

Characteristics of Rubella Virus Multiplication on Human Glioblastoma Cell Line(118MGC Cells) Treated with Various Drugs

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/2297/7982

薬剤処理ヒト神経由来細胞 (118MGC) における 風疹ウイルス増殖の特異性

金沢大学がん研究所ウイルス部 (主任：波田野基一教授)

尾 西 一

(昭和62年10月28日受付)

神経系細胞における風疹ウイルス (rubella virus, RV) 増殖の特異性を検討するために、ヒト神経膠芽腫由来 118MGC 細胞を用いて、サイクリック AMP (cAMP)、ジブチリルサイクリック AMP (db-cAMP)、パバペリン (Pav)、プロスタグランジン E₁ (PE₁)、デキサメサゾン (DM) 存在下での RV 増殖をみた。その結果、副作用なく薬剤発現に必要な濃度のこれら薬剤による単独処理 118MGC 細胞での RV 増殖は薬剤不含維持液で処理した対照と著しい差はなかった。また細胞形態は、db-cAMP によってのみ突起の伸長化などがみられたが、この変化は薬剤除去により復元する可逆的な変化であった。一方、db-cAMP, Pav, PE₁ のそれぞれと DM を混合した細胞維持液で処理した場合、細胞毒性はみられず、処理日数にもよるが、対照の 0.5~2.3% に及ぶ RV 増殖の著明な抑制が認められた。この抑制は RV 感染価測定 (PFU assay) および、RV RNA 合成能からも明らかであった。また、この際、薬剤処理を中断すると RV の増殖は非処理細胞の程度に回復した。また同様な、Pav と DM または db-cAMP と DM の混合液処理 118MGC 細胞でコクサッキーウイルスの増殖は全く影響されなかった。118MGC 細胞に代わり非神経系細胞である Vero 細胞を同様処理すると RV 増殖は多少影響されたが、118MGC 細胞の場合ほど強く抑制されなかった。また宿主細胞機能変動の観点から、Pav と DM 混合液で処理した 118MGC 細胞と Vero 細胞について細胞 DNA, RNA, 蛋白合成を検討した。その結果、両細胞ともに薬剤処理により、各合成は経時的に低下した。その低下程度は、Vero 細胞よりも 118MGC 細胞でより顕著であった。しかしながら、これらいずれの低下も薬剤処理を中断することにより急速に回復した。以上のことから、118MGC 細胞は各薬剤処理効果としての細胞機能の変動と関連しつつ、RV 増殖能を特異的に左右するものと考えられた。これら薬剤は直接または間接的に細胞内 cAMP レベルの上昇とその維持をもたらすことが知られていることから、核酸、蛋白合成など細胞機能変動を通して細胞の静止相または分化状態の出現も推定された。これらのことは生体内の神経系細胞における、RV の感染、増殖、再活性化は、各種生理活性物質による細胞機能変動に大きく依存していることを示唆していると言えよう。

Key words 風疹ウイルス, glioblastoma cells, 細胞内cAMP, dexamethasone, 細胞機能変化

風疹ウイルス (rubella virus, RV) 感染による先天性風疹症候群 (congenital rubella syndrome, CRS) の発生は、Gregg¹⁾の報告以来多数知られている。その後、臨床像としては、低出生体重や肝脾腫などの新生児期の一過性障害、白内障、難聴などの永久的障害、そして発育経過中に発症する遅発性の障害の3群に大

別されるに至った²⁾。このうち遅発性の障害は、遅発性風疹症候群として比較的最近注目されてきたもので内分泌異常や精神発達遅延、中枢性言語障害、痙攣、脳疾患などを幼児期から思春期にかけて呈する³⁾⁻⁶⁾。上記のうち中枢神経系 (central nervous system, CNS) の障害出現の事実は、RV の CNS への感染およびそ

Abbreviations: cAMP, cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate; CNS, central nervous system; CRS, congenital rubella syndrome; db-cAMP, N⁶-O^{2'}-dibutylthiyl cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate; DEAE, diethylaminoethyl; DM, dexamethasone; EDTA, ethylenediam-

の持続や再活性化の可能性を強く示唆していると思われる。また、出生後のRV感染においてもその合併症として関節炎、血小板減少性紫斑病などのほかに、低頻度ながら脳炎を中心としたCNS関連疾患の発生も知られている⁷⁸⁾。しかしながら、このようなRVのCNS感染についての臨床的報告がなされている一方で、その細胞レベルでの実験的検討は、動物の神経系細胞で一部報告されているのみである⁹⁾。

そこで著者はヒト神経系細胞を用いてその細胞機能の変動に関連するいくつかの薬剤、例えば細胞内サイクリックAMPレベルを上昇させる薬剤や糖質コルチコイドなどの作用による細胞機能の変化とRV増殖との関連性について以下のごとく検討した。

材料および方法

I. 細胞

1. 118MGC細胞

ヒト神経膠芽腫由来の株化細胞¹⁰⁾で、10%仔牛血清加Eagle's minimum essential medium (Eagle's MEM)を用いて37°Cで増殖、維持培養は仔牛血清不含のEagle's MEMで34°Cで行った。

2. Vero細胞

アフリカミドリ猿腎由来の株化細胞であり、RVの感染価の測定やウイルスストックの作成に使用した。細胞の増殖は、2%仔牛血清加Eagle's MEMで37°Cで行い、維持培養は仔牛血清不含のEagle's MEMを用いて34°Cで培養を行った。

II. ウイルス

RVはM-33株をVero細胞で増殖させ-80°Cにて保存したものを用いた。コクサッキーウイルスA群9型、B群3型は、いずれも初代アフリカミドリ猿腎細胞で増殖させ-80°Cで保存したものを用いた。

III. 薬 剤

サイクリックAMP (adenosine-3', 5'-cyclic monophosphate, cAMP) (Sigma社) (10^{-3} M), ジブチリルサイクリックAMP ($N^6 \cdot O^2'$ -dibutyryl adenosine-3', 5'-cyclic monophosphate, db-cAMP) (Sigma社) (10^{-3} M), パンパベリン (6,7-dimethoxy-1-veratryl isoquinoline, Pav) (Sigma社) (10^{-5} M), プロスタグランジンE₁ (PE₁) (小野薬品) ($1 \mu\text{g/ml}$), デキサメサゾン (9 α -fluoro-16 α -methyl prednisolone, DM) (Sigma社) (10^{-5} M) を用い培養細胞を処理した。これら各薬剤の()内に示した上記濃度は組織培養

細胞において、細胞毒性を示さず、一般的に薬理効果を認めるとされる濃度である。なおデキサメサゾンを除いては、Eagle's MEMに溶解しデキサメサゾンは、エタノールで 10^{-2} Mに溶解後、更にEagle's MEMで 10^{-3} 希釈して使用した。

IV. 118MGC細胞へのウイルス感染

組織培養用ガラス製中試験管に $2.0 \times 10^5/\text{ml}$ の118MGC細胞を1ml加え、37°Cで1日培養し単層とした。その後ハンクス液で細胞面を2回洗浄し、各種薬剤を含む血清不含のEagle's MEMに交換し適当な期間34°Cで培養した(前処理)。その後培養液を除去し、ハンクス液で2回洗浄後、ウイルス液を各試験管当たり0.2ml接種(multiplicity of infection, MOI=0.2), 37°C, 90分吸着後、再びハンクス液で洗浄して薬剤含有維持培地を2ml加え、34°Cで適当な期間培養を続けた(後処理)。また、薬剤を含有しないEagle's MEMで同様な期間維持培養したものを対照として使用した。なお種類の薬剤につき4本の試験管細胞を使用し、培養後、培養液、細胞ともに凍結融解し、その遠心上清中の全ウイルス感染価を測定した。

V. ウイルス感染価の測定

RVの感染価測定は以下のごとく実施した。Vero細胞を径60mmのプラスチックシャーレ(Falcon社)に $7 \times 10^5/5 \text{ ml}$ 加え、炭酸ガスふ卵器で37°C, 4日間単層培養した。細胞面をハンクス液で2回洗浄し、試料0.5mlを接種、34°Cで90分吸着した。吸着後、細胞面をハンクス液で2回洗浄し、5mlの一次寒天重層を行い、34°C, 4日間培養後、更に2mlの二次寒天重層を行った。一次寒天重層培地の組成は、0.7%寒天(AGAR PURIFIED®, Difco社), 0.15%炭酸水素ナトリウム, 0.01% DEAE-デキストラン(Pharmacia社), 2.5 $\mu\text{g/ml}$ アンホテリシンB(Gibco社)をEagle's MEMに含むものであり、二次寒天重層培地はこれに0.01%に中性紅を含むものを用いた。ブラック数の計数は、感染後7日目に実施した。なお、一つのウイルス試料の一希釈段階について2~4枚のシャーレを用いてそれらのブラック数の平均値からウイルス感染価を算出し、plaque-forming unit (PFU)/mlで表した。またコクサッキーウイルスの感染価は、RVの場合と同様に準備したプラスチックシャーレ上のVero細胞を用いて試料0.5mlを感染し、感染後3日目に二次寒天重層を行い、翌日ブラック計数し算出した。なお、寒天濃度を一次、二次とも1%とした他

inetetraacetic acid; FITC, fluorescein isothiocyanate; IgG, immunoglobulin G; MEM, minimum essential medium; MOI, multiplicity of infection; MV, measles virus; Pav, papaverine; PBS, phosphate-buffered saline; PE₁, prostaglandin E₁; PFU, plaque-forming

はRVの感染価測定法と同じ組成の培地を使用した。

VI. ウイルス RNA 合成の測定

Norvalの方法¹¹⁾準拠して行った。つまり、37°Cで1日増殖培養し、subconfluentの単層培養とした118MGC細胞を薬剤(PavとDM)含有維持培地で48時間前処理後、MOI約0.2でRVを感染し、同液で34°C24時間培養した。ついで、10 μ Ci/mlの³H-ウリジンを含む同液に交換し、34°Cで72時間培養を行った。その後、培養上清に等量の冷飽和硫酸アンモニウムを加え0°Cで1時間放置後、10,000 \times g 30分間(SW55Tiローター, Beckman社)遠心した沈渣を200 μ l TE緩衝液(10mM tris-HCl, 10mM EDTA, pH7.4)に浮遊した。次に同液を10~60%蔗糖密度勾配遠心法によって30,000rpm(同上ローター)で12時間遠心分画し、10%トリクロル酢酸で沈澱後、ガラスファイバーディスクで濾過し³H-ウリジンの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。なお、対照として薬剤非処理の培養についても同様に測定した。

VII. 細胞 DNA 合成の測定

薬剤処理の細胞への影響を調べるため細胞のDNA合成を測定した。37°C, 1日増殖でsubconfluentの単層培養とした118MGC細胞培養または、Vero細胞の培養液を除去しEagle's MEMで細胞面を洗浄した

後、PavとDMの両方を含む維持培養液で48時間前処理した。その後、更に新しい同液に交換し、経時的に同液に2 μ Ci/mlの³H-チミジンを追加して24時間パルスラベルを行った。ラベル後、細胞を氷冷10mM phosphate-buffered saline (PBS) (pH7.2)で2回洗浄し、0.6% sodium dodecyl sulfate (SDS)を含む10mM Tris-HCl-10mM EDTA-50mM NaCl (TES)緩衝液(pH7.4)600 μ lを加え室温30分処理し、更に10%トリクロル酢酸で沈澱後ガラスファイバーディスクで濾過して³H-チミジンの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。なお、対照として薬剤を含まない維持培養液で培養した細胞についても同様に測定した。

VIII. 細胞の蛋白合成およびRNA合成の測定

前記細胞のDNA合成の測定と同様な手順で2 μ Ci/mlの³H-プロリンおよび2 μ Ci/mlの³H-ウリジンを用いて24時間パルスラベルを行い、それぞれの時期における細胞の蛋白合成およびRNA合成を測定した。

IX. 蛍光抗体法

118MGC細胞を8チャンバースライド(Lab. Tek社)上で37°C, 1日増殖させ、subconfluentの単層培養とした。増殖培地を除去、細胞面をハンクス液で洗浄後、薬剤(PavとDM)含有培養液に交換して2日

Table 1. Replication of RV* in 118 MGC cells treated with cAMP, db-cAMP or dexamethasone

Period(day)for treatment in		RV titer (PFU/ml) produced in 118 MGC cells treated with					
Pre-infection	Post-infection	cAMP (10 ⁻³ M)**	db-cAMP (10 ⁻³ M)	Dexamethasone (10 ⁻⁵ M)	Ethanol (10 ⁻⁶ M)	Eagle's MEM (x 10 ⁻³)	Eagle's MEM
0	3	3.6 \times 10 ³ (45)***	8.0 \times 10 ³ (100)	NT****	NT	NT	8.0 \times 10 ³ (100)
2	4	NT	NT	2.3 \times 10 ⁴ (79)	2.9 \times 10 ⁴ (100)	3.1 \times 10 ⁴ (106)	2.9 \times 10 ⁴ (100)
3	3	2.6 \times 10 ³ (173)	3.0 \times 10 ³ (200)	NT	NT	NT	1.5 \times 10 ³ (100)
6	3	2.9 \times 10 ³ (181)	3.0 \times 10 ³ (187)	NT	NT	NT	1.6 \times 10 ³ (100)

* Rubella virus.

** Concentration.

*** Ratio of virus titer in culture treated with drug to that treated with Eagle's MEM (control)

**** Not tested.

units; PRP, progressive rubella panencephalitis; RV, rubella virus; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSPE, subacute sclerosing panencephalitis; TE, tris-HCl & EDTA; TES, tris-HCl • EDTA • NaCl.

間前処理し、RVを0.1 ml接種 (MOI. 約0.2) して37°C, 60分間吸着, 洗浄後, 更に同様な薬剤含有維持培地にて34°C, 4日間培養した。その後, 上記スライドを, 4°C, 10分間アセトン固定後, Coonsら¹²⁾, Woodsら¹³⁾の方法によって染色した。つまり一次血清としてヒト血清 (抗RV赤血球凝集抑制抗体価: 512)0.5 mlと 5×10^7 個の118MGC細胞を37°C, 2時間, 続いて4°C, 一晚反応させ非特異抗体を吸収除去したものを10倍希釈し使用した。また二次血清は, Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヒトIgGヤギ血清 (Hyland社) を20倍希釈して使用した。また, 反応は, 一次, 二次ともに37°C, 1時間で行った。

成 績

I. 細胞の薬剤処理によるRV増殖への影響

1. cAMP, db-cAMP, DM各単独および混合液による処理

cAMPまたはdb-cAMPで118MGC細胞を処理した場合, 前処理の有無およびその期間の長短にかかわらず, RVの増殖には非処理細胞と比較して有意な差は認められなかった (表1)。

また, DM単独処理においても, 非処理細胞やDMの 10^{-2} M液作成時に使用したエタノール液による処

理細胞との差はなかった (表1)。

薬剤処理による細胞形態の変化は, cAMPやDMでは見られなかったが, db-cAMPの処理においては処理開始後数時間以内から, 細胞が伸長化し, 更に数本の長く細い突起の伸長が認められた (図1, A)。この様な形態は, 薬剤処理中に持続して認められたが, 途中薬剤除去した場合は, すぐに元の形態に復帰した。

次に薬剤を混合して使用した場合の影響について検討した。cAMPとDMまたは, db-cAMPとDMとの混合液でそれぞれ118MGC細胞を処理した場合, 後者でRVの収量は対照の1.7~20.3%へと著しく減少した (表2)。とくにRV感染前よりも感染後の処理を行った場合その影響が大きく現れ, 前処理なしで後処理のみでも収量は対照の20%程度に減少した。また感染前後ともに処理した場合は, 4日間連続薬剤前処理したものは, 3日間Eagle's MEMで処理後, 感染前日の1日のみ薬剤処理したものより一層顕著なRV収量の減少を認めた。

このようなウイルス収量の減少が真にウイルス増殖の抑制に起因するものか否かを明らかにするために, db-cAMPとDMとを混合したEagle's MEM中でのRVの34°Cにおける経時的不活化率および同液処理細胞へのRVの吸着率を調べた。その結果, いずれも

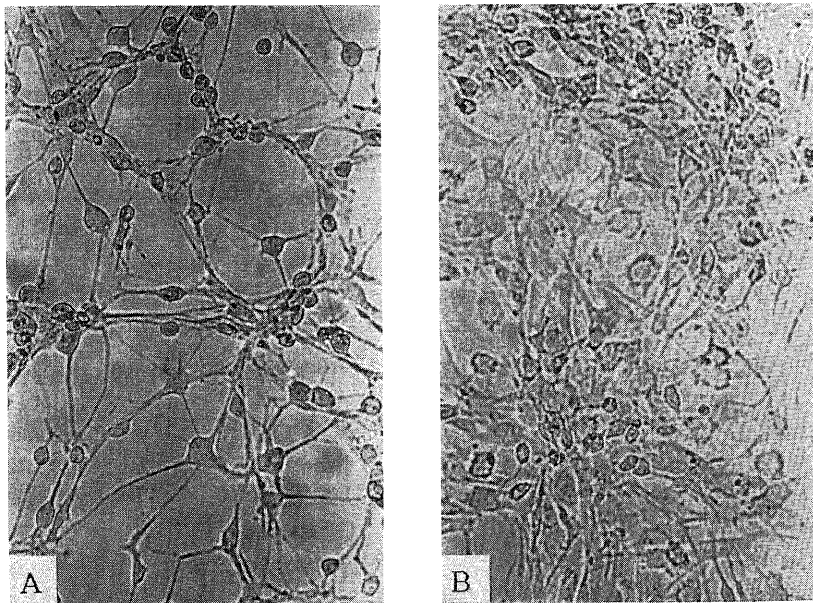


Fig. 1. Morphology of 118MGC cells untreated or treated with db-cAMP (10^{-3} M).

A) Cells treated with the drug for 24 hr.

B) Untreated cells (cultured with Eagle's MEM for 24 hr).

対照とした薬剤不含 Eagle's MEM の場合との差はみられず、本現象は薬剤による不活化または、細胞への RV 吸着の変動によるものではないことが判明した。なお、RV 感染後、薬剤処理を途中で中止した場合、RV 増殖は回復することから本現象は可逆的であることが

判った。また、この混合液処理 118MGC 細胞の形態は、db-cAMP 単独処理と同様な変化を示したが薬剤処理を途中で中止した場合その形態もまた復元した。

次に、このような RV 増殖が抑制される現象は、118MGC 細胞と RV の組み合わせに特異的な現象で

Table 2. Effect of a mixture of db-cAMP (10^{-3} M) and dexamethasone (10^{-5} M) on RV replication in 118 MGC cells for 3 days after the infection

period (day) for treatment in		RV titer (PFU/ml) produced in 118 MGC cells treated with a mixture of db-cAMP and dexamethasone
Pre-infection*	Post-infection**	
1***	3	9.8×10^2 (16.6)****
4	3	1.0×10^2 (1.7)
4	0	4.9×10^3 (83.1)
0	3	1.2×10^3 (20.3)
0	0	5.9×10^3 (100)

* Culture was incubated for 4 days in pre-infection.

** Culture was incubated for 3 days in post-infection.

*** Treatment started on 4th day of incubation.

**** Ratio of virus titer in culture treated with drug to that untreated

Table 3. Effect of a mixture of db-cAMP (10^{-3} M) and dexamethasone (10^{-5} M) on RV replication in non-neural cells (Vero cells) or Coxsackie virus A-9 (Cox A-9) replication in 118MGC cells

Kind of virus	Cells infected	Virus titer (PFU/ml) produced in each cell line	
		Treated*	Untreated
RV	Vero	1.5×10^4	1.0×10^4
Cox A-9	118MGC	7.9×10^2	1.1×10^3

* Treatment with drugs was performed for 2 days in pre-infection and 3 days in post-infection for RV, and for each 4 days in pre-and post-infection for Cox A-9.

Table 4. Replication of RV in 118MGC cells and Vero cells in the presence of papaverine or a mixture of papaverine and dexamethasone

Cell	Period (day) for treatment in		RV titer (PFU/ml) produced in the culture treated with		
	Pre-infection	Post-infection	Papaverine (10^{-5} M)*	Pav(10^{-5} M) +DM (10^{-5} M)**	Eagle's MEM
118MGC	0	4	9.6×10^3 (60.0)***	9.2×10^2 (5.7)	1.6×10^4 (100)
	3	4	2.6×10^3 (11.8)	1.0×10^2 (0.5)	2.2×10^4 (100)
Vero	3	3	3.1×10^3 (31.0)	1.1×10^3 (11.1)	1.0×10^4 (100)

* Concentration.

** A mixture of papaverine (Pav) and dexamethasone (DM).

*** Ratio. Refer to the footnote of Table 1.

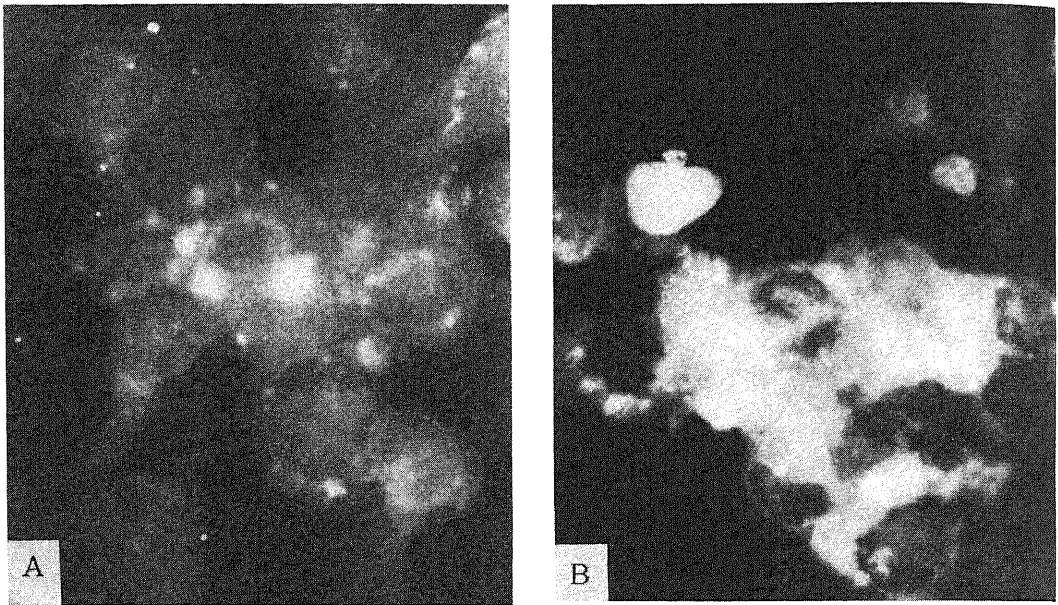


Fig. 2. Immuno fluorescent antibody staining of 118MGC cells at 4 days after rubella virus infection.
 A) Cells treated with a mixture of papaverine and dexamethasone.
 B) Untreated cells.

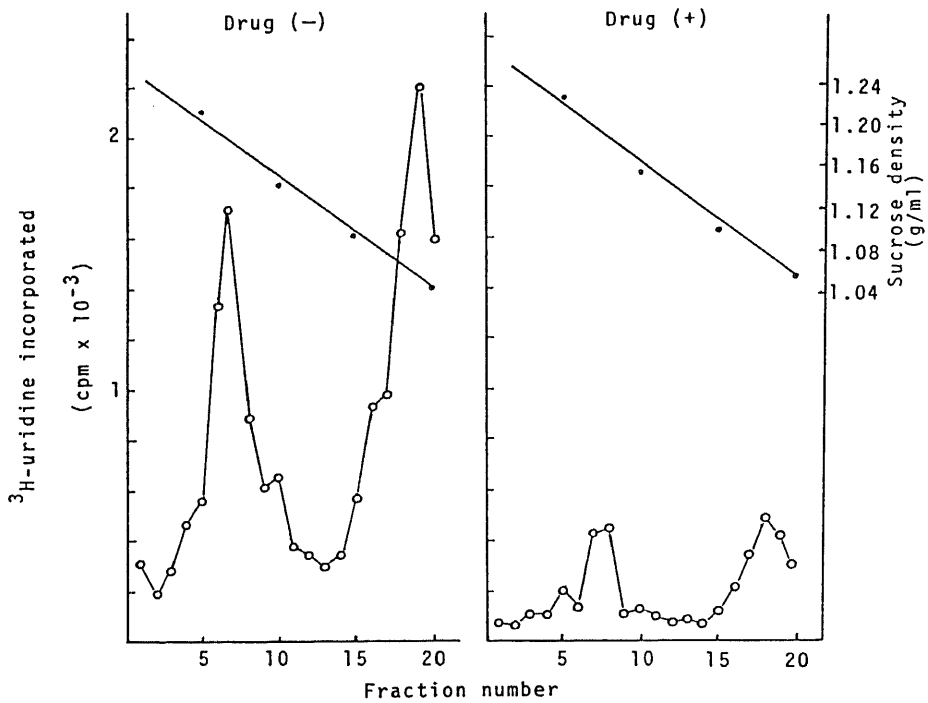


Fig. 3. RNA synthesis of rubella virus in 118MGC cells treated with a mixture of papaverine (10^{-5} M) and dexamethasone (10^{-5} M).

あるか否かを検討するために、118MGC細胞に代わり、Vero細胞を用いてdb-cAMPとDMの混合液で細胞を感染前後ともに処理し、同様な実験を行った。その結果、Vero細胞では同薬剤によるRV増殖の抑制は全く見られなかった(表3)。また、RVの代わりにコクサッキーウイルス(A群9型)を用いて118MGC細胞で前記と同様に実験したところウイルス増殖の抑制はRVの場合ほど著明ではなかった(表3)。以上のことからdb-cAMPとDMの混合液で処理した118MGC細胞でのRV増殖の抑制は、118MGC細胞とRVとの組み合わせに特異的な現象と考えられた。

2. PavおよびPavとDM混合液による処理

前記、db-cAMPとDMの混合液によるRV増殖抑

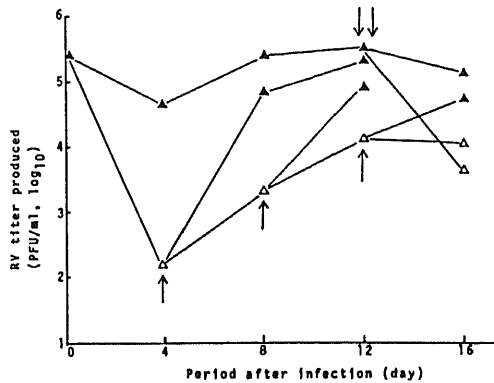


Fig. 4. Effect of a mixture of papaverine (10^{-5} M) and dexamethasone (10^{-5} M) on rubella virus replication in 118MGC cells. At the indicated times the mixture of drugs was removed (↑) or added(↓↓). ▲, drugs (-); △, drugs (+).

制効果は、細胞内cAMPレベルの上昇と関連している可能性が推定された。そこで、同様に細胞内cAMPレベルの上昇作用を有するPavを用いて118MGC、Veroの両細胞を処理しRV増殖への影響を調べた。その結果、118MGC細胞においてPavとDMの混合液処理によって一層顕著なRV増殖の抑制が認められた。この場合、感染前に細胞の薬剤処理を行うとその抑制は、強く現れる傾向があった。なお、Vero細胞でも118MGC細胞ほどではないが多少の抑制がみられた(表4)。

また、間接蛍光抗体法によっても同薬剤処理RV感染118MGC細胞では、非処理RV感染細胞にみられるような細胞質内の顆粒状の強い蛍光や細胞膜周囲の蛍光の明らかな減弱または消失が認められ、RV抗原の産生の低下が観察された(図2)。しかし、この混合液処理によりdb-cAMPの場合と異なり118MGC細胞の形態に特に目立った変化は見られなかった。

このようなRVの増殖抑制は、図3に示したとおりウイルスRNAへの³H-ウリジンの取り込みでも薬剤処理細胞におけるRV分画(比重1.19)のピークは薬剤非処理細胞のそれに比較し著しく低値であった。なお、薬剤非処理細胞で見られた分画番号7のピークは、その比重がMcCombsら¹⁴⁾の報告と一致することから、RVの完全Virionと考えられ、分画番号18、19のピークはVan Alstyneら¹⁵⁾の報告にも示されている不完全なvirionやそれを含む宿主細胞膜断片と考えられる。

上記のごとき顕著なRVの増殖抑制を示したPavとDMの混合液による118MGC細胞の処理をRV感染後途中で中止した場合は、RVの増殖は急速に回復し薬剤による抑制作用は可逆的であった(図4)。このことは、前述のdb-cAMPとDMとの混合液での場合

Table 5. Effect of prostaglandin E₁ and mixtures of prostaglandin E₁ or papaverine and dexamethasone on RV replication in 118MGC cells

Drug used for treatment*	RV titer produced (Ratio, %)**
PE ₁ (1 μg/ml)**	1.2 × 10 ⁴ (100)
PE ₁ (1 μg/ml) + DM (10 ⁻⁵ M)	2.8 × 10 ² (2.3)
Pav (10 ⁻⁵ M) + DM (10 ⁻⁵ M)	2.4 × 10 ² (2.0)
Eagle's MEM	1.2 × 10 ⁴ (100)

* Treatment with drugs for 3 days before and 4 days after the virus infection. PE₁, prostaglandin E₁; PE₁ + DM, a mixture of prostaglandin E₁ and dexamethasone; Pav + DM, a mixture of papaverine and dexamethasone; DM, dexamethasone; Pav, papaverine.

** Concentration.

*** Refer to the footnote of Table 1.

と同様であった。また、PavとDMの混合液処理118MGC細胞におけるコクサッキーウイルス(B-3)の増殖についても検討したところ、処理細胞でのウイルス力価は 1.6×10^4 PFU/ml、無処理細胞のウイルス力価は 1.8×10^4 PFU/mlであり、両者間には差は認められなかった。また、PavとDMの混合液および対照としたEagle's MEM中での 34°C におけるRVの不

活化率には差はみられなかった。同様に細胞への吸着率についても細胞の薬剤処理の有無による差はみられなかった。

3. PE₁およびPE₂とDM混合液による処理

Pavと同じく細胞内cAMPのレベルの上昇を誘導するとされるPE₁とDMの混合液を用いて、118MGC細胞を前記PavとDMの場合と同様な条件(前処理3日間、後処理4日間)で処理、培養したところRVの増殖は著明に抑制された。しかしPE₁単独では全くRVの増殖に影響がみられなかった(表5)。また118MGC細胞の形態はPE₁単独または、DMとの混合液のいずれでも変化がみられなかった。

II. PavとDM混合液処理による細胞機能の変動

1. 細胞DNA合成への影響

118MGC細胞を 34°C 、48時間PavとDMの混合液で処理した後、更に新たな同液に交換し、経時的に ^3H -チミジンで24時間パルスラベルを行い、各時期における ^3H -チミジンの取り込みから、細胞のDNA合成を調べた。その結果、48時間の薬剤前処理後、続いて薬剤処理を行ったもののDNA合成は、対照のそれに比較し、24時間では63.6%、48時間では29.4%、72時間では16.5%と経時的に低下した。しかしながら、薬剤処理を中止することによってそれ以後のDNA合成は上昇に転じた。また薬剤による前処理も、その後の処理も全く行なわなかった対照では時間経過と共に72時間までDNA合成の上昇がみられた(図5)。

118MGC細胞におけるこのような薬剤処理によるDNA合成の抑制がVero細胞においても認められるか否かを同様な方法で検討した。その結果、Vero細胞では48時間の薬剤前処理後、初めの24時間では、118MGC細胞にもみられたように、薬剤非処理細胞の

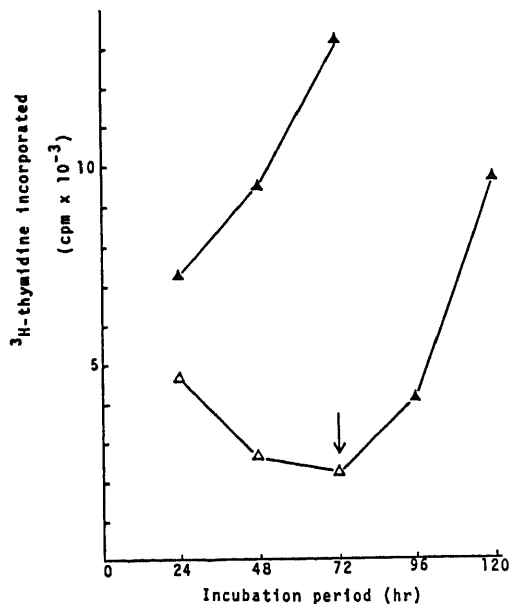


Fig. 5. Cellular DNA synthesis of 118MGC cells in the presence or absence of a mixture of papaverine (10^{-5} M) and dexamethasone (10^{-5} M). ▲, drugs (-); △, drugs (+). An arrow indicates the time of removal of the mixture of drugs.

Table 6. Comparative ratio of cellular DNA synthesis in 118MGC and Vero cells treated with a mixture of papaverine (10^{-5} M) and dexamethasone (10^{-5} M)

Labelling time** (hr)	Comparative ratio (%)* of cellular DNA synthesis in cells treated with drugs	
	118MGC	Vero
0-24	63.6	62.8
25-48	29.4	74.0
49-72	16.5	NT***

* The value was expressed as ratio of cpm of ^3H -thymidine incorporated into cellular DNA fraction of treated culture to that of untreated culture.

** Time after pre-treatment with drugs or Eagle's MEM for 48 hr.

*** Not tested.

63%程度までに DNA 合成は抑制された。しかしながら、次の 48 時間目では非処理細胞の 74% の DNA 合成を示し、118MGC 細胞で見られたような経時的な DNA 合成のより一層の低下はみられなかった (表 6)。なお、Vero 細胞は薬剤含有に関係なく培養液の交換なしで 72 時間以上維持すると、細胞の一部が自然に致死状態となるため、この時点以降の正確な DNA 合成は把握できなかった。

2. 細胞の RNA および蛋白合成への影響

細胞 DNA 合成の測定と同様な薬剤処理条件で細胞

の RNA と蛋白合成を調べた。その結果、まず 118MGC 細胞においては、48 時間の薬剤前処理およびその後の処理の有無に拘らず RNA、蛋白の合成は経時的に低下した。しかしながら、その低下の程度は RNA、蛋白ともに薬剤処理したものが常に非処理の対照より顕著であった。また、薬剤処理によりこのように低下した RNA、蛋白の合成は、途中 72 時間目で薬剤不含維持培養液に交換することにより一転して急速に合成を再開した。そして、ほぼ 96~120 時間目でピークに達した後急速に下降した。その下降は、薬剤非処

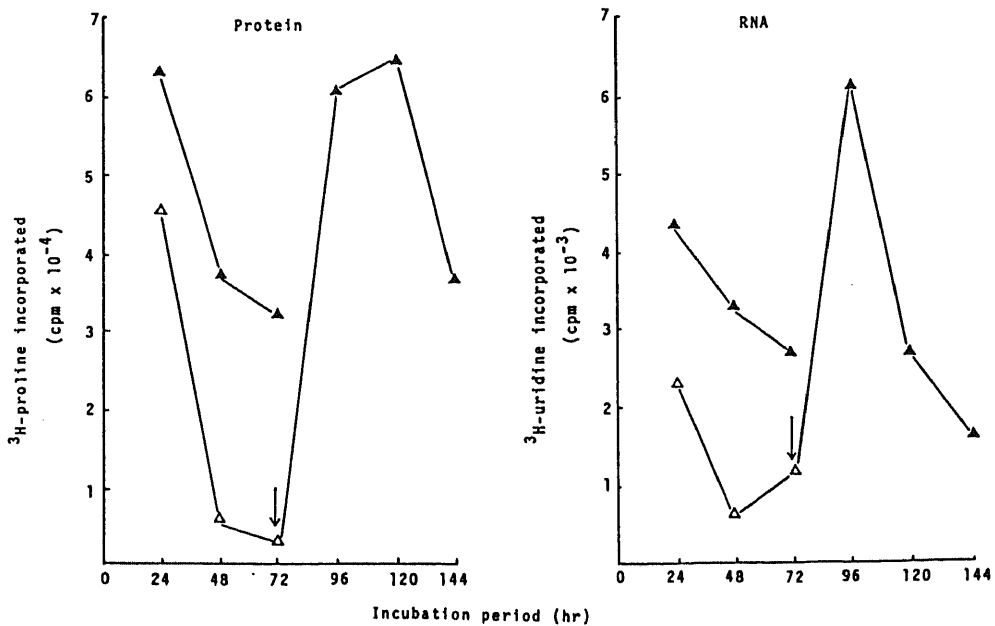


Fig. 6. Cellular RNA or protein synthesis of 118MGC cells in the presence or absence of a mixture of papaverine (10⁻⁵ M) and dexamethasone (10⁻⁵ M). ▲, drugs (-); △, drugs (+).

An arrow indicates the time of removal of the mixture of drugs.

Table 7. Comparative ratio of cellular RNA or protein synthesis in 118MGC and Vero cells treated with a mixture of papaverine (10⁻⁵ M) and dexamethasone (10⁻⁵ M)

cell	Labelling time* (hr)	Comparative ratio (%)** of cellular synthesis of	
		RNA	Protein
118MGC	0-24	52.5	72.0
	25-48	19.2	18.2
Vero	0-24	62.5	51.5
	25-48	83.9	43.7

* Time after pre-treatment with drugs for 48 hr.

** The value was expressed as ratio of cpm of treated cells to that of untreated cells.

理対照の下降パターンと類似していた(図6)。また、Vero細胞でもRNAと蛋白の合成は、118MGC細胞とほぼ同様な傾向を示した。しかし薬剤処理細胞のRNA、蛋白の合成の低下の程度は118MGC細胞ほど極端でなく、Vero細胞に対するPavとDMの混合液処理による影響は小さいと考えられた(表7)。

考 察

RVのヒト細胞における増殖は、in vivoではCRSを呈している胎児のウイルス検索で示されているように多くの組織、細胞において知られている¹⁶⁾。in vitroではPlotkinら¹⁷⁾の報告にあるように、肺、脳下垂体、皮膚、咽頭粘膜、胸腺などに由来した各種の培養初代細胞で、また、Wellerら¹⁸⁾は、羊膜の初代細胞での増殖をみている。更に乳癌由来の細胞¹⁹⁾や、滑膜に由来した細胞²⁰⁾における増殖も報告されている。このような多様なヒト細胞におけるRVの増殖が今日まで知られてはいるが、神経系細胞における増殖についての報告は見あたらない。

最近、CRSの遅発性障害として、甲状腺機能異常や糖尿病などのほかに、精神発達遅延、行動異常、そして進行性風疹全脳炎²¹⁾²²⁾など神経系に関連した障害が注目されている。とくに、進行性風疹全脳炎(progressive rubella panencephalitis, PRP)は、CRSまたは出生後のRV感染後、数年経過後に発病する進行性神経障害でRVの再活性化によるものと考えられており、脳生検からRV分離を認めた例も報告されている²³⁾。そこで、これらRVによる神経系疾患を考える上で、今回著者が実施した118MGC細胞による実験は一つのモデルとなり得ると考えられる。118MGC細胞を用いたこの実験では、その増殖培養が容易なこと、維持培養において、いかなる種類の血清も添加する必要がないことなどの利点があった。特に、後者は本研究のように各種生理活性物質による神経系細胞への影響を検討する際、様々な生理活性物質を含有するであろう血清成分の影響を完全に無視することができることから、この種の実験にふさわしい細胞の性格であった。

使用薬剤のうち、cAMP単独による118MGC細胞の処理で、細胞の形態やRVの増殖に影響が見られなかったのは、一般的にcAMPは細胞内部に入りにくい性質があることのほか、この細胞が外因性のcAMPに対する感受性が低いのか、または、特に急速に細胞内で分解することによるのかもしれない。また、db-cAMPによる処理においても、RVの増殖に影響はなかったが、細胞形態は短時間で著しく変化した。これはdb-cAMPが細胞内で分解されずcAMPとしての

作用を発揮したことによると考えられ、細胞内cAMPのレベルの上昇により、細胞が静止相へと変化し更に分化型へと移行したことに伴う変化と考えられた。cAMPの細胞増殖に及ぼす効果については、様々な細胞で多数の報告があるが、結果的には、その効果は細胞の種類に大きく依存し、増殖促進または抑制に働く事が知られている²⁴⁾。そして、このような細胞側の変化によってその場におけるウイルス増殖もまた増強あるいは抑制的な影響を受けることが報告されている²⁵⁾²⁶⁾。cAMPによる細胞増殖抑制作用については、細胞内cAMPレベルを上げると細胞のDNA合成が低下すること、増殖相の細胞ではcAMPレベルが低く、静止相の細胞では高いことなどの実験的事実²⁷⁾から示唆されたものであり、今回の実験でも、薬剤処理後、細胞の増殖が停止し、細胞内cAMPレベルの上昇があったことは充分あり得ることと思われる。そしてこの事により、既に他の神経細胞の例^{28)~30)}で見られるような細胞の分化が誘導されたと考えられる。また、使用薬剤の一つであるPavの作用は細胞内ホスホジエステラーゼ活性の阻害によって細胞内cAMPレベルを上昇させ、結果的には、db-cAMPの場合と同様、細胞の分化を誘導していると考えられた。しかし、この場合118MGCの形態は、db-cAMP処理で見られたような著しい変化は認められなかった。その理由については、明らかではないがPavによるcAMPレベルの上昇作用が前記のごとく間接的であることに、関係しているのかもしれない。このように、db-cAMP、Pavのどちらによっても細胞内cAMPレベルの上昇による分化が誘導されたことは充分推定できるが、これらの薬剤の単独の処理では、RV増殖には影響がなかった。この事は、RV増殖の抑制にはこれら薬剤に加えてDMの関与の重要性を示すものである。DMは、一般的に他の糖質コルチコイドと同じくその作用機作はホルモンレセプター複合体が活性化し、核のアクセプター部位に結合後、特異的なmRNAを合成する。そして、更に、新しい蛋白合成などを惹起せしめ、最終的に標的細胞のホルモンによる機能変化をもたらすものとされている³¹⁾³²⁾。また、一方では細胞増殖への作用も知られている。それはcAMPの場合と類似して、やはり細胞の種類に似存した増殖促進³³⁾と抑制³⁴⁾の相反する二つの作用である。特に、形質転換細胞では、増殖抑制に働く場合が多いとされいる。さらに、多くの器官や組織の細胞の組織培養法による研究で糖質コルチコイドは、細胞の分化誘導作用を有することが明らかにされてきている³⁵⁾。これらの作用は今回の実験における細胞の状態を考える上で非常に興味深いものである。

使用した 118MGC 細胞の DM に対するレセプターの存否については調べられてはいないので、確定的なことは言えないが、この実験によって DM を db-cAMP または Pav に追加すると RV 増殖への影響がみられた。このことから、恐らく DM に対するレセプターが 118MGC 細胞に存在すると考えられ、mRNA レベルで細胞の分化誘導のための調節機能が働いたことが推定できる。その事が db-cAMP または Pav による細胞内 cAMP レベルの上昇に続く細胞の静止相あるいは Go 期 (形質発現のための休止状態) への移行、さらには細胞分化への過程を助長しているのかもしれない。あるいは、逆に DM のホルモン作用としての細胞分化の誘導を db-cAMP や Pav によって上昇した cAMP が助長しているとも考えられる。いずれにしても、細胞内 cAMP レベルを上昇させるために用いた今回の全ての方法 (直接的には db-cAMP の添加、間接的にはホスホジエステラーゼ阻害剤の Pav, アデニル酸サイクラゼ活性を高める PE_1 の添加) において DM の共存により細胞の分化が誘導され、維持されていると考えられ、この状態は細胞の DNA, RNA, そして蛋白の各合成の低下現象として裏付けられているように思える。このような 118MGC 細胞の分化は、神経膠芽細胞本来の性質を発現していることが推定されるが、その様な細胞では RV の増殖は顕著に抑制されることがこの実験によって示された。またこの現象は、118MGC 細胞と RV の組み合わせに特異的であったことは、これらの薬剤に高い感受性を示す神経系細胞特有の性質によるものと考えられるが、同細胞でコクサッキーウイルスの増殖には全く影響が無かったことは、細胞側要因のみでなくウイルス側にも本現象をもたらすための何等かの特異的要因の存在が考えられる。しかしその実態は明らかではない。

この様なヒト神経系細胞の状態変化とウイルスの増殖との関係は麻疹ウイルス (measles virus, MV) において最近多数報告されている。それらはいずれも亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis, SSPE) のウイルス学的解明のために研究されており RV における PRP 研究の参考となるかもしれない。MV のこの種の研究では、ヒトの髄芽細胞腫由来の TE671 細胞を用いて MV の増殖を見たところ、Pav で最も顕著に増殖抑制を認め、その他、cAMP, db-cAMP, 8-Br-cAMP, そして Pav と同じくホスホジエステラーゼ阻害剤のイソブチルメチルキサンチン等でも抑制が認められている³⁶⁾。また神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞、乏枝神経膠腫由来 KG-1 細胞そして 118MGC 細胞などを cAMP, db-cAMP, Pav で処理して MV の増殖を調べてみると、これらの薬剤により程

度の差はあるものの全ての細胞で MV 増殖の抑制と細胞変性効果の抑制が認められている³⁷⁾。また、IMR-32 細胞では Pav によって MV の genomic RNA, mRNA 合成が抑制されたことなどの報告がある³⁷⁾。

RV については、MV のようなヒト神経系細胞における研究は見られないが、ラットのグリア細胞における研究では通常 RV の増殖が行なえないラットグリア細胞に db-cAMP を添加処理することによって RV の完全な増殖が起こることが知られている。それは、db-cAMP によるグリア細胞の分化に付随して起こる現象であるとされている³⁸⁾。

一方、糖質コルチコイドホルモンの作用によるウイルス増殖への影響については、今日までポリオーマウイルス³⁹⁾、マウス白血病ウイルス⁴⁰⁾、サイトメガロウイルス⁴¹⁾、単純ヘルペスウイルス⁴²⁾などの報告はあるが、それらのメカニズムは必ずしも明らかとなっていない。RV 増殖に関しては、 17β -エストラジオールを用いて、明らかにそのレセプターを保有しているヒトの乳癌の胸腔滲出液中に由来した継代細胞 (MCF-7) を処理し、RV の増殖を調べると、70%程度増殖が抑制されたとの報告がある⁴³⁾。そしてそのメカニズムは、ホルモン作用に因る宿主細胞の mRNA 合成の誘導とウイルスが誘導する mRNA 合成の競合の結果、子孫ビリオンへのウイルス RNA が減少したことに起因するとしている。しかし、この考えは、細胞の RNA 合成や蛋白合成が薬剤処理によって低下を認めた今回の実験においては RV 増殖抑制の根拠とはなり得ないと考えられる。

今回の実験でヒト神経系細胞における RV の増殖は宿主細胞の機能変動状態、つまり増殖相か静止相か、分化の誘導がされているかどうかなどによって著しい影響を受けていることが示唆された。これは生体内神経系細胞における RV 増殖を考える際、非常に複雑な要素を考慮しなければならないことを意味するものである。なぜなら、生体内の極めて多数の生理活性物質の作用や免疫機構、それらに対応する宿主細胞の分化や変化の程度に依存して RV の増殖が大きく支配されることが予想されるからである。またこのような多様な影響の総合的結果が RV の CNS への感染や持続、更には PRP 等の発症に繋がる再活性化をもたらすものであると考えられた。

結 論

ヒト神経系由来細胞 (118MGC 細胞) における RV の増殖と細胞機能変動との関連性について検討し、次の結論を得た。

1. 118MGC 細胞における RV 増殖は、細胞を

cAMP, db-cAMP, Pav, DM, PE₁ のそれぞれ単独で処理した場合、著しい影響はなかった。しかしながら、細胞形態は、db-cAMP 処理の場合のみ突起の伸長化など著しい変化がみられ、この変化は可逆的であった。

2. db-cAMP と DM の混合液で 118MGC 細胞を処理した場合、RV 増殖は著しく抑制された（対照の 1.7%）。そして処理の中断により抑制は回復した。しかし同様な処理でコクサッキーウイルスの増殖は抑制されなかった。一方、Vero 細胞を同様に処理しても RV 増殖は 118MGC 細胞の場合ほど大きな影響を受けなかった。また、db-cAMP と DM の混合液処理により細胞形態は、db-cAMP 単独処理と同様な変化を示し、その変化は可逆的であった。

3. Pav と DM の混合液処理 118MGC 細胞においては、RV の増殖は PFU による感染価測定のみならず、RV RNA 合成の面からも著明に抑制された（対照の 0.5~2.0%）。この抑制は薬剤処理の中断により回復した。一方、コクサッキーウイルスの 118MGC 細胞での増殖への本処理の影響は、前 2 と同様に少なく、また 118MGC 細胞はこの薬剤処理により形態変化を示さなかった。

4. PE₁ を DM との混合液として用い、118MGC 細胞を処理したところ、RV 増殖の抑制は前 2、3 とほぼ同じであった（対照の 2.3%）。またこの際、細胞の形態変化は見られなかった。

5. Pav と DM の混合液で 48 時間前処理後、更に新鮮な同液にて 118MGC 細胞を継続処理した場合、その DNA 合成は経時的に低下した（処理後 72 時間で対照の 16.5%）。またこの低下は途中の薬剤除去により上昇に転じた。また同様に処理した Vero 細胞では、DNA 合成の著しい低下は認められなかった。

6. 5 と同様な条件で細胞の RNA 合成、蛋白合成を調べた結果、118MGC 細胞では、いずれも Vero 細胞より、顕著な経時的低下を示し、この細胞のこれら薬剤に対する高い感受性が示された。また、この場合においても途中の薬剤除去によりこれらの合成は回復に転じた。

以上のことから、118MGC 細胞における RV の増殖は使用薬剤による細胞内 cAMP レベルの上昇（直接的または間接的いずれでも）とその維持に伴う細胞機能の変動と密接に関連していることが示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った波田野基一教授に深甚なる謝意を表します。

また本研究の機会を与えて下さいました石川県衛生公害研究所元所長三根晴雄先生、河野俊一先生、および現所長石田宗治先生に厚く感謝致します。また、有益な御助言、御協

力を頂いた金沢大学がん研究所ウイルス部田中淳之助教授、小倉勤先生に心から感謝するとともに、御支援を頂いたウイルス部の皆様、石川県衛生公害研究所の関係各位に謝意を表します。

本論文の要旨の一部は、第 22 回日本細菌学会中部支部総会（昭和 60 年 11 月、新潟県豊浦町）、第 1 回日本細菌学会中部・関西合同支部総会（昭和 61 年 11 月、岐阜県下呂町）、第 35 回日本ウイルス学会総会（昭和 62 年 11 月、京都府）において発表した。

文 献

- 1) Gregg, N. M.: Congenital cataract following German measles in mother. *Trans. Ophthalm. Soc. Aus.*, **3**, 35-46 (1941).
- 2) Cooper, L. Z. & Kurugman, S.: Diagnosis and management: Congenital rubella. *Pediatrics*, **37**, 335-338 (1966).
- 3) Desmond, M. M., Montgomery, J. R., Melnick, L. J., Cochran, G. G. & Verniaud, W.: Congenital rubella encephalitis. Effect on growth and early development. *Amer. J. Dis. Child.*, **118**, 30-31 (1969).
- 4) Menser, M. A., Dorman, D. C., Kenrick, K. G., Smith, S. G., Slinn, R. F., Dods, L. & Harley, J. D.: Congenital rubella. Long-term follow-up study. *Amer. J. Dis. Child.*, **118**, 32-34 (1969).
- 5) Cooper, L. Z.: Congenital rubella in united state. *In* Krugman, S. & Gershon, A. A. (eds.), *Infections of the fetus and the new born infant.*, p 1-22, Alan R. Liss. Inc, New York, 1975.
- 6) Menser, M. A., Forrest, J. M. & Bransky, R. D.: Rubella infection and diabetes mellitus. *Lancet*, **1**, 57-60 (1978).
- 7) 南谷幹夫: 風疹髄膜脳炎の臨床。臨床とウイルス, **6**, 117-123 (1978).
- 8) Monif, G. R. G. & Sever, J. L.: Chronic infection of central nervous system with rubella virus. *Neurology*, **16**, 111-112 (1966).
- 9) Pope, D. D. & Van Alstyne, D.: Evidence for restricted replication of rubella virus in rat glial cells in culture. *Virology*, **113**, 776-780 (1981).
- 10) Ponten, J. & Macintyre, E. H.: Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta path. microbiol. scandinav.*, **74**, 465-486 (1968).
- 11) Norval, M.: Mechanism of persistence of rubella virus in LLC-MK₂ cells. *J. Gen. Virol.*, **43**, 289-298 (1979).
- 12) Coons, A. H. & Kaplan, M. H.: Localization of antigen in tissue cells II. improvements in a

method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.*, **91**, 1-12 (1950).

- 13) Woods, W. A., Johnson, R. T., Hostetler, D. D., Lepow, M. L. & Rabbins, F. C.: Immunofluorescent studies of rubella-infected tissue cultures and human tissues. *J. Immunol.*, **96**, 253-260 (1965).
- 14) McCombs, R. M. & Rawls, W. E.: Density gradient centrifugation of rubella virus. *J. Virol.*, **2**, 409-414 (1968).
- 15) Van Alstyne, D., Krystal, G., Kettys, D. & Bohn, E.: The purification of rubella virus (RV) and determination of its polypeptide composition. *Virology*, **108**, 491-498 (1981).
- 16) Rawls, W. E. & Melnick, J. L.: Rubella virus carrier culture derived from congenital infected infants. *J. Exp. Med.*, **123**, 795-816 (1965).
- 17) Plotkin, S. A., Boúe, A. & Boúe, J. G.: The in vitro growth of rubella virus in human embryonic cells. *Am. J. Epidemiol.*, **81**, 71-85 (1965).
- 18) Weller, T. H. & Nava, F. A.: Propagation in tissue culture of cytopathic agents from patients with rubella like illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**, 215-225 (1962).
- 19) Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M.: A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Nat. Cancer Inst.*, **51**, 1409-1413 (1973).
- 20) Cunningham, L. & Fraser, J. R. E.: Persistent rubella virus infection of human synovial cells culture in vitro. *J. Infect. Dis.*, **151**, 638-645 (1985).
- 21) Townsend, J. J., Baringer, J. R., Wolinsky, J. S., Malaud, N., Mednick, J. P., Panitch, H. S., Scott, R. A. T., Oshiro, L. S. & Cremer, N.E.: Progressive rubella panencephalitis. Late onset after congenital rubella. *New Engl. J. Med.*, **292**, 990-993 (1975).
- 22) Wolinsky, J. S.: Progressive rubella panencephalitis. In Vinken, P. J. & Bruyn, G. W. (eds.), *Handbook of clinical Neurology.*, **34**, p 331-339, North Holland Publ Co., Amsterdam, 1978.
- 23) Weil, M. L.: Chronic progressive panencephalitis due to rubella virus stimulating subacute sclerosing panencephalitis. *New Eng. J. Med.*, **292**, 994-998 (1975).
- 24) 黒木登志夫: 細胞成長因子 (日本組織培養学会編), 130-134 頁, 朝倉書店, 東京, 1984.
- 25) Biron, K. & Raska, K.: Effect of dibutyryl cAMP on adeno virus replication in different cell line. *Virology*, **56**, 383-385 (1973).
- 26) Massab, H. F. & Soltysiak, R. M.: The effect of cyclic nucleotides on virus infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **284**, 375-388 (1977).
- 27) Pastan, I. H., Johnson, G. S. & Anderson, W. B.: Role of cyclic nucleotides in growth control. *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 491-522 (1975).
- 28) Lim, R., Turriff, D. E. & Troy, S. S.: Glia maturation factor: Effect on chemical differentiation of glioblasts in culture. *Science*, **195**, 195-196 (1975).
- 29) Lim, R., Mitsunobu, K. & Li, W. K. P.: Maturation-stimulating effect of brain extract and dibutyryl cyclic AMP on dissociated embryonic brain cells in culture. *Exp. Cell. Res.*, **79**, 243-246 (1973).
- 30) Matsuzawa, H. & Nirenberg, M.: Receptor-mediated shifts in cGMP and cAMP levels in neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3472-3476 (1975).
- 31) Yamamoto, K. R. & Alberts, B. M.: Steroid receptor. Elements for modulation of eukaryotic transcription. *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 721-746 (1976).
- 32) Rousseau, G. G.: Control of gene expression by glucocorticoid hormones. *Biochem. J.*, **224**, 1-12 (1984).
- 33) Trash, C. R. & Cunningham, D. D.: Stimulation of division inhibited fibroblasts by glucocorticoids. *Nature*, **242**, 399-401 (1973).
- 34) Grove, G. L., Houghton, B. A., Cochran, J. W., Kress, E. D. & Cristofalo, V. J.: Hydrocortisone effects on cell proliferation. Specificity of response among various cell types. *Cell. Biol. Inter. Rep.*, **1**, 147-155 (1977).
- 35) Sugimoto, M., Kojima, A. & Endo, H.: Role of glucocorticoids in terminal differentiation and tissue-specific function. *Develop. Growth and Differ.*, **18**, 319-327 (1976).
- 36) Miller, C. A. & Crrigan, D. R.: Reversible repression and activation of measles virus infection in neural cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 1629-1633 (1982).
- 37) Yoshikawa, Y. & Yamanouchi, K.: Effect of papaverine treatment on replication of measles

virus in human neural and non neural cells. *J. Virol.*, **50**, 489-496 (1984).

38) **Van Alstyne, D. & Paty, D. W.** : The effect of dibutyryl cyclic AMP on restricted replication of rubella virus in rat glial cells in culture. *Virology*, **124**, 173-180 (1983).

39) **Morhenn, V., Rabinowitz, Z. & Tomkins, G.** : Effect of adrenal glucocorticoids on polyoma virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1088-1089 (1973).

40) **Paran, M., Gallo, R. C., Richardson, L. S. & Wu, A. M.** : Adrenal corticosteroids enhance production of type C virus induced by 5-iodo-2' deoxyuridine from cultured mouse fibroblast. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U.S.A., **70**, 2391-2395 (1973).

41) **Tanaka, J., Ogura, T., Kamiya, S., Sato, H., Yoshie, T., Ogura, H. & Hatano, M.** : Enhanced replication of human cytomegalo virus in human fibroblasts treated with dexamethasone. *J. Gen. Virol.*, **65**, 1759-1767 (1984).

42) **Costa, J., Yee, C., Troost, T. & Rabson, A. S.** : Effect of dexamethasone on herpes simplex virus type 2 infection in vitro. *Nature*, **252**, 745-746 (1974).

43) **Roehrig, J. T., Brawner, T. A. & Riggs, H. G.** : Effect of 17 β -estradiol on the replication of rubella virus in an estrogen-responsive continuous cell line. *J. Virol.*, **29**, 417-420 (1979).

Characteristics of Rubella Virus Multiplication on Human Glioblastoma Cell Line (118MGC Cells) Treated with Various Drugs Hajime Onishi, Department of Virology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920—*J. Juzen Med. Soc.*, **96**, 945—959 (1987)

Key words: rubella virus, glioblastoma cells, intracellular cAMP, dexamethasone, changes of cellular function

Abstract

In order to examine growth characteristics of rubella virus (RV) in human neural cells, RV replication in 118MGC cells derived from human glioblastoma was investigated in the presence or absence of cyclic AMP (cAMP), dibutyryl cAMP (db-cAMP), papaverine (Pav), prostaglandin E₁ (PE₁) and dexamethasone (DM) under each effective concentration without cytotoxicity. Single treatment of the infected cells with one of these drugs showed no effects on RV growth. Elongation of multipolar process of the cells occurred only by the db-cAMP treatment, but was proved to be completely reversible after removal of the drug. However, the treatment of RV infected cells with a mixture of any one of db-cAMP, Pav or PE₁ plus DM caused significant inhibition of RV growth. The growth was reduced to 0.5~2.3% of that of untreated cells, depending on the treatment periods. These inhibitions were evaluated by both RV plaque assay and RV RNA synthesis assay, and disappeared upon removal of the drugs. Similar treatments of the cells gave no significant effects on the growth of Coxsackie type A-9 and type B-3 viruses. In addition, similar treatment did not strongly affect RV growth in a non-neural cell, Vero cells derived from African green monkey kidney, so much as that in 118MGC cells. From a point of view concerning changes in cellular functions, cellular DNA, RNA, and proteins syntheses were examined in both 118MGC and Vero cells similarly treated with a mixture of Pav and DM. These macromolecule syntheses in the treated 118MGC cells were significantly reduced, showing their recoveries after removal of the drugs. However, these reductions in the treated Vero cells were not as significant as those in the 118MGC cells. From the above results, the characteristic RV growth in neural 118MGC cells treated with the drugs seemed to be closely related to the changes of cellular functions due to the drugs' effects. Since the drugs employed here have been already

shown to have direct or indirect activities causing elevation and maintenance of cellular cAMP levels, treatment of the cells with these drugs might result in an induction of cell differentiation or static cell growth through such changes of cellular functions as DNA, RNA and proteins syntheses. These considerations would reasonably connect with the possibility that RV growth or reactivation in the neural cells may occur through changes of cellular functions by the actions of several physiologically active substances in vivo.