

メチル化ビタミン B<sub>12</sub> 存在下における  
培養株細胞の接着性亢進とその生化学的解析

指導教官 波利井清紀 教授

第三臨床医学専攻

平成3年4月1日入学

学生証番号 17375

北 愛 学 堂

①

メチル化ビタミンB<sub>12</sub>存在下における  
培養株細胞の接着性亢進とその生化学的解析

指導教官 波利井清紀

第三臨床医学専攻

平成3年4月1日入学

学生証番号17375

北野幸恵

## 目次

序論	3
方法	
1. 細胞培養	5
2. M m 2 T 細胞の形態観察	5
1) 位相差顕微鏡による観察	6
2) 透過型電子顕微鏡による観察	6
3. 細胞接着性の評価	
1) 浮遊細胞の計数	6
2) トリプシン処理への感受性	7
3) 細胞凝集形成度の評価	7
4. 蛋白質および脂質の定量	8
5. 糖添加による細胞凝集の変化	9
6. FITC-小麦胚芽レクチンによる細胞蛍光染色	10
7. 染色体分析	10
8. フローサイトメトリーによる細胞周期の解析	11
9. コントロールM m 2 T 細胞のクローニングおよび細胞 形態変化の誘導	11
結果	
1. 細胞形態の観察	
1) 位相差顕微鏡下での形態観察	12
2) 電子顕微鏡下での形態観察	13
2. 細胞接着性の評価	
1) 浮遊細胞の推移	13
2) トリプシンへの感受性	14
3) 凝集塊形成度の評価	14
3. 脂質分析の結果	15
4. 細胞間接着形成に対する糖の阻害作用	15
5. 蛍光WGAによる細胞染色	16

6. 染色体分析	16
7. フローサイトメトリーによる細胞周期の分析	16
8. クローニングした細胞におけるメチルB <sub>12</sub> 作用の誘導	
9. 神経芽細胞腫株細胞への影響	17
考察	17
まとめ	22
謝辞	24
文献	25
図表	29

## 序論

ヒトの生体内に存在するビタミン $B_{12}$ の主要形態は補酵素型 $B_{12}$ 、すなわちアデノシル化ビタミン $B_{12}$ とメチル化ビタミン $B_{12}$ （メチル $B_{12}$ ）である。このうちメチル $B_{12}$ は、悪性貧血、巨赤芽球性貧血、メチルマロン酸尿、ホモシステイン尿、末梢神経障害、不妊症などのビタミン $B_{12}$ 欠乏症に対する治療薬として汎用されている。また、最近ではメチル $B_{12}$ の新しい作用として胎児の神経発生誘導作用<sup>1-7)</sup>や睡眠障害の改善作用<sup>8-9)</sup>、発癌予防効果などが話題になっている<sup>1)</sup>。メチル $B_{12}$ の作用機序としては、現在、コバラミンに結合したメチル基の転移作用によるメチオニン生成、メタン合成および核酸代謝への関与などが知られているものの<sup>10-11)</sup>、メチル $B_{12}$ の多様な作用とその代謝経路はいまだ十分解明されていない。

インドホエジカ培養胸腺細胞株Mm2Tは、1977年勝田・高岡らによって樹立されて以来、哺乳類でもっとも少ない6本の染色体を持ち続けるユニークな細胞であり<sup>12)</sup>、近年、高岡らによってMm2Tに対する一連の薬剤効果の研究が行われてきた。高岡らは、その研究の課程でMm2T細胞に対する高濃度のメチル $B_{12}$ の影響を位相差顕微鏡下に観察したところ、メチル $B_{12}$ 投与後約3カ月後に細胞形態の変化を発見した<sup>13)</sup>。すなわち、個々の細胞はより平坦な形態を呈し、かつ、細胞浮遊現象が見られなくなるという現象が観察された。これらの変化はメチル $B_{12}$ が細胞接着性の亢進に関与することを推察させるものであった。

メチル $B_{12}$ の培養上皮細胞に対するこのような形態変化の作用は未だ報告されたことがなく、メチル $B_{12}$ 投与によるこの細胞形態変化の生化学的背景を明らかにすることは、メチル $B_{12}$ の作用機序を解明し、かつ、メチル $B_{12}$ の創傷治療や細胞

分化誘導作用などの分野での新しい利用の可能性を拓くために有用と考えられた。本研究においてはメチルB<sub>12</sub>投与によるMm2T細胞の形態変化と2価イオンの関係を詳細に観察し、それをもとにトリプシン処理への感受性および凝集形成度の評価から物理的な接着性を比較することにより、メチルB<sub>12</sub>処理細胞における接着性亢進を確認した。また、細胞膜の脂質の組成変化を分析した結果、細胞表面のグルコースの増加が予測されたため、培地にグルコースを添加することでグルコースの細胞接着への関与を確認した。また、細胞をクローニングし、短期間で変化を誘導した。

## 方法

### 1. 細胞培養

メチルB<sub>12</sub>未添加のMm 2 T細胞をコントロール細胞、メチルB<sub>12</sub>処理によって細胞形態が変化したMm 2 T細胞をメチルB<sub>12</sub>処理細胞と略称する。コントロールおよびメチルB<sub>12</sub>処理細胞は高岡氏より供与された。コントロールMm 2 T細胞の培養に用いた基本培地は、DM160（極東製薬）に2% fetal bovine serum、100mg/l Kanamycin（明治製薬）、1.0g/l NaHCO<sub>3</sub>を添加したものである。メチルB<sub>12</sub>処理細胞に対しては、基本培地にメチルB<sub>12</sub>（エーザイ製薬）を最終濃度10mg/lで添加した培地で培養した。培養容器はFalcon社プラスチックシャーレ及びプラスチックフラスコを用い、37°C、5%CO<sub>2</sub>の培養環境のもとに細胞培養を行った。継代は、ラバーポリスマンを用いて細胞を培養皿から剥離後にピペッティングし、1x10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>の細胞濃度で播種することによって行った。継代の翌日に第1回目の培地交換を行い、2回目以降の培地交換は3日おきに行った。

また、神経芽細胞腫株細胞TGW<sup>363</sup>をメチルB<sub>12</sub> 100mg/lを含む無血清培地DM201（極東製薬）で培養し、形態変化を観察した。

### 2. Mm 2 T細胞の形態観察

#### 1) 位相差顕微鏡による観察

コントロールおよびメチルB<sub>12</sub>処理細胞はともに接着阻止がかからず、コンフルエントになったあとでも増殖を続ける細胞であるが、これら両細胞の細胞培養過程での形態を詳細に位相差顕微鏡によって観察した。

また、EDTA添加によって細胞形態に対する2価イオンの影響を観察した。直径6.0cmプラスチック培養皿にコンフルエントになるまで培養されたコントロールおよびメチルB<sub>12</sub>処理細胞をそれぞれ2皿ずつ用意し、培地を除去し、PBSで洗浄したのちに1皿には1.8mM CaCl<sub>2</sub>を含むHanks'液と10mM N-2-Hydroxylpiperazine-ethan-sulfonic acid(HEPES), もう一皿には0.02% Ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA)を含むHanks'液と10mM HEPESを加えた。これらを室温で10分間処理した後に細胞形態を位相差顕微鏡下に観察した。

さらに、メチルB<sub>12</sub>添加によって形態が変化した細胞の培地をメチルB<sub>12</sub>未添加培地に替え、メチルB<sub>12</sub>未添加状態で培養を行った。

## 2) 透過型電子顕微鏡による観察

コンフルエント状態におけるコントロール及びメチルB<sub>12</sub>処理細胞を40mM磷酸バッファ(pH7.2)、2.5%グルタルアルデヒド、1.6%パラホルムアルデヒド混合液で固定した。固定後の細胞を2%四酸化オスミウムで固定し、脱水後、Epon812に包埋、マイクログラム(MT-2, Porter Blum)でプラスチックシャーレを含めて80nmに薄切し、酢酸鉛とウラン酸で染色し、透過型電子顕微鏡(H-7000, 日立)で観察した。

## 3. 細胞接着性の評価

### 1) 浮遊細胞の計数

コントロールおよびメチルB<sub>12</sub>処理細胞の培養過程で、2回目以降の培地交換ごとに培地に浮遊している細胞を遠心して集め、浮遊細胞として計数した。



## 2) トリプシン処理への感受性

$2 \times 10^5$ 個のコントロールおよびメチル $B_{12}$ 処理細胞を24穴マルチウェル (Falcon社) の6穴それぞれに播種し、2日間培養、これを0.25%トリプシン/PBS(Difco, 1:250)で洗浄後、同液中で37°C処理し、シャーレから剥離した細胞数を5、15、25および35分後に計数した。

## 3) 細胞凝集塊形成度の評価

コントロール及びメチル $B_{12}$ 処理細胞の培養課程では常に次の現象が観察された。すなわち、継代の際、ラバーポリスマンを用いて細胞皿から剥離したときに、コントロール細胞は個々の細胞がばらばらの状態で剥離されるのに対し、メチル $B_{12}$ 処理細胞では細胞どうしがお互いに接着して大きな凝集塊を形成した状態で剥離された。そこで細胞剥離時の凝集状態を評価し、加えてカルシウムイオンの細胞凝集に対する影響を評価することを目的に以下の細胞凝集実験を行った(Fig. 1)。

直径6.0cmのプラスチック培養皿に細胞密集状態まで培養されたコントロール及びメチル $B_{12}$ 処理細胞を用意し、次の3通りの処理を行った。(A)コントロール及びメチル $B_{12}$ 処理細胞の培地を3mlの無血清培地(基本培地よりFBSを除いたもの)で置換し、室温で20分間静置した後細胞をラバーポリスマンで剥離した。(B)コントロール及びメチル $B_{12}$ 処理細胞を3mlの0.02%EDTA/ $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ 不含PBS(PBS(-))で置換し、室温で20分静置したのちにラバーポリスマンで剥離した。(C)メチル $B_{12}$ 処理Mm2T細胞を(B)と同様に0.02%EDTA/PBS(-)で20分間処理した後に、3mlの無血清培地で置換し、37°Cで2時間静置し、ラバーポリスマンで剥離した。つぎに(A),(B),(C)で得られた細胞浮遊液をBurkel-Turk血球計数盤上で観察し、細胞凝集塊をその構成する細胞数によって分類し、計数した(凝集

塊の分類はMichael等の方法に準じて行った<sup>14)</sup>。凝集塊は次のように分類した。1) 凝集しない single cell。2) 2-10個の細胞で構成される小凝集塊。3) 11個以上の細胞で構成される凝集塊。4) 100個以上の細胞で構成される巨大凝集塊。各分類の凝集塊数を総凝集塊数に対する割合によって細胞間の接着性を比較した。各実験はそれぞれ3回行った。

#### 4. 蛋白質及び脂質の定量

コントロール及びメチルB<sub>12</sub>処理細胞(5×10<sup>8</sup>個)をPBS(-)で3回洗浄し、ラバーポリスマンで剥離した後にこれをポリトロンホモゲナイザー(Kinematika社)で破碎した。蛋白質定量は、Bradford法によって行った<sup>14)</sup>。破碎した細胞試料は凍結乾燥し、乾燥重量を求めた後に粗脂質を抽出した。抽出溶媒は、クロロホルム:メタノール:水を20:10:1(1.5ml)、10:20:1(1.5ml)、20:10:1(1.0ml)、10:20:1(1.0ml)の割合でこの順で用い、40°C、20分加熱処理することによって抽出した。全抽出液を合わせ、クロロホルム:メタノール、1:1を加えて正確に6mlに調整した。遊離コレステロール量測定のために、200μgの粗抽出液を20μgの5-α-cholestaneと混合し、50μlのpyridine-hexa-methylidisilazane-trimethylchlorosilane混合液で処理した。これをガス液体クロマトグラフィーで分析し、コレステロールのpeak areaを自動積分機で計算した(R-CIA、島津)。脂溶性リン量はHClO<sub>4</sub>とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で酸化した後、Bartlett法<sup>15)</sup>を用いて測定した。リン脂質の構成は、薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いて、クロロホルム:メタノール:水、65:35:8の展開溶媒で展開した後に酢酸銅-リン酸試薬で発色させ、濃度計で測定した。また、クロロホルム:メタノール:酢酸、95:1:5の溶媒を用いてセラミドの量を測定した。次に、中性と酸性の糖脂質を分離した。分離方法はSaito、Hakomoriらの方法<sup>16)</sup>に準じて行った。粗抽出液は5mlの

DEAE-Sephadexカラム (Pharmacia社) にかけて、3容のクロロホルム：メタノール。1：1、1容のメタノール、および5容の0.3M酢酸ナトリウム・メタノール、1：1で抽出した。このうち、中性脂質画分はクロロホルム：メタノール、1:1で抽出した画分に含まれるので、これをevaporatorを用いて乾燥させ、アセチル化によって中性糖脂質を分離し、Florisilカラムで分画したのちに脱アセチル化した。酸性糖脂質は、0.3M酢酸ナトリウム・メタノール溶液で抽出した分画に含まれるので、この分画液をケン化した。つぎに糖脂質および酸性糖脂質の構成をそれぞれ薄層クロマトグラフィーを用いて調べた。中性糖脂質の展開溶媒には、クロロフォルム：メタノール：水、65:35:8、酸性糖脂質の展開溶媒には、クロロフォルム：メタノール：水、55:45:10を用いた。糖脂質の発色には、オルシノール硫酸溶液を用い、420nmの波長で濃度計によって測定した。さらに、メチルB<sub>12</sub>処理細胞におけるceramide monohexoside(CMH)の糖鎖の種類を次の方法で調べた。まず、中性糖脂質画分を薄層クロマトグラフィー法でクロロフォルム：メタノール：水、65:35:8の展開溶媒を用いて展開し、CMHに相当する領域を薄層板から剥離した。単離した糖脂質の純度をTLCで確認した後、0.75M metanolic HClにて、100°C3時間でmetanolysis、さらに、脂肪酸メチルエステルをn-hexaneによって除去したのちに、糖組成をガス液体クロマトグラフィーで決定した<sup>1,7-18)</sup>。

#### 5. 糖添加による細胞凝集の変化

凝集塊評価実験に準じて実験と評価を行った。すなわち、直径6.0cmのプラスチックシャーレ上にコンフルエントになっているメチルB<sub>12</sub>処理Mm 2 T細胞を3mlの0.02% EDTA/PBS(-)で置換し、室温で20分放置した。EDTA処理によって細胞間が完全に解離したことを位相差顕微鏡で確認したのちに、単糖

および二糖類を高濃度に含む無血清培地で置換した。培地に添加した糖類は、50mM galactose, 50mM mannoseおよび50mM glucoseである。対象として、通常の組成の無血性培地で置換したメチルB<sub>12</sub>処理細胞も用意し、これらを37°Cで2時間処理した後ラバーポリスマンで剥離し、Burkel-Turk細胞計数板上で凝集塊を計数した。凝集塊の分類と評価は、前記の方法と同様に行った。

#### 6. FITC-小麦胚芽レクチンによる細胞蛍光染色

コントロールおよびメチルB<sub>12</sub>処理細胞を直径3.5cmのプラスチック培養皿にコンフルエント状態で用意し、3.5%パラフォルムアルデヒドを用いて4°Cで一晩固定した。固定液を除去後、0.5% Triton X-100, 0.1mM phenylmethyl sulphonyl-fluoride (PMSF), 50mM tris-HCl, pH7.2 の溶液中で4°C、

10分細胞を処理し、PBS(-)で50μg/mlに希釈したFITC-小麦胚芽レクチンWGA<sup>2,3), 2,4)</sup>によって4°C、20分染色した後、蛍光顕微鏡(Zeiss)で、励起光波長610nmにて観察した<sup>2,5)</sup>。

#### 7. 染色体分析

コントロールおよびメチルB<sub>12</sub>処理Mm 2 Tの直径3.5cmのプラスチック培養皿にそれぞれコルセミドを0.1μg/mlになるように加え、培養を続けた。2時間後、細胞をラバーポリスマンで集めて遠沈し培地を除いた後、1%クエン酸ナトリウム溶液を加えて30分、室温にて低張処理をした。等量の固定液(メタノール:酢酸, 1:1)を加え、30分間静置した後に遠沈し、再び固定液を加えた。このような固定操作を3回くりかえしたのちに、固定液に浮遊した細胞を50%エタノールを浸したスライドグラスに滴下して乾燥させ、ギムザ液で10分染色・水洗・風乾後封入後、光学顕微鏡で観察した(400倍)<sup>1,9)</sup>。

## 8. フローサイトメトリーによる細胞周期の解析

試料はコンフルエント状態まで培養したコントロール及びメチルB<sub>12</sub>処理細胞を用いた。培養液を0.02%EDTA/PBS(-)溶液で置換し、室温で20分静置して細胞間が解離したことを位相差顕微鏡で確認後、スクレーパーで剥離し遠沈して70%エタノールに懸濁し4°Cで一晩固定した後、遠沈してエタノールを除去し、細胞数が10<sup>8</sup>以上あることを確認した。さらに、細胞をクエン酸バッファートリプシン液(3.0mMクエン酸・1.5mMスペルミン・1.5mMトリリス・0.25% w/vトリプシン・0.1% NonidetP-40)に入れ、震とうしながら、37°Cで一晩処理した後、50μmメッシュを通して凝集した細胞を除いた。

次に、A液(0.03% w/v トリプシンの3.4mMクエン酸・1.5mMスペルミン溶液)、B液(0.05%w/vトリプシンインヒビター、

0.05%w/vリボヌクレアーゼAの3.4mMクエン酸・1.5mMスペルミン溶液)でそれぞれ10分間ずつ処理して細胞を裸核化し、C液(0.0416% Propidium Iodideの3.4mMクエン酸・1.5mMスペルミン溶液)で核染色した。このようにして分散・裸核化・染色された細胞試料はフローサイトメーター(FACScan, Becton Dickinson)にかけられ、細胞周期の核相の比率をコンピュータシステム(CellFIT Software, Becton Dickinson)で計算した<sup>20-22)</sup>。

## 9. コントロールMm2T細胞のクローニング及び細胞形態変化の誘導

メチルB<sub>12</sub>長期投与による細胞形態の変化が、メチルB<sub>12</sub>の clonal selection作用によるものか、あるいは、メチルB<sub>12</sub>が細胞膜の性質の変化を誘導したために起こったものであるかを判定するために、コントロール細胞をクローニングし、クローニングされた細胞に変化を誘導されるか否かを観察した。

クローニングは、単個希釈法によって行った。クローニングに用いる培地としては、M m 2 T細胞の単個からの増殖が活発なBSL-K100培地（極東製薬）+FBS10%を用いた。コントロール細胞を0.02%トリプシンで分散、BSL-K100培地+FBS10%で10個/mlに希釈した細胞浮遊液を、96穴マルチウェル（Microtest II tissue culture, フェルコン社）に100 $\mu$ lずつ注入し、翌日単一細胞であることを確認されたウェルをマークし、そのままクローニング用培地にて培養を続け、約10<sup>6</sup>個の均一な細胞を得た。このようにしてクローニングした5x10<sup>5</sup>個のM m 2 T細胞に対し100 $\mu$ g/mlのメチルB<sub>12</sub>を加えて培養をおこなった。細胞形態の変化は位相差顕微鏡で観察し、細胞接着性の変化をトリプシン処理で確認した。

## 結果

### 1. 細胞形態の観察

#### 1) 位相差顕微鏡下での形態観察

コントロールおよびメチルB<sub>12</sub>添加細胞の形態はコンフルエントになるまでは差が認められなかった。また、対数増殖期にある両細胞のdoubling timeはコントロール細胞が51.6時間、メチルB<sub>12</sub>処理細胞が57.5時間と差はなかった。両細胞の形態の違いはコンフルエントになった後に著明に観察された。コンフルエントになった後のコントロール細胞では細胞と細胞の間の透光度が高く、細胞中央部が暗調の、全体としてコントラストが強い細胞像を呈したが、メチルB<sub>12</sub>処理細胞は全体に中間的な色調で、コントラストが少ない細胞像が観察された（Fig. 2, a, b）。

また、コンフルエントになったあとの細胞増殖の仕方にも大きな違いが見いだされた。コントロールM m 2 Tではコン

フルエントになった後に増殖した細胞は培養皿を遊離して培養液中へ浮遊する。これらの浮遊細胞は新しい培養皿に移されると培養皿に接着して増殖した。一方、メチル  $B_{12}$  処理細胞はコンフルエントに達したあとほぼ全ての細胞が培養皿に接着した状態で増殖を続け、培養液中に浮遊する細胞はほとんど観察されなかった。メチル  $B_{12}$  処理細胞の培養皿では、コンフルエントになった後に増殖する細胞が次第に密に詰まるようになり、個々の細胞が占める面積が小さくなっていくように見えた。

さらに、EDTA処理による細胞の形態変化を位相差顕微鏡下に観察したところ、処理後20分でメチル  $B_{12}$  処理細胞の個々の細胞間に隙間ができるようになった (Fig. 2, c)。

メチル  $B_{12}$  処理によって形態が変化した細胞を、メチル  $B_{12}$  未添加培地で培養し続けたところ、最長1カ月の培養によってももとの形態を有する細胞は出現しなかった。

## 2) 電子顕微鏡下での形態観察

透過型電子顕微鏡では次のような細胞像が観察された。コントロール細胞は培養皿を底とする半球状の形態を呈しており、隣接細胞との接触は発達していないのに対し、メチル  $B_{12}$  処理細胞は培養液との境界が直線的で、隣接細胞との接着面積は広く、細胞間接着装置も発達していた (Fig. 3)。

## 2. 細胞接着性の評価

### 1) 浮遊細胞の推移

コントロールおよびメチル  $B_{12}$  処理細胞の浮遊細胞をそれぞれ集め、継代後に浮遊してくる細胞の累計を調べた結果、コントロール細胞では浮遊細胞が指数関数的に増えたのに対し、

メチルB<sub>12</sub>処理細胞では殆ど浮遊細胞が出現しなかった(Fig. 4)。

## 2) トリプシンへの感受性

0.25%トリプシン/PBS(-)に対する反応性を比較したところ、トリプシン処理5分でコントロール細胞はほとんど剥離したのに対し、メチルB<sub>12</sub>処理細胞は培養皿に接着したままであった(Fig. 5)。

## 3) 凝集塊形成度の評価

凝集塊形成実験の結果をFig. 6に示した。コントロール細胞は、EDTA処理の有無にかかわらず、単一細胞の比率が90%以上と非常に高く、凝集塊の比率はわずかであった。一方メチルB<sub>12</sub>処理細胞では、EDTA処理を受けない場合には細胞が凝集し、巨大凝集塊が形成され、単一細胞の比率が58.8%と低くなったが、EDTA処理後はこのような凝集塊のほとんどが消失し、単一細胞として剥離される細胞の比率が高くなった。この結果から、メチルB<sub>12</sub>処理細胞では細胞間接着性が高まっていること、及び、メチルB<sub>12</sub>処理細胞の細胞間接着はカルシウムイオンを除去することによって解離するということが示唆された。

さらに、EDTA処理によって細胞間が解離していたメチルB<sub>12</sub>処理細胞をCa<sup>2+</sup>が通常濃度で含まれる無血清培地中で2時間培養したところ、100個以上の細胞で構成される巨大細胞塊が出現するようになり、局所的な細胞間結合の回復が推察された。このことからカルシウムによる細胞間接着形成作用が可逆的であることがわかった。



## 5. 蛍光WGAによる細胞染色

メチルB<sub>12</sub>処理細胞の細胞表面はFITC-WGAによって明瞭に染色されたが、コントロール細胞の細胞表面は染色されなかった(Fig. 9)。

## 6. 染色体分析

Mm 2 T細胞の由来であるインドホエジカ生体の染色体数は6本である。コントロール細胞85個、メチルB<sub>12</sub>処理細胞87個についてそれぞれ染色体数を算定しその分布を調べた。双方とも染色体数の最頻値は生体内の細胞と同じく6本であるが、6本の染色体を有する細胞の頻度は、コントロール細胞が62%、メチルB<sub>12</sub>処理細胞が84%であり、メチルB<sub>12</sub>処理細胞の方が生体内と同数の染色体を持つ細胞の割合が高かった。Fig. 10はコントロールおよびメチルB<sub>12</sub>処理Mm 2 Tより無作為的に抽出した細胞の染色体像である。いずれも正常2倍体ではなく、様々な染色体異常が見られたが、コントロール細胞のほうがより多彩な染色体異常を呈しており、メチルB<sub>12</sub>処理細胞の染色体異常の程度の方が小さかった。

## 7. フローサイトメトリーによる細胞周期の分析

フローサイトメトリーの結果をFig. 11に示した。CV値は、コントロール細胞が7.4、メチルB<sub>12</sub>処理Mm 2 T細胞が6.0であった。それぞれの細胞周期の比率は、コントロール細胞では、G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>期が28.4%、S期が42.1%、G<sub>2</sub>+M期が29.5%、メチルB<sub>12</sub>処理細胞ではG<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>期が69.5%、S期が11.9%、G<sub>2</sub>+M期が18.6%であった。

## 8. クローニングした細胞におけるメチルB<sub>12</sub>作用の誘導

単個希釈法によってクローン化されたコントロールMm2T細胞に対して、これまでの10倍濃度の100 $\mu$ g/mlメチルB<sub>12</sub>を加えて培養したところ、21日目に、典型的なメチルB<sub>12</sub>処置細胞と同様な形態を有する平坦な細胞群が出現し、次第に増殖していった。この新たに生じた平坦な細胞群はトリプシン耐性を獲得していることが確認された(Fig. 12, a, b, c, d)。また、コントロール細胞は元来contact inhibitionがかからない細胞であるが、100 $\mu$ g/mlメチルB<sub>12</sub>を添加して培養すると、形態変化が発現していない細胞はcontact inhibitionを起こして培養皿より遊離するようになり、接着性亢進が発現された細胞のみが培養皿に残って増殖を続けるようになった。なお、コンフルエントになるまでの細胞増殖はメチルB<sub>12</sub>添加と無添加で差は見られなかった。

## 9. 神経芽細胞腫株細胞への影響

神経芽細胞腫TGWをメチルB<sub>12</sub>存在下で培養したところ、14日後より次第に細胞集塊を形成し、神経突起形成が抑制されるようになった。さらに2か月後には細胞凝集が解除され、枝分かれした細胞突起を長くのばすneuronal phenotypeを示す細胞に変化した。

## 考察

本研究においてメチルB<sub>12</sub>投与によって新たに観察された細胞形態変化を各種の方法を用いて詳細に調べ、形態変化の機構およびその生化学的背景をある程度まで明らかにした。

形態的には、透過型電子顕微鏡所見からメチルB<sub>12</sub>処理細胞は隣接細胞との間に広い接着面と多くの細胞間接着装置を有

することがわかった。また、EDTAを添加した後に細胞間が解離することから、細胞間接着は2価イオン依存性であることが示唆された。

物理的な接着力という点からは、メチルB<sub>12</sub>処理細胞は、細胞と細胞間および細胞とシャーレとの間の双方で接着性が亢進していることがわかった。

細胞とシャーレの間の接着に関しては、メチルB<sub>12</sub>処理によって細胞とプラスチックシャーレとの接着がトリプシンによって剥離されにくくなるという結果が得られた。メチルB<sub>12</sub>処理細胞では細胞とシャーレの間に何らかの細胞接着物質が増加した結果トリプシン耐性を獲得し、細胞とシャーレの間の結合力が亢進していると考えられた。細胞とシャーレの間に介在する可能性のある接着物質としては、ファイブロネクチン、ラミニン、コラーゲンI型およびIV型などの関与が考えられる。本研究では、シャーレに培養された状態の細胞の細胞体をデオキシコール酸で剥離し、シャーレに残存する物質をSDSポリアクリルアミド電気泳動で調べたところ、200kD付近にバンドを持ち、PAS陽性を示す糖タンパク質がメチルB<sub>12</sub>処理細胞に大量に認められた（未発表データ）。細胞-シャーレ間の接着亢進の原因となる物質として今後研究を進める予定である。

一方、透過型電子顕微鏡所見からメチルB<sub>12</sub>処理細胞の細胞間接着が発達していることが示唆され、メチルB<sub>12</sub>処理細胞における細胞間結合力の亢進が予測された。細胞凝集試験の結果はこの予測を支持するものであった。すなわち、メチルB<sub>12</sub>処理細胞が細胞剥離時に単一細胞となりにくいことから、コントロール細胞よりもはるかに強い細胞間結合力を獲得していると考えられた。この細胞間結合はカルシウム依存性であり、EDTA添加によって解離し、カルシウム含有培地添加によって再結合するという可逆性を有していた。また、WGAはN-アセチルノイラミン酸およびN-アセチルグルコサミンを有す

る 複合糖質に特異的に結合するレクチンであるが、今回メチル $B_{12}$ 処理 Mm 2 T 表面には WGA 結合性の複合糖質が大量に存在していることが示され、メチル $B_{12}$ 処理細胞に発達している細胞間接着に WGA 結合性複合糖質が関与していることが予測された。

以上の実験結果から、メチル $B_{12}$ 処理細胞の細胞膜に接着性が亢進するような変化が起きていると考えられ、そこで細胞膜の主要成分である脂質の組成を分析したところ、メチル $B_{12}$ 処理細胞では細胞表面のグルコシルセラミドがコントロール細胞の約8倍に増加していることがわかった。また、培地中の遊離グルコースがメチル $B_{12}$ 処理細胞の細胞間接着再形成を阻害することから、細胞表面のグルコースが細胞接着性の亢進に関与していることが示唆された。

カルシウムイオンが関与する細胞接着因子として、cadherin, L-CAM, A-CAM、C-type lectinなどが知られているが<sup>23-28)</sup>メチル $B_{12}$ によって Mm 2 T 細胞に誘導された接着機構は、細胞膜におけるグルコシルセラミドの増加および遊離グルコースによる接着阻害現象から、 $Ca^{2+}$ 依存性に蛋白質と結合する C-type lectin による接着であることが示唆された<sup>29-35)</sup>。さらに、メチル $B_{12}$ 処理細胞表面における WGA 結合性複合糖質の著明な増加から、C-typeレクチンが WGA 結合性の性質を持つことが予測され、今後この接着物質を同定してゆく上で WGA がマーカーとして有用であると思われる。

メチル $B_{12}$ 添加によるこれらの変化は、はじめメチル $B_{12}$ 添加後3か月後の形態変化として発見されたが、この段階では、メチル $B_{12}$ の作用が接着性細胞選択作用であるのか、細胞膜の組成変化による接着性誘導作用であるのかは不明であった。本研究では細胞をクローニングし、さらに  $100 \mu\text{g/ml}$  のメチル $B_{12}$ を投与して短期間で細胞形態を発現することにより、メチル $B_{12}$ の作用は細胞膜の組成変化による接着性の誘導作用であることを証明した。

本研究では、細胞の形態変化とトリプシン処理への抵抗性をマーカーとしてメチル $B_{12}$ の接着性亢進効果を追求したが、これらの変化が発現されるまでには、 $10 \mu\text{g/ml}$ のメチル $B_{12}$ 投与では3カ月、 $100 \mu\text{g/ml}$ のメチル $B_{12}$ 投与では21日と比較的長期間の投与が必要であった。おそらくメチル $B_{12}$ 投与による接着性の変化として発現されるまでには時間がかかるものの、細胞内の変化はもっと早期に起こると思われる。メチル $B_{12}$ 添加によって惹起される糖タンパク質の代謝変化の追跡が必要になる。

一方、染色体分析およびフローサイトメトリーによる細胞周期解析の結果は、メチル $B_{12}$ の臨床上の作用を考慮する上で参考になるものと思われた。Mm 2 Tは元来がん細胞ではないが、細胞株として樹立された時点より染色体変異が観察されており、一種の試験管内悪性化をおこした結果株化したものと考えられている。ところがメチル $B_{12}$ 処理されたMm 2 T細胞では、染色体変異の程度が低くなり、生体内と同じ本数の染色体を有する細胞の比率が高くなった。すなわち、メチル $B_{12}$ 処理によって染色体像は生体細胞の染色体像と類似した像を示すようになったといえる。また、フローサイトメトリーによる細胞周期の解析では、コントロール細胞ではS期および $G_2$ +M期細胞が増加し、あたかも悪性腫瘍のようなDNA量分布を示すのに対し、メチル $B_{12}$ 処理細胞では $G_0$ + $G_1$ 期細胞が増加、 $G_2$ +S期細胞が減少し、正常細胞におけるDNA量分布と類似した細胞周期像を示した。これらの結果から、メチル $B_{12}$ が $G_0$ + $G_1$ 期からS期への移行阻止作用を有することが推察された。メチル $B_{12}$ の細胞正常化作用は、contact inhibitionの誘導現象でも示された。これらの結果は、最近のビタミン $B_{12}$ の発癌予防効果の報告と考え合わせると、興味深い現象であると思われる。

メチル $B_{12}$ と細胞形態変化の関係としては、悪性貧血の巨赤芽球があまりにも有名であるが、メチル $B_{12}$ 欠乏にともなう代

謝異常の説明として有力視されている methyltetrahydrofolate trap hypothesis<sup>40)</sup>も十分に形態変化の機序を説明するとは言えない。一方、悪性貧血における赤芽球巨大化にもなってDNA複製遅延とS期細胞の増加が見られるとの報告は、本研究の形態変化と細胞周期の変化の関連と類似しているという点で興味深いことからであると思われる<sup>40)</sup>。

Phohl-Lescowicz等は0.01-1 $\mu$ Mの濃度のメチルB<sub>12</sub>投与はDNAのメチル化を促進するが、5 $\mu$ M以上の濃度のメチルB<sub>12</sub>投与では逆にDNAメチル化は阻害されると報告している<sup>41)</sup>。彼らの報告に準じて本研究の現象を解釈すると、本研究で用いたメチルB<sub>12</sub>濃度(約7 $\mu$ Mおよび70 $\mu$ M)ではDNAの脱メチル化が起こり、遺伝子読みとりが活発化し、接着タンパク質をはじめとする分子の合成が促進されているとも考えられる。

また、今回の実験とおなじ100 $\mu$ g/mlのメチルB<sub>12</sub>存在下の培養が他の細胞系に与える影響を数種類の培養株細胞に対して調べたところ、メチルB<sub>12</sub>存在下の神経芽細胞腫株細胞TGWの凝集が14日目に観察され、2カ月後には神経突起の著明な延長が観察された。これらの観察から、TGWにおいても細胞接着物質の産生亢進が起きていることが推察された。TGWにおける現象の生化学的背景は現在研究中であるが、メチルB<sub>12</sub>による細胞膜の変化が複数の細胞系に観察されたことは、メチルB<sub>12</sub>の作用が広範囲の細胞系に起こる可能性があることを示唆するものと思われる。

本研究のMm 2 TにおけるメチルB<sub>12</sub>の作用機序は今のところ明らかではないが、今後、WGAなどをマーカーにしてCRDタンパク質を同定・精製をすることなどにより、メチルB<sub>12</sub>による初期変化を研究し、作用機序を明らかにすることは、メチルB<sub>12</sub>の生物学的な役割を探求し、臨床での可能性を広げる上で大きく貢献するものと思われる。

## まとめ

本研究では、高濃度メチルB<sub>12</sub>投与による細胞形態の変化を詳細に観察し、細胞形態変化の生化学的背景を分析した。以下、得られた結果を列挙する。

### 1. 細胞形態の変化

- 1) コントロール細胞はコントラストの強い細胞像を呈し、浮遊細胞を多数産生するが、メチルB<sub>12</sub>処理細胞はコントラストが低い細胞像を呈し、浮遊細胞産生が抑制されていた。
- 2) メチルB<sub>12</sub>処理細胞では隣接細胞との接着面が広く、細胞間接着装置が発達していた。
- 3) メチルB<sub>12</sub>処理細胞の細胞間結合は2価イオン依存性であった。

### 2. 細胞接着性の評価

- 1) メチルB<sub>12</sub>処理細胞はトリプシン耐性を獲得し、細胞とシャーレの間の接着性亢進が見られた。
- 2) メチルB<sub>12</sub>処理細胞で亢進していた細胞間接着は2価イオン依存性であった。
- 3) メチルB<sub>12</sub>の細胞間接着形成は培地中のグルコースによって阻害された。

### 3. 脂質分析

メチルB<sub>12</sub>処理細胞では、コレステロール、リン脂質、GM3の含有量に変化がみられないにもかかわらず、トリグリセリド、セラミド、およびCMHの含有量が増加しており、特に、CMHの量はコントロールの8倍量を示した。CMHの糖鎖はグルコースであった。

#### 4. FITC-WGA染色

FITC-WGAによってメチルB<sub>12</sub>処理細胞の細胞表面はコントロール細胞の細胞表面よりも強く染色された。

#### 5. 染色体分析

染色体数が生体細胞の染色体数と同じ6本である確率はコントロール細胞が62%、メチルB<sub>12</sub>細胞が84%であった。

#### 6. フローサイトメトリーによる細胞周期解析

コントロール細胞はS期細胞が増加していたが、メチルB<sub>12</sub>処理細胞ではG1+G0期細胞の増加とS期細胞の減少が見られた。

#### 7. クローニングと形態変化誘導

メチルB<sub>12</sub>投与によって起こった現象がclonal selectionの結果起こったものであるのか、inductionの結果起こったものであるのかを見きわめるために、コントロール細胞をクローニングして、クローニングされた細胞にメチルB<sub>12</sub>を100 μg/mlの濃度で投与したところ、同様な形態変化が誘導された。

#### 8. 他細胞系でのメチルB<sub>12</sub>投与による形態変化

神経芽細胞腫細胞株においてもメチルB<sub>12</sub>投与によって形態変化が観察された。

以上、メチルB<sub>12</sub>投与による細胞形態変化が細胞接着性亢進に起因することがわかり、接着性糖タンパク質の増加あるいは、C-typeレクチンの増加が予想された。また、メチルB<sub>12</sub>の作用として、細胞の正常化作用を伴うことがわかった。今後メチルB<sub>12</sub>投与によって惹起された糖タンパク質の代謝変化をしてゆくことは、未だ不明な点の多いメチルB<sub>12</sub>の作



用機序の解明に貢献するものと思われる。

#### 謝 辞

本研究に当たり、懇切なるご指導ご鞭撻を賜りました東京大学医学部形成外科教室主任 波利井清紀教授に深く感謝いたします。また、直接に懇切なるご指導を賜りました東京大学医学部第二生化学教室岩森正男助教授に甚大なる感謝の意を表します。

培養細胞をご提供頂き、細胞培養手技のご指導を賜りました高岡聡子先生、電子顕微鏡撮影にご協力を頂きました福田実先生に深く感謝の辞を表します。

## 参考文献

1. P. N. Kirke, A. M. Molloy, L. E. Daly, H. Burke, D. G. Weir and J. M. Scott: Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Quarterly J. Medicine* 86: 703-11, 1993
2. P. N. Mooij, T. R. Steegers, C. M. Thomas, W. H. Doesburg and T. K., Eskes: Periconceptual vitamin profiles are not suitable for identifying women at risk for neural tube defects. *J. Nutrition* 123: 197-203, 1993
3. C. J. Schorah, N. Habibzadeh, J. Wild, R. W. Smithells, M. J. Sella: Possible abnormalities of folate and vitamin B12 metabolism associated with neural tube defects. *Annals of the New York Academy of Sciences* 678: 81-91, 1993
4. J. Wild, C. J., Schorah, T. A. Sheldon, and R. W. Smithells. Investigation of factors influencing folate status in women who have had a neural tube defect-affected infant. *British J. Obstetrics & Gynaecology* 100: 546-9, 1993
5. Weekes, E. W., Tamura, T., Davis, R. O., Birch, R., Vaugan, W. H., Franklin, J. C., Barganier, C., Cosper, P., Finley, S. C., and Finlay, W. H.: Nutrient levels in amniotic fluid from women with normal and neural tube defect pregnancies. *Body of the Neonate* 61: 226-31, 1992
6. D. L. Economides, J. Ferguson, I. Z. Mackenzie, J. Darley, I. I. Ware and S. M. Holmes: Folate and vitamin B12 concentration in maternal and fetal blood, and amniotic fluid in second trimester pregnancies complicated by neural tube defects. *British J. Obstetrics & Gynecology* 99: 23-5, 1992
7. F. B. Essien and S. L. Wannberg: Methionin but not folic acid or vitamin B12 alters the frequency of neural tube defects in Axed mutant mice. *J Nutrition* 123: 27-34, 1993
8. M. Kubota, M. Shinozaki, H. Sasaki: Circadian rhythm disturbance after radiotherapy for brain tumor in infantile period--clinical effect of L-thyroxine and vitamin B12. *Brain and Nerve* 45: 759-63, 1993
9. T. Ohta, T. Iwata, Y. Kayukawa and T. Okada : Daily activity and persistent sleep-wake schedule disorders. *Progress in Neuro Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 16: 529-37, 1992

10. M. Karasawa, H. Yamauchi, M. Omine and T. Maekawa: Methionine partially corrects the impaired DNA synthesis of B12-deficient megaloblastic bone marrow cells at low concentration. *Jap J. Med.* 25: 155-161, 1986
11. M. Karasawa, M. Yatabe, M. Omine and T. Maekawa: Growth and DNA synthesis of folate and methionine-dependent L1210 mouse leukemia cells in culture. *J. Nutr. Vitaminol.* 33: 21-30, 1987
12. T. Takaoka, M. Kasai and H. Katsuta: A cell line derived from the Indian muntjac thymus. *Dokkyo J. Med. Science* 9: 133-138, 1981
13. Personal Communication
14. M. M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochemistry* 72: 248-254, 1976
15. G. R. Bartlett: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234: 466-468, 1959
16. T. Saito and S. Hakomori: Quantitative isolation of total glycosphingolipids from animal cells. *J. Lipid Res.* 12: 257-239, 1971
17. M. Iwamori and H. W. Moser: Above-normal urinary excretion of urinary ceramides in Farber's disease and characterization of their components by high-performance liquid chromatography. *Clin. Chem* 21: 725-729, 1975
18. M. Iwamori, K. Sawada, Y. Hara, M. Nishio, T. Fujisawa, H. Imura and Y. Nagai: Neutral glycosphingolipids and gangliosides of bovine thyroid. *J. Biochem* 91: 1875-1887, 1982
19. T. H. Yoshida: Method for chromosome analysis in muridae, with special regards to the chromosomal polymorphism. *SABCO J.* 2: 1-7, 1974
20. A. Krishan: Rapid flow cytometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell. Biol.* 66: 188, 1975
21. L. L. Vindelov, I. J. Christensen and N. I. Nissen: A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 3: 323-327, 1983
22. H. Busch, K. S. Narayan and J. Hamilton: Isolation of nucleoli in a medium containing spermin and magnesium acetate. *Exp. Cell. Res* 47: 329-336, 1967

23. K. Tamaki, H. Hino, K. Ohara and N. Furue: Lectin-binding sites in Paget's disease *British J. Dermatology* 113: 17-24, 1985
24. K. Tamaki, M. Furue, A. Matsukawa, K. Ohara, M. Mizokuchi and H. Hino: Presence and distribution of carcinoembryonic antigen and lectin-binding sites in benign apocrine sweat gland tumors. *British J. Dermatology* 113: 565-571, 1985
25. M. Takeichi: Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J. Cell Biol.* 75: 464-474, 1977
26. M. Takeichi, T. Atsumi, C. Yoshida, K. Uno and T. S. Okada: Selective adhesion of embryonal carcinoma cells and differentiated cells with  $Ca^{2+}$ -dependent sites. *Developmental Biol.* 87: 340-350, 1981
27. C. Yoshida-Noro, N. Suzuki and M. Takeichi: Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody *Developmental Biol.* 101: 19-27, 1984
28. T. Volk and B. Geiger: A-CAM: A 135kD receptor of intercellular adherens junctions. I. Immunoelectron microscopic localization and biochemical studies. *J. Cell. Biol.* 103: 1441-1450, 1986
29. R. L. Hudgin, W. E. Pricer and G. Ashwell: The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins. *J. Biol. Chem.* 249: 5536-5543, 1974
30. K. B. Chiacchia and K. Drickamer: Direct evidence for the transmembrane orientation of the hepatic glycoprotein receptors. *J. Biol. Chem.* 259: 15440-15446, 1984
31. K. Drickamer: The distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* 263: 9557-9560, 1988
32. K. Kojima, H. K. Ogawa, S. Nobuko, Y. Kazuo, T. Irimura, O. Toshiaki and I. Matsumoto: Carbohydrate-binding proteins in bovine kidney have consensus amino acid sequences of annexin family proteins *J. Biol. Chem.* 267: 20536-20539, 1992
33. K. Kojima, H. K. Ogawa, N. Seno and I. Matsumoto: Affinity purification and affinity characterization of carbohydrate-binding proteins in bovine kidney. *J. Chromatography* 597: 323-

330, 1992

34. R. A. Child, J. R. Wright, G.F. Ross, Y. C. Ting, M. L. Alexander, C. Wengang K. Drickamer and T. Feizi: Specificity of lung surfactant protein SP-A for both the carbohydrate and the lipid moieties of certain neural glycolipids. *J. Biol. Chem.* 267: 9972-9979, 1992
35. K. Rust, L. Grosso, Z. Vvian, D. Chang, A. Persson, W. Longmore, G. Z. Cai and E. Crouch: Human surfactant protein protein SP-D contains a C- type lectin carbohydrate recognition domain. *Arch. Biochemistry and Biophysics* 290: 116-126, 1991
36. Y. Tsuchida, M. Sekiguchi, Y. Kaneo and N. Kanda: Origin of human neuroblastoma cell lines TGW and TNB1. *FEBS* 263: 191, 1990
37. S. Tsao, K. Miyashita and M. Young: Cytotoxic activity of cobalamin in cultured malignant nonmalignant cells. *Pathobiology* 58: 292-296, 1990
38. V. P. Lehto, T. Vartio, R. A. Badley and I. Virtanen: Characterization of a detergent-resistant surface lamina in cultured human fibroblasts. *Exp. Cell Research* 143: 287-294, 1986
39. K. Herbert and R. Zalusky: Interrelation of vitamin B12 and folic acid metabolism: folic acid clearance studies. *J. Clin. Invest* 41: 1263-1276, 1962
40. R. G. Wickremasinghe and A. V. Hoffbrand: Reduced rate of DNA replication fork movement in megaloblastic anemia. *J. Clin. Invest.* 65: 26-36, 1980
41. A. P. Leskiewicz, G. Keith and G. Pikheimer: Effect of cobalamin derivatives on in vitro enzymatic DNA methylation: methylcobalamin can act as a methyl donor. *Biochemistry* 30: 8045-8051, 1991
42. M. E. Charness, R. M. Safrans and G. Perides: Ethanol inhibits neural cell-cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 269: 9304-9309, 1994

Fig. 1 細胞凝集試験および阻害試験の手順

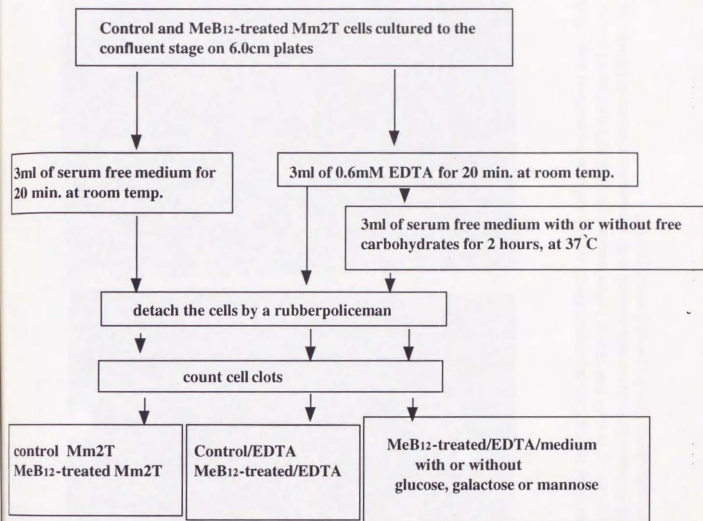
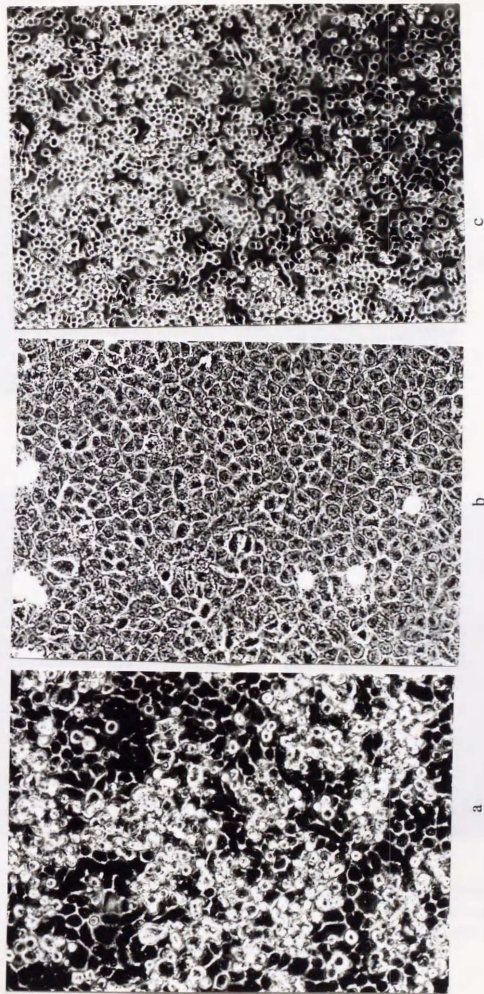
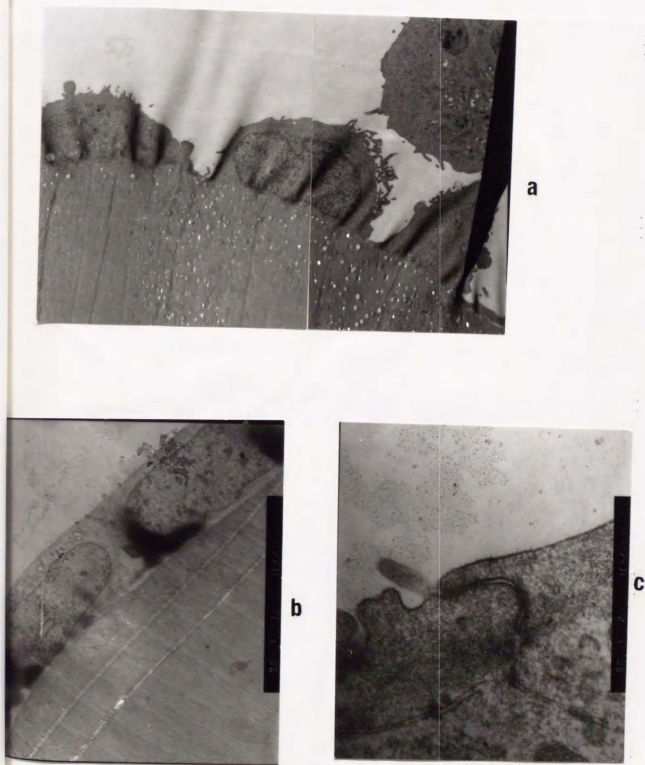


Fig. 2: 細胞の位相差顕微鏡像



Phase-contrast microscopic observation of the control (a) and the  $\text{CH}_3\text{-B}_{12}$ -treated Mm2T cells (b and c) at the confluent stage. Cells were washed with  $\text{Ca}^{2+}$ -containing Hank's buffer (a and b) or  $\text{Ca}^{2+}$ -free Hank's buffer containing 0.02% EDTA (c) for 15 min. at room temperature. Note the striking morphological difference between the cells cultured in the absence and presence of  $\text{CH}_3\text{-B}_{12}$  (a and b) and that EDTA treatment disrupted the cell-to-cell adhesion of  $\text{CH}_3\text{-B}_{12}$ -treated cells (c) (x100)

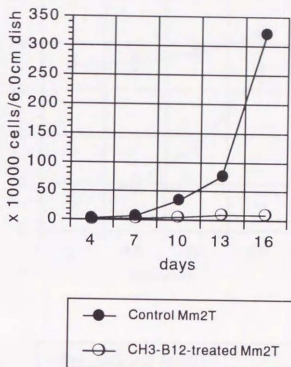
Fig. 3: 透過型電子顯微鏡像



Transmission electron microscopic observation of the control (a, x7000) and the CH<sub>3</sub>-B<sub>12</sub>-treated Mm2T cells (b, x8000). Cell-to-cell adhesion with adhesion structures was well developed among the CH<sub>3</sub>-B<sub>12</sub>-treated Mm2T cells (c, x80000), but not among the control cells.

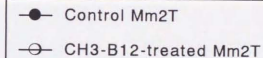
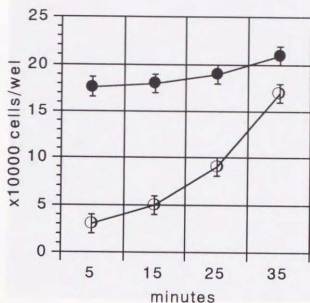


Fig. 4: 培養開始時より自然に浮遊する細胞数の累計



Number of floating cells in the control (●) and the CH3-B12-treated (○) Mm2T cells from 60mm culture plates. Both cells attained to be confluence 7 days after seeding. The floating cells were liberated by pipetting and counted on a Burkel-Turk hemocytometer. The mean of 3 cultures was plotted in the figure and standard deviation was within 5%. Note that the number of floating cells increased exponentially in the control culture, but appeared in much smaller number in the CH3-B12-treated culture.

Fig. 5. 0.25% トリプシンによって剥離される細胞数

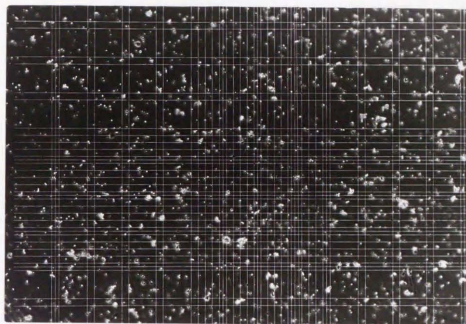


Number of cells liberated from control (●) and CH3-B12-treated (○) Mm2T cultures by treatment with 0.25% trypsin/PBS(-). Cells were inoculated at  $2 \times 10^5$ /ml 2 days before the experiments and were liberated by treatment with 0.25% trypsin/PBS(-) for 5 min followed by pipetting. Plating efficiency in each experiment was above 95%.

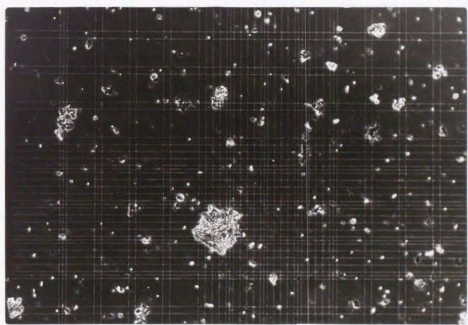
Fig. 6-1: 細胞剥離時の凝集状態

- (a): コントロールMm2T細胞 (x40)  
(b): メチルB<sub>12</sub>処理Mm2T細胞(x40)

a

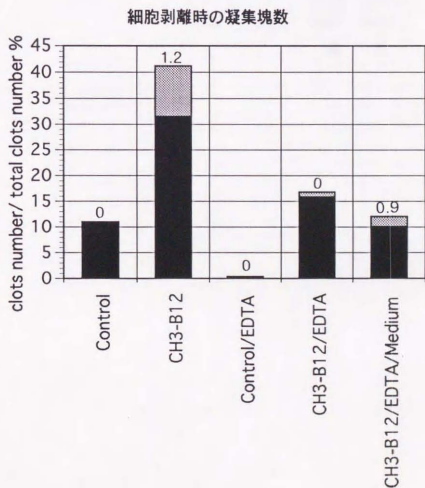
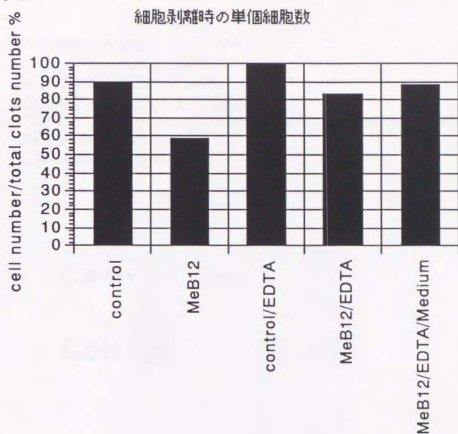


b

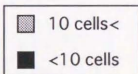


Phase-contrast microscopy of the control and CH<sub>3</sub>-B<sub>12</sub>-treated Mm2T cells after dispersion with a rubber policeman in the serum free medium. Note that CH<sub>3</sub>-B<sub>12</sub>-treated cells formed large clots, whereas control cells were dispersed to single cells.

Fig. 6-2



凝集塊を構成する細胞数



グラフ中の数字は100個以上の巨大細胞凝集塊数  
x10000/ml

Fig. 7: 中性糖脂質の薄層クロマトグラフィー

a. コントロールMm2T細胞

b. メチルB12処理Mm2T細胞

乾燥重量 2 mgに相当する中性糖脂質を

クロロホルム：メタノール：水、65:35:8で展開し、オルシノール硫酸で発色させた

CMH: ceramidemonohexoside

CDH: ceramidedihexoside

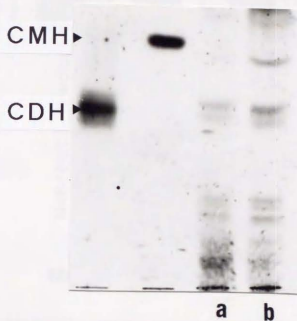
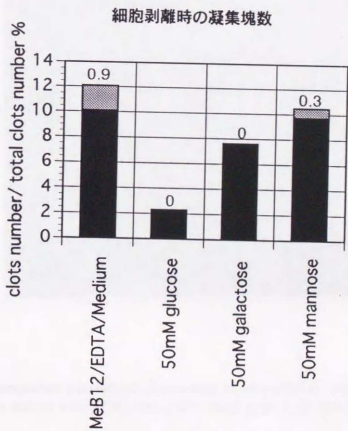
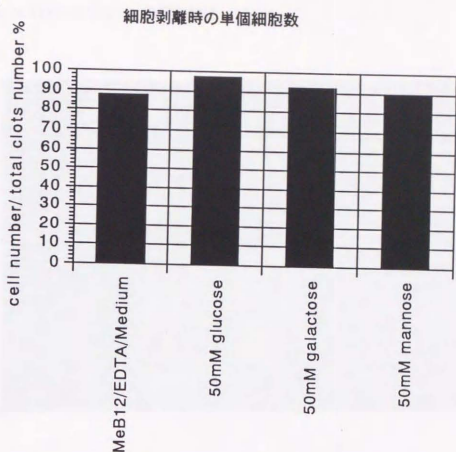
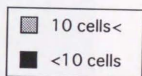


Fig. 8

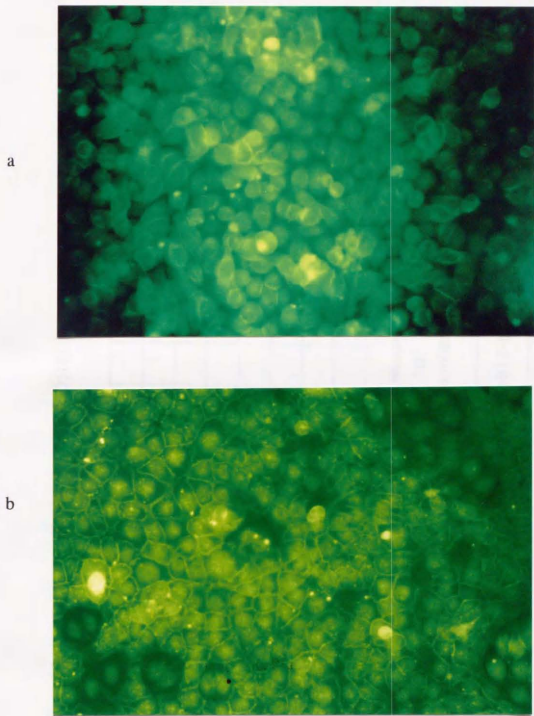


凝集塊を構成  
する細胞数



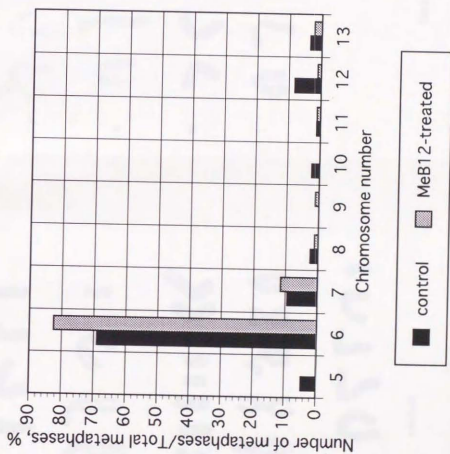
グラフ中の数字は  
100個以上の巨大  
細胞凝集塊数  
x10000/ml

Fig. 9: FITC-WGAによる細胞染色



Fluorescence microscopic observation of the control (a) and the CH3-B12-treated (b) cells stained with FITC-conjugated wheat-germ-agglutinin (x100).

Fig. 10-1:染色体数の分布





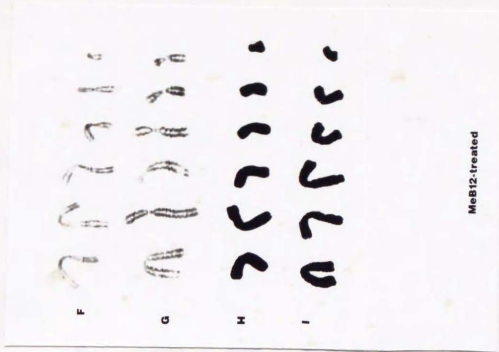
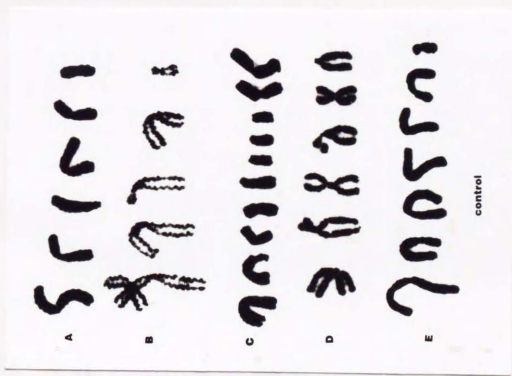


Fig. 10-2 コントロールおよびメチルB12処理細胞の染色体像

Fig. 11 フローサイトメトリーによる細胞周期の解析

(a): コントロールMm2T細胞

(b): メチルB12処理Mm2T細胞

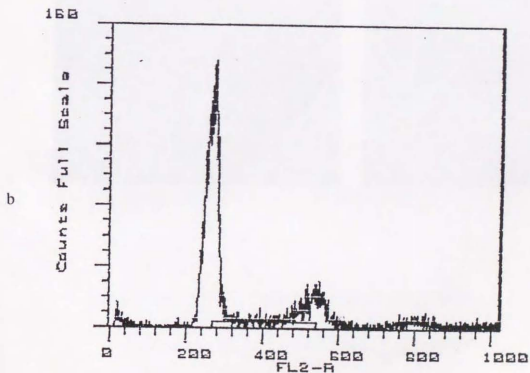
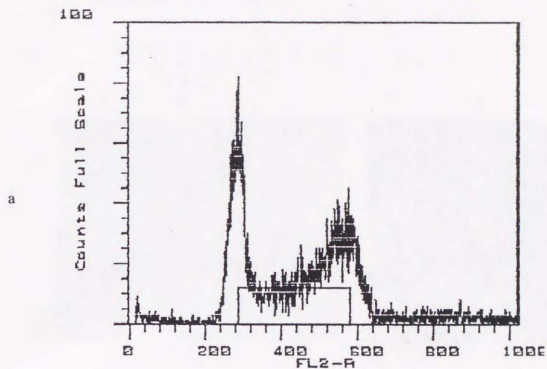


Fig. 12: クローニングしたコントロールMm2T細胞にメチルB12を  
100  $\mu$ g/mlで添加したときの初期変化

- (a):10日目。contact inhibitionの誘導
- (b):21日後
- (c):2か月後
- (d):0.25% トリプシン処理後

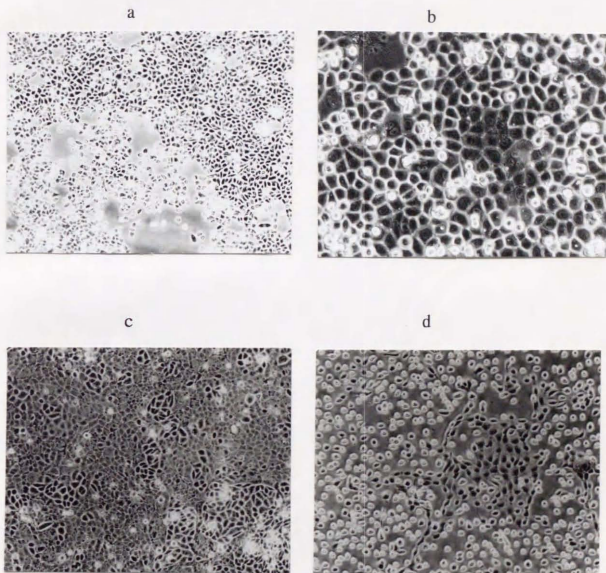
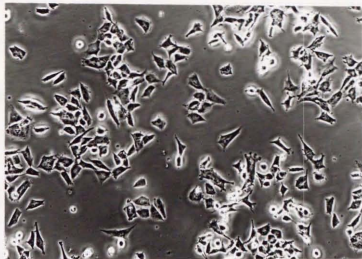


Fig. 13: 神経芽細胞腫TGWに対するメチルB12の形態変化誘導作用

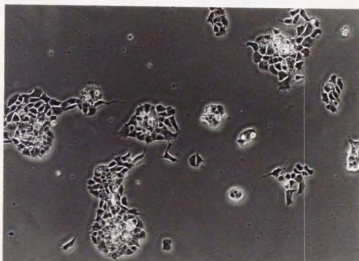
(a):メチルB12添加前(x100)

(b):メチルB12添加14日後(x100)

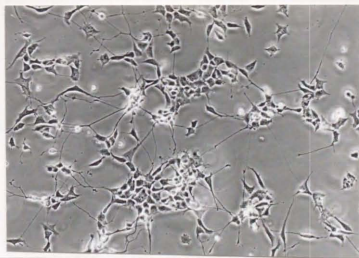
(c):メチルB12添加2ヵ月後(x100)



a



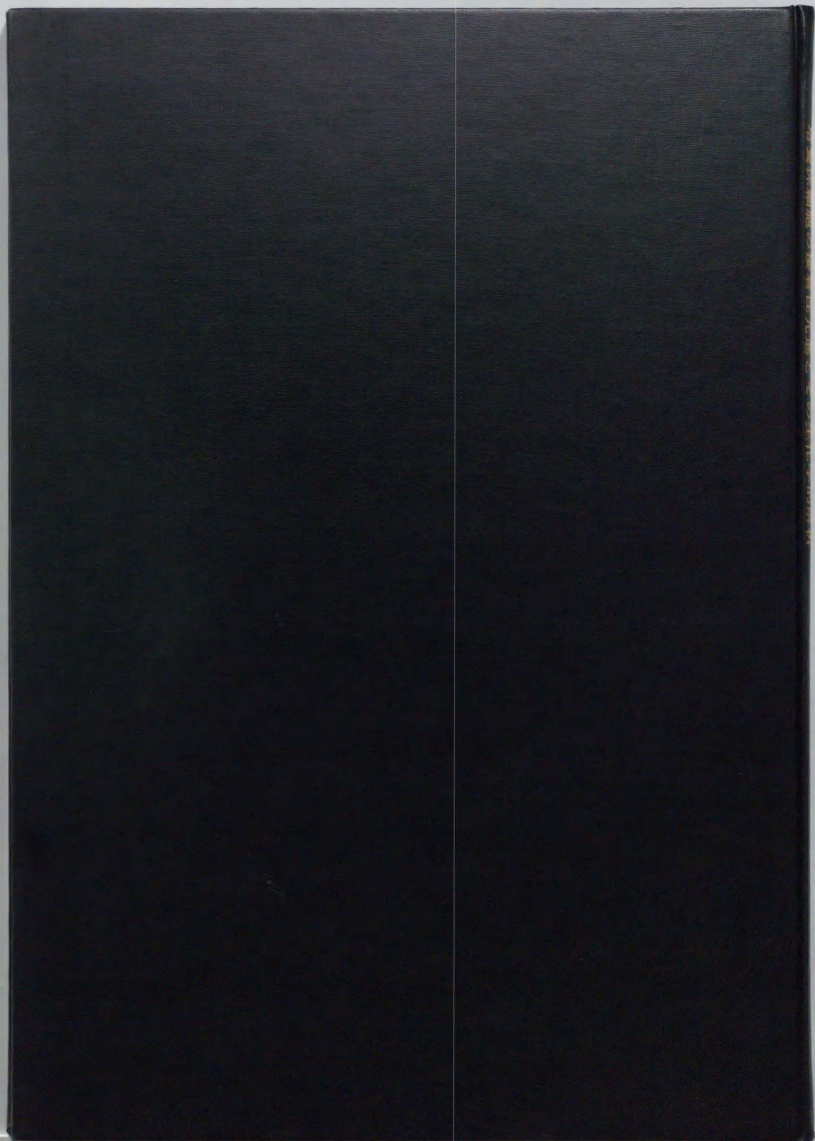
b

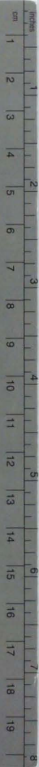


c

Table 1 Protein Content and Lipid Composition in Control Mm2T and CH<sub>3</sub>-B<sub>12</sub>-Treated Mm2T Cultures

	Control (a)	CH <sub>3</sub> -B <sub>12</sub> -Treated cultures (b)	(b)/(a)
	(μg/mg dry weight)		
Protein Content	581.90	506.90	
	(μmol/g dry weight)		
Cholesterol	17.00	30.95	1.77
Free Fatty Acid	20.00	19.52	0.98
Triglyceride	18.67	43.06	2.30
Cholesterol Ester	2.80	4.05	1.44
Lipid-Bound Phosphorus	56.47	73.13	1.44
Sphingomyelin	5.15	8.47	1.64
Phosphatidylcholine	26.54	36.47	1.38
Phosphatidylglycerol	2.48	1.50	0.61
Phosphatidylethanolamine	22.34	26.69	1.20
Ceramide	1.16	2.70	2.32
Ceramidemonohexoside	0.02	0.16	8.33
GM3-ganglioside	0.05	0.04	0.80





# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

