

氏名(本籍) 草野敬久

学位の種類 医学博士

学位記番号 医第482号

学位授与年月日 昭和43年3月4日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

最終学歴 昭和36年3月
東北大学大学院理学研究科修士課程
修了

学位論文題目 *In vitro* malignant transformation of the
embryonal hamster brain cells by human
adenovirus type 12 and the general
characteristics of the transformed cells
in vitro

(人アデノウイルス12型によるハムスター
胎児脳細胞の試験管内悪性変換及変換細胞の
一般的性状)

(主査)

論文審査委員 教授 山根 續 教授 石田 名香雄

教授 佐藤 春郎

論 文 内 容 要 旨

腫瘍ウイルスに依る細胞の *in vitro* transformation は、細胞の悪性変換の初期の変化の解明に重要な手段を供している。ヒトアデノウイルス 12 型は数種の歯齶類に腫瘍を作る事が報告された。しかしその後の試験管内に於ける細胞変換の研究は適当な培養細胞が見出されず進展しなかつた。

そこで腫瘍の組織発生を考慮しながら培養細胞系の開発につとめた結果、ハムスター胎児の脳組織、初期培養系が高率に transformation を起す系である事を見出した。ハムスター胎児の脳細胞は explant culture 法により培養された。その二代目培養の細胞 1 ケ当り 1 ~ 500 ケの範囲でウイルスが接種された。この際用いた培地は Eagle の MEM に 5% 仔牛血清を添加したものである。一般の細胞培養に於けるよりも血清濃度を下げているのは、予備試験で正常細胞の増殖を抑えておいた方が発生してくる transformed colony の増殖を促進する事が見出された事、及び transformed colony が見出し易くなると云う事による。

Transformed colony は細胞当り 10 ケ以下のウイルス接種では発生しない。10 ケから 100 ケ迄の感染では急速に transformation の率が上昇する。しかし 500 ケの感染では逆に transformation が起こりにくくなる。但しウイルス濃度が濃くなれば細胞障害が増大するので、それが原因の 1 つであろうと思われる。

これ迄の繰返しの実験の結果、植込細胞数 20×10^4 ケに 1 ケの割合で transform する。Transform した細胞は急速な増殖能を得て、互に重なり合つた形で colony を形成する。幾つかの colony は、細胞の性質を調べる為、継代培養された。この様にして、これ迄 7 つの異つた株が得られたが、形態的にはいずれも上皮様である。但し大きさは HeLa 細胞の数分の 1 程度の小さな細胞である。増殖は旺盛で永続的である。従つて多くの培養細胞が、株化する迄に遭遇する増殖の停滞が認められず、transformation の初期に、*in vitro* での永久増殖能を獲得している事を示している。補体結合反応及び蛍光抗体法に依る試験で、細胞は継代初期から長期にわたつて T 抗原を産生しており、これら細胞がウイルスに依つて変換した事を示している。

しかし感染性のウイルスは、これ迄の所見出されていない。試験管内で transform した細胞が悪性変換したかどうかは重要な問題なので丹念に調べられた。結果はいずれも transform した早期に、同種動物に対して造腫瘍性のある事を示し、TPD₅₀ は 1 ~ 2 ケ月の動物で

は 10^6 前後の細胞数であり、新生児では数千ヶの細胞数であつた。腫瘍を持つた動物は 2~3 ケ月で斃れる。

以上の事から、アデノウイルスに依るハムスター細胞の transformation では、その幼若期脳組織の培養細胞が効率的な系であり、transform した細胞は旺盛な増殖能の獲得と同種動物への移植性を獲得し、即ち *in vitro* で悪性変換を起した事を示している。

その他附随した細胞性状としては、5%炭酸ガス孵卵器内でなければ良く増殖出来ない事、 CaCl_2 の濃度の変化に可逆的に細胞の凝集塊を作る事が特徴的であるが、それらがウイルスゲノムの導入に依るものかどうかは、今後の検討に待たなければならぬ。

審 査 結 果 の 要 査

従来アデノウイルスによる試験管内発癌実験に関しては、2, 3の報告が見られるが、SV₄₀やポリオーマ、ウイルスによる実験に比べて、発生率と再現性が極めて低く、到底系統的継続的研究法とはなり得なかつた。

著者はアデノウイルス12型による腫瘍の target cell が神経膠細胞系のきわめて幼弱なものであろうという小川教授らの病理学的研究にヒントを得て、試験管内発癌実験を試みたところ、従来の報告より発生頻度が多く又再現性のある癌化細胞の focus を得た。そこで著者はこれらの focus 細胞を分離培養して、その腫瘍性、腫瘍抗原 (T 抗原) 保持性について調べたところ、いずれも悪性細胞であり、又 T 抗原を保持していることが判明したが、種々の探索を試みたくも拘らずこの細胞からはいずれもウイルスの放出を認める事が出来なかつた。ならに試験管内増殖性についても調べられたが培地内カルシウム存在によりこの細胞の増殖形式が微妙に影響されることが判つた。この細胞の染色体は正2倍体と偽2倍体のモザイクであることも認められた。

この様な研究はヒトのウイルスによる発癌機序に関して根本的な解明に大きく寄与する充分云いるので、本論文は学位を授与するに充分足るものと認められる。