



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32656">https://hdl.handle.net/11094/32656</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*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 4890 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°C, 5%CO<sub>2</sub> 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°C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、<sup>3</sup>H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<sup>3</sup>H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 0.45μmのHA millipore filterを通過させ、前日seedingしてまだsparseなembryo cellsに37°Cで1時間感染させた後、37°C · CO<sub>2</sub> 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 处理後 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 处理後 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 处理しなかったもの, 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  $^3\text{H}$ -thymidine の取りこみはみられず,  $^3\text{H}$ -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うる 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ニングした。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, 紡錐形の細胞や多核の細胞は非常に少い。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 (oncorna) virus 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 についてウイ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。ウイ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 をクローニングをおこない。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。