単純ヘルペスウイルスの潜伏感染とその機構

Ⅱ 試験管内のウイルス—細胞相互作用

山田 雅夫, 新居 志郎

岡山大学医学部ウイルス学教室

(受付: 昭和60年1月30日)

1. はじめに

HSV の *in vitro* での持続感染系については, 生体内での潜伏感染の事実が明らかになる以前から数多くの報告がなされている。

初期の持続感染系のすべては細胞集団レベルでの持続感染であり, 感染細胞と非感染細胞との混合によって成立している¹⁾。代表的研究として, Chinese hamster 由来細胞株における系^{2,3,4,5,6)}とマウス L 細胞における系が挙げられる^{7,8)}。これらの系では, 細胞側およびウイルス側の両者が互いに徐々に変化しながら細胞集団としての持続感染が維持されている⁹⁾。

一般に HSV の *in vitro* 持続感染系は, 以下の要因が単独にあるいは重複して作用することにより成立している⁹⁾。①中和抗体の添加^{9,10,11,12)}, ②干渉現象およびインターフェロンの関与^{13,14,15)}, ③至適培養温度以上^{16,17)}あるいは以下の温度条件¹⁸⁾, ④HSV に対して増殖許容性の良好でない細胞の利用^{1,7)}, などである。

近年報告されている *in vitro* 持続感染系についても^{19,20,21,22)}, 基本的には上述の諸要因が関与していると考えられるが, 以下の諸点に新しい展開が認められる。

まず生体内の潜伏感染の機構を解明するために, 神経組織由来の培養細胞における持続感染系や, その他 *in vitro* での HSV- 神経細胞相互関係に関する報告が数多くなされるようになった。また HSV に対する免疫反応の諸問題を含めて, リンパ系ならびに造血系由来細胞株における持続感染系が多数樹立された。

さらに持続感染の機構の上においても, 従来から数多く報告のある dynamic state の様式, すなわち上清中

に感染性ウイルスを持続的に産生する系のほかに, 例えば一部細胞にウイルス抗原あるいはゲノムが持続的に存在するもの, すなわち static state の様式に属すると見做されるものなど, あるいはさらに進んで生体内の潜伏感染と再活性化現象の試験管内での再現の試みが報告されるに至った。この試験管内潜伏感染モデルを利用して, 分子生物学的機構の解明を目指した研究も開始された。以下具体的にこれらの研究の進展について述べることにする。

2. 神経組織由来培養細胞と HSV の細胞—ウイルス相互作用

生体内での HSV の潜伏の場合が神経節であることが明らかになってから^{23,24)}, 神経組織由来培養細胞と HSV の細胞—ウイルス相互作用についての研究が, 積極的に推進されることになった。

まず神経組織由来のトランスフォーム細胞あるいは同組織腫瘍由来の培養細胞系を用いて行なった一連の研究がある。一般にこれら神経組織由来細胞系での HSV の増殖はきわめて制限されており^{25,26,27,28)}, とくにニューロン系への分化を示すものではその傾向が著しい²⁶⁾。例えばマウス神経芽細胞由来 C1300 細胞では, HSV-1 の高 MOI 感染では殺細胞性感染となり, 低 MOI 感染では持続感染系が樹立された²⁷⁾。この系では約 1% の細胞がウイルス抗原陽性で, 上清中に低レベルの感染性ウイルスの放出が持続した。なおこの持続感染系に抗 HSV 抗体を加えることにより, 治療現象が認められた。

また, ラット神経腫瘍由来 B103 細胞では, HSV-1 の低 MOI 感染と高温培養 (39°C) の条件では, ウイルスの産生が2週間程度で停止し細胞はその後も生存するが, これら細胞中にウイルス抗原が長期間持続的に発現していることが認められた²⁹⁾。なおラット神経腫瘍由来 C143 株でも, 同様の持続感染状態の報告がある³⁰⁾。同細胞に HSV-1 を感染させると大多数の細胞が破壊されたが, 一部生存した細胞が増殖を開始し, 一定期間感染

Mechanisms involved in latent herpes simplex virus infection. II. In vitro studies on virus-cell interactions. by Masao YAMADA and Shiro NII Department of Virology, Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan

〒700 岡山市鹿田町2-5-1

性粒子を上清中に放出したのち、以後長期間にわたってウイルス抗原のみを発現し、HSV の重感染に対して抵抗を示した。

以上の神経細胞由来培養細胞系を使用した研究のほかに、最近では正常の神経細胞などの神経組織由来細胞の *in vitro* での培養技術が向上し、これらの培養細胞を使用してより生体に近い状態で、HSV-神経細胞の相互関係についての研究が推進されるようになった^{31,32,33,34,35,36,37}。これらの主な成果としては次のようなものがある。

HSV が神経突起の先端から取り込まれ、軸索輸送によってスクレオカプシドの状態では神経細胞体へ到達し増殖すること、およびこの輸送がサイトカラシン B で抑制されることが示された^{31,32,35}。また、単クローン性抗体を含めて種々の分化のマーカーを利用することにより、*in vitro* で培養した神経組織の各種構成細胞間の HSV に対する感受性の差異が明らかになった。すなわちニューロンは、星状膠細胞やシュワン細胞に比べて HSV の増殖が制限されていることが示された³⁴。さらに Wigdahl らは、細胞分裂阻害剤を周期的に作用させることにより、ラット知覚神経節のニューロンのみを選択的に培養する技術を開発し、この系で後述の試験管内潜伏感染モデルを確立した^{36,37}。

3. リンパ組織ならびに造血組織由来培養細胞と HSV との相互作用

生体内でリンパ系ならびに造血系組織に HSV が潜伏しているという確かな報告はない。しかし EB ウイルスやマレック病ウイルスなどの γ -ヘルペスウイルスのリンパ系細胞に対する親和性に類似性を求めた研究や³⁸、リンパ系組織内の HSV の標的細胞を明らかにすることを意図した研究など、多数の報告が蓄積することになった。

1960年代末から EBV 関連 B リンパ芽球様培養細胞株が次々と樹立され、この種の細胞株と HSV との相互作用が検討され始めた。Robey らは^{39,40,41}、パーキットリンパ腫由来の P₃HR-1 細胞と Raji 細胞での HSV 持続感染系を報告した⁴¹。この系の特徴は、外部からとくに抗体などの感染の拡大を抑制する因子を加えることなく安定した持続感染系が成立し、大部分の細胞は HSV 抗原陽性であったが、数%以下の細胞のみが感染性ウイルスを産生し、しかも細胞系全体としては、対照の細胞と同様の増殖を示したことなどである。Leinbach と Summers は、EBV ゲノムの存在によってパーキットリンパ腫由来培養細胞株の HSV に対する感受性は亢進したが、持続感染の成立自体は EBV ゲノムの存在の有

無に無関係であることを明らかにした⁴²。また西山と Rapp は、Raji 細胞での HSV 持続感染系がヒドロコルチゾンの添加により修飾を受けることを示した⁴³。同様の B 細胞系の F365 細胞での長期持続感染系では、ブラックサイズの小型の変異株の出現がみられた。なおこの変異株の産生するポリペプチドと原株のものとの間には差異を認めなかった⁴⁴。

他方、T リンパ球や造血組織由来培養細胞株も次々と樹立され、これらの細胞株を使用した研究が行われた。Rinaldo らによると、ヒト T 細胞系 CEM、B 細胞系 NC37、骨髄球系 K562 の各株で HSV の持続感染が成立したが、null 細胞系の AZ227 ではウイルス増殖は程無く停止し持続感染の成立を認めなかった^{45,46}。また K562 細胞の一重株と HSV-2 の持続感染が Biswal らにより報告されている⁴⁷。

その後 T 細胞系 CEM 細胞を用い、二つの方向で研究が展開された。まず Cummings らは、とくに持続感染系の成立維持に関与する諸因子について解析を試みた⁴⁸。すなわち継代培養の頻度と、crisis と称しウイルスの増殖が亢進し細胞の生存率が低下する相との相互関連について検討し、さらに持続感染系中に維持されるウイルスの性状変化として、増殖力の増進、温度感受性の変化、ブラックサイズの減少などについて、原株からの変異を認めた。またこの系を高温培養、あるいは抗 HSV 抗体で処理することにより、dynamic state としての持続感染状態が停止した。その後この系が HSV の重感染に抵抗を示したことから、HSV ゲノムが細胞内に潜伏している可能性が示唆されたが、再活性化現象を認めなかった。

他方 Hammer らも同様に CEM 細胞を使用し、潜伏状態への導入と再活性化を制御できる興味ある持続感染系を発表した⁴⁹。この系では初期の83日間は培養上清中にウイルスを産生したが、その後自然にウイルスの産生が停止し、いわゆる static state となった。さらに培養を継続したところ、106日以降再び dynamic state に復帰した。先の static state の時期に PHA を培地に加えると、HSV の産生を再活性化することが可能であった。また Con A を加えることにより、前記106日以後も static state を継続維持することが可能であった。したがってこの持続感染系は、再活性化を伴う潜伏感染系の試験管内モデルの条件を満足しているように思われる。

さらに Youssoufian らは、上述の CEM 細胞の持続感染系を用い、同一部位を認識する制限酵素のうち認識部位のメチル化に感受性を示すものと非感受性のもののペアを使用して、ウイルス DNA の解析を行った⁵⁰。そ

の結果, Con A 処理によってウイルス非産生状態となった持続感染系中のウイルス DNA は高度にメチル化されていたが, 他方ウイルス産生状態, もしくは PHA 処理後再活性化状態にある細胞中のウイルス DNA はメチル化されていないことを観察し, HSV 潜伏感染の分子機構にウイルス DNA のメチル化が関与している可能性が示唆された。

さらに造血系細胞ならびに同系由来細胞株の分化の程度と, HSV に対する増殖許容性との関連について検討が進んでおり^{51,52)}, Braun らは単クローン性抗体を用いて細胞表面マーカーを検索し, 表面膜上に発現される I-a 抗原の存在が HSV に対する増殖許容性と密接に関連することを示した⁵²⁾。

4. 試験管内潜伏感染モデル

試験管内で生体内の潜伏感染に相応する試験管内潜伏感染モデルを樹立することは, この現象の分子生物学的機構の解明を促進するうえに必要なことと考えられる⁵³⁾。このようなモデルの満たすべき条件として, Levine らは以下のものを挙げて²⁹⁾。①感染細胞が生存し続けること, ②培養内に感染性ウイルス粒子を認めないこと, ③HSV の完全なゲノムが細胞内に持続していること, ④何らかの処理により感染性ウイルスの産生が誘導される, すなわち再活性化現象のみられることである。

先に述べたように, 従来報告のあった HSV 持続感染の多くは, 培養上清中に感染性ウイルスを産生しながら細胞集団として生存し続けるという dynamic state の型のものであったが, 最近になり主として二つの研究グループから上記の条件を満足していると思われる, いわゆる試験管内潜伏感染モデルが発表された。

その一つは既述の T 細胞株 CEM 細胞での持続感染系であり^{49,60)}, この系ではウイルス DNA のメチル化が HSV の潜伏感染の機構に関連することが示唆された⁵⁰⁾。

他は Rapp 一派によるもので, 彼等の多数の研究報告の中から成果の特徴点を要約すると次のようになる。①ヒト由来細胞, 主として胎児線維芽細胞に HSV-1⁵⁴⁾あるいは HSV-2^{55,56,57,58,59,60)}を感染後, 各種抗ウイルス剤 (Ara C^{55,56,57)}, または PAA⁵⁸⁾) で処理し, 高温条件下 (HSV-1 では 40.5°C⁵⁴⁾, HSV-2 では 39.5°C^{56,57,58,59,60)}) で培養することにより, 潜伏感染が成立する。あるいは UV 照射 HSV-2 を接種後, 高温で培養することによっても同様の系が得られる⁵⁹⁾。②高温培養下では, 抗ウイルス剤の非存在下でも上清中に感染性ウイルスが全く認められない状態が, 長期間安定して維持される。③再活性化, すなわち感染性ウイルスの産生の

誘導は, 37°C への培養温度の移行⁵⁶⁾, または HSV 温度感受性変異株⁶¹⁾あるいは HCMV⁵⁷⁾の重感染により得られる。この重感染による再活性化には, 初期機能の発現が必須である^{60,61,62)}。

最近になって, 以上の一連の実験系をさらに一步前進させた研究が2種, 同一グループによって発表された。その一つは, 抗ウイルス剤として Ara C の代りに BVDU((E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine)と IFN (α) を用いることにより, 従来の系に比べて潜伏状態にある細胞の比率を大巾に増加させ, 細胞-ウイルス間の相互作用の理解に一層有利な系を開発したというものである^{37,63)}。他は既述のように, ニューロンのみを単独で培養する技術を導入し, ラットのニューロンで同様のモデルを確立したことである³⁹⁾。潜在ゲノムの存在様式についての検討から, これらの系では HSV・DNA が組み込まれない状態で線状単位長で存在することが示されている⁶⁴⁾。以上の系では抗ウイルス剤の処理, 高温培養といった非生理的条件を潜伏感染の成立に用いており, 生体内の潜伏感染系と若干異なった機構が働いていると考えられるが, 現在までの報告のなかでは生体内の潜伏感染にもっとも近いものとして評価することができる。

5. おわりに

潜伏感染機構の解明に関連する全般的な問題については, 本総説第一編の最終項で触れたのでここでは割愛する。

試験管内における実験系は, 古典的な集団レベルの持続感染系を脱して, ニューロンを始めとする神経組織由来の培養細胞が主な対象となり, さらに潜伏感染の機構の上でもより生体に接近した系への開発が進展しつつある。

神経節を構成する, ニューロン, 外套細胞, その他個々の細胞学的ならびに生物学的性状のみならず, これら細胞間の相互作用に関する知見の拡大を推進すると同時に, 優れた実験系を使用して, 潜伏状態と再活性化現象の誘因となりまた随伴する分子生物学的, ウイルス学的ならびに生理学的諸変化について明確な情報を蓄積することが今後の研究の課題であろう。

文 献

- 1) 新居志郎 (1972): 新ウイルス学 (東昇, 石田名香雄編), 222-230, 朝倉書店, 東京。
- 2) Hampar, B. and Copeland, M. L. (1965): J. Bacteriol., **90**, 205-212.
- 3) Hampar, B. (1966): J. Bacteriol., **91**, 1959-1964.
- 4) Hampar, B. (1966): J. Bacteriol., **91**, 1965-

- 1970.
- 5) Hampar, B. and Keehn, M. A. (1967): *J. Immunol.*, **99**, 554-557.
- 6) Hampar, B. and Burroughs, M. A. K. (1969): *J. Natl. Cancer Inst.*, **43**, 621-634.
- 7) Nii, S. (1969): *Biken J.*, **12**, 45-67.
- 8) Nii, S. (1970): *Biken J.*, **13**, 339-352.
- 9) Wheeler, C. E. and Canby, C. M. (1959): *Arch. Dermatol.*, **79**, 86-95.
- 10) Fernandez, C. G. (1960): *Nature*, **185**, 268.
- 11) Hinze, H. C. and Walker, D. L. (1961): *J. Bacteriol.*, **82**, 498-504.
- 12) Szántó, J. (1963): *Acta Virol.*, **7**, 385-392.
- 13) Glasgow, L.A. and Habel, K. (1963): *Virology*, **19**, 328-339.
- 14) Waddell, G. H. and Sigel, M. M. (1966): *Arch. Ges. Virusforsch.*, **19**, 130-142.
- 15) Blackmore, R. V. and Morgan, H. R. (1967): *Acta Virol.*, **11**, 1-12.
- 16) Wheeler, C. E. and Canby, C. M. (1960): *J. Bacteriol.*, **79**, 657-660.
- 17) Kelleher, J. J., Varani, J. and Nelson, W.W. (1975): *Infect. Immun.*, **12**, 128-133.
- 18) Coleman, V. and Jawetz, E. (1961): *Virology*, **13**, 375-377.
- 19) Yura, Y. and Sato, M. (1983): *Arch. Virol.*, **75**, 299-306.
- 20) Yamada, M. (1981): *Herpesvirus, International Congress Series 571* (ed. Shiota, H., Cheng, Y. C. and Prusoff, W. H.), 34-37, Excerpta Medica, Amsterdam.
- 21) Yamada, M. (1983): *Biken J.*, **26**, 35-47.
- 22) Szántó, J., Lëššo, J. and Lackovič, V. (1976): *Acta Virol.*, **20**, 40-47.
- 23) Baringer, J. R. and Swoveland, P. (1973): *N. Engl. J. Med.*, **288**, 648-650.
- 24) Stevens, J. G. and Cook, M. L. (1971): *Science*, **173**, 843-845.
- 25) Lancz, G. J. and Zettlemoyer, T. L. (1976): *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **152**, 302-306.
- 26) Adler, R., Glorioso, J. C. and Levine, M. (1978): *J. Gen. Virol.*, **39**, 9-20.
- 27) Vahlne, A. and Lycke, E. (1977): *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **156**, 82-87.
- 28) Vahlne, A. and Lycke, E. (1978): *J. Gen. Virol.*, **39**, 321-332.
- 29) Levine, M., Goldin, A. L. and Glorioso, J. C. (1980): *J. Virol.*, **35**, 203-210.
- 30) Doller, E., Aucker, J. and Weissbach, A. (1979): *J. Virol.*, **29**, 43-50.
- 31) Ziegler, R. J. and Herman, R. E. (1980): *Infect. Immun.*, **28**, 620-623.
- 32) Price, R. W., Rubenstein, R. and Khan, A. (1982): *Arch. Virol.*, **71**, 127-140.
- 33) Kennedy, P. G. E., Al-Saadi, S. A. and Clements, G. B. (1983): *J. Gen. Virol.*, **64**, 1629-1635.
- 34) Kennedy, P. G. E., Clements, G. B. and Brown, S. M. (1983): *Brain*, **106**, 101-119.
- 35) Lycke, E., Kristensson, K., Svennerholm, B., Vahlne, A. and Ziegler, R. (1984): *J. Gen. Virol.*, **65**, 55-64.
- 36) Wigdahl, B. L., Ziegler, R. J., Sneve, M. and Rapp, F. (1983): *Virology*, **127**, 159-167.
- 37) Wigdahl, B. L., Smith, C. A., Traglia, H. M. and Rapp, F. (1984): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6217-6221.
- 38) Stevens, J. G. (1977): *Adv. Cancer Res.*, **26**, 227-256.
- 39) Henle, W., Henle, G. and Zur Hausen, H. (1969): *Cancer Res.*, **29**, 489-494.
- 40) Floyd, R., Glaser, R., Vonka, V. and Ben-yesh-Melnick, M. (1971): *Acta Virol.*, **15**, 133-142.
- 41) Robey, W. G., Graham, B. J., Harris, C. L., Madden, M. J., Pearson, G. R. and Woude, G. F. V. (1976): *J. Gen. Virol.*, **32**, 51-62.
- 42) Leinbach, S. S. and Summers, W. C. (1979): *J. Virol.*, **30**, 248-254.
- 43) Nishiyama, Y. and Rapp, F. (1979): *J. Virol.*, **31**, 841-844.
- 44) Roumillat, L. F., Feorino, P. M., Caplan, D. D. and Lukert, P. D. (1980): *Infect. Immun.*, **29**, 671-677.
- 45) Rinaldo, C. R. Jr., Richter, B. S., Black, P. H., Callery, R., Chess, L. and Hirsch, M. S. (1978): *J. Immunol.*, **120**, 130-136.
- 46) Rinaldo, C. R. Jr., Richter, B. S., Black, P. H. and Hirsch, M. S. (1979): *Infect. Immun.*, **25**, 521-525.
- 47) Biswal, N., Ko, U., Akman, S., Ross, D. D., Pollak, A. and Cimino, E. (1983): *Biochim. Biophys. Acta*, **740**, 271-281.
- 48) Cummings, P. J., Lakomy, R. J. and Rinaldo, C. R. Jr. (1981): *Infect. Immun.*, **34**, 817-827.
- 49) Hammer, S. M., Richter, B. S. and Hirsch, M. S. (1981): *J. Immunol.*, 144-148.
- 50) Youssoufian, H., Hammer, S. M., Hirsch, M. S. and Mulder, C. (1982): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2207-2210.
- 51) Katz, E., Mitrani-Rosenbaum, S., Margalith, E. and Ben-Bassat, H. (1981): *Intervirology*, **16**, 33-42.
- 52) Braun, R. W., Teute, H. K., Kirchner, H. and Munk, K. (1984): *J. Immunol.*, **132**, 914-919.
- 53) Stevens, J. G. (1980): *Oncogenic Herpesviruses Vol. II* (ed. Rapp, F.), 1-11, CRC Press, Boca Raton.
- 54) Wigdahl, B. L., Isom, H. C. and Rapp, F. (1981): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6522-6526.
- 55) O'Neill, F. J., Goldberg, R. J. and Rapp, F. (1972): *J. Gen. Virol.*, **14**, 189-197.
- 56) O'Neill, F. J. (1977): *J. Virol.*, **24**, 41-46.
- 57) Colberg-Poley, A. M., Isom, H. C. and Rapp,

- F.(1979): Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 5948-5951.
- 58) Colberg-Poley, A. M., Isom, H. C. and Rapp, F. (1979): Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **162**, 235-237.
- 59) Nishiyama, Y. and Rapp, F. (1981): J. Gen. Virol., **52**, 113-119.
- 60) Colberg-Poley, A. M., Isom, H. C. and Rapp, F.(1981): J. Virol., **37**, 1051-1059.
- 61) Wigdahl, B. L., Isom, H. C. and De Clercq, E. and Rapp, F. (1982): Virology, **116**, 468-479.
- 62) Hung, T., Mummaw, J. G., Wigdahl, B. L., Fang, Z. Y., Huaying, J. and Rapp, F. (1984): Intervirology, **21**, 5-16.
- 63) Wigdahl, B. L., Scheck, A. C., De Clercq, E. and Rapp, F.(1982): Science, **217**, 1145-1146.
- 64) Wigdahl, B. L., Scheck, A. C., Ziegler, R. J., De Clercq, E. and Rapp, F.(1984): J. Virol., **49**, 205-213.