



Title	BFマウス骨肉腫にみられたA型およびC型ウイルス粒子の腫瘍原性の証明
Author(s)	栗崎, 英二
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32656
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 ・ (本籍)	栗 崎 英 二
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 4 8 9 0 号
学位授与の日付	昭 和 55 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科 外科系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	BF マウス骨肉腫にみられた A 型および C 型ウイルス粒子の 腫瘍原性の証明
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小野 啓郎 (副査) 教 授 坂本 幸哉 教 授 豊島久真男

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

マウス骨肉腫にみられた virus particles の腫瘍原性の証明

〔方 法〕

自然発生のマウス骨肉腫の継代腫瘍 BF sarcoma は CBA mouse で継代し、その腫瘍細胞の培養株細胞である BFO cells は 37℃, 5 % CO₂ incubator の中で 10% fetal bovine serum を加えた Eagle MEM を培養液とし、60mm plastic petri dish にて培養している。embryo cells は妊娠 mice ・ rats からとった embryos の頭部を除いて細かく切り、37℃ で 1 時間 0.25 % trypsin で処理して培養した。電子顕微鏡による検索は通常の方法で固定・脱水し、Epon 812 に包埋して超薄切片を作製。透過型電子顕微鏡により観察した。reverse transcriptase assay は BFO cells の培養液を超遠沈して得られる virus を含んだ沈澱を detergent で処理し、³H でラベルした nucleotide の取りこみを hybrid polymer の存在下に測定した。buoyant density は ³H でラベルした uridine または thymidine を BFO cells に取りこませ、培養上清の硫酸沈澱分画を緩衝液で透析した後、15~60% の sucrose または 5 ~40% の Ficoll の濃度勾配で 30,000 r. p. m., 8 時間遠沈により分画した material 中への isotope の取りこみを Packard liquid scintillation spectrometer で測定した。

virus の核酸の抽出および電気泳動の分析は Bader らの方法により、2 % polyacrylamide, 0.5 % agarose gel でおこなった。cell transformation は BFO cells の培養液の遠沈上清を polyvinyl-pyrrolidone 処理した pore size 0.45 μm の HA millipore filter を通過させ、前日 seeding してまだ sparse な embryo cells に 37℃ で 1 時間感染させた後、37℃ ・ CO₂ incubator で培養して得た。

chromosome analysisはsubculture後48時間の培養細胞を $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ のcolchicineを加えて3時間培養し、trypsin処理後0.9%クエン酸ソーダの低張液で処理し、methanol 3: acetate 1の固定液で固定後、slide glass上に滴下して光顕(1500倍)で写真撮影してchromosome numberの測定をおこなった。

蛍光抗体間接法はBFO cellsまたはtransformed cellsによる担癌マウスの血清を一次血清とし、抗マウスIgG うさぎ血清とFITCをconjugateした液を二次血清としてBFO cellsとtransformed cellsについて検討した。

alkaline phosphatase (ALP) 活性の測定にはALP測定用キットALP-S (ヤトロン) を用い、発色値を日立spectrophotometerを用い $500\text{m}\mu$ で測定した。

[成 績]

電顕によるとBF sarcoma, BFO cellsの細胞内にtype-A virus, また細胞外にtype-C virusがみられた。reverse transcriptase活性はdetergent処理後hybrid polymerの存在のもとでnucleotideの取りこみは著しい上昇を示すが、detergent処理しなかったもの、熱処理をしたもの、あるいはhybrid polymerを加えないものではnucleotideの取りこみの上昇はみられなかった。buoyant densityでは ^3H -thymidineの取りこみはみられず、 ^3H -uridineの取りこみのpeakがみられ、そのdensityはsucroseでは $1.16\text{g}/\text{ml}$ 、Ficollでは $1.07\text{g}/\text{ml}$ であった。これにより、このvirus particlesはRNA virusであることがわかった。また、これと電気泳動の結果より、virus RNAの大きさは約72sであった。cell transformationはCBA mouse・C3H mouse・C57 BLACK/6 mouse・Wistar rat・Sprague-Dawley ratなどのembryo cellsで生じ、感染後3～4週では肉眼でも認めるfocus formationがみられたが、人のembryo cellsではtransformationはみられなかった。CBA mouseのtransformed cellsについてその細胞をクローン化した。その形態はBFO cellsより均一で小型であり、sparseなところでは多角形をしており、紡錘形の細胞や多核の細胞は非常に少ない。doubling timeはBFO cellsよりやや短かった。ALP活性は $38.8\mu\text{mol}/\text{mg prot}/15\text{min}$ でBFO cellsの13.9, embryo cellsの0.1よりもはるかに高値を示した。chromosome numberはtransformed cellsでは59, BFO cellsでは63にmodeをもっていた。蛍光抗体法ではどちらの培養細胞も膜の一部にgranularな蛍光を認め、BFO cellsとtransformed cellsの間にはcross reactionがみられた。CBA mouseにtransformed cellsを接種するとBF sarcomaの腫瘍細胞より均一な細胞からなる実質性の腫瘍を形成し、BF sarcomaではみられなかったはっきりした腫瘍性のosteoidが認められた。

[総 括]

BFO cellsには電顕的観察によりRNA virusと思われるvirus particlesを認めた。virus particlesを含む培養上清について浮上密度とuridineの取りこみ・電気泳動パターン・逆転写酵素活性より、BF sarcoma virusはRNA virusであることが証明された。このvirusはmiceやratsの培養embryo cellsでcell transformationを起こす。transformed cellsはBFO cellsと比較すると、形態的に均一でdoubling timeも短く、細胞内のALP活性は高値を示す。これをmouseに接種してできた腫瘍はBF sarcomaより均一な腫瘍細胞よりなり、BF sarcomaではみられなかったosteoid

の形成を認める。これから cell transformation を介して virus の腫瘍原性が証明され、自然発生の BF sarcoma が実験的に骨肉腫を発生させる oncogenic RNA (oncornavirus) を産生していることがわかった。

論文の審査結果の要旨

本研究は BF sarcoma に存在する virus particles についてウィルス学的検索をするとともにその cell transformation について検索した。ウィルス学的検索は電顕的観察・buoyant density・電気泳動 pattern・reverse transcriptase 活性の測定をおこない virus particles は RNA virus であることを証明した。また、cell transformation を観察し、transformed cells をクローン化おこない。この transformed cells が in vivo で osteosarcoma を形成するのを観察した。

これにより、この virus particles は cell transformation を介して腫瘍原性が証明され、RNA 腫瘍 virus であることが証明された。本研究は学位論文として価値あるものと考えられる。