

HVJ(Sendai
virus)持続感染細胞におけるウイルス変異：
特に持続感染成立初期ウイルスについて

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8965

HVJ (Sendai virus) 持続感染細胞におけるウイルス変異

—特に持続感染成立初期ウイルスについて—

金沢大学がん研究所ウイルス部 (主任: 波田野基一教授)

佐 藤 祐 一

(昭和57年1月9日受付)

多くのヒトウイルス病における, ウイルス持続感染の病因論的重要性にかんがみ, 試験管内 HVJ (Sendai virus) 持続感染が, そのモデルとして, 検討された. 特に持続感染成立初期の, いくつかの問題を追求した. まず, 39°Cで cloning し, 温度感受性 (ts) 変異株を含まぬと思われる野生株の HVJcl.01 を持続感染化させた, GM₂HVJcl.01 細胞の継代 12 代目の培養上清から, 19 クローンの HVJ を分離した. これらのうち, 2 クローン (HVJcl.1205 及び HVJcl.1207) は, 39°Cで増殖の低い ts 変異株であった. そして, 他にエラスターゼで活性化される変異株を, 9 クローン含んでいるが ts の性質はなかった. 2 ts 変異株感染細胞の培養温度の shift up, shift down の実験から, これらのウイルスの ts 部位は, どちらもウイルス複製の後期にあることがわかった. そして, 非許容温度での相補性試験で, 弱いながら相補性がみられたことから, お互いの ts 部位は, 少し異なるが, 似ているものと思われた. 蛍光抗体染色法により検出されるウイルス特異的抗原は, 非許容温度で, 細胞質にはみられたが, 細胞膜にはみられなかった. また, これらに関連して測定された, ウイルス RNA の合成は, HVJcl.1207 感染細胞では, 許容温度でのそれと比較して, 野生株の場合の約 70 %に減少していた. HVJcl.1205 の場合は, 野生株とほとんど変わらず, 正常に機能していない RNA 合成を含むものと思われた. さらに, 持続感染から分離されたウイルスは, ts 変異株であるなしにかかわらず, 一様に細胞病原性が弱くなっていた. 以上の事実から, HVJ 持続感染は, 一般的に ts, エラスターゼ活性化, 弱細胞病原性変異などの諸変異を, 持続感染成立初期でも, 起こしているものと考えられた.

Key words HVJ (Sendai virus), 温度感受性 (ts) 変異株, 持続感染, complementation, 細胞病原性

生体における, 非腫瘍原性ウイルス持続感染¹⁾²⁾のモデルとして, 培養細胞を用い, その成立維持に関与する因子の解明に, 種々のウイルス-細胞系を用いた研究が報告されている³⁾. その中で, DNA 型ウイルスの場合は, 一般に, ウイルス DNA ゲノムが宿主細胞染色体に組み込まれたかたちで持続感染化している (例えばヘルペスウイルスグループなど)⁴⁾. しかし RNA 型ウイルスの場合の機作に関しては不明な点が多い⁵⁾が Friedman ら⁶⁾は持続感染成立維持の重要な因子として, defective interfering particles (DIP と略), イ

ンターフェロン (IFN と略), ウイルス RNA の (complementary DNA: cDNA として) 宿主細胞染色体への組み込み, そして, 温度感受性 (ts) 変異株の 4 つをあげている. これらのうち, DIP に関しては, Holland ら⁵⁾は長期にわたる VSV (vesicular stomatitis virus) 持続感染細胞において, 完全なウイルス粒子と RNA サイズの異なる DIP が持続感染成立維持に重要な働きをしていると報告している. しかし, Kanda ら⁶⁾は Vero 細胞の HVJ 持続感染細胞で DIP が関与していないと報告している. そして, 彼らの用いた Vero 細胞は IFN

Development of HVJ (Sendai virus) Mutants in HVJ Persistently Infected Cells: Characteristics of HVJ Isolated from Early Stage of Establishment of HVJ Carrier Cells. Yuichi Sato, Department of Virology (Director: Prof. M. Hatano), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

非産生細胞⁷⁾であることから IFN も関与していないと考えられる。だが IFN が関与しているという報告⁸⁾もあり、IFN または DIP は、必ずしも必要な因子とはなっていない。また、レトロウイルスで知られていると同じ様な機作⁹⁾で、ウイルス RNA が cDNA となり宿主細胞 DNA に組み込まれるという考え¹⁰⁾¹¹⁾に関しては、否定的な報告⁵⁾¹²⁾¹³⁾もあり、未だ未解決の問題となっている。

一方、ウイルス持続感染細胞からは、持続感染成立維持におけるその役割は明らかではないが、ts 変異株が分離されるという報告¹⁴⁾¹⁵⁾も多い。著者の研究室においても、森田¹⁶⁾は、長期にわたって継代された HVJ 持続感染細胞中に ts 変異株の存在することを報告している。しかも、これら ts 変異株は細胞病原性が弱いという性質¹⁵⁾¹⁶⁾を同時に持つことも多く、持続感染成立維持への関与が示唆されている。だが、これら持続感染細胞由来の ts 変異株も、ウイルスが十分機能できる許容温度でも、持続感染が成立することから¹⁶⁾、ts 変異が、持続感染成立維持にどれほど重要な役割を果しているか疑問もある。そこで著者は、持続感染成立初期の細胞からウイルスを分離し、ts 変異株の性質と弱細胞病原性(持続感染成立のしやすさ)との関係についてらべた。

材料と方法

1. 使用細胞と培養条件

ウイルス持続感染に用いた細胞は、GM₂ (GN 系、ゴールデンハムスターのメチルコラントレン誘発肉腫由来) 細胞¹⁷⁾で、10% 仔牛血清加 Eagle の MEM (minimal essential medium) で培養した。HVJ の持続感染 GM₂ 細胞も、同じ条件で培養した。HVJ の感染価の測定に用いた LLC-MK₂ (Rhesus monkey kidney 由来) 細胞は、5% 仔牛血清加 Eagle の MEM で培養した。GM₂ 及び HVJ 持続感染細胞は 34°C、LLC-MK₂ 細胞は、37°C で培養し、継代は、0.02% EDTA (ethylenediaminetetraacetate) と 0.25% トリプシン (Difco) を用いて行なった。また、ウイルス RNA の合成をしらべるために、11 日令の鶏胎子を細切後、トリプシンで消化して single cell とし、10% 仔牛血清加 Eagle の MEM で、37°C に培養した。

2. ウイルス

HVJ 名古屋 1-60 株の野生株を 39°C で連続 3 回 single plaque isolation により cloning しさらに、発育鶏卵にて、39°C で増殖させたウイルス (HVJ cl. 01) を持続感染に用いた。また、持続感染細胞から分離されたウイルスは、LLC-MK₂ 細胞と同様に 3 回 cloning し、同じ細胞で、トリプシン (Sigma) 1 μg/ml 又はエ

ラスターゼ (Sigma) 10 μg/ml 存在下にて増殖させた。これらのウイルスは、使用まで -80°C に保存した。

3. ウイルスの定量

i) HVJ の感染価測定は、Sugita¹⁸⁾らの方法に従った。すなわち、LLC-MK₂ 細胞を用い、ウイルス接種後 30 分室温でインキュベートし、細胞を Hanks' BSS (balanced salt solution) で洗滌後、トリプシン又はエラスターゼ (それぞれ、ウイルスを増殖させた時と同じ量) を含む、0.8% 寒天 (Difco) MEM 重層による plaque 法で、HVJ 感染後 7 日目に、0.01% ニュートラルレッドを含む寒天培地 (一回目の重層と同じ) で再重層し、14 日目で、plaque 数をかぞえた。培養温度は ts 変異株を考慮し、32°C で行なった。

ii) HVJ の赤血球凝集素 (Hemagglutinin: HAin) の定量は、マイクロタイター法を用い、ウイルス液を 2 倍階段希釈した後、0.25% ニワトリ赤血球を 0.05 ml 加え、4°C に 90 分放置し判定した。凝集力価は、完全凝集を示した最終希釈倍数をもってその価とした。

4. ウイルス RNA の合成

鶏胎子細胞にウイルスを、感染多重度 (multiplicity of infection: m. o. i.) 5 PFU/細胞で感染させ、32°C で 48 時間培養した後、一部を 39°C に移して培養する。そして 2 時間後に actinomycin D (act D と略) (P-L biochemicals) 10 μg/ml で 30 分処理し、act D 存在下、³H] uridine (29 Ci/mmol, RCC Amersham) 10 μCi/dish で 6 時間ラベルした。その後 2% SDS (sodium dodecyl sulfate) 加 STE buffer¹⁹⁾ (0.1 M NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4) で細胞を溶解し 10% TCA (trichloroacetic acid) 等量を加え、酸不溶画分を GF/C ガラスフィルター (Whatman) に乗せた。以後、シンチラント (DPO 4 g と POPOP 0.1 g をトルエン 1 l に溶解したもの) を加え、液体シンチレーションカウンター (Beckman LS 9000) にて cpm を測定した。

5. 蛍光抗体 (FA) 染色法

HVJ 野生株で免疫した家兎から得た抗血清に蛍光色素 (FITC) をラベルし、蛍光抗体染色液とした²⁰⁾。HVJ の抗原検索は、カバースリップ上に培養した細胞を、アセトン固定、又は未固定で染色した。

6. immunoprecipitation 法

基本的操作法は Wechsler ら²¹⁾の方法に準じた。すなわち、LLC-MK₂ 細胞に HVJ を感染させ、72 時間後に Hanks' BSS で洗い、methionine を含まない培地 (Eagle の MEM) で 10 分間処理し、その後、³⁵S] methionine (600 Ci/mmol, Commissariat a l'Énergie Atomique) 10 μCi/dish で 3 時間ラベルした。次に、PBS (phosphate buffered saline) で細胞を洗い、

rubber policeman で細胞をはがし PBS で洗滌 (1500 rpm で 10 分間遠心) 後, 1% Triton X-100 含有 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) で細胞を溶解した。1 時間 4°C に放置後, 4°C で 30 分間遠心 (2000 rpm) し, 上清に抗血清 (蛍光抗体法に使用した抗血清と同じ) 20 μl 加え 4°C に一夜放置し反応させた。さらに, Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia) を加え 1 時間 4°C に放置し, 沈渣を SDS-polyacrylamide gel (ゲル濃度 10%) で電気泳動 (SDS-PAGE) をした。ゲルは乾燥後, X 線フィルムにはりつけ, オートラジオグラフィを行なった。

7. 相補性試験 (complementation test)

ts 変異株を単独の場合は, m.o.i. 5 PFU/細胞で, 2 つの ts 変異株を同時に感染させる場合は, それぞれ m.o.i. 2.5 PFU/細胞で LLC-MK₂ 細胞に感染させ 39°C で 48 時間培養した。そして, 単独, 混合感染のウイルスの培養液中への産生を測定し, 次の式により complementation index を求めた²²⁾²³⁾。

$$\text{complementation index} = \frac{\text{yield}(A+B)}{\text{yield}(A) + \text{yield}(B)}$$

(A, B は各 ts 変異株を表わす)

complementation index が 2 以上のとき相補性陽性²²⁾と判定した。

8. 持続感染細胞分離ウイルスの細胞増殖阻害試験

LLC-MK₂ 細胞をトリプシン (Difco) 消化し, 浮遊状態にして, 分離した HVJ をそれぞれ, m.o.i. 5 PFU/細胞で感染させた。室温で 30 分吸着後 Hanks'BSS で洗滌し, 細胞数をかぞえ, 5.0 × 10⁴ 個/ペトリ皿 (直径 35 mm, Falcon) の濃度で細胞を植え, 34°C で培養し, 4 日目と 7 日目に増殖した細胞数をかぞえ, その感染による増殖への影響をみた。

成 績

1. HVJ 持続感染細胞からの ts 変異株の分離

GM₂ 細胞に HVJcl.01 を m.o.i. 0.001 PFU/細胞で感染させ, 34°C で継代して, HVJ 持続感染 GM₂ (GM₂ HVJcl.01) 細胞を樹立後, 継代第 12 代 (感染後 84 日) の培養上清からウイルスを分離した。その後 3 回 cloning 後, LLC-MK₂ 細胞に m.o.i. 5 PFU/細胞で感染させ, 39°C と 32°C における, 48 時間後のウイルス増殖量

Table 1. Comparative yield at 32°C and 39°C of several HVJ clones (cl.) newly recovered from GM₂-HVJcl.01 cells

Viruses	Yield (PFU/ml)		Yield at 39°C
	at 32°C	at 39°C	Yield at 32°C
cl. 01	1.2 × 10 ⁸	6.3 × 10 ⁷	5.3 × 10 ⁻¹
cl. 1201	4.2 × 10 ⁷	2.8 × 10 ⁶	6.6 × 10 ⁻²
1202	3.5 × 10 ⁷	4.5 × 10 ⁶	1.3 × 10 ⁻¹
1203	4.4 × 10 ⁷	2.2 × 10 ⁶	5.0 × 10 ⁻²
1204	2.4 × 10 ⁸	3.6 × 10 ⁶	1.5 × 10 ⁻²
1205	2.0 × 10 ⁷	1.1 × 10 ⁴	5.5 × 10 ⁻⁴
1206	5.5 × 10 ⁵	1.4 × 10 ⁵	2.5 × 10 ⁻¹
1207	1.1 × 10 ⁷	2.0 × 10 ³	1.8 × 10 ⁻⁴
1208	9.5 × 10 ⁷	2.3 × 10 ⁷	2.4 × 10 ⁻¹
1209	1.2 × 10 ⁷	4.9 × 10 ⁵	4.1 × 10 ⁻²
1211	1.4 × 10 ⁸	2.2 × 10 ⁷	1.6 × 10 ⁻¹
cl. e1201	1.0 × 10 ⁶	5.5 × 10 ⁴	5.5 × 10 ⁻²
e1202	6.5 × 10 ⁶	1.4 × 10 ⁵	2.2 × 10 ⁻²
e1204	4.7 × 10 ⁶	4.0 × 10 ⁵	8.5 × 10 ⁻²
e1205	2.5 × 10 ⁶	2.5 × 10 ⁵	1.0 × 10 ⁻¹
e1251	1.2 × 10 ⁷	8.0 × 10 ⁵	6.7 × 10 ⁻²
e1252	5.5 × 10 ⁶	6.5 × 10 ⁵	1.2 × 10 ⁻¹
e1253	1.5 × 10 ⁷	1.9 × 10 ⁶	1.3 × 10 ⁻¹
e1254	2.0 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁶	9.0 × 10 ⁻²
e1255	7.5 × 10 ⁶	1.9 × 10 ⁶	2.5 × 10 ⁻¹

Each clone was inoculated on LLC-MK₂ cells at an m.o.i. of 5 PFU/cell and incubated for 48 hr at 32°C or 39°C. Viruses harvested 48 hr after infection were assayed on LLC-MK₂ cells at 32°C.

を各クローンで比較した (表 1)。

これを見ると、39°Cと32°Cの増殖比は、19クローンで、 $2.5 \times 10^{-1} \sim 1.8 \times 10^{-4}$ を示し、温度感受性の程度が、それぞれ異なるウイルスが存在していた。この39°Cと32°Cの増殖比が、 1.0×10^{-3} 以下をts変異株としてあつかうと、2個のts変異株(HVJcl.1205とHVJcl.1207)が含まれ、この状態の持続感染細胞よりのts変異株の分離率は2/19(表1のエラスターゼクローンも含めて)約10%であった。また、同じ培養上清中には、エラスターゼで活性化される、いわゆる protease activation mutant virus²⁴⁾が、 2.5×10^{-4} の頻度で含まれていた²⁵⁾。これら、エラスターゼで活性化されるウイルスについて、9個のクローンの39°Cと32°Cの増殖比をしらべたが、ts変異株は含まれていなかった(表1)。

2. ts変異株のts部位推定実験

分離された2個のts変異株(HVJcl.1205とHVJcl.1207)についてtsの部位がどこに存在するのかしらべるため、培養温度のshift up(32°Cから39°Cへ)、shift down(39°Cから32°Cへ)の実験を行なった。両ウイルスをm.o.i. 5 PFU/細胞でLLC-MK₂細胞に感染させ、感染後、shift upする時間を変化させると、HVJcl.1205では10時間以前で、HVJcl.1207では、13時間以前でshift upすると、いずれでもウイルスの産生がみられなかった(図1、図2)。また、shift downの実験では、感染後、24時間にshift downすると、両ウイルスとも、5時間後にウイルスの産生がみられた(図1、図2)。以上の実験から、両ts変異株の温度感受性の部位は、ウイルス感染後約10時間前後の後期にあると考えられた。

3. ts変異株のviral RNA (v-RNA)の合成比の比較

2個のts変異株HVJcl.1205、HVJcl.1207のv-RNA合成能が、39°Cと32°Cで変化するか否か、primary chick embryo cellでしらべた。chick embryo cellに両ts変異株をm.o.i. 5 PUF/細胞で感染させ、32°Cで48時間培養後、一部を39°Cに移し、act D存在下で³H]uridineのとり込み、すなわち、v-RNAの合成をみた(表2)。

HVJcl.1205は、野生株HVJcl.01の39°Cと32°Cの合成比(0.73)と比較してもその比が0.75とほぼ等しかったが、HVJcl.1207はその比が0.50と約30%低下していた。この表2には、他の持続感染細胞から得られたts変異株のv-RNA合成も比較のために表わした。そのうち、HVJcl.14はG₂(骨髄巨細胞腫由来)細胞のHVJ持続感染細胞から分離されたウイルス²⁶⁾で、39°Cでは、v-RNA合成がマイナスで、阻害されるもの、HVJcl.151は、BHK(baby hamster kidney由来)

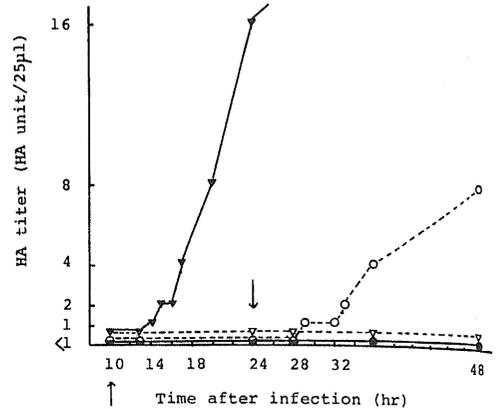


Fig. 1. One-step growth of HVJcl.1205 in LLC-MK₂ cells. LLC-MK₂ cells were infected with HVJcl.1205 at an input multiplicity of 5 PFU/cell and incubated in 2 ml of maintenance medium at 32°C or 39°C. At various times after infection, medium were harvested and assayed for hemagglutinin activity (▼—▼, 32°C; ●—●, 39°C). Culture temperature of one series of the cells incubated at 39°C was shifted down to 32°C (○—○) 24hr after infection, and the one of other series at 32°C was shifted up to 39°C (▽—▽) 10hr after infection.

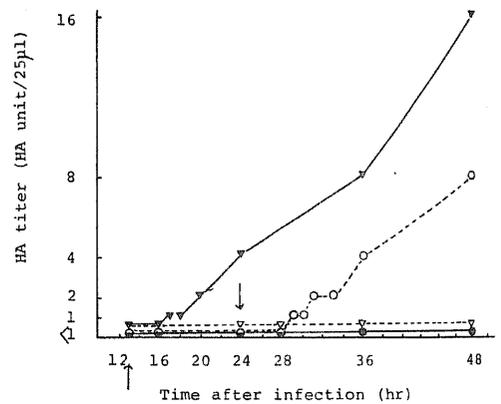


Fig. 2. One-step growth of HVJcl.1207 in LLC-MK₂ Cells. Experimental conditions were the same as shown in Fig. 1, except the temperature shift up from 32°C to 39°C 13hr after infection.

細胞のHVJ持続感染細胞から分離されたウイルス²⁷⁾でv-RNA合成がプラスで、39°Cでも変化をうけないものである。そしてこれらのウイルスと比較すると、ここで得たHVJcl.1205は、HVJcl.151に、またHVJcl.1207は、HVJcl.14に類似したv-RNA合成比(39°C

Table 2. Viral RNA synthesis at 32°C and 39°C in primary chick embryo cells infected with HVJ recovered from carrier culture

Viruses			cpm/dish		cpm/dish at 39°C
			at 32°C	at 39°C	cpm/dish at 32°C
wild	cl.	01	13152	9570	0.73
ts	cl.	1205	2205	1661	0.75
		1207	6775	3407	0.50
non-ts		1206	6751	4718	0.70
		1208	4752	6009	1.26
G ₂ -HVJ	cl.	14*	12678	5458	0.43
BHK-HVJ		151#	2524	1975	0.78

Incorporated [³H]uridine into cells infected with various HVJ clones were determined as described in Materials and Methods.

* RNA⁻ ts-mutant derived from G₂-HVJ carrier cells.

RNA⁺ ts-mutant derived from BHK-HVJ carrier cells.

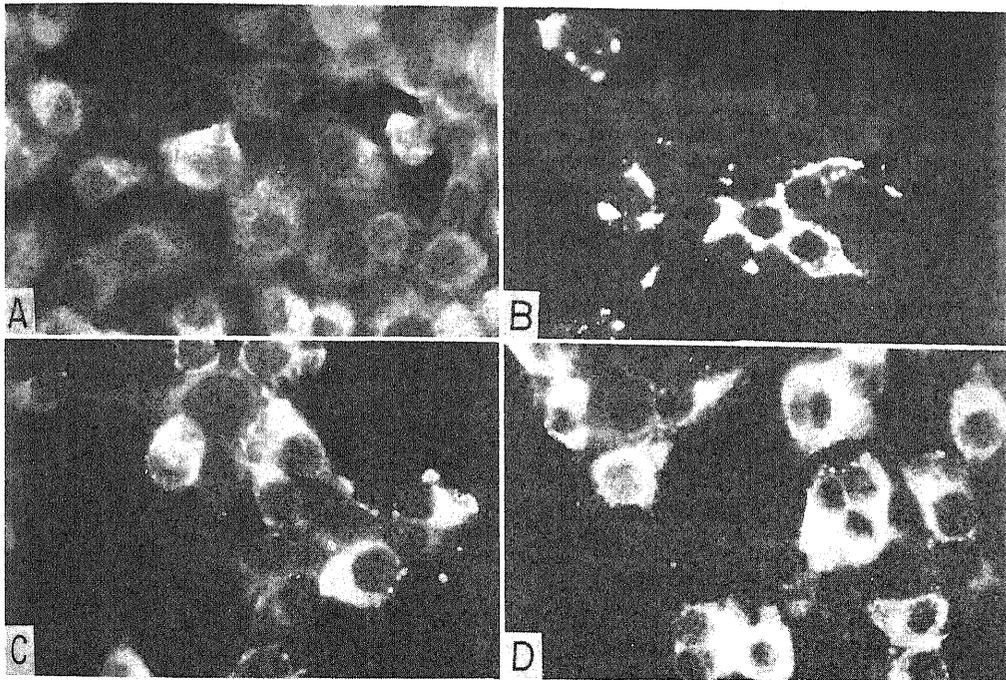


Fig. 3. Fluorescent antibody staining of acetone-fixed LLC-MK₂ cells infected with HVJcl. 1205 (A, B) or HVJcl.1207 (C, D). Infected cells were cultured for 72 hr at 32°C or 39°C and stained with HVJ-specific fluorescent antibody. A and C: at 32°C, B and D: at 39°C.

と32°Cにおける合成比)を示していた。

4. ts変異株のウイルス特異的抗原産生能

得られた2個のts変異株について、39°Cにおけるウイルス特異的抗原の産生を蛍光抗体染色法でしらべた。すなわち、それぞれのウイルスをLLC-MK₂細胞に感

染後、32°C又は、39°Cにおいて、72時間培養し、染色、鏡検した。

図3B、Dに示したごとく、39°Cにおいても、細胞質内に抗原の産生が認められた。しかし、32°Cにおける抗原産生(図3A、C)と比較すると、どちらのウイル

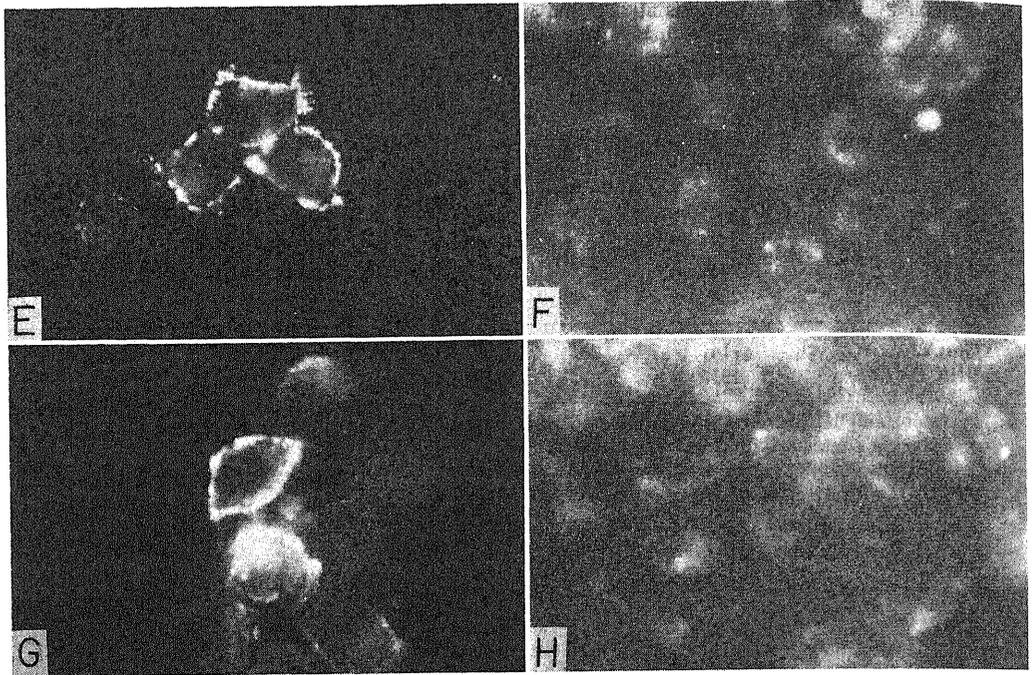


Fig. 4. Fluorescent antibody staining of unfixed LLC - MK₂ cells infected with HVJcl.1205 (E, F) or HVJcl.1207 (G, H). Each sample was incubated for 72 hr at 32°C or 39°C and stained with HVJ - specific fluorescent antibody. Strong fluorescence is seen on the cell membrane incubated at 32°C (E, G), but not on the samples incubated at 39°C (F, H).

スでも、抗原陽性細胞の率は低く、HVJcl.1205 感染細胞では、20~30%、HVJcl.1207 感染細胞では 50~60%であった。また、未固定標本による、細胞膜表面抗原の検出では、HVJcl.1205 又は、HVJcl.1207 感染細胞どちらも、39°Cにおいて、抗原が細胞膜に検出できなかった(図4 F, H)。しかし、32°Cでは、いずれのウイルス感染細胞においても、細胞膜の抗原が明瞭に認められた(図4 E, G)。

5. immunoprecipitation と SDS - PAGE 法によるウイルス抗原合成能の検索

非許容温度(39°C)において、ウイルス抗原産生のみられる ts 変異株について、どの構成蛋白が合成され、どの蛋白が合成されないかをしらべるのに immunoprecipitation 法は大変有用な方法である。そこで、両 HVJcl.1205, HVJcl.1207 を m.o.i. 5 PFU/細胞で LLC - MK₂細胞に感染させ、32°C又は 39°Cにおいて 72 時間培養した後、[³⁵S] methionine で蛋白をラベルして、immunoprecipitation と SDS - PAGE を行なった。

図5に示すごとく、HVJcl.1205, HVJcl.1207 感染細胞は、39°Cにおけるウイルス構成蛋白抗原の合成量が少なく、明瞭なバンドとして確認できなかった。特に

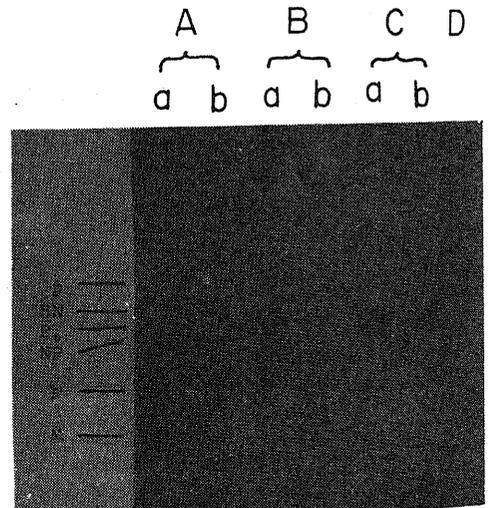


Fig. 5. Autoradiograph of HVJ - specific proteins observed by immunoprecipitation and subsequent polyacrylamide gel electrophoresis in LLC - MK₂ cells infected with HVJ clones at 32°C (a) and 39°C (b). A, B and C were infected with HVJcl.01, HVJcl. 1205 and HVJcl.1207 respectively. D shows uninfected LLC - MK₂ cells.

Table 3. Complementation test among HVJ ts-mutants, cl. 1205, cl. 1207, cl. 151 and cl. 14 in LLC-MK₂ cells at 39°C

ts-mutants	cl. 1205	cl. 1207	cl. 151	cl. 14
cl. 1205	—	7.8	17.0	981.6
cl. 1207	—	—	3.3	220.5
cl. 151	—	—	—	24.2
cl. 14	—	—	—	—

$$\text{Complementation index} = \frac{\text{Yield (A+B)}}{\text{Yield (A) + Yield (B)}}$$

(A and B indicate each ts-mutant.)

HVJcl.1205 感染細胞では、39°Cにおいて蛋白バンドが全くみられず、この方法による構成蛋白抗原合成の解析は、ウイルス RNA の合成実験と平行しなかった。しかし、FA 法による細胞質内のウイルス特異的抗原検索の結果とは、両ウイルス感染細胞ともほぼ一致した成績を示した。

6. 相補性試験

先の2変異株の ts 部位の推定実験で示されたごとく、HVJcl.1205 と HVJcl.1207 の両クローンは共に、ウイルス複製の後期に ts 部位をもっているらしいが、両者が同一か否か、相補性が成立しう部位かどうかを、39°Cで相補性試験を行ない検討した。また、この時、同時に、v-RNA 合成実験と同じく、対照として、HVJcl.14 と HVJcl.151 (共に ts 変異株) も用いて、相互の相補性を検討した。

表3に示したごとく、HVJcl.1205 と HVJcl.1207 の complementation index は 7.8 で、弱いながら相補性がみられ、ts 部位のある程度の相違が、両者間で明らかにされた。HVJcl.14 と HVJcl.151 との間では、両HVJcl.1205, HVJcl.1207 クローンは、いずれも complementation が陽性で、特に HVJcl.14 との間で index が大きかった。

7. 持続感染細胞から分離されたウイルスの細胞増殖阻害-細胞病原性の検討

ウイルス持続感染細胞から分離されたウイルスは一般に、細胞病原性(細胞変性効果惹起能)が低い²⁰⁾といわれている。そこで、HVJ 持続感染後 12 代継代した細胞から分離されたウイルスクローンについて、感染細胞の増殖への影響を指標にして、細胞病原性の強弱を検討してみた。

図6に示したように、持続感染から得られたウイルスは、ts 変異株のみならず、非 ts 変異株も細胞病原性が弱く、野生株、HVJcl.01 の感染と比較して、感染細胞の生存、増殖がみられた。また、同じ持続感染細胞より分離された、エラストラーゼ活性化変異ウイルス(表

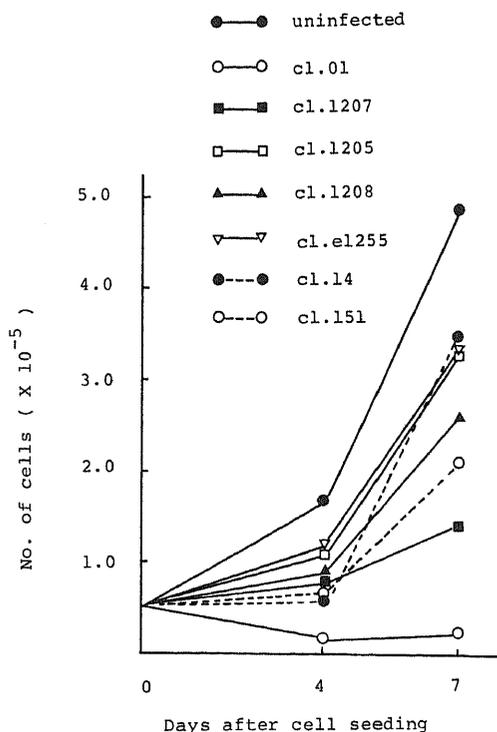


Fig. 6. Growth of cells infected with various HVJ clones. 5.0×10^4 cells were plated in 35 mm petri dishes. And an m.o.i. was 5 PFU/cell for all clones employed here.

1 参照)も、ts 変異株ではないが、細胞病原性は、同様に弱かった。同時に、長期にわたって維持されてきた持続感染細胞から分離された既述のウイルス、HVJcl. 14, HVJcl.151 についても、同様の実験を行なったが、継代 12 代目から分離されたウイルスと比較して、細胞病原性の強さに大きな差はなかった。

考 察

一般に、ウイルス持続、さらに潜伏感染が成立維持されていくのに、持続、潜伏感染ウイルスが、その感染成立に使用した野生株の性質、特に細胞内増殖や、細胞病原性などがそのままであれば、感染細胞は、細胞変性などに陥り、死滅せざるを得ない。しかし、この様なことは、持続又は潜伏感染成立に反しており、従って、その成立維持のため、最も基本的には、少なくとも、細胞病原性なども含めた、ウイルス変異が出現しなければ、持続感染は成立し維持されていかないと思われる。

先に述べたごとく、著者も、ウイルス持続感染成立維持に必要な、ウイルス側因子としてあげられているもののうち、特に ts 変異に関し、HVJ 持続感染細胞分離ウイルスについて、検討を加えた。ウイルス持続感染成立初期、第 12 代継代（ウイルス感染後 84 日）の GM₂HVJcl.01 細胞から分離された 19 のクローンについて、その温度感受性を、32°C と 39°C でウイルス増殖性としてしらべると、温度感受性のさまざまに異なったウイルスが存在していた。Ju ら¹⁹⁾も同様に measles virus の持続感染細胞分離ウイルスに、程度の異なる温度感受性のあることをみている。しかも、彼らの持続感染に用いた original のウイルスには、温度感受性のあるウイルスが存在していなかった。著者の場合も、持続感染成立に用いた HVJcl.01 は、39°C で 3 回 cloning したので温度感受性のあるウイルスの混在は考えにくい（表 1）。従って持続感染成立の過程において、感染に使用したウイルスが、宿主である細胞から何らかの影響を受け、それによって ts 変異化してくると思われた。また、ウイルスの 39°C と 32°C における産生量の比が 1.0×10^{-3} 以下を ts 変異株と定義すれば、著者の 12 代継代での分離率、約 10% (2/19) は、ウイルス持続感染成立のかなり初期における ts 変異株出現の可能性を暗示している。このことは VSV の持続感染 L 細胞、第 21 代継代細胞の培養上清からすでに ts 変異株を分離した、Thacore ら²⁰⁾の報告とも似かよっている。

分離された 2 個の ts 変異株の ts 部位は温度の shift up, shift down の実験から、ウイルス複製の後期（感染後約 10 時間前後）に存在することがわかった。そして、FA 法を用いた実験から、非許容温度（39°C）において、ウイルス抗原は細胞質には見いだされる（図 3 B, D）が、細胞膜の表面には見いだされなかった（図 4 F, H）。これは、shift down 後、ウイルス hemagglutinin (HAin) の産生が、5 時間後からみられること（図 1, 2）と一致していると思われる。何となれば、複製後期

に ts 部位があるため、39°C において、細胞質内に合成された HAin が、時間とともに細胞膜に移動し膜に組み込まれていないと考えられるからである。同様に、Yoshida ら²¹⁾は、非許容温度でウイルスの M (membrane 又は matrix の意) 蛋白と HN 糖蛋白が合成されない HVJcl.151 の shift down の実験で、shift down 後 3 時間以内に HAin の産生がおこると報告している。彼らの場合は、M 蛋白が、ウイルスの assembly に必要な蛋白である²⁰⁾²¹⁾ことから、ここで分離された ts 変異株は、assembly 以前の段階で停止すると考えられた。

そこで、非許容温度（39°C）における両 ts 変異株感染細胞でのウイルス構成蛋白合成を immunoprecipitation, SDS-PAGE 法で検討した。HVJcl.1205 及び HVJcl.1207 感染細胞は、32°C におけるウイルス構成蛋白合成と 39°C のものと比較すると 39°C の方がはるかに低下しており、明瞭な蛋白バンドとして確認できなかった（図 5）。特に HVJcl.1205 感染細胞の 39°C では、ウイルス構成蛋白のバンドが全くみられなかった。一方 HVJcl.1205, HVJcl.1207 感染細胞の非許容温度における v-RNA 合成を許容温度（32°C）と比較すると（表 2）、HVJcl.1205 では、野生株（HVJcl.01）と同じ比率であったが、HVJcl.1207 は野生株の約 70% に減少していた。これは、v-RNA 合成とウイルス構成蛋白合成は、一般に平行関係にあると考えられることからみると、HVJcl.1207 の場合は、両者の合成とも 39°C では減少し、一応平行関係にあるものの、HVJcl.1205 の 39°C においては、v-RNA 合成はみられたのに、ウイルス構成蛋白の合成が減少し、検出できないという関係がみい出された。それゆえ、HVJcl.1205 感染細胞の非許容温度で合成された v-RNA は、正常に機能しない v-RNA かもしれない、さらに RNA 分析が必要と思われた。

ここで得られた ts 変異株の相補性実験で、弱いながら相補性が、非許容温度でみられたことから、両 ts 変異株は、いくらか異なった部位に温度感受性の部位があると考えられる。しかし、培養温度変換実験から、ウイルス複製のほぼ同じ時期にその部位が推定され、そのために、非常に似た挙動を示し、相補性は小さかったのかもしれない。Adachi²²⁾らは、HVJ 野生株を持続感染させた Vero 細胞の第 37 代継代培養上清から、3 個の ts 変異株のクローンを分離し、それが互いに、相補性が無かったと報告している。一方、Ju ら²²⁾は measles virus の持続感染細胞から ts 変異株を分離し、7 つの complementation グループに分類しており、ts 部位の異なったウイルスが、同一持続感染細胞内に存在するとしている。これを考え合わせると、持続感染細胞分離ウイルスは、その分離される時期、あるいは、

持続感染に用いたウイルス-細胞の系で、ts 変異の程度に関しても、異なるのではないと思われる。それゆえ、ここで新たに成立させた HVJcl.01 持続感染細胞についても、さらに継代をかさねて、そこから分離されるウイルスの変異についてしらべることは、持続感染の機構解明に役立つと思われる。

ts 変異と関連して生ずる可能性のある HVJ 変異の一つとして、著者の場合、表 1 に示したごとく、HVJ 持続感染細胞から、エラストラーゼでのみ活性化される (トリプシンは無効) 変異株が、 2.5×10^{-4} の頻度で分離された。HVJ は、一般にその感染性を構成成分: F (fusion) の意) 蛋白に依存し、この蛋白が通常、トリプシンなどの蛋白分解酵素によって活性化されて、初めて感染性を獲得する³³⁾³⁴⁾とされている。それゆえ、このような protease activation mutant, エラストラーゼ活性化変異株が分離されたことは、ts 変異以外の変異が、持続感染細胞内で生じている一つの例を示していると思われるが、その持続感染成立維持における役割は不明で、今後、検討を要する問題と思われる。さらに、この様なものウイルスと異なる活性化機構の獲得変異は、HVJ の臓器嗜好性³⁵⁾から考えると興味深い。

さらに、持続感染から得られたウイルスは一般に、細胞病原性が低いことから、分離ウイルスについて、細胞増殖に与える影響を指標として、細胞病原性の強弱をしらべてみた (図 6)。持続感染細胞から得られた各ウイルスの細胞病原性は、温度感受性の程度が違っていても、野生株 HVJcl.01 感染のものと比較すると、はるかに弱かった。そして、この細胞病原性の低下は、感染細胞を細胞変性に陥ちいらしめて、死に追いやるのが少なく、持続感染成立維持に、甚だ合理的な変異といえよう。

以上、論じてきた、HVJ 持続感染細胞分離ウイルスの ts 変異、elastase activation 変異、細胞病原性の変異は、他のいわゆる持続感染成立維持に関与するといわれる DIP, IFN などの問題も含めて、いかに関連しているのか、また、これらの変異が、持続感染細胞で起き易い理由の追求も将来に残されている。

結 論

39°C で 3 回 cloning し、温度感受性変異株を含め HVJ (Sendai virus) クローンで、ハムスター肉腫由来 GM₂ 細胞を持続感染化した。そして、その細胞培養上清からウイルスを分離し、その性質をしらべ、以下の成績を得た。

1. 持続感染細胞の第 12 代継代よりの分離ウイルス、19 クローンは、さまざまに異なった ts 度 (39°C と 32°C における増殖比) をもち、その比が 1.0×10^{-3} 以下

の ts 変異株は、2/19 : 約 10% 存在した。また、同じ培養上清から、同時に、エラストラーゼでのみ活性化される変異ウイルスが 2.5×10^{-4} の頻度で分離された。

2. 分離された 2 個の ts 変異株は、温度の shift up, shift down の実験から、ts 部位が、ウイルス複製の後期、感染後約 10 時間前後に推定された。また、2 個の ts 変異株は、非許容温度で、弱いながら相補性が認められ、その ts 部位は、少し異なるが互いに近いよく似たものと思われた。

3. 分離 2 ts 変異株のうち HVJcl.1205 は、39°C と 32°C における v-RNA 合成比は野生株と同じであったが、他の HVJcl.1207 は、野生株における比より、さらに約 30% 低下した v-RNA の合成比を示した。

4. 2 ts 変異株のウイルス構成蛋白抗原合成能は、非許容温度で低下することが、蛍光抗体染色法、immunoprecipitation, SDS-PAGE 法でたしかめられた。

5. 持続感染細胞分離ウイルスは、ts 変異株、非 ts 変異株を問わず、細胞病原性が弱くなっていた。

以上を総括すると、HVJ 持続感染の場合、かなり初期に、すでに ts-, エラストラーゼ活性化-, 弱細胞病原性変異などが生じ、その成立維持にあずかっているものと思われた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜わった、恩師波田野基一教授、それに、御助言、御協力をいただきました、ウイルス部の諸先生に、心から感謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は、第 29 回日本ウイルス学会総会 (1981 年 10 月) 及び第 18 回日本細菌学会中部支部総会 (1981 年 11 月) において発表された。

文 献

- 1) Mims, C. A.: Factors in the mechanism of persistence of viral infections. *Prog. Med. Virol.*, 18, 1-14 (1974).
- 2) Gibbs, C. J. Jr., Memo, G. J. & Diwan, A. R.: Immunology of persistent and recurrent viral infection. p453-496. *In* G. Dick (ed.), *Immunological aspects of infectious diseases*. MTP Press, Ltd., Lancaster, (1979).
- 3) Rima, B. K. & Martin, S. J.: Persistent infection of tissue culture cells by RNA viruses. *Med. Microbiol. Immunol.*, 162, 89-118 (1976).
- 4) Friedman, R. M. & Ramseur, J. M.: Mechanisms of persistent infections by cytopathic viruses in tissue culture. *Arch. Virol.*, 60, 83-103 (1979).
- 5) Holland, J. J., Villarreal, L. P., Welsh, R. M., Oldstone, M. B. A., Kohne, D., Lazzarini, R. &

- Scolnick, E.**: Long-term persistent vesicular stomatitis virus infection of cells *in vitro*. *J. gen. Virol.*, **33**, 193 - 211 (1976).
- 6) **Kanda, T. & Shibuta, H.**: A temperature-sensitive mutant of Sendai virus which establishes persistent infection in Vero cells without cell crisis. *Virology*, **108**, 318 - 324 (1981).
- 7) **Desmyter, J., Melnich, J. L. & Rawls, W. E.**: Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J. Virol.*, **2**, 955 - 961 (1968).
- 8) **Youngner, J. S., Preble, O. T. & Jones, E. V.**: Persistent infection of L cells with vesicular stomatitis virus: evolution of virus populations. *J. Virol.*, **28**, 6 - 13 (1978).
- 9) **Temin, H. M. & Baltimore, D.**: RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses. *Advan. Virus Res.*, **17**, 129 - 186 (1972).
- 10) **Simpson, R. W. & Inuma, M.**: Recovery of infectious proviral DNA from mammalian cells infected with respiratory syncytial Virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3230 - 3234 (1975).
- 11) **Zhdanov, V. M. & Parfanovich, M. I.**: Integration of measles virus nucleic acid into the cell genome. *Arch. ges. Virusforsch.*, **45**, 225 - 234 (1974).
- 12) **Friedman, R. M. & Costa, J. R.**: Fate of interferon treated cells. *Infect. Immun.*, **13**, 487 - 493 (1976).
- 13) **Ju, G., Udem, S., Rager-Zisman, B. & Bloom, B. R.**: Isolation of a heterogeneous population of temperature-sensitive mutants of measles virus from persistently infected human lymphoblastoid cell lines. *J. Exp. Med.*, **147**, 1637 - 1652 (1978).
- 14) **Preble, O. T. & Youngner, J. S.**: Temperature-sensitive mutants isolated from L cells persistently infected with Newcastle disease virus. *J. Virol.*, **9**, 200 - 206 (1972).
- 15) **Kimura, Y., Ito, Y., Shimokata, K., Nishiyama, Y., Nagata, I. & Kitoh, J.**: Temperature-sensitive virus derived from BHK cells persistently infected with HVJ (Sendai virus). *J. Virol.*, **15**, 55 - 63 (1975).
- 16) **森田 修行**: Paramyxovirus: HVJ (Sendai virus) 持続感染の研究: 持続感染細胞分離 HVJ 温度感受性変異株の特性. 十全医会誌, **84**, 397 - 406 (1975).
- 17) **Ogura, H., Sato, H. & Hatano, M.**: Curing of virus persistent infection in HVJ (Sendai virus) carrier hamster tumor cells by transplantation. *Gann*, **72**, 498 - 503 (1981).
- 18) **Sugita, K., Maru, M. & Sato, K.**: A sensitive plaque assay for Sendai virus in an established line of monkey kidney cells. *Japan. J. Microbiol.*, **18**, 262 - 264 (1974).
- 19) **Sugiura, A., Ueda, M., Tobita, K. & Enomoto, C.**: Further isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of influenza virus. *Virology*, **65**, 363 - 373 (1975).
- 20) **小倉 壽**: Paramyxovirus: HVJ (Sendai virus) 持続感染による移植性培養細胞膜抗原の変換-温度感受性変異 HVJ による解析. 十全医会誌, **87**, 122 - 134 (1978).
- 21) **Wechsler, S. L., Rustigian, R., Stallcup, K. C., Byers, K. B., Winston, S. H. & Fields, B. N.**: Measles virus-specified polypeptide synthesis in two persistently infected HeLa cell lines. *J. Virol.*, **31**, 677 - 684 (1979).
- 22) **Burge, B. W. & Pfefferkorn, E. R.**: Complementation between temperature-sensitive mutants of Sindbis virus. *Virology*, **30**, 214 - 223 (1966).
- 23) **Adachi, A., Kanda, T. & Shibuta, H.**: Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of Sendai virus. *Microbiol. Immunol.*, **24**, 1053 - 1068 (1980).
- 24) **Scheid, A. & Choppin, P. W.**: Protease activation mutants of Sendai virus. Activation of biological properties by specific proteases. *Virology*, **69**, 265 - 277 (1976).
- 25) **小倉 壽, 佐藤 博, 佐藤 祐一, 波田野基一**: HVJ 持続感染細胞からの protease activation mutants の分離. 第 29 回日本ウイルス学会総会, 演説抄録, 1045 (1981).
- 26) **Ogura, H., Sato, H. & Hatano, M.**: Temperature-sensitive HVJ (Sendai virus) with altered P polypeptide derived from persistently infected cell lines. *J. gen. Virol.*, **55**, 469 - 473 (1981).
- 27) **Yoshida, T., Nagai, Y., Maeno, K., Inuma, M., Hamaguchi, M., Matsumoto, T., Nagayoshi, S. & Hoshino, M.**: Studies on the role of M protein in virus assembly using a ts mutant of HVJ (Sendai virus). *Virology*, **92**, 139 - 154 (1979).
- 28) **Preble, O. T. & Youngner, J. S.**: Tempera-

- ture-sensitive viruses and the etiology of chronic and inapparent infections. *J. Infect. Dis.*, **131**, 467 - 473 (1975).
- 29) **Thacore, H. R. & Winship, T. R.**: Host restriction property of a vesicular stomatitis virus mutant isolated from carrier cultures. *J. gen. Virol.*, **54**, 449 - 453 (1981).
- 30) **Shimizu, K. & Ishida, N.**: The smallest protein of Sendai virus. Its candidate function of binding nucleocapsid to envelope. *Virology*, **67**, 427 - 437 (1975).
- 31) **Yoshida, T., Nagai, Y., Yoshii, S., Maeno, K., Matsumoto, T. & Hoshino, M.**: Membrane (M) protein of HVJ (Sendai virus). Its role in virus assembly. *Virology*, **71**, 143 - 161 (1976).
- 32) **Ju, G., Birrer, M., Udem, S. & Bloom, B. R.**: Complementation analysis of measles virus mutants isolated from persistently infected lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.*, **33**, 1004 - 1012 (1980).
- 33) **Homma, M. & Ohuchi, M.**: Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. III. Structural difference of Sendai viruses grown in eggs and tissue culture cells. *J. Virol.*, **12**, 1457 - 1465 (1973).
- 34) **Scheid, A. & Choppin, P. W.**: Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology*, **57**, 475 - 490 (1974).
- 35) 田代真人, 本間守男: マウス肺における HVJ の活性化機構. 第 29 回日本ウイルス学会総会, 演説抄録, 1065 (1981).

