

ハムスター BHK 21 細胞ならびにそのポリオー
マウイルスによるトランスフォーム細胞
の Forssman 抗原反応性に関する研究*

芳賀博光

札幌医科大学癌研究所病理学部門 (主任 塚田英之教授)

札幌医科大学内科学第一講座 (主任 和田武雄教授)

内田孝宏**

札幌医科大学癌研究所病理学部門 (主任 塚田英之教授)

Studies on the Reactivity of Forssman Antigen Present
in Untransformed BHK-21 Cells and Their
Polyoma-transformed Derivatives

Hiromitsu HAGA

*Department of Pathology, Cancer Research Institute, Sapporo Medical College
(Chief: Prof. H. Tsukada)*

*Department of Medicine (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. T. Wada)*

Takahiro UCHIDA**

*Department of Pathology, Cancer Research Institute, Sapporo Medical College
(Chief: Prof. H. Tsukada)*

The reactivity of the Forssman antigen on the cell surface was studied in relation to the cell density of culture, cell growth, and cell cycle. In this study an established cell line of baby hamster kidney cells (BHK 21/13) and its polyoma virustransformed derivative (py-BHK) were used. The following results were obtained using an immune adherence (IA) method, in which the reactivity of Forssman antigen was expressed in terms of proportion of IA-positive cells.

1. When the BHK cells were collected from a sparse culture showing no cell-cell contact, 70-85% of the cells were IA-positive. At a density of 3×10^3 cells/cm², where the cells commenced to come in contact with each other, 60% of the cells were IA-positive. As the cell density increased, the reactivity of the antigen decreased. Only 30-40% of the cells were IA-positive, when a confluent culture was used. It is likely that the cell-cell contact is responsible for the alteration of cell surface leading to a decrease in the reactivity of IA reaction.

2. In the case of py-BHK cells, about 90% of the cells were IA-positive, irrespective of the cell density.

3. The reactivity of the antigen was tested on the BHK cells through their cell cycle, showing that the reactivity increased to 70-90% in a near S phase, while it decreased to about 45% in M and G₁ phases.

4. When the BHK cells of a confluent culture were treated with trypsin or neuraminidase, the reactivity of Forssman antigen increased to an extent comparable to that of py-BHK cells.

An immunofluorescence examination revealed that all cells were bound with the antibody regardless of their IA reactivity. The results suggest that decrease in the reactivity of Forssman antigen demon-

* 本論文の内容の一部は第31回日本癌学会総会(1972)で発表した。

** 現住所: 徳島市蔵本町徳島大学医学部ウイルス学教室。

** Present Address: Department of Virology, School of Medicine, Tokushima University, Tokushima.

strated by the IA method may be due to a masking phenomenon caused by a renewal and/or rearrangement of surface components.

緒 言

腫瘍ウイルスによる培養細胞のトランスフォーメーションに関しては多くの知見が得られ、対照の培養細胞とトランスフォーム細胞との間に種々の点で相違のあることが知られている¹⁾。細胞表層の抗原もその一つで、ウイルス特異的の移植抗原²⁻⁴⁾および *in vitro* で検出されるウイルス特異的の細胞表面抗原などがトランスフォーム細胞に出現する⁵⁻⁸⁾。他方、異種動物で作製した抗血清を用いると、ウイルスに非特異的な抗原がトランスフォーム細胞に検出されることが知られている。Fogel and Sachs⁹⁾ は、ハムスターの正常組織細胞には検出されない Forssman 抗原 (F 抗原)^{*} が、ポリオーマウイルス接種により発生したハムスター腎腫瘍細胞、あるいはハムスター胎児細胞を *in vitro* でトランスフォームした細胞に出現することを認めた。ハムスター株細胞についても、ポリオーマウイルスあるいは SV 40 ウイルスでトランスフォームすると F 抗原の出現することが知られている^{10,11)}。他方、F 抗原は必ずしもトランスフォーメーションによってのみ出現するものではなく、ハムスターの正常組織細胞を培養した時にも現われる^{9,12,13)}。しかし培養細胞が組織様構造を形成するような条件では、F 抗原は検出されなくなることが報告されている¹³⁾。このように、正常細胞では細胞の存在する条件によって、細胞表面の構成物質の存在様式あるいはその形成に変化を起し、抗原反応性に差異が生ずるものと考えられる。

本研究では、ハムスター腎株細胞 BHK 21/13 およびそのポリオーマウイルスによるトランスフォーム細胞を使用して、培養細胞集団の密度、細胞増殖、細胞周期などの生理的条件と F 抗原反応性との関連を immune adherence 法を用いて検討した。

実験材料と方法

1. 細胞培養

ハムスター腎株細胞 BHK 21/13 (BHK と略称する) は初め Macpherson and Stoker¹⁴⁾ によりクローン化された細胞で、Dr. R. Dulbecco の研究室で継代保存されたものおよび Flow Laboratories Co. より購入したものを本研究で使用した。ポリオーマウイルスによるトランスフォーム細胞 (py-BHK 細胞) は Dr. R. Dulbecco より分与された。BHK および py-BHK 細胞ともにオートラジオ

グラフィックにより mycoplasma の混入していないことを確かめて使用した。

培養液は Dulbecco's modified Eagle medium (GIBCO 製) に triptose phosphate broth (0.3%), penicillin (500 U/ml), streptomycin (0.1 mg/ml), コウシ血清 (10%) を加えて使用した。コウシ血清は Flow Laboratories Co. より購入した。細胞は 10 ml の培養液を含むペトリ皿 (直径 8.5 cm) 中に植え、5% CO₂ を含む恒温器中に静置し、37°C に保温して培養した。細胞の継代培養に際しては、0.1% trypsin (Difco Laboratories 製品, 1:250) と 0.02% EDTA を含む Tris 緩衝食塩水 (1 l 中に 8.0 g NaCl, 0.38 g KCl, 0.1 g Na₂HPO₄·12H₂O, および 3.0 g Sigma 7-9 を含む) で細胞を剥離し、Tris 緩衝食塩水で洗浄後、細胞培養を行った。実験に供する細胞は、0.02% EDTA を含む Tris 緩衝食塩水で剥離し、それぞれの実験に使用する緩衝液 (後述) を用いて、遠心沈澱法により 3 回洗浄した。

2. 同調培養 (thymidine double block 法)

Bootsma の方法¹⁵⁾ に準じて行った。Fig. 1 に示すように、 5×10^5 細胞をペトリ皿 (直径 8.5 cm) で培養し、48 時間後に培養液を 5 mM thymidine 加新鮮培養液に替えて 1 回目の thymidine 処理を行った。24 時間 thymidine 処理を行った後、thymidine を除くため、新鮮培養液で 3 回洗浄し、さらに 10 時間培養した。次に 2 回目の thymidine 処理を上記のごとく 24 時間行った。ペトリ皿を新鮮培養液で 3 回洗浄し、10 ml の新鮮培養液を加えて同調培養細胞とした。培養液の交換に際しては、すべて 37°C に保温した培養液を用いた。

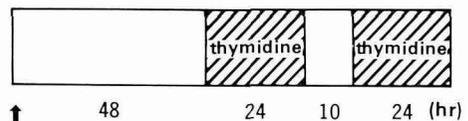


Fig. 1 Synchronization procedure of BHK cells with the thymidine double block method. An arrow indicates the time of plating of 5×10^5 cells on a petri dish (8.5 cm). Hatched bars show thymidine treatment (5 mM thymidine).

3. 同調培養系における DNA 合成および細胞分裂期の測定

a) 細胞 DNA 合成の測定: ペトリ皿中に円形カバー

* ここでは、ヒツジ赤血球に対する家兎抗血清と反応する heterogenetic な抗原を F 抗原と呼ぶ。

スリップ (直径 17 mm) を置き、細胞を加えて thymidine 2 回処理による同調培養を上記のごとく行った。このカバースリップを経時的に取り出し実験に供した。この際、細胞がカバースリップ面を均一に覆っていることを確認して使用した。 ^3H -thymidine (5.0 $\mu\text{Ci}/\text{m mol}$, The Radiochemical Center, Amersham) を 5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ に含む培養液 0.1 ml でカバースリップ上を覆い、37°C 30 分間 CO_2 恒温器中に静置した。その後、カバースリップ上の液を除き、Tris 緩衝食塩水中で洗浄し、さらに冷却した 5% トリクロロ酢酸に 5 分間浸し、この処理を 3 回繰り返した。シンチレーション溶液 (0.01% POPOP および 0.4% PPO 加トルエン 2 容と Triton X-100 1 容の混合液) の 10 ml を含む試料瓶にカバースリップを入れ、その放射活性を液体シンチレーションスペクトロフォトメーター (堀場) を用いて測定した。

b) 細胞分裂期の測定: カバースリップに付着した細胞を、エタノール固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、約 500 個の細胞を観察して、分裂期の細胞を計数した。

4. Immune adherence (IA) 法

西岡らの方法¹⁶⁾ に従い、次のごとく行った。

a) 抗血清: 加熱処理ヒツジ赤血球に対する家兎抗血清を Mayer¹⁷⁾ の方法に従って作製した。又、市販の hemolysin をも使用した。

b) 補体: 非特異的の反応を除くため、市販の凍結乾燥補体の溶液 (原液) を、ヒト O 型赤血球、ヒツジ赤血球、BHK 細胞、py-BHK 細胞で順に 0°C にて吸収して使用した。補体溶液は小試験管に分割し、-70°C に保存した。

c) 緩衝液: sp GVB# (0.02% KCl と 0.1% グルコースを含むゼラチンペロナル緩衝液)¹⁵⁾ を用いた。

d) 実験法: 小試験管中の細胞浮遊液 0.1 ml (1×10^5 個の細胞を含む) に抗血清 0.5 ml を加え、37°C の水浴中に 30 分間保温したのち、0°C の水水中に 60 分間静置し、さらに冷却した緩衝液 7 ml で細胞を 3 回洗浄した。遠心沈澱した細胞を 120 C'IA 50 単位の補体を含む緩衝液 0.4 ml 中に再浮遊し、これにヒト O 型赤血球浮遊液 0.1 ml (2×10^7 細胞) を加えて、37°C 15 分間振盪して反応させた。室温 (24°C) に 30 分間放置したのち、顕微鏡下で赤血球の付着している細胞を計数した。赤血球 4 個以上付着した細胞を IA 反応陽性とした。対照実験では赤血球 1~3 個が付着した細胞 (5% 以下) を認めることがあった。F 抗原反応性は IA 反応陽性細胞の百分率によって示した。

5. Trypsin および neuraminidase 処理

Tris 緩衝食塩水を用い、trypsin (2 x crystallized, Worthington Biochemical Co.) および neuraminidase (Type

V, Sigma Chemical Co.) の酵素溶液を調製した。さらに neuraminidase 溶液には CaCl_2 (0.01 M) を加えた¹⁸⁾。細胞浮遊液 0.1 ml (1×10^5 細胞) に 0.5 ml の trypsin 又は neuraminidase 溶液を加え、37°C 20 分間反応させ、10 ml の冷却 sp. GVB# で 1 回洗浄して、IA 反応に使用した。

6. 蛍光抗体法

Robertson and Black¹¹⁾ の変法により行った。 2×10^5 細胞を 5 ml の Tris 緩衝食塩水で 3 回洗浄したのち、細胞に 0.3 ml の抗血清を加え、37°C 1 時間保温した。その後、細胞を 5 ml の Tris 緩衝食塩水で洗浄し、蛍光標識したヤギ抗家兎ガンマグロブリン血清 (Behring Institut 製) の 4 倍稀釈液 0.1 ml を加え、37°C に 30 分間振盪し反応させた。5 ml の Tris 緩衝食塩水で洗浄したのち、細胞を 25% グリセリン加 Tris 緩衝食塩水に浮遊し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

実験成績

1. BHK 細胞および py-BHK 細胞の F 抗原反応性

ペトリ皿に 1.4×10^6 個の細胞をまき、培養 3 日目で細胞密度約 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ の状態に達した時、EDTA を用いて細胞を剝離し、F 抗原反応性を IA 法で調べた (Table 1)。10 倍稀釈抗血清の反応系では、py-BHK 細胞は 84.4% の細胞が IA 陽性であったが、BHK 細胞では 30% が陽性細胞であった。抗血清の稀釈倍数を高めると IA 反応陽性率は低下した。対照に正常家兎血清を用いると、py-BHK 細胞の約 10% 程度は反応するが、この反応は血清稀釈倍数によって左右されないことから、非特異的の反応と考えられる。又、血清の代りに緩衝液を用いた場合には IA 反応は全く起らなかった。(この成績から、以下の IA 法による

Table 1 The reactivity of Forssman antigen of BHK and py-BHK cells grown confluently

Cells ^{a)}	Serum	IA positive cells (%)			
		Dilution of serum			
		1:10	1:100	1:1,000	— ^{c)}
py-BHK	antiserum ^{b)}	84.4	44.4	7.0	0
	normal serum	6.6	9.0	10.5	0
BHK	antiserum	30.0	20.5	6.5	0
	normal serum	3.5	1.5	0.5	0

a) Cells grown for 3 days to a density of $1 \times 10^5/\text{cm}^2$. Initial inoculum was 1.4×10^6 cells/dish (8.5 cm).

b) Rabbit antiserum to boiled sheep blood cells.

c) Gelatin veronal buffer containing 0.02% KCl and 0.1% glucose (spGVB#), instead of serum.

F 抗原反応性の測定には抗血清を 10 倍稀釈して使用した.)

これらの成績から, py-BHK 細胞では F 抗原反応性が高く, BHK 細胞では多くの細胞は IA 反応陰性であることがわかった. 実験に使用した細胞は, BHK 細胞ですすでに細胞相互の接触が十分に起り, 単層の細胞シートを形成して, BHK 細胞に特徴的な平行配列 (parallel array) を示し, py-BHK 細胞では細胞が互に交差 (criss-cross) する状態を示していた.

BHK 細胞の細胞密度と F 抗原反応性の関係を調べるため, ペトリ皿当たり 2.8×10^4 個の細胞をまいて培養し, 3 日目に培養液の交換を行って, 経時的に IA 反応を調べた (Fig. 2). 培養日数と共に細胞密度は増加するが, IA 陽性細胞は 1 日目および 2 日目で 80~85% を示し, 3 日目で細胞密度が $3 \times 10^3/\text{cm}^2$ になると 60% まで低下し, その後は細胞密度の増加に伴い 40% 程度まで低下した. 3 日目培養時には, すでに隣接細胞の紡錘状突起の接触が認められ, その後細胞相互の接触が著明となった. 上記の実験で, 低細胞密度の BHK 細胞の F 抗原反応性は py-BHK 細胞の反応性と同程度であることが明らかとなった.

Fig. 2 から明らかなように, BHK 細胞の細胞密度の高い状態でも細胞は増殖する. したがって, BHK 細胞の F 抗原反応性の低下は細胞密度が直接関係しているものと考えられる. しかし, この実験で使用した細胞の培養期間がそれぞれ異なるため, 培養期間を一定 (3 日間) にして, 細胞密度と抗原反応性との関係を検討した. Fig. 3 に示す

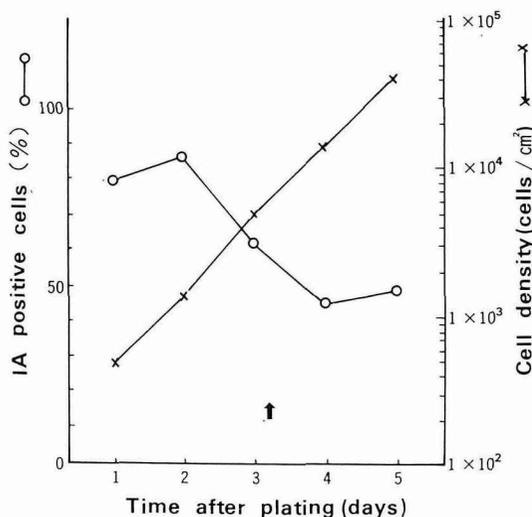


Fig. 2 The reactivity of Forssman antigen of BHK cells harvested at intervals after plating. The density of the cells at plating was 5×10^2 cells/cm². An arrow indicates the time of medium change.

ごとく, BHK 細胞では細胞密度 $2 \times 10^3/\text{cm}^2$ の細胞で IA 陽性細胞は 70% であり, 1.2×10^4 および $7 \times 10^4/\text{cm}^2$ の密度における細胞では約 30% の細胞が IA 陽性であった. py-BHK 細胞では細胞の密度に関係なく 90% 程度の細胞が IA 陽性を示した. このことから, BHK 細胞の F 抗原反応性は細胞密度依存性であることが明らかとなった.

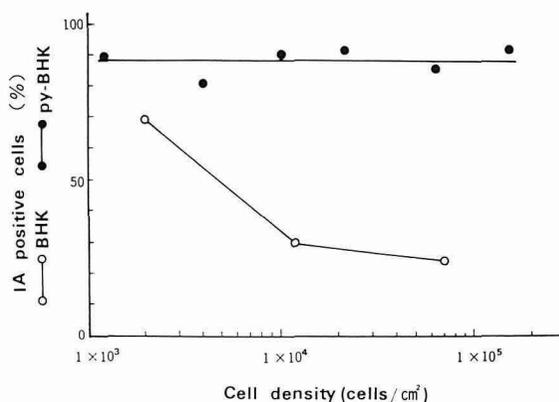


Fig. 3 The reactivity of Forssman antigen of sparse and confluent cultures. The cells were plated at various concentrations and incubated for 3 days resulting in the indicated cell density.

2. 細胞周期と F 抗原反応性

BHK 細胞では細胞相互接触により F 抗原反応性が低下したが, これは細胞接触により細胞表層に変化の起るためと考えられる. 他方, 細胞表層は, 細胞周期によっても変化することが知られている. ここでは, 細胞接触を起した BHK 細胞の同調培養系を用いて, 細胞周期における F 抗原反応性の変化を調べた. Fig. 4 A に示すごとく, thymidine 除去後, 直ちに細胞の DNA 合成が開始し, 4 時間目をピークとした S 期が認められ, さらに 16~18 時間目にピークをもつ二週目の S 期がみられた. Fig. 4 B に分裂細胞 (metaphase) の出現率を示した. M 期は 11~12 時間目に現われる. この同調培養系について, F 抗原反応性を IA 法で調べた. Fig. 4 C に示すごとく, thymidine 除去後には 53% の細胞が IA 陽性であったが, S 期のピークにかけて反応陽性細胞が増加し, 約 70% の細胞が IA 陽性であった. 二週目では S 期後半に F 抗原反応性が高まり, 90% の細胞が IA 陽性を示した. このように, 細胞接触の影響を受けていても, 細胞周期により F 抗原反応性が変化することがわかった.

3. F 抗原反応性におよぼす trypsin および neuraminidase の影響

Table 2 に示すごとく, 細胞密度の高い状態における

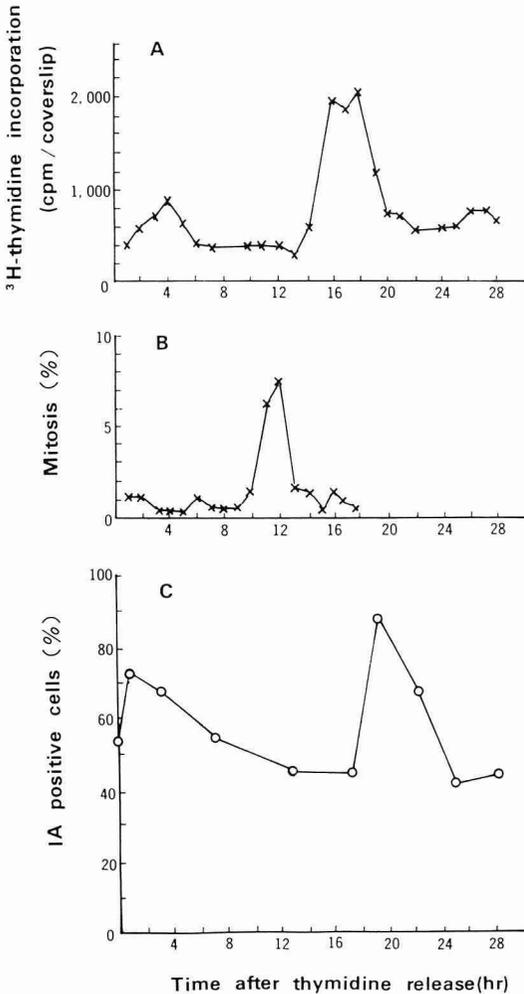


Fig. 4 Synchronization of BHK cells and the reactivity of Forssman antigen.

A: DNA synthesis after thymidine release. Cells were grown on coverslips placed in a petri dish, the coverslips were taken out at intervals, fresh medium containing ³H-thymidine was placed over the coverslips, the cells were incubated for min at 37°C, and the radioactivity of cold 5% trichloroacetic acidinsoluble materials was determined.

B: Mitotic index of the cells.

C: Forssman antigen reactivity.

BHK 細胞を trypsin (83 μg/ml) で処理すると, IA 陽性細胞が増加し, 反応陽性率は 70~80% の値を示した. 低密度の細胞の場合にも, 反応陽性細胞はほぼ 67% より 90% 程度まで増加した. Neuraminidase (830 μg/ml) 処理でも同様の結果が得られた. Trypsin および neuraminidase の濃度を 1/10 にして細胞を処理した場合には, IA 陽性細

Table 2 The reactivity of Forssman antigen of BHK cells treated with trypsin or neuraminidase

Treatment	IA positive cells (%)			
	Density of cells for assay ^{a)} (cells/cm ²)			
	2.8×10 ³	1.5×10 ⁴	7.1×10 ⁴	1.1×10 ⁵
—	67.3	30.6	22.0	29.0
Trypsin 83 ug/ml	92.0	70.5	70.4	82.0
Trypsin 8.3 ug/ml				28.4
Neuraminidase 830 ug/ml	85.0	81.3	72.5	72.0
Neuraminidase 83 ug/ml				28.0

a) Initial inoculum was 1.4×10⁶ cells/dish (8.5 cm).

胞は 28% で, 未処理の細胞との差は認められなかった.

4. 蛍光抗体法による F 抗原の検索

上記の成績より, 細胞接触をおこした BHK 細胞では IA 法による F 抗原反応性の低下していることがわかった. この反応性の低下が, F 抗原への抗体結合の阻害によるものか否かを調べるために, 次の実験を行った.

細胞密度 1.4×10⁵/cm² の BHK 細胞を用い, その細胞浮遊液を調製して, 蛍光抗体間接法により F 抗原の反応性を調べた. Table 3 のごとく, 抗血清 (hemolysin) の 4 倍および 16 倍希釈では, すべての細胞が蛍光陽性を示し, 抗血清の 64 倍希釈では 59% の細胞が蛍光陽性であった. しかし, 抗血清の 256 倍希釈, 正常血清あるいは Tris 緩衝食塩水では蛍光陰性であり, 又, py-BHK 細胞についても同様の成績が得られた. 細胞密度の低い培養の細胞についても, 抗血清の 4 倍および 16 倍希釈ではすべての細胞が蛍光陽性を示した. これらの成績から IA 陽性の細胞は勿論, IA 陰性の細胞でも F 抗体を結合することが明らかとなった. Fig. 5 に蛍光陽性を示す BHK 細胞の写真を示した. 細胞の輪郭に点状蛍光が多数認められる.

Table 3 The reactivity of Forssman antigen of BHK and py-BHK cells tested by the immunofluorescence method

Cells ^{a)}	IF positive cells (%)			
	Dilution of antiserum			
	1:4	1:16	1:64	1:256
BHK	100	100	59.2	0
py-BHK	100	100	62.6	0

a) Cells grown confluent at a density of 1.4×10⁵/cm².

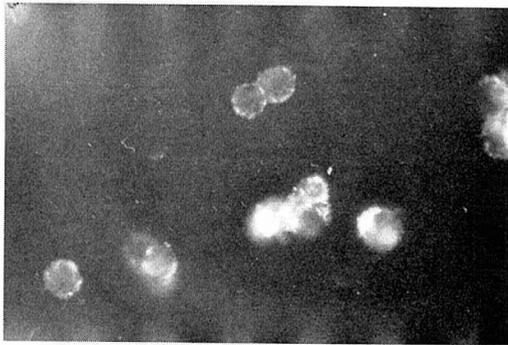


Fig. 5 Forssman antigen reactivity of BHK cells as revealed by immunofluorescence method. Note the positive fluorescence.

考 案

ハムスター腎株細胞 (BHK 21/13) とそのポリオーマウイルスによるトランスフォーム細胞 (py-BHK) について、細胞表層に存在する F 抗原の反応性を細胞の生理的状態との関連において、IA 法を用いて検討した。

BHK 細胞の F 抗原反応性は、細胞の相互接触のない培養条件 (sparse culture) では、py-BHK 細胞と同程度に高く、80~90% の細胞は IA 陽性であった。細胞接触が開始すると (細胞密度 $3 \times 10^3/\text{cm}^2$)、F 抗原の反応性は低下し、60% 程度の細胞が IA 陽性であった。さらに、細胞密度が増加すると、IA 陽性細胞は 30~40% に低下した。トランスフォーム細胞である py-BHK 細胞では、過密増殖しても contact inhibition は起らず、重なり合って criss-cross の状態を呈する。この py-BHK 細胞では、細胞密度に関係なく常に 90% 程度の細胞が IA 陽性を示した。一般に、正常細胞の増殖は、細胞相互の接触が起ると抑制される (増殖の接触阻止あるいは細胞密度依存性増殖阻止)。しかし、BHK 細胞は Macpherson and Stoker¹⁴⁾ の報告のように、トランスフォーム細胞に近い細胞飽和密度を示し、接触阻止の弱い細胞である。Fig. 2 にみるように、相互接触を起す密度を越えても、培養を継続すると細胞密度は増加する。したがって、細胞が増殖期にあるために抗原反応性が增強しているというのではなく、BHK 細胞の F 抗原反応性の変化は、細胞密度依存性であると思われる。実際、培養時間を一定にし、その間は培養液の交換を行わず、種々の細胞密度になるように培養して、F 抗原反応性を調べたところ、抗原反応性は細胞密度と直接関係のあることがわかった (Fig. 3)。

次に、F 抗原反応性と細胞周期との関連を調べた。同調培養における thymidine 除去直後の細胞は相互接触を起しており、IA 陽性細胞も 50% 程度であったが、S 期に入

ると F 抗原反応性は高まり、M 期の細胞では再び低下した。二週目の S 期では、DNA 合成のピークを越えた時期に F 抗原反応性が增強している。同調培養の細胞は、thymidine 除去を行った時点では G₁ から S 期への移行期 (G₁/S 期) にあるので、S 期の細胞表層の性状が発現して、一周目の F 抗原反応性の增強は早期に現われたものと思われる。この同調培養では、M 期に次いでかなり早く二週目の S 期が現われ、G₁ 期は短時間であった。しかし、細胞周期を通して F 抗原反応性をみると、M 期および G₁ 期で反応性が低下しているものと判断される。本実験では、相互接触を起した細胞を用いて、その細胞周期における F 抗原反応性の変化を調べ、S 期に反応性の增強することが明らかとなった。細胞相互の接触のない sparse culture について、同調培養を行ない、F 抗原反応性の変化を検討すると、さらにこの点は明確になるであろう。しかし、培養細胞の量的制限のために、実証は困難であった。

過密増殖した BHK 細胞を trypsin 又は neuraminidase で処理すると、F 抗原の反応性が增強した。このことは、trypsin あるいは neuraminidase により、細胞表層物質が除去され、細胞は IA 陽性となったことを示唆している。IA 法は、抗原・抗体複合体の形成後に、補体加わり、赤血球が吸着する現象である¹⁶⁾。したがって、細胞表層に存在する F 抗原が、他の表層物質の新生あるいは再配列により空間的に被覆されるか、あるいはその結果細胞表層の物理化学的性状に変化を起すと、赤血球の細胞表面への接近が阻害され、IA 反応は陰性となるとみることが出来る。このような見地から、IA 法による F 抗原反応性の変化をみると、細胞周期で細胞表層構成物質に質的あるいは量的変化が起り、又、細胞接触により細胞表層に変化の生ずるものと解釈される。Trypsin は細胞表層の蛋白質あるいは糖蛋白質に変化を起し¹⁹⁾、neuraminidase は糖蛋白質および糖脂質のシアル酸を除去する²⁰⁾。本実験に使用した neuraminidase には、蛋白分解酵素の混入が認められたが、使用濃度からみて neuraminidase 自体の作用が効果をもたらしっていると判断される。Trypsin による F 抗原の発現については、Burger²¹⁾、Makita²²⁾ らの報告もあり、IA 法による F 抗原反応性の減少は masking phenomenon として理解することが出来る。

本研究では、相互接触をおこした BHK 細胞は、30~40% の割合で IA 陽性であった。実験に供した細胞は、培養細胞を EDTA 処理で剥離して浮遊細胞としているので、一部の細胞の表層にある程度の変化をおこしたものと考えられる。実際、EDTA 処理により細胞表層物質が遊離するという報告^{23,24)}がある。

前述の酵素処理の成績から推測されるように、F 抗原の

反応性の低下は、抗原物質の消失によるものではない。この証明のために、蛍光抗体法により、F 抗原の存在を検討した。その結果、IA 陰性細胞でも抗体を結合し、蛍光陽性であった。Burger²¹⁾ は BHK 細胞に F 抗原が存在しないと報告しているが、培養細胞は継代維持することで細胞の性状が変化するとされ、同一の BHK 細胞でも細胞の表面構成に違いがでてくるためと考えられる。

本論文においては、耐熱性ヒツジ赤血球に対する抗体と反応する抗原物質を F 抗原と呼んだ。狭義の F 抗原は糖脂質として分離され、その構造はすでに明らかにされている²⁵⁾。Hakomori らの報告²⁶⁾によると、BHK 細胞には F 糖脂質は存在しないというが、本研究における抗原物質が F 糖脂質そのものであるか、あるいはその他の heterogenic な抗原物質であるのか、現在のところ不明である。

細胞周期における物質の変化について多数の報告がある。細胞表面の抗原物質である H₂ 抗原^{27~31)}、血液型物質³²⁾、モロニーウイルス依存性細胞表面抗原^{27,29,30)}などは G₁ 期に増量し、糖蛋白³³⁾、ロイシン、コリン、グルコサミン³⁴⁾も G₁ 期に取り込みの増加を示す。S 期に増加しているものとして磷脂質³⁵⁾、RNA³⁶⁾、蛋白³⁷⁾、糖蛋白^{37,38)}などの報告もある。又、植物凝集素 wheat germ agglutinin は M 期に結合するとされる¹⁹⁾。しかし、neuraminidase で細胞から剥離されるシアル酸に関しては CHO 細胞において変化しない³⁹⁾とされることなどから F 抗原の S 期周辺における IA 反応性の増大と特定物質の変動を結びつけることは現段階で困難であり今後の検討を要する。

結 語

ハムスター腎株細胞 (BHK 21/13) およびそのポリオーマウイルスによるトランスフォーム細胞 (py-BHK) を使用して、細胞表面に存在する F 抗原の反応性と細胞の生理的状態すなわち培養細胞の密度、細胞増殖、細胞周期との関連を検討した。

IA 法による成績は次のごとくである。

1. BHK 細胞では、細胞相互接触のない低密度の培養細胞を用いると、IA 陽性細胞は 70~85% を占め、F 抗原反応性は高く、py-BHK 細胞とほぼ同程度であった。細胞接触が始まる (細胞密度 $3 \times 10^3/\text{cm}^2$) と、IA 陽性細胞の比率は低下し、60% の細胞が IA 陽性であった。細胞密度がさらに高まると、IA 陽性細胞は 30~40% に低下した。しかし、この細胞密度でも細胞の増殖は認められたので、F 抗原反応性には細胞の増殖は関係なく、細胞密度依存性であり、細胞の相互接触が細胞表面に変化を与えるものと思われる。

2. py-BHK 細胞は細胞密度が高い状態でも細胞の相互

接触をおこさず、F 抗原反応性は常に高く、IA 陽性細胞は 90% 前後であった。

3. BHK 細胞の F 抗原反応性は、その細胞周期の S 期近傍で高まり、IA 陽性細胞は 70~90% であった。M および G₁ 期では F 抗原反応性は低下し、IA 陽性細胞は 45% に過ぎなかった。

4. 接触状態の BHK 細胞を用いて、trypsin 又は neuraminidase 処理を行うと、F 抗原反応性が増強し、py-BHK 細胞の反応性と同程度になった。

蛍光抗体法により F 抗原の存在を検討すると、BHK 細胞および py-BHK 細胞共に培養の細胞密度に関係なく、すべての細胞が蛍光陽性を示した。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (内田) によって行われた。

(昭和 51. 2. 17 受付)

References

- 1) Macpherson, I.: The characteristics of animal cells transformed *in vitro*. *Adv. Cancer Res.* **13**, 169-215 (1970).
- 2) Sjögren, H. O., Hellström, I. and Klein, G.: Transplantation of polyoma virus-induced tumors in mice. *Cancer Res.* **21**, 239-337 (1961).
- 3) Habel, K.: Resistance of polyoma virus immune animals to transplanted polyoma tumors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **106**, 722-725 (1961).
- 4) Sjögren, H. O.: Transplantation methods as a tool for detection of tumor-specific antigens. *Progr. exp. Tumor Res.* **6**, 289-322 (1965).
- 5) Tevethia, S. S., Katz, M. and Rapp, F.: New surface antigen in cells transformed by simian papovavirus SV 40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **119**, 896-901 (1965).
- 6) Kluchareva, T. E., Shachanina, K. L., Belova, S., Chibisova, V. and Deichman, G. I.: Use of immunofluorescence for detection of specific membrane antigen in simian virus 40-infected non-transformed cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **39**, 825-832 (1967).
- 7) Irlin, I.: Immunofluorescent demonstration of a specific surface antigen in cells infected or transformed by polyoma virus. *Virology* **32**, 725-728 (1967).
- 8) Hellström, I. and Sjögren, H. O.: Demonstration of common specific antigen(s) in mouse and hamster polyoma tumors. *Int. J. Cancer* **1**, 481-489 (1966).

- 9) Fogel, M. and Sachs, L.: Studies on the antigenic composition of hamster tumors induced by polyoma virus, and of normal hamster tissues *in vivo* and *in vitro*. *J. Natl. Cancer Inst.* **29**, 239-252 (1962).
- 10) O'Neill, C. H.: An association between viral transformation and Forssman antigen detected by immune adherence in cultured BHK 21 cells. *J. Cell Sci.* **3**, 405-422 (1968).
- 11) Robertson, H. T. and Black, P. H.: Changes in surface antigens of SV 40-virus transformed cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **130**, 363-370 (1969).
- 12) Fogel, M. and Sachs, L.: The induction of Forssman-antigen synthesis in hamster and mouse cells in tissue culture, as detected by the fluorescent-antibody technique. *Exptl. Cell Res.* **34**, 448-462 (1964).
- 13) Fogel, M. and Sachs, L.: Induction and repression of antigenic material (Forssman type) in relation to cell organization. *Develop. Biol.* **10**, 411-432 (1964).
- 14) Macpherson, I. and Stoker, M. G. P.: Polyoma transformation of hamster cell clones— an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* **16**, 147-151 (1961).
- 15) Bootsma, D., Budke, L. and Vos, O.: Studies on synchronous division of tissue culture cells initiated by excess thymidine. *Exptl. Cell Res.* **33**, 301-309 (1964).
- 16) Nishioka, K., Irie, R. F., Kawana, T. and Takeuchi, S.: Immunological studies on mouse mammary tumors. III. Surface antigens reacting with tumor-specific antibodies in immune adherence. *Int. J. Cancer* **4**, 139-149 (1969).
- 17) Mayer, M. M.: Complement and complement fixation. In: Kabat, E. A. and Mayer, M. M.: *Experimental Immunochemistry*. second edition 150-151, Charles C Thomas, Illinois (1961).
- 18) Wallach, D. F. H. and Kamat, V. B.: The contribution of sialic acid to the surface change of fragments of plasma membrane and endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **30**, 660-663 (1966).
- 19) Fox, T. O., Sheppard, J. R. and Burger, M. M.: Cyclic membrane changes in animal cells: Transformed cells permanently display a surface architecture detected in normal cells only during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **68**, 244-247 (1971).
- 20) Herschman, H. R., Breeding, J. and Nedrd, J.: Sialic acid masked membrane antigens of clonal functional glial cells. *J. Cell. Physiol.* **79**, 249-258 (1971).
- 21) Burger, M. M.: Forssman antigen exposed on surface membrane after viral transformation. *Nature New Biol.* **231**, 125-126 (1971).
- 22) Makita, A. and Seyama, Y.: Alterations of Forssman-antigenic reactivity and of monosaccharide composition in plasma membrane from polyoma-transformed hamster cells. *Biochim. Biophys. Acta* **241**, 403-411 (1971).
- 23) Collins, J. J. and Black, P. H.: Analysis of surface antigens on simian virus 40-induced antigens on transformed cells. II. Exposure of simian virus 40-induced antigens on transformed rabbit kidney and inbred hamster kidney cells by phospholipase C. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 115-134 (1973).
- 24) Culp, L. A. and Black, P. H.: Release of macromolecules from BALB/c mouse cell lines treated with chelated agents. *Biochemistry* **11**, 2161-2172 (1972).
- 25) Siddiqui, B. and Hakomori, S.: A revised structure for the Forssman glycolipid hapten. *J. Biol. Chem.* **246**, 5766-5769 (1971).
- 26) Hakomori, S. and Kijimoto, S.: Forssman reactivity and cell contact in cultured hamster cells. *Nature New Biol.* **239**, 87-88 (1972).
- 27) Cikes, M.: Relationship between growth rate, cell volume, cell cycle kinetics, and antigenic properties of cultured Murine lymphoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **45**, 979-987 (1970).
- 28) Pasternak, C. A., Warmsley, A. M. H. and Thomas, D. B.: Structural alterations in the surface membrane during the cell cycle. *J. Cell Biol.* **50**, 562-564 (1971).
- 29) Cikes, M. and Friberg, S. J.: Expression of H-2 and Moloney leukemia virus-determined cell-surface antigens in synchronized cultures of a mouse cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **68**, 566-569 (1971).
- 30) Cikes, M. and Klein, G.: Quantitative studies of antigen expression in cultured Murine lymphoma cells. I. Cell-surface antigens in "asynchronous" cultures. *J. Natl. Cancer Inst.* **49**, 1599-1606 (1972).
- 31) Cikes, M., Friberg, S. J. and Klein, G.: Quantitative studies of antigen expression in cultured Murine lymphoma cells II. Cell-surface antigens in synchronized cultures. *J. Natl. Cancer Inst.*

- 49, 1607-1611 (1972).
- 32) Thomas, D. B.: Cyclic expression of blood group determinants in Murine cells and their relationship to growth control. *Nature* **233**, 317-321 (1971).
- 33) Glick, M. C. and Buck, C. A.: Glycoproteins from the surface of metaphase cells. *Biochemistry* **12**, 85-90 (1973).
- 34) Gerner, E. W., Glick, M. C. and Warren, L.: Membranes of animal cells. V. Biosynthesis of the surface membrane during the cell cycle. *J. Cell Physiol.* **75**, 275-280 (1970).
- 35) Bergeron, J. J. M., Warmsley, A. M. H. and Pasternak, C. A.: Phospholipid synthesis and degradation during the life-cycle of P815 Y mast cells synchronized with excess of thymidine. *Biochem. J.* **119**, 489-492 (1970).
- 36) Warmsley, A. M. H. and Pasternak, C. A.: The use of conventional and zonal centrifugation to study the life cycle of mammalian cells. *Biochem. J.* **119**, 493-499 (1970).
- 37) Bosmann, H. B. and Winston, R. A.: Synthesis of glycoprotein, glycolipid, protein, and lipid in synchronized L5178 Y cells. *J. Cell Biol.* **45**, 23-33 (1970).
- 38) Bosmann, H. B.: Glycoprotein synthesis: Activity of collagengalactosyl and collagen-glucosyl transferases in synchronized mouse leukemic cells L 5178 Y. *Exptl. Cell Res.* **61**, 230-233 (1970).
- 39) Kraemer, P. M.: Configuration change of surface sialic acid during mitosis. *J. Cell Biol.* **33**, 197-200 (1967).