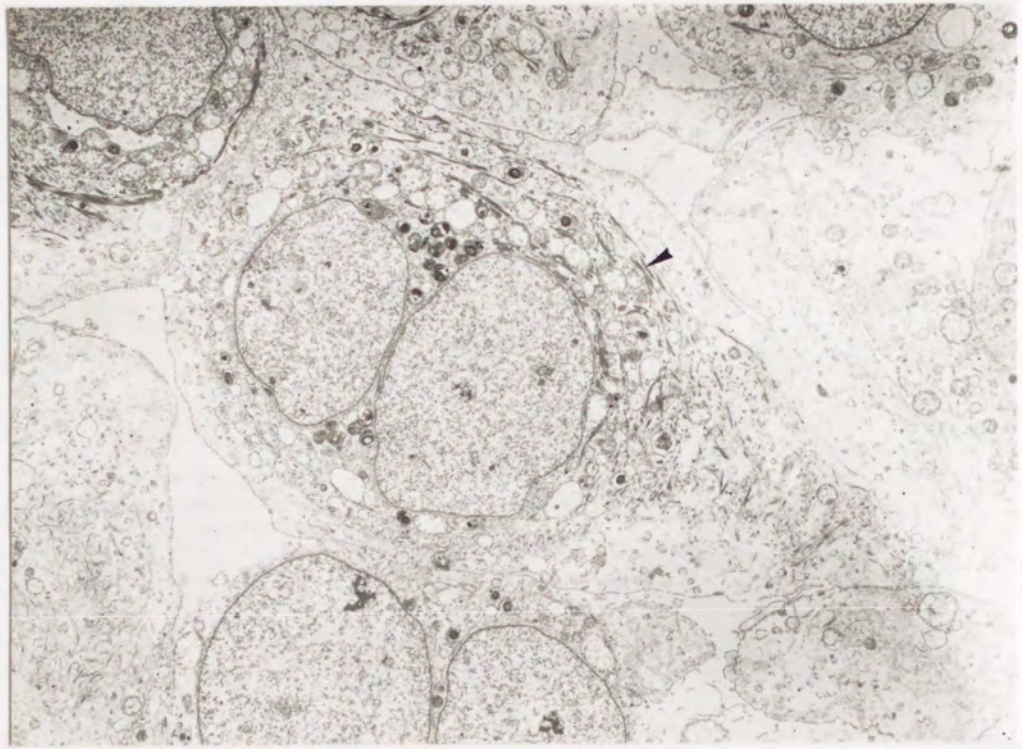


図5

図6

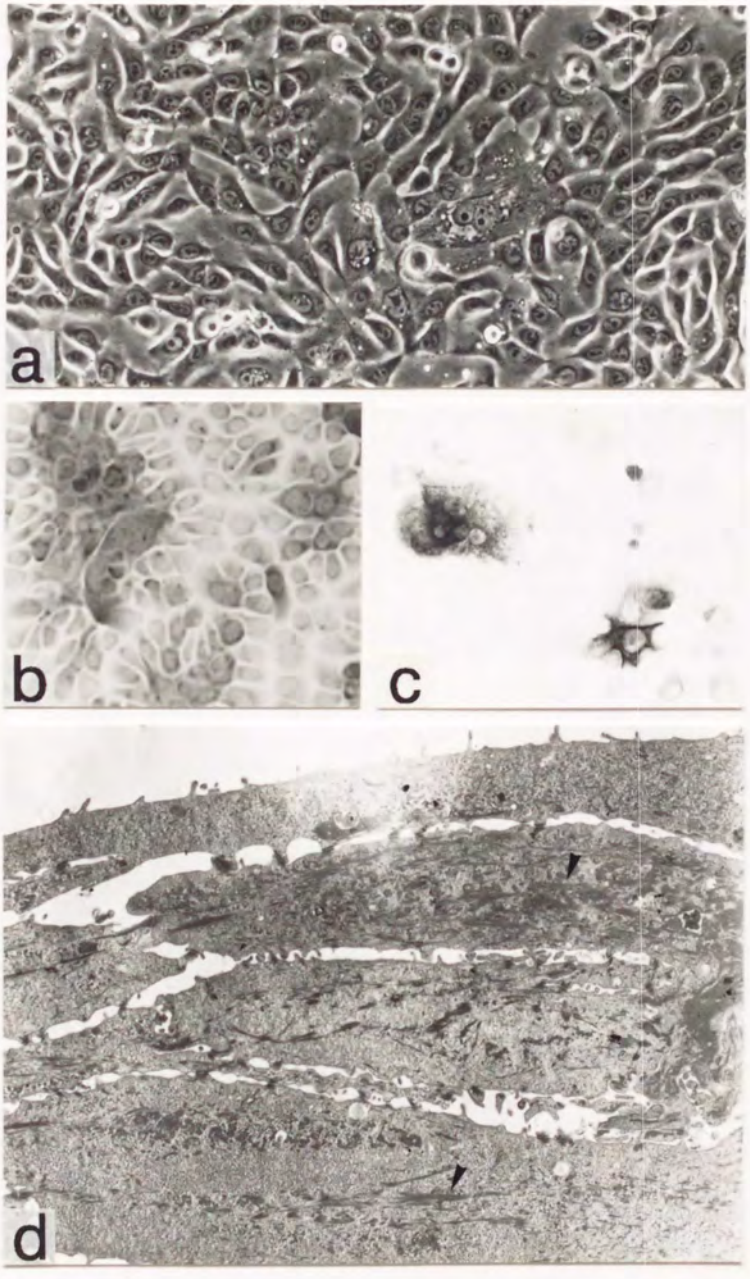


図7

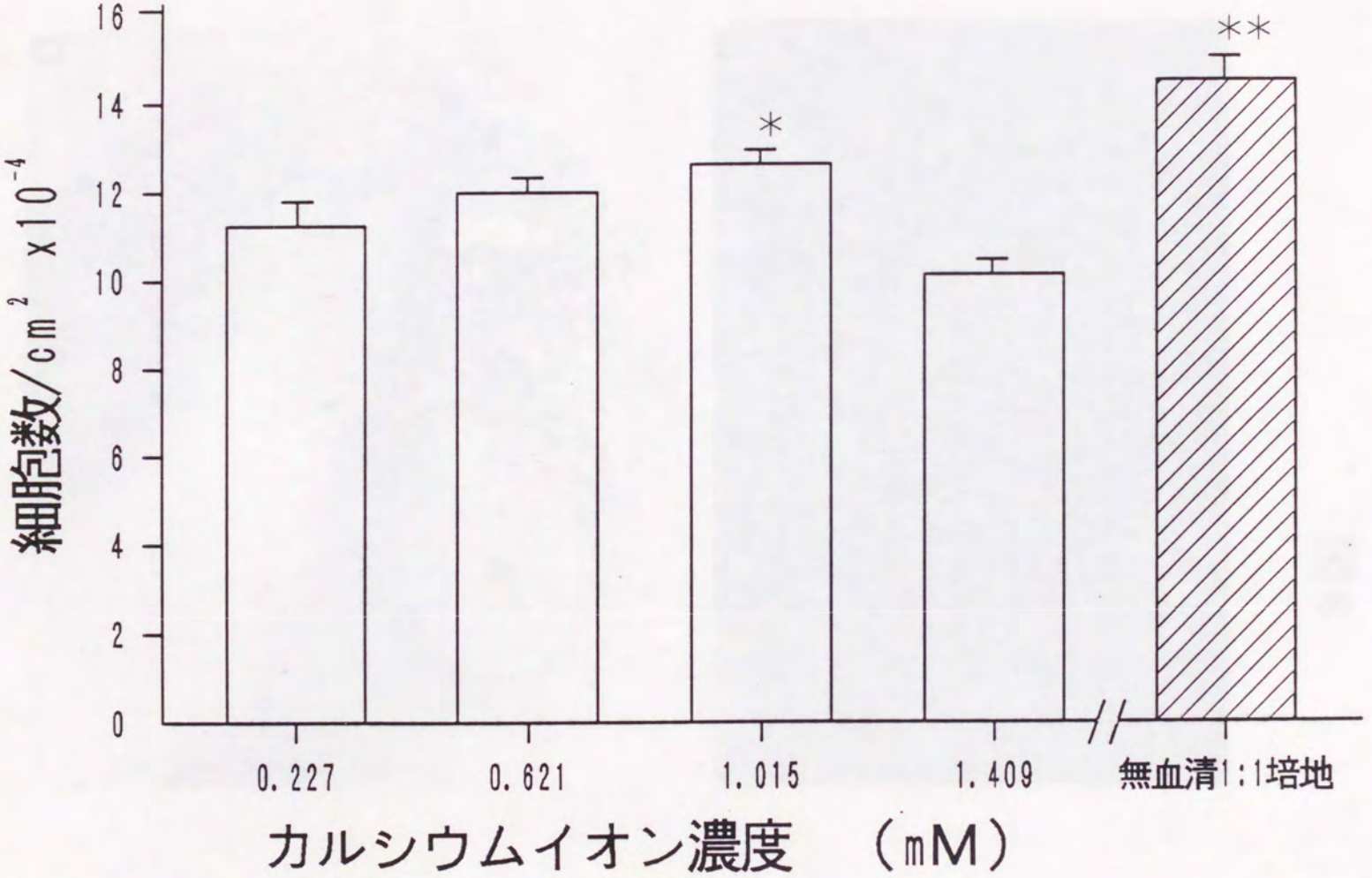

細胞数/cm² x10⁻⁴
16
14
12
10
8
6
4
2
0
*
**
0.227
0.621
1.015
1.409
無血清1:1培地
カルシウムイオン濃度 （mM）

図8

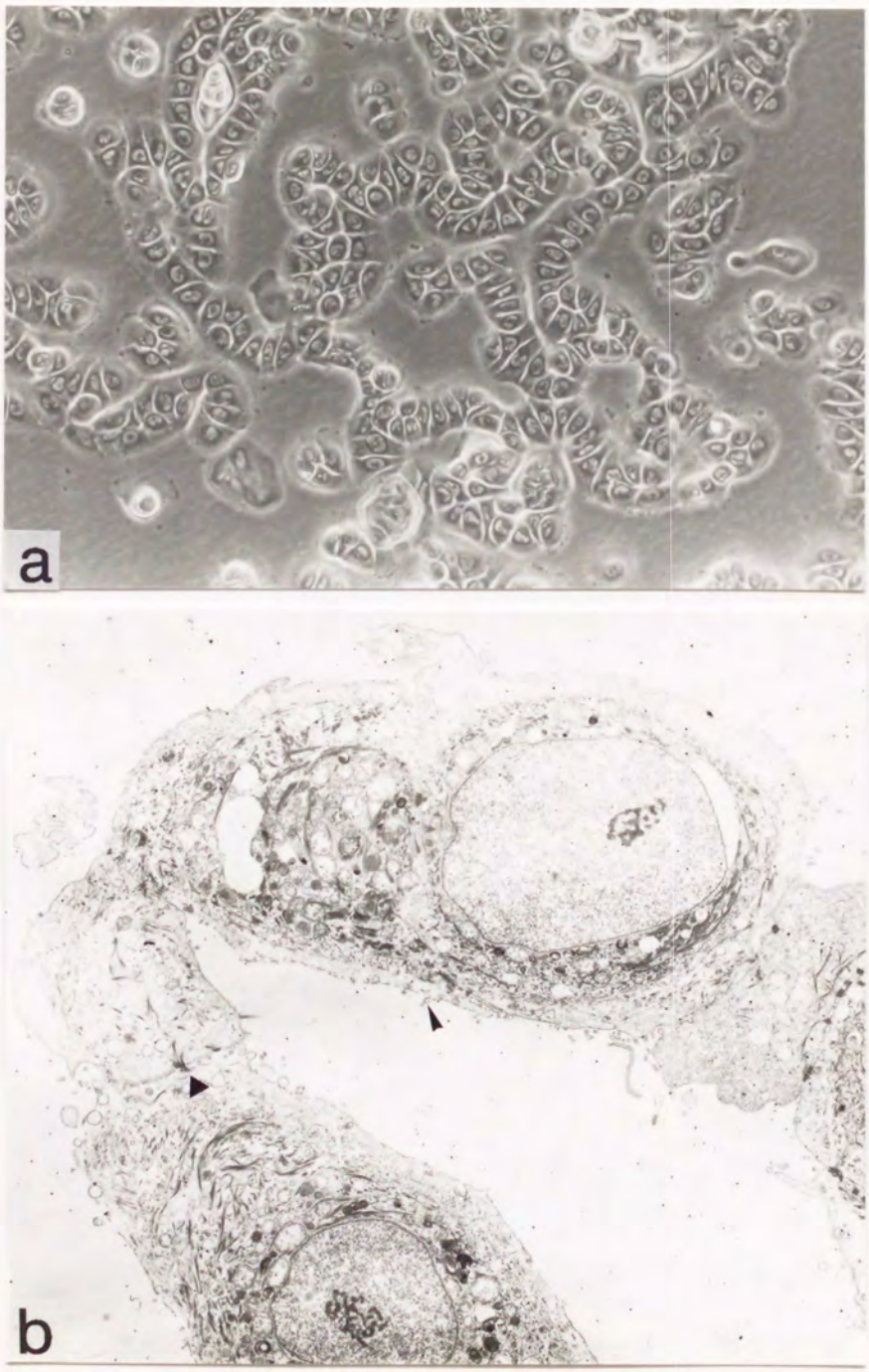


図9

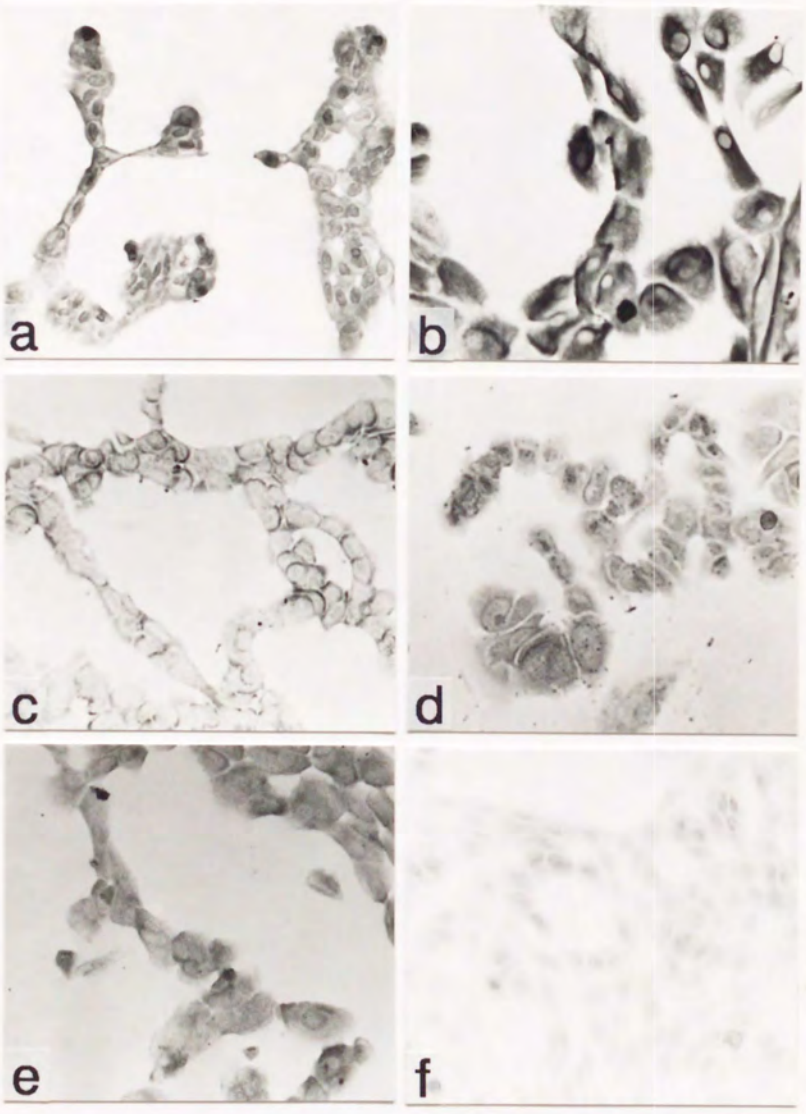


図１０

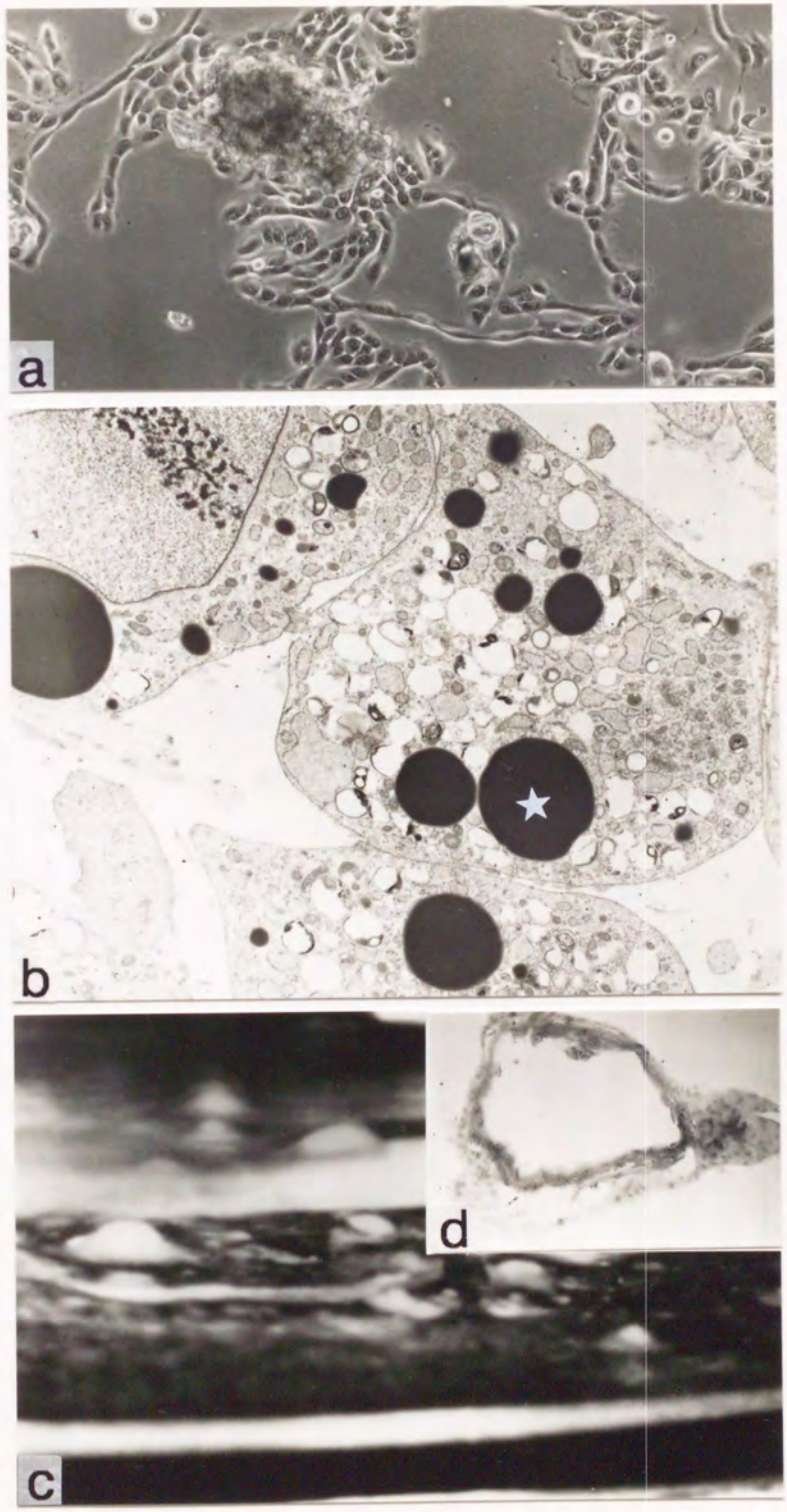


図１１

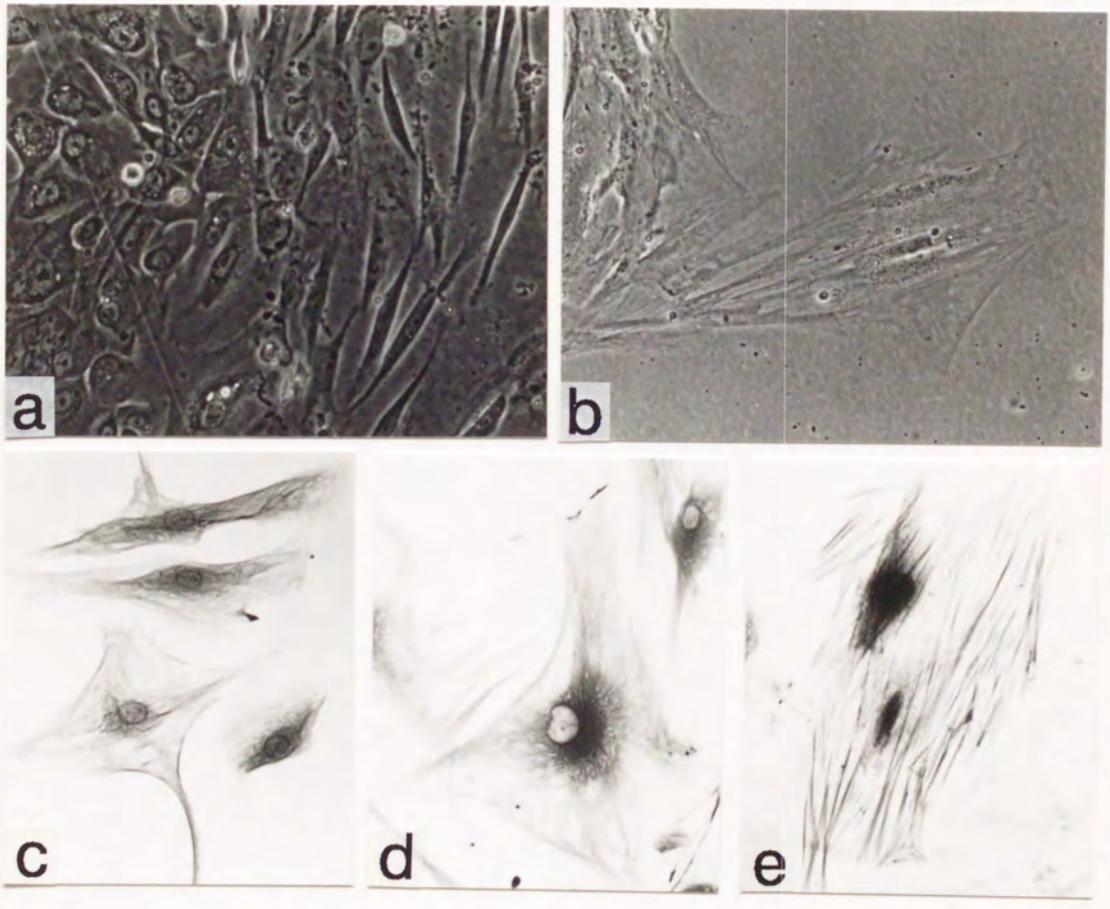


図１２

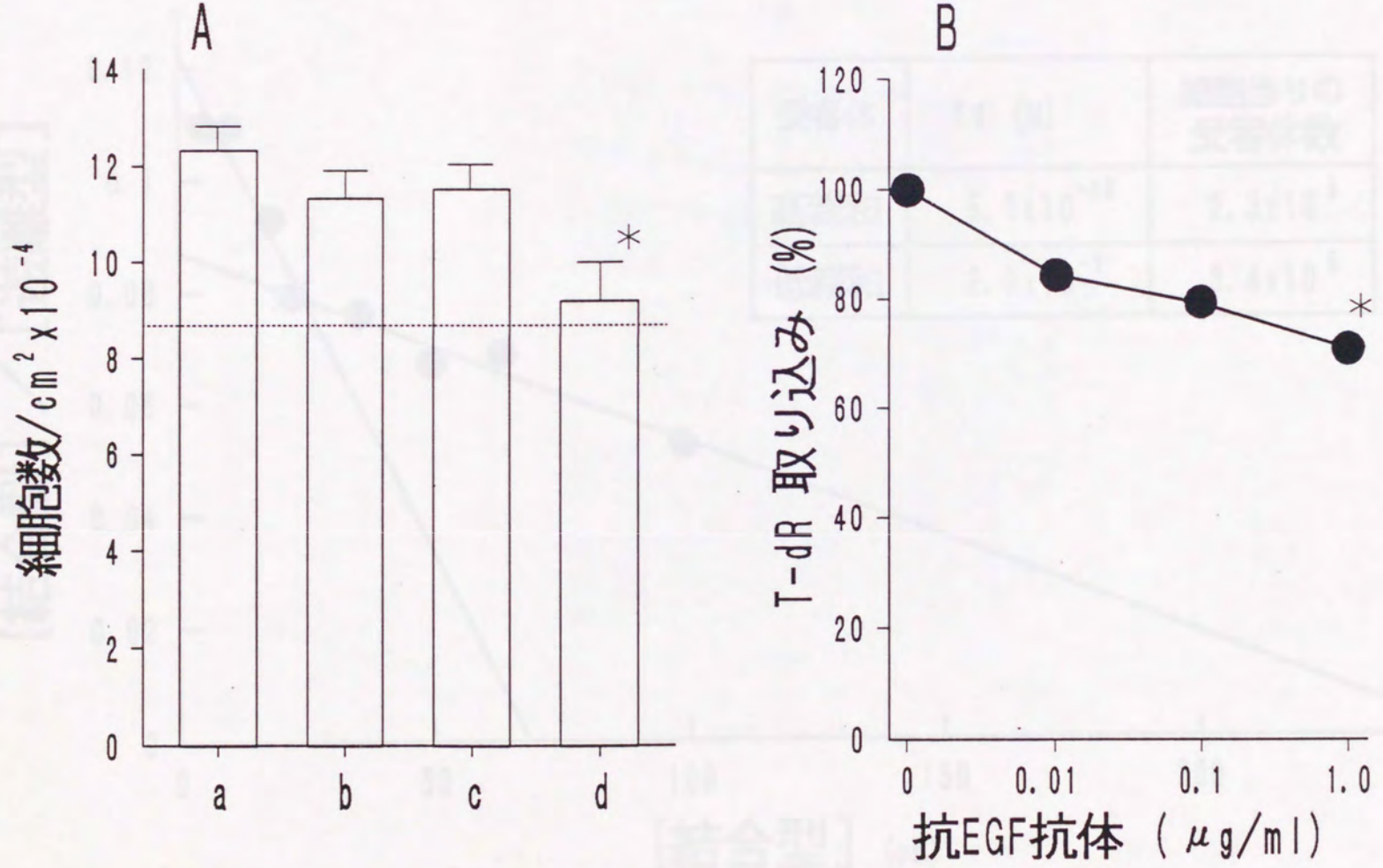
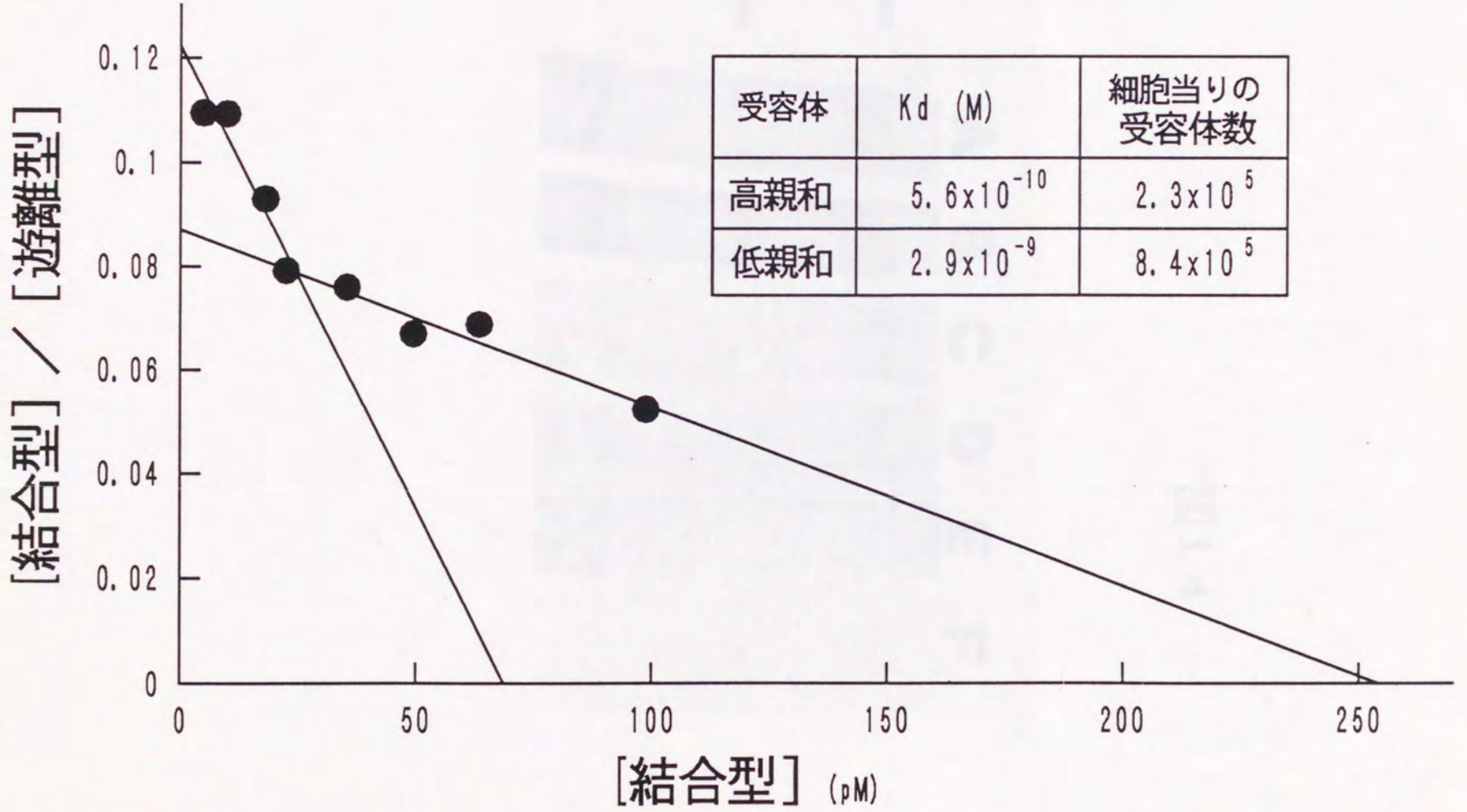

A
細胞数/cm^2 x10^{-4}
14
12
10
8
6
4
2
0
a
b
c
d
*
B
T-dR 取り込み (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
0.01
0.1
1.0
抗EGF抗体 (μg/ml)
*

図１３



受容体	Kd (M)	細胞当りの受容体数
高親和	5.6×10^{-10}	2.3×10^{5}
低親和	2.9×10^{-9}	8.4×10^{5}

図１４

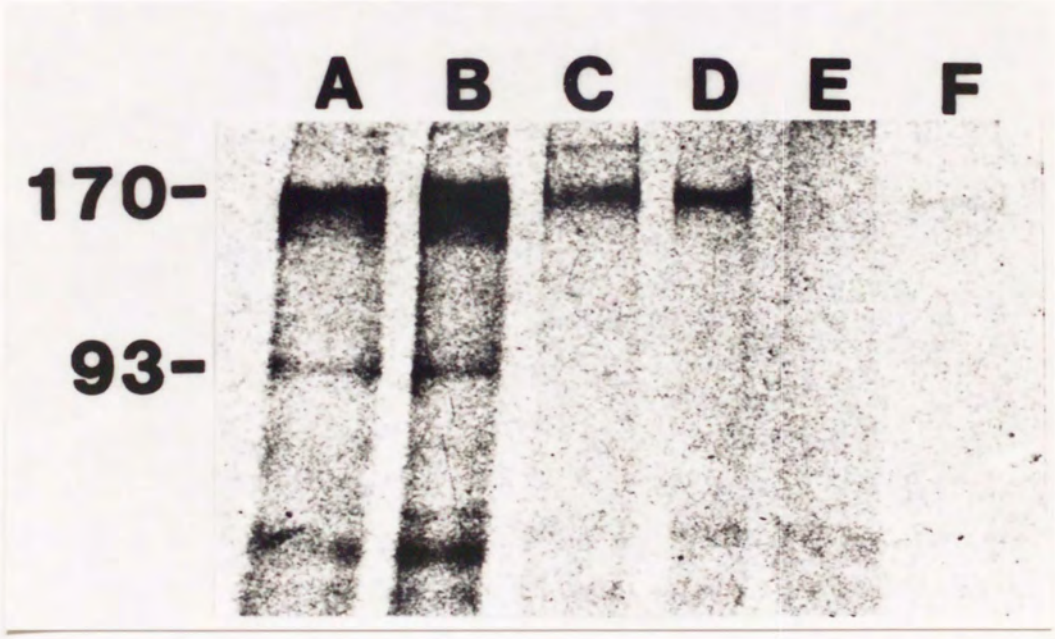


表1：本研究で用いた抗体

抗体	抗原の由来	希釈倍率	参考文献
抗Kerウサギポリクローナル抗体	ヒト上皮 (M.W. 56 kD and 64 kD keratins)	1:3000	3,11)
抗IV-Colウサギポリクローナル抗体	ヒトIV型コラーゲン	1:3000	11)
抗Amyウサギポリクローナル抗体	ヒト唾液アミラーゼ	1:2000	12)
抗Vimマウスモノクローナル抗体	vimentin (M.W. 57 kD)	1: 500	11,13,14)
抗SMAマウスモノクローナル抗体	α-smooth muscle actin (single iso-form α-actin)	1:2000	15～19)
抗EMAマウスモノクローナル抗体	human milk fat glouble membrane (human epithelial membrane antigen)	1: 600	20～23)
抗EGFマウスモノクローナル抗体	epidermal growth factor (M.W. 6045)	1: 200	24)
抗EGF-Rマウスモノクローナル抗体	epidermal growth factor receptor (M.W. 170 kD)	1: 300	25)
Ki-67 *	human proliferating cells	1: 50	14,26)

*：Ki-67は増殖中のヒト細胞、すなわちG1後期及びS,G2,M期にあるヒト細胞に特異性のある抗体である。

表２：各種特異抗原の顎下腺組織における局在

抗体	主導管細胞		線条部導管細胞	介在部導管細胞	腺房細胞		筋上皮細胞
	基底細胞	管腔側細胞			粘液細胞	漿液細胞	
抗Ker	＋	＋	＋	＋	－	－	＋
抗Vim	＋	－	－	－	－	－	＋
抗SMA	＋	－	－	－	－	－	＋
抗Ⅳ-Col	基底膜に特異染色						
抗EMA	－	＋	＋	±	＋	－	－
抗Amy	－	－	－	－	－	＋	－
抗EGF	＋	＋	±	±	±	±	－
抗EGF-R	＋	－	－	＋	－	－	－
Ki-67	＋	＋	－	－	－	－	－

＋：強陽性、±：弱陽性、－：陰性を示す。