EXPERIMENTAL STUDIES ON VIRAL ETIOLOGY OF EPSTEIN-BARR (EBV)
IN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA (NPC): ESTABLISHMENT OF EBV
INFECTION ON HUMAN EPITHELIAL CELLS DERIVED FROM
NASOPHARYNGEAL TISSUES

TORU TAKIMOTO, M. D.

Department of Oto-Rhino-Laryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa
(Director: R. Umeda, M. D.)

and

Department of Virology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa
(Director: M. Hatano, M. D.)

There have been many suggestive evidences on the close correlation between EBV infection and the development of NPC, though the mode of this lymphotropic EBV infection how to enter into the epithelial cells of the nasopharynx and transform the cells to NPC are still unknown. In order to clarify an etiological role of EBV in NPC, several approaches in vitro were tried in this respect, and the results are as follows:

- 1) EBNA (EBV-associated nuclear antigen) as an expression of EBV infection was found in 5-90% cells of 4/8 NPC biopsy specimens.
- 2) Nine tissues of 12 NPC were successfully cultured in vitro. EBNA-positive cells were observed in 2/3 epithelial cells cultured. In fibroblast-like cells from one case, floating cells were appeared and they were isolated without EBV infection for the establishment of the cell line (TNPCly-1). This TNPCly-1 cells clearly showed B lymphocyte markers and EBNA in more than 90% of the cells.
- 3) EBNA-negative lymphocytes from cord blood, adult peripheral blood and tonsil were possible to transform in vitro by EBV (B95-8 strain) infection. The transformed cells acquired EBNA and showed also B lymphocyte markers (CBL-E-1, 2, 3, 4, 5; APL-E-1, 2, 3, 4, 5; TON-E-1, 2).
- 4) Most of the human monolayer cells employed in this experiment (2-27-Ad, T-Ad, Hep-2, FL, Intestine-407, HHEL and AHEL) were not transformed to EBNA-positive by EBV infection. However, 3 floating cells (A1L, A2L, A3L cells) appeared in 6 nasopharyngeal fibroblast-like cells about one month after EBV inoculation. These 3 established cell lines also showed EBNA in more than 90% of the cells and B lymphocyte markers.
- 5) In the nasopharyngeal epithelial cells (2-27-Ad cells) which fused with EBNA-negative lymphocytes by UVed HVJ (Sendai virus) and then infected with EBV, EBNA was observed only in the nucleus of polykaryons. On the second day after EBV infection, both lymphocytes and 2-27-Ad cells of polykaryons showed positive staining of EBNA, which suggested an EBV infection in the epithelial cells. Moreover, the induction of both early nuclear antigen (ENA) and early antigen (EA) were possible by IudR (70 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treatment of the fused cells infected with EBV.
- 6) Using 2-27-Ad cells, the mutant cells (Ad-AH) defective of enzyme, HGPRT (hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase), were selected after the treatment of the cells with 8-

azahypoxanthine. Ad-AH cells were fused with EBNA- and HGPRT-positive A2L cells by UVed HVJ and then cultured with HAT (hypoxanthine-aminopterin-thymidine) medium. These somatic cell hybrids (Ad-AH/A2L) have been maintained for about 6 months with positive EBNA in more than 80% of the cells in this experiment, and this is a good model for study of NPC in vitro.

A82—0119—51390

EBV in vitro 感染による上咽頭癌発生機序の実験的研究

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

I. 緒 言

上咽頭癌と Epstein-Barr virus (EBV) との関連性については、1966年 Old ら¹⁾の最初の報告に端を発し、まず EBV 関連抗体が、上咽頭癌患者に特異的に高頻度かつ高力価に証明されるに至った²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾。さらに、上咽頭癌生検材料において、核酸相補性試験や⁶⁾⁷⁾、蛍光抗体補体法⁸⁾⁹⁾ (Anti-Complement Immunofluorescence; ACIF) により、腫瘍周囲に浸潤したリンパ球ではなく、腫瘍細胞自体に EBV ゲノムが、高頻度に見出されている。これら主な2点より、上咽頭癌と EBV は密接なつながりを有していると現在は考えざるを得ないと思われる。

しかし、EBV の感染標的細胞は、ヒトとサル¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾のリンパ球¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾、とりわけ B 細胞と考えられており、上皮性細胞への直接的感染成立は証明されていない。リンパ嗜好性の EBV が上皮性腫瘍である上咽頭癌とどのような関係を有し、さらに、いかなる機序にて、上咽頭上皮性細胞への感染成立が生ずるかは、興味ある問題である。

1974年山本ら¹³⁾¹⁴⁾、1975年古川¹⁵⁾は、in vitro の実験にて、EBV ゲノム保有細胞（リンパ芽球様細胞）と上皮性細胞との細胞融合により、融合細胞の上皮性細胞核内に EBV-associated nuclear antigen (EBNA) が発現することを報告した。

そこで、著者はこれらの報告をさらに発展さすべく、上咽頭上皮性細胞への新たな EBV 感染成立機作を in vitro 実験で解析しつつ、上咽頭癌発生機序につき考察したのでここに報告する。

II. 方法および材料

1) 上咽頭癌細胞（生検およびその培養）の EBNA 検索

① 対象

金沢大学、石川県立中央病院ならびに富山県立中央病院耳鼻咽喉科にて、上咽頭癌と診断された患者10名による上咽頭生検材料および頸部リンパ節摘出組織12例を対象とした。ちなみに対照として、上咽頭肉腫3例、上咽頭線維腫1例、喉頭癌5例、上顎癌5例、計14例の組織を選んだ。

② 標本作製法

耳鼻咽喉科領域の生検摘出組織の多くは、常に雑菌による汚染の可能性があるので、組織の表面は消毒用イソジン液（明治製）で充分消毒した。さらに多量の抗生物質（カナマイシン 5μg/ml、リラシリン 5μg/ml）加 Hanks 液で洗った。一方、頸部癌転移リンパ節は無菌的に摘出されているため、一回 Hanks 液で洗ってから、周囲脂肪組織や被膜を剝離、除去し、腫瘍組織と思われる部位を使用した。

これら組織を滅菌シャーレの Hanks 液中にて、ハサミとカミソリで細切（約 1 mm³）し、この一部組織を塗抹標本に使用した。残りの組織は、カバーガラス（10×30mm）を入れた培養瓶にて、三宅の moist system method²⁰⁾で、37°C培養した。なお、培養液は 10%牛胎児血清（56°C 30分 非働化）加 Eagle's MEM（ニッスイ製）（EF-10）を使用した。

③ EBNA の検索 (ACIF)

Reedman and Klein ら¹⁶⁾の方法の鈴木、日沼変法¹⁷⁾

を使用した。すなわち、標本を室温乾燥後、四塩化炭素 (CCl₄) で室温 15 分固定した。この標本を健康成人血清 (抗 viral capsid antigen; VCA 抗体価 1:160, 抗 early antigen; EA 抗体価 <1/10) と補体用健康成人血清 (抗 VCA 抗体価 <1/10, 抗 EA 抗体価 <1/10) とを混合し、それぞれの最終濃度 1:10 になるように BSS (balance salt solution) にて希釈し、一次血清として使用した。かかる血清にて、37°C 30 分反応後 BSS にて洗浄して、抗ヒト補体蛍光抗体 (FITC-labelled anti-human β_1C/β_1A , Hyland Lab. U.S.A.) で、さらに 37°C 30 分反応させた。そして、再び BSS で洗浄後、蛍光顕微鏡にて観察した。

2) ヒト各種培養細胞への EBV 直接感染実験

① 使用細胞

i) ヒト各種リンパ球

A) 臍帯血ならびに健康成人末梢血由来リンパ球。

ヘパリンを注射筒に浸し採血後 Conray-Ficoll 法¹⁸⁾ に従い、リンパ球の分離を行った。その後、この細胞を Hanks 液にて、3 回遠心洗浄後、20% 牛胎児血清加 RPMI 1640 液 (RF-20) で $10^6/ml$ の細胞濃度に 37°C で 1 日培養後、浮遊した単核細胞を使用した。

B) 口蓋扁桃リンパ球

口蓋扁桃摘出組織を 1) で述べた方法にて組織表面を消毒後、遠心管 (40ml 用) に入れ、下甲介剪刀にて細切した。そして、Hanks 液を加えた後、ガーゼと金属メッシュを通過した浮遊細胞液を Conray-Ficoll 法にて、リンパ球を分離した。以下、A) の方法と同様にて培養後、使用した。

ii) ヒト上咽頭由来単層培養細胞

A) 上皮性細胞株

a) 2-27-Ad 細胞¹⁵⁾

b) T-Ad 細胞: 著者は、1) の上咽頭癌生検材料による初代培養法と同様に、アデノイド組織の培養を行った。その結果、2-27-Ad 細胞と同様に樹立化に成功した細胞株。

いずれも 10% 牛牛血清加 Eagle's MEM (EC-10) で 37°C に培養された。

B) 線維芽様細胞

AdF₁~AdF₆細胞: ii) A) b) と同様の初代培養を行い、1 回継代を行って得られた細胞で、培養液には EF-10 を用い、37°C で培養した。

iii) その他ヒト各種単層培養細胞

A) 線維芽様細胞

HHEL, AHEL: 石川県立中央病院矢吹博士より分与をうけた胎児肺由来細胞で継代数 10 代以内の diploid 細胞で、培養は EF-10 による 37°C で行った。

B) 上皮性細胞株

Hep-2 (喉頭癌由来), Intestine-407 (胎児小腸由来), FL (羊膜由来): いずれも EC-10 で 37°C 培養した。

② EBV 液

B 95-8 細胞¹⁰⁾ を $3 \times 10^5/ml$ の細胞濃度で RF-10 に浮遊し、37°C 7 日間液交換なしで培養した。この培養液を 3000 rpm 10 分遠心し、上清をさらに 0.8 μ ミリポアフィルターにて濾過した液を使用した。

なお、感染ウィルスの定量は、50% of transforming dosis (TD₅₀)/ml にて算出した¹⁹⁾。すなわち EBV 液の 10 倍段階希釈液をヒト臍帯血由来リンパ球に接種し、約 1 カ月観察してリンパ球のトランスフォーメーション (液の酸性化、芽球化細胞のクランプ形成、EBNA 陽性) した最終希釈濃度を Reed and Muench 法で算出した。なお、著者の使用した EBV 液は 10^4 TD₅₀/ml である。

③ EBV 接種法

i) リンパ球への感染

リンパ球を RF-20 培養液にて $10^6/ml$ の細胞濃度に浮遊させ、その 0.8 ml に 0.2 ml の EBV 液を加え、全量を 1 ml とした。これを小試験管にて 37°C で培養し、その後週 2 回の液交換を行ない、リンパ球のトランスフォーメーションを観察した。

ii) 単層培養細胞への感染

培養液を吸引後、EBV 液を細胞面が浸る程度に入れ、37°C 90 分吸着させた。Hanks 液で 1 回洗った後、EF-10 を加え 37°C にて培養した。EBV 感染成立の証明は、感染後連日 1 週間、2 週間後、そして約 1~2 カ月後の EBNA 観察にて行った。

④ 各種リンパ芽球様細胞株の免疫学的同定

i) ロゼット形成反応

これら 3 種類の反応は、矢田ら²⁰⁾ および Robinson ら¹¹⁾ の方法に準じて行った。

ii) 細胞質内免疫グロブリンの検出

室温 10 分アセトン固定細胞を抗ヒト (IgG, IgM, または IgA) 蛍光色素ラベル血清にて 37°C 1 時間反応させて、蛍光顕微鏡で観察した。

3) EBNA 陰性ヒトリンパ球との融合 (新方法) による 2-27-Ad 細胞への EBV 感染実験。

① 使用細胞

i) ヒトリンパ球 (臍帯血, 健康成人末梢血およびアデ

ノイド由来): 2) i) A) B) の方法に分離し, EBNA 陰性を確認してあるリンパ球 ii) 2-27-Ad 細胞: 前記と同じものである。

② 使用ウィルス

HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan または Sendai Virus): 名古屋-1-60株接種発育鶏卵 (10日卵) より集めた漿尿液の $7,000 \times g$ で20分遠心上清をさらに $25,000 \text{ rpm}$ で60分超遠心し, その沈渣を PBS (Phosphate buffered saline) に浮遊後, 超音波処理により均一化した半精製 HVJ を使用した。なお, 使用にあたっては, この HVJ 液を Hanks 液で希釈 (8000 HAU/ml) 後, 紫外線ランプ (UV) (100 erg/sec/mm) にて, 10分照射し, 不活化して使用した。

③ 細胞融合法²¹⁾²²⁾ならびに EBV 接種法

2-27-Ad 細胞を通常のトリプシナイゼーション法にて単離させ, Hanks 液で $4 \times 10^6/\text{ml}$ の細胞濃度に浮遊した。またリンパ球も $2 \times 10^7/\text{ml}$ の細胞濃度にて Hanks 液に浮遊させた。かかる2種類の細胞を 0.25 ml ずつ (すなわち 1:5 の割合に) 混合させ, さらに HVJ 液 (8000 HAU/ml) 0.5 ml を加え, 全量を 1 ml にした。その後, 4°C 10分の反応により細胞凝集をおこさせ, さらに 37°C 30分の反応で細胞融合を行った。そして, Hanks 液で3回遠心洗浄後, ① ただちに EBV 液 5 ml にて細胞を浮遊し, 37°C 90分 EBV を吸着させ, 一方 ② 細胞融合後 EF-10 にて 37°C 24時間培養後, 培養液を吸引し, EBV 液 37°C 90分吸着させた。その後, ①②いずれの場合も接種未吸着 EBV をすて, Hanks 液で1回洗浄後, 新しい培養液 (EF-10) にて 37°C で培養した。

④ early nuclear antigen (ENA)²³⁾²⁴⁾, early antigen (EA)²⁵⁾²⁶⁾ 検出のための蛍光抗体間接法

上咽頭癌患者血清で, 異好性抗核抗体ならびに抗細胞質抗体を認めない血清による一次反応後の蛍光抗体間接法を行った。二次反応の蛍光抗体としては, 抗ヒト γ -グロブリン蛍光色素ラベル血清を使用した。

4) EBV ゲノム 保有雑種細胞 (単層培養細胞) の選別。

① 使用細胞

i) Ad-AH: 2-27-Ad 細胞の HGPRT (hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase) 欠損株で, Szybalski ら²⁷⁾ による Detroit 98 S の HGPRT 欠損株選別法に準じ, 8-azahypoxanthine (8-AH) 耐性株選別を行ない, 8-AH ($20 \mu\text{g/ml}$) 加 EC-10 にて増殖可能と

図 1. 8-azahypoxanthine の常時接触している条件下でのコロニー形成率 (log-log プロット)

なった 8-AH 耐性細胞 (図 1)。

ii) A₂L (ヒトアデノイド由来 EBNA 陽性リンパ芽細胞株): RF-10 にて, 37°C で継代培養している細胞。

② 細胞融合法ならびに培養法

3) で述べた細胞融合法と同様にして行った。かかる反応終了後, EF-10 にて1日培養後, 培養液を吸引して, HAT (EF-10+Hypoxanthine $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ Aminopterin $4 \times 10^{-7} \text{ M}$, Thymidine $1.6 \times 10^{-5} \text{ M}$, Glycine $3 \times 10^{-6} \text{ M}$) 培地にて, 37°C 培養し, 週2回の割合にて液交換を行った。

III. 成 績

1) 上咽頭癌細胞 (生検および培養) の EBNA 検索 (表 1)

上咽頭癌生検材料による塗抹標本では, 8例中4例の腫瘍細胞と思われる核内に EBNA を5~90%証明得た (写真 1)。またこの生検材料による初代培養は, 12例中9例が培養に成功した。そのうち, 6例は線維芽細胞のみ, 3例は上皮性細胞と線維芽細胞が混在していた。これらの細胞の EBNA を調べたところ, 2例の上皮性細胞が EBNA 陽性であった (写真 2, 3)。しかも, この EBNA 陽性を示した上皮性細胞は, 癌転移リンパ節からの初代培養によるものであった。この細胞をさらに継代を重ねると, 2代目より, 上皮性細胞はほとんど認められなくなり, 線維芽細胞のみとなった。し

表 I 上咽頭癌組織の EBNA 検索

患者名	性別	年齢	抗 EBV 抗体価 (VCA) (EA)	病理診断	培養材料 (生検部位)	塗末標本による EBNA の証明	初代培養細胞の形態ならびに その細胞の EBNA の証明
K. N.	♂	66	1: 320 1: 10	transitional cell ca.	Ly. ¹⁾	N. D. ³⁾	増殖せず
T. I.	♂	41	1: 320 1: 160	epidermoid ca.	NP. ²⁾	N. D.	雑菌による汚染
					Ly		線維芽様細胞・浮遊細胞 EBNA (－) EBNA (＋)
T. S.	♂	51	1: 320 1: 80	transitional ca.	NP.	10—20% EBNA(＋)	線維芽様細胞 EBNA (－)
K. N.	♂	68	1: 640 1: 10	invasive epidermoid ca.	NP.	(－)	線維芽様細胞 EBNA (－)
K. K.	♀	52	1: 160<1: 10	invasive. epidermoid ca.	NP.	(－)	線維芽様細胞 EBNA (－)
S. M.	♀	58	1: 2560 1: 160	undifferential cell ca.	Ly.	80—90% EBNA(＋)	上皮性細胞・線維芽様細胞 EBNA (＋) EBNA (－)
K. N.	♀	38	1: 320 1: 80	transitional cell ca.	Ly.	60—70% EBNA(＋)	上皮性細胞・線維芽様細胞 EBNA (＋) EBNA (－)
K. M.	♂	64	1: 320 1: 40	epidermoid ca.	NP.	(－)	線維芽様細胞 EBNA (－)
Y. N.	♂	47	1: 320 1: 80	epidermoid ca.	NP.	5—10% EBNA(＋)	上皮性細胞・線維芽様細胞 EBNA (－) EBNA (－)
					Ly.	(－)	増殖せず
S. B.	♂	59	1: 1280 1: 640	transitional cell ca.	NP.	N. D.	線維芽様細胞 EBNA (－)

1) Ly; 頸部転移リンパ節

2) NP; 上咽頭

3) N. D.; Not Done

写真 1. 上咽頭生検塗抹標本による EBNA の証明 ×400 (ACIF)

写真 2. 上咽頭癌組織による初代培養細胞 (上皮性細胞) 培養 1 週目 ×200

写真 3. 上咽頭癌組織による初代培養細胞
(上皮性細胞) の EBNA の証明.
×400 (ACIF)

かも、これらの線維芽様細胞のうち、9 例中 8 例が、3～6 カ月 (20～30 代継代) 後、細胞の増殖は停止して、樹立化に成功しなかった。一方、残りの 1 例においては 3 代継代後 (初代培養後 26 日目) より、線維芽様細胞間に円形細胞の出現を認めた (写真 4)。その後、急激に増殖してコロニーを形成し、さらに、コロニーの中心部より浮遊してクランプをつくるに至った (写真 5)。この浮遊細胞を集め、継代培養すると、一部ガラス面にはりつきながら増殖し、樹立化に成功した (TNPCly-1)。

この細胞の免疫学的特徴としては、EBNA は 90% 以上陽性、E-rosettes 陰性、EAC-rosettes 72% (写真 6) 陽性、陰性、細胞質内免疫グロブリン (IgG 12%, IgM 62% (写真 7) IgA 6%) 陽性であった。このことは、この細胞が EBV 感染リンパ芽球様細胞であり、同時に B リンパ球としての特徴を有していることを示している (表 IIa)。

写真 4. 上咽頭癌生検組織培養細胞 (線維芽様細胞) よりの円形細胞の出現像、培養 28 日目 ×200

写真 5. TNPCly-1 のクランプの形態 ×100

写真 6. TNPCly-1 の EAC rosette formation
×400

写真 7. TNPCly-1 の細胞質内免疫グロブリン (IgM) の検出 (蛍光写真) ×400

一方、その他上咽頭癌以外頭頸部悪性腫瘍細胞の検索では、14 例中 1 例も EBNA を認めなかった。しかも TNPCly-1 のときリンパ芽球様細胞の出現は 1 例も見られなかった。

2) ヒト各種培養細胞への EBV 直接感染実験

④ ヒト各種リンパ球 (表 IIb)

表 IIa 上咽頭癌由来線維芽様細胞からEBV非接種で樹立化した浮遊細胞の免疫学的特徴

浮遊細胞	初代培養から 樹立化するま での日数	リンパ球の免疫学的特徴						
		EBNA	E	EAC	EA(7S)	細胞質内		
						IgG	M	A
TNPCly-1	26(日)	>90%	0%	72%	/	12%	62%	6%

表 IIb B95-8由来EBV感染によりトランスホームしたリンパ芽球様細胞株の免疫学的特徴

リンパ芽球様 細胞株	リンパ球提供 者の抗EBV 抗体価 VCA EA	リンパ球の免疫学的特徴						
		EBNA	E	EAC	EA(7S)	細胞質内		
						IgG	M	A
CBL-E-1 ¹⁾		>90(%)	0%	/	/	12(%)	64(%)	/
2		>90	0	62(%)	/	14	52	0(%)
3		>90	0	/	0	15	50	0
4		>90	0	51	0	6	48	/
5		>90	0	/	0	9	/	/
APL-E-1 ²⁾	1:160 <1:10	>90	0	71	0	7	/	0
2	1: 80 <1:10	>90	0	/	0	30	49	0
3	1: 20 <1:10	>90	0	54	0	5	64	0
4	1: 40 <1:10	>90	0	52	0	21	45	0
5	1: 40 <1:10	>90	0	78	0	13	62	0
TON-E-1 ³⁾	1: 80 <1:10	>90	0	46	0	36	51	4
2	1: 40 <1:10	>90	0	64	0	8	62	5

1) CBL-E: 臍帯血由来リンパ芽球様細胞株

2) APL-E: 健康成人末梢血由来リンパ芽球様細胞株

3) TON-E: 扁桃由来リンパ芽球様細胞株

i) 臍帯血由来リンパ球

5例のEBV感染実験において、いずれも2～3日目より、リンパ芽球様細胞がクランプを形成し、さらに培養液の酸性化を生じた。この細胞を集め、継代を重ねて樹立化に成功した(CBL-E-1,～5)。ちなみに、このリンパ芽球様細胞は、免疫学的特徴としてEBNA 90%以上陽性、E-rosettes 陰性、EAC-rosettes 52～62%陽性、EA-rosettes 陰性、細胞質内免疫グロブリン(IgG 6～15%, IgM 48～64%, IgA 0%)陽性でBリンパ球の特徴を有している。

ii) 健康成人末梢血由来リンパ球

このリンパ球は、臍帯血由来リンパ球と異なり、トランスフォーメーションに至るまでの日数にそれぞれ個体差があった(4～9日間)。しかし、5例とも全て臍帯血リンパ球と同様樹立化に成功した。

このリンパ芽球様細胞の免疫学的特徴も、やはりEBNA 90%以上陽性、E-rosettes 陰性、EAC-rosettes 52～78%陽性、EA-rosettes 陰性、細胞質内免疫グロブリン(IgG 5～30%, IgM 45～64%, IgA 0%)陽性とリンパ球の特徴を有している。

iii) 口蓋扁桃リンパ球

4例の扁桃リンパ球のうち、2例がトランスフォーメーションを認めた。なおこのリンパ芽球様細胞免疫学的特徴もやはりEBNA 90%以上陽性、E-rosettes 陰性、EAC-rosettes 46～64%陽性、EA-rosettes 0～1%陽性、細胞質内免疫グロブリン(IgG 8～36%, IgM 51～62% IgA 4～5%)陽性であった。特に細胞質内免疫グロブリンIgAが4～5%認められたことは注目される。

なお、これらa)～c)の各リンパ球は、EBV感染前はいずれもEBNA 陰性であった。

② ヒト各種単層培養細胞

i) 2-27-Ad, T-Ad, HHEL, AHEL, Hep-2, Intestine-407, FL 各細胞

この7種類の各ヒト単層培養細胞へのEBV感染は、約2カ月間の経時的EBNAの観察にて、感染成立は証明し得なかった。

ii) AdF₁~AdF₆ (アデノイド由来線維芽様) 細胞

AdF₁~AdF₆の初代培養細胞1回継代後、培養瓶ぎしりに充分増殖させて、EBVを接種した。その後、液交換のみにて継代は行なわなかった。その間AdF₁, AdF₄, AdF₆は感染後それぞれ21日目、32日目、48日目に円形細胞の出現を認めた(写真8)。その後、前述のTNPCly-1(上咽頭癌由来線維芽様細胞よりの樹立化浮遊細胞)と類似の現象がおこり、クランプを形成し、樹立化に成功した。

A₁Lは約1週間、A₂Lは約1カ月間ガラス面に一部はりつきながら増殖し、その後全ての細胞は浮遊状となった。一方、A₃Lは現在5カ月間培養するも一部ガラス面にはりつき増殖し続けている。かかるA₃L細胞のうち、ガラス面にはりついた細胞(A₃M細胞)を⁶⁰Co(400rad)照射生後3日目のハムスターの皮下に 8×10^6 個の細胞を移植した。その結果、移植後1週目に腫瘤を一部のハムスターに認めたが、次第に退縮し、3週目には完全に消失した。また、⁶⁰Co(400~1200rad)照射ハムスター(生後2~3カ月)のcheek pouchに移植した場合も同様の結果であった(写真9)。

なお、このリンパ芽球様細胞ならびにガラス面にはりついた細胞は、EBNA 90%以上陽性(写真10)、E-rosettes 陰性、EAC-rosettes 60~70%陽性、EA-rosettes 0.9~3.8%陽性、細胞質内免疫グロブリン(IgG 9~26%, IgM 50~60%, IgA 6~10%)とやはりBリンパ球の特徴を有していた(表IIc)

3) 新方法による2-27-Ad細胞へのEBV感染実験(図2, 3, 4)

各種ヒトリンパ球と2-27-Ad細胞とを融合させ、EBV感染させた。

この際、①細胞融合後、ただちにEBV感染を行うと、頻度の差はあるが、融合細胞内リンパ球の核にEBNAがまず初めに認められた(写真11)。その後、融合細胞内リンパ球と2-27-Ad細胞との両方の核にEBNAが認められた(写真12)。しかし、融合細胞中2-27-Ad細胞の核のEBNA出現が、リンパ球の核のEBNA出現より先行する例はみあたらなかった。また、

写真 8. アデノイド由来線維芽様細胞へのEBV (B95-8細胞由来) 感染後50日目の円形細胞出現像, (A₃L) ×100

写真 9. ハムスター(800rad⁶⁰Co照射)へのA₃M細胞異種移植後1週目のcheek pouch 腫瘤出現

写真 10. A₂L細胞のEBNA証明(ACIF) ×400

EBNAの経時的観察において、単層培養細胞の単核細胞(おそらく、リンパ球と2-27-Ad細胞の雑種細胞でEBV感染成立した細胞と思われる。)においてもEBNA

表 IIc B95-8由来EBV感染により、上咽頭由来（アデノイド）線維芽様細胞から樹立した浮遊細胞の免疫学的特徴

浮遊細胞	EBV感染後 浮遊細胞出現 までの日数	リンパ球の免疫学的特徴						
		EBNA	E	EAC	EA(7S)	細胞質内		
						IgG	M	A
A ₁ L	21(日)	>90%	0%	70%	1.2%	14%	60%	6%
A ₂ L	32	>90	0	60	0.9	26	51	8
A ₃ L	48	>90	0	67	3.8	9	50	4
A ₃ M※	/	>90	0	63	2.9	/	/	/

※) A₃M: A₃Lのうち、一部ガラス面にはりつきながら増殖している細胞。

図 2. 各種リンパ球と 2-27-Ad 細胞との細胞融合後、直ちに EBV (B95-8 由来) を感染させ、その後の融合細胞内の EBNA 出現頻度の経時的観察。

● 多核巨細胞内のリンパ球核 EBNA のみ陽性

▲ 多核巨細胞内のリンパ球と 2-27-Ad 両方の核 EBNA 陽性

1) CBL: 臍帯血由来リンパ球

2) APL: 健康成人末梢血由来リンパ球

3) NPL: 上咽頭（アデノイド）由来リンパ球

の出現が認められた（融合細胞中 0.2%）（写真 13）。その後、約 1 カ月の経過観察中、一部コロニー状に EBNA 陽性の単層培養細胞（単核細胞）集団を認めた（写真 14）。この結果より、EBNA 陽性細胞クローニングを試みたが、成功しなかった。

次に、②リンパ球と 2-27-Ad 細胞との融合後 24 時間培養して融合過程をさらに進めた後、EBV を感染させた実験においても、全く同様に EBNA の核内出現を融合細胞に認めることができた。

ところで、ここに用いた各種ヒトリンパ球の細胞融合前すなわち EBV 感染前はいずれも EBNA 陰性であっ

た。しかし、ここに興味ある 1 例が認められた。すなわち、6 例のアデノイド由来リンパ球中 1 例（抗 VCA 抗体価 1:160、抗 EA 抗体価 <1:10）に 2-27-Ad 細胞との細胞融合 2 日後、EBV 非感染で融合細胞内リンパ球の核に EBNA が証明された（全融合細胞中 0.25%）。さらに、この場合は融合 4 日目より、融合細胞内 2-27-Ad 細胞の核にも EBNA の出現を認めた（全融合細胞中 0.14%）。

次に、融合細胞内 EBNA の観察に加え ENA、EA 検索の目的にて、蛍光抗体間接法を行ったが、これは 1 例も認められなかった。しかし、細胞融合に続く EBV 感

図 3. 細胞融合後の培養日数
 臍帯血由来リンパ球と 2-27-Ad 細胞を細胞融合させ EF-10 にて 24 時間 37°C 培養, さらに EBV 感染させその後の融合細胞内の EBNA 出現頻度の経時的観察
 ● 多核巨細胞内のリンパ球核 EBNA のみ陽性
 ▲ 多核巨細胞内のリンパ球と 2-27-Ad 両方核 EBNA 陽性

染 3 日目より 5-Iododeoxyuridine; IudR (70 μ g/ml) 添加による刺激を行うことにより, まず IudR 添加後 1 日目で融合細胞核内に光る 蛍光像 (ENA) を認めたが (写真 15), その後この蛍光像は徐々に消失した. 一方, IudR 添加後徐々に, 細胞全体特に細胞質に蛍光 (EA) の存在する融合細胞の頻度が上昇した (写真 16).

4) EBV ゲノム保有雑種細胞 (単層培養細胞の選別)

Ad-AH 細胞と A₂L (EBV ゲノム保有リンパ芽球様) 細胞とを紫外線不活化 HVJ により細胞融合させ, HAT 培地にて培養した. 第 1 週目は液交換を隔日に施行し, その後, 週 2 回の割合に行なった. その結果, A₂L 細胞と融合しなかった Ad-AH 細胞は, HAT 培地培養後約 10 日目より細胞の変性を認め, 培養 3 週目にはほとんど認められなくなった. また, Ad-AH 細胞と細胞融合していない A₂L は, 浮遊形態を示し, 頻回の液交換にて除去できた. かくて A₂L 細胞と Ad-AH 細胞との

図 4. IudR (70 μ g/ml) 添加後の培養日数
 臍帯血由来リンパ球と 2-27-Ad 細胞との細胞融合後, 直ちに EBV 感染させ EF-10 にて 37°C 3 日間 培養して IudR 添加, その後の融合細胞内 ENA と EA の出現頻度の経時的観察.

融合を行ない, HAT 選択培地で培養可能となった細胞, いわゆる雑種細胞 (A₂L/Ad-AH) のみが生存増殖をつづけ, HAT 培地培養後約 10 日目よりコロニーの形成を認めた. その後, 徐々に増殖して培養約 1 カ月目より継代可能となった. この雑種細胞は単層培養細胞の形態をし, EBNA は約 80% 陽性を示した. かかる細胞は現在に至るまで約 6 カ月間にわたり, 増殖しつつ, EBNA 陽性を示し続けている (写真 17)

写真 11. 臍帯血由来リンパ球と 2-27-Ad 細胞を UV 不活化 HVJ により細胞融合させ, EBV 感染後 1 日目における融合細胞内リンパ球の核に EBNA 出現 (ACIF)
 ×400

写真 12. 臍帯血由来リンパ球と 2-27-Ad 細胞を UV 不活化 HVJ により細胞融合させ、EBV 感染後 4 日目における融合細胞内すべての核に EBNA 出現 (ACIF) ×400

写真 15. 臍帯血リンパ球と 2-27-Ad 細胞を UV 不活化 HVJ により細胞融合させ、EBV 感染 3 日目に IudR (70 μ g/ml) 添加後 1 日目の ENA の蛍光写真 ×400

写真 13. 臍帯血リンパ球と 2-27-Ad 細胞を UV 不活化 HVJ により細胞融合させ、EBV 感染後 5 日目における単核単層培養細胞の EBNA 出現 (ACIF) ×400

写真 16. 臍帯血リンパ球と 2-27-Ad 細胞を UV 不活化 HVJ により細胞融合させ、EBV 感染後 3 日目に IudR 添加後 4 日目の EA の蛍光写真 ×400

写真 14. 臍帯血リンパ球と 2-27-Ad 細胞を UV 不活化 HVJ により細胞融合させ、EBV 感染後、約 1 カ月後、EBNA 陽性核をもつ単核単層培養細胞コロニー (ACIF) ×200

写真 17. A₂L 細胞と 2-27-Ad (HGPRT 欠損株) との雑種細胞で HAT 培地にて 6 カ月間維持細胞の EBNA. (ACIF) ×200

IV 考 察

上咽頭癌と EBV の関連性を示唆する根拠として、さきに著者は、上咽頭癌を含めた頭頸部悪性腫瘍、炎症疾患、健康成人計 232 例を対象に、抗 EBV 抗体価（抗 VCA 抗体価と抗 EA 抗体価）測定、血清疫学的研究を行った。その結果、上咽頭癌患者血清は、高頻度でしかも高力価を特異的に示した²⁸⁾。そこで今回、さらに上咽頭癌ならびにその他頭頸部腫瘍組織における EBNA の存在を検索した。その結果、上咽頭癌以外の頭頸部悪性腫瘍では 1 例も EBNA を証明できなかったが、上咽頭癌では、塗抹標本 8 例中 4 例（50%）、上咽頭癌組織初代培養細胞とりわけ上皮性細胞 3 例中 2 例（67%）に EBNA 陽性細胞が検出できた。しかも、Southan²⁹⁾ ならびに大星³⁰⁾によれば、リンパ節の構成細胞中に上皮性細胞は通常存在しないので、癌転移リンパ節初代培養に上皮性細胞が出現した時、この細胞は癌細胞と同定し得るとしている。この見解からすると、著者の EBNA 陽性上皮性細胞 2 例は癌細胞と思われる。一方、上咽頭癌組織の一部症例には EBNA 陽性細胞を認めなかったが、これより一部上咽頭癌では EBV ゲノムが存在しないとも考えられる。しかし、EBNA の出現は細胞増殖と相関があり³¹⁾、EBV ゲノムが存在しても、摘出組織の腫瘍がすでに壊死に近い状態であったため、EBNA の発現が不能であった故かもしれない。さらに、上咽頭生検の際、著者も経験しているが、正しい位置を生検できず、正常の上咽頭組織を誤り採っている可能性もある。また EBNA のための固定法に問題がある場合もあるであろう。すなわち、細胞固定として著者は CCl₄ を使用したが、この試薬は腫瘍周囲の脂肪組織を溶解できず、腫瘍細胞の固定が不十分となり、EBNA 検出のできなかったとも考えられる³²⁾。

以上、述べてきたように、1) 血清疫学的研究、2) 腫瘍細胞内 EBNA の存在より、諸家らの報告と同様に上咽頭癌と EBV は、密接な関連性があることがわかった。

そこで、著者はこの EBV 感染による上咽頭癌発生機序解明のため、in vitro での各種実験を行った。

まず P3HR-1³³⁾ 由来感染性 EBV は、ヒト由来単層培養細胞への感染が成立せず¹⁵⁾、またヒト臍帯血由来リンパ球へ一部感染成立を認めるが、トランスフォーメーションしないとの報告³⁴⁾³⁵⁾があるので、著者は今回 B95-8 由来感染性 EBV によるヒト由来各種培養細胞への直接感染を行った。その結果、各種リンパ球（臍帯血、

健康成人末梢血、扁桃由来）への EBV 感染成立ならびにトランスフォーメーションを認めることができた。また、このトランスフォーメーションした細胞は全て B リンパ球の特徴を示していた。

一方、単層培養細胞特に上咽頭以外の組織由来細胞への直接感染成立は認められなかった。しかし、一部の単層培養細胞、とりわけ上咽頭由来線維芽様細胞への EBV 直接感染で、6 例中 3 例（50%）に、円形細胞の出現さらには浮遊化、クランプの形成がみられた。これら 3 種の細胞の形態はリンパ芽球様細胞で B リンパ球の特徴を有していた。かかる現象は、大里ら³⁶⁾、Probert ら³⁷⁾によるヒト胎児由来線維芽様細胞のトランスフォーメーションと類似する。また、さらに上咽頭癌由来線維芽様細胞からの浮遊細胞出現をみた高田らの NPC 204³⁸⁾³⁹⁾、著者の今回の TNPCly-1 の出現とも類似した現象であった。

ところで、この細胞は、一部の線維芽様細胞には C₃ のレセプターを有しているとの報告⁴⁰⁾ および Klein ら⁴¹⁾⁴²⁾の EBV レセプターとの関連性から考えれば、線維芽細胞のトランスフォーメーションの可能性もある。しかし、これら細胞（A₃L、A₂L、A₃L 細胞）は、B 型のリンパ芽球様細胞の特徴を有していた。このことより、著者の得た結果は、一部線維芽様細胞間に潜んでいた B リンパ球が EBV の感染をうけ、トランスフォーメーションした可能性が大きいと考えられた。

ところで、A₃L 細胞は現在に至るも一部ガラス面にはりついて増殖している（A₃M 細胞）。そこで、川村ら⁴³⁾が示したごとく、NPC 204（ガラス面にはりついた細胞）のヌードマウス移植による紡錘状細胞癌発生もあるので、著者も、⁶⁰Co 照射ハムスターへの A₃M 細胞移植を試みた。しかし、移植後 1 週目に腫瘍の出現を認めたが、その後、徐々に退縮し、ハムスターへの異種移植は成功しなかった。三好ら⁴⁴⁾は、ALS (anti-lymphocyte serum) 接種ハムスターへの EBV 感染ヒト臍帯血リンパ球異種移植により、腫瘍発生をみているが、著者らの使用した ⁶⁰Co 照射ハムスターは、細胞性免疫の抑制が不充分のため、成功しなかったものと考えらる。

以上述べてきたごとく、一部の線維芽様細胞への EBV 直接感染によるトランスフォーメーションの可能性も残っているが、EBV の感染標的細胞は一般に B リンパ球とされ、著者も上皮性細胞への直接感染成立は完全に証明できなかった。しかし、諸家らの報告ならびに著者の成績にもあるように、上皮性腫瘍である上咽頭癌細胞内

に EBV ゲノムの存在は認められているので、何らかの機序による上咽頭上皮細胞への EBV 感染は可能な筈である。このことに関連して、1974年 山本¹³⁾¹⁴⁾、次いで 1975年 古川¹⁵⁾は、EBNA 陽性リンパ芽球様細胞と上皮性細胞との細胞融合により、上皮性細胞の核内にも EBNA が発現することを報告した。さらに Trumper¹⁶⁾は、上咽頭癌生検組織をヌードマウスに異種移植し、発生した腫瘍の再培養細胞に EBNA を証明し、さらにそれは人染色体をもったヒト細胞であることを確かめた。しかも、この染色体数は tetraploid であったことからみると、リンパ球と上咽頭上皮性細胞との細胞融合のごとき機作で tetraploid の癌細胞発生という可能性が示唆される。しかし、上咽頭癌組織の EBV ゲノム検索にて、腫瘍周囲のリンパ球における EBV ゲノムの存在は、核酸相補性試験や ACIF 法にて、検出されていない。そのため、山本¹³⁾¹⁴⁾、古川¹⁵⁾の報告による、EBNA 陽性リンパ芽球様細胞と上皮性細胞との細胞融合を介する上咽頭癌発生機序仮説によれば、in vivo においても細胞融合していない周囲リンパ球にも EBNA は証明される筈であるが、上述の in vivo における事実はこれに反している。

そこで、さらに他の機序による上咽頭上皮性細胞への EBV 感染が考えられる。このことに関連して、1972年 Gazzolo¹⁷⁾、1973年 Vuillaume¹⁸⁾は注目すべき報告をしている。すなわち、上咽頭由来単層培養細胞間からの浮遊細胞（リンパ芽球様細胞）の出現機序解明のため、上咽頭癌と上咽頭正常粘膜組織の電子顕微鏡撮影を行った。その結果、両者とも上咽頭組織におけるリンパ球と上皮性細胞との細胞融合の所見を見出した。この現象は、既に癌化している上咽頭癌細胞核内の EBV ゲノムがリンパ球の核内へ移行し、その結果リンパ球がトランスフォーメーションするのを示しているのではないかと推論している。しかしながら、これらの報告にはいっさい上咽頭上皮細胞内への EBV ゲノム移行機序についてはふれていない。そこで著者は上皮性細胞内へ EBV の感染機序として、彼らとは逆の径路を考えた。すなわち、上咽頭上皮性細胞と正常リンパ球の細胞融合がまずおこり、この融合細胞が EBV のレセプターを獲得すると初めて EBV 感染をうけるに至り、ついで上咽頭上皮性細胞核内への EBV ゲノム定着、さらには細胞レベルの癌化が生ずるのではないかと仮説を立て、in vitro での実験を行った。そのため、まずヒト各種リンパ球と上咽頭由来上皮性 2-27-Ad 細胞を UV 不活化 HVJ に

て細胞融合後ただちにまたは24時間培養後の EBV 感染とも、まずリンパ球の核 について 2-27-Ad 細胞の核に EBNA 発現が認められた。この場合、2-27-Ad 細胞の核に EBNA 発現が、リンパ球の核に EBNA 発現より早期おこることは1例もなかった。かかる結果から、1) リンパ球核内と 2-27-Ad 細胞核内にも同じ様に EBV ゲノムは定着するが、EBNA 発現は、リンパ球の核の方が早期におこりやすい。2) リンパ球の核内にも EBV ゲノム定着後 EBNA を合成し、この抗原物質 (EBNA) のみが 2-27-Ad 細胞の核へ移行する。3) リンパ球の核内へ EBV ゲノムがまず定着し、その後この核内で増えたゲノムが、2-27-Ad 細胞の核内へ移行し、その核で EBNA が発現する。以上の3つの可能性が EBV ゲノムの上皮性細胞への定着、移行、発現 (EBNA の証明) 機作に関して推論される。

ところで、この細胞融合実験にて、アデノイド由来リンパ球と 2-27-Ad 細胞との細胞融合のみで EBV 非感染例において一つの興味ある成績を得た。すなわち6例のリンパ球の細胞融合前は、全例 EBNA 陰性であったにもかかわらず、2-27-Ad 細胞との細胞融合により、1例のみ、融合細胞内リンパ球核の EBNA 発現を認めた。このことは、融合前の使用リンパ球にも EBNA は存在していたが、頻度は低く、EBNA の証明がたまたまでなかったためとも考えられる。しかし、一方では、ごく一部のリンパ球核内に微量の EBV ゲノムは定着しているが、核酸性相補性試験や EBNA 発現微弱のため ACIF で検出できなかった可能性もある。そして、かかるリンパ球が 2-27-Ad 細胞との細胞融合という外因性刺激をうけ、EBNA を発現したと考えられる。

この問題に関連して、大里¹⁹⁾の PH-CL 由来感染性 EBV による臍帯血由来リンパ球への感染実験はその可能性を示唆していると思われる。すなわちかかる EBV 感染をうけたリンパ球は、何らかの刺激をうけない時は EBNA を発現しないが、IudR と Pokeweed mitogen (PWM) による刺激により EBNA が発現するに至るという成績である。この PH-CL 由来感染性 EBV により感染をうけたリンパ球は著者の経験したリンパ球における EBNA 発現と類似のものではないかと考えられる。

以上述べてきた結果をまとめると、EBV 感染による上咽頭癌発生機序として in vitro 実験では次の可能性が考えられる。1) 上咽頭上皮性細胞と EBV ゲノム陰性リンパ球 (B細胞) との融合細胞へ EBV 感染が生ず

るが、実際には、初め a) リンパ球の核のみ、ついで b) リンパ球と上皮性細胞の両者の核への EBV ゲノム定着による EBNA 発現後、EBNA 陽性化雑種細胞（癌化と考えられる。）形成、2) EBV ゲノムを有するが EBNA 発現のないリンパ球と上皮性細胞の融合刺激によるリンパ球の EBNA 発現後、以下 1) と同じ様な癌化、3) 現在検討中ではあるが、EBV ゲノム陰性リンパ球と上皮性細胞により形成された雑種細胞へ EBV が直接感染し、雑種細胞の核に EBNA が発現して、雑種細胞がそのまま癌化、4) EBNA 陽性化リンパ球と上皮性細胞の融合による雑種細胞形成と EBNA 陽性およびその維持という過程を通しての癌化である。

次に、著者は 1)、4) の問題に関連して、EBNA 陽性雑種細胞選別を試みた。すなわち、1) の過程と思われる EBNA 陽性雑種細胞が 5 日目より出現し、約 1 カ月後には EBNA 陽性雑種細胞はコロニーを形成した。そこで、その途中、細胞融合後 EBV を感染して、約 2 週目よりクローニングを試み、EBNA 陽性雑種細胞の分離を計ったが成功しなかった。しかし、Glaser⁴⁹⁾⁵⁰⁾らは Detroit 98 細胞の HGPRT 欠損株と P3HR-1 細胞との細胞融合を行ない、HAT 選択培地にて、この雑種細胞 (D98/HR-1) の選別に成功し、しかも EBNA 陽性を示したと報告している。すなわち、野生型の細胞は、核酸合成回路として de novo 合成回路と salvage 回路をもち、細胞が核酸合成増殖するにはどちらか一方の回路でも可能である。ところが aminopterin は de novo 回路を阻害するため、HGPRT 欠損株は salvage 回路（この回路に HGPRT が必要とする）を利用できず aminopterin 存在下では核酸合成が不能となる。ところが、HGPRT 欠損株も他の野生型細胞との細胞融合により HGPRT 支配ゲノムを獲得し、融合雑種細胞となれば、この酵素を利用できるので、HAT 培地で核酸合成、増殖が可能となる。さらに、野生型細胞がリンパ球であるならば、細胞融合後、頻回の液交換により浮遊状の野生型であるリンパ球は除去可能となる。その結果、HAT 選択培地にて、維持可能な細胞は、野生型リンパ球と HGPRT 欠損株との雑種細胞のみとなり、雑種細胞の選別増殖が可能となる。かかる機序により、EBNA 陽性雑種細胞が選別された。

そこで、著者も、この原理を利用して、上記 4) の過程と関連して 2-27-Ad 細胞の HGPRT 欠損株をつくり、EBNA 陽性リンパ芽球細胞である A₂L 細胞との細胞融合後、HAT 培地にての雑種細胞の選別を行なっ

た。その結果、培養約 1 カ月後に EBNA 陽性雑種細胞の選別ができた。かかる細胞は、上咽頭癌発生機序解明のため、さらにヌードマウスへる異種移植実験、そしてまた、上咽頭癌治療の問題に関して、有効な細胞と考えられ、現在ひきつづき検討中である。ただ、生体内における上咽頭癌発生には、かかる上述のごとき機作で上咽頭上皮性細胞が癌化し得たとしても、その癌化細胞の増殖腫瘍形成には生体側の防衛機構としての免疫監視機構の関与の検討も必要となる。その点の問題はさらに別の in vivo のレベルから追求しなければならず、本実験における in vitro のレベルとは当然異ってくるであろうと思われる。

V 結 語

人癌ウィルスの 1 つの候補である EBV と上咽頭癌の関係には、現在多くの報告が知られている。しかし、リンパ嗜好性である EBV と上皮性腫瘍である上咽頭癌との関連性は一見奇異に思われる。そこで、著者は in vitro での EBV による上咽頭癌発生機序解明の実験的研究を行い、次の結果を得た。

1) 上咽頭癌組織（上咽頭生検ならびに頸部転移リンパ節）12 例による塗抹標本とその初代培養細胞の EBNA の検索を行った。その結果 a) 塗抹標本 8 例中 4 例（50%）は EBNA が陽性であった。b) 初代培養 12 例中 9 例が培養に成功し、上皮性細胞 3 例中 2 例（67%）が EBNA 陽性を示した。c) 線維芽様細胞培養中、1 例に浮遊細胞が出現し、樹立化に成功した。

かかる細胞は、EBNA 陽性（90%以上）で、リンパ芽様細胞（B細胞）の免疫学的特徴を有していた。

2) 各種ヒト由来培養細胞への EBV 直接感染実験を行い、a) リンパ球（臍帯血、健康成人末梢血、扁桃由来）はトランスフォーメーションすることができた（CBL-E-1, 5, APL-E-1~5, TON-E-1, 2）これらリンパ芽球様細胞は EBNA（90%以上）陽性で、B細胞の特徴を有していた。b) 単層培養細胞への直接感染は、多くのもので成功しなかった。ただ上咽頭（アデノイド）由来線維芽様細胞への直接感染にて、浮遊細胞の出現を認め（A₁L, A₂L, A₃L 細胞）、これらの細胞は樹立化されたが、EBNA（90%以上）陽性で、リンパ芽球細胞（B細胞）の特徴を有していた。

3) a) EBNA 陰性ヒトリンパ球と 2-27-Ad 細胞（上咽頭由来上皮性細胞）との UV 不活化 HVJ による細胞融合後の EBV 感染にて、リンパ球の核ならびに 2-

27-Ad 細胞の核両者に EBNA が発現した。しかも、かかる細胞の IudR (70 μ g/ml) の添加刺激培養にて、融合細胞に ENA, EA の発現を証明できた。b) 細胞融合前 EBNA 陰性であったアデノイド由来リンパ球のうち、1 例に 2-27-Ad 細胞との細胞融合にて、融合細胞内リンパ球ならびに 2-27-Ad 細胞の核に EBNA の発現を認めた。

4) A₂L 細胞と 2-27-Ad 細胞 HGPRT 欠損株との UV 不活化 HVJ による細胞融合後、HAT 培地で選別培養し、EBNA 陽性の雑種細胞 (単層培養細胞) の選別に成功した。かかる細胞は、現在に至るも (約 6 カ月間) EBNA 陽性を維持し続けている。

以上の成績より、上咽頭上皮性細胞への感染機序として、

- 1) EBV ゲノム陰性リンパ球と上咽頭性細胞が自然融合をおこし、その後 EBV 感染による EBNA 陽性雑種細胞の形成。
- 2) EBV ゲノムを認めるが EBNA を発現しないリンパ球と上咽頭上皮細胞融合による外因性の刺激をうけ、EBNA の発現、さらには EBNA 陽性雑種細胞の形成。
- 3) EBNA 陽性リンパ球と上咽頭上皮性細胞との細胞融合後の EBNA 陽性雑種細胞化形成。
- 4) 検討中ではあるが、EBV ゲノム陰性リンパ球と上咽頭上皮細胞の細胞融合後の雑種細胞形成後の EBV 感染成立による EBNA の発現。

以上の 4 点の機作が考えられた。かかる EBNA 陽性雑種細胞形成が上咽頭発生へ密接な関連性を有するものと推論された。

参 考 文 献

- 1) Old L J, Boyse E A, Oettgen H F, de Harven E, Geering G, Williamson B and Clifford P: Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 56; 1699-1703, 1966.
- 2) Ito Y, Takahashi T, Kawamura A Jr and Tu S M: High anti-EB virus titer in sera of patients with nasopharyngeal carcinoma. A small scaled seroepidemiological study. *Gann* 60, 335-340, 1969.
- 3) Kawamura A Jr, Takada M, Gotoh A, Hamaiima T, Sanpe T, Murata M, Ito Y, Takahashi T, Yoshida T, Hirayama T, Tu S, Liu C, Yang C and Wang C: Seroepidemiological studies on nasopharyngeal carcinoma by fluorescent antibody techniques with cultured Burkitt lymphoma cell. *Gann* 61; 55-71, 1970.
- 4) 犬山征夫 他: 頭頸部悪性腫瘍における抗 EB ウィルス抗体価. 日耳鼻 78: 729-737, 1975.
- 5) Ida S, Hinuma Y, Chu J, Lai J, Yang C, Lynn T, Hsu M, Tu S and Kawamura A Jr: Further studies on antibodies to early antigen induced by Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma patients. *Gann* 64; 545-553, 1973.
- 6) Zur Hausen H, Shulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Clifford P and Samtessen L: EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 228; 1056-1058, 1970.
- 7) Nonoyama M, Huang C H, Pagano J S, Klein G and Singh S: DNA of Epstein-Barr virus in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Proc Nat Acad Sci USA* 70; 3265-3268, 1973.
- 8) Huang D P, Ho J H C, Henle W and Henle G: Demonstration of Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen in nasopharyngeal carcinoma cells from fresh biopsies. *Int J Cancer* 14; 580-588, 1974.
- 9) Glaser R, de The G, Lenoir G and Ho J H C: Superinfection of epithelial nasopharyngeal carcinoma cells with Epstein-Barr virus. *Proc Nat Acad Sci USA* 73; 960-963, 1976.
- 10) Miller G and Lipman M: Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Nat Acad Sci USA* 70; 190-194, 1973.
- 11) Robinson J E, Andiman W A, Henderson E and Miller G: Host-determined differences in expression of surface marker characteristics on human and simian lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Proc Nat Acad Sci USA* 74; 749-753, 1977.
- 12) Shope T, Dechairo D and Miller G: Malignant lymphoma in cotton-top marmosets following

- inoculation of Epstein-Barr virus. *Proc Nat Acad Sci USA* 10; 2487-2491, 1973.
- 13) 山本興太郎 他: EB ウィルスゲノムのリンパ球細胞から上皮細胞への移行. 日本癌学会総会記事. 33; 121, 1974.
 - 14) *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.
 - 15) 古川 侃: 2, 3 のヒト組織由来培養細胞への EB ウィルスゲノムの移行. 十全医学誌 84; 190-210, 1975.
 - 16) *Reedman B M and Klein G*: Cellul 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.
 - 17) *Suzuki M and Hinuma Y*: Evaluation of Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen with various human cell lines. *Int J Cancer* 14; 753-761, 1974.
 - 18) 辻 公美, 宮本 宏: 比重遠沈法によるリンパ球の分離. Conray 400-Ficoll 法, 免疫実験操作法; 日本免疫学会編 265-269, 1971.
 - 19) *Moss D J and Pope J H*: Assaying of the infectivity of Epstein-Barr virus by transformation of human leukocytes in vitro. *J Gen Virol* 17; 233-236, 1972.
 - 20) 矢田純一, 橋 武彦: ヒトリンパ球のsubpopulationの分別 — ヒツジ赤血球結合性リンパ球と補体結合性リンパ球の証明法, 免疫実験操作法 日本免疫学会編 473-475, 1972.
 - 21) 岡田善雄: 細胞融合と細胞工学. 講談社 1976.
 - 22) *Okada Y and Maruyama Y*: Requirement of calcium ions for cell fusion reaction of animal cells by HVJ. *Exp Cell Res* 44; 527-551, 1966.
 - 23) *Sugawara K and Osato T*: Immunofluorescent antigen associated with Epstein-Barr virus induced by 5-iododeoxy-uridine. *Nature New Biology* 246; 72-73, 1973.
 - 24) *Matsuo T, Yamamoto K and Osato T*: Differential induction of Epstein-Barr virus-related antigen in human lymphoblastoid cells by virus-mediated cell-to-contact. *Int J Cancer* 17; 423-428, 1976.
 - 25) *Henle W, Henle G, Zajac B, Pearson G, Waubke R and Scriba M*: Differential reactivity of human serums with early antigens induced by Epstein-Barr virus. *Science* 169; 188-190, 1970.
 - 26) *Hinuma Y, Sairenji T and Ohta-Hatano R*: Detection of antibody to a new antigen induced by Epstein-Barr virus in serums from patients with malignant lymphoid disease. *Japan Acad Sci* 46; 989-992, 1970.
 - 27) *Szybalski W, Szybalska E H and Ragni G*: Genetic studies with human cell lines. *Nat Cancer Inst Monogr* 7; 75-89, 1962.
 - 28) 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 (投稿中)
 - 29) *Southan C M*: Growth of human adenocarcinoma cells in tissue culture. *Cancer* 7; 394-409, 1954.
 - 30) 大里章一, 菅野晴夫: 人癌細胞の培養, 朝倉書店,
 - 31) *Suzuki M and Hinuma Y*: Relationship between Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen and cell viability in human cell lines. *Gann* 66; 103-105, 1975.
 - 32) 大里外蕃郎 (私信)
 - 33) *Hinuma Y and Grace Jr J T*: Cloning of Burkitt lymphoma cells culture in vitro. *Cancer* 22; 1089-1095, 1968.
 - 34) *Miller G, Robinson J, Heston L and Lipman M*: Differences between laboratory strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection and interference. *Proc Nat Acad Sci USA* 71; 4006-4010, 1974.
 - 35) *Menezes J, Leibold W and Klein G*: Biological differences between Epstein-Barr virus (EBV) strains with regard to lymphocyte transforming ability. *Exp Cell Res* 92; 478-484, 1975.
 - 36) *Osato T and Ito Y*: Morphological alteration of human embryo cells in vitro by treatment with human leukemic culture fluid. *Proc Nat Acad Sci USA* 57; 1076-1079, 1967.
 - 37) *Probert M and Epstein M A*: Morphological transformation of human fibroblasts by Epstein-

- Barr virus: Preliminary observations. Science 175; 202-203, 1972.
- 38) Takada M Linn Y-C, Shiratori O, Sugano H, Yang C-S, Hsu M-M, Lynn T-C, Tu S-M, Chen H-C, Hamajima K, Murata M, Gotoh A, Kawamura A Jr, Yoshida T O, Osato T and Ito Y: Cultivation in vitro of cells derived from nasopharyngeal carcinoma. Gann Monogr 10; 149-161, 1971.
- 39) Takada M, Kawamura A Jr and Sugano H: transformation of the cultured cell sheets of nasopharyngeal carcinoma by extracts of P3HR-1 and NPC 204 cells carrying herpes-type virus. Gann Monogr 10; 163-171, 1971.
- 40) 植木 絢子 他: ヒト結合織より分離した線維芽細胞における C_3 リセプターについて 医学のあゆみ 101: 544-545, 1976.
- 41) 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.
- 42) Yefenof E and Klein G: Membrane receptor stripping confirms the association between EBV receptors and complement receptors on the surface of human B lymphoma lines. Int J Cancer 20; 347-352, 1977.
- 43) Kawamura A Jr, Chen H-C, Murata M, Hamajima K, Suzuki K, Sudo K, Takada M, Saito Y and Sawaki S: Heterotransplantation of cultured cells and biopsies derived from nasopharyngeal carcinoma in thymus-less (nude) mice-Japan J Exp Med 46; 351-362, 1976.
- 44) Miyoshi I, Kubonishi I, Uchida H, Hiraki S, Matsuda Y, Tanaka T, Masuji H, Hiraki K: Production of lymphoid tumors in hamsters by direct implantation of normal human peripheral and umbilical cord leukocytes. Int J Cancer 18; 67-75, 1976.
- 45) Trumpe P A, Epstein M A and Giovannella B C: Activation in vitro by BudR of a productive EB virus infection in the epithelial cells of nasopharyngeal carcinoma. Int J Cancer 17; 578-587, 1976.
- 46) Gazzolo L, de The G, Vuillaume M and Ho H C: Nasopharyngeal carcinoma. II. Ultrastructure of normal mucosa, tumor biopsies, and subsequent epithelial growth in vitro. J Nat Cancer Inst 48; 73-86, 1972.
- 47) Vuillaume M and de-The G: Nasopharyngeal carcinoma. III. Ultrastructure of different growth leading to lymphoblastoid transformation. J Nat Cancer Inst 51; 67-80, 1973.
- 47) 大里外誉郎 他: I 人がんとヘルペスウィルス — EB ウィルス — EB ウィルスによる in vitro 発癌. 日本癌学会総会《シンポジウム》 日本臨床 34: 26-35, 1975.
- 49) Glaser R and Rapp F: Rescue of Epstein-Barr virus from somatic cell hybrids of Burkitt lymphoblastoid cells. J Virol 10; 288-296, 1972.
- 50) Glaser R, Ablashi D V, Nonoyama M, Henle W and Easton J: Enhanced oncogenic behavior of human and mouse cells after cellular hybridization with Burkitt tumor cells. Proc Nat Acad Sci USA 74; 2574-2578, 1977.

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師梅田良三教授、がん研ウィルス部波田野基一教授に衷心より謝意を表するとともに終始御助力と便宜を計って下さったがん研ウィルス部小倉寿博士、第二内科宮崎良一先生に感謝致します。また細胞の分与をいただいた東大医科研免疫研究部川村明義教授、ならびに御助言いただいた北大がん研ウィルス部大里外誉郎教授に感謝致します。

本論文の要旨は、第79回日耳鼻総会、第15回日本細菌学会中部支部総会、第211回北陸地方部会において発表した。

(原稿受付 昭和53. 11. 13日急載)

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