

ヒト胎児細胞の *in vitro* における X 線, 腫瘍ウイルス単独および重複処理による変換現象

Transformation of Human Embryo Cells by X-irradiation and
Rous Sarcoma Virus *In Vitro*

千葉大学医学部産科婦人科学教室

高 根 健 Takeshi TAKANE

概要 ヒト胎児の細胞を *in vitro* で培養し、継代7代、培養109日目あるいは継代11代、培養141日目の細胞を 10^5 TD₅₀ 前後の Rous 肉腫ウイルス Schmidt-Ruppin 株 (SR-RSV と略す) で処理すると、処理後2週間前後から処理細胞の形態的変換がみとめられ、その変換細胞 10^5 コ前後をニワトリヒナ翼下に接種すると肉腫が発生し、ウイルスゲノムの存在が証明された。しかし、RSV単独処理による変換細胞は継代とともに脱落し、無処理対照細胞とは相前後して継代が困難となった。

同様にヒト胎児の培養細胞を 150R の X線照射処理を行うと、処理後一時増殖が止まるが処理後3日前後から再び増殖を開始する。しかしながら6ヶ月間の観察期間中形態的変換は認められなかった。

X線照射後、 10^5 TD₅₀ 前後の SR-RSV で重複処理を行うと、SR-RSV 単独処理の場合と相前後して処理細胞の形態的変換がみとめられたが、SR-RSV 単独処理による変換細胞と形態的変換、増殖、継代、軟寒天内コロニー形成能、移植性などの点で著しい相違は認められなかった。

緒 言

腫瘍ウイルスによる試験管内変換現象の報告は、Vogt および Dulbecco (1960) がマウスの細胞を、次いで Sachs et al. (1961) がハムスター胎児細胞をポリオーマウイルスで感染処理することにより始められた。

ヒト細胞は他の哺乳動物の細胞と同様に、*in vitro* で Rous Sarcoma Virus (RSV と略す) により感染処理すると処理細胞は変換する (Jensen et al. (1964), Zilber および Shevlyaghyn (1964), Stenkvist および Ponten (1964), 桑田ら (1968), 関谷ら (1970)。変換ヒト細胞は感染性ウイルスを産生しないが RSV ゲノムをもっている (Stenkvist (1966a))。この細胞-ウイルスの関係は、ラット、ハムスターおよびサルなどの他の哺乳動物においても同様にみられる (Svoboda (1966))。RSV により *in vitro* で悪性変換した他の哺乳動物の細胞は長期間安定した増殖を続け、同系のホストに接種することにより進行性の腫瘍をつくる

が、RSV で変換したヒト細胞では長期間安定した増殖を続けたという報告はない (Stenkvist (1966b) 関谷ら (1970))。しかも増殖および継代などの点で無処理対照との著明な相違は認められなかった。これらの結果から腫瘍ウイルスによつて *in vitro* で変換したヒト細胞については次の2点が問題として残る。第1は、いかに RSV 変換ヒト細胞を *in vitro* で長期間安定して増殖させ得るか、第2は、変換ヒト細胞が他の哺乳動物の変換細胞と同様に悪性である種々の性質を有するかどうかということである。

一方、X線などの放射線処理によつて *in vivo* で種々の細胞が悪性化することが報告され、*in vitro* では Borek および Sachs (1966) がハムスター胎児細胞をガラス器内で培養し、これに 300R の X線を照射することにより悪性化することを報告した。*in vivo* でウイルスおよび他の発癌因子を単独あるいは重複処理し、その相互作用を検討した報告は Duran-Raynals (1963) の総説に詳説し

であるが *in vitro* での報告は少ない。

本実験ではヒト胎児の細胞を *in vitro* で培養し、SR-RSV 単独、X線単独あるいはX線照射後SR-RSV で重複処理することによる変換現象を比較検討した。

実験方法

1. 細胞培養

妊娠3カ月で人工中絶をうけた婦人の全胎児2例 (HuE₅ 細胞, HuE₆ 細胞) を無菌的に細切し、PBS で洗滌、組織小片を0.25%トリプシン液 (Difco) で消化した。単細胞を集め Eagle (1959) の培地に biotin 0.25mg/l, penicillin 100 u/ml, streptomycin 100μg/ml および10%仔牛血清 (千葉血清研究所製, CS と略す) を加えたEagle のMEM変法培地を使用し、直径60mmプラスチック容器を用い、5%炭酸ガス培養を行なった。

2. ウイルス

千葉大学微生物学教室の桑田が Ahlström 博士 (Lund 大学, スウェーデン) により分与されたSR-RSV を用いた。50%グリセリン食塩水に浸し、-20°C保存した Rous 肉腫組織片をニワトリヒナで数代継代後、接種後10日前後の肉腫の20%抽出液を Hložánek (1966) らの方法にしたがつて作製した。ウイルスの定性、定量は20%肉腫抽出液の3,000回転、20分遠心沈澱培養上清の原液あるいは10倍段階稀釈液の0.3ml を生後2週間以内の白色レグホンヒナ翼下に接種し、30~45日間肉腫の発生を観察するニワトリヒナ翼下接種試験により行なった。

3. X線照射の方法

継代後48時間から72時間経過した対数増殖期にある6代~10代目のヒト胎児培養細胞を、管球からの距離40cm、照射時間1.34秒、10×15cmのツープスを使用し、Cu 0.5mm, Al 1.5mmでフィルターした硬X線で150R照射した。

4. ウイルス吸着処理の方法

対数増殖期にある7代あるいは11代の細胞を10⁵TD₅₀/ml 前後の20% Rous 肉腫抽出液1ml で2時間、37°C吸着処理後、10%CS添加Eagle培地を加え全量5mlとし、24時間放置後ウイルスの入った培地を捨て新鮮な培地を加えて継代培養

をつづけ、変換現象の観察を行なった。

5. X線およびウイルスによる重複処理の方法

培養開始後98日、継代7代のヒト胎児培養細胞の継代後3日目の培養細胞をX線単独処理と同様の方法でX線照射を行なった。照射後直ちに培地を加え、以後24時間ごとに細胞数を算定し、細胞数が再び対数増殖期にあるX線照射後4日目に10⁵TD₅₀/ml 前後のSR-RSV でSR-RSV 単独処理と同様の方法で吸着処理し、以後形態的変換現象を観察した。

6. 培養上清の感染性ウイルスおよび変換細胞内ウイルスゲノムの証明の方法

SR-RSV 処理細胞培養上清中感染性ウイルスの証明は、培養上清を回収し3,000回転、20分遠心沈澱後その0.3mlを、あるいは変換細胞中ゲノムの証明には、トリプシン処理後1,000回転、5分遠心沈澱し、単細胞を集め、その10⁶コ前後を白色レグホンヒナ翼下に接種し肉腫の発生を観察することにより行なった。

7. 軟寒天内培養法

Macpherson et al. (1964) の方法にしたがい、base layerとして0.5%のDifco社製 noble-agar および0.1%の bacto-peptone を含んだ4培量のアミノ酸およびビタミンを加えたEagleのMEM変法培地7ml, second layer として0.33%の noble-agar および0.1%の bacto-peptone を含んだ同じ培地1.5ml に処理細胞2×10⁵コを均等に浮遊し、直径60mmプラスチック容器に播き、37°C、5%炭酸ガス培養器で静置培養し、肉眼的コロニーの形成を3~4週間観察した。

8. 幼若ハムスター頬嚢膜下接種法

Foley et al. (1962) の方法にしたがつて体重60gr前後の幼若ゴールデン・ハムスターの頬嚢粘膜下へ変換細胞3×10⁶コを接種し、週あたり60mgのコーチゾン・アセテートで処理し、4週間腫瘍の発生を観察した。

実験結果

1. 無処理対照ヒト胎児の培養細胞 (HuE₅ および HuE₆ 細胞) の培養経過

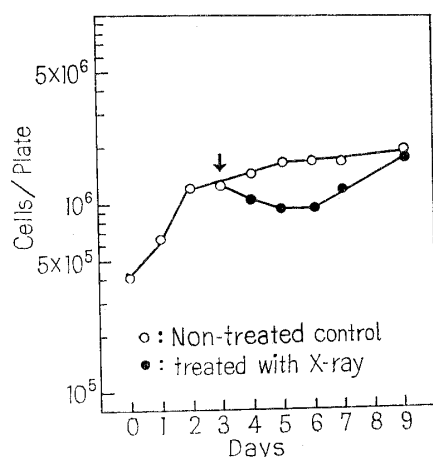
HuE₅ 細胞は培養初期にはかなり活発な増殖を続け、split ratio 1:2あるいは1:3で1週間

前後の間隔で継代できたが、12代、150日を過ぎる頃より分裂、増殖が緩慢となり、細胞の形が大きくなり、配列は乱れてきた。300日前後から細胞の分裂はほとんどみられなくなり、細胞質に顆粒、空胞を多数もつた比較的大きな細胞が点在するだけとなつた。HuE₆細胞でも培養開始後160日、継代10代までは分裂、増殖が活発で10日前後の間隔で split ratio 1 : 3 で継代できた。11代以後やや増殖が緩慢となり、21代、263日まで2週間前後の間隔で継代を行ない、22代以後は full sheet になるのをまつて不規則に継代を行なっている。

2. X線単独処理によるヒト胎児の培養細胞 (HuE₅/X および HuE₆/X 細胞) の培養経過

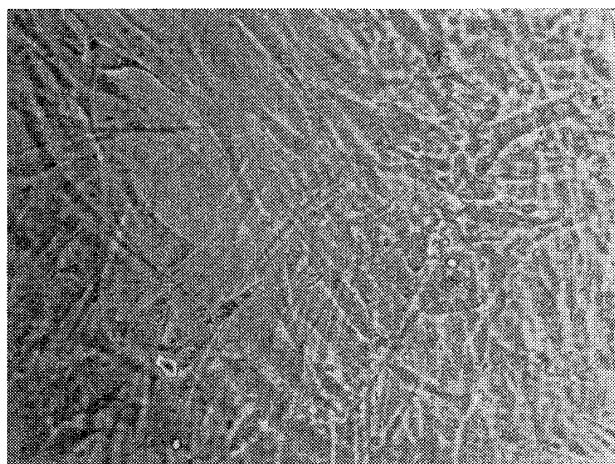
ヒト胎児培養細胞の HuE₅ では6代84日目、10代、137日目、HuE₆ では7代、98日目の対数増殖期にある細胞にX線照射すると、X線照射群は無処理対照と比べて細胞数が照射後24時間で減少するが、48～72時間前後から回復する。以後再び分裂、増殖が活発となり、照射後1週間前後で細胞数は無処理対照とほぼ同様になつた (図1). 形

図1. 無処理対照およびX線処理ヒト胎児培養細胞増殖曲線, HuE₆細胞, 継代7代, ↓印はX線150R照射を示す。



態的にはX線照射後かなり配列が乱れ、無処理対照細胞に比し細胞はやや大形で、criss-cross 様の配列の乱れが認められるが、いずれもX線照射単独処理では形態的変換現象はヒト胎児の培養細胞では認められなかつた。HuE₅/X細胞では照射後細胞の乱れがかなり顕著であつた (写真1) が、

写真1. X線照射培養細胞10代位相差像, 照射後72時間. ×100.



無処理対照細胞と増殖は変わらずX線照射後184日、8代に無処理対照細胞と相前後して継代が困難となり観察を中止した。HuE₆/X細胞ではHuE₅/X細胞と同様に細胞配列の乱れが認められたがX線照射後187日、継代15代に至つても変換現象は認められていない。

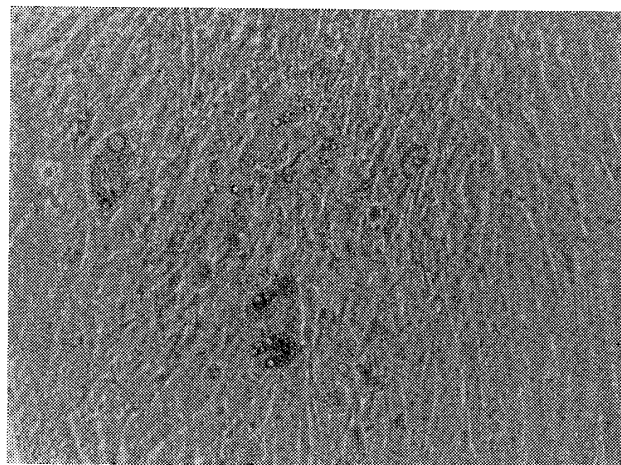
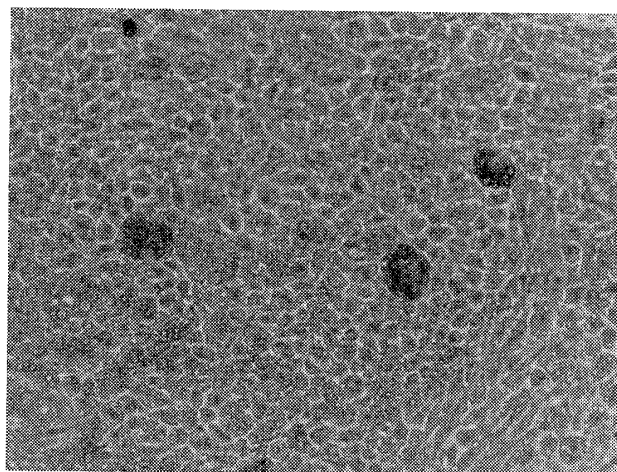
3. SR-RSV 単独処理によるヒト胎児の培養細胞 (HuE₅/SR および HuE₆/SR 細胞) の in vitro 変換現象

ヒト胎児細胞を培養141日、継代11代 (HuE₅細胞),あるいは培養109日、継代7代 (HuE₆細胞) で Rous 肉腫20%抽出液10^{4.5}TD₅₀/ml (HuE₅/SR細胞)あるいは10⁵TD₅₀/ml (HuE₆/SR細胞)で吸着処理を行なつた。HuE₅/SR細胞では処理後2～3週間頃から配列が不規則になり、やや屈光性の強い、細胞質に顆粒、空胞の顕著な多角性の細胞が focus 状に出現し、増殖が一時活発となつた。しかし、継代を行なうと次第に増殖が緩慢となり、変換細胞は次第に脱落し、処理後18代、

321日で継代が困難となつた。HuE₆/SR細胞ではSR-RSV 吸着処理後13日目に対照細胞と明らかに区別される屈光性の強い紡錘形、多角形あるいは円形で核周辺に空胞の著明な変換細胞が focus 状に出現し (写真2),その中に特徴的な巨細胞も少数認められた。巨細胞および小形円形空胞化細胞は継代とともに消失したが、紡錘形細胞は長期間観察された。SR-RSV 処理後22日までの培養上清には感染性ウイルスが証明されたが、処理後49

表1 培養上清の感染性ウイルスおよび変換細胞内ウイルスゲノムの証明

Culture	Treatment	Days After Treatment	Passage Number	Culture Fluid	Live Cells	
				No. of Tumors No. of Chickens	No. of Cells Inoculated	No. of Tumors No. of Chickens
HuE6/SR	$10^{4.5}TD_{50}$ SR-RSV	4		4/4		
		22		4/4		
		49	3	0/4	1.2×10^6	3/4
		127	10	0/4	0.9×10^6	0/4
HuE6/X-SR	150r X-RAY + $10^{4.5}TD_{50}$ SR-RSV	4		3/4		
		22		4/4		
		49	3	0/4	1.2×10^6	3/3
		127	10	0/4	0.9×10^6	4/4

写真2. SR-RSV 処理変換細胞. 処理後15日目. 位相差像. $\times 100$.写真3. 重複処理変換細胞. 処理後15日目. 位相差像. $\times 100$ 

日, 継代3代に至ると証明されなくなつた. また, 変換細胞 1.2×10^6 コをニワトリヒナ翼下に接種すると肉腫が発生し, ウイルスゲノムの存在が証明された(表1). 処理後57日目, 継代5代の変換細胞 10^5 コを軟寒天内で培養を行なつたところ肉眼的コロニーは形成されなかつた. また, ウイルス処理後39日目, 継代6代の細胞 3×10^6 コをコーチゾン処理ハムスター頬嚢への移植を試みたが腫瘍の形成は認められなかつた.

4. X線およびSR-RSV 重複処理によるヒト胎児の培養細胞 (HuE₆/X/SR 細胞) の in vitro 変換現象

a. 形態的変換現象

X線処理後 SR-RSVで重複処理を行なうとSR-RSV 単独処理の場合とほとんど相前後してSR-RSV

感染後2~3週から対照細胞と明らかに区別される屈光性の強い紡錘形, 多角形, あるいは円形で核周辺に空胞が著明な細胞が focus 状あるいは散在性に出現し, それに混在して少数の巨細胞も認められた(写真3). 変換初期には細胞分裂は活発で無処理対照細胞より増殖が活発であるが, 継代を重ねると増殖は次第に緩慢となり, 対照細胞と累積増殖曲線で差が認められなくなつた(図2). 現在処理後200日, 17代継代で培養継続中である. 継代とともに小形円形空胞化細胞, 空胞化巨細胞は減少し, 配列の乱れた紡錘形で顆粒が細胞質に著明な細胞が残存するのみで対照細胞と形態的に区別が困難となつた(写真4).

b. Plating efficiency

直径60mmのFalcon社製のシャーレにHuE₆/X/

図2. ヒト胎児培養細胞の累積増殖曲線

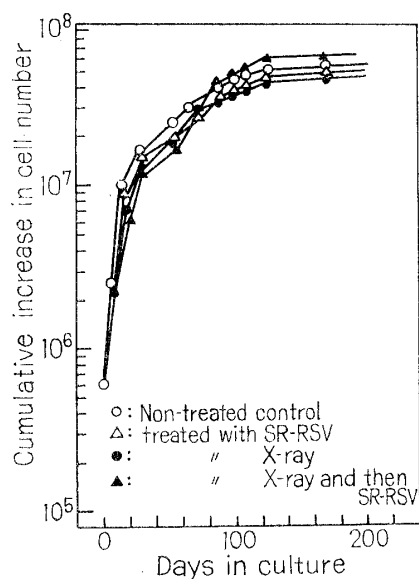
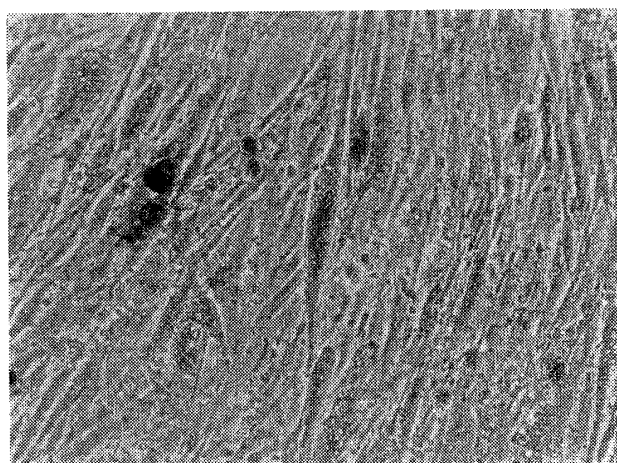


写真4. 重複処理変換細胞, 14代, 140日目, 位相差像. × 100.

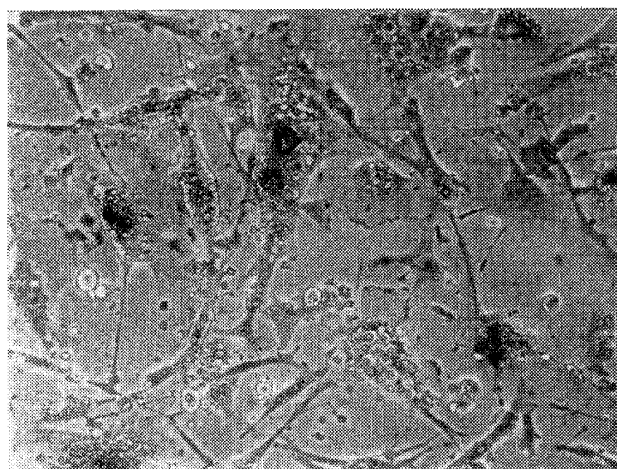


SR 細胞 10^3 コを接種し, 2週間5%炭酸ガス培養を行なつたが, 対照細胞, SR-RSV 単独, およびX線とSR-RSV 重複処理による変換細胞はともに0.1%前後で有意の差は認められなかつた.

c. Cloning

Puck et al.(1956)の方法にしたがつて重複処理による変換細胞 HuE₆/X/SR の処理後70日, 継代7代のクローニングを行なうと, クローン細胞は不規則な配列をした屈光性の強い細胞質に空胞の著明な紡錘形の細胞(写真5)で, 初期には分裂, 増殖が盛んで培地の酸性化も速やかであつたが, やがて空胞化が著明となり, 変性が顕著とな

写真5. Puckの方法によりえられた重複処理変換細胞のクローン細胞, 分離後31日目, 位相差像. × 100.



つてシャーレ面より剥離し, クローン後70日前後で継代が困難となつた.

d. 培養上清中感染性ウイルスおよび変換細胞内ウイルスゲノムの証明

SR-RSV 処理後22日までの HuE₆/X/SR 細胞の培養上清には, RSV 単独処理の場合と同様感染性ウイルスが証明されたが, 処理後49日, 3代に至ると証明されなくなつた. しかし, 変換細胞 1.2×10^6 コをニワトリヒナ翼下に接種するとウイルスゲノムが証明され, 処理後127日, 10代に至つても安定してウイルスゲノムが証明された(表1).

e. 軟寒天培養によるコロニー形成および液体培地での再培養

SR-RSV 処理後52日目の変換ヒト細胞 10^5 コを軟寒天内培養すると, SR-RSV 単独処理変換細胞ではコロニーの形成はみられなかつたが, X線およびSR-RSV 重複処理変換細胞では直径0.6mm~1mmの肉眼的コロニーが20コ前後形成された. 軟寒天培養33日目にコロニーを液体培地へ移してえられたクローン細胞は紡錘形あるいは多角形で配列の乱れた屈光性の強い細胞で, 細胞質に空胞あるいは顆粒が著明であつた(写真6). 培養30日を過ぎる頃から形態がflatで大きく, 輪郭が不明瞭で細胞質には多数顆粒, 空胞があらわれ, 増殖が多まりシャーレ面から剥離が目立ち(写真7), 多

写真6. 重複処理変換細胞の軟寒天培養よりえられたクローン細胞. 分離後10日目. 位相差像. $\times 100$.

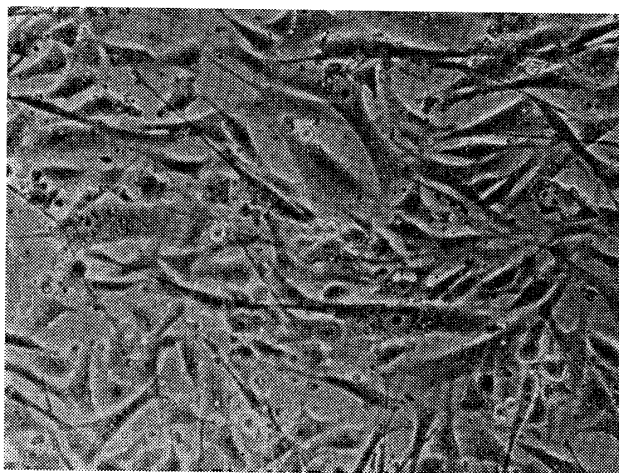
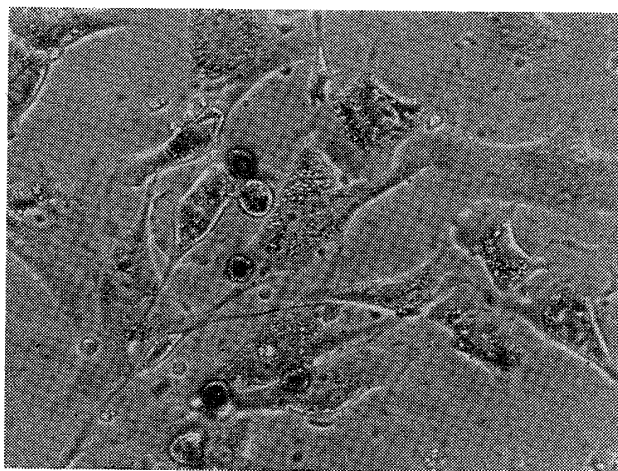


写真7. 重複処理変換細胞の軟寒天培養よりえられたクローン細胞. 分離後34日目. 位相差像. $\times 100$.



くは80日前後で観察を中止した.

f. 変換細胞のコーチゾン処理ハムスター頬嚢への移植

SR-RSV 単独あるいはX線との重複処理による変換細胞 3×10^6 コをコーチゾン処理幼若ハムスター頬嚢へ接種すると, 1週間後変換細胞 HuE₆/X/SR ではアズキ大の硬結が認められたが, 2週間後に硬結は吸収され腫瘍の発生はみられなかった.

総括ならびに考案

in vitro で哺乳動物の細胞を培養し, これに RSV を感染せしめ変換現象を観察した報告は多

い (Svoboda (1966)). in vitro でヒト胎児の培養細胞に SR-RSV を感染処理せしめ変換現象を観察した報告は Jensen et al. (1964), Stenkvist および Ponten (1964), Zilber および Schevlyaghyn (1964) に始まる. 関谷 (in press) は変換細胞の出現について同様の報告を行なった. 本実験では SR-RSV 単独処理による形態的変換ヒト胎児の細胞は, SR-RSV 処理後2週間前後で形態的変換現象がみとめられ, 変換直後から増殖が活発となり互いに重なりあつて単層非変換ヒト胎児の細胞と思われるシートの上に focus を形成した. 変換細胞は原形質に空胞のみられる屈光性の強い円形あるいは紡錘形の細胞で, 空胞化巨細胞も少数認められた. しかし, 継代とともに空胞化細胞は次第に脱落し, 形態, 増殖ともに無処理対照と著明な相違が認められなくなつた.

X線照射による哺乳動物細胞の in vitro における変換現象は Borek および Sachs (1966) がハムスターの胎児細胞を用い報告を行なったが, その後 Coggin (1969) の追試実験ではX線単独処理では変換現象が認められなかつた. 本実験ではヒト胎児培養細胞を用い, 150 R のX線照射を行なつて変換現象を観察したが, 照射後分裂, 増殖がみられず, 細胞数は一時減少するが72時間前後から再び増殖を開始した. 細胞配列の乱れは著明であつたが, X線照射単独処理では, いずれも変換現象は認められなかつた. Coggin (1969) はハムスターの細胞を用いてX線とSV40あるいはアデノウイルスとの重複処理について, Stoker (1963) はハムスターの細胞を用いてX線とポリオーマウイルスの重複処理について, また Pollock および Todaro (1968) はマウス細胞株3T3およびヒト2倍体細胞を用いてX線とSV40の重複処理による変換現象について検討し, いずれも重複処理による transformation の増強効果を報告した. 本実験では in vitro でヒト胎児の細胞を培養し, X線および SR-RSV の重複処理を行なったが, 単独処理の場合とほとんど相前後して形態的変換が認められた. 変換細胞の形態, 出現の時期は, SR-RSV 単独処理による場合と重複処理による場合との間

に明らかな差は認められなかった。

SR-RSV 変換ヒト細胞の増殖は、変換後しばらく無処理対照細胞とくらべて肉眼的によくなるといふ Zilber および Schevlyaghyn (1964) の報告もあるが、Jensen (1964), 関谷 (in press) は変換前後対照細胞と差が著明でないと報告している。本実験でSR-RSV単独処理変換細胞の増殖は、無処理対照細胞と累積増殖曲線あるいは plating efficiency では差がみられなかったが、X線との重複処理による変換細胞では変換後しばらく無処理対照細胞に比して増殖が高まった。しかし、ヒト胎児の変換細胞およびそのクローン細胞はSR-RSV 単独あるいはX線との重複処理にかかわらず、規則的に継代を行なうと無処理対照細胞と相前後して継代が困難となった。Stenkvis (1966b) および関谷ら (1969) はヒト胎児細胞で同様の報告を行なっている。

SR-RSV による変換ヒト細胞は他の哺乳動物の変換細胞と同様に感染性ウイルスを産生しないが、変換細胞にはウイルスゲノムが存在している。Stenkvis (1966 a) はニワトリヒナ翼下にRSVによるヒト変換生細胞 10^6 前後を接種することにより肉腫が発生し、ウイルスゲノムの存在を証明したが、培養上清には感染性RSVが証明されなかったことを報告した。本実験ではSR-RSV吸着後22日に至るまで単独処理あるいは重複処理にかかわらず培養上清に感染性ウイルスが証明されたが原因は現在までのところ明らかでない。また変換細胞には、単独あるいは重複処理にかかわらず生細胞 10^6 のニワトリヒナ翼下接種試験でウイルスゲノムが証明された。

ヒトを除くサルを含めた哺乳動物の細胞はRSV処理 (Rabotti ら (1967), 崎山ら (1968)) により変換後増殖をつづけ、軟寒天培養で肉眼的コロニーを形成し、復元接種により進行性の腫瘍をつくるが、ヒト変換細胞の悪性化を確認した報告はない。本実験でも単独処理によるヒト変換細胞は軟寒天培養により肉眼的コロニーを形成せず関谷 (in press) の報告と一致するが、重複処理による変換細胞では肉眼的コロニーを形成し、そ

のコロニーを液体培地に移すことに成功したが、やがてクローン細胞はガラス面より剥離し培養が困難となった。また、コーチゾン処理ハムスター頰嚢への移植は単独処理、重複処理両群とも成功しなかった。

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導、御鞭撻をいただいた千葉大学微生物学教室桑田次男教授ならびに産婦人科学教室高見沢裕吉講師、関谷宗英博士に深謝します。

恩師御園生雄三教授に感謝します。

文 献

- 桑田次男, 関谷宗英, 崎山比早子 (1968): 第27回日本癌学会総会記事, 107.
 崎山比早子, 桑田次男 (1968): 第16回日本ウイルス学会総会演説抄録, 1028.
 関谷宗英, 桑田次男, 塩沢 博 (1969): 第28回日本癌学会総会記事, 101.
 関谷宗英, 塩沢 博, 桑田次男 (1970): 第29回日本癌学会総会記事, 85.
 Borek, C. and Sachs, L. (1966): Nature, 210: 276.
 Coggin, J.H. (1969): J. Virol., 3: 458.
 Duran-Reynals, M.L. (1963): Progr. Exp. Tumor Res., 3: 148.
 Eagle, H. (1959): Science, 130: 432.
 Foley, G.E., Handler, A.H. and Adams, R.A. (1962): Nat. Cancer Inst. Monograph, 7: 173.
 Hlozaneck, I., Donner, L. and Svoboda, J. (1966): J. Cell Physiol., 68: 221.
 Jensen, F.C., Girardi, A.J., Gilden, R.V. and Koprowski, H. (1964): Proc. Nat. Acad. Sci., 52: 53.
 Macpherson I. and Montagnier, L. (1964): Virology, 23: 291.
 Pollock, E.J. and Todaro, G.J. (1968): Nature, 219: 520.
 Puck, T.T., Marcus, P.I. and Cieciura, S.J. (1956): J. Exp. Med., 103: 273.
 Rabotti, G.F., Landon, J.C., Pry, T.W., Beadle, L., Doll, J., Fabrizio, D.P. and Dalton, A.J. (1967): J. Nat. Cancer Inst., 38: 821.
 Sachs, L. and Medina, D. (1961): Nature, 189: 457.
 Sekiya, S.: Cancer, in press.
 Stenkvis, B. (1966a): Acta Soc. Med. Upsaliensis, 71: 130.
 Stenkvis, B. (1966b): Acta Path. Microbiol. Scandinav., 67: 67.
 Stenkvis, B. and Ponten, J. (1964): Acta Path. Microbiol. Scandinav., 62: 315.
 Stoker, M. (1963): Nature, 200: 756.
 Svoboda, J. (1966): Int. Rev. Exp. Path., 5: 25.
 Vogt, M. and Dulbecco, R. (1960): Proc. Nat. Acad. Sci., 46: 365.
 Zilber, L.A. and Schevlyaghyn, V.J. (1964): Nature, 203: 194.

(No. 2459 昭46・7・10受付)