ヒト中枢神経系由来細胞におけるヒトサイトメガロウイルス持続感染成立と維持の機構解明

金沢大学十全医学会雑誌　第96巻　第1号　58－70　(1987)

ヒト中枢神経系由来細胞におけるヒトサイトメガロウイルス持続感染成立と維持の機構解明

金沢大学がん研究所ウイルス部（主任：波田野基一教授）

小　倉　　勤

(昭和62年1月9日受付)

生体内でのヒトサイトメガロウイルス（HCMV）による中枢神経系細胞傷害機構解明のモデル実験として，ヒト中枢神経系由来細胞とHCMVの *in vitro* 相互作用について検討した．HCMV野生株（HCMVwt）感染 (m.o.i.=10) glioblastoma（118MGC）およびneuroblastoma（IMR-32）細胞では有意なウイルス増殖が認められたが，oligodendroglioma（KGC）細胞でのウイルス増殖はみられなかった．HCMVwt感染118MGC細胞の継代培養により，HCMV持続感染細胞が樹立化された．このHCMV持続感染細胞（118MGC/Towne）からは，感染後360日（50継代）以上に渡り，10^2～10^5 p.f.u./10^6細胞の感染性ウイルス（HCMVpi）が持続的に産生された．樹立化118MGC/Towne細胞からは，温度感受性変異ウイルス，欠損干渉ウイルスは産生されず，さらに，インターフェロン様活性物質も検出されず，この持続感染細胞成立・維持の機序として産生ウイルス再感染と非感染細胞増殖の平衡が示唆された．さらに，長期継代維持された持続感染細胞由来HCMVpiは，もとの野生型ウイルス（HCMVwt）と比べ以下の性状において異なっていた．1）HCMVpiの増殖は，HCMVwtと比較し遅く，さらに，ウイルス産生量も低かった．2）HCMVpi感染細胞には，HCMVwt感染によっては検出されない分子量73,000のHCMV特異的前初期蛋白が誘導された．3）HCMVpiおよびHCMVwt由来DNA間には構造上の違いが認められた。以上の結果より，長期持続感染細胞由来HCMVpiはHCMVwtの増殖能に関する変異株であることを示し，この変異ウイルス出現が持続感染成立・維持に重要な役割を果すものと考えられた．

Key words　HCMV, CNS cell lines, persistent infection, variant virus

Smith[1]およびRowe[2]により最初に分離されたヒトサイトメガロウイルス（human cytomegalovirus, 以下HCMV）は，ヘルペスウイルス科に属し，ヒトを唯一の宿主とする大型のDNA型ウイルスである．一般に，HCMVの初感染は不顕性感染であるが，疫学的調査結果より，本邦成人の80～90%がウイルス抗体を保持する[3]ことから，広くヒトを侵襲する代表的ウイルスと考えられている．HCMV感染様式の特徴として持続感染および潜伏感染が知られており，潜伏ウイルスは，宿主の免疫機能の低下により潜伏状態から活性化され，種々の感染症，例えば，肝炎，間質性肺炎などを誘発する[4]．特に妊婦における胎児の先天性感染は，全出生児の0.5～2.0%と高く[5]，既知の胎内感染因子の中でも最も頻度が高いとされている．これら先天性感染児の3～10%は，古典的巨細胞封入体症（cytomegalic inclusion disease）として肝脾腫，黄疸，小頭症ならびに脳石灰化像など重篤な臨床症状を呈する[6]．さらに，新生児期または乳児期において無症状を呈する感染児でも，その後の追跡調査より，軽度の知能低下，情緒障害あるいは聴力障害が高率に認められ[7]，神経学的後遺症が問題となっている．このような長期予後に認められる障害は，HCMVのヒト中枢神

Abbreviations: act D, actinomycin D; CH, cycloheximide; c.p.e., cytopatic effect; DIP, defective interfering particle; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; E, early; HCMV; human cytomegalovirus; HCMVpi, persistently infected HCMV; HCMVwt, HCMV wild type; HEL, human embryonic lung; IE, immediate early; IEA, immediate

経系細胞における持続感染化に基づく可能性が示唆されている[8]．しかしながら，これまで HCMV とヒト中枢神経系細胞との相互作用に関する研究は，ほとんど進展しておらず，HCMV 誘発中枢神経系細胞傷害のメカニズムは不明である．

本研究では，ヒト中枢神経系由来細胞での HCMV 増殖能の検討，ならびに HCMV 持続感染細胞の樹立化を計り，ヒト中枢神経細胞での HCMV 持続感染成立と維持の機序を明らかにし，上記神経細胞での発症機構を解明することを目的とした．

材料および方法

Ⅰ．使用細胞と培養条件

ヒト中枢神経系由来細胞として，neuroblastoma (IMR-32)[9]，glioblastoma (118 MGC)[10]，および oligodendroglioma (KGC)[11]の 3 株化細胞を用いた．IMR-32 および 118 MGC 細胞は，10%仔牛血清加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)（日水，東京）で，KGC 細胞は，10%牛胎児血清を含む DM-160（極東，東京）培地により増殖させた．ヒト胎児肺線維芽細胞（HEL 細胞）は，4 ケ月令胎児肺より調整し，10%仔牛血清添加 DMEM で増殖させた[12]．ウイルス感染 KGC 細胞は 5 %牛胎児血清加 DM-160，他 2 細胞は，5 %仔牛血清添加 DMEM により維持した．細胞の継代は，0.02% ethylendiamine tetraacetate と 0.25%トリプシン (Difco, Detroit, U.S.A.) により分散後，細胞濃度 1.0～2.0×10^5 cells/ml に調整し，37°C で増殖継代した．

Ⅱ．ウイルス

HCMV は，Towne 株を使用した．ストックウイルスは低 multiplicity of infection (m.o.i.) で感染させた HEL 細胞の，すべてに細胞変性効果 (cytopatic effect, c.p.e.) が出現後，培養液を遠心分離 (1,500×G, 10 分) し，その上清を−80°C に保存した[13]．

Ⅲ．ウイルス感染価の測定

培養ビン（1 オンス）中で単層培養された各細胞に HCMV を m.o.i.＝10 plaque forming unit (p.f.u.)/cell で感染させ，37°C，90 分吸着させ，以後のウイルス assay に用いた．全ウイルス量測定には，感染細胞を培養上清と共に凍結融解後，さらに，ソニファイア SD-12 (Branson, Chicago, U.S.A.) により超音波処理（50 ワット，30 秒）したものを使用した．また，細胞外放出ウイルス量測定には，感染細胞培養液の遠心 (1,500×G, 10 分) 上清を用いた．ウイルス感染価は，HEL 細胞上でのプラック法[12][13]により測定し，p.f.u./ml で表示した．また，cell associated virus 量は，全ウイルス量から細胞外放出ウイルス量を減じ，p.f.u./10^6 細胞で表示した．感染中心価は，田中らの方法[14]に従い算定した．

Ⅳ．ウイルス抗原の検出

HCMV 特異的抗原［前初期抗原 (immediate early antigen, IEA)[15] と後期抗原(late antigen, LA)[16]］は，間接螢光抗体 (indirect immunofluorescence, IF) 法[17]により検出した．その際，1 次抗体には，抗 IEA 抗体価 1：16 および抗 LA 抗体価 1：640 を含むヒト血清を用い，2 次抗体は，fluorescent-isothiocyanate 標識抗ヒト IgG ヤギ血清を使用した．

Ⅴ．免疫沈降法およびポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

HCMV 特異的前初期 (IE) および初期 (early, E) 蛋白の合成は，Blanton と Tevethia の方法[18]に従い分析した．25-cm^2 プラスチックフラスコ (Falcon, Cockeysville, U.S.A.) 内で培養した HEL 細胞に HCMV を m.o.i.＝5 で感染させた．1 時間吸着後，^{35}S 標識メチオニン (30 μCi/ml ; 放射比活性 1110 Ci/mmol) (Amersham, Buckinghamshire, U.K.) を含むメチオニン不含培養維持液にて，2 時間間隔で感染後 7 時間迄，IE 蛋白をパルス標識した．各パルス標識 IE 蛋白を，500 μl 抽出緩衝液 (30 mM NaCl, 10%グリセロール，1 mM $CaCl_2$, 0.5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.0003 %フェニルメチルスルフォニルフルオライド，20 mM Tris-HCl, pH 9.0) にて抽出し，上述の IEA 抗体陽性ヒト血清 10 μl と 4 °C，14 時間反応により，免疫沈降[19]させた．さらに，20 μl のプロテイン A セファローズ CL4B（ファーマシア，ウプサラ）を加え，抗原抗体反応物を回収後，10%スラブゲルを用いた PAGE を行なった．

さらに，サイクロヘキシミド (cycloheximide, CH) 処理による IE 蛋白分析は，Jeang と Gibson の方法[20]に従った．ウイルス感染前 1 時間より CH (50 μg/ml) (Sigma, St. Louis, U.S.A.) で前処理した HEL 細胞に，CH 存在下において，HCMV を m.o.i.＝5 で感染させた．1 時間吸着後，感染細胞をさらに CH を含む維持液中に保ち，IE mRNA 合成を増幅させた．感染 17 時間後 CH を除き，アクチノマイシン D

early antigen ; IF, indirect immunofluorescence ; K, kilodalton ; Kb, kilobase ; LA, late antigen ; m.o.i., multiplicity of infection ; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis ; p.f.u., plaque-forming unit.

(actinomycin D, act D; 5 μg/ml) (Sigma) 添加メチオニン不含維持液中で，感染細胞を2時間 ^{35}S-メチオニン標識した．その後，標識IE蛋白を抽出し，PAGEにより分離分析した．分子量マーカーとして，放射標識ミオシン，フォスフォリラーゼ，牛血清アルブミン，卵白アルブミン，炭酸脱水素酵素，リゾチーム (Amersham) [分子量は，それぞれ200, 92.5, 69, 46, 30, 14 kilodalton (K)] を用いた．

VI. IE蛋白合成の pulse-chase 分析

IE蛋白合成の pulse-chase 実験は，Gibson の方法[21]により行なった．^{35}S-メチオニン標識 CH 増幅 IE 蛋白を，act D (5 μg/ml) 存在下で，18時間非標識メチオニンで chase した．IE蛋白を抽出し，免疫沈降後，前述の如く PAGE 法により分離分析した．

VII. HCMV 粒子の精製およびウイルス DNA の抽出

HCMV 粒子の精製は，Talbot と Almeida の方法[22]に従い行なった．HEL 細胞に HCMV を m.o.i.=0.01 感染させ，80%の細胞が c.p.e.を示した時，培養維持液を交換した．5日後，培養維持液を集め，7,000×G, 20分遠心後，上清をタイプ21ローター (ベックマン，カリフォルニア) で56,000×G, 90分遠心し，その沈査を濃縮ウイルスとした．濃縮ウイルスを500 μl 緩衝液 (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) で再浮遊し，15%から30%の酒石酸カリウム密度勾配遠心を行ない，ウイルスバンドを分離した．精製ウイルスを，さらに，100 μg/ml プロテイナーゼK (Sigma)，0.5%サルコシル NL 96 を含む 200 mM EDTA (pH 8.0) 中で 50°C，3時間消化後，フェノール抽出を2回繰返しウイルス DNA を得た．

VIII. HCMV DNA の制限酵素切断と電気泳動

ウイルス DNA 構造解析のため，抽出ウイルス DNA を制限酵素 *Eco* RI, *Bam* HI, *Hind* III, *Xba* I (宝，京都) で切断した．0.1 μg の DNA と 20 単位の上記制限酵素を 37°C，2時間反応後，さらに，切断 DNA 断片を，0.6%アガロースゲルを用いた電気泳動により分離した．DNA の長さの標準マーカーとして，*Hind* III切断入ファージ DNA 断片[23] [分子量 23.3, 9.3, 6.5, 4.3, 2.2, 1.9 kilobase (Kb)] を用いた．

IX. ウイルス DNA 断片のサザンブロッティング法

HCMV DNA 断片は，サザンブロッティング法[24]によりニトロセルロース膜に転写した．膜上の DNA 断片は，Rigy らのニックトランスレーション法[25]により ^{32}P-dCTP (100 μCi; 放射比活性 3,000 Ci/mmol, Amersham) で放射標識された HCMV 野生株 DNA プローブとのハイブリダイゼーション法により検出した．

成　績

I. ヒト中枢神経系由来細胞における HCMV の増殖

一般に，*in vitro* での HCMV 増殖は，二倍体ヒト線維芽細胞において最も効率的であることが知られている[1]．そこで，ヒト中枢神経系由来細胞株での HCMV の増殖能を知る目的で，IMR-32, 118MGC, KGC, および HEL 細胞に，HCMV を m.o.i.=10 で感染させ，経日的に全感染性ウイルス量を測定し，各細胞間でのウイルス増殖能の差を比較検討した．

図1に示したように，HEL 細胞でのウイルス増殖は3日目より開始され，5日目には 3.0×10^7 p.f.u./ml の感染性子孫ウイルスが検出された．一方，IMR-32 および 118MGC 両細胞における感染性ウイルスの産生は，感染後4日目より開始され，5日目のウイルス産生量は約 10^5 p.f.u./ml であった．しかしながら，KGC 細胞では，有意なウイルス増殖は認められなかった．この結果は，感染5日後の細胞に合成された HCMV

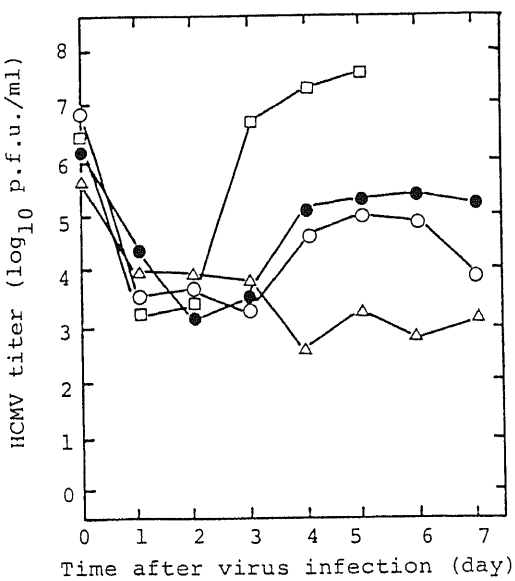

Fig. 1. Replication of HCMV in various human CNS cell lines. Subconfluent monolayers of IMR-32 (○), 118MGC (●), KGC (△) or HEL (□) cells were infected with HCMV at an m.o.i. of 10. After 90 min, cells were washed with Hanks' balanced salt solution and maintenance medium was added. At the indicated times, the cells were disrupted by freezing and thawing once, and by sonication. The total amount of infectious virus was then measured by plaque assay on HEL cells.

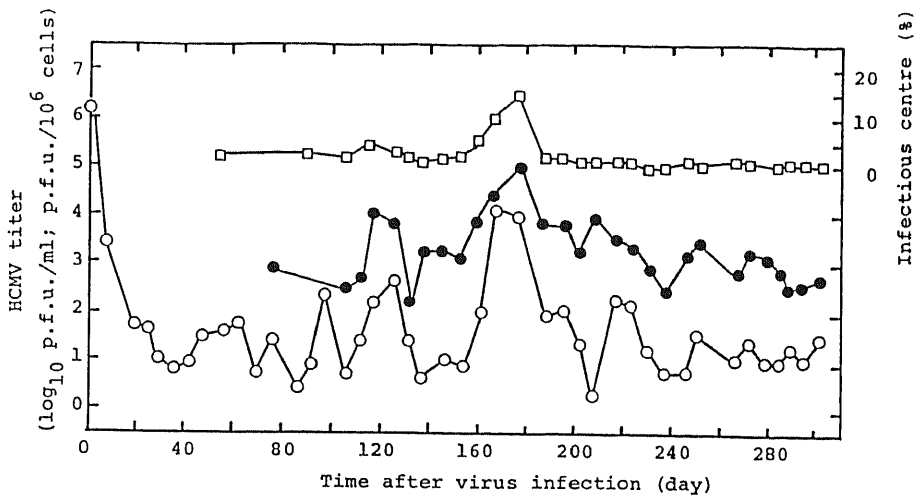

Fig. 2. Production of infectious HCMV in persistently infected 118MGC cells. The cells were infected with HCMV at an m.o.i. of 10 and subsequently subcultured once a week at a split ratio of 1 : 3. At the indicated times after infection, virus titers in the culture supernatant (○, $\log_{10}$ p.f.u./ml) and cell extract (●, $\log_{10}$ p.f.u./10^6 cells), or infectious centre titers (□) were determined.

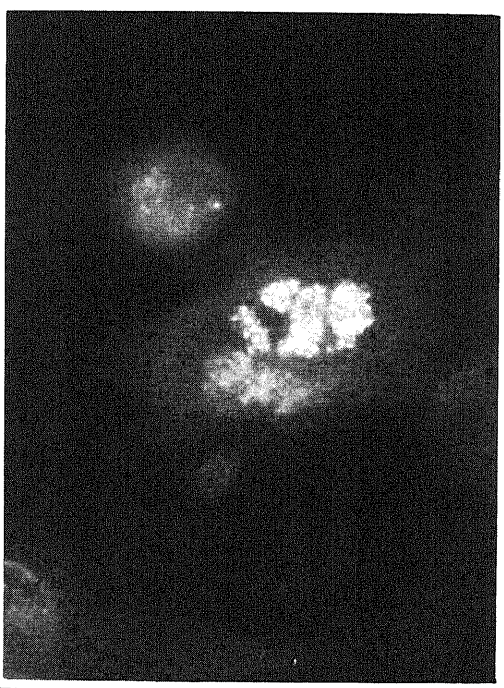

Fig. 3. Immunofluorescence photomicrograph of HCMV persistently infected 118MGC cells. At 650 days after infection, cells were fixed with acetone and stained with human convalescent serum and with anti- human immunoglobulin G goat serum conjugated with fluorescein isothiocyanate (×400).

特異的 LA（核内封入体）を IF 法により染色することによってさらに確認された．即ち，HEL, IMR-32, および 118MGC 細胞では，95%以上の細胞が LA 陽性であったが，KGC 細胞では，わずか 3.3%の細胞が LA 陽性にすぎなかった．これらの結果は，IMR-32 および 118MGC 細胞でのウイルス産生能は，HEL 細胞に比べ約 100 分の 1 であり，これら 2 種細胞は HCMV 増殖に対して semi-permissive であることが示された．

II．ヒト中枢神経系由来細胞における HCMV 持続感染の樹立化

HCMV により誘発された先天性巨細胞封入体症患者では，長期間中枢神経細胞にウイルスが持続感染することが示唆されている[8]．この事実を考慮して，各種細胞における HCMV 持続感染樹立化の可能性を次に検討した．IMR-32, 118MGC および KGC 細胞に HCMV を m.o.i.＝10 で感染後，週に 1 度，細胞数を 3 倍に稀釈した割合で継代培養を繰返し，継代毎に感染性ウイルス量，LA 陽性細胞数，および感染中心価をそれぞれ測定した．

その結果，KGC 細胞では，感染後 7 日目には LA 陽性細胞数は約 10%であったが，3 回の継代により，LA 陽性細胞および感染性ウイルスともに検出不能となった．IMR-32 細胞では，感染後 7 日目には，ウイルス特異的 c.p.e.の出現により 90%以上の細胞が脱落した．その生存細胞は継代可能であり，感染後 60 日間は，10^1～10^6 p.f.u./10^6 細胞の感染性ウイルス産生が認められた．しかし，2 ケ月以上の継代培養の結果，感染性ウ

イルスおよびLA合成は完全に停止した．一方，HCMV感染118MGC細胞では，感染後6日迄に約90%以上の細胞がc.p.e.を示し死滅したが，生存細胞の培養によりHCMV持続感染が樹立された．図2に示したごとく，HCMV持続感染118MGC細胞（以後118MGC/Towne）からは，細胞内ウイルス量として10^2～10^5 p.f.u./10^6細胞，また，培養液中には2×10^1～10^4 p.f.u./mlの感染性ウイルスが，感染後300日以上（40継代以上）持続的に産生された．各継代時での感染中心価は約0.1～15%であった．さらに，IF法により検出されたLA陽性細胞数は，0.1～60%を示し，感染中心価数とほぼ比例していた．

Ⅲ．HCMV持続感染118MGC/Towne細胞の性状

118MGC/Towne細胞自身の増殖能は，非感染118MGC細胞に比べ有意な差異は認められなかった．細胞形態の特徴として1～10%の細胞にc.p.e.が常に検出され，これらの細胞の大部分には，HCMV特異的核内封入体，すなわちLA抗原がIF染色により検出された（図3）．

118MGC/Towne細胞産生HCMV（HCMVpi）のHEL細胞上でのプラック形成能を34°Cと39°Cで比較した．両温度において形成されたプラックの数，形態およびサイズには有意な差は認められなかった．さらに，118MGC/Towne細胞を39°Cで7日間培養しても，感染性ウイルス産生およびLA合成能には34°C培養細胞と比べ有意な差は認められず，温度感受性変異株の出現は否定された．そこで次に，欠損干渉ウイルス（defective interfering particle, DIP）出現の可能性を検討した．HCMVpi感染HEL細胞への親株HCMV（HCMVwt）の重感染は，HCMVwt増殖を全く干渉しなかった．さらに，118MGC/Towne細胞内合成HCMVpi-DNAをセシウムクロライド密度平衡勾配遠心法により分析した結果，DIP由来DNA分子に相当するDNA[26]は検出されなかった．さらに，118MGC/Towne細胞培養液中には，インターフェロン様活性物質も認められなかった．一方，HCMV特異抗体（中和抗体価；1：64）存在下での118MGC/Towne細胞の3週間の継代培養は，感染性ウイルスおよびLA合成能を完全に抑制した．

Ⅳ．持続感染ウイルスの増殖性

長期継代維持された118MGC/Towne細胞から産生されるHCMVpiのプラックは，HCMVwt形成プ

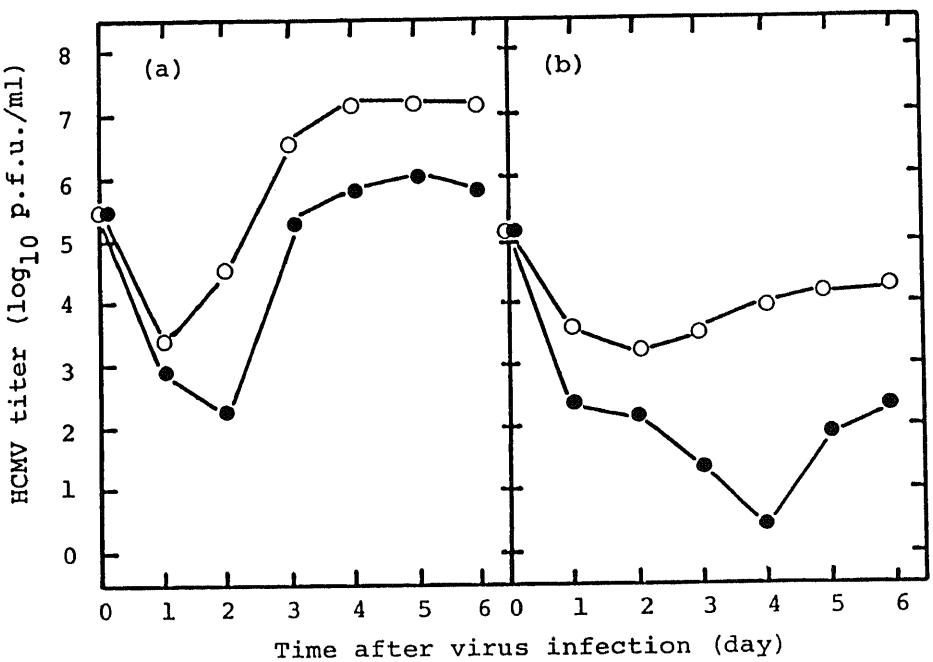

Fig. 4. Replication of HCMVwt and HCMVpi in HEL (a) or 118MGC (b) cells. Subconfluent monolayers of cultures were infected with HCMVwt (○) or HCMVpi (●) at an m.o.i. of 1. HCMVpi was obtained from 118MGC/Towne culture at 430 days post-infection and grown once in HEL cells at an m.o.i. of 0.1. After a 90 min adsorption period, cells were washed with Hanks' balanced salt solution and maintenance medium was added. At the indicated times the total amount of infectious virus was measured.

ラックと比べサイズの縮少と出現時間の遅延が観察され，ウイルス増殖能における変異が示唆された．そこで，HEL および 118MGC 細胞における HCMVpi の増殖能を HCMVwt のそれと比較検討した．HEL および 118MGC 細胞に，HCMVwt または HCMVpi を m.o.i.＝1 で感染後，経日的に全感染性ウイルス量を測定した．HEL 細胞での HCMVwt と HCMVpi の感染性ウイルスの合成は，それぞれ感染後 2 日目と 3 日目に開始され，HCMVpi の潜伏期は HCMVwt より 1 日長かった．さらに，感染 5 日後に認められた HCMVpi 最大産生量は，HCMVwt に比べ約 10 分の 1 であった（図 4 a）．一方，118MGC 細胞における HCMVpi の増殖では，感染性ウイルスの出現は HCMVwt に比べ 2 日遅く 5 日目に開始され，感染 6 日目での最大ウイルス産生量も約 100 分の 1 低かった（図 4 b）．

V．持続感染ウイルスの IE 蛋白合成能

HCMVpi の増殖性の低下を分子レベルで解析するために，HCMVpi 感染 HEL および 118MGC 細胞に誘導される HCMV 特異的 IE 蛋白を免疫沈降後，PAGE 法で解析した．図 5a に示したごとく，HCMVwt 感染 HEL（レーン 2）および 118MGC 細胞（レーン 5）には，分子量 72 K と 78 K の 2 つの主要 IE 蛋白が感染後 3 時間以内に合成された．一方，HCMVpi 感染 HEL（レーン 3）および 118MGC 細胞（レーン 6）における主要 IE 蛋白（72 と 78 K）の合成は，HCMVwt に比べ著しく低下した．興味深いことに，HCMVpi 感染 HEL 細胞では，HCMVwt 感染細胞には誘導されない 73 K IE 蛋白が新たに合成された．この HCMVpi 感染細胞に出現する 73 K IE 蛋白は，CH 増幅 IE 蛋白分析法によっても，同様に検出されることから，73 K IE 蛋白は免疫沈降により出現し

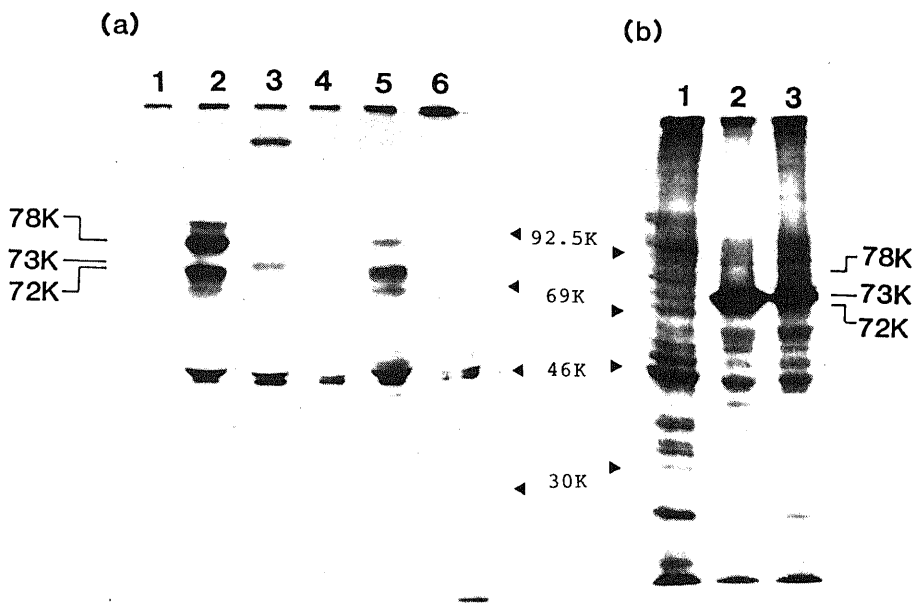

Fig. 5. Analysis of IE proteins synthesized in HEL or 118MGC cells infected with HCMVwt or HCMVpi. (a) Subconfluent monolayers or HEL (1, 2, 3)or 118MGC (4, 5, 6) were infected with HCMVwt (2, 5) or HCMVpi prepared as described in the legend to Fig. 4 (3, 6) at an m.o.i. of 5, or mock-infected (1, 4). After a 1 h adsorption period unadsorbed virus was removed and the cultuers were pulse-labelled with [^{35}S] methionine for 2 h in methionine-free maintenance medium. IE proteins were extracted, immunoprecipitated by human serum, and separated by SDS-PAGE as described under Methods. (b) Subconfluent monolayers of HEL cells were infected with HCMVwt (2) or HCMVpi (3) or mock-infected (1) in the presence of CH. At 18 h the CH-containing medium was removed, and cells were labelled for 2 h with [^{35}S] methionine in methionine-free maintenance medium containing act D. The radiolabelled cultures were immediately solubilized, and proteins were separated by SDS-PAGE. The mol. wt. of IE-specific proteins are presented, and arrowheads indicate the mol . wt. of standards.

た非特異的産物ではないことが確認された(図 5b).

HCMVwt と HCMVpi による IE 蛋白合成を経時的比較した結果, HCMVwt 感染 HEL 細胞では, 感染後 3 時間迄に 72 と 78 K の主要 IE 蛋白が合成され(図 6 ; レーン 2), 感染後 3～5 時間では, これら IE 蛋白の合成量はさらに増大した. この期間内には, 主要 E 蛋白として分子量 118, 88, 68 K の蛋白のバンドも検出された (レーン 3). 一方, HCMVpi 感染 HEL 細胞では, 感染後 3 時間迄には, 73 K IE 蛋白のみが合成され (レーン 5), その合成量は, 感染後経時的に減少した (レーン 6, 7). また, 72 と 78 K 主要 IE 蛋白の合成は, 感染後 3～5 時間に初めて認められ (レーン 6), さらに, 主要 E 蛋白の合成にもまた HCMVwt に比べ 2 時間の遅延がみられた (レーン 7).

VI. クローン化 HCMVpi の性質

HCMVpi (感染後 430 日の 118MGC/Towne 細胞産生) を HEL 細胞上で 3 回プラック純化したクローン化 HCMVpi を得た. 得られた 4 クローンの HEL 細胞における増殖能ならびに IE 蛋白合成能を HCMVwt と比較した. 4 つのクローン化 HCMVpi の最大ウイルス産生量は, HCMVwt のそれに比べ何れも 5～10 倍低かった. さらに, 感染後 3 時間迄に合成される IE 蛋白は 73 K 蛋白のみで, 図 4 ; レーン 3 に示した未クローン化 HCMVpi と同様の結果が認められた (データ省略). このように, HCMVpi は, その増殖性および IE 蛋白合成能に関し HCMVwt と異なる性状を有するウイルスであることが示された.

VII. 持続感染樹立後早期および後期細胞由来 HCMVpi の比較

HCMVpi の増殖能ならびに IE 蛋白合成能の違いが, 長期持続感染の結果生じたものかどうかを検討するため, 感染後比較的早期 (49 日) と比較的後期 (490 日) の 118MGC/Towne 細胞より HCMVpi を分離し, HEL 細胞における IE 蛋白合成能を PAGE により比較した. 感染後早期由来 HCMVpi が感染後 3 時間迄に誘導する IE 蛋白は, 72 と 78 K であり, HCMVwt と比べ差異は認められなかった (図 7 ; レーン 2, 3). 一方, 感染後後期由来 HCMVpi は, 73 K IE 蛋

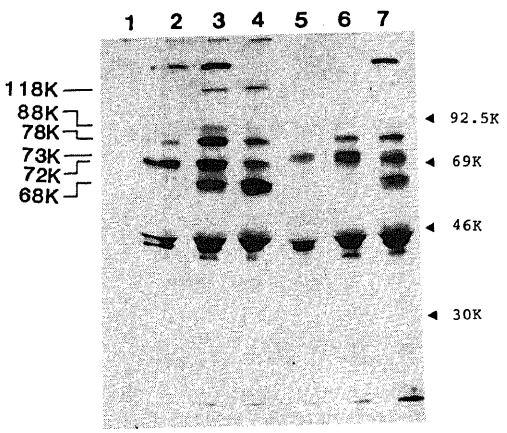

Fig. 6. Time coures of IE and E protein synthesis. HCMVwt (2, 3, 4) or HCMVpi (5, 6,7) at an m.o.i. of 5, or mock-infected (1). The cultures were pulse-labelled with [^{35}S] methionine at 1 to 3 h (2, 5), 3 to 5 h (3, 6), and 5 to 7 h (4, 7) after infection. IE proteins were extracted, immunoprecipitated, and separated by SDS-PAGE. The mol. wt. of IE- and E-specific proteins are presented, and the arrowheads indicate the mol. wt. of standards.

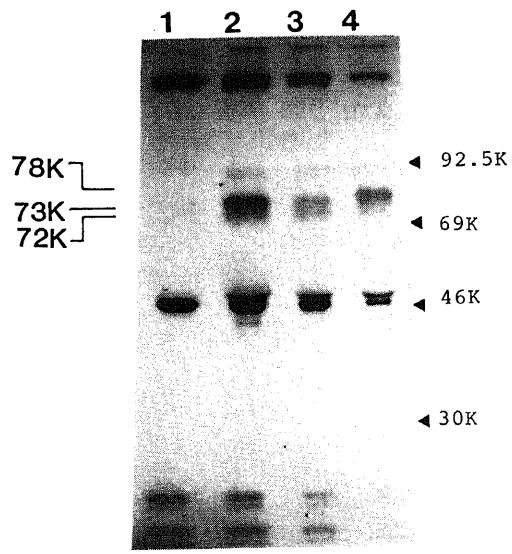

Fig. 7. Comparison of IE protein synthesis between short-term and long-term persistent infections. HCMVpi was obtained from 118MGC/Towne cultures at 49 and 490 days after infection. Subconfluent monolayers of HEL cells were infected with HCMVwt or HCMVpi at an m.o.i. of 5, or mock-infected. After 1 h adsorption, infected cultures were labelled with [^{35}S] methionine for 2 h. IE proteins were extracted, immunoprecipitated, and separated by SDS-PAGE. (1), mock-infected cultures; (2), HCMVwt-infected cultures; (3), cultures infected with HCMVpi obtained at 49 days; (4), cultures infected with HCMVpi obtained at 490 days. The mol. wt. of IE-specific proteins are presented, and the arrowheads indicate the mol. wt. of standards.

白のみを合成した（レーン4）．一方，両 HCMVpi の HEL 細胞での増殖能を比較した結果，感染後早期由来 HCMVpi の最大ウイルス産生量（4.0×10^6 p.f.u./ml）は，HCMVwt のそれ（2.5×10^6 p.f.u./ml）に比し差は認められなかった．しかし，感染後後期由来 HCMVpi 感染 HEL 細胞でのその産生ウイルス量は HCMVwt の約 20 分の 1 と低かった．

Ⅷ. 73 K IE 蛋白の性状

HCMVpi 感染細胞に誘導される 73 K IE 蛋白の性状を調べるため，CH 増幅 IE 蛋白をさらに 18 時間非標識メチオニンで chase し，PAGE 法により分析した．図 8 に示したように，HCMVpi 感染細胞で合成された 73 K IE 蛋白は，18 時間 chase 後でも分子量の変化またはそれの消失は認められなかった（レーン；4，5）．

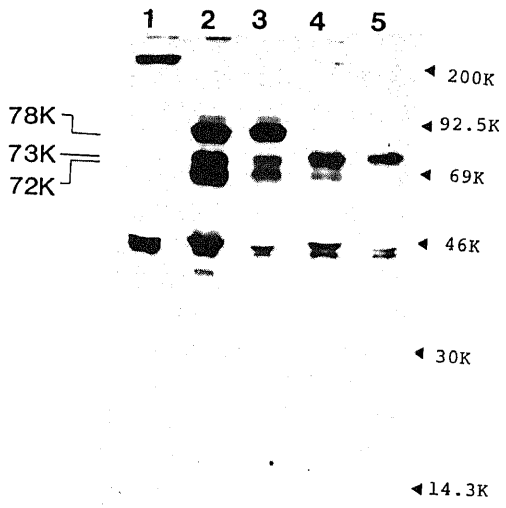

Fig. 8. Pulse-chase analysis of 73K IE protein synthesis. Subconfluent monolayers of HEL cells were infected with HCMVwt or HCMVpi (prepared as described in the legend to Fig. 4), or mock-infected in the presence of CH. At 18 h the CH-containing medium was removed. and cells were labelled for 2 h with [^{35}S] methionine in methionine-free maintenance medium containing act D. At the end of the labelling period, one culture was immediately processed for subsequent IE protein analysis by immunoprecipitation and SDS-PAGE. The other culture was rinsed three times with growth medium, and incubated for an additional 18 h in act D-containing medium. The cultures were then similarly processed for IE protein analysis. (1), mock-infected cultures labelled for 2 h; (2), HCMVwt-infected cultures labelled for 2 h; (3), HCMVwt-infected cultures chased for 18 h; (4), HCMVpi-infected cultures labelled for 2 h; (5), HCMVpi-infected cultures chased for 18 h. The mol. wt. of IE-specific proteins are presented, and the arrhowheads indicate the mol. wt. of standards.

Ⅸ. HCMVwt-DNA と HCMVpi-DNA の比較

上述のごとく，HCMVpi と HCMVwt と間で生物学的差が著明にみられたので，ウイルスゲノムとして HCMVpi-DNA が HCMVwt-DNA と構造上違いを持つかどうかを，制限酵素切断分析により次に比較した．HCMVpi-DNA と HCMVwt-DNA の制限酵素 *Eco* RI, *Bam* HI または *Hind* III による切断断片の電気泳動パターンには両ウイルス DNA 間での差異は認められなかった（図 9；レーン a 1, a 2, b 1, b 2, c 1, および c 2）．しかしながら，制限酵素 *Xba* I 切断 HCMVpi-DNA 断片には，HCMVwt-DNA と比較し少なくとも 3 つの電気泳動移動度の異なるバンドが検出された（レーン；d 1, d 2）．

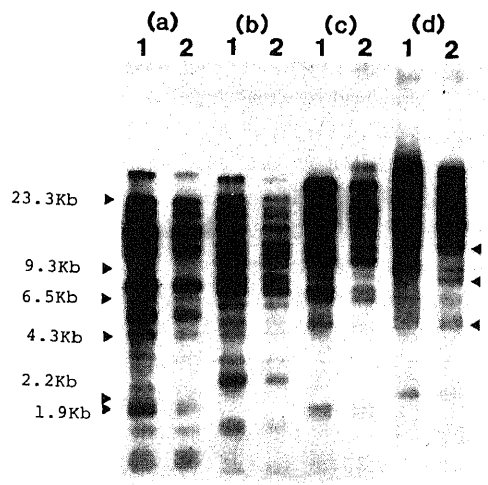

Fig. 9. Restriction enzyme analysis of DNA derived from HCMVwt (lanes 1) and HCMVpi (lanes 2) virions. DNAs were prepared and digested with *Eco* RI (a), *Bam* HI (b), *Hind* III (c) or *Xba* I (d) as described Materials and Methods. Digested DNA fragments were electrophoresed on a 0.6% agarose gel, and then transferred to nitrocellulose filters. The DNA fragments on the filters were blot-hybridized with ^{32}P-labelled HCMVwt DNA. The blots were autoradiographed by exposure to Kodak X-Omat AR film at −70°C for 24 h. Arrowheads at the right hand side indicate DNA fragments present in HCMVpi but absent in HCMVwt. Molecular sizes Kb for λDNA fragments digested with *Hind* III are indicated at the left hand side.

考 察

HCMVのヒト感染は，妊婦において時として胎児の中枢神経系へのウイルス侵襲を来たし，小頭症，無脳児および脳石灰化像などを呈する[6]ことが知られている．さらに，不顕性感染児の一部にも，成長に伴い神経学的後遺症（知能指数低下，情緒障害など）が現われるとされ[7]，HCMVは中枢神経系細胞に長期間潜伏持続感染する可能性が示唆されている[8]．しかしながら，中枢神経系におけるHCMV潜伏持続感染細胞や，その持続感染成立の機序はこれまで解明されていない．Wroblesk a ら[27]は，*in vitro* でのHCMVとヒト中枢神経系細胞との相互作用を検討し，ヒト脳初代培養細胞でのHCMVの増殖を確認し，そこでのウイルス産生量は，HEL細胞に比べおよそ100分の1であると報告した．しかし，この実験系では，起源の異なる各種神経系細胞間でのHCMV感受性の差異にはふれてない．そこで，著者は，3種の由来を異にするヒト中枢神経系由来株化細胞を用い，HCMVとの相互作用により詳細に検討した．用いた3種細胞株のうち，KGC（oligodendroglioma）細胞では有意なHCMV増殖は認められなかったが，118MGC（glioblastoma）細胞およびIMR-32（neuroblastoma）細胞では，HCMVの高m.o.i.（10 p.f.u./cell）感染によりウイルス増殖を確認した．これら2種細胞株でのウイルス感染性はHEL細胞のおよそ100分の1であり，前述のWroblesk a ら[27]の報告とほぼ一致した結果が得られた．この結果は，ヒト中枢神経系細胞のうち，ニューロン系またはグリア系細胞は，HCMVの高m.o.i感染により，ウイルス増殖を許容することを意味し，従来，マウスサイトメガロウイルス感染マウスで認められた病理学的観察結果[28)~30)]と一致した．一方，上記3種細胞株へのHCMV低m.o.i.（1 p.f.u./cell）感染では，118MGC細胞でのみウイルス増殖が認められた（未発表データ）．これらの結果より，妊婦における胎児のHCMV濃厚感染は，胎児の全脳組織へのウイルス侵襲が誘発され，無脳児，小頭脳などの重篤症状を引きおこすものと考えられる．一方，少量のウイルス感染は，グリア系組織のみでのウイルス増殖を許容し，脳炎などの軽度の症状を呈する可能性を示唆している．さらに，HCMV感染118MGC細胞では，長期継代維持可能なHCMV持続感染細胞が樹立化された．これまで生体内でのHCMV脳内持続感染細胞種は不明であったが，本研究で得た結果は，グリア系細胞では長期間HCMVが持続感染することを意味し，さらに，知能障害，情緒不安などの臨床症状を引きおこす可能性に連なる事実と思われる．

以前より種々のウイルスの *in vitro* での持続感染系の樹立およびその維持に関する報告は多いが，その成立機序として，1）温度感受性変異株の産生[31)32)]，2）欠損干渉ウイルスの出現[33)34)]，3）インターフェロン様活性物質の誘導[35)36)]など種々の因子が単独もしくは複数で関与していることが知られている．しかしながら，今回樹立化されたHCMV持続感染118MGC/Towne細胞では，上述のいかなる因子も証明できず，以前古川により報告されたHCMV持続感染系[37)38)]の成立機序と同様の感染性ウイルスの再感染と非感染細胞の増殖の平衡保持によるものと考えられた．

そこで，ウイルスの再感染と非感染細胞の平衡化による持続感染系成立機序の分子生物学的解明を目指した研究が開始された．これに関して，古川は[38]，持続感染ウイルス由来HCMVと親株HCMV由来DNAの構造の違いを報告している．118MGC/Towne細胞の場合は，産生される持続感染ウイルス（HCMVpi）が親株HCMV（HCMVwt）と比べHELおよび118MGC細胞での増殖が著しく低い変異株であることが示された．さらに，この増殖能低下の分子レベルでの解析により，著者の得たHCMVpiは，HCMVwt感染細胞に誘導されない分子量73 K IE蛋白を先に合成し，HCMVpiによる主要IE蛋白（72と78 K）および後の主要E蛋白の合成はHCMVwtより2時間遅れて出現した．このように，HCMVpiの増殖能の低下は，新たに誘導された73 K IE蛋白に起因すると思われた．従来，HCMV IE遺伝子の発現は，後期のHCMVゲノム発現の引き金として働き[39)40)]，さらに，主要72 K IE蛋白が全HCMV IE遺伝子の発現を自己制限している[41]と報告されている．ところで，著者の見出した73 K IE蛋白は，従来の主要72 K IE蛋白の前駆体でなく，HCMVpiにより新たに誘導された安定な蛋白であることが示されている．これらの諸事実を関連づけると，この73 K IE蛋白は，何らかの原因で主要72 K IE蛋白の微少変化により生じ，その結果本来の機能を保持せず，正常な72 K IE蛋白合成およびその機能の発現を競合的に阻害し，増殖を遅延せしめている可能性が強く示唆された．また，HCMVpi由来DNAは，HCMVwt由来DNAと構造に違いが認められたものの，その違いと73 K IE蛋白の合成との関連性に関しては，DNAのより詳細な解析により明確にされるであろう．

また，118MGC/Towne細胞より産生される変異ウイルスの出現は，持続感染樹立後後期（約300～400日以後）細胞でのみ認められ，持続感染樹立後早期（1ケ月前後）細胞からは検出できないことから，変異ウイルス出現には，長期持続感染の過程が必要で，

HCMVwt の全てまたは，一部のウイルスの変異により出現したと思われる．その変異ウイルスの出現が，本来 HCMVwt 中に一部存在していた変異ウイルスの選択的優位な増殖の結果生じたのかどうかは現在不明である．いずれにせよ，樹立化された 118MGC/Towne 細胞の安定な維持には必須の因子であると考えられる．これらを総合して，HCMV の *in vivo* での中枢神経系における持続感染は，細胞病原性の低下したウイルスのグリア細胞での増殖による細胞の一部損傷と治癒の平衡を保ちながら成立し，その結果として，生体における軽度の知能低下，情緒不安などを引きおこすと考えればそれ程大きな矛盾はない．

このように，今回樹立化した HCMV 持続感染 118MGC/Towne 細胞は，ヒト中枢神経系での HCMV 持続感染成立機序解明のための基礎的および臨床的研究をおこなううえで現在最も有効なモデル系と思われる．

結　　論

ヒト中枢神経系由来細胞（neuroblastoma, IMR-32；glioblastoma, 118MGC；oligodendroglioma, KGC）における HCMV の増殖性の検討ならびにウイルス持続感染細胞の樹立化とその維持の機序の解明をこころみ以下の成績を得た．

1．IMR-32 および 118MGC 細胞では，感染性ウイルスの有意な増殖が認められたが，KGC 細胞でのウイルス増殖はみられなかった．IMR-32 および 118MGC 細胞での HCMV 最大産生量は，HEL 細胞に比べおよそ 100 分の 1 と低かった．

2．HCMV 感染 118MGC 細胞の継代培養により，HCMV 持続感染細胞（118MGC/Towne）が樹立化され，その細胞からは感染後 360 日（50 継代）以上に渡り，持続的に感染性ウイルス（HCMVpi）が産生された．

3．118MGC/Towne 細胞からは，温度感受性変異株，欠損干渉ウイルス，およびインターフェロン様活性物質の産生は認められなかった．従って，この持続感染細胞成立・維持の機序は，産生ウイルス（HCMVpi）の再感染と非感染細胞の増殖との平衡に基づくことが示唆された．

4．HCMVpi は，その増殖性，ウイルス特異的 IE 蛋白合成能および DNA 構造において親 HCMV（HCMVwt）と明らかに異なる変異ウイルスであった．この変異ウイルスの出現は，118MGC/Towne 細胞の成立・維持に重要な役割を果している可能性が示唆された．

5．HCMVpi の増殖性，IE 蛋白合成能と DNA 構造における各変異は，持続感染成立初期（約 1 ケ月前後）においては見られず，後期（約 300 日以降）に初めて出現した．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲を賜わりました波田野基一教授ならびに，終始直接御指導をいただきました田中淳之助教授に対し深甚の謝意を表わします．さらに，御協力を賜わりましたがん研究所ウイルス部の諸先生方に感謝します．

本研究の一部は，第 32 回（昭和 59 年），第 34 回（昭和 61 年）日本ウイルス学会総会で発表した．

文　　献

1）**Smith, M. G.**: Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus disease. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **92**, 424-430 (1956).

2）**Rowe, W. P., Hartley, J. W., Waterman, S., Turner, H. C. & Huebner, R. J.**: Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **92**, 418-424 (1956).

3）**坂本　博**：小児における Cytomegalovirus 感染に関する研究．第 2 編血清疫学調査成績，日児誌，**78**, 678-688 (1974).

4）**Ho, M.**: Human cytomegalovirus infections in immunosuppressed patients. *In* Cytomegalovirus: Biology and Infection, p.171-203, Prenum Press, Now York & London (1982).

5）**Hanshaw, J. B.**: Cytomegalovirus. *In* W. B. Saunders (eds.) Infectious diseases of the fetus and newborn infant, p.107-155, Alan R. Liss, New York (1976).

6）**Reynolds, D. W., Stagno, S., Stubbs, K. G., Dahle, A. J., Livingston, M. M., Saxon, S. S. & Alford, C. A.**: Congenital cytomegalovirus infection: relation to auditory and mental deficiency. N. Engl. J. Med., **290**, 291-296 (1974).

7）**Hanshaw, J. B, Scheiner, A. P., Moxiley, A. W., Gaev, L., Abel, V. & Scheiner, B.**: School failure and deafness after "silent" congenital cytomegalovirus infection. N. Engl. J. Med., **295**, 468-470 (1976).

8）**Ho, M.**: Congenital and perinatal human cytomegalovirus infection. *In* Cytomegalovirus: Biology and Infection, p.139-141, Plenum Press, New York & London, (1982).

9) **Tumilowicz, J. J., Nicholes, W. W., Cholon, J. J. & Greene, A. E.**: Definition of continuous human cell line derived from neuroblastoma. Cancer Res., **30**, 2110-2118 (1970).

10) **Ponten, J. & Macintyre, E. H.**: Long term culture of normal and neoplastic human glia. Acta Pathol. Microbiol. Scand., **74**, 465-486 (1986).

11) **Miyake, E.**: Establishment of human oligodendroglial cell line. Acta Neuropathol., **46**, 51-55 (1979).

12) **Tanaka, J., Ogura, T., Kamiya, S., Sato, H., Yoshie, T., Ogura, H. & Hatano, M.**: Enhanced replication of human cytomegalovirus in human fibroblasts treated with dexamethasone. J. Gen. Virol., **65**, 1759-1767 (1984).

13) **Tanaka, J., Ogura, T., Kamiya, S., Yoshie, T., Yabuki, Y. & Hatano, M.**: Dexamethasone enhances human cytomegalovirus replication in human epitherial cell cultures. Virology, **136**, 448-451 (1984).

14) **Tanaka, J., Kamiya, S., Ogura, T., Sato, H., Ogura, H. & Hatano, M.**: Effect of dimethyl sulfoxide on interaction of human cytomegalovirus with host cell: conversion of a nonproductive state of cell to a productive state for virus replication. Virology, **146**, 165-176 (1985).

15) **Michelson-Fiske, S., Horodniceanu, F. & Guillon, J. C**: "Immediate early" antigens in human cytomegalovirus infected cells. Nature, **270**, 615-617 (1977).

16) **Smith, J. D. & de Harven, E.**: Herpes simplex virus and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. I. sequence of viral replication. J. Virol., **12**, 919-930 (1973).

17) **Tanaka, J., Yabuki, Y. & Hatano, M.**: Evidence for early membrane antigens in cytomegalovirus-infected cells, J. Gen. Virol., **53**, 157-161 (1981).

18) **Blanton, R. A. & Tevethia, M. J.**: Immunoprecipitation of virus-specific immediate-early polypeptides from cells lytically infected with human cytomegalovirus strain AD169. Virology, **112**, 262-273 (1981).

19) **Michelson-Fiske, S., Horodiceanu, F., kress, M. & Tardy-Paint, M.**: Human cytomegalovirus-induced immediate early antigens: Analysis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis after immunoprecipitation. J. Virol., **32**, 259-267 (1979).

20) **Jeang, K. -T. & Gibson, W.**: A cycloheximide-enhanced protein in cytomegalovirus-infected cells. Virology, **107**, 362-374 (1980).

21) **Gibson, W.**: Immediate-early proteins of human cytomegalovirus strains AD169, Davis, and Towne differ in electrophoretic mobility. Virology, **112**, 350-354 (1981).

22) **Talbot, P. & Almeida, J. D.**: Human cytomegalovirus: purification of enveloped virions and dense bodies. J. Gen. Virol., **36**, 345-349 (1977).

23) **Murray, K. & Murray, N. E.**: Phage lambda receptor chromosome for DNA fragments made with restriction endonuclease III of *Haemophilus influenzae* and restriction endonuclease I of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., **115**, 249-255 (1975).

24) **Southern, E. M.**: Detection of specific sequences among DNA fragments by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., **98**, 503-517 (1975).

25) **Rigy, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C. & Berg, P.**: Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol., **113**, 237-251 (1977).

26) **Ramirez, M. L., Virmani, M., Garon, C. & Rosenthal, L. J.**: Defective virion of human cytomegalovirus. Virology, **96**, 311-314 (1979).

27) **Wroblewska, W., Wellish, M. C., Wolinsky, J. S. & Gilden, D.**: Comparison of human cytomegalovirus growth in MRC-5 human fibroblasts, brain, and choroid plexus cells. J. Med. Virol., 8, 245-256 (1981).

28) **Davis, G. L. & Strauss, M.**: Viral disease of the labyrinth II. an experimental model using mouse cytomegalovirus. Ann. Otol., 82, 584-594 (1973).

29) **Margolis, G. & Kilham, L.**: Neural parasitism and cell fusion in mouse cytomegalovirus encephalitis. Exp. Mol. Pathol., **25**, 20-30 (1976).

30) **Davis, G. L. & Hawrisiak, M. M.**: Experimental cytomegalovirus infection and the developing mouse inner ear *in vivo* and *in vitro* studies. Lab. Invest. **37**, 20-29 (1977).

31) **Preble, O. T. Youngner, J. S.**: Temperature-sensitive viruses and etiology of chronic and inapparent infection. J. Infect. Dis., **131**, 467-473 (1975).

32) **Dal Canto, M. C. & Rabinowitz, S. G.**: Murine central nervous system infection by a viral temperature-sensitive mutant. Am. J. Pathol., **102**, 412-428 (1981).

33) **Mocarski, E. S. & Stinki, M.F.**: Persistence of the cytomegalovirus genome in human cells. J. Virol., **31**, 765-775 (1979).

34) **Dauenhauer, S. A., Robinson, R. A. & O' callaghan, D. J.**: Chronic production of defective-interfering particles by hamster embryo cultures of herpesvirus persistently infected and oncogenically transformed cells. J. Gen. Virol., **60**, 1-14 (1982).

35) **Sekellick, M. J. & Marcus, P. I.**: Persistent infection. I. Interferon-inducing defective-interfering particles as mediators of cell sparing: possible role in persistent infection by vesicular stomatitis virus. Virology, **85**, 175-186 (1978).

36) **Sakellick, M. j. & Marcus, P. I.**: Persistent infection. II. Interferon-inducing temperature-sensitive mutants as mediators of cells sparing: possible role in persistent infection by vesicular stomatitis virus. Virology, **95**, 36-47 (1979).

37) **Furukawa, T.**: Persistent infection with human cytomegalovirus in a lymphoblastoid cell line. Virology, **94**, 214-218 (1979).

38) **Furukawa, T.**: A variant of human cytomegalovirus derived from a persistently infected cultures. Virology, **137**, 191-194 (1984).

39) **Wathen, M. W. & Stinski, M. F.**: Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early, and late times after infection. J. Virol., **41**, 462-477 (1982).

40) **Wathen, M. W., Thomsen, D. R. & Stinski, M. F.**: Temporal regulation of human cytomegalovirus transcription at immediate early and early times after infection. J. Virol., **38**, 446-459 (1981).

41) **Stenberg, R. M. & Stinski, M. F.**: Anto-regulation of the human cytomegalovirus major immediate early gene. J. Virol., **56**, 676-682 (1985).

Human Cytomegalovirus Persistent Infection in a Human Central Nervous System Cell Line: Machanisms of Establishment and Maintenance of the Persistent Infection

Tsutomu Ogura, Department of Virology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920－J. Juzen Med. Soc., **96**, 58－70 (1987)

Key words: HCMV, CNS cell lines, persistent infection, variant virus

Abstract

The susceptibility of human central nervous system cell lines to human cytomegalovirus (HCMV) and the fate of infected cultures were studied. Significant amounts of infectious progeny virus were produced in glioma (118MGC) and neuroblastoma (IMR-32), but not in oligodendroglioma (KGC) cells when the cultures were infected with wild-type virus (HCMVwt) at an m. o.i. of 10. Further passage of infected 118MGC cells resulted in the establishment of a long-term persistent infection. This infection, designated 118MGC/Towne, continuously produced infectious virus (HCMVpi) with titres ranging from 10^2 to 10^5 p.f.u./10^6 cells up 360 days post-infection (corresponding to 50 subcultures). Since no temperature-sensitive mutant, defective interfering particles or interferon-like activity were found in the 118MGC/Towne cultures, maintenance of the persistent infection seemed to be due to a balance between the release of infectious virus and the growth of uninfected cells. The HCMVpi produced in long-term persistently infected cultures was shown to be different from the HCMVwt used originally by the following characteristics: (1) HCMVpi replicated slowly and yielded lower amounts of progeny

virus than HCMVwt; (2) HCMVpi induced a 73000 mol.wt. immediate early protein that was not synthesized in HCMVwt-infected cells; (3) the DNA structure of HCMVpi was different from that of HCMVwt. These results suggest that HCMVpi is a slower growing variant of HCMVwt and probably plays an important role in the maintenance of the persistent infection.