

S V 40 変異 マウス 胎児 細胞 の Single Cell 由来 Clone の T 抗原 の 消長 — 螢光 抗体 法 による 解析 —

岡山大学医学部癌研生化学 (主任: 小田 琢三 教授)

江 草 国 之 · 関 周 二 · 小 田 琢 三

[昭和48年6月15日受稿]

緒 言

S V 40 ウイルス 及び S V 40 D N A による マウス 胎児 細胞 の 試験 管 内 発 癌 につい て は すでに 報告 した が^{1) 2)}, その S V 40 変異 マウス 胎児 細胞 群 を 継代 培養 して ゆくと, cloning を 行わ ない 場合 には, T 抗原 の 陽性 率 が 次第 に 低下 して いく こと が みとめ られた.

著者 ら は この T 抗原 の 陽性 率 が 次第 に 低下 して いく 現象 が, T 抗原 陽性 細胞 が 陰性 細胞 に 転換 して いく の か (reversion 又は conversion), 或い は T 抗原 陽性 細胞 の 方が, 陰性 細胞 に 比し, その 成長 度 が 弱い ため に 次第 に 陽性 細胞 が 消滅 して いく の か (selection) を 究明 しよう とした. その 方法 として, まず 初代 培養 した マウス 胎児 細胞 に S V 40 を 感染 させ 変異 実験 を 行い, 直に, 特に 工夫 した カバースリッ プ の 上 に, S V 40 変異 マウス 胎児 細胞 群 を まいて, その 中 から single cell を チェック し, それ より 生ずる clone を 観察 して, 螢光 抗体 染色 により T 抗原 の 態度 を 観察 した. その 結果 として 著者 ら の 継代 した S V 40 変異 マウス 胎児 細胞 群 におい て は, cloning を 行わ ない 場合, T 抗原 陰性 細胞 が T 抗原 陽性 細胞 (transformed cell) を 抑えて selection されて, 結果 的に 陽性 細胞 が 消滅 して いく こと が 推測 された.

材料 と 方法

(1) 組織 培養

岡山 大学 医学 部 マウス コロニー より 得た 純系 の スイス マウス 12 日 目 の 胎児 を 初代 培養 して 得た 細胞 (以下 M E 細胞 と 称す) を 用いた. メディウム は autoclavable Eagle's minimum essential medium

を用い, 当初 30% 牛血清 を 加えて 継代 し, 3 日 目 以後 は 20% 牛血清 に 変更 して³⁾; 実験 に 用いた M E 細胞 は S V-ME 1, S V-ME 2, S V-ME 3 である (図 1).

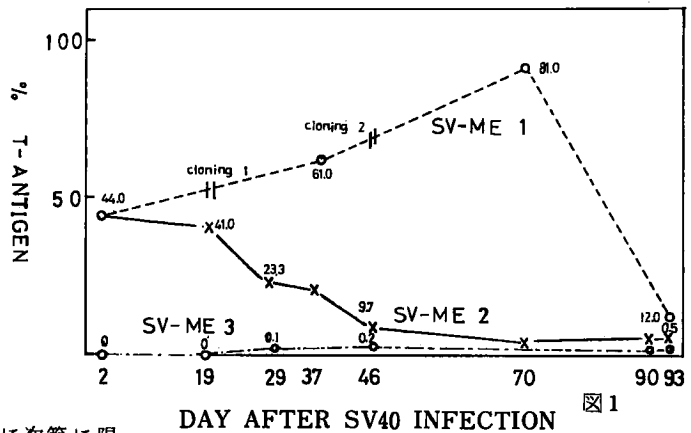


図 1

(2) ウイルス の propagation

S V 40 ウイルス 777 株 (阪大 微研 豊島 博士 より 恵与) を Vero 細胞⁴⁾ に 感染 させ 10 日 ~ 14 日 目 の C P E (++) の 細胞 を 集め 10,000 g, 30 分 遠心 した 沈渣 を 1% D O C 及び 0.1% トリプシン で 37°C, 30 分 処理 して, 10,000 g, 30 分 遠心 し, これ ら の 上清 を さらに 80,000 g, 2 時間 遠心 し, この 沈渣 を P B S (-) に 懸濁 し, ウイルス 液 とした. 尚, C P E (++) の 細胞 の 上清 の 感染 価 は 10^6 P F U であつた.

(3) 変異 実験

M E 細胞 を 培養 びん より トリプシン では がし, 2 回 P B S (-) で 洗い, 試験 管 内 で 浮遊 状態 とし, 0.5 ml の 原液 ウイルス を 加えて 37°C で 軽く ゆすり 乍ら 吸着 させた. その後, 2 時間 して メディウム に おきか え 継代 培養 に うつし^{5) 6)}; 一部 は, ただ ちに single cell より 由来 した clone の T 抗原 の 解析 に 用いた. T 抗原 の 染色 は 螢光 抗体 法 の 間接 法⁷⁾ を 用い, Nikon 螢光 顕微鏡 で 観察 した.

(3) single cell より 由来 した clone の T 抗原

の状態

変異実験と併行して、上記の如く変異させた細胞群で cloning した結果 T 抗原の陽性率の高い SV-ME 1 を、著者らが工夫したもので区画分けした目盛を刻んだカバースリップを P-1 シャーレ(ミハル工業性)に入れたものの中に、1,000ヶ/mlの割でまき(37℃, 5% CO₂), 細胞がカバースリップの上に生えるのを待った。24時間後にそれらの細胞のうち single cell として生えているのを確認、マークして、約6日間観察して、single cell より分裂、増殖した clone であることを確認した(表1)。各 clone の T 抗原の状態については上述の如く蛍光抗体法の間接法によって解析した。用いた SV-ME 1 は T 抗原の陽性率の最も高い、SV40 感染後70日目のもを用いた。

結 果

(1) T 抗原の消長

SV40 感染後の SV-ME 1, 2, 3 の T 抗原の消長は図1に示す如くである。この結果より clonal cloning を2回行った SV-ME 1 では T 抗原陽性率が可成り上昇して、70日目位で最高に達し、その後は下降をたどった。cloning を行わない SV-ME 2, SV-ME 3 では、T 抗原はわずか乍ら陽性であるが次第に消退に向った(図1)。尚、当初、SV40 感染後約4日目位に、いずれの細胞群も criss cross (図2 a), 及び transformed focus (図2) がみられ、T 抗原陽性をみたことと併せて変異細胞を有

する細胞群であることがうかがえた。

(2) single cell より由来した clone の T 抗原の状態

蛍光抗体染色の結果 T 抗原陽性の clone と陰性の clone ははっきりして(図3~図6)、陰性細胞と陽性細胞の混合した clone はみられなかった。又、表1の如く、T 抗原陽性 clone は T 抗原陰性 clone に比し、6日目の観察では、増殖した細胞数が少く即ち、前者は後者に比し、増殖率の少いことがうかがえた。

者察と結論

SV40 をマウス胎児細胞に感染させ変異実験を行ったが、T 抗原の陽性率は cloning によっても中々上昇せず、いずれの strain も陽性率が次第に低下して来た。この現象について、著者らは図7の如き4つの case を想定した。即ち、(a), (b) の case の如く、T 抗原陽性の細胞は陽性細胞から増殖し、陰性細胞は陰性細胞より増殖する。従って、陽性率が低下していくということは、T 抗原陰性の細胞が、陽性の細胞を増殖率において凌駕し、i) selection により次第に陰性細胞がふえる。(c), (d) の case の如く、T 抗原陽性の細胞が、陰性細胞にもどったり、逆に陰性細胞が陽性細胞に転換する、つまり ii) reversion 又は conversion により、T 抗原陽性の細胞が陰性の細胞へと変換していく。この2つの状態を考えた。蛍光抗体染色による各 clone の T 抗原の解析では(a), (b) の case はみられたが、

表1 ANALYSIS OF T-ANTIGEN OF CLONES DERIVED FROM A SINGLE CELL

CLONE No	Days after Inoculation of SV40 (cell numbers)			T-antigen (%)	judge
	1 day	2 days	6 days		
A-1*	1	2	10	100% (+)	positive clone
B-1*	1	2	12	100, (+)	positive
F-6	1	2	5	100, (+)	positive
H-2	1	1	8	100, (+)	positive
L-8	1	1	7	100, (+)	positive
B-2*	1	2	9	0% (-)	negative clone
C-3*	1	2	9	0, (-)	negative
D-5	1	2	21	0, (-)	negative
E-7	1	2	26	0, (-)	negative
J-4	1	2	32	0, (-)	negative
K-4	1	3	30	0, (-)	negative

* presented in figs 3, 4, 5 and 6

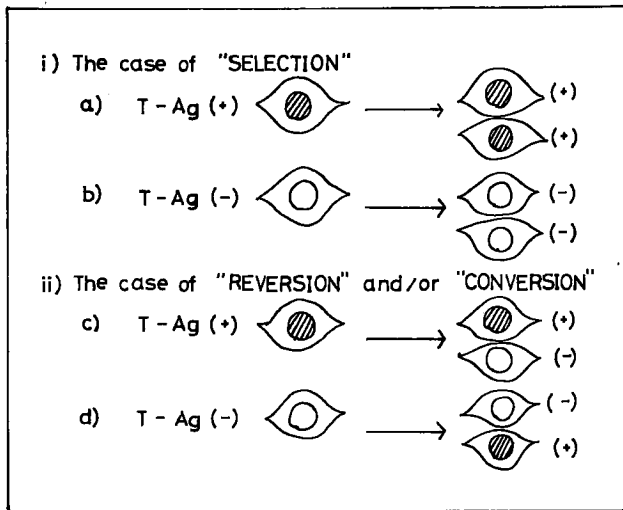


図 7
(c), (d)の case はみられなかった。又、表 1 より、T抗原陰性の細胞の方がT抗原陽性の細胞より増殖率が高い、即ちT抗原陽性 clone は陰性の clone

より増殖率が低いことがうかがえた。

従って、これらのことよりSV-ME細胞におけるT抗原の陽性率の消長は selection によるものであることが示唆された。

一搬に、マウス胎児細胞はハムスター胎児細胞よりもSV40により変異しにくい理由の中には²⁾、このようにT抗原陰性細胞が陽性細胞 (transformed cell) を抑えて selection されていくことが関与しているものと考えられる。

謝 辞

本研究は文部省科学研究補助金、がん特別研究費による。

稿を終るにあたり、マウスの胎児初代培養に御協力を頂いた佐藤啓子技術員に感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) 小田琢三, 小村幸子, 関周二, 山本晋一郎, 西田茂: SV40ウイルス変異細胞と腫瘍細胞内におけるT抗原とウイルスゲノムDNAの検索, 第20回日本癌学会総会記事P. 98, 1969.
- 2) 山本晋一郎, 江草國之, 小田琢三: SV40DNAによるマウス胎児培養細胞の試験管内発癌について, 岡山医学会雑誌, 第83巻, 267, 1971.
- 3) Yamane, I., Matsuya, Y. and Jimbo, K.: An autoclavable powered culture medium for mammalian cells. proc. Soc. Exp. Biol. Med., 127, 335, 1968.
- 4) 安村美博, 川喜多愛郎: 組織培養によるSV40の研究, 日本臨床, 21, 1201, 1963.
- 5) Nishida, S.: Studies on the transformation of human fetal cell cultures by simian virus 40. Acta Medicinæ Okayama, 24, 417, 1970.
- 6) Pope, J. H. and Rowe, W. P.: Detection of specific antigen in SV40 transformed cells by immunofluorescence. J. Exp. Med., 120, 121, 1964.
- 7) Egusa, K.: Cytotoxic action of sensitized spleen lymphocytes on target cells in simian virus 40 oncogenesis. Acta Medicinæ Okayama, vol. 27, No. 2, 1973. in the press.

附 図 説 明

- 図1, SV40変異ME細胞の3つの strain のT抗原の消長
 図2 a, SV40変異ME細胞にみられた criss cross
 2 b, 同, transformed focus
 図3, 蛍光抗体法間接法により証明された, Single Cell より由来したT抗原陽性 clone (B-1)
 4, 同, 陽性 clone (A-1)
 5, 同, 陰性 clone (C-3)
 6, 同, 陰性 clone (B-2)
 図7, Single Cell より由来した clone のT抗原の状態. 予想された実験結果は i) Selection; (a), (b) の case, ii) Reversion and/or Conversion; (c), (d) の case が考えられたが, 実験結果は i) Selection の case を示唆した.
 表1 Single Cell 由来 clone のT抗原の解析: T抗原陽性の clone とT抗原陰性の clone の混合したものはなく, T抗原陽性ばかりの clone.

Studies on T-antigen of the clones derived from a single cell in SV 40-transformed mouse embryo cells by the immunofluorescent method

Kuniyuki EGUSA, Shuji SEKI and Takuzo ODA

Department of Biochemistry, Cancer Institute, Okayama University

Medical School, Okayama, Japan

(Director: Prof. T. ODA)

In our previous observation, the T-antigen in uncloned mouse embryo cells transformed by SV 40 or SV 40 DNA declined gradually through long term cultivation. To analyze whether this phenomenon is due to selection or reversion and/or conversion, we observed the T-antigen of a series of clones derived from a single cell in the SV 40-transformed cells by the immunofluorescent method.

The T-antigen was either positive or negative in all cells in each clone, and none of the clones was consisted of the mixture of T-antigen positive and negative cells. The T-antigen negative cells were more predominant in the rate of growth than the T-antigen positive ones in this mouse embryo cells. One reasonable explanation on the data may be that the decline of T-antigen in the uncloned SV 40-transformed cells is due to the selection of the T-antigen negative cells. This fact may be one of the reason for difficulty in establishing the SV 40-transformed mouse embryo cell lines.

江草国之論文附図

