

非病原性細菌抽出物質によるがん細胞選択的 傷害像の電子顕微鏡的観察

上 田 久 子

受付：昭和44年6月15日

ELECTRON MICROSCOPIC STUDY ON SELECTIVE CELL INJURING REACTION BY EXTRACTS FROM NON-PATHOGENIC BACTERIA

Hisako UEDA

Received for Publication, June 15, 1969.

Abstract— Cancer cell selective injuring reaction (CIR), which is standardized with non-specific injury by HgCl_2 , by non-pathogenic bacteria or those extracts is now being established by our previous reports. Suggesting the first action site of CIR on cell membrane, some marginal evidences were accumulated.

In an attempt of the confirmation of these ideas, electron microscopic studies were undertaken by using three cancer cells injured by *streptococcus hemolyticus* (Su strain), extracts from *Bacillus cereus* (Y-27 strain) or *Bacillus brevis* (Y-30 strain), and HgCl_2 . Ehrlich ascites cell (ES), cultured human bone giant-cell tumor cell (G-2) and its HVJ virus carrier cell (G-2-H) after CIR assay were treated with the mixture of ferritin and colloidal gold solution, and submitted to electron microscopic observation.

These observations generally showed the partial defect or obscurity of plasma membrane, the reduction of cellular ribosome, and the intracellular invasion of ferritin and gold particles. An unique electron microscopic observation in injured G-2 and G-2-H by Y-30 extracts was the large or small protrusion of cytoplasm showing amorphous structure without clear damages on plasma membrane.

In the comparison of injuring patterns among three cancer cells, ES showed more cellular damages at an early reaction time than cultured G-2 and G-2-H. A similar higher sensitivity to cell injury was obtained in

G-2-H than in G-2. This higher responsibility for CIR in G-2-H might be derived from some effects of HVJ virus genome on cell membrane or cell conditions suggesting viral modifications of cell entity. HVJ virus particles in various stages of virus maturation were clearly observed in every G-2-H cell showing a proof of viral persistent infection.

緒 言

現在、細菌・ウイルス等微生物の示す抗腫瘍性^{1,2)}については、その作用面よりほぼ2つに大別される。その1つは、菌体成分主に lipopolysaccharide による宿主の免疫機能、特に細胞内皮系の作用促進を介しての間接的抗腫瘍性であり^{3,4)}、他の1つは、或る種のウイルス及び細菌^{1,2)}による oncolysis、即ちがん細胞直接的傷害作用によるものが挙げられる。

後者、即ちがん細胞直接的傷害作用を示すものの中で、岡本、越村等の報告してきた弱病原性溶血性連鎖球菌（溶連菌 Sū 株^{5,6)}）は、その作用機作が未だ完全に解明されていないとはいえ、甚だユニークな一面を有している。この解析を目指して行われた一連の実験で、清水、波多野等⁷⁻¹⁰⁾は、或る種の非病原性細菌のもつがん細胞選択的傷害能を、昇汞による非特異的傷害性に対比せしめ、*in vitro* のみで定量的に表現し得る CIR (Cell Injuring Reaction) assay を開発し、更にその至適反応条件を確立するに至った。その間に見出された CIR 陽性菌—溶連菌と同様な活性を示す一の菌体レベル

でのがん細胞傷害性の追求が更に一步進められ、傷害因子（即ち CIR 因子）が、菌体もしくはその培養濾液より抽出分離され得ることが判明した¹¹⁻²²⁾。

そこで今回は、これら *Bacillus cereus* (Y-27株)、*B. brevis* (Y-30株) からの抽出有効 CIR 因子の、作用機作解明の1つの実験として、*in vivo* free cell である Ehrlich 腹水がん細胞 (ES)、*in vitro* 継代培養人がん細胞 G-2、及びその HVJ virus carrier 細胞 (G-2-H) 各々に対する傷害像の電顕的観察を行い、その一次的作用点を明らかにせんと試みた。もし、それが細胞膜系にあると仮定するならば、(既にそれに対するいくつかの傍証が得られている¹⁰⁻¹²⁾が) CIR の結果生ずるであろう如の微小な膜欠損は、反応系に加えた horse spleen ferritin (粒子径約110Å) 及び colloidal gold (粒子径50~400Å) の、細胞膜欠損部位における侵入像や細胞質内取り込みを招来するであろう。かかる形態学的変化を電顕的に証明するために、以下の実験を行った。

実験材料および実験方法

1. CIR assay

これについての詳細は既に報告されているが⁸⁻¹⁰⁾、その概略は、或る種の非病原性細菌乃至その抽出物質のもつがん細胞選択的傷害能により、細胞外へ流出せしめられた細胞内 RNA 及

び酸可溶性物質を、反応上清の OD 260m μ 値又は orcinol 反応値として測定し、非特異的活性をもつ昇汞 (HgCl₂) のそれと比較するという方法である。従って、CIR 値は次の如く表現される。

CIR値(%) =

$$\frac{[(\text{Cell} + \text{Sample}) - (\text{Cell} + \text{DBS}) - (\text{Sample} + \text{DBS})] \text{OD}260\text{m}\mu\text{値またはOD}670\text{m}\mu\text{値}}{[(\text{Cell} + \text{HgCl}_2) - (\text{Cell} + \text{DBS}) - (\text{HgCl}_2 + \text{DBS})] \text{OD}260\text{m}\mu\text{値またはOD}670\text{m}\mu\text{値}} \times 100$$

実際には、試料の Dulbecco's buffered saline (DBS)²³⁾ による2倍希釈系列を作り、

その各々について種々の細胞一代表としては ES—に対する CIR 値を求め、それが50%を示す希釈倍数をもってその試料の一単位と定義し、CIR unit/ml で表わした。又、必要に応じて試料の人の O 型赤血球に対する溶血活性を測定¹⁹⁻²²⁾し、蒸留水による溶血性と比較して、HA unit/ml として表現した。

2. Ehrlich 腹水がん細胞 (ES) 浮遊液の調整

上記 CIR 活性の表示に多くの場合用いられた ES 細胞浮遊液を作るには、dd 系白色マウス(体重20~24g)に ES 0.2ml (5×10^6 cells/mouse) を腹腔内接種後、8~10日目の腹水を採取し、DBS にて3回洗浄、DBS で約 5×10^7 cells/ml となるように再浮遊した。

3. 人骨巨細胞腫由来継代培養細胞 (G-2) 及びその Parainfluenza virus-HVJ carrier 細胞 (G-2-H) の組織培養

両細胞とも、Eagle 液に10%仔牛血清加 medium で、培養角瓶 ($4.0 \times 10.0 \times 4.0$ cm) を用い、3~5日後に monolayer となるように培養した。その基本的継代培養法は、通常の trypsinization 法²³⁾に従った。

なお G-2-H 細胞は、HVJ virus を実験的に感染させた後、現在迄約50継代培養を重ね、7ヶ月以上を経過している G-2 細胞であるが、細胞内 virus 増殖を示唆する cytopathic effect (CPE) は光顕的に殆んど認められず、増殖し続けている。しかも HVJ virus の持続感染^{24,25)}が、hemadsorption (HAD)²⁶⁾として継代毎に認められ、G-2 細胞の viral modification が予想された細胞である。

4. 使用細菌の培養及び CIR 有効物質分離法

岡本、越村等^{5,6)}の *Streptococcus hemolyticus* (Su株)、及び CIR assay によるスクリーニングで、CIR 陽性菌として見出された¹⁴⁾ *Bacillus cereus* (Y-27株) と *B. brevis* (Y-30株) である。これらの中、Su 株は未だ活性物質が完全に分離されていないため、普通ブイヨンによる semi-synchronization¹⁷⁾ を2回行った後、ブイヨン又は TS 培地¹⁴⁾ で 37°C

14hrs 静置培養後、DBS にて2回洗浄、OD $660m\mu = 1.00$ の濁度に DBS で再浮遊した菌体そのものを用い、Y-27、Y-30株よりは、各 CIR 活性物質を抽出して、本実験は行われた。

Y-27株よりの CIR 活性物質分離精製は、当教室の矢吹が行った方法^{20,21)}に従って、14時間培養後の菌体を French presser にかけ、その上清を透析、Batch 法 (DEAE-cellulose, pH7.8 phosphate buffer 化 0.8% NaCl) による分画を経て、再透析後凍結乾燥して求められた。又、Y-30株よりの抽出法は、同じく野垣が用いた方法²²⁾で、culture fluid 上清を pH 8.4 に修正後、1/100 容の active carbon 及び DEAE 処理、次いで collodion bag 濾過により得られた。かくて Y-27株、Y-30株抽出物質は共に、Es に対する CIR 活性が 4~6 CIR unit/ml のものが実験に供された。

5. CIR における ferritin (Fe.), colloidal gold 粒子 (Au) の取り込み。

前記 ES、G-2 及び G-2-H 細胞に、Su 株菌体、及び Y-27、Y-30株抽出有効物質を経時的に作用せしめ、低速遠沈により反応上清を除いた後、一度 DBS で洗い、下記の混合液を加えてから 4°C で10分間振盪した。

混合液：DBS 4 ml + ferritin (N.B.C製、2回再結晶化)
3 ml + colloidal gold (R.C.C.製) 1 ml。

ES の場合は、CIR 後の細胞沈渣 (約 2.5×10^7 cells) 当り上記混合液を 1 ml 加えた。

培養細胞の場合、強い傷害を受けた細胞はガラス面より剝離するため、反応上清を軽く遠沈して遊離した細胞を集め、混合液 2 ml に再浮遊して元の bottle に戻し、4°C で10分間振盪した。猶、この細胞表面の傷害部位よりこれら微粒子の取り込み像を見る実験法は、Seeman の方法²⁷⁾を若干 modify したものである。

6. 電顕用試料作成法

混合液作用後の ES には、2% glutaraldehyde-DBS 15分、1% osmic acid-phosphate buffered saline (pH 7.4) 60分の二重固定を行

い、段階アルコールで脱水後、Epon 812で包埋した。各段階への移行は、低速遠沈を繰り返すことにより行った。

組織培養細胞の場合は、上述のごとく、CIR後混合液を作用させ、glutaraldehyde 固定後、rubber policeman で細胞をガラス面より静かにはがし、遠心管に集め、以後はESと同様の操作を行った。

かくて超薄切片作製後、電子染色は酢酸ウラン次いで、ferritin 粒子との鑑別を明らかにするため、Karnovsky B staining による一酸

化鉛法²⁹⁾を施し、鏡検した。

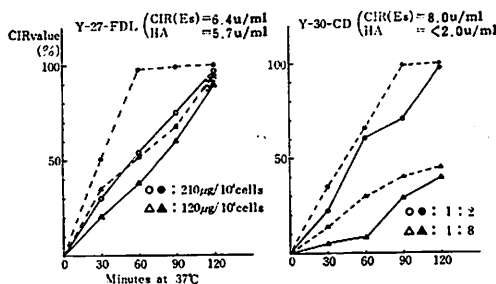
猶、HVJ virus carrier state を証明するため、G-2-H細胞及びG-2細胞(controlとして)に0.25% guinea pig red cell-PBSを60分間4°Cで作用せしめ、HVJ virus 粒子の存在、赤血球のG-2-H細胞面への吸着状態を観察し、virus carrier 細胞(持続感染細胞)の電顕的確認も試みた。電顕的試料作成法は、前記微粒子の取り込みを行わず、その他は全く同様の操作を行った。

実 験 報 告

1. ES 及び G-2, G-2-H における CIR assay

CIR assay に用いられた Y-27 株及び Y-30 株抽出半精製物質は、ES に対し Fig. 1 に示す如く、各々に 6.4 CIR unit/ml (2.1mg/ml) で、8.0 unit/ml (原液で) の CIR 活性が認められた。しかも Y-27 株抽出物質 (Y-27-FDL) はこの濃度で溶血活性 (HA=5.7u/ml) を示したが、Y-30株抽出物 (Y-30-CD) には殆んど認められなかった (HA=<2.0u/ml)。ここで、これら Y-27-FDL, Y-30-CD は、培養人がん細胞 (THEL) 及び培養人正常細胞 (PH EL) に、濃度及び時間の至適条件で作用させると、がん細胞をより選択的に傷害することが既に認められている¹⁹⁻²²⁾。

Fig. 1. CIR assay of Y-27-FDL and Y-30-CD in G-2 (○—○) and G-2-HVJ (●...●)



又、THEL とは異なる人がん継代培養細胞である G-2 及びその HVJ virus carrier G-2-

H 細胞を用いて CIR assay を行った処、Fig. 1 の如き結果を得た。両細胞の傷害性を比較すると、共に濃度反応時間の至適条件で明らかに強い傷害性を受けるが、特に反応時間 90 分迄は、G-2-H 細胞の方が常により高い CIR 値を示した²⁹⁾。このことは、virus 持続感染細胞としての G-2-H における viral modification と関連性があり、それが CIR responsibility の変化として捉えられたと考えられるであろう。

2. ES 細胞に対する CIR 後の電顕像

対照の DBS との反応 45 分までは (Photo. 1-a, -b)、細胞膜及び細胞内小器官 (endoplasmic reticulum, mitochondria 等) の unit membrane 構造^{30,31)}は保持され、細胞内 ribosome の流出も殆んどなく、Fe, Au 粒子の細胞内取り込みは全くみられなかった。

CIR の standard としての昇秉による非特異的傷害後は、(Photo. 2-a, -b) に示す如く、反応 15 分の早期において mitochondria は膨潤し、その cristae が厚膜化若しくは消失するに至った。又、ribosome の流出も著しく、細胞質内には vacuole が多発し、Fe, Au 粒子が多く取り込まれていた。細胞膜は明らかに一部欠損し、その部位からの Fe, Au 粒子の陥入像が観察された。

Su 株菌体 30 分反応後は (Photo. 3-a, -b, -c, -d)、何れも傷害は甚しく、その典型的な表現

としての膜構造の一部欠損, ribosome の流出, Fe, Au 粒子の取り込みの3つの変化が認められた。何れの場合にも, 菌体が細胞と直接 contact した鏡検像は得られず, 菌体の作用発揮にそれが必要か否かの問題は, 更に検討を要するであろう。Photo. 3-a の如く, vacuole が細胞膜の一部として多数隣接した状態を呈し, multi-vesicular body の出現 (Photo. 3-b) や, mitochondria 内部に ribosome 様の微粒子が認められることもあった (Photo. 3-c)。又, photo. 3-d の如く, virus-like particle (恐らく murine leukemia virus と考えられる) が matrix らしきものを形成して居り, latent virus が Es に感染増殖した結果, carrier virus³²⁾として観察されたものであろう。

Y-27-FDL との反応15分においては (Photo. 4-a), 既に ribosome の流出があり, 細胞質内には, electron dense body の出現があった。45分反応後では (Photo. 4-b), 細胞内 organella の膜構造は殆んど失われ, vacuole も増加し, ribosome の流出は更に進行していた。従って, Fe, Au 粒子は vacuole の中にまでも取り込まれ, 核膜にも傷害像が認められた。

Y-30-C の CIR 後では (Photo. 5), Y-27-FDL による傷害像と特に著しい差異はないが, その傷害程度は, 反応時間にして約10分ずつ遅れて出現した。又, 傷害の末期には, lysosome と思われる electron dense な小体が多く認められた。

3. G-2 細胞における CIR 後の電顕像

DBS 60分反応後の対照系では (Photo. 6-a), 細胞内小器官の膜系は完全に保持され, ribosome の流出も殆んど認められない。又, Fe, Au 粒子は隣接した細胞の微小な間隙にも入り込んでいたが (Photo. 6-b), 細胞質内には全く見られず, 殆んどは細胞外に存在していた。

ES の場合と同じく, 非特異的傷害を示す昇汞を15分反応せしめると (Photo. 7) 細胞質内は vacuole が網状に連なって生じ, いたる処, Fe, Au 粒子の取り込みが著明に認められ

た。

Y-27-FDL 反応60分では (Photo. 8-a, -b), 細胞質内に electron dense body が多発し, ribosome の流出も著しく, 部分的な細胞膜欠損及びその部分からの Fe, Au 粒子の侵入像 (Photo. 8-b), 核膜等の変化も認められた。

Y-30-CDC を60分作用せしめると (Photo. 9-a, -b), ES 細胞のときと全く異なり, 細胞質が部分的に膨化して袋状を呈し, その内部は無構造で, ribosome 様の均一な微粒子が粗に散在していた。膨化部位の細胞膜は比較的鮮明で, Fe, Au 粒子の取り込みはあまり著明ではなかった。又, 特異的な円形像を示す顆粒状或いはは多層板状のミエリン塊が細胞質内に認められることもあった (Photo. 9-b)。他方, 細胞膜の欠損が著しく, 細胞質内が Fe, Au 粒子で充満された像 (Photo. 9-c) も得られたが, 細胞質の一部が膨化し, 明らかに電子密度小なる無構造を呈するのは共通していた。

4. HVJ virus carrier 細胞 (G-2-H) の電顕的観察

前記 G-2 細胞との主なる相異点は, HVJ virus が持続感染の形で常在し, ある条件下で, 細胞のいくらかに virus 増殖を起し, それが細胞より遊離するため, 常に20~30%の HAD が認められることである。しかも HAD が認められぬ細胞においても, virus genome 存在による影響は, 何らかの形で生じていると考えられる。その一面として, 前記 CIR responsibility の上昇があげられるが, 電顕的形態学上, 以下の特徴が捉えられた。即ち, HVJ virus の細胞外遊離のあったと思われる G-2-H 細胞の細胞膜の一部には, myxovirus のユニークな細胞外放出パターンとしての budding を思わせる像 (Photo. 10-a) が認められた。細胞表層には, 遊離した完全な mature virus particle が見られ, 細胞質内には, virus 増殖の matrix らしきものが認められる場合もあり (Photo. 10-b), 何れも virus の存在を電顕的に確認できた。更にモルモット血球の hemadsorption を実験的に起させてみると, 高密

度無構造の赤血球が偽足様の形態をとって、G-2-H細胞表面に接触し、その間に HVJ virus 粒子と思われるものが存在していた (Photo.11)。又、HVJ virus 増殖 (virus 粒子の maturation の進行) のやや進んだもの (Photo. 12-a, -b) においては、細胞内小器官のミエリン化像が認められ、virus による CPE への一過程と考えられた。

5 G-2-HVJ 細胞における CIR 後の電顕像

先づ対照として DBS との反応系 (60分) をみると、未処理の G-2-H 細胞像 (Photo. 10-a, -b) と比較して、前記 virus maturation の進行度に依って、若干 ribosome の流出はあるものの、膜構造は比較的鮮明に保たれ、Fe, Au 粒子の取り込みは少ないもの (Photo. 12-b) と、virus 増殖の CPE によると思われる Fe, Au 粒子取り込みの若干認められる場合 (Photo. 12-a) があつた。しかしながら、virus maturation の進んでないものでは、傷害像としてのこれらの所見を欠くものが多かった。

昇汞との反応15分では (Photo.13), budding

で遊離しつつある HVJ virus 粒子が、 $HgCl_2$ による CIR の結果生じた細胞膜欠損部位から放出されるのが認められた。又、ribosome の流出は著しく、Fe, Au 粒子が不均一に多数取り込まれていた。

Y-27-FDL による反応の初期 (30分) において (Photo. 14-a), 細胞質は ribosome が限局的に流出し、そこには polysome らしきものが粗に散在していた。更に mitochondria を起源とするらしいミエリン化像も時に見られ、細胞表層には、HVJ virus 粒子の存在も認められた。進んで60分反応後では (Photo. 14-b), 細胞膜の欠損が著しく、従って ribosome 流出も全域にわたり、vacuole は時に virus 粒子を含んで居り、Fe, Au 粒子の取り込みも著明で、その傷害像は核膜にも及んでいた。

Y-30-CDC を30分作用させた場合には (Photo. 15-a, -b) 先の G-2 細胞のときと同様、細胞質の一部にユニークな膨化像が認められ、Fe, Au 粒子の取り込みが diffuse に甚しい場合 (Photo. 15-a) と、比較的少ない場合 (Photo. 15-b) が見られた。

考 察

以上、Ehrlich 腹水がん細胞 (ES), 培養がん細胞 (G-2) 及びその HVJ virus carrier 細胞 (G-2-H) を用い、*Bacillus* 属細菌抽出物質による選択的傷害作用の、電顕レベルでの解析を試みたが、一般に培養細胞よりも ES の方が、同じ条件下でより早期に傷害をうけやすかつた。これは、ガラス面に半分自由表面をうばわれている培養細胞より、完全に free cell としての ES の方が、反応表面積が大きい事によるものと考えられる。

一般に、生きている細胞は、多少とも Fe, Au 等の微粒子を貪食する能力を有するといわれているが、前記対照としての培養細胞の DBS 反応系をみると、微粒子は極端な場合、隣接した細胞間隙にまで入り込んでいても、細胞質内には全く見られなかつた。従って、本実験においては、たとえ直接、細胞膜欠損傷害像が見

られなくても、微粒子の細胞内とり込みは、細胞膜欠損部位発生の間接的証明になると考えられる。又、昇汞によるあらゆる細胞に対する非特異的傷害像と、他の細菌乃至その抽出 CIR 因子によるものとは、反応時間を初めとしてその傷害像も若干趣きを異にする事から、同じ OD 260m μ 物質が細胞外へ流出されるといっても、両者による CIR の作用機作は異なるものといえよう。このことは、 $HgCl_2$ と Su 株菌体による ES での CIR の経時的測定⁹⁾、及び位相差顕微鏡の観察乃至 CIR 後の ES 細胞を toluidine blue 染色した光顕的所見の差¹⁰⁾ 等からも予想されていたが、今回の電顕レベルでの検討からも、それが裏付けられたといえる。

Y-30株有効物質による傷害像で、G-2及びG-2-H細胞のみに特異的な一部細胞質の膨

化像が認められたのは、1 つには細胞の差（マウスと人の種属、*in vivo* と *in vitro* 細胞という起源等）によるものと考えられ、又他方には、ES の時使用された Y-30 有効物質が、精製の初期のものを用いたため、本来有する特異性が、若干マスクされた可能性も考えられる。

又、Y-30 sample は現在その精製法につきまとう 2% NaCl の高張液による非特異的傷害性が、かかる膨化像を惹起せしめたのかも知れぬという疑問が実験当初もたれたが、同じ高張条件での対照には、かかる変化が全く認められなかった点から、これはやはり得られた Y-30 活性物質による特異的傷害像と言えよう。但しかかる特異像は高張の条件下における Y-30 活性物質の作用特性と考えねばならぬかもしれない。ちなみに、*Staphylococcus* の α -toxin で red cell を溶血せしめると、二段階の反応系を有し、その初めの step は酵素反応で、その時は前記のごとく袋状の膨化像が認められるという報告がある⁸⁵⁾。従って、Y-30 活性物質は、その電顕的作用像の観察からみると精製の終末産物としては、酵素として得られうる可能性をもっているが、膨化像という特異的作用像の出現に高張の条件が必要かどうかはその時点で再検討の余地がある。

培養細胞における CIR assay をみると、G-2 細胞よりも HVJ virus carrier G-2 細胞の方が常に高い CIR 値を示した。更に、CIR 反応の比較的初期及び、virus carrier cell においては細胞質内に、ミエリン化像が多く認められた。この事は、基礎細胞質であるリン脂質タンパク複合体から lipophanérose が起り、複合体から遊離したリン脂質が、水をとって著しく膨化する為生ずるのが本態といわれている⁸⁴⁾

結 論

Ehrlich 腹水がん細胞 (ES)、G-2 細胞 (G-2) 及びその HVJ virus carrier 細胞 (G-2-H) における、*Bacillus* 属細菌抽出物質による選択的傷害性の一次的作用点を明らかにする目的で、それらの傷害反応 (Cell Injuring Reaction=CIR) 後、各細胞への ferritin (Fe),

が、CIR による病的傷害及び virus による cytolysis (CPE の一表現形として) によって、細胞の終末変性段階における退行変性に関連して出現したものと解釈されよう。

かくて、G-2 に比して HVJ carrier G-2-H は、virus maturation に伴う細胞変性及び細胞膜の変異という base があるためか、電顕的 CIR 傷害像は G-2 より早期に強く認められ、これが前述の CIR assay における被傷害性の差を裏づけているものと考えられる。これら HVJ virus の persistent infection をうけた細胞に見られる CIR responsibility の変化、電顕的傷害像の差等の関連性は、最近いくつかの oncogenic virus (SV40, adeno 等) 及び non-oncogenic virus (herpes, vaccinia 等) の感染初期の細胞膜に出現するといわれる viral specific surface antigen⁸⁶⁾ や、viral heterogenization をうけた transplantation antigen^{86,87)} とも考え合せると、将来さらに検討されるべき問題があるといえよう。

以上を通観して考えると、いづれの菌有効物質についても、その傷害性は先づ細胞膜の欠損から始まり、細胞内に lysosome, ミエリン像, vacuole 等が多発して、細胞内小器官の膜構造が退化するに至り、同時に ribosome の細胞外流出が進行し、終には核質まで傷害性が及ぶものと考えられる。

何れにしても、これら諸細胞膜系の傷害像からみて、CIR 因子は細胞膜系傷害が一次的作用点であるといえる。CIR について、かかる方向性をもった作用機作解明は、細胞一般の膜構成の差の解析に有用であり、更に選択的特異性との問題とからんで、がん・非がん細胞レベルでの比較検討も可能になるといえよう。

colloidal gold (Au) 粒子取り込み及び細胞の形態学的変化を、電顕的に観察し、次の結果を得た。

1. G-2 及び G-2-H 細胞の CIR assay を行った処、両者とも至適反応条件で強い傷害性を受けが、一定の反応時間までは、G-2-H 細

胞の方が常により高い CIR 値を示し、高い CIR responsibility が証明された。

2. CIR 後の細胞を電顕的に観察してみると、対照としての DBS との反応系では、何れの細胞間も反応時の経過に伴なって多少とも細胞内小器官の膜構造が不鮮明となるが、細胞膜欠損はなく、従って ribosome の流出及び Fe, Au 粒子の細胞内取り込みは全く見られなかった。

3. 非特異的傷害能をもつ昇汞を反応させると、反応時間15分で既に著明な傷害像(膜の部分的欠損, ribosome 流出, Fe, Au 粒子の取り込み等)がみられた。

4. 何れの細胞においても、Y-27 抽出物(Y-27-FDL)による傷害性の進行は先づ細胞膜の一部欠損に始まり、細胞内に lysosome, ミエリン像, vacuole 等細胞の autocytolysis の徴候が顕著となり、従って細胞内小器官の退化, ribosome 流出が激化して、終には核質にまで傷害が及ぶ事が明らかになった。

5. Y-30抽出物(Y-30-CD)による CIR 後の電顕像では、ES 細胞においては、Y-27-

FDL によるそれと著しい差異が認められなかった。しかしながら G-2, G-2-H 細胞においては、細胞質の一部に、ユニークな袋状の膨化像が観察され、CIR が進んだ所では基本的に Y-27-FDL とほぼ同様の傷害像を示した。

6. G-2-H 細胞においては carrier virus としての HVJ virus 粒子が、細胞内 matrix 中に又は細胞膜近くの表層に、或いは budding として成熟度は各々異なるにせよ明らかに認められた。

7. G-2-Hにおける持続感染 virus (HVJ) の CIR に及ぼす影響が、細胞膜における vira₁ modification と関連して論じられた。

終りに実験材料調整及研究推進に御協力を頂いたウイルス部各位に厚く感謝します。

本論文の一部は第42回日本細菌学会総会(徳島, 1969年4月)において発表された。又本研究の一部は文部省科学研究費(「がん特別研究」)によっている。

文 献

- 1) Gericke, D : Naturwissenschaft, 23, 629 (1965).
- 2) Klyuyeva, N. J. & Roskin, G. J. : Biotherapy of malignant tumors, (1963), 5, Pergamon Press, Oxford-London-New York.
- 3) 渡辺貞:蛋白質, 核酸, 酵素 13, 929 (1968).
- 4) 螺良英郎, 平尾文男, 藤沢和雄, 小倉剛, 正木繁, 見村吉弘, 竜田正晴, 湯徳正道:最新医学, 22, 2281 (1976).
- 5) Okamoto, H., Koshimura, S., Hirata, R., Murasawa, K. & Shimizu, R.: Z. Krebsforsch. 62, 408 (1958).
- 6) Okamoto, H., Minami, M., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R.: Jap. J. Exp. Med., 36, 175 (1966).
- 7) 清水隆作, 西田信義, 坂東勲, 越村三郎, 林鋭雄, 小林孝:金沢大学結核研究所年報, 22, 27 (1964).
- 8) 清水隆作, 越村三郎, 波多野基一, 森田修行, 大野真介, 上田久子: Symposia Cell Chem., 18, 35 (1967).
- 9) 波多野基一:医学のあゆみ, 63, 261 (1967).
- 10) 清水隆作, 上田久子, 波多野基一:医学と生物学, 75, 37 (1967).
- 11) 波多野基一:医学のあゆみ 87, 174 (1968).
- 12) 森田修行, 上田久子, 田中淳之, 矢吹朗彦, 波多野基一: Symposia Cell Chem., 19, 115 (1968).
- 13) 波多野基一:日本臨床, 25, 196 (1967).
- 14) 波多野基一, 清水隆作, 森田修行, 山岸高由:医学と生物学, 74, 293 (1967).
- 15) 波多野基一, 清水隆作, 森田修行:医学と生物学, 74, 319 (1967).
- 16) 波多野基一, 田中淳之, 矢吹朗彦, 清水隆作:医学と生物学, 74, 361 (1967).
- 17) 清水隆作, 田中淳之, 矢吹朗彦, 波多野基一:医学と生物学, 74, 299 (1967).
- 18) 寺山宏編:がんの細胞膜, 223 (1969) 南江堂, (東京).
- 19) 田中淳之, 矢吹朗彦, 上田久子, 清水隆作, 波多野基一:第15回毒薬シンポジウム, 11, (1968), (大阪).
- 20) 矢吹朗彦, 田中淳之, 上田久子, 清水隆作, 波多野基一:日本癌学会第27回総会記事, 417, (1968), (東京).
- 21) 矢吹朗彦:金大がん研年報, 2, 113 (1968).
- 22) 野垣俊幸:金大医十全学会誌, 78, 403 (1969).
- 23) 中井準之助編:組織培養—基礎と応用—, 27, (1964), 朝倉書店(東京).

- 24) Ginsberg, H. S. : Prog. in Med. Virol., 1, 361 (1958).
- 25) Walker, D. L. : Prog. in Med. Virol., 6, 111 (1964).
- 26) Vogel, J. E., & A. Shelkov. : Science, 126, 358, (1957).
- 27) Seeman, P. : J. Cell Biol., 32, 55 (1967).
- 28) Karnovsky, M. J. : J. Biophys. Biochem. Cytol, 11, 729 (1961).
- 29) 上田久子, 波多野基一 : 第42回日本細菌学会総会, 199, (1969), (徳島).
- 30) Robertson, J. D. : J. Physiol, 140, 58 (1957).
- 31) Robertson, J. D. : Symp. Soc. Cell. Chem. 14, Suppl. Intracellular Membraneous Structure, eds. : Seno, S. & Cowdry, E. V., 379, 196, (1963).
- 32) Report of a WHO Scientific Group, : Viruses and Cancer, WHO Techn. Rep. Ser., No 295, 56 (1965).
- 33) Cooper, L. Z., Madolf, M. A. & Weinstein, L. : J. Bact., 83, 515 (1962).
- 34) Policard, A. : 細胞—その動的構造 (山田英智監訳), 120, (1966), 朝倉書店, (東京).
- 35) Rapp, F., Melnick, J. L. & Tevethia, S. S. : Transplantation, 6, 649 (1968).
- 36) Hamburg, V. P. & Svet-Moldovsky, G. J. : Nature, 203, 772 (1964).
- 37) 小林博, 仙道富士郎, 加地浩, 白井俊一, 小玉孝郎, 斉藤弘, 武市紀年, 細川真澄男 : 第27回日本癌学会総会記事, 136, (1968) (東京).

- Photo. 1. Ehrlich ascites cell (ES) incubated with DBS as control at 37°C for 15 min (1-a) and 60 min (1-b), subsequently treated with ferritin (Fe) and colloidal gold (Au) solution for 10 min at 4°C.
- a) and b) $\times 20,000$
 - b) Membraneous structure of cellular organella is not so clear as a), but no reductions of intracellular ribosome are observed.
- Photo. 2. ES incubated with HgCl₂ as standard of CIR for 15 min and treated with similar colloidal solution.
- a) Thickened membranes of mitochondria. $\times 25,500$
 - b) Invasion of Fe and Au particles on lacked part of cell membrane. $\times 25,000$
- Photo. 3. ES incubated with native *Streptococcus hemolyticus* (Su-strain) for 30 min.
- a) Junction of many vacuoles on cell membrane. $\times 18,000$
 - b) Appearance of multi-vesicular body intracellularly and three cocci extracellularly. $\times 25,000$
 - c) Mitochondria-like bodies containing ribosome-like particles. $\times 20,000$
 - d) Mass of virus-like particles supposed to be murine leukemia virus. $\times 21,000$
- Photo. 4. ES incubated with Y-27-FDL for 15 min (4-a) and 45 min. (4-b).
- a) Appearance of electron dense bodies and reduction of intracellular ribosomes. $\times 25,000$
 - b) Vacuoles containing mass of Fe and Au particles. $\times 20,000$
- Photo. 5. ES incubated with Y-30-C for 60 min. $\times 20,000$
High electron dense body supposed to be lysosome.
- Photo. 6. Cultured human bone giant-cell tumor cell (G-2) incubated with DBS for 60 min.
- a) Membraneous structure of cell organella is clearly preserved. $\times 23,000$
 - b) Ferritin particles are observed at intercellular space but not in cytoplasm. $\times 20,000$
- Photo. 7. G-2 cell incubated with HgCl₂ for 15 min. $\times 25,000$
Space of cytoplasm is filled with many vacuoles. Intracellular invasion of Fe and Au particles is prominent.
- Photo. 8. G-2 cell incubated with Y-27-FDL for 60 min.
- a) Numerous Fe and Au particles in cytoplasm. $\times 17,000$
 - b) Invasion of Fe and Au particles from the lacked part of plasma membrane. $\times 21,000$
- Photo. 9. G-2 cell incubated with Y-30-CDC for 60 min.
- a) Partial protrusion of cytoplasm supposed to be unique for the action of Y-30 extracts. $\times 13,000$
 - b) Appearance of myeline-like body. $\times 21,000$
 - c) Amorphorous structure of electron low density in cytoplasmic protrusion. $\times 23,000$
- Photo. 10. Non-incubated HVJ virus carrier G-2 cell (G-2-H).
- a) Partly thickened cell membrane supposed to be budding of HVJ virus. $\times 22,000$
 - b) Mature HVJ virus particles on cell surface and virus matrix-like structure in cytoplasm $\times 24,000$
- Photo. 11. Hemadsorption on G-2-H. High electron dense body is red cell of guinea pig. HVJ virus-like particle on cell surface. $\times 20,000$
- Photo. 12. G-2-H cell incubated with DBS for 60 min.
- a) Virus maturation in cytoplasm. $\times 25,000$

b) Virus matrix and myeline-like body in cytoplasm. $\times 21,000$

Photo. 13. G-2-H cell incubated with HgCl₂ for 15 min. HVJ virus particles on budding. $\times 25,000$

Photo. 14. G-2-H cell incubated with Y-27-FDL for 30 min (14-a) and 60 min. (14-b).

a) Myeline-like body in cytoplasm and HVJ virus particles on cell surface. $\times 22,000$

b) Vacuoles containing virus-like particles, and invasion of Fe and Au particles in cytoplasm. $\times 25,000$

Photo. 15. G-2-H cells incubated with Y-30-CDC for 30 min.

a) Cytoplasm is filled with numerous Fe and Au particles. $\times 20,000$

b) Unique protrusion of cytoplasm without membrane destruction. $\times 18,000$

