

ヒトサイトメガロウイルス関連初期産物の mitogen 活性について

鳥取大学医学部ウイルス学教室 (主任: 栗村 敬教授)

鳥取大学医学部歯科口腔外科学教室 (主任: 浜田 曉教授)

領 家 和 男

The mitogenic activity in early products related to human cytomegalovirus

Kazuo RYOKE

Department of Virology and Department of Oral Surgery,
Tottori University School of Medicine, Yonago, Japan.

ABSTRACT

Human cytomegalovirus (HCMV) is a well known pathogen which causes congenital infection, posttransfusion syndrome, mononucleosis etc. Usually persistent infection occurs after primary infection with HCMV. HCMV induced blastoid proliferation of human lymphocytes both specifically and non-specifically. Non-specific stimulation of lymphocytes by the early products of HCMV might be one of the causes of HCMV mononucleosis. The nature of the mitogenic activity in the early products was analysed and the following results were obtained.

1. Both Towne strain and Inoue strain produced mitogenic substance(s) early after infection, so the induction of mitogenic substance(s) by HCMV was deduced to be universal among HCMV strains.
2. The mitogenic substance(s) stimulated both the E-rosetting and the EAC-rosetting subpopulations of human cord blood lymphocytes.
3. Addition of cycloheximide or tunicamycin revealed that the mitogenic substance was of protein nature and did not require sugar chain for the expression of the mitogenic activity.
4. By the use of Triton X-100, it was assumed that the mitogenic activity could be expressed only when the mitogen was integrated into the membrane structure.
5. The mitogenic activity was lost after 5 cycles of freezing and thawing. It was fairly unstable under the temperature above 40°C, but it was stable when incubated at 0-30°C for 1 hour and diminished after 12 hours incubation.

For the analysis of immunity evoked after HCMV infection and of the pathogenesis of HCMV mononucleosis, the data stated above offer a very important clue.

(Accepted on November 5, 1982)

ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) の初感染や再活性化を免疫学的にとらえた場合、液性免疫ではその

防壁は難しい²⁾²⁰⁾²¹⁾²²⁾。一方細胞性免疫に関しては、細胞性免疫能が不完全な乳幼児期に初感染をきたすこ

とが多く、その後の再活性化も、細胞性免疫能の低下を誘因として起こっている¹⁹⁾。すなわち HCMV 感染症やその再活性化は、細胞性免疫が重要なかわりをもっていると考えられている。

HCMV に対する細胞性免疫に関して、リンパ球の活性化を指標としたものでは、そのほとんどが antigen として作用しているものであるが、一部に mitogen の存在も明らかにされている³³⁾³⁹⁾。この HCMV 関連抗原の mitogen 活性に関して、具体的には Zaia が CF 抗原を用いたリンパ球活性化の実験で mitogen 活性の存在を思わせる報告を行い³⁹⁾、続いて、CF 抗原のみならず、early antigen (EA) 中にも mitogen 活性がみられたという竹原の論文がある³³⁾。この EA 中の mitogen は、感染後 3 時間には出現し、5 時間でピークに達しており、HCMV 感染初期における細胞性免疫の関与をこの mitogen との関連で論じることが興味深い。また EBV とともに HCMV は、単核症の病因ウイルス¹⁴⁾として知られており、伝染性単核症の際にみられる異型リンパ球の出現と、この

mitogen との間は何らかの関係があるのではないかと思われ、この mitogen 物質の性状について検討を行った。

実験材料と方法

1. ウイルスと細胞

HCMV は Towne 株および井上株 (何れも東海大より分与) を用い、ヒト胎児線維芽細胞 (HEF) に、細胞変性効果が最大にみられる感染後 6 日目の培養上清に dimethyl sulfoxide (DMSO)、牛胎児血清 (FCS) を各々 10% 加え、80°C に凍結保存したものをを用いた。細胞の継代には Eagle MEM (日水) に新生仔牛血清 (NCS) を 10% 添加したものをを用い、維持には NCS を 2% 添加したものをを用いた。ウイルスの感染価は TCID₅₀ 法を用いた。

2. HCMV 初期産物の抽出

HEF に HCMV を 1-2 TCID₅₀/cell で感染させ、一定時間の後、細胞を 1/100 M リン酸緩衝液 pH 7.2 (PBS) にて 2 回洗浄の後、ラバーポリスマンを用い

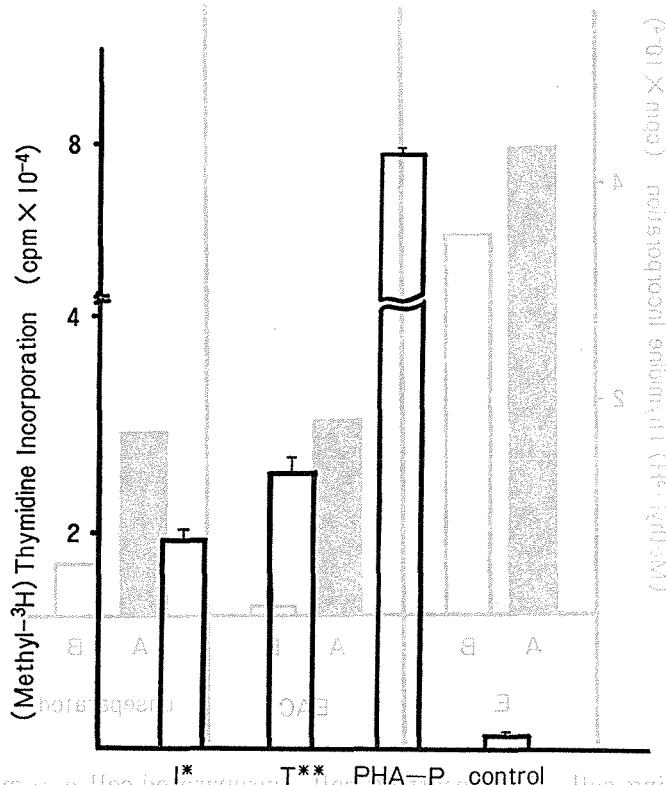


図 11 井上株 HCMV 初期産物の mitogen 活性
 臍帯血リンパ球 $2 \times 10^5 / 0.2 \text{ ml}$ に井上株 HCMV 初期産物 ($12 \mu\text{g/ml}$) 0.05 ml を添加し、3 日間培養し、最終の 4 時間に ³H-thymidine を加えラベルし、酸不溶性分画の放射活性を測定した。

* I : 井上株 HCMV 初期産物

** T : Towne 株 HCMV 初期産物

Ficoll-Conray (比重遠心法)にて単核球を分離した。更に T cell は E-rosette 法を用いて、B cell は EAC-rosette 法を用い³⁸⁾、どちらにも rosette を形成しなかつたものを unseparated cell とした。分離リンパ球は、非働化した 10% FCS 添加 RPMI 1640 (日水)に浮遊させ、平板マイクロプレート (Nunc) に 1 well あたり $2 \times 10^5/0.2$ ml 加えた。PHA-P 0.05 ml あるいは HCMV 初期産物 0.05 ml をリンパ球に加えた後、3 日間培養した。培養最終 4 時間前に ^3H -thymidine (5 Ci/mmol, $1 \mu\text{Ci}/\text{well}$) を添加し、ラベルし、所定時間後、GF/F glass fiber paper (Whatman LTD. U. K.) 上の 5% 冷 TCA 酸不溶性分画の放射活性を Packard Tricarb model 3255 液体シンチレーションスペクトロメーターで測定した。

10. HCMV 初期産物中の蛋白の精製¹²⁾

HCMV 初期産物中の蛋白を精製する目的で、最終濃度が 0.1% となるように Triton X-100 を添加後、Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad Lab. U.S.A.) を用い、4°C 2 時間の batch 法にて、この detergent を除去した。Bio-Beads SM-2 に吸着した Triton X-

100 の量は、試料の 275 nm の吸光度を調べることによつて決定した。蛋白定量は Lowry 法を用いた¹⁷⁾。

結 果

1. HCMV 初期産物の mitogen 活性

リンパ球に添加する HCMV 初期産物の最大の mitogen 活性に関しては、Towne 株において明らかにされているように、HCMV 初期産物の濃度と培養時間に密接な関係があり³³⁾、井上株では蛋白量として $12 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、Towne 株では $11.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の HCMV 初期抽出液 0.05 ml をリンパ球に添加、3 日間培養した。その結果、井上株初期産物の mitogen 活性は、DNA への放射活性のとり込み (cpm) として 19,386 cpm, stimulation index (SI) として 16.2 を示した。Towne 株では 25,674 cpm, SI で 21.2 を示した。井上株においても Towne 株と同様に、PHA-P より低いが確実な mitogen 活性を認めた (図 1)。

2. E-rosetting cell, EAC-rosetting cell,

unseparated cell に対する mitogen 活性
 臍帯血よりリンパ球を分離し、更に E-rosetting

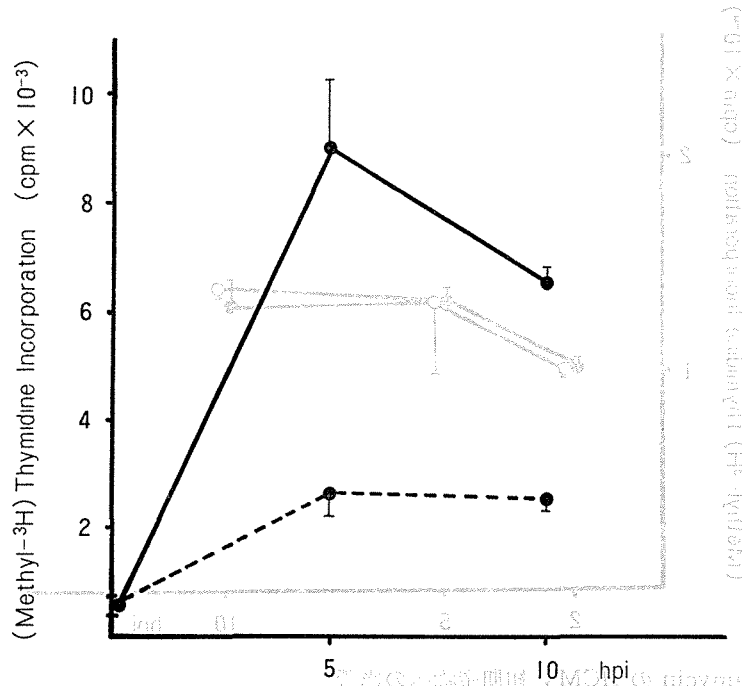


図 3. cycloheximide の HCMV 初期産物への影響

cycloheximide を $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に培養液に添加し、感染後 5 時間、10 時間の Towne 株の HCMV 初期産物を抽出し、それぞれのリンパ球刺激活性を測定した。臍帯血リンパ球 $2 \times 10^5/0.2$ ml に、HCMV 初期産物を添加、3 日間培養し、最終の 4 時間に ^3H -thymidine を加えラベルし、酸不溶性分画の放射活性を測定した。

- cycloheximide 非添加
- cycloheximide 添加

cell, EAC-rosetting cell, unseparated cell の3つの subpopulation に分画した。この割合はそれぞれ 65%, 12%, 23% を示した。各リンパ球 $2 \times 10^5 / 0.2 \text{ ml/well}$ に Towne 株 HCMV 初期産物を 0.05 ml 添加し、その mitogen 活性を測定した。その結果、HCMV 初期産物は、E-rosetting cell, EAC-rosetting cell, unseparated cell のいずれに対しても mitogen 活性を有した。なかでも E-rosetting cell に対しては最も活性が強く、 $4.2 \times 10^4 \text{ cpm}$ を示し、EAC-rosetting cell や unseparated cell は両者ともにほとんど等しい活性を示したが、その2倍以上の活性を有し、対照として用いた PHA-P よりも更に高い活性を示した。なお、EAC-rosetting cell への PHA-P の mitogen 活性はみられなかつた (図 2)。

3. cycloheximide の HCMV 初期産物への影響

HCMV 初期産物が蛋白であるかどうかを明らかにすべく、HCMV を HEF に吸着時およびその後も cycloheximide を $50 \mu\text{g/ml}$ の濃度で、培養液の

MEM 中に添加し、感染後 5 時間、10 時間の Towne 株初期産物のリンパ球刺激活性を測定した。その結果、感染後 5 時間において、cycloheximide 添加群では、リンパ球刺激活性は非添加群の約 30% の値を示しているにすぎず、10 時間後においても、cycloheximide 添加群では同様の抑制がみられた (図 3)。このことから、この mitogen は蛋白であることが明らかとなつた。

4. tunicamycin の HCMV 初期産物への影響

HCMV 初期産物の mitogen が糖蛋白であるかどうかを明らかにすべく、Towne 株 HCMV の HEF 感染時、およびその後の維持液に tunicamycin を $0.1 \mu\text{g/ml}$ の割合で添加し^{15) 21)}、感染後 2 時間、5 時間、10 時間に HCMV 初期産物を抽出し、リンパ球に対する mitogen 活性を測定した。その結果 tunicamycin 添加群は対照の非添加群とほとんど同じ活性を有し、mitogen 活性をもつ物質の産生は tunicamycin により阻害されなかつた (図 4)。すなわち、この mitogen は、糖蛋白であつたとしても、その活

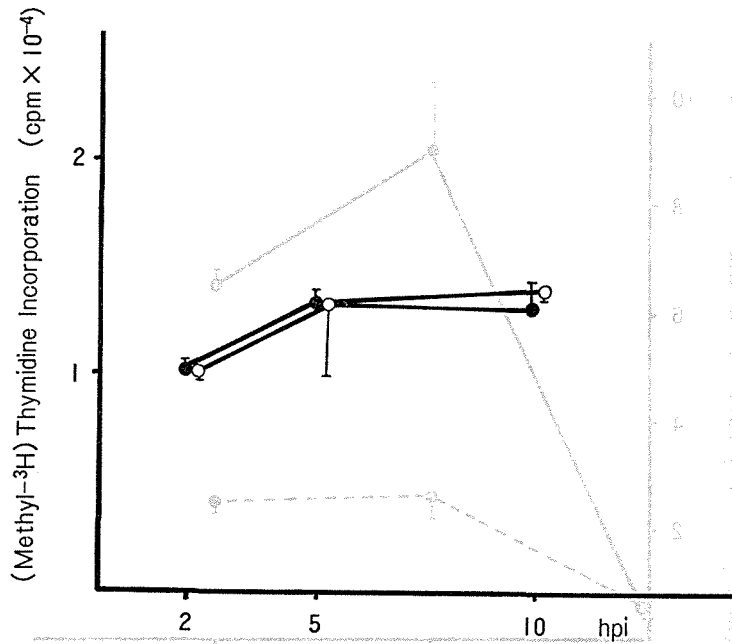


図 4. tunicamycin の HCMV 初期産物への影響

towne 株 HCMV を HEF に感染させる際、tunicamycin を $0.1 \mu\text{g/ml}$ の濃度で加え、感染後 2 時間、5 時間、10 時間の HCMV 初期産物を抽出し、その各々のリンパ球刺激活性を測定した。臍帯血リンパ球 $2 \times 10^5 / 0.2 \text{ ml}$ に HCMV 初期産物を添加、3 日間培養し、最終の 4 時間に ³H-thymidine を加えラベルし、酸不溶性分画の放射活性を測定した。

- tunicamycin 添加
- tunicamycin 非添加

性には糖鎖を必要としない蛋白であることが明らかとなった。

5. HCMV 感染 HEF 細胞における mitogen の存在部位

HCMV 感染 HEF 細胞中の mitogen の存在部位を明らかにすべく、感染 HEF 細胞を細胞質、細胞膜、核の3つの分画に分離し、それぞれの分画について、mitogen 活性を測定した。その結果、細胞膜、核は SI においてそれぞれ 32, 27 を示したのに対し、細胞質は 19 とやや低い値を示したが、その局在を明瞭に区分することはできなかった(表1)。

6. HCMV 初期産物の遠心操作と mitogen 活性

HCMV 初期産物を 1×10^5 g 30 分間、低温 (4°C) 遠心操作を加えた後、その上清と沈澱物の mitogen 活性を調べた。その結果、沈澱には、対照として遠心操作を加えなかった HCMV 初期産物とほぼ等しい mitogen 活性を持っていたのに対し、上清には活性は認められなかった(図5)。

7. Triton X-100 処理 HCMV 初期産物の mitogen 活性

5, 6 の実験より、mitogen の大部分が細胞膜や

表 1. HCMV 感染 HEF 細胞における mitogen の存在部位

	cpm ± SD	Stimulation index
• HCMV 初期産物		
細胞分画群		
細胞膜	19447 ± 4699	32
細胞質	11534 ± 303	19
核	16463 ± 413	27
未分画群	11643 ± 21	19
• PHA-P	48424 ± 7379	81
• 対照	601 ± 100	1

Towne 株 HCMV 感染 HEF 細胞を Coleman らの方法により、細胞膜、細胞質、核の3つに分画し、それぞれのリンパ球刺激活性を測定した。

臍帯血リンパ球 $2 \times 10^5/0.2$ ml に各分画物質を添加、3 日間培養し、最終の 4 時間に ^3H -thymidine を加えラベルし、酸不溶性分画の放射活性を測定した。

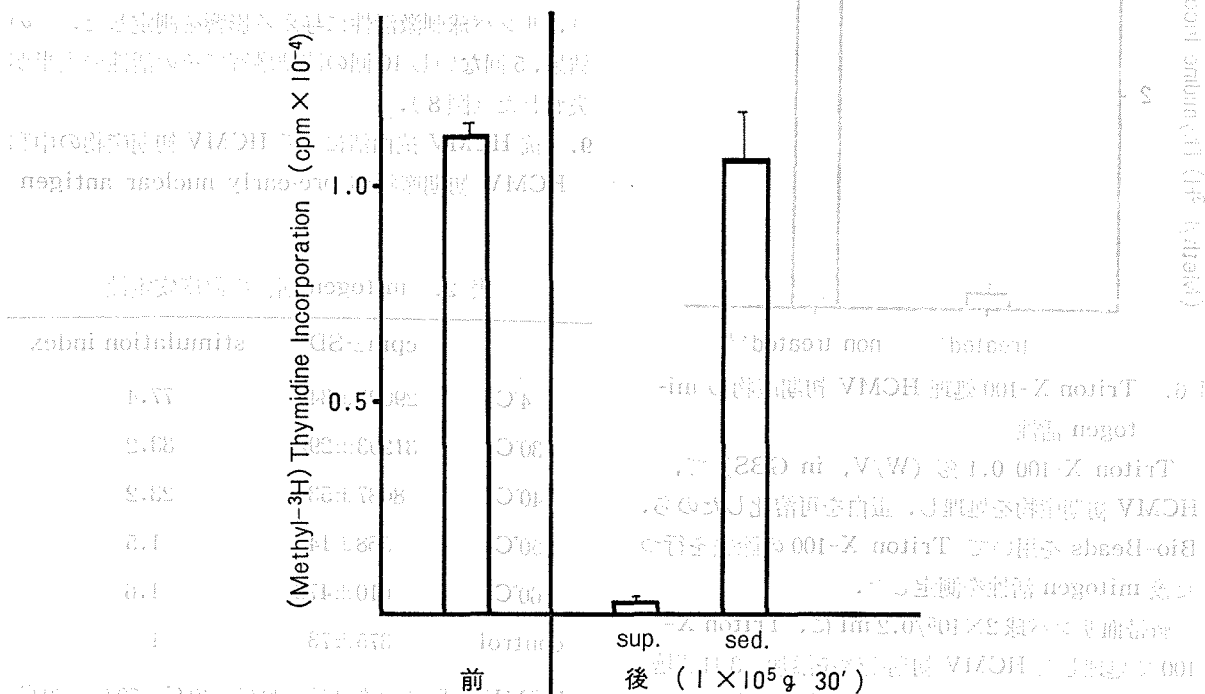


図 5. HCMV 初期産物の遠心操作と mitogen 活性

HCMV 初期産物を 1×10^5 g 30 分間 (4°C) 遠心操作を加え、その上清 (sup) と沈澱 (sed) の mitogen 活性を測定した。

臍帯血リンパ球 $2 \times 10^5/0.2$ ml に、上清、沈澱を添加、3 日間培養し、最終の 4 時間に ^3H -thymidine を加えラベルし、酸不溶性分画の放射活性を測定した。

核膜などに組み込まれて存在することが考えられたので、その蛋白を Triton X-100 を、最終濃度が 0.1% になるように添加、可溶化し精製した。予備実験で Bio-Beads SM-2 を用いることにより、Triton X-100 はリンパ球に対する影響がないまでの 1/100 以下に除去でき、蛋白の約 46% は回収されることが判明したので、Triton X-100 の除去は Bio-Beads SM-2 を用いた。上記操作の後、可溶化された蛋白の mitogen 活性を測定した。Triton X-100 処理 HCMV 初期産物は、対照として用いた Triton X-100 未処理の Bio-Beads 処理 HCMV 初期産物が mitogen 活性をもつのにまったく活性はみられなかった (図 6)。

8. HCMV 初期産物の各種条件における mitogen 活性の安定性について

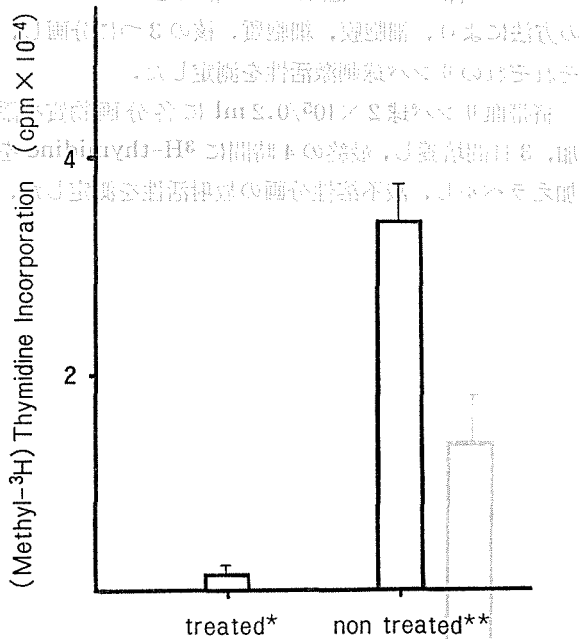


図 6. Triton X-100 処理 HCMV 初期産物の mitogen 活性

Triton X-100 0.1% (W/V, in GBS) で、HCMV 初期産物を処理し、蛋白を可溶化したのち、Bio-Beads を用いて Triton X-100 の除去を行った後 mitogen 活性を測定した。

臍帯血リンパ球 2×10⁵/0.2 ml に、Triton X-100 で処理した HCMV 初期産物を添加、3 日間培養し、最終の 4 時間に ³H-thymidine を加えラベルし、酸不溶性分画の放射活性を測定した。

* : Triton X-100 と Bio-Beads SM-2 で処理した HCMV 初期産物

** : Bio-Beads SM-2 のみで処理した HCMV 初期産物

(1) mitogen 活性の温度安定性

Towne 株初期産物を 4°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C に各 1 時間保存し、そのリンパ球刺激活性の変化を測定した。4°C や 30°C 1 時間保存後において、SI はそれぞれ 77.4, 83.2 を示したのに対し、40°C においては 23.2 とその活性は約 1/3~1/4 に低下し、50°C や 60°C においては殆んど活性を失い、control 群とほぼ同じ値を示した (表 2)。

(2) mitogen 活性の 4°C, 30°C における安定性

HCMV 初期産物を 4°C または 30°C で 1 時間保存した場合、その mitogen 活性に影響がみられなかったため、更に 5 時間および 12 時間後の mitogen 活性を測定した。1 時間後の DNA への放射活性の取り込み (cpm) は 4°C, 30°C においては、それぞれ 29,023, 31,203 を示し、5 時間後においても両者ともに同様の 30,000 前後の値を示した。しかしながら、12 時間後においては 4°C では 22,567 cpm を示し、約 20% の低下をきたし、30°C では 16,730 cpm を示し約 50% の低下をきたした (図 7)。

(3) 凍結融解の回数による mitogen 活性の安定性

HCMV 初期産物に 1 回、5 回、10 回の acetone dry ice を用いて凍結融解の操作を加えることにより、リンパ球刺激活性に与える影響を測定した。その結果、5 回ないし 10 回の凍結融解でその活性の大半が失われた (図 8)。

9. 抗 HCMV 抗血清による HCMV 初期産物の中和 HCMV 初期産物が pre-early nuclear antigen

表 2. mitogen 活性の温度安定性

	cpm ± SD	stimulation index
4°C	29023 ± 343	77.4
30°C	31203 ± 292	83.2
40°C	8687 ± 534	23.2
50°C	568 ± 143	1.5
60°C	610 ± 476	1.6
control	375 ± 73	1

HCMV 初期産物を 4°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, に 1 時間保存した後、mitogen 活性を測定した。

臍帯血リンパ球 2×10⁵/0.2 ml に HCMV 初期産物を添加 3 日間培養し、最終の 4 時間に ³H-thymidine を加えラベルし、酸不溶性分画の放射活性を測定した。

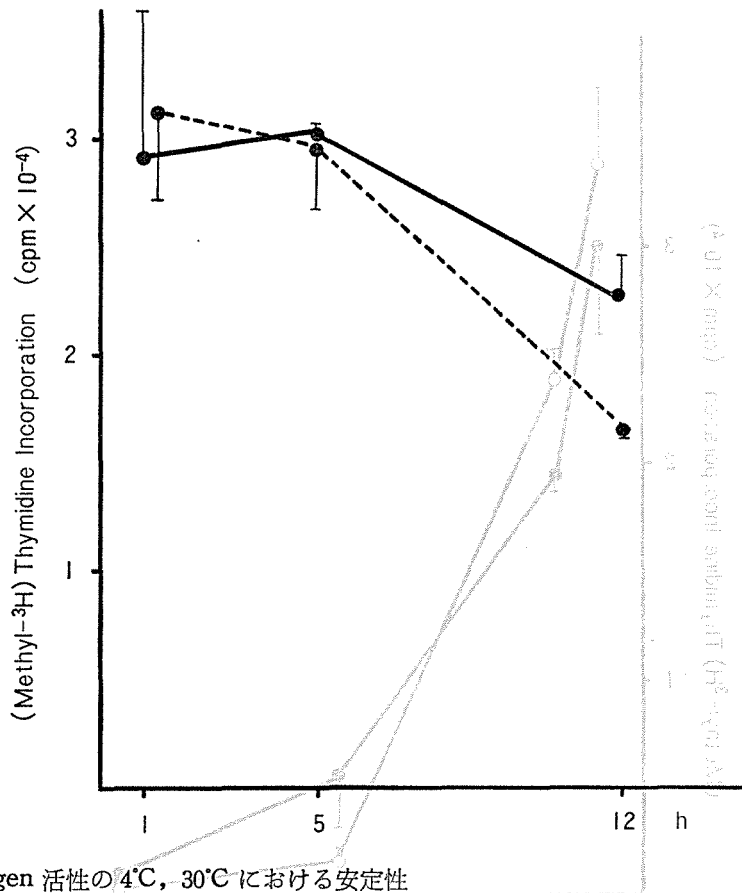


図 7. mitogen 活性の 4°C, 30°C における安定性

HCMV 初期産物を 4°C (●—●), あるいは 30°C (●—●) で 1 時間, 5 時間, 12 時間保存した後, リンパ球刺激活性を測定した.

臍帯血リンパ球 $2 \times 10^5 / 0.2 \text{ ml}$ に HCMV 初期産物を添加, 3 日間培養し, 最終の 4 時間に ³H-thymidine を加えラベルし, 酸不溶性分画の放射活性を測定した.

(PENA)³², immediate early antigen (IEA)¹⁸, EA²⁶) など同一である可能性があるため, 抗 PENA 抗体が 128 倍, 抗 EA 抗体 32 倍 (抗 LA 1024 倍, CF 抗体 16 倍) の抗 CMV 抗血清を 1 倍, 25 倍, 125 倍に希釈し, これを HCMV 初期産物に添加, 中和し, mitogen 活性を測定したところ, 添加した抗 HCMV 抗血清に dose dependent な mitogen 活性の低下がみられたが, control 群として用いた PHA-P 群においても同様な傾向がみられたため, この血清により, HCMV 初期産物の中和がおきたものかを同定することはできなかった.

考 察

HCMV は, 出生前における経胎盤感染, 周産期の産道感染, 出生後は腎移植をはじめとした臓器移植, 大量輸血, 摘脾後などに感染あるいは再活性化をきたし, その症状としては, ほとんど無症状のうちに潜伏

感染に移行するものから伝染性単核症様症状, 中枢神経系への障害を及ぼすものまでさまざまであること¹⁾ ²⁴⁾²⁵⁾は周知の事実であろう. しかしながら, HCMV 感染に関して, 液性免疫ではその防禦は難しいといわれている²⁾²⁰⁾²¹⁾²²⁾. 細胞性免疫に関しては, EBV や HCMV の伝染性単核症の人の末梢血中の異型リンパ球は Tcell であり³⁵⁾, 特異的免疫反応²³⁾により生じたとの報告があるが, in vitro において, HCMV の virion や dense body に対するリンパ球刺激活性は CF 抗体陽性者の中でも一部にしかみられないという報告³³⁾があり, 特異的細胞性免疫の関与もそう期待できそうにない. 以下に CMV 単核症の異型リンパ球は mitogen 刺激芽球類似の細胞で, 非特異的な細胞障害性を示す Lemon¹⁶⁾の報告や, CF 抗原や EA 中に mitogen 活性を見出した竹原³³⁾の報告があり, HCMV 単核症や HCMV 感染症の細胞性免疫に関してはむしろこの

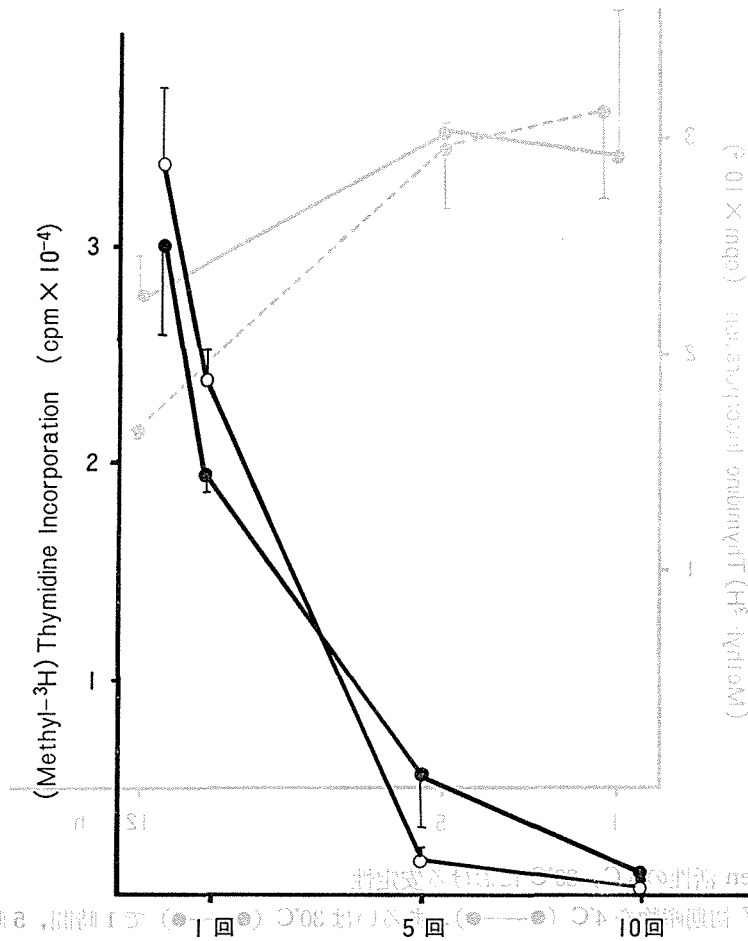


図 8. 凍結融解の回数による mitogen 活性の安定性

HCMV 初期産物の凍結融解を1回、5回、10回行った後、リンパ球刺激活性を測定した。

臍帯血リンパ球 $2 \times 10^5 / 0.2 \text{ ml}$ に HCMV 初期産物を添加、3日間培養し、最終の4時間に ^3H -Thymidine を加え、ラベルし、酸不溶性分画の放射活性を測定した。

○—○: sample A
●—●: sample B

mitogen 物質の関与が有力と考えられ、今回 HCMV 初期産物中の mitogen に注目した。この HCMV 初期産物中の mitogen の存在が、ウイルス株の違いにより異なるとしたならば、この mitogen は HCMV の中でも極く限られた一部の問題にしか過ぎなくなる。そこで既に mitogen 活性が明らかである Towne 株に加え、井上株の mitogen 活性を測定したところ、Towne 株とほぼ同等の活性が認められた。更に多くの HCMV においても mitogen 活性の存在の有無を確かめる必要があるかと思われたが、任意に選択した Towne 株、井上株ともに認められたことから他のウイルス株においても同様に mitogen 活性の存在が予想された。

一般に mitogen は、その活性が target になる細胞に関してまったく非特異的であるわけではなく、あるものは T cell を、またあるものは B cell を、また T, B cell の両者を選択的に活性化する。そこでこの HCMV 初期産物は、リンパ球のどの population に対し活性を有するかを調べたところ、PHA-P が E-rosetting cell にのみ活性を示したのに対し、E-rosetting cell に最も強く認めたものの EAC-rosetting cell や unseparated cell に対しても活性がみられた。またウイルスに関連した mitogen としてインフルエンザ A 型ウイルスの H2 スパイクは、T, B cell 両者を活性化することが知られている⁵⁾。また Westmoreland³⁷⁾は UV 照射した単純ヘルペスウイ

ルスが non E-rosetting cell を活性化すると報告を行っているのに対し、この HCMV 初期産物は、HCMV 自体には mitogen 活性は認められず、DNA 合成阻害剤存在下でもその mitogen 活性の産生が認められ、蛋白合成阻害剤である cycloheximide により、明らかに mitogen 活性の低下が認められることから、感染後早期に出現する蛋白であることが明らかとなった。

HCMV 初期産物の mitogen が糖蛋白である可能性もあるので tunicamycin で処理し、この mitogen 活性への影響をみた。この tunicamycin はリピド中間体の形成反応を選択的に阻害することによって糖蛋白質糖鎖、ペプチドグリカン、タイコイン酸等各種複合糖質の合成を阻害することが明らかになっており³¹⁾、この tunicamycin によっても何ら mitogen 活性に影響がみられていないことより、この mitogen は糖蛋白であつたとしてもその活性には糖鎖を必要としない蛋白であることが明らかとなった。

この mitogen の感染細胞上での存在部位について、感染細胞を細胞膜、細胞質、核と3つに分画したところ、細胞膜や核は細胞質に比しやや活性が高かつたが、各分画に mitogen 活性がみられ、その局在を明瞭に区分することはできなかつた。更に HCMV 初期産物を 1×10^5 g、30 分間低温遠心処理をしたのち、その上清及び沈渣の mitogen 活性を調べたところ、前者にはほとんど活性はみられなかつたのに対し、後者は処理前のものと変わらない活性がみられたため、膜抗原の可能性が考えられた。そのため、核膜や細胞膜などに組み込まれた蛋白を Triton X-100 を用いて可溶化したところ、Triton X-100 を用いたことにより蛋白の収量は約 15% 増加したにもかかわらず、mitogen 活性は消失し、あくまでも膜に結合した形で mitogen 活性をもつものと思われた。現在までに HCMV の感染細胞の膜抗原に関して、Stinski²⁷⁾ や Boldogh³⁾ の報告があるが、それが mitogen 活性を有していたとの報告は見当らない。

更にこの HCMV 初期産物の mitogen の安定性が、この物質の発見に影響を及ぼしていたことも考えられたので、種々の条件下における安定性を検討した。保存温度による mitogen 活性の安定性は 4°C や 30°C で 1 時間保存した場合、SI にしてそれぞれ 77.4、83.2 にに対し 40°C ではその 1/3~1/4 に活性が低下し、50°C や 60°C ではほとんどその活性は失われ、易熱性であることが判明した。更に 4°C、30°C で 5 時間と 12 時間後の mitogen 活性を測定したところ、この HCMV

初期産物は少くとも 5 時間目までは 4°C、30°C においては、その mitogen 活性に変化はみられなかつたが、12 時間後においては両者ともに低下がみられた。また 30°C の方が 4°C に比し、やや mitogen 活性の低下が強く認められた。HCMV 初期産物の mitogen 活性は 4°C、30°C においても、保存期間が mitogen 活性の低下に影響を与えることが明らかとなつた。すなわち保存温度や保存期間はこの mitogen の安定性に重要なかわりを持つていることがうかがえた。また凍結融解の影響を調べたところ、5 回、10 回の凍結融解において、ほとんどその mitogen 活性は失われていた。Kim¹³⁾ (1977) によると、CF 抗原活性は 4°C、2 ヶ月保存、10 回の凍結融解に耐えるのに対し、この CF 抗原の mitogen 活性はすみやかに消失しており、mitogen 活性については HCMV 初期産物や CF 抗原においても同様に非常に不安定なことがいえ、この mitogen の同定が難しかつたものと思われた。そのため、この mitogen の抽出の際はこれらの性質を考慮した操作を今後更に検討する必要があると思われる。

この HCMV 初期産物中の mitogen は感染後 3 時間には出現し、5 時間にピークとなり、10 時間後においても存在するといわれている³²⁾。その他の HCMV の関連抗原としては PENA³²⁾、EBNA 型 nuclear antigen⁸⁾¹⁰⁾、IEA⁶⁾¹⁸⁾、EA²⁶⁾³⁴⁾、late antigen (LA) などが報告されている。その分子学的性状については徐々に明らかにされつつある。PENA は感染後 1 時間以内に産生される蛋白で、その機能としては、HCMV 増殖過程中的細胞性 RNA 合成の誘導に関係しているといわれ、cycloheximide によりその合成が阻害される。EBNA 型 nuclear antigen は CMNA ともいわれ、感染 3~6 時間以内に産生される。IEA は感染後 1 時間以内出現し、DNA または RNA 合成阻害剤の影響を受けない。また EA は感染 12 時間後からウイルス DNA の合成が始まる 40 時間後の間に産生され、細胞性 RNA が誘導され、ポリゾームの生成をきたすことが明らかになっている。これはリフェンピンにより阻止される。LA はウイルス粒子構成成分が多いとされ、フォスフォノ酢酸により阻止される。最初に述べた mitogen を有す HCMV 初期産物は明らかに PENA、IEA、EBNA 型 nuclear antigen などと同一のものである可能性があり、あらかじめ HCMV の抗体価のわかっている血清 (抗 PENA 128 倍、抗 EA 32 倍、抗 LA 1024 倍、CF 抗体 16 倍) にて HCMV 初期産物の中和試

験をリンパ球で行ったが、非特異的なリンパ球芽球化抑制がみられ、PENA あるいは EA との関連を明らかにすることはできなかった。

HCMV 初期産物中の mitogen 物質は、熱や凍結融解に不安定で、膜に結合した形でのみ活性をもち、可溶化することによりその活性が失われるためその分析は難しいが、今回 T-B cell に対し mitogen 活性がみられたことより、今後更にリンホカイン産生の有無などに関連して研究することは HCMV 感染時における細胞性免疫の関与が更に明らかとなると思われる。またこの mitogen により芽球化したリンパ球と HCMV 単核症との関連については未解決であり、今後更に検討する必要があると思われる。

総 括

1. HCMV 初期産物中の mitogen 活性は、Towne 株同様、井上株においてもその存在が認められた。

2. Towne 株初期産物は、E-rosetting cell, EAC-rosetting cell, unseparated cell のいずれに対しても mitogen 活性を有した。なかでも E-rosetting cell に対しては、EAC-rosetting cell, unseparated cell 両者ともにほとんど等しい活性を有していたが、その2倍以上の活性を有し、PHA-P 刺激よりも更に高い mitogen 活性を示した。

3. Towne 株初期産物の mitogen は、tunicamycin 存在下でも出現し、cycloheximide により阻害されたことから、糖蛋白質であったとしても、その活性には糖鎖を必要としない蛋白である可能性が示された。

4. Towne 株初期産物の mitogen は、細胞膜あるいは核膜に結合しているものと思われた。またこれらの膜に結合している状況でのみ mitogen 活性をもつものと考えられた。

5. Towne 株初期産物の各種条件における mitogen 活性の安定性について

(1). 4°C や 30°C 1時間の保存には耐えうるが、40°C では1/3~1/4に低下し、50°C や 60°C ではそのほとんどが失われた。

(2). 4°C や 30°C においても、その保存期間が12時間を超えると活性の低下傾向がみられた。その際、30°C に保存した方がより低下傾向が強かった。なお、保存期間が少くとも5時間までは、両者ともに活性への影響はみられなかった。

(3). 凍結融解を繰り返すことにより、その活性は急

速に消失した。この mitogen は、本報告の論文を執筆するにあたり、終始御指導、御校閲を賜った恩師栗村敬教授、浜田駿教授に謹んで謝意を捧げるとともに、終始御指導、御援助いただいた竹原直秀博士、高知医大尾崎登喜雄教授、東大田村学造教授、東海大田中重明助教授、長田昭夫博士に深謝致します。

また、本研究に御協力、御援助いただいたウイルス学教室各位、口腔外科学教室各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Baumgartner, J.D., Glauser, M.P., Burgo-Black, A.L., Back, R.D., Pyndiah, N. and Chioloro, R. (1982). Severe cytomegalovirus infection in multiply transfused, splenectomised, trauma patients. *Lancet*, **8289**, 63-66.
- 2) Betts, R. F., Freeman, R. B., Douglas, R. G., Jr., Talley, T. E. and Rundell, B. (1975). Transmission of cytomegalovirus infection with renal allograft. *Kidney Int* **8**, 385-392.
- 3) Boldogh, I., Gönczöl, E. and Vaczi, L. (1977). Cytomegalovirus induced membrane antigens in productively infected cells. *Acta microbiol Acad Sci Hung* **24**, 21-28.
- 4) Böyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: isolation of mononuclear cells by one centrifugation and granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest* **21**, suppl. 97, 77-89.
- 5) Butchko, G.M., Armstrong, R.B., Martin, W.J. and Ennis, F.A. (1978). Influenza A viruses of the H2N2 subtype are lymphocyte mitogens. *Nature* **271**, 66-67.
- 6) Cameron, J.M. and Preston, C.M. (1981). Comparison of the immediate early polypeptides of human cytomegalovirus isolates. *J Gen Virol* **54**, 421-424.
- 7) Coleman, R., Michell, R.H., Finean, J.B. and Hawthorne, J. N. (1967). A purified plasma membrane fraction isolated from rat liver under isotonic conditions. *Biochem*

- him Biophys Acta **135**, 573-579.
- 8) Geder, L. (1976). Evidence for early nuclear antigens in cytomegalovirus infected cells. J Gen Virol **32**, 315-319.
 - 9) George, E.M., Robert, E.G. and Addison, H.F. (1967). Culture of normal human leukocytes. JAMA **199**, 519-524.
 - 10) Giraldo, D., Hammerling, V., Tarro, G. and Kourilsky, F.M. (1977). Detection of early antigens in nuclei of cells infected with human cytomegalovirus on herpes simplex virus type 1 and 2 by anticomplement immunofluorescence and use of a blocking assay to demonstrate their specificity. Int J Cancer **19**, 107-116.
 - 11) Holloway, P.W. (1973). A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. Anal Biochem **53**, 304-308.
 - 12) Jeang, K.T. and Gibson, W. (1980). A cycloheximide-enhanced protein in cytomegalovirus-infected cells. Virology **107**, 362-374.
 - 13) Kim, K.S., Moon, H.N., Sapienza, V.J. and Carp, R.I. (1977). Complement-fixing antigen of human cytomegalovirus. J Infect Dis **135**, 281-288.
 - 14) Klemola, E., von Essen, R., Wagner, O., Haltia, K., Koivuniemi, A. and Salmi, I. (1969). Cytomegalovirus mononucleosis in previously healthy individuals: Five new cases and follow-up of 13 previously published cases. Ann Intern Med **71**, 11-19.
 - 15) Kohno, K., Hiragun, A., Mitsui, H., Takatsuki, A. and Tamura, G. (1979). Effect of Tunicamycin on cell growth and morphology of nontransformed and transformed cell lines. Agric. Biol Chem **43**, 1553-1561.
 - 16) Lemon, S., Hutt, L. and Huang, Y-T. (1977). Cytotoxicity of circulating leukocytes in cytomegalovirus and mononucleosis. Clin Immunol Immunopathol **8**, 513-519.
 - 17) Lowry, O., Rosebrough, M., Farr, A. and Randall, R. (1951). Protein measurement with a Folin phenol reagent. J Biol Chem **193**, 265-275.
 - 18) Michelson-Fiske, S., Horodniceanu, F. and Guillon, J. C. (1977). Immediate early antigens in human cytomegalovirus infected cells. Nature **270**, 615-617.
 - 19) 南嶋洋一 (1981). サイトメガロウイルス感染症. 臨床とウイルス, **9**, 43-49.
 - 20) Numazaki, Y., Yano, N., Morizuka, T., Takai, S. and Ishida, N. (1970). Primary infection with human cytomegalovirus: virus isolation from healthy infants and pregnant women. Am J Epidemiol **91**, 410-417.
 - 21) Reynolds, D.W., Stagno, S., Hosty, T.S., Tiller, M. and Alford, C.A., Jr. (1973). Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. N Engl J Med **289**, 1-5.
 - 22) Reynolds, D.W., Stagno, S., Reynolds, R. and Alford, C.A., Jr. (1978). Perinatal cytomegalovirus infection: Influence of placentally transferred maternal antibody. J Infect Dis **137**, 564-567.
 - 23) Royston, I., Sullivan, J., Periman, P.O. and Perlin, E. (1975). Cell-mediated immunity to Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid cells in acute infectious mononucleosis. N Engl J Med **293**, 1159-1163.
 - 24) Sandler, S. G. and Grumet, F. C. (1982). Posttransfusion cytomegalovirus infections. Pediatrics **69**, 650-653.
 - 25) Stagno, S., Pass, R.F., Dworsky, M. E., Henderson, R. E., Moore, E. G., Walton, P.D. and Alford, C.A. (1982). Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection. N Engl J Med **306**, 945-949.
 - 26) Stinski, M.F. (1978). Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. J Virol **26**, 686-701.
 - 27) Stinski, M.F., Mocarski, E.S., Thomsen, D.R. and Urbanowski, M.L. (1979). Membrane glycoprotein and antigens induced by human cytomegalovirus. J Gen Virol **43**,

- 119-129.
- 28) Takatsuki, A., Arima, K. and Tamura, G. (1971). Tunicamycin, a new antibiotic. I: Isolation and characterization of tunicamycin. *J Antibiot* **24**, 215-223.
- 29) Takatsuki, A. and Tamura, G. (1971). Tunicamycin, a new antibiotic. II: Some biological properties of the antiviral activity of tunicamycin. *J Antibiot* **24**, 224-231.
- 30) Takatsuki, A. and Tamura, G. (1971). Tunicamycin, a new antibiotic. III: Reversal of the antiviral activity of tunicamycin by aminosugars and their derivatives. *J Antibiot* **24**, 232-238.
- 31) 高月昭, 田村学造 (1979). Tunicamycinの選択的阻害作用を利用した複合糖質の生合成と機能の研究. *生化学* **51**, 969-1008.
- 32) Tanaka, S., Otsuka, M., Ihara, S., Maeda, F. and Watanabe, Y. (1979). Induction of pre-early nuclear antigens in HEL cells infected with human cytomegalovirus. *Microbiol Immunol* **23**, 263-271.
- 33) 竹原直秀 (1979). ヒトサイトメガロウイルス関連抗原による Lymphocyte Proliferation. *米子医学雑誌* **30**, 535-545.
- 34) The, T.H., Klein, G. and Langenhuisen, M.M.A.C. (1974). Antibody reactions to virus specific early antigens (EA) in patients with cytomegalovirus (CMV) infection. *Clin Exp Immunol* **16**, 1-12.
- 35) Virolainen, M., Anderson, L.C., Lalla, M. and von Essen, R. (1973). T-lymphocyte proliferation in mononucleosis. *Clin Immunol Immunopathol* **2**, 114-120.
- 36) Wäner, J.L., Weller, T.H. and Stewart, J.A. (1979). Cytomegalovirus. *Manual of clinical immunology* (ed. Rose, N.R., Friedman, H.), pp. 622-627, American Society for Microbiology, Washington D.C., U.S.A.
- 37) Westmoreland, D. (1980). A lymphoblastoid response of human foetal lymphocytes to ultraviolet-irradiated herpes simplex virus. *J Gen Virol* **47**, 151-159.
- 38) 矢田純一, 橘武彦 (1979). 免疫実験操作法 **A**, pp. 451-454, 日本免疫学会, 金沢.
- 39) Zaia, J. A., Leary, P. L. and Levin, M. J. (1978). Specificity of the blastogenic response of human mononuclear cells to herpesvirus antigens. *Infect Immunol* **21**, 646-651.
- 40) Klemola, E., von Bonsdorff, O., Heltinen, K., Korhonen, A. and Salmi, I. (1979). Cytomegalovirus mononucleosis in previously healthy individuals: five new cases and follow-up of 13 previously published cases. *Ann Intern Med* **91**, 11-19.
- 41) Kohno, K., Hirata, A., Mitsui, H., Takahashi, A. and Tamura, G. (1979). Effect of tunicamycin on cell growth and morphology of non-transformed and transformed cell lines. *Virology* **43**, 132-134.
- 42) London, S., Hsu, E. and Huang, Y-T. (1977). Cytotoxicity of circulating leukocytes in cytomegalovirus and mononucleosis. *Clin Immunol Immunopathol* **8**, 513-519.
- 43) Davy, C., Rosebrough, M., Fair, A. and Knecht, R. (1971). Protein measurement with a colorimetric reagent. *J Biol Chem*