

Title	培養細胞におよぼすアクチノマイシンの影響に関する研究
Author(s)	奥平, 美奈子
Citation	大阪大学, 1965, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28739
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	奥 平 美 奈 子 おおく だいら み な こ
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 6 7 9 号
学位授与の日付	昭 和 40 年 3 月 26 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 外 科 系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	培養細胞におよぼすアクチノマイシンの影響に関する研究 (主査) (副査)
論文審査委員	教 授 足 高 善 雄 教 授 川 俣 順 一 教 授 加 藤 四 郎

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

アクチノマイシン (AcM) は制癌作用のみならず、強い発癌作用をもつ興味あるペプチド抗生物質である。ことに AcM が DNA と特異的に結合することを川俣らが報告して以来、その生化学的な作用機構についての研究は急速に展開された。しかし、細胞内における AcM の分布、ことに核の DNA との相互作用を形態学的に明らかにした報告は未だみられない。そこで、著者は ^3H で標識した AcM (^3H -AcM) を用いて培養細胞内における AcM の細胞内分布、ならびに、AcM 作用下の細胞の形態学的変化をも明らかにしようとした。

〔実験方法ならびに実験成績〕

培養細胞としてヒト正常卵管由来の TG-C1-33 を用いた。培養液はこうし血清 3.75% 馬血清 3.75%、ジヒドロストربتマイシン硫酸塩、ペニシリンGナトリウムを加えた Eagle HeLa 培地である。AcM は S_3 を用いた。

(1) 細胞形態に及ぼす AcM S_3 の影響

細胞分散後 4 日目の TG 細胞に 37°C の温浴中で $0.001 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の AcM S_3 を一定時間作用せしめた後、常法に従いメタノール固定、ギムザ染色を行なって観察した。

$1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では 5 分間の作用ですでに核小体の変化、すなわち、その萎縮、変形、染色性の低下が明らかに認められ、さらに核質の粗鬆化、細胞質中の空胞出現が認められた。

$0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ では 15 分間、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ では 2 時間、 $0.001 \mu\text{g}/\text{ml}$ では 5 時間作用で上記の変化があらわれ始めた。

AcM の分解産物であるアクチノマイシン酸を用いた場合、変化は認められなかった。

(2) 細胞増殖曲線におよぼす AcM S_3 の影響

細胞分散後3日目、対数期増殖を示す TG 細胞に $0.001\mu\text{g/ml} \sim 10\mu\text{g/ml}$ の ACMS₃ を作用せしめ、その後5日間、その増殖状態を核数計算法によって観察した。 $0.01\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では増殖は作用後完全に抑制された。 $0.001\mu\text{g/ml}$ では段階的な特異な曲線を示した。

薬剤の作用時間を15分間のみにして、すぐに洗滌して薬剤をふくまない培地で培養を再び続けた場合は、 $1\mu\text{g/ml}$ では完全に増殖は抑制されたが、 $0.01\mu\text{g/ml}$ 、 $0.1\mu\text{g/ml}$ ではその抑制の程度は僅かとなり、 $0.001\mu\text{g/ml}$ では対照と変らぬ増殖曲線を示した。

(3) 3H-AcM を作用せしめた細胞のオートラジオグラフィによる観察

3H-AcM S の試料は、ペーパークロマトグラフィにより、単一な放射性活性部分を AcM に一致して示し、その比放射能が $30\mu\text{c/mM}$ のものを用いた。オートラジオグラフィは Kodak の乳剤 NTB 2 を使用、浸漬法により露出期間は通常2週間とし、現像後ギームザ染色を行なって観察した。

(i) 3H-AcM を $20\mu\text{g/ml}$ 、 37°C で作用し、経時的に観察すると、15分、30分間の作用では銀粒子は核ならびに細胞質に一致した部分に僅かに認められたが、60分、120分間の作用では核上に銀粒子の増加が認められた。無作為に選んだ100個の細胞について、核および細胞質に一致する部分の銀粒子を数え、その分布を経時的に観察すると、この傾向はさらに確認された。100個の細胞の核部分の銀粒子数の平均は、15分、30分、60分、120分間作用の場合について、それぞれ、4.0個、7.9個、13.5個、22.5個と漸次増加した。それに対して細胞質部分のそれは、それぞれ、2.0個、4.7個、2.3個、5.3個と時間の経過とは無関係に常に低値を示した。

(ii) 4°C で 3H-AcM を作用した場合には核、細胞質いずれの部分にも銀粒子の出現は認められなかった。

(iii) 3H-アクチノマイシン酸の作用では、銀粒子を核、細胞質部分に認めなかった。

(iv) $20\mu\text{g/ml}$ を 37°C で2時間作用、洗滌、メタノール固定した後、 1mg/ml のリボヌクレアーゼを 40°C で4時間、または $50\mu\text{g/ml}$ のデオキシリボヌクレアーゼを 37°C で24時間作用すると、リボヌクレアーゼの場合には銀粒子の現われ方に変化はなかったが、デオキシリボヌクレアーゼの場合には銀粒子はほとんど認めなかった。

〔総括〕

(1) AcM S₃ は増殖しつつある培養細胞の核小体に、萎縮、変形、染色性の低下などの形態学的変化をもたらした。

(2) 3H-AcM 作用後のオートラジオグラフィの観察により、核に一致した部分に銀粒子が集まり、これがリボヌクレアーゼによっては変化をうけないのに対し、デオキシリボヌクレアーゼによっては消失することが認められた。

(3) 3H-アクチノマイシン酸のような不活性化したアクチノマイシンによっては形態学的な変化も銀粒子の出現も認められなかった。

以上の結果は AcM が細胞内にとりこまれた際、核の DNA と特異的に結合することを生化学的に証明されたと同様に、形態学的にも証明したものと見えるであろう。

論文の審査結果の要旨

制癌抗生物質であるアクチノマイシン (AcMと略す) はデオキシリボ核酸 (DNAと略す) と特異的に結合して、その結果細胞の DNA 依存性リボ核酸の合成を阻害する。このことが明らかにされて以来、本物質の作用機序に関する生化学的研究は著しく展開された。AcM は現在ひろく生物学的領域における細胞の制御機構の研究に用いられている。

本研究はこのように重要な物質の細胞内における作用点を細胞の微細構造と関連づけて明らかにすることを目的としてオートラジオグラフィーを用いて行なったものである。

AcMS³ をトリチウム (3H) で標識することに成功したが、さらに今まで困難とされていた非特異的放射活性物質の混在を除去する手段として AcM と DNA を結合させることによって精製する方法を考案して純粋な 3H-AcM を調製することができた。

このようにして精製した 3H-AcM をヒト正常卵管由来の培養細胞 TG-C1-33 に作用させて、その細胞内分布をオートラジオグラフィーによって詳細に研究した。

その結果 3H-AcM を作用させて 15 分後にはすでに銀粒子は細胞内に認められ、時間の経過とともにその数は増加して 2 時間後には非常に興味のある分布を示すことが明らかになった。すなわち細胞核に一致する部分に認められる銀粒子の数は時間の経過とともに逐次増大したが、これに反して細胞質に一致する部分に認められる銀粒子の数には何らの変化も認められなかった 3H-AcM を作用した後細胞を固定して、これに核酸分解酵素を作用させるとデオキシリボヌクレアーゼを作用させた場合には核内の銀粒子はことごとく消失するのに反して、リボヌクレアーゼを作用させた場合には何らの変化も認められなかった。また 3H-AcMS₃ 酸を作用させた場合には細胞内に銀粒子を認めることができなかった。

以上のように本研究は AcM という興味のある重要な抗生物質の細胞内における結合部位を明かにしたものである。これは AcM の作用機序として従来生化学的に述べられていた事実を独創的な方法によって極めて明快に形態学的に証明したものであって医学、生物学領域における細胞制御の研究に貢献する重要な論文と考えられる。