

自然ガン化マウス肉腫細胞とその内因性C型オンコルウイルスに対するインターフェロンの抑制効果

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8742

自然がん化マウス肉腫細胞とその内因性 C型オンコルナウイルスに対する インターフェロンの抑制効果

大阪府立公衆衛生研究所

柴 田 忠 良

(昭和53年10月24日受付)

インターフェロン (IF) は、ウィルス感染初期に宿主を防禦する物質：即ち、宿主に作用して RNA および DNA ウィルス増殖のみを特異的に抑制するものとされている。その作用機作は、ウィルスの細胞への吸着、侵入、細胞内での uncoating、ウィルス粒子の成熟、細胞外への放出には影響を及ぼさないことから、RNA、DNA ウィルスの両方の growth cycle に共通な段階であるウィルス・ゲノムの翻訳を阻害していることが示唆されている^{1)~4)}。

しかしながら、かかる IF のウィルス増殖特異的抑制作用以外に、宿主細胞機能にも影響を与える生物学的活性が2, 3知られている^{5)~9)}。中でも IF の抗腫瘍性については、ウィルスによる transformation を阻害する報告¹⁰⁾や、化学発癌剤による発癌を抑制したという報告¹¹⁾もあり、注目を集めている。

DNA 型腫瘍ウィルス：SV 40 に関して、IF 前処理細胞においては、T (Tumor) - , V (Virus) - 抗原合成と感染性ウィルス産生が抑制され、細胞の transformation も阻止されるが、細胞が SV 40 で transform された後では、T - 抗原の合成に対して IF は全く影響しないという (Oxman ら)^{12)~14)}。

他方、RNA 型腫瘍ウィルスに対する IF の効果は、外因性マウス白血病ウィルス (MuLV) の in vitro の感染^{15)~17)}、および内因性 MuLV の持続的産生¹⁸⁾と Iododeoxyuridine¹⁹⁾等による誘発について調べられている。しかし、これらの系において、IF は一過性に細胞外への C 型 RNA ウィルスの誘出を抑制するが、内因性ウィルス粒子産生には著効を示さないとされている。

著者らは²⁰⁾、従来、この IF 抗腫瘍性の機構を明らかにすべく検討を加えてきたが、更に、著者が長期継代

培養により得た自然がん化マウス肉腫細胞について実験を行なった。即ち、この細胞からの内因性 C 型 oncornavirus ウィルスの自発的産生に対する IF の効果、及び、この細胞の増殖に対する IF 作用についても検討を行ない、それらの機構を通じて IF の抗腫瘍性について考察を試みた。

材料及び方法

I. 使用細胞

L 細胞 (C3H/He マウス、正常皮下結合組織由来樹立化細胞) は 5% 仔牛血清加 Eagle's MEM (日水製) により単層培養を行なった。マウス胎児細胞 (ME) は ddy 系、NIH-Swiss 系、及び BALB/C 系各妊娠マウス 14~15 日令の胎児を無菌的に取り出し、トリプシンで消化したのち、10% 仔牛血清加 Eagle's MEM で単層培養された。このうち ddy ME は継代をくりかえし、後述のごとく樹立化細胞 (MC) が得られた。NIH-Swiss ME 及び BALB/C ME は、2~3 代目の細胞を実験に用いた。

XC 細胞は 10% 仔牛血清加 Eagle's MEM によって単層培養を行なった。この細胞は Rous Sarcoma virus の prague 株をウィスターラットに接種し、形成された腫瘍から樹立され、Rous Sarcoma virus のゲノムを持つが、感染性ウィルスは産生されない²¹⁾。マウス白血病ウィルス (MuLV) に感染した細胞と混合培養すると多核巨細胞を形成し、MuLV 感染細胞の同定検出に用いられた²²⁾。

II. ウィルス

Newcastle disease virus (NDV)：宮寺株は 10 日令の発育鶏胎児に接種し、2 日後に漿尿液を採取、遠心上清 (3000rpm. 20 分) をウィルス液として

70°Cに保存した。

Vesicular Stomatitis Virus (VSV): Indiana 株はL細胞の単層培養に接種し、37°C、24時間増殖後、培養液の遠心上清(3000rpm, 20分)をウイルス液としてNDVと同じく-70°Cに保存した。

マウス白血病ウイルス(MuLV)はMC細胞産生ウイルスを精製濃縮(後述)して用いた。MuLVの抗原性分析は通常のゲル内沈降反応を用い、抗Moloney virus及び抗Rauscher virus家兎抗血清はVirgo Reagent製を使用した。

Ⅲ. IF粗材料の調製

L細胞の単層培養5~6日目に、NDVをmoi 10~100で接種し、室温または37°Cで60分間吸着後、ウイルス液を除き、血清不含Eagle's MEMを加え、37°Cで18時間培養を行なった。その後、培養液を集め、型どおりに酸処理を行なうために、1N塩酸でpH2にして4°Cで2~3日間放置、1N苛性ソーダで中和し、低速遠心で細胞残渣を除いた。この上清を部分精製の出発材料とした。

Ⅳ. 正常細胞培養液の粗材料の調製

IF粗材料の調製法に準じてL細胞にNDVを接種せずに血清不含Eagle's MEMを加え、37°Cで一晩培養した。この培養液を集め、同様に遠心及びpH2処理と中和の操作を行ってIF対照粗材料とした。

Ⅴ. IFの部分精製

IF粗材料に55%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、氷水中で1~2時間攪拌し、生じた沈澱を6,000rpm, 30分の遠心で集めた。さらにその上清に80%飽和に硫酸アンモニウムを加え、同様の操作で生じた沈澱を遠心で集めた。これらの沈澱を0.01Mリン酸緩衝液(PBS) pH7.1で、出発材料の1/100~1/200容になるよう溶解し、続いて0.01M PBSで透析後、105,000×g, 60分間、超速心を行なった。この硫酸アンモニウム55~80%画分の超速心上清を部分精製IFとして-70°Cに保存し、以後の実験に用いた。

Ⅵ. IFの定量法

単層培養L細胞(シャーレ、径50mm)に2倍段階希釈したIF試料1mlを加え、炭酸ガス培養器にて、37°C、18時間培養後、PBSで2~3回洗い残存IFを除き、シャーレあたり100~200pfuのVSVを接種した。37°C、60分間吸着後、5mlの寒天培地(1%寒天を含む5%仔牛血清加Eagle's MEM)を重ねた。37°C、48時間培養後、0.03%ニュートラルレッドにて細胞を染色し、ブラック数をよんだ。VSVのブラックを50%減少させるIFの濃度を1U/mlとした。

また、別の方法として、L細胞をマイクロプレート

(ファルコン社製)に培養し、IF試料の2倍段階希釈0.1mlを各Wellに加えた。炭酸ガス培養器にて、37°C、18時間培養し、PBSで2~3回洗いIFを除き、各Wellあたり10 TCID₅₀のVSVを接種した。37°C、60分間吸着後、0.1mlの5%仔牛血清加Eagle's MEMを加え、37°C、48時間培養後のCPE(細胞変性効果)を観察した。この場合は、VSVのCPEを50%抑制するIFの濃度を1U/mlとした。

IF価はウイルスによってIF感受性に差があり、用いる細胞によっても、また定量法によっても感度が異なるので、他と比較する場合には、国際単位で表現する必要がある。国際基準マウスIF(Research Reference Reagent Branch, National Institute of Allergy and Infectious Disease, Bethesda, MD, USA)を標準試料として、上記の定量法で比較検定して、IFの単位を示した。

かくて、部分精製IF試料は 2.0×10^5 U/mlで、mg蛋白質あたりの比活性は 2.4×10^5 U/mg蛋白質であった。

Ⅶ. 染色体標本作製法

細胞(1.0×10^5 cell/ml)は10%仔牛血清加Eagle's MEMでカバーグラス入シャーレ(径50mm)にて24~48時間培養した。コルヒチンを最終濃度 10^{-6} M含むように加えて、3時間培養後、0.075M KClで15~20分間、低張処理を行なった。その後、メタノール・酢酸(3:1)の混合液にて細胞を固定、乾燥し、10%ギムザ液にて染色、水洗、乾燥ののち、カナダバルサムにて封入し、鏡検した。

Ⅷ. TRANSFORMATIONの測定法

1. 腫瘍形成

ddy MEは約20代継代培養を行なった時期に、同系統の哺乳マウスの背部皮下に 1.0×10^6 cell/mouse移植された。腫瘍を形成したマウスから腫瘍を無菌的に採り出し、その組織片を哺乳マウスに移植継代をした。腫瘍組織の一部は病理学的観察を行うとともに、組織培養された。

2) 軟寒天法²³⁾

細胞のコロニー形成能を軟寒天中で測定するために次のように行なった。シャーレ(径50mm)に最終濃度1%の寒天含有20%仔牛血清加Eagle's MEM培地を5ml入れ凝固させ、その後、100~200個の細胞を寒天培地上に十分に拡散するように植え込む。その上に0.33%寒天培地を5ml重層し凝固させて、5%炭酸ガス培養器にて37°Cで2~3週間培養した。

Ⅸ. IFによる細胞増殖抑制効果の測定法

1) 単層培養法²⁴⁾²⁵⁾

細胞を一定の密度で5%仔牛血清加 Eagle's MEM に浮遊し、2 mlづつシャーレ(径20mm)に分注、5%炭酸ガス培養(37°C)を行なった。IFは分注時に一定量加えた。一定時間培養後、トリプシンを用いて単個の細胞にし、トリパンブルー染色をして細胞数を血球計算盤にて数えた。

2) 軟寒天法

IFによる軟寒天中でのコロニー形成の抑制効果はGresserらの方法²⁶⁾に準じて測定した。IF又は正常細胞培養液(IF対照)を適当な濃度を含むように20%仔牛血清加Eagle's MEM寒天培地に加え、前述のごとく、細胞を軟寒天内で2~3週間培養し、コロニー数を数えた。コロニー形成の抑制率は対照とIF処理群と比較して求めた。IFの力価はウィルス増殖抑制単位(VSV 50%ブランク減少)で表わした。

X. MC細胞内因性C型ウィルスの検出法

1) 超遠心分析法²⁷⁾

細胞は 30×10^5 cell/mlの5 mlをプラスチックシャーレ(径50mm 豊島製)に培養した。³H-Uridine (20 μ ci/ml)を含む10%仔牛血清加Eagle's MEMに置き換えて18時間培養(ラベル)を行い、培養上清の10,000rpm, 10分、4°C遠心、上清を集めた。この上清をTNE(0.01M Tris-HCl, pH8.3, 0.15M NaCl, 0.005M EDTA)緩衝液で作製した蔗糖密度勾配(15~60%)上に重層し、26,000rpm 3.5時間、4°CでSW40ローターを用いて超遠心(日立製40p)行なった。遠心後、分画を行い、10% trichloro acetic acid (TCA)を各画分に加え、沈澱物を0.22 μ m millipore filter[®]にとり、5% TCAで数回洗い、乾燥させた。このfilterをSample Solubilizer (Soluen[®] pakard製)で溶解、トルエン・シンチレーション液を加え、シンチレーション・カウンター(pakard製)で測定した。

2) Mixed culture cytopathogenicity (XC-test)

Klementらの方法²²⁾に従って、プラスチック・シャーレ(径50mm)に 3.0×10^5 個のNIH-Swiss, BALB/C MEをそれぞれに培養し、MCのMuLV(後述)を接種した。MuLVの接種前に5 μ g/mlのpolybrene[®](²⁸⁾にて細胞を18時間処理した。培養は炭酸ガス培養器、37°Cで行い、培養液を週2回交換した。MuLV接種後、14~21日目に培養細胞をピペットで帯状にはがし、 2.0×10^5 cell/mlのXC細胞を加え、混合培養約1週間の典型的巨細胞出現の有無を調べた。

XI. 逆転写酵素(RNA dependent DNA polymerase)活性の測定

MC細胞培養上清は、遠心(10,000rpm, 10分)によって細胞成分を除き、さらに25,000rpm, 40分、4°Cで遠心を行なった。沈渣はTNE緩衝液で懸濁し、蔗糖密度勾配(15~60%)に重層し、SW40ローターにより超遠心(26,000rpm, 3.5時間, 4°C)を行なった。遠心後、密度1.16の分画部分を採用し、polymerase活性の測定用精製ウィルス粒子とした。

酵素活性の測定はGreenらの方法²⁹⁾に準じて行なった。精製ウィルス液10 μ l, 0.1% Triton X-100 10 μ l, 蒸留水30 μ lで計50 μ lとし、これに基質混合液(1M Tris-HCl, pH8.0, 80 μ l, 1M dithiothreitol 10 μ l, 3M NaCl 20 μ l, 10mM dATP 20 μ l, 10mM dcTP 20 μ l, 10mM dGTP 20 μ l, ³H-dTTP (500 μ ci/ml) 11.4 μ l/mole 400 μ l, 1M MgCl₂ 15 μ lに蒸留水415 μ lを加え全量を1,000 μ lにした。)を50 μ l加えて、37°Cで反応を開始。一定の時間をおき、150 μ lの1N PCAを添加後、急冷(0°C)、反応を止める。これに100 μ lのウシ胸腺DNA (1mg/ml)をキャリアーとして加えよく混合し、0°C, 10分間静置したのち20% TCAを添加して、0°C, 10分間静置した。反応液をmillipore filter[®]の上に集め10% TCAで洗浄、乾燥した。このfilterをsoluen[®]で溶解後、シンチレーション液を加え、酸不溶画分への³H-dTTPのとり込みを、シンチレーション・カウンターで測定した。

IFの影響を調べる場合は、内在性のtemplateを用いるかわりに、Spiegelmanらの方法³⁰⁾に準じて、合成templateであるpoly(rA)・oligo(dT)を用い酵素活性を測定した。

XII. 電子顕微鏡写真

MC細胞をラバーポリスマンでガラス面から剥離し、800rpm, 10分、遠心を行い、5%グルタルアルデヒドを含むPBSで、4°C, 45分間固定を行なった。その後、固定された細胞を遠心でくりかえし洗浄した。さらに、2%四酸化オスミウムで固定、アルコール脱水を行い、エポキシ樹脂に包埋後、超薄切片を作製し、電子顕微鏡で観察した。

XIII. 走査電子顕微鏡写真

MC細胞はカバーガラスを入れたシャーレで培養を行なった。カバーガラスを取り出しPBSで十分に洗浄を行い、5%グルタルアルデヒドを含むカコジル酸緩衝液で固定、さらにオスミウム酸で固定を行なった。固定後、アセトン脱水、臨界点乾燥、蒸着を行なって、走査型電子顕微鏡にて、MC細胞表面を観察した。

XIV. MC細胞内ウィルス粒子の合成とその逆転写酵素の測定

MC細胞は、 ^3H -Uridine (200 μCi) でラベルしたのち、凍結融解を行ない (5~6回)、前述のごとく、10,000rpm、及び25,000rpmの遠心、X、XIと同じ蔗糖密度勾配法で超遠心した。そこで得られた密度1.16附近に認められる放射活性の酸不溶性RNAを検討し、MC細胞抽出C型ウイルスとみなした。

IF処理細胞内ウィルスについては、2,000U/mlのIFをMC細胞培養液に加え18時間培養、 ^3H -Uridine (200 μCi) をラベルして上記の方法で分析した。

細胞内ウィルス粒子の逆転写酵素活性の測定には、MC細胞を72時間培養後、凍結融解し、その上清を蔗糖密度勾配遠心した各画分について酵素活性を測定した。またIF処理細胞は2,000U/mlのIFを加え72時間培養したものについて同様に測定した。templateには前述のごとく合成のpoly(rA)・oligo(dT)を用いた。

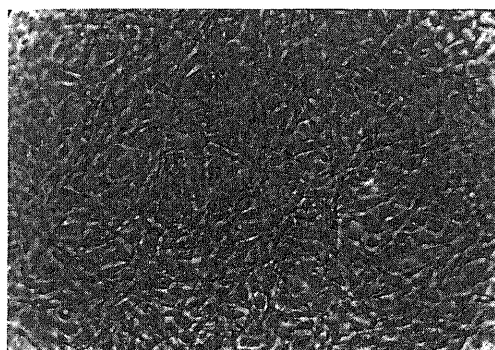


図1. MC細胞 (108代)
位相差顕微鏡写真 ($\times 100$)

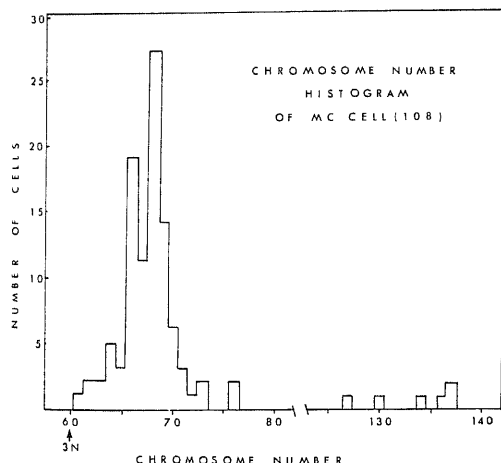


図2. MC細胞 (108代) の染色体数

結 果

I. 自然がん化マウス肉腫細胞株 (MC) の樹立

ddy系妊娠マウスの約15日令の胎児を無菌的に採り出し、材料及び方法に示すように、全胎児細胞を培養した。単層に増殖後、トリプシン・EDTA混合液を用いて細胞を分散し、3倍に希釈して継代を行なった。細胞の増殖状態に応じて週1~2回の頻度で継代培養を続けたところ、20代目を過ぎた頃から次第に細胞の配列が乱れ、接触阻害が起らず重層を形成して樹立化に至ったと考えられ、MC細胞となづけられた (図1)。

II. MC細胞の染色体分析

MC細胞の染色体は定法に準じ分析した。継代108代目で図2のような68にモードを示した。正常マウス細胞の染色体数は $2n = 40$ で、全てが端部動原体型染色体 (terocentric chromosome) であるが、MC細胞

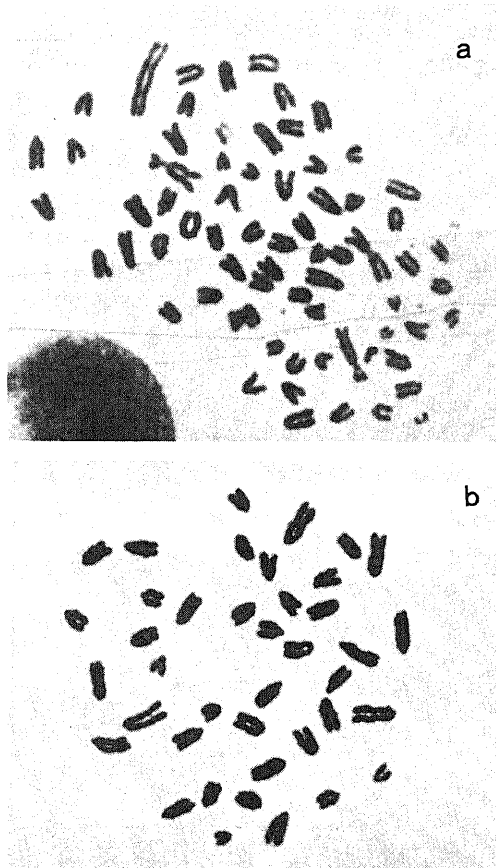


図3. MC細胞とマウス初代培養細胞の染色体

a. MC細胞134代目

b. ddyマウス初代培養細胞 ($2n = 40$)

では、中部動原体型 (metacentric chromosome) の長腕をもつ染色体も認められ、モード及び核型 (Karyotype) の上からも既に正常型よりずれて異型化を示すに至っていた。(図3)

Ⅲ. TRANSFORMATION の測定

1) in vivo 腫瘍形成能

MC 細胞を約 20 代継代後樹立化したと思われる時期に同系の ddy 系哺乳マウスの背部皮下に、一匹あたり 1.0×10^6 細胞を接種した。その結果、ほぼ 100% に移植後 1 週間後触知できる腫瘍となり、以後急速に腫大した。この腫瘍は病理組織学的検査の結果、線維芽肉腫であった。この肉腫は哺乳マウスの皮下移植で継代が可能で、マウスで継代された肉腫を組織培養にもどすと、MC 細胞と同様な形態および性質の細胞となった。

2) in vitro コロニー形成能

MC 細胞の transformation を in vitro で定量的に測定するために、軟寒天培地で培養を行なった。表 1 に示したように、MC 細胞は 40% 前後の効率でコロニーを形成した。

以上の結果から、MC 細胞は継代培養を重ねることによって自然に transform (がん化) した細胞である。

Ⅳ. IF による MC 細胞増殖抑制

1) 単層培養法

IF (2.0×10^4 U/ml) を培養液に加え、MC 細胞を培養した結果、図 4 に示すように、IF によって MC 細胞の増殖は約 1/3 ~ 1/5 抑制された。

IF が L 細胞の増殖を抑制することを Kawade ら²⁴⁾、Gresser ら²⁵⁾、paucker ら³¹⁾が報告しているので、著者も IF の濃度を変えて、その効果を L 細胞と

表 1 軟寒天培地における MC 細胞のコロニー形成

	播 かれた 細 胞 数	コ ロ ニ ー 形 成 数	平均コロニー形成率(%)
Exp. 1	300	123, 136, 124, 131	42.8
Exp. 2	140	47, 67, 49 56, 40, 46	36.3

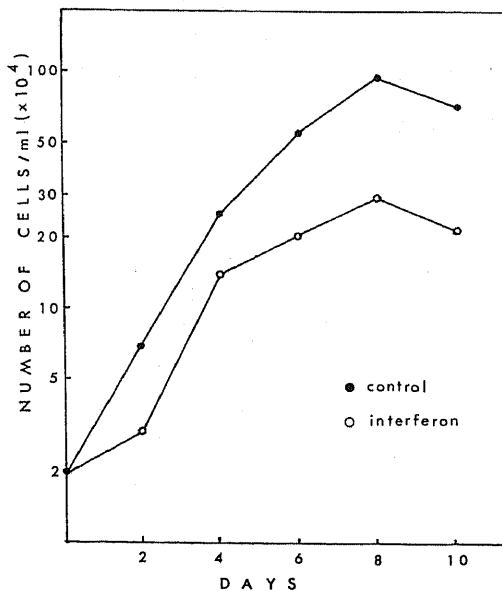


図 4. MC 細胞に対するインターフェロンの細胞増殖抑制効果

インターフェロン: 2.0×10^4 units/ml

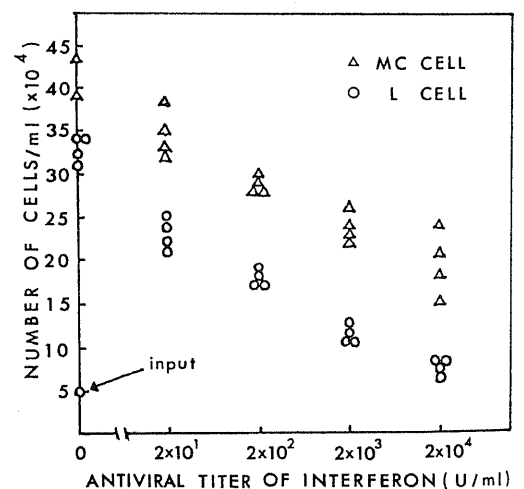


図 5. インターフェロン濃度と細胞増殖抑制効果 (インターフェロン存在下で 4 日間単層培養したのちの細胞数を示す.)

MC細胞について比較検討した。図5に示すようにIFの濃度に依存して、これら両細胞は何れも増殖が抑制された。

2) 軟寒天法

MC細胞のコロニー形成に対するIFの効果を調べ

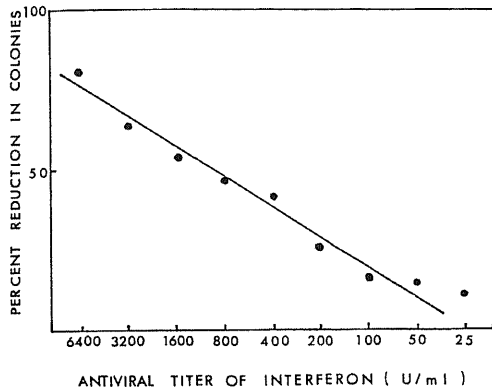


図6. MC細胞のコロニー形成に対するインターフェロンの抑制効果
(対照を100とした時の、軟寒天培地でのコロニー形成の抑制率を示す。)

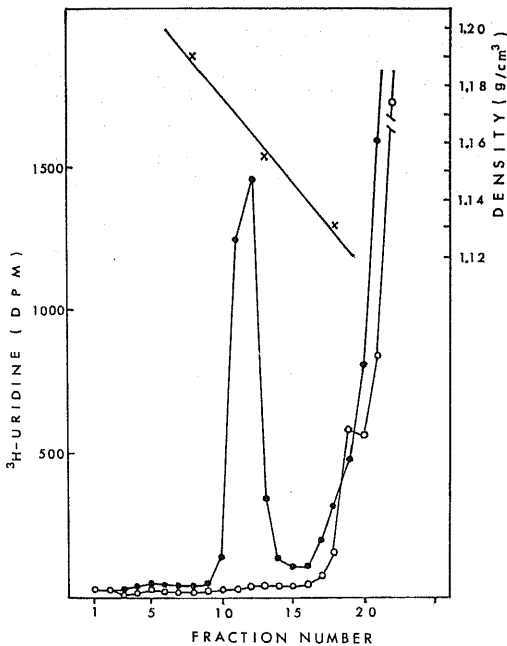


図7. 蔗糖密度勾配遠心法によるMC細胞産生ウイルス粒子の分析
・ MC細胞培養上清
○ インターフェロン(200units/ml)処理MC細胞の培養上清

た。種々の濃度にIFを含む軟寒天培地内におけるMC細胞のコロニー形成は、図6に示した。IFの濃度に依存してコロニー形成は抑制され、800～1,600U/mlのIFで50%の抑制が認められた。

V. MC細胞の内因性C型ウイルス検出

MC細胞に³H-Uridine (20μci/ml)を18時間ラベルして培養上清中に産生されるウイルス粒子をRNA腫瘍ウイルスの検出に用いられる条件の下で、蔗糖密度勾配遠心法を用いて分析した。MC細胞から産生されるラベルされたウイルス粒子は1.16g/cm³附近に密度をもつものであった。このウイルス粒子は³H-uridineの取り込みと密度から、自発的に産生されるC型ウイルスの一種であると考えられた。(図7)

MC細胞の電子顕微鏡による観察の結果、図8に示すように、MC細胞の細胞膜面から出芽している典型的なC型ウイルス像を認めた。

VI. ウィルス粒子のRNA dependent DNA polymerase 活性

マウス細胞産生C型ウイルス粒子には逆転写酵素が存在していることはよく知られている。MC細胞産生ウイルス粒子内にこの活性が存在するかどうかを測定するために、培養上清中のウイルス粒子を濃縮し、さらに蔗糖密度勾配遠心法により精製を行なった。この精製ウイルス液をTriton X-100で処理を行い、ウイルス粒子内のRNAを鋳型として基質混合液と反応させた。反応は37°C、45分まで行い、酸不溶画分への³H-dTTPのとり込みで酵素活性を測定した。図9に示すように、反応時間45分まで反応は直線的に進行した。この結果から、MC細胞が産生するRNA型ウイルスは、逆転写酵素をもつマウスRNA腫瘍ウイルスの一種であることが推定された。

VII. MC細胞産生ウイルス粒子の同定と感染性

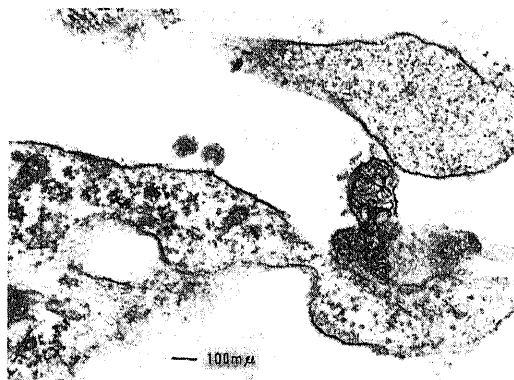


図8. MC細胞のC型ウイルス粒子

1) mixed culture cytopathogenicity (XC-test)

MC細胞とXC細胞の混合培養を行なったところ、図10のような多核巨細胞の形成が認められた。MC細胞の継代数に関係なく常に多核巨細胞は形成されるので、ウィルス粒子が持続的に産生されていることを示し、このウィルスはMuLVであることが解った。

2) MC細胞の内因性C型ウィルスの宿主域と抗原性

MuLVはその宿主指向性(宿主域)によって、N-

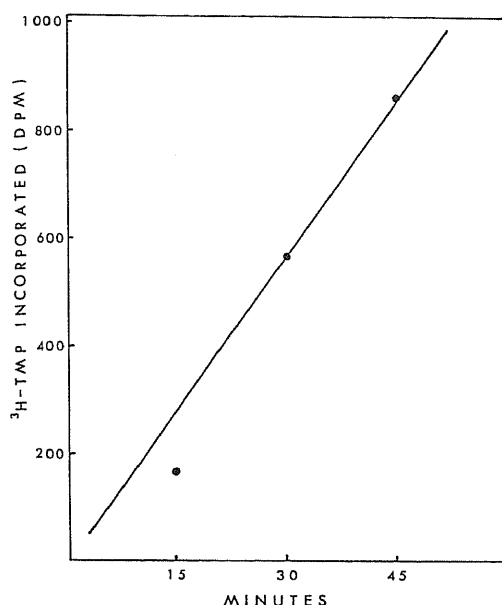


図9. MC細胞産生ウィルス粒子の逆転写酵素活性
 蛋白濃度: $2.5\mu\text{g}$ viral protein/0.1 ml
 template: endogenous RNA
 反応温度: 37°C

, B-, NB-tropic に分類される³²⁾. MC細胞が産生する内因性MuLVがどのような指向性を持っているかを調べた。NIH-Swiss, BALB/C MEに種々の濃度のウィルス液(MC細胞培養上清)を感染させた後に、XC細胞を加え、多核巨細胞の形成を観察した。表2に示すように、このウィルスはNIH-Swiss MEでより良く増殖する、いわゆるN-tropic MuLVであった。

MuLVの血清学的分類は未だ詳しくは行われていないが、動物に感染させて得られる白血病細胞の抗原性から、Gross-AKRグループとFriend-Moloney-Rauscher (FMR)グループの2つに分けられている³³⁾. MC細胞から産生されるMuLVを精製濃縮(抗原としての蛋白濃度: $2.5\mu\text{g}$ viral protein/0.1 ml)して、抗Moloney及び抗Rauscher血清との間でゲル内沈降反応を行なったところ、FMRグループのMoloney MuLVに抗原性が近いことが解った(図11)。

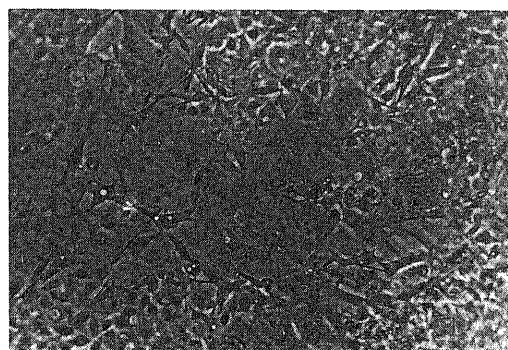


図10. MC細胞とXC細胞の混合培養による多核巨細胞 (×100)

表2 MC細胞内因性C型ウィルスの宿主指向性

		宿主細胞	感染価** (TCID ₅₀ /0.2 ml)
MC細胞培養上清		NIH-SWISS*	$10^{3.5}$
		BALB/C*	$10^{1.0}$
対照	NIH-SWISS 細胞培養上清	BALB/C	陰性
	BALB/c 細胞培養上清	NIH-SWISS	陰性

* NIH-SWISS, BALB/c 細胞は、10日令の胎児の初代培養細胞

** XC細胞(1.0×10^6 個)をウィルス感染後、14日以後に加え、多核巨細胞の出現をもって感染価とした。

Ⅷ. MC細胞内因性C型ウイルス細胞外産生放出に対するIFの効果

MC細胞を単層培養し、培養液のみ(対照)と、200u/mlのIFを含む培養液にそれぞれ置換し、さらに18時間処理を行なった。その後、培養液(IF)を除き、20 μ ciの³H-Uridineで18時間ラベルして、その培養上清を超速心分析した。対照では、C型ウイルスの密度である1.16附近にピークが認められることは前述した通りである。一方、200u/mlのIF処理MC細胞は、図7に示すように、放射活性のある密度1.16のウイルス粒子を産生放出しなかった。

次にIFの有効量をみるため、MC細胞(継代35代目)を、対照(IFなし)、及び6, 12, 25, 50, 500u/mlのIF含有培養液で18時間培養(前処理)後、前実験と同様に、20 μ ciの³H-Uridine含有培養液でさらに18時間ラベルした。その上清を蔗糖密度勾配遠心法によって分析した。図12に示すごとく、前処理に使用す

るIFの量が増加するに従い、1.16附近の放射活性のピークが減少した。即ち、細胞からのC型ウイルス粒子の産生が抑制されていることが解った。さらに、継代40代目と51代目のMC細胞で比較検討した結果を表3にまとめた。これを見ると、いずれの代数の細胞においても、IFの量が増加するにつれて、ウイルス産生は明らかに抑制されていた。この実験から、ウイルス産生を50%抑制するに必要なIF力価は6~12u/mlであった。

Ⅸ. MC細胞内因性C型ウイルス産生に対するIF抑制効果の持続性

IFは前述のごとくMC細胞のMuLV産生を抑制するが、その効果の持続期間を知る目的で次の実験を行なった。MC細胞を、培養液のみ(対照)と、500u/mlのIF含有培養液で18時間前処理後、前実験と同様

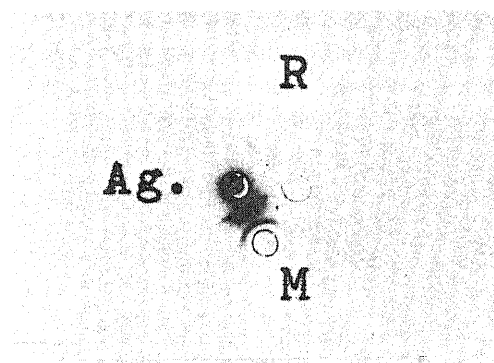


図11. MC細胞内因性C型ウイルスの抗原性

Ag: MC細胞産生C型ウイルス粒子

R: 抗ラウシャー白血病ウイルス家兔血清

M: 抗モロニー白血病ウイルス家兔血清

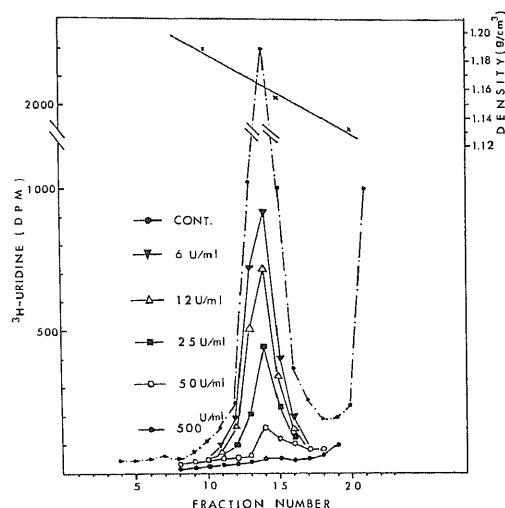


図12. MC細胞のMuLV産生に対するインターフェロンの量的効果

表3 インターフェロンによるC-type particle産生の抑制

IF units/ml	500	50	25	12	6	3	1.5
Exp. 1 MC (35)	100.0	95.4	81.4	70.0	60.0	—	—
Exp. 2 MC (40)	—	—	76.0	52.0	33.0	19.0	1.2
Exp. 3 MC (51)	—	89.7	81.4	61.0	51.9	41.4	—

* 数値は³H-Uridineの1.16画分へのとり込みの抑制率(%)を示す。

に、 ^3H -Uridine ($20\mu\text{Ci}$) でラベルした。その他に、18 時間 IF で前処理した細胞を、IF を除き洗浄して、さらに 24, 48, 72 時間それぞれに培養後、 $20\mu\text{Ci}$ の ^3H -Uridine を加え 18 時間ラベルした。これらの培養上清を個々に集め、蔗糖密度勾配遠心法にて分析した。図 13 に示すように、IF 処理後、直ちに ^3H -Uridine を加

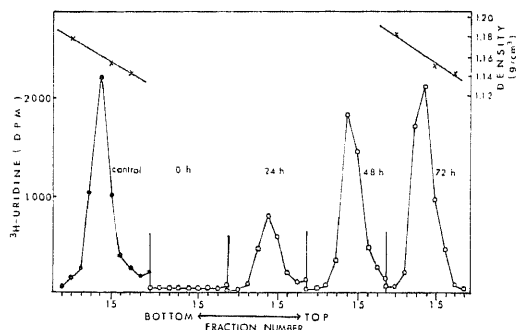


図 13. MC 細胞 MuLV 産生に対するインターフェロンの抑制効果の持続

- ・無処理細胞
- インターフェロン処理細胞 (500units/ml)

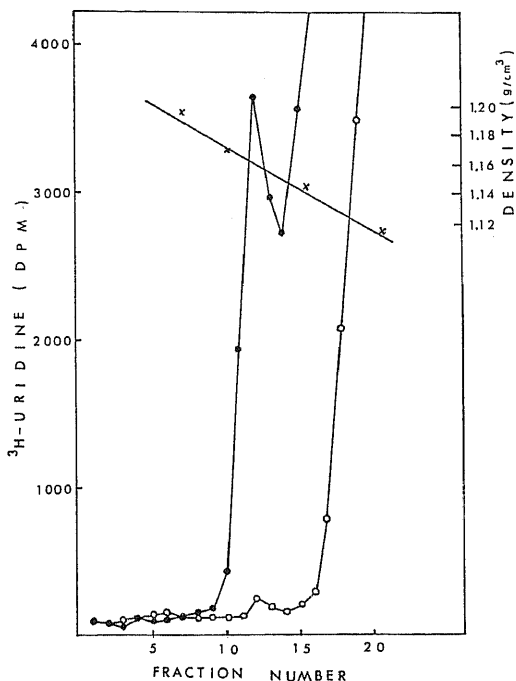


図 14. 細胞内ウィルス RNA 合成に対するインターフェロンの影響

- ・無処理 MC 細胞抽出液
- インターフェロン (2,000 units/ml) 処理 MC 細胞抽出液

えた場合 (oh) には、前実験の結果と同様に密度 1.16 附近に放射活性のピークは全く認められなかった。IF を除き 24 時間培養すると (24h)、すでに密度 1.16 附近に放射活性があり、ウィルス粒子の産生が認められた。さらに IF 処理後 72 時間培養を行なった場合 (72h) では、全く対照と同じレベルにまでウィルス粒子の産生が回復していた。この結果から、IF によって MC 細胞が産生するウィルス粒子を長期間抑制するためには、培養液中に IF が持続的に存在している必要があった。

X. MC 細胞内因性 C 型ウィルス RNA の細胞内合成及びその逆転写酵素活性に対する IF の影響

IF 処理細胞内におけるウィルス RNA 合成を知るために、無処理細胞を対照に、処理細胞抽出液につき図 14 の実験を行なった。その結果、 $2,000\text{u/ml}$ の IF で 18 時間処理することにより、密度 1.16 附近のウィルス RNA に最も関連ある分画への放射活性のとりこみは抑制された。このことは、IF によるウィルスの新たな MC 細胞内合成抑制を意味していると思われる。

同時に、IF 処理細胞抽出ウィルスの逆転写酵素活性について調べた。図 15 に示すように、IF 処理を行なっても、MC 細胞抽出の密度 1.16 附近に逆転写酵素活性のピークが認められた。この酵素活性は、対照 (IF 無処理 MC 細胞抽出液) と比較しても全く差異が認められなかった。これらの結果から、IF 処理によってウィルスの新たな合成は抑制され、また、培養上

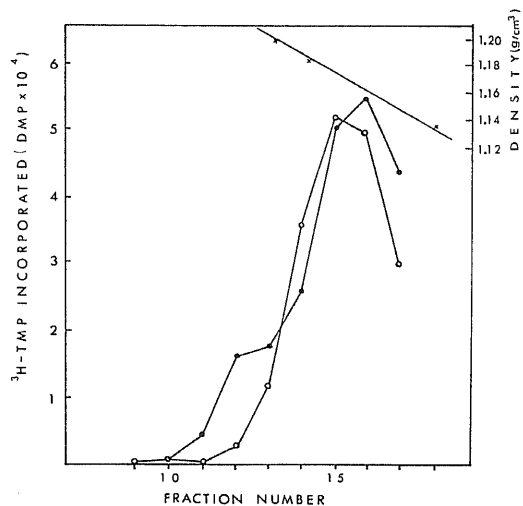


図 15. インターフェロン処理細胞内の逆転写酵素活性

- ・無処理 MC 細胞抽出液
- インターフェロン (2,000 units/ml) 処理 MC 細胞抽出液

清への放出(細胞外)も抑制されているが、IF 処理以前に合成されている細胞内に存在し、この酵素活性を有するウィルス粒子には全く影響しなかったことを示している。

XI. IF 処理 MC 細胞の XC-test

IF 処理 MC 細胞と XC 細胞との混合培養を行なっ

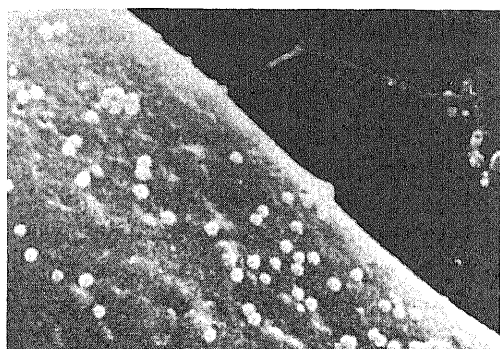


図 16. MC 細胞の走査電子顕微鏡写真 (×10,000)

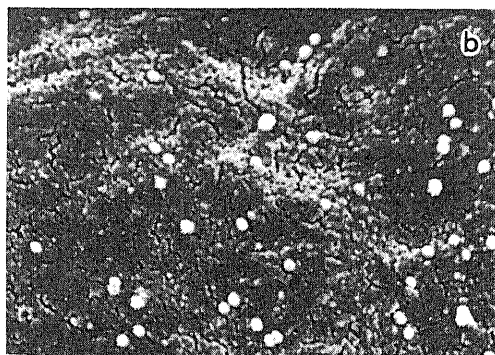
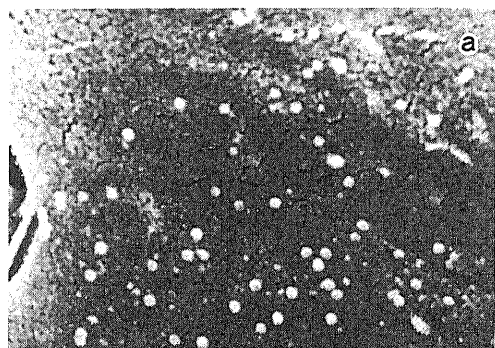


図 17. MC 細胞表面のウィルス粒子に対するインターフェロン影響

a. 無処理 MC 細胞 (×10,000)

b. インターフェロン処理 MC 細胞 (×10,000)

た. 1,000u/ml の IF を加えて MC 細胞を、7 日間、14 日間 (7 日目に継代培養) それぞれ培養した。対照は培養液のみで培養した。XC 細胞を加え混合培養した結果、MC 細胞を 1,000u/ml の IF で 14 日間処理した場合も XC 細胞の多核巨細胞の形成は阻止できなかった。この点については考察の項で特にふれたい。

XII. MC 細胞の走査電子顕微鏡写真

前実験に示したごとく、混合培養による XC 細胞の多核巨細胞形成が IF の長期 (7 ~ 14 日) 処理によっても阻止することができないという結果から、MC 細胞の表面の状態を走査電子顕微鏡によって観察した (図 16)。

MC 細胞を 1,000u/ml の IF を加え培養を行い、4 日目に 1,000u/ml の IF を含む培養液に交換し、さらに 7 日目に同じ単位の IF を含む培養液で継代培養を行なって、10 日目に固定した。対照として IF を含まぬ培養液で同様に培養したものをを用いた。図 17 に示すように、対照と比較しても、IF 処理細胞に認められるウィルス粒子の数に著明な差異はなかった。

考 察

in vitro における細胞の transformation は、ウィルス³⁴⁾のみならず化学発癌剤³⁵⁾、放射線³⁶⁾などによって起るが、低率ながら自然に起ることも知られている³⁷⁾。我々の樹立化した MC 細胞の transformation について、in vivo, in vitro で検討したところ、transformation の指標となる同系動物への移植による腫瘍形成、軟寒天内でのコロニー形成、および染色体の異数性が認められた。特にがん化の原因となった agent は実験過程で見当らず、我々の場合は細胞継代の過程で、ウィルスの感染や化学発癌剤以外の、自然がん化したものと考えられた。

さらに、MC 細胞は培養上清中に C 型ウィルス粒子を自発的に産生するようになったが、これについては、株化細胞樹立化過程での外因性の C 型ウィルスによる汚染を考慮しなければならない。しかし、我々の実験室において以前に MuLV を使用した経験は全くなかった。また、FMR グループのウィルスと抗原性は似ているが、自発的に産生されたこのウィルスは ddy 系マウスに腫瘍原性がなかった。また、ddy 系 ME の継代歴数代までは、³H-Uridine で測定する限りウィルス粒子は検出されず、継代を重ねるにつれてウィルス粒子の産生が高まり、20 代以降は高いレベルの産生が持続した。以上のことから、このウィルス粒子は MC 細胞から自発的に産生される内因性 C 型ウィルスであると考えた。

どのような機構によって、MC細胞が自発的にウィルスを産生するようになったかは現在明らかではない。しかし、Aaronsonら³⁸⁾によると、BALB/C MEが自発的にMuLVを産生するに至る要因の一つとして、高い細胞密度での継代培養が考えられている。

次いで、電子顕微鏡によるC型ウィルスの形態学的確認とともに、このウィルスの持つ逆転写酵素活性が明らかにされた。この活性は45分まで直線的に上昇したが、その後、活性は多くの場合急激に低下した。その原因はこのウィルス粒子内にあるDNA分解酵素によるとされているが³⁹⁾、我々の場合⁴⁰⁾もその可能性が強いと思われる。

また、自発的産生ウィルスの性状および感染性について調べると、XC-testの結果、それはN-tropic MuLVであることが判明した。

一般にIFは蛋白質であろうと予想されながら、完全に精製されていないという事情から決定的な解答は得られていない。しかし、代謝阻害剤を用いた間接的な証明、例えば、ウィルスや核酸誘発IFは、アクチノマイシンD⁴¹⁾⁴²⁾や、ピューロマイシン⁴³⁾⁴⁴⁾により産生が阻害されることは、mRNAの翻訳を通じて合成される蛋白質であることを示している。さらに、最近になってIF産生のためのmRNAに関する成果が得られ、無細胞系でIFが合成されるに至っている。IF産生誘発細胞からRNAを抽出し、これを無細胞蛋白合成系に加えるとIFが合成され、ウィルス増殖抑制作用が認められるとともに、それは種特異性を示し、同時に、抗IF抗体によって完全に失活した。これらより、合成された蛋白は生物学的活性を持ったIFであることが証明された⁴⁵⁾⁴⁶⁾。その後、ヒトIFのmRNAをアフリカツメガエルの卵母細胞に注入することによって、無細胞系よりも効率よくmRNAの翻訳を行わせ、ヒトIFの産生がみられている⁴⁷⁾。このIFは、1mgの蛋白量当り、 10^9 単位にまで精製が現在進んで、アフィニティ・クロマトグラフィやディスク電気泳動によって分離されるマウスIF活性は単一でなく、その分子の多型性が考えられ、分子量約22,000と約35,000のものの存在が示されている⁴⁸⁾。また、ヒトIFはヒト線維芽細胞とヒト・リンパ球産生で分子量が異なり、前者のそれは約20,000、後者のものは約15,000と約21,000といわれている⁴⁹⁾⁵⁰⁾。さらに、このことはVilčekら⁵¹⁾によって、ツメガエルの卵母細胞にそれぞれのmRNAを翻訳させ、産生されたIFによって確かめられた。

IFによる抗ウィルス作用の発現の機作は、IFによって感作された細胞は新しい蛋白質(Antiviral protein, AVP)を合成し、この蛋白が細胞のリボゾー

ムと結合しウィルスmRNAを選択的に識別して、ウィルスの蛋白合成を阻害(翻訳阻害)していると考えられる⁵²⁾。

一般にかかるIFは正常細胞の分裂又は生理機能に対して、全く影響しないと考えられてきたが、ウィルス増殖抑制作用以外の多面的な生物活性(IF産生の促進(Priming)⁵³⁾⁵⁴⁾、細胞増殖阻害作用²⁴⁾~²⁶⁾、腫瘍ウィルス持続感染細胞に対する作用等¹⁸⁾~⁵⁵⁾)に関する報告が最近多くなってきた。中でも、細胞増殖阻害作用については、その活性を現わすためにはウィルス増殖抑制作用の数百倍ものIFが持続的に作用する必要上、かかる作用はIF標品中の爽雜物の影響と考えられた。しかし、Gresserら⁵⁾~⁷⁾の行なった一連の実験によると、部分精製マウスIFは、L細胞、L-1210細胞やマウス正常二倍体細胞にまで影響を与え、その作用に種特異性があり、物理化学的性質もウィルス増殖抑制活性と同じであった。さらに、ウィルス増殖抑制作用に抵抗性をもつL-1210 R細胞を用いた実験において、IFはこの細胞の増殖を阻害できなかった⁵⁶⁾。このようにウィルス増殖抑制作用とこれ以外の作用もIFそのものによっていると考えられる。

IFのウィルス増殖抑制作用の機作については前述のごとく明確であるが、腫瘍ウィルスに対する機作は若干異なっている。著者もMC細胞の内因性MuLVに対するIFの効果について検討したところ、継代歴の異なった細胞でも、IFの量が増加するにつれてウィルス産生は抑制され、500u/mlのIFによって完全に抑制された。IF効果の持続性については、500u/mlのIFでMC細胞処理後、IFを除くと一時的にはウィルス産生は全く抑制されるが、かなり早い時期に回復した。MuLV持続感染細胞におけるIFのウィルス産生の一時的抑制という報告(Billiauら¹⁸⁾、Friedmanら⁵⁷⁾⁵⁸⁾)と符合して、内因性ウィルスの自発的産生MC細胞系の場合も、IFの継続的存在がウィルス産生の持続的抑制に必要であった。このように、MuLV産生に対するIFの効果は内因性ウィルスと外因性ウィルスとの間に差異はないようである。さらに、細胞内ウィルス合成および細胞内ウィルス粒子の逆転写酵素に対するIF効果をみると、細胞内ウィルス合成を阻害したが、細胞内ウィルス粒子の逆転写酵素活性に対しては全く影響しなかった。これは、内因性MuLV産生はIFによって抑制されるが、すでに合成されたウィルスは活性のある状態で細胞に留まっているが故と考えられる。

IF処理細胞内既存ウィルスが活性を持っているもう一つの証拠として、XC細胞との混合培養による多

核巨細胞の形成は IF によって阻止できなかった。MuLV 感染細胞と XC 細胞との混合培養による融合の機構については不明であるが、前述のごとく IF 処理以前にすでに合成されたウイルス粒子は細胞内又は細胞表面に活性を持った状態で留まっているのであろう。このことは、形態学的に走査電子顕微鏡によっても、IF 処理 MC 細胞と対照 MC 細胞の表面のウイルス粒子の数に差異のなかったことから、推定できた。Billiau ら⁵⁹⁾、Chang ら⁶⁰⁾は、IF 処理によって細胞表面からの MuLV の放出が抑制された結果、細胞表面に MuLV 粒子が異常に増加したと報告しているが、この点は著者の結果と異なっている。

また、Friedman ら⁵⁸⁾は、AKR ウィルスの持続感染細胞を IF 処理すると培養上清中へのウィルスの産生と逆転写酵素活性は減少するが、細胞内には MuLV の構造蛋白である P30 (group-specific antigen, gs 抗原)の蓄積が認められ、細胞内酵素活性には変化がないことをみている。さらに、IF は内因性 MuLV をもつ Balb, AKR 細胞の IdU によるウィルスの誘発を抑制することが知られている⁶¹⁾。一方、Wu, A.M ら¹⁹⁾によると、BALB 細胞と transformed nonproducer K-BALB 細胞において、IdU で誘発される Xenotropic MuLV は IF 処理によって産生が抑制されるが、細胞内の gs 抗原のレベルは上昇する結果が示された。また、pitha P.M. ら¹⁸⁾は、精製マウス IF を用いて、AKR 細胞クローン株における AKR-MuLV の複製、外因性ウィルスの複製、IdU による内因性ウィルスの活性化、持続感染細胞のウィルス産生について、IF はそれぞれのウィルスの複製、活性化、ウィルス産生の抑制をみた。しかし、細胞内の gs 抗原の合成は抑制されなかった。これは組込まれたウィルスの少なくとも一つの蛋白が、一部表現されていることを示していると思われる。さらに、Wong ら⁶²⁾は、IF 処理 AKR, C⁺細胞と Moloney MuLV, ts3 変異株感染 TB 細胞を non-permissive な温度(39°C)で培養し、両細胞表面に出芽しているウィルス粒子の蓄積を見出した。これはウィルス感熟過程が、IF の作用または ts3 変異によって阻害されていることを示唆するものであると報告している。

著者がここに示した悪性がん化マウス細胞から自発的に産生される内因性 MuLV に対する IF の効果は、腫瘍ウィルスに対する IF の作用に関する多くの報告と同様に、ウィルス粒子の assembly の段階と細胞からウィルス粒子を放出する段階が阻害されているものと考えられた。

MuLV に対する IF の確かな作用機序については今

後の結果を待たなければならないが、腫瘍ウィルス以外の一般ウィルスに対する作用機序に加えて、宿主細胞の生理的機能にも働いて、ウィルス産生の抑制を来たすものではなからうかと思われる。

要 約

ddy 系マウス胎児細胞を長期にわたり継代培養し、自然がん化マウス肉腫細胞 (MC) を得た。そのがん化は、20 代以上継代培養を行なった時期に同系の哺乳マウス皮下接種(10⁶細胞)による線維芽肉腫形成と軟寒天培地における約 40%の細胞のコロニー形成能で確められた。この細胞の C 型ウィルス粒子産生は電子顕微鏡、³H-Uridine のとり込みの実験によって証明された。さらに、密度 1.16 附近の産生ウィルス粒子内には逆転写酵素が存在し、XC-test の結果、このウィルスは N-tropic MuLV であった。MC 細胞の単層培養での増殖、および軟寒天培地内のコロニー形成は IF によって抑制され、コロニー形成を 50%抑制するには約 1,000u/ml の IF が必要であった。IF によるウィルス粒子産生抑制効果は、³H-Uridine とりこみ阻害で調べると、6~12u/ml で 50%抑制を示した。500u/ml の IF で処理した MC 細胞は培養液中にウィルス粒子を全く放出しなかったが、細胞内ウィルス粒子の逆転写酵素活性に変化は認められなかった。しかし、細胞内での新たなウィルス粒子の合成は抑制されていた。走査電子顕微鏡によるウィルス粒子の観察によっても、IF 処理細胞表面粒子の数は対照と差異は認められなかった。

以上の結果より、IF は自発的に産生しているウィルス粒子を細胞内に活性のある状態で留めて、細胞外へ放出する段階に作用して新たな産生(合成)を抑制していると考えられる。

本稿を稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました富山県衛生研究所所長渡辺正男博士および、御助言、御校閲を賜りました金沢大学癌研究所ウィルス部教授波田野基一博士に深謝の意を表します。また御協力いただきました、富山医科大学木村通郎博士、大阪大学微生物病研究所奥野良信博士、大阪府立公衆衛生研究所新宮浩寿博士に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、第 22 回日本ウィルス学会(1974)、および、第 3 回国際ウィルス学会(1975)において発表した。

文 献

- 1) Joklik, W. K. & Merigan, T. C. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 56, 558 (1966).
- 2) Levy, H. B. & Carter, W. A. : J. Mol. Biol., 31, 561 (1968).

- 3) Gupta, S. L., Grasiadei, W. D., Weideli, H., Sopori, M. L. & Lengyel, P. : *Virology*, 57, 49 (1974).
- 4) Metz, D. H. & Esteban, D. : *Nature*, 238, 385 (1972).
- 5) Gresser, I., Brouty-Boye, D., Thomas, M. - T. & Macieira-Coelho, A. : *J. Nat. Cancer Inst.*, 45, 1145 (1970).
- 6) Gresser, I., Brouty-Boye, D., Thomas, M. - T. & Macieira-Coelho, A. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 66, 1052 (1970).
- 7) Gresser, I., Thomas, M. T. & Brouty-Boye, D. : *Nature, New Biol.*, 231, 20 (1971).
- 8) Stewart, W. E. II, De Clercq, E., Billiau, A., Desmyster, J. & De Somer, P. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 1851 (1972).
- 9) Stewart, W. E. II, De Clercq, E. & De Somer, P. : *J. Gen. Virol.* 18, 237 (1973).
- 10) Todaro, G. J. & Baron, S. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 54, 752 (1965).
- 11) Sleno, R. A., Whitmire, C. E., Garcia, I. M. & Huebner, R. J. : *Nature, New Biol.*, 239, 31 (1972).
- 12) Oxman, M. N. & Black, P. H. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 55, 1133 (1966).
- 13) Oxman, M. N., Baron, S., Black, P. H., Takemoto, K. K., Habel, K. & Rowe, W. P. : *Virology*, 32, 122 (1967).
- 14) Oxman, M. N., Rowe, W. P. & Black, P. H. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 57, 941 (1967).
- 15) Billiau, A., Sobis, H. & Somer, P. : *Int. J. Cancer*, 12, 646 (1973).
- 16) Billiau, A., Edy, V. G., Sobis, H. & De Somer, P. : *Int. J. Cancer*, 14, 335 (1974).
- 17) Friedman, R. M. & Ramseur, J. M. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71, 3542 (1974).
- 18) Pitha, P. M., Rowe, W. P. & Oxman, M. N. : *Virology*, 70, 324 (1976).
- 19) Wu, A. M., Schultz, A. & Gallo, R. C. : *J. Virology*, 19, 108 (1976).
- 20) Watanabe, M., Shibata, T., Shingu, H. & Tanaka, I. : *Interferon Sci. Memo. I-A69*, (1974).
- 21) Svoboda, J., Chyle, P. P., Simkovic, D. & Hilgert, I. : *Folia. Biol. Prague*, 9, 77 (1963).
- 22) Klement, V., Rowe, W. P., Hartley, J. W. & Pugh, W. E. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 63, 753 (1969).
- 23) Macphason, I. & Montagier, L. : *Virology*, 23, 291 (1964).
- 24) Owaki, M. & Kawade, Y. : *Acta Virologica*, 16, 477 (1972).
- 25) Lindahl-Magnussen, P., Leary, P. & Gresser, I. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 138, 1044 (1971).
- 26) Gresser, I., Thomas, M. - T., Brouty-Boye, D. & Macieira-Coelho, A. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 137, 1258 (1971).
- 27) Weinstein, I. B., Gebert, R., Stradler, U. C., Orenstein, J. M. & Axel, R. : *Science*, 178, 1098 (1972).
- 28) Lieber, M. M., Sherr, C. J. & Todaro, G. J. : *Int. J. Cancer*, 13, 587 (1974).
- 29) Green, M., Rokutanda, M., Fujinaga, K., Ray, R. K., Rokutanda, H. & Gurgo, C. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 67, 385 (1970).
- 30) Goodman, N. C. & Spiegelman, S. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68, 2203 (1971).
- 31) Pauker, K., Cantell, K. & Henle, W. : *Virology*, 17, 324 (1962).
- 32) Hartley, J. W., Rowe, W. P. & Heubner, R. J. : *J. Virology*, 5, 221 (1970).
- 33) Aoki, T., Old, L. J. & Boyse, E. A. : *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 22, 149 (1966).
- 34) Vogt, M. & Dulbecco, R. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 46, 365 (1960).
- 35) Earle, W. R. : *J. Nat. Cancer Inst.*, 4, 165 (1943).
- 36) Borek, C. & Sacks, L. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 57, 1522 (1967).
- 37) Gey, G. O. : *Cancer Research*, 1, 737 (1941).
- 38) Aaronson, S. A., Hartley, J. W. & Todaro, G. J. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 64, 87 (1969).
- 39) Mizutani, S., Boettiger, D. & Temin, H. M. : *Nature*, 228, 424 (1970).
- 40) 新宮浩寿・柴田忠良・平野明子・栗村 敬・渡辺正男 : 第24回 日本ウィルス学会総会, 演説抄録. 2055 (1976).
- 41) Heller, E. : *Virology*, 21, 652 (1963).
- 42) Wagner, R. R. : *Nature*, 204, 49 (1964).
- 43) Ho, M. & Breining, M. K. : *Virology*, 25, 331 (1965).
- 44) Wagner, R. R. & Huang, A. S. : *Proc. Nat.*

- Acad. Sci. USA, 54, 1112 (1965).
- 45) Pestka, S., McInnes, J., Hanell, E. A. & Vilček, J. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 3898 (1975).
 - 46) Thang, M. N., Thang, D. C., De Maeyer, E. & Montagnier, L. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 3975 (1975).
 - 47) Reynolds, F. H. Jr., Prekumar, E. & Pitha, P. M. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 4881 (1975).
 - 48) De Maeyer-Guignard, J., Tovey, M. G., Gresser, I. & De Maeyer, E. : Nature, 271, 622 (1978).
 - 49) Vilček, J., Havell, E. A. & Yamazaki, S. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 284, 703 (1977).
 - 50) Stewart, W. E. II, Gresser, I., Tovey, M. G., Bandu, M. T. & Legoff, S. : Nature, 262, 300 (1976).
 - 51) Gavalieri, R., Havell, E. A., Vilček, J. & Pestka, S. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 3287 (1977).
 - 52) Samuel, C. E. & Joklik, W. K. : Virology, 58, 476 (1974).
 - 53) Isaacs, A. & Burke, D. C. : Nature, 182, 1073 (1958).
 - 54) Ito, F. & Kobayashi, S. : Japan J. Microbiol., 18, 223 (1974).
 - 55) Billiau, A., Edy, V. G., De Clercq, E., Hermans, H. & De Somer, P. : Int. J. Cancer, 15, 947 (1975).
 - 56) Gresser, I., Bandu, M. T. & Brouty-Boye, D. : J. Nat. Cancer Inst. 52, 553 (1973).
 - 57) Friedman, R. M. & Ramseur, J. M. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 3542 (1974).
 - 58) Friedman, R. M., Chang, E. H., Ramseur, J. M. & Myers, M. W. : J. Virology, 16, 569 (1975).
 - 59) Billiau, A., Hermans, H., Allen, P. T., De Maeyer-Guignard, J. & De Somer, P. : Virology, 73, 537 (1976).
 - 60) Chang, E. H., Mims, S. J., Triche, T. J. & Friedman, R. M. : J. Gen. Virology, 34, 363 (1977).
 - 61) Ramseur, J. M. & Friedman, R. M. : Virology, 73, 553 (1976).
 - 62) Wong, P. K. & McCarter, J. A. : Virology, 58, 396 (1974).

A b s t r a c t

A cell line (MC) was established from the embryonic cell culture of a ddystain mouse, which was shown to be transformed in vitro and to form fibrosarcoma in suckling mice of the same strain by inoculating the cells subcultivated over 20 times. The transformation of the cells was also proved by the technique of colony formation in the soft agar medium and by the observation of aberrant morphology of chromosome.

Examination of the cells by electron microscopy and experiments of ³H-uridine incorporation into the particles having 1.16 specific gravity in the sucrose density gradient centrifugation of the cell culture media clearly indicated spontaneous production of C-type virus particles from the cells. This endogenous C-type particle was identified to be a N-tropic murine leukemia virus by XC test and immunodiffusion technique.

Examining the effect of interferon on this MC cell and its endogenous virus production, the following results were obtained.

Multiplication of the cells both in monolayer cultures and in the soft agar media was inhibited by the interferon prepared in L cell-NDV system and partially purified. In the soft agar medium, interferon concentration to inhibit colony formation by 50% was about 1,000 units/ml. The spontaneous virus production in the cells was inhibited by the interferon preparation depending on their concentrations. Amounts of interferon

necessary for 50% inhibition of ^3H -uridine incorporation were about 10 units/ml.

Treatment of the cells with interferon of 500 units/ml for 18 hr resulted in a complete reduction in the virus production, but the antiviral effect disappeared rapidly when interferon was removed from cultured medium. In 72 hr after the removal of interferon, production of the virus was restored to the normal level.

Although the ^3H -uridine incorporation into the intracellular particle was affected by interferon treatment, its reverse transcriptase activity was not at all, even if with interferon up to 2,000 units/ml. Furthermore, the syncytium formation in the mixture of the cell and XC cell was shown not to be inhibited by interferon. Scanning electron microscopy of MC cells revealed that particles associated to the cell surface were observed equally in interferon-treated cells as well as in normal cells.

These results strongly suggest that the intracellular virus particles of the interferon-treated MC cells exist as a form of biologically active state, and that interferon inhibits the release of virus from the cell in our system.
