

マウス白血病ウィルスのヒト培養 白血球への感染に関する研究

第 1 編

ヒトリンパ芽球様細胞における EB ウイルスと C型ウイルスの重複持続感染の成立

岡山大学医学部第2内科教室（主任：平木潔教授）

林 建 彦

（受稿昭和50年4月9日）

第1章 緒 言

C型RNAウイルスがマウス¹⁾やネコ^{2) 3) 4)}をはじめ多くの哺乳動物の白血病の原因であることが次第に明らかとなってきた。サルについても Kawakamiら⁵⁾はテナガザルのリンパ肉腫細胞から樹立した培養浮遊細胞にC型粒子の存在を認めている。ヒトにおいては Dmochowski 一派^{6) 7)}が白血病やリンパ腫症患者生検リンパ節よりC型様粒子を証明し、Galloら⁸⁾はヒト白血病細胞よりRNA-dependent DNA polymeraseを発見し、さらに Spiegelman 一派はヒト白血病⁹⁾およびリンパ腫細胞¹⁰⁾より Rauscher 白血病ウイルス (RLV) RNA と homologous な RNA を検出し、或いはヒト白血病細胞の核DNAにRLV RNA と同様な塩基配列が存在することを見出している。¹¹⁾一方 Burkitt リンパ腫培養細胞内に発見されたEBウイルスはその後 in vitro でヒトやサルのリンパ球をリンパ芽球様細胞に transform させる^{12) 13) 14)}のみならずサルにリンパ腫を惹起させることが報告されている。¹⁵⁾さらにEBウイルス類似のヘルペス型ウイルスがニワトリに Marek 病を¹⁶⁾またサルにリンパ腫や白血病を惹起させる^{17) 18) 19) 20)}ことも知られるようになってきた。

1971年人癌患者由来の培養株細胞にC型粒子の持続的産生を認めたとする報告が2つのグループの研究者によって相次いで発表された。^{21) 22)}しかし動物のC型粒子の contamination 可否かをめぐって賛否両論があり^{23) 24)}いまだ決着をみるに至っていない現状

である。

著者は今回動物の白血病ウイルスがヒトの培養白血球に感染し得るか否か、さらに核酸構成の異なる2種類の腫瘍ウイルスが重複して持続感染可能か否かを知る目的で、教室で樹立したヒトのリンパ芽球様細胞へマウスのRLVを感染させることを試み、その持続感染に成功したので持続的に産生されるようになったC型粒子につき得られた若干の知見を報告する。

第2章 材料と方法

1. ウイルス

感染に使用したRLVは米国癌研究所のDr. F. J. Rauscher より白血病罹患マウスの10%脾抽出液 (HL-67-1117 H) として供与を受けたものである。

2. 細胞

被感染細胞はSMON患者の末梢白血球より樹立したリンパ芽球様細胞 (OUMS-11 a)²⁵⁾である。この株細胞は培養開始 (8-13-70) 以来浮遊状態で増殖し、4~5日毎に継代培養され、現在92代に及んでいる。細胞は37℃にて5% CO₂ ふらん器内にシャーレ培養した。

3. 培養液

ストレプトマイシン100γ/ml, ペニシリン100u/ml を含むRPMI 1640と胎児ウシ血清を4:1の割合に混じたものを使用した。

4. ウイルス感染

59代目 (培養開始後14ヶ月) のリンパ芽球様細胞

胞を Rauscher 白血病マウスの10%脾抽出液の Millipore (0.45 μ) 濾液 1 ml にて浮遊させ、37℃、2 時間のウイルス吸着後、ウイルス液を新しい培養液と交換し、以後非感染細胞と同様に 4～5 日毎に継代培養を続けた。

5. 電顕的観察

継時的に細胞浮遊液を2,000回転5分間の遠沈により pellet として、グルタルアルデヒド、オスミック酸の2重固定後、型のごとくエポン包埋し、超薄切片を作製し、ウラニール酢酸、クエン酸鉛にて2重染色し、Hitachi II 型電子顕微鏡で観察した。

第3章 実験結果

1. 電顕観察

RLV 感染細胞は、非感染細胞と形態学的にはほぼ同一で、今日まで感染後1年半(継代100代)を経ている。この感染細胞を経時的に7回、超薄切片として電顕により観察したが、いずれの材料にも多数のC型粒子が認められた(写真1)。ウイルス粒子は細胞外或いは胞体空胞内にあって、細胞膜よりの budding もしばしば認められた(写真2)。ウイルス粒子の大きさは、直径約110～120m μ で、ドーナツ型の未熟ウイルスと中央に電子密度の高い核様体を有する成熟ウイルスの両者が混在し(写真3)、マウスの培養細胞で産生される RLV²⁶⁾と形態学的にまったく同一である。さらに RLV 感染細胞には、EBウイルスも同時に存在する所見が観察された(写真4)。これに対し、RLV 非感染細胞にはC型ウイルス粒子をまったく認めなかった。経時的電顕観察所見を要約すると表1のごとなり、1回の感染操作によりC型ウイルス粒子が活発にヒトの培養白血病より産生され続けていることが明らかとなった。

2. Bioassay

ヒトのリンパ芽球様株細胞より持続的に産生されるようになったC型ウイルス粒子の生物活性をみる目的で、in vitro での培養細胞への感染実験と BALB/c マウスに接種する in vivo での実験を行った。すなわち in vitro でウイルス感染に用いた培養細胞は、教室で樹立した3系のリンパ芽球様株細胞^{27) 28)}と BALB/c マウス胎児初代培養細胞とである。これらの細胞にC型ウイルス持続産生系の培養液上清の Millipore 濾液 1 ml を加え、37℃にて2時間感染させた後、3～12週で電顕的に1～2回観察した。しかしいずれの場合にもC型粒子の存在を認めなかった(表2)。in vivo での接種実験には、生後24時間

表1 Rauscher 白血病ウイルス感染ヒト細胞の経時的電顕観察

培養日数	継 代 数	ウイルス粒子
71	14	C
104	22	C
147	32	C + E B
269	53	C
285	56	C + E B
427	75	C
572	96	C + E B

表2 ヒトの細胞より産生されるC型ウイルスの培養細胞への感染実験

被感染細胞	電顕観察	
	感染後日数	ウイルス粒子
リンパ芽球様株細胞 (OUMS-5) ²⁷⁾ (伝染性単核球症)	27	(-)
リンパ芽球様株細胞 (OUMS-17) ²⁷⁾ (急性リンパ球性白血病)	58	(-)
リンパ芽球様株細胞 (OUMS-20) ²⁸⁾ (Down 症候群)	31 85	(-) (-)
BALB/c マウス胎児細胞	22	(-)

以内の新生児ならびに成熟 BALB/c マウスを用い、接種材料は感染後経時的に採取したC型粒子産生培養細胞とその培養液の混合物、または無細胞培養液上清で、これらを0.2ml づつ腹腔内に注入し、2ヶ月間白血病の発生を観察した。しかしこの bioassay の結果はすべて陰性で、ヒトのリンパ芽球様株細胞より産生されるこのC型ウイルス粒子は、もはやマウスに対して白血病を惹起しない(表3)

つぎに前述のマウスへのウイルス接種実験におい

表3 C型粒子産生培養系材料の BALB/c マウスへの接種実験

感染後 培養日数	接種材料	接 種 マウス数	白血病発生 マウス数
7	細胞+上清	8 ※	0
15	上清	7 ※	0
109	細胞+上清	8	0
112	上清	6	0
166	細胞+上清	6	0
166	上清	5	0
299	細胞+上清	11	0
303	細胞+上清	6	0

※生後4週、その他は新生児マウス

林 論文 附 図

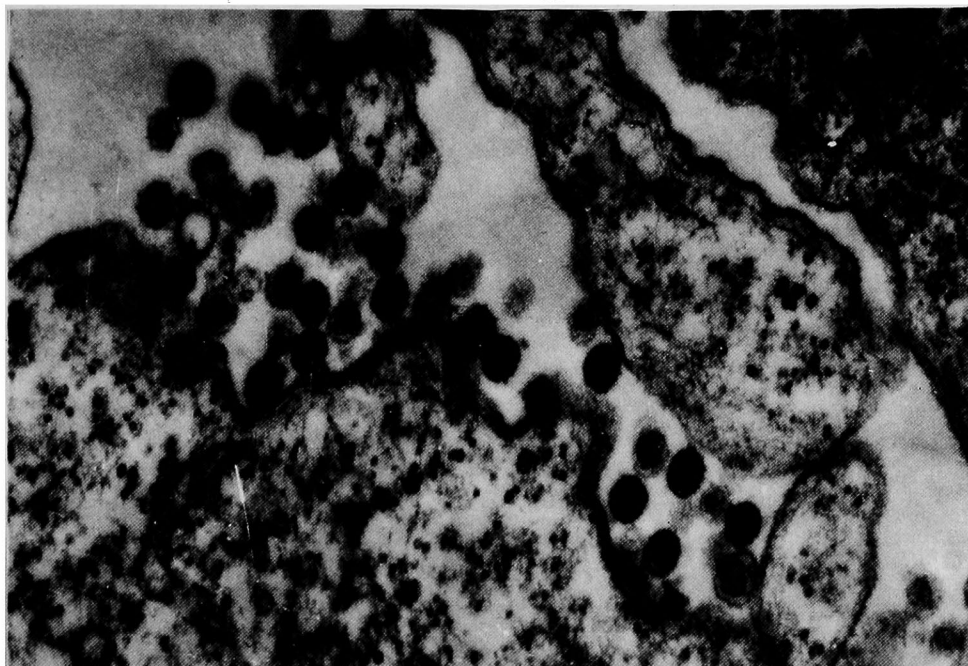


写真1 細胞間隙のC型粒子 (×47,500)

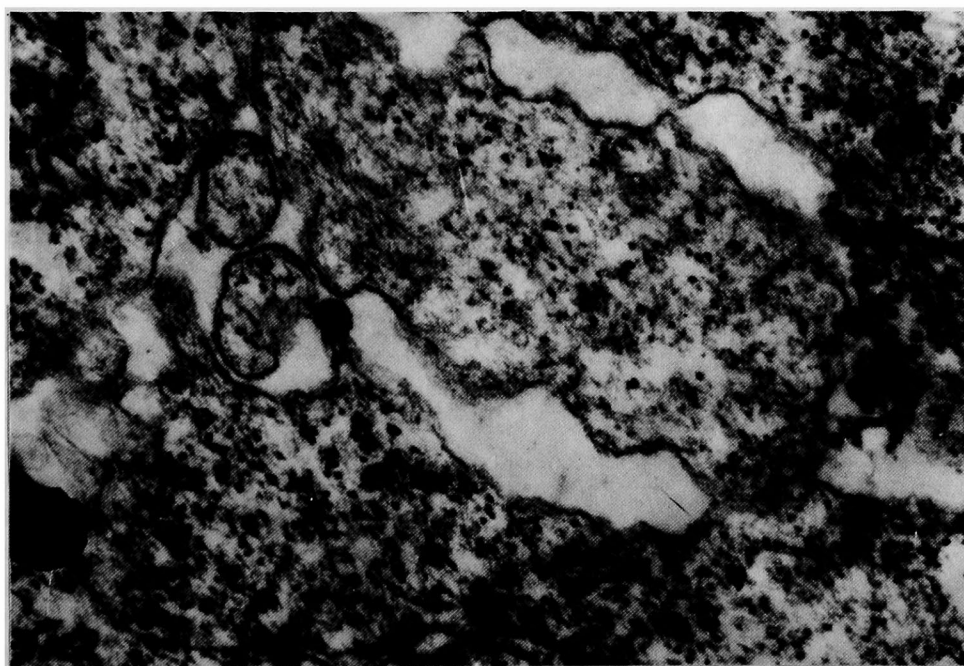


写真2 細胞膜面よりbudding中のC型粒子
(×47,500)

林 論 文 附 図

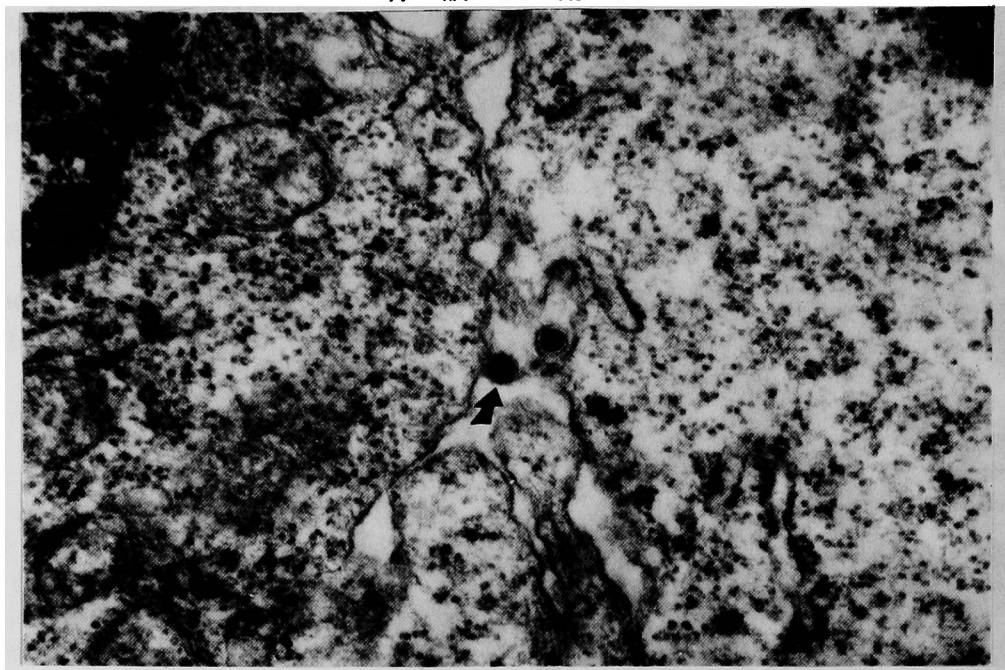


写真3 未熟ウイルス (●) と成熟ウイルス
(×39,200)

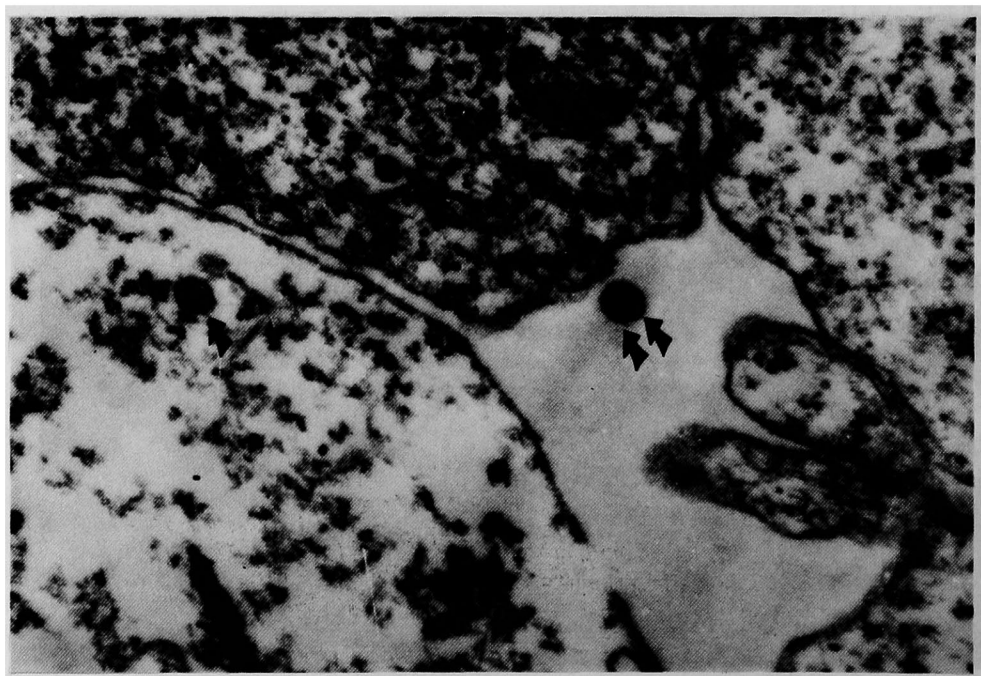


写真4 共存するEBウイルス (●) とC型ウイルス (●)
(×47,500)

て、2ヶ月間観察し、白血病の発生をみなかったマウスが、マウスで継代されている leukemogenic な RLV の challenge に対して免疫性を獲得しているか否かを検討した。challenge に使用したウイルスは、Rauscher 白血病マウスの10%脾抽出液の10倍希釈液の0.1mlである。その結果、RLV 持続感染系の培養細胞とその培養液との混合物を最初接種され、ついで challenge ウイルスを接種された群での白血病発生率は、23.5%であり、challenge ウイルスのみを接種された群での白血病発生率の70%に比し、前処置によりかなり白血病の発生が抑制された(表4)。

表4 ヒトの細胞より産生されるC型粒子接種によるワクチン効果

接種方法	接種マウス数	白血病発生マウス数	%
細胞 +) + Challenge 上清	17	4	23.5
Challenge のみ	20	14	70

第4章 総括ならびに考按

EBウイルスは我々日本人の培養白血球よりも容易に証明することができ、リンパ芽球様細胞の樹立にとって重要な役割を演じているということが出来るが、C型ウイルスはこれらいずれの培養系においても電顕的に認められなかった。1971年 Priori ら²¹⁾は Burkitt リンパ腫症患者の胸水細胞由来の株細胞にC型粒子を発見し、さらに McAllister ら²²⁾は株化したヒトの横紋筋肉腫細胞を猫の胎児に移植し、猫に生じたその腫瘍細胞を再び培養してそのなかにC型粒子を発見した。これらのウイルスはその後形態学的ならびに免疫学的に詳細に追求された結果、動物のC型粒子の contamination である可能性が大きくなってきている。一方 Wright ら²³⁾は人の胎児細胞への RLV の持続感染を報告し、動物の白血病ウイルスがヒトの胎児細胞に感染し得ることを示した。

著者は動物のC型ウイルスがヒトの培養白血球にただ1回の感染操作で容易に感染し、しかも感染後1年半以上を経た今日までC型粒子を持続的に産生しつづけ、同時にEBウイルスとの重複感染状態にあることを見出した。これらの事実は動物の白血病ウイルスがヒトにも容易に感染し得る可能性を示唆

しており、ひいてはC型ウイルスの垂直感染の考え方と共に、ヒトにおけるC型ウイルスゲノムの存在をも疑わしめる。特に興味あることは、核酸構成も由来もまったく異なるマウスのC型 RNA ウイルスとヒトのヘルペス型 DNA ウイルスの2種類のウイルスが、同一細胞系に重複感染状態にあることである。この点 RLV を Burkitt リンパ腫由来のリンパ芽球様細胞に感染させることにより、もともと存在していたEBウイルスが消失したという Maruyama ら²⁰⁾の成績と異なる。今後C型ウイルスがヒトの細胞になんらかの変化をおよぼしているか否か、また起原をまったく異にする2種類のウイルスがなんらかの interaction をもっているか否か等についても検討されなければならない。

今回の実験でヒトの細胞より持続的に産生されるようになったC型ウイルスは、Wright ら²³⁾の報告と同様にすでに leukemogenicity を失っている。このようにマウス白血病ウイルスをヒトの培養細胞に adapt させることにより leukemogenicity が失われる理由としては、ウイルス粒子がヒトの細胞膜を被って産生されてくるために、ウイルスの病原性ないし抗原性に变化をきたすためではないかと考えられる。²¹⁾一方このC型ウイルスのマウスに対する immunogenicity についての今回の検討では、C型ウイルス持続産生系細胞とその培養液との混合物を接種されたマウス群では、無処置群に比較して challenge ウイルスによる白血病発生率が、約1/3におさえられ、明らかに immunogenicity を有していることが示唆された。このことは、RLV に対するワクチンとして応用し得る可能性を示しているといえよう。

つぎにこのC型ウイルスが、最初感染に用いた RLV と同一のものであるか否かを蛍光抗体法により分析した結果²⁴⁾このC型ウイルス持続産生細胞は、抗 RLV 山羊血清や抗マウス gs-1 ラット血清と特異的に反応することが認められており、また米国の Flow Laboratory の畑中博士に検索を依頼した補体結合法によってもこの細胞がマウスに特異的な gs 抗原を有していることが明らかとなっている。このことはヒトの細胞より持続的に産生されるC型ウイルスがもともと感染に用いた RLV であって、ヒト由来のC型ウイルスである可能性を否定するものである。

第5章 結 語

動物およびヒトの白血病の成因に関して、C型ウ

ウイルスと EB ウイルスの関与の可能性がますます有力視されつつある。EB ウイルスは我々日本人を含めて培養白血球より容易に証明することができ、またリンパ芽球様細胞の樹立にとって重要な役割を演じているということができる。これに対して C 型ウイルスは、いずれの培養白血球系においても電顕的に認められていない。今回著者はマウスの C 型 RNA ウイルスである RLV をヒトのリンパ芽球様細胞に感染させることに成功し、電顕的および生物学的に次の如き興味ある事実を明らかにした。

1. マウスの C 型ウイルスはヒト由来の培養白血球に感染し、持続的な C 型粒子の産生を起す。
2. 核酸構成のまったく異なる C 型 RNA ウィル

スとヘルペス型 DNA ウイルスは同一細胞系において重複持続感染状態となる。

3. ヒト由来の培養細胞より持続的に産生されるようになった C 型ウイルスは、マウスの gs 抗原を保有するにもかかわらず、もはやマウスに接種しても白血病を惹起しない。

4. この C 型ウイルス持続産生系細胞とその培養上清との混合液を前もってマウスに接種しておく、そのマウスは RLV に対して免疫性を獲得する。

稿を終るにあたり、恩師平木潔教授、御指導いただいた三好勇夫講師ならびに坪田輝彦博士に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Gross, L.: *Oncogenic Viruses*. Pergamon Press, Oxford, 1970.
- 2) Jarrett, W. F. H., Martin, W. B., Crichton, G. W., Dalton, R. C., and Stewart, M. F.: *Nature*, **202**: 566, 1964.
- 3) Kawakami, T. G., Theilen, G. H., Dungworth, D. L., Munn, R. J., and Bell, S. G.: *Science*, **158**: 1049, 1967.
- 4) Rickard, C. G., Post, J. E., Noronha, F., and Barr, L. M.: *J. Nat., Cancer Inst.*, **42**: 987, 1969.
- 5) Kawakami, T. G., Huff, S. D., Buckley, P. M., Dungworth, D. L., and Synder, S. P.: *Nature New Biol.*, **235**: 170, 1972.
- 6) Dmochowski, L., and Grey, C. E.: *Blood*, **13**: 1017, 1958.
- 7) Dmochowski, L., Yumoto, T., Grey, C. E., Hales, R. L., Langford, P. L., Taylor, H. G., Freireich, E. J., Shullenberger, C. C., Shively, J. A., and Howe, C. D.: *Cancer*, **20**: 760, 1967.
- 8) Gallo, R. C., Yong, S. S., and Ting, R. C.: *Nature*, **228**: 927, 1970.
- 9) Hehlmann, R., Kufe, D., and Spiegelman, S.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**: 435, 1972.
- 10) Hahlmann, R., Kufe, D., and Spiegelman, S.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**: 1727, 1972.
- 11) Baxt, W. G., and Spiegelman, S.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**: 3737, 1972.
- 12) Pope, J. H., Horne, M. K., and Scott, W.: *Int. J. Cancer*, **4**: 255, 1969.
- 13) Gerber, P., Whang-Peng, J., Monroe, J. H.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **63**: 740, 1969.
- 14) Miller, G., Lisco, H., Kohn, H. I., and Stitt, D.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **137**: 1459, 1971.
- 15) Shope, T., Dechairo, D. and Miller, G.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70**: 2487, 1973.
- 16) Solomon, J. J., Witter, R. L., Nazeriom, K., Burmester, B. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **127**: 173, 1968.
- 17) Hunt, R. D., Meléndez, L. V., King, N. W., Gilmore, C. E., Daniel, M. D., Williamson, M. E., and Jones, T. C.: *J. Nat. Cancer Inst.*, **44**: 447, 1970.
- 18) Ablashi, D. V., Loeb, W. F., Valerio, M. G., Adamson, R. H., Armstrong, G. R., Bennett, D. G., and Heine U.: *J. Nat. Cancer Inst.*, **47**: 837, 1971.

- 19) Melendez, L. V., Hunt, R. D., Dniel, M. D., Blake, B. J., and Garcia, F. G.: *Science*, **171** : 1161, 1971.
- 20) Melendez, L. V., Hunt, R. D., King, N. W., Barahona, H. H., Daniel, M. D., Fraser, C. E. O., and Garcia, F. G.: *Nature New. Biol.*, **235** : 182, 1972.
- 21) Priori, E. S., Dmochowski, L., Myers, B., and Wilbur, J. R.: *Nature New. Biol.*, **232** : 61, 1971.
- 22) McAllister, R. M., Nicolson, M., Gardner, M. B., Rongey, R. W., Rasheed, S., Sarma, P. S., Huebner, R. J., Hatanaka, M., Oraszlan, S., Gilden, R. V., Kabigting, A., and Vermon, L.: *Nature New. Biol.*, **235** : 3, 1972.
- 23) Shigematsu, T., Priori, E. S., and Dmochowski, L.: *Nature*, **234** : 412, 1971.
- 24) Oraszlan, S., Bora, D., White, M. H. M., Toni, R., Foreman, C., and Gilden, R. V.: *Proc. Nat. Acad., Sci.*, **69** : 1211, 1972.
- 25) Miyoshi, I., Hasegawa, H., Tsubota, T., Masuji, H., and Hiraki, K.: *Gann*, **62** : 413, 1971.
- 26) Miyoshi, I., Tsubota, T., Nagao, T., Takata, H., Irino, S., and Hiraki, K.: *Gann*, **60** : 583, 1969.
- 27) 三好勇夫, 坪田輝彦, 長谷川晴己, 平木潔: *最新医学*, **28** : 1165, 1973.
- 28) Miyoshi, I., Yoshimoto, S., Fujiwara, S., Hiraki, K., and Kimura, S.: *Cancer*, **33** : 137, 1974.
- 29) Wright, B. S., and Koral, W.: *Cancer Res.*, **29** : 1886, 1969.
- 30) Maruyama, K., and Dmochowski, L.: *Texas Rep. Biol. Med.*, **29** : 83, 1971.
- 31) Mayyasi, S. A., Traul, K. A., Garon, C., Wright, B., and Maywood, N. J.: *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **11** : 54, 1970.
- 32) 入野昭三, 宇野潤一郎, 三好勇夫, 瀬崎達雄, 平木潔: *医学のあゆみ*, **86** : 912, 1973.

Studies on the Infection of Human Cultured Leukocytes

with Murine Rauscher Leukemia Virus

I. Persistent Dual Infection of Human Lymphoblastoid

Cells with EB Virus and C Type Virus

by

Takehiko Hayashi

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

An EB virus-carrying lymphoblastoid cell line established from peripheral blood of a patient with SMON was super-infected in vitro with murine Rauscher leukemia virus. Since then, the cell line has been dually infected with both viruses for more than 1.5 years, as repeatedly demonstrated by the presence of herpes type virus particles and C type virus particles. The C type virus particles liberated from the human cultured leukocytes were no longer leukemogenic when inoculated into otherwise susceptible BALB/c mice, but this procedure rendered them considerably resistant to challenge infection with leukemogenic Rauscher leukemia virus that had been maintained by passage through BALB/c mice. The infectivity of the human cell-derived C type virus to other lymphoblastoid cell lines established from different patients and to primary BALB/c mouse embryo cells could not be demonstrated by the method employed. The implication of these findings is discussed in the light of possible viral etiology of human malignancy.