

氏 名	世 古 口 公 宏 せ こ ぐち きみ ひろ
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	医 博 第 394 号
学位授与の日付	昭 和 44 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 病 理 系 専 攻
学位論文題目	長期培養したモロニー白血病細胞における起病性ウイルス の増殖

論文調査委員 (主 査) 教 授 田 部 井 和 教 授 岡 本 耕 造 教 授 翠 川 修

論 文 内 容 の 要 旨

モロニー白血病ウイルスに由来する ddl 系マウスのリンパ性白血病細胞から純粋白血病細胞培養株 (1-145その他) が当教室で確立された (1965)。以来3年間180代以上の長期にわたる継代期間中に形態学的, 生物学的検査をくりかえし行なった結果, 今日なお, 純粋リンパ性白血病細胞としての特長を維持し, 株確立当初と大差ないことを確認した。すなわち培養による増殖態度, 光学顕微鏡による形態, 超生体染色性, 遊走能, 電子顕微鏡による生産ウイルス粒子の形態学的特長や, 粒子増殖と培養との平行性, さらにマウス移植による系特異性など, 継代による変化を認めなかった。

白血病細胞株の報告は若干あるが, 感染ウイルスを増殖するもの, 特に長期間にわたるものはほとんどないので, この細胞株が生産するウイルス粒子の白血病起病性を検討し, ウイルス増殖を支持する培養細胞系なることを確認した。白血病ウイルスの感染実験には, 材料中に混入する白血病細胞の移植を伴う危険がある。この問題解決のために, まず細胞の系特異性, ついで移植性を検討する必要があった。同系 ddl マウス (成熟) の皮下に細胞数 8×10^6 を接種した時, 全例に局所腫瘤を発生, しかも腫瘤細胞はひきつづき同系統への移植性を有した。他方 C 57 BL/6, BALB/C, S 系などの異系統マウスには 10^7 以上の細胞でも移植不能であった。新生児の ddl 系マウスは, 2×10^4 接種で全例陽性, 2×10^3 で 1/5 陽性を示し, 感度の高いことが証明された。しかし 10^2 以下では移植不能で, 6ヶ月の観察期間中, 局所腫瘤も全身性白血病も発生しなかった。移植成立には少なくとも $10^3 \sim 10^4$ の細胞を必要とし, かつ潜伏期は2ヶ月以内であることを確認した。つぎにウイルス抽出実験には, 予め対数増殖期にある細胞を培養しておき, 培養液 1 ml 当り 1.2×10^6 の割で, 36°C 72時間培養した後, 緩衝液で洗滌した細胞を24時間内に凍結融解を3回行なう。0.153 モルのクエン酸カリ液と緩衝液の等量混合液 (pH 6.8) に再浮遊し, さらに超音波処理後, 低速遠心上清の上2/3を9000G 10分遠沈, その上清の上2/3を接種材料とし, 同系統 ddl の新生児ないし生後7日までの乳呑みマウスの皮下または腹腔内に0.1ml ずつ接種した。このウイルス感染実験の第一条件は, 接種材料中の無細胞性である。無細胞試験としては, 抽出実験と同条件における細胞凍結融解

後、染色標本を作り細胞の破壊度をしらべ、また残存する生細胞の有無はコンゴレッド還元能に基づいて検査した。凍結融解1回後、すでに細胞はいずれも破壊され、生細胞の存在を認めなかった。他方超音波単独処置細胞群でも同様無細胞であった。接種材料の調製には単独でも有効である上記二つの処理方法を併用し、さらに反復遠沈した上清を使用した。かくして得た無細胞抽出液を接種した後、2ヶ月以内の事故死を除いた有効接種群17匹中に13例の発症例(76.5%)を認めた。その潜伏期は4.8ヶ月から8ヶ月にわたり、4ヶ月以内のものはなかった。この点においても細胞移植と区別できる。発症マウスの剖検所見は、脾臓、リンパ節、胸腺の著明な肥大であった。発症した白血病はつぎの諸点に基づいて同定した。

1) 肥大臓器の病理組織学的所見、すなわち臓器固有構造の消失と、被膜にも及ぶ全面的なリンパ性白血病細胞浸潤を認めること。

2) 肥大臓器の細切片をddl系に移植すると、3～5日の潜伏期後局所に腫瘤を形成し、腫瘤内細胞は白血性リンパ球と同様の移植性と、形態学的特長を有すること。

3) 肥大臓器内細胞の示す培養上の特性、すなわち1～2日の通気培養でリンパ性白血病細胞の増殖像を認めること。

4) 肥大臓器よりマウス起病性のある白血病ウイルスを再抽出できることによる。

かくして13/17例マウスはリンパ性白血病を発生したことが確認された。本症が真に長期培養白血病細胞株の生産するウイルスに起因したことは以下の事実によって可能性を強調される。

1) 抽出ウイルス液中の無細胞性。各接種材料をテストした限りでは、生細胞の存在を認めなかったうえに、接種後白血病を起こした例はいずれも4ヶ月以上の長い潜伏期を要したこと、多数の皮下接種例でも細胞移植成立時にみられる局所腫瘤の発生を認めることなく全身性白血病をきたしたことなどから白血病細胞の移植によらなかったといえること。

2) その後の接種実験において、ウイルス抽出液の接種例のみ、比較的均等にかつ高率に同型白血病の発生を認め、対照は全て陰性であったこと。

3) 当研究室では、この実験期間中他の白血病ウイルスを使用しなかったこと。

4) ddl系マウスは隔離された飼育室で自家繁殖させ、過去5ヶ年間の飼育中、自然白血病の発症は1例も認めていないことである。

ここに長期培養白血病細胞は特有のリンパ性状を維持するのみならず、白血病ウイルスを同時増殖せしめることを確認した次第である。

論文審査の結果の要旨

モロニー白血病ウイルスに由来するddl系マウスのリンパ性白血病細胞の純粋培養株(1-145)は、3年以上、180世代以上にわたる長期培養後なお生体内におけると同様の諸性状を維持するのみならず、さらに十分量の白血病ウイルスを産生することを認めた。つぎにその培養細胞の無細胞抽出液をddl系統の新生児もしくは乳呑みマウスに接種したところ、10ヶ月間の観察において、17匹中13匹すなわち76.5%の発症例をみとめた。発症マウスはいずれも脾腫または胸腺肥大、ないしリンパ節肥大を有し、これらの臓器細胞は多数のリンパ性白血病細胞からなり、可移植性であった。

過去において、5世代70日間培養したモロニー白血病細胞から起病性ウイルスの増殖をみとめた報告はあるが、本研究におけるがごとく長期培養した白血病細胞から起病性ウイルスの増殖を証明した業績はみあたらない。

本研究は学術上有益であり、医学博士の学位論文として価値あるものとみとめる。