Effect of DNA or RNA Virus Super-infection on the Production of Hepatitis B Virus Surface Antigen(HBsAg) and α-Fetoprotein(AFP) in Cloned Ce1ls of Human Hepatoma Cell Line

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/2297/7744

金沢大学十全医学会雑誌　第93巻　第4号　620－634　(1984)

ヒト肝癌由来 PLC/PRF/5 細胞クローンの腫瘍原性と他ウイルス重複感染効果

金沢大学がん研究所ウイルス部（主任：波田野基一教授）
吉　江　忠　正

(昭和59年8月11日受付)

HBV (hepatitis B virus) 感染の試験管内解析は，現在未だ不可能なので，HBV 持続感染ヒト由来継代培養細胞：PLC/PRF/5 を用いてその一端の追求を試みた．その方法として，本細胞の軟寒天内コロニー形成法によるクローニングで得た各クローン細胞株の HBsAg (hepatitis B surface antigen) と AFP (α-fetoprotein) 産生能を見，同時にヌードマウス腫瘍原性を比較した．ついでこれらの性状に及ぼす他ウイルス重感染効果と薬剤処理効果も検討した．得られた計 11 クローン細胞株の HBsAg と AFP 産生能の間には HBsAg 高産生クローン細胞株は AFP 産生も高いという相関が見出された．HBsAg 高及び低産生クローン細胞株の両者をヌードマウスに移植すると，高産生クローン細胞株の方がより高い造腫瘍性を示した．これら，高及び低産生の両クローン細胞株に HSV-2 (herpes simplex virus type 2) の細胞溶解性重感染をさせると，HBsAg および AFP の何れも産生抑制が認められた．同様の HCMV (human cytomegalovirus) 重感染と DXM (dexamethasone) 処理では，両者の産生増加傾向を示し，HVJw (hemagglutinating virus of Japan, wild strain) 重感染では AFP のみの産生低下をみた．しかしながら，HVJts (temperature sensitive mutant) による持続重感染化細胞では，両者の変化はなかった．これらより，重感染する DNA 型及び RNA 型ウイルス種類の差及び細胞溶解性か持続性かの感染形態によっても HBV ゲノム表現として HBsAg および肝細胞ゲノム表現としての AFP 産生への異なる影響が明らかにされた．

Key words　human hepatoma cell line, clone, hepatitis B surface antigen (HBsAg), α-fetoprotein (AFP), virus super-infection.

肝炎を惹起させ得るウイルスには，黄熱，エンテロ，ヘルペス，風疹など肝以外の組織にもウイルス感染を起こさせ得る[1]ものと，肝自身を主要侵襲組織とするA型肝炎ウイルス (hepatitis A Virus, HAV)，B型肝炎ウイルス (hepatitis B Virus, HBV)，および非A非B肝炎ウイルス (non-A non-B hepatitis Virus, NANBHV) が知られている．これらのうち，HAV を除く HBV 及び NANBHV 感染は，肝癌を惹き起こす確率が高いとされている．特に HBV 感染は，急性肝炎，慢性肝炎，肝硬変そして肝癌，特に肝細胞癌へと移行し易い[2]．また，HBV の抗原が血清中に見いだされる無症候性キャリヤーの存在も周知の通りである．この無症候性キャリヤーの数は，日本では，人口の約2％以上と推定されており[3]，無症候性キャリヤーによる HBV の家族内感染，母子垂直感染が問題となっている．

HBV の感染実験は，*in vivo* ではチンパンジーなどの高等霊長類の一部でしかできず，in vitro の細胞培養での HBV の感染実験は不可能とされてきた[4]．しかし，1976年，南アフリカの Alexander らにより，HBs 抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg)，α-フェトプロテイン (α-fetoprotein, AFP) 陽性肝細

Abbreviations: AFP, α-fetoprotein, araA, adenine-arabinoside, CPE, cytopathic effect, DXM, dexamethasone, EDTA, ethylenediaminetetraacetate, FITC, fluorescein isothiocyanate, HAD, hemadsorption, HAV, hepatitis A virus, HBsAg, hepatitis B surface

胞癌患者解剖材料から，HBsAg 産生肝癌細胞株[5)6)]が樹立された．それが，PLC/PRF/5 細胞(PLC)で，HBV 感染の実態検索を *in vitro* である程度可能にした．その後，引き続き HBsAg 産生を示すヒト肝癌細胞培養株がいくつか樹立化され，現在huH-1,-4,[7)], Hep3B[8)], Mahlavu[9)], HCC-M[10)]などがあり，これらの細胞株を用いた実験により，HBsAg 産生についていくつかの知見が得られている．

一方，AFP は，本来胎児期に肝，卵黄嚢細胞から主として産生され，消化器からもわずかに産生[11)]されている蛋白で，生後間もなく消失するが内胚葉性組織の癌化に伴い再び産生されて来ることが多い．特に原発性肝細胞癌[12)]，卵黄嚢癌[13)]で上昇が著しく，胃癌[14)]でも AFP の産生を認めるものが報告されているがあまり多くはない．そのことより，AFP 産生の上昇は，非特異的ながら，肝細胞癌，卵黄嚢癌の腫瘍マーカーとなり得るとされている．

Alexander ら[15)]の報告によると，PLC 細胞は AFP 産生をしていないとされていたが，近年その産生の報告[16~18)]がみられるようになった．さらに，PLC 細胞のクローニング化細胞株においては，HBsAg 産生量と形態が各々に若干異なり[19)20)]薬剤感受性においても差[9)]を示すことが見いだされている．

そこで今回，HBV 持続感染細胞 PLC/PRF/5 細胞のクローニングを行ない，得られた細胞の性状を HBsAg と AFP 産生能より比較した．これらのうち，特に HBsAg 高産生クローンと低産生クローンについてヌードマウスへの腫瘍原性を比較検討した．さらに，DNA 型ウイルス：単純ヘルペス 2 型ウイルス (herpes simplex virus tvpe 2, HSV-2)，ヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus, HCMV) と RNA 型の HVJ (Sendai virus) 各ウイルスの細胞溶解性感染，さらに HVJ の持続感染(何れもウイルス重複感染に該当) による影響を HBsAg および AFP 各産生能の指標から検討した．

材料と方法

1．使用細胞と培養条件

クローン化とウイルス重複感染に用いた細胞は PLC 細胞で，10%仔牛血清加 Eagle の MEM (minimum essential medium) で培養された．HVJ 感染価の測定に用いた LLC-MK_2 (rhesus monkey kidney 由来) 細胞は，5%仔牛血清加の MEM で培養された．PLC 細胞と LLC-MK_2細胞の継代，およびウイルス細胞溶解性感染実験は 37°Cで行なった．HVJ 持続感染細胞は 34°Cで継代し，細胞の継代は，0.02%EDTA (ethylenediamine tetraacetate) と 0.25%トリプシン (Difco, U. S. A.) を用いて行った．

2．ウイルス

DNA 型ウイルスの HSV-2：196 株は FL 細胞（ヒト羊膜由来)で増殖させ，全細胞が細胞変性効果(cytopathic effect, CPE) を示した時，培養液を遠心してその上清をウイルス原液として－80°Cに保存した．HCMV：Towne 株はヒト胎児肺由来初代繊維芽細胞で増殖させ，凍結融解後，遠心上清を－80°Cに保存した．RNA 型ウイルスとしてHVJ：名古屋 1－60 株を用いた．HVJ 野性株 (HVJ wild strain, HVJw) は発育鶏卵を用い，37°Cで増殖させ，持続感染細胞樹立化に用いた HVJ は，温度感受性変異株 G_2H (ts)[21)]で，発育鶏卵に 32°Cで増殖させて何れも－80°Cに保存した．

3．PLC 細胞のクローニング

クローニングは軟寒天内コロニー形式法[22)]に準じて行なった．60 mm のシャーレに 0.5%寒天 (Difco, U. S. A.) を含む増殖培地 4 ml を加え，固化後，支持層とし，その上に 0.4%寒天を含む培地 3 ml に 2～10×10^2前後の PLC 細胞を混合して重層した．3～4 週間，37°C，5%炭酸ガス恒温器で培養した．形成されたコロニーをパスツールピペットにより採取して 35 mm シャーレに移し，10%牛胎児血清加 Eagle の MEM で培養を続けた．シャーレの 40～50%まで細胞が増殖した時に，0.02%EDTA と 0.25%トリプシン処理により，細胞をはがし，通常の継代培養を行なった．

得られた各クローン細胞株における HBsAg および AFP の産生を比較するために培養ビン（1 オンス）に 5×10^5個の細胞（1×10^5/ml）の細胞濃度）をまき，3 日目に培養液を交換した．その時の上清と 6 日目の上清を－20°Cに保存し，後日 HBsAg および AFP 量を測定した．細胞増殖能の比較は培養 6 日目後細胞数算定により行なった．

4．クローン細胞株のヌードマウスでの造腫瘍性

ヌードマウスは BALB/C, nu/nu を用いた．各クローン細胞株の造腫瘍性を比較検討する目的で 1 匹あたり 5 ×10^6個の細胞を皮下に接種して 9 週間観察した．腫瘍を形成したマウス 4 匹からは 6 週目に採血し，血清を分離して HBsAg および AFP 量を測定するま

---

antigen, HBV, hepatitis B virus, HCMV, human cytomegalovirus, H&E, hematoxylin-eosin, HSV-2, herpes simplex virus type 2, HVJ, hemagglutinating virus of Japan (Sendai virus), HVJts, HVJ temperature sensitive mutant, HVJw, HVJ wild strain, IFA,

で−20°Cに保存した．対照として同じ週齢のマウスの血清も−20°Cに同時に保存した．また血清を採取したマウスの腫瘍はホルマリン固定して，ヘマトキシリン・エオジン染色 (hematoxylin-eosin staining, H & E)，またはアルデヒド・フクシン染色[23] (aldehyde-fuchsin staining) で病理標本を作成した．

5．ウイルス重感染

1）細胞溶解性感染

未クローニングのPLC細胞，またはクローン細胞株を1オンスボトルに8〜10×10^5個 (1.6〜2.0×10^5 cells/ml) まき，24時間後にHSV-2またはHVJwをmultiplicity of infection (m. o. i.)=1.0すなわち1.0 plague-forming unit (p. f. u.) 細胞で感染させた．HCMVはm. o. i=10で感染させた．何れも1時間吸着後，Hank's液またはMEMで細胞を洗滌し，培養液を加え培養した．HCMV感染実験には，10^{-6}Mのデキサメサゾン (dexamethasone, DXM) を含む培養液を加えた．これら各ウイルス重感染後，継時的に培養上清を採取し，−20°Cに保存した．

2）HVJ持続感染細胞の樹立化

クローン細胞株にHVJtsをm. o. i=0.1または1.0で重感染させ，37°Cで1時間吸着後，Hank's液で洗滌して，培養液を加え34°Cで培養した．感染後，2〜3日目よりCPEが出現し，大部分の細胞は脱落した．しかし，約1ヶ月間，週1回培養液を交換しながら培養を続け，その残存した細胞の継代により，増殖可能な細胞を得た．この細胞のHVJ持続感染樹立化の確認は，モルモット赤血球吸着現象 (hemadsorption, HAD) と螢光抗体染色法 (immunofluorescent antibody staining, IFA) 陽性，およびLLC-MK_2細胞を用いてのHVJプラック法[24)25)]で確認し得る培養液中への感染性HVJ出現に依った．

持続感染樹立の確認後，HBsAgおよびAFP産生量に変化があるかどうかをみるために，1オンス培養ビンに5×10^5個(1.0×10^5cells/ml)の細胞をまき，継時的に上清を採取し−20°Cに保存すると共に，増殖した細胞数を算定した．

6．HBsAg, AFPの測定

1）HBsAgの測定

HBsAg産生量は，ラジオイムノアッセイ(radioimmunoassay, RIA) と逆受身赤血球凝集法 (reverse passive hemagglutination, RPHA) を用いて測定した．RIAにはAUSRIA(ダイナポット社，東京)キットを，RPHAには市販（富士臓器，東京）キットを使用した．

2）AFPの測定

AFP産生量は，RIA法で同じく市販（栄研化学社，東京）キットを使用して測定した．

7．螢光抗体染色法（IFA）

1）HBsAgの検索

HBsAgの検索は螢光抗体間接法で行なった．一次抗体は抗HBsAgモルモット血清(ミドリ十字，大阪)を用い，二次抗体には，螢光色素(fluorescein isothiocyanate, FITC)でラベルされた抗モルモットIgGヤギ血清を使用した．

HBsAgの検索は，カバースリップ上で培養したPLC細胞をアセトンで10分間固定後，一次抗体を37°C30分反応させた．ついでP. B. S. (phosphate buffered saline) で3回洗滌後，さらに二次抗体を37°C30分で反応させ，洗滌後オリンパス螢光顕微鏡で観察した．

2）HVJ抗原の染色

HVJ特異抗原はHVJwで免疫した家兎から得た抗血清にFITCをラベル[21)]し，螢光抗体直接法にて観察した．

3）AFPの染色

抗AFP血清は市販(協和発酵，東京)を用いて，螢光抗体直接法でAFPの染色を行なった．

成　　績

I．PLC細胞のクローニング

クローニング前のPLC細胞を抗HBsAg血清と抗AFP血清を用いてIFA法で染色すると(図1a，b)，細胞質に螢光陽性物質が見出された．一方，HBsAgおよびAFPの産生は，PLC細胞培養上清中に何れもRIA法で検出され，持続感染化HBVゲノムの表現と肝由来細胞の確認ができた．

1．クローン細胞株の形態

軟寒天内コロニー形成法により，PLC細胞のクローニングで，最終的に11個のクローン細胞株を分離し得た．これら，11クローン細胞株の形態学的差はほとんど認められず，ほぼ均一な細胞からなるものと，不ぞろいの細胞からなるものとに区別できたが，それ程明確な差とはいえなかった．

2．クローン細胞株の増殖性

11クローン細胞株における細胞増殖，HBsAgおよ

---

immunofluorescent antibody, IFN, interferon, MEM, minimum essential medium, NANBHV, non-A non-B hepatitis virus, PLC, PLC/PRF/5, RIA, radioimmunoassay, RPHA, reverse passive hemagglutination.

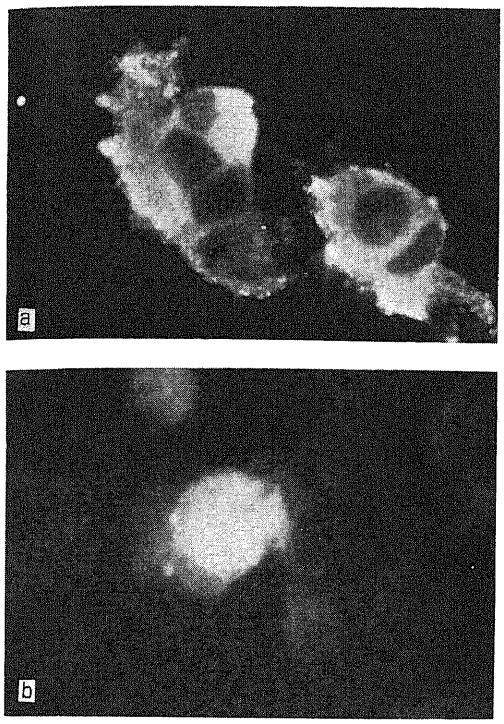

Fig. 1. Morphology of uncloned PLC cells. a) Staining by anti-HBsAg-IFA* (×500), b) Staining by anti-AFP-IFA** (×500)
*anti-HBsAg-IFA, anti-hepatitis B virus suface antigen-immunofluorescent antibody; **anti-AFP, anti-α-fetoprotein-immunofluorescent antibody.

びAFPの産生に違いがあるかをみるために，それぞれのクローン細胞株を実験方法で述べたごとく，37°Cで培養した．細胞増殖は6日後の細胞数で，HBsAgおよびAFP産生量は3日目，6日目の培養上清でそれぞれ測定した（表1）．

細胞増殖をみると，細胞増殖がもとのuncloned親細胞（6日目，1.35×10^6個）に比べ良好のクローン細胞株はH4, H5およびM6であった．高値を示したクローン細胞株(H4)に比べて，細胞増殖能の低いクローン細胞株(L8)では，両者の間に1.65倍の差があった．その他のクローン細胞株の培養6日目の細胞数は$1.2\sim1.4\times10^6$個の範囲であった．

3．クローン細胞株のHBsAg産生能

各クローン細胞株3日培養上清中のHBsAg産生能は，H3, H4およびH9クローン細胞株で親株に比し，有意と思われる高値が見出された．逆に低産生細胞株はL7, L8およびL10であった．これら，3日目に高値を示したクローン細胞株は，6日目も高く，同様に低産生クローン細胞株の6日目も低値であった．

そこで増殖後の細胞数の差によるHBsAg産生量に違いがあるかもしれないので，最も細胞数が少ないL8を基準として仮の比を算定した．L8の細胞数（6日目）をA(1.06×10^6)，他のクローン細胞株の細胞数（6日目）をBとし，B/Aで細胞数比を算出した．次いで，L8（6日目）のHBsAg量：9（c.p.m$\times10^{-3}$）をCとし，他のクローン細胞株のHBsAg量（6日目）をDとすると，D/CはHBsAg産生量の比となる．そこで(D/C÷B/A)を求めると，細胞数比も考慮に入れたL8のHBsAg産生能を1.00とした時の比率が得られた．

上記の式で計算した比率で比べてみても，HBsAg産生の高いクローン細胞株，H3, H4およびH9は高値を示した．同様に，低い産生クローン細胞株，L1, L2, L7,L10は低値を示した．他のM6, M11もかかる比率でみると低産生クローンであった（表1）．

4．クローン細胞株のAFP産生能

AFPの産生に関しては，3日後の培養液中に高いAFP産生がみられたクローン細胞株は，H3, M6およびH9であった．また低いクローン細胞株は，L2, L7およびL10であった．さらに，6日目で高値を示したのは，H3, H4, H5, M6およびH9であり，低値を示したクローン細胞株は，L1, L2, L7, L10およびM11であった．そこでやはり，細胞数当りに算定比較した．その結果，H3, H4, H5, M6およびH9が高値を示し，L1, L2, L7, L8, L10およびM11が低値に属していた（表1）．

5．HBsAgとAFP産生能の相関

各クローン細胞株におけるHBsAgとAFPの産生量は相関があるようにみえたので，表1に示されているHBsAgとAFPのそれぞれの比をプロットした（図2）．その結果，一般にHBsAg高産生クローン細胞株はAFP値も高いという傾向を示し，未クローン化親細胞は，HBsAgおよびAFP産生量ともに，ほぼ中間に位置した．親細胞株よりHBsAgおよびAFPとも高産生クローン細胞株は4個（H3, H4, H5, H9），低いそれは6個（L1, L2, L7, L8, L10, M11）であった．

そこで，以下の実験には，高クローン細胞株としてH4とH9，低いクローン細胞株としてL1とL10を用いた．

II．クローン細胞の腫瘍原性

HBsAgおよびAFPの産生能とヌードマウスでの腫瘍原性との間に，相関性があるかを次に検討した．すなわち高産生クローン細胞株（H4およびH9）と低産生クローン細胞株（L1およびL10）それぞれ細胞5×10^6個をマウス皮下に移植した．接種後，3週後半

Table 1. Cell growth, HBsAg (hepatitis B virus surface antigen) and AFP (α-fetoprotein) production of cloned PLC/PRF/5 cells

cloned No.	culture days	number of cells (10^4)	HBsAg		AFP	
			RIA[a]	ratio[b]	ng/ml	ng/10^4 cells
L 1	3	–	12	–	399	–
	6	148	10	0.79		6.61
L 2	3	–	12	–	276	–
	6	137	21	1.81		5.80
L 7	3	–	7	–	159	–
	6	129	10	0.92		3.73
L 8	3	–	6	–	257	–
	6	106	9	1.00		5.60
L 10	3	–	7	–	159	–
	6	131	8	0.72		2.50
M 6	3	–	23	–	1216	–
	6	160	29	2.13		17.06
M 11	3	–	13	–	328	–
	6	127	14	1.30		5.61
H 3	3	–	67	–	1918	–
	6	145	80	6.49		20.19
H 4	3	–	57	–	785	–
	6	175	86	5.84		13.33
H 5	3	–	20	–	455	–
	6	169	60	4.14		14.89
H 9	3	–	34	–	1289	–
	6	144	59	4.82		19.86
uncloned	3	–	13	–	863	–
	6	135	28	2.45	1707	12.68

Medium change was done on the third day. HBsAg and AFP in the culture medium were assayed on the third and sixth day after the inoculation of 5×10^5 cells/bottle.
RIA[a], ^{125}I (c.p.m.$\times10^{-3}$) ; ratio[b], tentative ratios expressed by a formula :

$$\frac{\text{HBsAg of other cloned cells (6d)}}{\text{HBsAg of L8 (6d)}} \div \frac{\text{number of other cloned cells (6d)}}{\text{number of L8 (6d)}}$$

より5週の間に腫瘍が出現し始め，8～9週まで経過をみた．

腫瘍形成はHBsAgおよびAFPの高いクローン細胞株接種マウスでは，9匹中4匹(44.4%)，低い産生クローン細胞株接種で11匹中3匹(27.2%)であった．全体では20匹中7匹に腫瘍形成をみ，その形成率は35.0%であった(表2)．これより，一般にHBsAg高産生クローン細胞は低産生クローン細胞に比べ，ヌードマウスでの腫瘍形成率は若干高いことが示唆された．しかしながら，出現した腫瘍の大きさには，高産生クローン細胞株と低産生クローン細胞株には差は認められず，腫瘍の大きさは，5週目で平均3×4 mmであった．

腫瘍を形成したマウスより血清を採取し，HBsAgとAFPの測定を行なった．HBsAgの測定には，少量の血清しか得られなかったために，RPHA法のみしか行なえなかった．測定したマウスにはH4およびL1クローン細胞株を移植し，腫瘍が出現したマウス2匹ずつを用い，未接種マウス2匹を対照とした．その結果は，表3に示したように腫瘍が形成されたマウスの全ての血清中に，かなり高い値のAFPが検出され，細胞未接種対照マウス血清中には，AFPは検出できなかった．HBsAgは，H4クローン細胞株接種後，腫瘍を形成した1匹のマウス血清中のみに検出できた．

形成された腫瘍を病理学的に検索したところ（図3 a，b)，腫瘍細胞はヒト肝細胞癌に極めて類似した形態を示していた．またHBsAgを有する肝細胞を濃い紫に染色するアルデヒド・フクシン法でみると，細胞質が染色される細胞が少数認められ，HBsAgの存在が確認された(図3，c)．

Ⅲ．HBsAgおよびAFP産生に及ぼすHSV-2, HCMVまたはHVJ重感染の影響

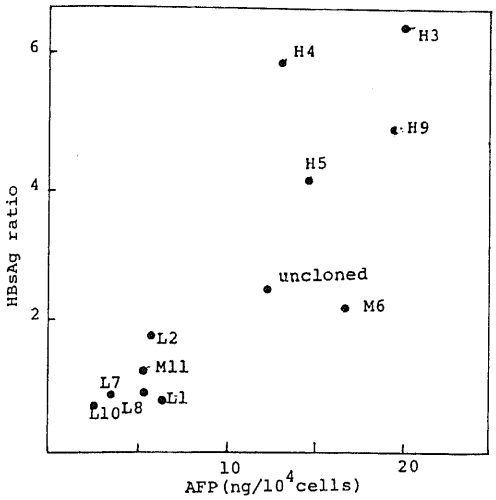

Fig. 2. Relationship between HBsAg ratio* and AFP production in cloned PLC cells, No. L1-M11**.

*The same ratio as shown in Table 1. **Cloned cells, No. L1-M11 are the same cloned as shown in Table 1.

Table 2. Tumorigenicity of cloned PLC cells by a transplantation of 5×10^6 cells/mouse

cloned cells	no. of mice transplanted	no. of tumor take at 5 weeks	tumor incidence (%)
H 4	5 (9)	2 (4)	4/9 (44.4)
H 9	4	2	
L 1	6 (11)	2 (3)	3/11 (27.2)
L 10	5	1	

Table 3. Values of HBsAg and AFP in nude mice's sera with tumor occurrence at 6 weeks after PLC cells transplantation

	no. of mice	HBsAg (RPHA)**	AFP (ng/ml)
H 4*	1	−	2887.7
	2	+	22672.2
L 1*	1	−	27407.4
	2	−	7496.1
control (non-transplanted)	1	−	0.5
	2	−	0.4

* 5×10^6 cells/mouse transplantated,
** reverse passive hemagglutination.

1. HSV-2 重感染の影響

HSV-2をm・o・i=1.0で,未クローン化親細胞株 PLC 細胞に感染させた. 感染後 8, 24, 48, 72 時間後の培養上清中の HBsAg および AFP の産生量を測定した. ウイルス感染による CPE は 8 時間後に最初に認められ, 48 時間後には全面 CPE となった.

HBsAg および AFP の培養液中への産生量は, ほとんどの細胞に CPE の認められない 8 時間ですでに未感染細胞に比べて, 軽度の低下を認めた. しかし, CPE

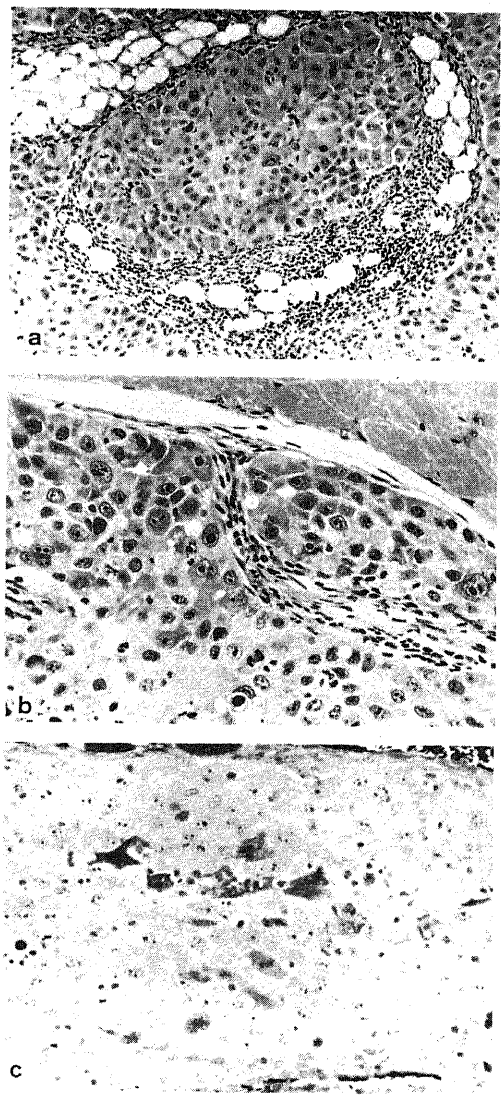

Fig. 3. Pathological examination of PLC-tumor formed in nude mice. a) Staining by hematoxylin-eosin (H&E, ×200), b) Staining by H&E (×400), c) Staining by aldehyde-fuchsin (×400).

の著明になる感染後24時間以降は両者とも抑制された（図4）．これはCPEによる細胞崩壊によるものと考えられた．

そこで，同様の実験を，クローン細胞株，H9およびL10を用いて行なった．すなわちHSV-2をm・o・i＝1.0で感染させ，HBsAgおよびAFPの産生量を経時的に測定した．図4の実験で感染後8時間(CPE軽度出現)ですでにHBsAgおよびAFP産生ともに抑制されていたので，感染後8時間までを2時間間隔で測定した．図5に示すように，感染後4～8時間から軽度に，HBsAgおよびAFP産生ともに抑制され始めた．さらに重感染が進むと図には示してないが12～24時間後には両者とも対照の約½～¼に著明に低下していた．しかもCPE出現前までをみると，HBsAgおよびAFPともにH9クローン細胞株の方が抑制傾向が強く，L10クローン細胞株では軽度であった．

2．HCMV重感染の影響

HCMV重感染はH9クローン細胞株のみを用いて行なった．HCMVは *in vitro* では上皮性細胞での増殖はないとされているが，当教室のTanakaら[26]により，HCMVを高m. o. i.でPLC細胞に感染させDXMで処理すると，HCMVは確かに増殖することが明らかにされている．そこでHCMVをm. o. i.＝10で感染させ，1時間後にDXM 10^{-6}M含有培養液で処理し，感染後12，24，48，72および96時間後の培養上清のHBsAgおよびAFP産生量を測定した．

CPEは初期 (early) CPEを24時間より認めたが，ごく少数で，感染後96時間でも1％以下であった．

かかる状態でHBsAg産生はHCMV未感染DXM未処理の対照細胞よりも，感染後48時間頃より一般にその産生能を軽度に増強し始め，感染後96時間後でもその傾向がひき続きみられた(図6)．これに比べAFP産生は感染後72時間まで差はなく，96時間ではHCMV未感染，DXM未処理対照細胞は横ばいにな

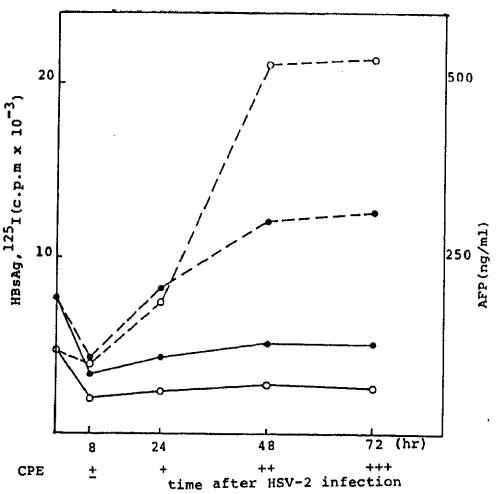

Fig. 4. Production of HBsAg and AFP in uncloned PLC cells super-infected with HSV-2 (herpes simplex virus type 2).
●, HBsAg; ○, AFP; ···, uninfected cells; —, HSV-2 infected cells.

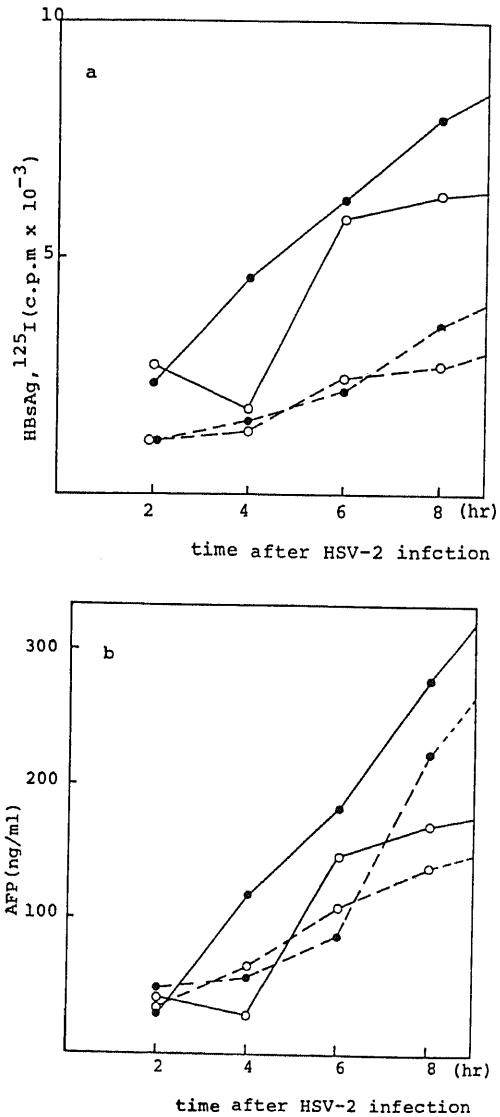

Fig. 5. Effect of super-infection with HSV-2 in cloned PLC cells (H9 and L10) on the production of HBsAg (a) and AFP (b). ●—●, uninfected H9: ●···●, uninfected L10, ○—○, HSV-2 infected H9; ○···○, HSV-2 infected L10.

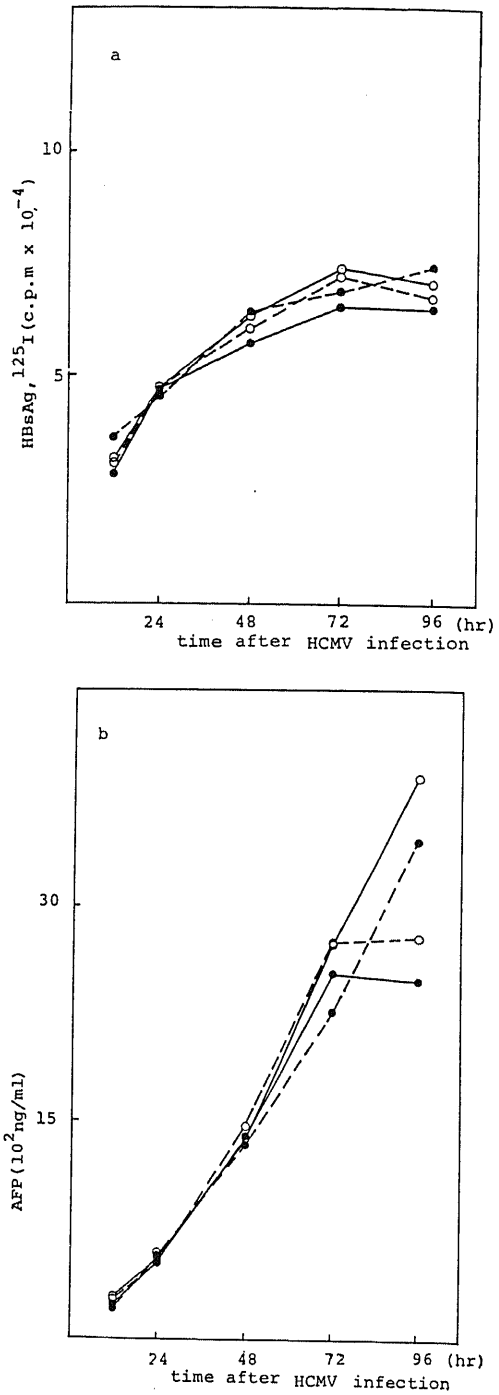

Fig. 6. Production of HBsAg (a) and AFP (b) in cloned PLC cells (H9) super-infected with HCMV (human cytomegalovirus) in the presence of DXM (dexamethasone). ●—●, control; ○—○, with DXM (10^{-6}M); ●···●, HCMV infection in the presence of DXM (10^{-6}M); ○···○, HCMV infection.

り，HCMV 感染細胞も同様であった．DXM 処理細胞と DXM 処理・HCMV 感染細胞は，前記対照細胞より明らかに高く AFP を産生し続けていた（図 6）．

HCMV 感染および DXM 処理の両者，またはどちらか一方の感染，処理で HBsAg および AFP の抑制はなくむしろ一般にすべて増強気味であった．

3．HVJw 重感染の影響

HSV-2 重感染と同様に，まず親細胞株を用いて，HVJw を m・o・i＝1.0 で感染させ，感染後 4，12，24 および 48 時間後の培養上清で HBsAg および AFP 量を測定した．CPE は感染後 24 時間に最初にみられ，48 時間後には，ほぼ細胞全面が CPE となる細胞溶解性感染像を呈した．

HBsAg の産生は，CPE 陰性の24時間までは，HVJw 感染の影響はほとんど認められなかった．CPE 陽性 48 時間後には，感染細胞に軽度の HBsAg 産生の抑制がみられた．AFP も同様に感染後 24 時間までは未感染対照とほぼ同量の産生が認められたが，48 時間以後の産生は，著明に抑制された（図 7）．

次に，H9 クローン細胞株と L1 クローン細胞株を用いて 96 時間まで，HBsAg および AFP 産生に及ぼす，HVJw 重感染効果を測定した．H9 クローン細胞株では HBsAg は CPE 陽性の 48 時間までは，感染細胞・未感染細胞ともほぼ同量であるが，CPE のさらに進んだ，72 および 96 時間後では，感染細胞の方がむしろ高くなっていた．L1 クローン細胞株では 72 時間後までは，HBsAg 産生量は感染細胞・未感染細胞とも同じであったが，96 時間後では同量かやや増量していた（図 8 a）．一方，AFP 産生は，H9 クローン細胞株では

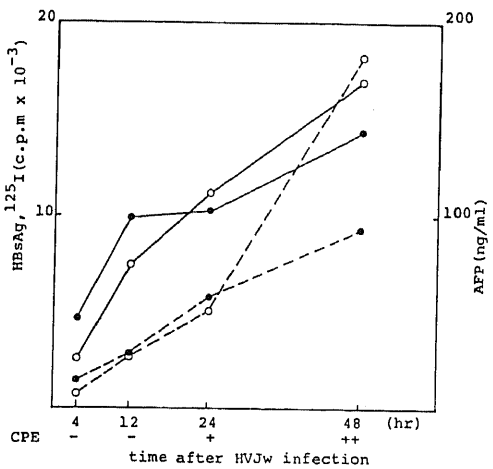

Fig. 7. Production of HBsAg and AFP in uncloned PLC cells super-infected with HVJw (HVJ wild strain). —, HBsAg; ···, AFP; ○, uninfected PLC cells; ●, HVJw infected cells.

CPEが全面に拡がるのとほぼ一致して，48時間以後急激な抑制がみられた．L1クローン細胞株でも72時間後よりやはり産生抑制がみられた（図8 b）．

これらの結果より，HVJw重感染はHBsAgの産生にはあまり影響を与えず，むしろ軽度の増強を示すのに，AFP産生量に対しては強い抑制効果が生じた（図8 b）．

4．HVJtsの持続感染化の影響

この感染実験に用いたクローン細胞株はH4, H9クローン細胞株とL1, L10クローン細胞株であった．m・o・i＝0.1～1で感染後2～3日目よりCPEが出現し，10～20日後にはCPEは全体に拡がった．培養液は週1回交換し続けると，もはやCPEの認められない増殖細胞が得られた．その後，かくの如くして得られたHVJts持続感染細胞は，5～6日に1回の割で継代した．

感染後，10代（約90～100日後）の細胞を用い，細胞増殖，HBsAgおよびAFP産生を未感染細胞のそれと比べた．用いたHVJts感染細胞は，HAD陽性細胞80%以上（図9 a）抗HVJ-IFAでやはり80%以上（図9 b）の細胞にHVJtsゲノムの発現を確認している．さらにLLC-MK_2細胞上でのプラック法により，培養液中に産生されるHVJtsの感染価を測定すると，10^2～10^3p. f. u./mlの感染性ウイルスが認められ，HVJts持続感染樹立化が証明できた．

これら持続感染細胞と未感染細胞の形態学的差はほとんどみられなかった．このように，HVJts持続感染

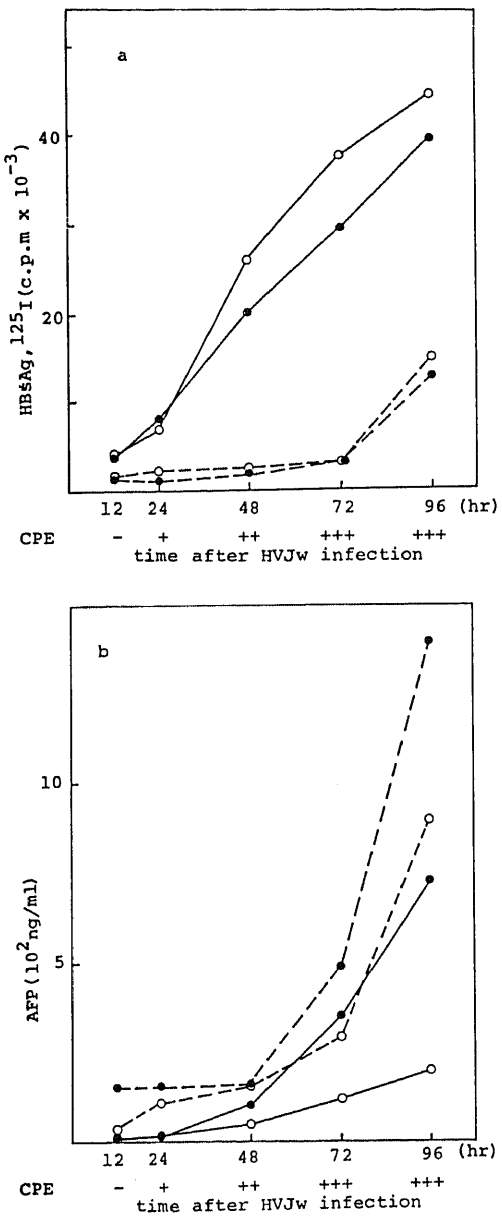

Fig. 8. Effect of HVJw super-infection in cloned cells (H9 and L1) on the production of HBsAg (a) and AFP (b). ●—●, uninfected H9; ○—○, HVJw infected H9; ●···●, uninfected L1; ○···○, HVJw infected L1.

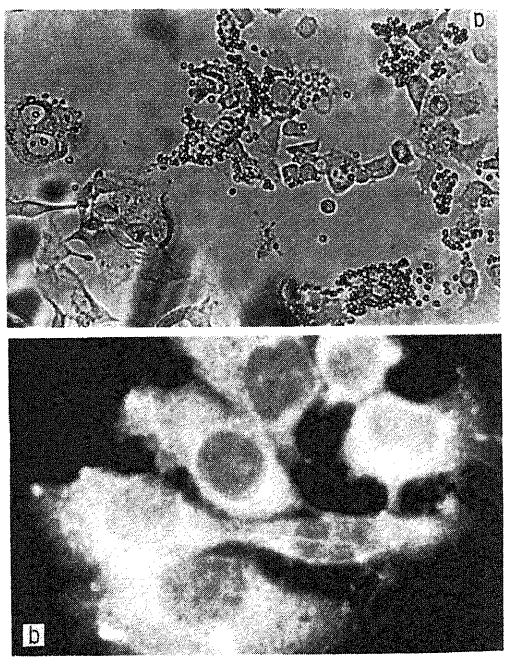

Fig. 9. Hemadsorption (HAD) pattern and immunofluorescent antibody (IFA) of cloned PLC cells (H9) persistently infected with HVJts (HVJ temperature-sensitive mutant). a) HAD (×200), b)IFA (×500).

が樹立化されたクローン細胞を，ボトルあたり5×10⁵個（10×10⁴cells/ml）に植込み，その後1，3，5および7日目に細胞数を数え，さらに培養上清中のHBsAgおよびAFPの産生量を測定した．

その結果，H4, L1両クローン細胞株で，細胞増殖はHVJts感染細胞と未感染細胞ではほとんど差はなかった（表4 a，b）．

HBsAg産生量はH4クローン細胞株では，7日目にHVJts持続感染細胞でやや低くなったが，一方，L1クローン細胞株では逆に持続感染細胞でやや高かっ

Table 4. Cell growth, HBsAg and AFP production of uninfected or HVJts persistently infected cloned cells

a) H4 clone

culture days	H4			H4 HVJts		
	number of cells ($\times 10^4$*)	HBsAg (RIA)**	AFP (ng/ml)	number of cells ($\times 10^4$*)	HBsAg (RIA)**	AFP (ng/ml)
1	43	4.4	33.9	39	4.9	10.0
3	48	3.4	39.0	53	6.2	94.3
5	134	10.0	273.2	124	10.0	432,7
7	235	28.3	1443.3	227	25.5	1198.2

b) L1 clone

culture days	L1			L1 HVJts		
	number of cells ($\times 10^4$*)	HBsAg (RIA)**	AFP (ng/ml)	number of cells ($\times 10^4$*)	HBsAg (RIA)**	AFP (ng/ml)
1	44	1.8	155.5	46	1.8	35.5
3	52	1.4	148.9	48	2.4	153.8
5	116	3.0	485.3	98	3.3	293.6
7	162	12.5	858.0	141	14.6	895.9

* Seeded with 5×10^5 cells/bottle, ** ^{125}I (c.p.m. $\times 10^{-3}$).

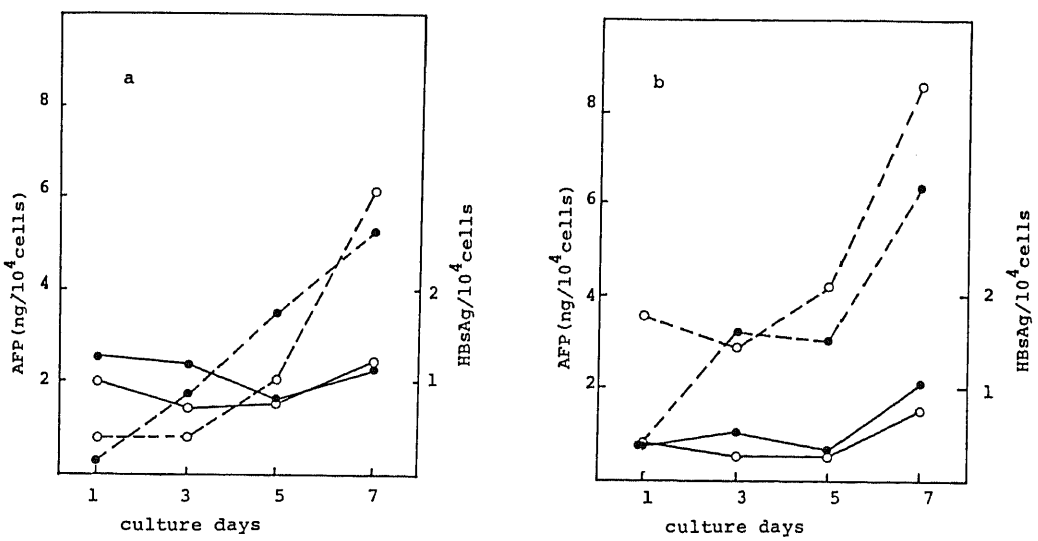

Fig. 10. Effect of HVJts persistent infection on the production of HBsAg and AFP in cloned H4 (a) and L1 (b) cells. HBsAg: ●—●, HVJts infected cells; ○—○, uninfected cells; AFP; ●···●, HVJts infected cells; ○···○, uninfected cells.

た.

AFP産生量は，H4, L1両クローン細胞株とも7日目の未感染細胞に比べ，H4クローン細胞株で約20%，L1クローン細胞株で約35%の産生低下があった．しかし，H4クローン細胞株は5日目までは未感染細胞に比べ高値を示していた．L1クローン細胞株は3日目を除いて全て低値であった．(表4 a，b)

そこでHBsAgおよびAFPの産生量を細胞数による差で修正してみた（図10)．H4およびL1両クローン細胞株では，HBsAgの産生はHVJts感染細胞，未感染細胞ともにほぼ一致した横ばいを示した．AFPの産生はH4クローン細胞では7日目を除いて持続感染細胞がやや高く，L1クローン細胞株では，有意の差はみられなかった．さらに一般にAFPは日が経つに連れ増強する傾向を示した．

考　　察

現在世界各国で多数知られているHBV感染無症候者へ他のウイルスが重感染した場合，持続潜伏感染しているHBVがいかに変化したかをみた例はほとんど知られていない．ただ，HAVが急性に重感染した例では，HAV感染症候の急性期にHBsAgが血清中で低下したとも，変化はなかったとも報告されている[27)28)]．

一般に生体レベルでのかかる他ウイルス重感染例の追求は困難な場合が多い．そこでin vitroでのかかる重複感染による変化をみる目的で，まずヒト肝癌由来継代培養細胞：PLC細胞のクローニングを行なった．このPLC細胞は個々の細胞により性状が異なることが，すでにSaundersら[29)]により報告されている．Saundersら[29)]のクローニングでは全ての細胞クローンは，HBsAgを産生しており，クローン細胞株間に著明な差はないとしている．しかしながら，今回のクローン細胞株のHBsAg産生量を測定した結果，WEN[19)]や中込[20)]も報告しているように，HBsAgは全てのクローン細胞株で産生され，クローン細胞株ごとにその産生能が異なっていた．ただ，形態学的には際立った差を何ら認めなかった[15)20)]．本実験に使用したPLC細胞DNAには，HBVゲノムは少なくとも6個(完全型4個，不完全型2個）は組み込まれているとされている[30~32)]各クローン細胞株間でHBsAg産生能に差が認められたのは，この様な組み込まれたHBV-DNAの数が各クローン間で異なることによるのか，或いは組み込まれたHBV-DNAの作動している数が異なることによるのかは不明であるが，両者の可能性があるであろう．

AFPは前述したように，PLC細胞では近年になって産生が確認されるようになった[17)18)33)]．今回，我々のクローン細胞でも，抗AFP-IFA法で確認しRIAでも検出できた．これらクローン細胞株によりその産生量は明らかに異なっていた．一方，ヒト肝癌患者の血清中のHBsAg量とAFP量は必ずしも相関性がないと報告されている[34)]．そこで，我々のクローン化PLC細胞各株でこの問題を追求してみた．その結果，細胞増殖のよいクローン細胞株はHBsAg産生量も高く，AFP産生量もそれにつれて高い傾向があり，逆もほぼ成り立つことからみると，細胞増殖の良さ悪さと関係しているのではないだろうか．しかも，細胞増殖能を加味した我々の算定比率で比較しても，両者とも高いクローン細胞株と，両者とも低いクローン細胞株という相関性をもった2つに分類できた．

ヒト生体レベルでのAFPの上昇は，肝炎または肝硬変から肝癌，特に肝細胞癌へ移行した時に著明に認められることが知られており，腫瘍原性と関係があるとされている[34)]．そこでHBsAgおよびAFP産生の高いクローン細胞株と低いクローン細胞株をヌードマウスに移植し，腫瘍原性を比較検討してみた．高いクローン細胞株を移殖したマウスは9匹中4匹(44.4%)に腫瘍が3～5週で出現し，低いクローン細胞株は11匹中3匹(26.2%)に同様に出現した．PLC細胞をヌードマウスに移植した報告はいくつかあり，生着率が80～90%であった[35~37)]とも，20～30%の生着率であった[33)38)]とも報告されている．生着率が異なるのは，継代数が増すことによる腫瘍原性の低下，移植する細胞数の違い，ヌードマウスの系によるのか，または使用ヌードマウスの週齢の違いなどによって異なってくるものと思われる．今回の移植ではHBsAgおよびAFP産生能の高いクローン細胞株の方が生着率が若干高いようであったが，移植ヌードマウスの数をさらに増して検討しなければならないであろう．

Bassendiane[33)]，Shouvalら[35)]は，PLC細胞の移植後，腫瘍が出現したヌードマウスの全ての血清よりHBsAgが検出できたと報告している．今回の我々の場合は，腫瘍形成した4匹の血清中，1検体だけが陽性であった．検出にはRPHA法しか行なわなかったため，その感度が鈍いための検出もれであるかもしれない．しかし，AFPは4匹すべてから検出され，対照の未接種マウスからはAFPは検出されなかった．マウスAFPと市販されている抗ヒトAFPとでは交叉することがない[34)]ので，ヒトが検出できたことは，移植PLCクローン細胞より産生されたものと言えるであろう．

一方，病理標本を見ると，形成腫瘍は典型的なヒト肝癌像を呈していた．Bassendineら[33)]は腺癌と診断できるとしているが，今回のを見る限り，肝細胞癌のよ

うであった．アルデヒド・フクシン染色で，細胞の一部に細胞質が濃紫に染色されるところがあり，HBsAgが確認された．

PLC細胞をいろいろな薬剤処理により，HBsAg産生量に変化があることが多く報告されている．特にステロイドホルモンによるHBsAgの産生増加[9)39)]はよく知られており，また，アデニンアラビノシド[39)40)] (adenine arabinoside, araA) シクロヘキシミド[15)] (cycloheximide)，インターフェロン[40)] (interferon, IFN)処理でHBsAg産生は抑制されている．我々はこれら薬剤処理の代わりにDNA型ウイルス，HSV-2, HCMVとRNA型ウイルス，HVJの重感染によるHBsAgとAFP産生能への影響をみた．前者では核への，後者では細胞質への影響としてそこに予想される代謝機能のウイルス重感染による変化が，HBVゲノムまたは肝癌ゲノム発現へどう影響するかをみたかったわけである．

HVJの細胞溶解性感染では，HVJによるCPEが拡がってもHBsAgの産生量は変化しないか，または，やや増量していた．これに反し，HSV-2感染は，HSVによるCPEが出現する前，すなわち細胞の形態変化の見られる前にすでにHBsAg産生がある程度抑制されていた．HCMV重感染にDXMを併用したのは，前述した理由によるためで，HCMV感染およびDXM処理細胞では未感染細胞よりもいずれもHBsAg産生量は増量気味であった．HVJ細胞溶解性感染がHBsAgの合成系に影響を与えずに細胞死に至り，HSV-2の場合は細胞核内のDNA合成に依存して，HBsAg合成の阻害を示したためであろう．araAとステロイドホルモンの併用によりHBsAg産生[39)]が増強されるのはHCMVとDXM併用に似ている．HCMVは感染により細胞のDNA合成を高め[41)]，araAはpolymeraseを阻害する[39)40)]がHBsAg産生に対しては阻害しないために，両者併用ではHBsAg産生が増強されるのであろう．HSV-2とステロイドホルモンの併用効果はその点あまり期待できないであろう．HSV感染は細胞のDNA合成をすべて抑制するとされているため[42)]HSV感染とaraAの併用はより抑制的HBsAg産生結果が期待できるかもしれない．

HSV-2およびHVJ細胞溶解性感染ではAFP産生が抑制され，HCMV細胞溶解性感染およびDXM処理ではそれが増強されていた．

HCMV感染およびDXM処理によるAFP産生増強およびHSV-2感染による産生抑制も，やはりHBsAg産生への影響と同様の機能によると考えられる．

HVJ感染によるAFP産生抑制は細胞のCPE出現とほぼ一致していることから，この現象は細胞依存性であろう．一般にAFPは内胚葉性の癌化[12)13)]により産生されるが，本来は胎児期のみに作られる蛋白である．それが癌化に伴い細胞のDNAに組み込まれているゲノムが胎児化し，発現されると思われる．AFP産生腫瘍に，*in vivo, in vitro*で抗AFP抗体を作用させると腫瘍発育の抑制があり[43)44)]，AFP産生とその抑制は腫瘍細胞増殖にも依存していると言えよう．ただ今回の実験で，AFP抑制がクローン細胞株により異なっていたのは，HVJに対する各クローン細胞株の感受性の違いによると考えられる．しかし，何れも多少の差はあれ一般にAFP産生は抑制されたのはHVJによるCPEと関連深いと言えよう．

HVJ持続感染成立後のHBsAgおよびAFP産生にはあまり変化がなかった．そうであれば，*in vivo*でのHBV無症候性キャリヤーに他のウイルスが慢性重感染していてもあまり影響がないように思われる．

結　　論

HBV持続感染ヒト肝癌由来継代培養細胞PLC/PRF/5細胞をクローン化し，各クローン細胞株の性状，腫瘍原性，他のウイルス（HSV-2, HCMVおよびHVJ重感染および薬剤（DXM）処理による影響をHBsAgおよびAFP産生の面より検討して，以下の成績を得た．

1．PLC細胞の軟寒天内コロニー形成法によるクローニングを行ない，11クローン細胞株を得た．これらクローン細胞株すべてはHBsAgおよびAFP産生能をもっていた．しかし，クローン細胞株間には，これらの産生能にかなりの差が認められ，一般に高いHBsAg産生株はAFP産生能も高い相関が見出された．

2．クローニングした細胞株のうちHBsAg高産生クローン細胞株と低いクローン細胞株をヌードマウスに移植した．HBsAg高産生クローン細胞株の方がより高い腫瘍原性を示す傾向があった．

3．クローン細胞株へのHSV-2の重感染では，CPEの出現する2～3時間前よりHBsAgおよびAFP両者の産生抑制が見られ，CPEが拡がるに連れ，それらの産生抑制はさらに著明となった．

4．同様のクローン細胞株へのHCMV重感染，またはDXM処理では，HBsAg産生能の軽度の増強を認めた．一方，AFP産生も未感染，未処理対照に比し，有意の上昇化傾向を示した．

5．HVJwの重感染したクローン細胞株では，HBsAg産生は未感染細胞とほぼ等しかったが，AFP産生はCPEの拡がりと共に抑制された．

6．クローン化PLC細胞にHVJts重感染を行ない，HVJts持続感染PLC細胞を樹立した．その細胞のHBsAgおよびAFPの産生をみると，両者とも著明な変動を認めず，HVJtsゲノムの内在化はHBVゲノム発現に影響ないものと判断された．

以上よりHBV保有クローン化PLC細胞は，重感染するDNA型又はRNA型ウイルスの違いにより，HBsAgおよびAFP産生能への影響にも差が生ずることが明らかになった．

謝　辞

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜わった波田野基一教授ならびに，終始直接御指導をいただいた田中淳之助教授に対し深甚の謝意を表します．また，病理標本作製にあたり御指導と御援助を賜わりました金沢医科大学第二病理の山道昇先生，ならびに御助言いただいたガン研ウイルス部の諸先生方に感謝します．

文　献

1) **Tauitz, E. T., Melnick, J. L. & Adelberg, E. A.**: General properties of viruses, p324-356. *In* Review of Medical Microbiology, 15th ed. Maruzen Asian Edition, Tokyo, 1982.

2) **日本肝癌研究会**：原発性肝癌症例に関する追跡調査－第4報－．肝臓，**20**, 433-441 (1979).

3) **松下　寛**：地域におけるHBウイルス感染の実態に関する疫学的研究．厚生省特定疾患難治性の肝炎調査研究．49年度報告，107-125 (1974).

4) **Brumpt, L., Mann, G. F. & Zuckerman, A. J.**: Biological activity of hepatitis B antigens in cell culture. J. Med. Virol., **3**, 157-164 (1978).

5) **Alexander, J. J., Bey, E., Geddes, E. W. & Lecatsas, G.**: Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. S. Afr. Med. J., **50**, 2124-2128 (1976).

6) **Macnab, G. M., Alexander, J. J., Lecatsas, G., Bey, E. M. & Urbanowicz, J. M.**: Hepatitis B surface antigen produced by a human hepatoma cell line. Brit. J. Cancer, **34**, 509-515 (1976).

7) **Huh, N. & Utakoji, T.**: Production of HBs-antigen by two new human hepatoma cell lines and its enhancement by dexamethasone. Gann, **72**, 178-179 (1981).

8) **Aden, D. P., Fogel, A. Plotkin, S., Damjanov, I. & Knowles, B. B.**: Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. Nature, **282**, 616-617 (1979).

9) **Oefinger, P. E., Bronson, D. L. & Dreesman, G. R.**: Induction of hepatitis B surface antigen in human hepatoma-derived cell lines. J. Gen. Virol., **53**, 105-113 (1981).

10) **Watanabe, T., Nakamura, T., Kumagai, N., Inagaki, Y., Tsuchimoto, K., Morizone, T. & Tsuchiya, M.**: Induction of HBsAg from human hepatoma cell line. Proc. Japan. Cancer Assoc., **40**, 180 (1981).

11) **Gitlin, D., Perricelli, A. & Gitlin, G. M.**: Synthesis of α-fetoprotein by liver, yolk Sac, and gastronintestinal tract of the human conceptus. Cacer Res., **32**, 979-982 (1972).

12) **Abelev, G. I., Assecritova, I. V., Kraevsky, N. A., Perova, S. D. & Perevodchikova, N. I.**: Embryonal serum α-globulin in cancer patients: Diagnostic value. Int. J. cancer, **2**, 551-558 (1967).

13) **Talerman, A. & Haije, W. G.**: Alpha-fetoprotein and germ cell tumors: A possible role of yolk sac tumor in production of alpha-fetoprotein. Cancer, 1722-1726 (1974).

14) **Mclntire, K. R., Waldmann, T. A., Moertel, C. G. & Go, V. L. W.**: Serum α-fetoprotein in patients with neoplasms of the gastronintestinal tract. Cancer Res., **35**, 991-996 (1975).

15) **Alexander, J., Macnab, G., & Saunders, R.**: Studies on in vitro production of hepatitis B surface antigen by a human hepatoma cell line. Perspect. Virol., **10**, 103-120 (1978).

16) **Copeland, J. A., Skelly, J., Mann, G. F., Howard, C. R. & Zuckerman, A. J.**: Hepatitis B surface antigen production as a growth cycle-related terminal event in PLC/PRF/5 hepatoma cells. J. Med. Virol., **5**, 257-264 (1980).

17) **Gerber, M. A., Garfinkel, E., Hirschman, S. Z., Thung, S. N. & Panagiotatos, T.**: Immune and enzyme histochemical studies of a human hepatocellular carcinoma cell line producing hepatitis B surface antigen. J. Immunol., **126**, 1085-1089 (1981).

18) **Monjardino, J. P., Fowler, M. J. F. & Thomas, H. C.**: Defective hepatitis B virus DNA molecules detected in a stable integration pattern in a hepatoma cell line, and in induced tumours and derived cell lines. J. Gen. virol., **64**, 2299-2303 (1983).

19) **Wen, Y. M., Copeland, J. A., Mann, G. F., Howard, C. R. & Zuckerman, J. A.**: Detection of HBsAg in a clone derived from the PLC/PRF/5

human hepatoma cell line. Arch. Virol., **68**, 157-163 (1981).

20) **中込　治・須藤恒久・石田名香雄**：PLC/PRF/5 細胞（Alexander 細胞）からの HBsAg 高産生クローン細胞株の分離，第 49 回日本ウイルス学会総会演説抄録．1035 (1981).

21) **小倉　壽**：Paramyxovirus：HVJ (Sendai virus) 持続感染による移植性培養細胞膜抗原の変換－温度感受性変異 HVJ による解析，十全医会誌，**87**, 122-134 (1979).

22) **黒木登志夫・後藤正義**：組織培養（中井準之助・他編），99-107 頁，朝倉書店，東京，1976.

23) **福島範子**：病理技術マニュアル 3，病理組織標本作製技術（下）－染色法－（日本病理学会編），175-179 頁，医歯薬出版.，東京，1981.

24) **Sugita, K., Maru. M. & Sato. K.**: A sensitive plaque assay for Sendai virus in an established line of monkey kidney cells. Japan. J. Microbiol., **18**, 262-264 (1974).

25) **佐藤祐一**：HVJ (Sendai virus) 持続感染細胞におけるウイルス変異．十全医会誌，**91**, 153-164 (1982).

26) **Tanaka, J., Ogura, T., Kamiya, S., Yoshie, T., Yabuki, T. & Hatano, M.**: Dexamethasone enhances human cytomegalovirus replication in human epithelial cell cultures. Virology (in press).

27) **佐田通夫・Beniger, P. R., 瀬戸山浩・向坂彰太郎・久永　盈・安部弘彦・谷川久一**：HAV と HBV の重感染についての検討．肝臓，**22**, 1654-1661 (1981).

28) **日野邦彦・菊家恒二・宮川　浩・岡崎睦也・岩崎政明・高橋　淳**：HBV キャリヤーに重複感染した A 型肝炎の一症例，肝臓，**23**, 420-425 (1982).

29) **Saunders, R. M. & Alexander, J. J.**: Electron micoscopy of HBsAg from human hepatoma cells. Lancet, **2** (ii), 714 (1977).

30) **Chankraborty, P. R., Ruiz-Opazo, N., Shouval, D. & Shafritz, D. A.**: Identification of integrated hepatitis B virus DNA and expression of viral RNA in an HBsAg-producing human hepatocellular carcinoma cell line. Nature, **286**, 531-533 (1980).

31) **Brechot, C. Pourcel, C., Louise, A., Rain, B. & Tiollais, P.**: Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequnces in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. Nature, **286**, 533-535 (1980).

32) **Edman, J. C., Gray, P., Valenzuela, P., Rall, L. B. & Rutter, W. B.**: Integration of hepatitis B virus sequences and their expression in a human hepatoma cell. Nature, **286**, 535-538 (1980).

33) **Bassendine, M. F., Arrborgh, B. A. M., Shipton, U., Monjardino, J., Arangibel, F., Thomas, H. C. & Sherlock, S.**: Hepatitis B surface antigen and alpha-fetoprotein secreting human primary liver cell cancer in athymic mice. Gastroentero., **79**, 528-532 (1980).

34) **石井　勝**：ウイルス肝炎から肝細胞癌へ（服部信編），237-248 頁，癌と化学療法社，東京，1982.

35) **Shouval, D., Reid, L. M., Chakraborty, P., Ruiz-Opazo, N., Morecki, R., Gerber, M. A., Thung, S. N. & Shafritz, D. A.**: Tumorigenicity in nude mice of a human hepatoma cell line containing hepatitis B virus DNA. Cancer Res., **41**, 1342-1350 (1981).

36) **Shouval, D., Shafritz, D. A., Zurawski, V. R. Jr., Isselbacher, K. J. & Wands, J. R,**: Immunotherapy in nude mice of human hepatoma using monoclonal antibodies against hepatitis B virus. Nature, **298**, 567-569 (1982).

37) **Desmyter, J., Groote, G. De., Bradburne, A. F., Desmet, V., Somer, P. De. & Alexander, J.**: Tumorigenicity and interferon properties of the PLC/PRF/5 human hepatoma cell line. Prog. Med. Virol., **27**, 103-108 (1981).

38) **中込　治・石田名香雄**：PLC/PRF/5 株-HBs 抗原産生細胞株．組織培養，**6**, 244-250 (1980).

39) **Clementi, M., Bagnarelli, P. & Pauri, P.**: Effect of steroids and adenine-arabinoside (araA) on growth and HBsAg production of human hepatoma cell line. Arch. Virol., **75**, 137-141 (1983).

40) **Lemon, S. M. & Bancroft, W. H.**: Lack of specific effect of adenine arabinoside, human interferon, and ribavirin on in vitro production of hepatitis B surface antigen. J. Infect. Dis., **140**, 103-117 (1978).

41) **Furukawa, T., Tanaka, S. & Plotkin, S. A.**: Stimulation of macromolecular synthesis in guinea pig cell by human CMV. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **148**, 211-214 (1975).

42) **Ben-Port, T. & Kaplan, A. S.**: Replication-biochemical aspects, p163-220. *In* A. S. Kaplan (ed.), The herpesviruses. Academic Press Inc., New York, 1973.

43) **Tsukada, Y., Mikuni, M., Watabe, H., Nishi, S. & Hirai, H.**: Effect of anti-alpha-fetoprotein

serum on some cultured tumor cells. Int. J. Cancer, **13**, 187-195 (1974).

44) Mizejewski, G. J. & Grinley, P. M.: Abortogenic activity of antiserum to alpha-fetoprotein. Nature, **259**, 222-224 (1976).

Effect of DNA or RNA Virus Super-infection on the Production of Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg) and α-Fetoprotein (AFP) in Cloned Cells of Human Hepatoma Cell Line: PLC/PRF/5 Persistently Infected with Hepatitis B Virus (HBV)

Tadamasa Yoshie, Department of Virology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920 – J. Juzen Med. Soc. **93**, 620–634 (1984)

Key Words: hepatitis B virus surface antigen, α-fetoprotein, human hepatoma cell line, Clone, virus super-infection

Abstract

In order to analyze various characteristics of HBV infection still unknown in vitro study, some experimental trials were made using human hepatoma cell line: PLC/PFR/5 persistently infected with HBV. The cells cloned by their colony forming ability by the soft agar method were tested in their tumorigenicity in nude mice, BALB/c, nu/nu. Their activity of HBsAg or AFP production in the culture was determined by radioimmunoassay.

Subsequently, the effects of DNA or RNA virus super-infection in the clones and treatment with drugs were examined on their HBsAg or AFP production activity. In eleven cloned cells obtained here, the clones having a highly producing activity of HBsAg generally indicated a high activity for AFP production, showing a close relationship between both activities of the clones. Transplantation into nude mice with the HBsAg highly producing clone showed a relatively higher tumorigenicity than that of the lowly producing clone. Cytolytical-super-infection for the highly or lowly producing clones with herpes simplex virus type 2 caused an inhibitory effect on both HBsAg and AFP productions. However, a treatment with dexamethasone following the superinfection of these clones with human cytomegalovirus revealed an enhancing effect on them. Similar super-infection with HVJw (hemagglutinating virus of Japan, wild strain) resulted in reduction of AFP production alone, but persistent infection with HVJys (temperature sensitive mutants) showed no significant effects on the production of both HBsAg and AFP. Therefore, the obtained results show that the effects of various types of infection (cytolytical or persistent) such as by DNA or RNA virus on HBsAg prodution can clearly be distinguished from each other in an expression of HBV genome or ATP production as one of hepatic cell genomes.