

ヒトT細胞白血病ウイルス抗原 特に内部構造蛋白質の免疫電子顕微鏡的研究

岡山大学医学部癌源研究施設生化学部門 (指導: 小田琢三教授)

壽 満 文 彦

(昭和63年9月7日受稿)

Key words: 成人T細胞白血病, HTLV-I, ウイルス抗原, 免疫電顕, 電顕酵素抗体法

緒 言

ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV-I)¹⁾は成人T細胞白血病 (ATL) の病因と密接に関連するT細胞親和性レトロウイルスである²⁾. ATL患者由来培養T細胞やHTLV-I感染培養T細胞には患者血清と特異的に反応するATL関連抗原 (ATLA) が検出され³⁾, ATL患者やHTLV-I感染健康人 (healthy HTLV-I carrier) の血清中にはATLA抗体が存在する³⁾. このATLA抗原はHTLV-Iウイルス遺伝子発現蛋白質の総称であり, ATLA抗体はそれらの蛋白質に対する抗体の総称である.

HTLV-IはそのプロウイルスDNAの全塩基配列の決定と遺伝子構造の解析によって, ウイルスの構成と増殖に必要な *gag*, *pol*, *env* 遺伝子と, その他に特異な pXs 遺伝子領域をもつことが明らかにされた⁴⁾⁻⁷⁾ (図1). *gag* 遺伝子の発現によっては *gag* 前駆蛋白質 PR^{gag} (Pr53) が生成され, それは *prt* 遺伝子にコードされる蛋白質分解酵素 (protease, PR, p14) によって切断されて3種の *gag* 蛋白質, すなわち matrix protein (MA, p19), capsid protein (CA, p24), および nucleocapsid protein (NC, p15) が生成する⁷⁾. これらはウイルス内部構造蛋白質である. *pol* 遺伝子の発現では逆転写酵素 (reverse

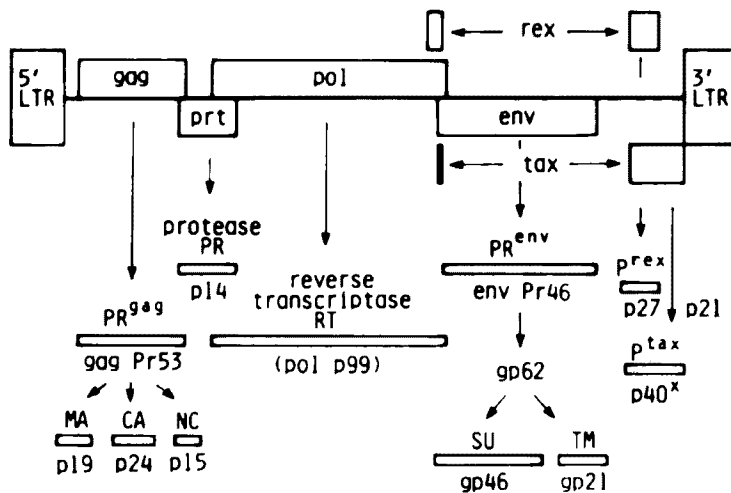


図1 HTLV-I 遺伝子と遺伝子産物の模型図^{6),7)}.

transcriptase, RT, pol p99?)が生成する。env 遺伝子の発現では env 前駆蛋白質 PR^{env} (env Pr46)が生成し、それに糖が結合して gp62 になった後、surface protein (SU, gp46)と transmembrane protein (TM, gp21)に切断される。これらはウイルス被膜蛋白質である。pXs 遺伝子領域は細胞由来の癌遺伝子ではないが、3種の蛋白質 (p40^x, p27^{x-111}, p21^{x-111})を発現する⁸⁾⁻¹⁰⁾。p40^x(P^{tax})は HTLV-I の LTR に trans にはたらく転写活性化作用を有し¹¹⁾、また T 細胞のインターロイキン 2 (IL-2) とその受容体 (IL-2R) の産生を誘導することが示され¹²⁾、HTLV-I の複製ならびに感染 T 細胞の異常増殖と変換に重要な役割を演ずるものと考えられている¹¹⁾⁻¹³⁾。

ATL 患者由来の HTLV-I 産生細胞には ATL 患者血清との免疫反応によって gp62, gp46, p40, p24, p19, p15 などの ATLA 抗原、すなわち HTLV-I 抗原が検出され^{3),14),15)}、MT-2細胞およびそれとの混合培養によって感染した培養細胞にはさらに gp68 と p28 が検出される。しかし、HTLV-I の個々の遺伝子の感染細胞内での発現は細胞の由来と環境によって必ずしも同じではなく、また ATL 患者血清中の ATLA 抗体も各個体によって各種抗体の有無、および量が異なる。

ATL の成因を解明するためには、HTLV-I による T 細胞の増殖と変換の分子機構を究明しなければならない。そのためには HTLV-I の各種抗原蛋白質のウイルス内および細胞内における局在とそのはたらきを明らかにする必要がある。従来、ATLA 抗原は、蛍光抗体法による光学顕微鏡的観察や細胞分画法などによって、主として細胞質とその周辺に存在し²⁾、p40^xは細胞核内と細胞質に存在することが示されているが^{16),17)}、その詳細な局在は不明であった。またフェリチン抗体を用いた免疫電顕的観察では、フェリチン抗体が分子量が大きいためウイルス内や細胞内部に浸入し難いので、内部抗原の正確な局在を検出することが困難であった¹⁸⁾⁻²⁰⁾。著者は HTLV-I 産生細胞の超微構造内における HTLV-I 抗原、殊に内部構造蛋白質 p24 と p19 の局在を明らかにするために、ATL 患者血清、

抗 p24 および抗 p19 モノクローナル抗体を用いて、間接酵素抗体法による免疫電子顕微鏡的観察を行い、感染細胞内およびウイルス内における抗原の局在を追究した。

材料と方法

1. 培養細胞

HTLV-I 産生細胞としては MT-2細胞²¹⁾ (高知医科大学内科, 三好勇夫教授より恵与)、HUT-102細胞¹⁾ (国立がんセンター, 下遠野邦忠博士より恵与)、ATL 患者末梢血より樹立した ATL-M細胞、ATL-S細胞 (岡大医療短大, 宮本寛治博士より恵与) を使用した。陰性対照細胞としては Molt-4細胞²²⁾ (岡大小児科, 国富泰二博士より恵与) を使用した。MT-2, HUT-102, ATL-M および ATL-S 細胞は 10% ウシ胎児血清 (GIBCO 社) 添加 RPMI1640 (日本製薬) 培養液で、Molt-4細胞は 10% ウシ胎児血清, x2 アミノ酸ビタミン添加 RPMI1640 で 5% CO₂, 飽和水蒸気中, 37°C の条件下で浮遊培養を行った。

2. 抗血清

一次抗体: HTLV-I 抗体陽性血清として複数の ATL 患者血清 (岡大医療短大, 喜多嶋康一博士, 宮本寛治博士より恵与) を混合してその血清を 10~50 倍希釈で使用した。モノクローナル抗体として抗 HTLV-I p19 モノクローナル抗体 GIN-14 (IgG 2b)²³⁾ および抗 HTLV-I p24 モノクローナル抗体 NOR-1 (IgG 2a)²⁴⁾ (北里大学, 田中勇悦博士より恵与)、ポリクローナル抗体として抗 HTLV-I p24 Balb C マウス血清 (香川医科大学, 田中輝和博士より恵与) を 20~100 倍希釈で使用した。陰性対照血清として正常成人血清, 正常ヒト臍帯血清, 正常マウス血清, および正常ヤギ血清を使用した。

二次抗体: 間接酵素抗体法で西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウス IgG ヤギ血清 F (ab')₂, および HRP 標識抗ヒト IgG ヤギ血清 F (ab')₂ (Cappel 社) を 20~100 倍に希釈して使用した。

3. 蛍光抗体法

浮遊培養細胞を 1000rpm, 5 分間遠心し, 沈渣に PBS-10% BSA (ウシ血清アルブミン, SIGMA Chem. Co.) を加えて遠心洗浄し, 上清を捨て,

そのまま静置して残った液で懸濁し、細胞濃度の高い状態で細胞を分散させた。その細胞を無蛍光スライドガラスに塗抹し、ドライヤーの冷風で速やかに乾燥させ、室温で30~60分間放置した。100%冷アセトンで20分間固定して風乾し、20分間放置した。次に希釈した一次抗体を塗抹試料上に載せ、抗体の乾燥を防ぐためにスライドガラスを湿箱に入れ37℃、30分間フラン器中で反応させ、その後冷PBSで10分間、3回洗浄し風乾させた。二次抗体として50~200倍希釈した抗ヒトFITC標識ウサギ血清F(ab')₂を試料上に載せ37℃、30分間フラン器中で反応させた後、冷PBSで10分間、3回洗浄し、風乾させた。無蛍光グリセリンで包埋後蛍光顕微鏡で観察した。蛍光抗体染色標本は冷暗所で1週間程度は比較的安定に保たれた。

4. 光顕酵素抗体法

浮遊細胞で反応する場合は、細胞の固定から抗体の反応、発色までの全過程で遠心懸濁を繰返し、浮遊状態で反応を行った。培養浮遊細胞を1200rpm、5分間遠心して、沈渣にPBS(10mMリン酸緩衝液pH7.2-140mM NaCl)-1%BSAを加えて遠心洗浄し、上清を除き冷PFA溶液(4%パラホルムアルデヒドを0.1Mリン酸緩衝液pH7.4で60℃で加熱溶解して作製)で、4℃、1時間固定した。PBSで3回遠心洗浄し、非特異反応を防ぐために、10倍希釈の正常ヤギ血清を加えて37℃、30分間反応した。次に一次抗体として、1%BSAを含むPBSで10倍希釈のATL患者血清または正常成人血清を加え37℃、30分間反応を行い、PBSで3回遠心洗浄した。次に二次抗体のHRP標識抗ヒトIgGヤギ血清F(ab')₂を20倍希釈して37℃、30分間反応し、PBSで3回洗浄した。HRPの酵素組織化学的発色は3,3'-ジアミノベンチジン(DAB)法(Graham-Karnovsky法)²⁵⁾で行った。反応直前にDAB-4HCl 20mgを約75mlの50mM Tris-HCl緩衝液pH7.6に溶解し、これに蒸留水で5%に希釈した過酸化水素(H₂O₂)水0.1mlまたは原液のH₂O₂17μlを加えたものを基質溶液(DAB-H₂O₂溶液)として使用した。反応は室温または37℃で5~10分間行い、PBSで洗浄した。卵白アルブミン処理スライドガラスに塗抹して乾燥

させ、エタノール、キシレンで脱水、エンテランで包埋し顕微鏡観察を行った。一部はPBS洗浄後、細胞内構造確認のためにヘマトキシリンによる核染色を行った。

5. 電顕酵素抗体法

浮遊細胞法：光顕酵素抗体法と同様処理を二次抗体反応まで行いその後1%グルタルアルデヒドで4℃、10分間固定後DAB-H₂O₂溶液で室温、5~10分間HRP反応を行った。その後の操作は次に述べる凍結切片法と同様に行った。

凍結切片法：Odaらの方法^{26),27)}に従い、次のごとく電顕試料を作製した。培養浮遊細胞を1200rpm、5分間遠心してその細胞沈渣に4%PFAを加え4℃、2時間または一晩固定を行い、1500rpm、10分間遠心して、細胞がばらばらにならないように注意しながら薬餌または針で遠心管底より凝集塊として回収し、以後は細胞凝集塊状態として操作した。4℃で10%蔗糖-PBS、半日、15%蔗糖-PBS、半日、20%蔗糖-PBS、1日、5%グリセリン-20%蔗糖-PBS、30分間、次にO.C.T. compoundに8%グリセリンを加えてよく攪拌したものに試料を浸した。アルミニウムボートの底に試料を載せ、ドライアイス-エタノールの容器の中に入れて瞬時凍結し、-80℃で保存した。免疫電顕実験時に約6~8μmの厚みの凍結切片を作り、卵白アルブミン処理スライドガラスに載せ、室温にてドライヤーで速やかに乾燥させ、その後室温で20分間乾燥させた。それ以降の実験においては試料が途中で乾燥すると非特異反応を起こすので乾燥させないように注意して行った。冷PBSで10分間、3回洗浄してキムワイプで切片の周辺の水分を拭取り、切片上に10倍希釈ヤギ血清(0.01%窒化ソーダを含むPBSで希釈)を載せ室温で30分間反応した。冷PBSで5~10分間、4℃、3回洗浄し、一次抗体をそれぞれ前記の倍率に希釈したものを切片上に20μl載せたスライドガラスを湿箱に入れて切片の乾燥を防ぎながら4℃で一晩反応させた。冷PBSで10分間、3回交換洗浄し、それぞれに対応するHRP標識二次抗体を50~100倍希釈したものを20μlを切片上に載せ3時間反応し、冷PBSで5~10分間、3回交換洗浄した。1%グルタルアルデヒド-PBSで10分間

固定後、冷 PBS で 5～10 分間、5 回交換洗浄した。DAB-DMSO (DAB10mg — 1% DMSO — 50mM Tris-HCl pH7.6, 50ml, 10 分間よく攪拌) に浸し室温 30 分間置き、DAB 溶液 — 0.005% H₂O₂ で室温、5 分間反応、冷 PBS で 5～10 分間、3 回交換洗浄、2% OsO₄ — リン酸緩衝液で室温、30～60 分間固定、エタノール 50%, 70%, 80%, 90% 各 5～10 分間、100% 10 分間 2 回で脱水を行った。次にゼラチンカプセル No. 00 にエポキシ樹脂 (A : B を 5 : 5 に混合) を入れカプセルを逆にしてスライドガラスの切片上に置き 60°C, 2 日間重合させて包埋した。スライドガラスの裏面を加熱して試料をはがし、超薄切片として、無染色で電顕観察を行った。反応の局在の確認のためには酢酸ウラニルクエン酸鉛で電子染色を施して電顕観察に供した。

6. ウェスタンブロッティング法

細胞の全蛋白質の抽出：培養浮遊細胞を遠心法 (1200rpm, 5 分間) により Versen 溶液 (EDTA : 0.02% Ethylenediaminetetraacetic Acid-10mM リン酸緩衝液 pH7.4-0.15 M NaCl) で 4°C, 2 回洗浄し、沈渣に 5×10^7 細胞に対して 1 ml の割合になるように 0.5% Nonidet-P40 (NP-40) を含む緩衝液 (10mM Tris-HCl pH8.0-0.14M NaCl- 3 mM MgCl₂-10mM DTT-1 mM PMFS) を加え 4°C, 30 分間細胞を融解した。エッペンドルフ型遠心器にて 4°C, 12,000rpm 30 分間遠心し、その上清を細胞の全蛋白質抽出物試料とした。

電気泳動法：全蛋白質抽出物を Laemmli の方法²⁸⁾に従って 0.2% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) — 1.2% ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で蛋白質を分離し、一部は全蛋白質の分子量確認のためにクマシーブリリアントブルー染色し、一部はニトロセルロース膜 (0.45 μ m, 東洋科学産業) 上へブロッティング装置 (Bio-Rad 社) を用いて蛋白質を移した²⁹⁾。

免疫酵素抗体法による蛋白質の検出：蛋白質をブロットしたニトロセルロース膜を 1% BSA-TBS 溶液 (10mM Tris-HCl pH7.5-0.15M NaCl) で洗浄後、ニトロセルロースフィルターをカバックに入れ、それぞれに希釈した一次抗体を加え 37°C, 1 時間反応させた後、カバック

よりフィルターを取り出してバットに移して、0.05% Tween20-TBS 溶液 (TTBS) で充分洗浄後、再びフィルターをカバックに入れ 100 倍希釈 HRP 標識二次抗体を加え室温で、30 分間反応させ、TTBS で充分洗浄後、DAB-H₂O₂ 溶液で室温 5 分間灰色のするまで発色させた (長時間置くとフィルター全体が着色するので注意)。蒸留水で洗浄後風乾させ、早目に写真撮影を行い、発色させたフィルターは暗所に保存した。

結 果

1. 蛍光抗体法による抗原の検出

HTLV-I のウイルス粒子が多く細胞外に放出されている MT-2 細胞 (図 2) での抗原の局在を ATL 患者血清を用いて観察した結果、細胞周辺に沿って強い陽性反応が見られた。核部にもわずかに陽性反応が見られたが、これは核内の反応か、その上の細胞質あるいは細胞表面の反応か光顕では判定し難い。正常対照血清については陰性であった。

2. 光顕酵素抗体法

ATL 患者血清を用いて MT-2 細胞での抗原の局在様式は蛍光抗体法と同様の結果を得た。陽性反応は細胞質に強く、核部にもわずかに陽性反応が認められたが、蛍光抗体法の場合と同様に核の内か外かは判定し難い (図 3)。微細な反応結果については電顕的観察によらなければ不明である。

3. 電顕酵素抗体法

浮遊細胞での ATLA 抗原の検出

MT-2 細胞の ATLA 抗原の局在を浮遊細胞で ATL 患者血清を用いて電顕酵素抗体法で観察すると、HTLV-I ウイルス粒子表面および細胞膜全周に沿って陽性反応が見られる (図 4)。ウイルス粒子内部、細胞質、核膜、核質への陽性反応は認められない。酵素抗体反応後に酢酸ウラニルクエン酸鉛二重染色を行って観察すると、細胞外陽性反応の大部分がウイルス粒子であることが確認された (図 5)。このように浮遊細胞法で抗原抗体反応すると、抗体がウイルス内および細胞内へ浸透し難いのでウイルス内および細胞内抗原の局在を検出し難い。浮遊培養細胞を用いて抗体の浸透を良くするためにアセトン

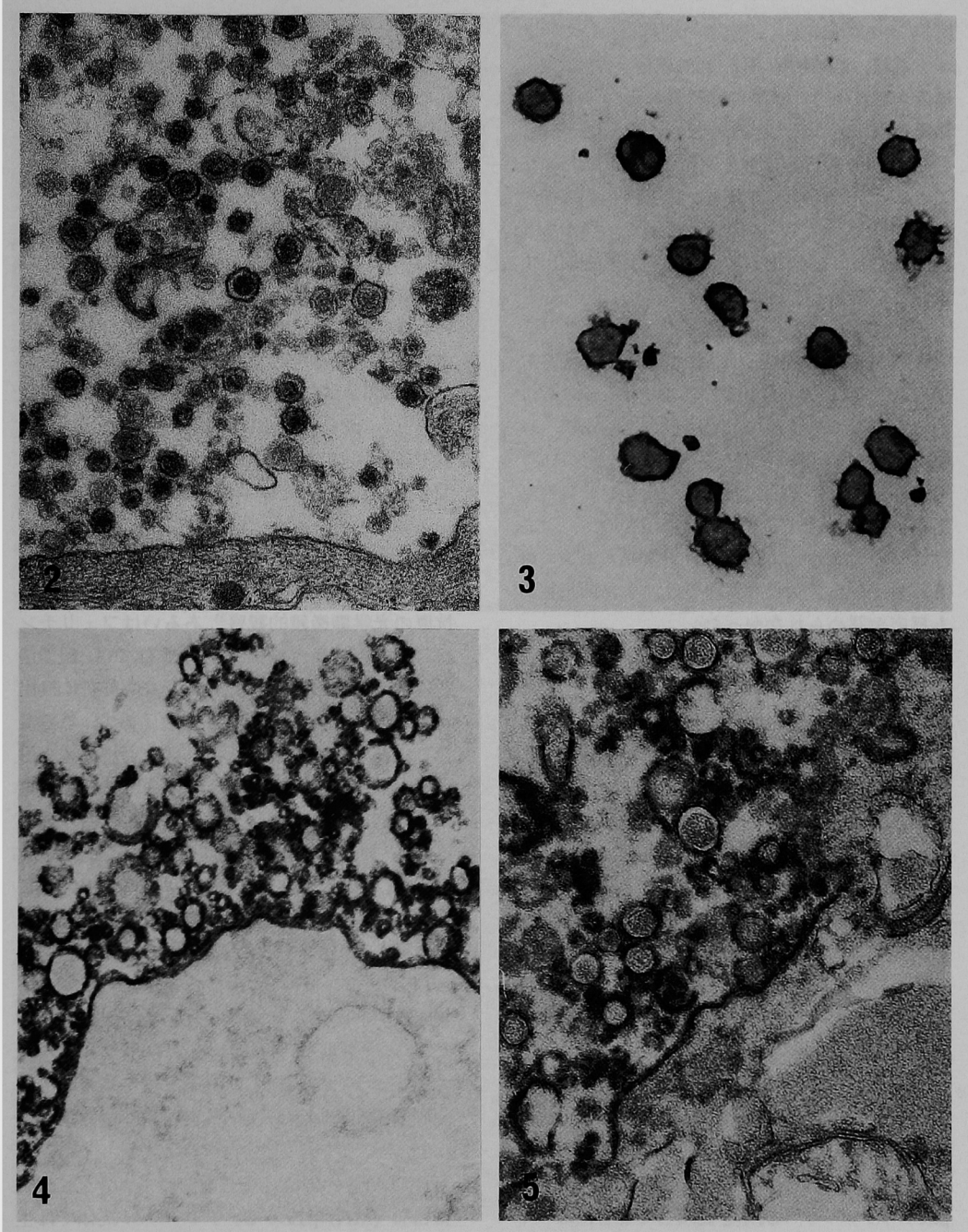


図2 MT-2細胞のグルタルアルデヒド-オスミウム酸固定，超薄切片，酢酸ウラニル-クエン酸鉛二重染色電顕写真。細胞外にHTLV-Iのウイルス粒子が多数みられる。(x46,000)

図3 ATL患者血清を用いて間接酵素抗体法で反応したMT-2細胞の光顕像。

図4 ATL患者血清を用いて浮遊細胞法で間接酵素抗体反応したMT-2細胞，HTLV-Iのウイルス表面と細胞膜に陽性反応が見られる。(x28,000)

図5 図4の酵素抗体反応後に酢酸ウラニル-クエン酸鉛二重染色を行ったもの，細胞外における陽性反応の大部分がウイルス粒子であることが確認できる。(x40,000)

固定,あるいはPFA固定後の細胞についてサポニン処理,凍結融解, NP-40処理等を試みたが,構造が壊れたり,抗原の非特異反応が強く,超微構造内における反応の局在が明瞭でなかった。ところがPFA固定細胞を凍結切片法で反応することによりウイルス内および細胞内への抗体の浸入が可能となり,超微構造の場で,ウイルス内,細胞質,核膜,核質への陽性反応を検出することが容易となった。

凍結切片法による各種抗原の検出

ATLA抗原の検出:ATL患者血清と反応に使用したMT-2, HUT-102細胞では多少の差はあるものの,ウイルス,細胞膜,小胞体膜,核膜にかなり強く陽性反応が見られた(図6)。HUT-102細胞においては核内にもかなり強い陽性反応が見られた(図7)。核小体内は陰性であった。陰性対照血清として使用した正常成人血清(図8),および正常マウス血清ではいずれの細胞にも反応が認められなかった。

抗p19モノクローナル抗体での抗原の検出:抗p19モノクローナル抗体ではMT-2, HUT-102, ATL-M, ATL-S細胞いずれもウイルスコアと被膜,細胞膜に陽性反応がみられた。特にウイルス放出部近辺の細胞膜に反応が強い。細胞質,核膜,核質は陰性であった(図9-11)。図9と同一標品を酢酸ウラン-ルークエン酸鉛二重染色を行い,免疫電顕像の陽性反応部位とウイルス,細胞膜,細胞質の微細構造との関係を確認した(図12)。

抗p24モノクローナル抗体での抗原の検出:電顕的観察の結果,抗p24モノクローナル抗体ではMT-2, HUT-102, ATL-M, ATL-S細胞いずれも主としてウイルスコア中心部に陽性反応が見られたが,細胞膜,細胞質,核膜,核質は陰性であった(図13-15)。

抗p24ポリクローナル抗体での抗原の検出:抗p24ポリクローナル抗体を使用した場合にはウイルスコアと被膜および細胞膜にも一部陽性反応が見られた。細胞質,核膜,核質は抗p24モノクローナル抗体と同様陰性であった(図16)。

対照細胞としてHTLV-Iの感染していないMolt-4細胞において,ATL患者血清,抗p19 MoAb,抗p24 MoAb,抗p24ポリクローナル抗

体ではいずれも陰性であった。すべての細胞において内在性ペルオキシダーゼ反応の検出を行ったが陰性であった。

以上の結果をまとめると表1のごとくである。

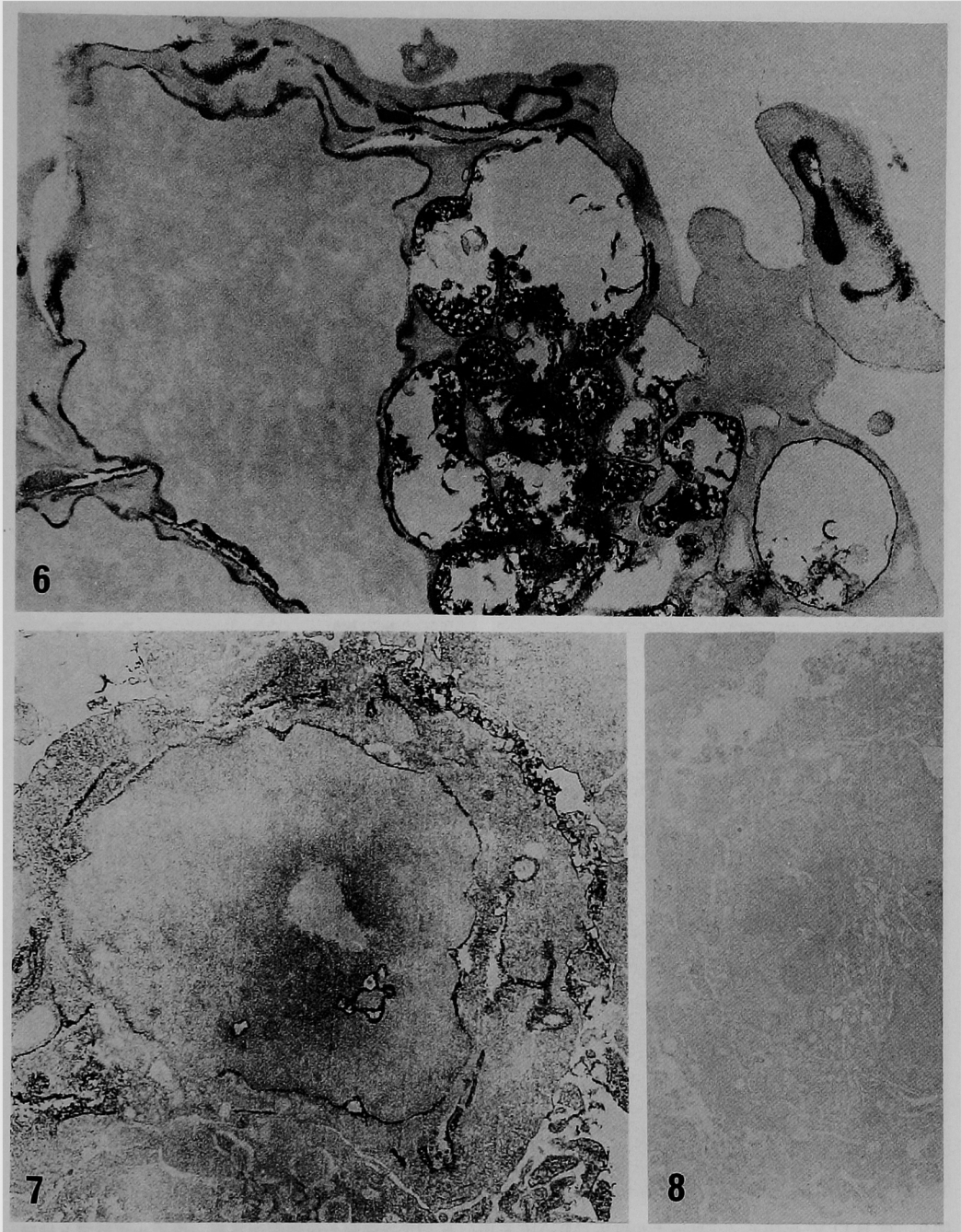
4. ウェスタンブロッティングでの抗原の検出

抗p19MoAbおよびATL患者血清を用いてHTLV-Iおよび各種細胞(MT-2, HUT-102, ATL-M, ATL-S, Molt-4)の抗原の検出を行った結果,抗p19MoAbによって,MT-2ではp19とp28の2本のバンドを認めたが,他の細胞およびHTLV-Iではすべてp19 1本のみであった。ATL患者血清によっては,MT-2ではp68, p46, p40, p28, p24, p19, p15などの各バンドを認め,他の細胞およびHTLV-Iでは主としてp46, p40, p24, p19, p15などが認められた。

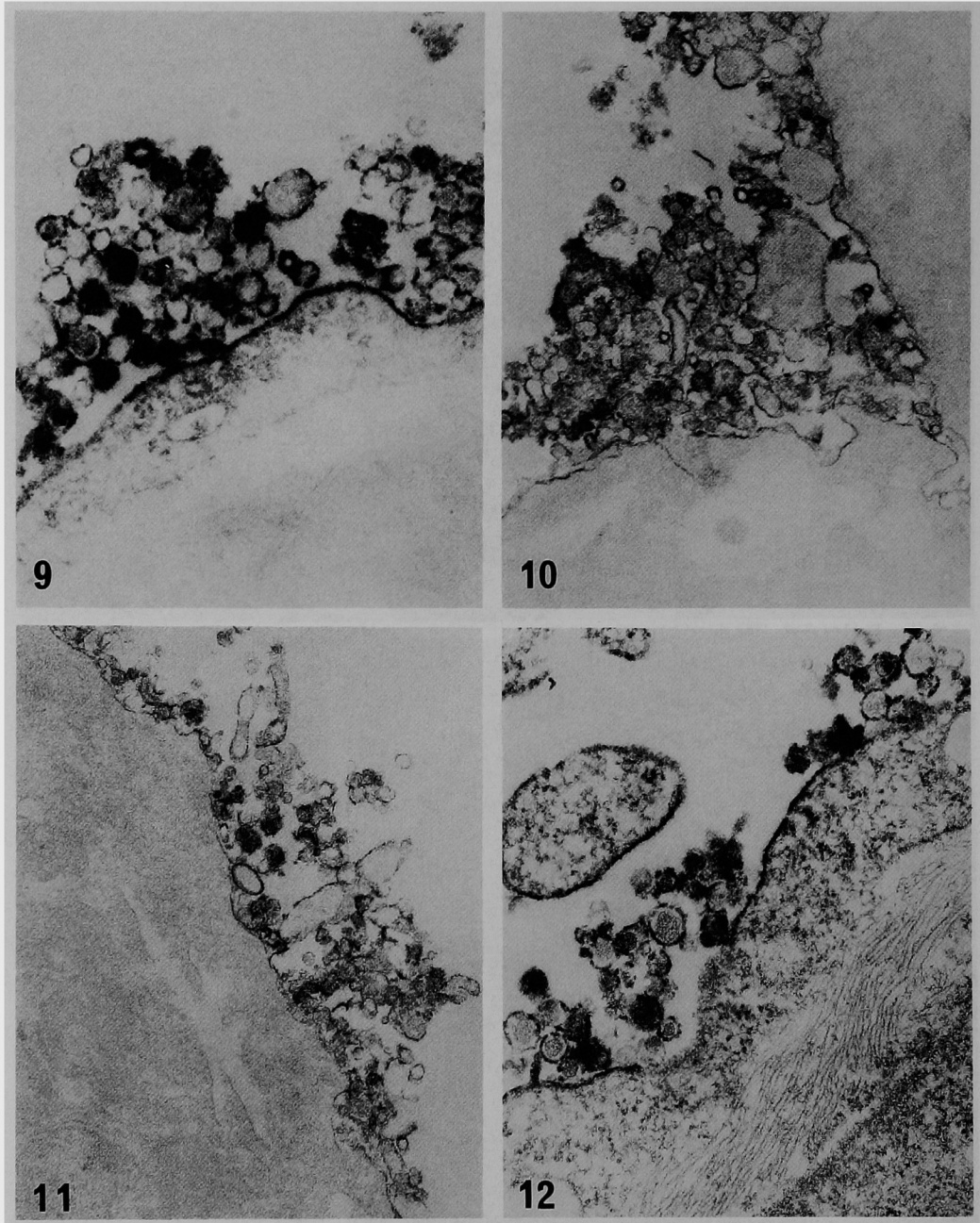
考 察

従来の蛍光抗体法や酵素抗体法によるATLA抗原の光学顕微鏡的観察²⁾,あるいはフェリチン抗体法による免疫電顕的観察¹⁸⁾⁻²⁰⁾では,超微構造内におけるHTLV-I抗原の局在を詳細に検出することができなかったが,著者はATL患者血清と内部構造蛋白質のモノクローナル抗体を用いて,凍結切片標本の酵素抗体法による免疫電顕的観察によって,HTLV-Iウイルス内およびHTLV-I感染細胞内におけるATLA抗原およびHTLV-I内部構造蛋白質の局在を検出することができた。浮遊細胞の免疫反応では抗体が内部に浸入し難いので,ATL患者血清を用いたATLA抗原の検出は,主にウイルス被膜および細胞膜表面にのみ観察された。この反応は主として,env蛋白質の反応である。凍結切片標本での反応によって,ATLA抗原はウイルス粒子,細胞膜,小胞体膜および核膜の内外葉に検出された。

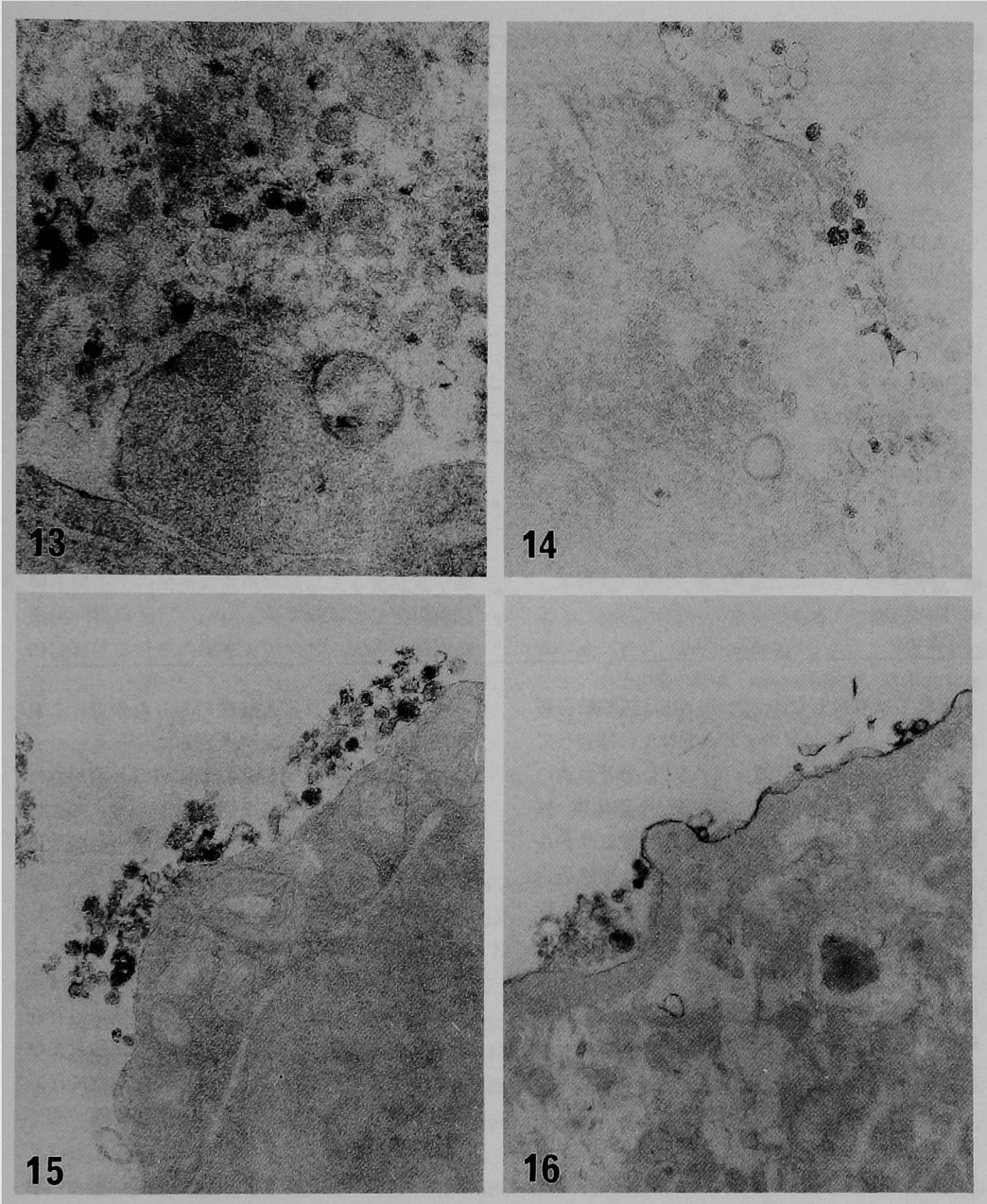
HTLV-I内部構造蛋白質のうち,マトリクス蛋白質(MA) p19のモノクローナル抗体では主としてウイルス被膜とその内部および細胞膜の一部に陽性反応が認められた。カプシド蛋白質(CA) p24のモノクローナル抗体では主としてウイルスコアに陽性反応が認められた。もう一種の内部構造蛋白質であるヌクレオカプシド蛋白質(NC) p15は抗体が入手できなかったの



- 図6 ATL患者血清で反応したMT-2細胞の免疫電顕写真(PFA固定-凍結切片法, 無染色標本像)。ウイルス, 細胞膜, 小胞体膜, 核膜に強い反応が見られる。(x11,700)
- 図7 ATL患者血清で反応したHUT-102細胞の免疫電顕写真。ウイルス, 細胞膜, 小胞体膜, 核膜に強い反応が見られ, 核質にも陽性反応が認められる。(x7,500)
- 図8 正常成人血清で酵素抗体反応したMT-2細胞(陰性対照標本)。(x3,600)



- 図9 抗 HTLV-Ip19モノクローナル抗体 (MoAb) を用いた MT-2細胞の免疫電顕写真. ウイルスコアと被膜に陽性反応が見られ, さらに細胞膜にも陽性反応が見られる. (x36,000)
- 図10 抗 p19MoAb を用いた ATL-M 細胞の免疫電顕写真. 図9の MT-2細胞と同様の陽性反応が見られる. (x18,000)
- 図11 抗 p19MoAb を用いた ATL-S 細胞の免疫電顕写真. MT-2細胞, ATL-M 細胞と同様の陽性反応が見られる. (x18,500)
- 図12 図9と同一標品に酢酸ウラニル-クエン酸鉛2重染色を行った免疫電顕像. ウイルス, 細胞膜, 細胞質の微細構造との関係を示す. (x36,000)



- 図13 抗 HTLV-Ip24MoAb を用いた MT-2細胞の免疫電顕写真. 主としてウイルスコアに陽性反応が局在し、細胞膜、核膜、核質には陽性反応が見られない。(x30,000)
- 図14 抗 p24MoAb を用いた ATL-M 細胞の免疫電顕写真. 図13の MT-2細胞と同様な陽性反応が見られる。(x18,000)
- 図15 抗 p24MoAb を用いた ATL-S 細胞の免疫電顕写真. MT-2細胞や ATL-M 細胞と同様な陽性反応が見られる。(x18,000)
- 図16 抗 HTLV-Ip24マウスポリクローナル抗体を用いた MT-2細胞の免疫電顕写真. ウイルスコアに陽性反応が見られることは、抗 p24MoAb を用いた場合と同様であるが、さらにウイルス被膜、および細胞膜にも陽性反応が認められる。(x18,500)

表1 各種抗体での抗原の検出

	ウイルスコア	ウイルス被膜	細胞膜	細胞質	小胞体膜	核膜	核質	核小体
抗 p19MoAb								
MT-2	+	+	+	-	-	-	-	-
HUT-102	+	+	+	-	-	-	-	-
ATL-M	+	+	+	-	-	-	-	-
ATL-S	+	+	+	-	-	-	-	-
Molt-4	-	-	-	-	-	-	-	-
抗 p24MoAb								
MT-2	+	-	-	-	-	-	-	-
HUT-102	+	-	-	-	-	-	-	-
ATL-M	+	-	-	-	-	-	-	-
ATL-S	+	-	-	-	-	-	-	-
Molt-4	-	-	-	-	-	-	-	-
抗 p24poly. Ab								
MT-2	+	+	+	-	-	-	-	-
Molt-4	-	-	-	-	-	-	-	-
ATL 患者血清								
MT-2	+	+	+	-	+	+	±	-
HUT-102	+	+	+	-	+	+	+	-
Molt-4	-	-	-	-	-	-	-	-

本実験では取扱わなかったが、p15は核酸結合蛋白質で、ウイルスコアのゲノム RNA に結合しているものと思われる。従って、ATL 患者血清による HTLV-I 産生細胞の細胞膜、小胞体膜、核膜における反応は患者血清中に存在するウイルス被膜蛋白質抗体に反応したウイルス被膜蛋白質およびその前駆蛋白質の局在を示すものと推論される。抗 p24マウスポリクローナル抗体を用いた場合にウイルスコアのみならずウイルス被膜及び細胞膜にも陽性反応が認められたことは抗体の作成に用いた p24が不純であったためと考えられる。

抗 p19モノクローナル抗体は HUT-102, ATL-M, ATL-S 細胞のウエスタンブロットでは p19 とのみ反応するが、MT-2細胞では p19の他に p28とも反応し²⁹⁾、また一部の p19モノクローナル抗体産生細胞クローンの p19モノクローナル抗体では感染細胞の p19の他、正常な胸腺上皮細胞や胎児細胞その他にも非特異的に反応する細胞があることが報告されている³⁰⁾⁻³²⁾。しかし、本実験においては、p19および p24モノクローナル抗体による反応は HTLV-I 非感染対照細胞ではすべて陰性であり、また本実験条件下では内在性ペ

ルオキシダーゼ反応も陰性であったので、これらの反応の特異性が証明される。

pol 遺伝子産物の逆転写酵素 (RT) の局在は未だ実験的に検出されていないが、ウイルス内では当然コア内に、またウイルス産生細胞では核内にあるものと思われる。

pX 遺伝子産物の超微構造内局在については、Oda ら^{33),34)}が p40^x抗体を用いた酵素抗体法による免疫電顕的検出によって、p40^xが HTLV-I 産生細胞の核内、主に真正クロマチン領域に存在することを証明した。ただし、MT-2細胞およびそれとの混合培養によって感染した細胞では、核内の p40^xのみならず、核膜、小胞体膜が強く陽性染色されることを見出した。このことはそれらの細胞中に p40^xと *env* 蛋白質の一部との融合蛋白質 p68が存在し、それが p40^xとエピトープを共有するためであると推論している³⁵⁾。

これら諸種の HTLV-I 抗原の局在と生物作用の相関は HTLV-I による細胞変換や ATL の成因の分子機構の解明のために今後更に詳細に研究されなければならない。なお最近、HTLV-I は ATL のみならず、HTLV-I 関連癌性脊髄麻痺 (HAM/TSP)³⁵⁾⁻³⁸⁾やびまん性汎細気管支炎

いわゆる HTLV-I 関連気管支炎 (HABA)^{39),40)} の病因とも密接な関連があることが報告されている。これらの疾患における HTLV-I の遺伝子構造には差異は見出されておらず、その分子機構は今後の課題であるが、それらの病因の究明のためにも、HTLV-I 抗原の局在とその生物作用および免疫反応の比較研究が期待される。

結 論

成人 T 細胞白血病 (ATL) の病因となるヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-I) および HTLV-I 産生細胞の超微構造内における ATL 関連抗原 (ATLA) すなわち HTLV-I 抗原、殊に内部構造蛋白質 (MA, p19 および CA, p24) の局在を明らかにするために、ATL 患者血清、抗 p19 および抗 p24 モノクローナル抗体を用いて、凍結切片標本での間接酵素抗体法による免疫電子顕微鏡的観察を行い、ウイルス内および感染細胞内における抗原の局在を追究し、次の結果を得た。

1. ウイルス内および細胞内の超微構造における抗原の局在は浮遊細胞での免疫反応では検出

できず、パラフォルムアルデヒド固定細胞の凍結切片標本での電顕酵素抗体法によって検出できた。

2. 抗 p19 モノクローナル抗体によりウイルスマトリクス蛋白質 (MA, p19) はウイルス被膜とその内部および細胞膜の一部に検出された。

3. 抗 p24 モノクローナル抗体により、カプソメア蛋白質 (CA, p24) はウイルスコアに局在して検出された。

4. ATL 患者血清によって HTLV-I の被膜および HTLV-I 産生細胞の細胞膜、小胞体膜、核膜内外葉に検出される陽性反応は主として HTLV-I 被膜蛋白質またはその前駆蛋白質によるものと推論された。

謝 辞

本研究の遂行と論文作成にあたり、御懇篤なご指導とご校閲を賜った恩師小田琢三教授に深甚の謝辞を表します。また、実験遂行にあたりご協力をいただいた渡辺晰子助手、中村孝志技官、安井民枝様をはじめ教室の皆様へ感謝致します。

文 献

- 1) Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD and Gallo RC : Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* (1980) **77**, 7415—7419.
- 2) Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita K, Shirakawa S and Miyoshi I : Adult T-cell leukemia : Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci USA* (1981) **78**, 6476—6480.
- 3) Yamamoto N, Schneider J, Koyanagi Y, Hinuma Y and Hunsmann G : Adult T-cell leukemia (ATL) virus-specific antibodies in ATL patients and healthy virus carriers. *Int J Cancer* (1983) **32**, 281—287.
- 4) Yoshida M, Miyoshi I and Hinuma Y : Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA* (1982) **79**, 2031—2035.
- 5) Seiki M, Hattori S, Hirayama Y and Yoshida M : Human adult T-cell leukemia virus : Complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* (1983) **80**, 3618—3622.
- 6) Gallo R, Wong-Staal F, Montagnier L, Haseltine WA and Yoshida M : HIV/HTLV gene nomenclature. *Nature* (1988) **333**, 504.
- 7) Leis J, Baltimore D, Bishop JM, Coffin J, Fleissner E, Goff SP, Oroszlan S, Robinson H, Skalka

- AM, Temin HM and Vogt V : Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J Virol* (1988) **62**, 1808—1809.
- 8) Slamon DJ, Shimotohno K, Cline MJ, Golde DW and Chen ISY : Identification of the putative transforming protein of the human T-cell leukemia viruses HTLV-I and HTLV-II. *Science* (1984) **226**, 61—65.
 - 9) Miwa M, Shimotohno K, Hoshino H, Fujino M and Sugimura T : Detection of pX proteins in human T-cell leukemia virus (HTLV)-infected cells by using antibody against peptide deduced from sequences of X-W DNA of HTLV-I and XcDNA of HTLV-II proviruses. *Gann* (1984) **75**, 752—755.
 - 10) Lee TH, Coligan JE, Sodroski JG, Haseltine WA, Salahuddin SZ, Wong-Staal F, Gallo RC and Essex M : Antigens encoded by the 3'-terminal region of human T-cell leukemia virus : evidence for a functional gene. *Science* (1984) **226**, 57—61.
 - 11) Sodroski JG, Rosen CA and Haseltine WA : *trans*-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells. *Science* (1984) **225**, 381—385.
 - 12) Inoue J, Seiki M, Taniguchi T, Tsuru S and Yoshida M : Induction of interleukin 2 receptor-gene expression by p40* encoded by human T-cell leukemia virus type I. *EMBO J* (1986) **5**, 2883—2888.
 - 13) Felber BK, Paskalis H, Kleinman-Ewing C, Wong-Staal F and Pavlakis GN : The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeats. *Science* (1985) **229**, 675—679.
 - 14) Schneider J, Yamamoto N, Hinuma Y and Hunsmann G : Sera from adult T-cell leukemia patients react with envelope and core polypeptides of adult T-cell leukemia virus. *Virology* (1984) **132**, 1—11.
 - 15) Sugamura K, Fujii M, Kannagi M, Sakitani M, Takeuchi M and Hinuma Y : Cell surface phenotypes and expression of viral antigens of various human cell lines carrying human T-cell leukemia virus. *Int J Cancer* (1984) **34**, 221—228.
 - 16) Goh WC, Sodroski J, Rosen C, Essex M and Haseltine WA : Subcellular localization of the product of the long open reading frame of human T-cell leukemia virus type I. *Science* (1985) **227**, 1227—1228.
 - 17) Kiyokawa T, Kawaguchi T, Seiki M and Yoshida M : Association of the pX gene product of human T-cell leukemia virus type-I with nucleus. *Virology* (1985) **147**, 462—465.
 - 18) Nakai M, Goto T, Miyoshi H, Sano K, Chosa T and Hinuma Y : Reactivity of sera from patients with adult T-cell leukemia (ATL) with type C virus particles associated with ATL cell lines : Immunoelectron microscopic study. *Gann* (1982) **73**, 511—513.
 - 19) Ohtsuki Y, Akagi T, Takahashi K and Miyoshi I : Detection of antibodies to adult T-cell leukemia (ATL)-associated virus in ATL patients' sera by immunoelectron microscopy. *J Cancer Res Clin Oncol* (1983) **106**, 240—243.
 - 20) Aoki T, Hamada C, Ohno S, Miyakoshi H, Koide H, Guroff MR, Ting RC and Gallo RC : Location of human T-cell leukemia virus (HTLV) P19 antigen on virus-producing cells. *Int J Cancer* (1984) **33**, 161—165.
 - 21) Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraishi Y, Nagata K and Hinuma Y : Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T-cells. *Nature* (1981) **294**, 770—771.
 - 22) Minowada J, Ohnuma T and Moore GE : Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J Natl Cancer Inst* (1972) **49**, 891—

- 895.
- 23) Tanaka Y, Koyanagi Y, Chosa T, Yamamoto N and Hinuma Y : Monoclonal antibody reactive with both P28 and P19 of adult T-cell leukemia virus-specific polypeptides. *Gann* (1983) **74**, 327—330.
 - 24) Tanaka Y, Lee B, Inoi T, Tozawa H, Yamamoto N and Hinuma Y : Antigens related to three core proteins of HTLV- I (p24, p19 and p15) and their intracellular localization, as defined by monoclonal antibodies. *Int J Cancer* (1986) **37**, 35—42.
 - 25) Graham RC and Karnovsky MJ : The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney : ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem* (1966) **14**, 291—302.
 - 26) Oda T, Watanabe S, Arakaki Y, Hatsushika M, Sumii H, Nakamura T, Suma F and Hisatake K : Immunoelectron microscopy of adult T-cell leukemia-associated antigen by the peroxidase-labeled antibody method. *Cell Mol Biol* (1985) **31**, 49—56.
 - 27) Oda T, Hatsushika M, Watanabe S, Ikeda S, Sumii H, Arakaki Y, Nakamura T, Tsutsui K, Seki S, Akiyama K, Wada T, Nakashima A, Suma F and Murakami M : Immunoelectron microscopic and immunoblotting analysis of a retrovirus produced in a human lymphoblastoid cell line with a monoclonal antibody. *Cell Mol Biol* (1986) **32**, 343—350.
 - 28) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) **227**, 680—685.
 - 29) Towbin H, Staehelin T and Gordon J : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* (1979) **76**, 4350—4354.
 - 30) Haynes BF, Guroff MR, Metzgar RS, Franchini G, Kalyanaraman VS, Palker TJ and Gallo RC : Monoclonal antibody against human T cell leukemia virus P19 defines a human thymic epithelial antigen acquired during ontogeny. *J Exp Med* (1983) **157**, 907—920.
 - 31) Suni J, Narvanen A, Wahlstrom T, Lethovirta P and Vaheri A : Monoclonal antibody to human T-cell leukemia virus P19 defines polypeptide antigen in human choriocarcinoma cells and syncytiotrophoblasts of first-trimester placentas. *Int J Cancer* (1984) **33**, 293—298.
 - 32) Palker TJ, Scarce RM, Ho W, Copeland TD, Oroszlan S, Popovic M and Haynes BF : Monoclonal antibodies reactive with human T cell lymphotropic virus (HTLV I) P19 internal core protein : cross-reactivity with normal tissues and differential reactivity with HTLV types I and II. *J Immunol* (1985) **135**, 247—254.
 - 33) Oda T, Watanabe S, Sumii H, Nakamura T, Arakaki Y and Shimotohno K : Immunoelectron microscopic localization of the pX gene products in human T-cell leukemia virus type I-producing cells. *Cancer Res* (1987) **47**, 2077—2082.
 - 34) 小田琢三 : ヒトT細胞白血病ウイルス抗原とその免疫電顕的局在. *組織培養* (1988) **14**, 84—89.
 - 35) Koprowski H, DeFreitas EC, Harper ME, Sandberg-Wollheim M, Sheremota WA, Robert-Guroff M, Saxinger CW, Feinberg MB, Wong-Staal F and Gallo RC : Multiple sclerosis and human T-cell lymphotropic retroviruses. *Nature* (1985) **318**, 154—160.
 - 36) Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M and Tara M : HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* (1986) **1**, 1031—1032.
 - 37) Jacobson S, Raine CS, Mingioli ES and McFarlin DE : Isolation of an HTLV- I-like retrovirus from patients with tropical spastic paraparesis. *Nature* (1988) **331**, 540—543.

- 38) Reddy EP, Mettus RV, DeFreitas E, Wroblewska Z, Cisco M and Koprowski H : Molecular cloning of human T-cell lymphotropic virus type I-like proviral genome from the peripheral lymphocyte DNA of a patient with chronic neurologic disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* (1988) **85**, 3599—3603.
- 39) Kimura I, Tsubota T, Tada S and Sogawa J : Presence of antibodies against adult T cell leukemia antigen in the patients with chronic respiratory diseases. *Acta Med Okayama* (1986) **40**, 281—284.
- 40) 木村郁郎 : HTLV-I 関連細気管支・肺胞異常症, HTLV-I associated bronchiolo-alveolar disorder (HABA) — DPB, IIP における ATL の存在とその本態一. *日胸* (1988) **47**, 283—293.

Immunoelectron microscopic studies on human T-cell leukemia virus antigens with special reference to the inner structural proteins

Fumihiko SUMA

Department of Biochemistry, Cancer Institute,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. T. Oda)

The locations of human T-cell leukemia (HTLV-I) antigens in HTLV-I and HTLV-I-producing T-cells were studied with special reference to the inner structure proteins (MA, p19 and CA, p24) by electron microscopy using the peroxidase-labeled antibody method with monoclonal antibodies. ATL-associated antigens (ATLA) were detected by electron microscopy of cells incubated in cell suspension with sera from adult T-cell leukemia (ATL) patients on the surface of virus particles and the plasma membrane, but not inside the virus and cells. Intraviral and intracellular antigens were detected by the immunoelectron microscopy of frozen-sectioned specimens of paraformaldehyde-fixed cells. The viral matrix protein (MA, p19) was detected with the anti-p19 monoclonal antibody in the viral envelope, the viral matrix and some parts of the plasma membrane. The viral capsid protein (CA, p24) was detected with the anti-p24 monoclonal antibody in the viral core. The positive reactions detected on the viral envelope, plasma membrane, endoplasmic reticulum, and nuclear envelope with sera of ATL patients were deduced to be mainly due to the viral envelope proteins and their precursors or to proteins fused to the viral envelope proteins.