

[展望]

ヒトの白血病とレトロウイルス

三 木 隆* 佐 藤 武 幸**

(昭和62年1月14日受付)

Key words: レトロウイルス, 白血病

略語一覧: AIDS: Acquired immunodeficiency syndrome, HTLV: Human T lymphotropic virus, SSV-1: Gibbon ape 白血病ウイルス, SSAV: サル肉腫関連ウイルス, ALL: 急性リンパ芽球性白血病, VSV: Vesicular stomatitis virus, MLV: ネズミ白血病ウイルス, CKV: CK ウイルス

はじめに

RNA をゲノムとし、逆転写酵素を含むウイルスを一括して Family Retroviridae (通称レトロウイルス) に分類する。レトロウイルスの中には、動物に白血病、肉腫をつくるものがあり¹⁾、多くの研究者の研究対象となってきたが、近年ヒトの重篤な疾患、成人T細胞白血病・リンパ腫²⁻⁴⁾、AIDS^{5,6)} の病原であることが強く示唆されるに至った。Family Retroviridae はその生物学的性状により Oncovirinae, Lentivirinae, Spumavirinae の三つの subfamily に分類する⁷⁾。Lentivirinae の prototype は visna ウイルスである。Visna ウイルスは羊の中樞神経に遅延性の進行性炎症を起こし、羊は全麻ひの結果死亡する。Lentivirinae に属するウイルスのヒト感染例の報告はなかったが、1985年塩基配列から AIDS ウイルスが Lentivirinae である事が判明した⁸⁾。Spumavirinae の prototype は foamy ウイルスである。Foamy ウイルスはヒトに何ら症状を示すことなく持続感染する。ある種のヒト培養細胞では、その名の由来である空胞型の病変を起こす⁹⁾。発癌性を示すすべてのレトロウイルス、および発癌性がなくても Lentivirinae, Spumavirinae に明確に分類できないレトロウイルスは慣例上 Oncovirinae に分類する。

上記の分類とは別に、ウイルス粒子の形態より C, B, D の三つの型に分類する⁹⁾。超薄切片の電子顕微鏡像より、RNA の電子密度の高いウイルスの芯がウイルス膜に関し中央に位置しているものをC型粒子、芯が中央に存在せず偏在しているものをB型粒子、C, B いずれの

型に分類して良いか判然としないものをD型粒子とする。Oncovirinae の大部分はC型、マウスに乳癌を起こす mouse mammary tumor virus はB型、サルに白血病を起こす Mason-Pfizer ウイルスはD型に属する。

白血病、リンパ腫の病原にレトロウイルスが関与していることは動物で実証されているが¹⁾、ヒトでは成人T細胞白血病・リンパ腫、hairy cell 白血病よりそれぞれ分離された HTLV type 1 (HTLV-1)²⁻⁴⁾、および type 2 (HTLV-2)¹⁰⁾ のみである。HTLV-1は、以下の観察、実験結果から成人T細胞白血病・リンパ腫の病因と関係あると考えられるに至った¹¹⁾。1) 地理的に成人T細胞白血病・リンパ腫患者が高頻度で発生する地域は HTLV-1感染頻度の高い地域と一致する。2) すべての成人T細胞白血病・リンパ腫患者には HTLV-1感染の証拠がある。3) 成人T細胞白血病・リンパ腫患者の腫瘍細胞中に HTLV-1の provirus が常に存在するが、同一患者の非腫瘍細胞中には存在しない。4) HTLV-1はヒトおよび動物のT細胞を in vitro で変換させる。

他のヒトの白血病の病因にレトロウイルスが関与しているかどうか、これは現在われわれの最関心事であるが、未だはっきりしない。急性骨髄性白血病患者由来の細胞からレトロウイルスが分離された事があるが、これは良く調べると既報の SSV-1/SSAV と BaEV との混合物であった¹²⁻¹⁵⁾。Nooter ら^{16,17)} は、ALL 患者の骨髄細胞と動物細胞とを混合培養することによってレトロウイルスを分離したが、これはラットウイルス、ネズミ肉腫ウイルス、SSAV, BaEV の混合物であった。そのため、彼らは研究の継続を断念せざるを得なかつ

* 千葉大学医学部第一微生物学教室, ** 同小児科学教室

Takashi MIKI* and Takeyuki SATO**: Human Leukemia and Retrovirus.

Departments of Microbiology* and Pediatrics**, School of Medicine, Chiba University, Chiba 280.

Received for publication, January 14, 1987.

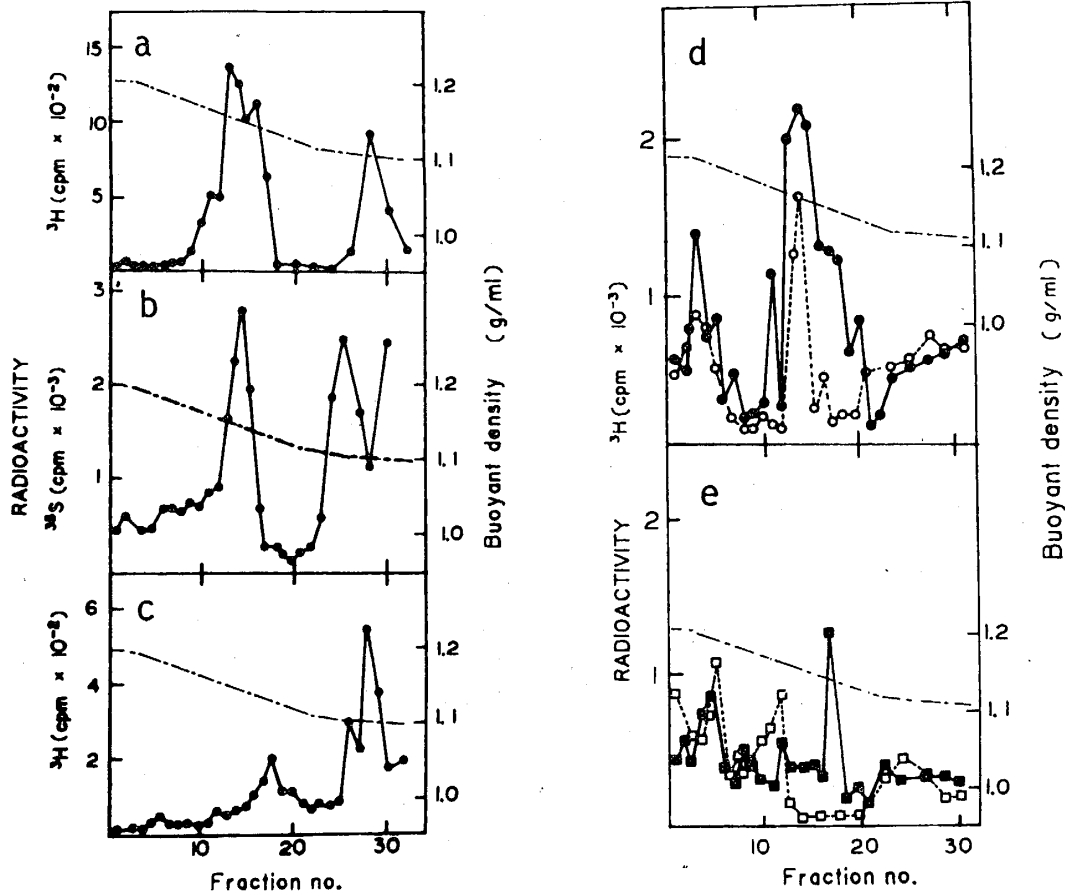


Fig. 1. Isopycnic gradient centrifugation of the culture supernatant of CK-a cells. The radiolabeled culture media of CK-a cells were pelleted by high speed centrifugation, and the pellet was centrifuged at 23,000 rpm (SW 28 rotor) for 16 hr at 4° in a 7-52% (w/w) sucrose density gradient. (a) [³H] uridine-labeled media. (b) [³⁵S] methionine-labeled media. (c) [³H] thymidine-labeled media. DNA polymerase activity in the culture supernatant was assayed after an isopycnic centrifugation with (d) poly (A). oligo (dT) (●—●), poly (C). oligo (dG) (○--○), (e) poly (dA). oligo (dT) (■—■) and poly (dA) (□--□).

た。

われわれは千葉大小児科入院の ALL 小児患者の末梢血より佐藤らが樹立したリンパ球様細胞株, CK-a 細胞よりレトロウイルスを分離し, CKV と仮称した¹⁸⁾. CKV が ALL の病因に関与しているかどうか, 現在検討中である。以下, CKV 分離の経緯について述べるが, 表題の下ではやや時期尚早の感があるがあえて試み諸賢の批判を仰ぎたい。

1. CK-a 細胞培養上清にリボ核たんぱく質の検出

CK-a 細胞を ³H ウリジン, ³⁵S メチオニンまたは ³H チミジンで標識し, 標識培養液をしよ糖等密度勾配遠心すると, ³H ウリジンおよび ³⁵S メチオニン標識は比重 1.16 と 1.11 g/ml 分画に (Fig. 1 a, b), 一方 ³H チミジン標識は 1.13, 1.11 g/ml 分画に (Fig. 1 c) 検出される。

Fig. 1 b の 1.16 g/ml 分画を酒石酸カリウム-グリセロール密度勾配中で再遠心すると, ³⁵S 放射活性は 1.16 g/ml 分画に出現する。これらの実験結果は, 1.16 g/ml 分画中の物質はリボ核たんぱく質であり, 安定であることを示している。

2. リボ核たんぱく粒子中に逆転写酵素活性の検出

しよ糖等密度勾配遠心後, 各分画の DNA ポリメラーゼ活性を測定した。ポリ (A) オリゴ (dT), ポリ (C) オリゴ (dG) をテンプレート・プライマーとすると, DNA ポリメラーゼ活性は比重 1.16 と 1.22 g/ml 分画に検出でき (Fig. 1 d), ポリ (dA) オリゴ (dT) では比重 1.14 と 1.22 g/ml 分画に検出できた (Fig. 1 e)。1.14, 1.22 g/ml 分画は ³H チミジンとり込みがみられた分画でもあり, 検出活性は残存している細胞の DNA ポリ

ゼの活性であると推定される。ポリ (dA) では、1.16 g/ml 分画に活性がなく、1.17と1.22g/ml 分画に活性がみられた (Fig. 1 e)。このように、比重1.16g/ml分画の DNA ポリメラーゼ活性は、そのテンプレート・プライマーとしてポリ (A) オリゴ (dT), ポリ (C) オリゴ (dG) を要求し、ポリ (dA) オリゴ (dT), ポリ (dA) を要求しない。このような性質は、細胞の DNA ポリメラーゼ、ターミナルデオキシリボヌクレオチジルトランスフェラーゼと明確に区別できるレトロウイルスの逆転写酵素の性質である。

逆転写酵素活性はどの位の大きさの粒子に担われてい

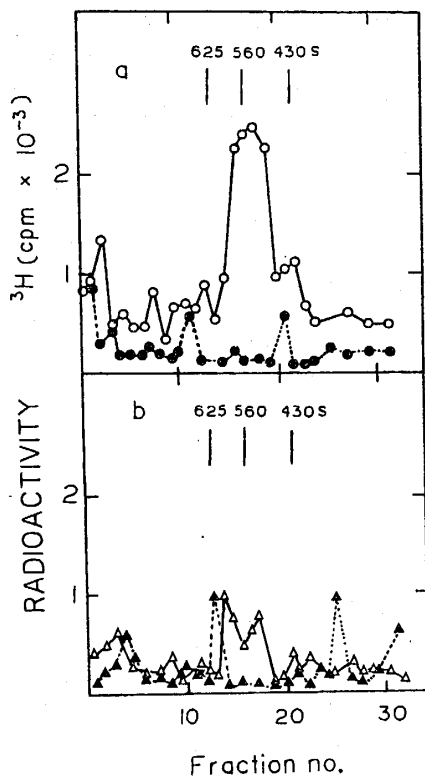


Fig. 2. DNA polymerase profiles obtained by velocity gradient centrifugation of the culture supernatants of the CK-a cells. The pellet of the culture supernatant was centrifuged at 15,000 rpm (SW 28 rotor) for 90 min in a 7-52% (w/w) sucrose density gradient. Sedimentation was from right to left. DNA polymerase activity in each fraction was assayed with (A) poly (C). oligo (dG) plus MgCl₂ (○—○), poly (C). oligo (dG) plus MnCl₂ (●---●), (b) poly (dA). oligo (dT) plus MnCl₂ (▲---▲) and poly (dA) plus MnCl₂ (△—△). HTLV-1, MLV (560 S), and the top (430 S) and the bottom (625 S) of VSV were run as controls.

るのだろうか。速度ゾーン遠心後、各分画の DNA ポリメラーゼ活性を測定した。沈降定数測定のマーカーとして、HTLV-1 (560S), MLV (560S), VSV の T(420 S)およびB因子 (625S) を使用した。ポリ (C)オリゴ

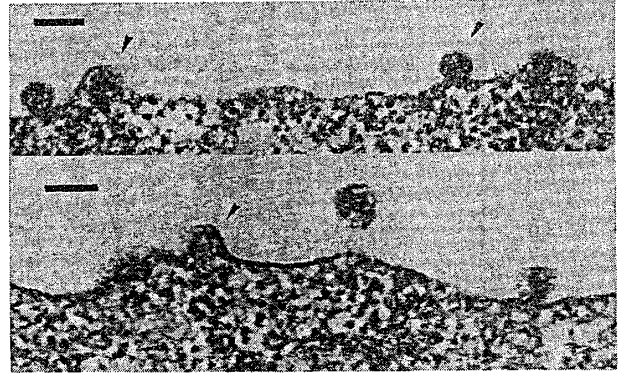


Fig. 3. Electron micrographs of ultrathin sections of CK-a cells. Arrows show the budding particles. Bar: 100nm. (千葉大学生物活性研究所 菅野治重氏撮影)

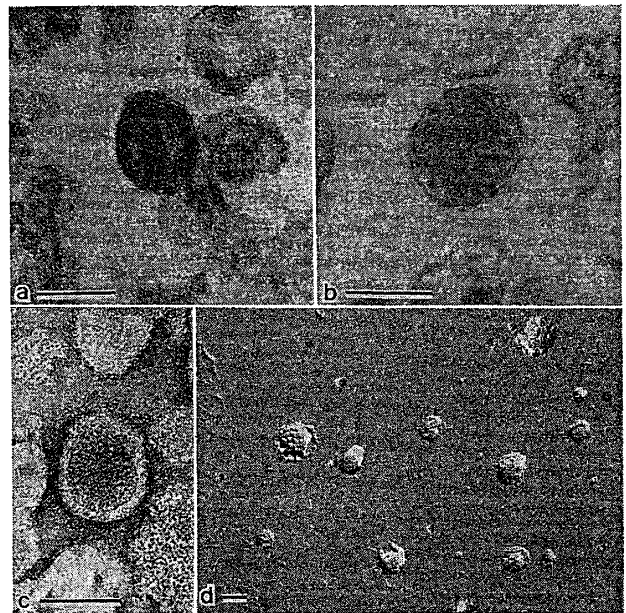


Fig. 4. Electron micrographs of the particles in the fractions at 1.16g/ml. The fractions banding at 1.16g/ml in a potassium tartrate-glycerol density gradient centrifugation were pelleted by high speed centrifugation. Electron micrographs of ultrathin sections (a, b), negatively stained (c) and surface-replicated preparations (d). The unit membrane surrounding the nucleoid is observed clearly (a, b). Bar: 100 nm. a, b and c: $\times 136,400$. d: $\times 37,600$.

(千葉大学医学部第二解剖学教室 外山芳郎氏撮影)

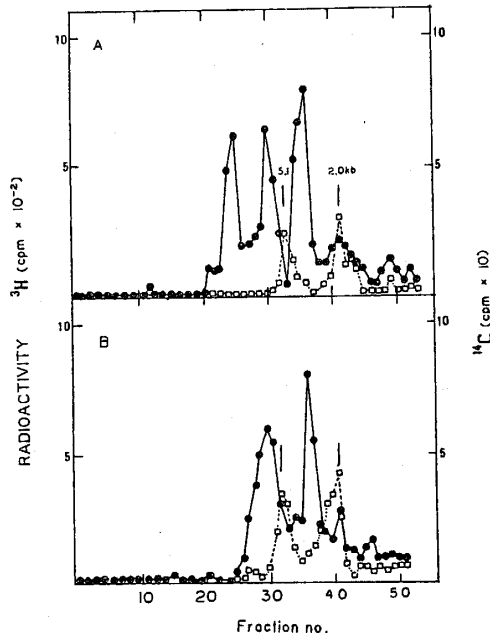


Fig. 5. Agarose-acrylamide composite gel electrophoresis of particle RNA. [^3H] uridine-labeled particle RNA was electrophoresed at 50 V for 2 hr in a 0.5 % agarose-2.4% acrylamide composite gel. After the run, the gel was sliced and the radioactivity of each slice was measured in a liquid scintillation counter (\bullet — \bullet). [^{14}C] uridine-labeled rRNAs (5.1 and 2.0 kb) of CK-a cells were coelectrophoresed as internal size markers (\square — \square). A) Particle RNA electrophoresed without preheating, B) particle RNA after heating at 100° for 5 min.

(dG)での活性は VSV の T 因子と MLV の中間でみられ (Fig. 2 a), Mg^{2+} を Mn^{2+} で置換すると消失した。ポリ (dA) オリゴ (dT), ポリ (dA) では、ポリ (C) オリゴ (dG) でのそれとは異なる分画に低い活性がみられた (Fig. 2 b)。これらの実験結果は沈降定数約 500S のリボ核たんぱく粒子が逆転写酵素活性の担体であることを示している。

3. 電子顕微鏡

CK-a 細胞の超薄切片を電子顕微鏡で観察すると、直径 70-120nm の成熟途上の粒子 (budding particle) が観察された (Fig. 3)。粒子中のヌクレオイドはその膜に関して中心に位置しているとも偏在しているとも云えない。したがって、観察粒子は D 型として分類するのが適当であると思われる。

比重 1.16g/ml 分画のペレットを電子顕微鏡で観察す

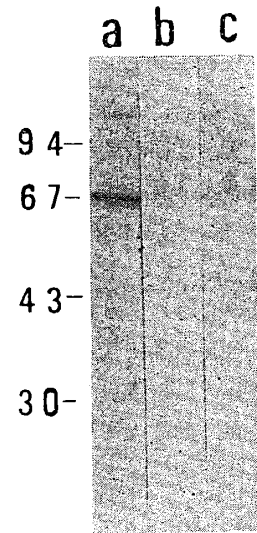


Fig. 6. Immune electroblotting of particle protein. Particle proteins separated on a 5-20% linear gradient acrylamide slab gel in SDS by electrophoresis were electroblotted to a cellulose membrane. The blotted proteins were allowed to react with 100 fold-diluted IgGs derived from sera of the patient (lane a), an ATL patient (lane b) and healthy control (lane c). The IgG antigen immune complex was detected by using goat antihuman IgG horse radish peroxidase assay system. Phosphorylase b (mol. wt. 94k), albumin (67 k), ovalbumin (43k) and carbonic anhydrase (30 k) were run as internal markers.

ると、超薄切片では単位膜でおおわれ、高電子密度のヌクレオイドを含んだ直径 100-120nm の粒子が (Fig. 4 a, b)、ネガティブ染色では smooth surface のある球状粒子が観察された (Fig. 4 c)。表面レプリカ法では表面に多数の Knob が観察できた (Fig. 4 d)。

4. RNA ゲノムの大きさ

^3H ウリジン標識精製粒子標品より RNA を抽出し、アガロース・アクリルアミド・ゲル電気泳動し、その分子サイズを決定した。CK-a 細胞の ^{14}C ウリジン標識リボゾーム RNA をサイズ・マーカーとして使用した。放射活性は二つのバンドとして泳動し、その分子サイズは 6.1 ± 0.2 , $2.5 \pm 0.1\text{kb}$ であった (Fig. 5 B)。リボゾーム RNA より大きい 6.1kb の RNA はレトロウイルスのゲノム RNA であると推定される。2.5kb の RNA は欠損粒子の RNA またはゲノム RNA の分解産物のいずれであるか、その起源ははっきりしない。加熱による前処理をしないで泳動すると、約 9.1kb の位置に、2

量体と思われるバンドが出現する (図5A)。

5. 患者血清中に粒子たんぱく質と反応する抗体の検出

粒子たんぱく質を電気泳動後エレクトロブロットティングし、患者血清、抗 HTLV-1、コントロール血清由来の IgG と反応させた。反応生成物はヤギ抗ヒト IgG-horse radish ペルオキシダーゼ・アッセイ・システム (Bio-Rad) で検出した。67kd の粒子たんぱく質は患者由来の IgG とのみ反応し、抗 HTLV-1および健康人血清由来の IgG とは反応しなかった (Fig. 6)。さらに、20人の健康人の血清を調べたが、いずれも67kd たんぱく質と反応しなかった。43kd の位置に薄いバンドがみられるが、これは健康人血清および抗 HTLV-1血清にも存在するので、非特異的な反応と考えられる。

おわりに

Non-T, non-B 型 ALL の女兒の末梢血から樹立した CK-a 細胞の培養上清中に、Retroviridae の定義を満足する粒子を検出した。われわれはこの粒子を CKV と仮称した¹⁸⁾。CKV のゲノム・サイズは6.1kb であり、典型的なレトロウイルスのそれに比べるとかなり小さい。Foamy ウイルスは表面に顕著な突起が存在し、ヒトはい細胞に接種すると細胞病変効果を誘起する^{9,19)}。しかし、このような突起および細胞病変効果の誘起性は CKV ではみられない。ヒトのレトロウイルスとして今までに報告されたウイルスの多くは SSV-1/SSAV および BaEV、またはその近縁のウイルスであった。これらのウイルスは XC 細胞と混合培養するとシンシチウムを形成するが、CK-a 細胞と XC 細胞を混合培養してもシンシチウムの形成はみられない。CKV の逆転写酵素はその活性に Mg^{2+} を要求する。しかし、BaEV の逆転写酵素は CKV のそれとは対照的に Mn^{2+} を要求する²⁰⁾。このように、foamy ウイルス、SSV-1/SSAV、BaEV いずれのウイルスも CKV の候補ウイルスとなり得ない。CKV の分類上の位置づけは、ウイルスのクロニングとその解析結果を待たねばならず、今後に残された問題である。

CKV と反応する抗体が患者血清中に存在することは、CKV が既知の動物由来のレトロウイルスの汚染である可能性を除外し、CKV が外来性ウイルスであることを強く示唆する。しかし、内因性ウイルスの場合でも、そのたんぱく質が発生初期に発現することなく後期に発現すると、外来性の抗原として認識されることもあると考えられるので、CKV が内因性ウイルスである可

能性は完全に除外できない。その起源についての明確な答えは CKV の cDNA をプローベとした各種細胞中の CKV プロウイルス・ゲノムの検索結果を待たねばならない。抗 HTLV-1抗体との無反応性は CKV の候補ウイルスから HTLV-1を除外する。現在、進行中の血清疫学的検索は CKV の病原としての性質を明らかにするのに役立つだろう。

文 献

- 1) Gallo, R. C. and Wong-Staal, F.: Retroviruses as etiologic agents of some animal and leukemias and lymphomas and as tools for elucidating the molecular mechanism of leukemogenesis. *Blood* 60, 545-557, 1982.
- 2) Hinuma, Y., Nagata, K., Hanaoka, M., Nakai, M., Matsumoto, T. Kinoshita, K., Shirakawa, S. and Miyoshi, I.: Adult T-cell leukemia: Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6476-6480, 1981.
- 3) Yoshida, M., Miyoshi, I. and Hinuma, Y.: Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2031-2035, 1982.
- 4) Poiesz, B. V., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D. and Gallo, R. C.: Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7414-7419, 1980.
- 5) Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Danguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L.: Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-870, 1983.
- 6) Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Papovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., H., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P. and Markham, P. D.: Human T-lymphotropic retrovirus, HTLV-III, isolated from AIDS patients and donors at risk for AIDS. *Science* 224, 500-503, 1984.
- 7) Fenner, F.: The classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 6, 1-12, 1975.
- 8) Sonigo, P., Alizon, M., Staszus, K., Kla-

- tzmann, D., Cole, S., Danos, O., Retzel, E., Tiollais, P., Haase, A. and Wain-Hobson, S.: Nucleotide sequence of the visna lentivirus: Relationship to the AIDS virus. *Cell* **42**, 369-382, 1985.
- 9) Teich, N.: Taxonomy of retroviruses. In Weiss, R., Teich, N., Varmus, H. and Coffin, J. eds. *Molecular Biology of Tumor Viruses: RNA Tumor Viruses*, pp 25-207, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- 10) Kalyanaraman, V. S., Sarngadharan, M. G., Robert-Garoff, M., Miyoshi, I., Blayney, D. and Gallo, R. C.: A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* **218**, 572-573, 1982.
- 11) Weiss, R.: Human T-cell retroviruses. In Weiss, R., Teich, N., Varmus, H. and Coffin, J. eds. *Molecular Biology of Tumor Viruses: RNA Tumor Viruses, 2/supplements and appendixes*, pp 406-485, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985.
- 12) Gallagher, R. E. and Gallo, R. C.: Type C RNA tumor virus isolated from cultured human acute myelogenous leukemia virus. *Science* **187**, 350-353, 1975.
- 13) Teich, N. M., Weiss, R. A., Salahuddin, S. Z., Gallagher, R. E., Gillespie, D. H. and Gallo, R.: Infective transmission and characterization of a C-type virus released by cultured human myeloid leukemia cells. *Nature* **256**, 551-555, 1975.
- 14) Okabe, H., Gilden, R., Hatanaka, M., Stephenson, J. R., Gallagher, R. E., Gallo, R. C., Tronick, S. R. and Aaronson, S. A.: Immunological and biochemical characterization of type C viruses isolated from cultured human AMV cells. *Nature* **260**, 264-266, 1976.
- 15) Sahagan, B. G. and Haseltine, W. A.: Relationship of retroviruses isolated from human leukemia tissues to the wooley monkey-gibbon ape leukemia viruses. *J. Virol.* **34**, 390-401, 1980.
- 16) Nooter, K., Aarssen, A. M., Bentvelzen, P., De Groot, F. G. and Van Pelt, F. G.: Isolation of infectious C-type oncornavirus from human leukemic bone marrow cells. *Nature* **256**, 593-597, 1975.
- 17) Nooter, K., Overdevest, J., Dubbes, R., Koch, G., Bentvelzen, P., Zurcher, C., Coolen, J. and Calafat, J.: Detection of human C-type "helper" viruses in human leukemic bone marrow with murine sarcoma virus-transformed human rat nonproducer cell. *Int. J. Cancer* **19**, 59-65, 1977.
- 18) Miki, T., Sato, T., Nakajima, H., Koyama, S., Toyama, Y., Fuse, A., Suzuki, N., Kanno, H., Sakamaki, T. and Kato, I.: Retrovirus produced from a lymphoid cell line from an infant with acute lymphoblastic leukemia. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **78**, No. 2, 1987.
- 19) Hooks, J. J. and Gibbs, C. J., JR.: The foamy virus. *Bact. Rev.* **39**, 169-185, 1975.
- 20) Benveniste, R. E. and Todaro, G. J.: Multiple divergent copies of endogeneous C-type virogenes in mammalian cells. *Nature* **252**, 170-173, 1974.
-