培養細胞に対するクロモマイシン A₃ の作用

第一報 癌組織および正常組織由来細胞の増殖に対する影響

道 健 一

東京医科歯科大学口腔外科学教室（指導：上野正教授）

（昭和 39 年 7 月 15 日受付）

Studies on the Effects of Chromomycin A₃ on the Mammalian Cell Cultures.

I. Effects of Chromomycin A₃ on the Growth of Carcinoma and Normal Cells in Culture.

Ken-ichi Michi

Department of Oral Surgery, School of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University.

(Director: Prof. T. Ueno)

I. 緒 論

クロモマイシン A₃ (トヨマイシン・タケダ) は Streptomyces griseus No. 7 から分離された¹⁾ 抗癌抗生物質で、その抗腫瘍作用については Tatsuoka ら (1958)²⁾, Sato ら (1960)³⁾, 梶原ら (1960)⁴⁾ 以来多数の報告があり、臨床的にも多くの報告がある^{5) 6) 7)}。

一方、最近の組織培養法の進歩につれて培養細胞が薬剤の作用機序を調べる為の有力な方法⁸⁾ に、また抗癌剤の検定法⁹⁾ に利用されている。しかし、クロモマイシン A₃ については培養細胞を利用した研究は少なく、Sato ら (1960)³⁾, Takagi ら (1959)¹⁰⁾, 山根ら (1963)¹¹⁾ の報告があるだけで、特に、その作用機序についてはほとんど検討されていない。

著者は培養細胞を利用してクロモマイシン A₃ の作用機序を、主に核酸合成の面で調べた。本報では種々の細胞、特に最近注目されている 2 倍体細胞株 (Diploid cell strain)^{12) 13)} と従来からある細

胞系 (Established cell line) とを比較しながら、細胞の増殖に対する影響を検討した。

II. 研究方法

1. 実験材料

細胞：人子宮癌由来細胞系 (HeLa-S3)^{14) 15)}, 人胎児肺組織由来細胞株 (NIHT 2 & 5)^{16) 13)}, 人肝由来細胞系 (Chang's liver cell)¹⁷⁾, およびハムスター腎由来細胞系 (BHK-21)¹⁸⁾ を使用した。いずれも国立予防衛生研究所病理部で継代保存していたものである。個々の細胞の形態、染色体数、ハムスター頬嚢への移植性、世代時間 (Generation time) および増殖様式等の性質は表 1 に示した通りである (表 1)。

培地：Eagle (1959)¹⁹⁾ の MEM 培地 (Minimal Essential Medium) にビオチンを 1 mg/l に加えたものを基礎とし、それに仔牛血清を加え使用した。血清濃度は通常 10 % としたが、NIHT および BHK-21 の単細胞培養の時には 20 %, 維持培地とする時には 1 % とした。

継代の時の細胞の分離には PBS (Phosphate

表 1 使用した細胞の性質

名 称	由 来	形 態	染 色 体	移 植 性	世代時間	増殖様式
HeLa-S3 細胞系	ヒト子宮頸癌	上皮様	異数性	あ り	20～25時間	無 限
NIH-T 細胞株	ヒト胎児肺	線維芽様	二倍性	な し	24～30時間	有 限
Chang の肝細胞系	ヒト肝	上皮様	異数性	あ り	24～30時間	無 限
BHK-21 細胞系	ハムスター腎	線維芽様	異数性	あ り	20～25時間	無 限

Buffered-Saline) にトリプシン (NBC 1:300) を 0.05% に混ぜたものを使用した。

クロモマイシン A₃: 結晶を 1 mg/cc になるようにメチルアルコールに溶解して冷暗所に保存し、使用する時に血清を含まない基礎培地で希釈した。保存中の変化を分光光度計による吸収曲線²⁰⁾で調べ、その安定範囲内に使用した。

2. 実験方法

増殖の測定: 増殖の測定は同型培養法²¹⁾、(Replicate tissue culture method)で行った。すなわち細胞をトリプシン液で分離して 2×10^4 /cc の細胞浮遊液を作った。これを 3×10^4 ずつ角型試験管内で培養し対数増殖期の内に実験を行った。

細胞数の算定は各群の試験管を 3 本ずつ抽出して核数計算法(Nucleus enumeration method)^{22) 23)}で行った。

コロニー形成率(Plating efficiency)の測定^{24) 25)}:

細胞を 1×10^5 /cc の濃度に播き、2 日後対数増殖期になった時に、0.05%トリプシン液で分離し、95%以上の単細胞率をもった細胞浮遊液とした。希釈後 10^2 、 10^3 および 10^4 の細胞を培地 5 cc に入れて、径 6 cm のシャーレに播いた。これを炭酸ガス培養器 (CO₂ incubator) に入れておくと 11～14 日で肉眼で見える大きさのコロニーができる。その時にシャーレの内容全部を 10%中性ホルマリンで固定し、0.1%クリスタルバイオレットで染色して、直接コロニー数を算定した。実験群と対照群のコロニー数の比をコロニー形成率とした。

細胞の経時的観察: 培地 5 ccが入った直径 6 cm のシャーレに 22×22 mm のカバーガラスを入れ、 1×10^5 の細胞を播いた。これを炭酸ガス培養器

に入れて、3～4 日後細胞が全体に拡がった時に実験を行った。細胞を生きたまま観察する時には、スライドガラスの上に薄い金属のリングをはりつけ、中に培地を入れたものを用意した。その上に細胞のついたカバーガラスを逆転してのせ、これを恒温器のついた位相差顕微鏡で観察した。染色標本とする時には細胞のついたカバーガラスをシャーレから取り出して、10%中性ホルマリンで固定し、ヘマトキシリン・エオジンで染色した。

III. 実験成績

1. クロモマイシン A₃ の濃度変化と増殖曲線の変化

クロモマイシン A₃ を培地中に 0.01 μ g/cc, 0.05 μ g/cc, 0.1 μ g/cc, 1.0 μ g/cc の各濃度に加えて、おのおのが HeLa-S3 細胞系と NIHT 細胞株の増殖におよぼす影響を比較した。0.01 μ g/cc および 0.05 μ g/cc の濃度では両細胞とも同様な変化を示した。すなわち無処置の HeLa-S3 細胞系は培養後 24 時間の増殖誘導期 (Lag phase) をすぎると世代時間 24 時間で対数増殖 (Logarithmic growth) し、NIHT 細胞株では 48 時間の増殖誘導期の後、世代時間 27 時間で対数増殖をするが、実験群の 0.01 μ g/cc の濃度のものは、その増殖の状態が無処置のものとはほとんど変らなかった。ただし薬剤を加えた直後に一時的な増殖の抑制があり、その後に回復したものもあつた。0.05 μ g/cc の濃度では薬剤を加えた後 60～70 時間は細胞数の変化がなくその後になつてから細胞数の増加が認められた。0.1 μ g/cc および 1.0 μ g/cc の濃度にクロモマイシン A₃ を加えた群では 2 つの細胞間で増殖曲線の型が異つていた。HeLa-

図1 クロモマイシン A₃ の濃度による増殖曲線の変化 (HeLa-S3 細胞と NIHT 細胞)。

図2 クロモマイシン A₃ の濃度と生存細胞数。
薬剤投与後 100 時間の細胞数を 対照群との 比
で現わした。

S3 細胞系は早期に、すなわち 24 時間以内に急激な細胞数の減少が起つたが、NIHT 細胞株は薬剤を加えた後、約 70 時間は細胞数の変化がな

く、その後になつてから減少した(図 1)。クロモマイシン投与後 100 時間の値をとつて薬用量と細胞数の関係を見た場合には、大きな差ではないが、0.05 $\mu\text{g}/\text{cc}$ 以上の濃度になると HeLa-S3 細胞の方が NIHT 細胞よりも感受性が高いことが認められた(図 2)。

Chang の肝細胞系と BHK-21 細胞系についても同じように調べてみた。0.01 $\mu\text{g}/\text{cc}$ および 0.05 $\mu\text{g}/\text{cc}$ のクロモマイシン A₃ を加えた群では、前の 2 種の細胞とほとんど変りがなかつた。0.1 $\mu\text{g}/\text{cc}$ の濃度に加えた場合には Chang の肝細胞系は直後から細胞の減少が起り、BHK-21 細胞系では細胞の減少が遅れて起つた。すなわち Chang の肝細胞系は HeLa-S3 細胞系と、また BHK-21 細胞系は NIHT 細胞株とおのの類似の型を示した(図 3)。なお NIHT 細胞株の内 NIHT-2 と NIHT-5 ではまったく同じ性質だったので両者は 1 つの群にまとめて記載した。

2. 位相差顕微鏡による細胞変化の経時的観察
上皮様細胞 (Epithelial-like cell) と線維芽様細胞 (Fibroblast-like cell) とを混合培養すると、上皮様細胞が集団をなし、周囲を線維芽様細胞がとり囲んで増殖し、癌巣のような像となる(図 4 A)。そ

図3 クロモマイシン A₃ の濃度による増殖曲線の変化 (Chang の肝細胞と BHK-21 細胞)。

の時期にクロモマイシン A₃ を 1.0 $\mu\text{g}/\text{cc}$ の濃度に加え、5 分間に一駒の微速度で映画撮影をして観察すると、HeLa-S3 細胞は 6 時間から 12 時間の間にほとんどが変性してガラス面から落ちてしまった (図 4 C,D)。ところが NIHT 細胞は 24 時間までほとんど変わらず (図 4 E), 36 時間頃から死ぬ細胞が出て来た。72 時間後には HeLa-S3 細胞は全くななくなつてしまつたが、NIHT 細胞はまだ残つて運動を続けているのが認められた (図 4 H)。

3. 染色標本による細胞変化の観察

クロモマイシン A₃ を 0.1 $\mu\text{g}/\text{cc}$ の濃度で加えた時、細胞に現われる顕著な変化として HeLa-S3 細胞では核小体の油滴状凝集とクロマチンの凝集が、時間が経過すると多核細胞、異常分裂像、細胞質全体の凝縮等が見られた (図 5)。NIHT 細胞では核小体の凝集と核の網状化が著明であつた (図 6)。両細胞とも初期には細胞質の変化がほとんどみられなかつた。

4. クロモマイシン A₃ の作用時間と細胞増殖の回復

HeLa-S3 細胞と NIHT 細胞に一定時間 0.1 $\mu\text{g}/\text{cc}$ の濃度のクロモマイシン A₃ を作用させ、

その後にクロモマイシン A₃ の入っていない培地に戻して、その時の細胞の回復の状態を見た。短時間作用させた時には、2 つの細胞の間でほとんど差がなかつた。24 時間以上作用させたものでは、両方の細胞とも回復が起らなかつた (図 7, 8)。

5. クロモマイシン A₃ のコロニー形成能におよぼす影響

HeLa-S3 細胞系、Chang の肝細胞系、NIHT 細胞株、BHK-21 細胞系のそれぞれについてコロニー形成能を調べた。無処置の時に HeLa-S3 細胞および Chang の肝細胞は、10 % の仔牛血清を加えると 100 % のコロニーが出来た。NIHT 細胞は継代数によつて異なるが、10~14 代の時は仔牛血清 10 % で 10~20 %, 血清 20 % では 30~40 % のコロニーが出来た。BHK-21 細胞は仔牛血清 10 % で 50 %, 血清 20 % では 75 % のコロニー形成があつた。それぞれの細胞でコロニー形成が最良の状態の時を基準として、コロニー数の減少から細胞の薬剤感受性を調べた。全体として見ると 4 種の細胞間に大きな差はないが、詳細に比較してみると、Chang の肝細胞は感受性が低く、BHK-21 細胞は他の細胞群より曲線の傾斜がゆるやかだつた (図 9)。

クロモマイシン A₃ の影響が増殖曲線で調べた

図4 顕微鏡映画による細胞変化の過程

HeLa-S3 細胞と NIHT 細胞の混合培養にクロモマイシン A_3 $1.0 \mu\text{g}/\text{cc}$ を作用させ、直後 (A), 3 (B), 6 (C), 12 (D), 24 (E), 36 (F), 48 (G), 72 時間後 (H) の変化を位相差顕微鏡で観察した。

4-G

4-H

5-A

5-B

6-A

6-B

図5 クロモマイシン A_3 による細胞の形態変化(HeLa-S3 細胞)
 単層になった HeLa-S3 細胞にクロモマイシン A_3 $1.0 \mu\text{g}/\text{cc}$ を作用させ、6 時間後の変化。
 A. 対照群, B. 実験群

図6 クロモマイシン A_3 による細胞の形態変化(NIHT 細胞)
 単層になった NIHT 細胞にクロモマイシン A_3 $1.0 \mu\text{g}/\text{cc}$ を作用させ、6 時間後の変化。
 A. 対照群, B. 実験群

図7 クロモマイシン A_3 を、作用させた後の細胞増殖の回復 (HeLa-S3 細胞と NIHT 細胞)。HeLa-S3 細胞と NIHT 細胞にクロモマイシン A_3 $0.1 \mu\text{g}/\text{cc}$ を夫々8時間および24時間作用させた時の増殖曲線の変化。

図8 クロモマイシン A_3 の作用時間と細胞増殖の回復 (HeLa-S3 細胞と NIHT 細胞)。HeLa-S3 細胞と NIHT 細胞にクロモマイシン A_3 $0.1 \mu\text{g}/\text{cc}$ を夫々の時間作用させ、100時間後の細胞数を対照群との比で現わした。

場合とコロニー形成能で調べた場合とで異なっていた。その原因を知る為に、HeLa-S3 細胞を同一の細胞濃度で閉鎖環境と炭酸ガス培養器とで培養し、比較してみたが、差はみられなかった。次に炭酸ガス培養器で細胞濃度を変えて培養してみた。するとクロモマイシン A_3 $0.05 \mu\text{g}/\text{cc}$ で、細胞濃度 $1 \times 10^5/\text{cc}$ の時には、10~14 日間で全体に未成熟コロニー (Abortive colony) が出来たが $1 \times 10^3/\text{cc}$ 以下では細胞はほとんど完全になくなってしまった。

6. 細胞の増殖状態によるクロモマイシン A_3 の影響の変化

HeLa-S3 細胞を通常の増殖培地 (Growth medium) および維持培地 (Maintainance medium) に入れて、一方では細胞が盛んに増殖し、他方では増殖しないような状態にした。すなわち、細胞をそれぞれの培地に入れて24時間以上経過してから、クロモマイシン A_3 を $0.1 \mu\text{g}/\text{cc}$ の濃度で24時間作用させた。その後、再び増殖培地に戻して培養を続けた。増殖培地でクロモマイシン A_3 を作用させたものでは、細胞増殖の回復がなかった

図9 クロモマイシン A_3 の濃度と各細胞のコロニー形成率(HeLa-S3細胞, NIHT細胞, Changの肝細胞およびBHK-21細胞)。培養11~14日目のコロニー数を対照群との比で現わした。

が、維持培地で作用させたものでは、約30%の細胞が回復しているのが認められた(図10)。このことをコロニー形成能からみると、増殖培地で0.1 $\mu\text{g}/\text{cc}$ 、24時間作用させた群では、0.01%以下のコロニー形成率であつたが、同じく維持培地で作用させた場合には、対照群を100%とすると52.6%のコロニー形成率であつた。

IV. 考 按

生体の複雑な条件を除去し、純粹に細胞だけの性質が調べられる組織培養法は、細胞を単に哺乳類動物細胞という意味で取り扱うならば、薬剤の影響を調べるのに最も良い方法である。その主な利点として、均一な材料が得られ、薬剤の直接作用が調べられ、さらに実験条件が自由に換えられ

図10 細胞の増殖状態とクロモマイシン A_3 の影響(HeLa-S3細胞)。

HeLa-S3細胞が増殖培地中にある時と維持培地中にある時に、クロモマイシン A_3 0.1 $\mu\text{g}/\text{cc}$ を8時間または24時間作用させその後の細胞増殖の回復状態をみた。

ることなどが上げられている⁸⁾⁹⁾。

しかし生体と関連させて細胞を扱う時には、その特異性を検討しておかねばならず、制癌剤の検定の場合には特に、使用する細胞が癌細胞あるいは正常細胞としての性質を維持しているか否かを確認する必要がある。今迄に癌細胞および正常細胞の培養は多くの人々によつて行なわれ、樹立細胞系も数多く得られている^{26) 27) 28) 29)}。Foleyら(1962)³⁰⁾は正常組織由来細胞と癌組織由来細胞とは、ハムスター頬嚢への移植能が異なっていると述べているが、一般には、培養細胞の性質は生体内の原組織とかなり変つていて^{31) 32)}、どの細胞もその特異性を失い^{33) 34)}均一になつて³⁵⁾といわれている。すなわち、正常組織由来細胞も癌組織由来細胞と同様に悪性腫瘍の性質を持つている^{36) 37) 38)}ことが認められている。

これに対し、最近組織培養法による染色体の研

究^{39) 40)}が進むにつれ、正常細胞の示標 (Marker) を 2 倍性染色体として、その維持を目標とした培養が試みられている^{41) 42)}。1961 年に Hayflick が人胎児臓器から 2 倍体線維芽細胞を培養し、再現性の高い方法を得ることに成功した。わが国においても山田ら¹⁶⁾ (1963) が数種の人胎児肺組織由来 2 倍体線維芽細胞株の培養に成功し、その増殖様式を詳細に研究している¹³⁾。この細胞株は従来のいわゆる正常細胞系とは、染色体数、組織分化能、移植性、増殖能、ウイルス・スペクトル等が異なり、生体内の正常細胞により近いことが認められている。この細胞の制癌剤に対する感受性についてはまだ比較検討が行われていないが、今迄ある樹立細胞系が制癌剤によつてどれも同じ作用を受ける⁴³⁾のに反し、この細胞は癌組織由来細胞とは異なつた反応を示すことが期待されるので、今回試験的に一薬剤について検討してみたわけである。

HeLa-S3 細胞系、NIHT 細胞株、Chang の肝細胞系、BHK-21 細胞系に対するクロモマイシン A₃ の毒性は、コロニー形成能からみるといずれにもほとんど差がなく、10⁻⁸ g/cc の濃度単位で増殖を抑制することがわかつた。詳細にみると、Chang の肝細胞は曲線の傾斜は同じだが下り始める濃度が高く、作用機序は同じだが感受性が異なっている。また BHK-21 細胞は曲線の傾斜が異なつていて、作用の受け方が違つていることが推測される。NIHT 細胞は対照群のコロニー形成率が 30~40% で、60~70% の細胞は増殖能力がないのであるから、増殖する細胞¹³⁾の感受性はわかるが、増殖能力を失なつてなお生活している細胞の感受性は、この実験からはわからない。ただ可成り多くの未成熟コロニーが見られることから、増殖能力を失なつた細胞は感受性が低いのではないと思われる。

薬剤に対する感受性はコロニー形成能で調べたときと、増殖曲線から調べたときとで異なり、細胞の濃度によつても、細胞の増殖度によつても異なっている。細胞の濃度によつて影響が変わることは他の制癌剤でも知られていることで¹¹⁾、細胞相

互の物質交換による再生、解毒の能力によると思われる。コロニー形成能による判定と増殖曲線による判定とが異なつているのは、細胞濃度の違いにもよるが、判定の相違、すなわちコロニー形成能は細胞の増殖能力を見るものであり、増殖曲線による判定は細胞の変性の過程を見ているということによると思われる。細胞の薬剤に対する感受性を調べるには、コロニー形成能によるのが妥当であると考えられているが、この方法^{24) 25)}は一般に技術的に難しいものと理解され、わが国においてはあまり利用されていない。実際には、試験した血清で培地を作り、炭酸ガス培養器で培養すれば、比較的簡単に出来る方法で、個々の細胞の増殖能を直接、解析的に調べられる利点がある。

クロモマイシン A₃ に対する感受性は増殖集団では、どの細胞もほとんど同じであつたが、細胞の変性の過程を増殖曲線および位相差顕微鏡所見から検討してみると、各細胞群で異なり、HeLa-S3 細胞系と Chang の肝細胞系では、細胞の死が早く起こるが、NIHT 細胞株および BHK-21 細胞系は長い間ガラス壁についたまま生活を続けて、その後に細胞が死んで行つた。NIHT 細胞株でクロモマイシン A₃ 投与後の細胞の回復を見ると、24 時間でほとんど完全に回復能力を失なつていたので、ガラス壁について運動している細胞もすでに増殖出来なくなつていいる。すなわち、これら各細胞群は薬剤に対する感受性は同じように現われたが、作用機序の異なつていいることが推測された。今回の実験からこの違いは上皮様細胞と線維芽様細胞の差によるものと解釈されるが、BHK-21 細胞系はハムスター由来の細胞なので、種の違いが薬剤の影響の差として現われているとも考えられる。このことはコロニー形成能による用量反応曲線が BHK-21 細胞系だけ異なつた型を示している点からも推定される。Takagi, ら¹⁰⁾ 山根ら¹¹⁾ もクロモマイシン A₃ の毒性が細胞によつて相違があることを述べていいるので、この薬剤自体に、特に細胞選択性があるようにも思われる。しかし、それらの報告と比較してみても、NIHT 細胞株のクロモマイシン A₃ に対する態

度は異なっているように思われ興味をひく。今後、制癌作用の認められている幾種類かの薬剤に対する反応を調べ、さらには肉腫および癌腫由来の細胞株を得て、比較することによつて利用価値の高い検定法の得られる可能性がある。クロモマイシン A₃ の各細胞に対する作用機序については検討中であり、別に発表する予定である。

クロモマイシン A₃ の作用を薬剤の側から考えてみると、 10^{-8} g/cc の濃度単位で培養細胞の増殖を抑制する薬剤というのは制癌剤の中でも最も細胞毒性の高い方であり、Eagle ら(1958)⁴⁴⁾によれば180種類の種々の薬剤中 10^{-8} g/cc 以下の濃度で細胞毒性を示すのはわずか11種類で、すべて制癌効果を認められたものであつたという。制癌効果と細胞に対する毒性がある程度平行するという考え方^{9) 40) 45) 46)}からすれば、クロモマイシン A₃ は可成り期待の持てる薬剤と言える。また回復曲線からわかるように作用は速効性で数時間で細胞に致死効果を与えるので、臨床的に用いる場合に血中に存在する時間が短く⁴⁷⁾でも差支えないということになる。

クロモマイシン A₃ の作用が同じ細胞系でもその増殖の状況によつて変るといふ性質は、他の薬剤ではほとんど知られていないことで興味あることと思われ、臨床応用に際しても考慮しなければならない点である。原因としては幾つかの機序が考えられるが、まず第一には代謝活性が下つた為に薬剤が細胞内へ入らないという可能性である。このことは同じ HeLa 細胞でも Mitomycin C は血清を除去した時にも効果が変わらず、低温で作用させた時に効果がなくなるという報告⁴⁸⁾があり、それを考えると血清を減らした為に代謝活性全体が低下するとかあるいは薬剤の透過性が下るといふことはないと思われる。次に考えられるのは細胞の増殖周期の一定の時期にだけ作用する可能性⁴⁹⁾だが、これはクロモマイシン A₃ を $0.3\mu\text{g}/\text{cc}$ の濃度で作用させると4時間でほとんどの細胞が回復出来なくなることから否定しても良いと思う。その他の可能性としては、細胞の増殖に必要な酵素等が抑制されて不均衡増殖 (Unbalanced

growth) が起り、それが一定以上になつた時に細胞が破壊するのだが、増殖の遅いものでは不均衡になりにくいということ、もう1つは薬剤の影響を受けた細胞は増殖周期の一定時期に達した時になつて破壊するが、増殖の遅い時にはその時期に達するまでに回復が起るという可能性である。いずれにしても今後検討すべき問題である。

染色標本で観察された形態変化から判断すると、HeLa-S3 細胞、NIHT 細胞とも核内の変化が最初にしかも明瞭に起こつていた。同様の所見は動物実験でも⁵⁰⁾報告されているが、クロモマイシン A₃ は細胞核内の物質に作用するものと考えられる。作用機序についての詳細は次報で述べる。

V 総 括

樹立細胞系 (Established cell line) の HeLa-S3 細胞、Chang の肝細胞、BHK-21 細胞と2倍体細胞株 (Diploid cell line) の NIHT 細胞とを比較しながら、クロモマイシン A₃ の培養細胞の増殖に対する影響を検討して次の結果を得た。

1. コロニー形成能からみた薬剤感受性は4種の細胞間でほとんど差がなく、すべて 10^{-8} g/cc の濃度単位で細胞の死が起つた。Chang の肝細胞はわずかに感受性が低く、BHK-21 細胞は作用曲線の傾斜が他に比してゆるやかであつた。
2. 増殖曲線から変性の過程をみると4細胞間で差があり、HeLa-S3 細胞と Chang の肝細胞では約24時間でほとんどの細胞が死んでしまうが、NIHT 細胞と BHK-21 細胞は約70時間生活を続け、その後になつてから死んで行つた。このことから各細胞間の薬剤作用機序の相違が推測された。
3. クロモマイシン A₃ の作用は培養細胞の増殖状態によつて異なり、維持培地で培養している時には効果が弱かつた。
4. 染色標本で形態変化をみると核の変化が最初に明瞭に現われ、クロモマイシン A₃ が核内の物質に作用することが推測された。
5. 2倍体細胞株の正常性および有用性について

て考察した。

本研究の一部は、昭和39年4月17日日本組織培養学会第17回研究会で発表した。

終りに。

本研究を進めるには、主任の上野教授および本教室の清水先生より御教示を受けるとともに、国立予防衛生研究所病理部の江頭部長の御理解によつて、同部の山田先生、高野先生から直接の御指導を受け、研究の場を提供していただいた。又予研病理部の方々および本学口腔外科学教室の方々の御理解と御協力をいただいた。皆様方に深く感謝いたします。

稿を進めるには、本教室の上野教授、伊藤教授、病理学教室の石川教授、本教室の岡助教授、清水先生および予研病理部の山田先生より、御教示と御校閲を受けた。諸先生に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) 柴田元雄, 田辺一雄・他: 放線状菌に関する研究, 新抗生物質 Chromomycin について, J. Antibiotics, B, 13 : 1, 1960.
- 2) Tatsuoka, S., Nakazawa, K. et al. : Isolation, anticancer activity and pharmacology of a new antibiotic chromomycin A₃. Gann, 49 : Suppl., 23, 1958.
- 3) Sato, K., Okamura, N. et al. : Studies on the antitumor activity of chromomycin A₃. Sci. Rep. Res. Tohoku Univ., Ser. C, 9 : 224, 1960.
- 4) 梶原彊, 渡辺順明・他: クロモマイシン A₃ の移植腫瘍に対する増殖抑制作用, 武田研究所年報, 19 : 68, 1960.
- 5) 井林淳, 佐藤勝己, 石井禎郎: 悪性腫瘍に対するトヨマイシンの使用経験, 癌の臨床, 6 : 386, 1960.
- 6) 鮫島夏樹, 井上忠司・他: トヨマイシンの使用経験, 外科, 22 : 108, 1960.
- 7) 樋口謙太郎, 植松一男: トヨマイシンによる皮膚癌の治療, 皮膚と泌尿, 22 : 596, 1960.
- 8) Pomerat, C. M. : Action of chemical agents on living cells. Methods in Medical Research 4. Chicago, 1951. The Year Book Publishers, p. 260.
- 9) 新田和男: 組織培養による抗腫瘍物質のスクリーニング, 医学生物学最近の展望, 第一集, 東京, 昭35, 医学生物学研究奨励会, p. 361.
- 10) Takagi, R., Sugi, Y. et al. : Effect of chromomycin A₃ on the tissue culture cells. Gann., 50 : Suppl., 11, 1959.
- 11) 山根績: 培養細胞の抗生物質耐性, トヨマイシンシンポジウム, 2 : 68, 1963.
- 12) Hayflick, L. & Moorehead, P. S. : The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell. Res., 25 : 585, 1961.
- 13) 山田正篤: ヒトの正常細胞を培養する, 科学, 34 : 295, 1964.
- 14) Gey, G. O., Coffman, W. D. & Kubicek, M. T. : Tissue culture studies on the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Res., 12 : 264, 1952.
- 15) Puck, T. T., Marcus, I. & Cieciura, S. J. : Clonal growth of mammalian cells in vitro : Growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a "feeder" layer. J. Exp. Med., 103, 273, 1956.
- 16) 山田正篤, 松元実, 道健一・他: 人2培体線維芽細胞株の継代培養における増殖度の推移, 癌 54 : Suppl. 286, 1963.
- 17) Chang, R. S. : Continuous subcultivation of epithelial-like cells from normal human tissues. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 87 : 440, 1954.
- 18) Macpherson, I. and Stoker, M. : Polyoma transformation of hamster cell clones : An investigation of genetic factors affecting cell competence. Virology, 16 : 147, 1962.
- 19) Eagle, H. : Amino acid metabolism in mammalian cell culture. Science, 130 : 432, 1959.
- 20) 水野公明: Chromomycin の研究, 第3報 Chromomycin の相互変換, J. Antibiotics, B, 13 : 335, 1960.
- 21) Evans, V. J., Earle, W. R. et al. : The preparation and handling of replicate tissue cultures for quantitative studies. J. Nat. Cancer Inst., 11 : 907, 1951.
- 22) Sanford, K. K., Earle, W. R. et al. : The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. J. Nat. Cancer Inst., 11 : 773, 1951.
- 23) Takano, K., Yamada, M. & Yaginuma, K. : Growth estimation of HeLa strain cells in tissue culture by nucleus enumeration method. Jap. J. Med. Sci. & Biol., 9 : 17, 1956.
- 24) Puck, T. T. & Marcus, I. : A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture : The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. Proc. Nat. Acad. Sci., 41 : 432, 1955.
- 25) 山田正篤: 細胞培養におけるコロニー形式とクローン分離の実際, 医学のあゆみ, 49 : 585, 1964.
- 26) Eagle, H. : Propagation in a fluid medium of a human epidermoid cancer. Strain KB. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 89 : 362, 1955.

- 27) Berman, L. & Stulberg, C. S. : Eight culture strains (Detroit) of human epithelial cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 92 : 730, 1956.
- 28) Fogh, J. & Lund, R. O. : Continuous cultivation of epithelial cell strain (FL) from human amniotic membrane. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 94 : 532, 1957.
- 29) Henle, G. & Deinhardt, F. : The establishment of strains of human cells in tissue culture. *J. Immunol.*, 79 : 54, 1957.
- 30) Foley, G. E., Handler, A. H. et al. : Assessment of potential malignancy of cultured cells : Further observations on the differentiation of "normal" and "neoplastic" cells maintained in vitro by hetero-transplantation in syrian hamsters. *Nat. Cancer Inst. Monograph*, No. 7 : 173, 1962.
- 31) 山田正篤 : 組織培養における癌細胞の変異性, 日本の医学の1959年, 1 : 152, 1959.
- 32) Earle, W. R. : Some morphologic variation of certain cells under controlled experimental conditions. *Nat. Cancer Inst. monograph*, No. 7 : 213, 1962.
- 33) Weiler, E. : A cellular change in hamster kidney cultures : Loss of tissue-specific antigens. *Exp. Cell Res.*, Suppl., 7 : 244, 1959.
- 34) 岡田節人 : 組織特異性の免疫学, 科学, 33 : 20, 1963.
- 35) Berman, L. et al. : Human cell culture. Morphology of the Detroit strains. *Cancer Res.*, 17 : 668, 1957.
- 36) Earle, W. R., Shelton, E. & Schilling, E. L. : Production of malignancy in vitro. XI. Further results from reinjection of in vitro cell strains into strain C₃H mice. *J. Nat. Cancer Inst.*, 10 : 1105, 1950.
- 37) Moore, A. E., Southam, C. M. & Sternberg, S. S. : Neoplastic changes developing in epithelial cell lines derived from normal persons. *Science*, 124 : 127, 1956.
- 38) Leighton, J., Kline, I. & Orr, H. C. : Transformation of normal human fibroblasts into histologically malignant tissue in vitro. *Science*, 123 : 502, 1956.
- 39) Hsu, T. C. & Klatt, O. : Mammalian chromosomes in vitro. X. Heteroploid transformation in neoplastic cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, 22 : 313, 1959.
- 40) Tjo, J. H. & Levan, A. : The chromosome number of man. *Hereditas*, 42 : 1, 1956.
- 41) Puck, T. T., Cieciura, S. J. et al. : Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.*, 108 : 945, 1958.
- 42) Moser, H. : Modern approaches to the study of mammalian cells in culture. *Experientia*, 16 : 385, 1960.
- 43) Eagle, H. & Foley, G. E. : The cytotoxic action of carcinolytic agents in tissue culture. *Am. J. Med.*, 21 : 739, 1956.
- 44) Eagle, H. & Foley, G. E. : Cytotoxicity in human cell culture as a primary screen for the detection of anti-tumor agents. *Cancer Res.*, 18 : 1017, 1958.
- 45) Nitta, K. : Studies on the effects of actinomycetes products on the culture of human carcinoma cells (strain HeLa). I. The effect of known antitumor antibiotics on HeLa cells. *Jap. J. Med. Sci. & Biol.*, 10 : 277, 1957.
- 46) Bieseke, J. J. : Tissue culture screening of agents in experimental cancer chemotherapy. *Methods in Medical Research* 4. Chicago, 1951. The Year Book Publisher, p. 272.
- 47) 山口寿, 石上重行・他 : 新抗生物質トヨマイシンの制癌作用について, 総合臨床, 8 : 2398, 1959.
- 48) Kuroda, Y. & Furuyama, J. : Physiological and biochemical studies on effects of Mitomycin C on strain HeLa cells in cell culture. *Cancer Res.*, 23 : 682, 1963.
- 49) Walker, I. G. & Helleiner, C. W. : The sensitivity of cultured mammalian cells in different stages of the division cycle to nitrogen and sulfure mustards. *Cancer Res.* 23 : 734, 1963.
- 50) 臼居敏仁, 梶原彊 : Chromomycin A₃ の吉田肉腫に対する作用の細胞学的解析, 武田研究所年報, 20 : 165, 1961.