

# ヒヒ細胞内在性C型ウイルス持続感染ヒト胎児肺由来線維芽細胞の性状

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/2297/8963">http://hdl.handle.net/2297/8963</a>

## ヒヒ細胞内在性C型ウィルス持続感染 ヒト胎児肺由来線維芽細胞の性状

金沢大学大学院医学研究科ウィルス学講座 (主任: 波田野基一教授)

神 谷 茂

(昭和57年1月9日受付)

ヒト胎児肺細胞 (Human Embryonic Lung fibroblasts: HEL) を用いて, ヒヒ内在性ウィルス (Baboon Endogenous Virus: Ba E V) 持続感染に伴う細胞生物学的性状を調べた。Ba E V 感染から130日, 細胞寿命が尽きるまで, 安定な Ba E V 持続感染細胞 (H E L B E) が維持され, この期間中細胞変性効果やトランスフォーム等の形態変化は認められなかった。mass culture での細胞増殖には H E L, H E L B E 両細胞間で差異は全くみられなかった。しかし, Ba E V 持続感染により, sparse culture でのコロニー形成率 (Plating Efficiency: PE) は, 非感染対照の約 1/10 に低下した。持続感染及び非感染細胞由来の 'conditioned medium' 中で培養することにより, H E L B E 細胞の PE は非感染細胞のレベルにまで回復され, Ba E V 持続感染による成長促進因子の産生や活性化の低下が示唆された。H E L B E 細胞での染色体変化, 他種ウィルス増殖許容性, コラーゲン合成能を検索したところ, H E L 細胞のそれとほぼ同様の結果を得た。SV-40 によるトランスフォーム率では Ba E V 持続感染による若干の上昇をみたが, 他のトランスフォーム因子 (化学発がん物質処理, 放射線照射など) によるトランスフォーメーションには影響はなかった。従って, 本ウィルスは一般に持続感染によりヒト細胞の生物学的活性に著明な変化を与えずに, 細胞と共存し内在化するものと思われた。

**Key words** Human Embryonic Lung fibroblasts, Baboon Endogenous Virus, plating efficiency, in vitro transformation

ヒヒ内在性ウィルス (Baboon Endogenous Virus, 以下 Ba E V と略) は Kalter ら<sup>1)</sup>によりヒヒ胎盤中より電顕的に見だし, 感受性細胞と胎盤組織とを混合培養することにより感染性ウィルスとして分離された<sup>2)</sup>。このウィルスは, 逆転写酵素 (Reverse Transcriptase, 以下 RT と略) をもち電顕的に C 型の形態をとり, ヒヒ細胞 DNA とハイブリッド形成が可能である。ヒヒよりもヒトにより近縁な羊毛猿やギボンからもレトロウィルスが検出されているが<sup>3)4)</sup>, これらは細胞内在性ではなく, Ba E V がヒトに最も近縁な内在性レトロウィルスであるといわれている。Ba E V の相補性 DNA をプローブとして霊長類細胞 DNA とハイブリッド形成を行なった結果, 旧世界ザルとホモロジーをもち, 新世界ザルやヒトとは 4% 程度のホモロジー

しかもたなかった<sup>5)</sup>。またヒト DNA はアジア起源のオラウタンやギボンと同程度に Ba E V の c-DNA と反応することより, ヒトの起源はアジアの猿類であろうといわれている<sup>6)</sup>。ヒト腫瘍組織や細胞株からレトロウィルス様粒子の検出されたとの報告は多いが<sup>7)~10)</sup>, 確実にヒト由来と決定されたものはない。これらのレトロウィルスの多くは BaEV 核酸と部分的ホモロジーをもつことから<sup>11)12)</sup>, ヒトの発がん BaEV との関連が注目されて来た。BaEV はヒヒ自身の細胞では増殖できないが, 他種の細胞 (ヒト, イヌ, コウモリ, ブタ) で増殖できる xenotropic なウィルスである。ヒトの細胞に感染後, RT により二本鎖 DNA となり, 8.6~9.0 kb の genome<sup>13)</sup> が完全な形で (colinear) ヒト DNA に組み込まれていく。一倍体あたり 1~2 個の

Characteristics of Human Embryonic Lung Fibroblast Cells Persistently Infected with Baboon Endogenous Type C Virus. Shigeru Kamiya, Department of Virology (Director: Prof. M. Hatano), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

プロウイルスがコピーされ、その染色体上の位置として6番<sup>14)</sup>又は19番<sup>15)</sup>が想定されている。

このようにBaEVのヒト細胞への感受性がしられ、更にヒト腫瘍細胞由来レトロウイルスとの相補性が問題とされているが、ヒト正常細胞におけるBaEVの感染病理に関する研究は少ない。そこでヒト生体への感染のin vitroモデルとして、ヒト正常胎児肺線維芽細胞を用いて、BaEV持続感染のもたらす細胞生物学的变化を、細胞増殖能、染色体変化、他種ウイルス増殖許容性、コラーゲン合成能などの点から検討した。さらにBaEV感染とがん化との関係を知るため、化学発がん物質処理、X線照射、及び発がんウイルス感染等を用いてin vitro transformation assayも試みた。

## 材料と方法

### I. 使用細胞

ヒト胎児肺線維芽細胞 (Human Embryonic Lung fibroblasts, 以下HELと略) は、在胎5ヶ月男児肺を石川県立中央病院産婦人科矢吹博士より分与され、トリプシン分散にて初代培養を行なった。継代は、0.25%トリプシン分散後1:2のsplitで行ないその度にpopulation doubling level (以下PDLと略)を1ずつ増した。A204細胞<sup>16)</sup>(ヒト横紋筋肉腫由来細胞株)及びA204BE細胞(BaEV持続感染の上記細胞)は慶大高野博士より分与を受けた。培地は10%仔牛血清加ダルベッコ変法イーグルMEM培地(日水)を用い、37°Cで培養した。BHK-21細胞(ハムスター腎由来)の仔牛血清濃度は2%とした。

### II. ウイルス

BaEV (M7株)はA204BE細胞の培養上清を低速遠心後ミリポアフィルター(0.45 $\mu$ , Millipore Co.)で濾過し、-80°Cに保存したものを用いた。VSV (Vesicular Stomatitis Virus, New Jersey株) HSV-1 (Herpes Simplex Virus type-1, HF株)はBHK-21細胞で増殖させたものを用いた。SV-40 (Simian Virus-40, 777株)は東大医科研小田博士より分与を受けた。

### III. 逆転写酵素活性の測定

BaEVの定量はBaEVの保有する逆転写酵素 (Reverse Transcriptase, 以下RTと略)活性の測定に依った。Lieberら<sup>17)</sup>の方法により、液交換後24時間の培養上清を12,000g10分遠心し細胞成分を除き、上清を20%グリセロール(0.05M Tris-HCl(pH 8.0), 0.1M KCl含む)上に重層し105,000g, 90分の超遠心を行なった。沈査を0.1mlのTND緩衝液(0.05M Tris-HCl(pH 8.0) 0.10M NaCl 10<sup>-3</sup>M dithiothreitol)に懸濁した。酵素活性の測定はSarinら<sup>18)</sup>の方法に準じ

て行なった。ウイルス液40 $\mu$ lに1%NP-40.10 $\mu$ lを加え、水中10分静置後、反応混合液(100mM Tris-HCl(pH 8.0), 80mM KCl, 4mM dithiothreitol, 2mM Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 0.02A<sub>260</sub>poly(rA)<sub>n</sub>oligo(dT)<sub>12-18</sub>(PL Biochemical Co.), 2.5 $\mu$ ci <sup>3</sup>H-dTTP (16.6Ci/mmol, New England Nuclear))50 $\mu$ lを加え、37°C1時間反応させた。150 $\mu$ lの1N過塩素酸を添加後急冷(0°C)し反応を止めた。キャリアーとして仔牛胸腺DNA(1mg/ml Sigma Co.)を100 $\mu$ l加え混合し水中にて10分静置した。H<sub>2</sub>O 0.3ml加え低速遠心後沈査を100 $\mu$ lの0.2N NaOHに溶かし更に3mlの10%TCAを加え水中にて20分静置した。反応液をフィルター(Whatman Co.)上に集め10%TCAにて3回洗浄し乾燥させた。シンチレーション液を加え、酸不溶性画分へ取り込まれた<sup>3</sup>H-TMPのpmole数をcultureあたりに換算しRT活性とした。またInfectious unitの測定は、Tamuraら<sup>19)</sup>の方法に準じた。単層培養されたHEL細胞に段階希釈したBaEVを2時間吸着感染させ、トリプシン分散後1:2splitで継代培養し、感染後8日(継代2回)の培養上清を採り、RT活性を測定し0.3pmoleの<sup>3</sup>H-TMPの取り込みを示す希釈度の逆数をTCID (Tissue culture Infecting Dose)とした。

### IV. 免疫蛍光法 (Immune Fluorescence: IF)

濃縮したBaEV (624ml $\rightarrow$ 1.5ml)を10~50%蔗糖密度勾配に重層し、SW-27ローターにて26,000rpm2時間超遠心分画し、各分画についてRT活性を測定し、RTのピークの画分を集め、同様の超遠心操作を繰り返し部分精製されたBaEVを得た。この分画を家兎腹腔内に4回(1週毎)、耳静脈に1回、Freund's complete adjuvantと共に接種し(総蛋白量34.7mg)、最終接種から7日目に採血し抗BaEV血清を得た。仔牛血清アセトン末、A204細胞、HEL細胞と吸収させ、IFに供した。カバースリップに培養された細胞をアセトンにて固定し(-20°C10分、末固定標本では省略)、抗BaEV血清(1:50)と37°C30分反応させ、PBS洗浄後、FITC標識ヤギ抗ウサギ $\gamma$ s-r-globulin (Hyland Co.)1:20と37°C30分反応させ、蛍光顕微鏡下にて検鏡した。

### V. ヘマトキシリンエオジン染色

カバースリップに単層培養された細胞を95%エタノールにて10分固定後、ヘマトキシリン液にて5分染色し水洗する。1%エオジン液にて3分染色し純エタノールで3回脱水後キシロール処理しピオライトにて封入した。

### VI. 染色体標本の作成

Moorhead<sup>20)</sup>らの方法に準じた。対数増殖期の細胞に

コルセミド (Gibco Co.) を  $0.5 \mu\text{g/ml}$  に添加し  $37^\circ\text{C}$  7 時間前処理した。トリプシン分散後、低張処理し、(1%クエン酸ナトリウム, 10分), 水中にて Carnoy 液(氷酢酸:メタノール=1:3)で固定する。3回新鮮な固定液に替えてから 50%アルコールに浸したスライドグラス上に細胞懸濁液を 2~3 滴、滴下し速やかにガスバーナーにより乾燥させた(flame-drying)。染色は 10%ギムザ液(Merck Da.)にて 20分行ない鏡検した。そのモード、性、染色体異常の判定には 100 個の metaphase の細胞を観察した。mitotic index は 1,000 個の細胞中の metaphase の割合を、4 倍体比は 500 個の metaphase 中の 4 倍体の割合をそれぞれ百分率で求めた。

### VII. 細胞増殖の観察

#### 1. Mass culture での細胞増殖

単層培養された細胞をトリプシン分散し、60 mm シャーレあたり  $5.0 \times 10^6$  個を植え込み 5%  $\text{CO}_2$  下  $37^\circ\text{C}$  で培養した。24 時間毎培地交換し経時的に細胞数を白血球算盤にて計測した。3 枚のシャーレの平均値をとった。

#### 2. Sparse culture での細胞増殖

60 mm シャーレあたり  $10^2 \sim 10^3$  個の細胞を植え込み、1 週後培地交換し 2 週後にメタノール固定し 10%ギムザ液にて染色した(20分)。直径 2 mm 以上でかつ密集したコロニーを 1 コロニーとして数え、5 枚のシャーレの平均値をとった。コロニー形成率(Plating Efficiency, 以下 P E と略)は次式より得た。

$$P E = \frac{\text{形成されたコロニー数}}{\text{植え込んだ細胞数}}$$

また Ba E V 持続感染細胞の P E の変化をみるため相対的コロニー形成率(Relative Plating Efficiency, 以下 R P E と略)を次式により得た。

$$R P E = \frac{\text{Ba E V 持続感染 H E L 細胞の P E}}{\text{H E L 細胞の P E}}$$

#### 3. 細胞寿命の観察

単層培養された H E L 細胞 (5~10 P D L) に Ba E V を  $37^\circ\text{C}$  2 時間吸着させトリプシン分散後、培養瓶 ( $18 \text{ cm}^2$ ) あたり  $2.5 \times 10^5$  個の細胞を植え込み培養を続けた。細胞寿命が尽きるまで継代してゆき、継代毎細胞数を測定し次式より累積増殖数 ( $C_k$ ; cumulative growth number) を算定した。

$$C_k = \sum_{i=1}^k \log \frac{x_i}{2.5 \times 10^5}$$

$X_i$ : 継代  $i$  代目での細胞数

#### 4. Conditioned Medium の調整

定常期(培養 5~9 日)に入った細胞を用いた(細胞

密度  $1.3 \sim 1.6 \times 10^5/\text{cm}^2$ )。培地交換後 24 時間の培養液を採り、低速遠心後  $4^\circ\text{C}$  に保存し Conditioned Medium (以下 C M と略) とした。

### VIII. 他種ウイルスの感染

H E L 細胞及びその Ba E V 持続感染細胞に low m.o.i. (multiplicity of infection) で H S V - 1 ( $1.3 \times 10^{-5}$  pfu/cell) 及び V S V ( $6.8 \times 10^{-4}$  pfu/cell) を感染させ、経時的に培養上清を採り低速遠心後  $-80^\circ\text{C}$  に保存した。plaque assay には B H K - 21 細胞を用い、ウイルス吸着後 2% 牛血清 MEM 培地を含む 0.9% 寒天 (V S V) 又は 0.3% アガロース (H S V - 1) を重層し、 $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  下 2 日間培養し形成されたブラック数を計測し、その yield とした。

### IX. コラーゲン合成量の測定

コラゲナーゼを用いた Peterkofsky<sup>21)</sup>らの方法に基づき、実験手技は組織培養に適した Schwarz ら<sup>22)</sup>の方法に準じた。培養 1 日目(対数増殖期)及び 7 日目(定常期)の細胞に  $50 \mu\text{g/ml}$  アスコルビン酸ナトリウム、 $20 \mu\text{g/ml}$   $\beta$ -アミノプロピオニトリル、(2, 3- $^3\text{H}$ ) -プロリン ( $24.9 \text{ Ci/mmole}$ , NEN)  $10 \mu\text{Ci/ml}$  を加え  $37^\circ\text{C}$  3 時間培養した。Na O H を  $0.25 \text{ M}$  に加え  $0^\circ\text{C}$  10 分静置した後、毛細ピペットで攪拌し更に 26 ゲージ注

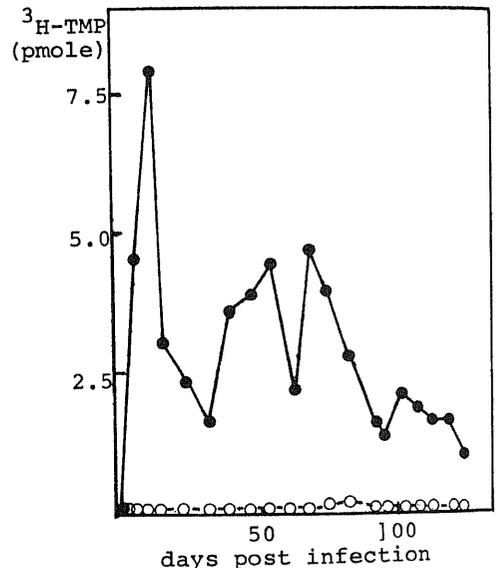


Fig. 1. Reverse Transcriptase (RT) activity in culture supernatants of HELBE (—●—) and HEL (···○···) cells. Culture supernatants were harvested at 24 hours after the last medium change. RT activity was expressed as pmole of  $^3\text{H}$ -TMP incorporated into acid-insoluble radioactivity per culture.

射針で5回吸引し反応に供した。反応液は0.8 mlのbuffer A (0.1M NaCl, 0.01M Tes (N-Trishydroxymethylmethyl-2-amino-ethane sulfonic acid) pH 7.2, 0.001M CaCl<sub>2</sub>, 1% (W/V) proline), 0.4 mlの0.5M Tes (pH 7.2), 0.1 mlの1M HClに0.5 mlの試料を加えた。0.25 mlずつの混合液を分注し、試験管Aにbuffer A, 試験管Bにはコラゲナーゼ25単位 (Advance Biofacture Co., Form III), 試験管CにはPronase (科研, 1 mg/ml, 50 μl) を入れ37°C 1時間反応させた。10% TCA 1 mlにて反応を停止させ、フィルター (Whatman Co.) 上に集め2% TCAで3回洗浄した。シンチレーションカウンターにて酸不溶性放射活性を測定した。合成された蛋白に対するコラーゲンの比率は次式より導いた。

$$\% \text{ collagen} = \frac{(A-C) - (B-C)}{A-C} \times 100$$

$$= \frac{A-B}{A-C} \times 100$$

(A, B, Cは各試験管内測定 c. p. m. 値)

また相対的なコラーゲン合成量の補正は Diegelmannら<sup>23)</sup>による次式に依った。

$$\begin{aligned} \text{relative \% collagen} &= \\ & \frac{\text{collagen} \times 100}{\text{non-collagenous protein} \times 5.4 + \text{collagen}} \\ & = \frac{(A-B) \times 100}{\{(A-C) - (A-B)\} \times 5.4 + (A-B)} \end{aligned}$$

9~10個のデータの平均値をその合成量とした。

## X. 形質転換 (transformation) の観察

### 1. 化学発がん物質による処理

2×10<sup>6</sup>個/ml に調整した細胞に4-ニトロキノリン-Nオキシド (4NQO, 和光), N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG, 和光) をそれぞれ0.1 μg/ml, 0.2 μg/mlの濃度で37°C30分処理し、シャーレあたり5×10<sup>5</sup>個の細胞を植え込んだ。1週毎その1部を1:4に継代し4週以上培養し、形質転換の発現を観察した。

### 2. X線照射

対数増殖期の細胞に200~600 radの線量のX線を照射し(東芝KXC-18型, 54 rad/min), 更に培養を続け定常期になった後1:4に継代し、以後1週毎に継代し45日間観察を続けた。

### 3. SV-40による感染

対数増殖期の細胞をトリプシンにて分散し、5×10<sup>6</sup>個の細胞を1 mlの培養液に懸濁し、これにSV-40 1 ml (3×10<sup>8</sup> pfu/ml) を加え、ポリアロマーチューブ中で37°C2時間感染させた。そしてシャーレあたり5×10<sup>4</sup>個の細胞を植え込み、週2回培地交換しながら24日間培養を続けフォーカスの形成を観察した。

## 成 績

### I. BaEV持続感染ヒト胎児肺線維芽細胞細胞の

#### 樹立化

単層培養されたHEL細胞(7PDL)にウィルス吸着性を増すため、25 μg/ml DEAE-dextran (Pharmacia Co.)で37°C30分前処理した。洗浄後BaEV 0.5 mlを37°C2時間吸着させた(m.o.i.=5×10<sup>-5</sup> TCID<sub>50</sub>/cell)。対照として、A204細胞の培養上清を接種した。洗浄後トリプシンにて分散し、1:2に継代培養し、1~2継代毎に培養上清を採取し、RT活性を測定した。BaEV感染細胞では感染後7日で4.2 pmole, 14日で8.1 pmoleの高いRT活性を認め、BaEVの増殖がみられた。以後130日まで0.94~4.90 pmoleの高いRT活性を示す安定なBaEV増殖が窺われた (Fig.1)。非感染細胞のRT活性は全経過を通じ全く認められず、Panemら<sup>24)</sup>の報じたHEL細胞由来のレトロウィルスは著者の場合検出されなかった。

その後世代時間の延長、細胞の拡大化、細胞集団の

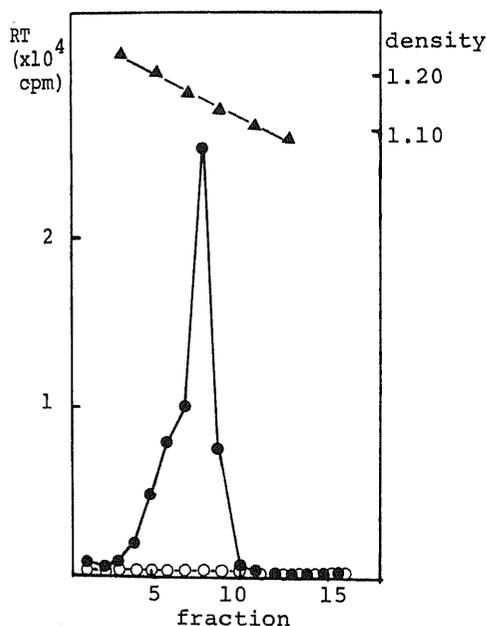


Fig. 2. Reverse Transcriptase (RT) activity in fractions by sucrose gradients ultracentrifugation of culture supernatants of HELBE (—●—) and HEL (---○---) cells. Sucrose density of each fraction was plotted together (—▲—).

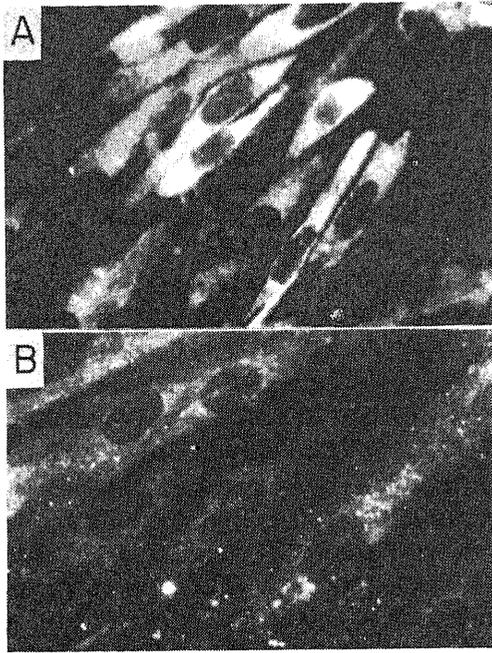


Fig. 3. Immunofluorescence of HELBE 16-9 (A) and HEL 16 (B) cells stained with anti-BaEV rabbit serum (1:50).

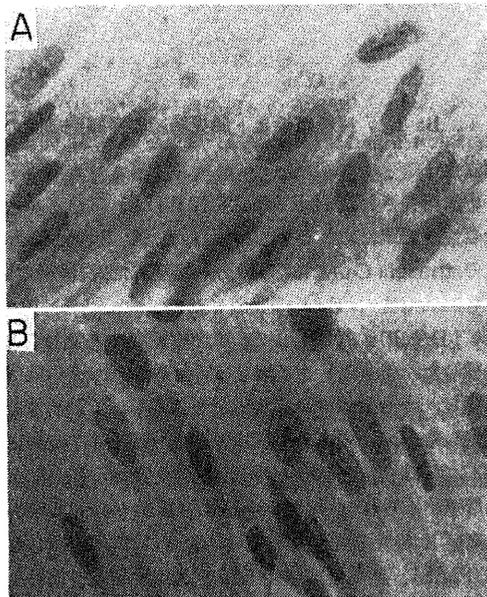


Fig. 4. Microscopic morphology in HELBE 18-11 (A) and HEL 18 (B) cells stained with hematoxylin-eosin.

不均一化などの老化現象は、感染後90日より徐々に認められ、この時期からのRT活性は最高値の12~25%に低下していた。そして、感染、非感染両細胞ともに感染後約130日(39 PDL)に増殖分裂能を喪失した。そこで、以下の実験では、老化を示す以前のBaEV感染20~90日までの細胞を用いた。

感染HEL細胞の産生するBaEV粒子の密度を測定し、BaEVの確認をするために培養上清を濃縮して(140 ml → 0.5 ml)、10~55%蔗糖密度勾配に重層し、105,000 g 14時間超遠心した。各分画についてRT活性と密度を測定したところ、密度1.15~1.16の画分に1つのRT活性のピークが認められた(Fig. 2)。この密度は、C型RNAウイルスに特徴的で、Sarinら<sup>10)</sup>の報告ともほぼ一致している。

ついでBaEV特異性をさらに確認するため、感染細胞のIFによる染色を行なった(Fig. 3)。固定標本では、その殆どどの細胞の細胞質中に広汎にBaEV特異蛍光が認められたが、非感染細胞では全く特異蛍光が検出されなかった。また未固定では、細胞膜における特異蛍光も検出された。以上の事実により、BaEV感染の結果、細胞レベルの持続感染がHEL細胞で成立していることがわかり、以下持続感染細胞をHELBE細胞と記すこととする。

## II. 形態学的変化

HELBE細胞の光顕的形態はHEL細胞と殆ど変わらず、融合細胞、封入体形成、核内クロマチンの変化等は認められなかった(Fig. 4)。

## III. 染色体分析

HELBE 14-7 (14 PDL, 7継代目)、HEL 14 (14 PDL)の細胞を用いて染色体分析を行なった(Table-1)。染色体数のモードはともに46で、ヒストグラムでもその拡がりには差異は認められなかった。mitotic indexはHELBEが7.4%、HELが9.2%であり著明な差はなかった。しかし4倍体比はHELBE、HELそれぞれ1.8%、1.0%であり有意な差異ではないが、BaEV持続感染細胞の方に4倍体が多い傾向がみられた。染色体異常を来した細胞の割合はHELBE、HELともに4%で、その内訳は全てBreak、もしくはGapであった。HEL細胞においても低頻度ながら異常が認められたのは、培養日数、培養条件、標本作製上の諸操作等に由るものと思われる。これらの結果よりBaEV持続感染による染色体レベルでの変化は一般に少ないが、若干の影響が考えられた。

## IV. 細胞増殖に対するBaEV持続感染化の影響

### 1. Mass cultureでの細胞増殖

HELBE、HEL細胞とともに培養1日目から5

Table 1. Chromosomal analysis in HELBE and HEL cells

cell type	mode	sex	mitotic index (%)	tetraploid ratio (%)	% cell with aberration	Break or Gap	others
HELBE 14-7*	46	male	7.4	1.8	4	4	0
HEL 14	46	male	9.2	1.0	4	4	0

\* cells with 14 PDL at 7th passage after BaEV infection

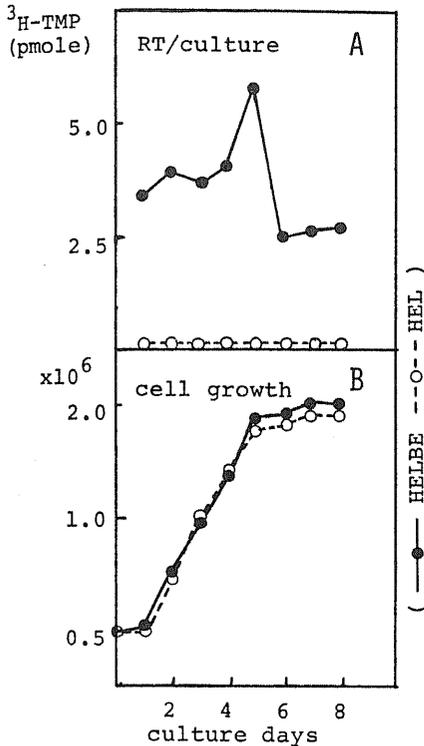


Fig. 5. Reverse Transcriptase (RT) activity in culture supernatants (A), and cell growth in mass culture (B) of HELBE (—●—) and HEL (---○---) cells.

日目まで対数的に増殖し、その世代時間はともに約48時間であった (Fig. 5.)。6日目以降は両細胞ともに定常期に入り、contact inhibitionの状態に入ったと考えられ、分裂は殆んどみられなくなった。これよりmass cultureでの細胞増殖はBaEV持続感染の影響を全く受けていないと思われた。

一方HELBE細胞でのBaEV増殖は、細胞の対数増殖期にはRT活性にして3.6~6.4 pmoleと漸増したが、定常期に入ってから最高値の約40%まで低下した (Fig. 5.)。野田ら<sup>25)</sup>は細胞密度の高い

A 204 BE (又は A 204) 細胞の培養上清中に BaEV の増殖を阻害する因子が蓄積されることを報告しているため、HELBE 細胞の系においてそれに関する検索を加えた。定常期の HELBE, HEL 細胞の培養上清 (24 時間培養) を採り、対数増殖期の HELBE 細胞の培地として用い、BaEV 増殖を調べた。未処理 (普通培養液) に比べ、HELBE 細胞の培養液ではむしろ 159% と、若干の促進作用を示したのに、HEL 細胞のそれでは 95% と大差なかった (データ未提出)。これにより、A 204 BE 細胞とは異なり、HELBE, 及び HEL 両細胞の定常期において何れでも BaEV 増殖阻害因子の産生はないことが明らかになった。

## 2. Sparse culture での細胞増殖

感染後 5~13 継代 (感染後 16~45 日, 12~20 PDL) までの細胞を用いて、sparse culture での細胞増殖能としてコロニー形成率 (Plating efficiency, 以下 PE と略) を比較した (Table 2.)。HEL 細胞の PE は  $7.65 \times 10^{-2}$  であったのに対し、HELBE 細胞の PE は  $6.58 \times 10^{-3}$  であり、HEL 細胞の 8.7% に低下していた。この結果は感染後の日数 (16~45 日) と無関係であった。この著明な PE 低下現象は胎児牛血清を用いても、更に 2 回の追加感染実験を行っても同様に確認された。

BaEV はそのゲノムに肉腫遺伝子 (sarcoma gene, 以下 src と略) を保有せず、一般に腫瘍原性は無いものと考えられているが、これを確認するため in vitro でのがん化の指標と考えられている軟寒天内コロニー形成率を調べた (Table 2.)。2 回の実験結果より、両細胞

Table 2. Plating efficiency (cell growth in sparse culture) and colony forming ability in soft agar of HELBE and HEL cells.

cell type	plating efficiency (mean $\pm$ S.E.)	colony forming ability in soft agar
HELBE	$6.58 \pm 1.18 \times 10^{-3}$	$< 1.0 \times 10^{-6}$
HEL	$7.65 \pm 1.13 \times 10^{-2}$	$< 1.0 \times 10^{-6}$

胞ともに形成率は  $1 \times 10^{-6}$  以下であり観察範囲内でコロニーは形成されなかった。

PE低下の時間的推移を追うため、新たに感染実験を行ない、継代毎にRTとPEとを測定した (Fig. 6). HELBE細胞のHEL細胞に対する相対的なPE (RPE) は感染後6日で0.70, 16日で0.10, 37

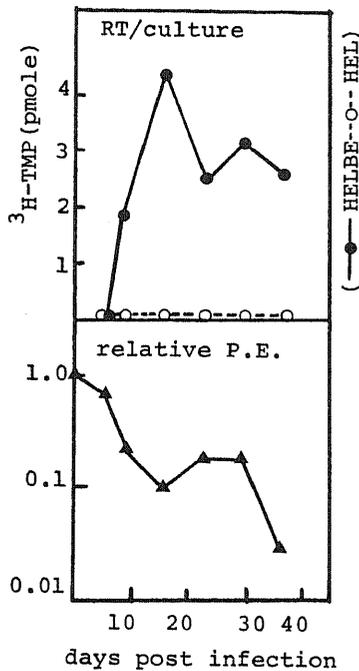


Fig. 6. Relative plating efficiency (RPE,  $\blacktriangle$ ) and Reverse Transcriptase (RT) activity in culture supernatants of HELBE ( $\bullet$ ) and HEL ( $\circ$ ) cells. RPE is the rate of the plating efficiency of HELBE cells to the one of HEL cells.

日では0.03にまで低下していった。一方BaEVの増殖は感染後9日で1.89 pmoleのRT活性を示し、16日では4.34 pmoleの最高値となったが、以後2~3 pmoleの安定なBaEV増殖が認められた。この結果よりBaEVの感染、増殖、そして持続感染化に伴い、HELBE細胞のPEは漸減し感染後約2週間でPEは非感染細胞の10%程度に低下するが培養液中のRT活性の変化はこれと必ずしも平行関係を示さなかった。

次にHELBE細胞のPEの低下をConditioned Medium (以下CMと略)が回復させるかどうか調べた。すなわちHELBE, HEL細胞の各CMに200個の細胞(ハンクス液に懸濁)を植え込み、対照(普通培養液)と同様な操作でPEを測定した (Table 3, Fig. 7). 普通培養液でのHELBE細胞のPEは本実験では  $0.7 \times 10^{-2}$  であったが、HEL, HELBE

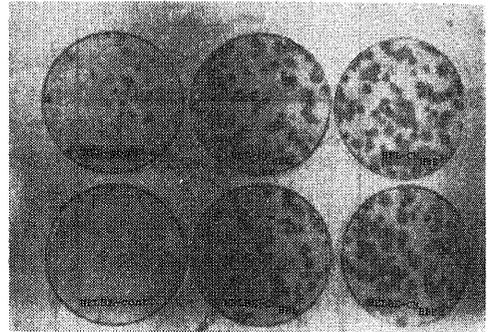


Fig. 7. Colonies of HEL and HELBE cells cultured in either fresh growth medium (cont.) or conditioned medium (CM). 200 cells were plated onto a 60 mm. petri dish, incubated for 14 days, and stained with 10% Giemsa solution. CM was harvested and centrifuged from the confluent HEL (CM<sub>HEL</sub>) and HELBE (CM<sub>HELBE</sub>) cells.

Table 3. Effects of conditioned medium (CM) from HEL and HELBE cells on plating efficiency of respective cells

cell type	medium	colony size (mm.)	PE $\pm$ SE ( $\times 10^{-2}$ )	relative ratio of PE
HEL	cont.*	2.0-4.5	15.2 $\pm$ 0.97	(100)
	CM <sub>HEL</sub> #	2.0-4.5	29.0 $\pm$ 1.41	(191)
	CM <sub>HELBE</sub> #	2.0-5.5	29.7 $\pm$ 1.11	(195)
HELBE	cont.	2.0-2.5	0.7 $\pm$ 0.15	(5)
	CM <sub>HEL</sub>	2.0-4.5	30.9 $\pm$ 1.78	(203)
	CM <sub>HELBE</sub>	2.0-5.5	29.8 $\pm$ 1.54	(196)

\* fresh growth medium

# culture supernatants harvested and centrifuged at 24 hours after the last medium change from the confluent HEL (CM<sub>HEL</sub>) and HELBE (CM<sub>HELBE</sub>) cultures

細胞の各CM使用時のPEは $30.9 \times 10^{-2}$ ,  $29.8 \times 10^{-2}$ となり約40倍の増殖亢進がみられた。一方、HEL細胞のPEは本実験時、 $15.2 \times 10^{-2}$ でありHEL, HELBE細胞の各CM使用でそのPEは $29.0 \times 10^{-2}$ ,  $29.7 \times 10^{-2}$ と約2倍に上昇した。これらのPE値は、各CM使用によるHELBE細胞の亢進したPE値とほぼ同じ値であった。またCMによるPEの増殖促進効果はHEL, HELBE細胞各CM間において殆んど差異が認められなかった。

HEL細胞由来のCMはHELBE細胞の形成コロニーの最大径を大きくさせたが、HEL細胞のそれには変化を与えなかった。一方、HELBE細胞由来のCMはHEL, HELBE両細胞の形成コロニーの最大径をともに大きくさせ、HEL細胞由来のCMに比べ、形成コロニーを拡大もしくは拡散させる傾向があった。また、本実験時、HEL細胞のPEはTable 2でのPEに比べ約2倍に上昇していたが、使用血清ロットの違いによるものと思われた。

### 3. 細胞寿命に対するBaEV持続感染の影響

2回の感染実験により細胞寿命をHELBE, HEL細胞について比較した(Fig. 8.)。実験Aでは9PDL, 実験Bでは7PDLのHEL細胞を感染に供し

た。HELBE, HEL細胞ともに同一の培養条件と継代方法を取り、感染後110日にわたり培養した。

両実験ともに感染後90日までは累積増殖数( $C_k$ )にして0.5程度HEL細胞の方が大であったが、それ以後HEL細胞の増殖度は低下し、最終的な $C_k$ はHEL, HELBE細胞それぞれ12.1, 12.7(実験A), 11.4, 11.7(実験B)、とほぼ同一であるが、いずれでもHELBE細胞が多少多い傾向にあった。PDLに換算するとHEL, HELBE細胞それぞれ49~90, 50~51PDL(実験A), 44~45, 45~46PDL(実験B)で分裂を停止することとなった。この場合、1:2の継代の代りに1:4~8の継代を行うと分裂回数は5~12回ほど延長する傾向にあった。2継代毎の培養上清中のRT活性を測定し、BaEVの増殖を検索したところ。結果はFig. 1.とほぼ同様なパターンを示した

(Fig. 8.)。すなわち感染後9~10日で最高値のRT活性を示し、細胞老化を示す70日以降( $C_k$ : 10.78~11.50)では、そのRT活性は最高値の11~44%に低下していた。これらの結果より、BaEV持続感染は細胞寿命に殆んど影響を与えていないと思われた。

### V. 他種ウィルスの増殖許容性

HEL, HELBE細胞に他種ウィルスの感染を行ない、その増殖許容性を比較した(Fig. 9.)。HSV-1は、感染後72時間でそのyieldが最高に達し、以後プラトーとなる増殖曲線の基本形を両細胞とも描き、VSVも感染後36時間でyieldは最高に達し、以後プラトーとなる同様の増殖曲線を呈した。HELBE, HEL両細胞間で比較すると、両ウィルスともHELBE細胞上で若干多めの増殖傾向をみせたが、有意ではなく、BaEV持続感染により、他種ウィルスの感染及び増殖を促進又は抑制する因子の産生は特にな

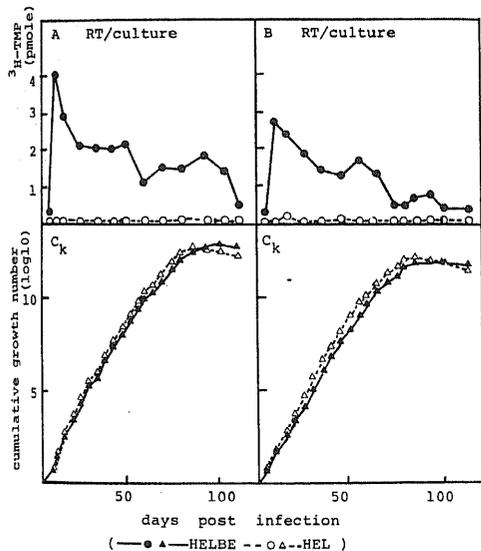


Fig. 8. Cumulative growth number ( $C_k$ ) of HELBE (—▲—) and HEL (··△··) cultures, and Reverse Transcriptase (RT) activity in culture supernatants of HELBE (—●—) and HEL (··○··) cells during serial passages. Two experimental series (A,B) were done in order to observe in vitro life span of cultures.

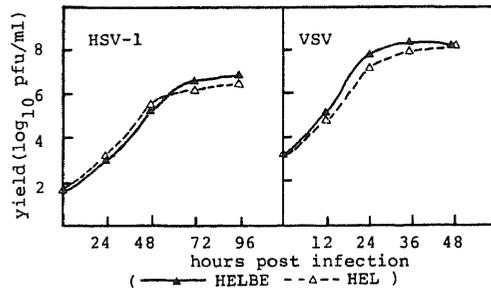


Fig. 9. Susceptibility of HELBE (—▲—) and HEL (··△··) cells to the growth of HSV-1 and VSV. Virus yields were plaque - assayed on BHK-21 cells used by culture supernatants harvested from virus infected cells.

いと考えられた。

#### VI. コラーゲン合成能の比較

線維芽細胞は *in vitro* においてもコラーゲンを産生する能力をもつので、Ba E V 持続感染のコラーゲン合成能に対する影響を調べた (Table 4.)。対数増殖期 (培養 1 日目) における、相対的コラーゲン合成量は、HEL, HELBE 細胞それぞれ全合成蛋白の 1.71%, 2.74% であった。また定常期 (培養 7 日目) でそれぞれ 2.44%, 2.12% であった。Student's *t* 検定の結果両細胞におけるコラーゲン合成能に有意な差なく、また両細胞での蛋白合成量自体にも有意差は認められなかった。この結果より、Ba E V 持続感染は線維芽細胞のコラーゲン合成能にも著明な影響を与えていないが、対数増殖期の HELBE 細胞では HEL 細胞よりも若干のコラーゲン合成の増加傾向を示していた (Table 4.)。

#### VII. Ba E V 持続感染の細胞がん化への影響

Ba E V 持続感染とがん化との関係の一端を知るために HEL, HELBE 細胞に 4NQO (0.1  $\mu$ g/ml), MNNG (0.2  $\mu$ g/ml) 処理及び X 線照射 (200~600 red), そして SV-40 感染を行ない形態転換細胞の出現を観察した (Table-5.)。

4NQO, MNNG 処理後それぞれ 49, 26 日間培養を続けたが、HEL, HELBE 細胞ともにトランスフォームされなかった。

200, 400, 600 rad の X 線量を照射後 45 日間にわたり培養を続けたが、両細胞にトランスフォーム細胞の出現はみられなかった。

次にヒト線維芽細胞を最も効率良くがん化させると云われている SV-40 を対数増殖期の HEL, HELBE 両細胞に感染させ 24 日間培養を続けた。フォーカスは HEL, HELBE 細胞ともにシャーレあたり 2~13 個形成され、トランスフォーム率は、HEL,

HELBE 細胞それぞれ  $1.45 \times 10^{-4}$ ,  $1.75 \times 10^{-4}$  と計算された。これより Ba E V 持続感染は、SV-40 のトランスフォーム率に著明な変化を起こさないが、若干高める傾向にあった。なお、定常期の細胞上に SV-40 を吸着、感染させ同様の実験を行なったが、40 日間培養を続けてもトランスフォームは全く認められなかった (データ未提出)。

#### 考 察

ヒト 2 倍体細胞に Ba E V (Baboon Endogenous Virus) を感染させると、7 日後 (継代 2 回) に高い RT 活性の検出すなわち、Ba E V の増殖が認められ、それ以後細胞寿命が尽きるまで Ba E V の安定な持続感染が示された。高野ら<sup>26)</sup>によると、Ba E V の増殖はヒト 2 倍体細胞では制限され、腫瘍細胞との混合培養や腫瘍ウイルスの重感染などにより Ba E V 増殖が促進されるとしている。著者の結果からは、線維芽細胞も腫瘍細胞と同様に Ba E V の増殖と持続感染が可能であった。Ba E V 増殖は少なくとも 2 回の細胞分裂 (感染後 7 日) が要求されていたが (Fig. 1.),  $5 \times 10^{-5}$  TCID<sub>50</sub>/cell ごとき低い m.o.i. の場合には、全ての細胞に感染が行なわれるためのウイルス多段階増殖の時間は 7~10 日を必要とすることが明らかになった。

ついで、Ba E V 特異抗体による蛍光抗体染色で明らかにされた細胞レベルでの Ba E V 持続感染ヒト線維芽細胞を用いて、その細胞生物学的特異変化を検索した。細胞寿命が尽きるまでの全経過にわたり、形態観察を行なったが、Ba E V による cytopathic effect (CPE) やトランスフォームなどの形態変化は認められなかった。細胞のがん化 (トランスフォーム) には細胞側の要因も強く関与しているらしい。すなわち Harvey, Moloney, Kirsten, などの肉腫ウイルスは、マウス白血病ウイルスを接種したマウスやラットから

Table 4. Collagen synthesis in HELBE and HEL cells at logarithmic or confluent stages

cell stages	HEL		HELBE	
	collagen synthesis (%)	corrected# (%)	collagen synthesis (%)	corrected# (%)
logarithmic*	8.21 ± 2.13§	1.71 ± 0.56	13.10 ± 1.12	2.74 ± 0.26
confluent**	11.61 ± 1.90	2.44 ± 0.44	9.43 ± 2.04	2.12 ± 0.56

# relative collagen synthesis as described in Method

\* incubated for 1 day

\*\* incubated for 7 days

§ standard error of the mean

Table 5. In vitro transformation assay of HELBE and HEL cells by chemical carcinogen treatment, X ray irradiation, and SV-40 infection

carcinogenic treatment	transformation freq.		days post treatment
	HELBE	HEL	
4NQO*	0/16#	0/17#	49
MNNG*	0/8	0/9	26
X ray 200 rad	0/8	0/10	45
400 rad	0/7	0/8	45
600 rad	0/8	0/6	45
SV-40 infection	$1.75 \times 10^{-4}\S$	$1.45 \times 10^{-4}\S$	24

\*  $2.0 \times 10^6$  cells were treated with 4NQO (0.1 $\mu$ g/ml) or MNNG (0.2 $\mu$ g/ml) for 30 min. at 37°C, then plated at  $5.0 \times 10^5$  cell per plate

# rate of the number of plate with transformed foci to all the cultured plates

§ transformed foci/cells plated ( $5 \times 10^4$ )

分離され、その src は宿主細胞由来とされている。また Wang ら<sup>27)</sup>は src を欠損したラウス肉腫ウイルスをニワトリに接種し、完全な src (+) の野生型ウイルスを回収している。そこで、Ba E V も宿主細胞如何ではトランスフォームする可能性が考えられるので、著者の場合も軟寒天中での Ba E V 持続感染ヒト線維芽細胞のコロニー形成能を測定し、トランスフォーメーションをみたが、 $1 \times 10^{-6}$ 以下の陰性であった (Table 2)。このことは Ba E V 自身はヒト線維芽細胞において形態的变化、またはトランスフォームも引き起こさないことを示している。

また、染色体分析の結果、Ba E V 持続感染に特異的な変化は少なく、染色体 6 番<sup>14)</sup>、または 19 番<sup>15)</sup>上に Ba E V プロウイルスの組み込み位置が想定されているが、通常の染色体分析の方法では、Ba E V 持続感染による染色体レベルでの著明な変化を検出し得ないと思われた。

mass culture での細胞増殖に Ba E V 持続感染による影響はなかった。また定常期の H E L B E 細胞での Ba E V 増殖が、対数増殖期の最高値の 40% に低下していたことに、野田ら<sup>29)</sup>のいう A 204 BE (又は A 204) 細胞における如き、Ba E V 増殖阻害 cell-density dependent 因子の関与は検出されなかった。よって、かかる定常期における Ba E V 産生の低下は細胞分裂の停止乃至 contact inhibition に基づくものと考えられ、Ba E V の増殖は宿主細胞の D N A 合成に少なからず調節を受けていることが示唆された。また、著者の系と野田らの系とを比較すると、Ba E V 阻害因子が腫瘍由来細胞 (A 204) からは産生され、正常線維芽細胞 (H E L) からは産生されていないことも興味深い。

一方、sparse culture での細胞増殖には Ba E V 持

続感染による影響が著明にみられた。すなわち、Ba E V 感染後 16 日までコロニー形成率 (P E) は次第に漸減し、Ba E V 持続感染が成立する 16 日以降では非感染細胞の 1~10% 程度に低下していた。しかし、H E L, H E L B E 細胞の Conditioned Medium (C M) 中で培養することにより、低下した P E は非感染対照細胞のレベルにまで回復した。これらに関連して、培地血清中には様々な未知の増殖因子が細胞増殖に関わっていると考えられる。現在までに Epidermal Growth Factor (E G F)<sup>28)</sup>、Fibroblast Growth Factor (F G F)<sup>29)</sup>、ゾマトメジン<sup>30)</sup>、インシュリン<sup>31)</sup>、Platelet derived Growth Factor (P D G F)<sup>32)</sup>などのペプチド様ホルモンが知られ、総括して成長促進因子と呼ばれている。一方、細胞の増殖抑制因子としてケイロンが知られ、ヒト線維芽細胞中にも検出されている<sup>33)</sup>。これら成長増殖諸因子と関連づけて考察すると、H E L B E 細胞は C M 中で培養することにより、その sparse culture での P E が回復することから、「普通培地」中では自身が充分増殖するに足るほど「普通培地」を condition することが出来ないものと思われる。すなわち、希薄にまかれた sparse culture 時の H E L B E 細胞は、「普通培地」中の成長促進因子を活性化する能力が低下しているのか、もしくは「普通培地」中の素材から成長促進因子を合成できないものと思われる。一方、ケイロン<sup>33)</sup>などの増殖抑制因子の関与もこの場合完全には否定できない。しかし、H E L B E 細胞からの C M は H E L 細胞の P E に殆んど変化を与えていないことから、Ba E V 持続感染により増殖抑制因子 (ケイロンなど) が非感染細胞に比べて多量に合成されている可能性は少ない。

上述諸因子中、E G F は最も研究が進んでおり、分子量 6045 の単鎖ペプチド<sup>34)</sup>でヒト胎児肺線維芽細胞

に増殖促進作用をもつ。その動態は細胞膜上のレセプターと結合し、膜上を移動したのち細胞内に取り込まれるとされている。Ba E V 持続感染の結果、細胞膜表面には Ba E V 特異抗原が形成されている（蛍光抗体染色で検出可能）。Tanaka ら<sup>35)</sup>は、Ba E V 持続感染ヒト線維芽細胞がヒト腫瘍細胞と特異的に細胞融合を起こすが、正常ヒト細胞とは融合しないことを示している。このように Ba E V 持続感染による細胞膜上の変化は充分示唆されるが、C M 中で P E が回復することよりみると、成長促進因子の細胞膜上のレセプター構造に大きな乱れはないと思われる。しかし細胞膜は、細胞増殖の調整に重要な役割を演じていると考えられ、P E 低下の現象と Ba E V 持続感染化による膜の修飾とは何らかの関係があると思われる。また上述の如き、C M 中の諸因子の関与と膜の問題、などは、先述の mass culture では sparse culture 時ほど深刻な問題にならぬ故に、mass culture への Ba E V 持続感染の影響はなかったのであろう。

さらに、Ba E V は、エンベロープを有するウイルスで細胞膜から出芽によって細胞外に放出される。この出芽の際のウイルス粒子中にはアクチン様分子が存在することも知られ、出芽には細胞骨格系因子の関与が考えられている。従って P E 低下には細胞膜ならず細胞骨格系の変化が関与している可能性も残されている。

加うるに、細胞寿命の延長に Ba E V 持続感染は、何の効果も示さなかった。ヒト 2 倍体細胞は 40~60 P D L でその寿命を絶やし、無限増殖はしないことが知られている<sup>36)</sup>。ハイドロコチゾン<sup>37)</sup>や E G F<sup>38)</sup>などが細胞寿命を若干伸ばすとされているものの、悪性転換—がん化しない限り、無限増殖の獲得は一般に不可能と思われた。

H S V - 1, V S V, など Ba E V とは異なる他ウイルスの感染に対し、H E L B E 細胞は H E L 細胞とほぼ同様に反応し、著明な増殖促進または、抑制効果も示さなかった。インターフェロン<sup>39)</sup>などのウイルス阻害因子や逆に促進因子<sup>40)</sup>がウイルス感染、特に持続感染細胞より産生される場合もあるが、H E L B E 細胞ではそのような因子は合成されなかった。ただここで用いたような激しい C P E を示すウイルスの代りに、より mild な C P E を起こすウイルス（パラミキソウイルスなど）での検討も将来必要かもしれない。

腫瘍ウイルス（R S V, S V - 40 など）や 4 N Q O でトランスフォームしたマウスやトリの細胞では、コラーゲン合成量の低下が認められ<sup>41)</sup>、また既知の型とは異なる型のコラーゲンの合成も知られている<sup>42)</sup>。そこで検討した H E L B E 細胞でのコラーゲン合成は、対

数増殖期、定常期とも若干の差はあるものの非感染細胞とほぼ同様で、Ba E V 持続感染は細胞コラーゲン合成能に特に重大な影響を与えず、トランスフォーメーションに伴う変化としては検出されなかった。

Ba E V 持続感染とがん化（トランスフォーメーション）との関連については、Ba E V が最もヒトに近縁な細胞内在性レトロウイルスであること<sup>2)</sup>、ヒト腫瘍から分離されたといわれるレトロウイルスの多くと部分的ホモロジーをもつこと<sup>11)12)</sup>、ヒト gene library 中に Ba E V の c D N A 中の Large Terminal Repeat が検出されること<sup>43)</sup>などから注目されて来た。しかし、先述の如く、Ba E V 感染により、著者の場合も線維芽細胞が直接トランスフォームされることはなかった（Table 2.）。そこで様々な発がん因子による in vitro トランスフォーメーションへの Ba E V 持続感染の影響を比較検討した。まず Kakunaga<sup>44)</sup>の方法により、H E L B E, H E L 細胞に 4 N Q O (0.1  $\mu$ g/ml) M N N G (0.2  $\mu$ g/ml) 処理したが、両細胞ともにトランスフォームされなかった。また腫瘍プロモーターとして知られる Tetradecanoyl Phorbol Acetate (T P A) 1~100  $\mu$ g/ml を添加し同様な実験を行なったが、両細胞ともにトランスフォームされなかった（データ未提出）。マウスの A K R 白血病ウイルス、ラウシャー白血病ウイルス（ともに in vitro でのトランスフォーム能はない）が持続感染したマウスやラットの胎児線維芽細胞では、化学発がん物質によるトランスフォーメーションが高率にみられている<sup>45)46)</sup>。しかし、これらと比べて Ba E V 持続感染ヒト線維芽細胞ではこのような促進効果はなかった。また、Borek<sup>47)</sup>と同じく、H E L, H E L B E 細胞に 200, 400, 600 rad の X 線照射し 45 日間培養したがいずれもトランスフォームしなかった。観察期間を伸ばしさらに長期にわたる培養を続ける必要があったかもしれない。

腫瘍ウイルスのうちでヒト線維芽細胞を高率にトランスフォームさせるといわれる S V - 40 を用いて同様な実験を行なった。トランスフォームフォーカスは、S V - 40 感染後 24 日目に明瞭に出現し、H E L B E, H E L 細胞上でのフォーカス形成率に著明な差はなかったが、若干 H E L B E の方が多かった。S V - 40 感染によるヒト正常線維芽細胞のトランスフォーム率は  $1\sim 4 \times 10^{-4}$  といわれ<sup>48)</sup>、著者の結果もほぼ一致している。遺伝的に発がん頻度の高いファコン貧血症やダウン症候群の線維芽細胞を用いた場合、S V - 40 のトランスフォーム率は  $2\sim 6 \times 10^{-3}$  に高まることが知られている<sup>48)</sup>。しかし、Ba E V 持続感染は S V - 40 トランスフォーム率をこれら程高めなかったが、高い傾向にあったことは確かであった。さらに、S V - 40 によ

るトランスフォームで内在化している持続感染化 Ba E V ゲノムの働きはどう変わるのか、またトランスフォーム細胞の腫瘍原性なども将来検討したいと考えている。

以上本実験で見出された Ba E V 持続感染のヒト正常細胞に与える影響は、使用した実験範囲内では一般に軽微なものが多かった。しかし、この点 Ba E V の内在性の本質を考えれば、マウス、ラットなどの実験動物細胞に見出される内在性ウイルスとほぼ同じであり、持続感染化細胞の運命に響くような劇的な変化を与えることは、ウイルス自身の存在にもかかる故に当然の結果ともいえよう。さらにより異なる実験方法での検討が軽微な変化をより明示し得るものと期待される。

## 結 論

正常ヒト胎児肺より線維芽細胞を初代培養し、Ba E V (Baboon Endogenous Virus) を感染させた。その結果、感染後 130 日にわたり持続的に Ba E V を産生し、蛍光抗体染色により殆んど全ての細胞に Ba E V 特異抗原が認められる細胞レベルでの持続感染の成立が確認された。そこで Ba E V 持続感染化がヒト線維芽細胞にどのような影響を与えているのか、細胞生物学的変化を検索した。

形態的变化は全過程を通じ認められず、通常の染色体分析の方法では特異的な染色体上の異常は殆んど見出しなかつた。また、mass culture での細胞増殖において、Ba E V 持続感染化の影響はなかつたが、sparse culture での細胞増殖（コロニー形成による Plating Efficiency; P E, 測定）は、Ba E V 持続感染化により、非感染対照の 1~10% 程度に低下していた。その低下は感染後 7 日より既に生じ、Ba E V 持続感染が成立する 16 日以降ではさらに激しくなつた。定常期の非感染、Ba E V 持続感染両細胞の培養上清（Conditioned Medium）中での培養により低下した P E が回復されることから、Ba E V 持続感染細胞では sparse culture でのコロニー形成に必要な成長促進因子の合成能や活性化能が低下しているものと思われた。

しかし、培養ヒト正常細胞一般にみられる細胞寿命への Ba E V 持続感染の影響は殆んどなく、Ba E V 感染細胞でも 40~50 P D L の寿命を保つことが確認された。H S V - 1, V S V などの他のウイルスの増殖は、Ba E V 持続感染細胞においても非感染細胞と同様に行なわれ、コラーゲン合成能にも両細胞間で差は少なかつた。

Ba E V 持続感染とがん化との関連性を検索するた

め、4 N Q O, M N N G などの化学発がん物質処理、X 線照射、及び S V - 40 感染による *in vitro* がん化実験を試みた。化学発がん物質や X 線によってヒト線維芽細胞をトランスフォームさせることは出来なかつたが、S V - 40 感染によりトランスフォームした細胞を得ることが出来た。しかしトランスフォーム率は Ba E V 持続感染による若干の上昇をみたにすぎなかつた。

これらを総括すると、Ba E V の内在性ウイルスの性格そのままに、ヒト正常細胞に持続感染化して内在化してもその細胞には、たかだか 2, 3 の軽微な変化を与えるだけで細胞と運命へ寿命を共にすることが明らかにされた。

(本研究の一部を第 18 回日本細菌学会中部支部総会に於いて発表した。)

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜わつた波田野基一教授に対し深謝の意を表します。また終始ご協力とご援助を戴いたウイルス部の皆様に感謝の意を表します。また、Ba E V 及び S V 40 を快く提供して下さいました慶大高野利也博士、東大医科研小田鈞一郎博士に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Kalter, S. S., Helmke, R. J., Panigel, M., Heberling, R. L., Felsburg, P. J. & Axelrod, L. R.: Observation of apparent C - type particles in baboon (*Papio cynocephalus*) placentas. *Science*, 179, 1332 - 1333 (1973).
- 2) Benveniste, R. E., Lieber, M. M., Livingston, D. M., Sherr, C. J. & Todaro, G. J.: Infectious C - type virus isolated from a baboon placenta. *Nature*, 248, 17 - 20 (1974).
- 3) Theilen, G. H., Goul, D., Fowler, M. & Dungworth, D. L.: C - type virus in tumor of a Woolly monkey (*Lagothrix* spp.) with fibrosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 47, 881 - 890 (1971).
- 4) Kawakami, T. G., Huff, S. D., Buckley, P. M., Dungworth, D. L., Snyder, S. P. & Gilden, R. V.: C - type virus associated with gibbon lymphosarcoma. *Nature (New Biol.)*, 235, 170 - 171 (1972).
- 5) Benveniste, R. E., Hellmann, R., Wilson, G. L., Callahan, R. & Todaro, G. J.: Detection of baboon type C viral sequence in various primate tissues by molecular hybridization. *J. Virol.*, 14, 56 - 65 (1974).
- 6) Benveniste, R. E. & Todaro, G. J.: Evolution of type C viral gene; evidence for an Asian origin

- of man. *Nature*, **261**, 101 - 108 (1976).
- 7) **Balavanova, H., Kotler, M. & Becker, Y.**: Transformation of cultured human embryonic fibroblasts by oncornavirus-like particles released from a human carcinoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**, 2794 - 2798 (1975).
- 8) **Gallageher, R. E. & Gallo, R. C.**: Type C RAN tumor virus isolated from cultured human acute myelogenous leukemia cells. *Science*, **187**, 350 - 353 (1975).
- 9) **Nooter, K., Arrssen, A. M., Bentvelzen, P., DeGroot, F. G. & Vanpelt, F. G.**: Isolation of infectious C-type virus from human leukemic bone marrow cells. *Nature*, **256**, 595 - 597 (1975).
- 10) **Kaplan, H. S., Goodenow, R. S., Epstein, A. L., Gartner, S., Declève, A. & Rosenthal, P. N.**: Isolation of type-C virus from an established human histiocytic lymphoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 2564 - 2568 (1977).
- 11) **Mishra, L., Hong, D. & Baluda, M. A.**: Sequences homologous to BAV component of HL23V in baboon tissues. *Z. Naturforsch.*, **34c**, 266 - 271 (1979).
- 12) **Mishra, L., Hong, D. & Baluda, M. A.**: Homology between HL-23V and primate viruses and search for proviral DNA sequences of Simian sarcoma associated virus and baboon endogenous virus in DNA from human leukemic cells. *Leukemia Res.*, **3**, 285 - 296 (1979).
- 13) **Battula, N. & Todaro, G. J.**: Physical map of infectious baboon type C viral DNA and sites of integration in infected cells. *J. Virol.*, **36**, 709 - 718 (1980).
- 14) **Lemons, R. S., W. G., O'Brien, S. J., Benveniste, R. E. & Sherr, C. J.**: A gene (Bevi) on human chromosome 6 is an integration site for baboon type C DNA provirus in human cells. *Cell*, **14**, 995 - 1005 (1977).
- 15) **Brown, S., Oie, H., Francke, U., Gazdar, A. F. & Minna, J. D.**: Assignment of a gene required for infection with endogenous baboon virus to human chromosome 19. *Cytogenet. Cell Genet.*, **22**, 239 - 242 (1978).
- 16) **Giard, D. J., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. & Parks, W. P.**: In vitro cultivation of human tumors; establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**, 1417 - 1423 (1973).
- 17) **Lieber, M. M., Sherr, C. J. & Todaro, G. J.**: S-tropic murine type-C viruses: Frequency of isolation from continuous cell lines, leukemia virus preparations and normal spleens. *Int. J. Cancer*, **13**, 587 - 598 (1974).
- 18) **Sarin, P. S., Friedman, B. & Gallo, R. C.**: Purification and characterization of baboon endogenous virus DNA polymerase. *Biochi. Biophys. Acta.*, **479**, 198 - 206 (1977).
- 19) **Tamura, T. & Takano, T.**: A new, rapid procedure for the concentration of C-type viruses from large quantities of culture media: Ultrafiltration by Diaflo membrane and purification by Ficoll gradient centrifugation. *J. Gen. Virol.*, **41**, 135 - 141 (1978).
- 20) **Moorhead, P. S., Nowell, P. C., Mellman, W. J., Battips, D. M. & Hingerford, D. A.**: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, **20**, 613 - 616 (1960).
- 21) **Peterkofsky, B. & Dieglmann, R.**: Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry*, **10**, 988 - 944 (1971).
- 22) **Schwarz, R., Colarusso, L. & Doty, P.**: Maintenance of differentiation in cultures of avian tendon cells. *Exp. Cell Res.* **102**, 63 - 71 (1976).
- 23) **Dieglmann, R. F. & Peterkofsky, B.**: Collagen biosynthesis during connective tissue development in chick embryo. *Dev. Biol.*, **23**, 443 - 453 (1972).
- 24) **Panem, S., Prochowik, E. V., Reale, F. R. & Kirsten, W. H.**: Isolation of type-C virions from a normal human fibroblast strain. *Science*, **189**, 297 (1975).
- 25) **野田 亮, 田村隆明, 高野利也**: C型ウイルス産生を阻害する cell density dependent 因子, 第26回日本ウイルス学会総会演説抄録, 309 (1978)
- 26) **高野利也・田村隆明・野田 亮**: SV-40でトランスフォームしたヒト2倍体細胞におけるヒト内在性ウイルスの発現  
第35回日本癌学会総会記事, 218 (1977)
- 27) **Wang, L. H., Halpern, C. C., Nadel, M. & Hanafusa, H.**: Recombination between viral and cellular sequences generates transforming sarcoma

- virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **75**, 5812 - 5816 (1978).
- 28) **Cohen, S.** : Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. J. Biol. Chem., **237**, 1555 - 1562 (1962).
- 29) **Holley, R. W. & Kiernan, J. A.** : "Contact inhibition" of cell division in 3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **60**, 300 - 304 (1968).
- 30) **Daughaday, W. H., Hall, K., Raben, M. S., Salmon Jr, W. D. & Van Wyk, J. J.** : Somatomedin; proposed designation for sulphation factor. Nature, **235**, 107 (1972).
- 31) **Jiménez de Asúa, L., Surian, E. S., Flawia, M. M. & Torres, H. N.** : Effect of Insulin on the growth pattern and adenylate cyclase activity of BHK fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **70**, 1388 - 1392 (1973).
- 32) **Antoniades, H. N. & Scher, C. D.** : Radioimmunoassay of a human serum growth factor for BALB/C-3T3 cells: Derivation from platelets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **74**, 1973 - 1977 (1977).
- 33) **Houck, J. C., Sharma, V. K. & Cheng, R. F.** : Fibroblast chalone and serum mitogen (anti-chalone). Nature (New Biol.), **246**, 111 - 113 (1973).
- 34) **Savage Jr, C. R., Inagami, T. & Cohen, S.** : The primary structure of epidermal growth factor. J. Biol. Chem. **247**, 7612 - 7621 (1972).
- 35) **Tanaka, T., Ogura, H., Ocho, H., Namba, M., Omura, S. & Oda, T.** : Syncytium formation induced by baboon endogenous virus in several transformed human cell lines. Virol., **108**, 230 - 234 (1981).
- 36) **Hayflick, L.** : The limited in vitro life time of human diploid cell strains. Exp. Cell Res., **37**, 614 - 636 (1965).
- 37) **Cristofalo, U. J. & Kabakjian, J.** : Lysosomal enzymes and aging in vitro: Subcellular enzyme distribution and effect of hydrocortison on cell life span. Mech. Age. Dev. **4**, 19 - 28 (1975).
- 38) **Rheinwald, J. G. & Green, H.** : Epidermal growth factor and multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. Nature, **265**, 421 - 424 (1977).
- 39) **Isaacs, A. & Lindermann, J.** : Virus interference. I. The interferon. Proc. Roy. Soc. London. Ser. B., **147**, 258 - 267 (1957).
- 40) **Chany, C. & Brailovsky, C.** : Stimulating interaction between viruses (stimulons). Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **57**, 87 - 94 (1967).
- 41) **Levinson, W., Bhatnagar, R. S. & Liu, T. Z.** : Loss of ability to synthesize collagen in fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. J. Natl. Cancer Inst., **55**, 807 - 810 (1975).
- 42) **Hata, R. & Peterkofsky, B.** : Specific changes in the collagen phenotype of BALB-3T3 cells as a result of transformation by sarcoma viruses or a chemical carcinogen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **74**, 2933 - 2937 (1977).
- 43) **栗原まさ乃・野田亮・高野利也** : Human gene library に見い出されるレトロウイルスのプロウイルス DNA 様構造  
第4回日本分子生物学会年会講演要旨集, 50 (1981).
- 44) **Kakunaga, T.** : Neoplastic transformation of human diploid fibroblast cells by chemical carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **75**, 1334 - 1338 (1978).
- 45) **Wolford, R. G., Maryak, J. M. & Huebner, R. J.** : Transformation of cell cultures as an indication of the carcinogenic potential of chemicals. J. Natl. Cancer Inst., **51**, 799 - 808 (1973).
- 46) **Rhim, J. S., Park, D. K., Weisburger, E. K. & Weisburger, J. H.** : Evaluation of an in vitro assay system for carcinogens based on prior infection of rodent cells with non-transforming RNA tumor virus. J. Natl. Cancer Inst., **52**, 1167 - 1173 (1974).
- 47) **Borek, C.** : X-ray-induced in vitro neoplastic transformation of human diploid cells. Nature, **283**, 776 - 778 (1980).
- 48) **Aaronson, S. A. & Todaro, G. J.** : SV-40 T antigen induction and transformation in human fibroblast cell strains. Virol., **36**, 254 - 261 (1968).

**Characteristics of Human Embryonic Lung Fibroblast Cells Persistently Infected with Baboon Endogenous Type C Virus** Shigeru Kamiya, Department of Virology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. Juzen Med. Soc., 91, 122-136 (1982)

**Key words:** Human Embryonic Lung fibroblasts, Baboon Endogenous Virus, plating efficiency, in vitro transformation

#### Abstract

Using HEL (Human Embryonic Lung fibroblast) primary cells, susceptible to BaEV (Baboon Endogenous Virus), some biological characteristics of the BaEV persistently infected cells were examined. Culture fluids of BaEV infected cells proved to be high RT (Reverse Transcriptase) activity, showing an active production of BaEV in the cells. This BaEV production without cytopathic effects continued for about 130 days until senescence of cultured cells. These BaEV carrier (HELBE) cells were positively stained with BaEV specific fluorescent antibody, but did not show any transformed morphology.

No growth difference in the mass culture was found between HELBE and HEL cells. However, an efficiency of colony formation in the sparse culture (Plating Efficiency:PE) was  $7.65 \times 10^{-2}$  in the uninfected cells, but the one in HELBE cells,  $6.58 \times 10^{-3}$ , showed a decrease to about one-tenth of that of HEL cells. Culture of HELBE cells in the 'conditioned medium' from either BaEV carrier or uninfected cells made the lowered PE of HELBE cells completely recover to the level of HEL cells. This seemed to suggest that the above decrease of PE in the BaEV carrier cells was probably due to the reduced production or activation of growth promoting factors by the cells.

Analysis of chromosomal changes, susceptibility to other virus growth, collagen synthesis in the BaEV carrier cells were similar to those observed in uninfected HEL cells. Transformation frequency by SV-40 infection was  $1.45 \times 10^{-4}$  in HEL cells, but  $1.75 \times 10^{-4}$  in HELBE cells, suggesting a slightly more increased susceptibility of the latter cells to this type of transformation than the former cells. However, no effects on the transformation of both cells were found in the experiments using other transforming factors such as irradiation, treatment with chemical carcinogen etc.

All this evidence seems to show that this primate cell-associated virus affects a little of biological activity of human cells and makes the infected cells survive even after the establishment of its carrier state.