



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 野生の齧歯類Millardia meltadaからの株細胞の樹立<br>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          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/32150">https://hdl.handle.net/11094/32150</a> |
| rights       |   |
| Note         |   |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

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

Establishment of Cell Lines from Wild  
Rodent *Millardia Meltada* and Tumor  
Virological Examination

大阪大学微生物病研究所腫瘍ウイルス部門  
(主任 豊島久真男教授)

杉山治夫 (Haruo Sugiyama)

## 序 論

Millardia melitada は、インドで捕獲された野生の齧歯類であり、ネズミ科に属する<sup>(28)</sup>。体の大きさは、マウスとラットの間であり、50本の染色体をもっている（マウスの染色体数は40本、ラットは42本である）。そして、マウスとラットとどちらにより近縁かは、まったく不明であり、新しい実験動物として有望である。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、腫瘍ウイルス学的検索を中心として、この動物のがん研究に対する有用性を検討した。数々の細胞内在性ウイルスが、鳥類から霊長類に至るまでの多くの動物に発見されており、白血病その他の発がんとも関係が深い。この細胞内在性ウイルスは、実験室で飼われている齧歯類からばかりでなく、<sup>(2)(19)</sup>野生の齧歯類からも分離されており、<sup>(3),(11)</sup>Millardia が細胞内在性ウイルスをもつかどうかということは、興味のある重要な

問題であるので、このウイルスの検索に重点を置いた。

この論文では、(1) Millardia胎児からの4つの株細胞の樹立、(2)樹立した株細胞の細胞内在性ウイルスの誘発実験、(3) Millardia細胞 DNA 中には、マウス白血病ウイルスやラット細胞内在性ウイルスに類似な塩基配列が存在するかどうか、(4)樹立された株細胞のマウス肉腫ウイルスやマウス白血病ウイルスに対する感受性、(5)マウス白血病ウイルスに対する感受性の原因の検索、について論じた。

## 材料と方法

### (1)細胞の培養

妊娠した Millardia から同腹のいくつかの胎児を無菌的に取り出し、プールし、トリプシン処理で遊離した単一細胞を培養した。細胞は、10% 熱処理ウシ胎児血清加 Eagle's MEM で培養され、単一層にまで成長した時点で、0.25% トリプシン溶液を用いて継代された。

A31-714細胞は、BALB/3T3のクローンA31のサブクローンである<sup>(15)</sup>。SC-1は、B-tropic 及び N-tropic マウス白血病ウイルス（以下 MuLV と略す。）の両者に感受性を示すマウス細胞<sup>(10)</sup>。XC細胞は、トリ肉腫ウイルスで transform したラット細胞。mink 及び mink (S+L-)細胞は、Xenotropic MuLV（以下 X-MuLV と略す。）に感受性を示す細胞。KN7-8細胞は、マウス肉腫ウイルス Kirsten株（以下 Ki-MSV と略す。）で transform した BALB/c の Non-Producer株細胞（以下 NP細胞 と略す。）である。Lyb-1は、MuLV Moloney株（以下 M-MuLV と略す。）を産生しているリンパ球の株細胞。AC細胞は、Sprague-Dawley ラットのグリオーマから樹立され、ラット細胞内在性ウイルス（以下 ACV と略す。）を産生している株細胞である。<sup>(13)</sup>

A31-714, SC-1, AC, 及び XC細胞は、5%熱処理ウシ胎児血清加 Eagle's MEM で培養され、KN7-8 及び Lyb-1細胞は、10%ウシ血清加 F12 medium で培養された。mink 及び mink (S+L-)細胞は、10%熱処理ウシ胎児血清加 McCoy 5A medium で培養され

た。すべての培養は、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$ 濃度 5% 下で行なわれた。

## (2) ウイルス

M-MuLV と ACV は、それぞれ、Lyb-1細胞と AC細胞の培養上清から得られた。Ki-MSV は、M-MuLV が感染した KN7-8細胞培養上清より得た。xenotropic と amphotropic マウス肉腫ウイルスは、mink(S+L-)細胞に、BALB/c の X-MuLV と amphotropic MuLV(以下 A-MuLV と略す。)も感染させて得た。SV40 は、同じ研究室の羽倉博士より与えられた。

## (3) 株細胞の成長曲線

血清中の細胞分裂促進因子を除くために、対数増殖期の MM-D細胞を、20% 熱処理ウシ胎児血清加 Eagle's MEM で 72時間培養し、その培養上清から、細胞片を除き、当量の Eagle's MEM と混ぜて conditioned medium を作った。 $3 \times 10^4$ 細胞を 35 mm のシャーレにまき、3日毎に、conditioned medium で培養液を交換し、細胞数を血球計算盤で算定した。

#### (4) 軟寒天中でのコロニー形成能

6 cm シャーレに 0.5% の寒天培地を 5 ml 入れ、その上に  $10^3$  個の細胞を含んだ 0.33% の寒天培地を 2 ml 重層した。1 ヶ月後、軟寒天中のコロニー数をカウントした。

#### (5) ウイルスの titration

MSV の focus assay は、Hartley と Rowe (1966)<sup>(9)</sup> の変法で、MuLV に対する XC plaque assay は、Rowe S (1970)<sup>(21)</sup> の変法である。マウス細胞に、MuLV を感染させてから 6~7 日後、XC 細胞も重層し、その 2 日後、細胞をメタノール固定し、Giemsa 染色して、XC plaque 数もカウントした。ウイルスの細胞への感染は、4  $\mu$ g/ml の polybrene 存在下で行な<sup>(25)</sup>った。

#### (6) 染色体分析

培養細胞に、0.2  $\mu$ g/ml のコルヒチンも 3 時間処理した後、細胞を、1% クエン酸ナトリウム溶液で suspend して、15 分間静置した。メタノール 3: 氷酢酸 1 の混合固定液で段階的に固定した細胞浮遊液の 1~2 滴を、エタノールでぬれ

たスライドガラスの上に落し、炎の上で燃やしてから、風乾後、Giemsa染色を行なって<sup>(7)</sup>検鏡した。

#### (7) RNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性の測定

0.04M Tris·HCl (pH 7.8), 0.06M KCl, 0.005M  $MgCl_2$ , 0.001M  $MnCl_2$ , 0.005M Dithiothreitol, 0.1% Triton X-100, 0.4 A<sub>260</sub> units/ml の poly(rA)·oligo(dT), 100  $\mu$ Ci/ml の  $^3H$ -TTP (50 Ci/mmol)<sup>(13)</sup>, 及び検体を含んだ反応液を、37°C で 1 時間反応させた後、TCA 不溶性分画の放射活性を測定した。

#### (8) Infectious Center Assay

Iododeoxyuridine (IdU と略す) で処理した NP 細胞 (6 cm シャーレ当り  $10^5$  細胞) を、マイトマイシン C で処理 (25  $\mu$ g/ml で 1 時間) し、SC-1, mink あるいは、MM-D 細胞のいずれか一つを、 $10^5$  細胞ずつ、indicator 細胞としてそれぞれのシャーレに加え、2 週間培養後、indicator 細胞上に生じた focus をカウントした。

#### (9) 電子顕微鏡

培養細胞を、2% glutaraldehyde で固定、2% osmium



tetroxideで後固定、そして、2% aqueous uranyl acetate で染色した。超薄切片を作成し、C粒子の有無について検鏡した。

#### (10) 細胞 DNA の抽出

肝のホモゲネートや培養細胞を、0.01M Tris·HCl (pH 7.4), 0.1M NaCl, 0.001M EDTA, 0.5% SDS, 100µg/ml の proteinase K で 37 °C、30 分処理後、核酸を phenol-chloroform - isoamyl alcohol (50:48:2) で 2 回、chloroform - isoamyl alcohol (48:2) で 1 回抽出した。エタノールで沈澱させて回収した核酸を、0.3M NaOH で 100 °C、20 分間処理して DNA を fragment 化し、中和した後、0.5% SDS, 100µg/ml の proteinase K で 37 °C、1 時間放置した。さらに、もう一度上記の操作で DNA を抽出し、エタノール沈澱で DNA を回収後、水に溶かして、hybridization に使用した。<sup>(22)</sup>

#### (11) ウィルス RNA に相補的な DNA (complementary DNA = cDNA) の調整

蔗糖密度勾配遠心法により濃縮精製したウィルスを、0.05M Tris·HCl (pH 7.8), 0.005M Dithiothreitol,

$0.01\text{ M MgCl}_2$ ,  $0.4\text{ mM dATP}$ ,  $0.4\text{ mM dGTP}$ ,  $0.4\text{ mM dCTP}$ ,  $0.04\%$  Triton X-100,  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  の actinomycin D,  $5\text{ }\mu\text{M }^3\text{H-dTTP}$  なども含む反応液と、 $37^\circ\text{C}$  で十数時間反応させた。その後、さらに、 $0.02\text{ M EDTA}$ ,  $0.1\text{ M NaCl}$ ,  $0.5\%$  SDS,  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  の proteinase K で  $37^\circ\text{C}$ 、1 時間処理した。それから、核酸を phenol-chloroform-isoamyl alcohol (50:48:2) で 2 回、chloroform-isoamyl alcohol (48:2) で 1 回抽出後、ウイルス RNA を、 $0.3\text{ M NaOH}$  で 2 時間処理して分解した。それから、エタノールで沈澱させて回収した DNA を、過量のウイルス RNA と anneal させ、anneal したウイルス RNA と cDNA の hybrid を、hydroxylapatite chromatography で分離し、<sup>(24)</sup>ウイルス RNA のみをアルカリ分解して cDNA を得た。

## (12) 感染細胞からの Integrate していないウイルス DNA の抽出

前日シャーレにまいた  $5 \times 10^7$  細胞に、M-MuLV を、m.o.i. (multiplicity of infection) 4 で感染させ、感染 12 時間後、Hirt の方法<sup>(12)</sup>で低分子の核酸分画のみを集めた。chloroform-isoamyl alcohol (48:2) で 3

同核酸を抽出後、エタノール沈澱で核酸を回収し、 $0.3\text{ M NaOH}$ ,  $25\text{ mM EDTA}$  で  $37^\circ\text{C}$ 、16時間 incubation して完全にウイルス RNA を分解後、さらに、20分間煮沸して、ウイルス DNA を fragment 化した。エタノール沈澱で核酸を回収後、 $200\mu\text{l}$  の水に溶かした。<sup>(8), (14)</sup>

### (13) Hybridization

hybridization は、 $0.05\text{ M Tris}\cdot\text{HCl}$  ( $\text{pH } 7.4$ ),  $0.6\text{ M NaCl}$ ,  $0.002\text{ M EDTA}$ , 約  $3,000\text{ cpm}$  の radioactivity をもった cDNA、そして複体である DNA と  $68^\circ\text{C}$  で、種々の時間 incubation することにより行なわれた。<sup>(26)</sup> hybridization の程度は、cDNA の  $\text{S1 nuclease}$  に対する低抗性によって測定された。<sup>(18)</sup>  $\text{Cot}$  値は、 $0.18\text{ M}$  の  $\text{Na}^+$  濃度での equivalent  $\text{Cot}$  値に修正して示した。<sup>(5)</sup> 感染細胞中の integrate していないウイルス DNA を検出する際は、Hirt の上清より得た  $200\mu\text{l}$  の核酸水溶液の  $10\mu\text{l}$  と cDNA を種々の時間 incubation し、incubation time と、その時の % hybridization とをプロットした。

## 実験結果

### (1) 株細胞の樹立及び染色体分析

Millardia胎児から4つの株細胞——MM-D, MM-CL4, MM-8, MM-663——を樹立した。胎児線維芽細胞の培養開始6ヵ月後(25継代培養後)、cell crisisを克服した細胞集団が出現し、ここに、MM-D株細胞が樹立された。このMM-Dは、上皮細胞様で、強いcontact inhibitionを示した。Ki-MSV(M-MuLV)でtransformしたMM-D細胞のfocusよりNP細胞を選択してMM-CL4株細胞を樹立した。また、胎児線維芽細胞にSV40を感染させてtransformした株細胞、MM-8, MM-663を樹立した。MM-D, MM-CL4, MM-8は、同一の胎児線維芽細胞由来であるが、MM-663は、別の胎児線維芽細胞由来である。

4つの株細胞はすべてMillardiaに特徴的な染色体像(No.1~2は、large subtelocentric, No.3~23は、acrocentric, No.24はmetacentric, No.25はsex chromosome)を示し、Millardia由来であることを

が確認された。Fig.1 に MM-D 株細胞の染色体像を示した。MM-D はほぼ 4 倍体 (モード 108) であり、MM-663 はほぼ 2 倍体 (モード 52) であった。MM-CL4 と MM-8 は、ほぼ 2 倍体の細胞とほぼ 4 倍体の細胞が混在していた (モードはそれぞれ 55 と 88)。

## (2) 株細胞の成長特性

Fig.2 に示したように、MM-D と MM-D 由来の MM-CL4 の成長はゆっくりであるが、SV40 で transform した MM-8, MM-663 の成長は非常に速かった。transform した 3 つの株細胞の細胞飽和密度は、正常型の MM-D に比し、10~15 倍高かった。transform した株細胞は、fibroblastic であったが、正常型の MM-D は、epithelioid であった。Table I に示すように、腫瘍化細胞の代表的なマーカーである軟寒天中でのコロニー形成能は、MM-D は陰性であったが、他の 3 つの transform した株細胞では陽性となり、腫瘍化細胞の特徴を示した。

## (3) MM-CL4 は NP 細胞

MM-CL4 の培養上清を、SC-1, mink, mink(S+L-) 及

が MM-D 細胞に感染させたが、focus は生じなかったし、SC-1 細胞での XC plaque も見当らなかった。また、MM-CL4 の培養上清を約 50~100 倍濃縮してから RNA 依存 DNA ポリメラーゼ活性を測定したが、約 1,600 cpm で control の単なる medium の活性と変わらなかった。なお、positive control に用いた Lyb-1 上清は、約 30,000 cpm と高い活性を示した。

次に、MM-CL4 が、MSV ゲノムをもっていることを証明するために MuLV による MSV の rescue を試みた。m.o.i. 2 で M-MuLV を感染させてから数回継代後、培養上清は、 $5 \times 10^2$  focus forming units (FFU) per ml の MSV を含んでいた。

以上のデータより、MM-CL4 が NP 細胞であることが証明された。

#### (4) 細胞内在性ウイルスの誘発実験

MM-8, MM-663 と 8 回継代目の Millardia 胎児神経芽細胞を、Iododeoxyuridine (IdU, 40  $\mu$ g/ml で 24 時間)、Bromodeoxyuridine (BrdU, 30  $\mu$ g/ml で 24 時間)、あるいは、cycloheximide (10  $\mu$ g/ml で 16 時間) で処理後、さら

に、dexamethasone ( $10^{-6}M$ ) を24時間処理した。以後、10日間毎日培養上清のRNA依存DNAポリメラーゼ活性を測定したが、検出できなかった。

SV40でtransformしたBALB/3T3のクローンを、30回以上継代したところ、自然に、その細胞内在性ウイルスが誘発されたという報告がある<sup>(22)</sup>ので、SV40でtransformしたMillardiaの株細胞についてもこの点を調べた。Table IIに示すように、76回継代目のMM-8、67回継代目のMM-663の培養上清のRNA依存DNAポリメラーゼ活性は、単なるmediumと変わらず、細胞内在性ウイルスの誘発がなかったことが示唆された。なお、活性測定のpositive controlとして用いたX-MuLVで感染を受けたmink(S+L-)細胞上清は、非常に高い酵素活性を示した。

また、4つの株細胞を電子顕微鏡で検索したが、細胞内在性ウイルスの粒子を発見できなかった。

(5) NP細胞を用いての細胞内在性ウイルスの

検索

: nontransforming oncovirus を検出する最も感度の高い方法は、NP細胞からの肉腫ウイルスの rescue を見る方法であると考えられており、この方法が誘発された細胞内在性ウイルスの検出に用いられている。(1),(6),(17),(27) ゆえに、Ki-MSV で transform した Millardia の NP細胞である MM-CL4 を樹立し、細胞内在性ウイルスの検索に用いた。なお、陽性対照として、マウスの NP細胞である KN7-8 を用いた。

両株細胞を、IdU (40  $\mu$ g/ml で 24 時間) で処理してから、上清の focus-forming ability を SC-1, mink 細胞、MM-D 細胞で、処理後 2 日目から 4 日目まで assay したが、IdU 処理 MM-CL4 培養上清からは、全く ability を検出できなかった。一方、IdU 処理 KN7-8 培養上清は、SC-1 も MM-D 細胞上には focus を誘発しなかったが、mink 細胞上に多くの focus を誘発し、KN7-8 細胞からマウスの xenotropic 細胞内在性ウイルスの誘発があったことが示唆された。

次に、誘発された細胞内在性ウイルスの検



出感度を上げるために、infectious center assayと、IdU処理細胞と種々の細胞との混合培養を行なった。IdU処理NP細胞を、マイトマイシンCで処理後、indicator cellとしてMM-D, SC-1, 及びmink細胞を重層し、2週間培養した。

Table IIIに示すように、IdU処理MM-CL4細胞の培養シャーレには、focusは全く見られず、内在性ウイルスの誘発を証明できなかった。一方、IdU処理KN7-8細胞の上に重層したmink細胞上には多数のfocusが見られ、xenotropic細胞内在性ウイルスの誘発があったことが示唆された。両NP細胞を、IdU(40 $\mu$ g/mlで24時間)、あるいは、BrdU(30 $\mu$ g/mlで24時間)処理後、非処理MM-CL4, SC-1, あるいは、mink細胞と約5週間混合培養した後、その培養上清のfocus forming abilityを、混合培養に用いた細胞でassayした。Table IVに示すように、inducer処理MM-CL4混合培養上清からは、全くfocus forming abilityを検出できなかったが、inducer処理KN7-8細胞とmink細胞との混合培養上清は、mink細胞上に多数のfocus

を誘発し、やはり、xenotropic 細胞内在性ウイルスの誘発があったことを示した。

以上のようにより、試行したものの方法によっても、Millardia細胞からの細胞内在性ウイルスの誘発を検出できなかった。

(6) Millardia細胞DNAにおける、マウス白血病ウイルスやラット細胞内在性ウイルスに相似な塩基配列の欠除

マウスとラットは近縁であるが、その細胞内在性ウイルスは非常に異なっており、hybridization techniqueにより、はっきり区別可能である。<sup>(4)</sup>そこで、この2つの代表的なマウスとラットの細胞内在性ウイルスに相似なウイルスを、Millardia細胞がもつかどうかを検索した。マウス細胞内在性ウイルスのかゆりによく似たM-MuLVを用い、ラット細胞内在性ウイルスには、ACVを用いて、in vitroでcDNAを合成した。

Fig.3Aに示すように、M-MuLVのcDNAと、このウイルスを産生しているA31-714細胞、非感染A31-714細胞、Fisherラット細胞、及びMillardia細胞の

DNA との hybridization を行なった。cDNA の約 70 % が、非感染性 M-MuLV 産生 A31-714 細胞の DNA と hybrid を形成したが、Fisher ラット細胞の DNA とは、cDNA の 15 % しか hybrid を形成しなかった。また、Millardia 細胞の DNA の Cot カーブが、子ウシ胸腺 DNA の Cot カーブと非常に似ていることより、Millardia 細胞 DNA と M-MuLV の cDNA との間にホモロジーがないことが示唆された。

Fig. 3B は、ラット細胞内在性ウイルス (ACV) の cDNA と、このウイルスを産生している AC 細胞、Fisher ラット細胞、C57BL/6J 細胞、及び、Millardia 細胞の DNA との hybridization の結果を示している。ACV の cDNA は、AC 細胞及び Fisher ラット細胞の DNA とは約 76 % の hybridization を示したが、Millardia 細胞や C57BL/6J 細胞の DNA とは、意味ある hybridization を示さなかった。

これらのデータから、Millardia 細胞 DNA 中には、M-MuLV や ACV の cDNA に相補<sup>的</sup>な塩基配列が存在せず、よって、Millardia 細胞は、マウスやラットの細胞内在性ウイルスに類似なウイ

ルスをもたないことが示唆された。

#### (7) マウス肉腫ウイルスに対する感受性

マウス細胞に感受性をもつ肉腫ウイルスである MSV(E-MuLV)、マウス以外の異種の細胞(例えば mink 細胞)に感受性をもつ肉腫ウイルスである MSV(X-MuLV)と、マウス細胞並びにマウス以外の異種細胞の両者に感受性をもつ肉腫ウイルスである MSV(A-MuLV)の3種の肉腫ウイルスに対する感受性を、各継代の MM-D 細胞について調べた。Table V の数字は、感受性を示しており、MSV(E-MuLV)では、A31-714 細胞に対する感受性を 1 とし、MSV(X-MuLV)と MSV(A-MuLV)では、mink 細胞に対する感受性を 1 として示した。用いたウイルスの titer が低かったのであるが、MSV(X-MuLV)に対しては、予期に反し、全く感受性を示さず、他の2種のウイルスに対しても低い感受性しか示さなかった。また、感受性は、継代によって変化し、29 継代目に一番感受性がよくなった。

#### (8) マウス白血病ウイルスに対する感受性

65継代目の MM-D, 39継代目の MM-CL4 など、A31-714細胞に、M-MuLV を m.o.i 2 で感染させ、1週間培養後、マイトマイシン C で処理 (25  $\mu$ g/ml で 1 時間) し、トリプシンではがしてから、この細胞を A31-714 細胞上にまき込んだ。そして、1週間後、M-MuLV が感染し、このウイルスを産生している細胞を XC plaque 法で検出し、各細胞の M-MuLV に対する感受性を比較した。M-MuLV に対する A31-714 細胞の感受性を 1 とすると、MM-D 細胞の感受性は  $10^{-1.2}$ 、MM-CL4 細胞の感受性は  $10^{-2.2}$  であり、Millardia 細胞は、マウス白血病ウイルス Moloney 株に対しても低い感受性しか示さなかった。

#### (9) マウス白血病ウイルスに対する Millardia 細胞の低感受性の原因

Millardia 細胞が、M-MuLV に対して低感受性であるのは、ウイルスの細胞内への侵入が阻害されるためかどうかを検討した。Millardia 細胞に M-MuLV を感染させてから 12 時間後、Hirt の方法で、細胞より低分子の核酸分画 (Hirt

の上清)を集め、この中の integrate されていない proviral DNA を、M-MuLV に対する cDNA を用いて検出した。Fig. 4 では、proviral DNA を含む Hirt の上清より得た DNA と cDNA とを incubation した時間を横軸に、その時の hybridization の程度 (%) を縦軸に えてある。Fig. 4A に示すように、59 継代目の MM-D 細胞に M-MuLV を感染させた時、proviral DNA の増加は、A31-714 細胞にくらべ少なかった。このことは、MM-D 細胞では、ウイルスの侵入から、proviral DNA の合成までの過程のどこかで阻害があることを示唆している。また、Fig. 4B に示すように、36 継代目の MM-CL4 に M-MuLV を感染させた時も、やはり A31-714 細胞に比べほんのわずかしか proviral DNA が増加せず、MM-CL4 細胞でも、ウイルスの侵入から proviral DNA 合成までの過程のどこかで阻害があることが示唆された。A31-714 細胞を基準にとると、MM-D 細胞の方が、MM-CL4 細胞より、proviral DNA の増加が大であるのは、MM-D 細胞の方が、MM-CL4 細胞より M-MuLV に対する感受

性が大であるという前述のデータと矛盾がないように思われる。なお、非感染 A31-714 細胞の Hirt 上清も、cDNA と hybridization を示すのは、DNA に integrate している細胞内在性ウイルスゲノムの Hirt 上清への混入によると考えられる。

60 継代目の MM-D 細胞に、M-MuLV を m.o.i. 2 で感染させ、約 10 日間培養後(この間 1 回継代した)、細胞 DNA を抽出して、DNA 中の integrate された proviral DNA を、M-MuLV の cDNA を用いて hybridization で調べたが、ごくわずかししか検出できなかった。MM-CL4 細胞についても同様な結果を得た。

## 考 察

樹立した 4 つの株細胞のうち、MM-D 株細胞のみが、上皮細胞様であり低い細胞飽和密度をもっていた。この株細胞は、medium change なしで約 2~3 週間維持可能である。他の 3 つ

の transform した株細胞 (MM-CL4, MM-8, MM-663) は、高い細胞飽和密度や、シャーレに付着せずに増殖する能力 (anchorage independency) のような transform した細胞に特有な特徴をもっていた。

今まで数々の種の細胞内在性ウイルスの誘発に用いられたハロゲン化ピリミジン (BrdU や IdU) や cycloheximide によつて、<sup>(2), (16), (20)</sup> Millardia の細胞内在性ウイルスを誘発できなかつた。また、最も感度の高い方法と思われる NP 細胞を用いた誘発実験でも検出できなかつた。そして、Millardia 細胞 DNA 中には、マウス白血病ウイルスやラット細胞内在性ウイルスに類似な塩基配列が存在しないことが示唆された。

Millardia 細胞は、予期に反し、xenotropic な MSV に対して感受性を示さず、ecotropic 及び amphotropic な MSV に対しても低い感受性しか示さなかつた。また、マウス白血病ウイルス Moloney 株に対しても低感受性であり、その一因は、ウイルス粒子の細胞内への侵入過程の阻害か、ウイルス RNA からプロウイルス DNA への変換の



阻害であることが示唆された。

Millardia細胞は、種々の方法で細胞内在性ウイルスが検出されないのて、細胞内在性ウイルスの関与のない、あるいは、少ない実験系を提供し、ウイルス発がん、化学発がん、あるいは、放射線による発がん実験に有用であろう。また、MM-D株細胞は、非常によく contact inhibition がかかり、長期間継代なしに培養可能であるので、in vitro の化学発がん実験に役立っている。

実験上の御指導、御助言を下さいました腫瘍ウイルス部門の羽倉明助教授、湯通堂満寿男博士ならぬに諸兄に心より感謝いたします。Millardiaを提供して下さいました国立遺伝学研究所の吉田俊秀博士、技術面での御援助を下さいました兵庫医科大学の古山順一助教授、奈良県立医科大学の村田芳明博士に心より

御礼を申し上げます。

- (1) Aaronson, S. A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68, 3069-3072 (1971).
- (2) Aaronson, S. A., Stephenson, J. R., Biochim. Biophys. Acta, 458, 323-354 (1976).
- (3) Benveniste, R. E., Callahan, R., Sherr, C. J., Chapman, V., Todaro, G. J., J. Virol., 21, 849-862 (1977).
- (4) Benveniste, R. E., Todaro, G. R., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 4090-4094 (1975).
- (5) Britten, R. J., Graham, D. E., Neufelt, B. R., Methods Enzymol., 29, 363-418 (1974).
- (6) Cabradilla, C. D., Robbins, K. C., Aaronson, S. A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 4541-4545 (1976).
- (7) Furuyama, J., "Methods in Medical Chemistry" (in Japanese), Vol. 5, pp. 436-456 (1974), Nakayama Press, Tokyo.
- (8) Gianni, A. M., Smotkin, D., Weinberg, R. A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 447-451 (1975).
- (9) Hartley, J. W., Rowe, W. P., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 55, 780-786 (1966).
- (10) Hartley, J. W., Rowe, W. P., Virology, 65, 128-134 (1975).
- (11) Hartley, J. W., Rowe, W. P., J. Virol., 19, 19-25 (1976).
- (12) Hirt, B., J. Mol. Biol., 26, 365-369 (1976).
- (13) Igarashi, K., Sasada, R., Niiijima, Y., Kozai, Y., Sugino, Y., Microbiol. and Immunol. (1978) in press.

- (14) Jolicoeur, P., Baltimore, D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 2236-2240 (1976).
- (15) Kakunaga, T., Int. J. Cancer, 12, 463-473 (1973).
- (16) Klement, V., Dougherty, M. F., Roy-Burman, P., Pal, B. K., Shimizu, C. S., Rongy, R. W., Nelson-Rees, W., Huebner, R. J., Virology, 85, 296-306 (1978).
- (17) Klement, V., Nicolson, M. O., Huebner, R. J., Nature (London) New Biol., 234, 12-14 (1971)
- (18) Leong, J. A., Garapin, A. C., Jackson, N., Fanshier, L., Levinson, N. E., Bishop, J. M., J. Virol., 9, 891-902 (1972).
- (19) Rasheed, S., Bruszewski, J., Rongey, R. W., Roy-Burman, P., Charman, H. P., Gardner, M. B., J. Virol. 18, 799-803 (1976).
- (20) Robinson, H. L., Swanson, C. A., Hruska, J. F., Crittenden, L. B., Virology, 69, 63-74 (1976).
- (21) Rowe, W. P., Pugh, W. E., Hartley, J. W., Virology, 42, 1136-1139 (1970).
- (22) Smith, H. S., Turner, S., Leong, J., Rigby, P. W. J., J. Virol., 19, 146-153 (1976).
- (23) Specter, D. H., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 4102-4106 (1978).
- (24) Stehelin, D., Guntaka, R. V., Varmus, H. E., Bishop, J. M., J. Mol. Biol., 101, 349-365 (1976).
- (25) Toyoshima, K., Vogt, P. K., Virology, 38, 414-426 (1969).
- (26) Weiss, S. R., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Cell, 12, 983-992 (1977).

(27) Wu, A. M., Schultz, A., Gallo, R. C., J. Virol., 19, 108-117 (1976).

(28) Yosida, T. H., Laboratory Animals, 12, 73-77 (1978).

Table I. Colony Formation in Soft Agar

| Cell lines | Efficiency of colony formation in soft agar (%) |        |      |        |
|------------|---|--------|------|--------|
|            | MM-D  | MM-CL4 | MM-8 | MM-663 |
| Expt 1     | < 0.1   | 15.6   | -    | 7.6    |
| Expt 2     | < 0.1   | 21.4   | 21.0 | 9.3    |

Efficiency is expressed as the percentage of cells forming colonies among the total cells seeded.

Table II. Reverse Transcriptase Activity in Long-term Cultures  
of Millardia Cells Transformed with SV40

| Culture fluid<br>from                     | Passage | Uptake of $^3\text{H}$ -TTP<br>( CPM ) |
|---|---------|--|
| -<br>(medium only)                        | -       | 1,527                                  |
| Mink(S+L-) infected<br>with BALB/c X-MuLV | -       | 436,798                                |
| MM-8                                      | 76      | 1,495                                  |
| MM-663                                    | 67      | 1,548                                  |

Before the test culture fluids were concentrated 50-100 times.

Table III. Infectious Center Assay of IdU-treated MM-CL4

| Cell line | Inducer | Foci on (foci/dish) |                   |                  |
|-----------|---------|---------------------|-------------------|------------------|
|           |         | SC-1 cells          | Mink cells        | MM-D cells       |
| MM-CL4    | IdU     | 0                   | 0                 | 0                |
|           | (-)     | 0                   | 0                 | 0                |
| KN7-8     | IdU     | 0                   | $2.0 \times 10^3$ | NT <sup>a)</sup> |
|           | (-)     | 0                   | 0                 | NT               |

a) not tested



Table IV. Co-cultivation of Inducer-treated MM-CL4 with SC-1,  
Mink, and Millardia cells

| Cell   | Inducer            | Co-cultivation<br>with | Assayed<br>on       | Infectivity of<br>culture fluid<br>(FFU/ml) |
|--------|--------------------|------------------------|---------------------|---|
| MM-CL4 | IdU <sup>a)</sup>  | MM-CL4                 | Millardia<br>(MM-D) | 0   |
|        | BrdU <sup>b)</sup> | MM-CL4                 | Millardia           | 0   |
|        | IdU                | SC-1                   | SC-1                | 0   |
|        | BrdU               | SC-1                   | SC-1                | 0   |
|        | IdU                | Mink                   | Mink                | 0   |
|        | BrdU               | Mink                   | Mink                | 0   |
| KN7-8  | (-)                | SC-1                   | SC-1                | 0   |
|        | IdU                | SC-1                   | SC-1                | 0   |
|        | BrdU               | SC-1                   | SC-1                | 0   |
|        | (-)                | Mink                   | Mink                | 0   |
|        | IdU                | Mink                   | Mink                | $1.0 \times 10^4$                           |
|        | BrdU               | Mink                   | Mink                | $4.5 \times 10^3$                           |

a) 40 µg/ml, for 24 h

b) 30 µg/ml, for 24 h

Table V. Sensitivity for Murine Sarcoma Virus

| Passage | Foci on Millardia cell/ Foci on permissive cell |               |               |
|---------|---|---------------|---------------|
|         | MSV (E-MuLV)                                    | MSV (X-MuLV)  | MSV (A-MuLV)  |
| 9       | $< 10^{-4.6}$                                   | $< 10^{-2.3}$ | $< 10^{-2.2}$ |
| 29      | $10^{-2.7}$                                     | $< 10^{-2.7}$ | $10^{-1.4}$   |
| 44      | $10^{-5.3}$                                     | $< 10^{-3.1}$ | -             |
| 51      | $10^{-3.7}$                                     | $< 10^{-2.0}$ | $< 10^{-3.1}$ |

## FIGURE LEGENDS

Fig.1 Typical metaphase chromosomes of MM-D (chromosome No.=108)

Fig.2 Growth curves of cell lines

The cells ( $3 \times 10^4$ ) were plated in 35-mm petri dishes with conditioned medium. At appropriate time cells were suspended by trypsinization and counted in a hemocytometer. MM-663 (○), MM-8 (●), MM-CL4 (△), MM-D (▲).

Fig.3 Hybridization of mouse and rat leukemia viral cDNA with Millardia cell DNA

(A)  $^3\text{H}$ -cDNA of M-MuLV was hybridized with cellular DNA of : A31-714 producing M-MuLV (○); A31-714 (●); Fisher rats (△); Millardia (▲); calf thymus (×).

(B)  $^3\text{H}$ -cDNA of rat endogenous virus (ACV) was hybridized with cellular DNA of : AC cells producing ACV (○); Fisher rats (●); C57BL/6J (△); Millardia (▲); calf thymus (×).

Fig.4 Detection of unintegrated proviral DNA in Millardia cells infected with Moloney murine leukemia virus

(A) A31-714 cells infected with M-MuLV (○), MM-D cells infected with M-MuLV (●), uninfected A31-714 cells (△), uninfected MM-D cells (▲).

(B) A31-714 cells infected with M-MuLV (○), MM-CL4 cells infected with M-MuLV (●), uninfected A31-714 cells (△), uninfected MM-CL4 (▲).

Fig. 1



Fig. 2

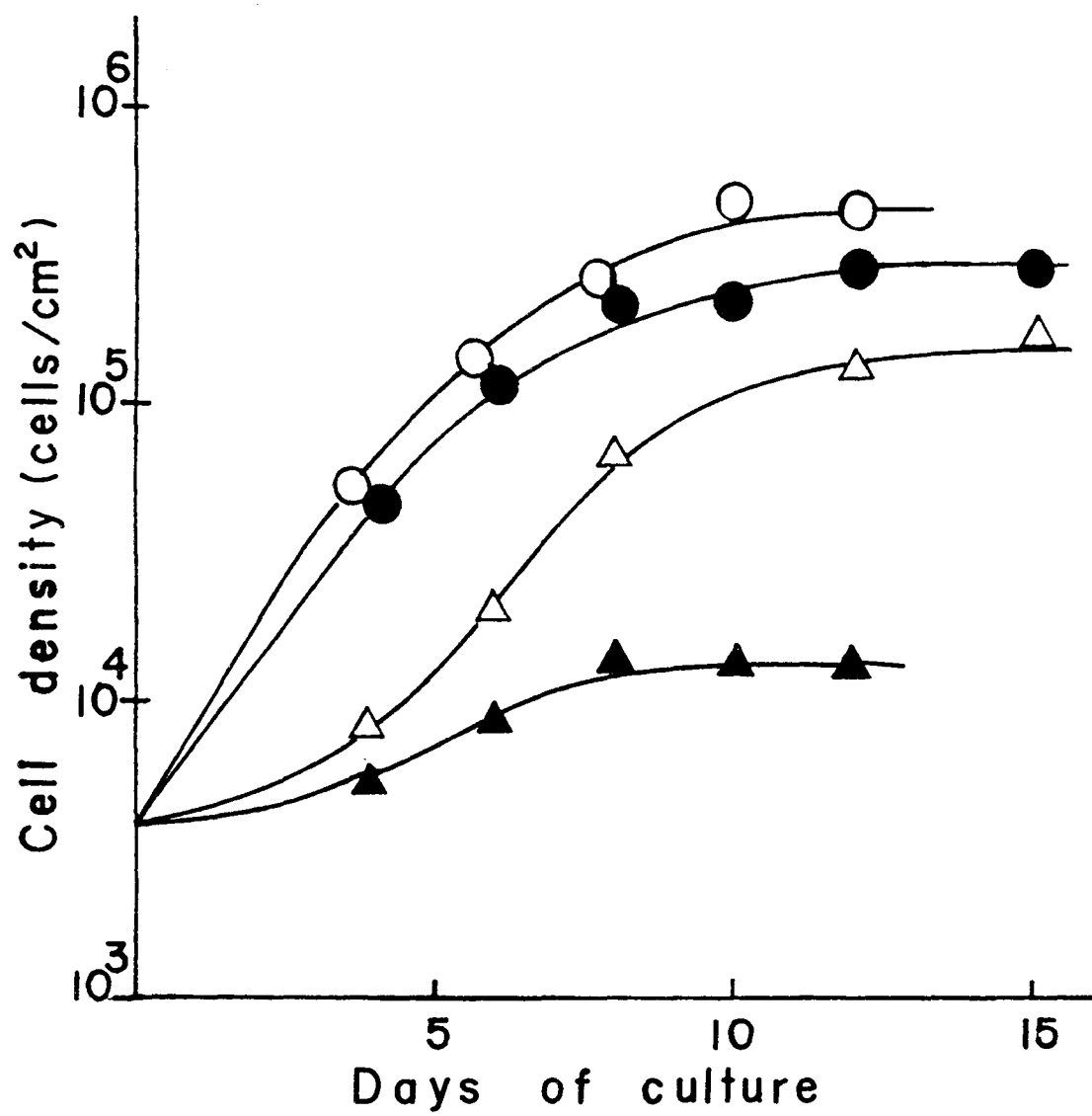


Fig. 3

