非リンパ系細胞での phytohemagglutinin の水痘ウイルスの感染効率に及ぼす効果

清水 明

国立予防衛生研究所
ウイルスリケッチャ部

(受付, 昭和58年8月26日)

適当なレクチンの使用は, ウイルスや細胞の生物学的あるいは生理学的性質を変化させるので, ウイルス-細胞間の相互作用の解析に有用な probe として, 利用出来ることが知られている^{5,7)}. しかしながら, 水痘ウイルス (VZV) での報告はまだない. 著者は VZV の感染成立の際の特性を明らかにするために, 感染成立に影響を与える因子の検討をしてきたが⁹⁾, 今回, 細胞の concanavalin A (con A) 処理は VZV 感染を阻害するが, phytohemagglutinin (PHA) 処理は逆に増強する効果のあることを認めたので報告する.

細胞はヒト胎児肺由来の HAIN-55 株⁸⁾ (一部の実験にはヒト胎児肺由来の他の細胞も使用した). VZV は K9 株¹¹⁾ を用いた. Cell-free VZV の作成並びに感染価の測定は前報に記載した方法⁹⁾ に従った. 対照ウイルスとして単純疱疹ウイルス 2 型 (HSV-2: UW 268 株¹⁰⁾) を用いた. HSV-2 の感染価は VZV のそれと同様にして測定したが, 中性紅による染色は 3 日目に, そして 4 日目にプラークを数えた.

35 mm plastic dish 内に単層を形成した細胞を con A (Sigma 社製) 液或いは PHA (Difco 社製の Bactophytohemagglutinin P 使用; 会社の説明書に従って溶解したもの) を原液とした.) 液で処理 (2 ml/dish) し, PBS で 1 回洗ってからウイルスを吸着させ, 次いで, 重層培地⁹⁾ を加え形成されたプラーク数を比較した成績を表 1 に示す. Con A ($\geq 94 \mu\text{g/ml}$) 処理は VZV の感染を阻害したが, PHA ($\geq 0.1\%$) 処理は逆に増強させ

た. また, 実験 3 より, PHA 処理はウイルスの吸着効率を高める効果のあることが認められた. 尚, ウイルスを直接 Con A 処理 ($188 \mu\text{g/ml}$; 36°C , 30 min) しても感染阻害効果は認められたが, PHA (0.1%) による処理は無効果であった. それ故, PHA 処理の効果は細胞を介して発現することが示唆された.

次に, 細胞に吸着したウイルスの感染成立に及ぼす PHA 処理の効果を調べた. ウイルスを細胞に吸着させ (4°C , 1 hr), 未吸着ウイルスは MEM (pH 6.4) で 2 回洗うことにより除いた. 次いで, 種々の培地を加え (2 ml/dish), 36°C 又は 4°C に維持した. 経時的に取り出し, 各培地を捨て重層培地に代えてから 36°C でプラーク形成能を調べることにより感染効率を比較した成績を表 2 に示す. VZV 吸着細胞を 36°C で PHA を含まない pH 6.5 を示す培地下で 4 時間以上維持すると感染効率は漸次低下した. 一方, pH 7.3 を示す培地 (PHA 不含) 下では, 最初に pH 依存性の感染性の不活化⁹⁾ によると思われる低下が認められたが, それ以降は pH 6.5 を示す培地下で認められたような時間の経過に伴う低下はなく安定していた. しかし, いずれの pH 域でも PHA を含む培地を使用すると低下の度合は小さくなっていた. それ故, PHA 処理は細胞に吸着した VZV の侵入効率をも僅かではあるが高める効果のあることが認められた. 尚, pH 6.5 を示す培地下で長時間維持した後に認められる VZV の感染効率の低下現象は温度依存性で 4°C では認められなかった.

VZV 感染に対し Con A が抗ウイルス作用を示すことを知ったが, 同様の効果は種々のウイルスですでに報告されている^{2,3,5,7)}. 一方, PHA のウイルス感染増強効果はリンパ系細胞ではいくつかの報告^{6,13)} があるが, 非リンパ系細胞では水疱性口内炎ウイルスの成績¹²⁾ があるのみでその作用機序は調べられていない. 今回, 著者は非リンパ系細胞で, PHA 処理が VZV の感染効率を

Effect of phytohemagglutinin on the plating efficiency of varicella-zoster virus in nonlymphoid cell.

Akira SHIMIZU

National Institute of Health

Department of Virology and Rickettsiology

Tokyo, Japan

〒141 品川区上大崎2-10-35

Table 1. Effect of pre-treatment of cells with lectins on the plaque formation with varicella-zoster virus

Exp. Pre-treatment of cells			Virus adsorption		PFU ^{***} (s.d.)	%****	
no.	with*		temperature	time			
1	(at 36°C for 30 min)						
	PBS			36 °C	60 min	50 (4.2)	100
	0.2%	PHA	in PBS	"	"	75 (4.4)	150
	0.1%	"	"	"	"	71 (4.9)	142
	0.05%	"	"	"	"	58 (9.2)	116
	0.025%	"	"	"	"	49 (4.3)	98
	188µg/ml con A in PBS			"	"	0	0
	94µg/ml	"	"	"	"	0	0
2	(at 36°C for 60 min)						
	Medium			36 °C	60 min	39 (4.9)	100
	0.1%	PHA	in medium	"	"	77 (6.9)	197
	0.01%	"	"	"	"	38 (2.4)	97
	188µg/ml con A in medium			"	"	0	0
	18.8µg/ml	"	"	"	"	33 (3.8)	85
3	(at 36°C for 60 min)						
	Medium			36 °C	15 min**	23 (3.7)	58
				"	30	38 (5.3)	95
				"	60	40 (4.2)	100
				"	120	41 (1.8)	103
	0.1%	PHA	in medium	"	15	56 (5.8)	140
				"	30	84 (4.9)	210
				"	60	86 (3.3)	215
			"	120	90 (4.3)	225	

* Before virus adsorption, cell monolayers were treated with the lectin solutions indicated. PBS (Phosphate buffered saline) and medium (consisting of MEM with 2% calf serum and 0.02% NaHCO₃; pH 6.8) were used as a base solution.

** In this experiment, the cell monolayers were washed with MEM (pH 6.4) twice after virus adsorption.

*** PFU (Plaque forming units, average of 4-5 dishes) and standard deviation (s.d.).

**** In each experiment, the number of plaques formed on the cells that were treated with the control solution without lectin before one hour's virus adsorption was taken as 100%.

高める効果のあること、又この効果はウイルスの吸着や侵入の効率を高めることにより発現することを明らかにした。この VZV 感染に対する PHA 処理の効果はすでに報告されている VZV と同じヘルペスウイルス群に属する単純疱疹ウイルスやヒトサイトメガロウイルスの成績⁴⁾とは異なる。ウイルス感染成立に対する細胞の PHA 処理の効果がウイルスにより異なる原因として、感染成立に必要な細胞膜上の各ウイルスに対する receptor の修飾のされ方が異なることが考えられる。レクチン処理により細胞膜上のレクチンに対する receptor の再配置が誘導されるだけでなく、膜の流動性が高まることにより、他の ligand に対する receptor も影響を

受けることが知られている¹⁾。VZV の感染効率が高められるのは、PHA 処理により、VZV が細胞膜上の VZV に対する receptor との結合がより容易にしかもより安定した結合をとりやすいため、ウイルスの細胞内への侵入の度合が高められる結果である可能性が強い。今回の成績はレクチンが VZV の感染成立機構の解明に有用であることを認めただけでなく、レクチンのウイルス感染に対する効果が同じウイルス群に属するウイルスの分類のための生物学的指標になるとの仮説^{3,4)}をも支持する。

通常の感染実験での吸着時間 (1~2 時間) の範囲では、弱酸性域での VZV の吸着は感染効率を高める⁹⁾にも拘らず、その範囲を超えての細胞の長時間維持は逆に

Table 2 Effect of the post-treatment of cells after virus adsorption on the establishment of virus infection

Virus	Post-treatment of cells with medium*	Incubation		PFU (s. d.)	% reduction**
		temperature	time		
VZV	No more treatment	—	—	131(10.4)	—
	pH 6.5 medium with 0.1% PHA	36 °C	2 hrs	137(3.1)	0
			4	123(6.8)	6
			6	96(11.4)	27
			8	75(6.4)	43
	pH 6.5 medium only	36 °C	2 hrs	121(6.3)	8
			4	78(3.9)	40
			6	53(1.3)	60
			8	25(5.2)	81
	pH 7.3 medium with 0.1% PHA	36 °C	2 hrs	74(9.4)	44
			4	75(9.0)	43
			6	72(3.3)	45
			8	84(7.0)	36
	pH 7.3 medium only	36 °C	2 hrs	36(5.3)	73
			4	46(7.8)	65
			6	38(5.3)	78
			8	45(1.9)	66
VZV	No more treatment	—	—	72(2.8)	—
	pH 6.5 medium only	4 °C	2 hrs	78(4.7)	0
			4	70(9.2)	3
			6	81(6.6)	0
			8	83(6.3)	0
HSV-2	No more treatment	—	—	96(3.1)	—
	pH 6.5 medium only	36 °C	2 hrs	104(3.1)	0
			4	106(5.8)	0
			6	109(3.1)	0
			8	106(4.8)	0

* After virus adsorption at 4 °C for 1 hr, the cell monolayers were washed twice and incubated in the various media indicated for appropriate times. Then the plaque forming ability was measured at 36 °C after replacing the media with the overlay medium. The base medium for treatment consisted of MEM with 2% calf serum and 20mM hepes-NaOH.

** For each virus, the number of plaques formed on the cells receiving no special treatment was used as the control.

感染効率を低下させた。この低下現象は同じ条件下の HSV-2 では認められないことから細胞死によるとは考えにくく、従って、感染成立過程における VZV の特性と考えられる。その機構の詳細はまだ不明であるが、この現象がアルカリ pH 域で認められないで弱酸性域でのみ認められること、換言すれば、感染成立が比較的安定で早く完了する場合と不安定で遅い場合が異なる環境下で認められることは、環境因子に感受性の異なる感染粒

子の感染成立様式は同じではない可能性を強く示唆する。

終りに、ウイルス (UW268株) の御分与と御校閲を賜った吉野亀三郎博士 (山梨県立衛生公害研究所所長) に厚く感謝します。

文 献

- 1) Edelman, G. M., I. Yahara, and J. L. Wang: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70**, 1442 (1973)
- 2) Finkelstein, M. S., and M. McWilliams: Virology, **69**, 570 (1976)
- 3) Ishizaki, R., and D. P. Bolognesi: J. Virol., **17**, 132 (1976)
- 4) Ito, M., L. Girvin, and A. L. Barron: Arch. Virology, **57**, 97 (1978)
- 5) Lonberg-Holm, K: J. gen. Virol., **28**, 313 (1975)
- 6) Nahmias, A. J., S. Kibrick, and R. C. Rosen: J. Immunol., **93**, 69 (1964)
- 7) Okada, Y., and J. Kim: Virology, **50**, 507(1972)
- 8) Okumura, H., Y. Udagawa, K. Yamada, K. Tsukahashi, Y. Azuma, and S. Nozawa: Proc. Japan Academy, **55**, Ser. S, 135 (1979)
- 9) 清水明: ウイルス, **32**, 73 (1982)
- 10) Tada, A., N. Sekine, M. Toba, and K. Yoshino: Microbiol. Immunol., **21**, 219 (1977)
- 11) Takayama, M., and A. Oya: Biken J., **24**, 109 (1981)
- 12) Valle, M.: Acta Pathol. Microbiol. Scand., suppl. **219**, 1 (1971)
- 13) Willems, F. T. C., J. L. Melnick, and W. E. Rawls: J. Virol., **3**, 451 (1969)