



Title	野生の齧歯類 <i>Millardia meltada</i> 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

野生の齧齒類 *Millardia meltada* か S 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 meltada は、イシドで捕獲された野生の齧歯類であり、ネズミ科に属する。⁽²⁸⁾ 体の大きさは、マウスとラットの中間であり、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、鳥類から靈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、野生の齧歯類からも分離されたり、^{(2),(19)} 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の塩基配列が存在するかどうか、(4)樹立し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既感受性の原因の検索、について論じた。

材料と方法

(1) 細胞及び培養

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⁽¹⁵⁾。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⁽¹⁰⁾。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。）を產生しているリンパ球の株細胞。AC細胞は、Sprague-Dawley ラットのク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。）を產生している株細胞である⁽¹³⁾。

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°C、CO₂濃度5%下で行なわれた。

(2) ウイルス

M-MuLV 及び ACV は、それぞれ、Lyb-1細胞又び 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 及び amphotropic マウス肉腫ウイルスは、mink(S+L-)細胞に、BALB/c の X-MuLV 及び amphotropic MuLV(以下 A-MuLV と略す。)を感染させて得た。SV40 は、同じ研究室の羽倉博士より分与された。

(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 とまぜて conditioned medium を作った。 3×10^4 細胞を 35 mm のシガーレにまき、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) 軟寒天中のコロニー形成能

6cm シャーレに 0.5% の 寒天培地を 5ml 入れ、その上に 10^3 個の細胞を含んだ 0.33% の 寒天培地を 2ml 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 & Rowe (1966)⁽⁹⁾ の変法で、MuLV に対する XC plaque assay は、Rowe S (1970)⁽²¹⁾ 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 細胞を重層し、その 2 日後、細胞をメタノール固定し、Giemsa 染色して、XC plaque 数をカウントした。ウイルスの細胞への感染は、4μg/ml の polybrene 存在下で行なった。⁽²⁵⁾

(6) 染色体分析

培養細胞に、0.2μg/ml のコルヒツンを 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、エタノールでぬり

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 (7) 捲鏡した。

(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 MgCl₂, 0.001M MnCl₂, 0.005M Dithiothreitol, 0.1% Triton X-100, 0.4A₂₆₀ units /ml の poly(rA)•oligo(dT), 100 Ci/ml の ³H-TTP (50 Ci/mmol), 及び 標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

Iodo-deoxyuridine (IdUと略す) で処理した NP 細胞 (6 cm シャーレ当たり 10^5 細胞) を、マイトマイシン C で処理 (25 μg/ml で 1 時間) し、SC-1, mink あるいは、MM-D 細胞のいずれか 1 つを、 10^5 細胞づつ、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

tetraoxide 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

肝のホモゲネートを培養細胞を、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。エタノールで沈殿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、エタノール沈殿で DNA を回収後、水に溶かして、hybridization に使用した。⁽²²⁾

(11) ウイルス 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イルスを、0.05M Tris-HCl (pH 7.8), 0.005M Dithiothreitol,

0.01M $MgCl_2$, 0.4mM dATP, 0.4mM dGTP, 0.4mM dCTP, 0.04% Triton X-100, 100 μ g/ml の actinomycin D, 5 μ M 3H -dTTP を含む反応液と、37°C で十数時間反応させた。その後、さしに、0.02M EDTA, 0.1M NaCl, 0.5% SDS, 100 μ g/ml の proteinase K で 37°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、0.3M NaOH で 2 時間処理して分解した。それから、エタノールで沈殿させて回収した DNA を、過量のウイルス RNA と cDNA の hybrid を、hydroxylapatite chromatography で分離し⁽²⁴⁾、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

前回シートにまいた 5×10^7 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⁽¹²⁾で低分子の核酸分画のみを集めた。chloroform - isoamyl alcohol (48:2) で 3

回核酸を抽出後、エタノール沈殿で核酸を回収し、0.3M NaOH, 25mM EDTA で 37°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。エタノール沈殿で核酸を回収後、200 μl の水に溶かした。^{(8), (14)}

(13) Hybridization

hybridization は、0.05M Tris-HCl (pH 7.4), 0.6M NaCl, 0.002M EDTA, 約 3,000 cpm の radioactivity をもつた cDNA、そして複体である DNA と 68°C で、種々の時間 incubation することにより行なわれた。⁽²⁶⁾ hybridization の程度は、cDNA の S1 nuclease に対する抵抗性によって測定された。⁽¹⁸⁾ Cot 値は、0.18M の Na^+ 濃度での equivalent Cot 値に修正して示した。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 μl の核酸水溶液の 10 μl と cDNA を種々の時間 incubation し、incubation time と、その時の % hybridization 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 5 種の株細胞—MM-D, MM-CL \times , MM-8, MM-663—を樹立した。胎児線維芽細胞の培養開始 6 カ月後（25 紹代培養後）、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-CL \times 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-CL \times , 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。

5 種の株細胞はすべて 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

が確認された。Fig.1 に MM-D 株細胞の染色体像を示した。MM-1 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 × 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つた。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 倍高かつた。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

べ" MM-D 細胞に感染させたが、focus は生じなかつたし、SC-1 細胞での XC plaque も見当らなかつた。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つた。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 ゲノムをもつてゐ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、 5×10^2 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 及び 8 回継代目の Millardia 胎児組織芽細胞を、Iododeoxyuridine (IdU, 40 μg/ml で 24 時間)、Bromodeoxyuridine (BrdU, 30 μg/ml で 24 時間)、あるいは Cycloheximide (10 μg/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 X ラーゼ活性を測定したが、検出できなかつた。

SV40 で transform した BALB/3T3 のクローニを、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⁽²²⁾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 X 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つ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つた。

(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(1),(6),(17),(27)用いられている。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 μ g/mlで24時間)で処理してから、上清のfocus-forming abilityをSC-1, mink及び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を検出できなかつた。一方、IdU処理KN7-8培養上清は、SC-1やMM-D細胞上にはfocusを誘発しななかつたが、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つ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 处理細胞と種々の細胞との混合培養を行なつた。IdU 处理 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 处理 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つた。一方、IdU 处理 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つたことが示唆された。両 NP 細胞を、IdU (40 μ g/ml で 24 時間)、あるいは、BrdU (30 μ g/ml で 24 時間) 处理後、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 处理 MM-CL4 混合培養上清からは、全く focus forming ability を検出できなかつたが、inducer 处理 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つたことを示した。

以上のように、試行したひの方法によつてでも、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つた。

(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つており、hybridization techniqueにより、はつきり区別可能である。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わりによく似たM-MuLVを用ひ、ラット細胞内在性ウイルスには、ACVを用ひて、in vitroでcDNAを合成した。

Fig.3Aに示すように、M-MuLVのcDNAと、このウイルスを產生している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 を行なつた。cDNA の約 70% が、非感染又は M-MuLV 產生 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 を形成しなかつた。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ゐることより、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、このウイルスを產生している AC 細胞、Fisher ラット 細胞、C57BL/6J 細胞、又は Millardia 細胞の DNA との hybridization の結果を示してゐる。ACV の cDNA は、AC 細胞及ぶ 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 を示さなかつた。

これらのデータから、Millardia 細胞 DNA 中には、M-MuLV や ACV の cDNA に相補的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

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) 及び、マウス細胞並びにマウス以外の異種細胞の两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) 及び 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つた。また、感受性は、継代によつて変化し、29 継代目に一番感受性がよくなつた。

(8) マウス白血病ウイルスに対する感受性

65 繼代目の MM-D, 39 繼代目の MM-CL4 及び、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 mg/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、このウイルスを產生している細胞を 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 株に対する感受性しか示さなかつた。

(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(%)を縦軸にとっている。Fig.4Aに示すように、59 繼代目の 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つた。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 繼代目の 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 繼代目の 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、ごくわずかしか検出できなかつた。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つていた。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つていた。

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ケン化ビリミジン (BrdU + IdU) + cycloheximide によって、^{(2), (16), (20)} 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 株に対する低感受性であり、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で、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つであろう。

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び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。

参 考 文 献

25

- (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., Niijima, 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 from	Passage	Uptake of ^3H -TTP (CPM)
-	-	1,527
(medium only)		
Mink (S+L-) infected 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	0	0
KN7-8	IdU	0	2.0×10^3	NT ^{a)}	NT ^{a)}
	(-)	0	0	NT ^{a)}	NT ^{a)}

a) not tested

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

Cell	Inducer	Co-cultivation with	Assayed on	Infectivity of culture fluid (FFU/ml)
MM-CL4	IdU ^{a)}	MM-CL4	Millardia (MM-D)	0
	BrdU ^{b)}	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	1.0×10^4
	BrdU	Mink	Mink	4.5×10^3

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 (3×10^4) 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 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 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





