EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV) INFECTION OF EPITHELIAL CELLS
FROM THE NASOPHARYNX — THE USE OF AUTORADIOGRAPHY —

TORU TAKIMOTO, M. D., KAZUO MORISHITA, M. D.,
MITSURU FURUKAWA, M. D. AND SATOSHI SUGIMORI, M. D.

Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa
(Director: R. Umeda, M. D.)

The EBV genome has been shown to be present inside tumor cells of nasopharyngeal carcinoma. Accordingly, it was reasonable to assume that EBV infection may possibly occur in epithelial cells of the nasopharynx by some sort of biological mechanism. The authors carried out the experiments of EBV infection to nasopharyngeal epithelial cells. Firstly cell fusion was attempted between lymphoid cells (BJAB cells) which originated from a case of Burkitt's lymphoma and freed from any of the EBV nucleic acid and adenoid-origin epithelial cells (2-27-Ad cells). Then, these fused cells were injected with EBV.

It was found that EBV-associated nuclear antigen (EBNA) immunofluorescence could be detected only in the BJAB nuclei in the heterokaryons in the first experimental day. From the second day of post-infection, there was a gradual increase in the percentage of 2-27-Ad nuclei in the heterokaryons. However, there was no instance in which the EBNA was found only in a 2-27-Ad nucleus of a heterokaryon.

A82—1388—51360

上咽頭由来上皮性細胞への Epstein-Barr Virus (EBV) 感染成立

— オートラジオグラフィーの利用 —

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任: 梅田良三教授)

滝元 徹・森下 和男・古川 亙・杉盛 恵

緒 言

上咽頭癌 (以下 NPC と略) と Epstein-Barr Virus (以下 EBV と略) とは, 1) 血清疫学的研究¹⁾ 2) NPC 細胞内 EBV ゲノム存在の証明²⁾, 以上主なる 2 点より密接なる関連性を有することをわれわれは以前に報告した。

しかし, Burkitt's lymphoma (以下 BL と略) と EBV の因果関係はこのウィルスのリンパ嚙好性からは容易に考えられるが, 上皮性悪性腫瘍である NPC では, 上咽頭上皮性細胞へ EBV がいかなる機序にて感染成立し, 癌化へと至るかは依然として解明されていない問題である。

われわれはこの問題に対し, リンパ球と上咽頭上皮性細胞との細胞融合が NPC 発生への一つの契機となるのではないかと仮説を立て in vitro での実験を行ってきた²⁾³⁾。

今回, この問題をさらに発展させるべく以下の実験を行ったのでここに報告する。

方法および材料

1. 使用細胞

1) BJAB 細胞⁴⁾: アフリカ BL 由来リンパ芽球様細胞株 (北大医学部癌研ウィルス部大里外善郎教授より細胞分与をうけた。) で例外的に EBV 感染をうけていない, なお培養は 10% 牛胎児血清 (GIBCO) 加 RPMI-

1640 (ニッスイ) 培地 (RF-10) にて 37°C で行った。

2) 2-27-Ad 細胞³⁾: われわれの教室にて樹立化に成功した上咽頭由来上皮性細胞である。培養は 10% 仔牛血清 (GIBCO) 加 Eagle's MEM (ニッスイ) 培地 (EF-10) にて 37°C で行った。

2. 使用ウィルス

1) HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan または Sendai Virus)

2) EBV (B 95-8 細胞株由来)

この 2 種類のウィルス液は既報の方法²⁾ にて精製、分離し使用した。

3. 細胞融合ならびに EBV 感染法

BJAB 細胞を前もって 1.0 μ Ci/ml ³H-thymidine (specific activity 40Ci/m mole) 添加 RF-10 にて 37°C 3 日間培養後、この細胞を集め使用した。一方、2-27-Ad 細胞は通常のトリプシナイゼーション法にて細胞分離を行い使用した。まず、10⁷ 個の BJAB 細胞と 2 $\times$ 10⁶ 個の 2-27-Ad 細胞を混合し、Hanks 液にて 3 回遠心洗浄後、0.5ml Hanks 液に浮遊させた。その後、紫外線にて完全に不活化した HVJ 液 (8000 HAU/ml) 0.5ml を加え、4°C 10 分間反応にて十分細胞凝集の起こった後 37°C 恒温槽中で振とうさせ、細胞融合を行った。その後、Hanks 液で 3 回遠心洗浄を行い余分のウィルス液を捨てた。そして EBV 液 5ml を加え、37°C 恒温槽中で EBV の吸着を行った。そして再び Hanks 液にて 3 回遠心洗浄後、EF-10 を加え、カバースリップ (10 $\times$ 30mm) を入れた培養ビンにて、37°C で培養を行った。

4. 蛍光抗体補体法ならびにオートラジオグラフィ法

1) 蛍光抗体補体法: Reedman and Klein らの方法⁵⁾ に準じて行い、EBV-associated nuclear antigen (EBNA) の存在を検索した。

2) オートラジオグラフィ法

蛍光抗体補体法施行後、その標本を室温にて乾燥させた。その後、サクラ液体乳剤 NR-M2 を 45°C の蒸留水にて 2 倍に希釈し、標本を浸した後、室温 (25°C、湿度 60~70%) にて再び乾燥させ、シリカゲル封管密閉箱に収め、4°C、7 日間露出した。そしてコニドール X にて現象し、コニフィクスで定着後、50% BSS 加グリセリンに封入し、同一視野を紫外線と可視光線にて対比鏡検しながら EBNA の合成、細胞形態および DNA 合成 (Grain の出現) について同時観察を行った^{6,7)}

成 績

まず、³H-thymidine にてラベルされた BJAB 細胞の 95% 以上が オートラジオグラフィにより DNA 合成 (Grain の数 5 個以上を陽性) が起こっていることを確認した。

次いで、培養された融合多核細胞は、培養後約 6 時間にて、カバースリップに一部はりつのが観察された。われわれは、培養 10 時間後カバースリップを取り出し、オートラジオグラフィを行い、融合多核細胞のうちヘテロカリオンの割合を調べた。そしてその後、経時的 (培養後 1, 2, 4, 6, 8 日目) にカバースリップを取り出し、蛍光抗体補体法とオートラジオグラフィ法を施行し、ヘテロカリオン内の EBNA の発現動態を観察した。その結果、融合多核細胞 525 個に対しヘテロカリオン 155 個で 29.5% の比率を占め、かつ、ヘテロカリオンにおいて、2-27-Ad 細胞と BJAB 細胞の核の割合は圧倒的に 2-27-Ad 細胞の核が優勢であった (図 1)。そして、融合多核細胞の EBNA の発現における経時的観察では、2-27-Ad 細胞のみによる多核細胞には、EBNA の発現は 1 例も認められなかった。しかし、ヘテロカリオンに

図 1 ヘテロカリオンにおける BJAB 細胞と 2-27-Ad 細胞との核の比率

A) 蛍光抗体補体法 (×400)

B) オートラジオグラフィー法 (×400)

写真 1 ヘテロカリオン (2-27-Ad・BJAB細胞) へのEBV感染

EBV感染(第1日目)

A) 蛍光抗体補体法 (×400)

B) オートラジオグラフィー法 (×400)

写真 2 ヘテロカリオン (2-27-Ad・BJAB細胞) へのEBV感染

EBV感染(第4日目)

表 1 2-27-Ad-BJAB ヘテロカリオンの EBNA の発現数

EBV 感染後の日数	ヘテロカリオン数	ヘテロカリオン内 BJAB細胞の核のみ EBNA 陽性数	BJAB と 2-27-Ad細胞両方の核に EBNA 陽性数
1	155	8	0
2	131	37	2
4	89	21	25
6	81	24	35
8	42	13	26

においては、EBV 感染後第 1 日目より EBNA の発現が認められた。まず第 1 日目では、ヘテロカリオン内の EBNA の発現は BJAB 細胞の核のみで、2-27-Ad 細胞の核には EBNA の発現は認められなかった (写真 1, A・B)。しかし、2 日目以降においてはヘテロカリオン内の 2-27-Ad 細胞の核にも EBNA の発現が認められ、

しかも経時的にその発現頻度が増大した (写真 2, A・B) (表 1), (図 2)。

ところで、このヘテロカリオン内 2-27-Ad 細胞における EBNA 発現動態で、2-27-Ad 細胞の核に EBNA 陽性の時は、同一のヘテロカリオン内 BJAB 細胞核内の EBNA は常時陽性を呈し、2-27-Ad 細胞の核のみ

図2 2-27-Ad-BJAB ヘテロカリオンのEBNA発現の比率

- : BJAB細胞の核のみEBNA (+)
●: 2-27-AdとBJAB細胞両方の核にEBNA (+)

EBNA陽性を示したヘテロカリオンは一例もみあたらなかった。

考 察

リンパ嚙好性であるEBVがいかなる機序にて上咽頭上皮性細胞へ感染し得るかを解明することは、EBVによるNPC発生機序を追求するうえで重要なテーマであると考えられる。この問題に対して、われわれは図3に

示した仮説を立て、*in vitro*での実験を行ってきた。まず図3a)の仮設では、アフリカBL由来EBVゲノム陽性リンパ芽球様細胞株P3HR-1細胞と2-27-Ad細胞との細胞融合実験を行い²⁾、そして図3b)の仮設においては、EBVゲノム陰性ヒトリンパ球(臍帯血、健康成人末梢血そしてアデノイド由来)と2-27-Ad細胞との細胞融合後のEBV(B95-8細胞株由来)感染実験を行ってきた²⁾。そして、この2つの実験いずれも融合細胞内2-27-Ad細胞の核にEBNAの発現することを以前報告した。しかし、この2つの上咽頭上皮性細胞へのEBV感染実験を行ってきた過程において一つの問題点が浮かんできた。すなわち、この2つの実験において融合細胞内の核の同定は、その2つの細胞の核の大小により判定してきた。そのため、これはその観察者の主観が入る危険性があると考えられた。

そこで、この問題点を解決するためオートラジオグラフィ法を利用することを考えたのである。すなわち、前もってこの種類の細胞のうち一方の細胞の核に³H-thymidineでラベルし、その後他の細胞との細胞融合を行い、オートラジオグラフィを行うことにより³H-thymidineでラベルしてある細胞核にのみ普通顕微鏡下にGrainを認める。そのため、融合細胞の核の同定は容易となる。そしてまた同一視野の蛍光顕微鏡下に切り変えることにより、その融合細胞の蛍光像も観察可能となる。この方法を用いるこにより、上咽頭上皮細胞へのEBV感染成立がより客観的に判定できると考えられた。

今回、われわれはこの方法を用いることにより、前回

図3 上咽頭癌発生機序仮説

報告した図3b)の仮説に基づいた実験をより客観的に行うことを試みたのである。

ところで、前回の報告²⁾では、ヒトリンパ球として、樹立化されていない臍帯血、健康成人末梢血ならびにアデノイド由来リンパ球を使用した。しかしながら、これらのヒトリンパ球では Phytohemagglutinin A (PHA-P), Concanavalin A (Con A) 等の Mitogens を使用しなければ DNA 合成はほとんど行なわれず、³H-thymidine の取り込み量は低く、オートラジオグラフィーを利用できない^{8,9)}。そしてまたこれらのリンパ球は T, B 細胞が混在しており、その比率は個人差がある。さらに EBV の直接的感染標的細胞は B リンパ球であることは知られている。そのため、このようなヒトリンパ球を用いた実験では必ずしも B リンパ球と 2-27-Ad 細胞との細胞融合がおこるとは限らず、実験条件が一定しない。さらに、このようなヒトリンパ球と 2-27-Ad 細胞との細胞融合は、すでに樹立化されたリンパ芽球様細胞と 2-27-Ad 細胞との細胞融合と比してその頻度は低い傾向にあるように思われた。そこで、今回はこれらの欠点を解決すべく、EBV ゲノム陰性であり、すでに樹立化された BL 由来の BJAB 細胞を用いたのである。

この細胞は予備実験にて BJAB 細胞を細胞数 20×10^6 個/ml にて、 $1.0 \mu\text{Ci/ml}$ の ³H-thymidine を添加後 3 日間 37°C 培養を行った。その後、オートラジオグラフィーを行い、4°C、7 日間の露出にて 95% 以上細胞にその取り込みが認められることにより、2-27-Ad 細胞との細胞融合を行っても核の同定が明らかに可能となることを確認し得た。その後、³H-thymidine にてラベルした BJAB 細胞と 2-27-Ad 細胞との細胞融合後の EBV 感染により、このヘテロカリオン内の 2-27-Ad 細胞の核内に EBNA の出現することを確認し得た。しかし、この 2-27-Ad 細胞の核内 EBNA の発現において、前回報告した結果²⁾と同様にヘテロカリオン内 BJAB 細胞の核、続いて 2-27-Ad 細胞の核への EBNA の発現が認められ、BJAB 細胞の核より早期に 2-27-Ad 細胞の核への EBNA の発現が認められることはなかった。この現象は、前回²⁾にも述べたごとく、1) BJAB 細胞核内と 2-27-Ad 細胞核内に EBV ゲノムは同じ様に定着はするが、BJAB 細胞の核の方が EBNA の発現がしやすい。2) BJAB 細胞の核内のみ EBV ゲノムが定着し、その後 EBNA を合成し、この抗原物質のみが、2-27-Ad 細胞の核内へ移行する。3) BJAB 細胞の核内へまず EBV ゲノムが定着し、その後この核内で増えた EBV

ゲノムが 2-27-Ad 細胞の核内へ移行し、その核内で EBNA を合成し、発現する。以上 3 つの可能性が融合細胞内 2-27-Ad 細胞核内への EBNA の発現の方法として推論される。

ところで、今回われわれの得た実験成績はこれからの EBV 感染による NPC 発生機序追求を行うにあたって一つのこれからの方向性を提起しているものと起えられる。すなわち、現在 EBV レセプターとして C₃ レセプターが極めて密接な関係を有していることは Klein 一派ら^{10,11)}により報告されている。しかし C₃ レセプターを有する細胞が必ずしも EBV 感染成立するとは限らない。例えば、C₃ レセプターを有する T 細胞由来 Molt-4 F 細胞は EBV は吸着するが感染成立するに至らない¹²⁾。このことは EBV レセプターを有するのみでは、その細胞内への EBV の侵入、定着へとは至らない場合もあることを示している。つまり、その侵入、定着へと至る過程には、その細胞の持つ他の因子が必要と考えられる。

われわれは、今回行った実験により、ヘテロカリオン (BJAB 細胞と 2-27-Ad 細胞) は、EBV レセプターを有し、かつ EBV の侵入かつ定着を証明し得たと考えられた。しかし、この EBV ゲノムの定着が、ヘテロカリオン内の BJAB 細胞の核にのみ起こり、2-27-Ad 細胞の核には、定着せず BJAB 細胞にて合成された EBNA という蛋白物質が移行したという可能性も否定できない。

この上皮性細胞への EBV ゲノム定着という問題を解決するためにわれわれの実験系を進展させ、サイトカリンにて BJAB 細胞の無核細胞を作り¹³⁾、2-27-Ad 細胞と細胞融合を行い、その後 EBV 感染を行い、この融合細胞における EBNA の発現を調べることにより、上咽頭上皮性細胞への EBV の吸着、侵入、定着、EBNA の発現との関連性についての解明へ一つの糸口となると考えられ今後われわれの追求すべきテーマと考えられた。

結 語

リンパ嗜好性である EBV いかなる機序にて上咽頭上皮細胞へ感染成立するかについて、一つの仮説を立て in vitro での実験を行い、以下の成績を得た。

³H-thymidine にてラベルされた BJAB 細胞 (例外的に EBV ゲノム陰性リンパ芽球様細胞) と上咽頭上皮性細胞である 2-27-Ad 細胞との細胞融合を行い、その後

EBV 感染させた。そして経時的に蛍光抗体補体法による EBNA の発現の観察ならびにオートラジオグラフィによる核の同定を行った。その結果、明らかにヘテロカリオン内 2-27-Ad 細胞の核内に EBNA が発現することを観察し得た。

このことは、現在までBリンパ球がEBVの感染的細胞と考えられていたが、ヒト上咽頭由来上皮性細胞へのEBV感染成立可能となることを間接的ではあるが証明できたと考えられた。

参 考 文 献

- 1) 滝元 徹: 抗 EBV (VCA, EA) 抗体同時測定による上咽頭癌診断の特異性 日耳鼻 82: 255-267, 1979.
- 2) 滝元 徹: EBV in vitro 感染による上咽頭癌発生機序の実験的研究 日耳鼻 82: 119-135, 1979.
- 3) 古川 昶: 2, 3 のヒト組織由来培養細胞への EB ウイルスゲノムの移行 十全医学誌 84: 190-210, 1975.
- 4) Clements G B, Klein G and Povey S: Production by EBV infection of an EBNA-positive subline from an EBNA-negative human lymphoma cell line without detectable EBV DNA. Int J Cancer 16: 125-133, 1975.
- 5) Reedman B M and Klein G: Cellular localization of an EPSTEIN-BARR virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. Int J Cancer 11: 499-520, 1973.
- 6) 小西二三男: がん 非がん細胞の ^3H -thymidine autoradiography 法を中心とした細胞動態学的解析 十全医学誌 80: 380-401, 1971.
- 7) Yamamoto K, Matsuo T and Osato T: Appearance of Epstein-Barr Virus determined nuclear antigen in human epithelial cells following fusion with lymphoid cells. Interviology 6: 115-121, 1975/76.
- 8) 滝元 徹, 前坂明男, 古川 昶, 加勢 満, 川中敏正, 森下和男: 全血微量法によるリンパ球幼若化去応—至適反応条件の検討と耳鼻咽喉科臨床への応用—耳鼻臨床 71: 1429-1436, 1978.
- 9) 早川 活, 林河 宏: リンパ球の in vitro Blastogenesis 臨床免疫 4: 371-380, 1972.
- 10) Yefenof E, Klein G and Kvarnung K: Relationship between complement activation, complement binding, and EBV absorptin by human hematopoietic cell lines. Cell Immunol 31: 225-233, 1977b.
- 11) Klein G, Yefenof E, Falk K and Westman A: Relationship between Epstein-Barr Virus (EBV)-production and the loss of the EBV receptor/complement receptor complex in a series of sublines derived from the same original Burkitt's lymphoma. Int J Cancer 21: 552-560, 1978.
- 12) 工藤俊雄, 橘 武彦, 石川 洋, 檜森 巽: Epstein-Barr ウイルス (EBV) 感染と補体レセプター 日本癌学会総会記事 p. 220 1977.
- 13) 岡田善雄: 細胞融合と細胞工学 講談社 1976.

稿を終えるにあたり御指導、御校閲下さいました恩師 梅田良三教授に深甚なる謝意を表します。

(原稿受付 昭和54. 7. 23日)

別刷請求先 〒920 金沢市宝町13-1

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室 滝元 徹