

顕微分光測光法によるヒト口腔癌由来培養細胞核 DNA 量に関する研究, 特にサイトカラシン B による多核細胞について

名 和 橙 黄 雄 石 関 清 人 坂 倉 康 則

岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座* (主任: 名和橙黄雄教授)

[受付: 1980年5月21日]

抄録: ヒト口腔癌由来細胞 (KB細胞株) を用い, 培養液中にサイトカラシン B を 0.5, 2.5, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の割合で添加し, 処理後 24 時間と 48 時間に固定して, 多核細胞, 1 核細胞, 分裂細胞に分けて各々の 1 細胞あたりの核 DNA 量と核面積を走査顕微濃度計 (ニコン・ビッカース M85) で測定した。

その結果, 1 核細胞の DNA 量と核面積はいずれの実験群においても大きな変動はみられなかった。DNA 量は多核細胞 > 分裂細胞 > 1 核細胞の順で 1% の危険率で有意の差がみられた。サイトカラシン B の濃度と処理時間の長さにもなって多核細胞の ploidy が増加し, 同時に分裂細胞の DNA 量の増加がみられた。このことは多核細胞ないしは polyploid 細胞の分裂を示唆している。一方, 多核細胞の DNA 量と核面積は比例の関係を示すが, 分裂細胞ではこのような関係はみられなかった。

緒 言

顕微分光測光法が 1936 年に Caspersson¹⁾ によって発表されて以来, *in situ* における細胞内構成成分の検索のきわめて有力な研究手段として, 細胞レベルでの核酸, 蛋白質などの定性と定量に急速に利用されるようになってきた。

現在, 我々はサイトカラシン B による多核細胞形成に関する DNA 量の動態を走査顕微濃度計を用いて測定し, 多核細胞形成の機構についての研究を進めている。

サイトカラシン B は Carter (1967)²⁾ によってはじめてその生物学的活性が示され, 脱核現象³⁾, 細胞運動の抑制⁴⁾, 細胞質分裂抑制による多核細胞形成⁵⁾ などが知られるようになってきた。我々はサイトカラシン B の多核形成作用

を利用して, ヒト口腔癌由来細胞に多核細胞を形成させ, 同時に DNA 量を測定することにより, 多核細胞形成意義の検討を試みた。

材料および方法

材料として用いたヒト口腔癌由来細胞株 (KB 細胞) は染色体数 77 で形態的には上皮性で Eagle (1955)⁶⁾ によって樹立されたものである。

1×10^5 個/ml の細胞を LAB-TEK Tissue culture chamber/slide に入れ, Eagle MEM (日水) に 10% 仔牛血清を加え炭酸ガス培養器にて培養を行った。培養 24 時間後にサイトカラシン B を 1 mg/ml の割合で dimethylsulfoxide (DMSO) にとかし, 各々培養液に 5, 2.5, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように添加

Microspectrophotometric study on the variation of DNA contents of human oral carcinoma cell strain treated with cytochalasin B in tissue culture, with special reference to multinucleate cells.

Tokio NAWA, Kiyoto ISHIZEKI and Yasunori SAKAKURA

(Department of Oral Anatomy, Iwate Medical University, School of Dentistry, Morioka 020)

*岩手県盛岡市中央通 1 丁目 3-27 (〒020)

Dent, J, Iwate Med, Univ, 5 : 77-83, 1980

表1 各細胞群の各々細胞20個の平均核DNA量と平均核面積(標準誤差で示してある)

核型 時間(h) 用量(μg/ml)	多核細胞		1核細胞		分裂細胞		
	24	48	24	48	24	48	
核DNA量	0	26.1+ 2.3	44.8+ 2.9	9.8+ 0.3	20.7+ 1.5	21.9+ 2.3	29.9+ 0.8
	0.5	18.6+ 1.4	36.8+ 4.1	12.5+ 0.6	19.1+ 1.0	15.9+ 0.4	24.8+ 1.3
	2.5	24.9+ 3.4	85.6+10.0	11.0+ 0.6	20.3+ 1.6	22.2+ 1.7	34.6+ 2.8
	5	43.5+ 6.0	96.8+11.1	12.8+ 0.6	26.0+ 0.5	27.3+ 2.8	69.3+ 3.1
核面積	0	34.6+ 2.3	41.0+ 1.2	14.8+ 0.3	17.2+ 0.7	10.7+ 1.1	11.3+ 0.5
	0.5	28.5+ 1.7	39.8+ 3.6	16.4+ 0.6	20.7+ 0.6	9.8+ 0.6	12.9+ 0.6
	2.5	33.2+ 2.9	69.9+ 7.9	15.2+ 0.7	20.9+ 1.2	11.9+ 0.7	16.7+ 0.9
	5	47.9+ 3.6	73.9+ 5.8	15.5+ 0.6	23.0+ 0.5	13.0+ 1.1	28.8+ 2.1

表2 表1にもとづく核DNA量の要因分析表

	SS	DF	MS
A	75018.7	2	37509.3**
B	57330.0	1	57330.0**
C	42169.5	3	14056.5**
A × B	1638.4	2	819.2**
A × C	20456.8	6	3409.4**
B × C	112559.7	3	37519.9**
E	60260.0	462	130.7
ABCR	369433.1	479	

A: 細胞型 B: 処理時間
C: 処理濃度 ** : 1%の水準で有意差を示す

表3 表1にもとづく核面積の要因分析表

	SS	DF	MS
A	96448.6	2	48224.3**
B	12938.6	1	12938.6**
C	12419.0	3	4139.6**
A × B	5709.3	2	2854.6**
A × C	8713.9	6	1452.3**
B × C	4045.0	3	1348.3**
E	62755.4	462	135.8
ABCR	203029.8	479	

A: 細胞型 B: 処理時間
C: 処理濃度 ** : 1%の水準で有意差を示す

した。対照群には等量のDMSOを添加した。各濃度のサイトカラシンBで24時間, 48時間処理後にエタノール酢酸(3:1)で10分間の固定を行った。標本は水洗した後に60℃1N-HClで10分間の加水分解を行い, Sibatani and

Naora²⁾の方法でFeulgen染色を施し, 脱水してEukittで封入を行った。

このようにしてできた標本をニコソ・ピッカーM85走査型顕微鏡濃度計にて最大吸収波長560mμで細胞1個あたりのDNA量を測定し, 同時に測定した核の面積を計測した。細胞は多核細胞(2核以上の細胞), 1核細胞, 分裂期の細胞の3群に分け, それぞれ細胞を20個づつを無差別に選んで測定した。

結 果

表1には各実験群における測定値20個の平均のDNA量と核面積を示した。この結果を要因分析表に示したのが表2と表3である。因子Aは細胞型, Bは処理時間, Cは処理濃度をあらわしているがいずれの場合もDNA量, 核面積ともに1%の危険率で有意の差が示された。

DNA量の結果を図示したのが図1と図2である。いずれの場合もDNA量は多核細胞>分裂細胞>1核細胞の順序であった。

図1のサイトカラシンB24時間処理群についてみると, 1核細胞にはあまり変動がなく, 多核細胞と分裂細胞ではサイトカラシンB5μgで有意の増加がみられてくる。サイトカラシンB0.5μgと2.5μg群は対照群とあまり差がなく, むしろ0.5μg群で若干の減少がみられたが, おそらくこの濃度は細胞のDNA合成を遅延させる効果があるものと推測される。

図2の48時間処理群ではDNA増加曲線の傾

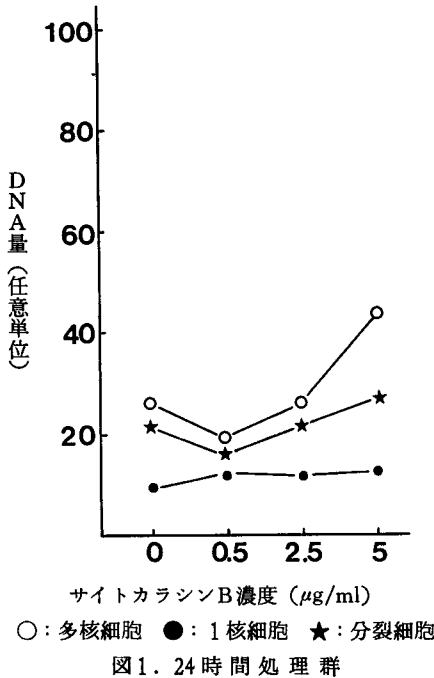


図1. 24時間処理群

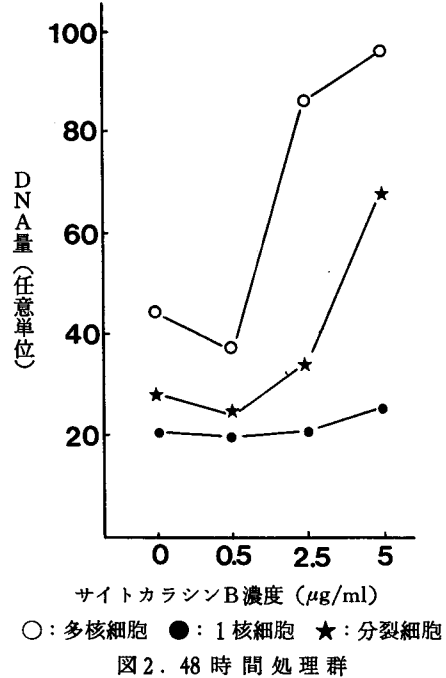


図2. 48時間処理群

向は24時間処理群と同じであるが、DNA量の著しい増加がみられる。三種の細胞群ともに平均DNA量は24時間処理群よりも多いが、今回は同調培養を行っていないのでこの時期にS期に入る細胞が若干含まれている可能性が考えられる。24時間処理群と同様に1核細胞でのDNA量の変動はほとんどみられなかったが多核細胞と分裂細胞群での著しい増加がみられた。とくにサイトカラシンB 2.5µgと5µg処理群でその傾向が著しい。

サイトカラシンBとDNA量の関係についてみるならば、0.5µgでは対照群と差がなくむしろ若干減少の傾向がみられた。本実験におけるサイトカラシンBの効果は2.5µg以上になって現われ、短時間処理では5µgが有意の増加を示し、処理時間を長くするといずれの濃度の場合もその効果が増大される傾向がみられた。

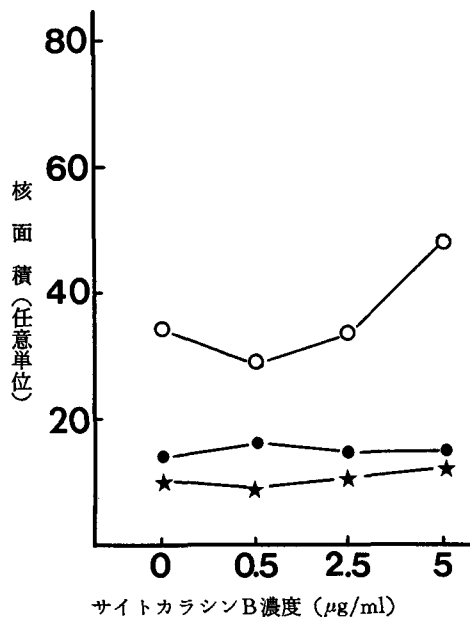
図3と図4はDNA測定時の核面積を表わしたものであるが図1と図2のDNA曲線によく類似しており、特に多核細胞の核面積増加はDNA量の曲線と一致し、この結果は Mirsky and Ris (1949)⁹⁾と Leuchtenberger and

Schrader (1951)⁹⁾らの結果を支持するものである。しかしながらDNA量とはちがって核面積の場合は1核細胞と分裂細胞では結果が逆転している。細胞分裂の際に染色体が形成されることを考えれば、この結果は当然のことであり、分裂細胞に関しては Mirsky と Leuchtenberger らの結果をあてはめることはできない。

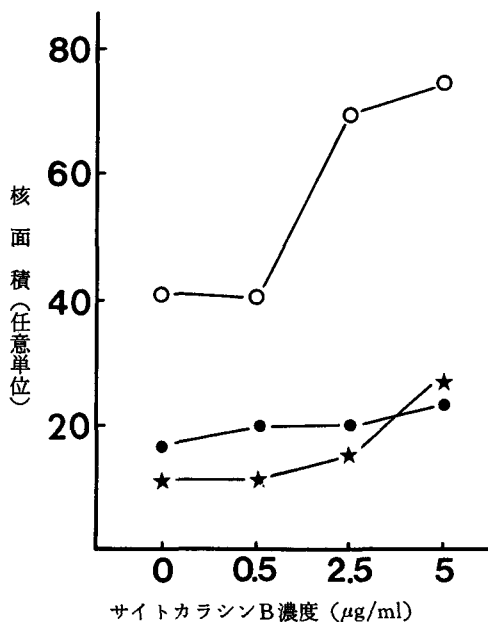
考 察

今回、我々はサイトカラシンBを利用して人為的に多核細胞を形成せしめ、それらを多核細胞、1核細胞、分裂細胞に分けて、1細胞あたりのDNA量と核面積を測定した。いずれの場合もサイトカラシンBの処理時間が長くなればDNA量は増加し、細胞についてみれば多核細胞>分裂細胞>1核細胞の順に少なく、統計的に1%の危険率で有意であった。

DNAに関しては Boivin (1948)¹⁰⁾ら、Vendrely and Vendrely (1949)¹¹⁾、Allfrey (1955)¹²⁾ら他の多数の報告によりDNA不変説が受け入れられているのが現状である。しかしながら Fautrez (1955)¹³⁾ら、Dunn (1958)



○: 多核細胞 ●: 1核細胞 ★: 分裂細胞
図3. 24時間処理群



○: 多核細胞 ●: 1核細胞 ★: 分裂細胞
図4. 48時間処理群

¹⁴⁾らのフランス・ベルギー派によればDNA量は細胞の種々の条件で変動するものであり彼らは excess DNA の存在を主張してきた。また永田・名和 (1972) ¹⁵⁾らは細胞周期とは無関係な糸粒体内DNA合成を報告している。しかしながらこのような metabolic DNA については今後の課題であり、DNA不変説の見地からすると、サイトカラシンBによるDNA量の増加は多核細胞増加にともなう polyploid の細胞増加を示している。

1核細胞においてはいずれの場合もDNA量には変動がみられないが、多核細胞と分裂細胞ではサイトカラシンBの濃度あるいは処理時間の増加にともなってDNA量の著しい増加がみられた。このことはサイトカラシンBによる細胞質分裂抑制の結果、polyploid の細胞が増加することを示している。さらにDNA量の増加した分裂細胞の出現はこれらの polyploid 細胞の分裂の可能性を示唆している。

今回は2核以上の細胞を多核細胞として一括してまとめ、1細胞あたりのDNA量として測定したので核1個あたりのDNA量については

不明であるが、一般に核数の増加にともなって細胞体が比例して無限に増大するものではなく、結果的に限られた細胞体内に大小不同の核が生ずることが知られている。このようにして形成された多核細胞あるいは polyploid の細胞は分裂様式からみると正常のルールから外れたものであり、一般に polyploid の増加は細胞の運命からみると老化あるいは死を意味するものと考えられている。

サイトカラシンBの作用には可逆性があり、薬物を除去すると元の状態に戻る。しかしながら高濃度あるいは長時間作用によって不可逆となると思われる。名和ら¹⁶⁾の走査電顕の報告によるとサイトカラシンB, 5 µg, 48時間処理では細胞の突起が消失して、細胞の運動性が阻害され、大多数の細胞がガラス面より脱落して変性に落るといわれている。このような不可逆な現象は内因的には polyploid の細胞増加が加担していると考えられる。

polyploidization は Nagata (1960)¹⁷⁾、名和 (1967)¹⁸⁾の正常肝細胞、Watanabe (1970)¹⁹⁾の肝切除実験、Gilbert and Pfister (1977)

²⁰⁾らの甲状腺についての報告にみられるように、いずれも aging と密接な関係にあることが示唆され、細胞能力の低下にともなって増加することが知られている。一方、培養細胞については森脇 (1969)²¹⁾ら、Cristofalo and Kritchevsky (1969)²²⁾、Mitsui and Schneider (1976)²³⁾、Kaji and Matsuo (1978)²⁴⁾の報告があり、いずれも growth rate の低下にともなって多核細胞が増え、同時に ploidy の増加がみられる。

サイトカラシンBによる培養細胞の多核形成については Wright and Hayflick (1972)²⁵⁾、Hirano and Kurimura (1974)²⁶⁾の報告があり、それによると正常細胞では2核細胞が増加し、造腫瘍細胞では2核以上の多核細胞の増加がみられ、サイトカラシンBの作用態度が正常と腫瘍細胞で異なることを示唆している。

Katsuta and Takaoka (1979)²⁷⁾も同様の報告をしているがサイトカラシンBによる多核細胞形成能は細胞の造腫瘍性の能力と比例するとして、多核細胞形成能は細胞悪性化の指標となることを示唆している。このような細胞の多核化と polyploidy は培養内老化過程で普通に起こる現象であるが、その原因について松村 (1979)²⁸⁾は、これらの現象は分裂限界に近づく細胞に多く、細胞周期外での調節されたDNA合成を含む生活相の存在を示唆している。

中西と藤田 (1977)²⁹⁾は多核細胞はDNA二重鎖間に出現する未修復の cross-link が潜在的な要因になり、cross-link が少ないか、または弱い場合は cross-link が修復されれば正常の分裂が起こるが、修復されないと多核細胞が生じ、未修復の cross-link が多いときは単核の polyploid 細胞になると報告している。多核細胞と polyploidization の誘導の素因に

ついては上記のような見解もあるが形成された多核細胞の運命については Ikeuch (1973)³⁰⁾の当を得た報告がある。すなわち核数の多い細胞ほど、核分裂の非同調にもとづく Chromosome pulverization が増加し、その結果、非分裂細胞が蓄積されていくと考えられている。

しかしながら、本実験でみられた polyploid 分裂細胞の増加は polyploid 細胞の分裂能がかなり持続されることを示唆するもので、Katsuta らがのべている造腫瘍性と関連しているのかも知れない。多核細胞形成と polyploidization は正常細胞では aging と、腫瘍由来細胞では造腫瘍性と関連し、お互いに表裏一体の関係をなしているように思われる。サイトカラシンBによる多核細胞形成はこれらの問題点を解決する一種のモデルとなり得る。

結 論

1. 1細胞あたりの核DNA量は多核細胞>分裂細胞>1核細胞の順で1%の危険率で有意の差がみられた。
2. 1核細胞のDNA量と核面積は各実験ともに大きな変動はみられない。
3. サイトカラシンBの濃度と処理時間の長さにもなって多核細胞に polyploid の細胞が増加した。このことはKB細胞における polyploidization は多核細胞形成に起因していることを示している。
4. DNA量の多い分裂細胞の増加がみられるが、このことは多核細胞ないしは polyploid 細胞の核分裂能が持続していることを示している。
5. 多核細胞においてはDNA量と核面積は比例の傾向を示すが、分裂細胞においてはこのような関係はみられない。

Abstract: This experiment was made to investigate the difference of total DNA content and nuclear size between multinucleate, mononucleate and mitotic cells which treated with cytochalasin B in culture.

Measurement of the DNA and nuclear size in each cells was done by means of the scanning microdensitometer utilizing on Nikon-Vickers M 85 (Nippon Kogaku, Co., Ltd.). The results obtained were as follows.

- 1) The DNA content was high in the following descending order : mononucleate cell, mitotic cell and multinucleate cell.
- 2) There was no significant difference between DNA content and nuclear size of mononucleate cells. On the other hand, in the multinucleate cells DNA content was in proportion to nuclear size but in mitotic cells there was no proportional relation between DNA content and nuclear size.
- 3) The frequency of polyploid cells in multinucleate cells increased together with the concentration of cytochalasin B and its incubation period. It was indicated that polyploidization in this strain was performed by the formation of multinucleate cells.
- 4) The frequency of polyploid mitotic cells increased with multinucleate cells. It was indicated that polyploid and multinucleate cells was endowed with karyokinetic activity.

文 献

- 1) Caspersson, T. : Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkernes. *Skand. Arch. Physiol.* 73 (Suppl. 8) : 1-158, 1936.
- 2) Carter, S. B. : Effect of cytochalasin on mammalian cells. *Nature.* 213 : 261-264, 1967.
- 3) Prescott, D. M., Myerson, D. and Wallace, J. : Enucleation of mammalian cells with cytochalasin B. *Exp. Cell Res.* 71 : 480-485, 1972.
- 4) Westermarck, B. : Induction of a reversible G1 block in human glia-like cells by cytochalasin B. *Exp. Cell Res.* 82 : 341-350, 1973.
- 5) Wright, W. E. and Hayflick, L. : Formation of anucleate and multinucleate cells in normal and SV 40 transformed WI-38 by cytochalasin B. *Exp. Cell Res.* 74 : 187-194, 1972.
- 6) Eagle, H. : Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. *Proc. Soc. exp. Biol.* 89 : 362-364, 1955.
- 7) Sibatani, A. and Naora, H. : Enhancement for colour intensity in the histochemical Feulgen reaction : method and quantitative estimation. *Experientia.* 8 : 1-4, 1952.
- 8) Mirsky, A. E. and Ris, H. : Variable and constant components of chromosomas. *Nature.* 163 : 666, 1949.
- 9) Leuchtenberger, C. and Schrader, F. : Relationship between nuclear volumes, amount of intranuclear proteins and deoxyribonucleic acid (DNA) in various rat cell. *Biol. Bull.* 101 : 95-98, 1951.
- 10) Boivin, A., Vendrely, R. and Vendrely, C. : L'acide désoxyribonucléique du noyau cellulaire, dépositaire des caractères héréditaires : arguments d'ordre analytique. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 226 : 1061-1063, 1948.
- 11) Vendrely, R. and Vendrely, C. : La teneur du noyau cellulaire en acide désoxyribonucléique à travers les organes, les individus et les espèces animales : étude particulière des mammifères. *Experientia.* 5 : 327-329, 1949.
- 12) Allfrey, V. G., Mirsky, A. F. and Stern, H. : Cytochemistry of the nucleus. *Adv. Enzymol.* 16 : 411-500, 1955.
- 13) Fautrez, J., Caralli, G. and Pisi, E. : Variation in the amount of DNA in the cell nuclei and its correlation with mitotic activity, compensatory hypertrophy of kidney. *Nature.* 175 : 684-685, 1955.
- 14) Dunn, C. E., Buss, A. D. and McArdle, A. H. : Effect of cortison on liver nucleoproteins. *Exp. Cell Res.* 14 : 23-28, 1958.
- 15) 永田哲士, 名和橙黄雄, 村田長芳, 横田貞記 : 腫瘍細胞糸粒体内核酸合成に関する電子顕微鏡的ラジオオートグラフィ, 昭和46年文部省科学研究費「がん」特別研究・研究報告集録, 311-312, 1972.
- 16) 名和橙黄雄, 立花民子, 石関清人 : 走査電子顕微鏡による細胞表面の観察 : ヒト口腔癌由来培養細胞におけるサイトカラシンBの作用について, 解剖誌, 52 : 366-373, 1977.
- 17) Nagata, T. : A quantitative study of the DNA contents in rat hepatic cell nuclei by means of microspectrophotometry with special reference to binucleate cells. *Med. J. Shinshu Univ.* 6 : 143-153, 1960.
- 18) 名和橙黄雄 : 顕微分光測光法による肝細胞核DNA量の年令的変動, ことに二核細胞との関係について, 信州医誌, 16 : 441-446, 1967.
- 19) Watanabe, M. : DNA synthesis in polyploid and binucleate hepatic cells in the regenerating rat liver of different ages. *Nagoya. J. Med. Sci.* 33 : 1-11, 1970.
- 20) Gilbert, P. and Pfister, P. : Facultative polyploidy in endocrine tissues. *Virchows Arch. B Cell Path.* 25 : 233-242, 1977.
- 21) 森脇和郎, 今井弘民, 吉田俊秀 : マウスミエローマ細胞における倍数性的変化と蛋白合成, 細胞化学シンポジウム, 20 : 195-203, 1969.
- 22) Cristofalo, V. J. and Kritchevsky, D. :

- Cell size and nucleic acid content in the diploid human cell line WI-38 during aging. *Med. exp.* 19 : 313-320, 1969.
- 23) Mitsui, Y. and Schneider, E. L. : Increased nuclear sizes in senescent human diploid fibroblast cultures. *Exp. Cell Res.* 100 : 145-152, 1976.
- 24) Kaji, K. and Matsuo, M. : Aging of chick embryo fibroblasts in vitro. II. Relationship between cell proliferation and increased multinucleate cells. *Mechanisms of Aging and Development.* 8 : 233-239, 1978.
- 25) Wright, W. E. and Hayflick, L. : Formation of anulate and multinucleate cells in normal and SV 40 transformed WI-38 by cytochalasin B. *Exp. Cell Res.* 74:187-194, 1972.
- 26) Hirano, A. and Kurimura, T. : Virally transformed cells and cytochalasin B. I. The effect of cytochalasin B on cytokinesis, karyokinesis and DNA synthesis in cells. *Exp. Cell Res.* 89 : 111-120, 1974.
- 27) Katsuta, H. and Takaoka, T. : Carcinogenesis in tissue culture 30 : malignant transformation of normal rat liver cells treated with diethylnitrosamine in tissue culture with special reference to the differential effects of cytochalasin B on various cells with and without tumorigenicity. *Japan. J. Exp. Med.* 49 : 187-198, 1979.
- 28) 松村外志張 : 多核細胞と倍数性細胞の出現とその意義, 組織培養, 5 : 241-248, 1979.
- 29) 中西和夫, 藤田哲也 : polyploid cell および二核細胞出現のメカニズム, 医学のあゆみ, 100 : 621-622, 1977.
- 30) Ikeuchi, T. : Chromosome pulverization in chinese hamster multinucleate cells induced by bleomycin and cytochalasin B. *Japan. J. Genet.* 48 : 391-405, 1973.