

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
大井幸昌	主査 教授 大槻 勝紀 副査 教授 浮村 聡 副査 教授 岡田 仁克 副査 教授 樋口 和秀
主論文題名 Morphology and infectivity of virus that persistently infected in AGS cell line (AGS 細胞系に持続感染しているウイルスの超微形態構造と感染性について)	
学位論文内容の要旨	
《目的》 AGS 細胞は、ヒトの胃腺癌組織より樹立され、微生物学・免疫学・腫瘍学等の研究分野で広く用いられている。微生物学分野では、 <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>) が AGS 細胞に特異的な細胞変性を来すことから、AGS 細胞系には他の細胞系にない <i>H. pylori</i> の病原性に関わる因子が存在していると考えられている。また、この細胞は、Interferon への低反応性や持続性の多核巨細胞形成を示すことより、ウイルスに感染していることが示唆されていたところ、Young らによって、AGS 細胞系に <i>Simian Virus 5</i> (SV5) と相同性のある RNA が存在することが証明された。しかし、そのウイルスの形態と感染性を主とする生物学的特徴は明らかにされていない。そこで、AGS 細胞系に存在するウイルス (AGSV) の形態と感染性を主とする生物学的特徴を明らかにすることを研究目的とした。	

《材料と方法》

ウイルス粒子を得るために AGS 細胞(ATCC-CRL1739 株)、感染実験には Vero 細胞 (E6 株) を用い、hummingbird cell (HBC) 形成に関する実験には *H. pylori* (ATCC-43504 株)をそれぞれ用いた。蛍光抗体法及び免疫電子顕微鏡法用の抗体には、一次抗体として AGS 細胞培養上清を密度勾配遠心して得た比重 1.19 のウイルス様粒子を家兎に免疫して得た血清(抗 AGSV 血清)を、二次抗体として FITC 標識抗家兎 IgG ヤギ抗体あるいは金コロイド標識抗家兎 IgG ヤギ抗体をそれぞれ用いた。AGS 細胞、AGS 細胞培養上清から密度勾配遠心法にて得た粒子、AGS 細胞培養上清を加えた Vero 細胞及び *H. pylori*を加えた AGS 細胞を試料とし、光学顕微鏡法、蛍光抗体法、走査型電子顕微鏡 (SEM) 法、透過型電子顕微鏡 (TEM) 超薄切片法、TEM ネガティブ染色法および免疫電子顕微鏡法にて観察した。

《結 果》

SEM 法では、直径約 170 nm のウイルス様隆起が AGS 細胞表面に観察された。TEM 超薄切片法では、AGS 細胞外に直径 176.0 ± 41.1 nm の球形膜様構造物に被われたウイルス様粒子が観察された。これらの粒子には内部の電子密度が高いものと低いものがあった。また、AGS 細胞の細胞質膜には出芽像と考えられる隆起が認められ、その膜直下には、直径約 20 nm の粒状構造物が認められた。この粒状構造物は大きさからヌクレオカプシドの断面であると推定された。TEM ネガティブ染色法では AGS 細胞培養上清の比重 1.19 のバンドに、表面にスパイクを有するウイルス様粒子およびヌクレオカプシド様構造物が観察された。

Vero 細胞を用いた *in vitro* 感染実験では、AGS 細胞の培養上清を加えた Vero 細胞に AGS 細胞に認められるのと同様の多核巨細胞が認められ、その感染力価は $10^{4.0}$ TCID₅₀ /ml であった。また抗 AGSV 血清を用いた蛍光抗体法では、AGS 細胞培養上清を加えた Vero 細胞に AGS 細胞と同様の強いシグナルが認められた。

ウイルス様粒子が Vero 細胞の中で複製していることを示すため、AGS 細胞培養上清を加えた Vero 細胞を TEM 超薄切片法で観察した結果、AGS 細胞に認めたものと同じ形態的特徴を有する粒子、出芽像および細胞質内封入体を認めた。上記の両細胞に存在するウイルス様粒子が同じ抗原を有することを確認するため、抗 AGSV 血清を用いて免疫電子顕微鏡法で観察した結果、これらのウイルス様粒子はともに抗 AGSV 血清に反応した。

また、*H. pylori*を加えることによって AGS 細胞に特異的に起こる HBC 形成は、抗 AGSV 血清によって阻害された。

《考 察》

本研究で、AGS 細胞 (ATCC CRL-1739 株) に持続感染しているウイルス様粒子が、直径 176.0 ± 41.1 nm の球形粒子で、表面にスパイクを有し、その内部の電子密度は高いもの或いは低いものが有り、ヌクレオカプシド様構造物が線状構造をとっている点で *Paramyxovirus* 属の形態構造の一般的特徴に一致することを明らかにした。また、現在のところ SV5 の詳細な形態構造は決定されておらず、本研究によって SV5 の微細構造が明らかにされた。

AGS 細胞培養上清を加えた Vero 細胞に AGS 細胞と同様に多核巨細胞が形成され、細胞質内封入体、ウイルス粒子を認めたことと、その粒子が抗 AGSV 血清へ反応することより Vero 細胞内で本ウイルスが複製し、AGSV が Vero 細胞への感染性を有することを明らかにした。また、本研究において、抗 AGSV 血清が HBC 形成を抑制したことから、AGSV が AGS 細胞における *H. pylori* の細胞傷害性に密接に関与している可能性を示すもので、*H. pylori* の病原性をウイルスが増強している可能性を示すものであると考えた。

AGS 細胞は腫瘍学・免疫学・微生物学の研究で有用な細胞株であるが、この細胞を用いた研究結果の解釈は慎重に行う必要があり、AGSV のウイルス感染力価は比較的高かったことから、AGS 細胞を取り扱う研究者は、細胞の取り扱いに注意を要する。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲第	号	氏名	大井幸昌
論文審査担当者			主査教授 大槻 勝紀	
			副査教授 浮村 聡	
			副査教授 岡田 仁克	
			副査教授 樋口 和秀	
主論文題名				
Morphology and infectivity of virus that persistently infected in AGS cell line (AGS 細胞系に持続感染しているウイルスの超微形態構造と感染性について)				
論文審査結果の要旨				
<p>ヒトの胃腺癌組織より樹立され、微生物学・免疫学・腫瘍学等の研究分野で広く用いられている AGS 細胞系 (ATCC CRL-1739 株) に、<i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>) が特異的な細胞変性を来すことから、AGS 細胞株には他の細胞系にない <i>H. pylori</i> の病原性に関わる因子が存在していると考えられている。また最近、AGS 細胞株に <i>Simian Virus 5</i> (SV5) と相同性のある RNA が存在することが証明されたが、そのウイルスの形態と感染性を主とする生物学的特徴は明らかにされていない。そこで申請者は、AGS 細胞株に存在するウイルス (AGSV) の形態と感染性を主とする生物学的特徴を明らかにする事を研究目的とした。</p> <p>各種の電子顕微鏡法を用い、AGSV が形態学的に <i>Paramyxovirus</i> 属のウイルスである事を明らかにした。試験管内感染実験によって、AGS 細胞株培養上清中に Vero 細胞内で複製する感染性因子が存在し、それが AGSV であることを各種電子顕微鏡法等を用いて明らかにした。更に、<i>H. pylori</i> が AGS 細胞株に特異的に起こす Humming bird cell (HBC) 形成を抗 AGSV 血清が阻害することを示し、AGSV</p>				

は HBC 形成を起こす一因である可能性を明らかにした。また、本研究によって未だ決定されていない SV5 の微細構造を明らかにした。

申請者は本研究において、AGS 細胞系特異的な *H. pylori* の細胞病原性の発揮に、ウイルスが関与している可能性を明らかにした。*H. pylori* の細胞病原性にウイルスが関わることを示唆されたことは、細菌性疾患の発症メカニズムを解明する新たな方向に知見を提供するものである。また、申請者は AGS 細胞系が微生物学・免疫学・腫瘍学の研究で用いられており、AGS 細胞系を用いた研究結果の分析を慎重にする必要がある、AGS 細胞系を取り扱う研究者は、その取り扱いに注意を要するとしている。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Medical Molecular Morphology 44: 2011 in press