Paramyxovirus:HVJ(SendaiVirus)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

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/2297/4622

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

金沢大学がん研究所ウイルス学講座（主任：波田野基一教授）
森　田　修　行

（昭和50年5月7日受付）

培養細胞におけるウイルスの持続感染はこれまで種々のウイルスについて報告されているが，その多くは，ウイルス増殖が一部分の細胞に限局され，少数の感染細胞と大多数の正常細胞との均衡によって成立しているとされている[1]．従って，持続感染の維持には，ウイルス感染に抵抗性の細胞の混在，あるいはインターフェロン（IF），低濃度のウイルス抗体等，抗ウイルス性因子の存在が必要とされた．かゝる持続感染細胞は，高濃度の抗血清存在下で培養されると，感染が容易に治癒（cure）された．これに対して，パラミキソウイルスによる持続感染細胞は，細胞変性効果（CPE）を示すことなく，正常な増殖を続けること，および抗血清存在下でも感染がけっして治癒されない[2)~4)]ことで，特異な持続感染系を示しているが，その持続感染機構については不明の点が多い．最近，同じパラミキソウイルスの一つであるニューカッスル病ウイルス（NDV）持続感染L細胞に，温度感受性（ts）変異株の存在することが報告された[5]．一方，HVJ（パラミキソウイルス1型，Sendai virus）持続感染 HeLa 細胞においては，感染性ウイルスが認められず，培養液中に見い出される血球凝集素（HAin）は感染性を示さない[4]．また，Morimoto らが，細胞維持液への低濃度トリプシン添加で，VERO 細胞における HVJ の完全増殖を報告[6]して以来，HVJ の感染性発現に及ぼすトリプシン効果について，いくつかの解析がなされてきた[7)8)]．これらより，著者は，重層寒天培地にトリプシンを加えた VERO 細胞でのプラック測定法により，各種 HVJ 持続感染細胞抽出液を検索したところ，それらに HVJts 変異株の存在を見い出した．そこで，かゝる HVJts と鶏胎児継代原株 HVJ(HVJ$_0$）との比較から，HVJ 持続感染化の機序について検討を加えた．

実験材料と方法

Ⅰ．使用細胞と培養法

HVJ 持続感染 HeLa 細胞（HeLa-HVJ）は，Maeno らによって樹立された[4]ものである．試験管内がん化ハムスター胎児肺細胞（THEL）[9]の HVJ 持続感染細胞（THEL-HVJ）[10]，および人骨巨細胞腫由来継代培養細胞（G2）[11]の HVJ 持続感染細胞（G2-HVJ）[12]は，我々の研究室において樹立され，6年以上にわたり，それぞれの親細胞と同一の培養条件（通常のトリプシニゼイション法）にて維持されてきた．これらの HVJ 持続感染細胞は，いずれも常に HVJ の HAin を産生し，すべての細胞にウイルス抗原が蛍光抗体法で認められ，かつ抗 HVJ 血清の存在で，持続感染から治癒されない点において，同じ性質を示し，（Eagle MEM＋10％子牛血清）を培養液として，通常 35°C にて継代培養された．HVJ assay 用の VERO 細胞は，（Eagle MEM＋2％子牛血清）液で 35°C ないし 37°C で培養された．

Ⅱ．ウイルス

HVJ：名古屋 1-60 株の鶏胎児（9日目），37°C 4日増殖後のウイルス（血球凝集価：32,000 HAU/ml，感染価：1.6×10^9 PFU/ml）が HVJ の原株（HVJ$_0$）として用いられた．血球凝集反応（HA）は鶏血球で測定された．インターフェロン測定用の水泡性口内炎ウイルス（Vesicular Stomatitis Virus：VSV）は，HeLa 細胞増殖後，使用まで－85°C に保存された．

Studies on the Persistent Infection with Paramyxovirus：HVJ (Sendai Virus) in Cultured Cells：Characteristics of Temperature-Sensitive Mutants Isolated from HVJ-Carrier Cultures. **Osayuki Morita**, Department of Virology (Director：Prof. M. Hatano), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

Ⅲ. HVJ 持続感染細胞抽出液

35°C 3日間培養された各種 HVJ 持続感染細胞は，0.1% プロナーゼで分散後，1×10^7 細胞/ml の濃度に Eagle MEM（MEM）で再浮遊し，−85°C に保存された．使用に際し，融解細胞液は，音波処理（30ワット，60秒処理）：ソニファイヤ，ブランソン）により壊わされ，遠心（5,000回転，15分）して細胞残渣を除いた．その上澄が細胞抽出液として，持続感染細胞由来の感染性 HVJ（HVJ_{pi}）の標品とされた．

Ⅳ. トリプシンおよびトリプシン阻害剤

再結晶化トリプシン（シグマ）と大豆製トリプシン阻害剤（シグマ）が用いられ，HVJ のトリプシン処理には，ウイルス液に最終濃度 10μg/ml のトリプシンを加え，37°C 温浴槽で10分作用後，トリプシン阻害剤をトリプシンと等量加えて，作用を停止させた．

Ⅴ. 抗 HVJ 血清

HVJ 含有漿尿液を超遠心（30,000g，60 分）し，沈渣を 0.15M リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に濃縮再浮遊して，HVJ 抗原（240,000 HAU/ml）とした．HVJ 免疫には，家兎腹腔内にかゝる HVJ 抗原 4 ml を 5 日間隔で 6 回 接種した．最終接種の 10日後，採血し，抗体価は血球凝集抑制試験（HAI）で，5,120 HAIU/0.25ml を示した．

Ⅵ. 蛍光抗体法（FA 法）と血球吸着法（HAD 法）

これら両者はいずれも，細胞内の HVJ 抗原，または HAin の検出に用いられた．FA 法：抗 HVJ 家兎血清ガンマグロブリン分画に蛍光色素（FITC），を結合した[13]．カバースリップ上に感染細胞を培養し，アセトン固定後，蛍光抗体液で染色し，HVJ 抗原を検索した．HAD 法：HVJ 感染細胞に 0.3% モルモット血球浮遊液を添加し，4 °C に 1 ～ 2 時間放置すると，HAin 産生細胞は血球吸着を示し，容易に判別できた．

Ⅶ. 細胞感染単位（CIU）測定

HVJ の感染価を定量するために，プラック法と共に Kashiwazaki らの報告した CIU 測定法[14]も用いられた．この方法で得られた値は，プラック法の値とほゞ一致した．

Ⅷ. HVJ のプラック測定

Morimoto らの方法[6]に従った．プラスチックペトリ皿（60 mm）または培養瓶（2 オンス角瓶）で単層培養された VERO 細胞に，適当に稀釈された HVJ を感染させ，35°C 2時間，ウイルス吸着後，Hanks 液で洗滌し，0.6μg/ml のトリプシンを加えた MEM を含む 1 % 寒天培地（5 ml）で重層された．35°C または 37°C で 3 ～ 4 日間培養後，中性紅（最終濃度 0.008%）添加の寒天培地（MEM + 1 % 寒天：5 ml）で再重層された．以後，プラックの最終計測まで，これらの細胞を遮光し，各温度に培養した．

Ⅸ. インターフェロン（IF）の調製と力価測定

HeLa 細胞に，感染多重度（multiplicity of infection : m.o.i）5 PFU/細胞で HVJ。を感染させ，MEM で，35°C 2時間培養し，その培養上清を IF の出発材料（64 単位/ml）とした．粗 IF 標品は，これを Lampson らの方法[15]に従い，過塩素酸処理，0.02M 酢酸亜鉛で沈澱させ，少量の 0.2N 塩酸に溶解後，0.15M PBS に透析（4 °C，一晩）して，半精製濃縮 IF（1,600 単位/ml）とした．IF 価の測定は，Wagner の方法[16]によるプラック半減法によった．35mm ペトリ皿に単層培養された HeLa 細胞を 2倍段階稀釈 IF 被験材料で18時間処理後，50～100 PFU の VSV で攻撃した．5 % CO_2（35°C）で48時間培養後，VSV のプラックが計数され，IF 未処理細胞の PFU に対する IF 処理細胞での PFU 百分率を求めた．それらの%値を縦軸に，IF 材料の稀釈度を横軸としてプロビット紙にプロットし，50% 値を示す IF 稀釈度をもって IF 力価の単位とした．

Ⅹ. 細胞の分画

細胞のホモジナイズおよび分画法は，Hara らの方法[17]に従った．0.5M 蔗糖溶液中の HeLa 細胞を，テフロンホモジナイザーによりホモジナイズして，2,000g，15分 の遠心で核と細胞層を除去後，その上澄を更に 32,000g，30分 遠心して，上澄分画と沈渣（リソゾーム分画）に分けた．リソゾーム酵素活性測定には，沈渣を小量の蒸留水に再浮遊し，6 回の凍結融解で壊わした．

Ⅺ. リソゾーム酵素活性の測定

酸性プロテアーゼ活性は，Allison らの方法[18]により，酸性ホスファターゼ活性は，Bessey らの方法[19]に従って測定された．蛋白量を Lowry らの方法[20]より求め，これら酵素活性を蛋白量当りの値として表現した．

実 験 成 績

Ⅰ. HVJ 持続感染細胞における感染性 HVJ の検索

HeLa-HVJ の細胞内および培養液中に見い出される HAin は，非感染性である[4]と考えられてきた．しかし，Morimoto ら[6]のトリプシン効果（VERO

細胞における HVJ の完全増殖化）が示されたので，著者は，トリプシン-VERO 細胞系のプラック測定法を用いて，HVJ carrier 細胞（HeLa-HVJ，THEL-HVJ，G2-HVJ）での感染性ウイルス存在を検討した．すなわち，VERO 細胞に各種 HVJ 持続感染細胞の細胞抽出液を接種し，トリプシン含有寒天培地での重層後，35℃ で培養した．接種後5～7日目よりプラックが出現し始め，その数は9～11日で最高値に達し，このプラックの大きさは，最大径 1.0mm であった．一方，鶏胎児継代原株 HVJ（HVJ_o）によるプラック形成は，感染5日目ですでに認められ，6～8日で最高値を示し，径は 3.0mm に達した．この結果から，各種 HVJ 持続感染細胞には，プラック形成可能な感染性 HVJ（HVJ_{pi}）が存在するといえよう．しかしこれら HVJ_{pi} のプラック形成は，上述のごとく HVJ_o のそれに比して出現が遅く，プラックも小さい．このことは，HVJ_{pi} が温度感受性（ts）変異株であることを一般的にも暗示していた．

そこで，更にそれぞれの細胞抽出液を35℃で VERO 細胞に感染吸着後，35℃ または 37℃ に培養して，プラック測定が行なわれた．Table 1 はその結果を示す．3種の HVJ_{pi} は，いずれも 35℃ でプラック形成可能だが，37℃ では，まったくプラック形成が認められなかった．これに対し，HVJ_o の場合は，35℃ または 37℃ いずれでも，ほゞ同じプラック力価を示すことから，これら3種の HVJ_{pi} は，いずれも 37℃ でプラック形成不能な ts 変異株であると結論された．

Ⅱ．HVJ_o と HVJ_{pi} の VERO 細胞における一段階増殖

上述のことを更に確認するために，両温度（35℃ と 37℃）における HVJ_{pi} の single cycle growth を HVJ_o のそれと比較した．すなわち，2オンス瓶で培養された VERO 細胞に HVJ_o（m.o.i：1.6 CIU/cell）または G2-HVJ 由来 HVJ_{pi}（m.o.i：3.0 CIU/cell）を接種し，35℃ で3時間の吸着後，細胞を Hanks 液で2回洗滌し，4 ml の MEM（no trypsin）を加え，35℃ または 37℃ で培養した．感染後の各時間毎に，培養液中へ産生された HVJ の感染価（VERO 細胞での CIU 測定による）および血球凝集価を測定し，その値を Fig. 1 に示した．

これら，CIU，HA いずれからみても，HVJ_o の産生（増殖）は，37℃ において 35℃ より速やかな上昇を示したのに，HVJ_{pi} の場合，35℃ で増殖はあるが，37℃ での増殖は抑制された．HVJ_{pi} の 37℃ 増殖時，産生 HVJ の CIU 値が，24時間前後より上昇ぎみなのは，ts 変異株のいわゆる leakiness[21] によるものと思われる．このことから，HVJ_{pi} は 35℃ で増殖し得るが，37℃ で増殖できない明らかな ts 変異株であるといえよう．

Ⅲ．HVJ_o または HVJ_{pi} による HeLa 細胞の持続感染化

従来，HVJ 持続感染細胞は，高力価の HVJ を感染後，強い CPE を起し，その後生残した小数の細胞の継代培養によって樹立されてきた[4)10)]．そこで，HVJ 持続感染成立機構を解明するために，同様の方法で新らたに HeLa 細胞の HVJ 持続感染樹立化を試みた．

HVJ_o を10の m.o.i で HeLa 細胞に感染し，培養液を加え，35℃ で培養すると，速やかに CPE が惹起

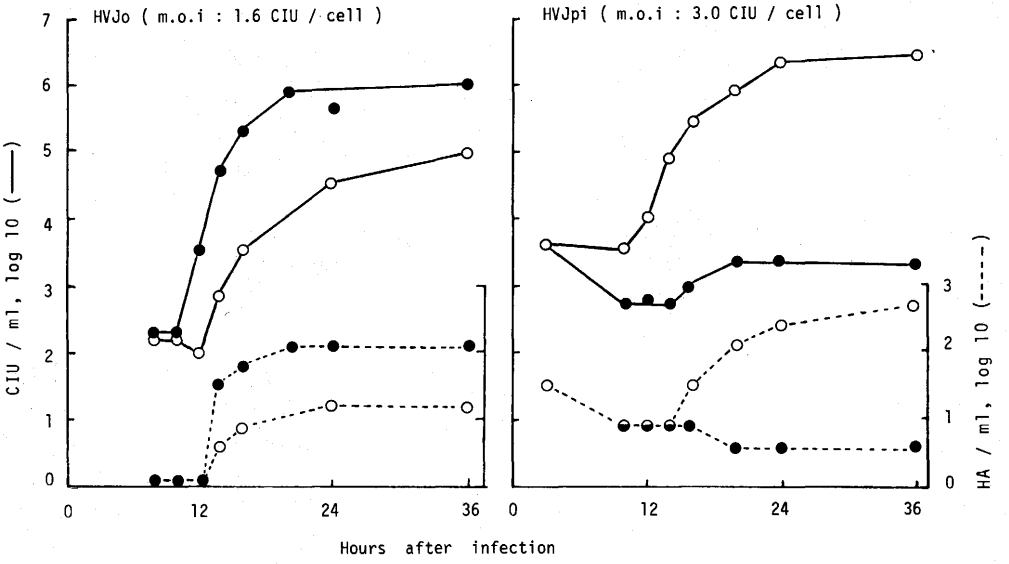
Table 1. Plaque assay of HVJpi from various HVJ-carrier cultures on VERO cells at 35℃ or 37℃

Virus	PFU / ml	
	35°C	37°C
HVJpi*(HeLa-HVJ)	3.2×10^4	0
HVJpi (G2-HVJ)	4.8×10^4	0
HVJpi (THEL-HVJ)	1.6×10^3	0
HVJo**	6.8×10^8	5.3×10^8

* HVJpi : Supernatant obtained by centrifugation (15 min., 5,000 rpm) of sonicated HVJ-carrier cells (1×10^6 cells / ml).

**HVJo : HVJ grown in chick embryo

Fig. 1. Comparative yield of HVJo and HVJpi in VERO cells at 35° or 37℃



され，大部分の細胞は崩壊脱落し，極く少数の生残細胞も細胞質の萎縮と増殖の停止が起った．約3週間の培養で，それらは徐々に CPE から回復し，コロニーを形成した．しかし，それらのコロニーには血球吸着（HAD）が認められず，再度の HVJ 攻撃にも感受性を示し，HVJ 持続感染細胞としての性質はまったく認められなかった．このことから，生残細胞は，ウイルス感染を免がれたものではなく，かつ HVJ 感染に抵抗細胞の選択でもないことは明らかである。多分，HVJ。感染によって誘導されたインターフェロン（IF）が，HVJ ゲノムの複製増殖を抑制した結果，細胞はウイルス感染から"治癒"したものと考えられた．一方，m.o.i：1 または0.1で感染の HeLa 細胞では，崩壊脱落する細胞は少なく，ほゞ正常な細胞増殖を続けたが，かゝる細胞の大部分は HAD 陰性であった．しかし，これらの細胞を継代培養する過程で，徐々に融合細胞の形成が増加し，やがて強い CPE を起し，50%以上の細胞に崩壊がみられた．この際の残存細胞のすべてに HAD と FA による HVJ 抗原を認めた．これらの細胞は，以後の継代培養において，HVJ 抗原産生の減衰をきたさず，抗 HVJ 抗体存在で治癒されず，かつ HVJ の攻撃に完全な抵抗性を示すことより，持続感染細胞とみなされた．持続感染成立は，m.o.i ：1 感染で，細胞継代8代目，m.o.i：0.1では5代目において認められた（Table 2）．かくのごとく，低m.o.iでの感染の方がより早く持続感染成立をもたらしたのは，HVJ 感染時における IF 産生が少量にすぎず，ウイルスの増殖および感染拡大があまり強く抑制されなかったゝめと解釈された．

次に，HVJ_{pi} による持続感染化について検討した．G2-HVJ より抽出された HVJ_{pi} で，m.o.i ：10，4，および0.4で感染し，HVJ。感染の場合と同一条件で培養された．m.o.i：10，および4感染での細胞は，軽度な細胞質萎縮と一時的な増殖停滞を示したが，細胞の脱落はまったくなく，融合細胞の形成もみられなかった．しかし，かゝる細胞は，HAD および FA が100%の細胞に陽性であり，抗血清で治癒されない点，持続感染細胞の特質を顕示した．m.o.i：0.4感染の場合，すべての細胞が持続感染化するまでに，3回の細胞継代を要した（Table 2）．これらの結果は，HVJ_{pi} による持続感染化が，HVJ。の場合に比し，極めて容易であることを示している．こゝで，持続感染成立に重要な影響を与えると思われる次の2点において，HVJ_{pi} は HVJ。と明らかな違いを示した．1つは，HVJ_{pi} が高m.o.i感染においてさえ，細胞崩壊を示さない，すなわち low cytopathogenic であること．他の1つは，HVJ_{pi} 感染のm.o.iに応じて，持続感染の成立時期が早まることである．これらの点に関連し，更に異なる面よりの検討を以下加えて

Table 2. Occurrence of CPE and the establishment of carrier state in HeLa cells infected with HVJo or HVJpi

Virus	M.O.I	Destructive CPE		Carrier state
		At infection	During passage	
HVJo	10	+++	-	-
	1	+	+++	+ (8)*
	0.1	-	+++	+ (5)
HVJpi	10	±	-	+ (0)
	4	-	-	+ (0)
	0.4	-	-	+ (3)

*Numbers of passage of the HVJ-infected HeLa cells until the establishment of carrier state with HVJ

みた.

Ⅳ. HVJ$_o$ または HVJ$_{pi}$ 感染 HeLa 細胞におけるリソゾーム酵素のリソゾームからの放出（活性化）

ウイルス感染による CPE 発現の機構はまだ十分解明されていない. Allison ら[18]によれば, ウイルス増殖の結果として CPE が起るのでなく, ウイルス感染によってもたらされるリソゾーム酵素の活性化, 即ちリソゾームからの酵素の放出が CPE の誘発に重要な役割を果していることが指摘された. そこで, HVJ$_{pi}$ 感染 HeLa 細胞におけるリソゾーム酵素の活性化を, HVJ$_o$ 感染のそれと比較検討した.

ルー瓶培養 HeLa 細胞を, m.o.i：1 で HVJ$_o$ または HVJ$_{pi}$ で感染させ, ウイルスの代りに MEM を加えたものを非感染細胞とした. 35°C, 2 時間のウイルス吸着後, MEM を細胞維持液とし, 35°C にて, 6 時間ないし18時間培養した. 各時間におけるそれぞれの細胞を, 実験材料と方法の項に記述した方法で処理し, リソゾーム (L) 分画と上澄 (S) 分画に分けた. 各分画における酸性プロテアーゼ活性, および酸性ホスファターゼ活性を定量測定し, L 分画の酵素比活性に対する S 分画の比活性の比率 (S/L比) が算定された. その結果は, Table 3 に示されている。

酸性プロテアーゼ活性の S/L 比は, 非感染細胞で 0.20～0.38の値を示したが, HVJ$_o$ 感染の 6 時間, 18 時間における細胞では, 1.03～1.29と高い値を示し, このことは, HVJ$_o$ 感染によって酸性プロテアーゼがリソゾームから放出されたことを暗示している。これに対し, HVJ$_{pi}$ 感染細胞の場合, 感染後 6 時間で S/L 比 は 0.73であり, 非感染細胞のそれと比較すれば有意な上昇を示したが, 感染18時間での値は0.56となり, 感染時間の過ぎるのに伴ない低下する傾向を示した. このことから, HVJ$_{pi}$ 感染によるリソゾーム酵素（この場合酸性プロテアーゼ）の活性化が, 温和でかつ一時的にすぎないと考えられた. 一方, 同時に測定された酸性ホスファターゼ活性については, いずれの HVJ 感染の場合にも, リソゾームからの放出に有意な変化が認められなかった.

Ⅴ. HVJ$_o$ または HVJ$_{pi}$ による IF 産生

HVJ$_{pi}$ 感染の場合, 高m.o.iで速やかに持続感染の成立をみたが, HVJ$_o$ ではm.o.iを高めることは, むしろ持続感染化を困難にした. その原因の 1 つとして, 産生 IF の影響が考えられた. そこで, 2 オンス瓶に培養した HeLa 細胞に HVJ$_o$ または HVJ$_{pi}$ を m.o.i：1 で感染させ, 35°C, 24時間での培養上清に産生された IF を測定した（Table 4）. これをみると, IF 産生は HVJ$_o$ 感染において認められたが, HVJ$_{pi}$ 感染においては, 35°C 培養においてさえ, IF は検出されなかった.

IF 産生に及ぼす HVJ$_o$ のm.o.iによる影響をみると, Table 5 に示されるように, IF 産生はm.o.iに依存しており, m.o.i：0.1では, 少量の IF 産生を認めるにすぎなかった. これらの結果から, HVJ$_o$ の高m.o.i感染において, 多量の IF 産生により, ウイルス増殖が抑制された結果, 持続感染の成立が困難になったものと推察された.

一方, HVJ$_{pi}$ 感染においては, IF を検出できなかったが, かゝる低 IF 誘導能が phenotypical なのか, genetical に安定なのか検討するために, 鶏胎児（8 日卵）で 4 回継代した鶏胎児馴化の HVJ$_{pi}$ につ

Table 3. Activities of acid protease and acid phosphatase in HeLa cells infected with HVJo or HVJpi at multiplicity of 1.0

Cells infected with	Hours after infection	Acid protease (PH 5.0)			Acid phosphatase (PH 4.8)		
		S-fraction	L-fraction	S/L ratio	S-fraction	L-fraction	S/L ratio
None	0	69	340	0.20	529	1429	0.37
	6	67	228	0.29	582	1983	0.29
	18	84	219	0.38	585	1678	0.35
HVJo	6	151	146	1.03	614	1610	0.38
	18	241	187	1.29	488	1468	0.33
HVJpi	6	184	253	0.73	886	1836	0.48
	18	101	180	0.56	480	1642	0.29

Acid protease activity : μM / hour / mg protein (tyrosine liberated from bovine hemoglobin)
Acid phosphatase activity : μM / 0.5 hour / mg protein (p-nitrophenol liberated from disodium p-nitrophenyl phosphate)

いて，HVJ。との比較において，IF の産生が調べられた．Fig. 2 がその結果を示す．HVJ。では感染後8時間で培養液中に IF が認められ，16時間で最高値に達したが，20時間以後減少する傾向にあった．これに比し，鶏胎児馴化 HVJ_{pi} でも感染後48時間まで培養液中にまったく IF の産生が認められなかった．これらのことから，HVJ_{pi} の示す低 IF 誘導能は，ウイルスが増殖した宿主細胞の違いによって影響されない，ウイルス固有の安定な性質と思われた．

Ⅵ. HVJ。または HVJ_{pi} の IF 処理細胞における増殖

半精製濃縮された IF で前処理，あるいは未処理の HeLa 細胞に，HVJ。または HVJ_{pi} を感染させ，未処理細胞でのウイルス産生量に対する処理細胞でのウイルス産生量の比を算定し，各ウイルスの IF に対する感受性の指標とした．指標値が小さい程，IF に対する感受性が高い（強い増殖抑制）ことを示す．

Table 6 の結果が示すごとく，HVJ。は，IF 処理細胞でも増殖抑制をあまり受けず，IF 感受性は比較的低いが，HVJ_{pi} はこれに比し，約100倍以上高い IF 感受性を示した．この結果と，Table 4 の結果とを合せ考えて，HVJ。は IF を誘導するが，IF 処理に対し抵抗性であり，これに反し，HVJ_{pi} は IF に高い感受性を示すが，IF 誘導能を有しないか低いと云えよう．このことは，HVJ_{pi} が ts 変異株であるのみならず，IF との関連性においても，原株である HVJ。とは著じるしく異なっていることを示している．

Ⅶ. HVJ。で新たに樹立された持続感染 HeLa 細胞から抽出される HVJ

Table 4. Interferon production in HeLa cells infected with HVJo or HVJpi

Virus	IF titer (Units / bottle)
HVJo	50
HVJpi	0

HeLa cells (bottle) infected with HVJo or HVJpi (m.o.i : 1.0) were incubated for 24 hours at 35°C. The culture fluids were treated with 2N $HClO_4$ and centrifuged (10 min., 2,000 rpm) to remove virus, following adjustment of PH with 5N NaOH. IF in those samples was assayed by the method of plaque reduction of VSV in monolayers of HeLa cells (plate).

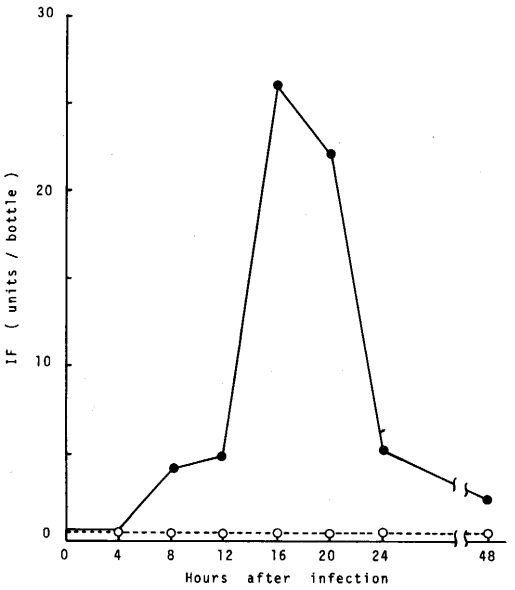
Table 5. Relationship between IF production and M.O.I of HVJo in HeLa cells

M.O.I (CIU / cell)	IF titer (Units / bottle)
0.1	16
0.2	64
0.3	100
0.4	126
0.6	128
1.0	164

IF assay : Same as in table 4.

こゝに用いられた各種 HVJ 持続感染細胞はいずれも，その起源において，HVJ$_o$ の感染により樹立化されたものであることから，ts 変異株の由来について検討された．Table 2 の実験において，HVJ$_o$ 感染で新たに樹立化し，35°C で継代培養された22代目の持続感染 HeLa 細胞から HVJ (HVJ$_{pi_o}$) を抽出して，その温度感受性について検討を加えた．その結果 (Table 7)，HVJ$_{pi_o}$ は 35°C および 37°C 培養の VERO 細胞で，ほゞ同等に増殖した．このことから，HVJ$_{pi_o}$ は完全な ts 変異株でないことは明らかである．すなわち，持続感染の樹立は，HVJ$_o$ 標品中に混在したかもしれない ts 変異株の選択的感染によってもたらされたものでなく，野生型の HVJ で持続感染が樹立され，長期間の継代培養中に ts 変異株が生じたものと考えられた．更に，HVJ$_{pi_o}$ の増殖を，HVJ$_o$ および ts 変異株 (HVJ$_{pi_{ts}}$) のそれらと比較した場合，35°C での HVJ$_{pi_o}$ の増殖が，HVJ$_o$ と異なり非常に高く，むしろ HVJ$_{pi_{ts}}$ のそれに匹敵する値を示した．

Fig. 2. Interferon production in HeLa cells infected with HVJo or HVJpi



M.O.I : 2.0 for HVJo (●—●) and HVJpi (○··○), at 35°C.
IF assay : Same as in table 4.

考　　察

培養細胞におけるパラミキソウイルスの持続感染[2)~4)]は，CPE を伴なわず，個々の細胞において，ウイルス増殖と宿主細胞の増殖とが両立している点において，特異な持続感染系を示す．NDV-L 細胞および HA 2 -HeLa 細胞系の持続感染細胞には，感染性ウイルスの存在することが既に報告されていたが，HVJ 持続感染 HeLa 細胞においては，HAin は産生されてもそれらは非感染性であると考えられてきた．従来，HVJ の増殖は鶏胎児に限られ，培養細胞では，子牛腎臓初代培養細胞におけるプラック形成が知られ

Table 6. Effect of cell treatment with interferon on the yield of HVJo and HVJpi in HeLa cells at 35℃

Virus a)	IF treatment b)	Virus yield c) (CIU / ml)	IF-sensitivity index d)
HVJo	-	3.2×10^2	
	+	2.3×10^2	0.72
HVJpi	-	5.8×10^3	
	+	3.3×10^1	0.0057

a) m.o.i : 1.0 CIU / cell.
b) Treatment of HeLa cells with IF (160 units / ml) for 18 hours before infection. IF used here was partially purified and concentrated from the culture fluid of HeLa cells infected with HVJo.
c) Yield at 24 hours after infection at 35°C.
d) Index = the yield in IF-treated cells / the yield in untreated cells.

Table 7. Yield of HVJo, HVJpi-o and HVJpi-ts in VERO cells at 35° or 37℃

Virus*	Yield (CIU / ml)**		Ratio
	35°C	37°C	37°/ 35°C
HVJo	3.5×10^4	5.3×10^5	15.0
HVJpi-o	5.0×10^6	3.0×10^6	0.6
HVJpi-ts	2.1×10^6	2.5×10^3	0.001

* m.o.i : 1.0 CIU / cell.

** Yield at 24 hours after infection.

る[22]のみで，継代培養細胞のすべてが HVJ の感染に非感受性である故に，HVJ 持続感染の研究はほとんど進展し得なかった．最近，HVJ の増殖におけるトリプシン効果が明らかにされて以来[6)~8)]，VERO 細胞において，プラック測定による HVJ の感染価定量が容易になった．著者は，VERO 細胞でのプラック測定法を用い，各種 HVJ 持続感染細胞における感染性 HVJ の存在を明らかにし得た．かゝる感染性ウイルスは 35℃ で増殖するが，37℃ では増殖できない ts 変異株であった．この発見と時を同じくして，HVJ 持続感染 BHK 細胞からも，鶏胎児を用い，32℃ 培養で ts 変異株の分離されることが報告された[23]．故に，持続感染と ts 変異株との必然的関連性について追求された．

HVJ_{pi} による HeLa 細胞の感染は速やかに持続感染化をもたらしたが，一方，HVJ_o の場合，ウイルス感染を受けた細胞のすべてが持続感染細胞になり得ず，特に高m.o.i感染において，生残した細胞は CPE から回復した時，まったく正常細胞であった．かくのごとき持続感染化に関与する両ウイルスの差は，IF 産生誘導活性の両ウイルス間の差によって，ある程度説明され得た．すなわち，HVJ_{pi} は IF 産生をほとんど誘導せず，よってウイルス増殖は全く抑制されなかった．著者は，更に HeLa-HVJ の培養上清に IF が検出されないことを見ているが，先に HeLa-HVJ がヘルペスウイルスの増殖を阻害せず，むしろ増強することを認めている[12]．同様に NDV および Sindbis ウイルスの増殖が HeLa-HVJ で HeLa 細胞より良く[4]，THEL 細胞より THEL-HVJ で牛痘ウイルスの増殖が促進される[24]ことが報告されている．これらのことから，HVJ_{pi} が IF を誘導しないことが裏づけられる．一方，HVJ_o の高m.o.i感染は多量の IF 産生を誘導する故に，ウイルスの持続的増殖が抑制されたのであろう．しかし，HVJ_o は IF 処理細胞において十分増殖可能であることから考えると，HVJ_o 感染にみられた持続感染化の困難さを IF の影響のみで説明するには十分でない．

持続感染化に重要な影響を及ぼす要素の一つとして，cytopathogenesis[25]がある．この点においても，HVJ_o と HVJ_{pi} との間に著るしい差異がみられた．HVJ_{pi} 感染は軽度の CPE を惹起するのみで，持続感染化が容易であった．今日，CPE 発現の機構については統一的見解はないが，CPE 出現とリソゾーム酵素のリソゾームから細胞質への放出との間に密接な関連性のあることを示唆したいくつかの報告がある[18)26)]．HVJ_o または HVJ_{pi} 感染細胞におけるリソゾーム酵素の細胞質への放出度合は，これらの HVJ によって惹起される CPE の強弱とほゞ並行した．

一方，IF 処理細胞における増殖を比較すると，HVJ_o と HVJ_{pi} とは異なっていた．IF によるウイルス増殖阻害の機作に関する報告は多いが，ほゞ次の2つに大別される．（1）ウイルス核酸合成の抑制[27)28)]，（2）ウイルス特異的メッセンジャー RNA（m-RNA）の translation の抑制[29]．HVJ_{pi} の場合，上記のうち，どちらのレベルにおける抑制にもとづくのか，まだ検討されていない．Richman ら[27]は IF 前処理細胞において，Sendai ウイルスの RNA 合成が低下することを報告していることから考えると，HVJ_{pi} の IF 高感受性は，RNA 合成機構における変異を示しているのかもしれない．

以上，HVJ 持続感染細胞から抽出される 染性 HVJ は，種々の点でその原株である HVJ_o と異なる性質を示すことが明らかになった．特に cytopathogenicity の低いことは，持続感染の維持に好適な性質と思われた．しかし，持続感染の成立が ts 変異株の選択的感染によるものでなく，野生型でも成立し得るという実験結果から，HVJ 持続感染化の開始の機序は，今後の問題として残った．Furman ら[30]は，NDV 持続感染 L 細胞から分離された NDV の ts 変異株のウイルス粒子内に RNA 依存 DNA 合成酵素の存在を認め，持続感染細胞内において，ウイルスゲノムが DNA の形で宿主細胞のクロマチンに組み込まれている可能性を暗示した．HVJ もまた DNA の形をとり得るかどうかは重要な課題の一つであり，今後，HVJ 持続感染が分子生物学的見地からも解析される必要があろう．

結　　論

トリプシン存在下の VERO 細胞におけるプラック測定法で，3種の HVJ 持続感染細胞から，感染性 HVJ（HVJ_{pi}）が検出された．かゝる HVJ_{pi} は，35℃

培養で増殖可能であるが，37°C では増殖できない ts 変異株で，用いられた HVJ 持続感染細胞のすべてに共通していた．

そこで，持続感染化との関連において，HVJ_{pi} の特性が，HVJ_0 との比較において検討された．HVJ_{pi} で感染され，35°C で培養された HeLa 細胞は，細胞崩壊性 CPE を示さず，IF の産生も検出されなかった．更に，感染細胞のリソゾーム酵素のリソゾームからの放出は，温和でかつ一時的にすぎなかった．これらのことから HVJ_{pi} は cytopathogenicity の低いウイルスであることが示された．しかし，HVJ_{pi} は，速やかに持続感染の成立をもたらした．これに対して，原株である HVJ_0 は，HeLa 細胞感染において cytopathogenic であり，IF 産生を強く誘導するところから，特に高m.o.iでは持続感染化が困難であった．

そこで，持続感染化が ts 変異株の選択的感染によって成立したものかどうか検討されたが，HVJ_0 感染で新たに樹立された持続感染細胞からの抽出 HVJ は温度感受性でないことより，ts 変異株の感染のみが，持続感染化を生ずるのではないことが明らかにされた．従って，かゝる ts 変異株は，HVJ の持続感染成立後，長期間の細胞継代培養の過程において生じたものであり，持続感染の安定なる維持に重要な役割を果しているものと考えられた．かくて，HVJ_{pi} の特性は，ts 変異株であることに加え，IF 産生誘導能はないかまたは甚だ弱く，かつ IF 処理に対しては感受性の高いことが示された．

稿を終るに臨み，御指導，御校閲を賜った波田野基一教授に謝意を表するとともに，有益なる御助言と御協力をいたゞいたウイルス部教室員の諸先生方に深く感謝致します．

文　献

1) **Walker, D. L.** : Progr. Med. Virol., **6**, 111 (1964).

2) **Henle, G., Deinhard, F., Bergs, V. V. & Henle, W.** : J. Exptl. Med., **108**, 537 (1958).

3) **Ishida, N., Homma, M., Osato, T., Hinuma, Y. & Miyamoto, T.** : Virology, **24**, 670 (1964).

4) **Maeno, K., Yoshii, S., Nagata, I. & Matsumoto, T.** : Virology, **29**, 255 (1966).

5) **Preble, O. T. & Youngner, J. S.** : J. Virol., **9**, 200 (1972).

6) **Morimoto, Y., Doi, Y. & Itoh, H.** : Japan. J. Med. Biol., **23**, 1 (1970).

7) **Homma, M.** : J. Virol., **8**, 619 (1971).

8) **Scheid, A. & Choppin, P. W.** : Virology, **57**, 475 (1974).

9) **矢吹朗彦** : 金沢大学がん研究所年報，**2**，113 (1968).

10) **Yamada, T. & Hatano, M.** : Gann, **63**, 647 (1972).

11) **Hatano, M. & Morita, O.** : Archv. Ges. Virusforsch., **20**, 305 (1967).

12) **Yamamoto, N., Morita, O., & Satoh, T.** : Molecular and Cellular Repair Processes, 248, Johns Hopkins University Press, 1972.

13) **McDevitt, H. O., Peters, J. H., Pollard, L. W., Harter, J. G. & Coons, A. H.** : J. Immunol., **90**, 634 (1963).

14) **Kashiwazaki, H., Homma, M. & Ishida, N.** : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **120**, 134 (1965).

15) **Lampson, G. P., Tytell, A. A., Nemes, M. M. & Hilleman, M. R.** : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **112**, 468 (1963).

16) **Wagner, R. R.** : Virology, **13**, 323 (1961).

17) **Hara, K. & Nozima, T.** : Japan. J. Microbiol., **14**, 243 (1970).

18) **Allison, A. C. & Sandelin, K.** : J. Exptl. Med., **117**, 879 (1963).

19) **Bessey, O. A., Lowry, O. H. & Brock, M. J.** : J. Biol. Chem., **164**, 321 (1946).

20) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.** : J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).

21) **Portner, A., Marx, P. A. & Kingsbury, D. W.** : J. Virol., **13**, 298 (1974).

22) **Nagata, I., Maeno, K., Yoshii, S. & Matsumoto, T.** : Arch. Ges. Virusforsch., **15**, 257 (1965).

23) **Kimura, Y., Ito, Y. Shimokata, K., Nishiyama, Y., Nagata, I. & Kitoh, J.** : J. Virol., **15**, 55 (1975).

24) **田中淳之，波多野基一** : 細胞生物学シンポジウム，**26**，29 (1974).

25) **Mims, C. A.** : Progr. Med. Virol., **18**, 1 (1974).

26) **Wolff, D. A. & Bubel, H. C.** : Virology, **24**, 502 (1964).

27) **Richman, D. D., Wong, K. T., Robinson, W. S. & Merigan, T. C.** : J. Gen. Virol., **9**,

141 (1970).
28) **Marcus, P. I., Engelhardt, D. L., Hunt, J. M. & Sekellick, M. J.** : Science, **174**, 593 (1971).
29) **Levy, H. B. & Carter, W. A.** : J. Mol. Biol., **31**, 561 (1968).
30) **Furman, P. A. & Hallum, J. V.** : J. Virol., **12**, 548 (1973).

Abstract

Using plaque assay on VERO cells in the presence of trypsin, an exsistence of infectious viruses in various cell cultures persistently infected with paramyxovirus : HVJ (Sendai virus) was proved. These viruses (HVJpi) were temperature-sensitive (ts) mutant capable of propagating in VERO cells only at 35°C, while the original type of HVJ (HVJo) showed a multiplication at both 35° and 37°C.

In HeLa cells infected with HVJpi at 35°C, little cytopathic effect (CPE) and, mild and transient release of lysosomal enzymes from lysosome into the cytoplasm occurred. Furtheremore, HVJpi induced no production of interferon (IF) in HeLa cells and easily led the cells to an establishment of persistent infection. On the other hand, HVJo caused cytopathogenic degeneration in HeLa cells with an activated cytoplasmic release of lysosomal enzymes. The production of IF in HeLa cells by the HVJo infection depended on multiplicity of infection (m.o.i). This appeared to make the cell hard to establish a persistent infection with that virus, especially at m.o.i of 10, because a large amount of IF produced may possibly result in an inhibition of intracellular replication of the viruses and finally the elimination of HVJ-genomes from the host cells. For the establishment of persistent infection with HVJo, an infection with HVJo at m.o.i of 0.1 and following subcultures of HVJ-infected cells by the usual trypsinization was effective.

Viruses reisolated from new carrier cells established with HVJo were not ts mutant, showing a replication in VERO cells at 37°C. These results strongly suggest that the infection with ts mutant is not essential to the initiation of persistent infection but plays rather an important role in the maintenance of steady carrier state of HVJ.

Concerning these persistent infections with HVJpi (HVJts), our ts mutant was interesting in its higher sensitivity to IF treatment than the original HVJo.