



Title	培養細胞への定量的物質導入法とその応用
Author(s)	目加田, 英輔
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33153">https://hdl.handle.net/11094/33153</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	自加田 英輔
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5552 号
学位授与の日付	昭和 57 年 3 月 3 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	培養細胞への定量的物質導入法とその応用

論文審査委員	(主査) 教授 岡田 善雄
	(副査) 教授 三輪谷俊夫 教授 深井孝之助

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

生物学的活性のある高分子物質を細胞内へ人為的に導入することは、その物質の細胞内での機能を調べるための一つの有効な手段である。これまで、細胞内への物質導入には、マイクロピペットによる注射法が用いられてきたが、この方法は、培養動物細胞のような小さな細胞には必ずしも適当でない。近年、古沢、山泉らは、赤血球ゴーストを用いて、細胞内に物質を導入する新しい方法を開発した。本研究では、赤血球ゴースト法に、Fluorescence-Activated Cell Sorter(FACS)を組み合わせて、細胞内への定量的導入法の開発を試みた。また、この方法の応用として、ジフテリア毒素フラグメント A の細胞内最小致死分子数の決定を行なった。

#### 〔方法ならびに成績〕

1) 赤血球ゴースト法は、細胞内に入れたい物質を赤血球ゴーストに包み込み、そのゴーストと細胞を HVJ を用いて融合させて、細胞内に物質を導入する方法である。赤血球ゴースト内に包み込まれる物質量は任意にコントロールできるので、細胞内に定量的に物質導入を行なうためには、一定個数のゴーストと融合した細胞だけを取り出せばよい。そこで、FACS を用いて、ゴースト 1 個と融合した 1 核細胞だけ集めることを試みた。

2) FACS は、個々の細胞の大きさと蛍光量の違いに基づいて細胞を選別する装置である。これを用いて、赤血球ゴースト 1 個と融合した細胞を他から区別するために、マーカーとして、FITC でラベルしたアルブミン (FITC-BSA) をゴースト内部にトラップさせることを考えた。

3) FITC-BSA をトラップした赤血球ゴーストを FACS にかけて、その蛍光量を調べたところ、

赤血球ゴーストにトラップされる FITC-BSA の量はゴースト調製時に用いた FITC-BSA の濃度に比例した。また、個々のゴーストがトラップする物質量はきわめて均一であることがわかった。

4) FITC-BSA を含む赤血球ゴーストを細胞と融合させ、それを FACS にかけた。その結果、細胞と融合しなかった赤血球ゴーストや細胞間の融合による多核細胞は、それらの大きさの違いから、1核細胞と区別することができた。次に、1核細胞についてだけその蛍光量を調べたところ、蛍光強度の違う4種類のポピュレーションが得られた。これらは、それぞれ0～3個の赤血球ゴーストが融合した細胞で、この蛍光量の違いに基づいて、ゴースト1個と融合した細胞だけを集めることができた。

5) 上記の方法を用いて、赤血球ゴースト1個と融合した細胞を分離し、その後それらを培養器に移し細胞の生存率を調べた。その結果、これら一連の操作にもかかわらず、細胞は、未処理のものと同じ生存率を示した。

6) この方法の応用として、ジフテリア毒素フラグメントAを細胞内に直接入れた時の最小致死分子数の決定を試みた。すなわち、一定量のFITC-BSAと種々の濃度のフラグメントAを同時に含む赤血球ゴーストを作り、このゴースト1個と融合した細胞のコロニー形成率を求めた。その結果、フラグメントAは、細胞内に1分子入るだけで、細胞を殺すことが明らかになった。さらにこれを確認するため、ジフテリア毒素の変異蛋白であるCRM 176から得たフラグメントA (fragment A-176)を用いて実験を行った。CRM 176は、そのフラグメントA部位に変異があり、動物に注射した時の毒性が約1/100に低下したものである。予測されたように、fragment A-176では、細胞を殺すために100～200分子必要であった。

#### 〔総括〕

- 1) 赤血球ゴースト法にFACSを組み合わせて、細胞内の定量的物質導入が可能になった。
- 2) ジフテリア毒素のフラグメントAは、1分子で細胞を殺すことがわかった。
- 3) フラグメントAが1分子で細胞を殺す事実を基準にして、リポゾーム法など、他の細胞内物質導入法で、入れ得る物質量の概算が可能になった。

#### 論文の審査結果の要旨

この研究は、細胞内への高分子物質の導入法である赤血球ゴースト法をさらに発展させて、物質を定量的に導入できるようにしたものである。この研究結果は、今後広く細胞生物学に利用されるものと思われ、高く評価されるものである。

また、これを用いて、ジフテリア毒素のフラグメントAが、1分子で細胞を殺し得ることが明らかにされたが、この結果は、ジフテリア毒素の細胞内侵入機構や、細胞内での毒素の作用を考える上で、極めて重要な知見である。