

琉球大学学術リポジトリ

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(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, Kinjo, Toshio メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4499

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*

金城 俊夫**

Toshio KINJO : Characteristics of cell lines established from hamster
embryo cells transformed by infectious canine hepatitis virus

I 緒 言

DNA ウイルスによって *in vivo* および *in vitro* 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、一般に困難とされている。

しかし、最近 SV40 でトランスホーム（試験管内での細胞の癌化）し、ウイルスが分離されなかったハムスター培養細胞を、SV40 に感受性のあるサル腎培養細胞と、紫外線（UV）で不活化した HVJ（hemadsorption virus of Japan）存在下で細胞融合を起させることによって、SV40 の分離が可能となり（8,13）、さらに別の SV40 でトランスホームしたハムスター培養細胞をも加え、3細胞間で同様、細胞融合を起させると、原因ウイルスの分離率が一層高まることが報告された（7）。

著者はすでに、イヌ伝染性肝炎（ICH）ウイルスがハムスターを *in vivo* および *in vitro* で腫瘍化する事実をはじめて認め報告した（4,6）。しかし、このように腫瘍化したハムスター細胞における、ICH ウイルスあるいはそのゲノムの存在様式については、なお不明の点が多い。

この点を解析する目的で、まず、由来の異なる多くの ICH ウイルス誘発ハムスター腫瘍細胞株の作出を試みている。今回、前報（6）の、*in vitro* でトランスホームしたハムスター細胞から、新たに W-16 および THW と命名した2株の細胞株の作出に成功したので、これら細胞株の株化の過程と、若干の性状について報告する。なお、細胞融合法によって、これら細胞株からウイルスの分離を試み、その結果をもとに、本ウイルスゲノムの腫瘍細胞内での存在様式について考察したので、あわせて報告する。

II 実験材料および方法

1. 供試培養細胞

組織培養法は常法に従いトリプシン消化法によった。トランスホメーションの実験には妊娠末期のハムスター全胎児の初代細胞を、また細胞融合に用いた ICH ウイルス感受性細胞には仔イヌ腎の2代目継代細胞をそれぞれ使用した。

* 本研究の一部は 第70回 日本獣医学会（1970年9月）において報告した。

** 琉球大学農学部畜産学科
琉球大学農学部学術報告 18:185~193 (1971)

2. 培養液

基礎培地としては、0.5%ラクトアルブミン水解物および0.3%トリプトースホスフェートブローチ加ハンクス液を用いた。さらにこれに、仔ウシ血清を10%に加えたものを増殖用培地とし、また2%に加えたものを維持用培地としてそれぞれ使用した。

3. トランスホーメーション実験

この実験に使用したICHウイルス株、ウイルス接種法、細胞の観察法、腫瘍原性の試験法その他関連のある方法等は前法(6)のそれらと同様である。

4. 細胞融合法

主として Takemoto et al. (11)の方法に準じた。HVJ としては、発育鶏卵漿尿膜で増殖させた血球凝集力価1:16,000の沼畑株を用い、使用に際してUVで不活化した。

融合を起させる両細胞をトリプシン消化により集め、それぞれ500万/0.5mlの濃度にした後混合し、さらに前記のHVJ浮遊液を1ml加えて、4°C、10分間、次いで37°C 20分間作用させ、この間時々軽く攪拌した。これをハンクス液で1回洗浄した後、細胞濃度が約 5×10^5 /mlになるよう増殖用培地に浮遊し、ガラス器に分注後、37°Cで静置培養した。

5. 蛍光抗体法

ICHウイルスT抗原の観察に本法の間接法を用いた。一次血清にはICHウイルス誘発hamster腫瘍を移植した担腫瘍hamster血清を、二次血清には蛍光色素(FITC)をラベルした抗hamster γ -グロブリン山羊血清を使用した。

III 実験成績

1. W-16およびTHW細胞株の由来

両細胞株共既報(6)のトランスホーメーション実験において、腫瘍化に成功した細胞に由来している。すなわち、第1表に示したように、小角瓶またはペトリ皿に培養したhamster胎児初代細胞にICHウイルスFDおよびWoc-4株を、感染の度合1.0あるいは0.1で接種し、以後培養液の交換を1日おきに行ない細胞の維持につとめた。

その結果、Woc-4株を感染の度合1.0で接種し維持できた小角瓶2本中1本に、接種後38日目に1個のトランスホームしたホーカスの発現を認めた。この小角瓶1本をトリプシン消化後2代目へ継代し、これよりW-16細胞株を確立した。

第1表 ICH ウイルスによるhamster細胞のトランスホメーション
 Table 1. Transformation of primary hamster embryo cells
 by ICH virus (Exp. 4 : May 16, 1969)

Strains	Approx. virus input *1	Small bottle		Petri dish	
		No.used	No.of foci per bottle	No.used	No.of foci per dish
Woc-4	0.1	3 (4) ^{*2}	0, 0, 0 ^{*3}	5 (8)	0, 0, 0, 0, 0,
	1.0	2 (5)	1, 0 ^{*4}	2 (8)	0, 0
FD	0.1	0 (4)	—	2 (6)	0, 0
	1.0	0 (5)	—	0 (8)	—
Control	—	4 (4)	0, 0, 0, 0	6 (8)	0, 0, 0, 0 0, 0

*1 TCID₅₀/cell

*2 3(4) means that of 4 bottles, 3 were actually used for the experiments, and others in which the cells were detached from glass due to CPE caused by ICH virus multiplication were omitted.

*3 Foci were counted 60 days after virus inoculation.

*4 This transformed focus, detected 38 days after virus inoculation (June 23, 1969), was subcultivated as the origin of W-16 cell line.

THW 細胞株は第2表に示す実験によるものである。

hamster胎児初代細胞に4株のICHウイルスを接種したところ、FD株以外の株では何れもトランスホメしたホーカスの出現を認めている。そこで、接種53日目に、ホーカスのできた小角瓶またはペトリ皿の細胞をトリプシン消化後ウイルス株別に集めて、幼若hamster皮下へ移植した。

その結果、Woc-4株でトランスホメしたペトリ皿の細胞を移植された2匹中1匹のhamster皮下に、移植後36日目に腫瘍の発現をみた。このhamsterをさらに19日後に放血殺し、その腫瘍を培養に供し、これよりTHW株を作出した。

第2表 ICH ウイルスによるハムスター細胞のトランスホメーション
Table 2. Transformation of primary hamster embryo cells
by ICH virus (Exp. 2 : April 24, 1969)

Strains	Approx. virus input	Small bottle			Petri dish		
		No. used	No.of foci per bottle	Tumori- genicity	No. used	No.of foci per dish	Tumori- genicity
FD	0.5	0 (4)	—	— *1	0 (4)	—	— *2
Woc-4	0.5	3 (4)	1, 0, 0	0/2	4 (4)	3, 1, 0, 0	1/2
FS	1.0	4 (4)	0, 0, 0, 0	0/1	4 (4)	2, 0, 0, 0	0/2
P2	1.0	4 (4)	1, 0, 0, 0	0/2	4 (4)	1, 0, 0, 0	0/2
Control	—	4 (4)	0, 0, 0, 0	0/1	4 (4)	0, 0, 0, 0	0/2

Sixty-three days after inoculation (June 26, 1969), the cell cultures inoculated with the same strain were pooled and were injected subcutaneously into hamsters with approximately 10^6 cells per animal.

*1 Number of tumored hamster/ number of tested

*2 A tumor developed in one hamster 35 days after inoculation with the cells in dishes transformed by strain Woc-4 (August 2).

The tumor was used for tissue culture (August 21) as the origin of THW cell line.

2. W-16 および THW 細胞株の継代歴

両細胞株共増殖の状況に応じて、第3表に示すような日程で、不定期に継代を重ねた。とくに W-16 細胞の場合は、継代に用いたホーカスが僅か1個で、そのため、初期の継代および維持にはかなりの困難と日数を要した。

なお、既報(5)の *in vivo* で腫瘍化した細胞からの株化細胞作出法にならって、継代歴の若いうちは培養液としては、通常のカルシウム濃度 1.2mM を 0.1mM に減じたハンクス液を使用した。

W-16細胞株作出の過程で、対照としてウイルス非接種ハムスター胎児細胞についても株化を試み、10代までかろうじて継代できたが、以後細胞の増殖悪く、失敗に終わった。

W-16細胞株では10代以降、THW 細胞株では8代以降、細胞の増殖が安定したので、通常のカルシウム濃度のハンクス液で培養すると共に、ほぼ毎週1回、定期的に継代を繰返している。1971年4月25日現在何れも80代、初代培養開始よりほぼ19~22カ月継代、維持されている。

第3表 W-16 および THW 細胞株の継代歴
 Table 3. Passage history of W-16 and THW cell lines

Number of passages	Date of passage	
	W-16	THW
1	May 16, 1969	Aug. 21, 1969
2	June 23	Aug. 25
3	July 29	Sept. 4
4	Aug. 21	Sept. 22
5	Sept. 18	Sept. 29
6	Sept. 25	Oct. 9
7	Oct. 6	Oct. 19
8	Oct. 21	↓ Oct. 26
9	Oct. 30	Nov. 2
10	↓ Nov. 10	Nov. 10
11	Nov. 17	Nov. 17
.	.	.
.	.	.
18	Jan. 7, 1970	Jan. 7, 1970
.	.	.
.	.	.
33	April 27	April 27
.	.	.
.	.	.
65	Jan. 9, 1971	.
.	.	.
.	.	.
80	April 21	.
.	.	.
.	.	.

During early passages, Hanks medium with low level of calcium chloride (0.1 mM) was used. After the 10 th (W-16) or 8th (THW) passage (↓), only medium with the usual level of calcium chloride (1.2mM) was employed.

3. W-16 および THW 細胞株の形態的, 免疫学的性状と腫瘍原性

両細胞株は形態的に目立った差異がなく, 既報(5)の in vivo で腫瘍化した細胞由来の HT-7 細胞のそれと同様で, 主として上皮様細胞よりなるが, 細胞層が完成された後は, 日時の経過と共に線維芽細胞様の形態を示すようになる。なお, 多核細胞が比較的多数形成される傾向があるが, これは in vivo 由来の HT-7 細胞と異なる点である (第1~3図)。

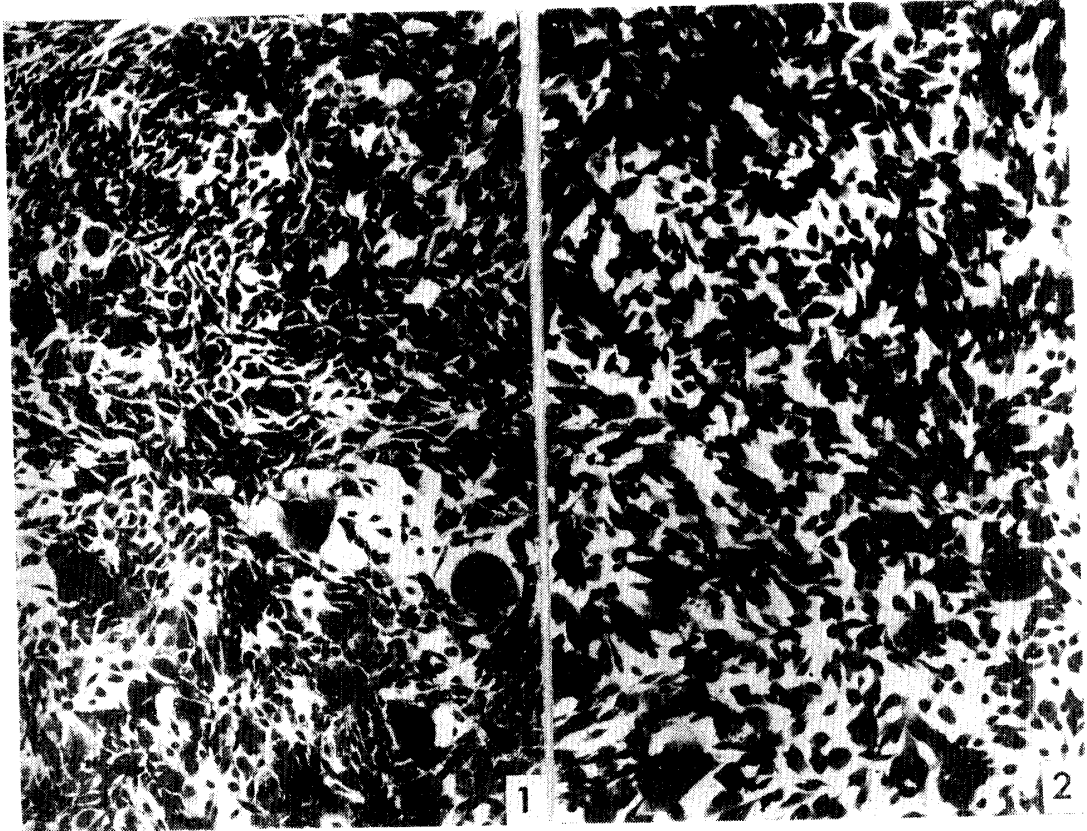


Fig. 1. W-16 cells of the 10 th passage
Cell monolayers predominantly
consisted of epithelial cells.
Polynuclear cells could be
observed.

Seven days after cultivation
Giemsa staining x185

Fig. 2. THW cells of the 10 th passage
Cell morphology was almost
same as figure 1.

Eight days after cultivation
Giemsa staining x185

Fig. 3. W-16 cells of the 4 th passage
Epithelial cells were replaced
by fibroblastic cells following
long term cultivation.
Twenty-eight days after sub-
cultivation

Giemsa staining x185

W-16細胞株の場合、継代初期には非腫瘍細胞もかなり混じていたことが、T抗原の蛍光抗体染色で認められたが、継代と共に腫瘍細胞だけが選択されたようで、現在では THW 細胞と同様、ほぼ全細胞がT抗原を保有しており、ICH ウイルスゲノムが、これらの細胞中に安定に保持されていることが明らかにされた。

なお、T抗原は、HT-7 細胞の場合と同様(3)、主として細胞質内の核膜に近い部分に分布している(第4図)。

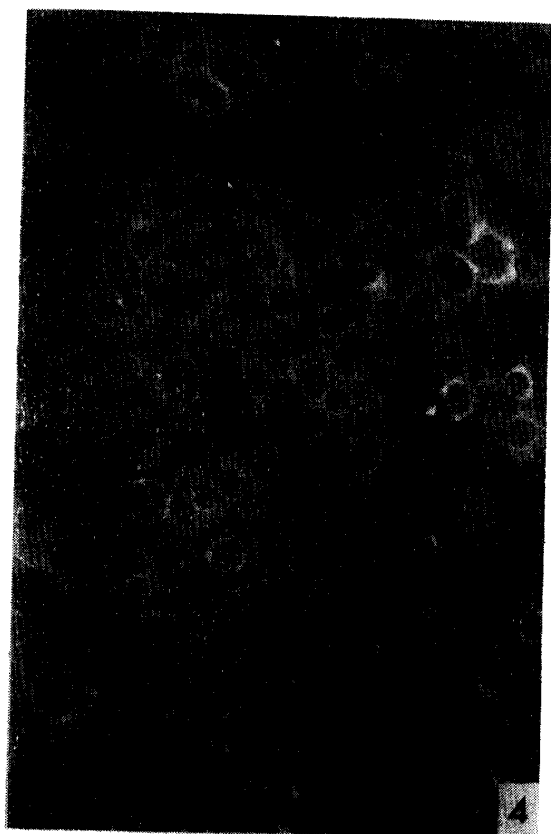


Fig. 4. Fluorescent antibody stained preparation of W-16 cells at the 10 th passage level T antigen was demonstrated at the margins of nuclei. x 600

これら細胞のハムスターに対する腫瘍原性は、第4表に示した如く、 10^3 個の細胞で確実に腫瘍の発現をみ、また継代による腫瘍原性の差もほとんどない。

第4表 W-16 および THW 細胞株のハムスターに対する腫瘍原性

Table 4. Tumorigenicity of W-16 and THW cell lines for young hamsters^{*1}

Number of passages	W-16					THW			
	No. of cells inoculated					No. of cells inoculated			
	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
5	2/2	2/2	2/2	0/2	—	2/2	2/2	1/2	2/2
10	—	3/3	3/3	1/2	—	—	3/3	2/3	0/3
23	—	1/2	2/2	1/2	—	—	2/2	2/2	1/2
70	—	3/3	3/3	1/3	0/3	—	—	—	—

*1 About 4-5 weeks of age

*2 Number of tumored hamster / number of tested

*3 Not tested

第4表で示した実験で得られた腫瘍発生ハムスターの一部を用い、その腫瘍の抗原性および血清中のT抗体について、既報(5)のHT-7およびHT-23細胞のそれらとの間で交差補体結合反応を実施した。

その結果、第5表に示したように、何れの組合わせにおいても交差反応が認められ、今回作出した両細胞が抗原的にICHウイルスに特異的であることが確認された。

第5表 各細胞株をハムスターに接種して得られた腫瘍および担腫瘍ハムスター血清についての交差CF反応

Table 5. Cross complement fixation tests of sera from tumored hamsters inoculated with tumor cells versus corresponding hamster tumor antigens

Sera of tumored hamsters inoculated with	Hamster tumor antigens ^{*1}					Control ^{*4}
	W-16-18	THW-1	THW-18	HT-7-89	HT-23-75	
W-16-18 ^{*2}	+ ^{*3}	+	+	+	+	-
THW-18	+	+	+	+	+	-
HT-7-89	+	+	+	+	+	-
HT-23-75	+	+	+	+	+	-
Control ^{*4}	-	-	-	-	-	-

*1 About 20% extracts of tumor tissues were homogenized and sonicated. The supernates after centrifugation at 8,000 rpm for 30 min were used as the tumor antigens.

*2 The 18 th passage of W-16 cell line

*3 Positive CF reaction at 1:4 or more serum dilutions

*4 Normal hamster muscle tissue, treated with same manner as tumor tissue, and serum were used as control antigen and serum.

4. W-16およびTHW細胞株からのICHウイルス分離

ICHウイルスに感受性のある細胞として、仔イヌ腎2代培養細胞を用い、UVで不活化したHVJ存在下で、第6表に示すような組合わせで細胞融合を起させ、ウイルスの分離を試みた。

しかし、何れの組合わせにおいても、これら細胞からのICHウイルスの分離に成功していない。

第6表 細胞融合法による腫瘍細胞株からの ICH ウイルスの分離
 Table 6. Isolation of ICH virus in fused cells between transformed hamster cells and dog Kidney cells

Transformed cell lines	Susceptible cells	Isolation of ICH virus
W-16	DKC	—
THW	"	—
W-16 + THW	"	—
W-16 + HT-7	"	—
W-16 + HT-23	"	—
THW + HT-7	"	—

To promote the cell fusion, UV inactivated HVJ was added to the cell mixtures. The secondary cultures of dog kidney cells were used as the susceptible for ICH virus.

IV 考 察

ウイルスによって細胞が腫瘍化もしくはトランスホームすることは多くの実験成績から明白な事実である。

しかし、このようなウイルスによる腫瘍化もしくはトランスホメーションの機構については不明の点が多い。

DNA ウイルスの場合、トランスホームした細胞からは、一般に原因ウイルスの分離は成功していないが、ウイルス特異的T抗原が存在することが認められている。すなわち、腫瘍化した細胞が、腫瘍細胞としての性状を維持するためには、完全ウイルスゲノムが存在する必要はなく、腫瘍性を支配する一部のウイルスゲノムが存在すれば充分であるといえる。このことは UV 等で感染性を不活化したウイルスによっても(1,9,10)、また感染性のない“かたわ”のウイルス粒子によっても(12)腫瘍化が可能であるということからも明らかである。

Watkins and Dulbecco (13)および Knowles et al. (7)は従来、感染性ウイルスの分離が不能といわれていた SV40 でトランスホームしたハムスター細胞から、この細胞と SV40 に感受性のあるサル腎培養細胞を融合させることによってウイルスの分離に成功している。また Koprowski et al. (8) はこれに他のトランスホームした細胞をも含めて融合を起させると、ウイルスの分離率がさらに高まることを報告している。このことは、トランスホームした細胞においては、ウイルスゲノムは完全にあるが、これを解読して感染性ウイルスに組立てる機構に欠陥がある場合と、あるいは、ウイルスゲノムは不完全であるが、トランスホームした細胞相互にそれらを相補的にうめあって、完全ウイルスゲノムに仕立てることができる場合を示唆するものであろう。

著者は既に、アデノウイルスに属するイヌ伝染性肝炎ウイルスが腫瘍原性のヒトアデノウイルス同様、ハムスターを *in vivo* および *in vitro* において腫瘍化させることを報告した(4,6)。*in vivo* で得られた腫瘍細胞からは、HT-7, HT-23 および HT-29 と命名した細胞株を試験管内で確立し、これら細胞株をも含めて、腫瘍細胞からのウイルスの分離を試みたが、まだ成功していない(5)。

今回は、前述の方法を参考に、なるべく由来の異なる腫瘍細胞株を多く確立し、これら細胞株間で細

細胞融合を起させて、ICH ウイルスの分離を試みることにした。また、その成績より本ウイルスゲノムの腫瘍細胞内での存在様式を解析する端緒が得られると考えたからである。

成績の項で述べた如く、トランスホメーションの実験より W-16 および THW と命名した2株の細胞株を作出したが、その株化の過程については、*in vivo* 由来の腫瘍細胞作出のそれとほぼ同様であるので考察を控えたい。たゞ、継代初期において、何れの場合も、ハンクス培養液のカルシウム濃度を通常のその約1/10に減じたものを用いているが、果してこれが株化を可能にした原因であるか否かについては、対照実験がないために結論し得ないが、今後検討すべき項目の一つであろうと考えられる。

作出した両細胞株は、形態的にも、ハムスターに対する腫瘍原性の面でも、また ICH ウイルスT抗原の存在についても、既報(5)の *in vivo* 由来の腫瘍細胞株とほとんど同様な態度を示し、ICH ウイルスの、少なくとも腫瘍化に関与している遺伝子は安定して継代、維持されていることが明らかである。

しかし、これら細胞からのウイルス分離の試みは、感受性イヌ腎細胞との細胞融合法によっても、すべて陰性に終わっている。

得られた実験成績より、ICH ウイルスゲノムの腫瘍細胞内での存在様式を次のように考察することができる。

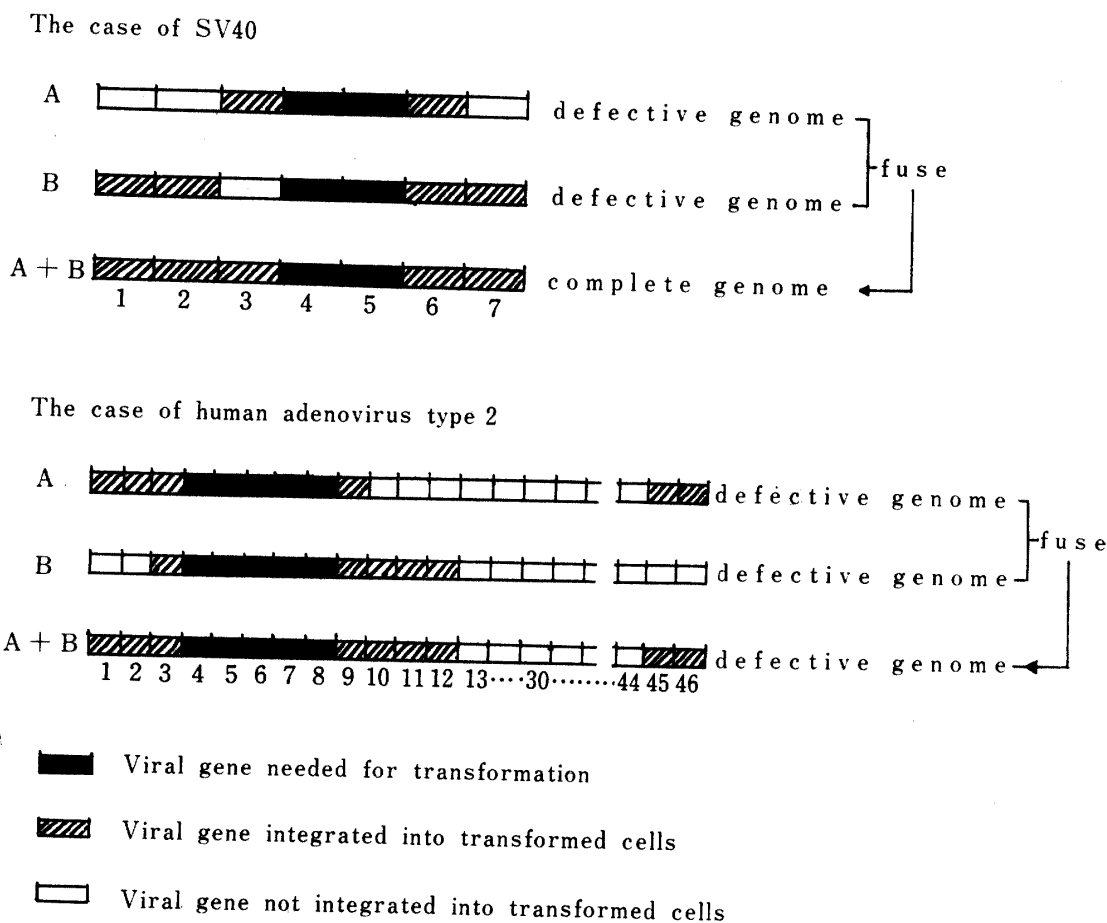
腫瘍化に必要なウイルスゲノムは、例えば SV40 の場合、小田(9)その他 (1.10) の実験からウイルス DNA のほゞ 20~25% で充分であろうと考えられている。SV40 の DNA はその分子量が 3.5×10^6 とされているので、この DNA のコードできるポリペプチッドの数は、その分子量をほゞ 50,000 とした場合4個、25,000 とした場合7個である。従って1遺伝子が1蛋白をコードするという前提で、4~7個の遺伝子があると想像できる。この20~25%に相当する遺伝子は1~2個で、従って、腫瘍化もしくはトランスホメーションはせいぜい2個の遺伝子があれば可能といえる。

第5図に模式化してある如く、SV40 でトランスホームした細胞の1つをA、他の1つをBとすると、Aではトランスホームに必要な2個のウイルス遺伝子 Nos.4,5 の他、No.3と6の遺伝子が組込まれている。しかし、遺伝子 Nos.1,2 および7が欠損しているため、A細胞からSV40 を回収することはできない。すなわち不完全な、“かたわ”のゲノムである。同様B細胞も遺伝子 No.3を欠いているため、完全ウイルスの回収はできない。

しかし、このAとB細胞を、SV40 に感受性のあるサル腎培養細胞と一緒に融合を起させると、AおよびB細胞に欠けていた遺伝子が相互に補われてSV40の完全ウイルスゲノムができ、サル腎培養細胞でウイルスの増殖がみられるようになることができる。

一方、ヒトアデノウイルスの場合を考察してみると次のようになる。

Fujinaga and Green (2)のアデノウイルス2型についての成績によると、トランスホメーションにはウイルス DNA の約4~10%が必要とされている。アデノウイルス DNA の分子量は約 2.3×10^7 で、この DNA のコードできるポリペプチッドの数は前述の方法で算出した場合23~45個となり、従って遺伝子も同数あると考えられる。この遺伝子の4~10%、すなわち1~5個の遺伝子で細胞のトランスホメーションが可能ということになる。



第5図 トランスホームした細胞中に組込まれたウイルスゲノム

Figure 5. Diagram representing the viral genome integrated into transformed cells

しかし、アデノウイルスの場合、トランスホメーションに必要なウイルスゲノムの全体に対する割合が、SV40の場合より小さく、従って逆の見方をすると、トランスホメーションに必要なウイルスゲノムと一緒に全ウイルスゲノムが細胞側に組込まれる機会が、SV40の場合より小さいといえる。従って、図に示してあるように、トランスホームしたAおよびB細胞を融合させても、なお完全ウイルスゲノムになり得ず、感染性ウイルスの回収が困難であろうというふうに考えられる。

本実験における、ICHウイルスの場合も、アデノウイルス群の一員として、ほぼ近似したDNA分子量を持っていることが推測されることから、前述のアデノウイルス2型の場合と同様に考えることができる。すなわち、ICHウイルスでトランスホームしたW-16およびTHW細胞中にはトランスホ

一メーションに関与している遺伝子と、その近隣の一部の遺伝子のみが組込まれていて、しかもお互に欠損している部分を相補えないような状態にあると考えられる。

今回の実験においては、既報(5)の HT-7 および HT-23 細胞株等も含めて細胞融合を起させ、同様のウイルスの分離を試みているが、どの組み合わせにおいても成功してないことから、感染性ウイルスを回収することは困難のように思われる。換言すれば、本ウイルスではトランスホメーションに必要なウイルスゲノムの完全ウイルスゲノム全体に占める割合は極めて小さいものであろうと推察することができる。

今後、この面を UV その他の方法で種々の程度に不活化したウイルスを用いてトランスホムさせることにより解析したい。

V 総 括

イス伝染性肝炎 (ICH) ウイルスによって、*in vitro* でトランスホム (試験管内での細胞の癌化) したhamster細胞から細胞株の作出を試み、また作出された細胞株について若干の性状を検討した結果、次の如き成績を得た。

1. ICH ウイルス Woc-4 株接種hamster胎児初代細胞に、接種後38日目にトランスホムしたホーカスが出現したが、これを継代することにより、W-16 細胞株を作出した。
2. 上記同様、Woc-4 株接種によってトランスホムしたホーカスを幼若hamster皮下に移植したところ、36日目に腫瘍の発現をみた。この腫瘍細胞を *in vitro* で継代することにより THW 細胞株を確立した。
3. 両細胞株共、継代初期はカルシウム濃度を通常の 1.2mM から 0.1mM に減じたハンクス培養液で不定期に継代した。しかし、 ≈ 10 代以降、細胞の増殖が安定したので、通常のハンクス培養液で、毎週1回定期的に継代を繰返し、現在 80 代、19ヵ月以上維持されている。
4. これら細胞のほとんどが ICH ウイルス T 抗原を細胞質内の核膜周囲に有していることが、蛍光抗体法によって示された。
5. hamster に対する腫瘍原性については、両細胞株共継代による影響なく、 $\approx 10^8$ の細胞で確実に腫瘍を発現させる。
6. 担腫瘍hamster血清を用い、既に確立された ICH ウイルス誘発hamster腫瘍由来の HT-7, HT-23 細胞をも含めて、交差補体結合反応を行なった結果、何れの組み合わせによっても陽性の成績が得られ、ICH ウイルス特異的 T 抗原の存在が確認された。
7. 両細胞株からのウイルス分離を、感受性のあるイス腎培養細胞との間で細胞融合法によって試みたが、どのような組み合わせによっても陰性に終わっている。
8. 前項の成績より、本ウイルスでトランスホムし、継代されている細胞には、ウイルスゲノムのうち、トランスホメーションに必要なごく一部のゲノムのみが、細胞内に組込まれ、継代、維持されているものと考えられる。

謝 辞

本研究は、著者が前任地北海道大学獣医学部家畜衛生学講座において行なったものを本学において引き続き実施し完結させたものである。研究の過程で種々御教示頂いた、前記講座主任梁川良教授ならびに御協力頂いた同所属大学院生、西武学士に感謝の意を表す。

なお、本研究の一部は、財団法人三菱財団の第1回(昭和45年度)自然科学研究助成費の援助によって行なった、記して謝意を表す。

文 献

- 1) Defendi, V., Jensen, F. and Sauer, G. 1967 Analysis of some viral functions related to neoplastic transformation, Ed. Colter, J. S. and Paranchych, W. The molecular biology of viruses, pp 645-666, Acad. Press, N.Y.
- 2) Fujinaga, K. and Green, M. 1970 Mechanism of viral carcinogenesis by DNA mammalian viruses VIII. Viral genes transcribed in adenovirus type 2 infected and transformed cells Proc. Nat. Acad. Sci. N.Y., **65**: 375-382
- 3) 金城俊夫 1969 イヌアデノウイルス誘発ハムスター腫瘍のT抗原 医学のあゆみ, **71** : 330
- 4) Kinjo, T., Yanagawa, R. and Fujimoto, Y. 1968 Oncogenicity of infectious canine hepatitis virus in hamsters Jap. J. vet. Res., **16** :145-158
- 5) — , — , and Nishi, T. 1968 Characteristics in tissue culture of infectious canine hepatitis virus - induced hamster tumor cells Jap. J. vet. Res., **16** :183-194
- 6) — , Nishi, T. and Yanagawa, R. 1969 In vitro transformation of hamster cells by infectious canine hepatitis virus Jap. J. vet. Res., **17** : 128-136
- 7) 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. N.Y., **61** :42-46
- 8) Koprowski, H., Jensen, F. C. and Steplewski Z. 1967 Activation of production of infectious tumor virus SV₄₀ in heterokaryon cultures Proc. Nat. Acad. Sci. N.Y., **58** :127-133
- 9) 小田鈞一郎 1968 SV₄₀, ポリオーマウイルスによる細胞のトランスホメーションの機構Ⅱ, 蛋白質 核酸 素酵, **13** :701-719
- 10) Oda, K. and Dulbecco, R. 1968 Regulation of transcription of the SV₄₀ DNA in productively infected and in transformed cells Proc. Nat. Acad. Sci. N.Y., **60** :525-532
- 11) Takemoto, K. K., Todaro, G. J. and Habel, K. 1968 Recovery of SV₄₀ virus with genetic markers of original inducing virus from SV₄₀ transformed mouse cells Virology, **35** :1-8
- 12) 内田清二郎 1969 かたわのSV₄₀ ウイルスによる細胞の癌化 医学のあゆみ, **68** :267-270
- 13) Watkins, J. F. and Dulbecco, R. 1967 Production of SV₄₀ virus in heterokaryons of transformed and susceptible cells Proc. Nat. Acad. Sci. N.Y., **58** :1396-1403

Summary

Two cell lines, named W-16 and THW, were successfully established from the hamster embryo cells transformed by infectious canine hepatitis virus.

During early passage levels, the both cell lines were cultivated with Hanks balanced salt solution with low calcium content, 0.1 mM, however, after about 10 passages, they were feeded with usual Hanks BSS (1.2 mM) .

ICH virus specific T antigen was demonstrated either in almost all cells by fluorescent antibody staining or in hamster tumors induced with these cells by complement fixation test.

The cells continuously possessed their oncogenic potency for hamsters.

ICH virus isolation in fused cells between the transformed hamster cells and dog kidney cells was negative. The data seemed to indicate that the viral genes, required for transformation, are a small part of total viral genes.