

マウス白血病ウイルスのヒト培養 白血球への感染に関する研究

第 2 編

EBウイルスとC型ウイルスの重複持続感染系ヒトリンパ芽
球様細胞の異種移植

岡山大学医学部第2内科教室 (主任：平木潔教授)

林 建 彦

[昭和50年7月24日受稿]

第1章 緒 言

ヒト白血病の病因ウイルスとして、EBウイルスとC型ウイルスが最も強く疑われている。第1編¹⁾において著者はEBウイルス感染系ヒトリンパ芽球様細胞にマウスのRauscher白血病ウイルス(RLV)であるC型ウイルスを重複持続感染させることに成功し、持続的に産生されてくるC型粒子がマウスのgs-1抗原を保有してい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ことを報告した。今回著者はこのようなEBウイルスとC型ウイルスの重複持続感染系ヒトリンパ芽球様細胞を免疫抑制した新生児ハムスターに移植し、その移植腫瘍にもC型粒子の産生を認めた。このC型粒子感染系株細胞のハムスターへの造腫瘍性はもとのC型粒子非感染系株細胞と比較し著明に低下していることが示されたので、その理由について若干の免疫学的検討を加えた。

第2章 材料と方法

1. 細胞

移植に用いた細胞は Hodgkin 病患者リンパ節より培養樹立したリンパ芽球様細胞のクローン株細胞(OUMS-6Cl)にRLVを感染させたもの(OUMS-6Cl-R2)である²⁾このOUMS-6ClとOUMS-6Cl-R2の2系の細胞は形態学的にも増殖態度もまったく同一である。さらに膜蛍光抗体法の検索にはもう1つのEBウイルスとC型ウイルスの重複持続感

染系ヒトリンパ芽球様細胞であるOUMS-11a-R³⁾およびEBウイルスもC型ウイルスも感染していないとされているMOLT細胞⁴⁾も用いた。MOLT細胞は熊本大学微生物学教室の日沼頼夫教授より戴いたものである。これら4系の細胞はいずれも、37℃、5%CO₂ふらん器内にて4~5日毎に継代培養された。

2. 培養液

ストレプトマイシン100r/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。

3. 動物

我々の研究室で繁殖させたシリアンハムスターである。これは固形食料と水で飼育した。

4. 抗血清

ハムスターの胸腺細胞に対する抗リンパ球血清(ALS)とOUMS-6Cl-R2細胞に対する抗血清はLeveyら⁵⁾の方法により作製した。すなわち生後1~2ヶ月のハムスターの胸腺細胞約10⁶コを2週間の間隔で体重4kgのウサギに2回静注し、2回目の静注より1週間目に心穿刺により採血し、分離した血清を0.45μのミリポア膜で濾過後-20℃に保存した。同様にしてOUMS-6Cl-R2細胞約10⁶コをウサギに静注し抗血清を作製した。なお抗OUMS-6Cl-R2血清は使用前にハムスターの肝粉末を用いて吸収した。

5. 移植

対数増殖期にあるOUMS-6ClとOUMS-6Cl-

R2細胞をそれぞれ1,000回転, 5分間遠沈し, RPMI 1640に再浮遊し, 生後24時間以内の新生児ハムスターの腹腔内に1匹あたり 10^7 コ/0.1ml注入し. ALSの投与はその直後より始めて週2回, 0.1mlずつ腹腔内に注射した.

6. 電顕的観察

ハムスターに発生した腫瘤を細切し, 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重染色して観察した.

7. 蛍光抗体法

E Bウイルスコア抗原の検索はHenleら⁹⁾の方法により間接法で行った. すなわち検索細胞を1,000回転, 5分間遠沈し, pH7.1~7.2の1/100モルリン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄後少量のPBSに再浮遊した. 次いで1枚のカバースリップ(6×32mm)に 5×10^5 コ程度の細胞を塗抹できるように加減して塗抹し, 室温で乾燥後アセトンで10分間固定した. この塗抹標本に無標識抗ヒトIgGヤギグロブリン抗体(Hyland製)の10倍希釈液をかぶせ, 37℃, 30分間反応させた後15分間に3回PBSを代えて洗浄した. ついで高E Bウイルス抗体価を示す血清をかぶせ, 37℃, 30分間反応後PBSで洗浄, ついで20倍希釈のfluorescein isothiocyanate(FITC)標識抗ヒトIgGヤギグロブリン抗体をかぶせ, 再び

た. なお抗gs-1ラット血清は米国 National Cancer InstituteのDr. R. J. Huebnerより戴いたものである.

膜染色のための抗OUMS-6Cl-R2血清はPBSで適当に希釈した後OUMS-6Cl細胞またはOUMS-6Cl-R2細胞で完全に吸収した. その抗OUMS-6Cl-R2血清を生培養細胞の塗抹標本にかぶせ, 37℃, 30分間反応させた後FITC標識抗ウサギγグロブリンヤギ血清で染色し観察した.

第3章 実験結果

1. OUMS-6Cl-R2細胞の移植

19匹(3腹)の新生児ハムスターにOUMS-6Cl-R2細胞を移植し, そのうち9匹は1週間以内にcannibalismで死亡し, 以後10匹が生存した. 週2回腹部を触知し, 腫瘤の形成を観察したが, 外見上なら異常を認めなかった. 移植後25~29日目に10匹すべてを屠殺後剖検し, うち4匹に腫瘤の形成をみた(表1). いずれの腫瘤も直径5mm以下であった. 4匹のうち2匹には, 肝表面の腫瘤と腸間膜リンパ節腫大を, 1匹には腎周囲腫瘤, 肺腫瘤ならびに少量の腹水貯溜を, のこり1匹には肝表面の腫瘤のみを認めた. これらの腫瘤と腹水から塗抹標本を作製し検鏡すると, 大部分の細胞は移植に用いたOUMS-6Cl-R2細胞とまったく同じであった. 組

表1 RLV非感染(OUMS-6Cl)および感染ヒトリンパ芽球様株細胞(OUMS-6Cl-R2)の異種移植成績

移植細胞	接 種 ハムスター数	1週間以上 の生存数	腫瘍形成 ハムスター数	移植後剖検 までの期間(日)
OUMS-6Cl				
初 代	7	6	6	16-28
継代1代	5	2	2	14-15
継代2代	7	4	4	10-14
OUMS-6Cl-R2				
初 代	19	10	4	24-28

37℃, 30分間染色し, 緩衝グリセリンで封入し観察した.

C型ウイルス抗原の検索も同様にして8~10倍に希釈した抗gs-1(mouse sarcoma virus)ラット血清をかぶせ, 37℃, 1時間反応させた後PBSで3回洗浄し, ついでFITC標識抗ラットγグロブリンヤギ血清の20倍希釈したものを反応させ観察し

織学的にはこれらの腫瘤は未分化リンパ肉腫の像を呈し, 幼若なリンパ系細胞の増殖を, また一部の腫瘤では壊死巣や多核白血球の浸潤を認めた(写真1). これらの腫瘤よりそれぞれ超薄切片を作製し電顕的に観察すると, いずれの腫瘤標本にも成熟または未熟C型ウイルス粒子が認められた(表2). これらのウイルス粒子は, 細胞間隙および胞体空胞内に存

写真1 OUMS-6Cl-R2細胞の移植腫瘍の肝浸潤

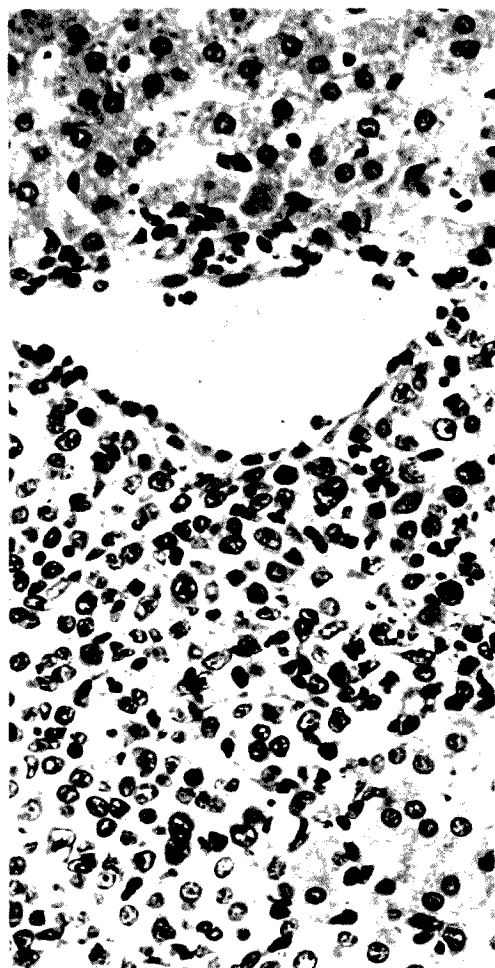


写真2 写真1に示した移植腫瘍内のC型ウイルス粒子 ×32,300

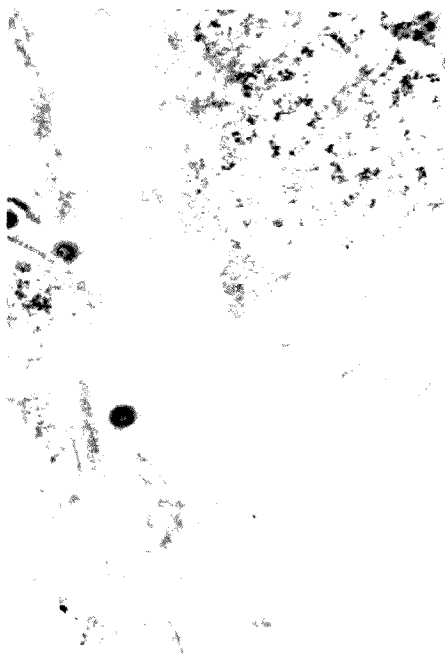


写真3 移植に用いたもの細胞 (OUMS-6Cl-R2) より budding中のC型ウイルス粒子 ×32,300



表2. RLV感染ヒトリンパ芽球様株細胞の移植腫瘍におけるウイルス粒子の証明

hamster number	検索臓器	C型ウイルス粒子	EBウイルス粒子
1	肝腫瘍	+	-
2	腫大リンパ節	+	-
3	腫大リンパ節	+	-

在し、細胞膜面より budding 中のももあり (写真 2), その大きさ, 形態において in vitro で継代維持されている OUMS-6Cl-R2 細胞に認められる C 型ウイルス粒子とまったく同一であった (写真 3). なお EB ウイルス粒子はまったく認められなかった.

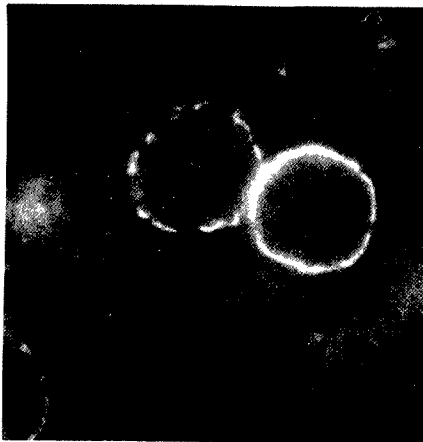
2. 移植腫瘍の再培養と培養株細胞

腎周囲腫瘍と腹水からの細胞を in vitro にて再培養することによりリンパ芽球様株細胞がそれぞれ樹立され, ヒトの染色体構成を有することが確認された. さらにこれら 2 系の培養株細胞を蛍光抗体法により検索したところ, 2.4~7.6% の EB ウイルスカプシド抗原陽性細胞と, 2.7~10.3% のマウス gs-1

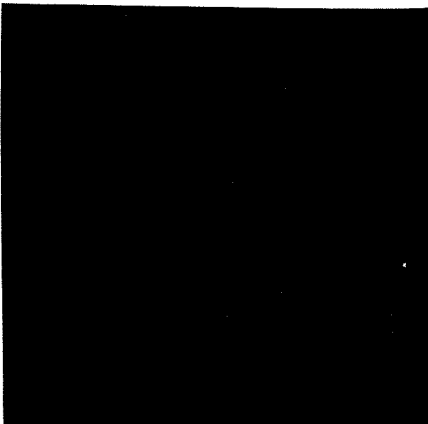
表 3 RLV 感染ヒトリンパ芽球様株細胞の移植腫瘍と腹水より培養樹立したリンパ芽球様株細胞の免疫学的検索

培養樹立株細胞の起原	染色体型	マウス gs-1 抗原陽性細胞 (%)	EB ウイルスカプシド抗原陽性細胞 (%)
腎周囲腫瘍	ヒト	10.3	7.6
腹水	ヒト	2.7	2.4

写真 4 (a) OUMS-6Cl にて吸収した抗 OUMS-6Cl-R2 血清による OUMS-6Cl-R2 細胞の膜蛍光と (b) 膜蛍光陰性の MOLT 細胞



a.



b.

表 4 抗 OUMS-6Cl-R2 血清による RLV 非感染および感染ヒトリンパ芽球様株細胞の膜蛍光抗体法

吸収細胞	被検細胞	感染ウイルス		膜蛍光
		EBV	RLV	
OUMS-6Cl	OUMS-6Cl	+	-	-
	OUMS-6Cl-R2	+	+	+
	OUMS-11a-R	+	+	+
	MOLT	-	-	-
OUMS-6Cl-R2	OUMS-6Cl	+	-	-
	OUMS-6Cl-R2	+	+	-
	OUMS-11a-R	+	+	-

抗原陽性細胞が認められた (表 3)。

3. OUMS-6Cl 細胞の移植

対照として OUMS-6Cl 細胞を 7 匹の新生児ハムスターに移植したが, 6 匹が 1 週間以上生存し, 移植後 17~29 日目に頻死状態において屠殺後剖検した. 6 匹全例に著明な腫瘍の形成と腹水の貯溜が認められた. 腫瘍細胞の浸潤は肝, 腎, 肺など腹腔内および胸腔内の諸臓器に認められた. これらの腫瘍を光顕的に観察すると, 多数の核分裂を伴った幼若なリンパ系細胞がシート状に浸潤増殖し, 未分化リンパ肉腫の像を呈していた. さらにこの腫瘍細胞は ALS 処置した新生児ハムスターに継代移植可能であった (表 1).

4. 膜蛍光抗体法

OUMS-6Cl 細胞で吸収した抗 OUMS-6Cl-R2

血清による膜染色では, OUMS-6Cl-R2 と OUMS-11a-R の 2 系の RLV 感染細胞のほとんどすべての細胞が円周状に蛍光陽性であった。これに対し RLV 非感染系の OUMS-6Cl 細胞と MOLT 細胞ではまったく陰性であった (写真 4 の a, b)。一方 OUMS-6Cl-R2 細胞で吸収した抗 OUMS-6Cl-R2 血清との反応では上記 2 系の RLV 感染細胞はまったく陽性反応を呈しなかった (表 4)。

第 4 章 総括ならびに考按

種々の疾患々々から樹立されたヒトリンパ芽球様細胞をマウス⁷⁾、ラット⁸⁾、或いはハムスター⁹⁾ の新生児に移植するとそれを腫瘍死させることが報告されている。これらのリンパ芽球様細胞には, EB ウイルスまたは EB ウイルスゲノムの存在が確認されているが, C 型ウイルスの感染は知られていない。今回の実験により, EB ウイルスと C 型ウイルスの重複持続感染系ヒトリンパ芽球様細胞が ALS 処

置新生児ハムスターに移植可能で, しかも in vivo に生じた腫瘍も in vitro 同様 C 型ウイルス粒子を産生し続けることが明らかとなった。さらに移植腫瘍から再培養により樹立されたヒトリンパ芽球様細胞にマウスの gs-1 抗原が証明されたことより, in vivo に生じた腫瘍に認められた C 型ウイルス粒子も, 最初感染に用いた RLV であると考えられることができる。Gardner ら¹⁰⁾ はネコ白血病ウイルスを感染したヒト横紋筋肉腫細胞をネコの胎児に移植し, 移植腫瘍から産生されるウイルスがもとの白血病ウイルスと同一であったと報告している。

今回の実験においてもこれまでの異種移植に関する報告^{7) 8) 9)} 同様に EB ウイルスのみの感染状態にある OUMS-6Cl 細胞を新生児ハムスターに移植するとそれを急速に腫瘍死させた。しかるに RLV を重複感染させた OUMS-6Cl-R2 細胞の移植ではハムスターを腫瘍死させることなく, 小腫瘍を形成するにとどまり, その組織学的検査においても腫瘍の退

表 5 RLV 非感染および感染ヒトリンパ芽球様細胞の移植腫瘍の比較

移植細胞	腫瘍死	肉眼的所見	組織学的所見
OUMS-6Cl	+	諸臓器への著明な浸潤と腫瘤形成	多数の核分裂を伴った未分化リンパ系細胞のシート状増殖
OUMS-6Cl-R2	-	2, 3 の臓器の小腫瘤形成	部分的な壊死・多核白血球浸潤を伴った未分化リンパ系細胞の増殖

行性変化とも考えられる所見が得られた (表 5)。Greenberger ら¹¹⁾ は C 型ウイルスを感染させたマウスの培養細胞は, もとの非感染細胞に比較して造腫瘍性が減弱することを報告しているが, この点著者の成績と一致する。

また今回の実験において, RLV 持続感染系細胞は RLV 非感染細胞には存在しない膜抗原を有することが明らかとなった。最近 Aoki¹²⁾ が示唆しているごとく RLV 感染細胞に RLV の膜抗原と共通の膜抗原が存在しているか否かはなお検討されなければならない。いずれにせよヒトリンパ芽球様細胞に RLV を感染させることにより細胞は新しい膜抗原を獲得し, 抗原性が高められる結果, このような細胞を異種移植しても移植腫瘍が拒絶反応を受けなくなり, 致命的腫瘍の増殖をまたさないものと考えられる。それでは何故 ALS 処置された新生児ハムスターが移植拒否能をもっているのだろうか。今

回の実験でも毎週 2 回 ALS を接種したにもかかわらずすべてのハムスターで剖検時にかなりの胸腺組織が残存しており, なお軽度ながら細胞性免疫能を保持している可能性が推測された。このことは ALS 接種と同時に胸腺摘出を行うと, ALS 接種のみに比較して異種移植が明らかに容易になるという Merk ら¹³⁾ の報告からもうかがえる。

OUMS-6Cl-R2 細胞の移植により発生した腫瘍内には EB ウイルスを電顕的に証明することはできなかったが, 腫瘍から再培養した細胞に EB ウイルスカプシド抗原の存在が確認されたことは, 前述の C 型ウイルスの証明と合せてヒトリンパ芽球様細胞が異種宿主内で増殖しても, EB ウイルスと C 型ウイルスの重複持続感染状態は不変であることを示唆している。現在進行中のクローニングによる分析結果によると, すべての OUMS-6Cl-R2 細胞には EB ウイルスと C 型ウイルスの 2 つのゲノムが同時に

存在するようである。

第5章 結 語

今回著者はEBウイルス感染ヒトリンパ芽球様株細胞にRLVを重複感染させた後、抗リンパ球血清(ALS)処置新生児ハムスターに移植し、その造腫瘍性を検討するとともに移植腫瘍のウイルス産生能につき電顕的、ならびに免疫学的検討を加え、つぎの如き興味ある事実を明らかにした。

1. EBウイルスとC型ウイルスの重複感染系ヒトリンパ芽球様株細胞(OUMS-6Cl-R2)を移植した群では、10匹中4匹のみに退縮性の小腫瘍の発生を認めたが、対照としてのRLV非感染系株細胞(OUMS-6Cl)を移植した群では、全例に著明な腫瘍の発生を認めた。
2. OUMS-6Cl-R2細胞の移植腫瘍には電顕的にC型ウイルス粒子の存在を確認した。

3. OUMS-6Cl-R2細胞の移植腫瘍から再培養により樹立したヒトリンパ芽球様株細胞にはEBウイルスカプシド抗原とマウスのgs-1抗原の両者が存在した。

4. RLV感染細胞にはRLV非感染細胞には存在しない新しい膜抗原が認められた。

以上の結果よりRLV感染に伴うヒトリンパ芽球様株細胞のハムスターにおける造腫瘍性低下の理由としては、恐らくC型粒子の感染により新たに生じた膜抗原がALS処置ハムスターにおいても、より著明な免疫反応を誘発させるためであろうと考えられた。

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、阿部申次両博士に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 林建彦：岡山医学会雑誌. **87**：893, 1975.
- 2) Miyoshi, I., Yoshimoto, S., Tsubota, T., Fujiwara, S., Dabasaki, H., Abe, S., and Irino, S.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **143**：850, 1973.
- 3) Miyoshi, I., Hasegawa, H., Tsubota, T., Irino, S., and Hiraki, K.: Gann, **63**：395, 1972.
- 4) Minowada, J., Ohnuma, T., and Moore, G.E.: J. Nat. Cancer Inst., **49**：891, 1972.
- 5) Levey, R.H., and Medawar, P.B.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **56**：1130, 1966.
- 6) Henle, G., and Henle, W.: J. Bact., **91**：1248, 1966.
- 7) Deal, D.R., Gerber, P., and Chisari, F.B.: J. Nat. Cancer Inst., **47**：771, 1971.
- 8) Southam, C.M., Burchenal, J.H., Clarkson, B., Tanzi, A., Mackey, R., and McComb, V.: Cancer, **23**：281, 1969.
- 9) Adams, R.A., Hellerstein, E.E., Pathier, L., Foley, G.E., Lazarus, H., and Stuart, A.B.: Cancer, **27**：651, 1971.
- 10) Gardner, M.B., Johnson, E.Y., Rasheed, S., and McAllister, R.M.: Int. J. Cancer, **12**：563, 1973.
- 11) Greenberger, J.S., and Aaronson, S.A.: J. Nat. Cancer Inst., **51**：1935, 1973.
- 12) Aoki, T.: J. Nat. Cancer Inst., **52**：1029, 1974.
- 13) Merk, L.P., and Adams, R.A.: Cancer Res., **32**：1580, 1972.

**Studies on the Infection of Human Cultured Leukocytes with
Murine Rauscher Leukemia Virus**

**2. Heterotransplantation of a Human Lymphoblastoid Cell Line
Chronically Infected with Epstein-Barr Virus and Rauscher Leukemia Virus**

by

Takehiko Hayashi

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

An Epstein-Barr virus (EBV) -positive human lymphoblastoid cell line chronically infected with Rauscher murine leukemia virus (RLV) was transplanted into antilymphocyte serum (ALS)-treated newborn hamsters. Four of 10 hamsters transplanted developed nonlethal regressive tumors which continued to shed C-type virus. Lymphoblastoid cell cultures reestablished from the heterotransplanted tumor cells were positive for both EBV capsid and murine gs-1 antigens. In contrast, all the hamsters transplanted with its parent cell line without RLV infection succumbed to lethal progressive tumors. The RLV-infected cells were shown to have cell surface antigen that was not found in the noninfected cells. It is postulated that new membrane antigen associated with C-type virus infection provoked more immunologic reaction even in ALS-treated hamsters, accounting for the reduced tumorigenicity of the RLV-infected human leukocytes.