The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Detection of Epstein-Barr virus transcripts in chemically or immunologically-activated cells and in a null cell-line (HLN-STL-C) by in situ hybridization with alkaline phosphatase-linked oligonucleotide probes
Author(s)	弘中, 孝史
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38749
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【 59 】

氏　　名	弘　中　孝　史（ひろ なか たか し）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学 位 記 番 号	第 1 0 9 2 0 号
学位授与年月日	平成 5 年 9 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Detection of Epstein-Barr virus transcripts in chemically or immunologically-activated cells and in a null cell-line(HLN-STL-C) by in situ hybridization with alkaline phosphatase-linked oligonucleotide probes **(アルカリフォスファターゼ結合オリゴヌクレオチドプローブを用いた in situ ハイブリダイゼーションによるホルボールエステル及び抗体により活性化させた細胞株と null 細胞株の Epstein-Barr ウイルスの転写産物の検出)**
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 遠山 正彌 (副査) 教 授 山西 弘一　教 授 網野 信行

論 文 内 容 の 要 旨

【目　的】

Epstein-Barr ウイルス（EBV）はバーキットリンパ腫，上咽頭癌，日和見 B 細胞リンパ腫等に密接に関連するヒト常在性ウイルスである。EBV は B リンパ球 CD21を介して侵入し，多くの場合不顕性感染後，ウイルスゲノムは宿主細胞核内にプラスミド状態或は細胞 DNA に組み込まれた（integration）型で存在する。この感染細胞は一部のウイルス抗原のみ産生し，宿主免疫系を逃れて潜伏感染状態を維持していると考えられている。この潜伏感染状態から何らかの刺激によりウイルス産生（再活性化）が誘導され病変の悪化，特に免疫抑制下では重篤な症状を呈する。故に EBV の再活性化機構の解明は EBV の発症予防，治療，検査法の開発に重要である。本研究は，より容易な EBV 遺伝子産物の検出方法の確立と EBV 存在状態及びウイルス遺伝子活性化機構の解明を目的とした。

【方法ならびに成績】

RNAISH 法による EBV 遺伝子産物の検出には感染細胞に多量に発現する EBV-encoded small RNA(EBER) 1，latent membrane protein(LMP) 1 及び glycoprotein（gp）350/220のアルカリホスファターゼ（APase）結合オリゴヌクレオチドプローブを用いた。Raji 細胞（EBV 非産生細胞）では，EBER1及び LMP1アンチセンス鎖（AS）プローブでは明らかに細胞内にその RNA が検出され，これらのセンス鎖（S）プローブ，gp350/220 AS 及び S プローブでシグナルは検出されず，BJAB 細胞（EBV 陰性細胞）では全てのプローブは反応しなかった。又，Akata 及び P3HR-1細胞（EBV 産生細胞）を抗ヒト IgG 抗体処理或は，12-O-tetradecanoyl-phorbol-12-acetate（TPA）と n-butyrate（TPA-B）処理後，間接免疫蛍光（IF）法でウイルスカプシド抗原（VCA）を発現した細胞数の増加に伴い，gp350/220 mRNA の増加がこのプローブで検出できた。又，B95-8細胞（EBV 産生細胞）の TPA-B 処理及び phosphonoacetic acid（PAA）処理後，APase 標識 BamHI-W プローブでの ISH 法と，抗 LMP1抗体での酵素抗体法の二重染色より，ウイルス増殖に伴い LMP1発現する事が示された。

次にこれらプローブを用いて CD21陰性の ATL 由来 HLN-STL-C 細胞（Null 細胞）に発現する RNA を検出したところ EBER1及び LMP1が100％の細胞に顕著に検出され EBV 感染細胞である事が示され，gp350/220が検出

された事よりこの細胞がウイルス産生細胞であることが示唆された。

EBV ゲノムを1コピー含む cl. 9細胞（P3HR-1細胞の subclone）の EBV DNA はサザンドットハイブリッド法で P3HR-1の standard DNA である事が明らかとなり，EBERs 及び oriP 領域を含む BamHI-C フラグメントの左半分に欠損が認められた。細胞内の EBV ゲノムの存在状態を検出できる Gardela gel analysis 法により環状及び線状 DNA は検出されず，塩化セシウム濃度勾配遠心法の DNA 分離を行うと，EBV DNA は細胞 DNA 分画に検出された。更に，蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法で C 型の姉妹染色分体上の同一部位に EBV ゲノムが検出され，この EBV ゲノムは本細胞 DNA に integrate している事が示された。本細胞を TPA-B 処理で VCA 及び gp350/220は発現は認められなかったが，ウイルス初期抗原（EA）及び LMP1が明らかに増加した。

【総　括】

ここで用いた APase 標識オリゴヌクレオチドプローブは，各種 EBV 感染細胞の EBV 遺伝子産物を容易に且つ特異的に高感度検出でき，更に極低バックグラウンドである特徴を示した。EBV 活性化処理の結果では EBERs の発現に差はなく，LMP1はウイルス増殖と関連していることが示唆された。又，ATL 患者由来の CD21陰性 null 細胞（HLN-STL-C 細胞株）には EBV ゲノムが存在し，EBV 感染には CD21　を介さない系も存在する事が示された。c 1. 9細胞は EBV ゲノムが細胞内に1コピーを含み，ウイルス活性化機構を研究するのによい実験系と言える。本ゲノムは integration 型である事が示されたが，TPA-B 処理で VCA 及び gp350/220は発現誘導されず，又，ウイルス複製せずに latent LMP1及び EA の増加が認められた。通常，前初期遺伝子産物(IEA)は前期(EA)或は後期遺伝子（LA）を活性化してウイルスを産生することより，本細胞は LA までには至らないが IEA により EA までは明かに誘導されると言える。更に，EBERs 領域の欠損より，LMP1或は EA の発現には不必要と考えられる。既知の integration 型細胞（Namalwa, IB-4細胞）ウイルス活性化剤でウイルス増殖に関与する遺伝子産物の発現は認められず，これは integration 型もウイルス活性化剤で EBV ゲノムが活性化される最初の報告である。

論文審査の結果の要旨

本研究は容易な Epstein-Barr virus（EBV）遺伝子産物の検出方法の確立と EBV 存在状態及びウイルス遺伝子活性化機構の解明を目的としたものである。

EBV 遺伝子産物の検出法には，アルカリホスファターゼ標識オリゴヌクチドプローブを用いた in situ ハイブリダイゼーション法を行い EBV 感染細胞を検出する系を確立した。これらプローブで null 細胞から EBV 遺伝子産物を検出し，B 細胞のみならず，CD21受容体を有さない細胞でも EBV に感染しうることを見いだした。また，EBV 存在状態及びウイルス遺伝子活性化機構の解明を目的とし，先ず，1細胞当たり1コピーの EBV ゲノムを含む cl. 9細胞の EBV DNA 解析を行った結果，そのゲノムが細胞染色体に組み込まれていることを明らかにした。さらに，その細胞をウイルス活性化剤で処理すると染色体に組み込まれた EBV ゲノムでもその遺伝子が活性化され遺伝子産物が発現誘導されることを初めて明らかにした。

本研究は EBV 感染細胞の新検出法の確立とウイルス存在状態及びその再活性化機構の解明に貢献したものであり，学位に値すると考える。