

## 網膜芽細胞腫の分子生物学的研究

非腫瘍細胞との細胞融合実験 第1報 (図10)

戸塚 清一\*・Paul Matsumura\*\*・George Inana\*\* (\*信州大学医学部眼科  
\*\*米国国立眼研究所)Molecular Biological Study of Retinoblastoma  
Hybrids between Retinoblastoma and Non-malignant Cell

Seiichi Totsuka, Paul Matsumura\* and George Inana\*

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Shinshu University

\*National Eye Institute, National Institutes of Health, U.S.A.

## 要 約

近年、網膜芽細胞腫(RB)は染色体13番の遺伝子欠損により生ずる recessive cancer であろうと考えられている。本論文はRBが recessive cancer であるか否かを、RBY79細胞と非腫瘍細胞であるマウス線維芽細胞 NIH 3T3間に細胞融合を行ない、分子生物学的に検討した。両細胞間の細胞融合を確認できるように neomycin 抵抗遺伝子 neo および E. coli xanthine-guanine phosphoribosyl transferase 遺伝子 GPT という2種類のマーカー遺伝子を、Y79, 3T3各々に transfection し、その後細胞融合を行ない、両マーカー遺伝子に対応する二重選択培養下に hybrid を分離し、さらに DNA blot hybridization により両マーカー遺伝子を有することを確認した。計60個の hybrid が得られたが全て anchorage dependent で、紡錘型を呈し、方向性を有する細胞配列を示し、3T3に極めてよく類似したものであった。(日眼 92: 828—836, 1988)

キーワード: 網膜芽細胞腫, 細胞融合, Hybrid, Recessive Cancer, Hybridization

## Abstract

In order to determine whether retinoblastoma (RB) is a dominant or a recessive cancer, the RB Y79 cells containing the neomycin-resistance gene were fused with "non-malignant" NIH 3T3 cells containing the E. coli xanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene. Totally 60 hybrids were isolated by a double selection with neomycin and media containing aminopterin and mycophenolic acid, and their morphological characteristics were studied. All hybrids had the ability to grow in the double selection media, and DNA blot hybridization with <sup>32</sup>P-labeled neo or GPT probes demonstrated the presence of both sequences in the hybrid cells. The hybrid cells were all spindle-shaped and fibroblastic. Colonies showed a wheatsheaf cell alignment. Therefore, all hybrids were morphologically most similar to the "non-malignant" fibroblast parent NIH 3T3. These results appear to confirm the recessive nature of RB. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 828—836, 1988)

Key words: Retinoblastoma, Cell Fusion, Hybrid, Recessive Cancer, Hybridization

別刷請求先: 390 松本市旭3-1-1 信州大学医学部眼科学教室 戸塚 清一 (昭和63年1月19日受付)

Reprint requests to: Seiichi Totsuka, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Shinshu Univ.  
3-1-1 Asahi, Matsumoto 390, Japan

(Accepted January 19, 1988)

## I 緒 言

網膜芽細胞腫 (Retinoblastoma: 以下 RB と略す) は、眼科領域に於る代表的悪性腫瘍であり、その発生率は1,5000~2,8000の出生に対し1例といわれる<sup>1)</sup>。本腫瘍には以下の如き特徴がある。1) 本腫瘍は、出生から4歳という極めて低い年齢に於て、ほとんど全てが発症する。2) 遺伝性を有する症例が40%を占め、それらは常染色体優性遺伝を示す。3) 病型に両眼性、片眼性の別があり前者では全例が遺伝性を有するのに対し、後者ではその15%のみが遺伝性を有する。さらに発症時期にも両者で差がみられ、前者の方が早い。また、前者の場合、二次的に骨肉腫などの他の原発性悪性腫瘍を発症する危険性が、正常者に比し高い。

本腫瘍が患児の眼内に腫瘍を形成するまでの仮説として、“two-hit”説が提唱された。つまり、本腫瘍の発現には2つの hit が必要であり、遺伝性の症例の場合には、生殖細胞の段階で第1の hit たる遺伝子異常を生じ、次いで第2の hit として、体細胞突然変異が、既に第1 hit で異常を有する幼若な網膜芽細胞に生じ、RB が発現する。また、非遺伝性の症例の場合には、第1、第2の hit が、共に、体細胞突然変異として、同一の網膜芽細胞に生じ発現すると考えた<sup>2)3)</sup>。

一方、染色体分析が進むにつれ、RB 患者の5%弱に染色体13番 q14域の欠損を含む異常が認められるようになり、この部分が RB 発現と深い関係のあることが示唆された<sup>4)</sup>。

その後の1980年以降の研究は、主として分子生物学の方面からもたらされたものである。まず、染色体13番 q14にあり、RB に関する遺伝子のごく近くに、酵素 Esterase D (以下 EsD と略す) の遺伝子が存在することが判明し、これをマーカーとして RB 患者および家族の検討が進められた<sup>5)~7)</sup>。

また、この頃、recombinant DNA を用いた Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) 法が確立され<sup>8)</sup>、染色体13番についても、いくつかの有質なマーカー DNA が得られ、染色体上での位置も同定されるにいたった<sup>9)~11)</sup>。

1983年 Benedict らは、興味ある1例を報告した<sup>12)</sup>。この RB 患者の EsD 活性は、体細胞では正常の1/2、RB 腫瘍自体では0を示し、顕微鏡を用いた染色体分析では、体細胞には異常を見出せず、腫瘍細胞では、一方の染色体13番が全欠損していた。彼らは、RB および EsD 遺伝子を含む submicroscopic な染色体13番

q14域の欠損が、体細胞の一方の染色体にあり、RB 腫瘍では、この異常な13番染色体が残り、他方の正常な染色体が全欠損したものと考えた。こうして“two-hit”説が正しいこと、RB がある遺伝子が欠損するために生ずる腫瘍 (これを recessive cancer という) であろうと報告した。その後、同様のマーカーを駆使した検索が積み重ねられ<sup>13)~15)</sup>、また、RB 患者の胎児が RB を発症する危険性につき、羊水を採取し、マーカー DNA を用い検討する臨床的試みもなされている<sup>16)</sup>。

さらに、この遺伝子の recessive mutation は、RB とも骨肉腫の発症とも関係しており<sup>17)</sup>、RB が recessive cancer とした場合、この RB 遺伝子が抑制あるいは調節する相手の遺伝子として、N-myc の可能性が検討されている<sup>18)~20)</sup>。また、EsD の遺伝子を出発点とし、染色体13番上を、少しずつ RB 遺伝子に近づく試みがなされ、非常に近い complementary DNA (cDNA) が報告されている<sup>21)22)</sup>。

一方、1961年 Barski らは<sup>23)</sup>、マウス線維芽細胞由来の1つは悪性、他は悪性度の低い2種類の細胞を混合培養し、双方の細胞が自然に融合したと考えられる hybrid を発見し、この hybrid は悪性を示すと報告した。こうして、異なる2種類の細胞間に細胞融合が生じ hybrid ができることが初めて明らかにされ、その後 Sendai virus<sup>24)25)</sup> や polyethylene glycol (PEG)<sup>26)</sup> を用いることにより、細胞融合の効率が上昇することが発見され、各種細胞間の hybrid が系統的に作られるようになった。

特に、悪性腫瘍細胞と正常細胞間の hybrid を検索し、悪性の性質およびその調節、そしてその表現型発現のメカニズムにつき研究が行なわれるようになった。当初は上記の如く、悪性細胞と正常細胞間の hybrid は全て悪性を示すものと考えられていたが<sup>27)~29)</sup>、正常に近い性質を示す場合もあることが明らかになり<sup>30)~33)</sup>、現在では悪性腫瘍には、前者の如き dominant cancer と、後者の如き recessive cancer があることが知られている。

前述の如く、RB は染色体13番 q14に存すると考えられる RB 遺伝子の欠損により生ずる recessive cancer であろうとの見方が有力であるが、未だ生物学的に検討した報告はない。そこで著者らは、RB と非腫瘍細胞の間に細胞融合を行ない hybrid を作り、その形態につき検討したので報告する。

## II 実験方法

### 1. Cell line, transfection, 細胞培養

RBとしてはY79 cell line<sup>34)</sup>を用い、非腫瘍細胞としてはマウス線維芽細胞 NIH 3T3 cell line<sup>35)</sup>を用いた。そして、細胞融合により hybrid が生じた場合に、確認が可能であるように、前者には neomycin (G418) 抵抗遺伝子 neo を有する pSV2neo<sup>36)</sup>、後者には E. coli xanthine-guanine phosphoribosyl transferase 遺伝子 GPT を有する psV GPT<sup>37)38)</sup> という dominant マーカー遺伝子を、リン酸カルシウムを用い各々 transfection した<sup>39)</sup> (図 1)。

その後、前者については、10%子牛血清、2mML グルタミン、200単位/ml ペニシリン、200 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン、0.25 $\mu$ g/ml アンホテリシン B を含む RPMI1640培養液 (これを以下 RB 培養液と呼ぶ) に、G418を0.5mg/ml となるように (この選択を以下 neo 選択と呼ぶ) 加えて培養した。また後者については、10%子牛血清、200単位/ml ペニシリン、200 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン、0.25 $\mu$ g/ml アンホテリシン B を含む Dubbeco Modified Essential Medium (これを以下 3T3培養液と呼ぶ) を1mM L グルタミン、0.025mg/ml mycophenolic acid (以上全て Gibco 社製)、0.001 mg/ml thymidine、0.002mg/ml aminopterin、0.25 mg/ml キサンチン、0.015mg/ml ピボキサンチン (以上 Sigma 社製) となるよう調整し (この選択を以下 GPT 選択と呼ぶ) 培養した。培養液は週 2 回交換し、Pco<sub>2</sub> 7.5%36.4℃の湿度制御式培養機にて培養した。尚、RB Y79細胞については、poly-D-lysine、ファイブロンネクチン (Gibco 社製) で表面処理した培養皿を用いた<sup>40)</sup>。

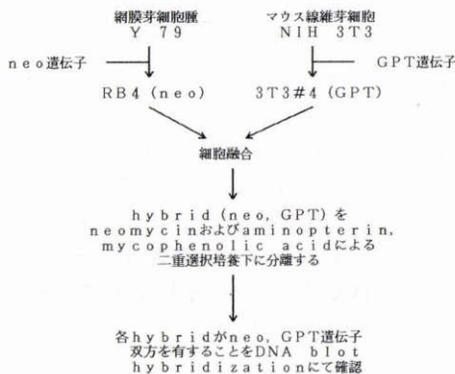


図 1

こうして選択培養し、それに抗して増殖する clone を分離した。その中から RB4, 3T3#4 と名付けた各々 neo 遺伝子, GPT 遺伝子の組み込まれた新しい細胞を、以下の細胞融合実験に用いた。

### 2. 細胞融合および hybrid の分離

RB Y79細胞は、通常の培養皿には付着せず浮遊しつつ増殖する性質があり、また細胞融合により生ずる hybrid の中に、RB4に類似した性質のものが出現する可能性もあるので、細胞融合用の培養皿の半数は、上記の如き poly-D-lysine、ファイブロンネクチンで表面処理した培養皿を用いた。つまり、6個の通常の培養皿と6個の表面処理をした培養皿を実験用として用意し、また対照用としてはRB 4用には3個の表面処理培養皿、3T3#4用には3個の通常の培養皿を用意した。3個の対照の内訳は、そのまま各々 neo 選択, GPT 選択で当初と同様に増殖するかを確認するのに1個、実験用と同様に途中から neo および GPT の二重選択をかけ経過をみるのに1個、実験用と同様に PEG 操作を加えた後、二重選択で経過観察し、PEG 操作による細胞傷害をみるのに1個使用した。

まず、実験用培養皿12個および3T3#4対照培養皿3個の計15個の培養皿に3T3#4細胞を各々  $6 \times 10^6$  個播種した。次いで3日後に、既に3T3#4が生着増殖している12個の実験用培養皿およびRB4用対照培養皿3個に、RB4細胞を各々  $6 \times 10^6$  個ずつ播種した。その後3日間、RB 培養液、3T3培養液 1:1 混合液にて培養した後、細胞融合に用いた。

細胞融合には PEG を用い<sup>26)</sup>、最初に40% (重量/容積) PEG (分子量1000, Sigma 社製)、20% dimethylsulfoxide (DMSO, Fisher Scientific 社製) を含む Minimum Essential Medium (Eagle) (MEM, Gibco 社製) で30~45秒間処置した後、10% DMSO を含む MEM で3回洗い、次いで10%子牛血清 (Gibco 社製) を含む MEM で1回洗った。この操作はRB4, 3T3#4 各々の対照培養皿1個についても同様に行なった。

細胞融合操作後は、実験用培養皿12個、対照培養皿のうち上記 PEG 操作を加えたもの、および操作を加えていないもの各々1個の計4個に対し、RB 培養液、3T3培養液 1:1 で、neo 選択, GPT 選択を含む二重選択培養下に培養し観察した。培養液は週 2 回交換し、交換時の液は一度新しい処理培養皿に移し、RB 様細胞のないことを確認の上、廃液した。

### 3. Hybrid DNA 中の neo, GPT マーカー遺伝子の確認

各 hybrid 細胞から DNA を取り出し、その約5 $\mu$ g を制限酵素 EcoRI で cut した後、0.8% agarose gel にて電気泳動し、Southern<sup>(1)</sup>の方法により、nitrocellulose filter に移した。

一方、neo probe は、pSV2neo plasmid DNA をそのまま、あるいは、制限酵素 Hind III, Nae I で二重消化して得られた約700bp の neo 遺伝子 DNA を<sup>32</sup>P でラベルして作った(図2)。また GPT probe は pSV GPT plasmid DNA をそのまま、あるいは、制限酵素 Hind III, EcoRV で二重消化して得られた約450bp の GPT 遺伝子 DNA を<sup>32</sup>P でラベルして作った(図3)

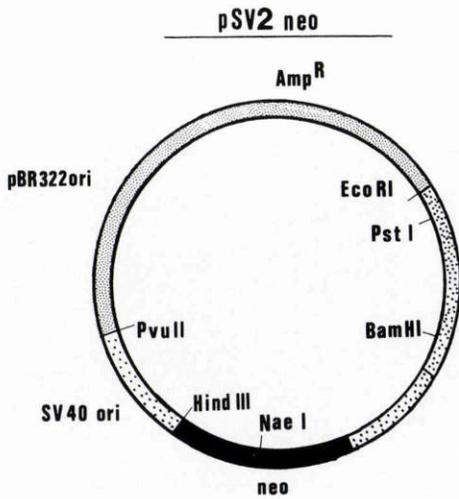


図 2

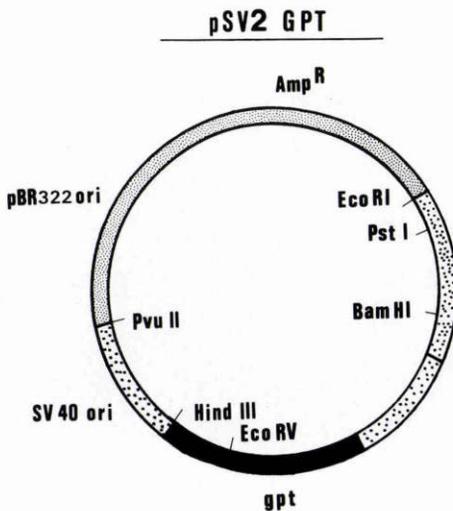


図 3

Southern blotting による確認

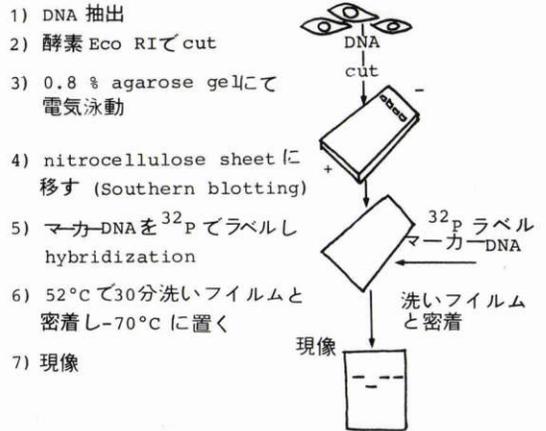


図 4

(上記使用酵素は全て Bethesda Research Laboratories 製)。これらを denature し単鎖とした後、neo probe, GPT probe を各々別々の blot に hybridization させた後、40°C で30分間洗い、増感板と共にコダック XAR フィルムと密着させ、フィルムカセットに入れ、-70°C に保存した後現象しオートラジオグラフィを得た(図4)。

4. Hybrid の形態学的観察

培養皿は、定期的な光学顕微鏡にて観察し必要に応じてニコン位相差顕微鏡にて写真撮影を行なった。

III 結 果

1. Hybrid の分離

細胞融合そして二重選択培養開始後11日目には、二重選択のかかっている対照培養皿には、生きた細胞は認められなくなった。またRB4, 3T3#4の対照培養皿で各々neo 選択のみ、GPT 選択のみかかっている培養皿では、細胞は良好な増殖を示しており、選択培養液の適正であることが確認された。

実験培養皿においても、RB4, 3T3#4細胞は死滅し浮き上りがみられたが、その中で、少し大型で線維芽細胞に類似した形態を示す細胞が、所々に小さな集合を形成しつつ認められるようになった。これら hybrid 細胞には多核の細胞もみられた。実験用培養皿の半数を処理培養皿とし、全実験用培養皿の培養液交換時に、一定期間、古い培養液を新しい処理培養皿に移し観察を行なったが、RB4様の hybrid 細胞の出現は認められなかった。

各々の hybrid colony が十分な大きさになるのを待って、細胞融合後 4 週目より colony の分離にかかった。小円筒とトリプシン—EDTA (Gibco 社製) を用い、合計 60 個の colony を各々 35mm 培養皿に移し、二重選択培養を続けた。概その hybrid 発生率は  $8.3 \times 10^{-6}$  であった。

## 2. Hybrid の形態

RB4 は、もとの Y79 細胞と同様の形態を示し、Reid ら<sup>34)</sup>の記載の如く、小型球型の未分化細胞であり、poly-D-lysine, ファイブロネクチン表面処理培養皿では、Kyritsis ら<sup>40)</sup>が記載している如く、小型球型細胞が monolayer を成し生育し、鎖あるいは房のように連なった配列が認められる。細胞の大きさは  $10 \sim 20 \mu$  であった (図 5)。

一方、3T3#4 は、Todaro ら<sup>35)</sup>の NIH 3T3 についての記載の如く、線維芽細胞の形態を示し、細胞配列に

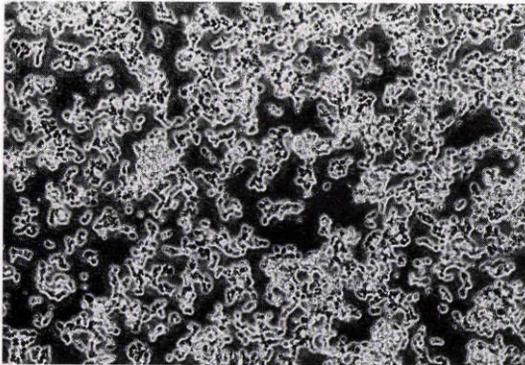


図 5 RB4, 位相差顕微鏡写真  $\times 50$ . 小型球型の細胞が、鎖状あるいは房状に配列する。

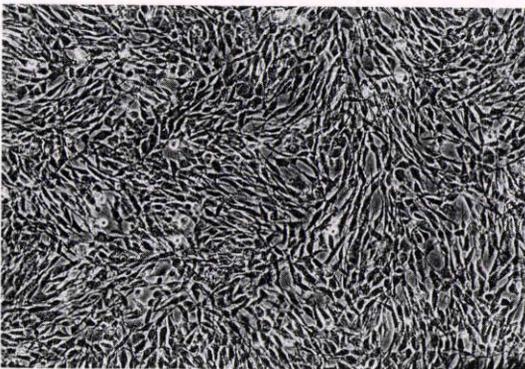


図 6 3T3#4, 位相差顕微鏡写真  $\times 50$ . 紡錘型の細胞が、平行に流れるが如く連なり「小麦の束」様の配列を示す。

は方向性があり、平行に流れるが如く連なり「小麦の束」様の配列を示した。細胞の大きさは、約  $20 \times 100 \mu$  であった (図 6)。

今回の細胞融合により生じた hybrid は、60 個全て、線維芽細胞様の形態を示し、RB4 様、あるいは悪性の細胞形態を示すものは 1 つも認められなかった。hybrid 細胞は、いずれも 3T3#4, RB 4 に比し少し大きなものが多く、中には多核を有する細胞もみられた。Hybrid の細胞形態および細胞配列は NIH 3T3 に極めて良く一致するものであった (図 7, 8)。

## 3. Hybrid DNA 中の neo, GPT マーカー遺伝子の確認

各 hybrid に、neo および GPT 双方の遺伝子が存在することが証明された (図 9, 10)。

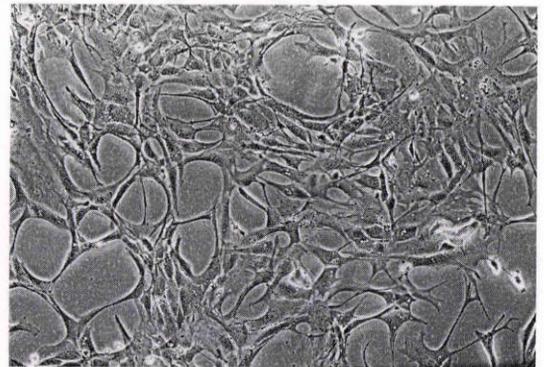


図 7 Hybrid B, 位相差顕微鏡写真  $\times 50$ . 紡錘型をした 3T3#4 の約 2 倍の大きさの細胞が、方向性を有する配列を示す。

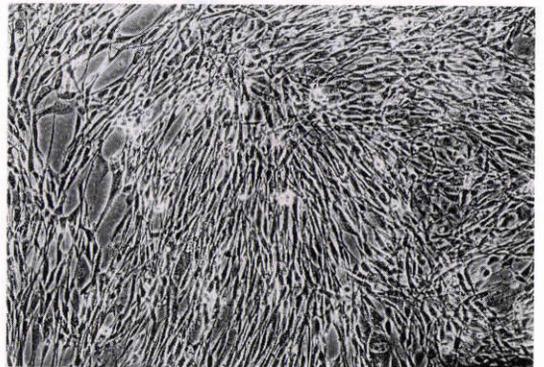


図 8 Hybrid P, 位相差顕微鏡写真  $\times 50$ . 3T3#4 に極めて良く類似した紡錘型細胞が、「小麦の束」様に配列する。

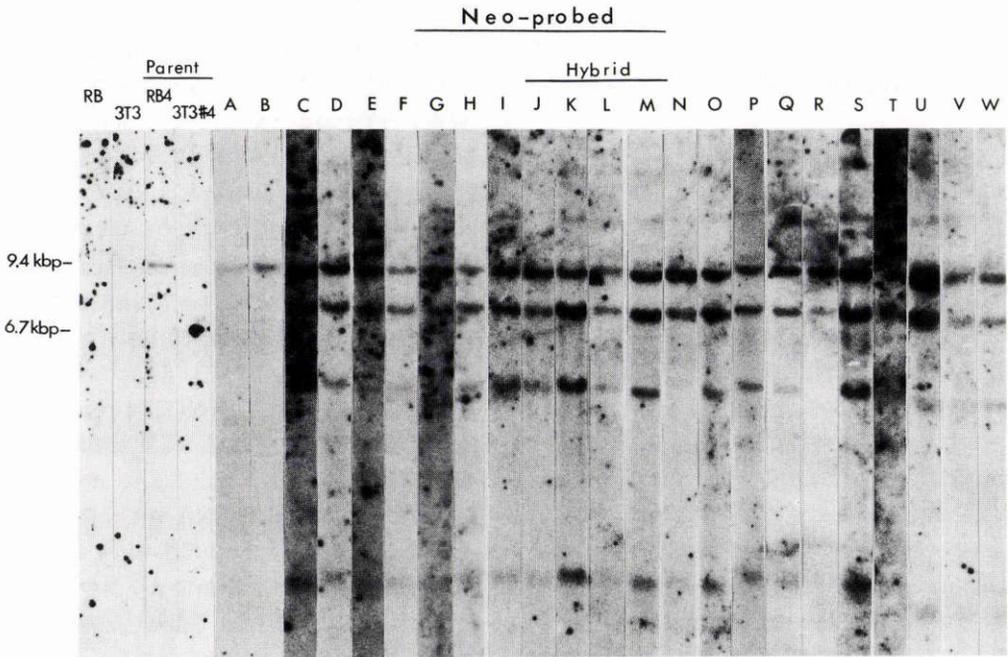


図9 <sup>32</sup>Pでラベルされた neo 遺伝子を probe とした Southern blot hybridization. 左端 6 例は、Hind III, Nae I で cut された (図 2) 約 700bp DNA を probe とし、残る 21 例は、図 2 の plasmid 全体を probe とした、各 hybrid は neo 遺伝子を有する。

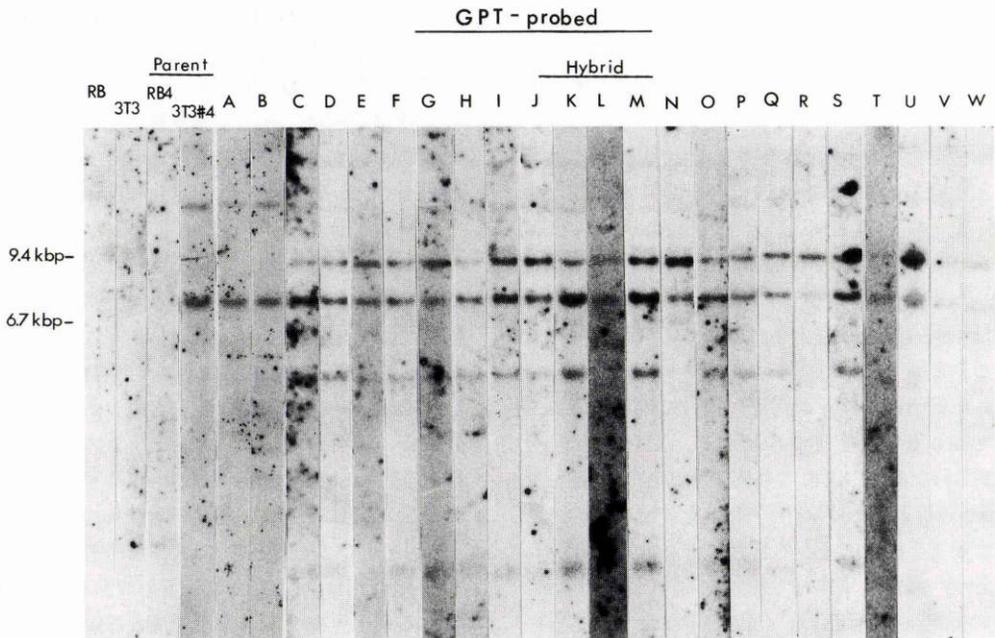


図10 <sup>32</sup>Pでラベルされた GPT 遺伝子を probe とした Southern blot hybridization. 左端 6 例は、Hind III, EcoRV で cut された (図 3) 約 450bp DNA を probe とし、残る 21 例は、図 3 の plasmid 全体を probe とした、各 hybrid は GPT 遺伝子を有する。

#### 4. マイコプラズマテスト

各 hybrid に、マイコプラズマの感染のないことを確認した (BRL Myco Tect™使用, Gibco 社製)。

### IV 考 按

本腫瘍が recessive cancer であろうと考えられるにいたったのは、染色体分析により RB 患者の 5%程に染色体13番 q14域を含む欠損が認められたこと<sup>4)</sup>、そしてマーカーDNA による患者および家族の検索により同部の欠損が考えられる例が多数確認されたことによる<sup>12)~15)</sup>。さらに近年相次いで報告された Friend ら<sup>21)</sup>、Lee ら<sup>22)</sup>の cDNA は、共に染色体13番 q14に存在し、しかも RB 以外のヒトの細胞には存在するが、RB 腫瘍細胞自体には前者では 4例中 4例、後者では 6例中 2例に mRNA 転写が全く認められず、後者の残る 4例では mRNA の大きさが異なり、全てに異常がみられた。これらの cDNA が RB 遺伝子そのものか否かは今後の検討を待たねばならぬが、これらは本腫瘍の recessive nature によく合致している。

さて、本実験は本腫瘍が recessive cancer であるか否か、上記の如き方法とは全く異なる生物学的方面から検討したものである。過去にこの方面からの報告がみられないのは、RB 発生頻度の低いこと<sup>1)</sup>、RB 細胞が脆弱であり細胞融合などの操作に耐えられなかったためかと推察する。本実験においては最終的に hybrid を得ることができたが、その率は  $8.3 \times 10^{-6}$  と低率であった。

細胞融合を行ない hybrid を得る場合、両細胞が融合したことを確認し、しかも hybrid を分離する方策が重要である。本実験ではこれに pSV2neo<sup>36)</sup>、pSV GPT<sup>37)38)</sup> という 2 種類 dominant マーカー遺伝子を用いた。ヒトやマウスの細胞は本来これら遺伝子を有さず、したがって neo 選択下あるいは GPT 選択下では生育できない。これに対し各々のマーカー遺伝子を与えられた細胞は、各々の選択に抗して生存しうる。こうして neo 遺伝子を有する RB4 と、GPT 遺伝子を有する 3T3#4 を得て、次にこの両者間に細胞融合を行ない、neo 遺伝子、GPT 遺伝子双方を有する細胞を二重選択培養下に得れば、その細胞こそが RB4、3T3#4 間の hybrid であり、他の細胞はこの選択下に死滅し、hybrid の分離も可能となる (図 1)。そして、さらに hybridization により、各 hybrid DNA 中に neo および GPT 遺伝子の双方が存在することを直接確認した (図 9, 10)。したがって各 hybrid は RB4 と 3T3#4 の細胞

融合体であると断定できる。

また、本実験では新しくできる hybrid がどのような性質の細胞か予測できず、RB 様細胞が出現しても観察系から失われよう特に注意し、poly-D-lysine、ファイブロンectin により表面処理した培養皿<sup>40)</sup>も用いた。しかしながら、hybrid には RB の如く処理培養皿にしか着生できないものは 1 つもなく、得られた 60 個の hybrid 全てが anchorage dependent な性質を示し、しかもその細胞形態はいずれも紡錘型で、end to end の流れるが如き細胞配列を呈し、NIH 3T3 に極めてよく一致していた (図 7, 8)。

この結果は、本腫瘍が recessive cancer であることを強く支持するものである。もし仮に本腫瘍が dominant cancer であると仮定すると、dominant である RB 遺伝子が hybrid の DNA 中にも存在することになり hybrid は「悪性」の表現型を示すものと考えられる。しかし、実際には hybrid は全例で例外なく「非悪性」である NIH 3T3 とよく類似した表現型を示した。ヒトとマウスという種の違いはあるが、本腫瘍で欠損している recessive な RB 遺伝子が、細胞融合によりマウス細胞より補われたものと考えられる。

Lee ら<sup>22)</sup>は、RB 遺伝子に極めて近い cDNA である RB-1、RB-5 を求め、その塩基配列も決定している。彼らはその中で、RB 遺伝子の如く、発達上重要な遺伝子は系統発生的に近い他の生物にも広く存在するものと考え、RB-5 を probe として、ヒト胎盤、子牛網膜、ネコ線維芽細胞、そして本実験に用いたのと同じマウス線維芽細胞 NIH 3T3、さらにニワトリ胎児線維芽細胞の Southern blot に対し hybridization を行ない、ヒトから遠ざかるにつれ band は薄くなるが、これら全てにこの遺伝子の存在が確認されたと報告している。この RB-5 が、RB 遺伝子そのものか否かは現段階では断定できないが、本実験において、本腫瘍に欠けていた RB 遺伝子が、細胞融合により NIH 3T3 細胞より補われたと考えることは、充分可能であると思われる。

また、本実験の如く、ヒトとマウスといった異なる種の間 interspecies hybrid では segregation という現象に留意せねばならない。これは、異なる種同士の hybrid では経過と共に、次第に一方の種の染色体が一部 hybrid から排出される現象である。染色体の排出される種は、種の組み合わせで決まる傾向があり、ヒトとマウスの場合には、ヒトの染色体が排出されるとの報告がある<sup>42)</sup>。本実験においては、細胞融合直後より頻回の観察を行なっているが、3 カ月まで hybrid の形態

には変化は認められておらず、全て NIH 3T3 に類似した形態および配列を示した。

RB が recessive cancer であると断定するには、さらに soft agar 中での hybrid の増殖の仕方を調べたり、ヌードマウスでの腫瘍形成能につき検討する必要がある、今後行なう予定である。

RB が recessive cancer であるならば、欠損している RB 遺伝子を求め、それを probe として胎児の早期診断が可能となり、遠い将来には、RB 遺伝子を補う遺伝子治療が実現する可能性がある<sup>43)</sup>。

本論文の要旨は、第91回日本眼科学会総会にて発表した。

#### 文 献

- 1) **Vogel F**: Genetics of retinoblastoma. *Hum Genet* 52: 1—54, 1979.
- 2) **Kundson AG**: Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 820—823, 1971.
- 3) **Comings DE**: A general theory of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 3324—3328, 1973.
- 4) **Knudson AG, Meadows AT, Nicholas WW, et al**: Chromosomal deletion and retinoblastoma. *New Engl J Med* 295: 1120—1123, 1976.
- 5) **Sparkes RS, Sparkes MC, Wilson MG, et al**: Regional assignment of genes for human esterase D and retinoblastoma to chromosome band 13q14. *Science* 208: 1042—1044, 1980.
- 6) **Strong LC, Riceardi VM, Fervell RE, et al**: Familial retinoblastoma and chromosome 13 deletion transmitted via an insertional translocation. *Science* 213: 1501—1503, 1981.
- 7) **Sparkes RS, Murphree AL, Lingua RW, et al**: Gene for hereditary retinoblastoma assigned to human chromosome 13 by linkage to esterase D. *Science* 219: 971—973, 1983.
- 8) **Botstein D, White RL, Skolnick M, et al**: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314—331, 1980.
- 9) **Dryja TP, Bruns GAP, Orkin SH, et al**: Isolation of DNA fragments from chromosome 13. *Retina* 3: 121—125, 1983.
- 10) **Cavenee W, Leach R, Mohandas T, et al**: Isolation and regional localization of DNA fragments revealing polymorphic loci from human chromosome 13. *Am J Hum Genet* 36: 10—24, 1984.
- 11) **Dryja TP, Rapaport JM, Weichselbaum R, et al**: Chromosome 13 restriction fragment length polymorphisms. *Hum Genet* 65: 320—324, 1984.
- 12) **Benedict WF, Murphree AL, Banerjee A, et al**: Patient with 13 chromosome deletion: Evidence that the retinoblastoma gene is a recessive cancer gene. *Science* 219: 973—975, 1983.
- 13) **Godbout R, Dryja TP, Squire J, et al**: Somatic inactivation of genes on chromosome 13 is a common event in retinoblastoma. *Nature* 304: 451—453, 1983.
- 14) **Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, et al**: Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305: 779—784, 1983.
- 15) **Murphree AL, Benedict WF**: Retinoblastoma: Clues to human oncogenesis. *Science* 223: 1028—1033, 1984.
- 16) **Cavenee WK, Murphree AL, Shull MM, et al**: Prediction of familial predisposition to retinoblastoma. *New Engl J Med* 314: 1201—1207, 1986.
- 17) **Hausen MF, Koufos A, Gallie BL, et al**: Osteosarcoma and retinoblastoma: A shared chromosomal mechanism revealing recessive predisposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6216—6220, 1985.
- 18) **Lee WH, Murphree AL, Benedict WF**: Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma. *Nature* 309: 458—460, 1984.
- 19) **Kohl NE, Gee CE, Alt FN**: Activated expression of the N-myc gene in human neuroblastomas and related tumors. *Science* 226: 1335—1336, 1984.
- 20) **Squire J, Goddard AD, Carton M, et al**: Tumour induction by the retinoblastoma mutation is independent of N-myc expression. *Nature* 322: 555—557, 1986.
- 21) **Friend SH, Bernard R, Rogely S, et al**: A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323: 643—646, 1986.
- 22) **Lee WH, Bookstein R, Hong F, et al**: Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning, identification, and sequence. *Science* 235: 1394—1399, 1987.
- 23) **Barski G, Sorieul S, Cornefert F**: “Hybrid” type cells in combined cultures of two different mammalian cell strains. *J Nat Cancer Inst* 26: 1269—1291, 1961.
- 24) **Okada Y**: Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich’s

- ascites tumor cells. *Exp Cell Res* 26: 98—107, 1962.
- 25) **Harris H, Watkins JF**: Hybrid cells derived from mouse and man: Artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. *Nature* 205: 640—646, 1965.
  - 26) **Pontecorvo G**: Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somatic Cell Genetics* 1: 397—400, 1975.
  - 27) **Barski G, Cornefert F**: Characteristics of "hybrid"-type clonal cell lines obtained from mixed culture in vitro. *J Nat Cancer Inst* 28: 801—821, 1962.
  - 28) **Scaletta LJ, Ephrussi B**: Hybridization of normal and neoplastic cells in vivo. *Nature* 205: 1169—1171, 1965.
  - 29) **Defendi V, Ephrussi B, Koprowski H, et al**: Properties of hybrids between polyoma-transformed and normal mouse cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 57: 299—305, 1967.
  - 30) **Harris H, Miller OJ, Klein G, et al**: Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 223: 363—368, 1969.
  - 31) **Bregula U, Klein G, Harris H**: The analysis of malignancy by cell fusion 2. Hybrids between Ehrlich cells and normal diploid cells. *J Cell Sci* 8: 673—680, 1971.
  - 32) **Wiener F, Klein G, Harris H**: The analysis of malignancy by cell fusion 3. Hybrids between diploid fibroblasts and other tumour cells. *J Cell Sci* 8: 681—692, 1971.
  - 33) **Wiener F, Klein G, Harris H**: The analysis of malignancy by cell fusion 5. Further evidence of the ability of normal diploid cells to suppress malignancy. *J Cell Sci* 15: 155—183, 1974.
  - 34) **Reid TW, Albert DM, Rabson AS, et al**: Characteristics of an established cell line of retinoblastoma. *J Nat Cancer Inst* 53: 347—360, 1974.
  - 35) **Todaro GJ, Green H**: Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17: 299—313, 1963.
  - 36) **Southern PJ, Berg P**: Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* 1: 327—341, 1982.
  - 37) **Mulligan RC, Berg P**: Expression of a bacterial gene in mammalian cells. *Science* 209: 1422—1427, 1980.
  - 38) **Mulligan RC, Berg P**: Selection for animal cells that express the *Escherichia coli* gene coding for xanthine guanine phosphoribosyl transferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2072—2076, 1981.
  - 39) **Graham FL, van der Eb AJ**: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456—467, 1973.
  - 40) **Kyritsis A, Tsokos M, Chader G**: Attachment culture of human retinoblastoma cells: Long-term culture conditions and effects of dibutyryl cyclic AMP. *Exp Eye Res* 38: 411—421, 1984.
  - 41) **Southern EM**: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by agarose gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503—515, 1975.
  - 42) **Weiss MC, Green H**: Human-mouse hybrid cell lines containing partial complements of human chromosomes and functioning human genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 58: 1104—1111, 1967.
  - 43) 戸塚清一: 網膜芽細胞腫と遺伝子. *眼科* 29: 1225—1232, 1987.

(第91回日眼総会原著)