

氏 名	浜 路 政 博 はま じ まさ ひろ
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	論 医 博 第 355 号
学位授与の日付	昭 和 42 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	各種ビタミン B ₁ 誘導体の組織培養細胞におよぼす作用
論文調査委員	(主 査) 教 授 田部井 和 教 授 岡本耕造 教 授 藤原元典

論 文 内 容 の 要 旨

この研究は各種ビタミン B₁ 誘導体の培養組織細胞におよぼす影響を検討したものである。供試した B₁ および B₁ 誘導体は

- i) B₁-HCl (Neoparanutrine 注射液 “シオノギ”)
- ii) B₁- リン酸エステル
 TMP=Thiamine monophosphate
 TDP=Thiamine diphosphate
- iii) 対称型 Disulfide 誘導体
 TDS=Thiamine disulfide
 BTDS=0-Benzoylthiamine disulfide
- iv) 非対称型 Disulfide 誘導体
 TAD=Thiamine allyldisulfide
 TED=Thiamine ethyldisulfide
 TMD=Thiamine methyldisulfide
 TPD=Thiamine propyldisulfide
 TTFD=Thiamine tetrahydrofurfuryldisulfide
 TOED=Thiamine β -hydroxyethyldisulfide
- v) S-Acyl-B₁ 誘導体
 DAT=Diacetylthiamine
 DBT=Dibenzoylthiamine
 BTMP=S-Benzoylthiamine monophosphate
- vi) S-Alcoxycarbonyl-B₁ 誘導体

CET=S-Carbethoxythiamine

DCET=0, S-Dicarbethoxythiamine

の16種である。

第1編では B_1 を除き、牛血清を10%に加えた HeLa 細胞用基礎培養液に B_1 および各種 B_1 誘導体をいろいろな濃度に添加し、培養ビンを用いて HeLa 細胞の単層培養を行ない、添加薬剤の細胞増殖に及ぼす影響を観察した。細胞増殖の程度は核数を算定する方法で判定し、基礎培養液のみを用いた場合の細胞増殖の程度と比較すると同時に、培養細胞の変性についても観察し、つぎのごとき結果を得た。

1) B_1 -HCl, B_1 リン酸エステル (TMP, TDP), 対称型 Disulfide 誘導体 (TDS, BTDS), 非対称型 Disulfide 誘導体 (TPD, TMD, TED, TTFD, TOED, TAD), S-acyl- B_1 誘導体 (DAT, DBT, BTMP), S-Alcoxycarbonyl- B_1 誘導体 (CET, DCET) の B_1 類は、多少の濃度差はあるが、いずれも低濃度では細胞の増殖を促進し、ことに TDP, BTDS, TPD, TAD, TOED, DAT, DBT, DCET は 0.005~0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で著しい増殖促進作用を示した。

2) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のごとき高濃度に加えた場合は、 B_1 -HCl と B_1 リン酸エステルとは全く増殖を抑制しなかった。非対称型 Disulfide 誘導体ことに TPD, TED, TMD では細胞変性および増殖抑制作用が顕著であった。しかし TOED, TTFD による抑制作用は TPD ほど著明ではなく、TAD の抑制作用は一そう軽微であった。また同濃度において、上記以外の誘導体もほとんど細胞の増殖を抑制しなかった。

第2編では人由来細胞として HeLa 用培地における HeLa 細胞、動物由来細胞として YLE 培地における L 細胞、血漿包埋法で培養したニワトリ胎児心組織細胞、堀田・大山法を用いたハムスター腎初代目および2代目培養細胞、YLE 培地におけるサル腎細胞の増殖におよぼす高濃度誘導体特に Disulfide の影響を核数算定法により検討し、つぎのごとき結果を得た。

1) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の TPD は細胞の増殖をほとんど抑制しなかったが、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では著明な細胞変性、増殖抑制作用がみられた。しかし TTFD は TPD のような著明な阻害作用は示さなかった。BTDS は高濃度でも増殖抑制作用が軽微であった。

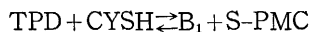
2) 以上の実験成績から単層培養に対する Disulfide 誘導体の作用は、初代培養細胞あるいは継代培養細胞、上皮細胞あるいは非上皮細胞、人由来の細胞あるいは哺乳動物由来の細胞であるとを問わず、共通して上記の作用があらわれることは明らかである。

3) ニワトリ胎児心組織の血漿包埋培養では TPD の高濃度環境 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の下でも組織の発育を抑制する作用は認められなかった。

第3編は TPD を高濃度に添加した培地では著明な細胞変性をきたし、増殖が阻止されることの原因の究明を試みたものである。従来は、このような現象は非対称型 Disulfide 誘導体が B_1 に還元されるときに生ずる側鎖に関係するのではないかと考えられていた。著者は TPD に Cysteine (CYSH) を加えて還元したものおよびこの場合に生ずる S-Propylmercapto-*l*-cysteine (PMC) の HeLa 細胞増殖におよぼす影響を検討するとともに、高濃度 TPD の浮游状態にある細胞およびシートになった細胞に対する作用を数種の培養細胞を用いて検討し、つぎのごとき結果を得た。

1) CYSH によって TPD から生ずるとされる TPD 分解産物の培養細胞におよぼす作用を検討す

ると、高濃度 TPD と同様の著明な細胞阻害作用だけがみとめられた。これは TPD が CYSH で還元されても



のごとき平衡状態で存在する TPD がもたらした結果と思われる。

2) 種々な濃度の PMC の HeLa 細胞増殖におよぼす作用を核数算定法で検討すると、30~50 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度の PMC でも高濃度 TPD のような著明な増殖阻止作用は見られなかった。このことから高濃度の TPD の細胞阻害作用の機構として PMC の作用は重視できないように思われる。

3) HeLa 細胞、L細胞およびサル腎細胞の単層シートを高濃度 TPD あるいは BTDS 添加培地で維持培養し、細胞シートの維持と細胞の生存におよぼす作用を検討したところ、高濃度の TPD のもつ著明な細胞阻害作用は細胞シートに対しては軽微で、BTDS もほとんど阻害作用を示さなかった。したがって培養液中で浮游状態にある細胞と培養ビン壁に固定した細胞とでは TPD に対する感受性が異なることを認めた。

論文審査の結果の要旨

ビタミン $\text{B}_1\text{-HCl}$ および種々の B_1 誘導体合計16種類を別々に基礎培養液に加えて HeLa 細胞、L細胞、ハムスター腎細胞、サル腎細胞を単層培養した場合、およびニワトリ胎児心組織を血漿包埋法で培養した場合の細胞発育におよぼす影響を検討した。その結果、これら16種類の B_1 類はいずれも単層培養した細胞に対しては、低濃度では増殖促進作用を示した。しかしながら非対称型 Disulfide に属するあるものでは、高濃度においては単層培養細胞に対して変性作用および著明な増殖阻止作用が認められた。

つぎに非対称型 Disulfide のこのような作用の機構に検討を加えた結果、Cysteine (CYSH) を少量に用いた場合には、非対称型 Disulfide が Cysteine により還元されて生ずる S-Propylmercapto-*l*-Cysteine (PMC) の作用によると考えるよりは、むしろ $\text{TPD} + \text{CYSH} \rightleftharpoons \text{B}_1 + \text{PMC}$ のごとき平衡状態で存在する TPD そのものによると思われる成績を得ると同時に、この細胞阻害作用に対しては培養液中に浮游状態で存在する細胞と培養ビン壁に固定した細胞シートとでは、浮游細胞はより高度の影響をうけるのを認めた。

本論文は学術上有益にして医学博士の学位論文として価値あるものと認定する。