2,3のヒト組織由来継代培養細胞へのEBウィルスゲノムの移行:上咽頭癌のEBウィルス病因論についての実験的研究

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/2297/4600

金沢大学十全医学会雑誌　第84巻　第2・3号　190—210　(1975)

2，3のヒト組織由来継代培養細胞へのEB ウィルスゲノムの移行

上咽頭癌のEB ウィルス病因論についての実験的研究

金沢大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科学講座（主任：梅田　良三教授）
金沢大学がん研究所ウィルス部（主任：波多野基一教授）
古川　伃

（昭和49年12月28日受付）

上咽頭癌は，台湾から華南，さらに東南アジア地域にかけて特に中国人に多発し，同じ東洋民族でも本邦には少なく，欧米人にはまれな疾患である[1)~3)]．しかし臨床的には，その特殊な解剖学的位置関係から，多岐にわたる症状を呈し，診断，治療面に多くの問題をなげかけている．ところで今日，上咽頭癌 (Nasopharyngeal carcinoma : NPC) 研究の場に，1964年，Epstein, Barr がアフリカの Burkitt リンパ腫[4)] (BL) 由来の樹立化細胞[5)]に見出したヘルペス型ウィルス[6)] (Epstein-Barr Virus : EBV) の登場を見るに至った．それは，Old ら[7)]が，EBV 保有細胞から分画した可溶性抗原と，BL 及び NPC 患者血清との間で，特異的沈降反応を証明したことに由っている．時を同じくして，Henle ら[8)]も，EBV 保有細胞を標的抗原 (viral capsid antigen : VCA と考えられる[9)]) とした蛍光抗体間接法で，BL 患者血清中にその特異的抗体の存在を証明している．さらに Klein ら[10)11)]は，蛍光抗体法で細胞膜抗原 (viral envelope antigen と考えられる[12)13)]) と反応する抗体を BL や NPC 患者血清中に証明し，日本でも伊藤ら[14)]，川村ら[15)]は，NPC 患者血清中の抗 EBV 抗体価が高率に上昇することを報告している．これらの知見の集積から，EBV は NPC の仮設的病因ウィルスとして急速にクローズアップされるに至った．また，Henle ら[16)]は，伝染性単核球症においてヘルペス型ウィルスの感染，発症，これにつづく抗 EBV 抗体の動態が一致することを報告し，EBV の生物学的活性と病態に関して多くの問題点を投げかけるに至った．

ところで，BL は，病理学的にリンパ腫を示し，その組織培養細胞もリンパ芽球系細胞[17)]で，又 EBV の検出は，このような細胞に限られていることなどから，BL における EBV の病因的可能性は強く，腫瘍免疫学的証明[18)19)]もかなり進んでいる．しかし，NPC 由来組織の培養で樹立化され，EBV の検出されたのはすべて浮遊系の，lymphoreticular 細胞[17)]で，実際の癌細胞である上皮性細胞の樹立化，および in vivo 腫瘍における癌細胞からの EBV 検出は，すべて不成功に終っている[20)21)]．ところが，最近，zur Hausen ら[22)23)]，Nonoyama ら[24)]などの分子生物学的 hybridization 法や，Klein ら[25)] による EBV-associated nuclear antigen (EBNA) を検出する蛍光抗体補体法などの発展により，上咽頭癌細胞自体に EBV ゲノムの存在が見出されるに至り，NPC と EBV の密接な関係が一層強く示唆されてきた．そこで著者は，NPC における EBV の病因的意義をさらに明らかにするため，in vitro で EBV ゲノムの上咽頭細胞への移行機序を，いくつかのヒト組織由来継代培養細胞と比較しながら以下の実験を行った．

実験材料と方法

Ⅰ．使用細胞

1．上咽頭由来正常上皮性細胞（2-27-Ad）

初代培養用の組織として，当科でアデノトミーを施行した5才男子の摘出アデノイド組織を用い，上咽頭

Transfer of EBV(Epstein-Barr Virus)-genome from Lymphoblastoid Cells to Established Epithelial Cells Derived from Human Tissues : Experimental Studies on the Viral Etiology of Nasopharyngeal Carcinoma(NPC) Related to EBV Infection. **Mitsuru Furukawa,** Department of Otorhinolaryngology (Director : Prof. R. Umeda), School of Medicine, Kanazawa University, Department of Virology (Director : Prof. M. Hatano), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

由来の正常上皮性細胞の樹立化を計った．Hanks 液中で，ハサミで充分に細切し，数回の洗浄遠心操作後，ガーゼと金網メッシュを通過してきた細切組織片を集め，培養液：20%仔牛胎児血清加 RPMI-1640（RF-20）で37°Cに静置培養した．その後の樹立化過程は後述する．

2．ヒト末梢静脈血由来リンパ芽球系細胞株（F_1L, F_2L）

今日，ヒト造血系細胞由来の多くの培養株は，前述のように EBV と密接な関係がある．すなわち，BL 又は白血病患者リンパ球[26)27)]や，腫瘍そのものであったり，リンパ球を標的とした EBV による試験管内発癌（in vitro transformation[28)~31)]）をしたものが大多数である．かかる細胞の感染性 EBV 産生頻度は，陰性か，甚だ少ないが[32)33)]，EBV の内蔵は否定できない．そこで，EBV 特異的抗原陰性のリンパ系細胞樹立のため，phytohemagglutinin (PHA) 刺激によるリンパ球の培養を試みた．まず，ヘパリン加末梢静脈血 10ml より，辻[34)]の，Conray 400-Ficol 法に従い，リンパ球を分離した．一度，燐酸塩緩衝化食塩水（PBS，pH 7.2）で洗浄した後，RF-20 に，1×10^6 cells/ml の細胞濃度で浮遊し，PHA-M (Difco) 100μg/ml 存在下，37°Cで培養し，F_1L, F_2L 株が樹立された（詳細は後述）．この，使用リンパ球の性状を，PHA 刺激前後の ^{3}H-Thymidine の取り入み率[35)]から比較検討した．

3．EBV 産生細胞株

EBV 産生細胞株として既知の，BL 由来樹立化浮遊細胞株 P_3HR-1[36)]，EB_3[37)] は 5×10^5 cells/ml の細胞濃度で培養された．継代は3～4日毎に行なわれ，培養液はそれぞれ RF-20，10%仔牛胎児血清加 Eagle's MEM (EF-10)を用いた．

4．単層培養系細胞株

その他，使用単層培養系細胞は，次のごとく，ヒト，サル，ハムスター組織由来の継代培養細胞である．

ヒト正常組織由来：HeL（胎児肺)[38)]，Hek（胎児腎)[39)]，Intestine-407（胎児小腸)[40)]，Chang's Liver（肝臓)[41)]，Detroit-98[42)]（胸骨骨髄）

ヒト癌組織由来：Hep-2（喉頭癌)[43)]，KB（口腔底癌)[44)]，Hela（子宮癌)[45)]，G2（骨髄巨細胞腫)[46)]

サル正常組織由来：VERO（ミドリザル腎臓)[47)]

ハムスター正常組織由来：THEL（胎児肺)[48)] これらは，いずれも仔牛血清2～20%加 Eagle's MEM (EC-2～EC-20) を用い，通常のトリプシニゼィション法[49)]により，継代培養された．

Ⅱ．EB ウィルスの抽出とその接種法

EBV 産生株：P_3HR-1 又は EB_3 細胞より，細胞抽出液を VCA 産生の高い時期につくり，EB ウィルス液とした．すなわち，Eagle's MEM で 2×10^7 cells/ml に再浮遊し，−90°Cで凍結融解3回後，3,000rpm，20分，4°Cで遠心した．その上清の millipore filter (0.45μ) 濾過液を EBV 原液とした．EBV の接種には，単層培養細胞では，$1\sim1.5\times10^5$ cells/ml で培養2～3日後，3回 Hanks 液で洗った細胞シートに EBV 原液0.5mlを接種した．浮遊培養細胞では，5×10^5 cells/ml の細胞濃度に EBV 液で再浮遊し直して EBV 感染を行った．35°C，2時間 EBV 吸着後，単層培養細胞では EBV 液をすててから，1度 Hanks 液で細胞を洗った後，培養液（EC-2）に換えて培養した．浮遊培養系では，1,200rpm，10分遠心で EBV 吸着細胞を沈澱させ，同量の新鮮RF-20培養液に再浮遊し，培養された．

Ⅲ．EBV 特異的抗原検出の蛍光抗体法

蛍光抗体法はいずれも間接法で行われた．

1．使用血清

蛍光抗体法における第一次血清として，過去3年間，当料で診療を受けた NPC 患者血清18例，上咽頭に初発病巣のみられた細網肉腫患者(NPS) 6例の初回採血血清と，健康正常人血清10例，計34血清を56°C，30分間非働化して用いた．

2．蛍光抗体間接法（Henle 法[8)]の川村変法[15)]）

EBV 産生細胞株（P_3HR-1，又は EB_3）を標的細胞とする被検血清の VCA 抗体価測定，EBV 接種細胞での VCA 検出に蛍光抗体間接法が用いられた．蛍光抗体液は，抗ヒトγ-グロブリンの蛍光色素ラベル血清（Hyland Lab. USA.）を，使用前，Sephadex-G-50，DEAE セルロースクロマトグラフィーで再精製したものを使用した．VCA 染色には，アセトン固定標本を用いた．

3．蛍光抗体補体法（Anti-Complement immunofluorescence：ACIF）

被検細胞の EBV ゲノム証明として，EBV-associated nuclear antigen (EBNA) を検出する Klein らの蛍光抗体補体法（ACIF test)[25)]を用いた．EBNA(%) は，VCA(%) と同様に，被検細胞500以上に対する蛍光染色陽性細胞数の割合（%）で求めた．

Ⅳ．Ouchterlony 法による寒天ゲル内沈降反応

使用 NPC，及び NPS 患者血清中，VCA 又は EBNA 検出において，特異な態度を示したものについて，その抗原検索のため，ヒストンおよび，プロタ

ミンとの Ouchterlony 法[50]を行った．寒天ガラス板は既述の方法[50]により作られた．抗原として使用したヒストンは渡辺[51]が Johns の方法[52]に従って抽出した仔牛胸腺ヒストン，F_1，F_2(B)，F_3，F_2(A) 分画の凍結乾操したものを適宜希釈して用いた．また同じくプロタミンは，サケ精巣抽出プロタミン硫酸塩液（清水武田製）を用いた．

V．HVJ (Sendai virus 又は，Hemagglutinating Virus of Japan) の不活化

EBV 接種又は産生細胞と各種継代培養細胞の混合培養を行い，EBV ゲノムの継代培養細胞への移行をみる際，その移行頻度をあげるため，不活化 HVJ による細胞融合を行った．実施にあたっては，Harris ら[53]，Miggiano ら[54]の方法を参考にした．HVJ（名古屋-1-60株）の発育鶏卵増殖ウィルスは23,000rpm 60分の超遠心で半精製濃縮し，Dulbecco's PBS (DBS)[49] で希釈したもの (20,480HAU/ml) を直径4.5 cmのシャーレに1.5ml入れ，手でよく振盪しながら，21 erg/mm²/sec の紫外線を5分間照射して完全に不活化した．

その他，必要な事項は，各実験毎にふれることとする．

Fig. 1 Fluorescent antibody staining of EB viral capsid antigen (VCA) in P_3HR-1 cells by nasopharyngeal carcinoma (NPC), reticulum cell sarcoma of nasopharynx (NPS) and normal human sera

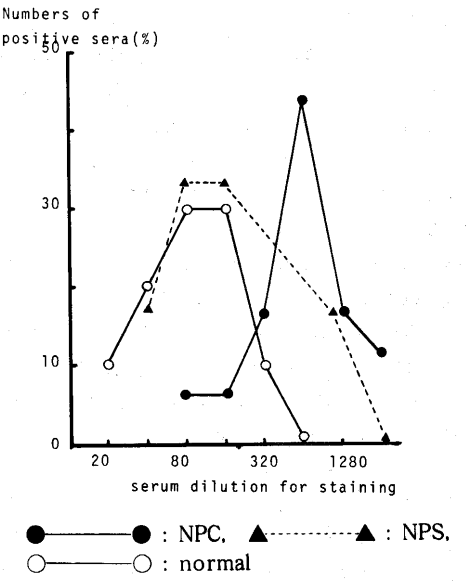


Table 1. EBV antibody in NPC, NPS and normal human sera

Anti EBV titer *	Numbers of cases (%)		
	NPC	NPS	Normal
1 : 20	0	0	1 (10)
40	0	1 (16.7)	2 (20)
80	1 (5.6)	2 (33.3)	3 (30)
160	1 (5.6)	2 (33.3)	3 (30)
320	3 (16.7)	0	1 (10)
640	8 (44.4)	0	0
1280	3 (16.7)	1 (16.7)	0
2560	2 (11.1)	0	0
positive numb. (%) **	13/18(72.2)	1/6(16.7)	0/10

* Positive staining of EB viral capsid antigen (VCA) with immunofluorescence in P_3HR-1 cells

** more than 640 fold dilution of serum

NPC : Nasopharyngeal carcinoma

NPS : nasopharyngeal sarcoma (reticulum cell sarcoma of nasopharynx)

実験成績

I　NPC, NPS 患者および健康者の抗 EBV-VCA 抗体価の分布

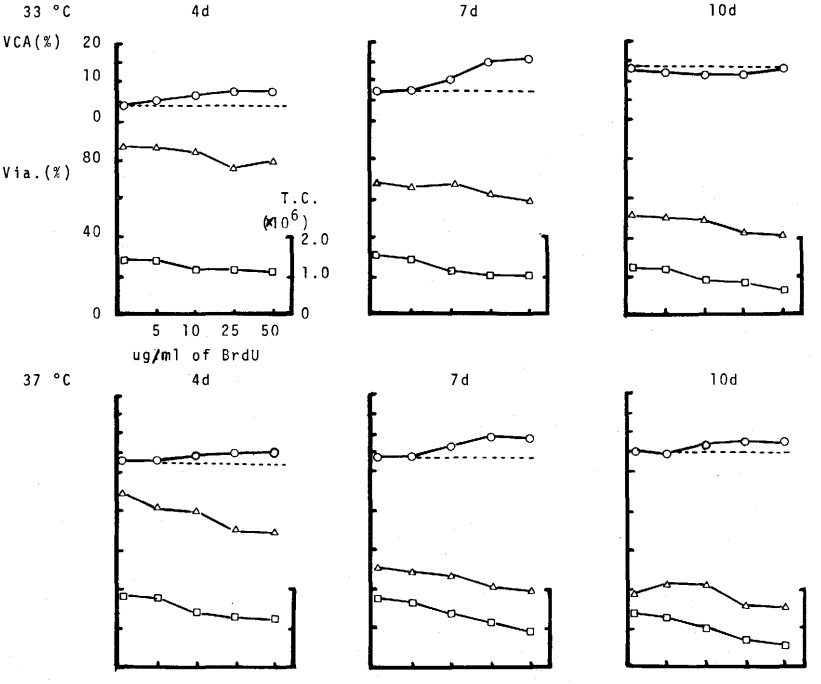
NPC（18例），NPS（6例）および健康者（10例）の抗 EBV 抗体価を，EBV 産生細胞：P_3HR-1 を標的細胞として，VCA で測定すると，Table 1，および Fig. 1 のごとくなった．これより，抗 EBV 抗体価の有意な陽性限界を640倍以上とすると，その陽性率は，NPC：72.2％(13/18)，NPS：16.7％（1/6）となり，健康者には1例もなかった．これからも NPC 患者血清には，既報[14)15)]のごとく，高率に抗 EBV 抗体価の上昇があり，NPC と EBV 間の関連性を強く暗示していた．

II．EBV 保有細胞の EBV 産生におよぼす BrdU の影響

感染性 EBV を比較的大量に産生する培養系は，in vitro で EBV により transform したリスザル白血球細胞（B95-8株）[55)]を除き，今日殆どない．その中で，既報[56)~59)]に従い，EBV 保有 P_3HR-1 細胞を用いて，BrdU 存在による EBV 産生の増強効果を，33°Cと37°Cにおいて検討した．EBV 産生率は，VCA 陽性細胞率で表わし，同時に，0.2％トリパン青染色による細胞の生存率と，総細胞数を求めた．蛍光抗体染色用一次血清には，健康正常人血清〔抗 EBV 抗体価（1：160）〕を10倍希釈して用いた．本実験では，培養液のRF-20に BrdU を5～50μg/ml含ませて，1×10^6 cells/ml の P_3HR-1 細胞〔実験開始時の細胞は VCA：3.2%，生存率（TB不染率）91％〕を浮遊し，培養液の交換，追加なしで，10日間培養した．

結果は Fig. 2 にみられるごとく，BrdU 10μg/ml 以下の時，33°C，37°Cのいずれでもほぼ濃度に比例して，VCA は経時的に上昇を示した．しかしながら，細胞の生存率は，逆に，BrdU 濃度増加と共に日を追って減少した．培養温度で比較すると，VCA

Fig. 2.　Effect of BrdU on EB-VCA formation, viability and total cell numbers in P_3HR-1 cells cultured at 33 or 37°C



VCA or Viability（%）：(VCA positive cells or unstained cells with trypen blue/more than 500 cells counted) × 100
○————○：VCA, △————△：Viability(Via),
□————□：Numbers of total cells(T.C.)

率は33°Cの方が37°Cに比して常に1.4～2.7倍の増強がみられた．VCA 陽性率の上昇につれて生存率も低下し，これに比例して総細胞数も減少する傾向は，両温度で同じであったが，細胞増殖に関しては37°Cの方がより盛んであった．これらのことは，BrdU の EBV 産生の誘導は，宿主細胞の機能低下，おそらく EBV 放出の減少，即ち細胞内蓄積という間接的な原因によることを示唆している．なお，この実験において，VCA 陽性率の最高値は BrdU 50μg/ml, 33°C, 7日後の 16.2% で，これとほぼ同率（13.2%）の細胞が33°C, 10日間の培養で得られたので，以後 EBV 抽出用細胞は，この条件下で培養された．

Ⅲ．1．上咽頭由来正常上皮性細胞株，2-27-Ad細胞の樹立化

Photo. 1 に示すごとく，ガラス面に固着した細切片よりの細胞増殖が，培養3～5日頃より認められ，1週間目に培養液を交換した．（この時，大部分がリンパ球と思われる浮遊細胞の分離培養を試みたが樹立化しなかった．）その後，細胞は順調に増殖し，2週間目に線維芽細胞の細胞シートができあがり (Photo. 2)，継代培養を施行した．以後継代をくりかえすごとに上皮由来細胞の占める割合が次第に増加し (Photo. 3)，継代4代頃より現在維持している2-27-Ad細胞株が樹立された (Photo. 4)．なお，4代以降の継代には，培養液（EC-10）を用い，上咽頭由来正常上皮性細胞とした．

2．PHA 刺激による末梢血リンパ球の幼若化と樹立化

ヒト末梢血リンパ球は，PHA 添加培養液で2～3日後，殆どが芽球様細胞となり，ガラス面に附着した．以後培養をさらに続けて，樹立化されたリンパ芽球細胞株（F_1L, F_2L）の場合は，ガラス面より再浮遊し，すみやかに凝集塊をつくり，細胞数増加，生存率一定化，培養液酸性化など樹立化のサインが明瞭であった．このようにして樹立化した例と，不成功例におけるリンパ球の PHA 刺激による幼若化率は Table 2 に示されている．幼若化率測定には 1×10^6 cells /ml のリンパ球を，PHA-M 100μg/ml 添加培養液（10%自家血清加 RPMI-1640）で37°C，66時間，5%CO_2中で培養後，^{3}H-TdR（1μci/ml）を加えてさらに6時間培養した．かくて，5%TCA（三塩化酢酸）を加え，その不溶性分画の ^{3}H-TdR を測定し，その取り込み率を指標に幼若化率を検討した．

これによると，樹立化2例はともに，異種弁 (Ha-

Table 2. Peripheral lymphocytes employed in cultures for the establishment of cell lines

Peripheral lymphocytes obtained from			Notes	^{3}H-TdR uptake[3] in culture			establishment
cases	diagnosis[1]	days[2]		PHA(−)	PHA(+)	ratio [(+)/(−)]	: cell line
1．28y. o. ♀	MI	36	Mitral valve replacement with Hancock valve	383	94,225	246	(+) : F_1L
2．28y. o. ♂	AS_I+MS_I	96	Aortic valve replacement with Hancock valve	366	87,112	238	(+) : F_2L
3．32y. o. ♀	ASD	20	direct suture	356	36,082	101	(−)
4．30y. o. ♀	WPW	3	cut of Kent's bundle	267	19,704	74	(−)
5．30y. o. ♂	normal			428	58,913	138	(−)
6．28y. o. ♂	normal			403	46,343	115	(−)

1) MI : Mitral Insufficiency,
AS_I+MS_I : Aortic Stenosis & Insufficiency + Mitral Stenosis & Insufficiency,
ASD : Atrial Septal Defect,
WPW : Wolf-Perkinson-White Syndrome
2) Days after surgical operation
3) cpm/5×10^5 lymhocytes

Table 3. ACIF-test in NPC-tissues, lymphoblastoid cell lines and monolayered cell lines using various NPC or NPS sera diluted to (1:10)

Serum No. Diagnosis	VCA titer	NPC-tissue No. 21, (frozen sp.)	P_3HR-1 or EB_3	F_1L or F_2L	F_1LE**	12 monolayered cell lines
1 NPC	1 : 1280	+	+	−	+	−
2 NPC	320	−	+	−	+	−
3 NPC	640	−	+	−	+	−
4 NPS	80	−	+	−	+	−
5 NPC	640	−	+	−	+	−
6 NPS	1280	+	+	−	+	−
7 NPS	80	−	+	−	+	−
8 NPC	1280	+	+	−	+	−
9 NPC	640	−	+	−	+	−
10 NPS	160	−	+	−	+	−
11 NPS	40	−	+	−	+	−
12 NPC	2560	+	+	−	+	+(10 cells) * −(2 cells) *
13 NPC	640	−	+	−	+	−
14 NPC	80	−	+	−	+	−
15 NPC	640	−	+	−	+	−
16 NPC	1280	−	+	−	+	−
17 NPC	320	−	+	−	+	−
18 NPC	160	−	+	−	+	−
19 NPC	320	−	+	−	+	−
20 NPC	640	−	+	−	+	−
21 NPC	2560	+	+	−	+	+(10 cells) * −(2 cells) *
22 NPC	640	−	+	−	+	−
23 NPC	640	−	+	−	+	−
24 NPS	160	−	+	−	+	−

*(+): positive in 2-27-Ad, HeL, HeK, Chang's Liver, Intestine-407, Detroit-98, KB, Hep-2, G2 and HeLa cells
(−): negative in VERO and THEL cells
**EBV-infected lymphoblastoid cells

ncock 豚心臓弁) を移植された患者由来リンパ球で，他の心臓手術例や，健康正常人由来のものでは，長時間の培養が不可能であった．更に，これら計6例のヒトリンパ球の PHA 刺激による ^{3}H-TdR の取り込み率を，刺激（−）の場合のそれと比較してみると，樹立化成功の2例では，それぞれ246，238となり，他の非成功例4例の約2倍の取り込み率（幼若化率）を示した．

Ⅳ．NPC，NPS 患者血清による NPC 組織並びにヒト各種継代培養細胞系における EBV 特異的核内抗原（EBNA）の検出

1．in vivo 腫瘍（NPC）組織細胞における EBNA の証明

生の癌細胞として，NPC (transitional cell carcinoma) 患者からの生検組織を用い，クライオスタット（サクラコールドトーム，CM-3型）で作製した厚さ4μの凍結切片で蛍光抗体法（ACIF）を用いて，EBNA を検索した．この際，第一次反応用血清には NPC（18例），NPS（6例）患者血清の計24例を各々（1：10）に希釈して用いた．

結果は Table 3に示したごとく，血清NO．1，8，12，21，の NPC 4血清と，NO．6の NPS 血清は生検組織切片で，明らかに上皮性細胞にのみ，EBNA を検出し得た (Photo.5)．EBNA 陽性を示したこれら5血清は，すべて抗 VCA 価（1：1280）以上を示し，この種の反応には，高い抗 EBV 抗体価が要求されるものと思われた．

2．ヒト由来継代培養細胞における EBNA の証明

EBV 感染実験に先立ち，手持ちの細胞16株（浮遊培養系4株，単層培養系12株）について，EBV 感染の有無を ACIF による EBNA 検出で調べてみた．使用血清は前項のものと同一である．EBNA 陽性細胞の出現は，細胞の生存率とほぼ平行することを P_3HR-1 細胞で確認できたので，常に生存率90％以上の生細胞を用いれば，ACIF の判定は（＋），（−）で表わし得た．結果は Table 3に示した．

これをみると，浮遊系細胞においては，BL由来樹立化細胞株（P_3HR-1，EB_3）の2例が共に EBNA 陽性で，使用血清全例と反応した (Photo. 6)．しかし，著者が PHA 刺激で樹立化した F_1L，F_2L 細胞は，共に全血清で陰性を示し，EBV ゲノム陰性株であった．しかしながら，後にも詳述するが，これに EBV を感染させた F_1LE 細胞では，全血清が陽性を示した．一方，単層培養系12株すべての細胞は，NPC 患者の NO．12，21の2例を除いた他の22血清で陰性を示し，EBV ゲノムの存在しない細胞株と判定した．

ところでNO．12，21の両血清は，単層培養系細胞12株の中，ヒト以外の組織由来である VERO，THEL 細胞を除いた他の10細胞すべてと反応し，陽性像を与えた．NO．12での染色パターンは，核内のまばらな点状蛍光と，細胞質一様の強い顆粒状蛍光が明瞭に観察された (Photo.10)．しかし，NO．21では，核内にのみ，粗な顆粒状蛍光を一様に認め，P_3HR-1 細胞でみられた密な顆粒状蛍光と明らかに区別できた (Photo. 11)．

このように，ヒト由来の何れの細胞とも ACIF 陽性を示す血清〔NPC患者血清の約11％（2/18)〕は，細胞内の如何なる抗原性物質と反応するのかが問題になる．先に吉田[60]は，NPC 患者血清中に抗核抗体 (heterophilic anti-nuclear antibody : ANA) を見出し，それは核内抗原性物質としてヒストン，プロタミンと反応すると述べている．そこで，寒天内沈降反応により，仔牛胸腺由来ヒストンの4分画と，市販プロタミンを抗原としてその検討を加えた．結果は Photo. 7，8，9 に示した．

これをみると，この2血清（NO．12，21）はヒストンの F_2(B) 分画 1mg/ml，プロタミン 2mg/ml と反応して沈降線を示し，対象の正常ヒト血清〔抗 EBV 抗体価（1：160)〕では陰性であった．これよりこの2血清は，EBV に非特異的な，ヒト細胞に対する好異種性の抗細胞質抗体又は抗核抗体を含むと判断され，EBV 感染実験には使用できなかった．又，この血清の供血者において，抗核抗体陽性既知疾患[61]，例えば SLE (Systemic lupus erythematosus) のごとき，バックにかくれた自己免疫性疾患の合併している可能性を臨床生化学的に検索したが，既知の自己免疫疾患は見出されなかった．

Ⅴ．ヒト継代培養細胞への EBV 接種による EBV ゲノム移行の試み

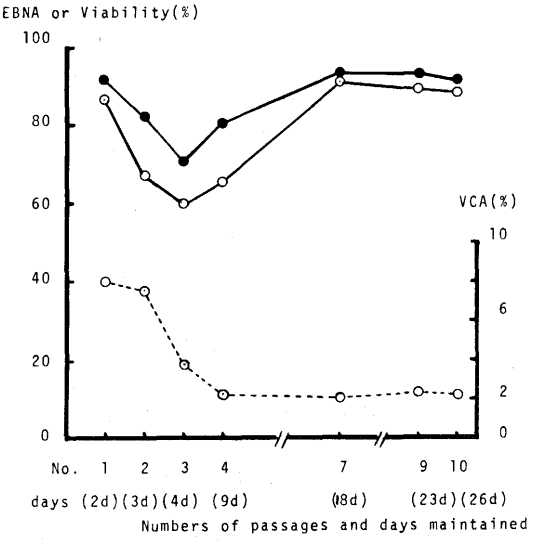
EBV 感染成立（EBVゲノムの移行）の証明は，前述の EBNA，VCA 両抗原の検出で行われた．この際 EBV 抗体陽性血清は，Table 3の結果より，No．1，6，8の何れかを用いた．

1．浮遊培養細胞系の場合

EBV ゲノム陰性と判明したヒト末梢静脈血由来リンパ芽球系細胞，F_1L に EBV（抽出ウィルス原液）を接種後，EBNA，VCA 陽性率を追求した．

結果は Fig．3 に示すごとく，接種後2日目において EBNA：86.5％，VCA：8％を示し，明らかに EBV 感染の成立をみた．以後の継代培養での両抗原

Fig.3. Fluorescent antibody staining (EBNA or VCA) in F_1L cells infected with EB virus



陽性率の推移をみると，EBNA は細胞の生存率に平行して多少変動したが，VCA は漸減傾向を示した．しかし本実験の継代数：10代，培養日数：26日間，完全消失することはなく，その後も2％前後の陽性率を保持した．このように，EBV 感染により，明らかに EBV ゲノム保有細胞に transform したヒトリンパ細胞株 F_1LE を Giemsa 染色して，元の F_1L 細胞と比較しても，形態学的にほとんど差異を認め得なかった．

2．単層培養細胞系の場合

ここでは，2-27-Ad，HeL，HeKのいずれもヒト由来正常上皮性細胞を使用した．これら3種の細胞に，同条件で EBV を接種し，前項1．と同様に両抗原を検索したが，ウィルス接種後，7日間の観察において結果はすべて陰性であった．ウィルス接種後，BrdU を5～50μg/ml 添加し，両抗原の増強を計ったが，同じく陰性で，形態学的にも細胞変性効果の出現はなかった．

以上のことから，EBV は生体においてリンパ球を標的宿主細胞とする好リンパ組織性ウィルスで，上皮性細胞への直接感染成立が困難であると考えられた．このことは，現在，ヒトの EBV 保有細胞がリンパ系細胞に限られていることによく一致している．

Ⅵ．ヒト由来 EBV 保有リンパ芽球系細胞株とヒト由来上皮性細胞株との細胞融合による EBV 感染（EBVゲノムの移行）の成立

上皮性細胞での実験的 EBV 感染は，不成功に終ったが，NPC の上皮性癌細胞に EBV ゲノムが存在するという報告[22)~24)]とともに，著者も生の癌細胞で Table 3のごとく EBNA を検出することができた．感染以外に EBV ゲノムの細胞内移行機序を考える時，上咽頭はリンパ系組織が豊富である故に，リンパ球と上皮性細胞の融合によるゲノムの移行が充分考えられる．そこで，in vitro での細胞融合による EBV ゲノム移行を不活化 HVJ 使用群と，対象の非使用群で検討した．

1．BL 由来 EBV 保有リンパ芽球系細胞 (P_3HR-1) を用い，継代培養を行った場合

Table 4-1）に示すごとき条件で混合培養し，EBV ゲノムの証明を前項と同様に ACIF テストで EBNA として判定した．この際の使用 DBS などは血清，glucose フリーで細胞洗浄，HVJ 希釈等に用い，細胞融合の効果を高めた．又，3種の上皮性細胞と P_3HR-1 細胞の HVJ 存在下での融合細胞形成率は，出現した多核巨細胞の割合から求めた．この場合，上皮性細胞(2-27-Ad，HeL，Hekの何れか）又はリンパ芽球系細胞 (P_3HR-1) は，各細胞の形態学的差から明らかに区別され，更に上皮細胞同志あるいはリンパ球同志の融合 (Photo.12) も同様に区別され，蛍光染色像からも識別可能であった．

かくて P_3HR-1 細胞との融合をみると，2-27-Ad 細胞が最も高く，培養3日後，18.1%を示し，HeL，HeK 細胞ではそれぞれ2.6%，3.7%であった．この時，多核巨細胞中の上皮性細胞核が EBNA 陽性を示す細胞 (Photo.13) は，2-27-Ad：38.6%，HeL：21.4%，HeK：21.1%を占め，かかる実験的方法でリンパ球細胞中の EBV ゲノムが使用3種の上皮性細胞へ移行することは，明らかであった．しかしながら，2-27-Ad 細胞の場合，HVJ 非存在下においても，多核巨細胞が培養初代で 6.5% 出現し，このうち EBNA 陽性細胞は22.9%認められた．ところが，HeL，HeK 両細胞のかかる HVJ (－) での自然融合は，はるかに低く (0.8～1.0%)，かつ EBNA 陽性細胞は全く認められなかった．これより，ヒト組織由来継代培養細胞種の間で，EBV ゲノム移行機序や，頻度に差のあることは明らかであった．更に，HVJ

の有無にかかわらず，出現した EBNA 陽性融合細胞は継代培養とともにいづれも減少し，このような融合細胞の増殖ないし維持は困難であった．ただ，継代培養によるEBNA陽性細胞の残存傾向も，2-27-Ad細胞では他の2つの細胞におけるものより，若干の有意さを示していた．

2．P_3HR-1 細胞を用い，継代培養を行わなかった場合

前項の実験で困難であった，EBNA 陽性融合細胞の維持と増殖を向上せしめるため，P_3HR-1，2-27-

Table 4. EBNA-staining of monolayered cell lines (2-27-Ad, HeL and HeK cells) fused with EBV-positive lymphoblastoid cell lines (P_3HR-1 or F_1LE cells) by UV-inactivated HVJ

1). P_3HR-1 cells

Cells UV-inact. HVJ		Numbers of Passages (days)					
		0 (3 days)		1 (6 days)		2 (9 days)	
		p.n. giant cells	EBNA	p.n. giant cells	EBNA	p.n. giant cells	EBNA
2-27-Ad	(−)	12/513 (2.3)	0/12	7/530 (1.3)	0/7	6/546 (1.1)	0/ 6
2-27-Ad + P_3HR-1	(−)	35/537 (6.5)	8/35 (22.9)	23/505 (4.6)	3/23 (13.0)	25/527 (4.7)	0/25
2-27-Ad + P_3HR-1	(+)	88/487 (18.1)	34/88 (38.6)	37/510 (7.3)	4/37 (10.8)	29/509 (5.7)	1/29 (3.4)
HeL	(−)	2/511 (0.4)	0/2	3/525 (0.6)	0/3	N.T.	N.T.
HeL + P_3HR-1	(−)	5/507 (1.0)	0/5	6/491 (1.2)	0/6	N.T.	N.T.
HeL + P_3HR-1	(+)	14/534 (2.6)	3/14 (21.4)	12/547 (2.2)	1/12 (8.3)	26/533 (4.9)	0/26
HeK	(−)	2/551 (0.4)	0/2	2/535 (0.4)	0/2	N.T.	N.T.
HeK + P_3HR-1	(−)	4/521 (0.8)	0/4	6/522 (1.1)	0/6	N.T.	N.T.
HeK + P_3HR-1	(+)	19/508 (3.7)	4/19 (21.1)	25/505 (5.0)	1/25 (4.0)	34/527 (6.5)	0/34

p.n. giant cells : (polynuclear giant cells/counted cells) × 100
EBNA : (EBNA positive cells/polynuclear giant cells) × 100, test serum=No. 1 in Table 3
Cell fusion : A mixture containing both equal volumes (0.5ml) of epithelial cells (2×10^6cells/ml) and P_3HR-1 cells (1×10^7cells/ml) was reacted with 0.5ml of UV-inactivated HVJ (20,480HAU/ml) for 20 minutes at 37°C following a reaction for 15 minutes at 4°C. These reacted mixtures were successively cultured at 35°C after further supplementation of 5.0ml of EC-20 medium. Thereafter, they were examined or passaged as shown in Table.
N.T. : not tested

2). P_3HR-1 cells without passages

ratio 2-27-Ad cells : P_3HR-1 cells	UV-inact. HVJ	culture days at 35℃					
		3 days		6 days		9 days	
		p. n. giant cells	EBNA	p. n. giant cells	EBNA	p. n. giant cells	EBNA
1 : 1	(+)	45/553 (8.4)	6/45 (13.3)	34/536 (6.3)	3/34) (8.8)	16/511 (3.1)	1/16 (6.3)
: 5	(+)	84/537 (15.6)	30/84 (35.7)	71/511 (13.9)	19/71 (26.8)	43/554 (7.8)	5/43* (11.6)
: 10	(+)	103/521 (19.8)	45/103 (43.7)	91/541 (16.8)	40/91 (44.0)	45/515 (8.7)	12/45* (26.7)
: 10	(−)	38/535 (7.1)	10/38 (26.3)	36/521 (6.9)	17/36* (47.2)	26/530 (4.9)	7/26* (26.9)

Cell fusion etc. : Same as in 1), except passage culture. Mixed cultures were maintained for 9 days with appropriate medium change.
* In these samples, a positive staining of cytoplasma in non-fused cells was occasionally observed.

Ad 両細胞間での融合後，継代培養を行わず培養液の交換のみで維持した場合を検討した．同時に両細胞の混合比率を（1 : 1～1 : 10）に変えて行った結果を，Table 4-2）に示した．

これによると，HVJ 存在下における融合細胞形成と，その中の EBNA 陽性細胞の出現は，混合する P_3HR-1 細胞が多いほど，何れも高率に認められた．特に混合培養後6日目において，各群とも最高値を示し，以後減少した．しかし，EBNA 陽性融合細胞は，この9日間の継続培養において，継代培養を行った前項のものより，明らかに高率(最高値：融合率，16～19%，EBNA 率，43.7～44.0%)に維持された．このことは，HVJ 非存在下（2-27-Ad : P_3HR-1 の細胞混合比は1 : 10の自然融合）でも同様の傾向を示し，培養6日目に融合細胞6.9%，EBNA 陽性率47.2%のピークに達した．この場合，培養6日以降の融合細胞形成率が比較的低い（6.9%）にもかかわらず，HVJ 存在下と同程度の EBNA 率が検出されたことは，かかる条件での自然融合から，EBNA 陽性上皮性細胞株樹立の可能性を示唆している．さらに注目すべきことは，(1:10) 混合の6日目標本と，9日目の各群において，融合してない単一の2-27-Ad細胞の細胞質に蛍光陽性像 (Photo. 14) が数としては少いものの，出現したことである．しかし，このような陽性細胞は蛍光抗体間接法（VCA）では認め得なかった．この細胞の出現意義については考察で後述する．

3．EBV 持続感染化正常ヒト由来リンパ芽球系細胞株 (F_1LE) を用いた場合．

そこで，P_3HR-1 細胞の代りに F_1LE 細胞を用い，浮遊状態での細胞融合に代えて，単層培養した細胞と混合培養する方法が生体レベルにより近く，ゲノムの継代がより長く維持できないかと考え，本実験を行った．（実験条件は Table 4-1),2）と殆ど同じ）その結果を Table 4-3）に示した．

これより，EBV ゲノムの上皮性細胞への移行は，HVJ 存在下の場合，継代1代（培養4日）において，2-27-Ad：融合細胞10.8%中，36.8%，HeL：3.8%中，30%，HeK：4.5%中，34.8%に認めた．又，HVJ 非存在下でも，2-27-Ad 細胞では継代1代，2代（培養6日目）に渡って23.8%，12.5%の EBNA 陽性細胞の出現をみたが，HeL，Hek 両細胞においては全く証明できなかった．ここで，EBV ゲノムの移行した細胞の維持は期待に反し，1）の実験とほとんど差がみられず，培養3代（9日目）には全く消失した．

ちなみに3種上皮性細胞同志における，HVJ 誘発細胞融合率は2-27-Ad：8.0%，HeL：3.9%，HeK：4.6%を示し，2-27-Ad 細胞の融合細胞形成率が他の2種の細胞に比して高いことが，HVJ 非存在下で

3). F_1LE cells

Cells UV-inact. HVJ		Numbers of passages (days)					
		1 (4 days)		2 (6 days)		3 (9 days)	
		p. n. giant cells	EBNA	p. n. giant cells	EBNA	p. n. giant cells	EBNA
2-27-Ad	(−)	6/526 (1.1)	0/6	6/549 (1.1)	0/6	7/518 (1.4)	0/7
2-27-Ad	(+)	43/535 (8.0)	0/43	17/507 (3.4)	0/17	8/531 (1.5)	0/8
2-27-Ad + F_1 LE	(−)	21/515 (4.1)	5/21 (23.8)	8/507 (1.6)	1/8 (12.5)	6/533 (1.1)	0/6
2-27-Ad + F_1 LE	(+)	57/529 (10.8)	21/57 (36.8)	20/505 (4.0)	2/20 (10.0)	11/540 (2.0)	0/11
HeL	(−)	2/517 (0.4)	0/2	1/518 (0.2)	0/1	3/529 (0.6)	0/3
HeL	(+)	21/543 (3.9)	0/21	9/511 (1.8)	0/9	4/554 (0.7)	0/4
HeL + F_1 LE	(−)	5/510 (1.0)	0/5	4/522 (0.8)	0/4	4/511 (0.8)	0/4
HeL + F_1 LE	(+)	20/522 (3.8)	6/20 (30.0)	11/520 (2.1)	0/11	5/547 (0.9)	0/5
HeK	(−)	3/541 (0.6)	0/3	3/530 (0.6)	0/3	3/518 (0.6)	0/3
HeK	(+)	25/541 (4.6)	0/25	10/510 (2.0)	0/10	2/527 (0.4)	0/2
HeK + F_1 LE	(−)	5/518 (1.0)	0/5	3/534 (0.6)	0/3	2/527 (0.4)	0/2
HeK + F_1 LE	(+)	23/511 (4.5)	8/23 (34.8)	11/518 (2.1)	1/11 (9.1)	5/544 (0.9)	0/5

Cell fusion : Same as in 1), except three epithelial cells (1×10^5/ml) were pre-cultured for 3 days at 37°C.

も EBV ゲノムが移行し得た一つの誘因と考えられた．しかしこれら細胞の性状の差が何に由来するのかは，更に今後の追求が必要と思われる．

考　　察

ヒトの悪性腫瘍（広義の癌）が，ウィルスによっておこるかもしれない，という考えは，ヒト以外の動物癌ウィルスの存在と，現代ウィルス学の発展過程で得られつつある傍証的事実の集積から次第に広く定着しつつある． Epstein, Barr らによって Burkitt リンパ腫 (BL) 培養細胞に発見された Epstein-Barr Virus (EBV) は，人癌ウィルスの一つの候補として脚光をあびている．これが，血清学的研究を中心に BL や，上咽頭癌 (NPC) と関連づけられている中で，著者は，上咽頭細胞への EBV ゲノムの移行機序解明を試み，NPC における EBV の病因的意義を論ずることにした．

まず，上咽頭由来の上皮性細胞樹立化に際し，用いられたアデノイド組織は， Waldeyer 咽頭輪に属し，主にリンパ球と結合組織からなる扁桃組織であるが，

その位置する解剖学的位置が上咽頭であり，摘出組織に上皮性細胞の含まれる可能性は大きい．さらに，アデノイドの組織培養で，上皮性細胞の出現をみたという報告[62]もある．かくて，樹立化された2-27-Ad細胞は形態学的特徴から明らかに，上皮性細胞であると判断した．

ところで，Epstein, Achong の綜説[63]にもあるように，EBV は水平感染で伝播し，世界中広汎にその感染が認められ，ウィルスは咽頭上皮細胞内で増殖し，唾液によって感染するとされている．しかし今回，上咽頭由来上皮性細胞(2-27-Ad)をはじめとして，上皮性のヒト由来継代培養細胞を用いても，in vitro で EBV の直接感染成立は証明し得なかった．この理由として，ウィルス感染性に要約されるウィルス側の条件（高力価感染性ウィルス抽出の困難さ）と，標的細胞に EBV 感染レセプター様物質が欠けているかもしれないという，細胞側の原因が考えられる．しかし，同一 EBV サンプルでもリンパ球には，すみやかに感染が成立したことから考えると，特に後者に主原因があるように思われる．そこでこのようなレセプターの問題点からリンパ球を考えると，現在，ヒトリンパ球には，ヒツジ赤血球とのロゼット形成や，免疫学的レセプター（C_3補体レセプター）を細胞膜マーカーとして，胸腺由来リンパ球：T細胞と，骨髄由来リンパ球：B細胞に分別し得るレセプター[64)65)]が知られており，これを利用して両細胞の分離培養も試みられている[66]．さらに，T又は，B細胞への EBV 感染実験[67)68)]や，EBV で transform したリンパ球のT又はBの同定から[69]，EBV の感染標的細胞はBリンパ球であると結論されている．前述のごとく，Bリンパ球には補体レセプター（従来 Immuno adherence receptor：IA レセプターと称されている）が存在するところから，EBV の感染成立にかかるIA レセプターが必要で，このようなレセプターを欠く，一般上皮性細胞への感染は，本質的に不可能なのかもしれない．

さて，著者がリンパ系細胞として EBV 感染実験に用いたヒト由来末梢血リンパ球は，T細胞に対する chemical mitogen である PHA[70]刺激により樹立化されたリンパ芽球系細胞株であった．このF_1L，F_2L細胞樹立化に際して興味あることは，両者とも PHA 刺激による^{3}H-TdRの取り込み率が対象に比し，約2倍の上昇を示したことである．この場合，両細胞は，ともにブタの心臓弁 (Hancock valve) を移植された人由来で，換言すればかかる異種移植による宿主リンパ球の免疫反応，ことに細胞性免疫応答の関与が考えられる人からの末梢リンパ球であった．加藤ら[71]は，サルの歯を移植されたヒト3名において，異種リンパ球（ヒトとサル）の混合培養後の芽球化率と，異種移植の成否の関係を検討し，生着不成功例ではヒトリンパ球の芽球化率は対象より約2倍上昇することを観察している．著者は，リンパ球混合培養の代りに，PHA 刺激を用い，芽球化率を^{3}H-TdRの取り込みから検討したが，この加藤らの報告から推察すると，前述の異種（ブタ）生体弁の生着は期待できないかもしれない．これらに関連した問題は，今後の移植免疫学的研究への一つのアプローチとなるであろう．又，リンパ球幼若化（芽球化）亢進を細胞樹立化の要因と結びつけることにはいくらか問題が残る．しかし，異種抗原物質刺激をある期間行った生体からのリンパ球に，PHA 刺激を行い，幼若化率が異常に高くなるような時，樹立化は容易であることを暗示し，興味深いものといえよう．

一般には，ヒト臍帯血リンパ球や，胎児リンパ球は，EBV の関与ではじめて樹立化され[30)72)73)]，又樹立化リンパ芽球系細胞のほとんどに EBV 特異的抗原が検出されている[74)75)]．この意味から，著者の得たF_1L，F_2L細胞について蛍光抗体法によりVCA，EBNAを検索したが，共に陰性で，EBVゲノムの存在は否定された．このように樹立化リンパ芽球細胞の中でも，EBNAが陰性のものは，Kleinの報告[25]〔PHA transformed cord blood cell (Dr. W. Leibold 提供の2株)〕や，更に，T細胞由来樹立化リンパ球[76]，Herpes virus saimiri により transform したキヌザルのリンパ球[25]などが挙げられる．さらに，F_1L細胞は，橘ら[77]の方法でリンパ球の分別を行ったところ，両細胞ともB細胞と同定され，また，EBV感染により，VCA，EBNA両抗原の出現が認められた．これはBリンパ球が EBV の感染標的細胞であるという諸家の報告と完全に一致した．

一方，EBV直接感染の成功しなかった上皮性細胞については，UV- 不活化 HVJ の存在下で，EBV ゲノム保有ヒトリンパ芽球系細胞 (P_3HR-1，F_1LE) と混合培養して融合細胞を出現させ，これに EBNA を証明することができた．さらに，上皮性2-27-Ad細胞では，HVJ 非存在下でも融合がおき，その中の上皮性細胞核内に EBV ゲノムの移行（EBNAの出現）が認められた．同様の EBNA の出現は，VERO 細胞（ミドリザル腎由来継代培養細胞）を用いても，率は低いが認め得た．しかし同じ上皮性細胞でも，HeL，HeK 細胞の HVJ 非存在下では，かかることがなく，ゲノムの移行機序に細胞間の差がみられ，各組織由来

継代培養細胞の違いが明白に反映された．同様に大里ら[78]は，P_3HR-1細胞とヒト羊膜由来の FL 細胞との不活化 HVJ による細胞融合を行い，EBV ゲノムのリンパ球細胞から上皮性細胞への移行を証明している．これによると，両細胞の融合は，全細胞の約3％で，融合細胞の50％以上に EBNA の陽性像を得たとしている．従って，HeL，HeK 両細胞は FL 細胞と類似の融合形成能をもつ細胞であり，これに比し，2-27-Ad細胞は，リンパ球細胞とはるかに高率に融合しあう細胞と考えられた．このことは，2-27-Ad細胞が，もともとリンパ系細胞の豊富な上咽頭粘膜組織，あるいはリンパ系組織であるアデノイド由来の上皮性細胞である故に，発生学的に，他の組織由来細胞よりリンパ球親和性が強いためと推察されたが，それが何に基づくかは今後の追求に待ちたい．

以上のことは，生体においても EBV ゲノム保有リンパ球 (EBV transformed lymphoid cell) が上咽頭上皮細胞と融合し，上皮性細胞の核内へ EBV ゲノムが移行することを証明したものと考えられる．そこで，以上の成績をもとに NPC の EBV 病因性に関し，推論を加えたい．まず，EBV 感染を受けたリンパ系組織において，Bリンパ球が EBV 宿主細胞となり，EBV ゲノムが維持される．このような EBV ゲノム保有リンパ球が，上咽頭粘膜上皮と時として細胞融合した時，上皮細胞内に移行した EBV ゲノムは，核内で遺伝情報を発揮し，癌化への契機となるかもしれない．ことに，免疫担当細胞であるリンパ球（この場合はB細胞）で EBV が増殖すると，EBV 感染量の増大と共に，B細胞担当の生体の免疫学的防禦機構は，T細胞へのB細胞の関与も考えると，著しくそこなわれるであろう．その結果，癌細胞に対する免疫学的抑制が少なくなり，腫瘍細胞発生増大の頻度が高まり担癌状態，すなわち上咽頭癌の発生につながるように推察される．このような免疫監視機構[79]の異常化に腫瘍発生の可能性を求めた場合，著者の調べた NPC 患者の約11％（2/18）に好異種性の抗核あるいは抗細胞質抗体が認められた（NPC血清No．12，21）事実を考えあわせると，その可能性は非常に高い．吉田ら[60]の報告によると，このような抗核抗体は，NPC 患者血清中に日本人で20％，中国人で44％存在し，BL 患者では41血清中，疑わしき2例以外1例もなかったとしている．このことは，NPC が中国民族に何故多発するかの民族的因子の一つにこのような免疫機構の異常があるとも考えられ興味あることである．加うるに，この抗体が細胞核中の基本物質であり，細胞増殖，機能発揮，特に核内 DNA の制禦機構に重要な役割を果すとされといるヒストン[80]，又はプロタミンのような物質と沈降反応を示したことは，今後，ウィルス癌化の機序解明などにも重要な意味を示唆している．又文献的にも殆ど例をみない抗細胞質抗体が NPC 患者血清（No．12）に出現したことは何を意味しているのであろうか．しかも Table 4-2）で示したごとく，NPC血清No．1でも実験条件により，No．12で観察されたと同様の蛍光陽性像が2-27-Ad細胞質に出現したことは甚だ意義が深い．一つには，両細胞の自然融合の高い条件下で，直接感染し得た EBV ゲノムの表現が時間と共に核から細胞質におよんだ結果なのかもしれない．あるいは，EBV ゲノムの表現が細胞質にのみ発揮され，EBV 特異的細胞質内新抗原をとらえうる未知の抗体が NPC 患者血清に存在するとも考えられる．何れにせよ，No．12の場合，このような未知ともいえる抗体が何故 EBV 特異的範囲を越えて，好異種性に出現したかは将来残された問題である．

ところでこのような抗体の意義を癌の悪液質から死につながる一因子として考えられないであろうか．つまり，正常では異物（抗原）として認識し得ない核内物質に対して抗体をつくり，さらに細胞質内の同様の物質に対しても抗体を作るに至ったことは，担癌生体（NPC）において，抗核抗体の出現に加えてさらに医学生物学的に細胞にとって重篤と思われる．かかる免疫学的異常の出現から悪液質につながる方向性は，何によって支配されるかなどは，今後の課題であろう．又 EBV oncogenesis の生体における直接証明が不可能である以上，今後培養株化されるであろうNPC由来癌細胞で，EBV ゲノムが確認されるならば，実験腫瘍学的に NPC の EBV 病因論はより確実なものになるかもしれない．この意味で，生の NPC 由来上皮性細胞における EBNA（EBVゲノム）の証明と，実験的 EBV ゲノム移行の成立に伴い観察し得た現象の示唆する所は非常に多いと考える．

結　　論

上咽頭癌（NPC）と Epstein-Barr virus（EBV）の関連性において，in vitro ではリンパ系細胞にのみ認められる EBV ゲノムの移行（EBV感染成立）を，上咽頭由来上皮性細胞で試み，NPC 病因性との結びつきを検討した．その結果，次のごとき知見が得られた．

1．NPC，NPS（上咽頭肉腫）及び健康者血清の中，抗EBV-VCA (viral capsid antigen) 抗体価：640倍以上の陽性を示すものは，NPC 患者血清に著し

く，健康者血清には全くなかった．

2．EBV 保有細胞（P_3HR-1）の BrdU による EBV 産生の誘導は，BrdU 50μg/ml，33°C，7日間の培養が最も高く（VCA率：16.2%），これより比較的高力価 EBV が抽出できた．

3．アデノイド組織より，培養約1カ月で上咽頭由来正常上皮性細胞：2-27-Ad細胞株が，また PHA (phytohemagglutinin) 刺激により，ヒト末梢血由来リンパ芽球（HLBC）細胞株（F_1L，F_2L）が樹立された．

4．NPC 生検組織および上述の両細胞も含めてヒト各種継代培養細胞16株（浮遊系：4，単層系：12）について，NPC 18，NPS 6の計24血清を用いて，EBNA (EBV-associated nuclear antigen) 検出により，EBV 感染の有無を検索した．その結果，NPC 生検凍結切片と EBV 保有 HLBC で陽性を示し，ヒト単層培養株と PHA-transformed HLBC に陰性を示す3血清が，以後の EBV 感染実験のために選択された．一方 NPC 患者血清中2例（No．12，21）は VERO（サル由来），THEL（ハムスター由来）を除いたヒト由来の10細胞株すべてと反応する好異種性を示し，No．12は主に細胞質と，No．21は核と反応する抗体を含んでいた．また，これら5例の抗 EBV-VCA 抗体価は，何れも1280倍以上の高力価を示した．さらに，上述の2血清（No．12，21）は，仔牛胸線由来ヒストン，サケ精子由来プロタミンと寒天ゲル内で，沈降線を形成した．

5．EBV 保有 HLBC からの抽出 EBV をヒト由来上皮性継代培養細胞3株（2-27-Ad，HeL，HeK）に接種しても EBV の感染（ゲノムの移行）は証明されなかった．しかし PHA-transformed HLBC (F_1L) では接種後，EBNA：86.5%，VCA：8%が出現し，継代培養後も両抗原の消失はなく，EBV 持続感染細胞（F_1LE）が成立した．

6．EBV 直接感染の成立しなかったヒト由来上皮性細胞3株と，EBV保有HLBC（P_3HR-1 又は F_1LE）の混合培養にUV-不活化 HVJ を作用させて，両細胞の融合を起させると，EBV ゲノムは上皮性細胞へ移行した．特に2-27-Ad細胞では，融合細胞形成率が高く，HVJ がなくてもゲノムの移行が可能で，他の上皮性細胞に比し，リンパ球親和性が明らかに高かった．この際，2-27-Ad細胞に対する P_3HR-1 細胞の混合比率を上げると HVJ に関係なく，実験成績Ⅳ-2のNo.12血清で認めたと同様の蛍光陽性像が2-27-Ad細胞質に一部出現した．しかし，EBNA 陽性融合細胞の維持（EBV ゲノム保有上皮性細胞の樹立化）は困難で，2～3代継代，培養9日前後に消失した．

稿を終るに臨み，御指導，御校閲を賜わった恩師梅田良三教授，がん研ウィルス部波多野基一教授に衷心より謝意を表するとともに，多大の御助力と便宜を計って下さったがん研病態生理部倉田自章教授，本学第一外科土屋和弘先生に感謝致します．又有益なる御助言をいただいたがん研ウィルス部教室員の諸先生方に深く感謝致します．

文　献

1) **Digby, K. H., Fook, W. L. and Che, T. Y.** : Brit. J. Surg., **28**, 517 (1941).

2) **Yey, S. and Cowdry, E. V.** : Cancer, **17**, 425 (1954).

3) **河辺義孝**：日本医師会雑誌，65巻，11号別刷，1319 (1970).

4) **Burkitt, D.** : Brit. J. Surg., **46**, 218 (1958).

5) **Epstein, M. A., Barr, Y. M.** : Lancet **1**, 252 (1964).

6) **Epstein, M. A., Achong, B. G., Barr, Y. M.** : Lancet **1**, 702 (1964).

7) **Old, L. J., Boyse, E. A., Oettgen, H. F., de Harven, E., Geering, G., Williamson, B. & Clifford, P.** : Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **56**, 1699 (1966).

8) **Henle, G., Henle, W.** : J. Bacteriol., **91**, 1248 (1966).

9) **Henle, G., Henle, W., Klein, G., Gunven, P., Clifford, P., Morrow, R. H. & Ziegler, J. L.** : J. Nat. Cancer Inst., **46**, 861 (1971).

10) **Klein, G., Clifford, P., Klein, E. & Stjernswärd, J.** : Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **55**, 1628 (1966).

11) **Klein, G., Clifford, P., Klein, E., Smith, R. T., Minowada, J., Kourrilsky, F. M. & Burchenal, J. H.** : J. Nat. Cancer Inst., **39**, 1027 (1967).

12) **Peason, G., Dewey, F., Klein, G., Henle, G. & Henle, W.** : J. Nat. Cancer Inst., **45**, 989 (1970).

13) **Pearson, G. R., Henle, G. & Henle, W.** : J. Cancer Inst., **46**, 1243 (1971).

14) **Ito, Y., Takahashi, T., Kawamura, A. & Tu, Shin-Mien** : GANN **60**, 335 (1969).

15) **Kawamura, A., Takada, M., Gotoh, K., Hamajima, K., Sanpe, T., Murata, M. & Ito, Y.**

: GANN, **61**, 55 (1970).
16) Henle, G., Henle, W. & Diehl, V. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **59**, 94 (1968).
17) Nishioka, K., Tachibana, T. & Sekine, T. : GANN Monograph, **10**, 265, Tokyo, Maruzen Co., 1971.
18) Epstein, M. A., Hunt, R. D. & Rabin, H. : Int. J. Cancer, **12**, 309 (1973).
19) Shope, T., Dechairo, D. & Miller, G. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA., **70**, 2487 (1973).
20) de-The, G., Ho, H. C., Kwan, H. C. : Nature, **221**, 770 (1969).
21) Takada, M., Lin, Y. C., Shiratori, O., Sugano, H. : GANN Monograph, **10**, 149, Tokyo, Maruzen Co., 1971.
22) zur Hauzen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P. & Santesson, L. : Nature, **228**, 1056 (1970).
23) Wolf, H., zur Hauzen, H., Becker, V. : Nature new Biol., **244**, 245 (1973).
24) Nonoyama, M. & Pagano, J. S. : Nature, **242**, 44 (1973).
25) Reedman, B. M. & Klein, G. : Int. J. Cancer, **11**, 499 (1973).
26) Moore, G. E., Grace, Jr, J. T., Citron, P., Gerner, R. E. & Burns, A. : N. Y. J. Med., **66**, 2757 (1966).
27) Pope, J. H. : Aust. J. exp. Biol. med. Sci., **46**, 643 (1968).
28) Gerber, P., Whang-Peng, J. & Monroe, J. H. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **63**, 740 (1969).
29) Miller, G., Lisco, H., Kohn, H. I. & Stitt, D. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **137**, 1459 (1971).
30) Nilsson, K., Klein, G., Henle, W. & Henle, G. : Int. J. Cancer, **8**, 443 (1971).
31) Miller, G., Shope, T., Lisco, H., Stitt, D. & Lipman, M. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA., **69**, 383 (1972).
32) Rauscher, Jr, F. J. : Cancer Res., **28**, 1311 (1968).
33) 鈴木正紘，酒本喜与志，日沼頼夫：第22回ウィルス学会総会，演説抄録，1036 (1974).
34) 辻 公美：日本免疫実験操作法，265，前田印刷K. K. 金沢 (1971).
35) Thomas, J. W. : Cancer, **27**, 1046 (1971).
36) Hinuma, Y. & Grace, Jr, J. T. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **124**, 107 (1967).
37) Epstein, M. A., Barr, Y. M. & Achong, B. G. : Wistal Inst. Symp. Monogr., **4**, 69 (1965).
38) Ogura, H. personal communication
39) Ogura, H. personal communicacion
40) Henle, G., Deinhardt, F. : J. Immunol., **79**, 54 (1957).
41) Chang, R. S. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **87**, 440 (1954).
42) Berman, L., Stulberg, C. S. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **92**, 730 (1956).
43) Moore, A. E., Sabachewsky, L., Toolan, H. W. : Cancer Res., **15**, 598 (1955).
44) Eagle, H. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **89**, 362 (1955).
45) Gey, O., Coffman, W. D. & Kubicek, M. T. : Cancer Res., **12**, 264 (1952).
46) Hatano, M. & Morita, O. : Archv Fur Gesamte Virusförsh., **20**, 305 (1967).
47) Yasumura, Y. & Kawakita, Y. : Nippon Rinsho, **21**, 1201 (1963).
48) Yamada, T. & Hatano. M. : GANN, **63**, 647 (1972).
49) 奥村秀夫：組織培養，基礎と応用，99頁，東京，朝倉書店 1964.
50) Ouchterlony, O. : Acta Pathol. Microbiol. Scand., **32**, 231 (1953).
51) 渡辺駅七郎：金大がん研年報，**3**，163 (1970).
52) Johns, E. W. : Biochem. J., **92**, 55 (1964).
53) Harris, H., Watkins, J. F., Ford, C. E. & Schoefl, G. I. : J. Cell Sci., **I**, 1 (1966).
54) Miggiano, V., Nabholz, M. & Bodmer, W. : Wistar Inst. Symp. Monograph, **9**, 61 (1969).
55) Miller, G. & Lipman, M. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA., **70**, 190 (1973).
56) Hinuma, Y., Konn, M., Yamaguchi, J., Wudarski, D. J., Blakeslee, Jr, J. R. & Grace, Jr, J. T. : J. Virol., **1**, 1045 (1967).
57) Hinuma, Y., Konn, M., Yamaguchi, J. & Grace, Jr, J. T. : J. Virol., **1**, 1203 (1967).
58) Hampar, B., Martos, L. M., Walker, J. L. : J. Nat. Cancer Inst., **47**, 535 (1971).
59) Gerber, P. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA.,

69, 83 (1972).
60) Yoshida, T. O. & Takada, M., Kawamura, A., Jr, Yang, C. -S., Tu, S. -M., Liu, C. -H. & Ito, Y. : GANN Monograph, **10**, 283 (1971).
61) Utsumi, K. R., Yoshida, T. O., Sekikawa, M. & Klein, G. : Scand. J. Immunol., **2**, 159 (1973).
62) Hosokawa, T., Ishimoto, A., Ito. Y. & Takasu, T. : GANN Monograph, **10**, 209 (1971).
63) Epstein, M, A. & Achong, B. G. : Lancet, **13**, 836 (1973).
64) Jondal, M., Holm, G. & Wigzell, H. : J. Exp. Med. **136**, 207 (1972).
65) Yata, J., Tsukimoto, I. & Tachibana, T. : Clin. Exp. Immunol., **14**, 319 (1973).
66) Yata, J., Detgranget, C., de The, G. & Tachibana, T. : Biomedicine, **19**, 479 (1973).
67) 高田 満, 岡田忠昭, 斉藤保二, 橘 武彦, 川村義明：第22回日本ウィルス学会総会，演説抄録，1038 (1974).
68) 水野文雄, 綾 隆夫, 大里外誉郎：第22回日本ウィルス学会総会，演説抄録，1039 (1974).
69) Pattengale, P. K., Smith, R. W. & Gerber, P. : Lancet, **14**, 93 (1973).
70) Janossy, G. & Greaves, M. F. : Clin. Exp. Immunol., **9**, 483 (1971).
71) 加藤征治, 粟屋和彦：第4回日本免疫学会総会記録，479 (1974).
72) Pope, J. H., Horne, M. K. & Scott, W. : Int. J. Cancer, **3**, 857 (1968).
73) Chang, R. S., Hsieh, M. & Blankenship, W. : J. Nat. Cancer Inst., **47**, 479 (1971).
74) Vonka, V., Benyesh-Melnick, M., & McCombs, R. M. : J. Nat. Cancer Inst., **44**, 865 (1970).
75) Reedman, B. M., Pope, J. H. & Moss, D. J. : Int. J. Cancer, **9**, 172 (1972).
76) Kaplan, J., Shope, T. C. & Peterson, Jr, W. D. : J. Exp. Med., **139**, 1070 (1974).
77) Tachibana, T. & Ishikawa, M. : Jap. J. Exp. Med., **43**, 227 (1973).
78) 山本興太郎, 松尾 巧, 大里外誉郎：第33回日本癌学会総会記事，464 (1974).
79) Burnet, M. : Immunological Surveillance, Pergamon Press, Oxford/London/New York/Toront/Sydney, (1969).
80) Stedman, E. & Stedman, E. : Nature, **166**, 780 (1950).

Abstract

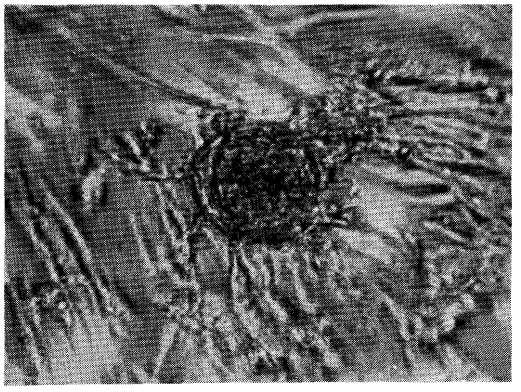
In order to investigate an etiological role of Epstein-Barr virus (EBV) in Nasopharyngeal carcinoma (NPC), a transfer of EBV-genome to cultured epithelial cells derived from Nasopharynx was attempted here. This transfer or infection of EBV is usually detected by immunofluorescent staining of EB viral capsid antigen (EB-VCA) or by more sensitive staining of EBNA (EBV-associated nuclear antigen) in EBV-infected cells.

24 sera from NPC or NPS (Nasopharyngeal sarcoma) patients were screened for the EBNA staining by ACIF (anti-complement immunofluorescence) test, using a frozen section material from a NPC patient and 16 cultured cell lines. 3 sera (NPC : 2 and NPS : 1) were, thus, selected for the experimental EBV infection. These 3 sera were determined to be useful from their positive EBNA stainings for NPC-tissues and EBV-carrying human lymphoblastoid cells (HLBC), or their negative ones for human epithelial cells and PHA (phytohemagglutinin)-transformed HLBC. Other 2 NPC sera of 24 sera gave either nuclear or cytoplasmic staining 10 of human epithelial cell lines except 2 non-human cell lines (VERO and THEL cells). This unique staining by 2 NPC sera appeared to be heterophilic rather than EBV-specific. Its heterophilic properties were also suggested by a precipitation test in agar between these sera and histone frcation etc..

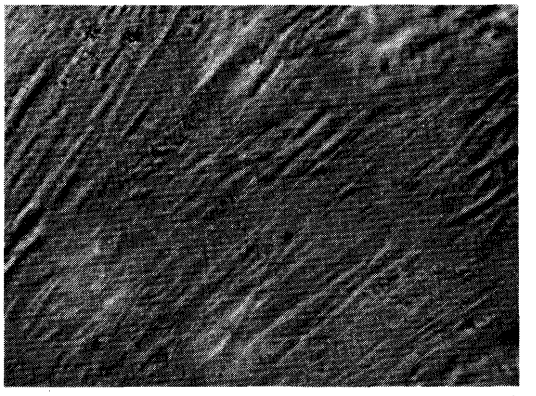
By this EBNA staining, the experimental infection of EBV extracted from P_3HR-1 cells on EBV-genome free HLBC (F_1L cells) was easily confirmed, while its infection on 3 human epithelial cells (2-27-Ad, HeL and HeK cells) was negative. Therefore, a mixed culture between P_3HR-1 or F_1LE (EBV-infected F_1L cells) and each of 3 epithelial cells was carried out in the presence of UV-inactivated HVJ (Sendai virus). This culture showed a formation of poly-nuclear giant cells, in which the EBNA staining of either epithelial or lymphatic nucleus was able to be identified. In 2-27-Ad cells, the EBNA staining of fused cells was found more frequently than those in other two cells, regardless of HVJ action. In every case, the fused cells between epithelial and lymphatic cells with the positive EBNA staining were hard to maintain and following 1~3 passages they disappeared within 9 days.

These results seemed to be clear evidence for the transfer of EBV-genome from EBV-carrying HLBC to human epithelial cells, showing a different efficiency of the transfer. Furthermore, they might suggest the possibility for a causal role of EBV in NPC, when it was considered that epithelial cells of NPC harboured the EBV-genomes demonstrated by EBNA using ACIF test.

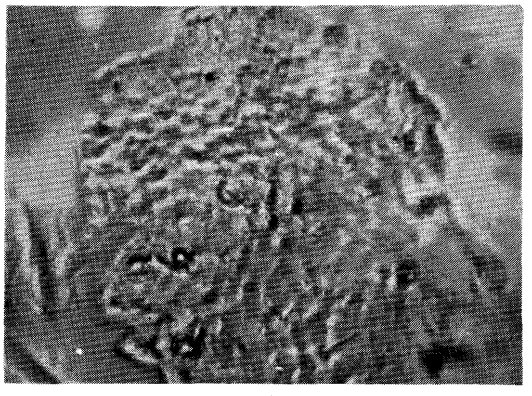
Photo. 1-4. Morphology of nasopharyngeal cells, 2-27-Ad cells, derived from adenoid tissues (×200)



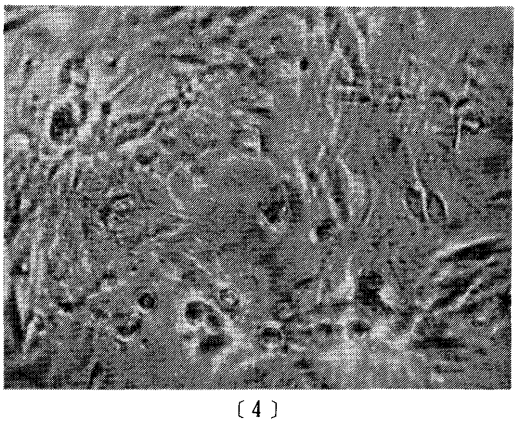
〔1〕



〔2〕



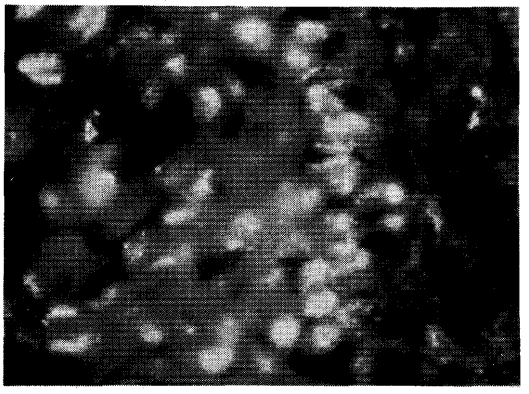
〔3〕



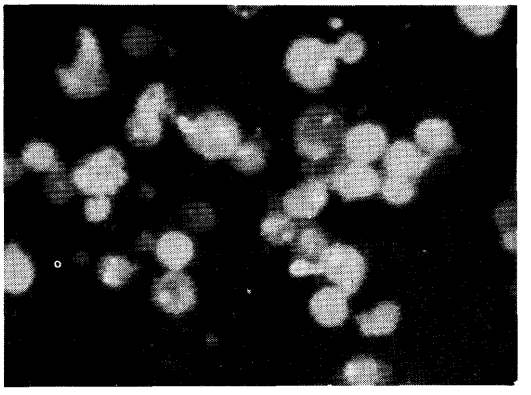
〔4〕

Photo. 1 : Growth of fibroblastlike cells from adenoid tissues fixed on glass surface at 3 days after in vitro culture
Photo. 2 : Monolayered fibroblastlike cells at 10 days after in vitro culture
Photo. 3 : Colony of epitheliallike cells appeared at 24 days (3rd passages) after in vitro culture
Photo. 4 : Monolayered epitheliallike cells, 2-27-Ad cells, at 30 days (4th passages) after in vitro culture

Photo. 5-6. ACIF test in NPC-tissue (EBNA positive staining with NPC-No. 1 serum, X800, Photo. 5) and in P3HR-1 cells (EBNA positive staining with NPC-No. 8 serum, X1200, Photo. 6)

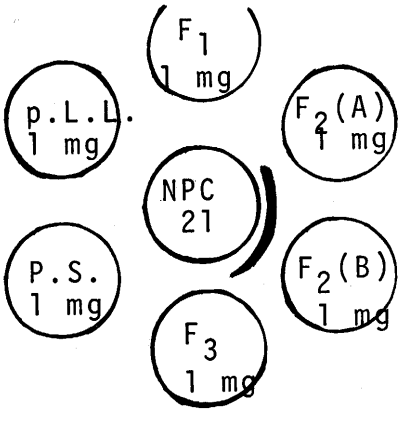


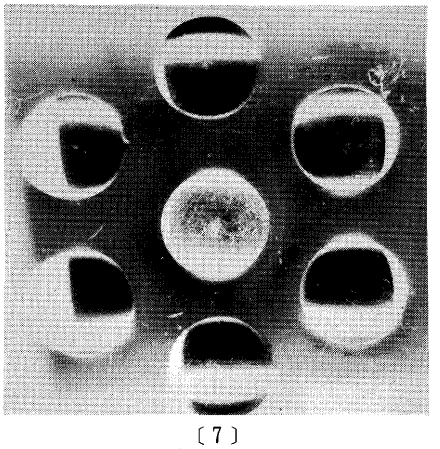
〔5〕



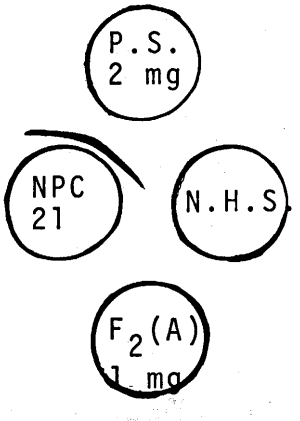
〔6〕

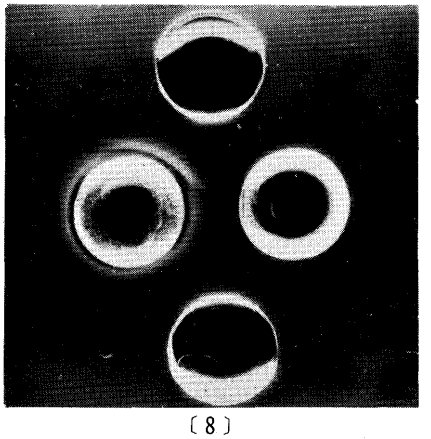
Photo. 7-9 Double immunodiffusion pattern between NPC-No. 21 or 12 serum and histone fraction of calf thymus



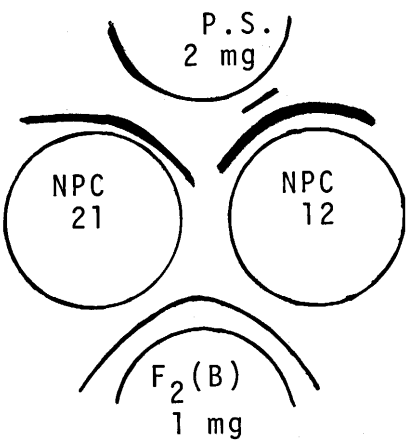


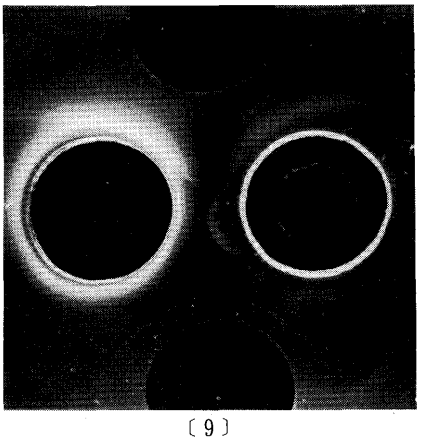
〔7〕





〔8〕





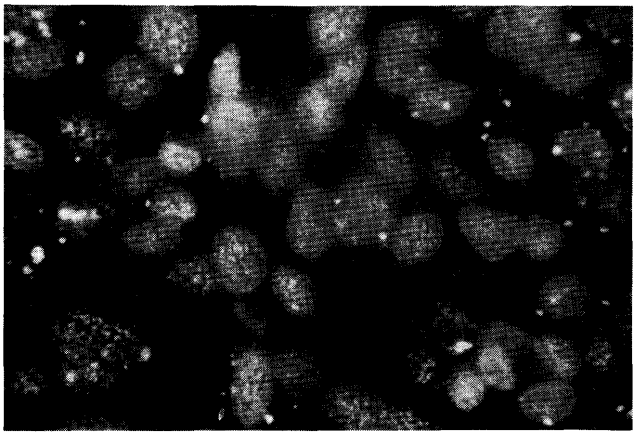
〔9〕

F_1, F_2(A), F_2(B), and F_3 : histone fractions of calf thymus
P.S. : protamine sulfate
P.L.L. : poly-L-lysine
NHS : normal human serum

Photo. 10-11. ACIF test in 2-27-Ad cells stained with NPC-No. 12 serum (cytoplasmic staining, X500, Photo.10) or with NPC-No. 21 serum (nuclear staining, X800, Photo. 11)



〔10〕



〔11〕

Photo. 12. Cell fusion of P_3HR-1 cells in the presence of UV-inactivated HVJ (X1,200)
EBNA positive staining with NPC-No.1

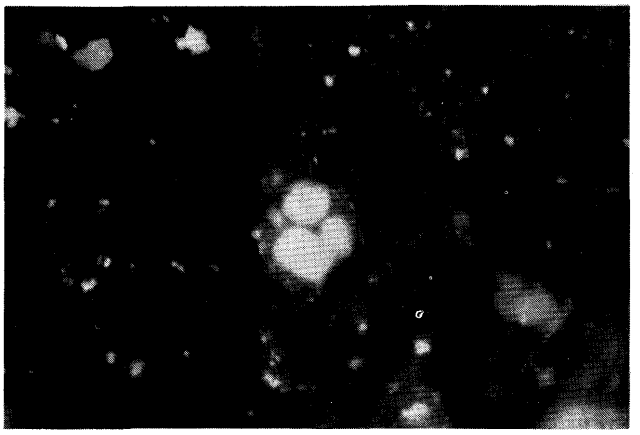


Photo. 13. ACIF test in cells fused between P_3HR-1 and 2-27-Ad cells Nuclear staining with NPC-No.1 serum (X800)
Cell fusion without UV-inactivated HVJ

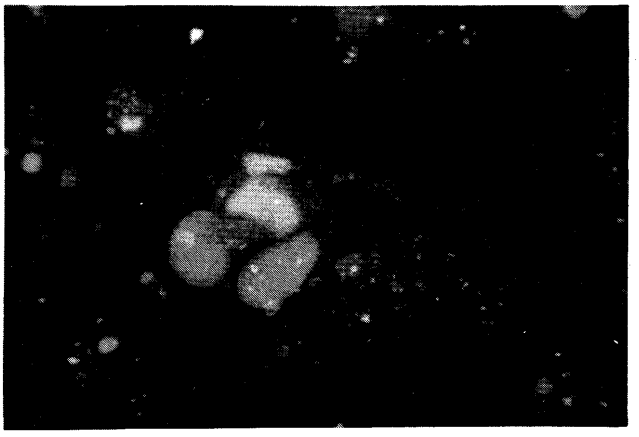


Photo.14. Cytoplasmic staining by ACIF test in nonfused 2-27-Ad cells cultured for 6 days after mixed culture (2-27-Ad : P_3HR-1 =1 : 10) without UV-inactivated HVJ (X800)
staining serum : NPC-No.1

