

琉球大学学術リポジトリ

細胞融合によるイヌ伝染性肝炎ウイルス誘発ハムスター腫瘍細胞からイヌ細胞への T 抗原の移行(畜産学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 金城, 俊夫, 西, 武, 梁川, 良, Kinjo, Toshio, Nishi, Takeshi, Yanagawa, Ryo メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4473

細胞融合によるイヌ伝染性肝炎ウイルス誘発ハムスター 腫瘍細胞からイヌ細胞へのT抗原の移行*

金城俊夫**・西武***・梁川良***

Toshio KINJO, Takeshi NISHI and Ryo YANAGAWA : Transfer
of T antigen from ICH virus-induced hamster tumor cells to
dog kidney cells by cell fusion technique

I 緒 言

ヒトおよび動物由来のアデノウイルスを新生仔ハムスターに接種した場合、長い潜伏期の後に腫瘍が発生することは広く認められている(2,7,14,15,18)。しかしこれらアデノウイルスがそれぞれ本来の自然宿主に対しても同様の腫瘍原性を有しているか否かについては非常に興味あるまた重要な問題であるが、現在のところ全く不明である。

著者らはイヌアデノウイルスすなわちイヌ伝染性肝炎(ICH)ウイルスが新生仔ハムスターに腫瘍原性を有することを既に明らかにしたが(9)、上記のような観点から果してこのウイルスが自然界にみられるイヌ腫瘍の原因の一つになっているかどうかについて明らかにしてない。

一般にイヌは腫瘍が発生しやすい動物であるが、発生した腫瘍とICHウイルスの関連を明らかにするためには、その腫瘍あるいは腫瘍をもつ生体にICHウイルス関連物質の存否をみたり、あるいは何らかの処置をしたICHウイルスを直接イヌに接種して腫瘍発現の有無をみたりすることが、より直接的な方法であるが、今回の実験は、次のような間接的な方法によって前述の疑問を解明することにした。

すなわち、著者らが確立したICHウイルス誘発ハムスター腫瘍由来のHT-7細胞(10)と同ウイルスに感受性のあるイヌ腎細胞由来のMDCKを融合させ、それによってHT-7の有するT抗原産生を支配するウイルスゲノムをMDCKに移行させるわけである。

もしこのような方法でT抗原産生能を獲得したMDCKが得られれば、この細胞を新生仔イヌに接種し、腫瘍の発現の有無をみることでさらにその成果をもとにICHウイルスT抗原のイヌ腫瘍との関連を明らかにすることができる。

このような仮定のもとに実験を実施した結果、T抗原のイヌ細胞への移行に関してはその事実を認めたが、移行された細胞によるイヌへの腫瘍の発現は確認することができなかった。しかし対照実験に比して微弱ではあったが、その可能性を示す成績も得られた。

* 本研究の一部は第69回日本獣医学会(昭和45年4月)において報告した。

** 琉球大学農学部畜産学科

*** 北海道大学獣医学部

琉球大学農学部学術報告 19: 431~443 (1972)

本実験はなお所期の目的に対する結論を得るに至っていないが、今までに得られた成績の概要を報告し、今後さらに検討を加えたい。

II 実験材料および方法

1. 腫瘍細胞株

本実験に使用した腫瘍細胞は、著者らがICHウイルス誘発ハムスター腫瘍細胞からin vitroで株化に成功し、HT-7細胞と命名したもので、100代以上継代維持されているものである。本細胞は継代による差なくほとんど全細胞がその核膜の周囲にICHウイルス特異的T抗原を有していることが蛍光抗体法で示されておるが、ICHウイルスは回収されてない(10)。

2. ICHウイルス感受性細胞

イヌ腎細胞由来の株化細胞であるMDCKを細胞融合に使用した。本細胞株は岡山大学医学部微生物学教室俵寿太郎博士より分与されたもので、ICHウイルス感染に対し初代イヌ腎細胞同様に感受性を示す。

その他、初代あるいは2代継代の仔イヌ腎細胞をも用いた。

3. 組織培養液

0.5%ラクトアルブミン加Hanks液に牛血清を継代培養の場合は10%、維持培養の場合は2%それぞれ加えたものを用いた。

4. HVJ

ハムスター腫瘍細胞とイヌ腎細胞のin vitroでの細胞融合を効率的に行わしめるために、仲介のウイルスとしてHVJ沼畑株を使用した。本ウイルス株は北大医学部細菌学教室松宮英視博士より分与を受けたもので、発育鶏卵漿尿膜接種により増殖させた。ウイルスの力価が16,000HAU/mlになるよう調整し、これを使用に先だち紫外線(UV)で不活化した。

UV不活化は、上記ウイルス液2mlをシャーレ(9cm)に入れ、暗室内で高さ30cmの所より20W殺菌ランプで5分間照射し、その間時々軽く振盪することによった。

5. 細胞融合法

主としてTakemotoら(1968)の方法に準じた。すなわち融合させるHT-7細胞とMDCKのそれぞれほぼ100%単層培養になったものを、トリプシン消化して細胞を集め、Hanks液で1回洗浄した後それぞれ約500万/0.5mlに調整した。

両細胞液を0.5ml宛等量加え、これにさらに前述の如く不活化したHVJ 1mlを混合攪拌した後、4°C冷蔵庫に10分間納置した。その間混合液を軽く振盪した。次いで37°C温浴中に20分間作用させ、遠心洗浄を1回行ない、継代培養用Hanks液に約 5×10^5 /mlなる如く浮遊して、小角ビンに5ml宛分注し、培養した。

6. 仔イヌへの融合細胞移植と観察

野犬抑留場より妊娠末期の雑種のイヌを入手し、実験室内にて出産させ、生後24~96時間の仔イヌを実験に供した。

所定の濃度に調整された細胞浮遊液0.5~1mlを仔イヌの頸部背側皮下に接種した。接種後は毎日接種部位における腫瘍発現の有無を観察した。

7. その他の方法

T抗原の蛍光抗体あるいは補体結合反応による検出法，その他記載しなかった各種実験法等は前報(8,9,10)のそれらに準じた。

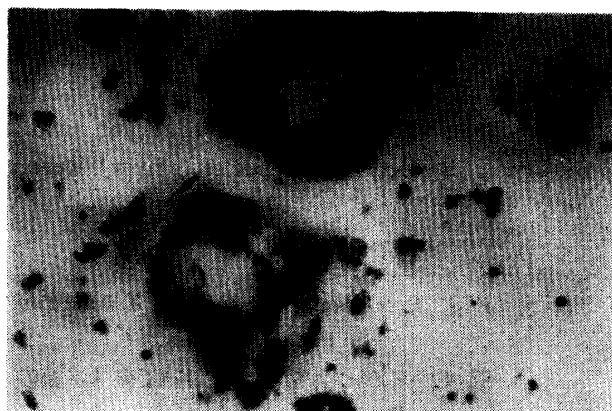
III 実験成績

1 細胞融合によるヘテロカリオン形成

ICHウイルス誘発ハムスター腫瘍細胞由来のHT-7細胞とICHウイルスに感受性のあるイヌ腎由来株化細胞MDCKを，HVJ存在下で融合させると，融合の結果できるヘテロカリオンの出現率は実験の都度一定ではないが，ほぼ10~30%の範囲で現われる。

HVJを添加せずに行なった場合のそれは2%以下で明らかにHVJの存在によって効率よく融合が行なわれる。なお，それぞれの細胞株同志のホモカリオンも多数出現する。

図1は中央に2個の大きな多核体細胞を示しているが，細胞融合後48時間目のもので，1個の細胞の中に数10個の核が包含されている。



Photographed 48 hours after fusion

Fig. 1. Multinucleated cells formed by fusion of HT-7 and MDCK cells in the presence of inactivated HVJ

図1. HT-7とMDCKの融合によってできた多核体細胞



One (left side) nucleus of multinucleated cell (heterokaryon) and both 2 of dinucleated cell (homo-karyon) were of MDCK origin.

Fig. 2. Homo- and heterokaryons of HT-7 and MDCK cells

図2. HT-7とMDCK細胞の融合によってできたホモおよびヘテロカリオン

図2は中央に5個の細胞が融合してできた多核体細胞と右側に2個の核を有する2核体細胞を示している。この程度に倍率を拡大すると，両細胞の核の染色性の相違などからどの細胞の核であるかの区別が可能である。すなわち，多核体細胞の左上端の核1個と，2核体細胞の両核がイヌ腎由来MDCKの核で，核質が他のハムスター腫瘍由来HT-7細胞のそれに比し明るく染り，また核仁も同様の所見を呈している。従って中央の多核体細胞はHT-7とMDCKの両細胞が融合してできたヘテロカリオンであり，

右側下の2核体細胞はMDCK同志で融合したホモカリオンと判断される。

2 HT-7細胞よりMDCK細胞へのT抗原の移行

両細胞の融合によりT抗原産生を支配するウイルスゲノムがHT-7細胞よりMDCK細胞に移行し、次いでT抗原がそこで新たに合成されるか否かをT抗体を用いた蛍光抗体法によって調べた。

HT-7細胞単独を染色すると図3の如く、ほぼ全細胞が核膜の周辺に蛍光を発し、T抗原の存在が認められる。



T antigen was detected mainly at the margins of nuclei.

Fig. 3. Demonstration of T antigen in HT-7 cells by immunofluorescent antibody staining

図3. HT-7細胞におけるT抗原の分布



Positive fluorescence at the margins of all nuclei of heterokaryon was obtained and 2 nuclei (arrow) were confirmed as MDCK origin after restaining with giemsa.

Fig. 4. Demonstration of T antigen in heterokaryons

図4. ヘテロカリオンについてのT抗原の検索

融合細胞を同様染色してみると、図4の中央にある多核体細胞の矢印の核がMDCK細胞のそれで、HT-7細胞と同様に核膜の周囲とさらにこの場合、細胞質全体にT抗原の存在が確認される。なお、矢印の2つの核がMDCKのそれであることは図に示す蛍光抗体染色によっては明らかでないが、同標本をギムザ液で後染色することによって判別された。

このことから、細胞融合によってICHウイルスのT抗原産生を支配するゲノムがHT-7細胞よりMDCKに移行することが示唆された。

しかし、このようなゲノムの移行にヘテロカリオンを作ることが絶対的な必要条件ではなくて、接融培養の状態でも僅かながらイヌ細胞にこのようなT抗原の産生を認めている。

3 細胞融合によるICHウイルスの活性化

前項の成績よりICHウイルスゲノムのうちT抗原産生を支配するゲノムは少なくともHT-7細胞よりMDCKに移行することが明らかにされたが、本実験においてはこのような処置によってさらに感染性のウイルスが感受性のあるMDCK上で活性化しえないか否かを検討した。

融合細胞をそのままの状態で長期培養したり、あるいは継代したりしてMDCKにICHウイルスによるCPEが出現しないかを観察したが、実験範囲内では感染性ウイルスの活性化を確認しえなかった。

しかし、融合細胞を継代していくと漸時多核体細胞は減少し両細胞が接触培養の状態になるが、これらをギムザで染色してみると図5にみられるように、一部のMDCKの核にICHウイルス感染によって生ずる核内封入体に類似のものが検出される。

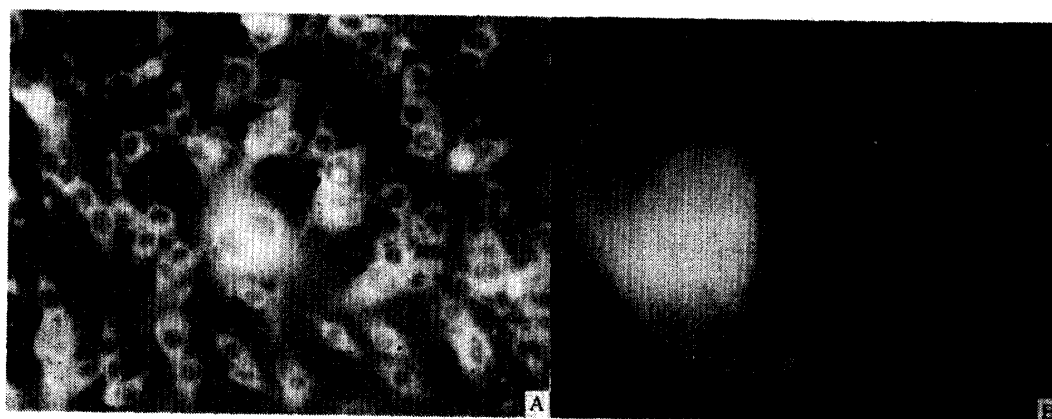


Arrows indicate inclusion body-like structures.

Fig. 5. Inclusion body-like structure in the nucleus of MDCK after passage of fused cultures

図 5. 融合後継代した細胞中のMDCK細胞に出現する核内封入体様構造

これらをT抗原に対する蛍光抗体で染色してみると図6Aの矢印の2つの細胞の核にみられる如く、他の細胞同様に核膜の周辺とさらに図5の核内封入体様構造に相当する部分にもT抗原の存在が認められた。なお、この場合図4でも観察されたように細胞質内の蛍光もハムスター細胞のそれより強いように思われる。



A : Two nuclei (arrow) of MDCK in mixed cell population have inclusion body-like structure stained with T antiserum.

B : Higher magnification

T antigen is demonstrated at the margins of nucleus and at the part correspond to inclusion body-like structure.

Fig. 6. Demonstration of T antigen in inclusion body-like structure

図 6. MDCK細胞に出現する封入体様構造についての蛍光抗体法によるT抗原の検索

図6Bはこのような封入体類似の構造をもつMDCK細胞を強拡大したもので、明らかにT抗原が核膜の周囲と封入体様構造の部分に認められる。

このものがウイルスの増殖の過程にみられる封入体にどういふ関連にあるか明らかでないが、感染性ウイルスが分離できないに拘わらずこのような所見が得られたことは興味ある点である。

5 融合細胞の仔イヌへの移植実験

生後24~96時間の仔イヌの同腹のものを1群として5群23匹について実験を行なった。

成績の概要は表1に示す通りであるが、移植に用いた材料はHT-7とMDCKを、HVJを加えた状態あるいは加えない状態で融合させたもの、対照としては、HT-7、MDCKあるいはハムスター腫瘍を細切したもの、上記細胞等を浮遊するのに用いたPBSなどである。

Table 1. Inoculation of fused cells subcutaneously into baby dogs less than 96 hours of age

表 1. 融合細胞の仔イヌへの接種

Cells inoculated	No. of dog inoculated	Reaction at site of inoculation*		Anti T CF antibody
		++	+	
Fused cells				
HT-7+MDCK (with HVJ)	5	3	2	3/5**
HT-7+MDCK (without HVJ)	2	0	2	1/2***
Control				
HT-7	7	0	0	0/4
MDCK	2	0	2	0/2
Minced hamster tumor	2	0	0	0/1
Phosphate buffered solution	5	0	0	0/3

Notes * Palpable mass was developed within 2 weeks at site of inoculation with maximum size of about 1 (+) to 2 cm (++) in diameter but was regressed finally.

** No. of slightly positive / No. of tested
Of 3 positive 1 showed 50% hemolysis at 1 : 4 serum dilution and other 2 showed 75% hemolysis at 1 : 2.

*** One showed 75% hemolysis at 1 : 2 serum dilution.

移植に用いた融合細胞は両細胞を融合させた後、継代を7~10代繰返したもので、細胞数は約100万~456万の範囲である。

なお、移植時の培養細胞には多核体細胞の存在はまれで、図7のように両細胞がそれぞれ境界を接し別個に島を作った状態で細胞層を形成していた。

仔イヌにおける反応をみると、HVJ存在下で融合させた細胞を移植された5匹中5匹が移植局所に移植後3~6日目より小豆大の腫瘤が触知されるようになり、その後ほゞ2週目位まで徐々に大きさを増し、うち3匹は拇指頭位まで、また他の2匹は小指頭にまで達し以後漸時退縮している。

HVJを加えないで融合させた細胞を移植された2匹、さらにMDCK単独移植された2匹も同様の反応を示し、小指頭大までなっている。しかし他の対照群14匹ではこのような反応を感知できなかった。



Fig. 7. Monolayer cultures at the 7th passage level of fused cells between HT-7 and MDCK

図 7. HT-7とMDCK細胞の融合後7代継代した単層培養の状況

図8は拇指頭大あるいは小指頭大までになった例で、それぞれ移植後20、13日目に殺処分したものである。



- A : Photographed 20 days after inoculation with 1 million cells
- B : Photographed 13 days after inoculation with 1.8 million cells

Fig. 8. Palpable cutaneous masses developed after inoculation of fused cells into baby dogs

図 8. 融合細胞移植後の仔イヌの移植局所に生じた腫瘍

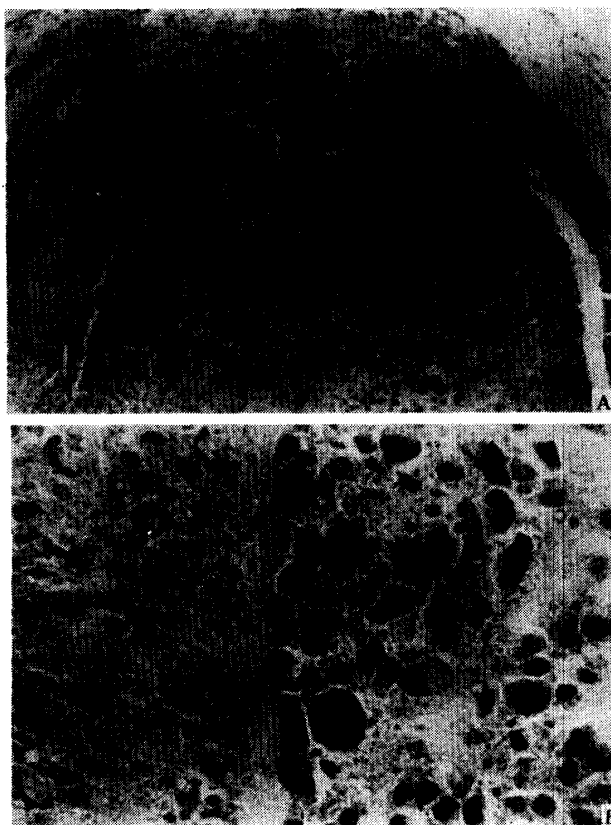
図8-Aは生後36時間目の仔イヌに継代7代目の融合細胞約100万個頸部皮下接種したもので、4日目より局所に小豆大のものが触知され、13日目には拇指頭大までになったが、以後逆に漸時退縮したので、小指頭大になった20日目に殺処分した。

剖検上接種部皮下に摘出容易なあまり固くない小指頭大の腫瘍があり、断面の中心部は淡黄色を呈しやゝ固い感じで、周辺部は白色の比較的やはらかい感じの細胞からなる。

なお、このものを一部乳剤にし、ハムスターおよび仔イヌへの移植を試みたが、何れにおいても腫瘍の発現をみてない。細菌学的検索の結果は陰性であった。

この材料の病理組織学的所見は図9の如くで、Aの中心部にみられる変性した移植組織が線維性の肉芽組織により被囊されている。

Bはその強拡大像であるが、右側は移植組織があり大型細胞が多数みられ、左側の肉芽組織との境界には結合織性被膜が存在しており、結局生体の反応としての肉芽腫形成と診断された。



A : Degenerated transplanted cells in the lower center part of the figure are surrounded with fibrous granule tissue .

B : Higher magnification Transplanted tissue (right) in which many large cells are seen, and granule tissue (left) are bordered with connective tissue.

Diagnosed as granulom

Fig. 9. Histopathological findings of the masses

図 9. 腫瘍 (図8-A) の病理組織学的所見

図8-Bに示すイヌは生後76時間目に前例と同様の細胞の10代継代したもの180万個接種した例である。接種5日目より小豆大のもの触知され、9日目に小指頭大に達したが、以後増大せず、むしろやや退縮の傾向がみられたので13日目に殺処分したものである。

剖検あるいは組織学的所見は前例のそれとほぼ同様で、移植によって形成された腫瘍は腫瘍の増生によるものでなく、肉芽腫形成と診断された。しかし中心部の変性した移植組織の中に細胞の分裂像も観察され、移植された細胞が生体内で増殖したことを確認しえた。

次にこのような仔イヌの血清について、ハムスター腫瘍より作出したT抗原を用い、補体結合反応によってT抗体産生の有無を検討した。

反応を実施しえた14匹について、それぞれの血清対照に比し微弱な反応でも陽性にでたものをまとめると表1の右欄のような成績になる。すなわち、HVJ存在下で融合させた細胞を接種した5匹中3匹と、HVJなしで融合させた細胞接種の2匹中1匹にそれぞれ微弱な陽性反応が認められている。

反応の強さは、前者の3匹中1匹が血清希釈1:4で50%溶血阻止し、他の2匹および後者の1匹は何れも血清希釈1:2で25%溶血阻止した程度の極めて弱い反応で、この成績をもってT抗体の産生があったと結論することはできない。たゞ他の例では何れも血清の原液でも全く反応を示していない点が注目される。

IV 考 察

ICHウイルスがその自然宿主であるイヌに対しても腫瘍原性を有するかを検討するために、間接的な方法ではあるが、ICHウイルス誘発ハムスター腫瘍細胞から腫瘍原性に関連あるT抗原をイヌ培養細胞に移行させ、このような処置をしたイヌ細胞をイヌに移植し腫瘍の発現があるかどうかを観察した。

一般にDNAウイルスで *in vitro* および *in vivo* で腫瘍化した細胞から、その原因ウイルスを分離することは困難で、これら細胞が腫瘍原性を維持するためには全ウイルスゲノムが定着する必要はなく、T抗原産生を支配するゲノムがあればいいと考えられている。

この観点から宿主細胞へのウイルスDNAの定着について、Benjamin (1966) はSV40やポリオーマウイルスの系で、Fujinaga and Green (1966) はアデノウイルスの系で、腫瘍細胞中にそれぞれのウイルス遺伝子としてのDNAと特異的にhybridizeするmRNAの存在を確認している。以来多くのDNA homology testによってウイルスDNAの細胞内定着は一般的に肯定されている。またHausen (1968) はオートラジオグラフィによって、ウイルスDNAが宿主染色体に組込まれ、それが細胞の継代によっても消えることなく維持されることを確認し、上記の事実を支持している。

しかし一方では、従来感染性ウイルスの分離が困難とされていたSV40腫瘍細胞から、腫瘍細胞とウイルスに感受性のある細胞を不活化HVJの仲介で融合させることによりウイルスの分離に成功したというGerber (1966)の報告以来多くの追試確認があって、全ウイルス遺伝子が腫瘍細胞中にありうるものが、ほぼ確定的な事実として受け入れられるに至っている。

Koprowskiら (1967) およびWatkins and Dulbecco (1967)はこのウイルス活性化の機構を詳細に検討し、SV40の増殖は腫瘍細胞と感受性細胞との間にできたヘテロカリオンでのみ起ることを示し、感受性細胞からウイルス増殖に必要な何等かの細胞質因子あるいはアンチプレッサーの提供を受けるのだらうと考察している。またKoprowskiらはヘテロカリオン中の感受性細胞の核の中にT抗原の存在を蛍光抗体法により確認し、ヘテロカリオン中でT抗原の移動が起ることを推定している。

しかし、これらの実験系においてもウイルスの活性化が起る率は極めて小さく、全くウイルスの回収されない腫瘍細胞のクローンもあることが示されていることから、腫瘍原性を維持するために全ウイルス遺伝子が宿主細胞中に組込まれる必要はないといえる。

アデノウイルス腫瘍についても同様の試みがなされているに拘わらず、ウイルス分離の成功例もほとんどなく、僅かにSlifkinら (1969)がサルアデノウイルス7型腫瘍細胞から初めて分離に成功したという報告をみるに過ぎない。

著者らの確立したICHウイルス誘発ハムスター腫瘍由来の各株化細胞からのウイルス分離も全く陰性に終わっている(8.10)。

このような背景のもとに、著者らはまずICHウイルス誘発ハムスター腫瘍由来のHT-7細胞からイヌ腎由来のMDCKにT抗原を移行させることを試みた。このHT-7細胞は継代による変化なくハムスターに対する高い腫瘍原性とほぼ全細胞がT抗原を有している(10)。

先人の方法によってUV不活化HVJの存在下で両細胞の融合を起させると、10~30%の割合にホモあるいはヘテロカリオンが得られた。

両細胞の核の識別は染色性の差によった。

蛍光抗体法によりヘテロカリオン中のT抗原を検索した結果、HT-7細胞の核は勿論、MDCKの核もその核膜の周辺にT抗原の存在が確認され、その上HT-7細胞単独の場合にはほとんど観察されない細胞質にも蛍光を認めることができた(図4)。

このような蛍光抗体染色像から、T抗原産生に関与するウイルスゲノムがHT-7細胞よりMDCKの核に移行したと結論することは困難であるが、HT-7細胞のホモカリオンに上記のような細胞質にお

るT抗原の分布がなかったことおよびMDCKのホモカリオンにT抗原を全く認め得なかったことなどから判断して、ヘテロカリオン中の蛍光所見はHT-7からMDCKへT抗原産生を支配するゲノムが移行した結果であろうと考えられる。

ヘテロカリオン中でT抗原の移行があることは、既に前述のKoprowskiら(1967)によりSV40の系で示されているが、萩原・北原(1969)も詳細に検討し確認している。

すなわち、氏はAd-7-SV40のあいこのウイルスによってトランスホームした細胞と感受性ミドリザル腎細胞(GMK)とをHVJを介して融合させ、GMKの核にSV40のT抗原が検出されることを認めている。さらにこのようにして得たヘテロカリオンをテフロンホモジナイザーで遊離させ、これにあらかじめ³H-TdRでラベルしたGMKを加えて再び融合させることにより、先のGMKと新たに加えたラベルGMKのホモカリオンを形成させた。このようなホモカリオンの両核にT抗原産生のあることを確認し、この事から融合細胞においてT抗原の合成に関与するウイルスゲノムが細胞間を移行することを示唆した。

著者らの系においても、同様な方法でこの点を今後明確にする必要があるが、実験の範囲内でもT抗原の移行のあったことを確認し得たと思う。

次にこのように細胞融合を起させた後継代を繰返して行くと、漸時多核体細胞は減少し、それぞれの細胞が境界を接し独立した嶋を形成した状態になる(図7)。この過程で細胞を染色してみた場合、一部のMDCKの核にICHウイルス増殖の結果みられる封入体と類似の所見が得られた(図5)。これについて蛍光抗体法でT抗原の検索をやった結果、核膜の周囲と封入体に相当する部分に強い蛍光が認められ、また一部ではさらに細胞質にも弱い蛍光が認められた(図6)。

この系では前述の如く全く感染性ウイルスが分離されてないことから、この所見がウイルス増殖のある時点まで進行したことを意味するのか、ウイルスの増殖との関連でV抗原に対する蛍光抗体法も加味して、今後検討すべき興味ある点と思われる。

最後に、MDCKへのT抗原の移行のあったことを前提に、融合細胞の継代7~10代のものを生後24~96時間の仔イヌに皮下接種を試みた。

従来この種の実験はあまり例をみないが、Rabsonら(1965)SV40でトランスホームしたサル細胞による同体(autologous)移植を試み、腫瘍発現をみなかったと述べている。

移植実験においては、組織適合性抗原などに関連して実験系を画一する必要があるが、今回の実験では生後間もないイヌを使用するということを考慮したに過ぎない。使用するイヌ細胞を、移植を受けるイヌと同体(autologous)あるいは同系(isologous)のものに規制して行なう必要がある。

移植の結果は、融合細胞を移植した仔イヌに多く生体の反応が現われたが、移植局所に拇指頭大まで増殖して触知されたものは組織学的検索の結果では腫瘍細胞の増殖によるものでなく、生体反応としての肉芽腫形成と診断された。たゞ、移植細胞の中に細胞分裂像も観察されていることからして、一時的にせよイヌの生体内で細胞の増殖があったことは確認できた。この増殖細胞が、T抗原産生能のあるMDCKであるかどうかは明らかにし得なかった。

また、仔イヌ血清中のT抗体の検出をCF反応により試みたが、有意の差は認められず、上記の生体反応の大きかったイヌに極めて僅かT抗体産生を示唆するような反応があったに過ぎない。しかし、対照実験のそれに比して僅かながらでも反応のあったことは、今後この面からの検討の可能性を示すものといえる。

以上の実験成績からは、T抗原産生能を獲得したと思われるイヌ腎由来MDCKの移植によって仔イヌに腫瘍を発現させることはできなかった。しかし、今後以下のような点も考慮して実験を行なえば所期の目的にその成果が得られる可能性が残されているように思われる。すなわち、MDCKの代りにICHウイルスに感受性の最も高い仔イヌ腎細胞の初代あるいは2代継代細胞を用いることによりT抗原の移

行を容易にするようにしたり、細胞融合後は今回行なったような継代をすることなくできるだけ速やかに移植を行なうこと、さらにこのようなイヌ細胞と移植を受ける仔イヌを前述の如く同体あるいは同系の組み合わせになるようにして細胞移植に対する拒否反応がないよう留意することなどである。

このような成果と反省に基づき、実験システムを改善して、この面をさらに深く検討する必要がある。

V 総 括

ICHウイルス誘発hamster腫瘍よりin vitroで確立したHT-7細胞とイヌ腎由来の株化細胞MDCKをUV不活化HVJの仲介のもとに細胞融合を起させ、HT-7細胞の有するT抗原をMDCKに移行させるべく、実験を試みた。

その結果、細胞融合により約10~30%のホモあるいはヘテロカリオンが形成されたが、多核体のヘテロカリオン中に蛍光抗体法によってT抗原を有するMDCKの核がみられ、イヌ細胞へのT抗原の移行を確認できた。

なお、細胞融合によってICHウイルスの活性化はできなかったが、一部のMDCKの核に、ICHウイルス増殖の過程でみられる核内封入体と類似のものが観察され、このものはT抗体によって染色された。

融合細胞を7~10代継代後、その100~500万個を生後96時間以内の仔イヌの皮下に移植を行ない、腫瘍の発現の可能性を検討した。

その結果、細胞移植後1~2週の間局所に小指頭大~拇指頭大の腫瘍の発生があり、その大きさはHVJ仲介のもとで融合させた細胞を移植されたイヌで著明であった。

しかし、腫瘍の病理組織学的観察結果は、移植細胞の増殖によるものでなく、それをとりまく生体側の肉芽腫形成と診断され、細胞融合法によってT抗原産生能を獲得したと思われるMDCKによる腫瘍の発現は確認し得なかった。

謝 辞

本実験材料の一部について、病理組織学的診断をして下さった北海道大学獣医学部比較病理学講座、藤本胖教授に深謝致します。

文 献

1. Benjamine, T. L. 1966 Virus specific RNA in cells productively infected or transformed by polyoma virus, J. mol. Biol., **16** : 359~373
2. Darbyshire, J. H. 1965 Oncogenicity of bovine adenovirus type 3 in hamsters, Nature, **211** : 102
3. Fujinaga, K. and Green, M. 1966 The mechanism of viral carcinogenesis by DNA mammalian virus : Viral specific RNA in polysomes of adenovirus tumor and transformed cells, Proc. nat. Acad. Sci., **55** : 1567~1574
4. Gerber, P. 1966 Studies on the transfer of subviral infectivity from SV40-induced hamster tumor cells to indicator cells, Virology, **28** : 501~509
5. 萩原和夫, 北原典寛 1969 HVJ融合細胞におけるSV40 T抗原の合成について,

- ウイルス, **19** : 209~210
6. Hauzen, H. Z. 1968 Association of adenovirus type 12 deoxyribonucleic acid with host cell chromosomes, *J. Virology*, **2** : 218~223
 7. Hull, R. N., Johnson, I. S., Culberston, C. G., Peimer, C. B. and Wright, H. P. 1965 Oncogenicity of the simian adenovirus, *Science*, **150** : 1044~1046
 8. 金城俊夫 1971 イヌ伝染性肝炎ウイルスでトランスホームしたハムスター胎児細胞からの株化細胞の作出とその性状, *琉大農学報*, **18** : 185~193
 9. Kinjo, T., Yanagawa, R. and Fujimoto, Y. 1968 Oncogenicity of infectious canine hepatitis virus in hamsters, *Jap. J. vet. Res.*, **16** : 145~158
 10. ————, ———— and Nishi, T. 1958 Characteristics in tissue culture of infectious canine hepatitis virus-induced hamster tumor cells, *Jap. J. vet. Res.*, **16** : 183~194
 11. Knowles, B. B., Jensen, F. C., Steplewski, Z. and Koprowski, H. 1968 Rescue of infectious SV40 after fusion between different SV40-transformed cells, *Proc. nat. Acad. Sci.*, **61** : 42~46
 12. Koprowski, H., Jensen, F. C. and Steplewski, Z. 1967 Activation of production on infectious tumor virus SV40 in heterokaryon cultures, *Proc. nat. Acad. Sci.*, **58** : 127~134
 13. Rabson, A. S., Kirschstein, R. L. and Legallais, F. Y. 1965 Autologous implantation of rhesus monkey cells "transformed" in vitro by simian virus 40, *J. nat. Cancer Inst.*, **35** : 981~984
 14. Sarma, P. S., Huebner, R. J. and Lane, W. T. 1965 Induction of tumors in hamsters with an avian adenovirus (CELO), *Science*, **149** : 1108
 15. ————, Vass, W., Hubner, R. J., Igel, H., Lane, W. T. and Turner, H. C. 1967 Induction of tumors in hamsters with infectious canine hepatitis virus, *Nature*, **215** : 293~294
 16. Slifkin, M., Merkow, L. and Rapoza, N. P. 1969 Oncogenic simian adenoviruses V. Recovery of infectious virus from intracranial tumor cells induced by simian adenovirus 7, *J. nat. Cancer Inst.*, **43** : 423
 17. Takemoto, K. K., Todaro, G. J. and Habel, K. 1958 Recovery of SV40 virus with genetic markers of original inducing virus from SV40-transformed mouse cells, *Virology*, **35** : 1~8
 18. Trentin, J. J., Yabe, Y. and Taylor, G. 1992 The quest for human cancer viruses, *Science*, **137** : 835~841
 19. Watkins, J. F. and Dulbecco, R. 1967 Production of SV40 virus in heterokaryons of transformed and susceptible cells, *Proc. nat. Acad. Sci.*, **58** : 1396~1403

Summary

Attempts to transfer T antigen from HT-7 cells originated from ICH virus-induced hamster tumor to established dog kidney cells (MDCK) were carried out using cell fusion technique.

The percentage of multinucleated homo- and hetero-karyons produced after fusion of the both cell types in the presence of inactivated HVJ was approximately 10—30%.

When heterokaryon cultures were examined for presence of T antigen by immunofluorescent staining, some multinucleated cells contained fluorescing nuclei being of MDCK origin. The fact seems to indicate that transfer of T antigen from the HT-7 cells to MDCK took place.

Attempts to reactivate ICH virus from the HT-7 cells by fusion technique were unsuccessful, but in some nuclei of MDCK origin, inclusion body-like structure resembling that of ICH virus-infected MDCK was observed. The structure was shown to contain T antigen by immunofluorescent staining.

To determine whether the MDCK thus treated can produce tumor in dogs, the fused cells after being passaged for 7 to 10 times were inoculated subcutaneously into baby dogs less than 96 hours of age. Within 2 weeks after inoculation, palpable mass at site of inoculation was noted in some of the dogs but was regressed gradually thereafter. On histological examination, the mass was designated granulom. Tumor development could not be confirmed by such methods.