

新制

理

333 函

学位申請論文

体細胞雜種細胞を用いた  
細胞間接着機構の解析

京都大学大学院  
理学研究科  
生物物理学専攻

青山 裕彦

体細胞雑種細胞を用いた  
細胞間接着機構の解析

京都大学大学院  
理学研究科  
生物物理学専攻

青山 裕彦

## 目 次

第1章	はじめに	—	1
第2章	親株細胞	—	10
2-1	接着能を有する株細胞		
	— V79細胞	—	10
2-1-1	細胞	—	10
2-1-2	細胞培養	—	13
2-1-2-1	単層培養	—	13
2-1-2-2	軟寒天培養	—	15
2-1-3	クローニング	—	18
2-1-3-1	単層培養での クローニング	—	18
2-1-3-2	軟寒天培養での クローニング	—	18
2-2	接着能をもたない株細胞		
	— エールリッヒ腹水癌細胞		20

2-2-1	細胞	—	20
2-2-2	細胞培養	—	21
2-2-2-1	浮遊培養	—	21
第3章	雑種細胞の形成と単離	—	22
3-1	細胞融合	—	22
3-1-1	HVJの調整	—	22
3-1-1-1	HVJの培養	—	22
3-1-1-2	HVJの精製	—	23
3-1-1-3	HVJの定量	—	23
3-1-2	細胞融合	—	24
3-2	雑種細胞の単離	—	26
3-3	雑種細胞の培養と形態	—	31
3-3-1	単層培養	—	31
3-3-2	軟寒天培養	—	32
第4章	細胞の接着性	—	34
4-1	細胞間接着性の測定法	—	34

4-1-1	細胞の解離法	—	36
4-1-1-1	E 処理	—	36
4-1-1-2	TE 処理	—	37
4-1-1-3	TC 処理	—	37
4-1-2	解離細胞の集合	—	38
4-2	V79 細胞の接着性	—	41
4-2-1	V79 細胞の接着性	—	41
4-2-2	V79 細胞の接着機構	—	44
4-3	EAT 細胞の接着性	—	46
4-4	雑種細胞の接着性	—	49
4-4-1	E 細胞の接着性	—	49
4-4-2	TC 細胞の接着性	—	56
4-4-3	LTE 細胞の接着性	—	60
第 5 章	核型分析	—	62
5-1	核型分析の方法	—	62
5-1-1	染色体標本の製作	—	62

5-1-2 染色体分染 —— Gバンド法	—— 64
5-2 親細胞株の核型	—— 66
5-2-1 V79細胞の核型	—— 67
5-2-2 EAT細胞の核型	—— 68
5-3 雑種細胞の核型分析	—— 72
5-4 雑種細胞の接着性と 核型との関係	—— 76
第6章 論議	—— 79
おわりに	—— 86
謝辞	—— 89
文献	—— 92

## 第1章 はじめに

多細胞生物が、その個体を構築するうえで、細胞の接着性は基本的な性質である。まず、細胞と細胞、あるいは細胞とコラーゲンなど基質との接着がなければ多細胞生物の個体というものが成り立ち得ないことは明らかである。第2に細胞の接着性には何らかの特異性があると想定される。例えば、特定の細胞は一定の組織構造を形成し、それを維持し、正常の状態では、他の組織を構成している細胞と混じり合うことがない、これは細胞と細胞が特異的に接着する性質を有しているからではないか、というのである。このことを証明しようと、多くの実験がなされてきた。それは、多細胞生物より人為的に解離された単一細胞が、ある条件下で再集合し、さらに完全な個体にまで (Wilson, 1907)、あるいは、もとの個体や組織と同様の相対的位置関係を示す

集合体を形成し得る (Towns & Holtfreter, 1955; Fujisawa, 1971) というものである。この事実は解離された細胞自身に、細胞レベル以上の形態を形成するにあたって、どのようにふるまうべきかという情報が、ある程度存在していることを示唆している。その機構はまだ充分には解明されていないが、細胞と細胞が、お互いを認識した結果、何らかの過程を経て、特異的な接着を形成するに至ったことは間違いない。動物の発生過程で細胞が移動したり、形態形成を行うのは、この特異的な細胞接着機構が大きな役割を果たしているものと考えられる。また奇形の形成 (Ede & Flint, 1975; Yanagisawa & Fujimoto, 1977) や癌細胞の浸潤や転移 (Nicolson & Winkelhake, 1975; 他) のように、ヒトにとって重大な疾患も接着性、および、その特異性の異常が原因となっている可能性がある。

このように、基礎的にも応用的にも重大な問題である、細胞接着機構を解明しようと多



くの研究がなされてきた。まず、次のような、環境因子の細胞接着への影響が明らかにされた； 2価陽イオン (Steinberg, 1958; Humphrey, 1963; Collins, 1966; Armstrong, 1966; Armstrong & Jones, 1968; Hornby, 1973; Rabinovitch & De Stefano, 1973; Ueda & Takeichi, 1976), pH (Takeichi & Okada, 1972), 温度 (Moscona, 1961; Moscona & Moscona, 1966; Takeichi & Okada, 1972; Ueda, Ito, Okada & Ohnishi, 1976) などである。また細胞内骨格を構成している、微小繊維や微小管の役割が、サイトカラシンBやコルヒチンの効果を調べることを通じて研究された (Weiss, 1972; Jones & Partridge, 1974; Wadell, Robson & Edwards, 1974; Ozaki, Okada & Yasuda, 1978)。

一方、細胞接着をのかさじる、細胞表面の分子を単離、同定しようとする研究がなされている。カイメソを解離した際に遊離してくる物質で、一度解離されたカイメソ細胞の再集合を、種特異的に促進するもの (Müller &

Zahn, 1973), ラット腹水肝癌の島形成型細胞より遊離される物質で, 同癌の自由型細胞を集合させ, かつ島形成型細胞で見られるのと同じ結合構造を作るもの (Kudo, Hanaoka & Hayashi, 1976) 培養されたニワトリ胚網膜細胞より遊離する, 解離網膜細胞の再集合促進物質 (Lillien, 1968) など, 細胞集合を特異的に促進する物質が精製されている。ただし, これらの物質が細胞表面に局在しているか否かは, まだ明らかではない。さらに, ニワトリ網膜細胞膜分画より得られた, 解離網膜細胞の再集合促進物質 (Hausman & Moscona, 1976), ニワトリ胚網膜細胞の培養液中より得られた, 細胞接着に関与すると考えられる因子 (Brackenbury, Thiery, Rutishauser & Edelman, 1977; Thiery, Brackenbury, Rutishauser & Edelman, 1977) や チャイニーズハムスター由来V79株細胞の接着因子のひとつ (Urushihara, Ozaki & Takeichi, 1979; Urushihara & Takeichi, 1980) が, 細胞表面に存在する接着因子として単離, 同定された。

以上は、細胞と細胞との接着に関与する物質であるが、細胞と基質間の接着に関与する物質として、ファイブロネクチン (fibronectin) があげられる (Yamada & Olden, 1978)。

ところが、これらの単離された物質が、実際に接着因子であるのかどうか、という検定は、それほど容易ではない。また、その物質が、細胞接着に直接かかわっている細胞表面因子であると同定されても、それは接着機構全体における一因子であり、その他の因子の同定や、それらの因子が、どう作用し合って細胞が接着するという現象がおきるのかは、この方法では明らかにされない。細胞接着が、細胞表面物質が存在するだけでは正常に機能し得ないことは、前述の、環境因子がおよぼす影響に関する実験の結果からみても明らかである。しかし、環境因子の変化は、細胞の特定の構造や機能に影響をおよぼす以外にも、様々な副反応を伴う場合も多く、必ずしも、ある特定の因子の細胞接着への関与を意味す

るわけではない。

このように弱点を補いうる方法として遺伝学的方法がある。培養細胞，特に樹立株細胞を用いた細胞接着の研究においては，体細胞遺伝学の方法が有効に利用できると考えられる。これには2通りの方法がある。その第1は突然変異細胞株を利用するものである。すなわち，接着能を有する細胞株から，接着能の欠損した突然変異株を単離し，それと，もとの株と，あるいは欠損株間で比較することによって，接着機構に関与する因子を明らかにしようとするものである。近年，接着に関する突然変異株がいくつか単離されている。そのうち，細胞と細胞の接着に関するものの報告は一報だけで (Edwards, Dysart & Hughes, 1976) その他はすべて，細胞と基質間の接着に関するものである (Gottlieb, Skinner & Kornfeld, 1974; Pouysségur & Pastan, 1976; Atherly, Barnhart & Kraemer, 1977; Klebe, Rosenberger, Naylor, Burns, Novak & Kleinman, 1977; Pouysségur

Willingham & Pastan, 1977; Juliano, 1978)。これは細胞と基質間の接着能の低い変異株の単離に比べ、細胞と細胞の接着能の低い変異株の単離が、はるかに困難であるためであろう。Edwards ら (1976) の報告したのもも選択の基準は接着能ではなく、細胞表面の糖鎖の変異株を、レクチンの一種であるリシン (ricin) に対する耐性株を単離することによって得、その中から細胞間接着能の低い株が発見されたのである。この方法は、既知の特定の細胞表面物質が細胞接着因子であるかどうかの検定には有益であるが、全く未知の物質に関しては無力である。

第2は、体細胞雑種細胞株を用いるものである。これは接着能を有する細胞と、接着能のない細胞とを融合させて、得られる一連の雑種細胞株の比較から細胞接着機構の解明に接近しようとするものである。体細胞雑種形成は Barski らによって初めて報告された現象であるが (Barski, Sorieul & Cornfert, 1961),

HVJ (haemagglutinating virus of Japn, Sendai virus) による細胞融合現象の発見 (Okada's 1957) 以来, このウィルスを使用して, 種々の細胞間で効率よく雑種形成が行われてきた (Ringertz, 1979)。これは, 前核生物の形質転換実験に相当し, 真核生物の遺伝子解析の有力な手段となる。

細胞接着機構を解明するにあたって, 筆者はこの第2の方法によることにした。その理由は; 雑種細胞形成法によれば, 得られる雑種細胞は何らかの変異が起きている可能性が極めて高く, また変異の起きている雑種株の存在も解析の上で役立ち, 困難な, 変異株のみの単離は, 原理的に不必要であること; 核型分析により, 接着因子の遺伝子を担った染色体の同定が可能であり, 逆に, 接着因子の存在の推測も可能であること, などである。

本論文では, まず第2章で 雑種形成に用いた親細胞株 接着能を有するチャイニーズハムスター肺由来V79細胞と, 接着能を有し

ちいマウス乳癌由来エールリッヒ腹水癌細胞の細胞培養法を、続く第3章で、この両者間の雑種細胞形成法、およびその単離について述べる。

第4章で、両親株および雑種株について、細胞間の接着性を調べ、雑種細胞株の接着能は V79 細胞に比べ種々の程度に低下していることを示す。第5章では、核型分析の結果に基づいて、この接着能の低下が、エールリッヒ腹水癌細胞由来の“阻害因子”によるものであることを明らかにする。

## 第2章 親株細胞

### 2-1 接着能を有する株細胞 — V79細胞

#### 2-1-1 細胞

V79細胞は、チャイニーズハムスター肺由来の繊維芽様細胞で、ガラスやプラスチックなどの基質に接着して増殖し、単層を形成する（図1A）（単層培養；後述）。また軟寒天培地中で増殖し、表面の比較的滑らかな細胞集合塊をもちコロニーを形成する（図2A）（軟寒天培養；後述）。この細胞は、Takeichiらにより、2種類の接着機構をもつことが、明らかにされているものである（Takeichi, 1977; Takeichi, Ozaki, Tokunaga & Okada, 1979, Urushihara, Ozaki & Takeichi, 1979）。本実験には、親株の遺伝的均一性を高めるため、V79株より



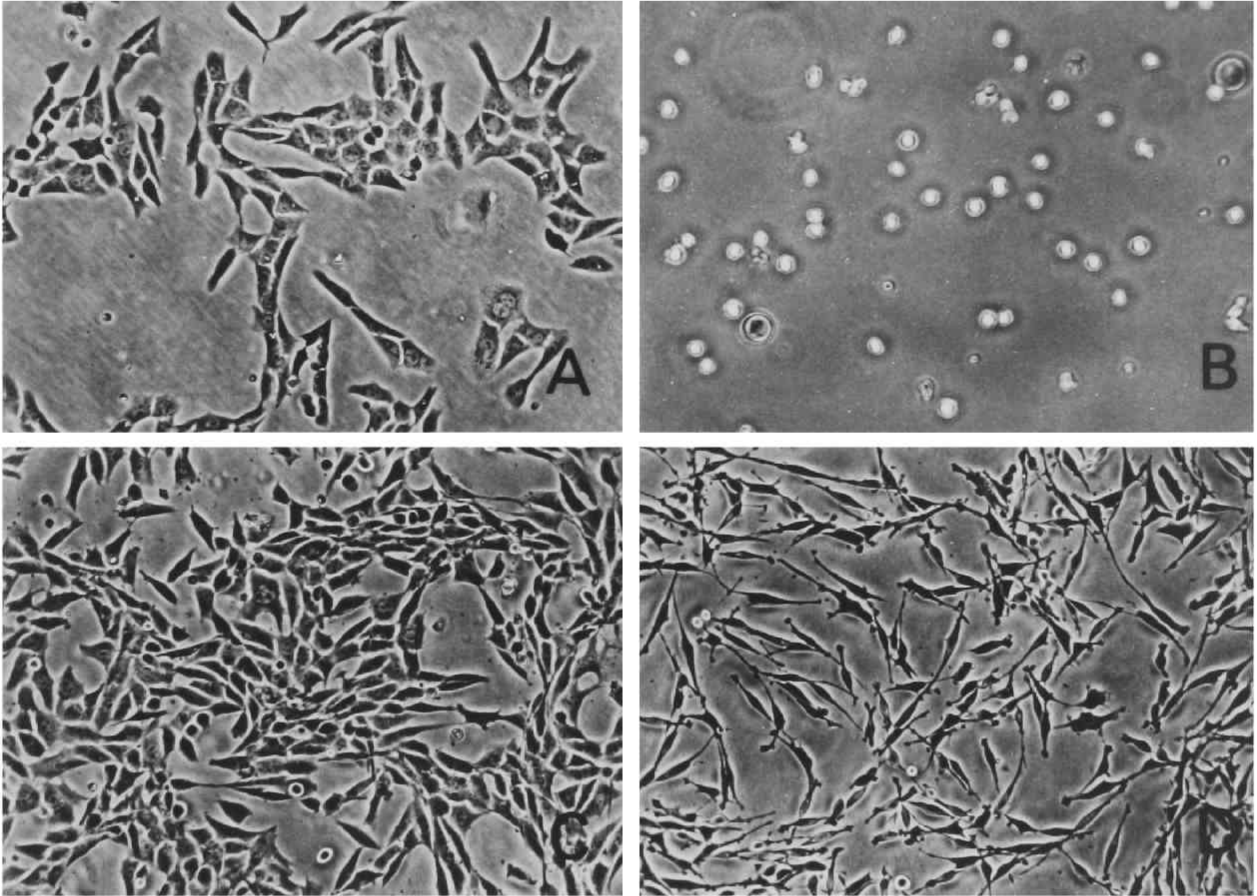


図1 V79細胞(A)，偏平な繊維芽様の雑種細胞，VE-a21細胞(C)，より丸みをおびた紡垂形の雑種細胞，VE-g23細胞(D)の単層培養，およびEAT細胞(B)の浮遊培養。位相差顕微鏡写真。120倍。

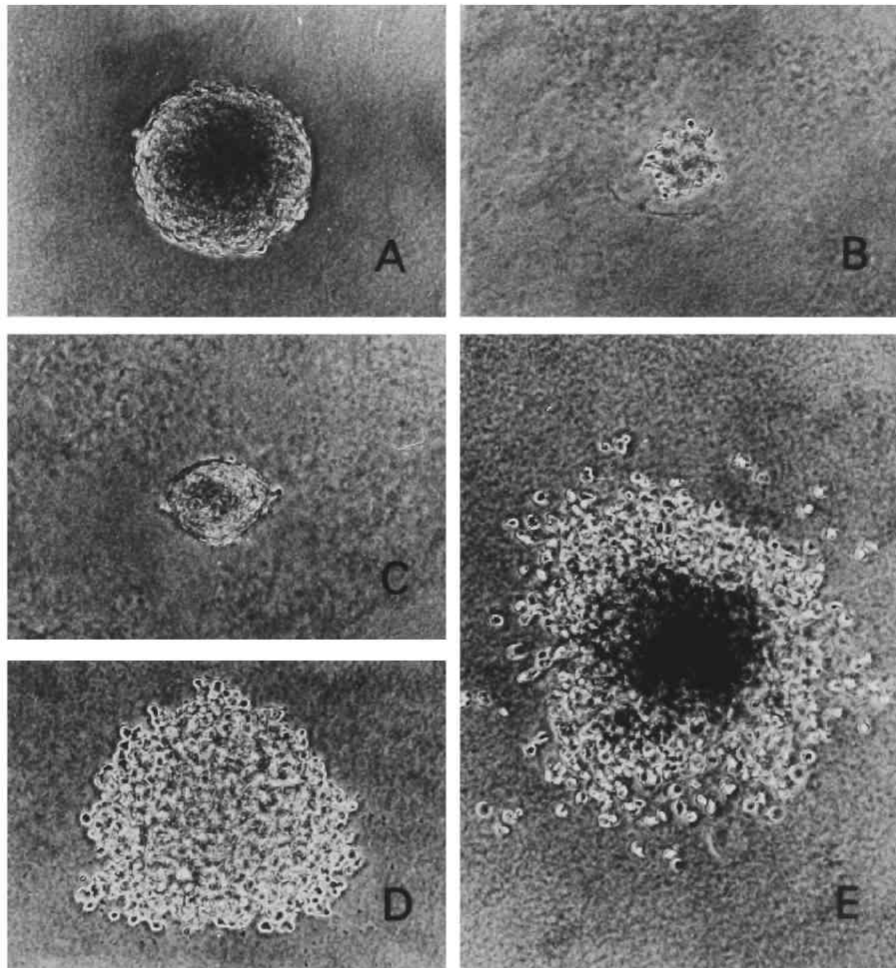


図2 V79細胞(A)，EAT細胞(B)，雑種細胞の凝集型，VE-a11細胞(C)とVE-g21細胞(D)および分散型，VE-g23細胞(E)の軟寒天培養(培養7日後)の位相差顕微鏡写真。90倍。

新たにクローニングした亜株, V79-111 株を用いた。以下, 特にことわらない限り, この V79 111 株の細胞を V79 細胞と呼ぶ。

## 2-1-2 細胞培養

V79 細胞は単層培養, または軟窩天培養する。

2-1-2-1 単層培養      イーグルの最小基本培地のアミノ酸およびビタミン類をそれぞれ2倍量にしたもの (イーグル MEM 培地 ニッスイ①粉末; 白水製薬(株), 東京; イーグル MEM アミノ酸ビタミン培地 ニッスイ粉末; 白水製薬(株), 東京) に, 牛胎児血清 (Fetal Calf Serum; Cwlth Labs., Melbourne, Australia) を 6%, ペニシリン (結晶ペニシリン G カリウム 明治; 明治製菓(株), 東京) を  $1 \times 10^5$  u/l, ストレプトマイシン (硫酸ストレプトマイシン 明治; 明治製菓(株), 東京) を 0.05g(カ価)/l, ファ

ンギゾン (Fungizone, Amphotericin B for Injection V.S.P.: E.R. Squibb & Sons, USA) を  $2\text{ mg}/\text{l}$  とするように加えたものを培地とし (EF培地), ガラス製またはポリスチレン製 (Falcon, Tissue Culture Dish,  $60 \times 15\text{ mm}$ ; Div. Becton, Dickinson & Co. Oxford, Calif.) ペトリ皿中で,  $37^\circ\text{C}$ , 湿度  $100\%$ ,  $\text{CO}_2$  濃度  $5\%$  の空气中で培養する。細胞はペトリ皿の底面に接着し仮足を伸ばす。その後、細胞は増殖を開始し,  $15$  時間ごとに倍加し, 単層のシートを形成する。この間  $1-2$  日ごとに培地交換を行う。細胞が皿一面を覆う状態 (confluent) になったところで継代する。このときの細胞数は皿あたり  $1.2 \times 10^7$  個 ( $1.6-3.1 \times 10^5$  個/ $\text{cm}^2$ ) である。

培地を除去した後,  $0.25\%$  粗トリプシン溶液 [(Trypsin,  $1:250$ ; Difco Labs., Detroit, Mich.) を  $2$  価陽イオンを含まない Puck の塩類溶液 (CMF; 表 1) (Puck, Cieclura & Robinson, 1958) に溶解したものを加え,  $37^\circ\text{C}$  で  $15$  分間処理し, 細胞を分散させ, EF培地で  $1$  回洗った後, EF培

表1 CMFの組成

NaCl	8.0 g	(137 mM)
KCl	0.4 g	( 5.4 mM)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.39 g	( 1.1 mM)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.15 g	( 1.1 mM)
Glucose	1.1 g	( 6.1 mM)
Distilled Water		
CMF	1.0 liter	

括弧中に各成分の最終濃度を示す。

地に、適当な細胞密度になるようにけんたくしたものを、新しいペトリ皿にまき継代とする。

2-1-2-2 軟寒天培養 直径6cmのポリスチレン製ペトリ皿 (Nunc: A/S Nunc, Roskilde, Denmark) 中で培養する。10%牛胎児血清を含むイーグルの最小基本培地に 0.5% 寒天 (Special Agar Noble; DIFCO Labs, Detroit, Mich.) を含むもの (0.5%寒天培地) を、皿あたり 4 ml 加えて固めた上、細胞をけんたくした (2-1-2-1 により分散させた) 0.33%寒天を含

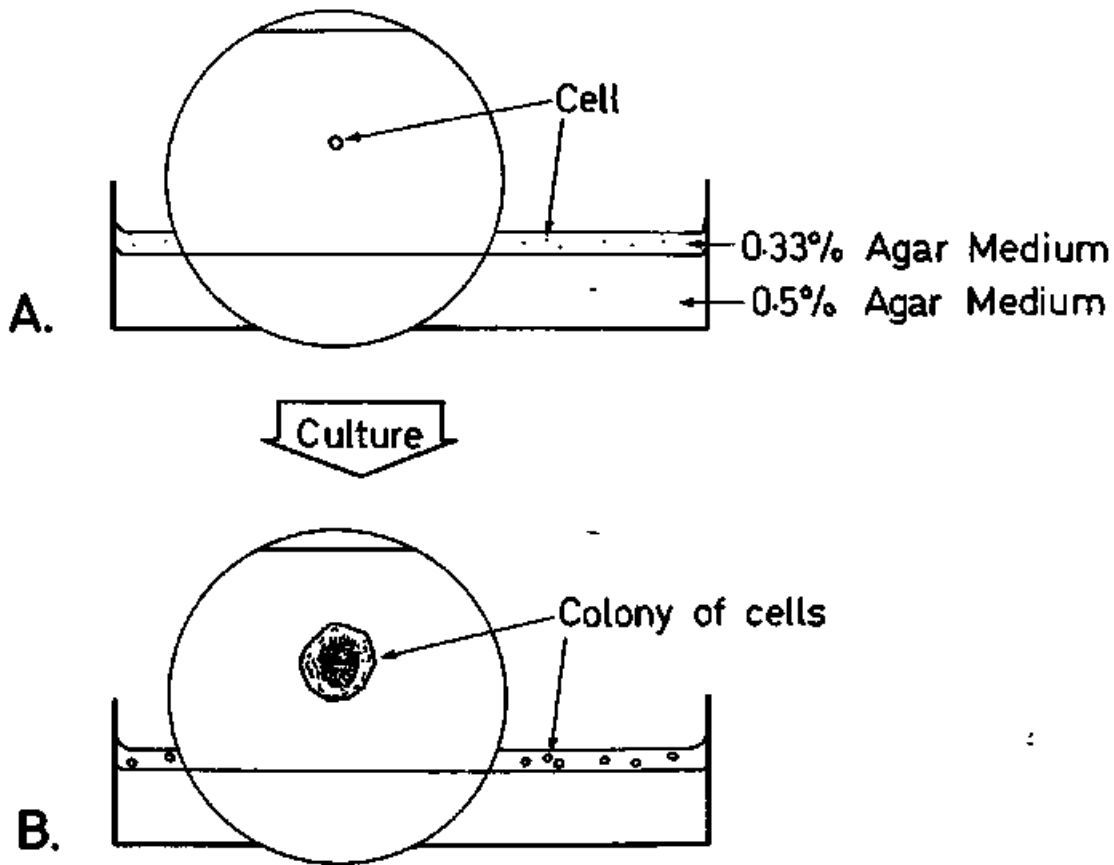


図3 軟寒天培養

む同培地を 1.5 ml 加えて固め，単層培養と同じ条件で培養する（図3A）。このときまく細胞数は皿あたり 100-200 個ぐらいが適当である。0.5%寒天培地は，使用時に表2にあがた各成分を，寒天は1度沸騰水浴中で完全に溶解したものを，44℃に保温してから混合

表2 0.5% 寒天培地

	Parts by volume
1.1% Agar	9
2 x Eagle MEM	9
Fetal Calf Serum	2
<hr/>	
0.5% Agar Medium (10% Fetal Calf Serum)	

表3 細胞けんたく 0.33% 寒天培地

	Parts by volume
0.5% Agar Medium	2
Cell Suspension in EF Medium <sup>a</sup>	1
<hr/>	
Cell Suspension in 0.33% Agar Medium <sup>b</sup>	

<sup>a</sup> 2n細胞/ml。ただし，bを皿あたり15ml加えるとき。nは皿あたりの細胞数。

し，作成する。この0.5%寒天培地に，細胞をけんたくしたEF培地を44℃に保温したものを，2:1の割合で混合して（表3），ペトリ皿中に固めた0.5%寒天培地の上にまくのである。これを7-10日間培養すると，細胞は増殖して，肉眼で検出できる大きさのコロニーを形成する（図3B）。

### 2-1-3 クローニング

2-1-3-1 単層培養でのクローニング  
単層培養を低密度（100-200 細胞 / 直径6cmのペトリ皿）で7-10日間行い，形成されたコロニーをシート状のままラバーホリスマンではがし，パスツールピペットですいとる（以下図4参照）。この細胞のシートを，直径35cmのペトリ皿（Falcon）に1滴0.25%粗トリプシン溶液（1mMEDTAを含む）をおとしたもの中で，97℃で15分間処理する。ここにEF培地を1.5ml加え，よくピペッティングすることにより細胞を解離した後，そのまま前述の単層培養を行う。

2-1-3-2 軟寒天培養でのクローニング  
軟寒天中で7-10日間培養して形成されたコロニー1個をパスツールピペットで寒天中よりすいとり，その細胞塊を2-1-3-1と同じ方法で単一細胞に解離し単層培養する（図4）。



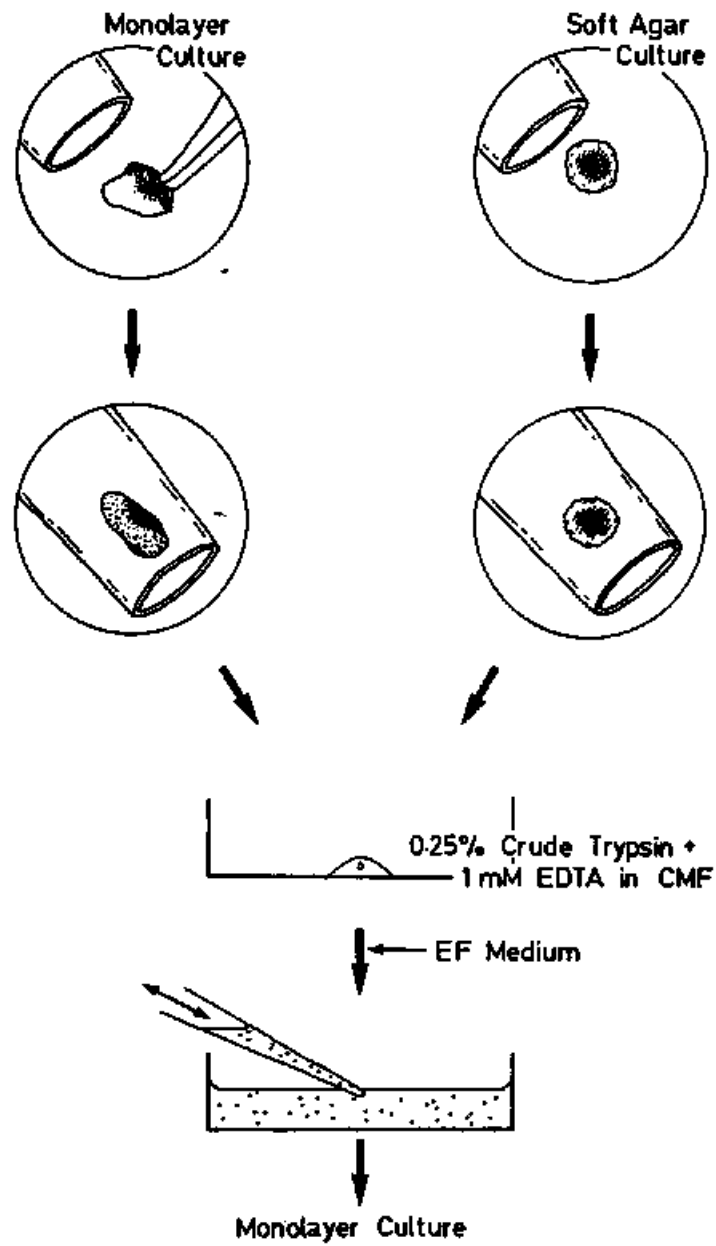


図4 クローニングの方法

## 2-2 接着能をもたない株細胞

### — エールリッヒ腹水癌細胞

#### 2-2-1 細胞

エールリッヒ腹水癌細胞 (Ehrlich's ascites tumor cell; 以下 EAT 細胞と略す) は, マウス乳癌由来の腹水型腫瘍を *in vitro* で浮遊培養 (後述) できるようなったものを用いた。EAT 細胞は, 浮遊培養で単一細胞として, あるいは 10 個程度の細胞集合塊を形成して, 増殖する。この細胞集合塊では細胞間の結合は軽いピペッティングで完全に単一細胞に分離し得る程度に弱い。また, ガラスやプラスチックなどの基質には, 血清の存在する条件下では, ほとんど接着しない (図 1B)。軟寒天培養ではあまりよく増殖せず, コロニー形成率も 10—20% と低頻度である。コロニーの表面は個々の細胞の細胞が球状のままで, V79 細胞のそれのような滑らかさはない (図 2B)。

## 2-2-2 細胞培養

EAT細胞は、浮遊培養と軟寒天培養(2-1-2-2)が可能である。

2-2-2-1 浮遊培養 細胞を EF 培地にけんたくしたものを、直径9cmのガラスペトリ皿で、単層培養と同じ条件で培養する。EAT細胞は倍加時間が15時間で、EF培地1mlあたり最大  $1 \times 10^6$  個まで増殖可能である。継代は、培養の一部を新しいEF培地で希釈することにより行う。大量に培養するときには密封した250ml耐圧びん中で50mlの培養を振とう培養する。

## 第3章 雑種細胞の形成と単離

前章でみたように、その形態が大きく異なる2種類の株細胞を、HVJを用いて細胞融合させ、両親細胞株と形態の異なった体細胞雑種株を単離した。

### 3-1 細胞融合

#### 3-1-1 HVJの調整

3-1-1-1 HVJの培養 孵化10日目  
卵漿尿腔にHVJを接種し、3日間35.5℃で培養後、冷室(4-10℃)に一晩放置し、胚を殺してから卵の気室に面した卵殻を破り、注射器で漿尿液を採取する。この感染漿尿液をBSS(表4)で1,000倍に希釈した液を、卵1個あたり0.1ml、接種したとき、3日後に2,000HAU/ml(後述)の漿尿液6-10mlを

表4 BSSの組成

NaCl	8.2 g	(140 mM)
KCl	4.0 g	( 54 mM)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.36 g	( 1 mM)
Tris	1.2 g	( 10 mM)
Distilled Water		
HCl		
<hr/>		
BSS (pH 7.6)	1.0 liter	

括弧内に各成分の最終濃度を示す。

1個の卵から採取される。

3-1-1-2 HVJの精製 上述の感染漿尿液を低速遠心(200×g)して細胞残渣を除いた上清を超遠心(30,000×g)しHVJを沈殿させる。上清を除き新しいBSSを加えて冷室に一晚放置後、再びけんたくする。以上の操作を2回くり返した後、最後に、低速遠心によりHVJ凝集塊を取り除き、その上清を採取する。

3-1-1-3 HVJの定量 HVJの赤血

球凝集価 (HAu) を測定することによって行った。HA プレートにウイルス試料を 0.5 ml とし、SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム) で 2 倍階段希釈系列を作る。これに 0.5% ニワトリ赤血球液 (ニワトリ新鮮血より低速遠心により採取, SSC で洗浄後, SSC にけんたくしたものの。濃度は体積比。) を加え、よくかくはんした後、室温に 1 時間放置、赤血球凝集を示す最大希釈倍数を求め、これをウイルス試料の HAu とする。

### 3-1-2 細胞融合

細胞融合は、Yamanaka と Okada (1966) に従って行った。

V79 細胞を 0.25% 粗トリプシン溶液で解離し、直径 6 cm のポリスチレン製ペトリ皿 (Falcon) あたり  $1-2 \times 10^3$  個まき、EF 培地で単層培養の条件 (2-1-2-1) で培養する。細胞が基質と充分接着し、仮足を伸長するまで 約、

2-4時間培養した後(図5A), EF培地を除き,  
 1mM  $Ca^{2+}$ を含むBSS(BSS-Ca)で2度洗う。  
 これに, 500HAu/mlのHVJけんたく液(BSS-Ca

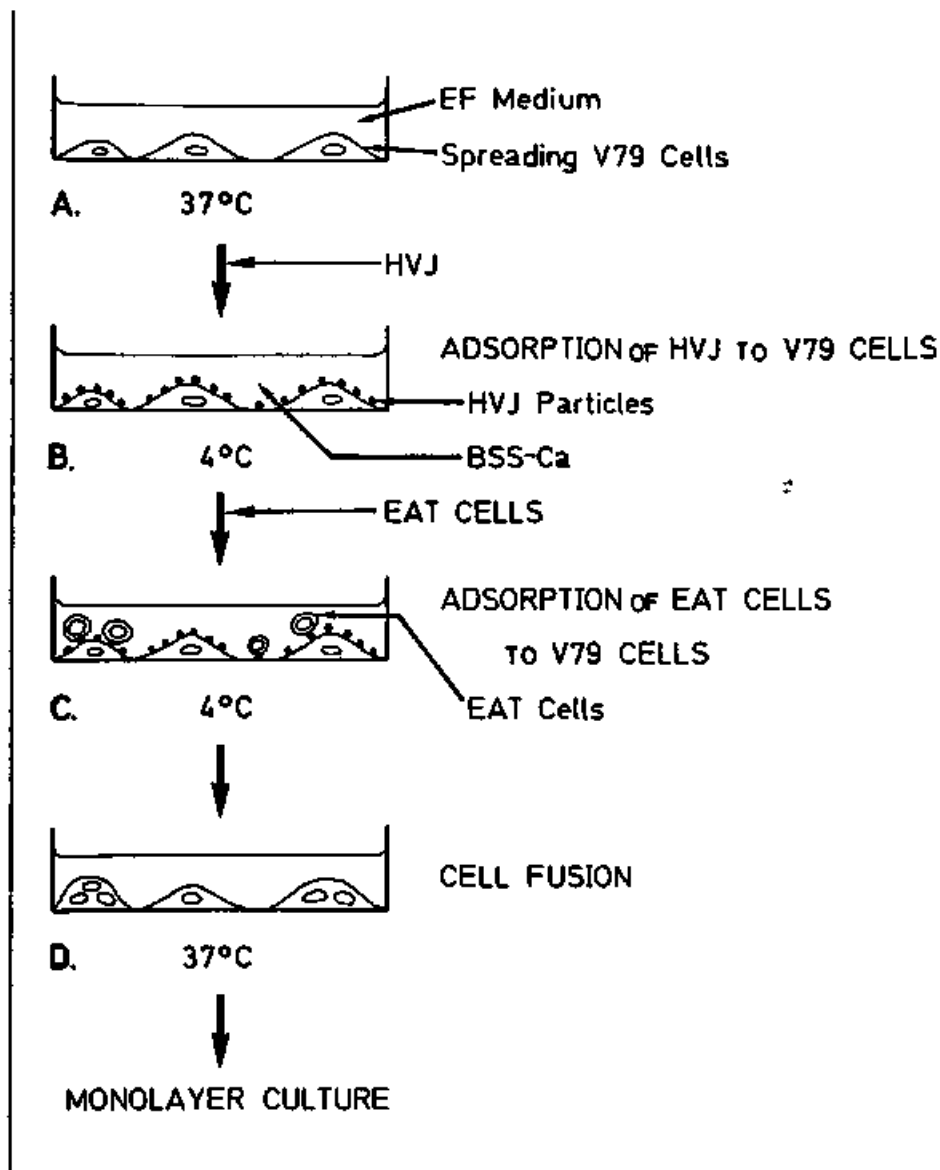


図5 細胞融合

けんたく液)を0.5ml加え, 4°Cに5分間放置して, HVJをV79細胞に吸着させる(図5B)。これをBSS-Caで2回洗浄後, BSS-Caで2回洗った $1 \times 10^6$ 個のEAT細胞をBSS-Ca 1mlにけんたくしたものを加え, 4°Cに10分間おいて, EAT細胞をV79細胞にHVJを介して結合させる(図5C)。さらに37°Cで90分間培養し細胞融合を起こさせる(図5D)。これから浮遊しているEAT細胞と共にBSS-Caを取り除き, EF培地でおきかえ単層培養を続ける。

### 3-2 雑種細胞の単離

上述の培養を7日間続けた後, 形成されたコロニーのうちから, V79細胞とも, EAT細胞とも異なった形態の細胞から成るコロニーを単離しクローニング(2-1-3-1)した。クローニングを2回くり返したのち, 各クローニングごとに接着性を調べ, その結果に基づいて, 9株の2次クローンを選んだ。それらは8株



の、それぞれ互いに独立に融合した、1次クローン株由来である。この2次クローン株細胞を2-3週間培養した後、3次クローン株を単離した。7株の2次クローン株より、それぞれ2クローンずつ、1株(VE-g2)からは10クローン、1株(VE-d1)からは1クローンだけを単離した。この3次クローンは軟寒天中の形態に基づいて単離した(2-1-3-2)。図6にこれらの雑種細胞株の系統を示した。それぞれの雑種株細胞は約 $10^7$ 細胞まで増やした後、分散し、凍結用培地(表5)にけんたくし、分注して $-70^{\circ}\text{C}$ で凍結保存する。これらの雑種細胞株を用いたすべての実験は、凍結後

表5 凍結用培地の組成

Dried EAGLE MEM (NISSUI 1)	8.46	g
L-Glutamin	0.263	g
HEPES	2.38	g
Dimethyl Sulfoxide	100	ml
(fetal) calf serum	100	ml
Distilled Water		
Freeze Medium	1.0	liter

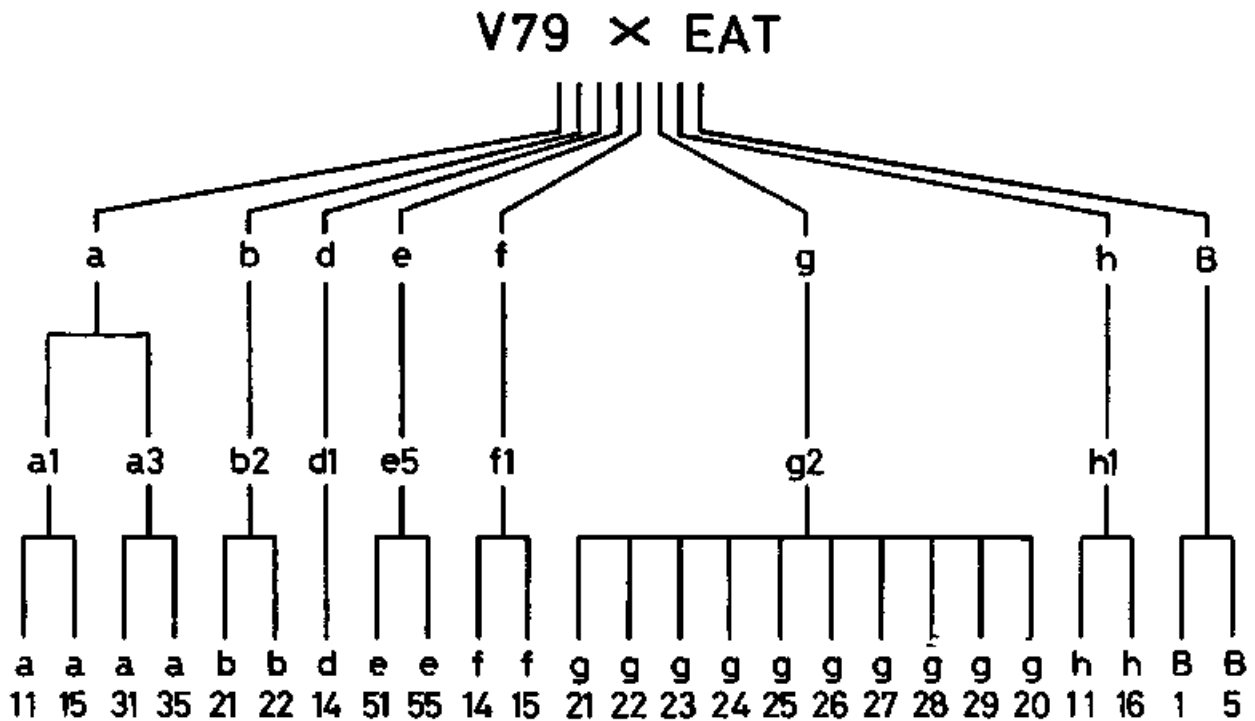


図6 雑種細胞株の系統図

1年以内に解凍し、培養1月以内に行う。

ここで雑種細胞の選択法について、一言述べておく。一般に、体細胞雑種をその親細胞から選択して分離するには、別々の酵素を欠損した1組の株を用い、その間の雑種細胞で酵素欠損が相補的に補われたもののみ生き残

れる条件で培養するという方法が用いられる。例えば、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損と今ミジンキナーゼ欠損株との間の雑種細胞は、HAT培地で培養することにより、両親細胞から選択できる (Littlefield, 1964)。本実験では、このような選択法はとらず、もっぱら形態のちがいのみを指標として行った。本実験に使用した親株どうしは細胞の形態が全く異なる。EAT細胞は丸い球状で浮遊状態であり (図1B)、V79細胞は扁平な繊維芽様細胞である (図1A)。

このように形態の異なる細胞間から雑種細胞を得た場合、その多くは両親細胞の中間の形態を示し、それは、それぞれの親株由来のゲノムセットの存在比に比例するような形態変異を示す (Murayama-Okabayashi, Okada & Tachibana, 1971)。従って、形態が両親株の細胞と異った細胞が雑種細胞であろう、との推測に基づいて選択した。

このような選択により得られたクローンが、

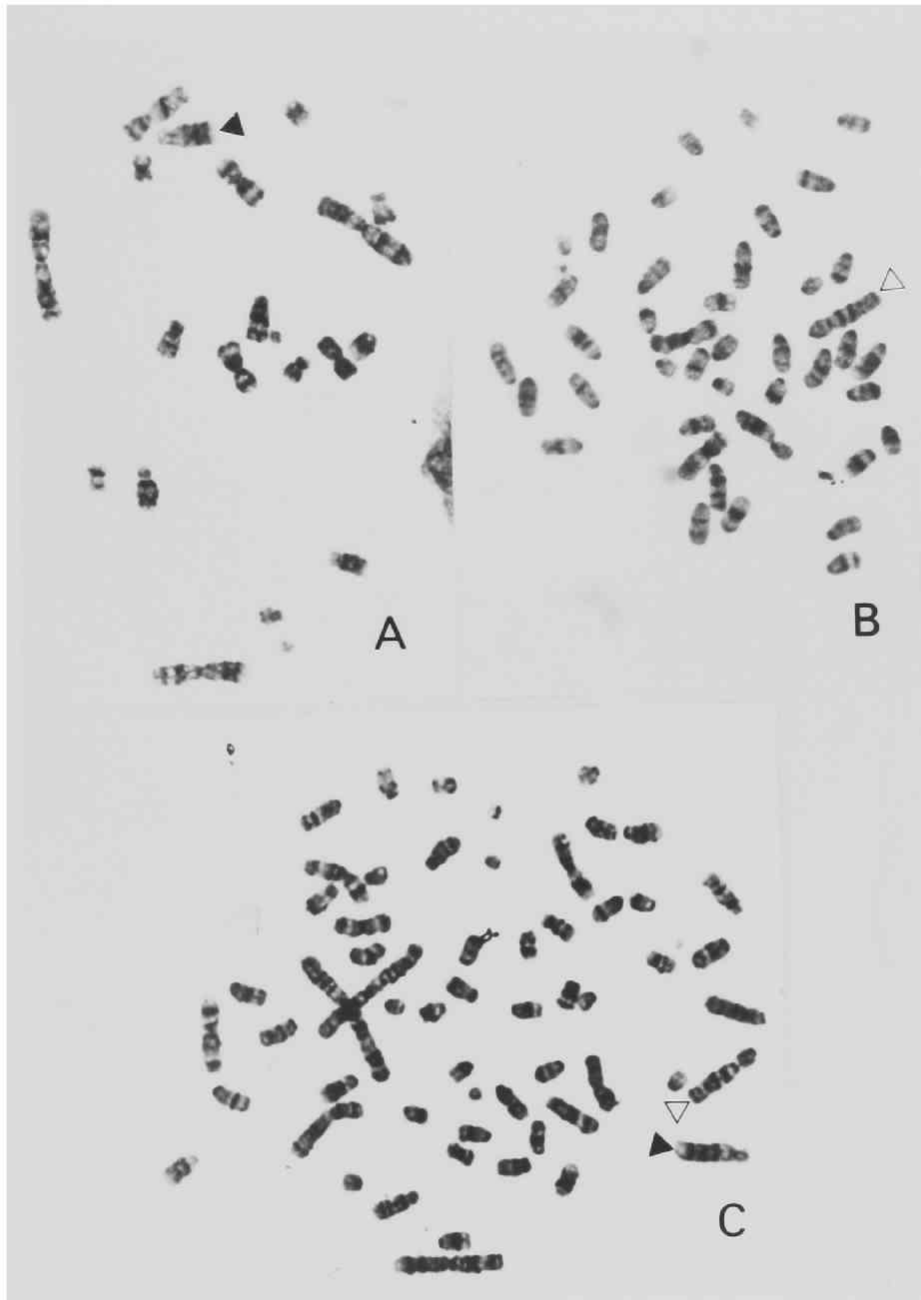


図7 V79細胞(A), EAT細胞(B), 雑種細胞, VE a2 (C)の染色体標本。▶,▷はそれぞれV79, EAT細胞の対応する染色体を示す。

実際に雑種細胞であることは、3次クローンをとる際に選んだ、9株の2次クローンについて核型分析することにより確かめた。つまり、これらの株の細胞には、すべて、EAT細胞由来およびV79細胞由来の染色体が共存しているのである。一例を図7に示す。

### 3-3 雑種細胞の培養と形態

#### 3-3-1 単層培養

基本的には、V79細胞の場合(2-1-2-1)と同じである。倍加時間も、ほぼ15時間と、V79細胞、EAT細胞と同じはやさで増殖するが、また培地交換を12-24時間おきに行う必要がある。雑種細胞も固型の基質上で培養した場合、その形態は大きく2型に分けられる。ひとつは、かなり扁平で、V79細胞にやや似た形態の繊維芽様細胞であり(図1C)、他のひとつは、より丸味をおびた細胞で、そ

の両側に細長い仮足を持つものである(図1D)。この形態は少くとも10代の継代の間, ほとんど変化なく維持された。各3次クローンの形態を表7にまとめてある。(表7: p52)

### 3-3-2 軟寒天培養

9株の2次クローン, 25株の3次クローンのいずれもが, 軟寒天培養で増殖可能である。軟寒天培養はV79細胞の場合(2-1-2-2)と全く同じ方法で行った。軟寒天中のコロニーの形態は2型に分けられる。ひとつは, 凝集型(packed type)コロニーで, 単一細胞が増殖してできた娘細胞が, 凝集塊を形成するものであるが, V79細胞のように滑らかな表面をもつものから(図2C), EAT細胞のもののように個々の細胞の輪郭が明らかな表面をもつものまで(図2D)さまざまある。もうひとつは, 分散型(disperse type)コロニーで, 増殖してできた娘細胞が, 軟寒天中を周囲へ

移動していく結果，形成されるコロニーは，細胞がゆるやかにつまった中心部と，個々の細胞が分散している周辺部とからなる（図2E）。この形態のコロニーはV79細胞，EAT細胞共に全くみられず，雑種細胞独自のものである。この2型は少くとも10代の継代の間，ほとんど変化なく維持された。表7（P.52）に各3次クローンの形態を示す。

## 第4章 細胞の接着性

この章では、まず接着性の測定の方法を述べ、細胞同士の接着能を有するV79細胞が2種類の接着機構をもつこと、接着能を有しないEAT細胞はこの接着機構を両方共もたないことを確認したうえで、この両細胞間の雑種細胞株について、測定した接着性を記述し、V79細胞で見られた2種類の接着機構の発現について論じる。

### 4-1 細胞間接着性の測定法

本実験で用いられる細胞間接着能の指標は、単層培養した細胞を一度解離し、それを、ある条件下で再集合させたときの、その集合の程度を総粒子（細胞集合塊）数の減少で表したものである（以下 図8を参照）（Edwards, 1973; Ueda & Takeichi, 1976）。



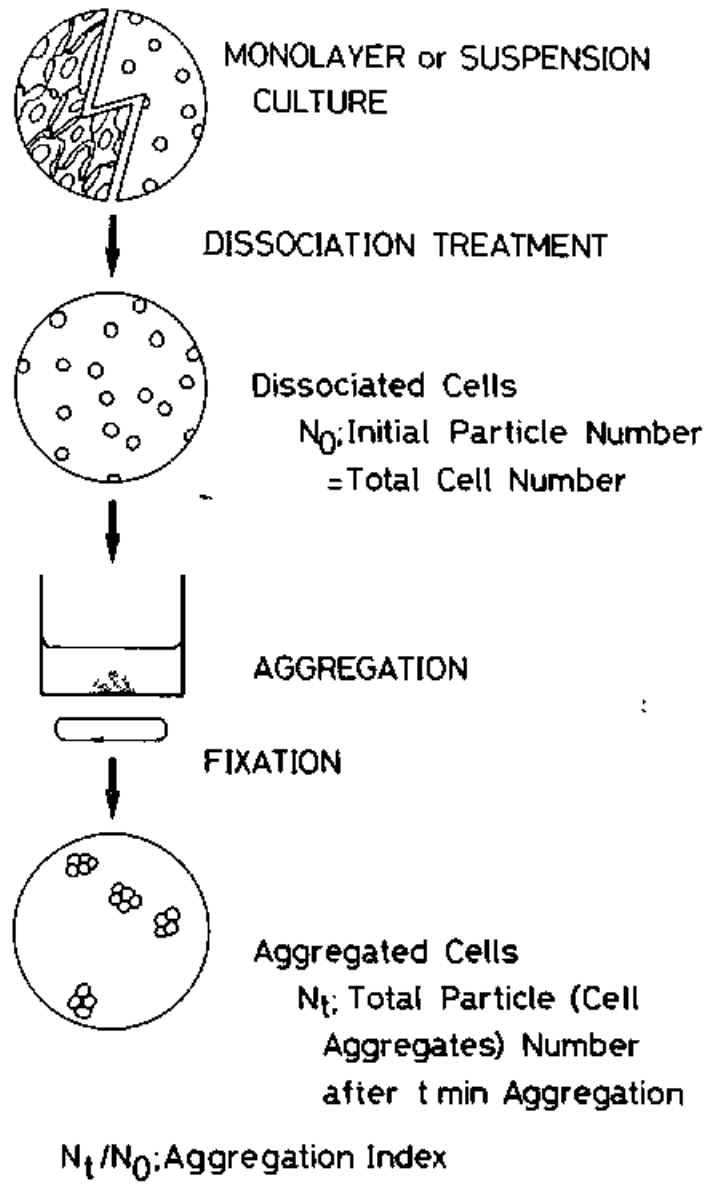


図 8 細胞間接着性の測定

## 4-1-1 細胞の解離法

基本的には、3通りの解離法がある (Takeichi, 1977; Urushihara *et al.*, 1979)。

4-1-1-1 E処理      ペトリ皿を一面に覆うまでに増殖した単層培養を、CMFで2回洗った後、1 mM EDTA を含む、HEPES で緩衝し、pH 7.4 に調整した、2価陽イオンを含まない塩類溶液 (HCMF; 表6) で、37°C, 15分間処理する。処理後 HCMF で2回洗い、HCMF にけんぞくする。

表6 HCMF の組成

NaCl	8.0 g	(137 mM)
KCl	0.4 g	( 5.4 mM)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0.12 g	( 0.34 mM)
HEPES	2.38 g	( 10 mM)
Glucose	1.1 g	( 6.1 mM)
1N NaOH	9.6 ml	
Distilled Water		

---

HCMF (pH 7.4)      1.0 liter

括弧内に各成分の最終濃度を示す。

4-1-1-2 TE 処理 0.01%再結晶  
トリプシン (Crystalline Trypsin, Type I; Sigma,  
St. Louis, Mo), 1mM EDTA を含む HCMF を処  
理液として E処理 (4-1-1-1) と同じ操作を  
行う。この処理で、トリプシン濃度のみを、  
 $10^{-3}\%$ ,  $10^{-4}\%$ ,  $10^{-5}\%$  とかえたものも行う。  
 $10^{-4}\%$  のときを特に LTE 処理と呼ぶ。

4-1-1-3 TC 処理 単層培養を  
1mM  $\text{Ca}^{2+}$  を含む CMF (MF) で 2 回洗った後、  
0.01% 再結晶トリプシン, 1mM  $\text{Ca}^{2+}$  を含む  
HCMF を処理液とし、以下 E処理と同じ操作  
を行う。

TE 処理およびそのトリプシン濃度をか  
えた処理、TC 処理の際には、トリプシン処  
理後、トリプシンインヒビター (Trypsin Inhibitor  
from soy bean, Type I-S; Sigma, St. Louis, Mo.) を加  
えてトリプシンを不活化する。こうして得ら  
れた解離細胞をそれぞれ、E細胞, TE細胞,

TC細胞と呼ぶ。

#### 4-1-2 解離細胞の集合

直径16mm, 深さ17mmの平底井戸型皿 (Linbro, Tissue Culture Multi Well Plate, 24 Flat Bott Wells, 17×1.6 cm; Linbro Scientific, Inc. Subsidiary of Flow Labs, Inc. Hamden, Conn.) をあらかじめ牛血清アルブミン (BSA) (Bovine Serum Albumin Fraction V; Armour Pharm. Co.) でコートし、細胞が皿に接着するのを防いだるものを使用する。BSAコートは、皿に0.5% BSA水溶液を入れ、10℃で16時間、または37℃で1時間以上放置することにより行う。細胞を扱う他の器具もBSAコートしておく。

この皿に(4-1-1)で得られた解離細胞を1皿に $3 \times 10^5$ 個、0.5mlのHCMFにけんたくして入れる。必要があれば、50mM  $MgCl_2$ , または50mM  $CaCl_2$  を10 $\mu$ l, これに加える。これを37℃ 80rpmで旋回培養すると、細胞は

皿の中央に集り、お互いが接触しあった状態が形成され、細胞集合塊が形成され始める。一定時間培養したのち 25%グルタルアルデヒド HCMF 溶液を 0.5 ml 加えて固定し、集合反応を停止させる。固定そのものの効果によって、細胞が二次的に集合することはない。1時間以上固定したのち、0.145 M NaCl 9ml

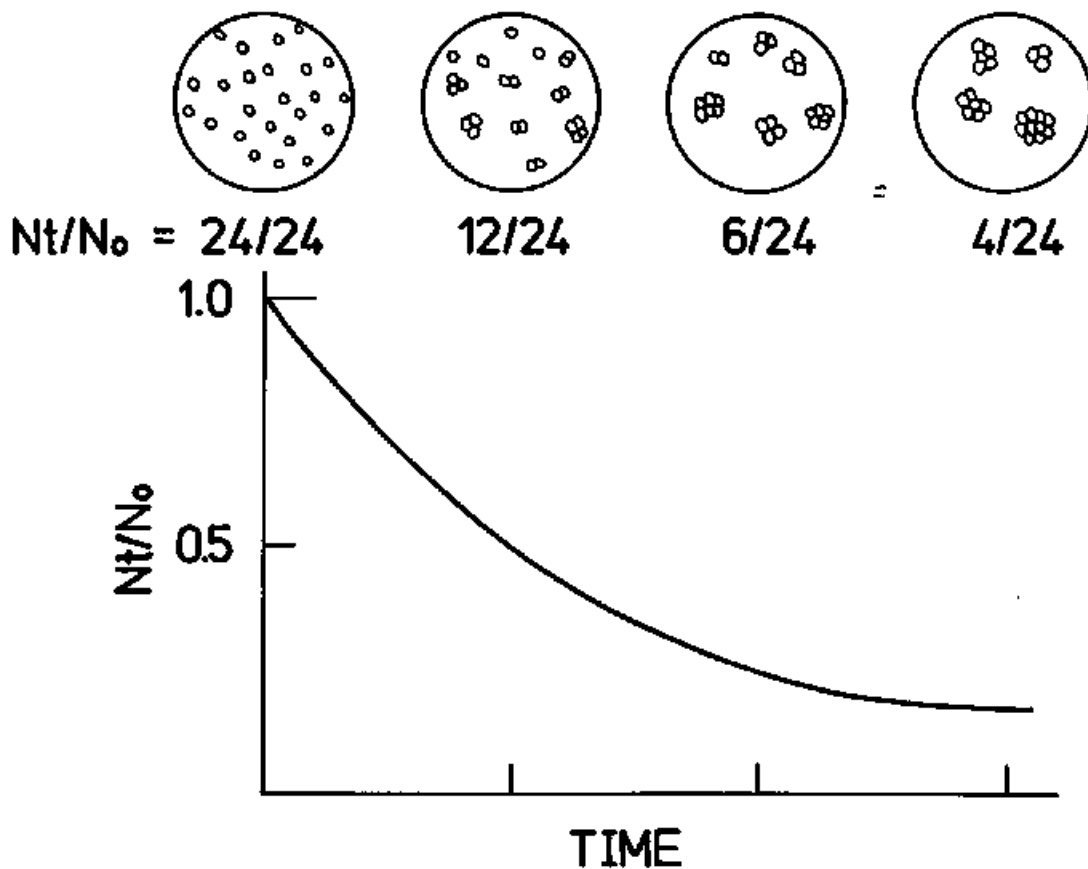


図9  $N_t/N_0$ で表わした細胞集合の継時変化

で希釈し、その 0.5 ml 中の総細胞（集合塊）数をコールターカウンター（Coulter counter, model ZB, Coulter Electronics, Hialeah, Fla.）で測定する。旋回培養  $t$  分後のこの数値を  $N_t$ 、培養開始時のそれを  $N_0$  としたとき、 $N_t / N_0$  を、 $t$  分後の集合度と定義し、接着能の指標とする。集合度の値域は  $0 < N_t / N_0 \leq 1$  であり、1 に近いほど接着能は低く、0 に近いほど接着能は高いのである（図 9 を参照）。

これまでの記述では、接着性と接着能という言葉を使い分けてきたが、ここで定義しておく。細胞の接着能とは、ここに述べた特定の解離法(4-1-1)で解離した細胞の、特定の条件下での集合度を意味する。一方、細胞の接着性とは、細胞がそれぞれの条件で、どのような接着能を示すかを意味する。

## 4-2 V79細胞の接着性

すでに述べたように (2-1-1), 本実験に用いられたV79細胞は Takelchi (1977), Urushihara *et al.* (1979) により その接着性が報告された株から単離した亜株であるので, その接着が, もとの株と同じであるかどうか調べた。以下に その結果とともに, V79細胞の2種類の接着機構の存在について解説を加える。

### 4-2-1 V79細胞の接着性

1mM EDTA で解離した細胞は (E細胞),  $\text{Ca}^{2+}$  の非存在下で高い接着能を示すが, 1mM  $\text{Ca}^{2+}$  の存在下で, それはさらに高められる (図10A)。1mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下でトリプシン処理した細胞 (TC細胞) は,  $\text{Ca}^{2+}$  としては, ほとんど接着しないが, 1mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下での接着能は, E細胞と同程度に高い (図10B)。

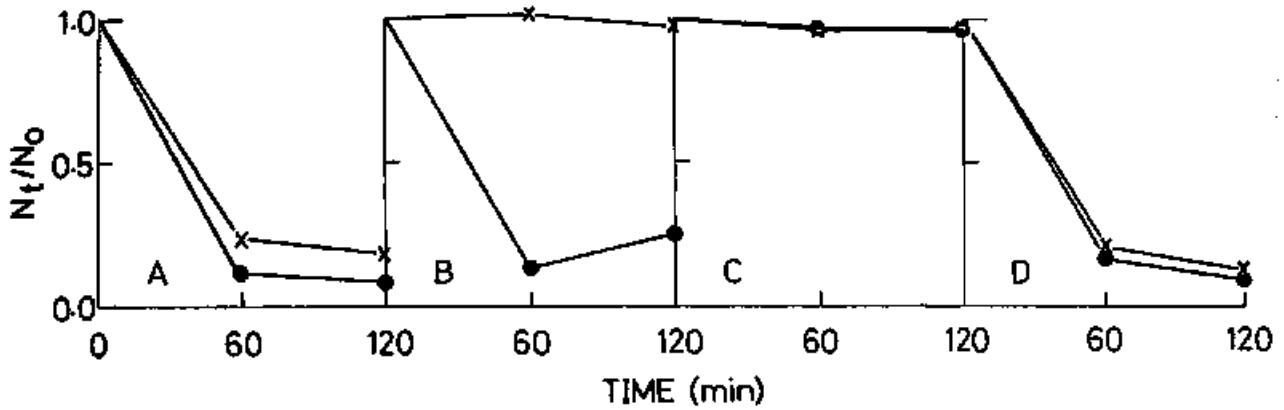


図10 V79細胞の接着性。E (A), TE (B), TE (C) および LTE (D) 細胞の集合度 (縦軸) の経時変化。横軸は巡回培養した時間 (単位: 分)。x:  $Ca^{2+}$ なし。●:  $1mM Ca^{2+}$

1mM EDTA 存在下でトリパシン処理した細胞は、トリパシン濃度が $10^{-2}\%$ のとき (TE細胞) には、 $Ca^{2+}$ の存否にかかわらず、ほとんど全く集合しない (図10C, 11)。トリパシン濃度の低下に従って接着能は高まるが (図11)、 $10^{-4}\%$ トリパシン処理の場合 (LTE細胞)、 $Ca^{2+}$ による接着能の増大は、E細胞に比べて小さいか、ほとんどみられない (図10D, 11) また LTE細胞の $Ca^{2+}$ なしでの接着能も、E細胞



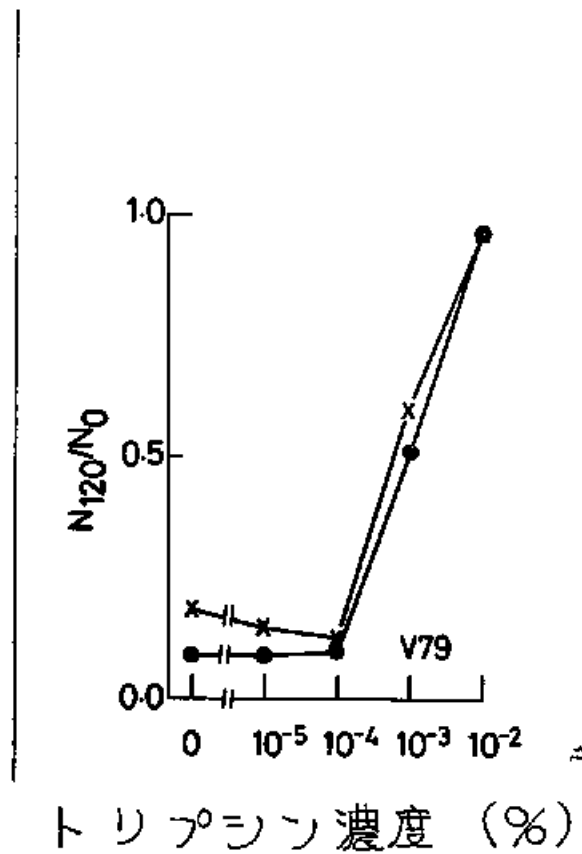


図11 1mM EDTA 存在下でトリファン処理したV79細胞の接着能。縦軸：旋回培養120分後の集合度。横軸：処理トリファン濃度（単位：%）。x： $Ca^{2+}$ なし。●：1mM  $Ca^{2+}$

より高い場合が多い（図11）。

以上の結果を、もとのV79株の接着性と比較すると、この亜株ではE細胞 TC細胞と

も、もとのV79株よりやや接着能が高いが、全体の接着性としては一致している。従ってこの変株も、もとのV79株と同じ接着機構を保有していることが判った。

#### 4-2-2 V79細胞の接着機構

V79細胞の接着性の詳細な研究から、V79細胞の接着には、少なくとも2種類の質的に異なった機構が関係している、という仮説が提唱されている (Takeichi, 1977; Urushihara *et al.*, 1979; Takeichi *et al.*, 1979)。この仮説によれば、(以下図12を参照) V79細胞は、 $Ca^{2+}$ の存在に依存しない接着機構 (CIDM: Calcium Independent Mechanism) と、 $Ca^{2+}$ 依存性の接着機構 (CDM: Calcium Dependent Mechanism) をもつ。E処理ではこの両機構が保存されるが、CDMは $Ca^{2+}$ 存在下で、0.01%トリカシン耐性であり、CIDMはもつてないため、TC細胞では、CDMのみが機能することとなる。一方、 $Ca^{2+}$

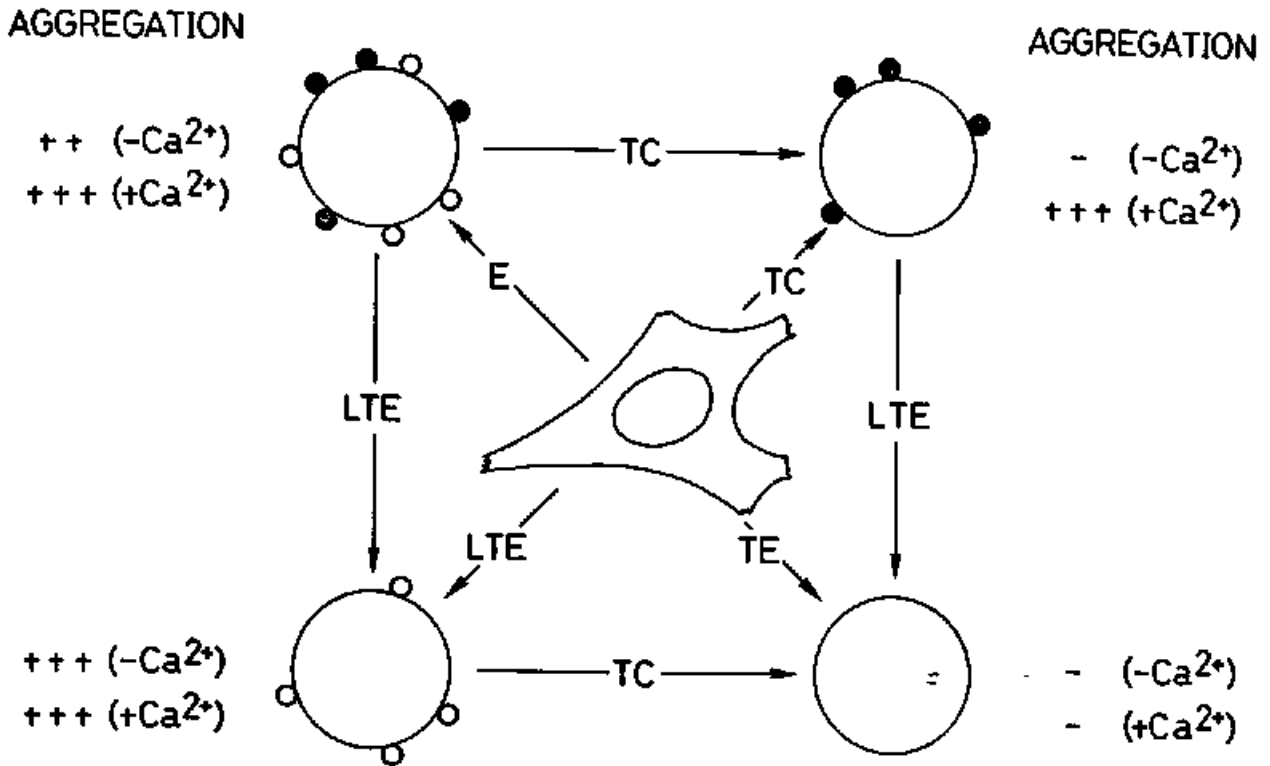


図12 細胞の処理条件と、得られる細胞の接着能との関係。中央が未処理細胞，周囲の4つが処理された細胞を表わす。接着能（集合度）の大きさは+の数で表わしてある。仮説上の2種類の接着機構，CDM(●)，CIDM(○)を各処理細胞について表示してある。(竹市，1978より)

おしの場合では、CIDMよりCDMの方が、トリプシンに対して感受性が高く、LTE処理ではCIDMのみ保存される。TE処理では、両者とも失活する。これらの処理は可算的である。すなわち、E細胞を、TC処理またはLTE処理すると、それぞれ、TC細胞またはLTE細胞と同じ接着性を示す細胞が得られる。また、TC細胞、LTE細胞を、それぞれ、LTE処理、TC処理すると、いずれの場合もTE細胞と同じ接着性を示す細胞が得られる。

CIDMとCDMは、それぞれ独立した接着機構を形成していて、CIDMとCDMとが反応し合うことはない(Takelchi *et al.*, 1979)。

#### 4-3 EAT細胞の接着性

EAT細胞は、浮遊状態で培養され、培養中での細胞間接着もあまり見られず、細胞間接着能は低いと思われるが、V79細胞のもつ2種類の接着機構が存在しているかどうかを、

改めて調べる，無処理のとき，およびV79細胞と同じ処理を細胞に施し，その接着能を測定した。無処理とは，培養された細胞をHCMFで2回洗うことをいう。

無処理のもの（データ略。以下のものにほぼ等しい），E（図13A），TC（図13B），TE（図13C），LTE（図13D）処理を施したものの，いずれの細胞も，ほとんど細胞集合塊を形成しない。トリカシン濃度を $10^{-2}\%$ — $10^{-6}\%$ と変え，1mM EDTA で処理した場合にも，E細胞

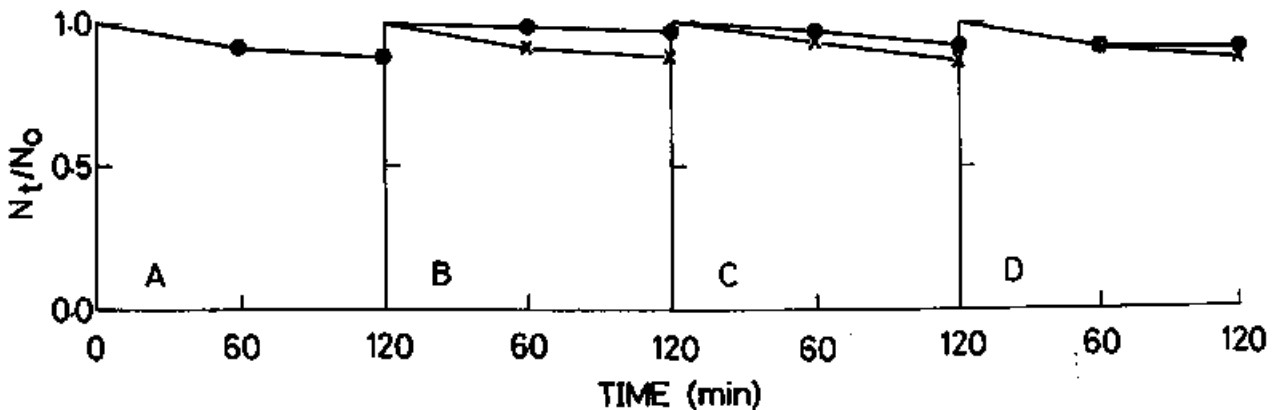


図13 EAT細胞の接着性。E (A)，TC (B)，TE (C) およびLTE (D) 細胞の集合度（縦軸）の経時変化。横軸は旋回培養した時間（単位：分）。x:  $Ca^{2+}$  なし，●: 1mM  $Ca^{2+}$ 。

TE 細胞と同様である (図14)。

以上の結果から, EAT細胞では, V79細胞のもつ接着機構(CIDM, CDM)の両方共が発現されていると結論される。

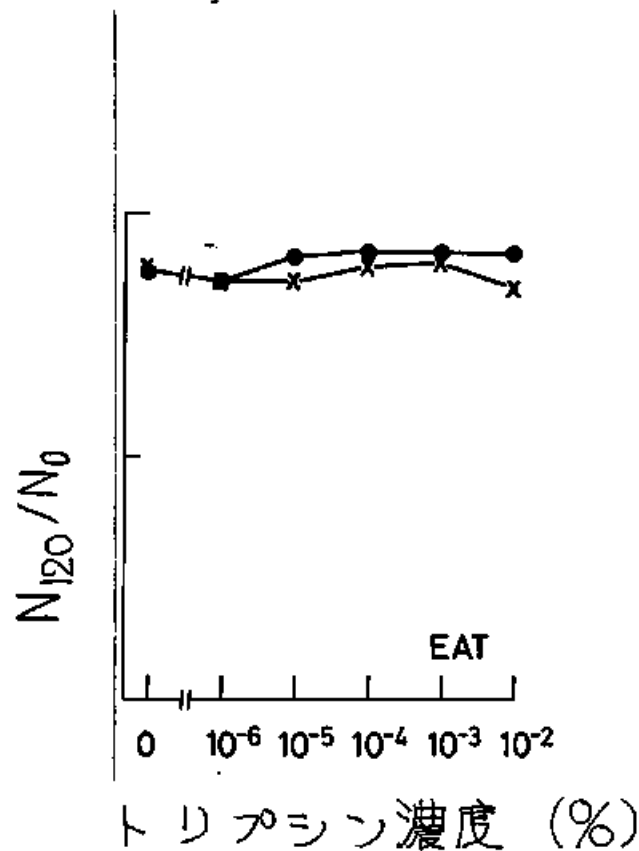


図14 1mM EDTA 存在下でトリプロシン処理したEAT細胞の接着能。縦軸: 旋回培養120分後の集合度。横軸: 処理トリプロシン濃度 (単位: %)。-x-: Ca<sup>2+</sup>なし, ●: 1mM Ca<sup>2+</sup>

#### 4-4 雑種細胞の接着性

雑種細胞株の2次クローン9株、およびそれら由来の3次クローン25株について接着性を調べた。すべての株についてE細胞の接着性を調べ、一部の株についてはTC細胞、TE細胞についても調べた。

##### 4-4-1 E細胞の接着性

V79細胞において、E処理は、その2種類の接着機構を保存したまま、細胞を解離する方法であった。そこで雑種細胞でのCIDM、CDM、両機構の発現状態を知るため、E細胞の接着能を測定した。

雑種細胞の接着性は多様である。図15にその代表例を示す。VE-e51株では、 $Ca^{2+}$ 存在下での接着能はV79細胞と同程度であるが、 $Ca^{2+}$ なしでの接着能がV79株に比べ低下している。これは、この雑種細胞株においては、

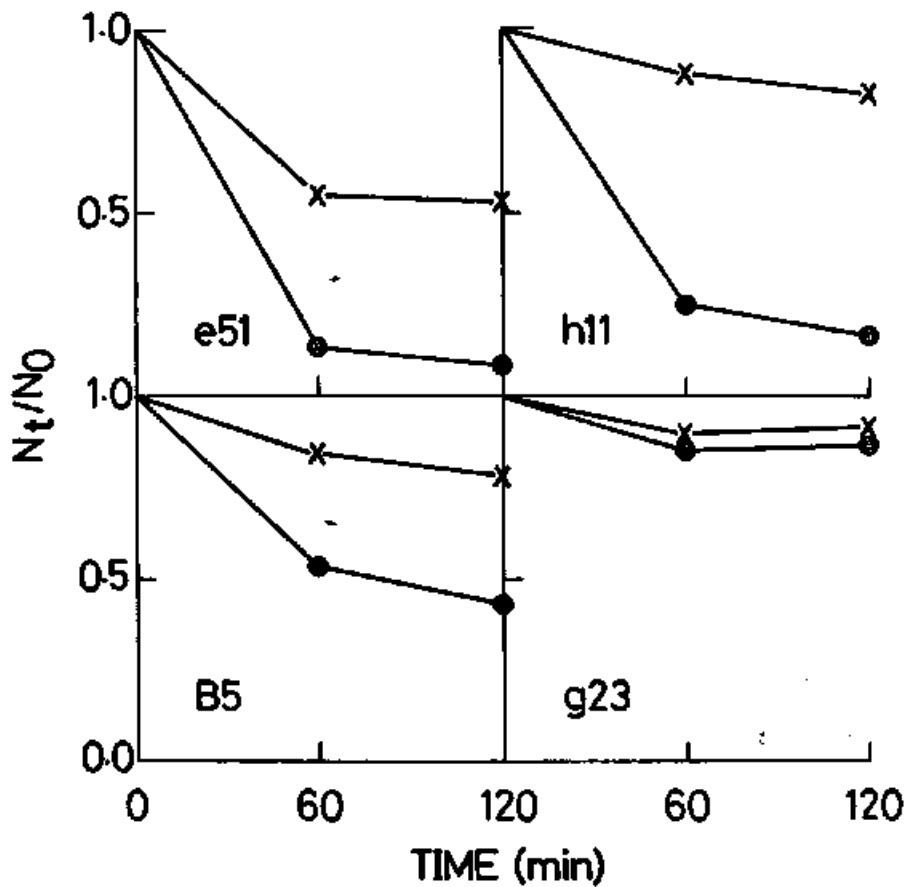


図15 雑種細胞の接着性。各雑種細胞株のE細胞の集合度(縦軸)の経時変化。横軸は巡回培養した時間(単位:分)。

\*:  $Ca^{2+}$  あり。●: 1mM  $Ca^{2+}$ 。

V79細胞株と比べて, CDM活性には違いはないが, CIDM活性の方は低下していることを示す。VE-h11株では $Ca^{2+}$ 存在下での接着能の



低下はわずかであるが、 $\text{Ca}^{2+}$ なしでの接着能は極めて低く、あたかもV79細胞をTC処理したもののようである。この株では、CDM活性については、V79細胞株からの変化はほとんどないが、CIDMの活性の方は、ほとんど消失してしまっているのである。同様に、VE-B5株では、CIDMの活性がほとんどなく、CDM活性も低下している。さらに、VE-g23株では、V79細胞株のTE細胞や、EAT細胞に近似した接着性を示し、CIDM、CDM両活性共極めて低下している。

調べた全部の株の、2価陽イオンなし、 $1\text{mM Mg}^{2+}$ 、 $1\text{mM Ca}^{2+}$ 存在下での接着能(Neo/No)を表7にまとめた。E細胞では、すべての株で $\text{Ca}^{2+}$ による接着能の増大がみられ、LTE処理したV79細胞のように、 $\text{Ca}^{2+}$ の有無によらず同程度の接着能を示す株、すなわち、CIDMのみもち、CDMをもたないと考えられる株は存在しなかった。

表7のデータに基づいて、3次クローンにつ

表 7 雑種細胞の性質

cells	Morphology of cells		Aggregation ( $N_{60}/N_0$ ) of E cells				Aggregation ( $N_{60}/N_0$ ) of TC cells			Total number of chromosomes	
	cultured on substrate <sup>a</sup>	cultured in soft agar <sup>b</sup>	without divalent cations	with 1 mM Mg <sup>2+</sup>	with 1 mM Ca <sup>2+</sup>	Number of samples <sup>d</sup>	without divalent cations	with 1 mM Ca <sup>2+</sup>	Number of samples <sup>d</sup>		Number of samples
V79	F	P	0.24 ± 0.077 <sup>c</sup>	0.14 ± 0.036	0.10 ± 0.021	7	0.99 ± 0.021	0.22 ± 0.032	3	20.9 ± 1.7	101
EAT	-	P	0.89 ± 0.053	0.87 ± 0.057	0.90 ± 0.036	3	0.91	0.98	2	43.9 ± 0.8	134
VE-a1	F	-	0.72 ± 0.054	0.53 ± 0.10	0.24 ± 0.035	4	0.98 ± 0.059	0.22 ± 0.10	3	55.2 ± 2.9	141
VE-a11	F	P	0.87 ± 0.032	0.37 ± 0.037	0.21 ± 0.023	7				54.6 ± 5.4	126
VE-a15	R	D	0.86 ± 0.033	0.56 ± 0.057	0.16 ± 0.034	7					
VE-a3	R	-	0.89 ± 0.079	0.79 ± 0.094	0.23 ± 0.022	4	1.01 ± 0.014	0.14 ± 0.013	4		
VE-a31	R	P	0.85 ± 0.021	0.47 ± 0.043	0.19 ± 0.029	7				53.6 ± 4.8	151
VE-a35	R	D	0.84 ± 0.048	0.44 ± 0.045	0.25 ± 0.020	7				101.9 ± 9.3	144
VE-b2	R	-	0.88 ± 0.11	0.81 ± 0.11	0.40 ± 0.021	4	0.98	0.19	2		
VE-b21	F	D	0.80 ± 0.043	0.71 ± 0.017	0.27 ± 0.080	7				68.0 ± 3.9	139
VE-b22	F	P	0.86 ± 0.025	0.79 ± 0.035	0.26 ± 0.082	7				70.0 ± 8.4	146
VE-d1	F	-	0.67 ± 0.045	0.62 ± 0.064	0.21 ± 0.036	4	1.00 ± 0.010	0.14 ± 0.007	3		
VE-d14	F	P	0.88 ± 0.051	0.71 ± 0.11	0.36 ± 0.036	7				66.4 ± 5.3	139
VE-e5	F	-	0.88 ± 0.088	0.83 ± 0.126	0.34 ± 0.13	4	0.97 ± 0.037	0.28 ± 0.037	4		
VE-e51	F	P	0.55 ± 0.015	0.25 ± 0.10	0.13 ± 0.028	7				62.5 ± 6.5	129
VE-e55	F	D	0.87 ± 0.067	0.80 ± 0.061	0.44 ± 0.073	7				71.8 ± 7.6	154
VE-f1	R	-	0.95 ± 0.052	0.86 ± 0.048	0.36 ± 0.046	4	1.00 ± 0.013	0.17 ± 0.059	4		
VE-f14	F	P	0.74 ± 0.063	0.54 ± 0.075	0.22 ± 0.042	7				51.4 ± 3.1	154
VE-f15	R	D	0.83 ± 0.025	0.60 ± 0.060	0.27 ± 0.028	7				58.4 ± 2.9	156
VE-g2	R	-	0.93 ± 0.046	0.85 ± 0.092	0.62 ± 0.10	4	0.97 ± 0.015	0.33 ± 0.081	3		
VE-g20	F	P	0.74 ± 0.042	0.46 ± 0.087	0.19 ± 0.065	6	0.90 ± 0.032	0.16 ± 0.040	5	51.5 ± 3.5	133
VE-g21	F	P	0.59 ± 0.098	0.34 ± 0.082	0.17 ± 0.013	5	0.87 ± 0.075	0.18 ± 0.044	5	50.9 ± 3.5	154
VE-g22	F	P	0.75 ± 0.090	0.51 ± 0.13	0.27 ± 0.087	8	0.87 ± 0.063	0.17 ± 0.037	5	52.5 ± 4.2	30
VE-g23	R	D	0.89 ± 0.042	0.83 ± 0.070	0.85 ± 0.055	5	0.92 ± 0.025	0.57 ± 0.17	5	60.0 ± 2.7	135
VE-g24	F	P	0.81 ± 0.061	0.61 ± 0.084	0.53 ± 0.16	4	0.92 ± 0.023	0.23 ± 0.061	6	55.8 ± 3.9	37
VE-g25	F	P	0.76 ± 0.13	0.52 ± 0.095	0.17 ± 0.058	5	0.89 ± 0.038	0.18 ± 0.054	5	50.1 ± 2.1	136
VE-g26	R	D	0.84 ± 0.061	0.70 ± 0.092	0.59 ± 0.11	5	0.93 ± 0.031	0.26 ± 0.036	4	58.1 ± 3.7	143
VE-g27	F	P	0.75 ± 0.060	0.48 ± 0.11	0.17 ± 0.036	5	0.90 ± 0.035	0.20 ± 0.040	3	51.5 ± 3.6	145
VE-g28	F	P	0.73 ± 0.049	0.43 ± 0.13	0.19 ± 0.056	6	0.89 ± 0.044	0.14 ± 0.028	4	51.7 ± 3.1	152
VE-g29	R	D	0.90 ± 0.0082	0.81 ± 0.0096	0.70 ± 0.13	4	0.93 ± 0.023	0.25 ± 0.114	5	61.2 ± 3.2	142
VE-h1	F	-	0.76 ± 0.10	0.53 ± 0.068	0.26 ± 0.052	4	0.98 ± 0.021	0.14 ± 0.006	3		
VE-h11	F	P	0.88 ± 0.044	0.66 ± 0.061	0.25 ± 0.047	7				61.8 ± 4.7	185
VE-h16	R	D	0.86 ± 0.045	0.66 ± 0.063	0.16 ± 0.024	7				58.7 ± 4.0	142
VE-B	R	-	0.94 ± 0.038	0.80 ± 0.074	0.37 ± 0.040	3	1.04 ± 0.049	0.37 ± 0.057	4		
VE-B 1	R	P	0.84 ± 0.053	0.56 ± 0.10	0.26 ± 0.066	7				59.9 ± 3.3	142
VE-B 5	R	D	0.85 ± 0.032	0.65 ± 0.049	0.54 ± 0.065	7				59.1 ± 3.4	144

a. F: 扁平な繊維芽様, R: 丸まをびた紡錘形。図1参照。

b. その株の由来した、初めのコロニーの形態。P: 凝集型コロニー, D: 分散型コロニー。

図2参照。

c. 平均値±標準偏差 (実験の回数が2回以下のときは、平均値のみを示した)

d. 独立して行われた集合実験の回数。

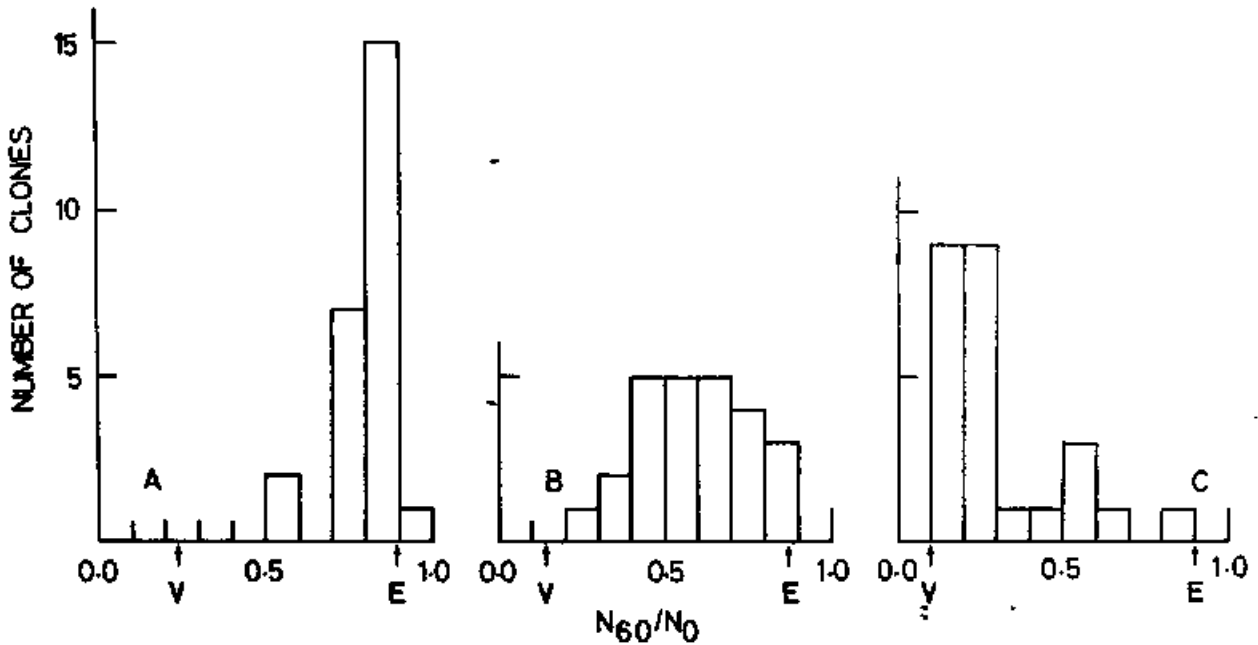


図16 雑種細胞株の接着能に関する分布。  
 2 mM Mg<sup>2+</sup> (A), 1 mM Mg<sup>2+</sup> (B),  
 1 mM Ca<sup>2+</sup> (C) の条件下での  $N_{60}/N_0$  (横軸)  
 に関する分布。縦軸は、 $N_{60}/N_0$  がその値  
 をとる3次クローン株の数。V, Eは、  
 それぞれE処理したV79細胞, EAT細胞  
 の接着能を示す。

いて、接着能に関する雑種細胞株の分布を明示したのが図16である。この図から次のことが判る。①すべての雑種細胞株は、V79細胞株に比べ、2価イオンなしの条件下での接着能が低く、その多くは、EAT細胞と同様、ほとんど接着能がない。すなわち、CIDM活性のほとんどない株が多い。②1mM  $Ca^{2+}$ 存在下では、多くの株で、V79細胞と同程度の、高い接着能がみられる。③1mM  $Mg^{2+}$ 存在下では、すべての株でV79細胞より接着能が低い。また、その分布が広い。

各2次クローンと、それに由来する3次クローンとの接着能を比較すると、多くの場合3次クローンの接着能が、その由来する2次クローンの接着能を上回る。25株の3次クローンのうち、2価陽イオンなしの条件下で20株が(図17A)、1mM  $Mg^{2+}$ 存在下で21株が(図17B)、1mM  $Ca^{2+}$ 存在下で19株が(図17C)、その由来した2次クローンの接着能を上回る。もし2次クローンの接着能が その中の異質

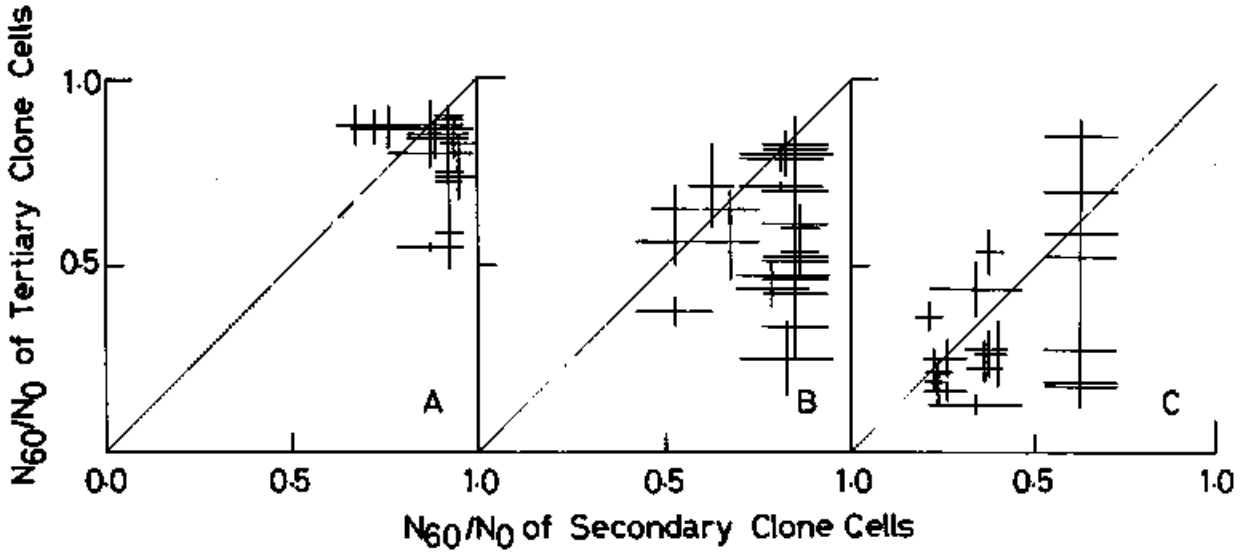


図17 雑種細胞2次クローン株の接着能と  
 それに由来する3次クローン株の接着能  
 との相関図。横軸は2次クローン株の接着  
 能 ( $N_{60}/N_0$ )、縦軸は3次クローン株の接  
 着能 ( $N_{60}/N_0$ )。線分は標準偏差を表わす。  
 斜線の下側にあるものが、3次クローン  
 株の接着能がそれの由来した2次クロー  
 ン株のそれを上回るものである。

の細胞集団の接着能の平均値であるために、3次クローン株の接着能に変異が生じたとするならば、接着能が上昇する3次クローン株と低下するものとの数がほぼ同数あらわれるはずである。ところが約80%の3次クローン株で接着能が上昇している。これは3次クローン株を単離する際の基準、軟寒天培地中のコロニーの形態、によるのではない。<sup>もばち</sup>凝集型、分散型のいずれのグループでも、接着能がそれの由来した2次クローン株より上昇している3次クローン株の方が、低下しているものより多いからである。以上のことは、接着能を一度失った細胞が培養を続けていくうちに、再び接着能を回復したのではないかと理解できる。

#### 4-4-2 TC細胞の接着性

2次クローン9株 および2次クローン株、VE-g2由来の10株の3次クローン株につ

いて、TC細胞の接着能を、 $Ca^{2+}$ なし、および1mM  $Ca^{2+}$ の条件下で測定した。表7にその結果を示す。どの株でもV79細胞のTC細胞と似た接着性を示す。すなわち $Ca^{2+}$ が存在しないような条件下での接着能はほとんどないが、1mM  $Ca^{2+}$ 存在下での接着能は高い。これはE細胞で1mM  $Ca^{2+}$ 存在下での接着能の低い株でもそうであり、調べたすべての株で、1mM  $Ca^{2+}$ 存在下では、E細胞よりTC細胞の方がより接着能が高い。

この結果は2通りに説明できよう。①CDMがE細胞では“マスク”されていて、TC処理により“マスク”が除去されるために、TC細胞ではCDMが活性化する。②雑種細胞では、E処理といえども、2種類の接着機構を両方共保存するような解離方法とはなり得ない。例えば、細胞自身が、E処理中に、プロテアーゼを放出して、CDMが分解されたり、 $Ca^{2+}$ なしの条件下では、CDMが細胞膜より脱落するようなことが起こるのかもしれない。

もし②でなく①が正しければ、TC細胞をE処理、またE細胞をTC処理すると、その細胞はいずれも、TC細胞と同様の接着性を示すはずである。逆に、①でなく②が正しければ、このような処理をした細胞はいずれも、E細胞同様の低接着能のものが得られるはずである。

3次クローン VE-g23 株について、これを実験した結果が表8で、実験の詳細な手順は表の説明に記してある。TC細胞をE処理しても、TC処理を2回くり返した細胞と同様の接着性を示す。ただCa<sup>2+</sup>存在下での接着能にやや低下がみられる。ところが、E細胞をTC処理すると、ほとんど全く接着能がない。すべての処理(MFによる洗浄、TC処理以外)を50 TIU アプロチニン (Aprotinin, Protease Inhibitor from Bovine Lung; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)

---

次頁より 液以外の溶液すべてに、50 TIU  
のアプロチニンが含まれている。



表8 雑種細胞株VE-g23細胞を2重処理した細胞の接着性。

	1st treatment	2nd treatment	protease inhibitor	$N_{60}/N_0$	
				-Ca <sup>2+</sup>	+Ca <sup>2+</sup>
Experiment 1	TC	TC	-	0.91	0.14
	TC	E	-	0.90	0.39
	E	TC	-	0.88	0.90
	E	E	-	0.86	0.75
Experiment 2	TC	TC	+	0.91	0.21
	TC	E	+	0.91	0.29
	E	TC	+	0.96	0.94
	E	E	+	0.85	0.67
	E	E	-	0.86	0.63

実験1: 1次処理として, 通常のE, TC処理により, ペトリ皿より解離した後, トリプシンインヒビターを加えてから, 2次処理が, TC処理のときにはMFでE処理のときにはCMFで3回洗浄した後各処理液に懸濁し 97°Cで15分間処理する。以後は通常の手順で接着能を測定。

実験2: 同じ処理を, 蛋白質分解酵素インヒビター(アプロチニン, 50 TIU)存在下で行ったもの。MFおよびTC処理

前へ

存在下で行ってもほぼ同じ結果（表8 実験2）が得られた。

この結果からは、上記のどちらの説明が適切であるかは、明らかにならない。同じ組み合わせでも処理の順序で全く異なった結果になるのは、処理時の細胞の状態によるためであろう。すなわち、この実験では、1次処理を、細胞は基質上に伸展した状態で受けるが、2次処理では、細胞は浮遊状態で処理を受けることになるのである。

#### 4-4-3 LTE細胞の接着性

前項でみられたような現象が、CIDMについてもみられるかどうか、VE-g23株について、トリプシン処理（濃度、 $10^{-2}\%$  -  $10^{-5}\%$ ）を  $1\text{mM}$  EDTA 存在下で行い、接着能を調べた。E処理のものに比べ、トリプシン濃度が高まるにつれて、接着能が低下する（図18）。

CIDM の高まりは、どの処理でもみられ

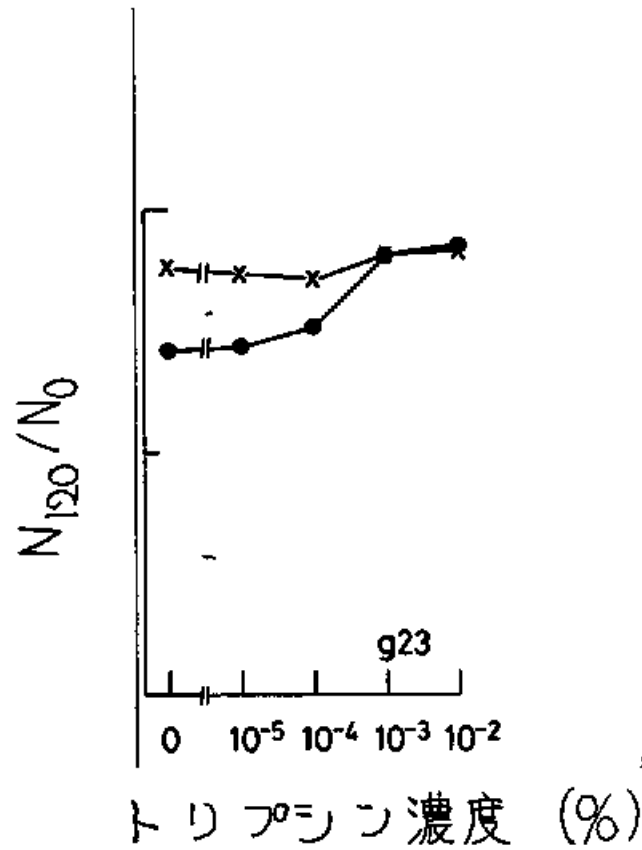


図18 1mM EDTA 存在下でトリプシン処理した雑種細胞 (VE-g23細胞) の接着能。  
 縦軸: 旋回培養120分後の集合度。横軸: 処理トリプシン濃度 (単位: %)。  
 -x-:  $Ca^{2+}$  螯合, -●-: 1mM  $Ca^{2+}$

なかった。

## 第5章 核型分析

雑種細胞における接着能の低下の原因は、根本的には、遺伝子組成の変化による、ということは何違いない。この章では、核型分析を通じ、親細胞株と雑種細胞株の染色体組成を比較し、その接着性との関連を論ずる。

### 5-1 核型分析の方法

#### 5-1-1 染色体標本の製作

直径6cmの培養皿に、少し隙間の残る程度にまで増殖した細胞を用いる。この培養を、培地交換し、 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ のコルヒチン (Colchicin, krist. reinst; Merck Darmstadt, Germany) (細胞分裂阻害剤) 存在下で、4時間培養すると10%—20%の細胞が分裂中期でとまる。これを、0.25%粗トリプシン溶液で細胞を分散し、

CMFで2回洗った後、0.1%クエン酸ナトリウム水溶液(2ml)にけんだくし、37°Cで10分間放置する。この低張処理により、細胞が膨じゅんし染色体がプレパラート上で重なるのが防げる。これをカルノア固定液（酢酸：メタノール＝1：3）で固定する。まず低張処理液1mlにつき1-2滴の割合で固定液を、細胞けんだく低張処理液に、よく攪拌しながら加える。これを氷冷し10分間放置。さらに、5mlの固定液をこれに重層し、氷冷15分間放置。低速遠心（200×g, 3分間）、上清をすて固定液を5ml加えけんだく。このあと2-3回、遠心し上清を捨て固定液に再けんだくする操作を繰り返す。最終的に $10^6$ 細胞/mlとなるように固定液にけんだくする。この試料を、氷冷した70%エタノールに浸しておいたスライドガラス上に数滴たらし、引火乾燥または自然乾燥する。室内の湿度が高い場合は前者を、低い場合は後者を用いるなど、染色体が重ならず、また散らばりすぎない標本が得ら

れるように，乾燥の速さを調節する。  
以上吉山，4代，1977に従う。

### 5-1-2 染色体分染法 — Gバンド法

Casperson らにより，染色体を縞模様  
 に染めわけることが可能になった (Casperson,  
 Zech, Johansson & Modest, 1970) これを染色体  
 分染といい，この染色法の開発の結果，従来  
 識別不可能であった染色体が互いに区別で  
 きるようになり，核型分析が容易になった。  
 また，欠失，付加，逆位，転座といった染色  
 体異常の発見も困難なものではなくなった。  
 このように染色体分染法は細胞遺伝学分野  
 に大きく寄与している。

本実験でも染色体を分染して核型分析を行  
 った。通常よく用いられる分染法に，Qバン  
 ド法 (Casperson *et al.*, 1970) とGバンド法  
 (Sumner, Evans & Buckland, 1971; Seabright,  
 1971) とがある。前者は蛍光色素のキナクリ  
 ンマスタードを用いて染色するものであり，

染色法は簡単であるが、観察には蛍光顕微鏡を必要とし、永久標本とはならぬので標本は写真撮影して記録する必要がある。一方後者は、種々の前処理を施した標本をギムザ染色するもので、染色に手間がかかり、また一定の出来具合の標本を得るのが困難である。例えば、標本の乾燥法や乾燥状態に左右されたりする。このような欠点はあるが、染色した標本は半永久的に保存できる。ここでは、2種類のGバンド法、ASG法 (Sumner *et al.*, 1971) とトリフィン法 (Seabright, 1971) とを組み合わせた古山法によった (千代, 大塚, 福島, 古山, 1977)。この方法で分染すると、ほぼ一定の染色標本が比較的容易に得られる。以下にその手順を述べる。

(5-1-1) で作成した標本を  $2 \times$  SSC (0.3M NaCl, 0.03M クエン酸ナトリウム) に浸し、室温より徐々に  $60^{\circ}\text{C}$  まで上げ、後  $60^{\circ}\text{C}$  で 30 分間放置する。蒸留水、続いて 100% メタノールですすぎ、1 時間以上風乾する。これを

0.25%粗トリフィンCMF溶液で 97°C 24秒処理し、直ちに100%メタノールに浸して酵素を失活させる。風乾した後、2%ギムザ液（原液 [Giemsa-Lösung; Merck, Darmstadt, Germany] を100mMリン酸緩衝液, pH7.6で希釈）で30分間染色する。水洗、乾燥後オイキット (Eukitt; Kindler, Germany) を用いて封入する。100倍油浸対物レンズ (Olympus, Tokyo) を用いて観察、写真撮影する。ミニコーフォームHRII (富士写真フィルム(株), 東京) を用い、印画紙は硬調のものを使用する。

## 5-2 親細胞株の核型

雑種細胞形成に用いた2株の細胞の核型をまず分析した。



### 5-2-1 V79細胞の核型

V79細胞はチャイニーズハムスター由来の株細胞である。チャイニーズハムスターの正常2倍体細胞の染色体数は22である。V79細胞の染色体数は、図19に示すように、モードが21で、数のうえからは、正常2倍体細胞とのへだたりが小さいが、各染色体の標準核型の染色体への対応づけは困難である。例えば、正常であれば相同染色体が2本1組になっているはずであるが、V79細胞では2組しか、そういうものがない。

そこで、V79細胞の染色体も、標準核型とは無関係に番号づけした(図20A)。染色体5, 9はそれぞれ相同染色体2本ずつからなる。染色体1-3は中部動原体型、染色体4-6, 13, 16は次中部動原体型、染色体7-12, 17は次端部動原体型、染色体14, 15は端部動原体型、染色体18, 19は点染色体である。端部動原体型染色体の動原体の染色性は、染色

体14でわずかに染まる程度で、染色体15では、ほとんど染まらず、これがEAT細胞と異なる点である（5-2-2参照）。

### 5-2-2 EAT細胞の核型分析

EAT細胞はマウス由来の株細胞である。正常マウス2倍体細胞の染色体数は40で、その形はすべて端部動原体型である。EAT細胞の染色体数は、モードが44の図19に示すような分布をとり、正常2倍体に比べやや多い。

これも、正常2倍体の標準核型とは無関係に番号づけした（図20B）。染色体1は中部動原体型、染色体2は次中部動原体型、残りはすべて端部動原体型である。動原体部はV79細胞のものと異なり極めてよく染色される。このことを利用すると雑種細胞において、V79細胞由来の染色体と、EAT細胞由来のものとを容易に区別することができる。

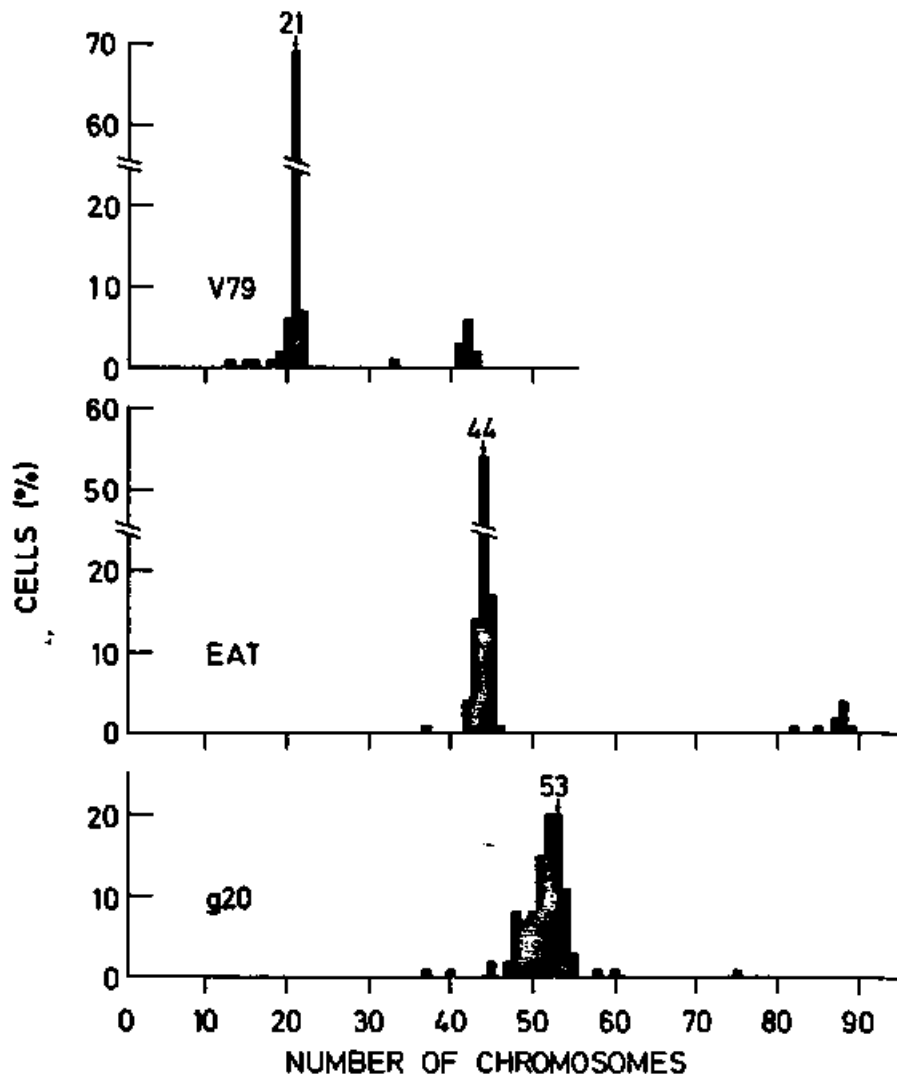


図19 V79細胞, EAT細胞, 雑種細胞VE-g20細胞の染色体数分布。それぞれ100以上の中期像について染色体数を数えた。図中の数字はモードを示す。

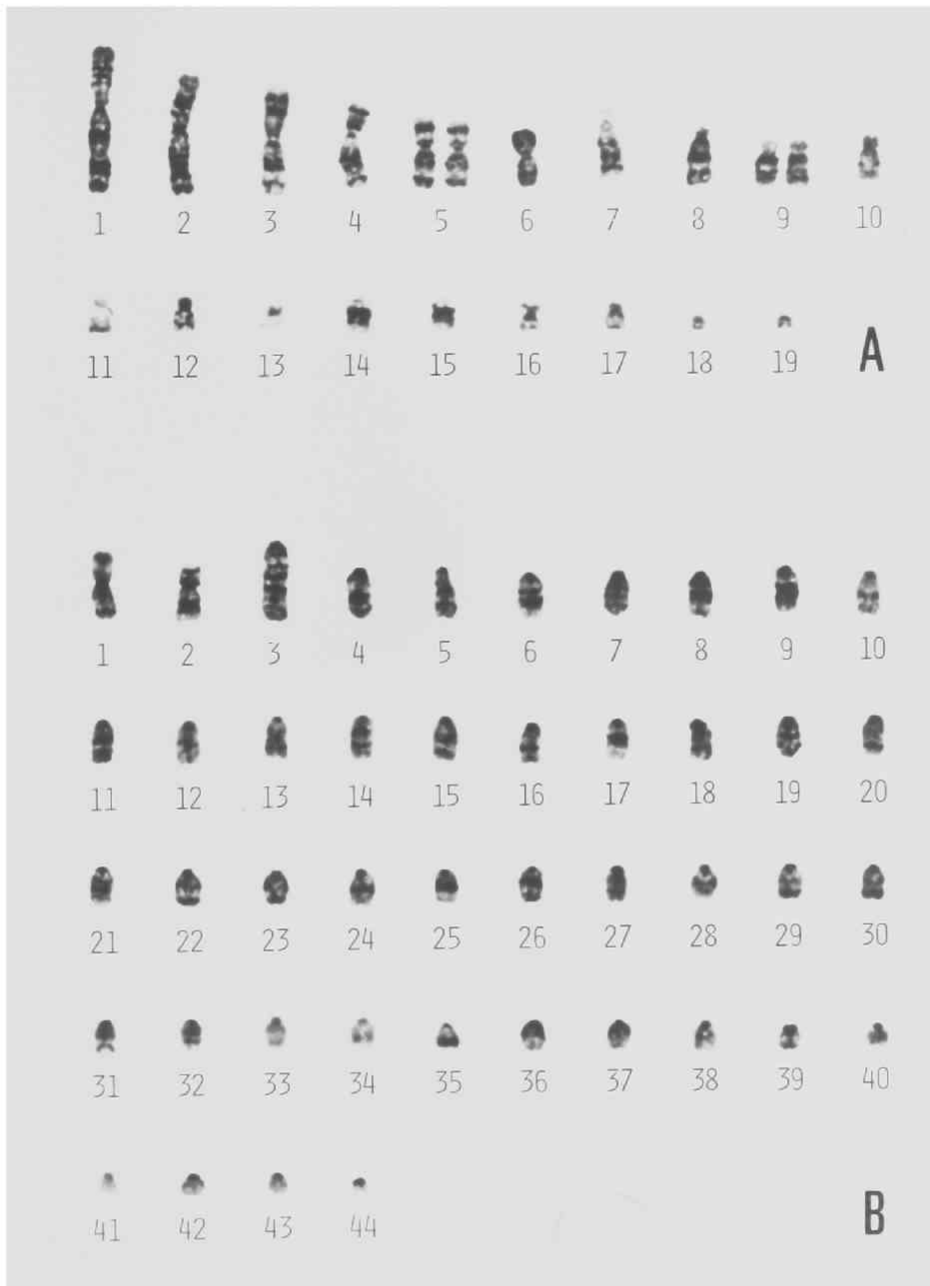
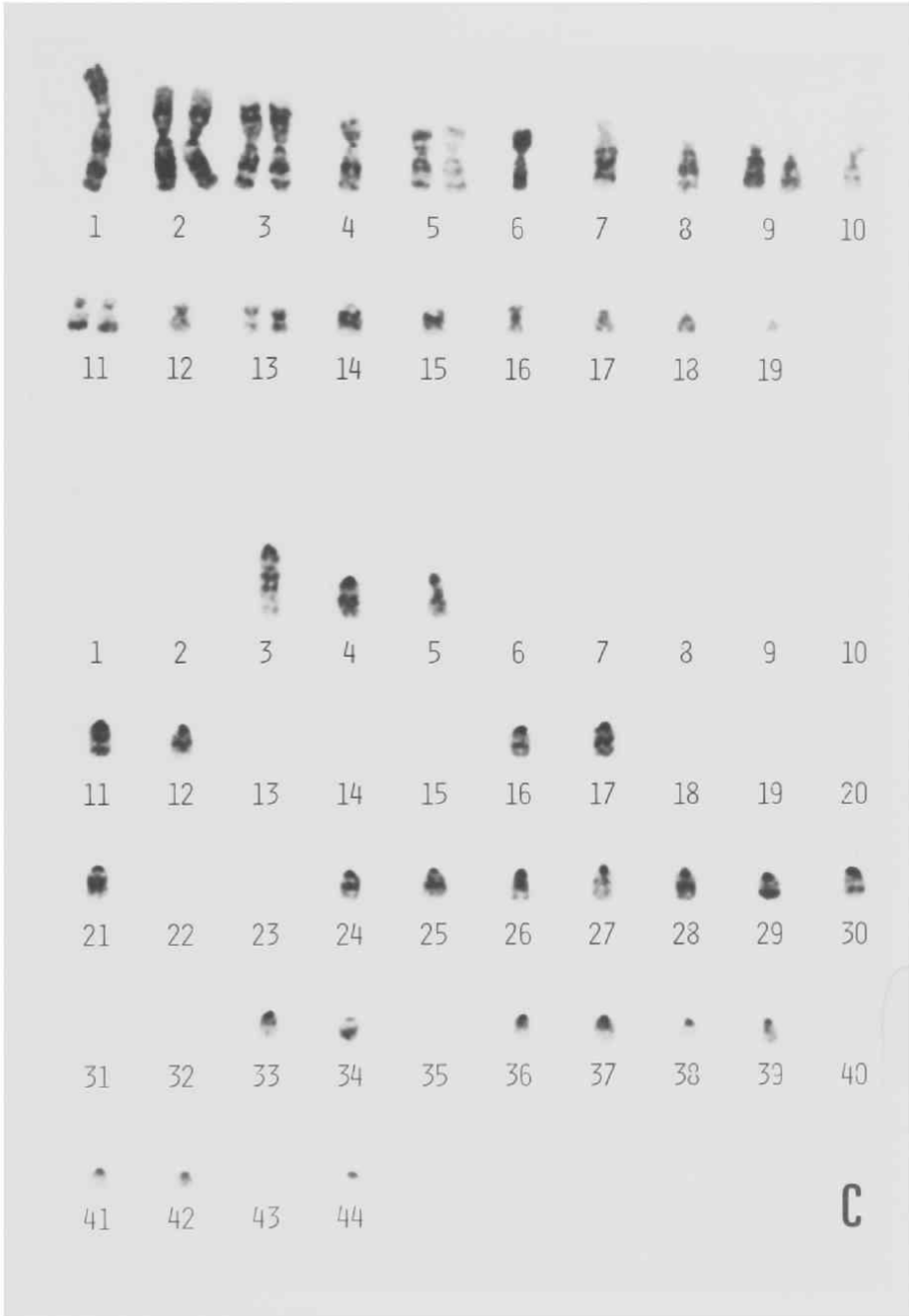


図20 V79細胞(A), EAT細胞(B), 雑種細胞VE-g20(C)の核型。  
 C図で、上2段はV79細胞由来の染色体、下4段はEAT細胞由来の染色体であり、個々の染色体は親細胞のそれと対応づけて番号がふられている。



## 5-3 雑種細胞の核型分析

まず、雑種細胞の3次クローン全株について、総染色体数を、100個以上の分裂中期像について数えた。親細胞株とちがって、染色体数のばらつきは大きい。一例として、VE-g20株のものを図19にあげる。染色体標本の作成は、クローンの始まりの1個の細胞が $10^7$ - $10^8$ 個まで増殖した頃、つまり、約25回分裂した頃、に行ったが、雑種細胞では核型はかなり不安定だといえる。表7に染色体数の平均値と標準偏差とをまとめた。雑種細胞の染色体数は、両親細胞のそれぞれの和にほぼ等しいか、より少ないものが多い。VE-a35株は、例外的に多く、平均101本の染色体をもつ。これは、この株の由来した2次クローンVE-a3株の染色体が倍加したものと思われる。なぜなら、同じVE-a3株由来のもうひとつの3次クローンVE-a35株細胞は平均53.6本の染色体をもつからである。

しかし、いずれの雑種細胞株も、V79細胞由来およびEAT細胞由来の染色体を両方共もっていることが、Gバンド染色した標本から確認された。以上の結果から、第4章で調べた、接着性において多様な変異を示している雑種細胞株のいずれもが、両親細胞株の遺伝因子を保持していることが明らかにされた。その一例（VE-g20細胞）を図20Cにあげる。

次に、同一2次クローン<sup>株</sup>由来の3次クローン株5組17株の雑種細胞株について核型分析を行った。各株ごとに、12の分裂中期像について分析した。その結果を表9にまとめる。V79細胞由来の名染色体について、12中期像中、8中期像以上に1本ずつあれば+、5-7中期像に1本ずつあれば(+)、それ以下は無印とし、+印1個で染色体1本を表す。EAT細胞由来の染色体については、同一株でも細胞間で不均一であるので（図21）その総数を12分裂中期像について平均した数値を示してある（表9）。また、表9には各中期

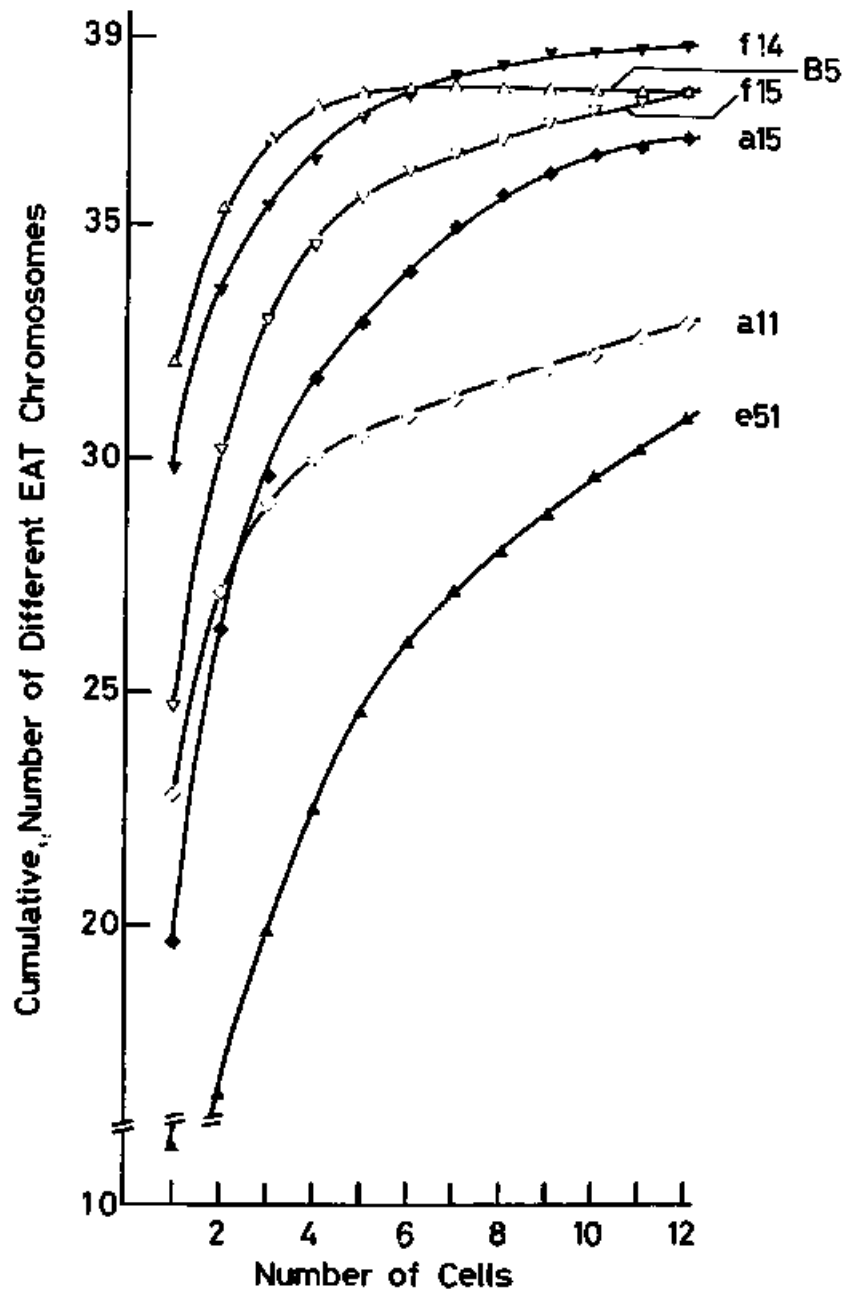


図21 雑種細胞株のEAT細胞由来染色体に関する不均一性曲線。縦軸：集積EAT細胞由来染色体種数。横軸：細胞数。この曲線の傾きが大きいため、ほとんどもと<sup>より</sup>不均一である。



表9 雑種細胞の核型

Cells	Chromosome number of V79 cells <sup>a</sup>																			Total number of chromosomes of EAT cells <sup>b</sup>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
V79	+	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
VE-a11	++	+	+	++	+	++	+	++(+)	+++	+	+	++	++	+	+	+	++	+	+	27.0 ± 1.7
VE-a15	++	+	++	++	+++	++(+)	+	+	+++	+	++(+)	+	++	++(+)	+	+	++(+)	+	+	24.3 ± 3.9
VE-e51	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	++(+)	++	++	++	++	++	++(+)	+++	++	+++	13.8 ± 4.0
VE-e55	++	++	+	++	+++	++(+)	+++	++	++++	++	++	++	++(+)	++	++	++(+)	++	++	++	28.3 ± 4.0
VE-f14	+	+	+	+	++	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	29.8 ± 1.6
VE-f15	+	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	++(+)	+	+	+	34.3 ± 2.6
VE-g20	+	++	++	+	++	+	+	+	++	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+	26.9 ± 2.0
VE-g21	+	++	++	+	++	+	+	+	++	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+	26.3 ± 2.1
VE-g23	+	++	+	+	++	+	+	+	++	+	++	+	++(+)	+	+	+	+	+	+	36.8 ± 2.4
VE-g24	+	++	+	+	++	+	+	+	++	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+	33.7 ± 3.1
VE-g25	+	++	++	+	++	+	+	+	++	+	++	+	++	+	+	+	++(+)	+	+	26.0 ± 2.0
VE-g26	++	+	+	+	++	+	+	++	++(+)	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+	35.5 ± 2.4
VE-g27	+	++	++	+	++	+	+	+	++	+	++	+	++	+	+	+	++(+)	+	+	27.1 ± 1.9
VE-g28	+	++	++	+	++	+	+	+	++	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+	27.1 ± 1.6
VE-g29	++	+	+	+	++	+	+	++	++	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+	36.6 ± 1.5
VE-B1	+	+	++(+)	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	36.8 ± 2.2
VE-B5	++	+	+	++	++	+	+	+	++(+)	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	35.8 ± 2.2

a. 本文参照

b. 各分裂中期像中EAT細胞由来染色体の平均本数 ± 標準偏差

c. 各分裂中期像中の染色体の平均本数 ± 標準偏差

優さとの総染色体数の平均と標準偏差を示してある。この数値が、前述のものとの値(表17)とほぼ一致しているので、この標本抽出は、かなりの正確さをもって行われていることがわかる。

#### 5-4 雑種細胞の接着性と核型との関係

雑種細胞株では、親細胞株である V79 細胞とも EAT 細胞とも異なった接着性を示すことを第4章でみた。この接着性変異の機構を、核型 = 遺伝子組成の面から考察してみよう。

接着機構が正常に機能しない理由は2通りに考えられる。①接着機構に関する遺伝子を担った染色体を欠失することにより、接着機構が欠損した。②接着機構に関する遺伝子は保有しているが、その活性を何らかのレベルで阻害する遺伝子が付加した。

この2つの仮説を念頭に、核型と接着能との関係を調べてみると次のことがいえる。



①調べたすべての雑種細胞株では、そのCIDM活性は、V79細胞より低いにもかかわらず、V79細胞由来の染色体を少なくとも1セットはもっている。これは第1の仮説を否定する。

②接着能の高低に、その数が比例するようなV79細胞由来染色体は、単一でも、複数の組み合わせでも存在しない。これも第1の仮説を支持しない。①②より第2の仮説が正しい可能性が残る。

③特定のV79細胞由来染色体（単一でも複数の組み合わせでも）の数の増加により、接着能が低下している、という関係は見出せない。これは第2の仮説の阻害遺伝子が、V79由来染色体上にもいることを示す。

④EAT細胞由来染色体数の多い株は、接着能がより低い傾向にある（図22）。これは第2の仮説を支持し、その阻害遺伝子はEAT細胞由来染色体上にあり、しかもそのような染色体は単一でなく複数で、各阻害遺伝子が可算的に働くものであることを示唆している。

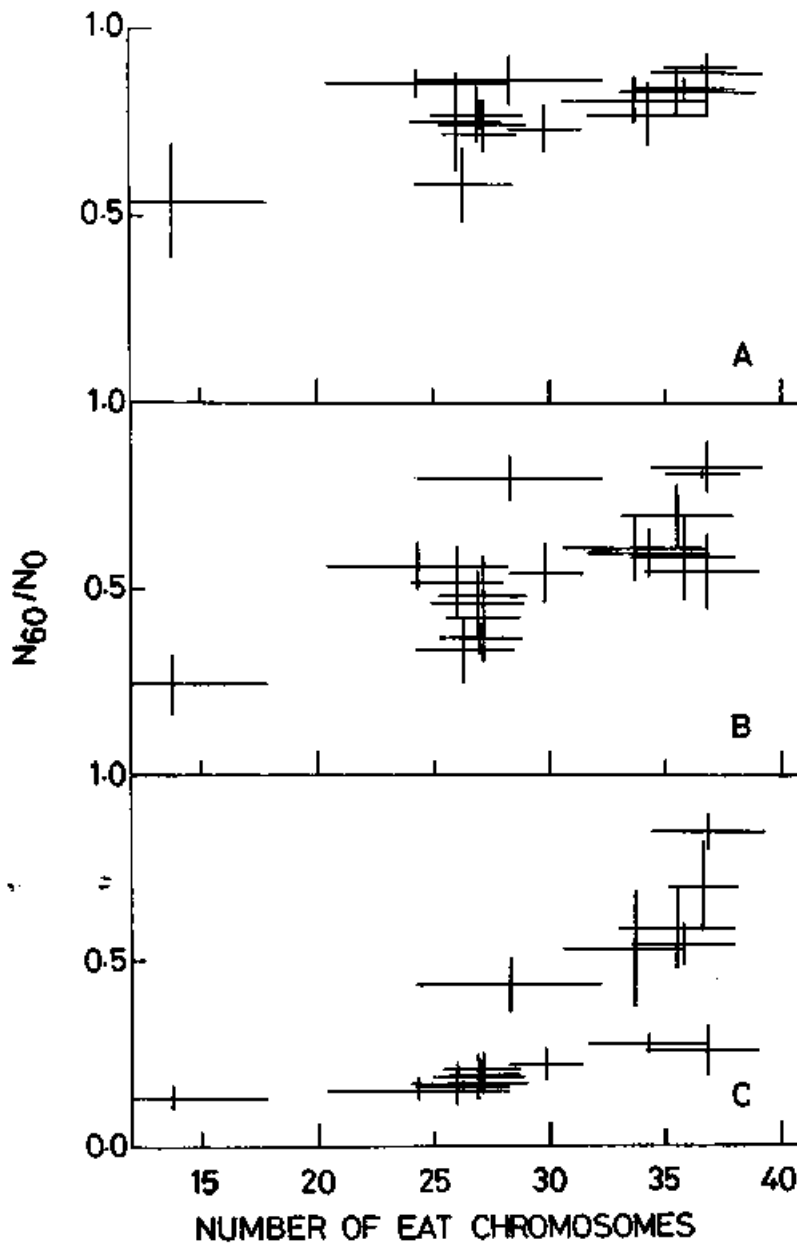


図22 雑種細胞株E細胞の接着能と、EAT細胞由来染色体数との相関図。縦軸：2価陽イオンなし(A)， $1\text{mM Mg}^{2+}$ (B)， $1\text{mM Ca}^{2+}$ (C)での接着能( $N_{60}/N_0$ )。横軸：EAT細胞由来染色体数。線分は標準偏差を表わす。

## 第6章 論議

以上に述べてきたように、接着能の高い V79 細胞と、接着能の低い EAT 細胞とから、細胞融合法により得られた体細胞雑種細胞は、その両親の細胞とは異なった接着性を示した。Takeichi (1977), Takeichi *et al.* (1979), Urushihara *et al.* (1979) は、V79 細胞が 2 種類の接着機構を有することを明らかにした。第 1 のものは、解離した細胞の集合の際に、 $Ca^{2+}$  に依存せずに機能する機構と (CIDM: Calcium Independent Mechanism) 第 2 のものは、そのとき  $Ca^{2+}$  に依存して機能する機構 (CDM: Calcium Dependent Mechanism) である。単層培養した V79 細胞を、1mM EDTA で処理した場合には、解離された単一細胞は、CIDM と CDM の両者をあわせもつ。この細胞 (E 細胞) は、 $Ca^{2+}$  を含まない塩類溶液中では CIDM のみの作用によって集合し、1mM  $Ca^{2+}$  を含む塩類溶液中

での集合は CIDM および CDM の両者の作用による。E細胞の集合が、 $1\text{mM Ca}^{2+}$  によって促進されるのは、この CDM の存在を反映しているのである。

雑種細胞は EDTA で解離し、 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下で集合させた場合、その接着能 (CIDM 活性) は、すべての株で、同じ処理をした V79 細胞の接着能 ( $N_{60}/N_0=0.24$ ) より低い ( $N_{60}/N_0 > 0.5$ )。一方、同じく EDTA で解離した雑種細胞は、 $1\text{mM Ca}^{2+}$  存在下で集合させると、3次クローン 25株のうち 18株で、CIDM 活性が低いのににもかかわらず、V79細胞のもの ( $N_{60}/N_0=0.10$ ) に近い高い接着能 (CIDM + CDM 活性) を示す ( $0.10 < N_{60}/N_0 \leq 0.30$ )。この結果は、CIDM と CDM とが別々の機構に支えられていることを示唆する。残りの 7株は同じ条件で、より低い接着能 ( $0.30 < N_{60}/N_0 \leq 0.90$ ) を示す。これらの株では、同時に、 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下での接着能も他の株よりもさらに低い。このことは、

雑種細胞において、CDM活性の低下を引き起こす機構は、CIDM活性の低下をも引き起こすことを意味する。

雑種細胞が、その両親株細胞と異なった接着性を示す原因として、2通りの仮説が考えられる。①接着能の低下している雑種細胞では、接着機構に関与する遺伝子が欠失している。すなわち、接着能の低下は、V79細胞由来染色体の欠失によるものである。②接着能の低下している雑種細胞では、接着機構に関与する遺伝子は失われていないのだが、その正常な発現を阻害する遺伝子が導入された。すなわち、接着能の低下は、EAT細胞由来染色体の存在、あるいはV79細胞由来染色体の過剰によるものである。

核型分析の結果は、第②の仮説がより適切であることを示している。核型分析したすべての雑種細胞株は、接着能がV79細胞より

低下しているにもかかわらず、V79細胞由来の染色体を少なくとも1セットはもっていることが明らかになった。従って、これらの雑種細胞株では、余分のV79細胞由来の染色体か、あるいはEAT細胞由来の染色体の存在により、V79細胞の接着機構を担った遺伝子の完全な発現が阻害されているのである。各雑種細胞株間での核型と接着性についての比較から、V79細胞由来の染色体で接着能の低下に働いていると関連づけられるものがあり、EAT細胞由来の染色体の数と接着能の低下とにかなりの相関があることが明らかになった。このことはEAT細胞由来の複数個の染色体の存在が、V79細胞の接着機構の発現を、何らかのレベル（転写、翻訳、合成された蛋白質の輸送、あるいは細胞表面上の構成など）で阻害していることを意味する。すべての雑種細胞株で、 $Ca^{2+}$ 存在下での接着能が、E細胞よりTC細胞の方が高いのも、E細胞ではその表面に蛋白質性CDM阻害因子があって、



それがTC処理によって除去される、ということなのかもしれない。接着能回復現象(p.55)もこの阻害因子の欠損として説明できよう。

CIDMの方がCDMより阻害されやすいと仮定すれば、CIDM活性の低い雑種細胞株がCDM活性の低い雑種細胞株よりも数多く存在し、かつCDM活性の低い株では必ずCIDM活性も低い事実が説明できる。また細胞の形態と接着能との関係についていえば、基質との接着の少ない形態の株では、実際この細胞は基質からはがれやすく、細胞と基質間の接着能が低いと考えられるのであるが、細胞間の接着能も低い(表7)もこのような株では阻害因子が細胞と細胞との間の接着機構だけでなく、細胞と基質との間の接着機構をも阻害しているものと考えられる。

同様の現象がGordon & Cohn (1971)によって報告されている。彼らはFcレセプター活性をもつマクロファージを色素細胞(Fcレセプ

ター活性をもたない)に融合させて形成されたヘテロカリオン(同一細胞内に、由来を異にする2個以上の核をもつ細胞)のFcレセプター活性を調べた。ヘテロカリオンは、形成直後はFcレセプター活性をマクロファージと同程度もっているが、培養するに従って、その活性は低下していく。このレセプター活性の低下はサイクロヘキシミドで阻害される。またレセプター活性の低下したヘテロカリオンをトリプシン処理すると、レセプター活性が直ちに回復する。これらの結果は、マクロファージのFcレセプターがヘテロカリオンでは“マスク”されていることを示している。彼らは、マクロファージとEAT細胞間のヘテロカリオンについても、Fcレセプター活性の低下がおきること、しかもそれは、マクロファージと色素細胞間のヘテロカリオンの場合よりもすみやかに起こる、と報告している。彼らの系でみられた現象は、本論文で述べてきた、V79細胞の接着能がEAT細胞と融合さ

せたときに低下した事実と類似している。このような実験結果は細胞表面接着部位やFcレプターが正常に機能するためには、単にその分子が細胞表面に存在することだけでは充分でなく、その分子の存在様式も重要な役割を果たしているにちがいないことを示している。

## おわりに

接着能の高い V79 細胞と、接着能の低い EAT 細胞とを融合させて得られた雑種細胞では、多かれ少かれ、接着能が V79 細胞より低下している。この接着能の低下の原因は、雑種細胞中の EAT 由来の染色体の存在量に比例するような阻害因子の存在であることが、核型分析により明らかになった。阻害因子の本体は何であるかは、今後に残された問題である。少なくとも CDM に関しては、細胞膜レベルでの阻害であることは間違いない。(4-4-2 7 細胞の接着性)

体細胞雑種形成法による遺伝子解析では、目的とする形質の欠損株に、正常株を融合させ、正常株のどの染色体の残存により形質発現がみられるか、と行うことでその形質を担う遺伝子の染色体上の座位を同定したり、また欠損株どうしを融合させる相補性テストか

ら、その形質発現に関与する一群の酵素の存在を明らかにすることができる。

一般に、欠損株が構成酵素の突然変異体であるとき、この方法はそのまま適用できる。しかし、細胞分化の研究の様に、その形質発現に複雑な調節過程を経て起こると考えられるものに、この手法を応用する場合には、分化した細胞への、外来遺伝子の導入は慎重に行う必要がある。分化形質を発現している細胞に、発現していない細胞を融合させると、本実験の場合と同様、発現している細胞より発現に影響をおよぼす因子が導入される可能性があり、しかもその因子が、どのレベルで作用するのかは簡単には明らかでない。なぜなら、このような研究では、本来分化形質の発現機構が未知であるのだから。

そこで、このような場合には、分化形質発現細胞由来遺伝子をほぼ完全にもち、発現していない細胞由来の遺伝子は、細胞の生存に最小限必要ただけもつような雑種細胞を使用

することが望ましい。本実験の組みあわせで  
例えば、接着能をもつV79細胞の染色体を  
1-2本失い、接着能をもたないEAT細胞の染  
色体は数本保有するだけのものについて 解  
析することは、細胞接着機構の解明をより容  
易にするであろう。

## 謝 辞

1975年4月に、岡田先生から「こんなことをやってみなにか」といわれ「それはおもしろい、ぜひやりたい」と答えてから、1976年の末、ようやく実際に本実験にとりかかり、それから今日ひとくぎりができるまで数々の人のお世話になりました、ここで感謝したいと思います。

岡田節人教授には、まずこのテーマを与えて下さったことに感謝しなければなりません。いつまときるかわけからないような研究を、また私自身の停滞しがちな、ときには迷いがちなやり方を、総始、見守り指導し続けて下さったことを大変有難く思っています。

阪大微研の岡田善雄教授には、HVJとEAT細胞の供与を受け、また細胞融合や雑種細胞単離法についても有益な助言をいただいたことに感謝いたします。「細胞融合や雑種細胞や

いうてみんなようやりやるけど、なかなかうまくいこといかんもんやで。」という先生の言葉が今日ではずと身にしみて理解されます。

兵庫医大の古山順一博士には、本実験に用いた染色体標本に関する技術のすべてを教えていただきました。お礼を申し上げます。奥地に染色体検査とかかわっておられる先生の「誰にでも簡単に、一定した標本を作る方法を開発しよう」との御努力には敬服します。その恩恵を受けられて幸いです。

竹市雅俊博士には、多くの有益な助言をいただいたことに感謝します。とりわけ、先生の発見にかかる、V79細胞の接着現象のような明解な系を用いなければ、本研究はここまでくることができなかつたでしょう。

宝谷絃一博士には顕微鏡の扱い方の手ほどきを受けたり、大切なレンズを貸していただいたことにお礼を申し上げます。

安田国雄博士には、私が大学院に進学して以来、色々の面でお世話になりました。あり



がとうございました。

近藤寿人博士には、分子生物学者の新鮮な目で、本研究を批評し励まして下さったことに感謝します。

短期間ではありましたが池村淑道博士の研究のお手伝いをさせていただいたことは、私に確かな技術の重要性を改めて気づかせました。敬意と共に感謝いたします。

この5年間、同じ研究室で実験生活を過ごした方々との日々の討論は、雑談めいたものも含め、教えとなり、励ましとなり、また慰めとなりました。みなさんにお礼を申し上げます。

## 文 献

1. Armstrong, P.B. (1966). On the role of metal cations in cellular adhesion: Effect on cell surface charge. J. exp. Zool., 163, 99-110.
2. Armstrong, P.B. & Jones, D.P. (1968). On the role of metal cations in cellular adhesion: Cation specificity. J. exp. Zool., 167, 275-282.
3. Atherly, A.C., Barnhart, B.J. & Kraemer, P.M. (1977) Growth and biochemical characteristics of a detachment variant of CHO cells. J. Cell Physiol., 90, 375-385.
4. Barski, G., Sorieul, S. & Cornfert, F. (1961) "Hybrid" type cells in combined cultures of two different mammalian strains. J. Natl. Cancer Inst., 26, 1269-1277.
5. Brackenbury, B., Thiery, J., Rutishauser, U. & Edelman, G.M. (1977). Adhesion among neural cells of the chick embryo. I. An immunological assay for molecules involved in cell-cell binding. J. Biol. Chem., 252, 6835-6840.
6. Caspersson, T., Zech, L., Johansson, C., & Modest, E.J. (1970). Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agent. Chromosoma, 30, 215-227.
7. 千代豪昭, 大塚則光, 福島田鶴子, 古山順一 (1977) 中央臨床検査部における染色体検査の現状と問題点。臨床病理, 25, No 2 87-92.

8. Collins, M. (1966). Electrokinetic properties of dissociated chick embryo cells. II. Calcium ion binding by neural retina cells. J. exp. Zool., 163, 39-48.
9. Ede, D.A. & Flint, O.P. (1975). Intercellular adhesion and formation of aggregates in normal and talpid mutant chick limb mesenchyme. J. Cell Sci., 18, 97-111.
10. Edwards, J.G. (1973). Intercellular adhesion. In New techniques in biophysics and cell biology (ed. T. Pain & B.J. Smith), pp. 1-27. New York: Wiley.
11. Edwards, J.G., Dysart, J.M. & Hughes, R.C. (1976). Cellular adhesiveness reduced in ricin-resistant hamster fibroblasts. Nature, 264, 66-68.
12. Fujisawa, H. (1971). A complete reconstruction of the neural retina of chick embryo grafted onto the chorio-allantoic membrane. Develop., Growth and Differ., 13, 25-36.
13. 吉山順一, 千代豪昭 (1977) 染色体検査法。 Clinical Laboratory, No. 7, (1977, Spring), 281-288.
14. Gordon, S. & Cohn, Z. (1971). Macrophage-melanoma cell heterokaryons. IV. Unmasking the macrophage specific membrane receptor. J. exp. Med., 134, 947-962.
15. Gottlieb, C., Skinner, S.A.M. & Kornfeld, S. (1974). Isolation of a clone of chinees hamster overy cells deficient in plant lectin-binding sites. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 71, 1078-1082.
16. Hausman, R.E. & Moscona, A.A. (1976). Isolation of retina-specific cell-aggregating factor from membranes of embryonic neural retina tissue. Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 3594-3598.
17. Hornby, J.E. (1973). Measurement of cell adhesion. II. Quantitative study of the effect of divalent ions on cell adhesion. J. Embryol. exp. Morphol., 30, 511-518.

18. Humphrey, T. (1963). Chemical dissociation and in vitro reconstruction of sponge cell adhesion. I. Isolation and functional demonstration of the components involved. Develop. Biol. 8, 27-47.
19. Jones, G.E. & Partridge, T. (1974). Limpet haemocytes. III. Effects of cytochalasin B and colchicine on cell spreading and aggregation. J. Cell Sci., 16, 385-399.
20. Julano, R.L. (1978). Adhesion and detachment characteristics of chinese hamster cell membrane mutants. J. Cell Biol., 76, 43-49.
21. Klebe, R.J., Rosenberger, P.G., Naylor, S.L., Burns, P.L. Novak, R. & Kleinman, H. (1977). Cell attachment to collagen. Isolation of a cell attachment mutant. Exp. Cell Res., 104, 119-125.
22. Lilien, J.E. (1968). Specific enhancement of cell aggregation in vitro. Develop. Biol., 17, 657-678.
23. Littlefield, J.W. (1964). Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science, 145, 709-710.
24. Moscona, A. (1961). Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. Exp. Cell Res., 22, 455-475.
25. Moscona, A.A. & Moscona, M.H. (1966). Aggregation of embryonic cells in a serum-free medium and its inhibition at suboptimal temperatures. Exp. Cell Res., 41, 697-702.
26. Müller, W.E.G. & Zahn, R.K. (1973). Purification and characterization of a species-specific aggregation factor in sponges. Exp. Cell Res., 80, 95-104.
25. Nicolson, G.L. & Winkelhake, J.L. (1975). Organ specificity of blood-borne tumor metastasis determined by cell adhesion? Nature, 255, 230-232.
26. Okada, Y., Suzuki, T., & Hosaka, Y. (1957) Interaction between influenza virus and Ehrlich's tumor cells: III. Fusion phenomenon of Ehrlich's tumor cells by the action of HVJ, Z strain. Med. J. Osaka Univ., 7, 709-717.

27. Ozaki, H.S., Okada, T.S. & Yasuda, K. (1978). Does colchicine affect aggregation of normal and transformed BHK cells differently? Develop., Growth Differ., 20, 55-59.
28. Pouyssegur, J.M. & Pastan, I. (1976). Mutants of Balb/c 3T3 fibroblasts defective in adhesiveness to substratum: Evidence for alteration in cell surface proteins. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 73, 544-548.
29. Pouyssegur, J., Willingham, M. & Pastan, I. (1977). Role of cell surface carbohydrates and proteins in cell behavior: Studies on the biochemical reversion of an N-acetylglucosamine-deficient fibroblast mutant. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 74, 243-247.
30. Puck, T.T., Cieciura, S.J. & Robinson, A. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. J. exp. Med., 108, 945-956.
31. Rabinovitch, M. & De Stefano, M.J. (1973). Manganese stimulates adhesion and spreading of mouse sarcoma ascites cells. J. Cell Biol., 59, 165-176.
32. Ringertz, N.R. & Savage, R.E. (1976). Cell hybrids. New York: Academic press.
33. Seabright, M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet, ii, 971-972.
34. Steinberg, M.S. (1958). On the chemical bonds between animal cells. A mechanism for type-specific association. Am. Nat., 92, 65-81.
35. Sumner, A.T., Evans, H.J. & Buckland, R.A. (1971). New technique for distinguishing between human chromosomes. Nature, New Biol., 232, 31-32.
36. Takeichi, M & Okada, T.S. (1972). Roles of magnesium and calcium ions in cell-to-substrate adhesion. Exp. Cell Res., 74, 51-60.
37. Takeichi, M. (1977). Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. J. Cell Biol., 75, 464-474.

38. 竹市雅俊 (1978). 細胞間接着における相互認識. 科学, 48, 474-481
39. Takeichi, M., Ozaki, H.S., Tokunaga, K. & Okada, T.S. (1979). Experimental manipulation of cell surface to affect cellular recognition mechanisms. Develop. Biol., 70, 195-206.
40. Thiery, J., Brackenbury, R., Rutishauser, U. & Edelman, G.M. (1977). Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina. J. Biol. Chem., 252, 6841-6845.
41. Townes, P.L. & Holtfreter, J. (1955). Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. J. exp. Zool., 128, 53-118.
42. Ueda, M.J., Ito, T., Okada, T.S. & Ohnishi, S. (1976). A correlation between membrane fluidity and the critical temperature for cell adhesion. J. Cell Biol., 71, 670-674.
43. Ueda, M.J. & Takeichi, M. (1976). Twomechanisms in cell adhesion revealed by effects of divalent cations. Cell Struct. Funct., 1, 377-388.
44. Urushihara, H., Ozaki, H.S. & Takeichi, M. (1979). Immunological detection of cell surface components related with aggregation of chinese hamster and chick embryonic cells. Develop. Biol., 70, 206-217.
45. Urushihara, H. & Takeichi, M. (1980). Cell-cell adhesion molecule: Identification of a glycoprotein relevant to the Ca<sup>2+</sup>-independent aggregation of chinese hamster cells. Submitted.
46. Waddell, A.W., Robson, R.T. & Edwards, J.G. (1974). Colchicine and vinblastine inhibit fibroblast aggregation. Nature, 248, 239-241.
47. Weiss, L. (1972). Studies on cellular adhesion in tissue culture. XI. Some effects of cytochalsins and colchicine. Exp. Cell Res., 74, 21-26.

48. Wilson, H.V. (1907). On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. J. exp. Zool., 5, 245-258.
49. Yamaka, K.M. & Olden, K. (1978). Fibronectins—adhesive glycoproteins of cell surface and blood. Nature, 275, 179-184.
50. Yamanaka, T. & Okada, Y. (1966). Cultivation of fused cells resulting from treatment of cells with HVJ. I. Synchronization of the stages of DNA synthesis of nuclei involved in fused multinucleated cells. Biken J., 9, 159-175.
51. Yanagisawa, K.O. & Fujimoto, H. (1977). Differences in rotation-mediated aggregation between wild-type and homozygous brachyury (T) cells. J. Embryol. exp. Morphol., 40, 277-283.
52. Kudo, K., Honaoka, Y. & Hayashi, H. (1976). Characterization of tumor cell aggregation of two factors with different antigenic property. Br. J. Cancer, 33, 79-90.