

ヒトアデノウイルス 12 型および 7 型 DNA 断片で 誘発したラットトランスフォーム細胞に 関する細胞遺伝学的研究

山下利春

札幌医科大学癌研究所分子生物学部門 (主任 藤永 蕙教授)

Cytogenetic Study of Rat Cell Lines Transformed by DNA Fragments of Human Adenovirus Types 12 and 7

Toshiharu YAMASHITA

Department of Molecular Biology, Cancer Research Institute,
Sapporo Medical College (Chief: Prof. K. Fujinaga)

A cytogenetic study of a rat normal cell line, 3Y1-B clone 1-6 (3Y1) and its adenovirus (Ad) transformed derivatives, W 4 (transformed by Ad 12 virion), CY1-1 (transformed by Ad 12 DNA *EcoRI*-C fragment, left 16.5%), GY1-1 (transformed by Ad 12 DNA *HindIII*-G fragment, left 6.8), HY 1 (transformed by Ad 12 DNA *AccI*-H fragment, left 4.7%) and 7IY1-2 (transformed by Ad 7 DNA *HindIII*-IJ fragment, left 8.1%) was presented. The results obtained are as follows:

1) 3Y1 and some of the transformed cell lines (W 4 and GY1-1) were diploid or pseudodiploid, while others (CY1-1, HY 1 and 7IY1-2) were hypotetraploid.

2) The metacentric marker M1 was detected in GY1-1 cells and another metacentric marker, M2, was detected in W 4, CY1-1 and 7IY1-2 cells at a high frequency. By using the Giemsa banding technique, both metacentric markers found in these complete transformants were identified as isochromosomes of the long arm of No. 1 (M1) and the long arm of No. 3 chromosomes (M2), respectively. On the other hand, these markers were detected only at a low frequency in incompletely transformed HY 1 cells.

3) Hypersomy of No. 1 or of the long arm of No. 1 chromosome was found in GY1-1 cells, while hypersomy of No. 3 or the long arm of No. 3 chromosome was detected in W 4 and CY1-1 cells at a high frequency.

(Received October 13, 1980 and accepted October 27, 1980)

1 緒 言

ウイルスが感染細胞に染色体異常を起し得ることは、Hamper and Ellison¹⁾ が Herpes virus で報告して以来、measles²⁾, chickenpox³⁾, adenovirus (Ad)⁴⁾ など多くのウイルス感染細胞で報告されている。これらウイルスにより誘発された染色体異常は、chromosome 又は chromatid breaks, gaps, fragmentation などである。zur Hausen⁵⁾ および McDougall *et al.*^{6,7)} は、培養ヒト胎児腎細胞を用いた *in vitro* の実験において adenovirus 12 型 (Ad 12) 感染によりヒト染色体のうち No. 1 と No. 17 に高率に染色体異常が誘発されることを観察し、これらを specific aberration と呼んだ。また、Stich は、強造腫瘍性 A 群に属する Ad 12 および Ad 18 感染 HAp-II 細胞では、他の血清型に比べ chromosome breaks の頻度がよ

り高いことを報告している。

一方、SV 40⁸⁾, Herpes⁹⁾, Ad⁷⁾ など発癌ウイルスによる腫瘍組織、あるいはトランスフォーム細胞の karyotype に関しては、染色体数の変化 (hyperploidy および aneuploidy) とマーカー染色体の出現がしばしば認められる。

ヒトアデノウイルスの 31 の血清型の中には、げっ歯動物を場として造腫瘍活性を示し、またげっ歯動物由来の培養細胞をトランスフォームできるいくつかの血清型が含まれており、造腫瘍活性の程度により強造腫瘍性 A 群 (Ad 12, 18, 31), 弱造腫瘍性 B 群 (Ad 3, 7, 14, 16, 21) および非造腫瘍性トランスフォーム C 群 (Ad 1, 2, 5, 6) などに分けられている¹⁰⁾。近年、Ad による細胞のトランスフォーメーションにはウイルスゲノムの全体が必要ではなく、左端 10% 以内の DNA 断片で充分であることが明らかとなり、A 群: Ad12DNA *EcoRI*-C 断片 (左端 16.5%)¹¹⁾, *Hind*-

III-G 断片 (左端 6.8%)¹²⁾, B 群: Ad7DNA *Hind*III-IJ 断片 (左端 8.1%)¹³⁾ および C 群: Ad2 および Ad5DNA-*Hind*III-G 断片 (左端 7.5%)¹⁴⁾ によるラットトランスフォーム株が樹立されている。さらに, Ad12DNA *Acc*I-H 断片 (左端 4.7%)¹⁵⁾, Ad7BgII-H 断片 (左端 4.5%)¹⁶⁾ および Ad5DNA *Hpa*I-E 断片 (左端 4.3%)¹⁷⁾ は, 不完全ながら, トランスフォーメーション活性を有することが知られている。

本論文では, Ad12 および Ad7DNA の左端断片でトランスフォームした4ラット細胞株に加え, Ad12 粒子でトランスフォームしたラット細胞株 W4 を取り上げ, 染色体数および染色体形態の変化, 特異的マーカーの有無などを細胞遺伝学的に検索し, その結果とトランスフォーム細胞の形態と造腫瘍性との関連を探ることを意図した。

2 実験材料と方法

2.1 培養細胞株

研究対象として取り上げた細胞株を Table 1 に示した。親株である Fischer rat embryo 由来のラット正常細胞株 3Y1-Bclonel-6 (3Y1)¹⁸⁾ およびこれを Ad12 粒子でト

ランスフォームした細胞株 W4¹⁹⁾ は, 九州大学の木村元喜教授から恵与を受け当研究室で継代したものである。3Y1 を Ad12DNA *Eco*RI-C 断片 (左端 16.5%) でトランスフォームした CY1-1¹¹⁾, Ad12DNA *Hind*III-G 断片 (左端 6.8%) でトランスフォームした GY1-1¹²⁾, Ad12DNA *Acc*I-H 断片 (左端 4.7%) でトランスフォームした HY1¹⁵⁾ および Ad7DNA *Hind*III-IJ 断片 (左端 8.1%) でトランスフォームした 7IjY1-2¹³⁾ は, 当分子生物学部門と東京大学医科学研究所癌ウイルス部門との共同研究により樹立されたものである。なお Fig. 1 に, トランスフォーメーションに用いた Ad12 および Ad7DNA 断片の切断点地図上の位置を示した。

2.2 細胞培養

ラット正常細胞株 3Y1 は, 細胞培養フラスコ (Nunc 社製, N-1460) に, 10% 牛胎児血清添加 Eagle's minimum essential medium (MEM) で培養した。各トランスフォーム細胞株は, 10% 牛胎児血清添加の低 Ca²⁺ (0.1 mM) Eagle's MEM を用いて培養した。

形態学的観察には, 6 cm Petri dish (Nunc 社製) に細胞を 10⁶ 個接種し, 1 日の培養の後, メタノールで固定し,

Table 1 Cell lines

Cell lines	Origin	Transformed phenotype
3Y1	Fischer rat embryo	
W4	3Y1 transformed by Ad12 virion	+
CY1-1	" Ad12 <i>Eco</i> RI-C	+
GY1-1	" Ad12 <i>Hind</i> III-G	+
HY1	" Ad12 <i>Acc</i> I-H	incomplete ¹
7IjY1-2	" Ad7 <i>Hind</i> III-IJ	+

1. Examinations of several transformed phenotypes such as anchorage independence, growth ability in low serum medium and tumor formation in transplanted rats showed that HY1 cells revealed intermediate character between 3Y1 and transformed cells (Shiroki *et al.*, 1979).

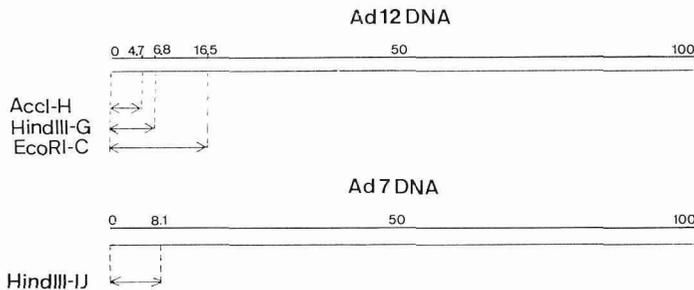


Fig. 1 Map positions of restriction fragments used for transformation. Ad12 and Ad7 genomes were represented by solid horizontal lines, 0 to 100 units, and left and fragments by arrows.

Giemsa (MERCK 社製) で染色した。

2.3 染色体標本

培養1日後の対数増殖期の細胞を出発材料とした。約20分の colchicine 処理 (最終濃度 $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$) の後, trypsin 処理をし, 900 rpm, 5分の遠心によって細胞を集め, これを低張液 (0.075MKCl) に懸濁し 37°C で11~12分間 incubation する。遠心して細胞を集めた後, メタノール・酢酸混液 (3:1, v/v) で2回固定し, さらに少量の同じ固定液に懸濁し, パスツールピペットでスライドに滴下・乾燥させ, 標本を得る。染色体分染法は, 染色体標本を $2 \times \text{SSC}$ ($0.3 \text{M NaCl} + 0.03 \text{M Na}_3\text{citrate}$) で, 60°C , 1時間 incubation した後に Giemsa (MERCK 社製) 染色をする GAG

法を用いた^{20,21}。

3 実験成績

3.1 形態学的検索

親株のラット正常細胞株 3Y1 は, 線維芽細胞様の形態を示し, 単層で confluent に達する (Fig. 2 a)。Ad 12 および Ad 7 で誘発したトランスフォーム細胞では, HYI 以外は, ウイルス粒子およびいずれの DNA 左端断片により誘発したトランスフォーム細胞も, 相互によく似た細胞形態を示した。CY1-1 を例に示したが (Fig. 2 b), 核・細胞質比 (N/C) の大きな上皮様細胞が細胞集団を形成して密に増殖している。

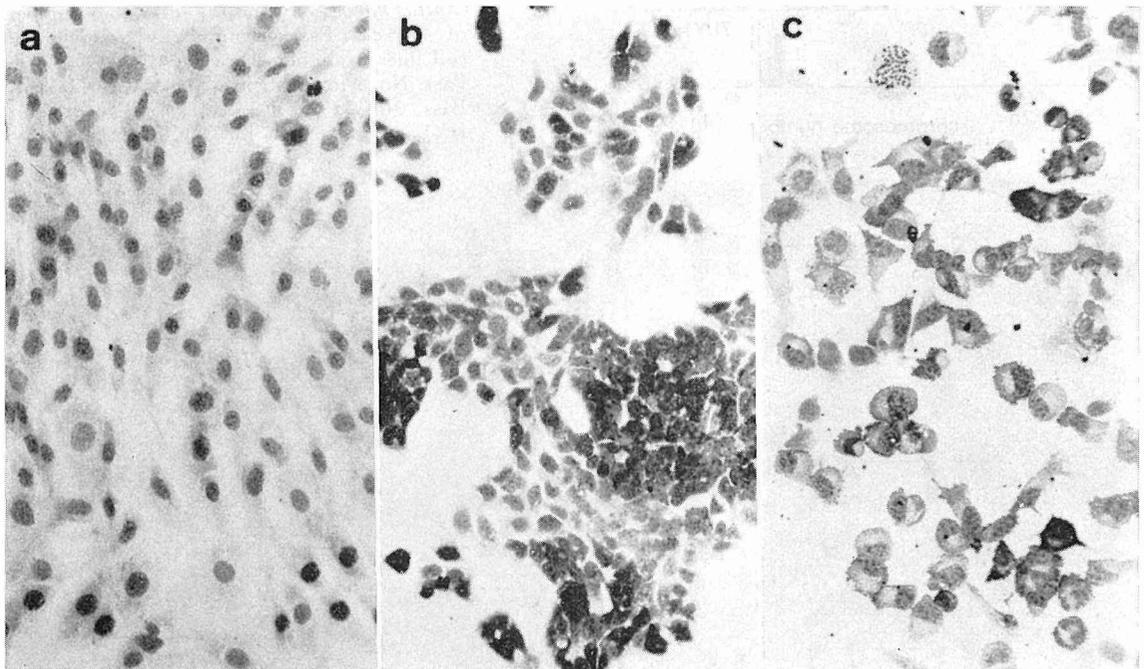


Fig. 2 *In vitro* morphology of 3Y1-B clone 1-6 (3Y1) (a), CY1-1 (b) and HY1 (c). Compared with 3Y1 (a), CY1-1 (b) shows epithelioid feature and large nucleus/cytoplasm ratio, and forms the characteristic cell clusters. Pile up of the cells are also observed. Though HY1 cells have epithelioid feature, they have rather abundant cytoplasm and grow dispersedly like 3Y1 cells.

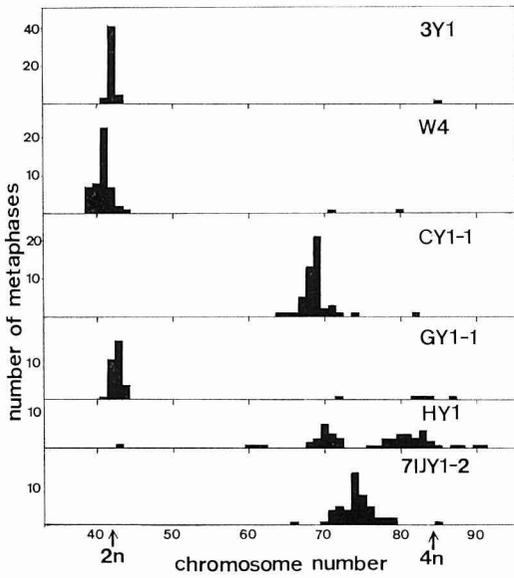
HYI 細胞 (Table 1 参照) では, 上皮様の形態を示すが, N/C 比が他のトランスフォーム細胞よりも小さく, 又, 増殖時の細胞集団形成が弱く, むしろ散在性に増殖する (Fig. 2 c)。

3.2 細胞遺伝学的検索

3.2.1 染色体数

3Y1 とトランスフォーム細胞株の, 染色体数のモードと

分布を Fig. 3 に示した。検索した分裂中期細胞数は Fig. 3 の中に示した。3Y1 では, 分裂中期細胞の 80% がラット (*Rattus norvegicus*)²² の正常染色体数 $2n=42$ を有し, 90% 以上の細胞が 42 ± 1 であった。一方, トランスフォーム細胞株は, 染色体数のモードが2倍域の細胞株 (W 4 および GY1-1) と, 低4倍域の細胞株 (CY1-1, HY 1 および 71JY1-2) とに分かれた。W 4 細胞の染色体数は $39 \sim 42$ の



→ Fig. 3 Chromosome number distribution of 3Y1 and its transformed derivatives. For each cell line 50 metaphases were counted except for GY1-1 for which 37 metaphases were examined. Arrow indicate the normal chromosome number of $2n=42$ for rat cells (*Rattus norvegicus*) and the tetraploid number of $4n=84$. Passage number (Pass. No.) of cell lines examined were Pass. No. 3 for 3Y1, Pass. No. 4 for W4, Pass. No. 25 for CY1-1, Pass. No. 15 for GY1-1, Pass. No. 18 for HY1 and Pass. No. 17 for 7IJIY1-2, respectively.

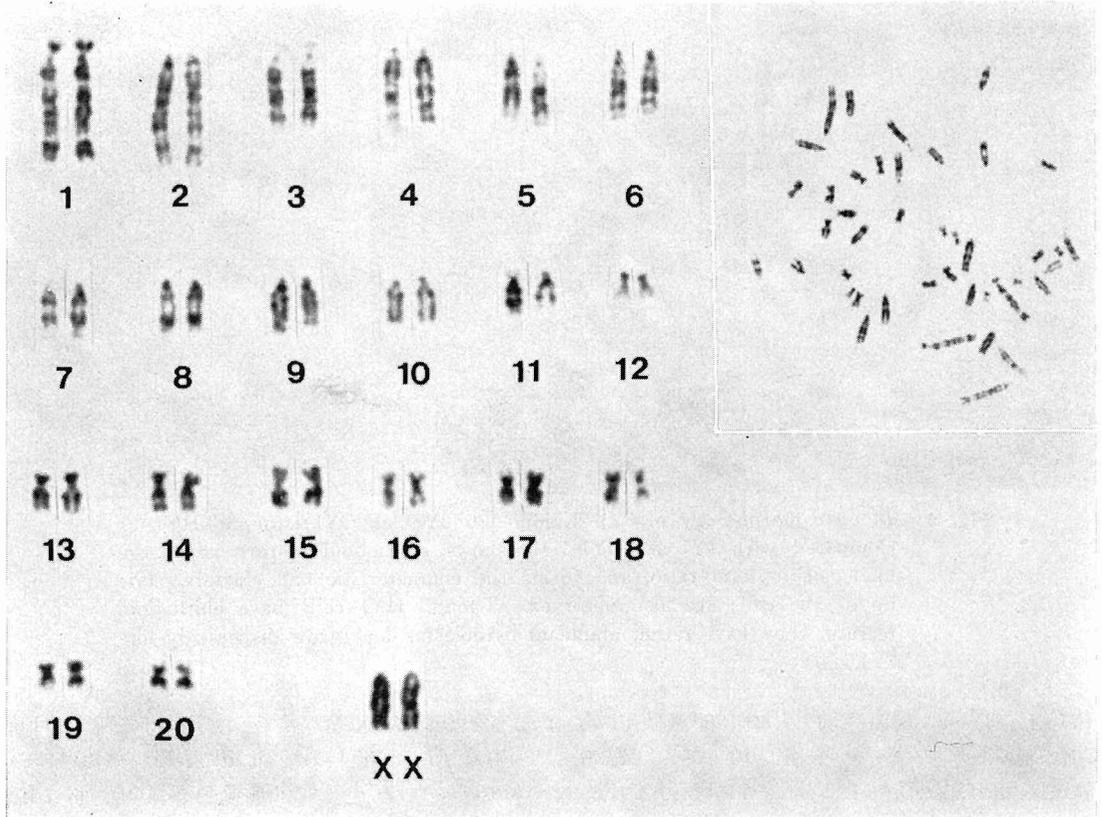


Fig. 4 Metaphase chromosomes and representative karyotype of 3Y1 cell (Pass. No. 14) from a GAG preparation.

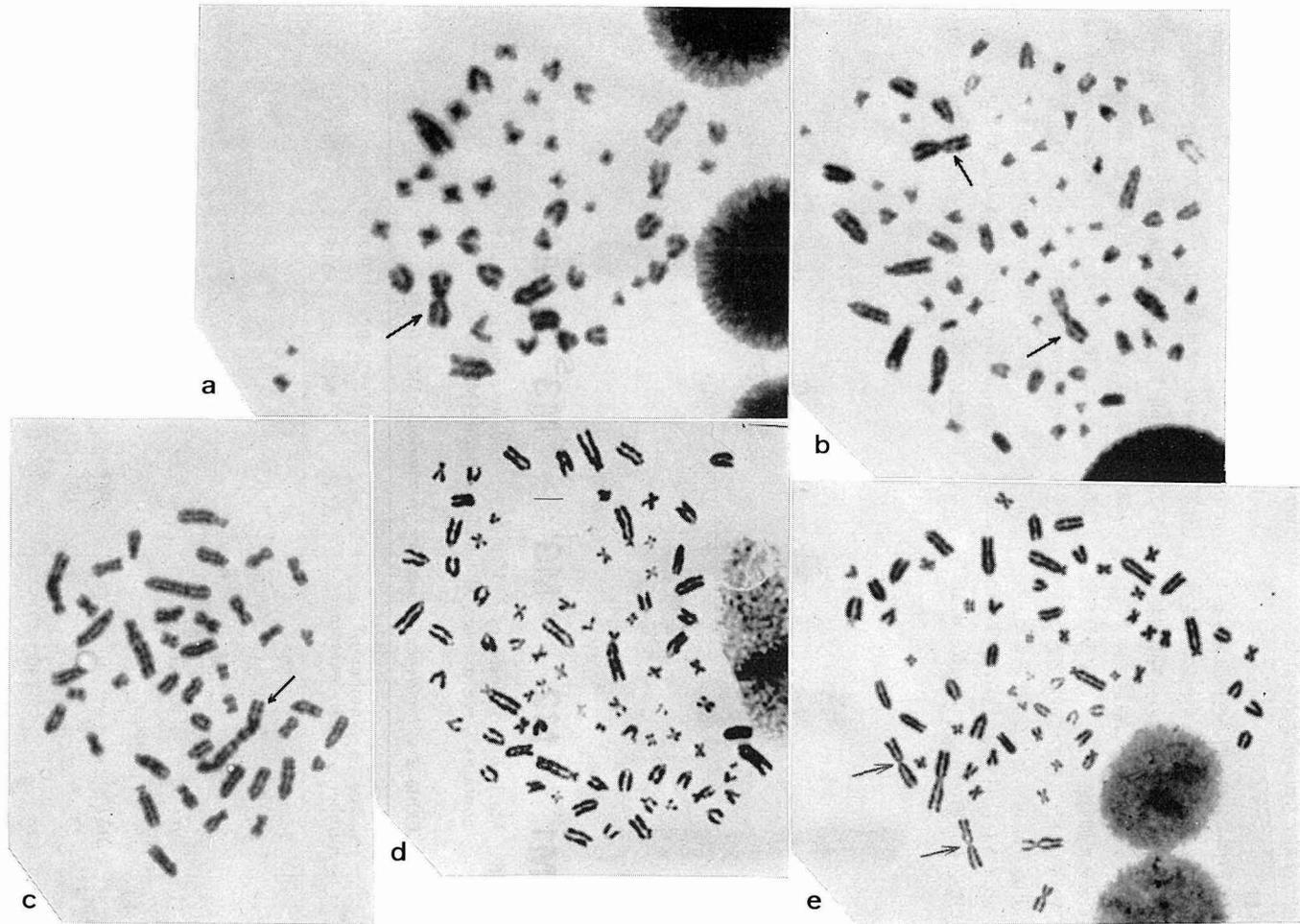


Fig. 5 Metaphase chromosomes of the transformed cell lines from GAG preparation. Arros indicate marker chromosomes, metacentric marker M2s in W4 (Pass. No. 4) (a), CY1-1 (Pass. No. 25) (b) and 7I1Y1-2 (Pass. No. 40) (e) and large metacentric marker M1 in GY1-1 (Pass. No. 25) (c). No markers are detected in HY1 (Pass. No. 18) (d). Note irregular and contracted chromosomes especially in W4 and CY1-1 cells compared with those of 3Y1 cell (Fig. 4).

分布した。一般に、トランスフォーム細胞の染色体数は、3Y1細胞が $2n=42$ にシャープなピークを示したのに対し、モードの前後に広く分布する傾向が認められた。

3・2・2 染色体形態

3Y1細胞では、拡がりの良い分裂中期染色体像が容易に得られ、また個々の染色体も伸展がよく、染色体相互を識別しやすい。Fig. 4に代表的な3Y1細胞の分裂中期像と核板を示した²²⁾。一方、トランスフォーム細胞においては、個々の染色体形態がきわめて伸展性に乏しく、輪郭が不整で、とくにW4とCY1-1では、一見して正常細胞の染色体と識別可能である(Fig. 5a, b)。ところが検索したトランスフォーム細胞のうちGY1-1, HY1および7IJY1-2では、むしろ3Y1に近い染色体形態を示した(Fig. 5c, d, e)。

3・2・3 マーカー染色体

トランスフォーム細胞では、容易に識別し得る大型のmetacentric marker chromosomeが特徴的に認められた(Fig. 5a, b, c, e)。その他のsubmetacentricおよびacrocentric markerも含めて、トランスフォーム細胞に出現したマーカー染色体をM1からM4まで区別した(Fig. 6)。Table 2は各細胞株について、50あるいは40の分裂中期像におけるマーカー染色体の出現率を調べたものである。マーカー染色体のうち、metacentric marker M1とM2がきわめて高率に、かつ安定して存在する。Fig. 7に示した様に、Giemsa banding法を用いることによって、metacentric marker M1とM2は、それぞれNo. 1染色体長腕およびNo. 3染色体長腕のcentric

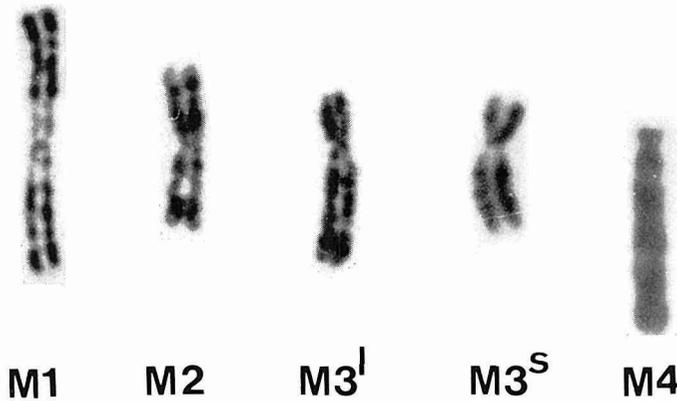


Fig. 6 Marker chromosomes M1^L to M4s. Submetacentric marker M3 contains large marker M3^L and small one M3^S.

Table 2 Incidence of marker chromosomes M1 to M5

Cell lines	Passage number	Number of cells examined	Percentages of markers ²			
			M1	M2	M3	M4
3Y1	3	50				
	16	50				
W4	4	50		85		
CY1-1	25	50		100	48	2
	73	50		100	68	6
GY1-1	15	50	100	2		
	25	50	100	5	7.5	
HY1	18	40		8.3	5	1.7
7IJY1-2	17	50	6	84	16	2

1. Passage numbers were counted from the establishment of each transformed cell line.

2. $\frac{\text{number of metaphase cells containing M1, M2, M3, or M4}}{\text{total cell number studied}} \times 100$

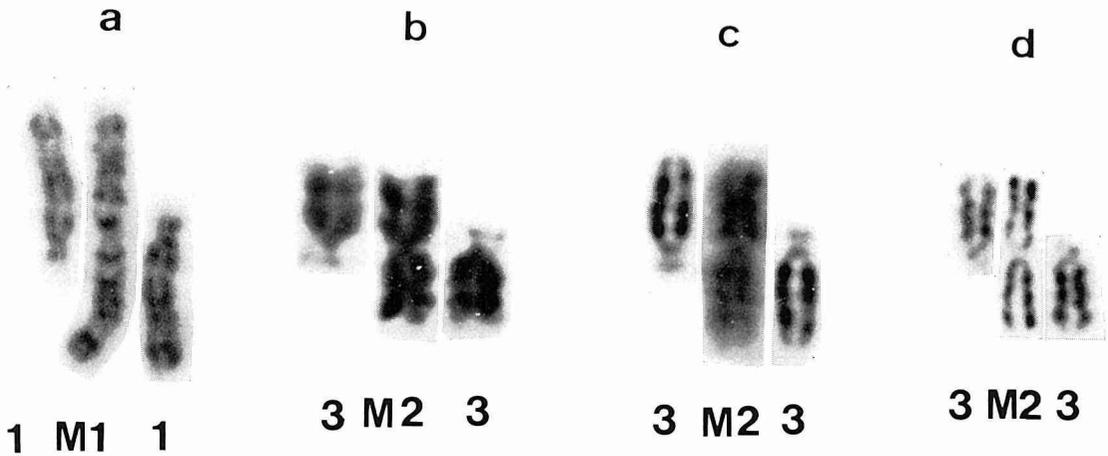


Fig. 7 Comparison of G-banded metacentric marker M1s from GY1-1 cells with normal banded No. 1 chromosome (a), and M2s from W 4 (b), CY1-1 (c) and 7IJY1-2 (d) with normal banded No. 3 chromosome.

fusion に基づく isochromosome であることが明らかである。M1 は検索したすべての GY1-1 細胞に、M2 は W 4, CY1-1 および 7IJY1-2 細胞に、それぞれ 85%, 100%, 84% の高率で認められた。一方、HY1 細胞では、いずれの metacentric marker もきわめて低頻度であった。GY1-1 細胞において、M1 を構成する No. 1 染色体の長腕は tetrasomy を示した (Fig. 8d)。M2 を構成する No. 3 染色体の長腕に関して、W 4 では約 50% の細胞が disomy, 約 20% が trisomy を示し、CY1-1 では tetrasomy を示した (Fig. 8a, b, c)。

さらに M1 あるいは M2 が別の CY1 および GY1 subclone にも同様に存在するかどうか、また、M1 が別の Ad12HindIII-G トランスフォーム株 GY2 にも存在するかどうかを検索した (Table 3)。Table 3 に示した様に、GY1-1 の subclone GY1-3 には同様の高率で M1 が見い出され、一方 CY1-1 の subclone, CY1-2 には M2 が高率に見い出された。また、M1 は GY1-1 とは別の Ad-12HindIII-G トランスフォーム細胞株 GY2 にも見い出された。

4 考 察

本論文では、incomplete transformant (HY1) を含む 4 つの Ad 12 および Ad7DNA 左端断片でトランスフォームしたラット細胞株、および Ad 12 粒子によるトランスフォーム細胞株 (W 4) の染色体を解析した。その結果、metacentric marker の出現などの興味深い結果を得た。

一般に、発癌ウイルス誘発トランスフォーム細胞の形態学的特徴として、線維芽細胞より上皮様細胞への形態変化、主として細胞質の減少に基づく核・細胞質比の増大と

細胞の小型化、増殖時の細胞集団形成、細胞の重層などがあげられる。対象とした Ad ラットトランスフォーム細胞もこれらの特徴的形態を示したが、HY1 細胞では核・細胞質比が他のトランスフォーム細胞より小さく、散在性に増殖する。すなわち、HY1 細胞は、トランスフォーム細胞が特徴的に示す他のいくつかの表現型と同様¹⁵⁾、形態学的にも 3Y1 とトランスフォーム細胞との中間型を示した。

ウイルス誘発トランスフォーム細胞の染色体数のモードは hyperploidy を示す場合が少なくない²¹⁾。本研究においても、親株 3Y1 細胞の染色体が $2n=42$ であったにもかかわらず、トランスフォーム細胞株のうち、CY1-1, HY1 および 7IJY1-2 は低 $4n$ 域のモードを示した。細胞のトランスフォーメーションにおける ploidy の増加は、細胞分裂を伴わない DNA 複製もしくは細胞融合のいずれかの機序によるものと考えられるが²²⁾、本研究におけるトランスフォーム細胞の場合、いずれの機序が働いたものかは不明である。

検索したトランスフォーム細胞株のうち、W 4 および CY1-1 の染色体は、一般に、伸展性に乏しく輪郭不整な形態像を示した。この所見はきわめて再現性が高く、これらのトランスフォーム細胞は、分裂中期染色体像から容易に 3Y1 細胞と識別される。一方、GY1-1, HY1 および 7IJY1-2 細胞においては、染色体形態は上記トランスフォーム細胞と 3Y1 の中間型を示した。すなわち、トランスフォーメーションに使用された AdDNA 断片が、Ad12-HindIII-G (左端 6.8%), Ad12AccI-H (左端 4.7%) と小さいものでは、トランスフォーム細胞の染色体形態も正常細胞のものに近づく傾向が認められた。細胞のトランスフォーメーションに伴う、このような染色体形態の変化の

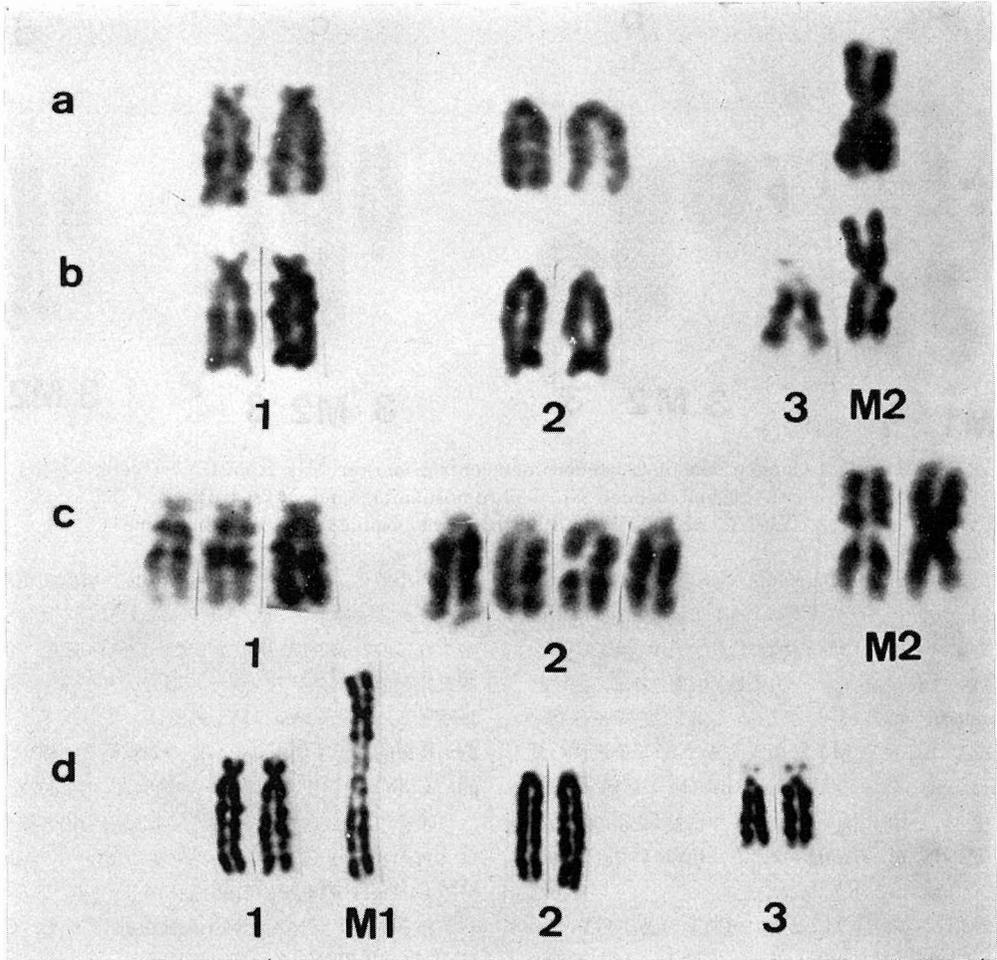


Fig. 8 Constitution of No. 1, No. 2 and No. 3 chromosomes containing both free and isochromosomes from predominant karyotypes of W 4 (Pass. No. 4) (a and b), CY1-1 (Pass. No. 25) (c) and GY1-1 (Pass. No. 25) (d). About 60% metaphases of W 4 exhibited (a) pattern and about 20% of them (b) pattern. About 80% of CY1-1 cells had two M2s without free or translocated No. 3 chromosome. All of GY1-1 cells had two No. 1 and one M1 in their metaphases.

Table 3 Metacentric markers in several clones of rat cell lines transformed by Ad 12 HindIII-G or EcoRI-C fragment

Cell lines	Transformed by	Passage numbers	Chromosome numbers	Frequency of metacentric markers ³	
				M 1	M 2
GY1-1 ¹	Ad12HindIII-G	15	43 (42-44)	22/20	0/20
GY1-3 ¹	"	30	41 (40-42)	22/23	0/20
GY2 ²	"	17	78 (67-83)	7/20	0/20
CY1 ²	Ad12EcoRI-C	22	72 (66-76)	0/20	20/20
CY1-1 ¹	"	25	69 (67-71)	0/20	20/20
CY1-2 ¹	"	15	75 (68-80)	0/20	20/20

1. Cell line recloned in soft agar after focus isolation (Shiroki *et al.*, 1977; Yano *et al.*, 1919).
2. Cell line established from focus (Shiroki *et al.*, 1977; Yano *et al.*, 1979).
3. Number of cells of having markers/total cells examined.

原因は明確ではない。

対象としたトランスフォーム細胞株に出現したマーカー染色体を M1 から M4 まで分類し、各細胞株における出現率を調べた。マーカー染色体のうち高率に、しかも安定して存在した metacentric marker がトランスフォーマーメーションに何らかの関連を持つと考えられ、Giemsa banding 法により由来を同定した。metacentric marker のうち M1 は No. 1 染色体の長腕、M2 は No. 3 染色体の長腕の centric fusion 由来する isochromosome であることが確認された。M1 は GY1-1 細胞に見い出され、さらに頻度は低いが、GY1-1 とは別の Ad12HindIII-G トランスフォームラット細胞 GY2 にも認められたことから、M1 はラットの Ad12HindIII-G トランスフォーマーメーションに特異的である可能性が考えられる。一方、M2 はより大きな左端断片 Ad12EcoRI-C によって誘発したトランスフォーム細胞株 CY1-1 と、ウイルス粒子によるトランスフォーム細胞株 W4、さらに Ad7HindIII-IJ 断片によるトランスフォーム細胞株 7IJY1-2 にも高率に認められた。ところが小断片 Ad12AccI-H (左端 4.7%) でトランスフォームした HY1 では、いずれの metacentric marker の出現も低頻度であった。このことから、metacentric marker M1 あるいは M2 は Ad によるラット細胞の complete transformation の 1 つの指標となるかもしれない。

7, 12-dimethylbenz (a) anthracene により誘発した Rat leukemia²⁴⁾ および sarcoma²⁵⁾ 細胞は、No. 2 trisomy を特異的に示し、また、Rous rat sarcoma²⁶⁾ 細胞は No. 7 trisomy を特異的に示すことが知られている。しかし Ad 誘発ラットトランスフォーム細胞を検索した本研究においては、これら No. 2 あるいは No. 7 trisomy は認められなかった。ところが metacentric marker を構成する No. 1 および No. 3 染色体に関して、CY1-1 および 20% の W4 細胞においては No. 3 trisomy、GY1-1 細胞では No. 1 trisomy を示し、hypersomy となる傾向が認められた。

5 結 語

ラット正常細胞株 3Y1 と、これを Ad12 粒子、EcoRI-C 断片 (左端 16.5%)、HindIII-G 断片 (左端 6.8%)、AccI-H 断片 (左端 4.7%) および Ad7HindIII-IJ 断片 (左端 8.1%) でそれぞれトランスフォームした 5 つのラット細胞株 W4、CY1-1、GY1-1、HY1 および 7IJY1-2 の染色体を解析し、以下の結果を得た。

1) 3Y1、W4 および GY1-1 細胞の染色体数は $2n=42$ もしくは $2n$ 域であったが、CY1-1、HY1 および 7IJY1-2

では低 $4n$ 域を示した。

2) トランスフォー細胞の染色体には、それぞれ No. 1 長腕あるいは No. 3 長腕の isochromosome である metacentric marker M1 および M2 が高率に認められた。W4 CY1-1 および 7IJY1-2 細胞には M2 が、GY1-1 細胞には M1 がそれぞれ高率に認められた。一方、小断片 Ad12AccI-H (左端 4.7%) でトランスフォームした incompletely transformed HY1 細胞では、いずれの metacentric marker も低頻度の出現にとどまった。

3) マーカーを構成する No. 1 および No. 3 染色体に関して、20% の W4 および CY1-1 細胞では No. 3 trisomy、GY1-1 細胞では No. 1 trisomy を示した。

文 献

1. Hampar, B. and Ellison, S. A.: Chromosome aberration induced by an animal virus. *Nature* **192**, 145-147 (1961).
2. Nichols, W. W.: The role of viruses in the etiology of chromosomal abnormalities. *Am. J. Human Genetics* **18**, 81-92 (1966).
3. Aula, P.: Chromosome breaks in leukocytes of chickenpox patients. *Hereditas* **49**, 451-453 (1963).
4. Stich, H. F.: Oncogenic and nononcogenic mutants of adenovirus 12: Induction of chromosome aberrations and cell division. *Prog. Exp. Tumor Res.* **18**, 260-270 (1973).
5. zur Hausen, H.: Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *J. Virol.* **1**, 1174 (1967).
6. McDougall, J. K.: Effects of adenoviruses on the chromosomes of normal human cells and cells trisomic for an E chromosome. *Nature* **225**, 456-458 (1970).
7. McDougall, J. K., Dunn, A. R. and Gallimore, P. H.: Recent studies on the characteristics of adenovirus-infected and -transformed cells. *Symposia on Quantitative Biology* **39**, 591-600 (1974).
8. Lehman, J. M. and Defendi, V.: Changes in DNA synthesis regulation in Chinese hamster cells infected with simian virus 40. *J. Virology* **616**, 738-749 (1970).
9. Copple, C. D. and McDougall, J. K.: Clonal derivatives of a Herpes type 2 transformed hamster cell line (333-8-9): Cytogenetic analysis, tumorigenicity and virus sequence detection. *Int. J. Cancer* **17**, 501-510 (1976).
10. Green, M., Mackey, J. K., Wold, W. S. M. and

- Rigden, P.: Thirty-one human adenovirus serotypes (Ad 1-Ad 31) form five groups (A-E) based upon DNA genome homologies. *Virology* **93**, 481-492 (1979).
11. Yano, S., Ojima, S., Fujinaga, K., Shiroki, K. and Shimojo, H.: Transformation of rat cell line by an adenovirus 12 DNA fragments. *Virology* **82**, 214-220 (1977).
 12. Shiroki, K., Handa, H., Shimojo, H., Yano, S. and Fujinaga, K.: Establishment and characterization of rat cell lines transformed by restriction endonuclease fragments of adenovirus 12 DNA. *Virology* **82**, 462-471 (1977).
 13. Sekikawa, K., Shiroki, K., Shimojo, H., Ojima, S. and Fujinaga, K.: Transformation of rat cell line by adenovirus 7 DNA fragment. *Virology* **88**, 1-7 (1978).
 14. Graham, F. L., van der Eb, A. J. and Heijnecker, H. L.: Site and location of the transforming region in human adenovirus type 5 DNA. *Nature* **251**, 687-691 (1971).
 15. Shiroki, K., Shimojo, H., Sawada, Y., Uemizu, Y., and Fujinaga, K.: Incomplete transformation of rat cells by a small fragment of adenovirus 12 DNA. *Virology* **95**, 127-136 (1979).
 16. van der Eb, A. J., van Ormondt, H., Schrier, P. I., Lupker, J. H., Jochemson, H., van den Elsen, P. J., Deleys, R. J., Maat, J., van Beveren, C. P., Dijkema, R. and de Waard, A.: Structure and function of the Transforming genes of human adenoviruses and SV 40. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **44**, 383-399 (1979).
 17. Dijkema, R., Dekker, B. M. M., van der Feltz, M. J. M. and van der Eb, A. J.: Transformation of primary rat kidney cells by DNA fragments of weakly oncogenic adenoviruses. *J. Virol.* **32**, 943-950 (1979).
 18. Kimura, G., Itagaki, A. and Summers, J.: Rat cell 3Y1 and its virogenic polyoma-and SV 40-transformed derivatives. *Int. J. Cancer* **15**, 694-706 (1975).
 19. Hama, S. and Kimura, G.: Abortive transforming infection of rat cell line 3Y1 by adenovirus type 12. *J. Virology* **25**, 907-1011 (1978).
 20. Summer, A. T., Evans, H. J. and Buckland, R. A.: New Technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biol.* **232**, 31-32 (1971).
 21. Report of the standing committee on human cytogenetic nomenclature: An international system for human cytogenetic nomenclature (1978). *Cytogenet. Cell Genet.* **21**, 358-359 (1978).
 22. Committee for a standardized karyotype of *Rattus norvegicus*: Standard karyotype of the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Cytogenet. Cell Genet.* **12**, 199-205 (1973).
 23. Wolman, S. R. and Horland, A. A.: Genetics of tumor cells *Cancer, a comprehensive treatise 3* (Becker, F. F., ed.) 155-198 (1975).
 24. Sugiyama, T., Kurita, Y. and Nishizuka, Y.: Biologic studies on 7, 12-dimethylbenz(a) anthracene-induced rat leukemia with special reference of the specific chromosomal abnormalities. *Cancer Res.* **29**, 1117-1124 (1969).
 25. Mitelman, F. and Levan, G.: The chromosomes of primary 7, 12-dimethylbenz(a) anthracene-induced rat sarcomas. *Hereditas* **71**, 325-334 (1972).
 26. Levan, G. and Mitelman, F.: G-banding in Rous rat sarcomas during serial transfer: Significant chromosome aberrations and incidence of stromal mitoses. *Hereditas* **84**, 1-14 (1976).

別刷請求先: (〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目
札幌医科大学癌研究所分子生物学部門
山下利春