

# Biological Characteristics of Epstein-Barr Virus(EBV) Derived from Nasopharyngeal Carcinoma

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7864">http://hdl.handle.net/2297/7864</a>

## 上咽頭癌由来 Epstein-Barr virus (EBV) 株の生物学的特異性

金沢大学がん研究所ウイルス部 (主任: 波田野基一教授)

佐 藤 博

(昭和61年2月17日受付)

上咽頭癌初代培養細胞とヒトアデノイド由来上皮系細胞株との細胞融合により樹立化された, Epstein-Barr virus (EBV) 産生性上皮系細胞株 NPC-KT の産生するウイルス (NPC-KT ウイルス) 株の生物活性について検討した。この NPC-KT ウイルスは、臍帯血リンパ球 (cord blood lymphocytes, CBL) トランスフォーム活性、ウイルス早期抗原 (early antigen, EA) 誘導活性、及び細胞溶解活性の3つを併せ持っていた。従って、CBL の低力価 NPC-KT ウイルス感染は CBL をトランスフォームし、EBV 核内抗原陽性細胞株の樹立化をきたしたが、高力価 NPC-KT ウイルス感染では、CBL の DNA 合成を感染2日後に一旦上昇させ、その後感染 CBL の溶解をきたした。NPC-KT ウイルスの EA 誘導活性は、ジメチルスルホキシド添加により増強されたが EBV の一つの代表株: P3HR-1 ウイルス株では逆に阻害された。NPC-KT ウイルス感染により誘導される EA ポリペプチドはアクリルアミドゲル電気泳動法 (polyacryl amide gel electrophoresis, PAGE) では P3HR-1 ウイルスによるものと差はなかった。さらに、NPC-KT, P3HR-1 細胞内に合成されるウイルス構成抗原 (viral capsid antigen, VCA) も PAGE で差は認められなかった。しかし NPC-KT ウイルス遺伝子 DNA は EBV の他の代表株 B95-8 ウイルス株のものと明らかに異っていた。継代培養 60 代めの NPC-KT 細胞よりクローニングで得られた 6 株では、NPC-KT ウイルス産生能に著しい差が見られたが、トランスフォーム活性と、EA 誘導活性の比は常にほぼ一定であった。同時に NPC-KT ウイルス遺伝子 DNA の分析でも不均一性を示すバンドは検出されなかった。このことは、両活性が単一のウイルス粒子に由来する可能性を示唆していると思われた。

---

**Key words** EBV. トランスフォーメーション, 早期抗原誘導, 細胞溶解

---

Epstein-Barr virus (EBV) は 1964 年 Epstein とその協同研究者 Barr<sup>1)</sup>によりパーキットリンパ腫に見出された発癌性ヘルペスウイルスで、現在、パーキットリンパ腫、伝染性単核症、上咽頭癌発生への関与が示唆されている<sup>2)-3)</sup>。EBV はヒトの B 細胞を容易にトランスフォーム (正確には不死化, immortalization) することができ<sup>4)</sup>、マーマセットを実験動物としてこれにリンパ腫をひきおこし得る<sup>5)</sup>。現在、EBV 産生細胞株として一般に使用されているものは、パーキットリンパ腫由来 P3HR-1 細胞と伝染性単核症由来 EBV 持続感染マーマセットリンパ球 B95-8 細胞 (B95-8 細胞) の 2 株であるが、その産生されるウイルス株の生

物活性は著しく異っている。すなわち、P3HR-1 細胞の産生する EBV (P3HR-1 ウイルス) 株はトランスフォーム能力を喪失した欠陥ウイルスであり、EBV 持続感染 Raji 細胞 (Raji 細胞) 重感染により EBV 早期抗原 (early antigen, EA) を誘導するが<sup>6)</sup>、B95-8 細胞の産生する EBV (B95-8 ウイルス) 株はトランスフォーム活性のみを有するとされている<sup>7)</sup>。EBV は B リンパ球細胞指向性と考えられているが、上咽頭癌組織中の上皮系細胞内に EBV 核内抗原 (EBV related nuclear antigen, EBNA) 及びウイルス DNA が検出されている<sup>8)</sup>。しかし、これまで EBV 産生性上咽頭癌細胞の試験管内培養に成功した例はない。

---

Abbreviations: CBL, cord blood lymphocyte; CR, complement receptor; DMSO, dimethylsulfoxide; DMEM, Dulbecco modified Eagle's minimum essential medium; EA, early antigen; EAIU, EA inducing unit; EBNA, EBV related nuclear antigen; EDTA, ethylenediaminetetraacetate; EBV, Epstein-Barr virus; FITC, fluorescein isothiocyanate;

最近、滝元<sup>9)</sup>は上咽頭癌初代培養細胞とヒトアデノイド由来細胞株との細胞融合により EBNA 陽性の上皮系細胞株 NPC-KT を樹立した。著者は、滝元らとの協同研究<sup>10)11)</sup>により、NPC-KT 細胞が低温培養、ヨードデオキシウリジン (5-iodo-2-deoxy uridine, IudR) 処理により、EBV を高率に培養液中に放出することを見出した。本研究ではさらに NPC-KT 細胞産生 EBV (NPC-KT ウイルス) 株の特異性を P3HR-1、B95-8 ウイルス株と比較検討し、さらに EBV 感染と上咽頭癌発生機序の関連について考察を加えた。

### 材料および方法

#### I. 使用細胞と培養条件

NPC-KT 細胞は金沢大学医学部耳鼻咽喉科滝元徹博士より分与を受け、滝元<sup>9)</sup>の方法に準拠して培養調整を行った。すなわち、単層を形成した NPC-KT 細胞を 0.02% ethylenediaminetetraacetate (EDTA), 0.8% NaCl, 0.02% KCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 pH 7.2 で室温 5 分間処理後、分散した細胞を増殖培養液である 10% 牛胎児血清加 Dulbecco modified Eagle's minimum essential medium (DMEM) (日水, 東京) へ細胞濃度  $1.0 \sim 2.0 \times 10^5$  cells/ml になるよう調整して 34°C で増殖させた。Raji, B95-8, EBV 非感染 BJAB, EBV 持続感染 Daudi 各細胞は 10% 牛胎児血清加 Rosewell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) 培養液 (日水, 東京) を用い、 $1.0 \times 10^5$  cells/ml に調整し 37°C で増殖させ、P3HR-1 細胞は同培養液にて同様に 34°C で増殖させた。

#### II. NPC-KT 細胞のクローニング

継代培養 60 代めの NPC-KT 細胞、 $1 \sim 100$  cells/ml を 0.33% アガロース (マリンコロイド社, ロックランド) を含む 10% 牛胎児血清加 DMEM に浮遊し、直径 60 mm のプラスチックシャーレにて 37°C 10 日間培養した。その後生じたコロニーをパスツールピペットで採取し、さらに培養を行った。必要に応じて再クローニングを同様の方法で行った。

#### III. ウイルス液の調整

NPC-KT 細胞を IudR ( $60 \mu\text{g/ml}$ ) を含む 10% 牛胎児血清加 DMEM で 34°C 3 日間培養後、4% 牛胎児血清加 DMEM でさらに 7 日間培養して、培養液を集めた。この培養液は  $7,000 \times \text{g}$ , 20 分遠心して、その上清を孔径  $0.80 \mu\text{M}$  のメンブレンフィルター (タイプ

AA) (ミリポア, ベッドフォード) を用いて口過後、タイプ 21 ローター (ベックマン, カリフォルニア) で  $56,000 \times \text{g}$ , 2 時間超遠心し、その沈渣を培養液の約百分の一量の DMEM に浮遊後、ソニファイア SB-12 (ブロンソン, ダンベリ) により超音波処理 (50 ワット, 30 秒) により均質化したものを NPC-KT ウイルス濃縮液とした。B95-8 ウイルス濃縮液は 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) (シグマ, セントルイス) を含む 10% 牛胎児血清加 RPMI-1640 培地にて B95-8 細胞を 37°C 2 週間培養し、又 P3HR-1 ウイルス濃縮液は、TPA を含む同培養液で、P3HR-1 細胞を 34°C 1 週間培養後、夫々集めた培養上清より、同様の超遠心濃縮により調整した。

#### IV. ウイルス感染価の測定

##### 1. EA 誘導活性

EA 誘導活性は、Sairenji らの方法<sup>12)</sup>により、Raji 細胞を用いて測定した。Raji 細胞  $2.0 \times 10^6$  cells にウイルス液 1 ml を加え、37°C 2 時間吸着、DMEM で洗浄後、増殖用培養液で、37°C 48 時間培養した。この細胞をスライドグラスに塗抹し、室温で 10 分間アセトン固定後、上咽頭癌患者血清 (EA 抗体価, 1:160) を一次抗体として、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヒト免疫グロブリンウサギ血清を二次抗体とする蛍光抗体間接法にて、EA 陽性細胞数を算出して、EA inducing unit (EAIU) で表した。

##### 2. トランスフォーム活性

トランスフォーム活性 (transforming unit, TFU) は、Katsuki & Hinuma の方法<sup>13)</sup>に準じて行った。すなわち、臍帯血リンパ球 (cord blood lymphocyte, CBL),  $1.0 \times 10^7$  cells に 1 ml の 10 倍段階希釈ウイルス液を加え、37°C 2 時間吸着させ、DMEM で洗浄後、20% 牛胎児血清加 RPMI-1640 培養液にて  $2.0 \times 10^6$  cells/ml に浮遊した。その 0.2 ml ずつを 96 穴マイクロプレート (メンク, ロスキルデ) の各穴に注入、2~4 週間後の細胞凝集塊のコロニー形成より、TFU を算出した。

##### 3. DNA 合成

ウイルス感染により促進される細胞 DNA 合成の測定は、上述のマイクロプレートに各時間毎に  $0.4 \mu\text{Ci}$  の  $^3\text{H}$ -チミジン (アマーシャム, アマーシャム) を加え、4 時間後にガラスフィルターに細胞を吸着させ、 $^3\text{H}$ -チミジンの取込みを液体シンチレーションカウンター

IudR, 5-iodo-2'-deoxy uridine; K, kilodaltons; kb, kilobases; PAA, phosphonoacetic acid; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; RPMI-1640, Rosewell Park Memorial Institute-1640; TFU, transforming unit; TPA, 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate; VCA, viral capsid antigen.

LS9000 (ベックマン, カリフォルニア) で測定した。

#### V. コロニー形成阻害試験と中和試験

##### 1. コロニー形成阻害試験

EBV のコロニー形成阻害試験は, Rocchi らの方法<sup>14)</sup> に準じて行った。すなわち Raji 細胞  $2.0 \times 10^5$  cells にウイルス液 0.1 ml を加え  $37^\circ\text{C}$  2 時間吸着させた後, DMEM で洗浄して,  $5.0 \times 10^3$  cells を  $20 \mu\text{l}$  の 0.5% アガロースを含む 20% 牛胎児血清加 RPMI-1640 培地にて培養した。この培養には 96 穴マイクロプレートを用い, アガロースが固化後  $200 \mu\text{l}$  の 20% 牛胎児血清加 RPMI-1640 培地を加え,  $37^\circ\text{C}$  7 日間培養して得られるコロニー数を顕微鏡下にて測定した。

##### 2. 中和試験

中和試験には EBV を十分の一量の非働化上咽頭癌患者血清又は EBV 抗体陰性健康人血清と  $4^\circ\text{C}$  2 時間反応させた。これらの血清のウイルスキャプシド抗原 (virus capsid antigen, VCA) に対する抗体価はそれぞれ  $1:640$ ,  $< 1:5$  であった。その後この反応 EBV についてコロニー形成阻害試験と EAIU 測定を行った。

#### VI. EBNA 染色

EBNA 染色は Reedman と Klein の方法<sup>15)</sup> により FITC 標識抗ヒト補体抗体を用いた蛍光抗体補体法で行った。

#### VII. dimethylsulfoxide (DMSO) 誘導の Raji 細胞 DNA 合成及び蛋白合成阻害の測定

$2.0 \times 10^5$  cells の Raji 細胞を容積比 1%, 3% の DMSO を含む又は含まない 2 ml の増殖培地で 24 時間培養後,  $1 \mu\text{Ci}$  の  $^3\text{H}$ -チミジン又は  $5 \mu\text{Ci}$  の  $^{35}\text{S}$  メチオニン (アマーシャム, アマーシャム) で 4 時間標識した。その後ガラスフィルターに細胞を吸着させ, 液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

#### VIII. 免疫沈降法及びポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

$^{35}\text{S}$ -メチオニン標識細胞 ( $5.0 \sim 20 \times 10^5$  cells) を 1 ml の 0.5% Nondiet P-40, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 0.25 mM ジチオスレイトール含有 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で  $4^\circ\text{C}$  1 時間可溶化後,  $5.000 \times \text{g}$ , 20 分間遠心し, その上清に上咽頭癌患者血清又は EA 抗体陰性, VCA 抗体陽性健康人血清 (EA 抗体価,  $< 1:5$ , VCA 抗体価,  $1:160$ ) を  $2 \mu\text{l}$  加え, 14 時間反応させた。  $20 \mu\text{l}$  のプロテイン A セファローズ (ファーマシア, ウプラザ) にて抗原抗体複合物を回収して, 可溶化緩衝液で 4 回洗浄後, Laemmli の方法<sup>16)</sup> にて PAGE を行った。さらにゲルを乾燥後, X 線

フィルム X-Omat AR フィルム XAR-5 (コダック, ニューヨーク) でオートラジオグラフィを行った。分子量マーカーとしては, 標識ミオシン, フォスホリラーゼ, 牛血清アルブミン, 卵白アルブミン (アマーシャム, アマーシャム), 分子量は各々 200, 92.5, 69, 46 kilodaltons (k) を用いた。

#### IV. ウイルス遺伝子 DNA の解析

ウイルス遺伝子 DNA はサザンブロッティング法<sup>17)</sup> にて行った。濃縮 NPC-KT 及び B95-8 ウイルスを, さらに 10% から 30% のデキストラン T10 (ファーマシア, ウプラザ) を用いた密度勾配遠心法により, SW55Ti ローター (ベックマン, カリフォルニア) で  $76,000 \times \text{g}$ , 1 時間遠心後, ウイルスのバンドをパスツールピペットで吸引することにより精製した。精製ウイルスを  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のプロテイナーゼ K (シグマ, セントルイス), 0.5% サルコシルを含む 200 mM EDTA (pH 7.4) 中で  $50^\circ\text{C}$ , 5 時間消化後, フェノール抽出を 2 回行い, ウイルス DNA を得た。ついで,  $0.1 \mu\text{g}$  のウイルス DNA を 20 単位の DNA 制限酵素 EcoRI, Bam HI (宝, 京都) で  $37^\circ\text{C}$ , 2 時間消化後, 0.4%, 0.6% アガロースゲルにて各々電気泳動を行った。このゲルを 0.6 M, NaCl を含む 0.2 N NaOH で 30 分間処理後, 0.6 M NaCl を含む 0.2 M, Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で中和した。その後, ウイルス DNA をニトロセルロース膜に移し,  $80^\circ\text{C}$ , 5 時間熱処理後,  $^{32}\text{P}$  標識 NPC-KT ウイルス DNA と  $65^\circ\text{C}$ , 14 時間ハイブリダイズさせ, オートラジオグラフィにて検出した。プローブは  $0.1 \mu\text{g}$  の NPC-KT ウイルス DNA を  $100 \mu\text{Ci}$  の  $^{32}\text{P}$ -dCTP (アマーシャム, アマーシャム) を用いたニックトランスレーションにより標識したものをを用いた。B95-8 ウイルス DNA の EcoRI, Cam HI 消化による断片の記号は, Heller ら<sup>18)</sup> の報告に従った。DNA の長さの標準には, Hind III 消化  $\lambda$  ファージ DNA 断片, 各々 23.3, 9.3, 6.5, 4.3, 2.2, 1.9 kilobases (kd) を用いた。

#### 成 績

##### I. NPC-KT 細胞のクローニング

継代培養 60 代めの NPC-KT 細胞をクローニングし, ウイルス産生能に差のある 6 クローンの細胞を選んだ。これら 6 クローンはいずれも上皮系の形態を示し, 形態学的差異は相互にはほとんど認められなかった。また細胞増殖能にも著しい差はなかった。

そこで, 6 クローンを IudR 処理することにより産生される NPC-KT ウイルスの EAIU と TFU を互いに比較した (表 1)。最も産生能の高い cl. 6 と最も低い cl. 5 では EAIU 及び TFU で約 400~500 倍の差が

Table 1. Virus yield from 6 clones of NPC-KT cells

clone of NPC-KT cells	Activity of NPC-KT virus* produced by each clone	
	TFU/ml	EAIU/ml
cl. 1	$1.0 \times 10^6$	$4.2 \times 10^3$
cl. 2	$3.3 \times 10^3$	$1.8 \times 10^3$
cl. 3	$5.0 \times 10^3$	$1.1 \times 10^3$
cl. 4	$5.0 \times 10^3$	$8.5 \times 10^2$
cl. 5	$1.0 \times 10^3$	$5.2 \times 10^2$
cl. 6	$5.0 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$

\* Each clone of NPC-KT cells ( $5.0 \times 10^5$  cells/ml) was treated with IudR ( $60 \mu\text{g/ml}$ ) for 2 days at  $34^\circ\text{C}$ , and then incubated further in growth medium containing 4% fetal calf serum for 7 days. Culture supernatants were assayed for transforming and EA-inducing activities expressed as TFU/ml and EAIU/ml, respectively.

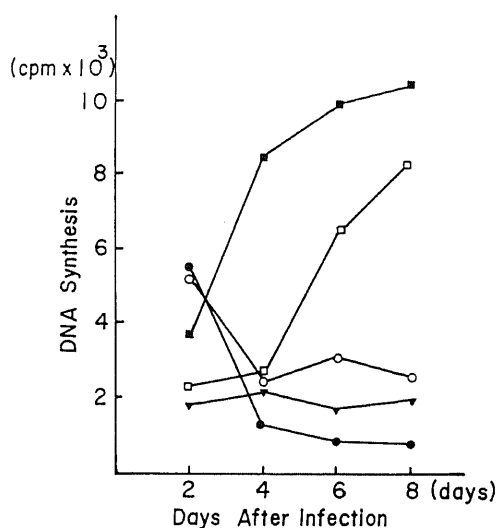


Fig. 1. Stimulation of DNA synthesis in CBL by infection with various dilutions of NPC-KT virus. CBL ( $1.0 \times 10^7$  cells) were exposed to 1 ml of various dilutions of NPC-KT virus stocks ( $1.0 \times 10^6$  TFU/ml and  $2.7 \times 10^5$  EAIU/ml) (undiluted,  $\bullet$ — $\bullet$ — $\bullet$ ;  $10^{-1}$ ,  $\circ$ — $\circ$ — $\circ$ ;  $10^{-2}$ ,  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ — $\blacksquare$ ;  $10^{-4}$  dilutions,  $\square$ — $\square$ — $\square$ ; mock-infected,  $\blacktriangledown$ — $\blacktriangledown$ — $\blacktriangledown$ ). Incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine was determined after varying times post-infection.

あったが、各クローン産生ウイルスのEAIUとTFUの比はおおむね一定であった。最もウイルス産生能の高いcl. 6を再クローニングして、cl. 61を得、以後の実験にはこのcl. 61を用いた。

## II. NPC-KT ウイルス感染 CBL の運命

NPC-KT ウイルス感染によるCBLのDNA合成及びトランスフォーメーションについて、感染ウイルス濃度差から、感染多重度の影響を検討した。図1のように $1.0 \times 10^6$  EAIU,  $2.7 \times 10^5$  TFUのウイルス及びその十分の一のウイルスを $1.0 \times 10^7$  cellsのCBLに感染させると、DNA合成は2日後に顕著に上昇したが、その後低下した。その際細胞は2日後には一旦凝集塊を形成し、その後溶解を起した。しかしウイルス液を百分の一( $10^{-2}$ )又は一万分の一( $10^{-4}$ )に希釈して同数のCBLに感染させると、ウイルス量に応じてDNA合成が上昇した。またCBL細胞は凝集塊を形成し最終的にEBNA陽性のトランスフォーム細胞株が樹立化された。

これに比べて、B95-8 ウイルス感染ではいずれの濃度( $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^6$  TFU)でも細胞の溶解はみられず、すみやかにトランスフォーム細胞株が樹立化された。また、P3HR-1 ウイルス ( $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^6$  EAIU) 感染CBLではトランスフォーム細胞株は樹立化されなかった。

## III. NPC-KT ウイルスの Raji 細胞への重感染

Raji細胞にNPC-KT ウイルスを重感染させ、EBVのEA誘導と軟寒天中でのコロニー形成能をP3HR-1ウイルスによるものと比較した(表2)。この際Raji細胞の自発的EA発現は0.01%以下、コロニー形成率は3.1%であった。NPC-KT ウイルスをRaji細胞に重感染させると、24時間後に、細胞は肥大化し、13.6%の細胞にEAが誘導された。このNPC-KT ウイルス重感染Raji細胞のコロニー形成率は、非感染Raji細胞に比較して94.8%の低下をみた。一方、P3HR-1 ウイルス重感染Raji細胞ではEA陽性細胞出現率は

45.0%で、コロニー形成低下率は85.2%であった。

これらEA誘導とコロニー形成率の低下がEBV重感染によることを確認するために、抗EBV抗体陽性上咽頭癌患者血清を用いて中和試験を行った。その結果、NPC-KTウイルスによるEA陽性細胞出現率は、14.0%から3.0%へコロニー形成低下率は94.8%から23.9%へと減少した。さらに、P3HR-1ウイルスによるそれらは、45.0%から9.1%へ、また85.2%から21.9%へとそれぞれ減少した。しかし抗EBV抗体陰性健康人血清では顕著な減少はみられなかった。

#### IV. NPC-KTウイルスのRaji細胞重感染によるEA誘導に対するDMSOの効果

DMSOのEA誘導に及ぼす影響を調べる前に、DMSOのRaji細胞DNA合成、蛋白合成に対する効

果を検討した。表3に示したように、1%及び3%のDMSOはRaji細胞のDNA合成を共に30%以上阻害した。一方、蛋白合成は1%DMSOで影響を受けなかったが、3%DMSOでは30%以上阻害された。

DMSOのEA誘導に及ぼす影響は、NPC-KT又はP3HR-1ウイルス重感染Raji細胞をDMSO存在又は非存在下で培養し、感染48時間後に、EA陽性細胞を測定することにより検討した。表4に示したように0.5%~3%DMSOは非感染Raji細胞の自発的EA発現をごくわずかに上昇させた。3%より高濃度のDMSOは細胞毒性が強く、使用できなかった。NPC-KTウイルス重感染Raji細胞を1%DMSO存在下で培養すると、EA誘導はDMSO非存在下に比して、10倍以上増強されたが、P3HR-1ウイルスによるEA誘

Table 2. EA induction and colony reduction after superinfection of Raji cells with NPC-KT and P3HR-1 viruses\*

Virus infected	Number of colonies formed	Colony reduction ratio (%)	Ratio (%) of EA-positive cells
Mock	155	0	< 0.01
NPC-KT virus	8	94.8	13.6
NPC-KT virus treated with EBV-positive serum	118	23.9	3.0
NPC-KT virus treated with EBV-negative serum	17	89.0	9.7
P3HR-1 virus	23	85.2	45.0
P3HR-1 virus treated with EBV-positive serum	121	21.9	9.1
P3HR-1 virus treated with EBV-negative serum	39	74.8	49.2

\* Raji cells ( $2.0 \times 10^5$  cells) were exposed to NPC-KT virus ( $1.0 \times 10^4$  TFU and  $3.4 \times 10^3$  EAIU), P3HR-1 virus ( $1.0 \times 10^4$  EAIU), or virus treated with human EBV antibody-positive and negative serum.

Table 3. Effect of DMSO on DNA and protein synthesis of mock-infected Raji cells\*

Concentration of DMSO (%)	DNA synthesis		Protein synthesis	
	cpm	Inhibition ratio (%)	cpm	Inhibition ratio (%)
0	17460	0	27330	0
1	11916	31.8	28184	-3.1
3	11785	32.5	18666	31.7

\* Mock-infected Raji cells ( $2 \times 10^5$  cells) were cultured in 2 ml of growth medium with or without DMSO for 24 hr, and then labeled with  $^3\text{H}$ -thymidine or  $^{35}\text{S}$ -methionine for 4 hr.

Table 4. Effect of DMSO on EA induction by infection with P3HR-1 and NPC-KT viruses\*

Kind of cell	Concentration of DMSO (%)	Ratio (%) of EA-positive cells		
		None	P3HR-1 virus	NPC-KT virus
Raji**	0	<0.01	1.5	0.86
	0.5	0.15	1.1	6.5
	1.0	0.35	0.95	11.4
	3.0	0.11	0.80	1.9
Daudi**	0	<0.01	0.55	0.25
	0	0.08	0.51	1.26
BJAB**	0	<0.01	0.48	0.15
	1.0	<0.01	0.40	0.47

\* Raji, Daudi or BJAB cells ( $2 \times 10^5$  cells) were mock-infected or infected with P3HR-1 or NPC-KT virus and incubated in the presence or absence of DMSO. EA-positive cells were determined 48 hr after infection.

\*\* P3HR-1 virus or NPC-KT virus was infected with  $7.5 \times 10^3$  or  $4.3 \times 10^3$  EAIU, respectively.

\*\*\* P3HR-1 virus or NPC-KT virus was infected with  $2.2 \times 10^5$  or  $6.1 \times 10^4$  EAIU, respectively.

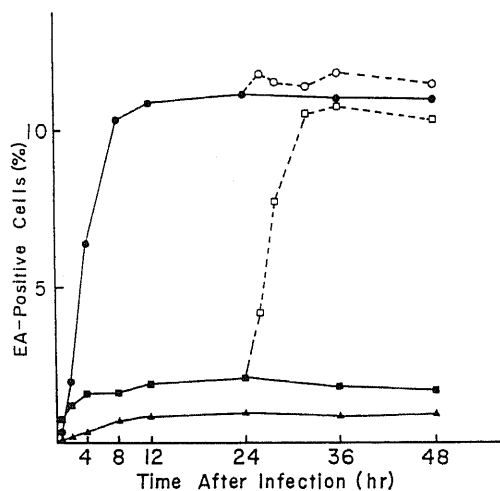


Fig. 2. Time course of EA induction by NPC-KT virus in the presence or absence of DMSO. Raji cells ( $2.0 \times 10^5$  cells) superinfected with  $1.7 \times 10^8$  EAIU of NPC-KT virus were incubated in the presence (1%,  $\bullet$ — $\bullet$ — $\bullet$ ; 3%,  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ — $\blacksquare$ ) or absence ( $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ) of DMSO. At 24hr after infection, DMSO-containing medium was replaced with medium free from the drug (absence of 1% DMSO,  $\circ$ — $\circ$ — $\circ$ ; absence of 3% DMSO,  $\square$ — $\square$ — $\square$ ) or not.

導は 1% DMSO によりむしろ阻害された。しかし、3% DMSO 存在下では、NPC-KT ウイルスによる EA 誘導は顕著には増強されなかった。

EBV による EA 誘導、及びそれへの DMSO 効果

は、他の EBV 持続感染細胞である Daudi 細胞と非感染細胞である BJAB 細胞においても検討した。NPC-KT ウイルス及び P3HR-1 ウイルス重感染により Daudi 細胞に誘導される EA 陽性細胞出現に対する効率率は Raji 細胞のその約三分の一であった。そして NPC-KT ウイルス感染による EA 誘導のみが 1% DMSO により約 5 倍増強された。BJAB 細胞は NPC-KT, P3HR-1 ウイルスによる EA 誘導がさらに低率であったが、NPC-KT ウイルス感染による EA 誘導のみが 1% DMSO 存在下で約 3 倍増強された。

DMSO の EA 誘導増強効果の機構を解析するために、NPC-KT ウイルス重感染 Raji 細胞を DMSO 存在、非存在下で培養し、EA 陽性細胞数を経時的に測定した (図 2)。NPC-KT ウイルス重感染 Raji 細胞の EA 陽性細胞率は 1% DMSO 存在、非存在下にかかわらず、感染 12 時間後に最高値に達した。1% DMSO による増強効果は培養時間にかかわらず常にほぼ一定であった。前述のように 3% DMSO は NPC-KT ウイルスによる EA 誘導に顕著な効果は示さなかったが、ウイルス重感染後、24 時間 3% DMSO 存在下で培養し、その後培養液中より DMSO を除くと、EA 陽性細胞率はその 8 時間後、1% 存在下のレベルまで上昇した。しかし、1% DMSO を NPC-KT ウイルス重感染 24 時間後、培養液中より除いても、それ以上の効果はみられなかった。P3HR-1 ウイルスによる EA 誘導はこのような操作を行っても、起らなかった。また Raji 細胞をウイルス重感染以前に DMSO 処理しても EA 誘導効果はみられなかった。

### V. NPC-KT ウイルスの Raji 細胞重感染により誘導される EA ポリペプチドの PAGE 分析

NPC-KT 又は P3HR-1 ウイルス重感染 Raji 細胞を 3% DMSO 存在, 非存在下で 12 時間培養後, DMSO 非存在下で  $50 \mu\text{Ci/ml}$  の  $^{35}\text{S}$ -メチオニンで 10 時間標識し, 可溶化後, 抗 EBV 抗体反応沈降物を PAGE 分析した. 非感染 Raji 細胞,  $3.8 \times 10^4$  EAIU/ $5.0 \times 10^5$  cells の P3HR-1 ウイルス重感染 Raji 細胞 (EA 陽性細胞率, 7.5%) では DMSO 処理, 未処理にかかわらず, EBV 特異的ポリペプチドは検出されなかった (図 3). NPC-KT ウイルスを上述の P3HR-1 ウイルス重感染にほぼ等しい条件 (DMSO 未処理時の EA 陽性細胞率, 7.5%) ( $3.8 \times 10^4$  EAIU/ $5.0 \times 10^5$  cells) で重感染した場合, DMSO 未処理では EA ポリペプチドは検出されなかったが, DMSO 処理により EA 陽性細胞率はほぼ 100% となり, PAGE により EA

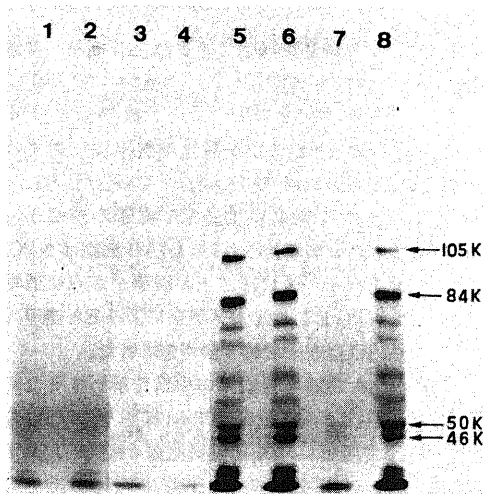


Fig. 3. PAGE analysis of EA induction by NPC-KT and P3HR-1 viruses in the presence or absence of DMSO. Raji cells ( $5.0 \times 10^5$  cells) mock-infected or superinfected with NPC-KT virus or P3HR-1 virus were incubated in the presence or absence of 3% DMSO for 12hr and then in medium without the drug containing  $40 \mu\text{Ci/ml}$   $^{35}\text{S}$ -methionine for further 10hr. Mock infected Raji cells without DMSO (lane 1), with DMSO (lane 2), Raji cells superinfected with P3HR-1 virus ( $3.7 \times 10^4$  EAIU) without DMSO (lane 3) or with DMSO (lane 4), Raji cells superinfected with P3HR-1 virus ( $4.8 \times 10^5$  EAIU) without DMSO (lane 5) or with DMSO (lane 6), Raji cells superinfected with NPC-KT virus ( $3.8 \times 10^4$  EAIU) without DMSO (lane 7) or with DMSO (lane 8).

ポリペプチドのバンドが明白に検出された.  $4.8 \times 10^5$  EAIU/ $5.0 \times 10^5$  cells の P3HR-1 ウイルス重感染では処理, 未処理にかかわらず (EA 陽性細胞率はそれぞれ 88%, 95%) EA ポリペプチドが検出された. NPC-KT ウイルス, P3HR-1 ウイルス重感染により Raji 細胞に誘導される EA ポリペプチドは, PAGE によれば両者間に全く差がみられなかった.

### VI. IudR 処理により NPC-KT 及び P3HR-1 細胞に誘導される EA, VCA ポリペプチドの PAGE 分析

IudR 処理により NPC-KT 細胞に誘導されるウイルス特異的 EA, VCA ポリペプチドを免疫沈降法及び PAGE で P3HR-1 細胞のものと比較した (図 4). EA 抗体陽性, VCA 抗体陽性血清では EA, VCA ポリペプチドが検出され (レーン 1, 2) EA 抗体陰性, VCA 抗体陽性血清では VCA ポリペプチドのみが検出され

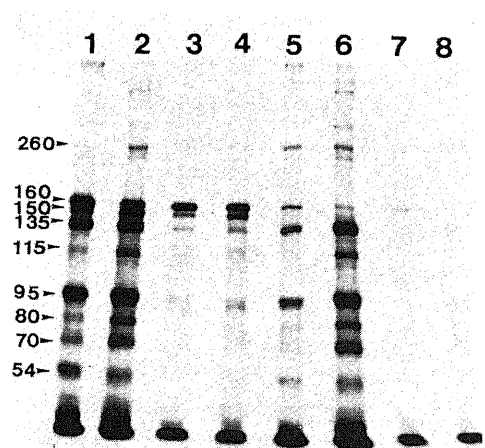


Fig. 4. PAGE analysis of virus antigens induced in P3HR-1 and NPC-KT cells by IudR. NPC-KT and P3HR-1 cells were cultured in the presence of IudR for 3 days, and then labeled with  $50 \mu\text{Ci/ml}$  of  $^{35}\text{S}$ -methionine for 48hr in the presence or absence of  $50 \mu\text{M}$  phosphonoacetic acid (PAA). Lanes 1 and 2, P3HR-1 and NPC-KT cells immunoprecipitated by the serum positive in antibodies against EA and VCA, respectively; 3 and 4, P3HR-1 and NPC-KT cells precipitated by the serum negative in antibody against EA but positive in antibody against VCA, respectively; 5 and 6, PAA-treated P3HR-1 and NPC-KT cells precipitated by the serum positive in antibodies against EA and VCA, respectively; 7 and 8, PAA-treated P3HR-1 and NPC-KT cells precipitated by the serum negative in antibody against EA but positive in antibody against VCA, respectively.



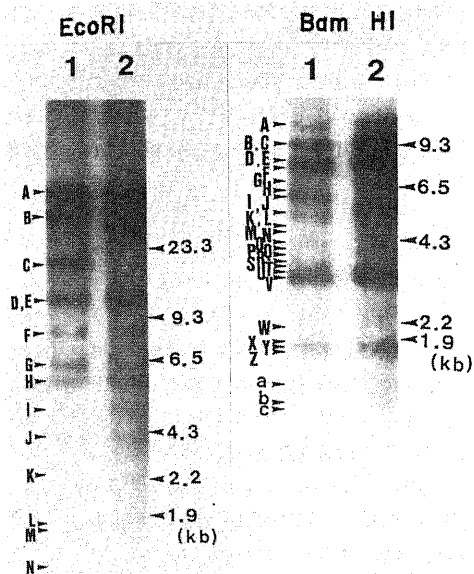


Fig. 5. Southern blot analysis of genome DNA of B95-8 and NPC-KT viruses. Genome DNAs of B95-8 (lane 1) and NPC-KT (lane 2) viruses digested by EcoRI or Bam HI were transferred to nitrocellulose filters and hybridized with  $^{32}$ P-labeled genome DNA of NPC-KT virus.

た。さらに、50  $\mu$ M phosphonoacetic acid (PAA) 処理ではウイルス DNA 合成が阻害されるため VCA の合成は起こらないので PAA 処理を行った細胞では、EA 抗体陽性、VCA 抗体陽性血清で EA ポリペプチドのみが検出され(レーン 5, 6), EA 抗体陰性、VCA 抗体陽性血清ではウイルス特異的ポリペプチドは沈降しなかった(レーン 7, 8)。レーン 1, 3, 5, 7 は P3HR-1 細胞、レーン 2, 4, 6, 8 は NPC-KT 細胞である。

これらいずれも、EA ポリペプチドとして 260, 135, 115, 95, 80, 70, 54 k のバンドが、また VCA ポリペプチドとして 160, 150 k のバンドが両細胞で特に強く検出された。両細胞間では、合成されるウイルス抗原の量比に若干の差が認められるが、各ポリペプチドの PAGE の移動度には全く差が認められなかった。

#### VII. ウイルス遺伝子 DNA の比較

NPC-KT ウイルス遺伝子 DNA を B95-8 ウイルスのものと比較した(図 5)。EcoRI 消化による B95-8 ウイルスの 7.4 kb の C 断片は、NPC-KT ウイルス DNA ではみられず、かわって 28 kb のバンドが新たに検出されたが、他のバンドは全て一致した。また、DNA の不均一性を示唆するようなマイナーバンドも検出されなかった。一方 Bam HI 消化では G~L 断片

の領域にいくつかの違いがみられたが、どの断片によるものか同定できなかった。

#### 考 察

EBV のヒト感染は、バーキットリンパ腫、伝染性単核症、上咽頭癌などの発生に密接な因果関係があるとされている<sup>11-13)</sup>が、その詳細な機序は未だ解明されていない。本研究で用いた NPC-KT 細胞及び同細胞産生 EBV は、従来の P3HR-1 及び B95-8 両細胞又はそれら由来の EVB と異なり、上咽頭癌由来と考えられる<sup>9)</sup>。故に EVB の上咽頭癌発生への関連を直接解明するには、現在、最も適切な実験系と考えられる。この NPC-KT 細胞の表面マーカーとして、表面免疫グロブリン、Fc レセプター、OKB1, B2, 補体レセプター (complement receptor, CR) 1, EBV のレセプターと考えられている CR2 など、B リンパ球関連のものは陰性であり、従って NPC-KT 細胞は EVB 感染 B リンパ球との融合細胞である可能性は一応否定された(未発表データ)。この細胞の産生する NPC-KT ウイルスのウイルス特異的 EA, VCA ポリペプチドは、PAGE でみる限り、P3HR-1 ウイルスのそれらとほぼ完全に一致し、構造的には、従来の EBV とほぼ同じと思われる。一方、B95-8 ウイルス構造蛋白では、一部糖蛋白に違いがあるが、これは糖鎖による修飾がヒトとマウスで異なるためと考えられている<sup>10)</sup>。

しかしながら、NPC-KT ウイルスは、P3HR-1 ウイルスのもつ Raji 細胞重感染による EA 誘導及び細胞溶解活性と、B95-8 ウイルスのもつ高いリンパ球トランスフォーム活性の両活性を併せもつという従来の EBV にはない特異な生物活性を有していることが判明した。しかも遺伝子 DNA の制限酵素消化による解析では、この NPC-KT ウイルス DNA は従来のウイルス産生性及び非産生性細胞のウイルス DNA<sup>10)</sup>のいずれとも異なる DNA 構造を有する新種のウイルスであることが見出された。さらに、継代培養 60 代めの NPC-KT 細胞よりクローニングして得られた 6 株は、いずれもウイルス産生量に大きな違いがあるにもかかわらず、EA 誘導活性とトランスフォーム活性の比は常にほぼ一定の値を示していた。また、これクローニング細胞の IudR 処理及び低温培養により産生されるウイルス量は各々異ったが、両活性の比は常に一定であった。ウイルス DNA の解析でも不均一性を示すバンドは検出されなかったことなどから、単一ウイルスが両活性を担っている公算は大きい。今後遺伝子 DNA の詳細な解析などにより、さらに検討の余地が残されている。

NPC-KT ウイルスは P3HR-1 ウイルスと同様に

Raji細胞重感染によりEAを誘導するが、この活性はP3HR-1ウイルスと異なりDMSOにより10倍以上増強された。DMSOの培養細胞及びウイルス感染に及ぼす影響には多くの報告がある。EBVに関して、Laroccaら<sup>19)</sup>はDMSOがP3HR-1細胞内のEBV DNA合成を促進すること、また菅原ら<sup>20)</sup>はDMSOがP3HR-1ウイルス重感染によるEA誘導を阻害することなどを報告している。本研究では、DMSOがNPC-KTウイルス重感染Raji細胞のEA発現を10倍以上増強するにもかかわらずP3HR-1ウイルスによるEA誘導は菅原らの報告のようにやや阻害された。1% DMSOはRaji細胞のDNA合成を阻害するが、蛋白合成には影響がなく、3% DMSOではこれらは共に阻害された。そのために3% DMSO存在下で、EA合成は顕著には増強されなかったが、薬物除去後に強い増強効果がみられた。したがってDMSOはEA誘導過程の蛋白合成以前の段階に作用していると考えられる。かかるDMSOの作用機序として、NPC-KTウイルスは上皮系細胞より産生されるため、そのウイルス被膜構造がリンパ球由来のP3HR-1ウイルスと異なることが関与していると思われる。すなわち、リンパ球細胞Rajiへの吸着後の侵入過程にNPC-KTウイルスは若干障害を認めるが、DMSOが細胞膜の流動性を高めることにより、NPC-KTウイルスの細胞内侵入を容易ならしめている可能性が考えられる。もう一つの可能性として、DMSOにより宿主細胞機能に変化が生じ、細胞内阻害因子が弱められた結果、より多くのNPC-KTウイルス感染細胞がEA合成過程へ入ることなどが考えられる。

EBVはリンパ球をトランスフォームする能力を持ったB細胞指向性ウイルスと考えられている。したがって、EBVの上皮系細胞への感染過程には不明の点が多い。Sixbeyら<sup>21)</sup>は伝染性単核症患者の咽頭ぬぐい液中のEBVは直接ヒト上皮系細胞へ感染、増殖するが、B95-8ウイルスは高濃度のものでも感染しなかったと報告している。また、彼らはこれら咽頭ぬぐい液の口腔内上皮系細胞内にEBV DNAを検出し、咽頭ぬぐい液中のEBVはこの上皮系細胞由来であると結論している。これらの結果は上皮系細胞由来のウイルスは、リンパ球由来のリンパ球指向性ウイルスとは宿主域にも違いがある可能性を示唆している。既に述べたように、NPC-KT細胞表面にはEBVのレセプターと考えられているCR2は検出されず、またP3HR-1、B95-8、NPC-KTウイルスのNPC-KT細胞への吸着も起こらないことより、上咽頭癌へ移行するEBV感染上皮系細胞へのEBV感染成立様式には不明の点が多い。またEBVはBリンパ球を不死化すると共に、

ウイルスDNAのトランスフェクションにより上皮系細胞をも不死化することが証明されている。しかし現在までのところ、EBV自体に細胞がん化能力及びがん遺伝子(oncogene)等は発見されておらず、今後その上皮系細胞への感染成立様式と共に解明されるべき課題と考えられる。

## 結 論

上咽頭癌初代培養細胞とヒトアデノイド由来上皮系細胞株との細胞融合により得られたEBV高産生性上皮系細胞株NPC-KTより産生されるウイルス(NPC-KTウイルス)の生物学的活性について以下の成績を得た。

1. NPC-KT細胞産生ウイルスはB95-8ウイルスのもつ高いヒトリンパ球トランスフォーム活性とP3HR-1ウイルスのもつRaji細胞重感染によるEBVのEA誘導能を併せもっていた。

2. NPC-KTウイルスは上記活性と共に細胞溶解活性を持つため、ヒトリンパ球に高濃度ウイルスを感染させると、リンパ球DNA合成は一過性に上昇した後、細胞は溶解した。しかし低濃度ウイルス感染ではすみやかにトランスフォーム細胞株が樹立化された。

3. NPC-KTウイルスによるEA誘導活性はDMSOにより強く増強されたが、P3HR-1ウイルスでは逆に阻害された。DMSOはNPC-KTウイルスによるEA誘導の蛋白合成以前の段階に作用していたと思われる。

4. NPC-KT及びP3HR-1ウイルスのRaji細胞重感染により誘導されるEAポリペプチドはPAGEでみる限り差がなかった。同様にIudR処理によりNPC-KT及びP3HR-1細胞内に合成されるウイルス蛋白にも差はみられなかったことから、両ウイルスは構造的にもほぼ同じであると考えられた。しかし、NPC-KTウイルス遺伝子DNAは従来のEBVのいずれとも異なる制限酵素消化断片を有していた。

5. NPC-KT細胞よりクローニングした6株間には、そのウイルス産生能には著しい差がみられるにもかかわらず、そのNPC-KTウイルスのトランスフォーム活性と、EA誘導活性の比は常に一定であった。また、NPC-KTウイルスDNA中にも不均一性を示すようなバンドは検出されないことより、両活性が単一のウイルスによる可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました波田野基一教授に心からの謝意を表します。またNPC-KT細胞を分与していただくと共に終始、御協力を賜りました金沢

大学耳鼻咽喉科滝元徹博士に深謝します。さらに御協力を賜りましたががん研究所ウイルス部の諸先生方に感謝します。

本研究の一部は、国際ヘルペスウイルスシンポジウム(昭和60年)、第33回日本ウイルス学会総会(昭和60年)で発表された。

## 文 献

- 1) Epstein, M. A., Achong, B. G. & Barr, Y. M.: Virus particles in cultured lymphoblasts from Barkitt's lymphoma. *Lancet*, **1**, 702-703 (1964).
- 2) Henle, G., Henle, W. & Diehl, V.: Relation of Burkitt tumour associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **59**, 94-101 (1968).
- 3) Henle, W., HO, J, H, C., Henle, G. & Kwan, H. C.: Antibodies to Epstein-Barr virus related antigens in nasopharyngeal carcinoma. Comparison of active cases and long term survivals. *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**, 1398-1412 (1973).
- 4) Pope, J. H., Horne, M. K. & Scott, W. : Transformation of fetal human leukocytes *in vitro* in filtrates of a human leukemic cell line containing herpes-like virus. *Int. J. Cancer*, **3**, 857-866 (1968).
- 5) Shope, T., Dechairo, D. & Miller, G.: Malignant lymphoma in cotton-top marmosets after inoculation with Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **70**, 2487-2491 (1973).
- 6) Hinuma, Y., Kohn, M., Yamaguchi, J., Wudarski, D. J., Blakeslee, J. R. & Grace, J. T. Jr.: Immunofluorescence and herpes-type virus particles in the P3HR-1 Burkitt lymphoma cell line. *J. Virol.*, **1**, 1045-1051 (1967).
- 7) Miller, G., Robinson, J., Heston, L. & Lipman, M.: Difference between laboratory strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection and interference. *Pro. Natl. Acad. Sci.*, **71**, 4006-4010 (1974).
- 8) Wolf, H., zur Hausen, H. & Becher, Y.: EB virus genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature New Biol.*, **244**, 245-257 (1973).
- 9) Takimoto, T, Kamide, M. & Umeda, R.: Establishment of Epstein-Barr virus (EBV)-associated nuclear antigen (EBNA)-positive nasopharyngeal carcinoma hybrid cell line (NPC-KT). *Arch. Otorhinolaryngol.*, **239**, 87-92 (1984).
- 10) Takimoto, T., Ogura, H., Sato, H., Umeda, R. & Hatano, M.: Isolation of transforming and early antigen-inducing Epstein-Barr virus from nasopharyngeal carcinoma hybrid cells (NPC-KT). *J. Natl. Cancer Inst.*, **74**, 57-59 (1985).
- 11) Sairenji, T. & Hinuma, Y.: Assay of Epstein-Barr virus by immunofluorescence. *Gann*, **64**, 633-636 (1973).
- 12) Takimoto, T., Ogura, H., Sato, H. & Hatano, M.: A new strains of Epstein-Barr virus derived from nasopharyngeal carcinoma hybrid cells. *Gann*, **75**, 947-949 (1984).
- 13) Matsuki, T. & Hinuma, Y.: Characteristics of cell line derived from human leukocytes transformed by different strains of Epstein-Barr virus. *Int. J. Cancer*, **15**, 203-210 (1975).
- 14) Rocchi, G., Hewetson, J., Henle, W. & Hjsqj, G.: Antigenic expression and colony formation of lymphoblastoid cell lines after superinfection with Epstein-Barr virus. *J. Natl. Cancer Inst.*, **50**, 307-314 (1973).
- 15) Reedman, B. M. & Klein, G.: Cellular localization of an Epstein-Barr virus associated complement-fixing antigen in producer and nonproducer lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Cancer*, **11**, 499-520 (1973).
- 16) Laemmli, U.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, **227**, 680 (1970).
- 17) Southern, E. M.: Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
- 18) Heller, M., Dambaugh, T. & Kieff, E.: Epstein-Barr virus DNA IX. Variation among viral DNAs from producer and nonproducer infected cells. *J. Virol.*, **38**, 632-648 (1981).
- 19) Miller, G., Coope, D., Niederman, J. & Pagano, J.: Biological properties and viral surface antigens of Burkitt lymphoma- and mononucleosis-derived strains of Epstein-Barr virus released from transformed marmoset cells. *J. Virol.*, **18**, 1071-1080 (1976).
- 20) Edson, C. M. & Thorely-Lawson, D. A.: Epstein-Barr virus membrane antigens: Characterization, distribution, and strain differences. *J. Virol.*, **39**, 172-184 (1981).
- 21) Larocca, D., Homisak, D. & Clough, W.: Synthesis of hypomethylated Epstein-Barr viral

DNA is stimulated by dimethylsulfoxide treatment of lymphoblastoid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 559-565 (1981).

22) 菅原健二・柳瀬杉夫・伊藤洋平: Dimethylsulfoxide 及び類似の極性化合物による EB ウイルス誘発の特異的阻害. 第 3 2 回日本ウイルス学会総会, 演説抄録, **67**, (1984).

23) Sixbey, J. W., Versterinen, E. H., Nedrud, J.

G., Raab-Traub, N., Walton, L. H. & Pagano, J. S.: Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. *Nature (London)*, **306**, 480-483 (1983).

24) Griffin, B. E. & Karran, L.: immortalization of monkey epithelial cells by specific fragments of Epstein-Barr virus DNA. *Nature (London)*, **309**, 78-82 (1984).

**Biological Characteristics of Epstein-Barr Virus (EBV) Derived from Nasopharyngeal Carcinoma** Hiroshi Sato, Department of Virology, Cancer Research Institute, Kanazawa University 920 — *J. Juzen Med. Soc.*, **95**, 268-278 (1986)

**Key words:** EBV, nasopharyngeal carcinoma, transformation, EA-induction, cytolysis

#### Abstract

The present study was pursued to examine biological activities of Epstein-Barr virus (EBV) which was produced by epithelioid hybrid cell line (NPC-NT) newly established by the fusion of primary nasopharyngeal carcinoma epithelioid cells with the epithelioid cells derived from the human adenoid tissue. NPC-KT cells highly produced unique EBV (NPC-KT virus) with properties to transform cord blood lymphocytes (CBL), and to induce viral early antigens (EA) and cytolysis. Infection to CBL with low concentrations of NPC-KT virus induced the cells to form EBV-nuclear antigen-positive continuous cell lines. However, the CBLs exposed to higher doses of virus showed increase of DNA synthesis 2 days after infection, followed by cell lysis. EA-induction by NPC-KT virus was stimulated by dimethylsulfoxide, but that by P3HR-1 virus, another strain of EBV, was inhibited by the drug. EA polypeptides induced by superinfection of Raji with NPC-KT and P3HR-1 viruses were undistinguishable by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Viral structural proteins produced in NPC-KT and P3HR-1 cells were also undistinguishable by SDS-PAGE. However, genome DNA of NPC-KT virus was apparently different from those of EBVs of other strains. Six clones of NPC-KT cells cloned at 60th passages showed different virus-producing ability, but the ratio of transforming unit to EA inducing unit was nearly constant. Further viral DNA analysis did not indicate the presence of minor molecule, showing no heterogeneity of the virus. These data suggest the possibility that a single clone of virus has both transforming and EA-inducing activities.