The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	野生の齧歯類Millardia meltadaからの株細胞の樹立及び腫瘍ウイルス学的検索
Author(s)	杉山, 治夫
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/32150
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【15】

氏名・(本籍)	杉山治夫（すぎやまはるお）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4563 号
学位授与の日付	昭和54年3月24日
学位授与の要件	医学研究科 病理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**野生の齧歯類Millardia meltadaからの株細胞の樹立及び腫瘍ウイルス学的検索**
論文審査委員	(主査) 教授 豊島久真男 (副査) 教授 川俣 順一　教授 高橋 理明

論文内容の要旨

〔目 的〕

Millardia はつい最近インドで捕獲された野生の齧歯類であり，体格はマウスとラットの中間で新種実験動物として有望であるが，どちらにより近縁かは全く不明である。もちろん，腫瘍ウイルス学的知見は全く得られていない。そこで，株細胞を樹立し，細胞内在性ウイルスの検索及び腫瘍ウイルス学的特徴を明らかにし，癌研究に対するこの株細胞の有用性を検討した。

〔方法並びに成績〕

(1) 4種の株細胞の樹立：Millardia の胎児を小さく切り，トリプシンで単一細胞にして培養を開始した。培養開始6カ月後，よく増殖する株細胞が樹立され，MM－Dと名づけた。またMM－Dにマウス肉腫ウイルスKirsten 株を感染させて，MM－CL4株細胞を樹立した。一方，Millardia 胎児線維芽細胞にSV40を感染させて，MM－8，MM－663株細胞を樹立した。これら4つの株細胞の染色体はMillardia の染色体の特徴をもっており，株細胞はMillardia 由来であることが確認された。

(2) 樹立された株細胞の成長曲線及び軟寒天中でのコロニー形成能：血清中の細胞分裂促進因子を除いたconditioned medium で各株細胞を培養した。MM－Dのsaturation density (cells/cm²) が非常に低いのに比し，他の株細胞は，MM－Dのそれの10～15倍の高いdensity を示した。なお，MM－Dのみがcontact indibition を示した。MM－Dは軟寒天中ではコロニーを形成できなかったが，他の株細胞はコロニーを形成し，トランスフォーム細胞の特徴を示した。

(3) 細胞内在性ウイルスの検索：Millardia の胎児線維芽細胞及びMM－8，MM－663をIdU, BrdU

及びcyclohexamide で処理したが，内在性ウイルスを検出できなかった。そこで，現在最も感度の高い内在性ウイルスの検出方法と考えられているnon -producer (NP) 細胞にinducer を処理し，誘発された内在性ウイルスによる肉腫ウイルスのrescue を見る方法を用いた。NP細胞であるMM－CL 4にIdUやBrdU を処理し，SC－1，mink あるいはmillardia 細胞と約5週間混合培養したが，培養上清からは肉腫ウイルスを検出できなかった。またinfectious center assay として，MM－CL 4にIdU を処理した後，マイトマイシンCで細胞分裂を止め，この細胞上にSC－1，mink あるいはMM－D細胞をまき込んだが，focus は形成されず，マウス肉腫ウイルスの放出が検出されなかった。なお，対照に用いたKirsten ネズミ肉腫ウイルスでトランスフォームしたBALB/3T3のNP細胞からは，上記のいずれの方法でも肉腫ウイルスを検出し得た。

(4) Moloney マウス白血病ウイルスやラット内在性ウイルスゲノムに相補的なDNA（cDNA）を用いたMillardia 細胞DNA の検索：Moloney マウス白血病ウイルスやラット内在性ウイルスのゲノムRNA に相補的なDNA（cDNA）をin vitroで合成した。これら2種のcDNA は，Millardia 細胞のDNA とはハイブリッドを形成しなかった。よって，Millardia の細胞DNA 中には，Moloney マウス白血病ウイルスやラット内在性ウイルスのウイルスゲノムと相似な塩基配列が存在しないことが示唆され，Moloney マウス白血病ウイルスやラット内在性ウ　ルスに類似な内在性ウイルスは，Millardia 細胞DNA 中には存在しないことが推測された。

(5) Ecotropic，Xenotropic 及びAmphotropic マウス肉腫ウイルスに対するMM－D株細胞の感受性：MM－D細胞に上記3種の肉腫ウイルスを感染させたが，非常に低い感受性しか示さなかった。

(6) Millardia 細胞のMoloney マウス白血病ウイルスに対する低感受性及びその原因の探究：Moloney マウス白血病ウイルスに対して，MM－D及びMM－CL 4 は非常に低い感受性しか示さなかった。そこで，この低感受性は，virus particle の細胞内への penetration 過程の阻害によるのか否かを調べた。マウス白血病ウイルスを感染させてから12時間後，細胞をつぶしてHirt の方法で低分子のDNA 分画のみを集め，この分画中のunintegrated proviral DNA を，この白血病ウイルスのcDNA を用いて検出を試みたが少量のviral DNA しか検出できなかった。このことより，これらの細胞が低感受性を示すのは，virus penetration 過程の阻害が一因であることが示唆された。

〔総　括〕

(1) 野性の齧歯類Millardia meltada より4種の株細胞を樹立した。

(2) これらの細胞からは，細胞内在性ウイルスを検出できなかった。

(3) Millardia の細胞DNA 中には，Moloney マウス白血病ウイルスやラット内在性ウイルスゲノムと相似な塩基配列が存在しなかった。

(4) Millardia 細胞は，Ecotropic，Xenotropic 及び，Amphotropic マウス肉腫ウイルスに対して低感受性であった。

(5) Millardia 細胞のEcotropic マウス白血病ウイルスに対する低感受性の一因は，virus の細胞

内へのpenetration の阻害であることが示唆された。

論文の審査結果の要旨

Millardia は，最近インドで捕獲された野生の齧歯類であり，体格はマウスとラットの中間で，新種実験動物として有望であるが，どちらにより近縁かは全く不明で，もちろん，腫瘍ウイルス学的知見は，全く得られていない。そこで，本論文では，millardia より株細胞を樹立し，細胞内在性ウイルスの検索および腫瘍ウイルス学的特徴を明らかにした。

接触阻止がよくかかる正常型の細胞は，従来からガン研究に重用されている３Ｔ３細胞に比べうる性質と，それを上廻る安定性があり，他のトランスフォームした細胞株とともに，ガン研究に役立つものと期待される。