培養ラットエナメル上皮細胞におよぼす Tetracycline の影響に関する研究

堀 越 勝

東京医科歯科大学歯学部第2口腔外科学教室（指導：伊藤秀夫教授）

（昭和47年7月15日受付）

Effects of Tetracycline on Rat Enamel-epithelium in Culture

Masaru Horikoshi

Second Department of Oral Surgery, School of Dentistry,

Tokyo Medical and Dental University

(Director: Prof. Hideo Ito)

要旨：Tetracycline (TC) は諸種の細菌感染症に使用されており，その臨床的效果は一般的にかなり高く評価されているが，一方では，TC が形成されつつある硬組織に強い親和性を持つことが明らかにされている。TC 投与による長管骨の成長の阻害や歯牙の着色ないしは減形成については多くの報告があるが，歯牙硬組織形成に関与する細胞に対する TC の作用を細胞レベルで検索しに報告はほとんど無い。そこで，比較的良く分化能を保持しているとされている初代培養に増殖したラットのエナメル上皮細胞を用いて，TC による細胞障害を TC の細胞内分布と， ^3H -Thymidine, ^3H -Uridine および ^3H -Proline の細胞内とり込みを指標とし，それを蛍光顕微鏡ならびにオートラジオグラフィによりしらべた。その結果を要約するとつぎのようである。

1) TC は細胞質全体に分布しており，ミトコンドリアないしはその他の細胞内小器官への局在性を示唆する所見は得られなかった。

2) ^3H -Thymidine, ^3H -Uridine のとり込みに比較して， ^3H -Proline のとり込みが強く阻害される傾向がみられ，阻害率の平均値は TC 濃度 $100\mu\text{g/ml}$ で50%， $200\mu\text{g/ml}$ の TC で70%， $400\mu\text{g/ml}$ の TC で約80%であった。また $200\mu\text{g/ml}$ の TC を含んだ培養液から TC を含まない培養液に移して incubate したときの阻害率が， ^3H -Thymidine および ^3H -Uridine では10%程度であったが， ^3H -Proline ではなお35%の阻害率を示した。

3) ^3H -Uridine の核から細胞質への移動が TC 濃度 $200\mu\text{g/ml}$ でかなり強く阻害されたと思われる所見を得た。

4) 上記の結果は，培養液中の TC 濃度が $200\mu\text{g/ml}$ 以上になると，ラットエナメル上皮細胞における蛋白合成が阻害されることを示唆するものと考えられる。

結 言

Tetracycline (TC) は諸種の細菌感染症に使用されており，その臨床的效果は一般的にかなり高

く評価されているが，一方では，TC が形成されつつある硬組織に強い親和性を持つことが明らかにされており¹⁾²⁾，さらに，比較的高濃度の TC が動物胎児の成長や，長管骨への ^{45}Ca の沈着を阻

害することなどが報告されている³⁻¹³⁾。

一般に、TC による石灰化の阻害は、硬組織形成細胞における蛋白合成阻害よりも、無機質の沈着そのものが阻害されることのほうが主な原因であろうと考えられている^{14,15)}。しかし一方では、TC が細菌のみならずある種のウイルスの増殖を抑制し、また、TC 投与によって重篤な肝臓障害が現われる場合もあることなどから、TC は生体の細胞に対しても何らかの作用を示すであろうと考えられている。

TC による細胞障害に関する研究は、動物細胞の初代培養を利用したものが多く¹⁶⁻¹⁹⁾、TC が動物の培養細胞内にとり込まれることは明らかにされているが、その細胞内分布に関しては、ミトコンドリアに局在する²⁰⁻²²⁾、細胞質にとり込まれる¹⁶⁾、各細胞分画に分布する²³⁾、および白血球においては特に核に多くとり込まれる^{24,25)}、などの報告があって一致した結果が得られていない。

TC 投与による歯牙の着色ないしは減形成については1956年以来多くの報告があるが²⁶⁻³³⁾、歯牙硬組織形成に関与する細胞に対する TC の作用を細胞レベルで検索した報告はほとんど無い。そこで、著者は比較的良く分化能を維持しているとされている初代培養に増殖したラットのエナメル上皮細胞を使用し、TC の細胞内分布と、³H-Thymidine, ³H-Uridine および ³H-Proline の細胞内とり込みを中心とした阻害作用に関する実験的研究を行ない、いくつかの知見を得たので、その結果を報告する。

実験方法

ラットエナメルに上皮の初代培養細胞ならびに HeLa-S3 細胞におよぼす TC の影響を、位相差顕微鏡所見による形態の変化、TC の細胞内分布、および核酸前駆物質とアミノ酸のとり込みの阻害の3つの面から検討した。HeLa-S3 細胞を対照として用いた理由は、TC の細胞内分布に関する予備実験によって、両者にほぼ同様の結果が得られたからである。なお、本研究に使用された TC 系薬剤は Tetracycline-HCl である。

エナメル上皮細胞と HeLa 細胞の培養はつぎのようである。

イ) ラットエナメル上皮細胞の培養

無菌的に取り出された Wistar 系 rat の胎生18日 (plug 法) の胎児から、4°C の Hanks 氏液 (pH 7.4) 中で下顎原基をとり出し、周囲の結合組織を取り除いて左右1個ずつの切歯歯胚を得た。それをシャーレの中で鋭利な2枚のカミソリでほぼ0.5mm³ の大きさに細切し、10ml の遠沈管に入れ、0.25 % Trypsin-PBS 溶液 (Ca²⁺, Mg²⁺ を含まない) 3ml を加え、37°C で15分間保温したのち、静かにピペッティングを行なった。ただちに PBS を加えて500rpm の遠沈を2回行ない、最後に培養液で1回遠沈洗滌した。上清を捨て、3ml の培養液を加えて再び静かにピペッティングを行ない、均等になった細胞浮遊液を1ml ずつ、カバーグラス (12×16mm) の入ったシャーレに分注し、5 % CO₂-Incubator, 37°C で静置培養を行なった。24時間後に培養液を2ml 追加し、その後1日おきに培養液を交換し、細胞がカバーグラス一面に単層に増殖したものを実験に使用した。培養液は、HAM-F 12 (日水製薬) を0.3μ のミリポアフィルターで濾過滅菌したものに仔牛血清 (極東製薬) を20%加えたものを使用した。またトリプシンは結晶トリプシン25万単位/V (持田製薬) を使用した。

ロ) HeLa-S3 細胞の培養

HeLa-S3 細胞は Eagle MEM (日水製薬) に仔牛血清を10%加えた培養液で継代してあるものを使用した。実験に際しては0.01% Trypsin-PBS で細胞をガラス面から剝し培養液に浮遊させ、1×10⁵/ml の細胞を播き、3～4日後にカバーグラス一面に増殖したものを使用した。

I. 培養細胞の形態におよぼす TC の影響に関する実験

培養細胞の形態におよぼす高濃度 TC の影響をみるため、上記の培養ラットエナメル上皮細胞と HeLa 細胞とを、それぞれ400μg/ml の TC を含む培養液で60分間 incubate し、一部は再び

TC を含まない培養液に移して24時間培養し、両者について位相差顕微鏡で観察した。

II. 培養細胞内の TC 分布に関する実験

TC 分布については、蛍光顕微鏡所見およびオートラジオグラムの所見によって検討した。

a) 蛍光顕微鏡による観察

イ) カバークラス上に増殖した細胞を40 μ g/ml の TC を含んだ培養液に入れ、37°C で60分間 incubate したのち、Hanks 氏液で洗滌し、無固定でグリセリン封入し、ただちに蛍光顕微鏡 (BV 励起) で蛍光ならびに蛍光位相差の同時観察を行った。

ロ) 上記の TC を含んだ培養液中で incubate したものを良く洗滌してから、TC を含まない 37°C の培養液中に移し、60分後のものについて同様の方法で観察した。

なお、TC の細胞内分布とミトコンドリアとの関係を検討するためにミトコンドリア染色を行った。すなわち、Janusgrün を0.9%生理的食塩水で2万倍に稀釈し、染色液とした。染色時間は5ないし10分とした。succinic dehydrogenase (SDH) 染色は Nachlas ら (1950) の方法³⁴⁾ によった。基質反応液の組成は次のとおりである。

0.2M	コハク酸ナトリウム	5 ml
0.2M	リン酸緩衝液 (pH 7.6)	5 ml
Nitro-BT	1 mg/ml	10ml

b) オートラジオグラフィによる観察

オートラジオグラフィによる ³H-TC の細胞内分布に関する実験方法は表1に示すようである。培養液中の ³H-TC (Tetracycline 7-T hydrochloride 1 Ci/mM, The Radiochemical Centre Amersham) の濃度を20 μ g/ml とし、37°C 3時間 incubate したのち試料を Hanks 氏液で洗滌し、ドライアイスとアセトンで冷却したヘキサン (-78°C) の中に投入した。ただちに凍結するので、それを真空乾燥機 (10⁻³mmHg) で120分間乾燥した。オートラジオグラフ用感光乳剤は永田らの方法³⁵⁾ により作製した。すなわち NR-M2 (小西六写真工業) 100ml に 4% dioctyl sodium sulfosuc-

表 1 ³H-TC によるオートラジオグラムの作成法

Labeled specimens
↓
Rinsed with Hanks' solution
↓
Freezed in cold hexane
↓
Drying
↓
Dry-mounting (Wire-loop technique)
↓
autoradiographic emulsion 4% dioctyl sodium sulfosuccinate
↓
Exposed for 14 days
↓
Autoradiograms toluidine blue staining (pH 7.0)

表 2 ³H-Thynidine のとり込みに関する実験方法

Incubated at 37°C in the medium containing 0, 40, 100, 200, 400 μ g/ml TC respectively for 30 min.
↓
Exposed to H ³ -Thymidine 0.05 μ Ci/ml dissolved in the TC containing medium for 30 min.
↓
Rinsed with Hanks' solution (3 times)
↓
Fixed with ethanol-acetic acid (3 : 1)
↓
Dried at room temperature
↓
Dipping
↓
Exposed for 14 days
↓
Autoradiograms
↓
Grain count

inate 1 ml を加えた。この乳剤を wire-loop を使用した dry-mounting 法により、乾燥した試料にのせた。乾燥冷暗所 (4°C, 湿度 0%) で14日間露出し、Konidol-X (小西六) 20°C, 4分間、Koni-fix-X で20分間写真処理し、染色、脱水、脱アルコール、ビオライト封入を行ない、光学顕微鏡により観察した。染色液は pH7.0 の Toluidine-blue を使用した。

III. 培養細胞の ³H-Thymidine, ³H-Uridine および ³H-Proline のとり込み におよぼす TC の影響に関する実験

a) ³H-Thymidine のとり込みについて

イ) 表2に示すように培養液中の TC 濃度をそれぞれ0, 40, 100, 200, 400 μ g/ml とし, 培養細胞を37°C で30分間 incubate したのち, Thy-midine-6-T (spec. act. 5 Ci/mM, The Radio-chemical Centre Amersham) を0.05 μ Ci/ml の割に加え, さらに30分間 incubate したのち, 試料を Hanks 氏液で3回洗滌し, 酢酸—エタノール (1 : 3) で固定し, Dipping 法により乳剤をかけ, 14日間露出したのち Konidol-X, 20°C 4分間, Konifix-X で20分間写真処理し, オートラジオグラムを作成した。細胞20個ずつについて, 核内の grain 数をかぞえ, TC 濃度0 μ g/ml のときの核内 grain 数を N, TC の各濃度における grain 数を Nx として, $(N-Nx)/N \times 100$ を算出し, これを阻害率(percent inhibition)とした。なお培養液の pH は最終的には10% NaHCO₃ で pH 7.4 に補正した。

ロ) ³H-Thymidine のとり込み阻害の回復について

この実験には HaLa-S3 細胞を使用した。培養液中の TC 濃度をそれぞれ0, 100, 200, 400 μ g/ml とし, 50分間 incubate したのち試料を洗滌し, TC を含まない培養液中に移してさらに30分間 incubate し, その後 ³H-Thymidine を0.05 μ Ci/ml の割合で加えて30分間 incubate したのち, 前と同様にしてオートラジオグラムを作成し, graincount した。

b) ³H-Uridine のとり込みについて

イ) Uridine-5-T (spec. act. 5 Ci/mM, 第一化学薬品) 0.5 μ Ci/ml を使用して, a)と同様の実験を行ない, 核と核小体について grain count し, TC の各濃度における阻害率を求めた。³H-Uridine による labeling-time は20分間とした。

³H-Uridine の核から細胞質への移動の阻害については, HeLa 細胞を使用した。培養液中の TC 濃度を0, 100, 200, 400 μ g/ml とし, 30分間 incubate したのち, ³H-Uridine 0.5 μ Ci/ml を加えて20分間 label し, 試料を Hanks 氏液で洗滌し, 別に用意した0, 100, 200, 400 μ g/ml の TC を含む培養液に, unlabeled uridine を5 μ g/ml

の割合で加えた培養液中で120分間 incubate したのち, 前と同様に洗滌, 固定してオートラジオグラムを作成した。

ロ) ³H-Uridine のとり込み阻害の回復について

³H-Uridine による labeling-time を20分間として a)-ロ)と同様の実験を行なった。この場合核全体についての grain count をした。

c) ³H-Proline のとり込みについて

イ) L-Proline-T (spec. act. 578 mCi/mM, The Radiochemical Centre Amersham) 0.5 μ Ci/ml を使用して a)と同様の実験を行ない, 細胞内の grain count をし, 阻害率を求めた。³H-Proline による labeling-time は70分とした。

ロ) ³H-Proline のとり込み阻害の回復について

³H-Proline を使用して a)-ロ)と同様の実験を行なった。labeling-time は70分間とした。

実験結果

I. 培養細胞の位相差顕微鏡的所見

a) 上記の初代培養におけるラット切歯歯胚由来の細胞は, 一般に単層に敷石状に増殖するエナメル上皮細胞の集団と, いわゆる fibroblastic cell の集団とに大別されるが, 培養初期においてはエナメル上皮細胞の増殖が著明である(図1)。エナメル上皮細胞がほぼ対数的に増殖する時期においては, 細胞の形態はほぼ均一であり, 細胞質に比して大きな球形の核が中央に位置し, 核小体も明瞭である。核の周囲にはコントラストの強い多数の顆粒が認められた。敷石状に配列した細胞の間隙もほぼ一定であり, 細胞間橋も明瞭に認められる。新島が示したFingerprint-pattern³⁶⁾が認められるところもあった(図1)。alkaliphosphatase 染色は細胞質の周辺部に, SDH 染色は核の周囲に陽性であった。

b) エナメル上皮細胞の初代培養および HeLa 細胞を TC 濃度400 μ g/ml を含む培養液に移して37°C 60分間 incubate したときの所見は図2および3のようで, 細胞間隙は不規則に拡大し, 濃

縮した細胞や、細胞質内に空胞がみられる細胞が認められた。核には著しい変化は認められなかった。400 μ g/ml の TC を60分間作用させたのち、TC を含まない培養液に移して24時間培養したときの所見では、球状に変形した細胞が数多く見られたが、一方では新たな out growth や細胞分裂も認められた。

II. 培養細胞の TC 分布に関する実験結果

a) エナメル上皮細胞の初代培養を TC 濃度40 μ g/ml を含んだ培養液に移して、37°C, 60分間 incubate したときの蛍光顕微鏡的所見は図4のよう、TC に特異的な黄色の蛍光が細胞質のほぼ全体に認められ、特に核の周囲あるいは golgi 装置と思われる部分に特に強い蛍光を示す細胞が多く存在した。しかし TC がミトコンドリアに局在すると判断されるような顆粒状ないしは糸粒状の蛍光は認められず、また核には蛍光がみられなかった。変性したと思われる球形の細胞では、細胞全体にわたって強い蛍光がみられた。HeLa 細胞においても同様の所見がみられ、TC の細胞内分布の状態についてはエナメル上皮細胞と差異は認められなかった(図5)。

TC で label した細胞(図6)を TC を含まない培養液に移して60分間 incubate したときの所見は、全体的に TC の蛍光の減弱がみられたのみで(図7), TC と細胞内小器官との特異的結合、すなわち TC の細胞内局在性についての知見は得られなかった。

Janusgrün 染色および SDH 染色は核の周囲に

陽性であり、TC による蛍光部分とかなり良く一致してはいたが(図8, 9および図10, 11), TC の蛍光は細胞質全体におよんでいるので、TC が特にミトコンドリア部分に局在しているとはいえない所見であつた。

b) ^3H -TC によるオートラジオグラムは図12に示すよう、細胞質全体にほぼ均一に ^3H -TC の grain がみられ、局在性は認められなかった。核は label されていなかった。

III. 培養細胞の ^3H -Thymidine, ^3H -Uridine および ^3H -Proline のとり込み阻害に関する実験結果

a) ^3H -Thymidine のとり込みの阻害についての実験結果は表3のようであり、阻害率の平均値をグラフに示すと図13のようである。すなわち TC 濃度200 μ g/ml ではほぼ50%, 400 μ g/ml の TC では70—80%の阻害率を示した。HeLa-S 3細胞においてもほぼ同様の結果が得られたが(表4および図14), ラットエナメル上皮細胞に比較して阻害率がやや低いようであった。

^3H -Thymidine のとり込み阻害の回復についての実験結果は図15に示すようであり、TC 濃度200 μ g/ml のとき阻害率は10%に減少したが400 μ g/ml TC のときは80%の阻害率を示した。

b) ^3H -Uridine のとり込み阻害に関する実験の結果はエナメル上皮細胞については表5および図16に示すよう、核および核小体への ^3H -Uridine のとり込みは TC 濃度200 μ g/ml では50%,

表3 ラットエナメル上皮細胞における ^3H -Thymidine のとり込みの阻害

* Inhibition (%) は本文中の阻害率を示す

Experiment	I		II		III	
TC conc. μ g/ml	Inhibition* (%)	Nuclear Grains Mean $\pm$ S.D.	Inhibition (%)	Nuclear Grains Mean $\pm$ S.D.	Inhibition (%)	Nuclear Grains Mean $\pm$ S.D.
0	0	37 $\pm$ 7	0	46 $\pm$ 14	0	55 $\pm$ 11
40	—	—	—	—	5	52 $\pm$ 11
100	10	34 $\pm$ 7	11	41 $\pm$ 9	20	44 $\pm$ 6
200	43	21 $\pm$ 7	41	27 $\pm$ 6	51	27 $\pm$ 5
400	73	10 $\pm$ 2	80	9 $\pm$ 2	—	—

図 13 表 3 における Inhibition の平均値をグラフに示したもの

表 4 Hela-S3 細胞における ^3H -Thymidine のとり込みの阻害

Experiment	I		II	
TC conc. $\mu\text{g/ml}$	Inhibition (%)	Nuclear Grains Mean $\pm$ S.D.	Inhibition (%)	Nuclear Grains Mean $\pm$ S.D.
0	0	90 $\pm$ 24	0	86 $\pm$ 14
40	12	79 $\pm$ 23	8	79 $\pm$ 10
100	19	73 $\pm$ 15	29	61 $\pm$ 10
200	34	59 $\pm$ 13	57	37 $\pm$ 7
400	44	50 $\pm$ 6	73	23 $\pm$ 4

図 14 表 4 における Inhibition の平均値をグラフに示したもの

図 15 ^3H -Thymidine, ^3H -Uridine および ^3H -Proline のとり込みの阻害からの回復

表 5 ラットエナメル上皮細胞における ^3H -Uridine のとり込みの阻害

TC conc. $\mu\text{g/ml}$	Nucleus						Nucleolus					
	I		II		III		I		II		III	
	Inhibition (%)	Grains /20 cells Mean $\pm$ S.D.	Inhibition (%)	Grains /20 cells Mean $\pm$ S.D.	Inhibition (%)	Grains /20 cells Mean $\pm$ S.D.	Inhibition (%)	Grains /20 cells Mean $\pm$ S.D.	Inhibition (%)	Grains /20 cells Mean $\pm$ S.D.	Inhibition (%)	Grains /20 cells Mean $\pm$ S.D.
0	0	64 $\pm$ 10	0	64 $\pm$ 11	0	76 $\pm$ 11	0	23 $\pm$ 4	0	24 $\pm$ 6	0	25 $\pm$ 4
40	—	—	23	49 $\pm$ 6	13	66 $\pm$ 10	—	—	21	19 $\pm$ 4	0	26 $\pm$ 5
100	44	41 $\pm$ 8	42	37 $\pm$ 6	30	53 $\pm$ 10	46	10 $\pm$ 2	45	13 $\pm$ 3	24	19 $\pm$ 4
200	—	—	50	32 $\pm$ 5	58	32 $\pm$ 6	—	—	58	10 $\pm$ 3	52	12 $\pm$ 3
400	73	7 $\pm$ 2	59	26 $\pm$ 4	64	27 $\pm$ 5	85	1 $\pm$ 1	62	9 $\pm$ 1	68	8 $\pm$ 1

図 16 表 5 における Inhibition の平均値をグラフに示したもの

図 17 表 6 における Inhibition の平均値をグラフに示したもの

表 6 Hela-S³ 細胞における ^3H -Uridine のとり込みの阻害

TC conc. $\mu\text{g/ml}$	Nucleus		Nucleolus	
	Inhibition (%)	Grains /20 cells Mean $\pm$ S.D.	Inhibition (%)	Grains /20 cells Mean $\pm$ S.D.
0	0	88 $\pm$ 19	0	27 $\pm$ 5
40	6	83 $\pm$ 17	7	25 $\pm$ 3
100	23	68 $\pm$ 18	27	17 $\pm$ 3
200	48	46 $\pm$ 16	56	12 $\pm$ 4
400	56	38 $\pm$ 13	67	9 $\pm$ 3

表 7 ラットエナメル上皮細胞における ^3H -Proline のとり込みの阻害

Experiment TC conc. $\mu\text{g/ml}$	I		II		III	
	Inhibition (%)	Grains /20 cells Mean $\pm$ S.D.	Inhibition (%)	Grains /20 cells Mean $\pm$ S.D.	Inhibition (%)	Grains /20 cells Mean $\pm$ S.D.
0	0	68 $\pm$ 15	0	114 $\pm$ 22	0	63 $\pm$ 8
40	34	45 $\pm$ 6	10	103 $\pm$ 20	19	51 $\pm$ 7
100	—	—	53	53 $\pm$ 10	—	—
200	72	19 $\pm$ 5	73	30 $\pm$ 4	—	—
400	88	8 $\pm$ 1	89	13 $\pm$ 4	71	18 $\pm$ 3

400 μ g/ml では約70%阻害された。HeLa 細胞においては表6および図17に示すように、阻害率はTC濃度200 μ g/mlで50%, 400 μ g/mlでは60%であった。

HeLa 細胞について行なわれた ^3H -Uridine の細胞質への移動の阻害に関する実験の結果は、TC濃度0 μ g/mlでは細胞質、核および核小体の全体にわたって多数の grain が認められたが(図18), 100 μ g/mlのTCでは ^3H -Uridineの細胞質への移動は減少しており200 μ g/ml TCでは細胞質に grain は認められず、 ^3H -Uridineの細胞質への移動が停止したと思われる像が認められた(図19)。TC濃度の上昇に応じて核および核小体の ^3H -Uridineのとり込みが減少していることは、前述の結果と同じである。

^3H -Uridine のとり込み阻害の回復についての実験結果は図15に示すようであり、TC濃度200 μ g/mlのときの阻害率は2%に減少したが、400 μ g/ml TCでは70%の阻害率を示した。

c) ^3H -Proline のとり込みの阻害に関する実験結果は表7および図20に示すように、 ^3H -Thymidine および ^3H -Uridine の阻害率に比較してやや高く、TC濃度100 μ g/mlで50%, 200 μ g/ml TCでは約70%, 400 μ g/ml TCでは約80%であった。HeLa 細胞においては表8および図21に示すように、多少バラツキがみられたが、全体としては阻害率がやや低く、TC濃度100 μ g/mlで20~30%, 200 μ g/ml TCで約50%, 400 μ g/ml TCでは約70%であった。

^3H -Proline のとり込み阻害の回復についての実験結果は図15に示すようであり、TC濃度200 μ g/mlではなお約35%阻害率を示し、400 μ g/ml TCで75%の阻害率を示した。

考 察

1. 培養細胞について

ラット歯胚のエナメル器の組織培養において out growth を示す上皮性の細胞は、細胞質周辺部に Al-P 染色が陽性であり、SDH 染色が核の周辺部に強陽性であるなどの点が、エナメル器の

図20 表7における Inhibition の平均値をグラフに示したもの

表8 HeLa-S3 細胞における ^3H -Proline のとり込みの阻害

Experiment TC conc. μ g/ml	I		II	
	Inhibition (%)	Grains /20 cells Mean $\pm$ S.D.	Inhibition (%)	Grains /20 cells Mean $\pm$ S.D.
0	0	81 $\pm$ 16	0	93 $\pm$ 15
40	5	77 $\pm$ 19	5	88 $\pm$ 13
100	21	64 $\pm$ 12	31	64 $\pm$ 7
200	30	57 $\pm$ 13	70	28 $\pm$ 4
400	63	30 $\pm$ 10	80	19 $\pm$ 4

図21 表8における Inhibition の平均値をグラフに示したもの

ameloblast および stratum intermedium の細胞と一致していることから ameloblast と表現されている³⁷⁾。本研究におけるラット胎児の歯胚の細胞培養では、培養 3 日目頃から上皮性の細胞のほぼ対数増殖と線維芽細胞様細胞の増殖とがみられた。この上皮性の細胞は組織化学的には Zussman らの報告³⁷⁾と一致しているが、形態学的には、細胞質に比較して核が大きく、かつ細胞質の中央に位置し、著明な Fingerprint-pattern も認められたので、新島³⁶⁾にならってこれをエナメル上皮細胞と表現した。細胞の同定に関しては旋回培養等を利用して、さらに検討することが必要であるが、この上皮性の細胞は単層に敷石状に一枚のシートを形成して増殖しているので、線維芽細胞と区別してこの細胞だけを観察することが可能であると判断された。もちろん生体の細胞が培養系に移されると、由来臓器の特異性は徐々に消失するので³⁸⁾、この細胞がラット歯胚のエナメル上皮細胞と全く同じ性格と機能と有するとは考えられないが、本研究のような細胞レベルでの実験を行なう場合は、比較的良く分化能を保持しているといわれている初代培養細胞を利用することは非常に有効な方法であると思われる。

2. TC の細胞内分布について

投与された TC が硬組織だけでなくある種の腫瘍あるいは腫瘍間質にとり込まれることは、臨床的ならびに実験的に古くから知られている³⁹⁻⁴¹⁾。TC の細胞内分布に関して、Du Buy ら²⁰⁾はサルの培養腎細胞において、TC がミトコンドリアに局在することを蛍光顕微鏡で観察し、ミトコンドリアにおける酸素消費量には変化がないが、酸化的リン酸化が阻害されると報告している。同様の TC の局在性は正常ヒトリンパ球、白血病患者のリンパ球および PHA (Phytohaemagglutinin) 処理の培養ヒトリンパ球についても観察されており^{21, 22)}、in vitro でリンパ球の増殖が抑制されるのは、TC がミトコンドリアの機能を阻害するためであろうといわれている²¹⁾。しかし、この点については異なった見解もみられ、Dressler ら^{24, 25)}は血球、特に白血球においては細胞質より

も核に著明な TC 蛍光を認め、Kohn⁴²⁾は核内にとり込まれた TC の蛍光が増強されるのは、2 価の金属イオンの存在下では TC は DNA と結合しやすく、この場合には TC がより強い蛍光を発するためであると説明している。その他、培養肝細胞においては TC は細胞質にとり込まれるとの報告があり¹⁶⁾、また各細胞分画に分布するという報告もみられる²³⁾。

著者の蛍光位相差同時観察においては、TC の蛍光が細胞質のほぼ全体、あるいは golgi 装置と思われる部分にやや濃厚に分布しているものが多く、ミトコンドリアに局在する特異蛍光と見なすべき所見は得られなかった。一部の細胞では、Janusgrün ならびに SDH 染色によるミトコンドリア染色部とかなり良く一致していたが、顆粒状ないしは糸粒状の蛍光はみとめられなかった。また TC で label された細胞を TC を含まない培養液中で培養して TC の特異結合の有無を検討したが、蛍光は全体的に減弱しただけで、局在性を示唆できるような所見は得られなかった。

上述のように、蛍光顕微鏡による観察では TC の細胞内局在性を確認することができなかったで、さらにオートラジオグラフィーにより ³H-TC の細胞内分布を検索した。TC は可溶性物質であるために、通法の手技によるオートラジオグラフでは目的を達することができないので、³H-TC で label された培養細胞を凍結乾燥し、液体乳剤 100ml に対し 4%，dioctylsodium sulfosuccinate 水溶液 1 ml を加え、wireloop に張って、空中乾燥させ、それをカバーガラス上に増殖した細胞にかぶせる方法³⁵⁾を採用して検討した。その結果かなり良好なオートラジオグラムを得ることができたが、それによると、TC 濃度 20 μ g/ml では、³H-TC は細胞質内にほぼ均一に分布しており、局在性は認められなかった。また核には ³H-TC による grain はみられなかった。TC は核内にはとり込まれないと考えられた。

以上の結果から、培養ラットエナメル上皮細胞においては、TC は細胞質にほぼ均一に分布する

ようで、したがって TC に細胞の機能障害作用があるとすれば、それはミトコンドリアの機能障害というよりは、広く細胞質の機能障害ではなからうかと推測したほうが良いように思われる。

3. TC の細胞障害作用について

TC は細菌のみならずある種のウイルスの増殖も抑制することから、動物細胞の増殖にも何らかの影響をおよぼすことが推測されている。この点について、Lepine ら⁴⁷⁾はニワトリの胎児の心臓由来線維芽細胞と肺由来上皮細胞の増殖抑制を面積測定法によって検討した結果、若干の差はあるが、両者とも Chlortetracycline (CTC) では10 $\mu\text{g/ml}$ から増殖抑制がみられ、100 $\mu\text{g/ml}$ では細胞質に多数の空胞(脂肪変性)が出現し、1000 $\mu\text{g/ml}$ では増殖が完全に阻害されると報告している。その後 Nikolov ら⁴⁸⁾は CTC が各種組織の蛋白質へのメチオニンのとり込みを抑制することを発見し、TC は動物細胞の蛋白合成を阻害するのではないかと推論している。同様にラット肝臓のリボゾーム蛋白へのロイシンのとり込みが CTC 200 $\mu\text{g/ml}$ で70%阻害されること⁴⁴⁾、250 mg/Kg 筋注された TC がラット肝、腸管、筋へのロイシンのとり込みを約30%阻害することなどが報告されている⁴⁵⁾。一方 Zuckerman ら¹⁶⁾は初代培養ヒト肝細胞において、TC が細胞質にとり込まれ、やがて肝細胞は脂肪変性に陥ってゆく過程を Sudan III, Sudan IV染色により組織化学的に観察し、500 $\mu\text{g/ml}$ の TC でほぼ50%の細胞が著明な脂肪変性に陥ったことから、TC による培養ヒト肝細胞の ED_{50} を500 $\mu\text{g/ml}$ とした。著者の TC 濃度400 $\mu\text{g/ml}$ 60分培養でも、エナメル上皮細胞および HeLa 細胞の多くに諸種の変性がみられた。これらは臨床で実際に使用される濃度からみればはるかに高濃度の TC の影響ではあるが、長期投与時における肝への蓄積、あるいは静脈内投与による組織内濃度の急上昇による影響などの点は一応考慮されなければならないと思われる。

TC の細菌蛋白合成阻害の mechanism について Connamacher ら⁴⁶⁾は、E. coli と Bacillns

cereus の30-S リボゾームと TC の結合を報告し、また、Gottesman⁴⁷⁾は、TC は lysyl-tRNA とリボゾームの結合を阻害するが、polylysyl-tRNA とリボゾームとの結合は阻害しないことから、TC がリボゾームの aminoacyl site(A-site)に aminoacyl-tRNA が結合するのを阻害することにより、菌蛋白の合成が阻害されると述べている。

以上の実験結果ならびに文献的考察のもとに、著者は培養ラットエナメル上皮細胞および HeLa-S3 細胞における ^3H -Thymidine, ^3H -Uridine および ^3H -Proline の細胞内とり込みにおよぼす TC の影響を検討した。

Thymidine は細胞内プールが少ないために、培養細胞では培養液に添加した直後より特異的に DNA にとり込まれる。DNA は Cell-cycle の S 期にのみ合成されるので、培養細胞に ^3H -Thymidine を短時間作用させると S 期の細胞だけが label される。したがって ^3H -Thymidine による labeling-time を30分間としてオートラジオグラムを作成して grain count し、それを比較値としてアイソトープのとり込みを半定量的に取り扱えば、S 期の細胞における DNA 合成阻害作用を観察することができると思われる。本実験ではエナメル上皮細胞の初代培養によって行なわれたので、増殖した細胞は必ずしも均一とはかぎらないが、その結果 TC 濃度200 $\mu\text{g/ml}$ で ^3H -Thymidine のとり込みが約50%阻害されることが明らかにされた。しかし TC は上述のように核には入らないので、これは TC の直接的な DNA 合成阻害による結果であるとは考えにくい。また、ラットエナメル上皮細胞と HeLa-S3 細胞とでは阻害率に若干の相違がみられたが、その原因については、さらに詳細な検討が必要であると思われる。

動物細胞においては、RNA 合成の大半が核内でおこることは、前駆物質である ^3H -Uridine などを用いたオートラジオグラフにより証明されており⁴⁸⁾、前駆物質を入れてから5~30分の間は grain はほとんど核内に局限していることが知られている。したがって TC による RNA 合成の

阻害は、TC を含む培養液中の細胞を ^3H -Uridine で短時間 label してオートラジオグラムを作成し、graincount することによってしらべることができる。また短時間 label した後、unlabeled uridine を加えて chase すると、核内の grain が減少し、ふつう数時間以内にそれが細胞質に現われてくるが、これは核内で作られた RNA のある部分が細胞質中に移動することによると解釈されている⁴⁹⁾。

リボゾーム RNA は核小体でつくられるが⁵⁰⁾、Jackson ら⁵¹⁾ は哺乳動物において蛋白合成を特異的に阻害するとされている Puromycin⁵²⁾ を HeLa 細胞に作用させると、核小体における ^3H -Uridine のとり込みが阻害されるとともに、核小体の RNA が細胞質に移動するのも阻害されることから、蛋白合成には核小体におけるリボゾーム RNA の合成が必要であり、蛋白合成にともなってリボゾーム RNA が細胞質に移動することを明らかにした。Higashi ら⁵³⁾ もラット再生肝において Cycloheximide で蛋白合成を阻害すると、核から細胞質へのリボゾームの輸送が著しく阻害されると報告している。Uridine は RNA に特異的にとり込まれるわけではないが、Prescott ら⁵⁴⁾ が示しているように対数増殖期の細胞に60分間作用された Uridine が RNA にとり込まれるものとすれば、これにしたがって行なわれた本実験で、 ^3H -Uridine の核から細胞質への移動の阻害がみられたこと (図 18 および 19) は、多少の異論もあるが⁵⁵⁾、TC による蛋白合成阻害の結果であると解釈してもよいと思われる。しかし Jackson ら⁵¹⁾ が言うような、核小体における ^3H -Uridine のとり込みだけが特異的に阻害されるという結果は得られなかった。

200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の TC を50分間作用させた後、TC を含まない培養液に移して30分間 incubate した実験では、 ^3H -Thymidine および ^3H -Uridine のとり込みはほとんど回復し、 ^3H -Proline のとり込みだけが35%阻害される結果が得られた。このことは200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の TC の50分間作用は細胞致死条件ではないこと、DNA、RNA 合成に比較して蛋

白合成がより強く阻害されることを示している。また TC の濃度を400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ として60分間作用させてから培養液を交換すると、24時間後に新たな outgrowth および細胞分裂像がみられたので、この濃度の TC も一応細胞致死条件ではなかったものと考えられた。

以上を要約すると 1) TC は細胞質全体にとり込まれ、ミトコンドリアに局在するとはいえない、2) ^3H -Thymidine および ^3H -Uridine に比較して、 ^3H -Proline のとり込みの阻害がやや高度である、3) ^3H -Uridine の核から細胞質への移動が阻害される、および 4) 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の TC の50分間作用では細胞致死条件とは考えられない。ということになり、したがって、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃厚な TC は培養ラットエナメル上皮細胞に対して蛋白合成阻害作用を示すと考えられる。しかしその場合に、一般に初代培養を構成する細胞は比較的良く分化能を保持しているとされているが、細胞生物学的には必ずしも均一とは限らないので、その点を考慮する必要があるし、また上皮系の株細胞である HeLa-S3 細胞においてもほぼ同様の結果が得られたので、TC による蛋白合成阻害作用がエナメル上皮細胞に対する特異的な障害作用ではないといえよう。

最近ヒトリンパ組織の無細胞系における polyphenylalanine 合成系においては、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の TC で50%合成が阻害されることが報告され⁵⁶⁾、また Yeast の無細胞系の polyphenylalanine 合成系についても同様の報告がみられ⁵⁷⁾、この障害作用は細菌における同様に、amino acyl-tRNA とリボゾームの結合を阻害するためと考えられている。この考えを細胞系に適用することは、薬物の細胞膜透過という点で問題はあるにしても、TC の動物細胞の蛋白合成阻害の mechanism の解明の基礎を示すものであるように思われる。しかし細菌において蛋白合成阻害作用を示す抗生物質は細菌の70S リボゾームには強い親和性を持つが、80S の大きさである動物細胞 (ただしミトコンドリアのリボゾームは70S⁵⁸⁾) やイーストのリボゾームには親和性が低いとされているので、動

物細胞における阻害作用の mechanism についての詳細は今後の研究を待たねばならない。

一方口腔領域において TC の投与による歯牙の着色や、減形成については1956年の Schwachman²⁶⁾ の報告をはじめとして、その後多くの研究が行われてきた。Hammaström³¹⁾ はラットのエナメル質において、TC が新しく形成された enamel matrix に沈着することを明らかにし、同時に投与された ^{45}Ca の分布が TC の蛍光部分と必ずしも一致しないことを発見した。さらに、エナメル質への TC の最初の沈着は新しく形成された enamel matrix にかぎられ、その matrix 内での TC の分布が時間とともに変化して行く現象にもとづき、Hwang⁵⁹⁾ および Young⁶⁰⁾ らの文献を引用して、硬組織と TC の結合は単に Ca とだけとは考えられないとしている。また Nylen^{61, 62)} はラットにおいて30~65mg/Kg 投与された TC によりエナメル質の石灰沈着の低下がおこり130mg/Kg で明瞭なエナメル質減形成がみられるとしている。しかし、TC 投与による歯牙の着色、石灰沈着の低下、および減形成の mechanism については不明の点も多く、培養細胞を用いた本研究の結果をそのまま生体の細胞にあてはめて考えることはむずかしいので、著者はさらに in vivo でのエナメル上皮細胞、エナメル芽細胞および象牙芽細胞等におよぼす TC の影響についても今後検討していきたい。

結 論

ラットエナメル上皮細胞の初代培養を用いて TC による細胞障害を TC の細胞内分布と、 ^3H -Thymidine, ^3H -Uridine および ^3H -Proline の細胞内とり込みを指標とし、それを蛍光顕微鏡ならびにオートラジオグラフィによりしらべた。その結果を要約すると次のようである。

1) TC は培養細胞の細胞質全体に分布しており、ミトコンドリアないしはその他の細胞内小器官への局在性を示唆する所見は得られなかった。

2) ^3H -Thymidine, ^3H -Uridine のとり込みに

比較して、 ^3H -Proline のとり込みが強く阻害される傾向がみられ、阻害率の平均値は TC 濃度100 $\mu\text{g/ml}$ で50%, 200 $\mu\text{g/ml}$ の TC で70%, 400 $\mu\text{g/ml}$ の TC で約80%であった。また TC を含んだ培養液から TC を含まない培養液に移して incubate したときの阻害率は、 ^3H -Thymidine および ^3H -Uridine では10%程度であったが、 ^3H -Proline ではなお35%の阻害率を示した。

3) ^3H -Uridine の核から細胞質への移動が TC 濃度200 $\mu\text{g/ml}$ で強く阻害されたと見做し得る所見を得た。

4) 上記の実験結果は、培養液中の TC 濃度が200 $\mu\text{g/ml}$ 以上になると、ラットエナメル上皮細胞における蛋白合成が阻害されることを示唆するものと考えられる。

本論文の要旨の一部は第15回および第16回口腔外科学会総会において発表した。

稿を終るに当たり、御懇切なる御指導と御校閲いただいた主任伊藤秀夫教授、御校閲いただいた薬理学教室小椋秀亮教授ならびに第一口腔外科学教室上野正教授に心から感謝いたします。また直接御指導くださった当教室名倉英明博士ならびに御協力くださった当教室諸兄に心からの謝意を表します。

文 献

- 1) Milch, R. A. et al.: Bone Localization of the Tetracyclines. J. Natl. Canc. Inst. 19: 87, 1957.
- 2) Milch, R. A. et al.: Fluorescence of Tetracycline Antibiotics in Bone. J. Bone and Joint Surg. 40 A; 897, 1958.
- 3) Bevelander, G. et al.: The Effect of Tetracycline on the Development of the Skeletal System of Chick Embryo. Develop. Biol. 2: 298, 1960.
- 4) Bevelander, G.: The Effect of Tetracycline on Mineralization and Growth. Adv. Oral Biol. 1: 205, 1964.
- 5) Cohlan, S. Q. et al.: Growth Inhibition of Prematures Receiving Tetracycline. Am. J. Diseases Child. 105: 453, 1963.
- 6) Halme, J. and Aer, J.: Effect of Tetracycline on Synthesis of Collagen and Incorporation of ^{45}Ca into Bone in Foetal and Pregnant Rats. Biochem. Pharmac. 17: 1479, 1968.

- 7) Saxén, L.: Tetracycline: Effect on Osteogenesis in Vitro. *Science* 149 : 870, 1965.
- 8) Saxén, L.: Drug-Induced Teratogenesis in vitro: Inhibition of Calcification by Different Tetracyclines. *Science* 153 : 1384, 1966.
- 9) Saxén, L.: Effect of Tetracycline on Osteogenesis in Vitro. *J. Exp. Zool.* 162 : 269, 1966.
- 10) Bennett, I. C. et al.: Determination of Growth Inhibitory Concentrations of Tetracycline for Bone in Organ Culture. *Nature* 216 : 176, 1967.
- 11) Norton, L. A. et al.: Effects of Tetracycline on Bone Growth in Organ Culture. *Growth* 32 : 113, 1968.
- 12) Halme, J. et al.: Effects of Tetracycline on Collagen Biosynthesis in Cultured Embryonic Bones. *Biochem. Pharmacol.* 18 : 827, 1969.
- 13) Kaitila, I.: Studies on the Inhibitory Effect of TC on Osteogenesis in Vitro. *Acta, Paediatr. Scand. Suppl.* 206 : 44, 1970.
- 14) Kaitila, I.: Effect of TC on Mineralization in Cycloheximide-Treated Bones in Vitro. *Calc. Tiss. Res.* 7 : 46, 1971.
- 15) Kaitila, I.: The Mechanism by which Tetracycline-Hydrochloride Inhibits Mineralization in Vitro. *B.B.A.* 244 : 584, 1971.
- 16) Zuckerman, A. J. et al.: The Effect of TC on Human Liver Cells in Culture. *British J. Exp. Path.* 59 : 20, 1968.
- 17) Lepine, P. et al.: Action of Chloromycetin and of Aureomycin on Normal Tissue Cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73 : 252, 1950.
- 18) New, R. et al.: Effects of Antibiotics on Chromosomes of Cultured Human Leucocytes. *Nature* 9 : 171, 1965.
- 19) Vdorichenko, V. I.: Effect of TC on Respiration and Glycolysis of Normal and Neoplastic Cells. *Antibiotiki* 15 : 928, 1970.
- 20) Du Buy, H. G. and Showacre, J. L.: Selective Localization of Tetracycline in Mitochondria of Living Cells. *Science* 133 : 196, 1961.
- 21) Lindgren, I.: Incorporation of Tetracycline in Phytohaemagglutinin Blast Cells. *Acta. Path. Microbiol. Scand.* 65 : 528, 1965.
- 22) Holland, P. and Sleamaker, K.: A Cytologic Evaluation of Intracellular Tetracycline Fluorescence in Normal and Neoplastic Lymphocytes. *Acta Cytologica* 13 : 246, 1969.
- 23) Pamukcu, F. S. et al.: Localization of Trisiated Tetracycline in Mitochondria of Rat Liver Cells. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 113 : 575, 1963.
- 24) Dressler, J. and Mach, P.: A Study of in Vitro Incorporation of Tetracycline Antibiotics into Avian and Mammalian Blood Cells. *Folia Haematologica* 84 : 368, 1966.
- 25) Park, J. K. and Dow, R. C.: The Uptake and Localization of Tetracycline in Human Blood Cells. *Br. J. Exp. Path.* 51 : 179, 197.
- 26) Schwachman, H. and Schuster, A.: The Tetracycline: Applied pharmacology. *Pediat. Clin. N. Amer.* 3 : 295, 1956.
- 27) Bevelander, G. et al.: The Effect of the Administration of TC on the Development of Teeth. *J. Dent. Res.* 40 : 1020, 1961.
- 28) Story, E.: Tetracycline Antibiotics and their Effects on Calcified and Noncalcified Tissues. *Australian Ann. Med.* 12 : 325, 1963.
- 29) Johnson, R. H. and Mitchell, O. F.: The Effects of Tetracyclines on Teeth and Bones. *J. Dent. Res.* 45 : 86, 1966.
- 30) Weyman, J.: Microscopic Appearance of Tetracycline Deposition in Human Dentin. *J. Dent. Res.* 47 : 742, 1965.
- 31) Hammarström, L.: Different Localization of Tetracycline and Simultaneously Injected Radiocalcium in Developing Enamel. *Calc. Tiss. Res.* 1 : 229, 1967.
- 32) Hammarström, L.: Tetracycline in Developing Rat Enamel in Relation to Protein Synthesis and Maturation. *Acta, Odont. Scand.* 26 : 337, 1968.
- 33) Löfgren, C. G. et al.: Effect of Intraperitoneal Injections of Tetracycline Hydrochloride and Oxytetracycline on Forming Enamel of Rat Incisors. *Calc. Tiss. Res.* 2 : 145, 1968.
- 34) Nachlas, M. M. et al.: *J. Histochem. Cytochem.* 5 : 420, 1957.
武内忠男ら：酵素・組織化学，東京，1968，朝倉書店，106頁より引用。
- 35) 松沢大樹ら：オートラジオグラフィ，手技と応用，東京，1969，朝倉書店，82頁。
- 36) Niizima, M.: Enamel Epithelium in Tissue Culture. *Am. J. Anat.* 99 : 351, 1956.
- 37) Zussman, W. V. and Joachim, H. L.: Growth of Ameloblasts in Vitro. *Lab. Invest.* 13 : 371, 1964.
- 38) 黒田行昭：体外培養細胞の遺伝的特性と分化能の変化，細胞化学シンポジウム，14 : 149, 1964.
- 39) Rall, D. P. et al.: Appearance and Persistence of Fluorescent Material in Tumor Tissue after Tetracycline Administration. *J.*

- Natl. Canc. Inst. 19 : 79, 1957.
- 40) Tapp, E. : Tetracycline Fluorescence in Experimental Tumors. Brit. J. Cancer. 19 : 538, 1965.
 - 41) Mikhail, G. R. et al. : The Mechanism of Tetracycline Fluorescence in Experimental Squamous Carcinoma of the Rat. J. Invest. Derma. 52 : 37, 1969.
 - 42) Kohn, K. W. : Mediation of Divalent Metal Ions in the Binding of TC to Macromolecules. Nature. 191 : 1156, 1961.
 - 43) Nikolov, T. K. and Illkov, A. F. : Proc. Intern. Congr. Biochem. 5th. Moscow. 1961, p. 44, Biochem. J. 87 : 449, 1963より引用.
 - 44) Franklin, T. J. : The Inhibition of Incorporation of Lencine into Protein of Cell Free System from Rat Liver and E. Coll by CTC. Biochem. J. 87 : 449, 1963.
 - 45) Yeh, S. D. and Shils, M. E. : TC and Incorporation of Amino Acids into Proteins of Rat Tissues. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121 : 729, 1966.
 - 46) Connamacher, R. H. and Mandel, H. G. : Binding of Tetracycline to the 30 S. Ribosomes and to Polyuridylic Acid. Biochem. Biophys. Res. Commun. 20 : 98 : 1965.
 - 47) Gottesman, M. : Reaction of Ribosome-bound Peptidyl Transfer Ribonucleic Acid with Aminoacyl Tranfer Ribonucleic Acid of Puro-mycin. J. Biol. Chem, 242 : 5564, 1967.
 - 48) 高木康敬ら : 核酸, 東京, 1970, 朝倉書店, 238 頁.
 - 49) Amond, M. and Leblond, C. P. : Comparison of the Specific Activity Time Curves of Ribonucleic-acid in Chromatin, Nucleolus and Cytoplasm. Exp. Cell. Res. 20 : 250, 1960.
 - 50) 村松正実 : 動物細胞における RNA 合成. 蛋白質, 核酸, 酵素, 12 : 838, 1967.
 - 51) Jackson, L. G. and Studzinski, G. P. : Autoradiographic Studies on the Effects of Inhibitors of Protein Synthesis on RNA Synthesis in HeLa Cells. Exp. Cell, Res. 52 : 408, 1968.
 - 52) Allen, D. W. and Zamencnik, P. C. : The Effect of Puromycin on Rabbit Reticulocyte Ribosomes, B.B.A. 55 : 865, 1962.
 - 53) Higashi, K. et al. : Selective Suppression of Nucleolar RNA Metabolism in the Absence of Protein Synthesis. B.B.A. 166 : 388, 1968.
 - 54) Prescott, D. M. and Bender, M. A. : Synthesis of RNA and Protein During Mitosis in Mammalian Tissue Culture Cells, Exp. Cell. Res. 26 : 260, 1962.
 - 55) Warner, J. R. et al. : Ribosome Formation in the Absence of Protein Synthesis, J. Mol. Biol. 19 : 373, 1966.
 - 56) Bermek, E. and Matthaei, H. : The Effect of Antibiotics on an Optimized Polyphenyl-alanine Synthesizing Cell-free System from Human Lymphatic Tissue. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351 : 1377, 1970.
 - 57) Battaner, E. and Vazquez, D. : Inhibitors of Protein Synthesis By Ribosomes of the 80-S Type. B.B.A. 254 : 316, 1971.
 - 58) Bücher, Th. and Sies, H. : Inhibitors Tools in Cell Research. Berlin, 1969, Springer-Verlag, p. 100.
 - 59) Hwang, W. S. S. et al. : An Autoradiographic Study of the Mouse Incisor using Tritiated Histidine. Arch. Oral. Biol. 8 : 377, 1963.
 - 60) Young, R. W. et al. : Distinctive Autoradiographic patterns of Glycin Incorporation in Rat Enamel and Dentin Matrices. Arch. Oral. Biol. 8 : 509, 1963.
 - 61) Nylen, N. U. et al. : Fine Structure of TC Induced Hypoplastic and Hypomineralized Defects in Rat Incisor Enamel. J. Dent. Res. 43 : 850, 1964.
 - 62) Nylen, N. U. et al. : Effect of Intraperitoneal Injections of Tetracycline and Oxytetracycline on Forming Enamel of Rat Incisors. Calc. Tiss. Res. 2 : 145, 1968.

図 1 エナメル上皮の初代培養細胞 (×150)
中央上部に Finger print-pattern がみられる

図 2 高濃度 TC による細胞の形態変化
(ラットエナメル上皮細胞)

図 3 図 2 と同じ条件での HeLa-S3 細胞
の形態変化

図 4 TC によるエナメル上皮細胞内の蛍光

図 5 TC による HeLa-S3 細胞内の蛍光

図 6 TC によるエナメル上皮細胞内の蛍光

図 7 図 6 と同条件の細胞を TC を含まない培養液中に移して60分間 incubate したもの

図 8 Janus grün によるミトコンドリア染色
(エナメル上皮細胞)

図 9 TC による細胞内蛍光(エナメル上皮細胞)

図 10 SDH 染色によるミトコンドリア染色
(エナメル上皮細胞)

図 11 TC による細胞内蛍光の蛍光位相差同時観察写真(エナメル上皮細胞)

図 12 ^3H -TC によるオートラジオグラム
(エナメル上皮細胞)

図 18 ^3H -Uridine の核から細胞質への移動を示すオートラジオグラム (HeLa-S3 細胞)

図 19 TC 濃度 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ では ^3H -Uridine の核から細胞質への移動がみられないことを示すオートラジオグラム (HeLa-S3 細胞)