

# Polyoma virus処理細胞におけるInfluenza virus(NWS株)の増殖促進現象について: [ I ] Polyomavirus処理細胞の特性

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/4603">http://hdl.handle.net/2297/4603</a>

# Polyoma virus 処理細胞における Influenza virus (NWS株) の増殖促進現象について

## 〔I〕 Polyoma virus 処理細胞の特性

金沢大学がん研究所ウイルス学講座 (主任：波多野基一教授)

木 村 晋 亮

(昭和49年11月28日受付)

本論文の一部は、第14回日本ウイルス学会総会 (1966)、第6回日本細菌学会中部支部総会 (1969) で発表した。

我々は前報<sup>1)</sup>において、紫外線不活化 Polyoma virus (PV) により前処理された細胞上で、Influenza virus (IV) NWS 株の増殖が増強される現象を報告したが、この現象は生のPVによっても同様であることがその後示されるに至った。かゝる NWS の増殖増強は、NWS が本来増殖可能なすべての細胞系において認められ、初代培養細胞系ではコウシ腎臓細胞、ブタ腎臓細胞、ニワトリ腎臓細胞など、継代培養細胞系ではサル腎臓由来の VERO, MS, ヒト由来の G1, G2 細胞などで確認された。しかし、Myxovirus の1段増殖 (single cycle growth) のみが可能で、以後の増殖が不完全な増殖系であるヒト由来の HeLa, HEp 2 細胞では、この現象が生じなかった。一方、これら各細胞でのPV増殖は全く認められていない。

このようにある細胞系において、ある1つのウイルスを感染させることにより、次に感染させた他のウイルスの増殖が促進される現象の機作については、これまで complementation や phenotypic mixing による helper effect, interferon の産生やその抗ウイルス作用の抑制、更には積極的にウイルスの増殖を促進する因子 (enhancer, stimulon など) の産生など、幾つかが明らかになりつつある<sup>2)</sup>。

そこで前報<sup>1)</sup>では、PV前処理がG1およびG2細胞におけるIV(NWS株)の増殖増強に、どんな役割を演じているかを予備的に検討したが、今回は自己干渉の問題、増殖促進物質産生の有無を中心として、更に検討を加え、従来知られている機作の何れに該当するかを

明らかにせんとした。

## 材 料 と 方 法

### I. 培養細胞

用いたG1およびG2細胞は、何れもヒト骨巨細胞腫由来の継代培養細胞で、増殖用培養液には Eagle MEM 培地にコウシ血清を10%に加えて用いた。ウイルス感染後の細胞の継持には、Medium-199 培地に Bovine Plasma Albumin Fraction V (Armour) を0.1%、コウシ血清を0.2%に添加したものを維持培養液 (MM) として用いた。

### II. ウイルス

Influenza virus (IV) : A型のNWS株の発育鶏卵継代株 (NWSegg) で赤血球凝集 (HA) 価 : 512 HAU/ml のものを全ての実験に供した。

Polyoma virus (PV) : 4B5-6株を初代マウス (Swiss) 胎児 (ME) 細胞で増殖させ継代したもので、4.096HAU/ml,  $10^{8.5}$ TCID<sub>50</sub>/0.2mlのものを実験に供した。

ウイルス液の稀釈には、何れの場合にも Eagle MEM培地に炭酸水素ナトリウムを0.15%に添加したものを用いた。

### III. ウイルスの定量

1. IV, PV の赤血球凝集 (HA) 価の測定 : IV, PV とも、pH 7.2 の 0.01M リン酸塩緩衝食塩水 (PBS) で2倍階段稀釈 (試験管法) し、IVの場合には0.3%ニワトリ赤血球、PVの場合には0.3%モルモット赤血球を何れの場合にも等量 (0.5ml) 加え、4°C

Enhanced Multiplication of Influenza Virus (NWS Strain) in Cultured Cell Lines Treated with Polyoma Virus (4B5-6 Strain). **Nobuaki Kimura**, Department of Virology, (Director : Prof. M. Hatano), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

に2時間静置後、凝集を示す最高稀釈をHA価 (HAU/ml) とした。

2. 赤血球吸着現象誘発量 (HAD<sub>50</sub>) の測定によるIV感染価定量: ローラーチューブ内に単層培養したG1あるいはG2細胞を Hanks 液で2回洗滌後、NWSeg の10倍階段稀釈した液を0.2mlずつ各稀釈2本宛接種した。37°C 5時間 NWSeg を吸着させた後、接種 NWSeg を捨て、維持液 (MM) に換え35°Cに培養した。必要に応じMMの交換をしながら、7日間培養した後MMを去り、これに新鮮モルモット赤血球浮遊液 (PBSで0.3%) を1ml加え、4°Cで30分間静置し、1回冷PBSで洗滌した後鏡検し、細胞への赤血球吸着 (HAD) の状態を観察した。明らかにHAD 陽性を示す NWSeg の 最高稀釈から Behrens & Karberの方法<sup>2)</sup>により50%に HAD を起す値 (HAD<sub>50</sub>/0.2ml) を計算した。

3. ブラック (plaque) によるIVの定量: ブラック瓶に単層培養したG2細胞を Hanks 液で2回洗滌後、測定材料のIVを稀釈液で10倍階段稀釈し、各稀釈液を1.0ml宛接種した。37°Cで5時間IV吸着後、Hanks 液で1回洗滌し、第1次重層 medium (OM) を重層した。35°C 3日後 Neutral Red を含む第2次OMを重層し、翌日ブラックを計数した。重層用のOMは次の組成のものを使用した。第1次OMは Medium-199 10倍濃縮液10.0, 9.1% Skim milk (DIFCO) (pH7.6) 8.0, 0.5M Tris buffer (pH7.6) 4.0, 5% Bovine Plasma Albumin Fraction V (Armour) 1.0, 1% DEAE Dextran (Pharmacia) 1.0, コウシ血清 0.2, 7.5%炭酸水素ナトリウム液2.0, 再蒸溜水 23, 2% Special Agar Noble (DIFCO) 50, 全量100である。これは用時調製し、寒天は重層直前に混和し、42°Cに保温しながら、ブラック瓶あたり5ml宛重層した。第2次OMは、Medium-199 10倍濃縮液10.0, 7.5%炭酸水素ナトリウム液 2.0, 0.2% Neutral Red (DIFCO) 6.0, 再蒸溜水 32, 2% Special Agar Noble (DIFCO) 50, 全量100のものを第1次OMの上に更に2ml宛重層した。

#### IV. 赤血球凝集抑制 (HAI) 価の測定

使用IV (NWSeg, NWS<sub>62</sub>など) の抗原性のチェックが必要な時行なった。これには、NWSeg を更に初代コウシ腎細胞で増殖させた NWS<sub>RCK</sub> で免疫したモルモット抗血清を用いて、赤血球凝集抑制反応 (HAI) を実施した。抗原は8HAU/0.25mlのIVを用い、凝集抑制を示す抗血清の最高稀釈 (HAI価/ml) を求めた。

#### V. 紫外線 (UV) による IV (NWSeg) の不活化

ウイルス材料を直径90mmの petri dish に液層が1mm以下になるように入れ、20cmの高さより東芝GL-10 (10W) の殺菌灯ランプにて90秒照射を行なった。殺菌灯照射中は、材料がUVに均等に照射されるように、絶えず緩やかに振盪した。かゝる条件での不活化はほぼ完全で、生残活性ウイルスを認めなかった。

#### VI. PV乃至UV不活化 NWS (NWS<sub>UV</sub>) による細胞処理

単層に培養されたG1またはG2細胞を Hanks 液で2回洗い、PVまたはNWS<sub>UV</sub>をMMで適宜に稀釈した後接種し、37°Cに1~2日間静置し、これを細胞の前処理とした。対照にはMMのみを接種し、同様に培養した。かゝるPVによる前処理細胞を Hanks 液で2回洗滌した後、NWS接種などに用いた。

#### VII G2細胞からの促進因子の抽出ならびに産生干渉物質の調整

1. PV処理G2細胞からの促進因子の抽出: 単層培養したG2細胞に、PV (4B5-6株) を (10<sup>-1</sup>) にMMで稀釈して接種し、37°Cで3時間吸着後、Hanks 液で1回洗滌し、MMで2日間培養した。その後、細胞をMMと共に3回凍結融解し、1N塩酸でpH2.0にして4°Cで1夜放置した。更に3,000rpm, 15分の遠心上清を1N水酸化ナトリウム液および7.5%炭酸水素ナトリウム液でpH7.0に戻したものを抽出材料とした。対照にはMMで同様に処理したG2細胞抽出物を用いた。

2. UV不活化IV処理細胞産生の干渉物質調整: UV不活化したIV (NWS株) の (1:2)稀釈のサンプル (256HAU/ml) をG2細胞に5時間吸着させた後、2日間維持培養した。その培養上清を1N塩酸でpH2.0にし、4°C1夜放置後pH7.0に戻したものを干渉物質としての interferon 粗材料とした。

### 成 績

#### I. PV処理効果の永続性

G2細胞をPVで前処理すると、前報<sup>1)</sup>の通り、その細胞でのIV (NWS株) の増殖は未処理細胞での増殖より明らかに高い。かゝるPV処理によって獲得したG2細胞の性状の継続性、即ち処理細胞の継代培養を続けても、この性質が残存維持されるかどうかについて検討を加えた。

1. PV処理後継代培養を重ねたG1, G2細胞のNWS感受性

単層培養したG1およびG2細胞にPV処理を行ない、 $7 \times 10^4$ /mlの濃度で継代培養を重ねた。4日毎に継代を繰返し、G1細胞は4代と7代で、G2細胞は11代で実験に供した。PV処理細胞の対照には、未処理細胞を全く同様な方法で継代したものをを用いた。

これらPV処理後継代培養を繰返したG1、G2細胞、および未処理の正常G1、G2細胞へNWSを感染し、7日目におけるHAD<sub>50</sub>のみた感染価および7日目の細胞培養液中のHA価のみたNWS産生量を比較したのが Table 1である。測定されたNWSの感染価についてみると、G1、G2細胞とも処理後継代を重ねた細胞と正常細胞とでは、全く差異がみられず、僅かにPVを常に ( $10^{-1}$ ) に培養液に加えて継代したもののみにNWS増殖の増強がみられた。このことは、PV処理によって細胞が遺伝的に何らかに変換し、NWSに対する感受性増強を獲得したのではなく、NWSの接種前にPVが何らかの形で直接細胞に働きかけているのでなければ、このような増殖増強効果はないことを意味している。しかし一方、接種NWSの各同一稀釈液 (同一接種量) における産生HA価を比較してみると、PV処理後の継代培養細胞の方が正常対照細胞よりもやや高い傾向を示した。これらより、PV処理後の継代数が少なければ、前処理したPVの影響が幾分残る可能性もあるという程度で、その永続性は著明ではなかった。

## 2. PV処理細胞の継代培養およびPV再処理による

### NWS感受性の変化

前実験と同様にPV処理後5代継代したG1細胞および12代継代したG2細胞に、更にPV再処理を行なって、接種NWSの感染価および産生ウイルスのHA価に及ぼす影響をみた。再処理方法は最初の処理と全く同一である。

この結果は Table 2に示したように、対照の正常細胞では、PV処理によって感染価もHA価も上昇(感受性増強)したのに比し、PV処理後継代培養した細胞への再処理では、G1、G2細胞ともNWS感受性の若干の低下が有意にみられた。(感染価で0.5~1.0 log, 産生したHA価では1~32倍の低下)。この原因については不明であるが、先の実験同様、細胞の側に何からの形でPVの影響が残っていたのではないかと思われた。しかし前実験と同じく、PV存在下で継代した細胞では、かゝる再処理の影響は全くみられなかった。

### II. PV処理G2細胞上で増殖したNWSの性状

このようにPVで処理した細胞では、NWSの増殖が増強されるが、処理および未処理細胞で増殖したNWS間に何らかの差異があるかどうかを知るための次の実験を行なった。

#### 1. 正常G2細胞における増殖性

PVの ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) に稀釈したサンプルをG2細胞に37°C 3時間吸着し2日間培養した後、NWSを感染し、7日目に判定されるNWSの感染価を比較

Table 1. Effect of cell subcultures after cell treatment with Polyoma virus on NWS virus susceptibility

Cells	Treatment with	Numbers of subcultures after treatment	NWS infected						
			Virus infectivity in subcultured cells HAD <sub>50</sub> /0.2 ml (7d)	Virus yield in culture media of subcultured cells: HA titer/0.5ml(7d) at inoculum dilution of					
				-1	-2	-3	-4	-5	-6(log)
G1	None PV, $10^{-1}$	4	6.5			128	128	128	32
			6.5 (0)*			128	128	128	128
G1	None PV, $10^{-1}$	7	6.5	32	32	32	8	< 2	
			6.5 (0)*	16	32	64	16	8	
G2	None PV, $10^{-1}$ PV,(+) #	11	5.5	32	16	8	< 4		
			5.5 (0)*	64	16	8	< 4		
			6.5 (+1.0)*	32	16	16	8	4	

\* Difference between control and experiment

# Subcultured in the presence of Polyoma virus (final dilution :  $10^{-1}$ )

してみると、前実験と同じく、PV処理細胞においては、正常未処理細胞に比し、1.0~1.5log高かった (Table 3)。しかし、ここで NWS の ( $10^{-5}$ ) を接種後、7日目の培養液中へ産生された NWS (HA価は、PV処理 (NWS<sub>PV-G2</sub>)、未処理 (NWS<sub>G2</sub>) 何れも同じで128HAU/ml) を各々正常未処理G2細胞上で assay した。

その結果、PV処理細胞増殖の NWS(NWS<sub>PV-G2</sub>) は、正常未処理細胞増殖のものに比べ、HAD<sub>50</sub>/0.2ml で表わされた感染価が0.5~1.0log高い価を示し、かつその時の培養液への産生ウイルスHA価も16倍高い価を与えた。このことは、PV処理細胞上で増殖した NWS<sub>PV-G2</sub> が正常細胞で増えた NWS<sub>G2</sub> とは若干異なり、HA価は同じでも感染価はより高く、同時にそれは完全ウイルス粒子の多いことを暗示していた。

### 2. 赤血球凝集抑制 (HAI) 抗体との反応性

このような増殖性の差異が両細胞で産生された NWS 粒子の何に由来しているかを探るため、抗原性の差を検討した。抗体としては発育鶏卵継代後初代コウジ腎細胞で増殖させた NWS のモルモット免疫血清を用い、ウイルス抗原としてはG1およびG2細胞の正常およびPV処理細胞で増殖した NWS を選び、HAI反応を行なった。

その結果を Table 4 に示したが、HAI試験のみ

る限りにおいては、これらPV処理および未処理細胞で増殖した2つのウイルス間には、免疫学的な差異は全くみられなかった。このことから、PV処理細胞で増殖した NWS 粒子の赤血球凝集素の抗原性には、何の変化もPVによりもたらされていないことが判明した。(G1, G2両細胞とも)。

### III. PV処理G2細胞への NWS吸着の問題

このようにPV前処理 G1 および G2 細胞では、NWS の増殖が増強されたが、それがPV処理細胞への NWS 吸着の上昇に由来しているかどうかをみた。4.096HAU/mlのPVサンプルを ( $10^{-1}$ ) に希釈してG2細胞に接種し、36°C、3時間吸着後、1日培養した処理細胞に、512HAU/mlの NWS を ( $10^{-1}$ ) に希釈して36°C、5時間吸着させ、5時間後の未吸着 NWS を正常G2細胞で assay した。対照には、未処理のG2細胞への未吸着 NWS をおき、同様な方法で assay した。その他に、NWS 自身の熱不活化による測定価低下への対照として、吸着実験用ウイルス液 ( $10^{-1}$ 希釈) およびこのウイルス液を吸着条件である36°C5時間放置したものが用いられた。

その結果 (Table 5)、未吸着 NWS 自身のHA価からみると、処理、未処理いずれの細胞へも、使用 NWS 量の約半量程度の吸着が同われ、これら2つの細胞間には差異がみられなかった。一方かゝる未吸着

Table 2. Effect of cell retreatment with Polyoma virus on NWS virus susceptibility of cells subcultured after treatment with Polyoma virus

Cells	Pre-treatment with	Numbers of subcultures	Re-treatment with	NWS infected						
				Virus infectivity in retreated cells HAD <sub>50</sub> /0.2ml (7d)	Virus yield in culture media of retreated cells: HA titer/0.5ml(7d) at inoculum dilution of					-7 (log)
					-2	-3	-4	-5	-6	
G1	None	5	None	5.5			128	64	<2	
			PV, 10 <sup>-1</sup>	7.0 (+1.5)			128	64	32	<2
G2	PV, 10 <sup>-1</sup>	5	None	7.5			128	128	128	64
			PV, 10 <sup>-1</sup>	6.5 (-1.0)			128	128	128	<2
G2	None	10	None	6.0	128	128	128	64	<2	
			PV, 10 <sup>-1</sup>	≥ 6.5 (≥ +0.5)	128	128	128	64	8	
	PV, 10 <sup>-1</sup>	12	None	5.5	128	128	128	64	<2	
G2	PV(+)	#	PV, 10 <sup>-1</sup>	5.0 (-0.5)	64	64	8	<2		
			None	6.0	64	64	16	8	<2	
			PV, 10 <sup>-1</sup>	6.0 (0) *	64	64	16	8	<2	

\* , # : Same as in Table 1.

の HAD<sub>50</sub>を指標とした感染価を、正常G2細胞で assay してみると、PV処理細胞上での未吸着 NWS は未処理細胞でのそれに比し、1.0 log高い感染価を示した。更に各未吸着 NWS (10<sup>-1</sup>~10<sup>-4</sup>稀釈)の接種により、培養液中に7日後産生されるHA価の比較

からみると、むしろPV処理細胞上での未吸着 NWSの方がやゝ高い感染性を維持していることになり、結果的にはPV処理細胞への NWS 吸着はむしろやゝ悪いといえる。何れにせよ NWS 吸着度は、PV処理、未処理細胞で大差なく、少くともPV処理細胞がNWS

Table 3. Replicating activity of NWS grown in the polyoma virus-treated G2 cells

G2 cell treatment for 2 days with	NWS infected			
	Virus infectivity in treated cells HAD <sub>50</sub> /0.2ml (7d)	Virus yield in culture media of treated cells: HA titer/0.5ml at 10 <sup>-5</sup> inoculum		
		5 d	6 d	7 d(after NWS infection)
M. M.	5.5	64	128	(128) : NWS <sub>G2</sub> (A)
PV {	10 <sup>-0</sup>	6.5 (+1.0)*	64	128 (128) (B)
	10 <sup>-1</sup>	6.5 (+1.0)*	64	128 (128) (C)
	10 <sup>-2</sup>	7.0 (+1.5)*	64	128 (128) (D)
				} NWS <sub>PV-G2</sub>

Assay of 7 day's culture media (NWS<sub>G2</sub> and NWS<sub>PV-G2</sub>) in G2 cells

Virus sample	Virus infectivity in G2 cells HAD <sub>50</sub> /0.2ml (7d)	Virus yield in culture media of G2 cells HA titer/0.5ml (7d) at 10 <sup>-3</sup> inoculum (NWS <sub>G2</sub> and NWS <sub>PV-G2</sub> )	
NWS <sub>G2</sub> (A)	3.0	4 (1)*	
NWS <sub>PV-G2</sub> {	(B)	3.5 (+0.5)*	64 (16)*
	(C)	3.5 (+0.5)*	64 (16)*
	(D)	4.0 (+1.0)*	64 (16)*

\* Difference between control and experiment

Table 4. Hemagglutination inhibition test by NWS grown in developing chick embryos and NWS grown in polyoma virus-treated G1 or G2 cells

Antiserum	Virus as antigen	Grown in	HAI titer/ml of antiserum
Anti-NWS E <sub>8</sub> CK <sub>17</sub> guinea pig serum	NWS E <sub>8</sub>	E	1,280
	NWS E <sub>8</sub> CK <sub>17</sub> *	CK	5,120 (homo.)
	NWS E <sub>8</sub> G1 <sub>1</sub>	G 1	5,120
	NWS E <sub>8</sub> PV-G1 <sub>1</sub>	PV-G 1 #	5,120
	NWS E <sub>14</sub>	E	1,280
	NWS E <sub>14</sub> G2 <sub>1</sub>	G 2	1,280
	NWS E <sub>14</sub> PV-G2 <sub>1</sub>	PV-G 2	1,280

\* Passaged numbers of NWS in developing chick embryo (E) and primary calf kidney cells (CK)

# Polyoma virus-treated G1 cells

吸着の上昇を来すということは全く見出されなかった。

#### IV. PV処理G2細胞から NWS 増殖促進因子の抽出

このようにPV処理は NWS の吸着を促進させるこ

とはないとすると、G2細胞のPV処理により細胞が NWS 増殖促進因子を産生することも考えられる。そこで文献(14)~(18)にみられる stimulon や enhancer などのようなウイルス増殖促進物質の抽出を PV処理G2細胞より試みた。材料と方法の項で述べ

Table 5. Assay of NWS unadsorbed on the Polyoma virus-treated and untreated G2 cells

Infected viruses	HA titer/0.5ml	Virus infectivity in G2 cells HAD <sub>50</sub> /0.2ml(7d)	Virus yield in cultured media of G2 cells: HA titer/0.5ml (7d) at inoculum dilution of			
			- 1	- 2	- 3	-4 (log)
Unadsorbed NWS (adsorbed for 5 hrs, at 37°C) on PV-treated G2 cells	16 (1/2)*	5.5 (+1.5)*	16	16	16	8
on untreated G2 cells	16 (1/2)*	4.5 (+0.5)*	16	16	16	< 2
Inoculum NWS (control) (incubated for 5hrs, at 37°C)	32 (1)*	4.0	16	8	8	< 2
Inoculum NWS (no incubation)	64 (2)	5.5 (+1.5)*	32	16	16	4

\* Difference between control and experiment

Table 6. Effect of extracts from Polyoma virus-treated G2 cells on NWS multiplication

G2+PV(10<sup>-1</sup>)→adsorbed for 3 hrs. and cultured for 2 days→freezing and thawing of cells with culture media, 3 times→pH2.0 for overnight at 4°C→supernatant centrifuged for 15 min. at 3,000 r.p.m.→pH7.0=Ext.

#### A) Liquid culture method

G2 cell treatment for overnight at 37°C with	NWS infected				
	Virus infectivity in treated cells HAD <sub>50</sub> /0.2ml(5d)	Virus yield in culture media of treated cells: HA titer/0.5ml (5d) at inoculum dilution of			
		- 3	- 4	- 5	-6 (log)
M. M	5.5	8	32	8 (1)*	< 2 (1)*
Ext.(G2+M, M.)(1:1)	5.5 (0)*	8	32	8 (1)*	< 2 (1)*
Ext.(G2+PV) (1:1)	6.5 (1.0)*	8	32	32 (4)*	8 (4)*

#### B) Plaque assay method

G2 cell treatment for overnight at 37°C with	NWS infected				
	Numbers of plaque(14d) in treated cells (average)				Plaque size(mm)(15d)
M. M.	42	55	58	52	0.3-0.7
Ext.(G2+M, M.)(1:2.5)	45	47	53	48 (-4)*	0.3-0.5
Ext.(G2+PV) (1:2.5)	51	51	55	52 (0)*	0.2-0.4
PV adsorbed for 3 hrs (1:5)	73	76	77	75 (+23)*	0.3-0.7

\* Difference between control and experiment

た作製法の如く抽出したPV処理G2細胞由来の物質と正常G2細胞由来の抽出物および維持液（対照）のみで、G2細胞を36°Cで1夜前処置し、これら前処置した各G2細胞上における接種NWSの増殖を比較した。

その結果は、Table 6, A) に示したように、PV処理G2細胞抽出液で前処置したG2細胞は、維持液のみおよび未処理G2細胞からの抽出液で処置したものに比べ、NWSの感染価(HAD<sub>50</sub>, 5日目の判定)で1.0 log, 培養液への産生HA価でも4~8倍高い価を示した。

一方、これら抽出液の(1:2.5)でG2細胞を前処置した後、接種NWSの感染価を plaque assayで求めたのが Table 6, B) である。これをみると、各抽出物で前処置した細胞間で全く差はみられなかったが、PVで3時間処置したG2細胞上では、ブラック数の増加が認められた。これらの結果から、PV前

処理G2細胞のNWS増殖促進物質産生は著明でなく、かつその再現性は乏しいと思われる。

#### V. 紫外線 (UV) 不活化 NWS の自家干渉と細胞のPV処理によるそれへの拮抗乃至回復

一般に、ウイルスを細胞に感染させると、ウイルス材料自身に若干含まれる不活化ウイルスにより、ある程度必然的に生ずる自家干渉現象にうちかって始めてそのウイルスの増殖がおきると考えられている。前項まで検討してきた幾つかの機作がすべて否定的であったので、我々のPV前処理によるNWSの増殖増強機作もこの自家干渉への拮抗またはそれよりの回復ではないかと考えた。そこでNWS-G2細胞の系でも、この自家干渉に関係するinterferon産生の有無、細胞性干渉の成立乃至それへのPV処理の影響などについて検討を加えた。

#### 1. UV不活化NWS処理G2細胞におけるinterferon産生

Table 7. Autointerfering activity of G2 cells treated with UV-irradiated NWS

#### A) Interferon activity of culture media (C.M.) of NWS<sub>UV</sub>-treated G2 cells

G2 cell treatment for overnight at 37°C with	NWS infected			
	Virus infectivity in treated cells HAD <sub>50</sub> /0.2ml (7d)	Virus yield in culture media of treated cells: HA titer/0.5ml(7d) at inoculum dilution of		
		-5	-6	-7 (log)
M, M	7.5	32	32	32
C, M, (G2 + M. M.)(1:4)	7.5 (0)*	64	32	16
C, M, (G2 + NWS <sub>uv</sub> )	7.5 (0)*	64	32	16

#### B) Cellular autointerfering activity of G2 cells treated with NWS<sub>UV</sub>

G2 cell treatment for overnight at 37°C with	NWS infected								
	Virus infectivity in treated cells HAD <sub>50</sub> /0.2ml (7d)	Virus yield in culture media of treated cells: HA titer/0.5ml(7d) at inoculum dilution of							
		-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8 (log)	
NWS <sub>uv</sub>	1:20	3.5 (-5.0)*	8	4	< 2				
	1:40	4.5 (-4.0)*	8	4	< 2				
	1:80	5.5 (-3.0)*		8	8	2	< 2		
	1:160	6.0 (-2.5)*		16	32	32	4	< 2	
	1:320	7.0 (-1.5)*			32	64	32	2	< 2
	1:640	7.5 (-1.0)*			64	64	32	16	< 2
M.M. (control)	8.5			64	128	64	64	16	

\* Difference between control and experiment

先ず材料と方法の項で述べた如く調整したものを interferon 材料とした。その対照には、不活化 NWS の代りに維持液を用いて作った培養上清、および NWS 増殖の対照として維持液のみで、G2細胞を Table 7, A) の如く処理した後、NWS を感染させた。その結果これら3者の中で、測定される感染価 (HAD<sub>50</sub>)、産生ウイルスのHA価とも全く差はなく、この条件では、UV不活化 NWS によるG2細胞での interferon 産生は確認できなかった。

2. UV不活化 NWS による細胞性自家干渉の成立 人工的にUVで不活化した NWS 粒子によるG2細胞の interferon 産生は認めなかったが、このUV不活化 NWS 粒子による細胞性自家干渉を次に検討した。

その結果、Table 7, B) に示したように、このUV不活化粒子によるG2細胞自身の自家干渉は著明に見出された。即ち未処理のG2細胞における感染7日目のHAD<sub>50</sub>からみた接種NWS感染価は、10<sup>8.5</sup>であるのに対し、不活化NWSの(1:640)稀釈で前処理してもなおその感染価を1/10に減弱させる細胞性自家干渉効果がみられた。この効果は、不活化NWSの稀釈倍数が低くなる(不活化NWSの濃度が高くなる)につれて増大し、(1:20)稀釈で処理すると、測定された感染価は10<sup>3.5</sup>(対照の10<sup>8.5</sup>)であった。同様の事実は、細胞培養液中に産生されるウイルスの

HA価でも明らかに示された。

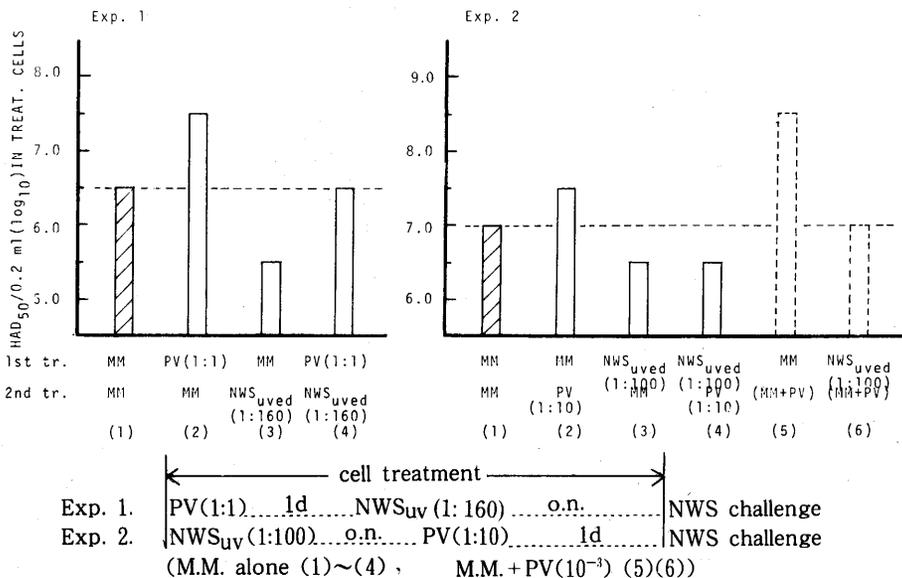
3. PV処理による NWS 自家干渉の回復効果

上述の如く、UV不活化 NWS で細胞を前処理すると、顕著な細胞性自家干渉現象がみられたが、この現象がPV処理によって如何なる影響を受け、NWS 増殖増強に関連するかについて検討を加えた。

1) 接種 NWS の感染価 (HAD<sub>50</sub>) および産生ウイルスHA価測定による方法

実験方法は Fig.1, Table 8 に示してある。先ず、PVをG2細胞に作用させ(前処理)、36°Cで1日培養後、UV不活化NWS(1:160)稀釈で更に36°C1夜処置し、次にNWSをchallengeした(Fig. 1, Exp. 1)。ここでUV不活化NWSの(1:160)稀釈を用いたのは、細胞性自家干渉がNWS増殖抑制程度として(10<sup>-2</sup>)前後に出現し、このところがこの実験に好適と判断したので選ばれた。対照には、PVまたはUV不活化NWSの代りに維持液(MM)で前処理(処置)したG2細胞を用いた。感染7日目の接種NWSの感染価(HAD<sub>50</sub>)測定の結果が Fig. 1, Exp.1 に示されている。PVで前処理後、UV不活化NWSで処理した場合(Exp.1,(4))には、不活化NWSによる細胞性自家干渉作用(Exp.1,(3))は相殺され、challenge NWSの感染価は対照のMM処理細胞のそれ(Exp.1,(1))まで完全に回復された。この時同時にPV処理によるNWS感染価上昇

Fig. 1. NWS virus susceptibility in G2 cells treated with PV and NWS.



(NWS 感受性乃至増殖促進) (Exp. 1, (2)) は、図の如く明らかに見出された。同様のことは培養上清への産生 NWS のHA価でも認められ (Table 8, Exp. 1)。この場合その回復は完全でなかったが、未処理対照に近いパターンを示した。

次にG2細胞処理の順を逆にした場合について検討を加えた (Fig. 1, Exp. 2)。即ちUV不活化NWSの(1:100)稀釈でG2細胞を36°C1夜前処理後、PV(1:10)稀釈で36°C1日後処置し、NWSをchallengeした。その結果、不活化NWS誘発自家干渉のPVによる回復は、NWSの感染価 (Fig. 1, Exp. 2, (4)) からも、培養液への産生HA価 (Table 8, Exp. 2) からも全く認められなかった。これは処理に用いたUV不活化NWSの濃度が高い (Exp. 1では1:160なのにExp. 2では1:100) のに、同じ

く処理に用いたPVの濃度が低かった (Exp. 1では1:1, Exp. 2では1:10) ため、自家干渉が強く、PVによるその回復能が弱い組合せという実験条件から生じていると考えられた。しかしこのようなExp. 2の条件下でも、MM中にPVを( $10^{-3}$ )に加えると、感染価は未処理対照と同じ程度に回復した (Fig. 1, Exp. 2, (6))。またこの場合のPV自身によるNWS増殖増強作用は、NWS感染価上昇として1.5 log高い値を与え、MM中にPVを加えるという実験方法がより有効な効果を示した。しかもこのExp. 2のPV含有維持液という条件下で、培養液中への産生ウイルスHA価は、Exp. 1の場合と同じ様に回復を認めることができた (Table 8, Exp. 2)。これらExp. 1, Exp. 2の結果を総合すると、UV不活化NWS処理による自家干渉誘発をPV処理に先行させると、NWS

Table 8. Virus yield in culture media of G2 cells treated with PV and NWS<sub>uv</sub>

G2 cell treatment at 37°C		Challenged with live NWS and cultured with	NWS yield in culture media of treated cells: HA titer/0.5ml (7d) at inoculum dilution of					
1st (for 1d)	2nd (for overnight)		-3	-4	-5	-6	-7	-8 (log)
Exp. 1.								
PV (1:1)	NWS uv (1:160)	M. M.	32	32	8	2	< 2	
PV (1:1)	M. M.	M. M.			64	64	8	
M. M.	NWS uv (1:160)	M. M.		32	4	< 2		
M. M.	M. M.	M. M.			64	4	< 2	
Exp. 2.								
NWS uv (1:100)	PV (1:10)	M. M.		8	8	4	< 2	
NWS uv (1:100)	M. M.	M. M.		8	16	4	< 2	
NWS uv (1:100)	M. M.	M. M. + PV, $10^{-3}$		16	16	8	2	< 2
M. M.	PV (1:10)	M. M.			32	16	4	< 2
M. M.	M. M.	M. M.			32	32	8	< 2
M. M.	M. M.	M. M. + PV, $10^{-3}$			32	32	16	4

Table 9. NWS plaque assay in G2 cells treated with PV and NWS<sub>uv</sub>

G2 cell treatment for overnight at 37°C with a mixture of	Numbers of plaque (14d) in treated cells at inoculum dilution of				Plaque size (14d) mm
	-5.0	-5.5	-6.0	av. (-5.0) (log)	
NWS uv (1:25) + PV(1:2.5)	31, 37	22, 25		54	0.2-0.3
NWS uv (1:25) + M. M.	13, 18	5, 8		18	0.1-0.3
M. M. + PV (1:2.5)		68, 77	37, 41	301	0.2-1.0
M. M. + M. M.		60, 65	16, 17	181	0.1-0.3

の challenge 後の細胞維持培養液にPVを加えた時のみ、不活化 NWS の自家干渉よりの回復がみられたが、一般的にはPV処理乃至存在は、不活化 NWS の自家干渉（活性 NWS の増殖抑制）よりの回復解放を来すといえよう。

## 2) plaque assay による方法

次に、不活化 NWS とPVの両者で同時に細胞を処理した場合を plaque assay によって試みた。即ちUV不活化 NWS とPVとを等量に加えた混合液（各々の最終稀釈は1:50および1:5）5.0mlで、単層に増殖したG2細胞（50mm径 petri dish）を36°C1夜前処理後、NWS を challenge して出現するブラック数を計数した。Table 9 にそれら結果を示した。

出現ブラック数は、未処理対照に比べ、PV単独処理では、その増殖増強作用で(309/181=1.7)倍に増加するのに、UV不活化 NWS による単独前処理では、自家干渉により(18/181=1/10)に減少した。しかしながら(PV+UV不活化 NWS)混合液処理では(54/181=1/3.3)となり、UV不活化 NWS 単独処理に比べると(54/18=3)倍の増加を来した。かくてかゝる実験方法でも、不活化 NWS による自家干渉（増殖抑制）効果は、PVの増殖増強作用により相殺されて、ある程度の回復がみられることが明らかにされた。この際ブラックの大きさは、PV単独の処理で若干増大をみせた以外には顕著な差異はなかった。

## 考 察

同一細胞上において、あるウイルスが他のウイルスの増殖を促進する現象については、Kumagai ら<sup>3)</sup>によって、ブタ睾丸細胞における hog cholera virus (HCV) 感染が Newcastle disease virus (NDV) の増殖を助長する END (Exaltation of NDV) 現象の報告以来、幾つか知られている。

我々も Polyoma virus(PV) 処理細胞で Influenza virus(IV) NWS 株の増殖が増強されることを先にみたが<sup>1)</sup>、NWS 単独感染では完全増殖のできない細胞（例えば HeLa や HEp 2 細胞）においては、かゝるPVによる増強は認められなかった。そこでこの報告では、継代培養細胞の中でも比較的増強効果の高かったヒト骨巨細胞腫由来のG1およびG2細胞を用い、その機作解明を試みた。この現象は、始めNWS 感染後の培養上清のHA価測定で、PV処理細胞の方が未処理細胞におけるより高いHA価を示したことに端を発している。しかしその検討には、感度、正

確さからいっても、NWS の HAD<sub>50</sub>による感染価、培養上清のHA価測定よりも、むしろ plaque assay による解析が当然望ましい。ところがPVによる増強作用が明瞭なG1およびG2細胞は、細胞の維持培養、とりわけ plaque assay に必要な agar overlay 後の細胞の維持が必ずしも良好でなく、このような細胞側の制約から、この方法の適用は甚だしく制限をうけた。この傾向はG2細胞よりもG1細胞の方がより強かった。しかし継代培養細胞のG2細胞における Myxovirus の plaque assay が報告されている<sup>4)</sup>ので、overlay medium 中への血清の添加やブラック瓶へ seed する細胞量を多くし、2日目に monolayer になるようにするなど種々改良を行い、本実験にも一部加えることができた。従ってこゝに得られた結果の大部分は、HAD<sub>50</sub>による感染価と培養上清のHA価測定という plaque assay に若干劣る方法に頼らねばならなくなったが、それでもなおかつ有意と思われる結果が幾つか得られた。

PV含有維持液で1夜細胞を培養（前処理）することによって得られる NWS の増殖増強効果は、細胞が一時的に獲得したものなのか、或いは遺伝的に何代も安定に受け継がれるものなのかについては、前者が正しいと思われた。ところがPV前処理後何代か継代培養されたG1およびG2細胞を、再度PVによって1夜処理すると、この場合には何れの細胞とも再処理しない群に比べて、NWS 感受性が若干低下した。その理由は明らかではないが、細胞側に何らかの形で第1回のPV処理に対する memory が残っていたのではないかと推測される。しかしこの memory は、腫瘍ウイルスによる transformation の如き明瞭なものではなかった。

かゝるPV処理G2細胞上で増殖した NWS と、正常G2細胞上で増殖した NWS との正常G2細胞上における増殖性を検討したところ、同一HA価を示すサンプルでもPV処理細胞上で増殖した NWS の方が、正常細胞での増殖 NWS より増殖性が優れていた。このことは、前者がより多くの完全ウイルス粒子を含み、PV処理は NWS の complete growth cycle をより強く助長する結果と考えられた。

しかしながら抗血清による検討では、これら2つの NWS 間に全く差が認められず、少なくとも HAin に関する限り同一で、免疫学的変化（変異）、特にPVによるウイルス粒子構造変換などということは考えられなかった。更に NWS 増殖が本来不完全であると思われる HeLa や HEp 2 細胞では、PVによる増殖増強がみられないこと、即ち permissive な細胞

でしかこの現象がおきないことを考え合せると、本現象はいわゆる helper effect とは異なると思われる。即ち、RSV と RAV<sup>5)</sup>、Moloney sarcoma virus と Mouse leukemia virus<sup>6)</sup>、ヒト Adeno とサル Adeno<sup>7)</sup> など、比較的近縁の組合せにおいて、単独では自己の蛋白 coat が合成されず、helper virus の素材を利用しなければ成熟粒子となり得ないような helper effect による phenotypic mixing でないことは、上述の如く NWS-PV の recombinant が出現しないことよりも明らかである。また TNSV と TNV<sup>8)</sup>、ASV と Adeno virus<sup>9)</sup> の組合せのごとく、両ウイルス間には形態学的及び血清学的に全く類縁関係がないにも拘らず、helper となる一方のウイルスの作る酵素の助けを借りて始めてウイルス核酸合成と増殖が可能になる defective virus の "satellism" と呼ばれている範疇に入らないことも確かである。また Adeno virus と SV40<sup>10)</sup>、PARA、MAC と Adeno virus<sup>11)~15)</sup> にみられるように、non-permissive な細胞で本来増殖できない場合でも、他のウイルスが共存することにより hybridization<sup>2)</sup> や transcapidation<sup>2)</sup> によって増殖が可能になるといういわゆる complementation<sup>2)</sup> によるものでないことも、増殖が増強された NWS の性状にPVの影響の跡がみられないことより明らかであろう。

更に、上述してきたPV処理または存在による NWS 増殖増強が、細胞の NWS 吸着率上昇によるものでないことも、未吸着 NWS の assay で明らかにされた。assay の方法については、plaque assay によっていないので、正確に若干欠けるところはあるが、PV処理と未処理の細胞間で未吸着 NWS 量に本質的な差が見出せなかったので、吸着促進による増殖増強機作は一応否定できよう。そこで他の一機作として、PVが感染することによって、G2細胞に NWS の増殖を促進するような因子の産生される可能性も考えられた。類似の事実として、これまで HVJ (Parainfluenza virus 1) や PR 8 (Influenza virus A) を感染させた漿尿液中に現われる enhancer<sup>16)~18)</sup>、Adeno virus 12 を感染させたヒト胎児腎細胞で産生される stimulon<sup>19)20)</sup>、NDV、Fowl plague virus 感染漿尿液中に産生される blocker<sup>21)</sup>、NDV、Herpes simplex virus 感染ニワトリ胎児繊維芽細胞で産生される interferon depressor<sup>22)</sup> などがある。そこでこれら因子の抽出とほぼ似た方法で、PV処理(感染)G2細胞の抽出液を作り検討を加えたが、plaque assay で増殖促進(増強)

活性を認めることはできなかった。たゞ抽出物処理細胞における HAD<sub>50</sub>価測定、培養液中への産生 NWS のHA価測定では、ある程度抽出物の活性を見出したが、結論的には、増殖活性因子の産生は再現性がなく、或いはあっても少ないといえるであろう。

次に interferon の問題が強く関与してくるウイルス-細胞の系においては、他のウイルス感染がそのウイルスによる interferon の産生(自家干渉の1つ)を阻止したり、産生された interferon の作用(自家干渉の1つ)を抑制することによって、結果的にはそのウイルスの増殖が助長される例も幾つか知られている。Hermodsson<sup>23)24)</sup>は NDV の自家干渉が Parainfluenza virus 3 の混合感染により抑制されること、またコウシ腎細胞の NDV carrier culture で PIV-3 を重感染すると、NDV の増殖が増強されること、また Maeno ら<sup>25)</sup>は HeLa<sub>HVJ</sub> carrier culture において、同じく Homma ら<sup>26)</sup>は HeLa<sub>HA2</sub> carrier culture において NDV の増殖が助長されることを報告しているが、これらは何れも前述の自家干渉の阻止による増殖増強の例である。同様に、Diderholm と Dinter<sup>27)</sup>は Bovine diarrhea virus による NDV の増殖増強が interferon の作用の阻害によること、Toba ら<sup>28)</sup>は HCV による NDV の増殖増強が NDV の自家干渉での interferon 産生の抑制により起きるとしている。

そこで我々のPVと NWS の系を考えてみると、不活化 NWS によるG2細胞の interferon 産生は認められなかったが、UV不活化 NWS で前処置された細胞での NWS の増殖は明らかに抑制され、細胞性の自家干渉誘発は著明であった。このように interferon の産生が検出できないのに細胞性干渉がおきる例<sup>29)~33)</sup>や、actinomycin D 処理で細胞の interferon 合成を block<sup>34)~36)</sup>してもなおかつ細胞性干渉がおきる例<sup>37)~39)</sup>はかなり知られており、我々の NWS による自家干渉もおそらくはこれら interferon 産生の関与していない系であろうと考えられる。たゞこの実験は、UV不活化 NWS をG2細胞に36°C 5時間吸着後2日間培養した培養上清を産生 interferon 粗材料としているが、もし細胞内での interferon 産生およびその細胞外への放出が弱いとすれば、我々の場合 interferon を検出できなかったことは当然といわねばならない。もし、そうであるとすれば、UV不活化 NWS 処理での interferon 産生誘発に先立ってPVで細胞を処置しておけば、その産生が更に少なくなること(自家干渉の抑制乃至回復)も充分予想される。得られた実験結果からも、かゝる機

作が本現象の本態であることを強く暗示している。また逆に不活化 NWS 処理が PV 処理に先立てば、このような interferon が既に細胞内に多少とも形成され、細胞性干渉能をもつに至れば、例え PV で後処理しても、接種 NWS の増殖抑制の回復には余り効果的ではないであろう。しかしこの場合でも、維持培養液中に PV を添加共存させた場合には、共存 PV の自家干渉回復作用は永続的となって、NWS 増殖の増強という結果を生じたと考えられる。

前述の自家干渉の回復という機作で、第 2 のウイルスの増殖増強のみられた例は、何れも常に active なウイルスを必要としている<sup>(22)~(24)(40)(41)</sup>。即ち他の第 2 のウイルス増殖に促進的に働くウイルスを UV や熱や low pH, その他化学物質などによって不活化したり、或いは抗血清によって中和したり、超遠心によってウイルス粒子を除去したりすると、その増殖促進活性はなくなると報告されている<sup>(23)(24)(42)~(44)</sup>。しかし PV の場合には、UV で不活化してもその増殖増強活性が低下しないことからみて、これまであげた例のように infectious な virus による自家干渉の回復 (interferon の産生や作用の阻止) による増殖増強とはやゝ趣きを異にしている。

PV と IV との組合せは、一方が DNA 型、片方が RNA 型と、これまで報告されているウイルスの組合せが何れも DNA 型か RNA 型かに限定されているのに比し、異なった型の組合せの例である。これらの特殊性を考えると、自家干渉の回復が一応本態と思われても、それを細胞に生ぜしめるものは、PV の何であるかが問題になる。即ち PV サンプル中の PV 粒子そのものなのか、粒子自身であるとしても感染性を必要としないとする何であるのか、或いはそこに含まれる何か enhancing factor の如きものなのか、未だ多くの疑問点が残っている。PV サンプルの作製にはマウス胎児細胞を用いるが、PV がマウス胎児細胞内で増殖する過程において、viral code による或いは cell dependent な non-viral factor が形成され、この物質が細胞種をこえて NWS の増殖促進因子として働く可能性も生じてくる。既に Adenovirus 12 を感染させたヒト胎児腎細胞に産生される stimulon と呼ばれる因子が、種特異性をこえて、ラット胎児細胞における Kilham rat virus の増殖を促進する<sup>(19)(20)</sup>こと、そしてこの因子の作用点は interferon の作用点とは異なることが知られている<sup>(45)(46)</sup>。この点は、他の増殖促進因子として報告されている interferon blocker, enhancer, interferon depressor が同種の細胞系においてのみ interferon

の産生を阻止する機作がある<sup>(21)(47)~(49)</sup>のとは異なっている。かくて、PV 感染マウス胎児細胞にもこのような stimulon 様因子が産生されている可能性は充分考えられ、その検討が将来の問題として残されている。

## 総 括

我々は従来 Polyoma virus (PV) で細胞を前処理することにより、次に superinfect された Influenza virus (IV) の増殖が増強されること、そしてこの現象は幾つかの細胞系においても成立することを報告してきた。今回は、ヒト骨巨細胞腫由来の継代培養細胞 G1 および G2 細胞を用いて、PV: 4 B 5-6 株による IV: NWS 株の増殖増強現象の機作乃至本態について検討し、次の成績を得た。

1. PV による増強効果は、処理細胞を数代にわたり継代すると消失するので、PV が細胞に対して遺伝的な増強能力を賦与したとは考えられない。しかしこの処理継代細胞を更に PV で再処理すると、NWS の増殖は逆に軽度の抑制を受けた。

2. PV 処理により増強効果をうけた細胞で増殖した NWS は、未処理細胞で増殖した NWS に比し、より高い増殖能をもち、完全粒子が多いと考えられた。しかし赤血球凝集抑制抗体との反応でみる限りにおいては、両者間に免疫学的な差異は認められなかった。

3. PV 処理細胞と未処理細胞への未吸着ウイルスの assay からみると、PV 処理が細胞への NWS 吸着を促進させるとは考えられなかった。

4. PV 処理細胞からの NWS 増殖促進物質抽出は再現性に乏しく、PV 処理によるかゝる物質の産生誘発は極めて少ないと考えられた。

5. 紫外線 (UV) 不活化 NWS 処理による G2 細胞での interferon の産生は確認できなかったが、処理細胞自身での NWS 増殖は著しく抑制され、細胞性自家干渉の成立は明らかであった。この細胞性自家干渉による NWS 増殖抑制は、あらかじめ PV で細胞を前処理しておくことにより、明らかに相殺される程度回復することから、我々の見出した PV 処理による NWS の増殖増強現象は、接種 NWS ウイルス中に若干含まれる不活化ウイルス粒子による自家干渉効果を PV サンプルが減弱せしめる結果生ずると考えられた。

この稿を終るにあたり、終始かわらぬ御指導と御校閲を賜った波多野基一教授に深甚の謝意を表すと共に、御助言をいたゞいた教室の諸先生方に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Kimura, N. : 金大がん研年報, 1, 207 (1967).
- 2) Jawetz, E., Melnick, J. L. & Adelberg, E. A. : Review of Medical Microbiology, p. 301, Tokyo, Maruzen Asian Edition, 1972.
- 3) Kumagai, T., Shimizu, T. & Matumoto, M. : Science, 128, 366 (1958).
- 4) Hatano, M. & Morita, O. : Arch. Ges. Virusforsch., 20, 305 (1967).
- 5) Hanafusa, H., Hanafusa, T. & Rubin, H. : Proc. Nat. Acad. Sci., 49, 572 (1963).
- 6) Valentine, A. F. & Bader, J. P. : J. Virol., 2, 224 (1968).
- 7) Alstein, A. D. & Dpdonova, N. N. : Virology, 35, 248 (1968).
- 8) Kassanis, B. : J. Gen. Microbiol., 27, 477 (1962).
- 9) Atchison, R. W., Casto, B. C. & Hammon, W. McD. : Science, 149, 754 (1965).
- 10) Paul, F. J. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 116, 187 (1964).
- 11) Rapp, F., Melnick, J. L., Butel, J. S. & Kitahara, T. : Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 1348 (1964).
- 12) Rowe, W. P. & Baum, S. G. : Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 1340, (1964).
- 13) Rapp, F., Butel, J. S. & Melnick, J. L. : Proc. Nat. Acad. Sci., 54, 717 (1965).
- 14) Rapp, F. & Melnick, J. L. : Progress Med. Virol., 8, 349 (1966).
- 15) Butel, J. S., Rapp, F. Melnick, J. L. et al. : Science, 154, 671 (1966).
- 16) Kato, N., Okada, A. & Ohta, F. : Virology, 26, 630 (1965).
- 17) Kato, N., Okada, A. & Ohta, F. : Arch. Ges. Virusforsch., 17, 631, (1965).
- 18) 岡田章子 : ウイルス, 15, 55 (1965).
- 19) Brairovsky, C. & Chany, C. : Compt. Rend. Acad. Sci., 260, 2634 (1965).
- 20) Chany, C. & Brairovsky, C. : Compt. Rend. Acad. Sci., 261, 4282 (1965).
- 21) Isaacs, A., Rotem, Z. & Fantès, K. H. : Virology, 29, 248 (1966).
- 22) 太田不二人 : ウイルス, 17, 90, (1967).
- 23) Hermodsson, S. : Virology, 20, 333 (1963).
- 24) Hermodsson, S. : Acta Pathol. Microbiol. Scand., 62, 224 (1964).
- 25) Maeno, K., Yoshii, S., Nagano, I. & Matsumoto, T. : Virology, 29, 255, (1966).
- 26) Homma, M., Ohira, M. & Ishida, N. : Virology, 34, 60 (1968).
- 27) Diderholm, H. & Dinter, Z. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 121, 976 (1966).
- 28) Toba, M. & Matumoto, M. : Japan. J. Microbiol., 13, 303 (1969).
- 29) Ho, M. Arch. Intern. Med., 110, 653 (1962).
- 30) Cantell, K. & Paucker, K. : Virology, 19, 81 (1963).
- 31) Marcus, P. I. & Carver, D. H. : Science, 149, 983 (1965).
- 32) Solovyov, V. D. & Mentkevich, L. M. : Acta Virol., 11, 47 (1967).
- 33) Bratt, M. A. & Rubin, H. : Virology, 35, 395 (1968).
- 34) Heller, E. : Virology, 21, 652 (1963).
- 35) Taylor, J. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 14, 447 (1964).
- 36) Wagner, R. R. : Nature, 204, 49 (1964).
- 37) Sreevalsan, T. & Lockart, R. Z. : Nature, 212, 540 (1966).
- 38) Marcus, P. I. & Carver D. H. : J. Virol., 1, 334 (1967).
- 39) Zebovitz, E. & Brown, A. : J. Virol., 2, 1283 (1968).
- 40) Lindenmann, J. : Z. Hyg. Infekt. -Kr., 146, 287 (1960).
- 41) Wagner, R. R. & Huang, A. : Virology, 28, 1 (1966).
- 42) Matumoto, M., Kumagai, T., Shimizu, T. & Ikeda, S. : J. Immunol., 87 257 (1961).
- 43) Shimizu, T., Kumagai, T., Ikeda, S. & Matumoto, M. : Arch. Ges. Virusforsch., 14, 215 (1964).
- 44) Omori, T., Inaba, Y., Morimoto, T., TanaKa, Y., Kurogi, H. & Matumoto, M. : Japan. J. Microbiol., 11, 133 (1967).
- 45) Chany, C. & Brairovsky, C. : Proc. Nat. Acad. Sci., 57, 87 (1967).
- 46) Chany, C. & Brairovsky, C. : Perspectives

in *Virology*, 5, 107 (1967).

47) Kato, N., Ohta, F. & Okada, A. : *Virology*, 28, 785 (1966).

48) 太田不二人 : ウイルス, 17, 96 (1967).

49) Kato, N., Eggers, H. J., Ohta, F. & Kobayashi, T. : *J. Gen. Virol.*, 5, 195 (1969).

### Abstract

In our previous report, we described an enhanced multiplication of Influenza virus(NWS strain) in some established cell lines pretreated with Polyoma virus(PV, 4B5-6 strain). This enhancement was considered in terms of an increase of NWS infectivity ( $HAD_{50}$  or PFU) in the PV-treated cells or NWS yield (HAU or PFU) in culture media of the PV-treated cells after NWS inoculation. Using the most effective cells, G1 and G2 cells derived from the human giant cell tumor of bone, some mechanisms involved in this phenomenon were investigated here.

The enhancing phenomenon caused by the PV-treatment of cells disappeared after following subcultures of the treated cells. Hybrid viruses between PV and NWS were not found in NWS grown in the PV-treated cells. These mean that any genetical changes of cells or genetical interactions between both viruses did not occur in this phenomenon. Furthermore, an increased NWS adsorption on the PV-treated G2 cells or their cellular production of enhancing substances related to NWS multiplication was not observed.

On the other hand, a treatment of cells with ultraviolet(UV)-inactivated NWS ( $NWS_{uv}$ ) clearly made cells resistant to NWS multiplication (an acquisition of cellular autointerference), while an extracellular production of interferon by this treatment was scanty. This experimental cellular autointerference was completely recovered when cells were pretreated with PV before the  $NWS_{uv}$  treatment or cultured in the presence of PV after the treatment with  $NWS_{uv}$ . Therefore, the enhanced multiplication of NWS found here seemed to be due to the recovery by PV from the cellular autointerference, which appeared to occur in the infection with partially inactive NWS particles possibly contained in inoculum NWS.

---