脳腫瘍培養細胞に対するvincristineの影響：光顕及び電顕による検索

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8741

脳腫瘍培養細胞に対するvincristineの影響
－光顕及び電顕による検索－

金沢大学医学部脳神経外科学講座（主任：山本信二郎教授）
木谷隆一

（昭和53年10月16日受付）

vinka alkaloidの一種であるvinblastineはJohnsonによって1960年に白血病を移植されたマウスに対し治療効果のある事が証明された[1]．ヒトの脳腫瘍に対しては1962年Armstrongらが，vincristineをastrocytomaに使用し，以来髄芽腫，多形膠芽腫にも治療効果のある事が報告された[2)~7)]．腫瘍細胞に対するこの物質の作用機序に関しては有糸分裂停止作用によるcytostatic効果が重要であると考えられている[8)~12)]．しかし癌に対する臨床使用経験では，腫瘍の縮小と有糸分裂停止の程度が，比例しない事実が認められ，vinka alkaloidの抗腫瘍効果作用を単なる有糸分裂停止のみでは説明できない事が指摘された[13)14)]．一方vincristineを作用させた細胞の核酸代謝の研究では，RNA前駆体の^{3}H-uridineは45S RNA－32S RNAに蓄積し，18S RNAや28S RNAへ移行し難い事よりvincristineはリボゾームRNAの生成を阻害する作用を有する事が証明された[15)16)]．

リボゾームRNAは核小体に由来するものである[17)]．形態学的検索によれば，核小体内において，まず細線維成分が合成され，これから顆粒成分が合成される．又生化学のデータとの検討により45S RNAが細線維成分に，そして28S RNAが顆粒成分に含まれる事が知られ，しかも顆粒成分がリボゾームRNAの直接の前駆体と考えられている[18)]．従ってリボゾームRNAの代謝に変化のある場合には核小体の形態にも何らかの変化のある事が推定される．

本実験では臨床上使用される濃度のvincristineを多形膠芽腫と髄膜腫の初代培養脳腫瘍細胞に作用させ，光顕及び電顕を用いて細胞質と核小体の形態の変化を検索した．

材料および方法

手術によって剔出された3例の多形膠芽腫と3例の髄膜腫を実験に供した．無菌的に採取された腫瘍組織を0.5～1.0mm角に細切し，0.1％トリプシン液中でピペッティングを施した．この操作によって細胞はほとんど1個1個に分離され，これを500rpm 3分間遠心し，上澄み液にハンクのプラス液を加え，トリプシンの消化効果を停止させ，1000rpm 5分間遠心し，上澄み液を捨て，その沈査に20％仔牛血清添加199培養液を加え，ガラス瓶による単層培養を行った．ガラス瓶は小角培養瓶（池本理研）を用い，その中に5mm×10mmのカバーグラスを置き，その上に増殖した細胞を実験に使用した．培養液は3日に1回の頻度で交換し，培養16日～18日目にその初代培養細胞にvincristineを0.1μg/mlの濃度で24時間作用させ，コントロール群と対比検索した．

コントロール群とvincristine作用群とを同日に固定した．カバーグラス上に付着している細胞を燐酸緩衝液にて洗浄後，0.1Mカコジル酸ナトリウム緩衝液による2.5％グルタールアルデヒド（pH7.4）にて4℃で20分間固定した後，鋏にてカバーグラスを切断し，一部を光顕用にギムザ染色を施した．残りのカバーグラス上の細胞を4℃にて0.1Mカコジル酸緩衝1％オスミウム酸（pH7.4）で30分間後固定した後，上昇エタノール系列にて脱水し，酸化プロピレンで置換後，5％コロジオン液（和光純薬）の入ったシャーレに30分間浸した．カバーグラスをコロジオン液から取り出して，室温にて5分間乾燥させると，カバーグラス上に薄いコロジオンの膜ができる．このコロジオン膜を蒸留水中でカバーグラスより剥離すると，培養細胞

Effects of vincristine on cultured cells derived from human brain tumors. **Ryuichi Kitani**, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University.

はすべてコロジオン膜に含まれる．この剥離したコロジオン膜を恒温槽で37℃にて約20分間乾燥させた後，これをLuftの方法[19]に従い調合したエポン812樹脂と酸化プロピレン液の混合液（9：1）にて60分～90分間振盪して軟化させ，塊状にして平板包埋板のくぼみにエポン樹脂と共に入れ脱気した．脱気後，サーマノックスカバースリップにてくぼみに蓋をし，四隅を針で止め，包埋板を45°に傾斜させたまま恒温槽内で80℃にて24時間重合させ，LKB Ⅱ型ウルトラミクロトームを用いて超薄切片を作製した．電子染色は2％酢酸ウラニール水溶液と佐藤のクエン酸鉛液[20]による二重染色を行ない，日立HU－11DS型，日本電子JEM 100B型電子顕微鏡にて観察し，直接培率1800倍より12万倍にわたり写真撮影した．

成　　績

写真1は多形膠芽腫培養17日目の光顕所見を示す．細胞は大小不同が著るしく，突起を除く大きさは最も大きいもので長径100μ，小さいものでは長径20μである．大型の細胞は長径が100μ～50μの大きさで，小数である．細胞の形は5ないし6角形をなし，細胞突起は太く短かい．比較的大きな類円形の核がみられる．その大きさは約20μ×12μである．中型の細胞は長径50μ～30μであり，多数みられ，概ね2つの形態を示す．その一つは台形ないし長方形をなし，2ないし3本の太い突起を有する細胞である．他の型の細胞は5ないし6角形を示すが，長短様々な6ないし9本の突起を持つため，細胞辺縁が不規則である．これらの細胞の核は大小不同である．小型の細胞は30μ以下で数は少なく類円形ないし三角形を示す．突起の数は少なく0～2個である．核は約10μ×6μである．大型および中型の細胞の核の約半数に辺縁の不規則性が見られ，多核細胞もこれらの細胞の1/7～1/8にみられる．有糸核分裂は認められない．

写真2は上記の培養細胞に0.1μg/ml vincristineを24時間作用させたものである．全ての細胞において萎縮変性が見られる．細胞の突起や角は消失し，全体に丸い．細胞は大小不同であり，大きいもので長径が40μであり，小さいもので長径が12μである．萎縮の程度は様々であり，萎縮の強い細胞は，わずかに核の周囲に細胞質が見られるのみで，金米糖様の形を示す．核には光顕所見に関する限り，対照群と差異を認め得なかった．又細胞の他に，死滅細胞を疑わしめる紫色に濃染する無構造物が散在する．有糸分裂像は見られない．

写真3は対照群の電顕像を示す．細胞は紡錘形を示すものが多く，約70％の細胞には，辺縁に0.1μから4μのコブ状の突出が見られ，多いものでは8個みられる．又細胞の辺縁は多数の浅い陥凹のため不規則に見える．細胞質中にはミトコンドリア及び遊離リボゾームが多い．細胞質中には少数ながら空胞も見られる．細胞の約1/3が多核の所見を示し，形は三角形あるいは楕円形で一定せず，核の辺縁には浅い核膜の湾入が多く見られる．一核の細胞のうちの約1/3は深い核膜の湾入を有する不規則な形をした核を有する．約半数の核の核膜周囲にクロマチンが少量見られる．核小体の多くは類円形であり辺縁に浅い陥凹を多数有し，約1500 Åの太さの核小体糸による粗な網目状構造を示し，核小体糸上には径約200 Åの顆粒が散在する．

写真4は0.1μg/ml vincristineを24時間作用させたものである．細胞質内において多数の0.2μ～0.8μの空胞が見られる．ミトコンドリアの形には変化は見られない．遊離リボゾームの減少は核小体の変化が後述の第3及び第5型に属する細胞において明らかであった．核に関してはその輪郭及びクロマチンの配置については特に変化は見られない．これに対し，核小体には，網目状構造及び顆粒成分と細線維成分の構成比に著明な変化が認められ，これを5つの型に分けた（表1）．

核小体の変化の第1型は写真4の上方の細胞の核小体に見られる如く，核小体糸がからみ合って緻密な網目状構造を有するものである．この核小体内には径約200 Åの顆粒が普通に見られる．第2型は写真4の下方の細胞の核小体に見られる如く，核小体糸による網目状構造を失い，light areaは消失して全体が均質に見えるものである．この型の核小体には前述の径約200 Åの顆粒が核小体全体に存在するものからわずかに散在するものまで種々ある．第3型は写真5に見られる如く，核小体糸による網目状構造が失われ，均質に見えるものである．この型の核小体には径200 Åの顆粒は消失して見られず，すべて径40 Å～50 Åの細線維で構成されている．第4型は写真6に見られる如く，核小体内にcentral lacunaeを1個ないし，2個有するリング状核小体である．この種の核小体の皮質部分が緻密な網目状構造を呈するものと，均質に見え，径約200 Åの顆粒と50 Åの細線維で構成されているものがある．第5型は写真7，及び8に見られる様に電子密度の高い部分と低い部分に明確に分離して見えるものである．この電子密度の高い部分も低い部分も共に径約50 Å前後の細線維のみで構成され，顆粒は見られない．

写真9は髄膜腫細胞培養18日目の光顕像である．核

表1　Vincristine による核小体の変化

	核小体糸による網目状構造	200Åの顆粒	40Å～50Åの細線維	備　考
第1型	緻　密	普　通	普　通	
第2型	な　し	少ない	多　い	
第3型	な　し	な　し	多　い	
第4型	緻　密 or 消　失	少ない	多　い	リング状核小体
第5型	な　し	な　し	多　い	segregation を示す

分裂像は見られない．細胞の多くは台形ないし細長い三角形，あるいは紡錘形をなし，核は大体径 12μ の円形ないし類円形であり，ほぼ一定である．三角形の細胞では胞体が乏しいため辺縁は湾入しており，細長い直線状の突起を有する．台形の細胞では突起を除く細胞の大きさは長径約 50μ～20μ であり，殆んど突起を有さず，有しても短かい．核の辺縁には陥凹などの不規則さは殆んど見られない．又多核細胞は少ない．

写真 10 は髄膜腫培養細胞に 0.1μg/ml vincristine を 24 時間作用させたものである．核分裂像は認められない．全ての細胞に細胞質の萎縮変性が見られる．半数の細胞では細胞質が比較的多く，形は全体に丸くなって細胞の突起や角が消退している．細胞質の少ない細胞では核の周囲にわずかに細胞質が見られるのみであり，小さな三角形ないし，星状を呈する．核の形には対照群に比して差を認め得ない．細胞間には紫色に染まる無構造物が散在する．

写真 11 は対照群の電顕像である．細胞は卵円形ないし紡錘形をなし，小さな細胞質の突出が所々に見られる．多くの細胞においてその辺縁の所々に少数の陥凹が認められる．多くの細胞の細胞質内には約 0.8μ の空胞が散在し，又 0.1μ～0.2μ の小さな空胞が多数存在する細胞もある．細胞質中にはミトコンドリアや遊離リボゾームが比較的多く見られる．全体の約 3/4 の核は規則正しい辺縁を有するか，あるいは辺縁に浅い核膜の湾入が 1 個ないし 2 個みられる．約半数の核において少量の核膜周囲クロマチンが見られる．多核細胞は稀である．核小体は類円形ないし，多角形であり，径約 1500 Å の太さの核小体糸による粗な網目状構造を有し，核小体糸上には径約 200 Å の顆粒が見られる．

写真 12 は 0.1μg/ml vincristine を 24 時間作用させた髄膜腫培養細胞の電顕像である．細胞質には著明な空胞の増加が見られ，胞体の変化は核小体の変化と関連し，核小体の変化の型は前述の膠芽腫における場合の分類とほぼ同様である．核の形，クロマチンの分布については対照例と比べ特に変化はないが，核小体に著明な変化が見られる．

細胞質の空胞の増加及び遊離リボゾームの減少の程度は第 1 型の核小体を有する細胞では顕著でないが，写真 12 に見られる如く，第 3 型ないし第 5 型の核小体を有する細胞において顕著である．

写真 13 は第 1 型の核小体を示し，径約 2000 Å の核小体糸が豊富で，非常に密な網目状構造を呈し，径約 200 Å の顆粒も見られる．細胞質中にミトコンドリアも多い．

写真 14 は第 2 型の核小体を示す．核小体の網目状構造は全く失なわれ，ほぼ均質に見える．この核小体中には径約 200 Å の顆粒と径約 50 Å の細線維とが見られる．その顆粒も径約 50 Å の細線維の集合であるのが見られる．

写真 15 に見られる核小体は第 3 型に属し，顆粒成分が全く見られず，全て径約 50 Å の細線維成分のみで構成されている．

写真 16 に見られる核小体は第 4 型に属し，リング状核小体であり，その皮質部分は第 2 型の核小体と同様に，径約 200 Å の顆粒と豊富な細線維より成っている．第 5 型の核小体は髄膜腫の検索では認め得なかった．

考　察

本実験においては培養脳腫瘍細胞に対する vincristine の作用について，最も悪性に属する多形膠芽腫と，これに対し良性腫瘍に属する髄膜腫との間に有意の差を認めなかった．研究の経過において，星状膠細胞腫及び神経鞘腫の培養は困難であり，研究の

対象とし得なかった．これに対し，髄膜腫細胞の培養は容易であり，多形膠芽腫のそれに匹敵するものであった．この事より元来良性腫瘍と考えられている髄膜腫が本実験の培養環境では多形膠芽腫と同様の代謝活性を持ち，vincristine に対し同様の反応を示したものと考え得る．

vinka alkaloid の抗腫瘍作用の検索から vincristine, leurosine, vinblastine 等の一連の物質が描出され，それらは Hodgikin 病をはじめ消化管腫瘍，白血病にも効果のあることが知られた[14][21][22]．脳腫瘍に対するこれらの物質の作用に関しては，1962年に Armstrong が星状膠細胞腫に vincristine が効果のある事を報告して以来，髄芽腫や多形膠芽腫にも効果のある事が知られた[6][8][9]．

vinka alkaloid の抗腫瘍性の作用機序については spindle tubules の合成阻害による有糸分裂停止による cytostatic 効果が重要な役割を果すとされてきた[8][13]．一方 Wilson らはヒト脳腫瘍の単層培養細胞に対する vincristine の影響を光顕で観察し，細胞が変性することより vincristine が cytotoxic 効果を有する事を明らかにした．しかしながらこの物質の作用機序については不明のまま残された[23][24]．本実験では vincristine を投与した場合，光顕所見で最も著明な変化は細胞の萎縮変性であり，一方電顕では核小体に著明な形態の変化が見られた．核小体はリボゾーム RNA 合成の場である事実[17]は，核小体の形態の変化はリボゾーム RNA 代謝の変化を示唆する．

電顕によれば，核小体は核小体糸と呼ばれる径 0.1μ ～ 0.2μ の線維のからまり合ったものである[25][26]．Marrinozzi らは肝細胞の検索により核小体は次の3つの成分から成るとした．第1は径約 150 Å ～ 200 Å の顆粒，第2は径 50 Å の細線維であり，この2者は RN ase により消化される RNA であり，第3は pepsin により消化される蛋白質の基質である[27][28]．核小体内におけるこの二種類の RNA の関係については，^{3}H-uridine を用いた Novikoff hepatoma cell の電顕的オートラジオグラフィにより Unuma らは，^{3}H-uridine はまず細線維成分に集まり，次に顆粒成分に移行することを明らかにし，これより細線維成分が顆粒成分の前駆物質であるとした[29]．

核小体の RNA の代謝については，村松らは ^{14}C-orotic acid をラットに投与後経時的にラット肝より核小体を取り出して分析する事により，核小体においてまず 45S RNA が合成され，このものより更に 28S RNA が合成される事を証明した[30]．Penman らは HeLa 細胞において，45S RNA から 28S RNA が合成される前に 18S RNA が 45S RNA から切り離され，それはすばやく細胞質中に現われ，核小体中には殆んど検出されない事も示した[31][32]．核小体において細線維成分は顆粒成分の前駆体であり，しかも 45S RNA は 28S RNA の前駆体である事実は，45S RNA が細線維成分に，28S RNA が顆粒成分に含まれる事を示唆する．実際肝核小体において 45S RNA の合成を阻害する actinomycin D の投与は RNA を含む細線維成分を消失させる[33]．又，HeLa 細胞の核小体において 45S RNA から 28S RNA を合成する過程を阻害する toyocamycine を作用させた場合には顆粒成分が減少し，細線維成分が増える事も証明された[34]．一方 Wagner らは生化学的に vinka alkaloid の RNA 合成の阻害作用を検索した．^{3}H-uridine で 15 分間ラベルされた HEp-2 細胞に 30 分間 2×10^{-4} 及び 1×10^{-5}M の濃度の vinblastine あるいは vincristine を作用させた場合，放射能が対照例と比較して，18S RNA において 40 %，そして 28S RNA において 20 % しか検出されない．45S RNA から 18S RNA が切り離され，それから 28S RNA が合成される事より，上述の実験結果は vincristine が少なくとも 45S RNA → 28S RNA の阻害作用と 45S RNA 合成阻害作用の二つを有する事を示すと彼らは推定した[15]．

本実験で見られた vincristine の作用による核小体の変化は表1の如く5つの型に分けられた．第1の型は核小体糸の核小体内における密度が増加し，核小体は非常に密な網目状構造を示すものである．又核小体内には顆粒成分も存在する．このものは 45S RNA とともに 28S RNA を含むものと考えられる．第2の型は上記の網目状構造の濃密化が一層進み，核小体が均質に見えるものである．この型の核小体内には細線維成分が豊富で，顆粒成分は全般に少なく，顆粒のほとんど見られないものもあり，45S RNA の含有の比率が多くなるものと考えられる．第3の型は核小体は網目状構造を失い均質に見えるが，顆粒成分は全く見られず細線維成分だけで構成されているものであり，28S RNA が存在しないものと考えられる．toyocamycine は 45S RNA から 28S RNA を生成する成熟過程を阻害する薬剤であり[35]，これを HeLa 細胞に作用させると時間の経過と共に核小体の濃密化，細線維成分の増加と共に顆粒成分の減少が見られる[34]．第1型から第3型までの核小体の変化は vincristine の作用により核小体内において細線維成分が蓄積すると共に顆粒成分が減少し，ついには消失する過程を示すものであり，vincristine が 45S RNA → 28S RNA の過程を阻害する作用を有する事

を示すと推定される．

第4型のリング状核小体は通常哺乳動物細胞には殆んど見られず，わずかにいくつかの血球細胞，及び45S RNA 合成を阻害する actinomycin D や chromomycine A_3 を作用させた細胞に見られるものである[36)~40)]．この様なリング状核小体が見られる成熟リンパ球においては RNA の合成が停止している事がラジオオートグラフィにより証明されている[38)41)]．これらの事より第4型の核小体においてもリボゾーム RNA の産生自体が減少している事が推定され，又それは vincristine はリボゾーム RNA 成熟過程の阻害のみならず actinomycin D と同様の作用機序をも有する事を暗示する．

第5型の核小体は電子密度の高い部分と低い部分に分離して見え，これは segregation と呼ばれる形態と類似する．segregation は主に actinomycin D 等の DNA 依存 RNA の合成を阻害する物質を作用させられた核小体において見られる[42)43)]．Unuma 等によれば，ラット肝核小体に actinomycin D を作用させた場合，電子密度の高い部分にのみ DNA と RNA が存在し，電顕では顆粒成分が多く見られ，これに対して電子密度の低い部分には蛋白成分のみが存在する．この現象は DNA core が収縮して，それに付着する細線維状 RNA が共に nucleolus organizer の方へ集合するものであり，この際 actinomycin D は 45S RNA 合成を阻害するにもかかわらず，45S RNA → 28S RNA の過程を阻害しないため電子密度の高い部分には顆粒成分が圧倒的に多く見られると解されている[44)]．然るに第5型の核小体においては，電子密度の高い部分には細線維成分のみが見られ，顆粒成分が見られない．この事実は vincristine を作用させた核小体において 45S RNA 合成阻害において見られ得る DNA と RNA の偏在現象と 45S RNA → 28S RNA 成熟阻害による顆粒成分の減少が同時に存在することを暗示する．したがって第4型と第5型の核小体は本質を同じくする現象と解釈され得る．

vincristine による細胞質の著明な変性は細胞質に対する薬物の直接作用によるものか，あるいは核小体の障害に由来する2次的なものか問題となる．細胞質のリボゾーム RNA は核小体で合成される事は既に知られている[17)]．鵜沼らは電顕による検索で，細胞質リボゾームと核小体の顆粒成分（28S RNA）とが同様の形態を有する事より，核小体内顆粒成分がリボゾーム RNA の直接の前駆体であると推定した[18)]．リボゾーム RNA の代謝は速く 45S RNA の半減期は正常肝核小体で 10 分から 20 分，再成肝核小体で 4 分から 7 分，そして Walker 腫瘍細胞核小体で 6 分ないし 7 分である[30)45)]．したがって核小体の RNA 代謝の変化は，速に細胞体内のリボゾームの量に反映し得ると考えられる．本実験において顆粒成分の認められない第3型及び第5型の核小体を有する細胞にリボゾームの減少が著明である．培養細胞集団では分裂しない細胞もまた ^{3}H-uridine や ^{3}H-leusine を取り込み，RNA の合成や蛋白質の合成を行なっており[46)47)]，一方細胞における蛋白合成は殆んどリボゾームで行われる．これらの事実より vincristine による細胞の萎縮変性は，核小体内の RNA 合成阻害がリボゾームの減少をきたし，そのために細胞内における蛋白合成が阻害されたため生じたと推定され得る．

結　　論

手術によって剔出された多形膠芽腫及び髄膜腫の初代培養細胞に対する vincristine の作用を光顕ならびに電顕により検索した．

1．多形膠芽腫と髄膜腫の間では vincristine の作用について有意の差は見られない．

2．光顕検索では細胞質に著明な萎縮変性が見られる．

3．電顕による検索では核小体に変化が見られ，5つの型に分類された．第1型から第3型の変化は核小体系による網目状構造の変化及び細線維成分と顆粒成分の混合比の差によるものであり，第1型は両者が混在し，第3型は細線維成分のみからなる．これらの変化は 45S RNA から 28S RNA を合成する過程を阻害する薬物の投与による核小体の変化と類似する．第4型はリング状の核小体であり，第5型は segregation の型を示し，これらの変化は vincristine が DNA 依存 RNA（45S RNA）合成を阻害する作用を暗示する．

4．細胞質中においてリボゾームの減少が著明に見られたのは，核小体に顆粒成分の見られない第3型及び第5型の核小体を有する細胞である．

5．以上より vincristine の抗腫瘍作用の一つはリボゾーム RNA の合成の阻害によるものと考えられる．

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜わった山本信二郎教授ならびに終始御指導を載いた久保田紀彦講師ならびに本研究に協力下さいました教室員の皆様に感謝します．本研究の資料提供に御協力いただきました国立金沢病院，富山市民病院，厚生連高岡病院，福井県立病院の脳神経外科諸先生に感謝します．また資料作製に援助いただいた古川明子低ならびに横田輝一氏に感謝します．

文 献

1) **Johnson, I. S., Wright, H. F., Svoboda, G. H. and Vlantis, J.** : Antitumor principles derived from vinca rosea linn I. vincaleukoblastine and leurosine. Cancer Res., **20**, 1016－1022 (1960).

2) **Armstrong, J. G., Dyke, R. W. and Fouts, P. J.** : Initial clinical experience with leurocristine, a new alkaloid from vinca rosea linn. Proc. Am. Ass. Cancer Res., **3**, 301 (1962).

3) **Lassman, L. P., Pearce, G. W. and Gang, J.** : Sensitivity of intracranial gliomas to vincristine sulphate. Lancet, **1**, 296－297 (1965).

4) **Lampkin, B. C., Mauer, A. M. and McBride, B. H.** : Response of medulloblastoma to vincristine sulfate : a case report. Pediatrics, **39**, 761－763 (1967).

5) **Braham, J., Sarova-Pinhas, I. and Goldhammer, Y.** : Glioma of the brain treated by intravenous vincristine sulphate. Neurochirurgia, **12**, 195－200 (1969).

6) **Lassman, L. P., Pearce, G. W., Banna, M. and Jones, R. D.** : Vincristine sulphate in the treatment of skeletal metastases from cerebellar medulloblastoma. J. Neurosurg., **30**, 42－49 (1969).

7) **Afra, D.** : Vincristine therapy in malignant glioma recurrencies. Neurochirurgia, **16**, 189－198 (1973).

8) **Cardinali, G., Cardinali, G. and Enein, M. A.** : Studies on the antimitotic activity of leurocristine (vincristine). Blood, **21**, 102－110 (1963).

9) **Cutts, J. H.** : The effect of vincaleukoblastine on dividing cells in vivo. Cancer Res., **21**, 168－171 (1961).

10) **Frei, E., Whang, J., Scoggins, R. B., Van Scott, E. J., Rall, D. P. and Ben, M.** : The stathmokinetic effect of vincristine. Cancer Res., **24**, 1918－1925 (1964).

11) **George, P., Journey, L. J. and Goldstine, M. N.** : Effect of vincristine on the fine structure of HeLa cells during mitosis. J. Nat. Cancer Inst., **35**, 355－375 (1965).

12) **Malawista, S. E., Sato, H. and Bensch, K. G.** : Vinblastine and griseofulvin reversibly disrupt the living mitotic spindle. Science, **160**, 770－771 (1968).

13) **Vaitkevicius, V. K., Talley, R. W., Tucker, J. L. and Brennan, M. J.** : Cytological and clinical observations during vincaleukoblastine therapy of disseminated cancer. Cancer, **15**, 294－306 (1962).

14) **Selawry, O. S. and Hananian, J.** : Vincristine treatment of cancer in children. F. Amer. Med. Ass., **183**, 101－106 (1963).

15) **Wagner, E. K. and Roizman, B.** : Effect of the vinca alkaloids on RNA synthesis in human cells in vitro. Science, **162**, 569－570 (1968).

16) **Torelli, U., Torelli, G. and Mauri, C.** : The macromolecular metabolism of ribosomal precursor RNA as a common target of different antitumor drugs. Europ. J. Cancer, **8**, 611－615 (1972).

17) **Jones, K. W.** : The role of the nucleolus in the formation of ribosomes. J. Ultrastruct. Res., **13**, 257－262 (1965).

18) 鵜沼直雄：リボゾームの構造，細胞生物学シンポジウム，**21**, 1－14 (1970).

19) **Luft, J. H.** : Inprovements in epoxy resin embedding methods. J. Biophsic. and Biochem. Cytol., **9**, 409－414 (1961).

20) 佐藤泰山：超薄切片用鉛染色法の一改良法．J. Electron Microscopy, **17**, 158－159 (1968).

21) **Hodes, M. E., Rohn, R. J. and Bond, W. H.** : Vincaleukoblastine I. preliminary clinical studies. Cancer Res., **20**, 1041－1049 (1960).

22) **Warwick, O. H., Darte, J. M. M. and Brown, T. C.** : Some biological effects of vincaleukoblastine, an alkaloid in vinca rosea linn in patients with malignant disease. Cancer Res., **20**, 1032－1041 (1960).

23) **Wilson, C. B. and Baker, M.** : Sensitivity of cell cultures of neural tumors to vinblastine sulfate (NSC-49842). Cancer Chemotherapy Rept., **44**, 9－13 (1965).

24) **Wilson, C. B. and Barker, M.** : Relative cytotoxicity of mithramycin and vincristine sulfate in cell cultures of human neural tumors. J. Nat. Cancer Inst., **38**, 459－467 (1967).

25) **Borysko, E. and Bang, F. B.** : Structure of the nucleolus as revealed by the electron

microscope. Bull. Johns Hopkins Hosp., **89**, 468 -473 (1951).

26) **Bernhard, W., Haguenan, F. et Oberling, Ch.** : L'ultra-structure du nucléole de quelques cellules animales, revelee par le microscope electronique. Experientia, **8**, 58 - 59 (1952).

27) **Marinozzi, V. et Bernhard, W.** : Presence dans le nucleole de deux types ribonucleo-proteines morphologiquement distinctes. Exptl. cell Ress., **32**, 595 - 598 (1963).

28) **Marinozzi, V.** : Cytochimie ultrastructurale du necleole-RNA et proteines. J. Ultrastruct. Res., **10**, 433 - 456 (1964).

29) **Unuma, T., Arendell, J. P. and Busch, H.** : High resolution autoradiographic studies of the uptake of ^{3}H-5-uridine into condensed and dispersed chromatin of nuclei and granular and fibrillar components of nucleoli of novikoff hepatoma ascites cells. Exptl. cell Res., **52**, 429 -438 (1968).

30) **Muramatus, M., Hodnett, J. L., Steele, W. J. and Busch, H.** : Synthesis of 28 S RNA in the nucleolus. Biochim. Biophys. Acta, **123**, 116 - 125 (1966).

31) **Penman, S.** : RNA metabolism in the HeLa cell nucleus. J. Mol. Biol., **17**, 117 - 130 (1966).

32) **Vaughan, M. H., Warner, J. R. and Darnell, J. E.** : Ribosomal precursor particles in the HeLa cell necleus. J. Mol. Biol., **25**, 235 - 251 (1967).

33) **Unuma, T., Senda, R. and Muramatsu, M.** : Nature of the so-called fibrillar component in the segregated nucleolus after treatment of actinomycin D. J. Electron Microscopy, **21**, 60 - 70 (1972).

34) **Heine, U.** : Electron microscopic studies on HeLa cells exposed to the antibiotic toyocamycine. Cancer Res., **29**, 1875 - 1880 (1969).

35) **Tavitian, A., Uretsky, S. C. and Acs, G.** : Selective inhibition of ribosomal RNA synthesis in mammalian cells. Biochim. Biophys. Acta, **157**, 33 - 42 (1968).

36) **Lafontaine, J. G.** : Structure and mode of formation of the nucleolus in meristematic cells of vicia faba and allium cepa, J. Biophysic. and Biochem. Cytol., **4**, 777 - 797 (1958).

37) **Panteleakis, P. N. and Mateyko, G. M.** : Effects of actinomycin D on the nucleoli of different cells in vitro. J. cell Biol., **31**, 154A (1966).

38) **Smetana, K., Lane, M. and Busch, H.** : Studies on nucleoli of leukemic agranulocytes and plasmacytes in multiple myeloma. Exptl. Mol. Path., **5**, 234 - 244 (1966).

39) **Lane, N. J.** : Spheroidal and ring nucleoli in amphibian oocytes. J. Cell Biol., **35**, 421 - 434 (1967).

40) **Smetana, K. and Potmesil, M.** : Ring shaped nucleoli in liver cells of rats after treatment with actinomycin D. Z. Zellforsch., **92**, 62 - 69 (1968).

41) **Torelli, U., Quaglino, D., Artusi, T., Emilia, G., Ferrari, G. and Mauri, C.** : An autoradiographic study of the RNA and protein metabolism of normal plasma cells and phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes. Exptl. Cell Res., **42**, 1 - 9 (1966).

42) **Schoefl, G. I.** : The effect of actinomycin D on the fine structure of the nucleolus. J. Ultrastruct. Res., **10**, 224 - 243 (1964).

43) **Simard, R. et Bernhard, W.** : Le phenomene de la segregation nucleolaire : specificite daction de certains antimetabolites., Int. J. cancer, **1**, 463 - 479 (1966).

44) **Unuma, T., Senda, R. and Muramatsu, M.** : Mechanism of nucleolar segregation-Differences in effects of actinomycin D and cycloheximide on nucleoli of rat liver cells - J. Electron Microscopy, **22**, 205 - 216 (1973).

45) **Jacob, S. T., Steele, W. J. and Busch, H.** : Turnover of 45 S RNA of regeneration liver and walker tumor. Cancer Res., **27**, 50 - 60 (1967).

46) **Macieira-Coelho, A., Ponten, J. and Philipson, L.** The division cycle and RNA-synthesis in diplold human cells at diffffferent passage levels in vitro. Exptl. Cell Res., **42**, 673 - 684 (1966).

47) **Hag, R. J. and Strehler, B. L.** : The limited growth span of cell strains isolated from the chick embryo. Exp. Geront., **2**, 123 - 135 (1967).

写 真 説 明

写真1．多形膠芽腫培養17日目．×800
細胞に大小不同があり，約半数の核では辺縁に陥凹が見られる．約1/7の細胞は多核細胞である．

写真2．vincristine 24時間作用による多形膠芽腫培養細胞の変化．×800
細胞質は萎縮し，細胞の形は類円形となり，空胞が多い．細胞残査と考えられる紫色の無構造物が散在する．

写真3．多形膠芽腫培養細胞17日目．電顕所見．×12000
細胞辺縁には小さな瘤状の突出が所々に存在し，又浅い陥凹も多く存在する．細胞質内にはミトコンドリア及び遊離リボゾームが認められる．核は多角形であり，辺縁に浅い陥凹が多くある．核小体は径約2000 Åの核小体糸による粗な網目状構造を示す．

写真4．vincristine 24時間作用後の多形膠芽腫培養細胞．第1型及び第2型の核小体．×18000
細胞質中には空胞が多い．上方の細胞の核小体は密な網目状構造を示し，顆粒成分は普通（第1型）．下方の細胞の核小体には網目状構造はなく，核小体は均質に見える．径約200 Åの顆粒が少量散在する（第2型）．

写真5．vincristine 24時間作用後の多形膠芽腫培養細胞．第3型の核小体．×48000
円形の均質な構造を呈し，顆粒成分はなく，径約50 Åの細線維成分のみが存在する．

写真6．vincristine 24時間作用後の多形膠芽腫培養細胞．第4型の核小体．×10000
上方の細胞には空胞が多く，核は核膜の湾入が強く，不規則な辺縁を有する．核小体は中央に大きな電子密度の低い部分を有するリング状を呈し，その皮質部分は密な網目状構造を示す．

写真7．vincristine 24時間作用後の多形膠芽腫培養細胞．第5型の核小体．×6000
細胞質中に空胞が多い．核は核膜の湾入の強い不規則な辺縁を有する．核小体は電子密度の高い部分と低い部分に分離している．

写真8．前写真の核小体．×60000
核小体は電子密度の高い部分と低い部分に分離し，いずれの領域にも顆粒成分はない．核小体は径約50 Åの細線維のみから成っている．

写真9．髄膜腫培養18日目．×250
細胞は全般に小さく，細長い三角形の細胞と台形の細胞が混在する．多核細胞が1個認められる．

写真10．vincristine 24時間作用後の髄膜腫培養細胞の変化．×500
細胞質の萎縮，減少の強い金米糖様の形をした細胞と，三角形又は台形の細胞の突起が退縮した細胞が見られる．

写真11．髄膜腫培養18日目．×9600
細胞質内には小さな空胞が多く見られるが，ミトコンドリアや遊離リボゾームも比較的多く存在する．核は浅い陥凹を所々に有するが，比較的規則正しい類円形である．核小体は5角形を呈し，径約1500 Åの太さの核小体糸による粗な網目状構造を有し，顆粒成分も見られる．

写真12．vincristine 24時間作用後の髄膜腫培養細胞．第3型の核小体．×10800
細胞質には大小不同の空胞が多数存在し，遊離リボゾームは少ない．ミトコンドリアには変化はない．核小体は均質な構造で第3型に属する．

写真13．vincristine 24時間作用後の髄膜腫培養細胞．第1型の核小体．×36000
核小体は径約1500 Åから2000 Åの太さの核小体糸による密な網目状構造を示し，約200 Åの顆粒が中等量存在する．核外にはミトコンドリアが多く見られる．

写真14．vincristine 24時間作用後の髄膜腫培養細胞．第2型の核小体．×60000
核小体は正常な網目状構造を失ない，ほぼ均質な構造である．核小体内には径約200 Åの顆粒が散在している．

写真15．vincristine 24時間作用後の髄膜腫培養細胞．第3型の核小体．×90000
核小体はほぼ均質な構造であり，径約50 Åの細線維のみから構成され，顆粒成分は存在しない．

写真16．vincristine 24時間作用後の髄膜腫培養細胞．第4型の核小体．×60000
中央部に明るい部分が2ヶ所あるリング状の核小体である．皮質部分は網目状構造を持たず，細線維成分と顆粒成分から構成されている．

Abstract

Effects of chemotherapy with vincristine on brain tumor cells were assessed in primary cultures derived from human glioblastoma and meningioma.

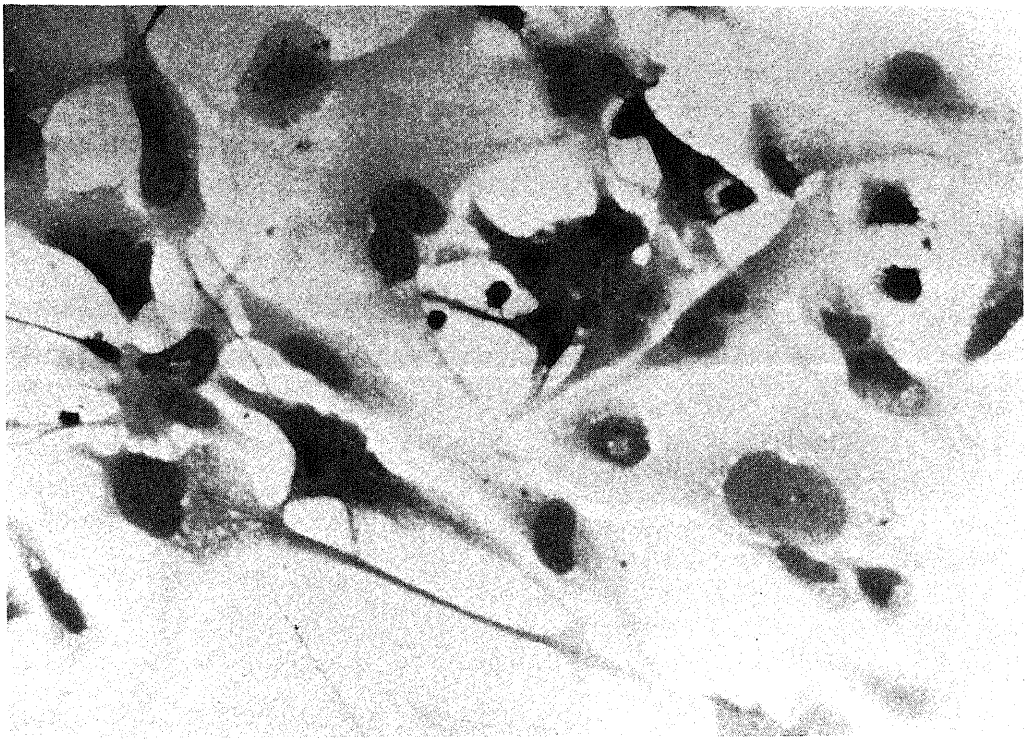
1) The cultured cells of glioblastoma and meningioma showed similar responses to vincristine.

2) Findings with the light microscope showed cytotoxic effects of vincristine.

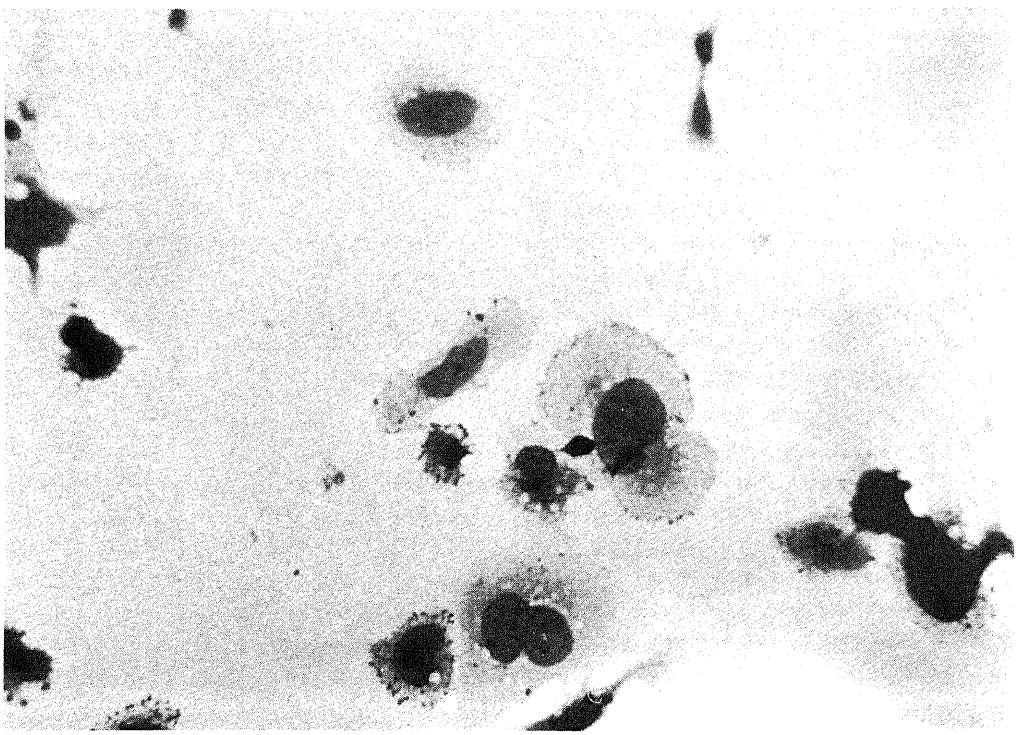
3) Findings with the electron microscope showed changes of nucleolar structure. These changes were classified into five types. Type 1 to type 3 nucleoli indicated that vincristine acted as an agent which interfered with the maturation of ribosome RNA precusor in nucleoli. Type 4 and 5 nucleoli indicated that vincristine acted as actinomycin D.

4) Cells with type 3 and 5 nucleoli which had no granular component had small amounts of free ribosomes.

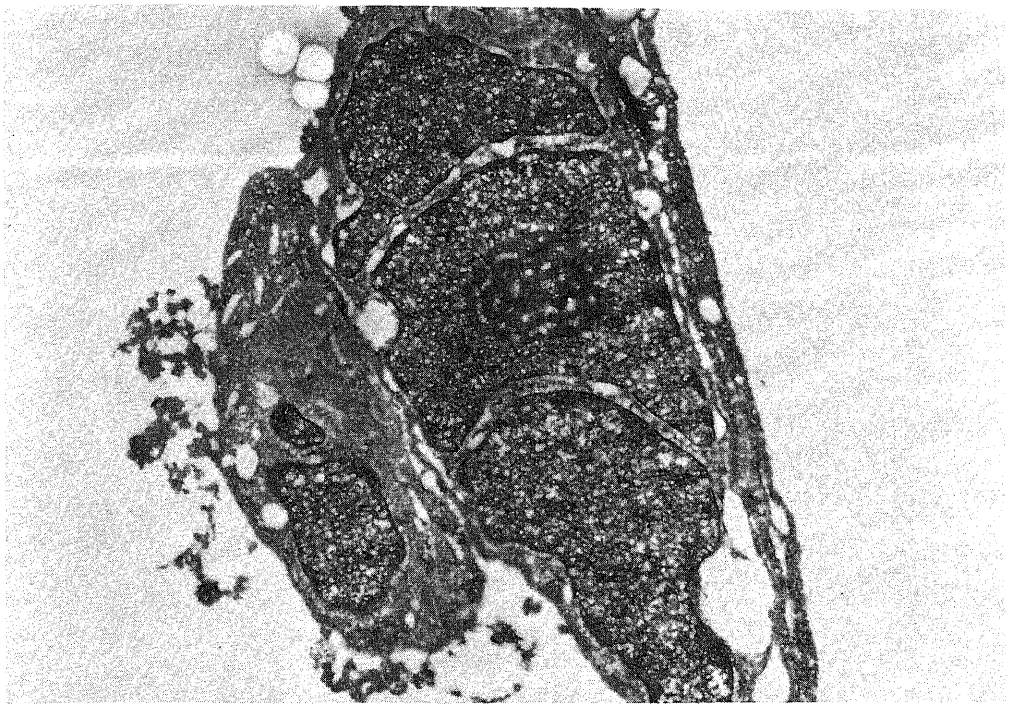
5) These findings indicate that one of the anti-tumor effects of vincristine is due to the suppression of the production of ribosome RNA in the nucleolus.



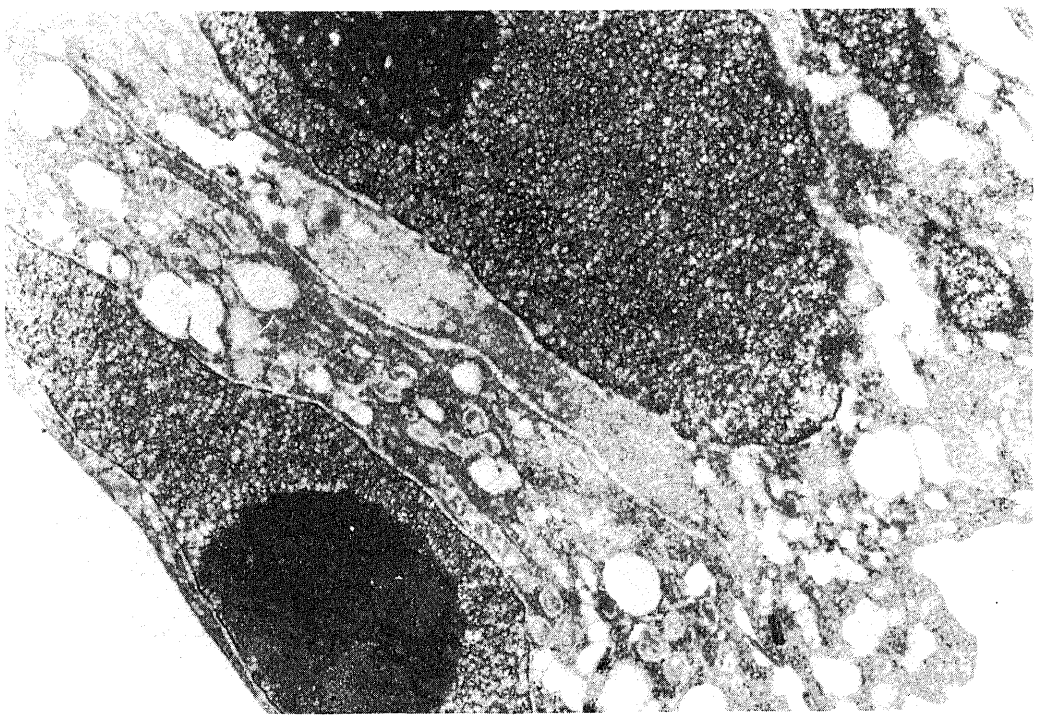
写 真 1



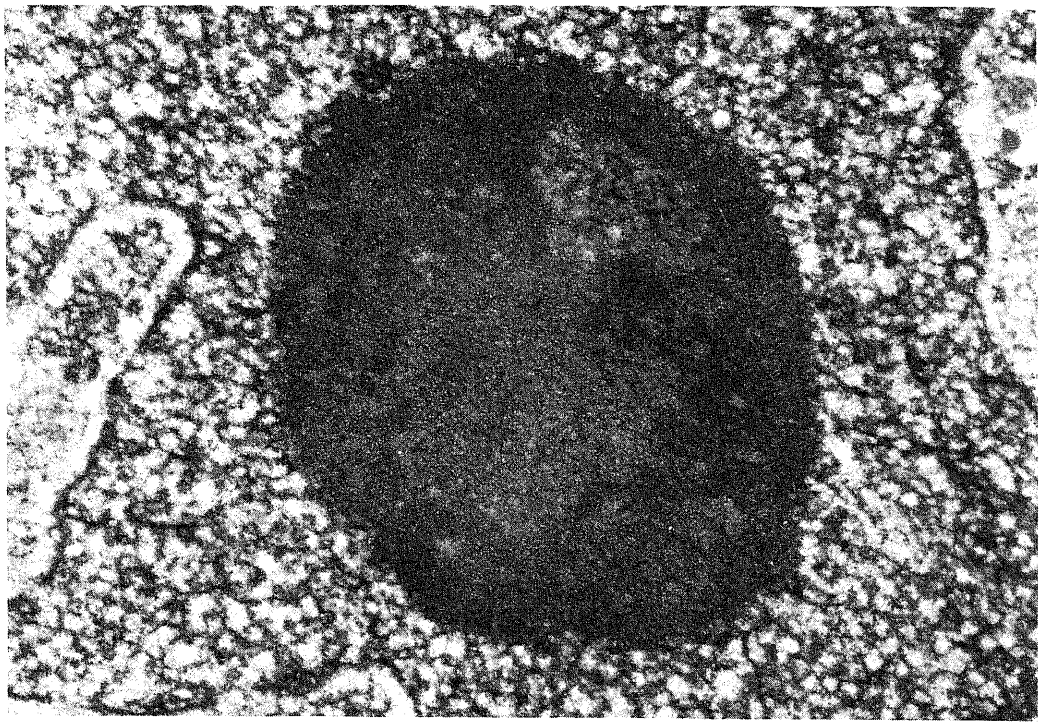
写 真 2



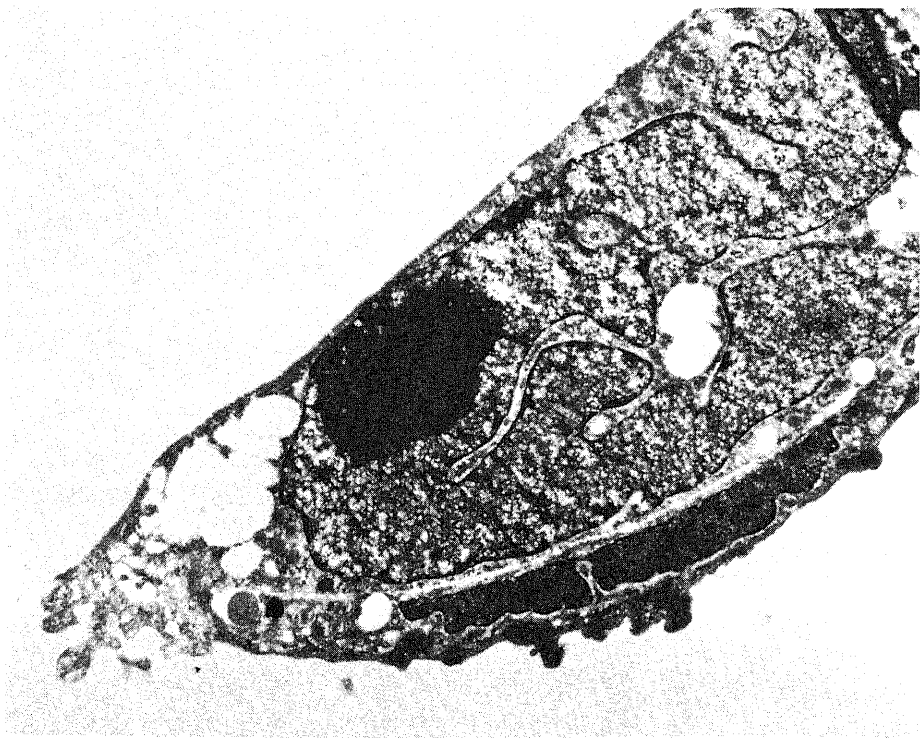
写　真　3



写　真　4



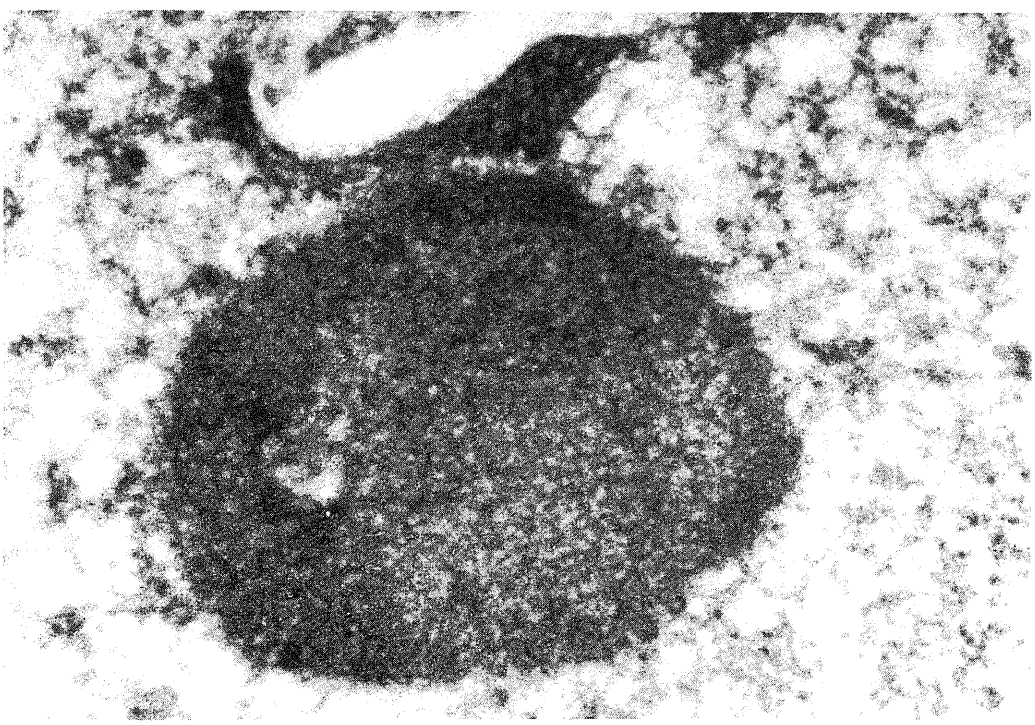
写 真 5



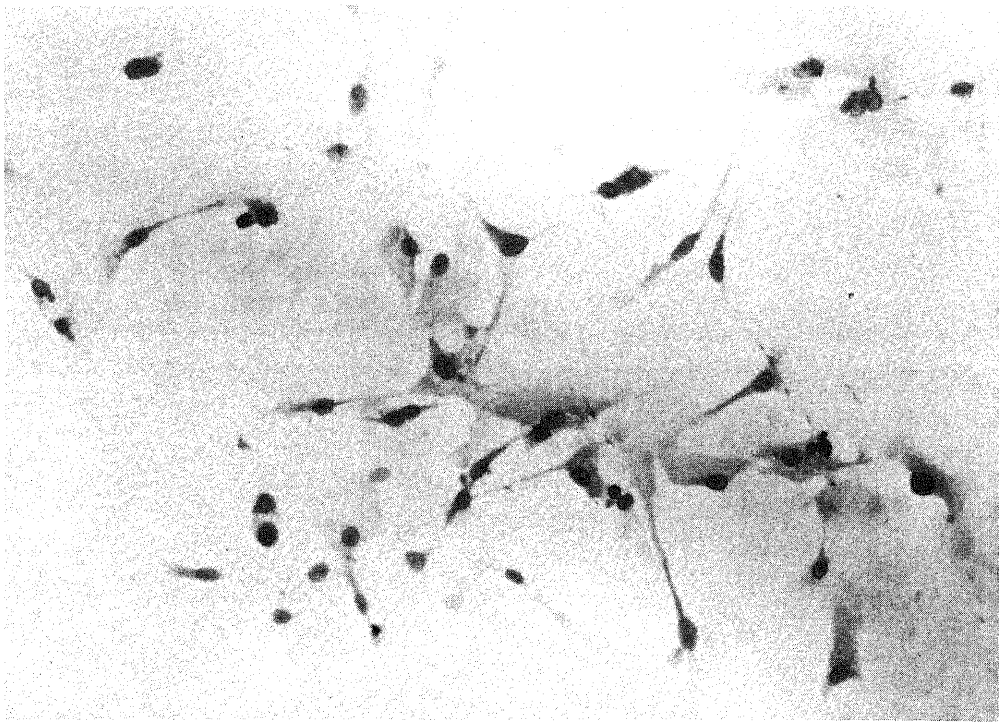
写 真 6



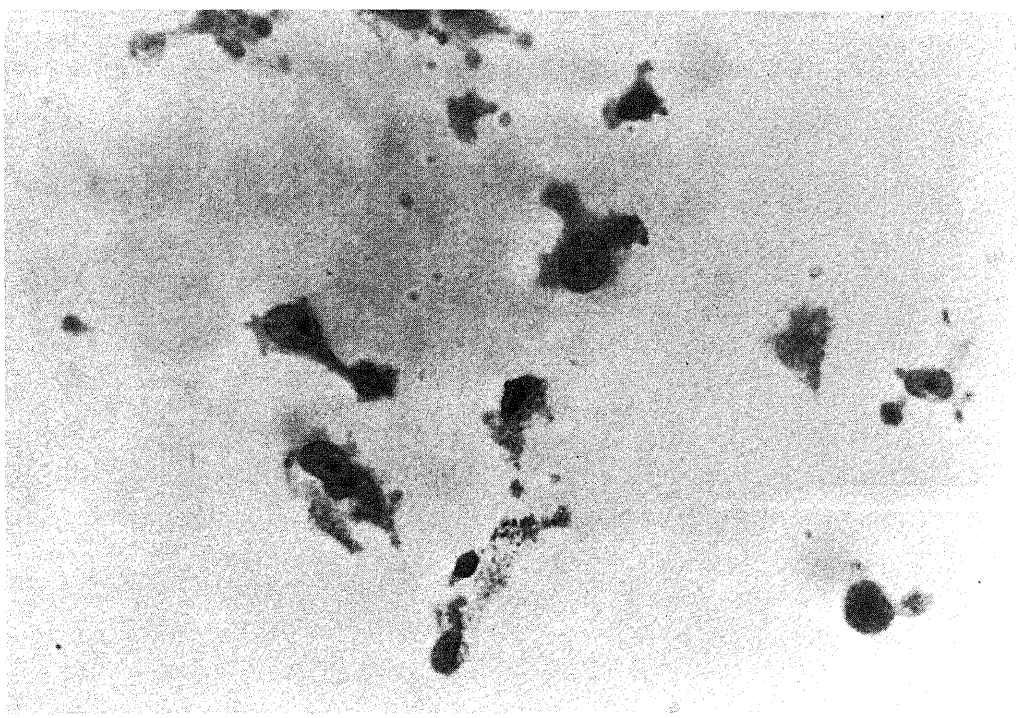
写　真　7



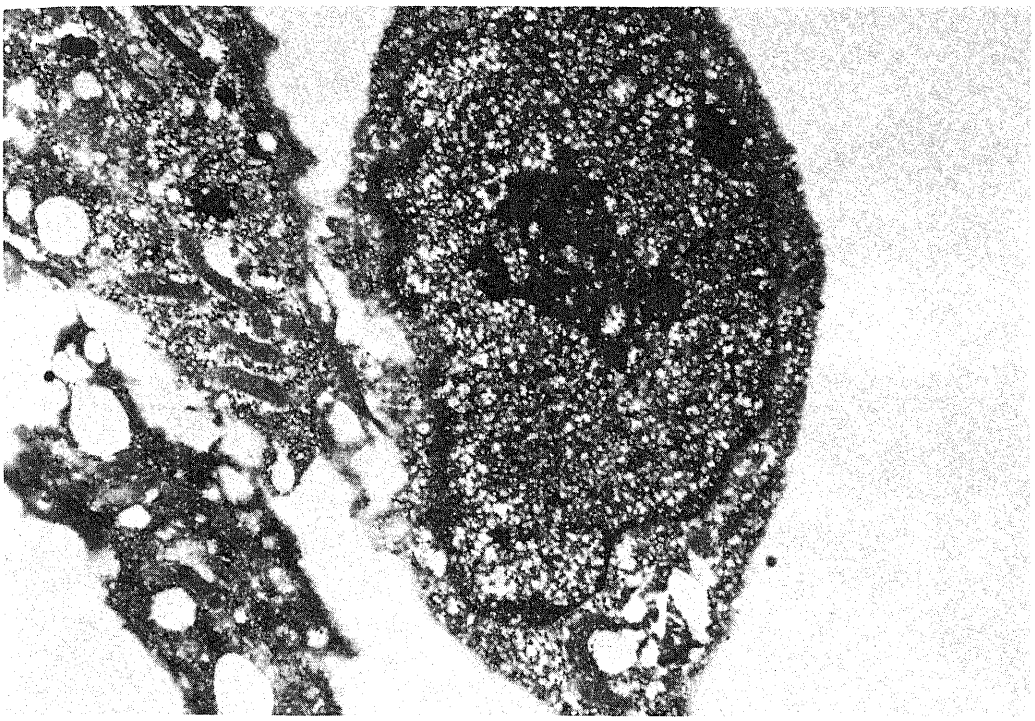
写　真　8



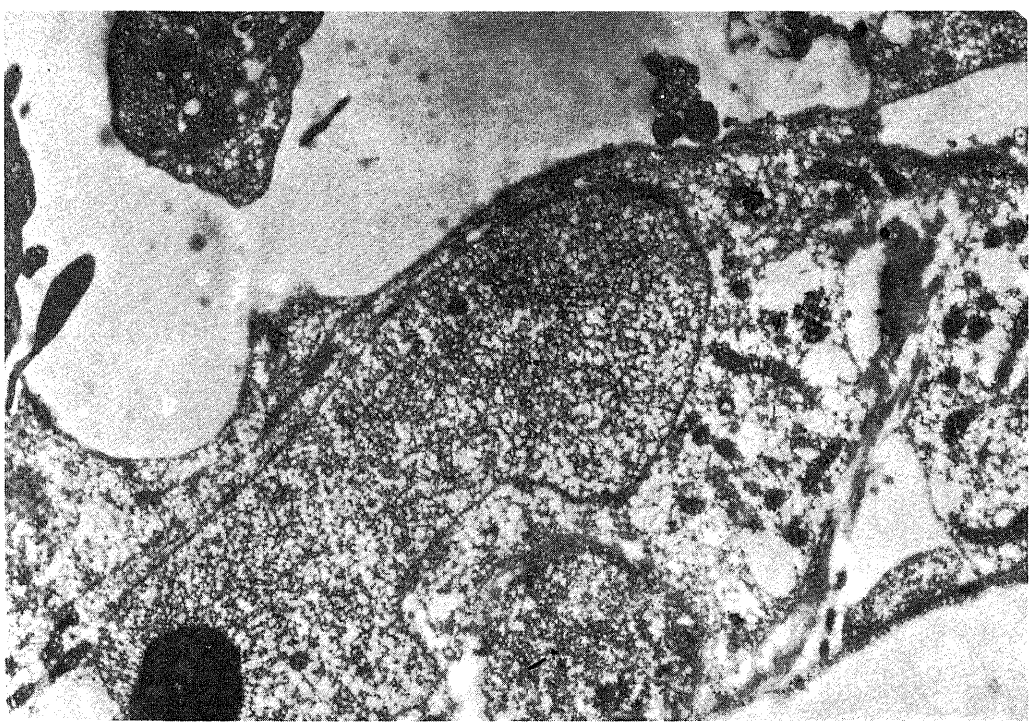
写 真 9



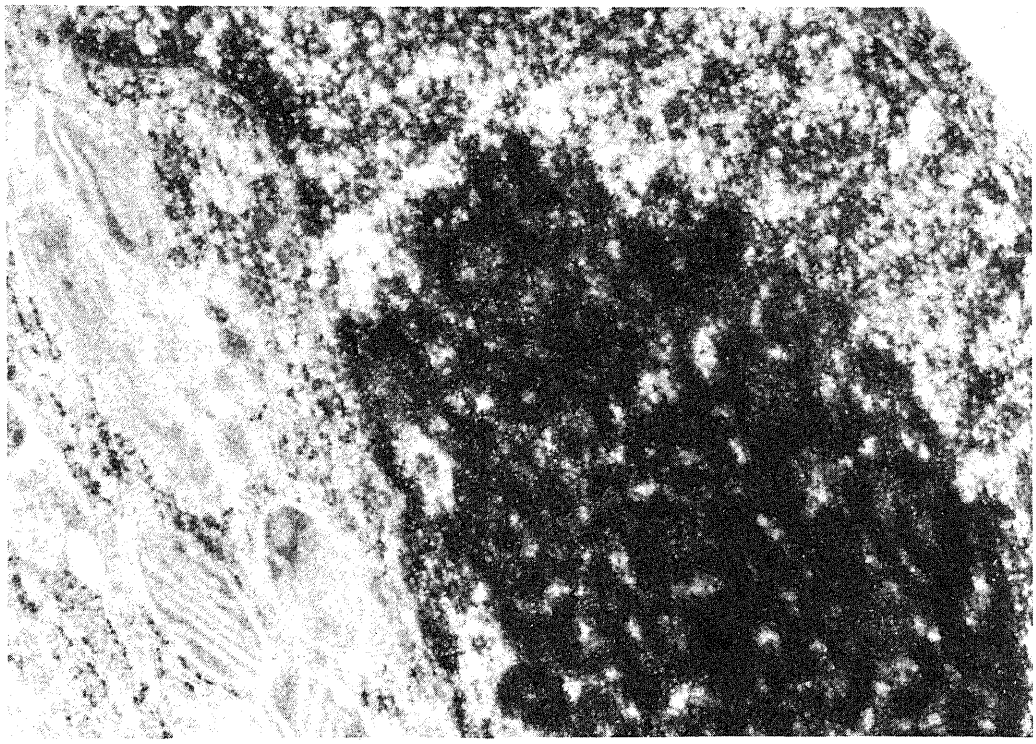
写 真 10



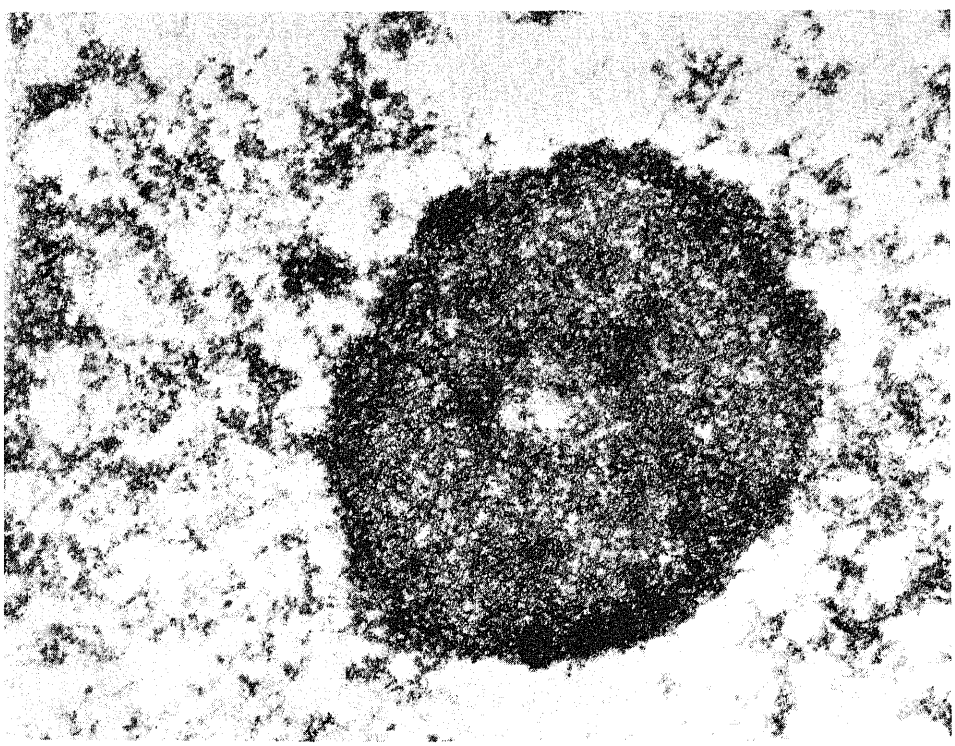
写　真　11



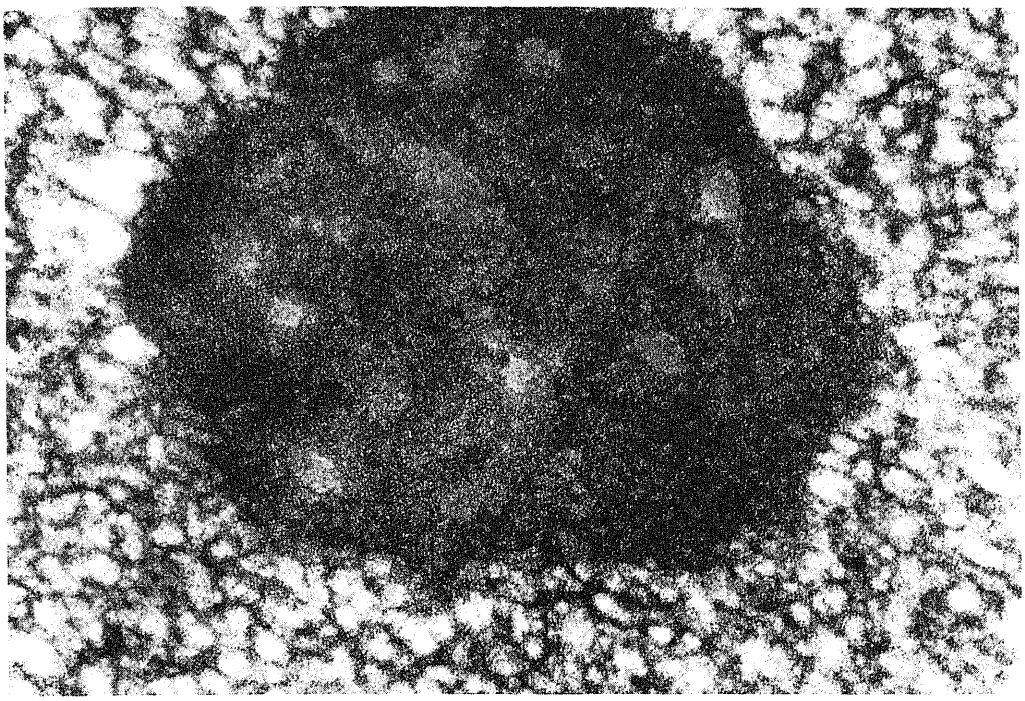
写　真　12



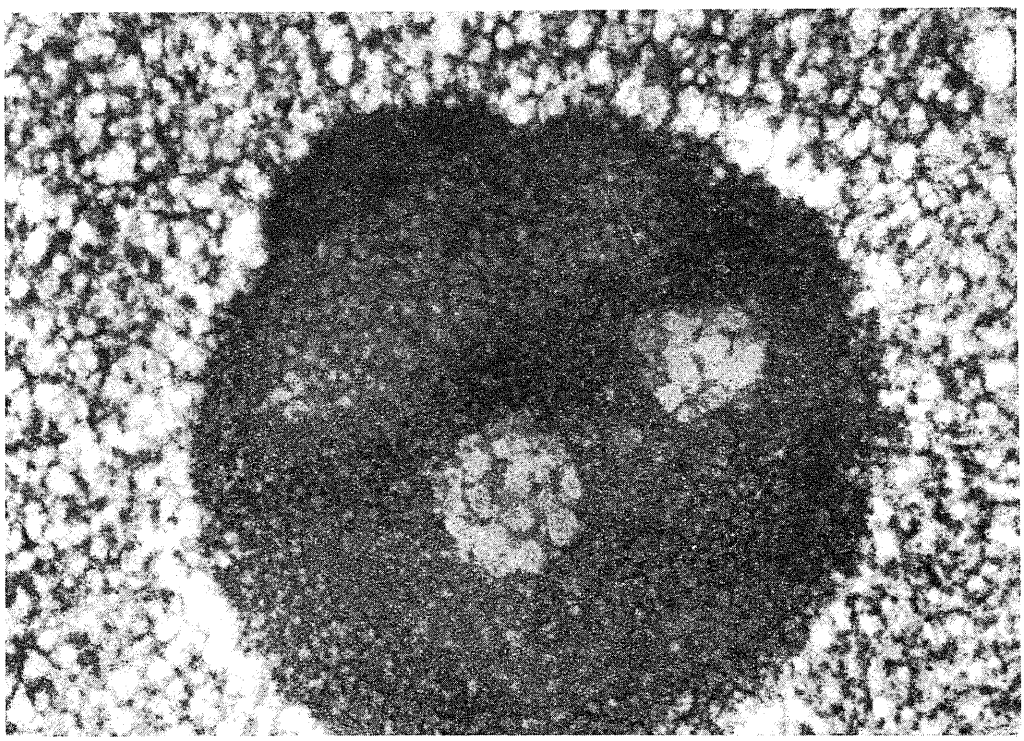
写 真 13



写 真 14



写　真　15



写　真　16