

サイトカラシン B によるエールリッヒ 腹水癌細胞の形態変化に関する光学 顕微鏡的・電子顕微鏡的研究

岡山大学医学部第1解剖学教室（指導：大塚長康教授）

今 中 雅 章

（昭和57年8月28日受稿）

Key words：サイトカラシン B

エールリッヒ腹水癌細胞

カチオン化フェリチン

Zeiotic knob

microfilament

結 言

サイトカラシンは、かびの培養液中から分離された一群の代謝産物であり、現在までに20種を越える誘導体が発見されている。サイトカラシン B は、サイトカラシン A とともに *Helminthosporium dematioideum* から得られたもので、図1に示す分子構造を持ち、その分子量は479である¹⁾。

Carter²⁾は、マウス線維芽細胞の培養株である L 細胞を用いた実験から、サイトカラシン B が核分裂に影響を与えることなく細胞質分裂を阻害し、その結果、多核細胞を生ずること、ruffle 形成のような細胞運動を阻害すること、さらに脱核を引き起こすことを見出し、同時にこれらの作用が極めて速かつ可逆的な反応であることを示した。その後、サイトカラシンにより

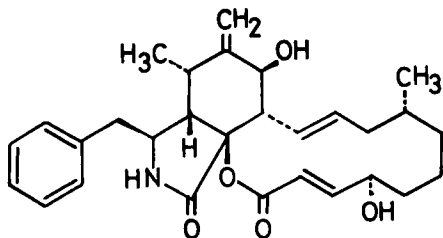


図1. サイトカラシン B の分子構造

引き起こされる種々の現象が多くの細胞について報告されてきたが、それらは、低濃度領域で細胞膜の糖輸送を阻害する作用³⁻⁴⁾と、microfilament系を介して細胞運動などの阻害^{5,6)}や細胞の形態変化を導く作用^{5,7-14)}との2つに大別されている。そして、Lin¹⁵⁾、Tannenbaumら¹⁶⁾は、前者は細胞膜の high affinity binding sites への結合により、後者は主として low affinity binding sites への結合によると報告している。特に後者のサイトカラシン B の作用については、細胞運動などと microfilament 系との関連を研

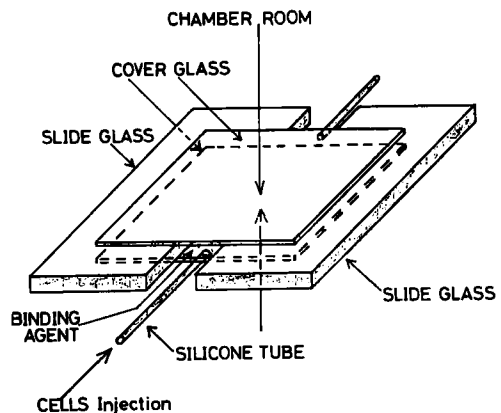


図2. 位相差顕微鏡による観察のためのChamber. 矢印の箇所から、試料を注入する。

究するための手段として利用されている。

サイトカラシンによる形態変化の1つに、細胞表面における突起の形成が知られている。これは、上皮性の細胞で著名な現象であり、zeiosis (「boil over」の意¹⁷⁾)もしくはblebbing⁷⁾と呼ばれている。サイトカラシンによる脱核もzeiosisの1つの形態と見なすことができる。Sasakiら¹⁸⁾は、エールリッヒ腹水癌細胞をサイトカラシンB処理すると、細胞表面の形態が著しく変化すること、さらにその過程は2段階に分けることができることを見出した。すなわち、まず顕著なzeiotic knob (突起)が細胞全周に生じ、次いでそのknobが微絨毛の移動を伴って細胞の一極へ集合することを走査電子顕微鏡を用いて観察した⁹⁻¹⁰⁾。

そこで本研究では、サイトカラシンB処理によるエールリッヒ腹水癌細胞の形態変化の詳細を、経時的に、また温度およびサイトカラシンB濃度を変化させて検討した。さらにカチオン化フェリチンを用いて細胞表面を修飾し、それによってもたらされる形態変化を観察するとともに、カチオン化フェリチンをマーカーとすることによって、サイトカラシンBの作用部位とカチオン化フェリチンのそれとの間にいかなる関係が存在するかを調べ、細胞表面分子と細胞内骨格構造との相関について検討した。

材料および方法

細胞

エールリッヒ腹水癌細胞は、これをスイス系マウスの腹腔内に 2×10^6 個注射後5~6日目に腹水を採取、調製した。すなわち、腹水をリン酸緩衝液¹⁹⁾(PBS, pH 7.4)で数回洗浄(1500 rpm, 30秒~1分間の遠心分離による)し、混在する赤血球を除去、同じ緩衝液で 2×10^6 個/mlに調製して実験に供した。

試薬

サイトカラシンB (Sigma社)は1 mg/mlのジメチルスルホキシド(DMSO)溶液とし、これを保存用原液とした。カチオン化フェリチン(Sigma社)は、最終濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ で実験に用いた。その他の試薬はすべて、市販の特級を使用した。

実験操作

①位相差顕微鏡による観察

厚さ約1.0mmのスライドガラスおよびカバーガラス各2枚でチャンバーを作り(厚さ約1.1 mm)、両端に細いシリコンチューブを接着した(図2)。チューブの一端から細胞懸濁液を流し込み、静置後、サイトカラシンB溶液(あらかじめ、反応温度まで加温)を静かに注入し、経時的に0秒、40秒、2分および10分後に写真撮影を行なった。反応は 37°C で行なった。

②走査型電子顕微鏡による観察

反応温度で5分間以上細胞懸濁液をプレインキュベートしたのち、サイトカラシンB溶液を加え、一定時間インキュベートした。反応温度は 15°C 、 20°C 、 37°C で、また、サイトカラシンBの最終濃度は1、5、 $10 \mu\text{g/ml}$ で行なうことによって、反応の温度および濃度依存性を調べた。インキュベーションののち、等量の5%グルタルアルデヒド溶液(リン酸緩衝液に溶解)を加えて反応を停止させるとともに固定を行なった($0 \sim 4^\circ\text{C}$, 1時間)。固定した細胞を、0.1%ポリ-L-リジンでコーティングした $5 \times 5 \text{ mm}$ のスライドガラス上に載せ⁹⁾、moist chamber中で30分間静置した。続いてリン酸緩衝液で穏やかに洗浄して過剰の細胞を除去、一層の細胞層を得た。これをアルコール系列で脱水後、酢酸イソアミルに置換し、臨界点乾燥を行なった(日立, HCP-1臨界点乾燥器)。次いでPt-Pd蒸着(Eiko Ion Coater)し、走査電子顕微鏡(日立, HHS-2R または日本電子, LSM-U₃)にて観察した。撮影にはFuji Neopan SS-12フィルムを用いた。

③透過型電子顕微鏡による観察

エールリッヒ腹水癌細胞に対し、3種類の方法でカチオン化フェリチン処理を行なった。すなわち、プレインキュベーションののち、(i)細胞懸濁液と等量のグルタルアルデヒド溶液を加えて固定($0 \sim 4^\circ\text{C}$, 1時間)し、リン酸緩衝液で洗浄後、カチオン化フェリチン処理を行ない($50 \mu\text{g/ml}$, 37°C , 15分)、表面分子をラベルした細胞群、(ii) $50 \mu\text{g/ml}$ で 37°C 15分間カチオン化フェリチン処理し、固定した細胞群、(iii) $50 \mu\text{g/ml}$ で 37°C 15分間カチオン化フェリチン処

理し、リン酸緩衝液で1回洗浄後、さらにサイトカラシン B を10 μ g/ml添加、37°C10分間インキュベートののち固定した細胞群である。

以下の操作は、(i)~(iii)のいずれについても共通である。すなわち、グルタルアルデヒドで固定後、リン酸緩衝液で洗浄し、1% OsO₄ (0.05M リン酸緩衝液、pH7.4)で0°C、1時間、後固定した。引き続き遠心分離操作で得た細胞のペレットを、少量の緩衝液に懸濁し50~60°Cに加熱した。これに50~60°Cに暖めた1% Noble agarを、同温度のピペットで1~2滴加え、すばやく懸濁、遠心分離 (3,000rpm, 15分) した。冷却により agarが固化したあと、取り出して小さなブロックに細断し、アセトン系列で脱水後、エポン中に包埋した。超薄切片は、ダイヤモンドナイフを装着したウルトラマイクローム (Sorvall, MT-5000)で作製し、無染色または酢酸ウランウムおよびクエン酸鉛で二重染色したのち、透過型電子顕微鏡 (日本電子, JEM-100CX) で観察した。

結 果

①サイトカラシン B 処理によるエールリッヒ腹水癌細胞の形態変化——位相差顕微鏡による観察——

サイトカラシン B 処理によりエールリッヒ腹水癌細胞に生ずる zeiotic knobの形成と、その移動の初期像を、図2に示したチャンバーを使用し、位相差顕微鏡により経時的に追跡した。写真1-aはサイトカラシン B添加前の細胞像であるが、zeiotic knobの形成は認められなかった。写真1-bは、サイトカラシン B処理40秒後の細胞で、この時点において、すでに一部の細胞に zeiotic knobの形成が認められた。さらに120秒後には、写真1-Cに示すように、一部の細胞で zeiotic knobの移動が観察された。zeiotic knobの移動は、その後さらに進行し、10分後には、細胞の一極に強く集合した。このように、zeiotic knobの出現は、サイトカラシン B処理後40秒前後という非常に早い時点で観察され、その後数分間のうちに移動することが明らかとなった。

②zeiotic knob 形成におけるサイトカラシン

Bの濃度依存性——走査型電子顕微鏡による観察——

エールリッヒ腹水癌細胞は、円形で、細胞表面全体に均一に分布する微絨毛を持つ。写真2-aは、10 μ g/mlのDMSOで、37°C15分間処理した細胞であるが、無処理の細胞像と変わらず、DMSO自身はこの細胞の形態に対して影響を及ぼさないことが示された。ただし全細胞の約5%では、短くなった微絨毛が細胞の一極へ集合することがあり (写真2-b)、これは、Sasaki¹⁸⁾やYahara²⁰⁾により観察された、spontaneous capに相当するものと思われる。cap以外の部位にも微絨毛の存在が観察されるのが特徴的である。

次に、サイトカラシン Bの濃度と zeiotic knob形成の間の関係を知る目的で、1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/mlの各濃度における細胞形態の変化を観察した。実験条件は、細胞を37°C、10分ブレインキュベート後、各濃度において、サイトカラシン B処理を37°C15分行なった。写真3-aは、1 μ g/mlのサイトカラシン Bの作用をみたものであるが、zeiotic knobは細胞全周にわたって観察され、やや短縮した微絨毛が zeiotic knobの間に存在していた。写真3-bは5 μ g/mlの場合であるが、1 μ g/mlのときと比較して、明らかに zeiotic knobが偏在している様子が観察され、なかにはすでに、細胞の一極に集合している例もみられた。微絨毛はより短縮し、一部分では、平滑な細胞表面が出現することもあった。10 μ g/mlの濃度では、典型的な zeiotic knobの集合が観察され、それに伴ない、平滑な部分が細胞表面の大半を占めるようになった (写真3-C)。

③サイトカラシン Bによる zeiotic knob 形成の温度依存性——走査型電子顕微鏡による観察——

膜表面分子の側方移動は、細胞膜の流動性と密接な関連があるために、その移動の程度は温度依存性を示すことが知られている。したがって、zeiotic knobの移動とサイトカラシン作用温度との間にも強い相関があることが示唆される。また zeiotic knob形成自体の温度依存性を調べることは、その形成メカニズムを考えるう

えて、重要な情報を提供するものである。以上の理由から、zeiotic knobの形成ならびに移動における温度の影響を調べた。

写真4-a, 4-bは、15°Cおよび20°Cで10分間サイトカラシン B (10 μ g/ml) 処理した時の細胞像を示したものである。両者ともに zeiotic knobの形成は認められたが、形成されたzeiotic knobが細胞の一極に集合することは、ほとんど観察されなかった。

一方37°Cにおいては、写真3-C(または5-C)に示すように、形成された zeiotic knobが細胞の一極に強く集合した。この時の細胞の特徴は、zeiotic knobが大型化し、その数は明らかに減少した。また、zeiotic knobの集合部には微絨毛が見られるが、それ以外の細胞表面は非常に平滑となった。

④サイトカラシン Bによるzeiotic knob形成の経時的変化——走査型電子顕微鏡による観察——

37°Cにおける zeiotic knob形成を経時的に追跡してみると、写真5のようになった。まず写真5-aと5-bは、サイトカラシン処理1分後の細胞像であるが、位相差顕微鏡で観察したように、zeiotic knobは細胞全周にわたり観察され、やや短くなった微絨毛がzeiotic knobの周辺に均一に分布しているのがわかる。この時点では、まだzeiotic knobを形成していない細胞もみられた。

さらに10分間インキュベートすると、種々の形態を示す細胞が観察されたが、一般的に、zeiotic knobはほとんどの細胞で微絨毛の移動を伴って一極に移動し、knobが集合した領域以外では細胞表面が平滑となり、微絨毛は消失していた。写真5-Cは、典型的なzeiotic knobの移動を示したもので、集合した突起と微絨毛が全体として一つの大きな突起を形成している。このような像が、サイトカラシン B処理により起こるエールリッヒ腹水癌細胞の最終的な形態変化と考えられる。写真5-dも37°C、10分間のインキュベートで得られた像である。zeiotic knobが細胞の一極に集合しつつあり、短くなった微絨毛もzeiotic knobに遅れてpatch状に集合しつつある。これに伴ない、平滑な細胞表

面が現われてきている。この像は、zeiotic knobの集合に伴って微絨毛が集合しつつある写真5-a(または5-b)から5-cに至る途中の像を示していると考えられる。zeiotic knobの移動と微絨毛の移動は常に同時に生じていた。

⑤カチオン化フェリチンによるcap形成とサイトカラシン B処理による形態変化との関連について——透過型電子顕微鏡による観察——

zeiotic knobの挙動と微絨毛の挙動が類似していることから、knobを構成する膜は微絨毛由来であることが示唆される。そこで、細胞膜表面分子がサイトカラシン Bによるzeiotic knob形成に伴って示す挙動を知る目的で、以下の実験を行なった。すなわち、細胞表面分子(負荷電分子)のラベル化剤であるカチオン化フェリチンで処理した細胞にサイトカラシン Bを作用させ、カチオン化フェリチン粒子の挙動とzeiotic knob形成との関係を、透過型電子顕微鏡で追跡した。

写真6-aは、対照として、サイトカラシン B無処理細胞の表面におけるカチオン化フェリチンの分布を調べたもので、固定・洗浄後の段階で50 μ g/ml作用させた。カチオン化フェリチンは細胞全周に均一に分布しており、微絨毛上にも細胞表面の他の領域と同様に2~3層にラベルされていた。

一方、50 μ g/mlのカチオン化フェリチンで37°C、15分処理した細胞では、その粒子は、微絨毛の集合を伴って細胞の一極へ集合しており、いわゆるcapを形成していた(写真6-b)。この形態は、Con Aによるエールリッヒ腹水癌細胞のcap形成¹⁸⁾と極めて類似していたが、それに比較してしばしば広い領域に集合しており、cap領域以外にも、カチオン化フェリチンがpatch状に観察されることがあった。またcap領域下の細胞質内にも、小胞中に取り込まれたカチオン化フェリチン粒子が観察された。微絨毛の先端にはカチオン化フェリチンのラベルはみられなかったが、これはcap形成の現象に特有のものである。

カチオン化フェリチン処理した細胞を、さらにサイトカラシン B(10 μ g/ml)で37°C、10分間処理すると、サイトカラシン Bによるzeiotic knobは、

カチオン化フェリチン粒子をその表面に持たないで cap 形成領域に集合していた(写真6-c, 6-d)。写真6-cは低倍率のものであるが、同視野の数個の細胞でこのような変化を観察することができる。この zeiotic knob 形成を経時的に検討すると、カチオン化フェリチンで前処理しない細胞でみられたのと同様に、突起はまず cap 部位を除いた細胞全周に出現し、次いで cap 領域に集合するのが観察された。

考 察

サイトカラシン B の作用については Carter²⁾ 以来多くの報告があるが、それらは前述したように 2 つに大別することができる。1 つは細胞膜の high affinity binding sites への結合による糖輸送の阻害作用であり、他の 1 つは low affinity binding sites への結合に起因する、細胞の運動等に対する阻害作用である。このうち後者は、今回述べる zeiosis のような細胞形態の変化をしばしば伴っており、microfilament を介する作用であると考えられている。形成される zeiotic knob は、その内容物として細胞質成分を含むところに特徴があり、水を主成分とする blister とは著しく異なっている²¹⁾。zeiotic knob は、培養細胞においても長時間サイトカラシン B とインキュベートすることにより形成され、その突起は花冠状に細胞の自由面に集まってくる⁷⁾。この突起の形成は上皮性の細胞においてより著名であるが、著者は、材料としてエールリッヒ腹水癌細胞を使用し、サイトカラシン B の作用メカニズムについて検討した。

サイトカラシン B 処理によるエールリッヒ腹水癌細胞の形態変化は、2 段階より構成されることを、走査型電子顕微鏡による観察で確認した。すなわち、まず細胞全周に多数の knob が形成され、次いでこれらが細胞の一極に集合した。これは Sasaki らの報告⁹⁾ と良く一致していた。zeiotic knob の形成は、サイトカラシン B 処理後約 1 分という短時間でほとんどの細胞に生じ、20°C および 15°C という低温においても阻害されなかった(移動は阻害された)。またその生成過程と移動過程の順序が逆転することはない、したがって、一極に集合した状態で zeio-

tic knob が出現する場合は観察されなかった。生成段階がある程度進行してはじめて、移動が可能になるようである。一方、zeiotic knob の移動過程は NaN_3 で阻害され、さらに集合した knob の基部に microfilament 様構造が観察され¹⁸⁾、同部に螢光物質 DACM-HMM²²⁾ が分布する²³⁾ ことから、microfilament 系を介するエネルギー依存性の現象と考えられる。しかしながら、microfilament 阻害剤と考えられているサイトカラシン B 処理後の段階で、microfilament がいかにこの移動過程に関与するかは明らかでない。また本研究では、サイトカラシン B 作用の濃度依存性について検討した。1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では、knob は形成されたが、knob の移動は認められなかった。このことは、その移動には約 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のサイトカラシン B が必要であることを示している。この理由については現在のところ明らかではないが、zeiotic knob の生成とその移動に対しては、種類の異なる microfilament が関与している可能性も考えることができる。生成を支配する microfilament の方がサイトカラシン B に対し、より sensitive かもしれない。

位相差顕微鏡による観察結果もまた、サイトカラシン B の作用が 2 段階よりなることを支持した。すなわち、図 2 に示したチャンバーを製作し、位相差顕微鏡下でサイトカラシン B 作用の初期変化を検討したところ、添加後 40 秒で zeiotic knob が形成され始め、120 秒後には、これらが移動し始めるのが観察された。このようにサイトカラシン B の作用はすこぶる迅速で、Lin ら¹⁵⁾ のいう low affinity binding sites を介する現象としても、より直接的なものと考えられる。

走査電子顕微鏡を用いてサイトカラシン B 処理による形態変化を注意深く観察すると、その作用と微絨毛の挙動との間には密接な関連があることが示唆される。すなわち、サイトカラシン B 処理に伴ない、まず微絨毛は短くなり、その数は減少する。続いて、knob の移動に伴ない微絨毛も同じ部位に移動し、そのあとに平滑な細胞表面が現われる。また、微絨毛内に microfilament の bundle が観察されており^{5, 18)}、前述

のサイトカラシンBとmicrofilamentに関する知見を合わせて考えると、zeiotic knobは微絨毛由来であることが強く示唆される。

サイトカラシンBの作用を追求するうえで、細胞表面分子の挙動を同時に調べることは、その解析に際し有力な情報を提供してくれる。そこで本実験では、カチオン化フェリチンで処理することによって細胞表面分子に関する情報を得るとともに、同じく代表的な表面修飾試薬であるConAによるデータとの比較検討を行なった。さらにConAおよびカチオン化フェリチンによるcap形成と、サイトカラシンB処理による形態変化との間の相関関係について考察した。

まずConAによるcap形成は、形態的に微絨毛の集合を伴っており、また低温や NaN_3 存在下では阻害された¹⁸⁾。DACM-HMM²²⁾を用いて観察したところ、capの基部にその分布が確認された²³⁻²⁴⁾。これらは、前述したサイトカラシンB作用の結果と極めて類似しており、サイトカラシンB作用部位とConAレセプター両者の間に互いに密接な連結性が存在することを示唆している。

Sundqvistら¹²⁾は、サイトカラシンB処理により形成されたzeiotic knobの移動に伴ない、細胞表面分子が移動しcapを形成することを螢光顕微鏡で観察している。しかし森ら²⁵⁾は、サイトカラシンB処理によってzeiotic knobの集合したエールリッヒ腹水癌細胞においても、表面分子(ConAレセプター)の移動が起こっていないことを透過型電子顕微鏡で明らかにしている。彼らは、サイトカラシンB処理では表面分子の移動は起こらず、微絨毛の集合等による膜密度の増加が、螢光顕微鏡上では見かけのcap形成をきたしたと考えている。このように、サイトカラシンBにより形成されたzeiotic knobの移動は、少なくともエールリッヒ腹水癌細胞においては表面分子の移動を伴わず、この点に関してはConAによるcap形成と著しい相異を呈している。

一方、カチオン化フェリチンのみの処理によっても典型的なcap形成が引き起こされた。その大きさがより広範囲にわたっている点を除いては、ConA-capと形態的に極めて類似してい

た。このあらかじめcapを形成した細胞にさらにサイトカラシンB処理を行なうと、やはりzeiotic knobはまず細胞全周に形成されたのち、カチオン化フェリチンによるcap部位に集合してゆく。このように、カチオン化フェリチンでcapが形成されたあとでもzeiotic knobの移動が生ずることは、それぞれを引きおこすmicrofilamentが別々に存在するか、あるいは、カチオン化フェリチンでcap形成に利用されたmicrofilamentがzeiotic knobの移動に何らかの方法で再利用されることを示唆する。最近の研究では、cap過程においてintermediate filamentもまたco-capを起こすことが報告されており²⁶⁾、この線維の関与も考察されなければならないが、いずれにせよ、カチオン化フェリチンによるcap部位にzeiotic knobは移動するので、これらのmicrofilamentには密接な関連があるものと考えられる。microfilamentの再利用については、Condeelis²⁷⁾が、cap形成に際してはcap部のactin, myosin量が増加し、cap形成の終了とともにこれらが減少することを報告している。なお無処理細胞の約5%にみられたspontaneous cappingでは、cap以外の部位にも微絨毛が観察される。このことは、微絨毛の移動を支配するmicrofilamentも、2種類以上存在している可能性を示唆するものである。

最後に、サイトカラシンBのmicrofilamentに対する作用メカニズムについて考察する。サイトカラシンBがmicrofilamentに作用することを最初に報告したのはWesselles⁶⁾である。しかし、サイトカラシンによって修飾を受けた生物活性とmicrofilamentとの因果関係を直接的に証明することは難しい²⁸⁾。たとえば、ConAにより生じたcap領域下にアクチンの集合が観察された場合でも、先に集合したアクチンがConAレセプターを引き寄せたのか、それともその逆の関係にあるのかを知ることは容易ではない。しかし、in vitroでの最近の研究から、細胞質の粗抽出液におけるアクチンゲルの形成がサイトカラシンBで阻害されること²⁹⁻³⁰⁾、赤血球でのアクチン-スペクトリン複合体におけるアクチン重合の阻害³¹⁾等が明らかにされてきた。さらに、サイトカラシンBがF-アクチンの

一端に結合することによってアクチンモノマーの添加を阻害し、その結果アクチンの polymerization が阻害される³⁰⁻³⁵⁾との報告も出されている。特に Phillips ら³⁶⁾は、毛細胆管に富む肝細胞分画で、細胞膜に結合した microfilament の網を電顕的に観察し、約 10 μ g/ml のサイトカラシン B 処理でこの microfilament が膜から離れることを報告している。zeiosis の際に形成される filamentous mass は膜から遊離して集まったものであるという考えは、サイトカラシン B 作用の迅速性を説明するうえで、魅力的なものである。

以上、細胞表面分子の挙動と細胞内骨格系との関係についてサイトカラシン B の作用部位に着目しながら討議してきた。今後、これらの作用部位に関する新しい知見をふまえ、反応の経時的変化を詳細に研究することにより、両者の関係を明らかにしてゆく必要があると思われる。

結 語

サイトカラシン B による細胞形態変化を、エールリッヒ腹水癌細胞を用いて、位相差顕微鏡、走査型・透過型電子顕微鏡により調べた。37°C で 10 μ g/ml のサイトカラシン B 処理を加えると、40 秒後には細胞の全周に knob が生じ始め、120 秒後にはこの移動が起り、10 分間のインキュベートで細胞への一極へ移動したが、1 μ g/ml 以下の作用濃度または 20°C 以下の反応温度では、

knob の移動は生じなかった。また knob の移動に伴ない微絨毛も移動し、細胞表面は突起の集合部位を除いて平滑となった。

細胞表面分子の挙動とサイトカラシン B 処理による形態変化との関連を調べるために、細胞をカチオン化フェリチンで処理した後、サイトカラシン B を作用させ検討した。その結果、カチオン化フェリチン単独でも著明な cap 形成を引き起こすことが明らかになった。またサイトカラシン B 処理による knob は、まず細胞全周にわたって形成され、次いでこの cap 形成部位に集合することが明らかになった。これらのことは、両者の過程が極めて密接な関係にあることを示唆しており、細胞膜表面の分子と細胞内のサイトカラシン B 作用部位の強い関連を示している。

さらに、ConA による知見より、サイトカラシン B の作用部位について考察した。

稿を終えるにあたり、ご懇篤なるご指導とご校閲を賜った大塚長康教授、佐々木順造助教授に深く感謝致します。また終始ご助言とご指導をいただいた苅田成人技官、野村貴子助手、実験にご協力いただいた第 1 病理学教室、森 将晏博士、中本 周博士、第 1 解剖学教室、渡辺定博氏、また走査電子顕微鏡の使用に際しご協力いただいた岡山中央病院、金重哲爾博士、金重浩彰氏、青木淳偉氏、菊田純子氏に心から感謝致します。

文 献

1. Tamm, C.H.: Chemistry and biosynthesis of cytochalasins. In "Cytochalasins. Biochemical and Cell Biological Aspects", ed. Tanenbaum, S.W., North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp15—51, 1978.
2. Carter, S.B.: Effect of cytochalasins on mammalian cells. *Nature* 213, 261—264, 1967.
3. Wagner, R., Rosenberg, M. and Estern, R.: Endocytosis in Chang liver cells. Quantitation by sucrose-³H uptake and inhibition by cytochalasin B. *J. Cell Biol.* 50, 804—817, 1971.
4. Plagemann, P.G.W., Wohlhueter, R.M., Graff, J.C. and Marz, R.: Inhibition of carrier-mediated and non-mediated permeation processes by cytochalasin B. In *Cytochalasins. Biochemical and Cell Biological Aspects*' ed. Tanenbaum, S.W., North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp 445—473, 1978.
5. Godman, G.C. and Mirand, A.F.: Cellular contractility and the visible effects of cytochalasin. *Ibd.* pp 277—429, 1978.
6. Wessells, N.K., Spooner, B.S., Ash, J.F., Bradly, M.O., Luduena, M.A., Tayler, E.L., Wrenn, J.T. and Yamada, K.M.: Microfilaments in cellular and developmental process. *Science* 171, 135—143, 1971.

7. Godman, G.C., Miranda, A.F., Deitch, A.D. and Tanenbaum, S.W.: Action of cytochalasin D on cells of established lines. Zeiosis and movement at the cell surface. *J. Cell Biol.* **64**, 644—667, 1975.
8. Mirand, A.F., Godman, G.C., Deitch, A.D. and Tanenbaum, S.W.: Action of cytochalasin D on cells of established lines. Early events. *J. Cell Biol.* **61**, 481—500, 1974.
9. Sasaki, J., Imanaka, M., Watanabe, S., Otsuka, N., Nakamoto, S. and Mori, M.: A scanning electron microscopic study of the two-step effect of cytochalasin B on Ehrlich ascites tumore cells. *Acta Med. Okayama* **35**, 197—204, 1981.
10. Sasaki, J., Imanaka, M., Watanabe, S., Mori, M., Nakamoto, S., Kirizuka, K. and Otsuka, N.: Cationized ferritin-induced cap formation and the effect of cytochalasin B. *Acta Med. Okayama* **36**, 1982 (in press).
11. Everhart, J.P.Jr. and Rubin, R.W.: Cyclic changes in the cell surface. The effect of cytochalasin B on the surface morphology of synchronized Chinese hamster ovary cells. *J. Cell Biol.* **60**, 442—447, 1974.
12. Sundqvist, K.G. and Otteskog, P.: Cytochalasin B induces polarization of plasma membrane components and actin in transformed cells. *Nature* **274**, 915—917, 1978.
13. Sundqvist, K.G. and Ehrnst, A.: Cytoskeletal control of surface membrane mobility. *Nature* **264**, 226—231, 1976.
14. Miyake, Y., Kim, J. and Okada, Y.: Effects of cytochalasin D on fusion of cells by HVJ (Sendai virus). Cell-cell fusion is separable from cell-virus fusion. *Exp. Cell Res.* **116**, 167—178, 1978.
15. Lin, S.: Interaction of cytochalasins with red blood cells membrane and its association proteins. In *Cytochalasins. Biochemical and Cell Biological Aspects*, pp 499—520, 1978.
16. Tannenbaum, J., Tenenbaum, S.W., Lo, G.C., Godman, G.C. and Miranda, A.F.: Binding and subcellular localization of tritiated cytochalasin D. *Exp. Cell Res.* **91**, 47—56, 1975.
17. Costero, I. and Pomerat, C.M.: Cultivation of neurons from the adult human cerebral and cerebellar cortex. *Am. J. Anat.* **89**, 405—467, 1951.
18. Sasaki, J., Kanda, S., Otsuka, N., Nakamoto, S. and Mori, M.: Morphology of cap formation in Ehrlich ascites tumor cells induced by concanavalin A. *Cell Struct. Funct.* **4**, 1—10, 1979.
19. Dulbecco, R. and Vogt, M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitic viruses. *J. Exp. Med.* **99**, 167—182, 1958.
20. Yahara, I. and Kakimoto-Sameshima, F.: Ligand-independent cap formation: Redistribution of surface receptors on mouse lymphocytes and thymocytes in hypertonic medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4511—4515, 1977.
21. Trump, B.F., Penttila, A. and Berezsky, I.K.: Studies on cell surface conformation following injury. I. Scanning and transmission electron microscopy of cell surface changes following p-chloromercuribenzenesulfonic acid (PCMB)-induced injury of Ehrlich ascites tumor cells. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* **29**, 281—296, 1979.
22. Namihisa, T., Tamura, K., Saifuku, K. and Sekine, T.: Fluorescent staining of microfilaments with heavy meromyosin labelled with N-(7-dimethylamino-4-methyl-coumarinyl) maleimide. *J. Histochem. Cytochem.* **28**, 335—338, 1980.
23. Sasaki, J., Watanabe, S., Imanaka, M. and Otsuka, N.: in preparation.
24. Toh, B.H. and Hard, G.C.: Actin co-caps with concanavalin A receptors. *Nature* **269**, 695—697, 1977.
25. Mori, M., Nakamoto, S. and Sasaki, J.: in preparation.

26. Dellagi, K. and Brouet, J.C.: Redistribution of intermediate filaments during capping of lymphocyte surface molecules. *Nature* **298**, 284—286, 1982.
27. Condeelis, J.S.: Isolation of concanavalin A caps during various stages of formation and their association with actin and myosin. *J. Cell Biol.* **80**, 751—759, 1979.
28. Estensen, R.D., Rosenberg, M. and Sheridan, J.D.: Cytochalasin B: Microfilaments and “contractile” processes. *Science* **173**, 356—358, 1971.
29. Hartwig, J.H. and Stossel, T.P.: Cytochalasin B and the structure of actin gels. *J. Mol. Biol.* **71**, 303—307, 1979.
30. Weihing, R.R.: Cytochalasin B inhibits actin-related gelation of Hera extracts. *J. Cell Biol.* **71**, 303—307, 1976.
31. Lin, D.C. and Lin, S.: Actin polymerization induced by motility-related high-affinity cytochalasin binding complex from human erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2345—2349, 1979.
32. Lin, D.C., Tobin, K.D., Grumet, M. and Lin, S.: Cytochalasins inhibit nuclei-induced actin polymerization by blocking filament elongation. *J. Cell Biol.* **84**, 455—460, 1980.
33. Brown, S.S. and Spudich, J.A.: Cytochalasin inhibits the rate of elongation of actin filament fragments. *J. Cell Biol.* **83**, 657—662, 1979.
34. Brown, S.S. and Spudich, J.A.: Mechanism of action of cytochalasin: Evidence that it binds to actin filament ends. *J. Cell Biol.* **88**, 487—491, 1981.
35. MacLeon-Fletcher, S. and Pollard, T.D.: Mechanism of cytochalasin B on actin. *Cell* **20**, 329—340, 1980.
36. Phillips, M.J., Oda, M., Yousef, I.M. and Funatsu, K.: Effects of cytochalasin B on membrane-associated microfilaments in a cell-free system. *J. Cell Biol.* **91**, 524—527, 1981.

写 真 説 明

- 写真1. サイトカラシンBによるエールリッヒ腹水癌細胞の形態変化を経時的に追跡した位相差顕微鏡写真。
(×1600)
- 写真1-a: サイトカラシンB添加前
- 写真1-b: サイトカラシンB, 10 μ g/ml添加, 37°C40秒間インキュベート後観察。矢印(↑)は, knobの形成を示す。
- 写真1-c: サイトカラシンB, 10 μ g/ml添加, 37°C120秒間インキュベート後観察。
- 写真1-d: サイトカラシンB, 10 μ g/ml添加, 37°C10分間インキュベート後観察。
- 写真2. DMSOのみを添加した細胞の走査電子顕微鏡像。
- 写真2-a: DMSO 10 μ g/ml添加, 37°C15分間インキュベート後観察。無処理細胞と同じ形態が観察される。
(×9500)
- 写真2-b: DMSO 10 μ g/ml添加, 37°C, 15分間インキュベート後観察。
短くなった微絨毛が細胞の一極に集合した例で, 約5%の細胞で観察される。(×10000)
- 写真3. サイトカラシンB作用の濃度依存性の走査型電子顕微鏡による観察。
- 写真3-a: サイトカラシンB, 1 μ g/ml添加, 37°C15分間インキュベート後観察。zeiotic knobは細胞全周に観察され, 微絨毛がその間に存在している。(×6500)
- 写真3-b: サイトカラシンB, 5 μ g/ml添加, 37°C15分間インキュベート後観察。zeiotic knobの集合が観察される。(×4100)
- 写真3-c: サイトカラシンB, 10 μ g/ml添加, 37°C15分間インキュベート後観察。典型的な zeiotic knobの集合が観察される。(×2500)
- 写真4. サイトカラシンB作用の温度依存性の走査型電子顕微鏡による観察。
- 写真4-a: サイトカラシンB, 10 μ g/ml添加, 15°C10分間インキュベート後観察。zeiotic knobの細胞の一極への集合はみられない。(×9000)
- 写真4-b: サイトカラシンB, 10 μ g/ml添加, 20°C10分間インキュベート後観察。zeiotic knobの細胞の一極への集合はみられない。(×10000)
- 写真5. サイトカラシンB作用の経時変化の走査型電子顕微鏡による観察。
- 写真5-a: サイトカラシンB, 10 μ g/ml添加, 37°C1分間インキュベート後観察。zeiotic knobは細胞全周に生じており, 微絨毛がその周辺に均一に分布している。また, zeiotic knobの生じていない細胞も観察される。(×1500)
- 写真5-b: 写真5-aで, zeiotic knobを形成している細胞を, 高倍率(×7000)で観察した。
- 写真5-c: サイトカラシンB, 10 μ g/ml添加, 37°C10分以上インキュベート後観察。
典型的な, zeiotic knobの移動が観察される。(×6000)
- 写真5-d: サイトカラシンB, 10 μ g/ml添加, 37°C10分以上インキュベート後観察。
zeiotic knobは一極に集合しているが, 微絨毛は patch 状に集合している。写真5-a(または, 5-b)から写真5-cに至る途中の像を示していると考えられる。(×8000)
- 写真6. カチオン化フェリチンをマーカーとして, サイトカラシンB処理に伴う表面分子の挙動を調べた透過型電子顕微鏡写真。
- 写真6-a: コントロール。細胞を固定, 洗浄後, カチオン化フェリチン50 μ g/mlを作用させ観察。カチオン化フェリチン粒子は均一に分布しており, 微絨毛上にも観察される。(×29000)
- 写真6-b: カチオン化フェリチン50 μ g/ml添加, 37°C15分間インキュベート後, 洗浄, 固定し観察。
カチオン化フェリチン粒子は, 微絨毛を伴って細胞の一極へ集合している。また cap 領域下の細胞質内にも, 小胞中に取り込まれたカチオン化フェリチン粒子が観察される。しかし, 微絨毛の先端は

ラベルされていない。(×6800)

写真6-c: カチオン化フェリチン50 μ g/ml 添加, 37°C15分間インキュベート, 洗浄後, サイトカラシンB 10 μ g/ml 添加, 37°C10分間インキュベート後, 固定し観察。(×3400)

写真6-d: 写真6-cと同一条件下で処理した細胞を高倍率(×9500)で観察。6-c, 6-dの場合ともに, サイトカラシンBによる突起が, カチオン化フェリチンによるcap形成領域に集合している様子を, 観察することができる。

今中雅章論文附図

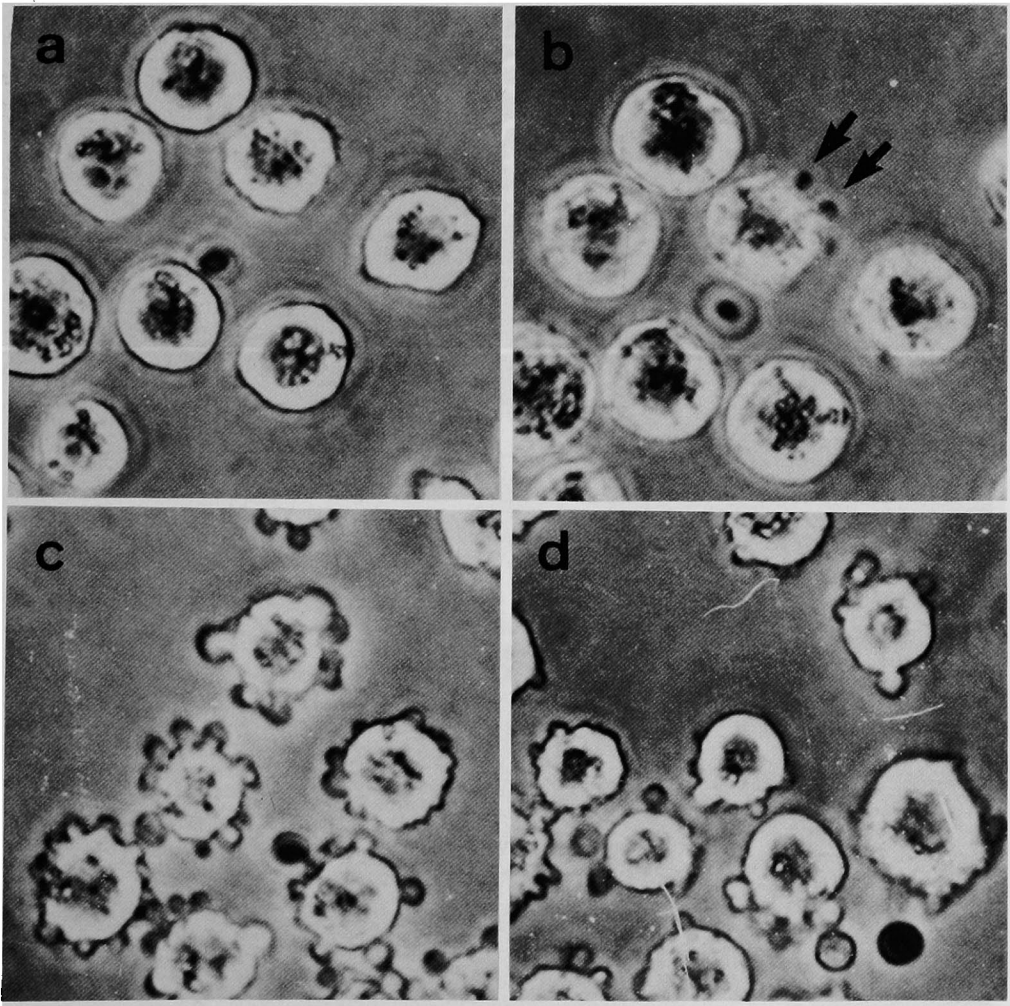


写真1.

今 中 雅 章 論 文 附 図

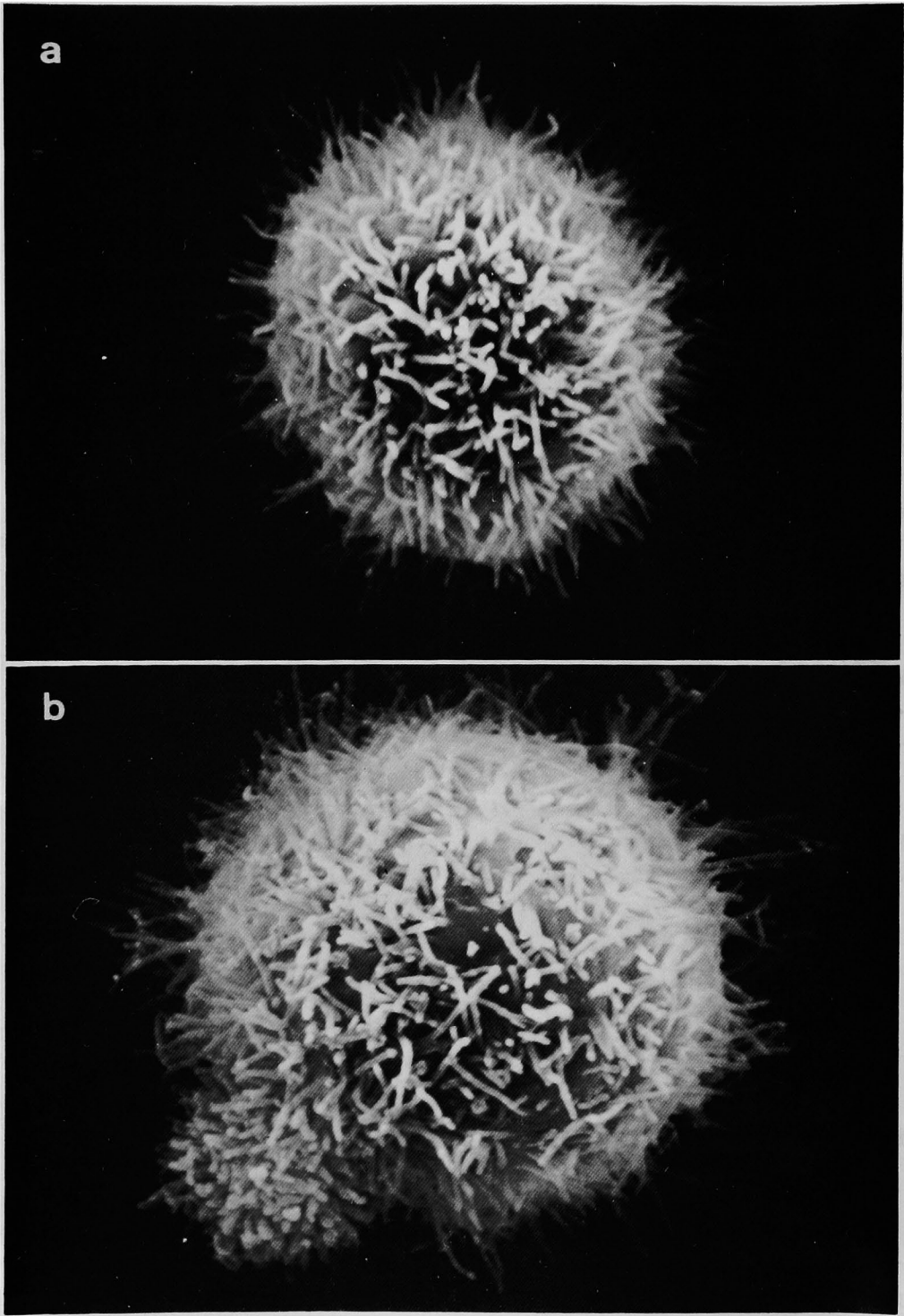


写真 2.

今中雅章論文附図

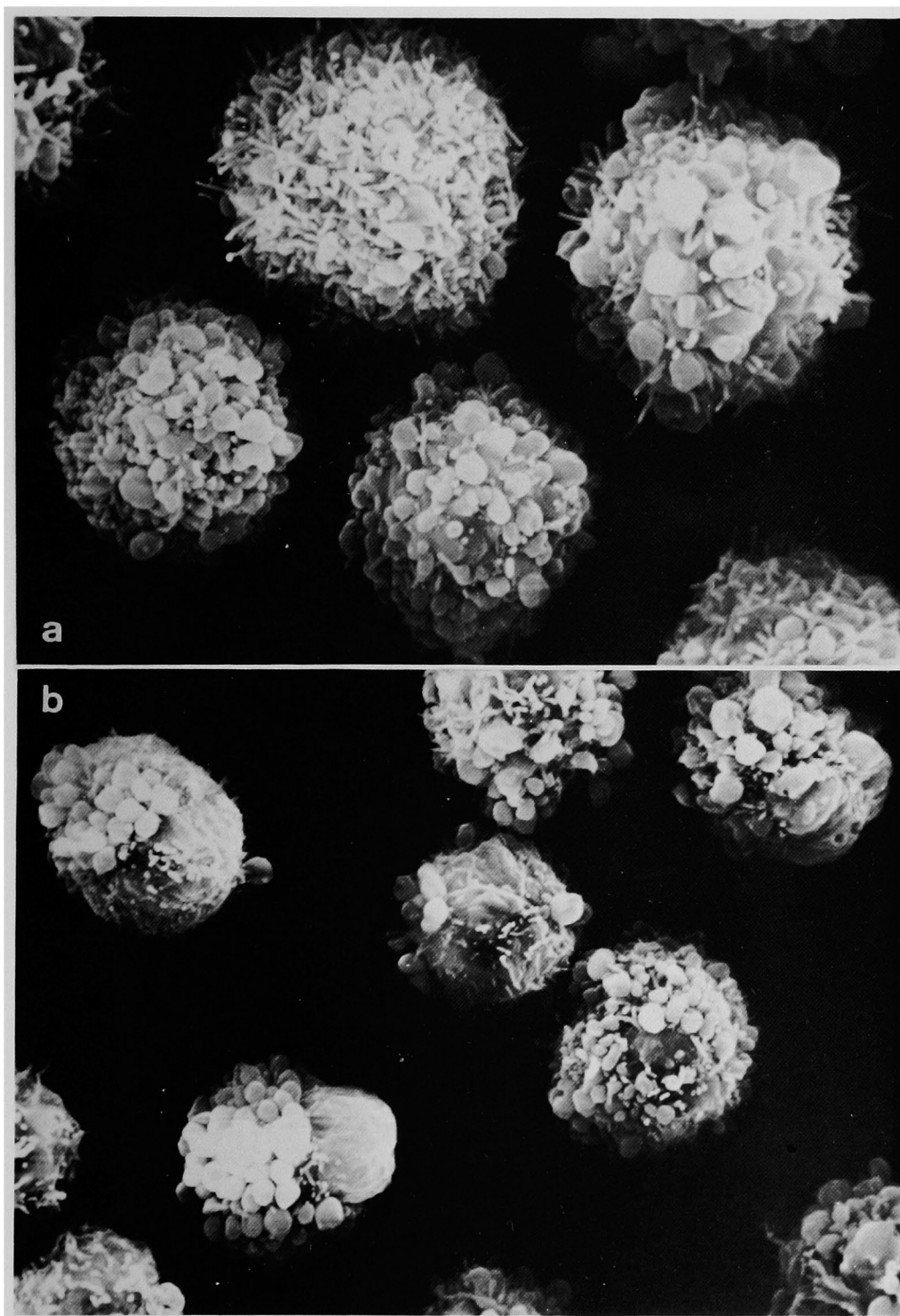


写真 3.

今 中 雅 章 論 文 附 図

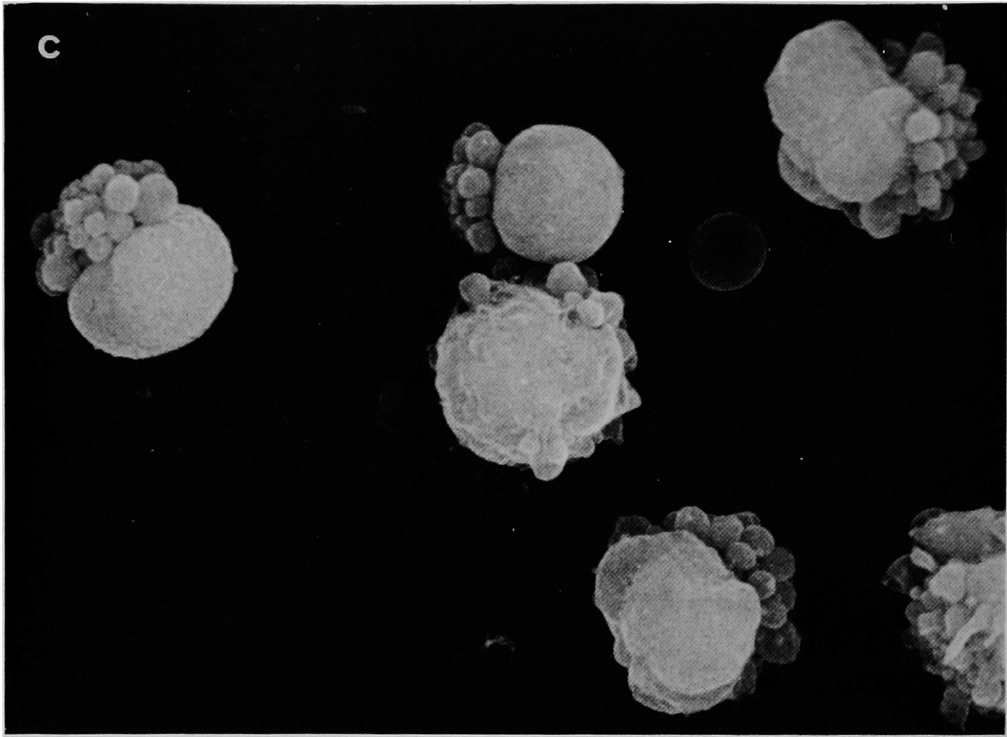


写真 3.

今中雅章論文附图

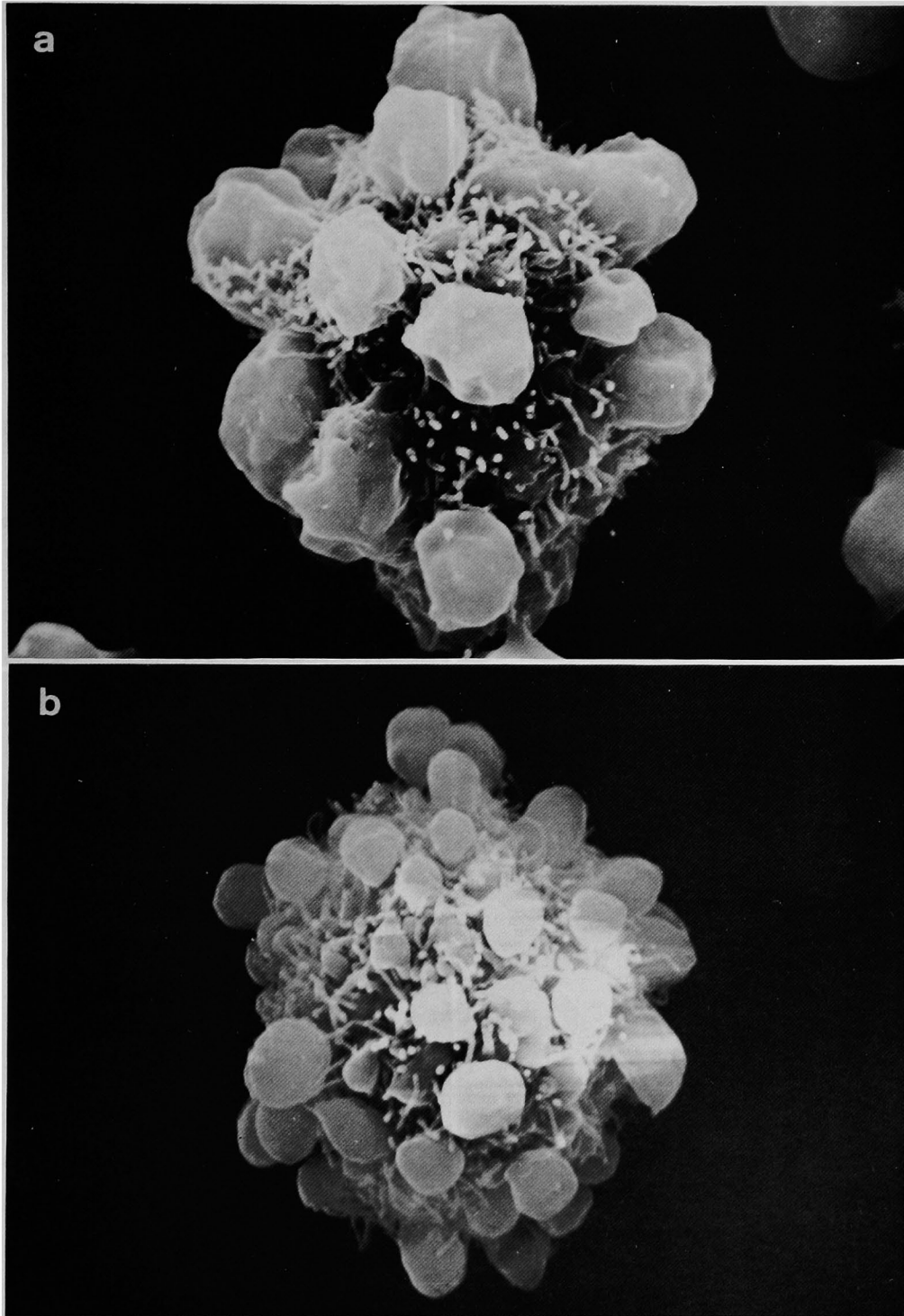


写真 4 .

今 中 雅 章 論 文 附 図

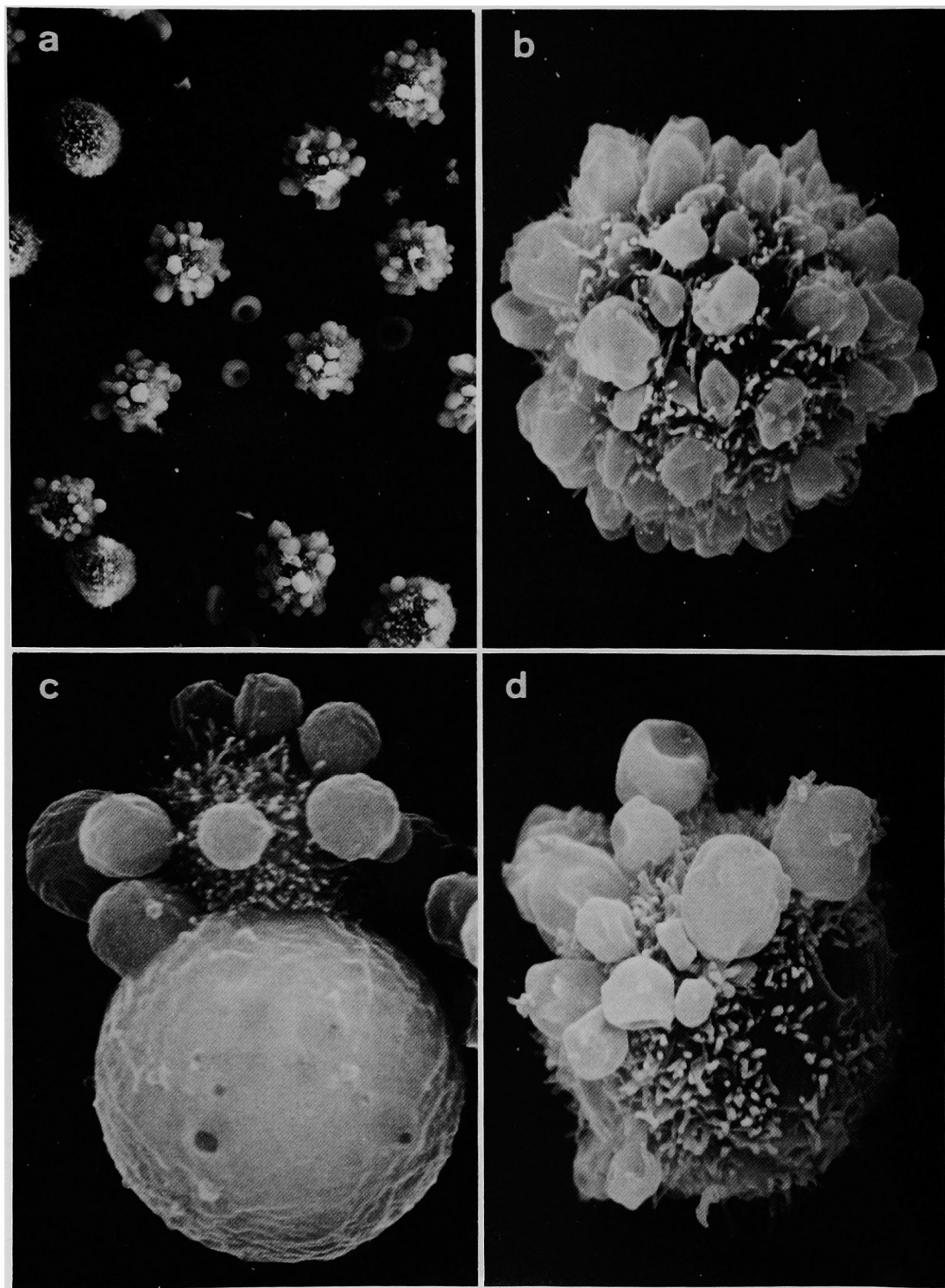


写真 5.

今中雅章論文附図

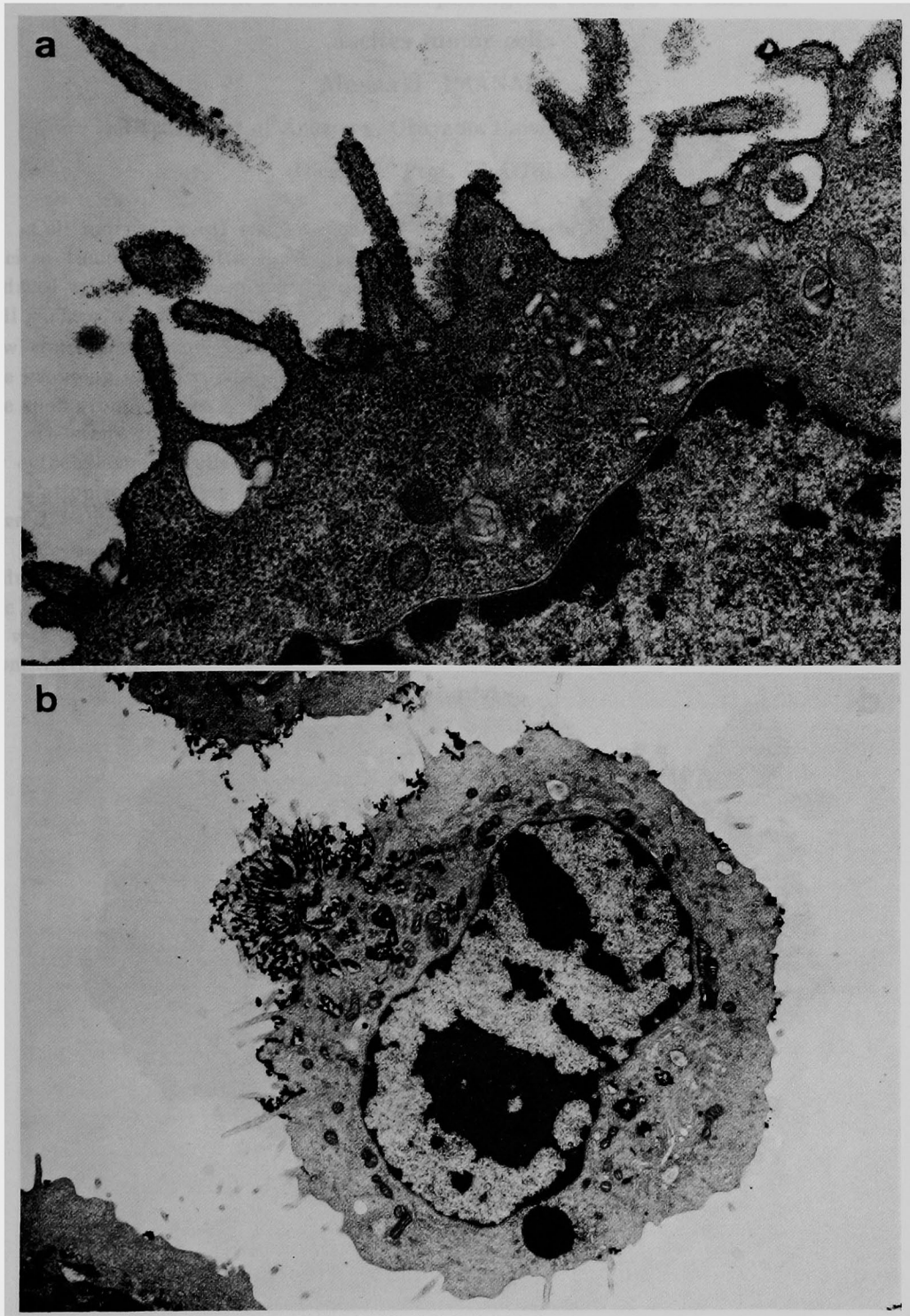


写真 6 .

今 中 雅 章 論 文 附 図

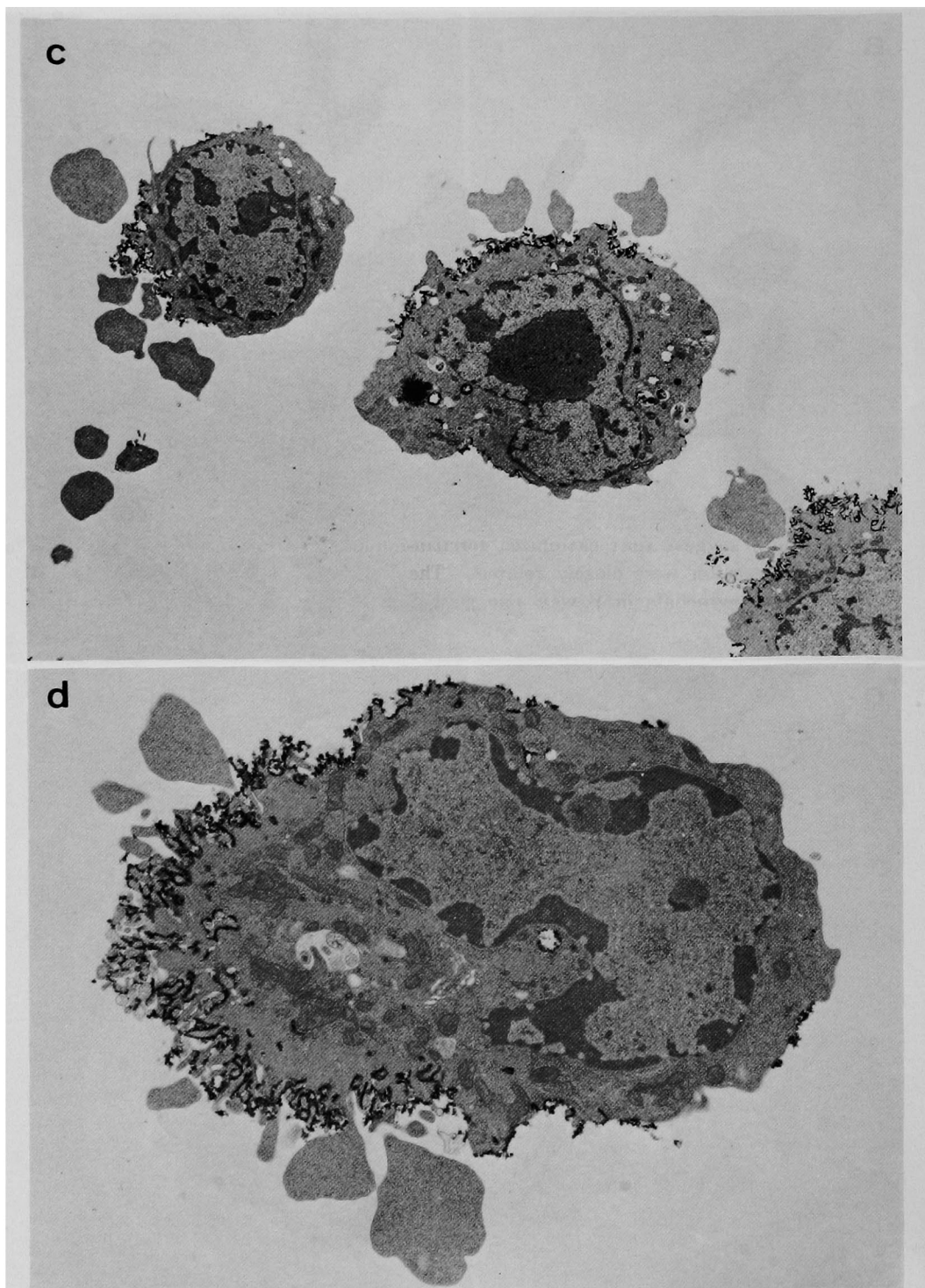


写真 6 .

**Cytochalasin B-induced morphological changes of Ehrlich
ascites tumor cells**

Masaaki IMANAKA

Department of Anatomy, Okayama University Medical School.

(Director: Prof. N. OTSUKA)

Cell morphological changes induced by cytochalasin B were investigated in Ehrlich ascites tumor cells with light and electron microscopes. Cytochalasin B (10 $\mu\text{g/ml}$) induced zeiotic knobs around the cell surface. These knobs gathered to one pole of the cell surface where cells were treated at 37°C for 10 min but not at low temperature and low concentration of cytochalasin B. The migration of knobs was concomitant with the grouping of microvilli and, as a result, the cell surface became smooth except for the knob grouping area.

To study the behavior of cell surface molecules during the knob formation induced by cytochalasin B, cells labeled with cationized ferritins were treated with cytochalasin B. Cationized ferritins themselves induced cap formation in these cells. Zeiotic knobs formed by cytochalasin B gathered at the cationized ferritin-induced cap area.

These results suggest that cationized ferritin-induced capping and cytochalasin B-induced knob migration were closely related. The linkage of cell surface molecules to the action site of cytochalasin B was also suggested. The action site of cytochalasin B was discussed in relation to the above results and in relation to experiments using Concanavalin A.