

Title	HVJによる動物細胞の雑種に関する基礎的研究
Author(s)	山中, 忠
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/29678">http://hdl.handle.net/11094/29678</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名・(本籍)	山 中 忠 やま なか ただし
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 6 5 8 号
学位授与の日付	昭 和 4 4 年 3 月 2 8 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 病 理 系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	<b>HVJ による動物細胞の雑種に関する基礎的研究</b>
論文審査委員	(主査) 教 授 深井孝之助 (副査) 教 授 釜洞醇太郎 教 授 加藤 四郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

1957年岡田等によってHVJ (Hemagglutinating Virus of Japan) による細胞融合現象が報告され、主にこの現象の解析が行われ、その間異種の動物細胞相互の融合も可能である事が明らかになった。最近細胞の雑種に関する研究が盛んになり、融合細胞の代謝の pattern の変化及び細胞分裂の検討が必要となった。この研究ではその基本となる同種融合細胞を培養して DNA 合成及び細胞分裂の分析を行ってその細胞調節機構を明らかにしようとしたものである。

#### 〔方法ならびに成績〕

口底癌由来の KB 株細胞を用いて紫外線照射した HVJ により 3 つの方法 (浮遊状, 単層状と浮遊状の組合わせ, 単層状) で細胞融合を行った。 $^3\text{H}$ -チミジンを使った Autoradiography により融合細胞の DNA 合成能および核の DNA 合成期 (S 期) と DNA 合成間期 (G 期) の分布をみた。顕微鏡写真及び染色標本から多核細胞の分裂および progeny 形成を検討した。

1. 融合直後の多核細胞の核の G 期と S 期の分布は,  $^3\text{H}$ -チミジン puls-label で S 期の細胞を label してから融合させて調べた。HVJ 非処理及び処理の 1 核細胞から  $nC_r P^n (1-P)^{n-r}$  の計算式より理論値を求めて観察値と比較した。観察値は理論値によく一致した。即ち細胞世代周期の相に関係なく random に融合することを示す。顕微鏡写真観察より分裂期の細胞も融合することを示した。融合直後には違った相の核を持つ多核細胞が作られる。HVJ 処理細胞の培養は 20% の牛血清を含む Eagle (M.E.M.) 培地で容易で, ガラス面によく固着し,  $^3\text{H}$ -チミジンの長時間 label で 1 核および多核細胞いずれも殆んど全ての核が DNA 合成能を持つことを示した。

2. 融合細胞を培養したのち  $^3\text{H}$ -チミジンの puls-label を行って多核細胞中の核の G 期と S 期の分布をみると, 培養時間と共に理論値からずれ, S 期或は G 期のみの核を持つ細胞が多くなり, 多核

細胞内の核の DNA 合成に関する相の同調化がみられた。この傾向は核数が少ないほど明瞭で、核数が増すに従って不明瞭となりそれに要する時間も長くなる傾向を示した。

3. 融合細胞に過剰チミジンによる同調化を行なってその世代周期をみた。最終濃度 2mM のチミジンを加えて DNA 合成を止め、チミジン除去後の多核細胞の DNA 合成期を時間的に追った。核の G 期と S 期の分布より核数の少ないものでは G ( $G_1$ ) 期から S 期及び S 期から G ( $G_2$ ) 期への進行がみられた。また多核細胞の S 期の核の平均値 (labeling %) は核数の少ないものでは 1 核細胞に近い世代周期を示した。この傾向も核数が増えるに従い不明瞭になる。以上の結果より核数の少ない多核細胞では、融合直後は各々の核の相が違っていても培養中に各々の核の相の同調化が起り、更に正常な世代周期を進み分裂の可能性が考えられた。

4. 最も条件の良いと思われる最少核数の多核細胞即ち 2 核細胞に於いて分裂の観察を行なった。2 核細胞の頻度が多くかつ同調細胞の融合で大体の分裂時間を知るために、寺島法で分裂期の細胞を集めその娘細胞を融合させて 2 核細胞を得た。2 核細胞に於いても 1 核細胞とほぼ同時間、即ち、 $G_1$  期の融合の場合は約 20 時間後、 $G_2$  期の場合は 12 時間以内に分裂期に入り、多くは 2 極分裂を示して親細胞より大きい同大の 2 個の 1 核娘細胞に分れ、1 部は 3 極分裂を示して大小のあったり核数の異なる 2 個又は 3 個の娘細胞に分れた。染色標本の cell colony から分裂頻度をみると、1 核細胞 (HVJ 非処理及び処理) の 1 個から 2 個および 2 個から 4 個に進むのは 50% から 97%、2 核細胞から 2 個の娘細胞へは 79% から 89% を示し 1 分裂目に於いては 1 核細胞とほぼ同頻度を示した。2 分裂目の頻度は 2 核細胞では少し低い様である。2 核細胞由来の progeny は 1 週間後に  $10^{-1}$  以上の頻度で形成され 2 極分裂を示したものから最も多くみられた。その progeny は親細胞より大きく ploidy の高い 1 核細胞からなる。途中で 3 極分裂を示した 2 核細胞からはいろいろな大きさの細胞からなる progeny が形成される。初回分裂までに時間を要したものや 3 極以上等の異常分裂を示したものと及び 3 核以上の細胞は多くは 1 分裂後に変性した。以上の結果は HVJ により核の相の合った 2 核細胞から高頻度に細胞の雑種のとれる可能性を示し、またいろいろな ploidy の細胞の取れる可能性は細胞遺伝学の研究手段として役立つものと思われる。

#### 〔総括〕

1. HVJ による細胞の融合は世代周期の相に関係なく random に起り、分裂期の細胞も融合し違った相の核をもつ多核細胞が生じる。紫外線照射 HVJ で処理した細胞は容易に培養されガラス面によく固着し DNA 合成能は対照と同様に旺盛である。

2. 培養すると融合多核細胞中の核の DNA 合成期が同調化する。更に  $G_1$  期から S 期から  $G_2$  期への移行がみられる。これらの傾向は核数が少ないほど明瞭である。

3. HVJ で融合した 2 核細胞は 1 核細胞とほぼ同時間で分裂期に入り、多くは 2 極分裂から大きい同大の 1 核の 2 娘細胞を生じ、1 部は 3 極その他の異常分裂から大小又は核数の異なる娘細胞を生じる。

4. 娘細胞を HVJ で融合した 2 核細胞は 1 核細胞とほぼ同頻度で分裂し、娘細胞から更に分裂増殖して  $10^{-1}$  以上の頻度で progeny を形成する。2 核細胞由来の progeny は 2 極分裂からが多く、親細胞より大きい ploidy の高い 1 核細胞からなる。途中で 3 極分裂を示したものは色々な大きさの

細胞からなる progeny を生じる。

### 論文の審査結果の要旨

著者は雑種細胞研究の基本型として HVJ ウイルスによる同種融合細胞を作り、その培養課程で世代周期の同調化が起り、略々もとの 1 核細胞と同様に娘細胞に至る条件があることを定量的に示した。この結果は HVJ による細胞融合の新生面を開くと共に、細胞制御機構或は雑種細胞の研究の基礎となり従る貴重なものであると考える。