HVJ(Sendai virus)持続感染細胞におけるCowpox virus特異的細胞膜抗原産生の増強：HVJ野生株および温度感受性変異株感染による増強機作の解析

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: 田中, 淳之
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8609

金沢大学十全医学会雑誌　第85巻　第1号　115－128（1976）

HVJ (Sendai virus) 持続感染細胞における Cowpox virus 特異的細胞膜抗原産生の増強

HVJ 野生株および温度感受性変異株感染による増強機作の解析

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）
田　中　淳　之

（昭和50年11月26日）

DNA 型腫瘍ウイルス SV40[1] またはポリオーマウイルス[2] により，トランスフォームされた細胞で，はじめて検出されたウイルス特異的細胞表層抗原 (cell surface (S) antigen) は，非腫瘍ウイルス—例えば，麻疹ウイルス[3]，単純性疱疹ウイルス[4] およびポックスウイルス[5][6]—感染細胞膜にも同様に誘導されることが，その後明らかにされた．かゝる S 抗原は，一般に，ウイルス DNA 合成以前の感染初期に出現し[5]，その生物学的性状からも，ウイルス構成抗原 (viral (V) antigen) や，多くの腫瘍ウイルス誘導の T (tumor) 抗原とも，明らかに区別されている[2]．しかし，その生物学的意義に関する知見は，かゝる S 抗原がウイルス感染と免疫，特に細胞性免疫の成立に重要な役割を果していると示唆されてはいる[7][8] が，まだ不十分といえよう．

著者らは，先に，いくつかの樹立化継代培養細胞を用い，牛痘ウイルス (cowpox virus＝CPV) の S 抗原産生を，蛍光抗体法で比較検索中，この S 抗原産生は細胞種の違いにより，著明な差異を示すことを観察した．しかも，この低産生性細胞（THEL および G2 細胞など）における S 抗原産生が，CPV のトリプシン処理により有意に増強されることを認めた[9]．さらに，パラミクソウイルス：HVJ を持続感染化した低産生性細胞に，CPV を重感染した場合にも，同様の増強が見出され，CPV 増殖初期に必要な細胞機能の HVJ 感染による亢進が，強く示唆されるに至った[10]．そこで，著者は，前述 S 抗原の生物学的意義解明を考慮しつゝ，HVJ 持続感染細胞における，CPV-S 抗原産生増強の機作を，HVJ 野生株および温度感受性変異株持続感染化から，以下のごとく追求した．

実験材料と方法

Ⅰ．使用細胞および培養条件

THEL（ハムスター肺由来）細胞[11][12] およびその HVJ 持続感染細胞（THEL-HVJ）[12] は，すべて10％仔牛血清加 Eagle の MEM により，VERO（アフリカミドリザル腎由来）細胞[13] およびその HVJ 持続感染細胞（VERO-HVJ）は，Eagle の MEM に2％仔牛血清を加えて培養された．これらの培養には，通常35°C，実験により32°ないし37°Cが用いられた．

Ⅱ．ウイルス

1．cowpox virus (CPV)：LB-R 株を VERO 細胞で増殖させ，部分精製または，Joklik の方法[14] に従い，sucrose 密度勾配遠心により，高度精製して用いられた．これらは，ウイルス凝集をなくす目的で，使用直前に短時間音波処理された．

2．HVJ (Sendai virus または Hemagglutinating Virus of Japan)：発育鶏胎児（10日卵）継代（37°C）名古屋—1—60株を HVJ 野生株（HVJo）として用いた．温度感受性（ts）変異株は，HVJ 持続感染 THEL 細胞（THEL HVJ）を音波処理（30ワット，60秒，Branson sonifier）し，その5,000回転，15分遠心上清を抽出 ts 変異株（HVJpits）として用いた．さらに，抽出 ts 変異株を発育鶏胎児（8日卵）で3代以上低温（32°C）継代して，卵馴化 ts 変異株（HVJpits E）とした．

Ⅲ．ウイルスの感染価測定

1．CPV の感染価は，すべて VERO 細胞上の plaque assay[9][10] により，PFU (plaque forming

The Enhanced Formation of Cowpox Virus-Specific Cell Surface Antigen in HVJ (Sendai Virus)-Carrier Cells: Analysis of the Enhancing Mechanism by Infection with HVJ Wild Type and Temperature-Sensitive Mutants. **Junji Tanaka,** Department of Virology (Director : Prof. M. Hatano), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

unit) として測定された．

2．HVJ の感染価測定は，Kashiwazaki らの方法[15]により，VERO 細胞上の CIU (cell infectious unit) で表示された．

Ⅳ．抗 CPV 血清

高度免疫抗 CPV 血清は Ueda らの方法[5]に従い家兎で作製され，中和抗体価 1：5,000倍以上の血清が蛍光抗体液作製に用いられた．

Ⅴ．蛍光抗体（FA）法

上記，高度免疫抗 CPV 血清から，粗γ-グロブリン分画を調整し，これに浜島らの方法[16]に従って，蛍光色素（FITC）ガラベルされ，蛍光抗体液として使用された．S 抗原の検出には，カバースリップ上に培養した細胞に，cytosine arabinoside (CA)（20 μg/ml）の存在下でウイルスを感染（5 pfu/cell）させ，未固定で染色した[5)10)]．V 抗原は，CA 非存在下でウイルスを感染させ，アセトン固定後染色された[5]．S または V 抗原陽性細胞数の測定は，500個以上の細胞をカウントして，それぞれ細胞膜に典型的環状蛍光（S 抗原）を有する細胞数，または細胞質に蛍光（V 抗原）のみられる細胞数を数え，各々のパーセント（%）で表わした．

Ⅵ．細胞粗抽出液の作製

Roux びんで単層培養した各種細胞を，EDTA と少量のプロナーゼではがし，Eagle の MEM に浮遊（4.4×10^7個細胞/ml）した．これら細胞浮遊液を音波処理（30ワット，60秒）して破壊し，これを細胞の粗抽出液とした．これら細胞粗抽出液は，ライソゾーム由来の粗酵素液として，*in vitro* での CPV の外膜 (outermembrane) 脱殻 (uncoating) 活性測定実験に用いられた．

Ⅶ．細胞分画法

Allison らの方法[17]に基づいて行われた．1.5～2.0×10^8個細胞を，低張 Gey の溶液で処理後，0.125M sucrose 溶液（0.01M phosphate buffer, pH8.5 に溶解）中に浮遊して，テフロンのホモジナイザーにより90%以上の細胞が裸核になるまでホモジナイズした．このホモジネートの（2,000g，15分）遠心上清はさらに，（12,000g，60分）再遠心して，上清と沈査に分別された．2,000g遠心沈査は「核と砕片」分画，12,000g再遠心沈査は「ライソゾーム」分画，さらに，その上清は「上清」分画とされた．「核と砕片」および「ライソゾーム」分画は，使用直前に音波処理（30ワット，40秒）され，「上清」分画も含めて，酵素活性ないし，CPV 外膜の脱殻活性の測定に使用された．

Ⅷ．ライソゾーム酵素活性の測定

上記（Ⅵ，Ⅶ）の方法で得られた，細胞粗抽出液と細胞各分画は酵素液として，各酵素反応の至適濃度で用いられた．protease および β-glucuronidase 活性は，Allisonらの方法[17]により，acid phosphatase 活性は，Bessey らの方法[18]に従って測定された．これらの酵素活性は，いずれも細胞当りで表示された．

Ⅸ．赤血球吸着（HAD）法

HVJ 持続感染細胞における HVJ 遺伝子発現の示標として，HAD 陽性細胞数を測定した．35℃ないし37℃で72時間まばらに単層培養された HVJ 持続感染細胞を，リン酸緩衝化食塩水，pH7.2（PBS）で一回洗浄後，これに，0.3%モルモット赤血球浮遊液を加えた．30分間，4℃で放置後，PBS で未吸着血球を洗い去り，総計，500個以上の細胞を数え，その中の血球吸着陽性細胞数の割合を%で表示した．

その他必要な実験方法は，各項目でふれることにする．

実 験 成 績

Ⅰ．HVJ 持続感染細胞への CPV 重感染による CPV-S 抗原産生の増強

1．HVJ 持続感染細胞における CPV-S 抗原産生増強効果

まず，THEL および VERO 細胞とこれらの HVJ 持続感染細胞に CPV を感染し，経時的に CPV-S 抗原陽性細胞数の変化を測定した(Fig. 1 (a, b))．その結果，THEL 細胞では，その産生がきわめて低く，G2（ヒト骨巨細胞腫由来）細胞[19]と同じく CPV-S 抗原低産生性細胞であった．これらに比べると，HeLa（ヒト子宮癌由来）細胞[20]など多くの細胞は，VERO 細胞と同様に CPV-S 抗原高産生性細胞であった[9)10)]．かゝる S 抗原低産生性細胞（THEL，G2）では，CPV の MOI (multiplicity of infection) をあげても，S 抗原産生には特に増強はなかった．一方，S 抗原低産生性細胞を持続感染化させると，そこでの CPV-S 抗原産生増強は，特に THEL の HVJ 持続感染細胞（THEL-HVJ）において著明であった（Fig. 1 (a)）．さらに，CPV-V 抗原の産生も，THEL 細胞では VERO 細胞より低く，その HVJ 持続感染化で，S 抗原と同様に，著しく増強された．

ところで，CPV-S 抗原産生に増強が認められた THEL-HVJ 細胞は，HVJ 野生株（HVJo）感染により得られた HVJ 持続感染細胞で，しかも，樹立後約

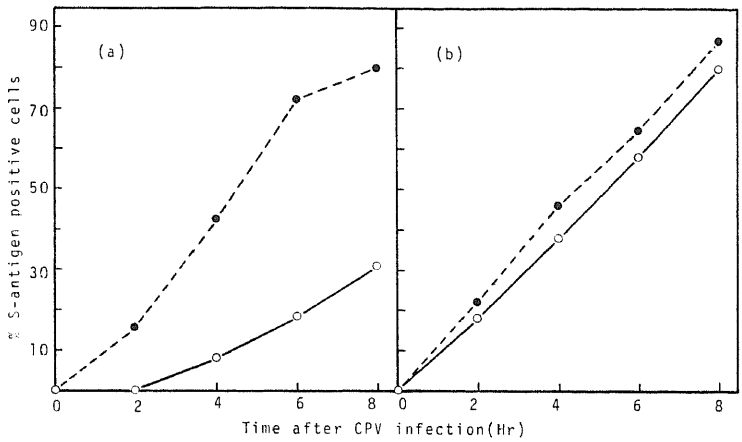

Fig. 1. S-antigen formation in THEL, VERO and their HVJ-carrier cells infected with CPV, 5pfu/cell.
(a) ○——○, THEL cells; ●……●, THEL-HVJ cells.
(b) ○——○, VERO cells; ●……●, VERO-HVJ cells.

Table 1. Relationship between establishment of persistent infection with HVJ wild type or ts-mutant and S-antigen formation by CPV superinfected, 5pfu/cell

Cells	HVJ[b] infected	% S-antigen positive cells[a] (ratio)					
		Control (uninfected)	Passage numbers of THEL cells after HVJ infection[b]				
			2	7	10	20	40
THEL	–	39.0(1.0)[c]					
	HVJpits		47.0(1.2)	59.1(1.5)	82.1(2.1)	89.9(2.3)	85.9(2.2)
	HVJpits-E		62.4(1.6)	–	70.0(1.8)	74.1(1.9)	78.1(2.0)
	HVJo		–	–	27.3(0.7)	59.2(1.5)	74.2(1.9)
THEL-HVJ	–	76.2(2.0)[c]					

a) Observation at 8 hrs after CPV infection. b) moi = 1.0 ciu/cell. c) Average of 5 experiments.
HVJo, wild type; HVJpits, ts mutant extracted from THEL-HVJ; HVJpits-E, ts mutant passaged in developing chick embryos.

6年を経，現在この細胞より検出される HVJ はすべて，37℃以上では増殖し得ない，温度感受性（ts）変異株であることが最近明らかにされた[21]．

この事実から，上述の CPV-S 抗原産生増強は，持続感染化により，ある特殊な細胞の選択された結果，もたらされている可能性が生じた．

2．HVJ 持続感染成立過程における CPV-S 抗原産生能

そこで，この可能性を否定するため，新たに HVJ 持続感染化を計り，その成立過程での検討を試みた．そのために，HVJo，および ts 変異株（HVJpits，HVJpits-E）を，新たに THEL 細胞に持続感染化させ，継代代数毎に親細胞と比較して，CPV S 抗原産生能を検討した（Table 1）．

その結果，HVJpits または HVJpits E感染THEL細胞は，感染後ほとんど CPE（細胞変性効果）を示さず，HAD および抗 HVJ 血清による FA 陽性細胞数は90%以上認められた．また，この性質は細胞の

継代によっても変化なく，ts 変異株による持続感染化は感染後直ちに成立したと考えられた．かゝる持続感染成立細胞における CPV-S 抗原産生は，感染後継代2代の細胞ですでに有意に増強され，継代10代以降の細胞では，従来の持続感染細胞（THEL-HVJ）にみられる増強率とほゞ一致した．

一方，HVJo 感染 THEL 細胞は，感染直後の軽度の CPE と，継代8代に出現した著名な CPE を経て，残存細胞の継代により，持続感染が漸く成立した．しかし，成立直後の継代10代頃の細胞では，CPV-S 抗原産生は逆に親細胞より低く（抑制），継代20代の細胞で漸く増強に転じた．しかしながら，この頃の持続感染細胞内の HVJo は，ヘムアグルチニン産生の温度感受性[22]からみると，すでに約45%が ts 変異株化していると考えられた．

これらの結果から，HVJ 持続感染細胞における CPV-S 抗原産生の増強は，THEL 細胞中の特殊な細胞（CPV-S 抗原産生が高率）の選択的持続感染によるものではなく，また，S 抗原産生の確実な増強には，持続感染細胞内の HVJ が殆ど ts 変異株として存在する必要性を示唆している．

3．CPV-S 抗原産生能への HVJ 持続感染細胞培養温度効果

前記の方法で，新たに樹立化した各種 HVJ 持続感染細胞を，ts 変異株遺伝子機能の permissive な32℃または non permissive な37℃で，それぞれ72時間培養後，35℃における CPV-S 抗原産生を親細胞と比較した．こゝで，VERO 細胞は高産生性細胞として比較のため，以後の実験に用いられた．

Table 2 に示されたように，32℃培養後の持続感染細胞における CPV-S 抗原産生は，親（THEL）細胞の約2～2.7倍にいずれも増強された．これに比べて，37℃培養後の ts 変異株持続感染細胞（THEL-HVJ，THEL（HVJpits）および THEL（HVJpits-E））の HAD 陽性細胞数はいずれも1%以下に低下し，同時に，32℃培養細胞で認められたS 抗原産生増強能は，すべて消失して親細胞のレベルになった．しかしながら，37℃培養後の野生株樹立化持続感染細胞（THEL(HVJo)-38）の HAD 陽性細胞数は，なお依然として約半数が陽性で，持続感染細胞内の HVJ の約半数は，未だ ts 変異化していない野生株のまゝと考えられた．しかも，かゝる THEL（HVJo)-38 細胞の37℃培養後，重感染した CPV の S 抗原産生には殆ど増強が認められなかった．さらに，本来，S 抗原産生の高い VERO 細胞では，この培養温度効果は全くみられなかった．

Table 2. Effect of culture temperature of THEL and its HVJ-carrier cells on S-antigen formation by CPV superinfected

Cells	S-antigen positive cells(%)[a] cultured at			
	32°C[b]	(ratio)	37°C[b]	(ratio)
THEL	29.0	(1.0)	32.2	(1.0)
THEL-HVJ	71.4	(2.4)	28.9	(0.8)
THEL(HVJpits)	79.4	(2.7)	33.9	(1.0)
THEL(HVJpits-E)	69.7	(2.4)	33.3	(1.0)
THEL(HVJo)-38	57.2	(1.9)	36.2	(1.1)
VERO	82.0	(2.8)	65.2	(2.6)

a) Observation after 8 hrs at 35 ℃ in cells infected or superinfected with CPV, 5 pfu/cell. b) Cultured for 72 hrs before CPV infection.
HAD positive cells, culture at 32 ℃ : all HVJ-carrier cells > 90 %
culture at 37 ℃ : THEL(HVJo) cell = 45 %
other HVJ-carrier cells < 1 %

かくして，HVJ 遺伝子機能が37°Cで permissive な野生株として約半数細胞内に存在する持続感染細胞では，HVJo permissive な37°C培養で，CPV-S 抗原産生増強能が失われること，および32°Cで permissive な ts 変異株が主に存在する持続感染細胞を permissive な温度で培養した時にのみ，増強が著明であることから，CPV-S 抗原産生増強の機作は，主として，ts 変異株遺伝子機能によることが大きいと考えざるを得なかった．

Ⅱ．CPV の uncoating（脱殻）の問題

1．THEL およびその HVJ 持続感染細胞における CPV 増殖初期パターンの比較

一般に，THEL 細胞への CPV 吸着率は VERO 細胞に比べると低かったが，HVJ 持続感染化により，その吸着率が有意に上昇することはなかった．一方，各種持続感染細胞内 CPV の産生は，CPV 感染後 8 時間においてすでに親細胞に比べ，著しく増強された．これらの実験成績を考えると，HVJ 持続感染細胞における S 抗原産生の増強は，特に，細胞内 HVJ 遺伝子機能による CPV 初期増殖の促進に由来すると予想された．そこで，親（THEL）細胞と各種 HVJ 持続感染細胞の両者に CPV を感染または重感染させ，細胞内 CPV 感染価の経時的変化を測定し，CPV 増殖の初期パターンを相互に比較検討した．この実験は，すべてのウイルスと同じく，吸着侵入した細胞内 CPV の外膜（outermembrane）が，脱殻（uncoating）されると，感染性の検出できない eclipse phase（暗黒期）に入る[23]ことに基づいている．

その結果，Fig. 2 にみられるように，S 抗原低産生性親細胞（THEL）においては，吸着侵入した感染 CPV が感染 2 時間迄著しく細胞内に蓄積し，その有意の低下，すなわち eclipse phase の出現は，他のすべての細胞におけるものより，きわめて遅かった．一方，このパターンに比べ，S 抗原高産生性 VERO 細胞および，S 抗原産生が増強された各種 HVJ 持続感染細胞では，感染性 CPV の蓄積が極めて少く速やかに低下して，若干の差はあるものの，吸着侵入 CPV は，直ちに脱殻されることを示していた．さらに，CPV 感染後 6 時間の比較でも親細胞では，他の細胞と異なり，one step の増殖開始がみられぬという差を認めた．

2．細胞粗抽出液（CPV 外膜脱殻酵素含有）と

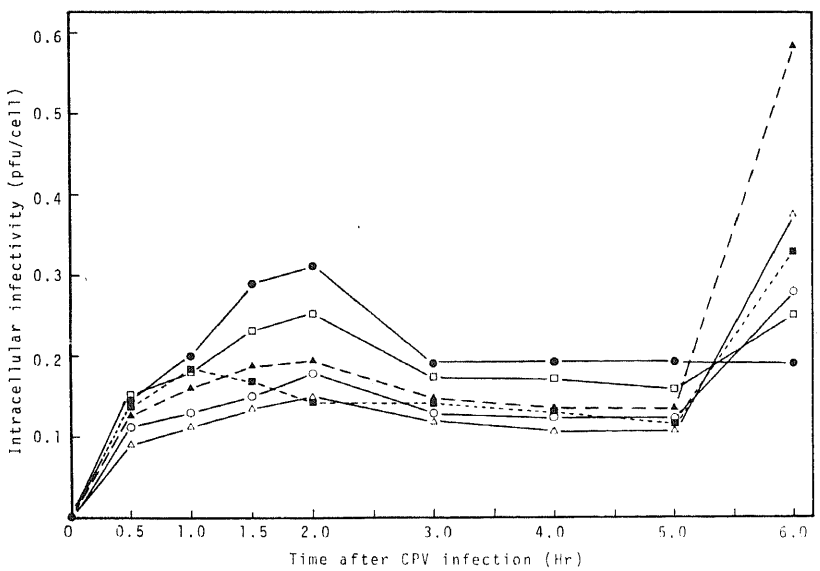

Fig. 2. Infectivity of intracellular virus at different stages after infection with CPV, 5 pfu/cell.
●——●, THEL; △——△, THEL-HVJ; ▲……▲, THEL (HVJ pits); ○——○, THEL (HVJ pits-E); □——□, THEL (HVJo)-30; ■……■, VERO cells.
Virus-infected cells were washed twice with MEM containing virus anti-serum (1:100) before treatment in sonifier

CPV との反応

一般に，pox virus の外膜脱殻は，宿主細胞既存の酵素 (uncoating enzyme) によって行われる[23]とされている．これより，前述の親細胞とその HVJ 持続感染細胞，さらに VERO 細胞における CPV 増殖初期のパターンの差異—特に eclipse phase 出現の差—は，各細胞既存の外膜脱殻酵素活性の違いに由来する可能性が考えられた．そこで，各細胞の粗抽出液と高度精製 CPV とを反応させ，*in vitro*-での CPV 脱殻効率（感染価低下活性）を比較測定した．

その結果（Table 3），多くの場合，反応120分迄 CPV 感染価は反って上昇した．すなわち，親細胞粗抽出液と CPV との反応では，20分より感染価は上昇し始め，30分で最高に達し，以後その上昇率は少くなったが，反応120分でもなお若干認められた．これに対し，VERO 細胞粗抽出液と反応させると，感染価上昇の最高値はすでに10分で生じ，以後 THEL 細胞に比べると著明に低下していった．これら脱殻の進行過程で，反って感染価が上昇するということは，部分的な或る未完成な脱殻状態の CPV が生じたためで，著者らが先に報告した[9] CPV の至適トリプシン処理効果と甚だ近いといえよう．なおこの問題に関しては，後に NP-40 処理 CPV としても論じられるであろう．

一方，ts 変異株持続感染細胞粗抽出液と CPV との反応では，上述の親細胞に比して反応がさらに促進され，10ないし20分で感染価は最高に上昇した．さらに，興味あることには，持続感染 HVJ のほとんどが，野生株の THEL(HVJo) 継代13代抽出液との反応では，その感染価上昇低下パターンは，親細胞とほとんど同じであった．しかしながら，持続感染細胞内 HVJ の約90%が ts 変異株化している継代42代細胞抽出液との反応では，上述のごとく，反応20分で最高に上昇し，以後の上昇低下は親細胞よりも ts 変異株持続感染細胞のパターンに近かった．ちなみに，持続感染細胞内含有 HVJ 粒子自身または HVJ 粒子含有のノイラミニデースが，かかる CPV の感染価を上昇低下させる可能性は，対照実験[10]で完全に否定された．

同様の実験を，ts 変異株遺伝子発現の non permissive な，37°Cで72時間培養各細胞よりの粗抽出液を用いて行った．

その結果は，Table 2 における37°C培養後の CPV-S 抗原産生増強への培養温度効果の場合と同じく，

Table 3. Infectivity of CPV incubated with cell extracts from THEL and its HVJ-carrier cells cultured at 35℃

Cell extracts*	% infectivity of CPV incubated for					
	0	10	20	30	60	120 min
MEM (control)	100	100	100	101	93	79
THEL		98	120	144	134	126
THEL-HVJ		149	159	104	103	98
THEL (HVJpits)		144	135	127	114	107
THEL (HVJpits-E)		134	149	126	114	103
THEL (HVJo)-13		94	136	141	112	104
THEL (HVJo)-42		148	154	147	123	118
VERO		160	150	116	92	75

* 4.4×10^7 cells/ml in Eagle's MEM, sonication at 30 w for 1 min.
HAD positive cells after cultivation at 35 ℃: all HVJ-carrier cells > 90 %.
Highly purified CPV(1×10^7 pfu/ml) was incubated with equal volume of cell extracts for indicated period at 37 ℃.

各種持続感染細胞粗抽出液の活性は，いずれも親細胞粗抽出液の示す活性に低下し，培養温度効果が認められた．これらより，CPV 感染価上昇低下（脱殻）活性は，持続感染細胞上での HVJ，特に ts 変異株の遺伝子機能発現と明らかに相関していた．

3．Nonidet P-40（NP-40）と CPV との反応
—人工的脱殻のモデル実験．

上述のごとき，各細胞粗抽出液と CPV との反応(脱殻)過程に認められた CPV 感染価上昇の機作を解析する目的で，さらに CPV を detergent：NP-40 と反応させ，人工的脱殻のモデル実験を試みた．これは，NP-40 が pox virus の外膜を分解し，徐々に core を露出する[24]，いわば *in vitro* で外膜の "uncoating" を行う作用のあることに基づいて行われた．

その結果を Fig. 3 に示した．最終濃度 0.1% NP-40 は，CPV の感染価を反応10分ですでに，100分の1以下に低下させたが，0.01%および 0.001% NP-40 は，10ないし20分でいったん CPV の感染価を上昇させ，それ以後の反応で感染価を低下させた．この結果は，CPV の外膜が NP-40 によって，ある程度以上に分解されると，CPV 粒子は宿主細胞にもはや吸着し得ず，感染力を失うが，外膜の部分的分解を受けたウィルス粒子は，むしろ，感染細胞内で脱殻され易くなり，そのため感染価が上昇すると解された．それ故，前述の各細胞粗抽出液との反応によってもたらされた CPV の感染価上昇ないし低下は，至適濃度の NP-40 との反応にみられたパターンと全く同一の機作によるものと考えられた．

以上，1～3の結果より，THEL 細胞では，CPV 脱殻の第1のステージである外膜の脱殻[23]に必要な細胞機能が，S 抗原高産生性 VERO 細胞に比べると，非能率的であったが，持続感染 ts 変異株の遺伝子発現により，細胞内 CPV の脱殻機能は，有意に促進されると考えられる．

Ⅲ．CPV 外膜の脱殻活性本態の解析

これまでみてきた HVJ 持続感染細胞上での CPV-S 抗原産生増強は，細胞内 HVJ ts 変異株による細胞機能の亢進，すなわち，CPV の外膜脱殻を促進することに基づいていることが，上述の段階までで明らかにされた．それ故，CPV の外膜脱殻活性の本態は何であるかの追求を次に試みた．そのため，Allison らの方法[17]により，ライソゾームに焦点を合わせて，THEL および THEL(HVJpits-E) 細胞の分画を作り，各細胞分画と CPV とを反応させてみた．

その結果（Fig. 4(a, b)），親細胞および HVJ 持

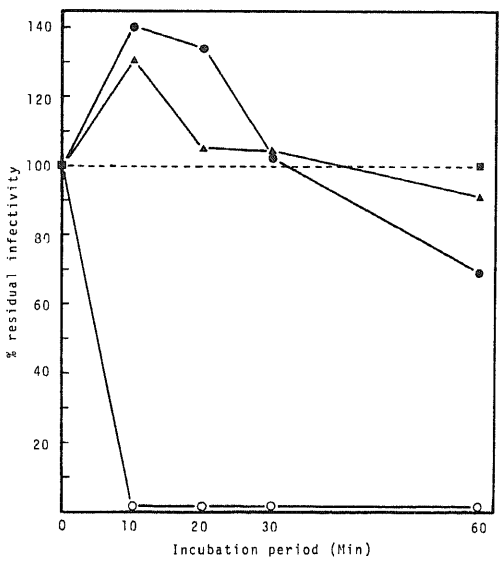

Fig. 3. Effect of Nonidet P-40 (NP-40) on CPV infectivity.
Highly purified CPV (1×10^7 pfu/ml) was incubated with equal volume of MEM (control) (■) and NP-40 at final concentration of 0.1 (○), 0.01 (●) and 0.001% (▲) for indicated periods at 37℃.

続感染 THEL 細胞由来のいずれでも，前述（Ⅱ）にみられたような CPV 感染価の上昇低下は，「核と砕片」および「上清」分画に比べ，「ライソゾーム」分画との反応において，最も著明に認められた．さらに，親細胞と HVJ 持続感染細胞との比較では，後者の「ライソゾーム」分画の活性（感染価の上昇および低下度）が，やゝ強い傾向を示した．これより，CPV の外膜脱殻は，主としてライソゾーム由来の酵素作用によると考えられた．

Ⅳ．HVJ 持続感染細胞内のライソゾーム酵素活性

1．HVJ 持続感染化によるライソゾーム酵素活性の増強

上述の諸実験で，CPV 外膜の脱殻には宿主細胞のライソゾーム酵素が，重要な役割を果していることが示唆された．それ故，CPV-S 抗原産生の増強された HVJ 持続感染細胞では，当然ライソゾーム酵素活性も増強されていると考えられる．そこで，親細胞および各種 HVJ 持続感染 THEL 細胞における，ライソゾーム由来酵素：acid phosphatase, protease および β-glucuronidase の（全活性／細胞）を比較測定した．なお，protease 活性は，THEL 細胞では，pH5.0 と pH8.0～9.0 の二点が至適 pH を示し，VERO 細胞では，pH4.0 が至適 pH であった．酵素活性測定には，35℃ 2 日培養後，ほゞ monolayer の完成した細胞を用いた．

その結果を Table 4 に示した．ts 変異株持続感染細胞では，持続感染成立直後の細胞（継代 2 代）ですでに，親細胞に比べると各酵素活性はいずれも上昇傾向が認められた．しかしながら，S 抗原産生が親細胞より逆に低下した HVJo 持続感染成立直後の細胞（継代 9 代）では，ライソゾーム酵素活性も同様に低く，S 抗原産生が増強に転じた頃の細胞（継代18代）では，すべての酵素活性は増強されていた．

かくして，HVJ 持続感染成立に伴う，ライソゾーム酵素活性の増強と，CPV 外膜脱殻の促進，さらに，S 抗原産生増強の動きには，ほゞ比例関係が認められた．

2．ライソゾーム分画処理 CPV による S 抗原産生増強

前記，ライソゾーム分画との反応後，感染価上昇のみられた CPV は，無処理 CPV に比べ，細胞内で脱殻され易く，かゝる反応（処理）後のウィルス感染 THEL 細胞の，S 抗原産生は当然増強が期待された．それ故，この点を追求し，S 抗原産生増強と CPV 脱殻の促進，さらに，ライソゾーム酵素活性の増強との関係をより確実にせんとした．すなわち，CPV 外

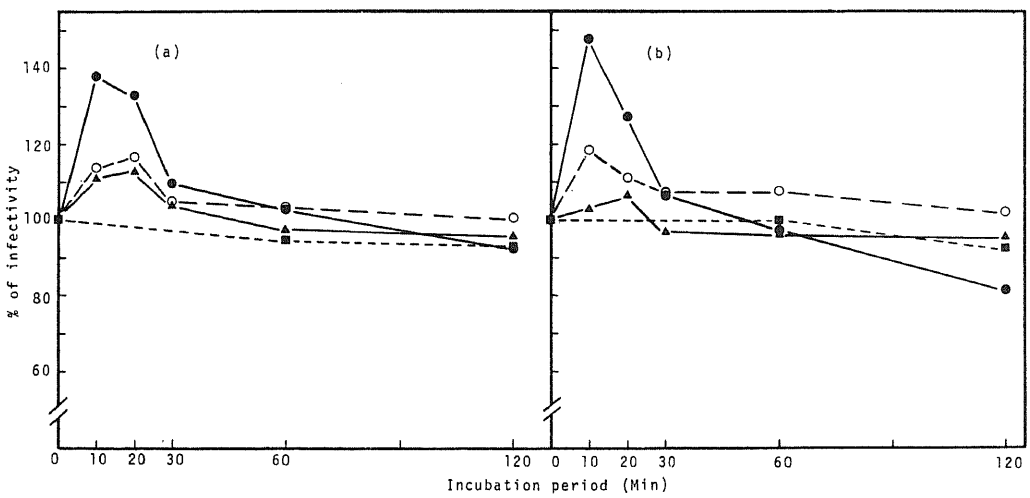

Fig. 4. Infectivity of CPV incubated with nuclei and debris, lysosomal and supernatant fractions prepared from (a) THEL and (b) THEL (HVJ pits-E) cells.
Highly purified CPV (1×10^7 pfu/ml) was incubated with equal volume (1.4mg protein) of nuclei and debris (○------○), lysosomal (●——●), supernatant (▲——▲) and sucrose (control) (■------■) fractions for indicated periods at 37℃.

膜脱殻活性（ライソゾーム酵素活性）の増強されたTHEL (HVJpits-E) 細胞由来ライソゾーム分画と，種々の時間 *in vitro* で反応させた CPV を，それぞれ THEL 細胞に感染（処理前の感染価で，5 pfu/cell）させ，感染8時間の S 抗原産生をみた．

その結果（Fig. 5），ライソゾーム分画と反応させた CPV の感染価は，反応10分で対照 (sucrose) に比べ，約40%上昇し，30分以後，次第に低下して，前述の結果（Fig. 4(b)）とほゞ同様であった（Fig. 5 (a)）．一方，10分間反応させた CPV の THEL 細胞への感染は，無処理 CPV 感染に比べ，CPV-S 抗原産生を，約55%増強させ，30分以上反応させたもので

Table 4. Lysosomal enzyme activities of THEL and its HVJ-carrier cells

Cells	Acid[a] phosphatase	Protease[b] pH 4.0	Protease[b] pH 5.0	Protease[b] pH 8.1	β-glucuronidase[c]
THEL	211.2*(1.0)		899.5*(1.0)	700.2*(1.0)	18.5*(1.0)
THEL-HVJ	339.1*(1.6)		1290.8*(1.4)	1338.8*(1.9)	72.2*(3.9)
THEL(HVJpits)-2	201.5 (0.9)		899.5 (1.0)	927.5 (1.3)	22.1 (1.2)
THEL(HVJpits)-50	260.4 (1.2)		981.7 (1.1)	1213.8 (1.7)	25.6 (1.4)
THEL(HVJpits-E)-2	236.4 (1.1)		932.0 (1.0)	999.5 (1.4)	26.0 (1.4)
THEL(HVJpits-E)-22	252.3 (1.2)		938.0 (1.0)	987.0 (1.4)	23.1 (1.2)
THEL(HVJo)-9	112.2 (0.5)		682.5 (0.8)	542.5 (0.8)	10.0 (0.5)
THEL(HVJo)-18	290.1 (1.4)		975.6 (1.1)	1152.0 (1.6)	32.4 (1.8)
VERO	546.0 (2.6)	1463.6	799.9 (0.8)	521.8 (0.7)	247.8 (13.4)

a) μM p-nitrophenol/0.5 hr/8 x 10^5 cells. b) μM tyrosine/hr/8 x 10^6 cells.
c) μM phenolphthalein/hr/8 x 10^6 cells. * Average of 3 differrent experiments.

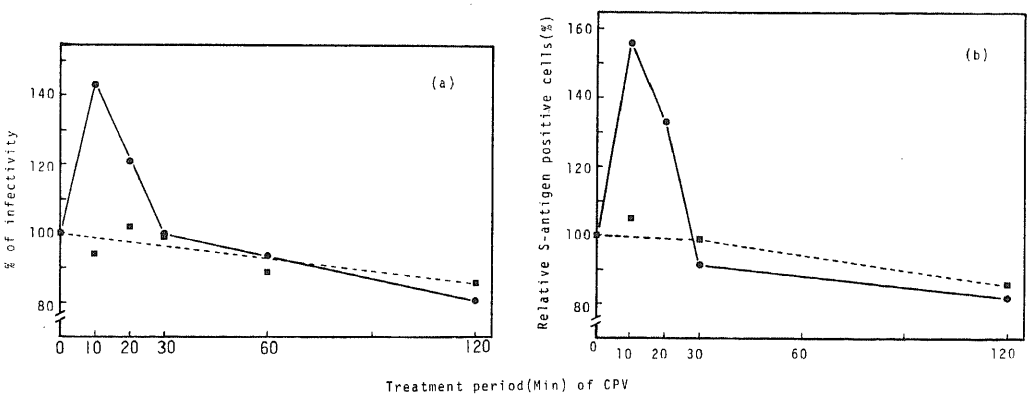

Fig. 5. Effect of treatment of CPV with lysosomal fraction from THEL (HVJ pits-E) cells on (a) infectivity and (b) S-antigen formation in THEL cells.
Virus infection for S-antigen formation: 5pfu/cell (infectivity before treatment). ●——●, treated with lysosomal fraction; ■·····■, treated with sucrose (control).

は次第に低下減少し，感染価上昇低下パターンと似ていた（Fig. 5(b)）．かくて，ライソゾーム分画処理CPV による感染価の上昇低下（脱殻活性の強さ）とS 抗原産生の増減とは，ほゞ比例していた．

V．CPV-S 抗原産生と CPV 初期 messenger RNA (m-RNA) および初期蛋白合成の関係．

次に，上述の HVJ 持続感染細胞における CPV-S 抗原産生増強に関し，一つの見方として，S 抗原の本態の面より追求した．一般に，pox virus の S 抗原は，ウィルス脱殻後に合成される初期 m-RNA によってコードされ，ウィルス DNA 合成以前に形成される初期蛋白であると考えられている[5]．そこで，HVJ 持続感染細胞における CPV 外膜の脱殻促進が，引き続いて S 抗原合成に必要な，初期 m-RNA および初期蛋白（S 抗原）合成の促進につながるかどうかを次に検討した．すなわち，CPV 感染前または感染後，種々の時間に actinomycin D (ActD) または puromycin (Puro) を添加し，これらの薬剤存在下で，CPV 感染 8 時間後の S 抗原の合成をみた．ActD, Puro の使用濃度は，それぞれ使用細胞の RNA および蛋白合成阻害に必要十分で，かつ形態学的障害の認められない程度[10]を用いた．

その結果，Table 5 に示したように，S 抗原高産生性 VERO 細胞をみると，ActD は CPV 感染 1 時間以後に，Puro は 3 時間以後に添加した場合，S 抗原合成の阻害はもはやみられなかった．この結果，VERO 細胞では，CPV 感染後 1 時間以内に合成される m-RNA によってコードされ，3 時間迄に合成される蛋白が，S 抗原であると考えられた．一方，THEL 細胞では，S 抗原の合成阻害が，両薬剤によってともに CPV 感染 4 時間迄みられ，VERO 細胞に比べ，著明な差を示した．しかし，ts 変異株持続感染 THEL 細胞（THEL-HVJ と THEL (HVJpits-E)）および，野生株樹立化持続感染 THEL 細胞（THEL(HVJo)）で，すでに持続感染 HVJ のほとんどが ts 変異株である継代58代の細胞では，THEL 細胞におけるパターンと明らかな差を示した．すなわち，ActD による阻害は，親細胞よりいずれも 3 時間短縮され，さらに，Puro による阻害も 1 時間短縮され，VERO 細胞のパターンにより近づいてきた．

これらの結果は，ts 変異株持続感染細胞では，前述の細胞内 CPV 外膜の脱殻促進に引き続き，S 抗原合成に不可欠な初期 m-RNA 合成さらに初期蛋白合成も促進されていることを示している．

VI．HVJ 重複感染による CPV-S 抗原産生の増強．

これまで，HVJ 持続感染細胞に CPV を重感染することにより，S 抗原産生が増強されることをみてきたが，同じ現象は，CPV 感染細胞に後から HVJ を重複感染しても認められた．この増強の機作は，一部報告した[25]ように，持続感染 HVJ による増強機作と同一であると考えられたが，野生株（HVJo）およ

Table 5. S-antigen formation in respective cells by CPV in the presence of actinomycin D or puromycin added at various intervals before and after virus infection, 5pfu/cell

Cells	Drugs	Time (Hrs) of addition									
		-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8
THEL	ActD*	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+
	Puro**	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+
THEL-HVJ	ActD	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+
	Puro	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+
THEL (HVJpits-E)	ActD	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+
	Puro	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+
THEL (HVJo)-58	ActD	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+
	Puro	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+
VERO	ActD	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+
	Puro	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+

* actinomycin D, 5 ug/ml. ** puromycin, 10 ug/ml. +, S-antigen positive; −, S-antigen negative. Observation of S-antigen was done at 8 hrs after CPV infection.

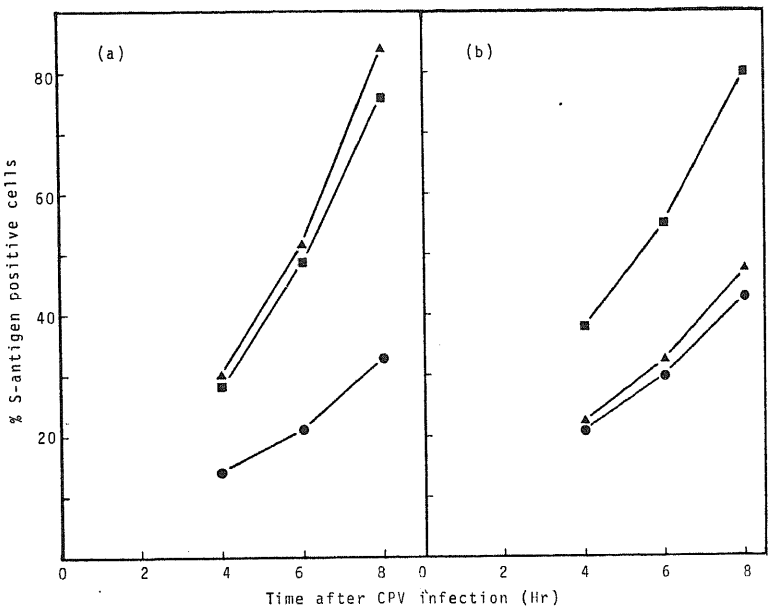

Fig. 6. Effect of superinfection with HVJ on CPV S-antigen formation in THEL cells.
THEL cells infected with CPV (5pfu/cell) for 2hrs at 35℃ were superinfected with HVJo (■) or HVJ pits-E (▲) (1ciu/cell) for 2hrs at (a) 35 or (b) 37℃ and maintained at 35 or 37℃, respectively. (●), without superinfection (control).

び ts 変異株 (HVJpits-E) を用いて,改めて検討し直した．すなわち，THEL 細胞に CPV を35°Cで 2 時間吸着感染後，HVJo または HVJpits-E を35°C または ts 変異株遺伝子機能の non permissive な37°Cで，2 時間重複感染し，以後それぞれの温度で培養して，経時的に S 抗原産生をみた．

その結果を Fig. 6 に示した．35°Cでは，HVJo または HVJpits-E のいずれの HVJ 重複感染によっても，S 抗原産生は著明に増強された (Fig. 6 (a))．一方，37°Cでの重複感染による増強効果は，HVJo にのみみられ，HVJpits-E 感染では無効であった (Fig. 6 (b))．

この結果および既述の持続感染細胞での結果の総合は，後述の考察の項で改めてふれたい．たゞ，HVJ 野生株は ts 変異株と同様に，本来 S 抗原産生増強能を持つが，持続感染状態での増強には，前述のごとく，野生株としてよりも ts 変異株としての存在が重要である[21] ことは明らかであった．

考　　察

著者は，CPV の S 抗原産生が，THEL 細胞の HVJ 持続感染細胞 (THEL-HVJ) 上で，有意に増強される現象[10] について，HVJ 野生株および ts 変異株の特性を利用して，その増強機作解明をここに試みた．この際，著者が最初に懸念した S 抗原産生能の高い特殊な細胞の選択的 HVJ 持続感染化という可能性は，野生株および ts 変異株による，新持続感染細胞樹立化過程を通しての再検討で，はじめて完全に否定され，本質的に持続感染 HVJ 特に ts 変異株の遺伝子機能に基づいていることが明らかにされた．一方，CPV-S 抗原産生増強効果は，後から感染させた HVJ (すなわち，CPV-HVJ) の重複感染によっても ts 変異株遺伝子発現の permissive な35°Cならば，HVJ 野生株または ts 変異株を問わず，どちらのウィルスでも同様に認められた．しかしながら，樹立直後の野生株持続感染細胞へ重感染した CPV の S 抗原産生は，培養温度如何に拘わらず，全く増強されなかった．たゞ，かゝる持続感染細胞内に ts 変

異株が検出される頃になってはじめて増強に転ずることが判明し，上述の重複感染との間に多少の矛盾が生じた．しかし，最近，HVJ 野生株樹立化持続感染 HeLa 細胞でも，ある期間の継代後はじめて，ts 変異株が出現し，安定な HVJ 持続感染細胞の維持に，ts 変異株化とその存在が重要な役割を果すことが示唆された[21]．この事実を考え合わせると，野生株は本来 S 抗原産生増強能を持つが，その機能発揮は持続感染化した場合，やゝ趣きを異にしているといえよう．すなわち，不安定な HVJ 持続感染細胞の時代（樹立化直後）は，野生株が多く ts 変異株は少いため，野生株産生インターフェロン（野生株は ts 変異株よりその産生が多い[21]）による S 抗原産生抑制（恐らく脱殻以後の S 抗原産生過程への抑制）の方が強く現われるためと推定された．ちなみに，野生株を予め35または37℃，2時間感染させた THEL 細胞へ，CPV を重感染させても CPV-S 抗原産生増強は全くみられないという結果も同様に観察している[25]．これに比べ，CPV 感染細胞への HVJ 重複感染の場合には，先に感染して CPV-S 抗原合成が開始されている細胞内では，後から感染した野生株産生インターフェロンは，もはや無効であると考えられる（インターフェロンの作用機作を考えてもこの可能性は甚だ高いといえる）．

さて，かゝる S 抗原産生増強の機作は，親細胞および HVJ 持続感染細胞両者における，CPV 初期増殖パターンの差，さらに両細胞粗抽出液と CPV との *in vitro* での反応の差異から，HVJ 持続感染細胞における CPV の外膜脱殻活性の促進に基因することが明らかにされた．pox virus の脱殻効率は，細胞の種類，生理的状態によって大きく左右される[26]といわれている．S 抗原低産生性 THEL 細胞は，高産生性 VERO 細胞に比べると，CPV 脱殻はきわめて非能率的であるが，HVJ 持続感染化により，脱殻の効率は明らかに促進された．その結果，その後の S 抗原合成に不可欠な CPV 遺伝子の初期機能（初期 m-RNA，初期蛋白の合成）も効率よく促進されることが判明した．

著者は，細胞粗抽出液（CPV 外膜の脱殻酵素含有）ないし NP-40 を CPV と反応させ，*in vitro* での CPV 脱殻活性を測定したが，この反応の初期（10～30分）において，CPV の感染価は必ずいったん上昇することを認めた．一方，Sarov ら[27]は，vaccinia virus が L 細胞内で脱殻される過程で，沈降速度がわずかに遅いだけで，成熟粒子ときわめて類似した中間体 (intermediate) が出現することを報告している．この中間体の持つ感染力は不明であるが，細胞粗抽出液ないし NP-40 との反応によってもたらされた CPV の感染価上昇も，かゝる中間体の出現を意味するのかもしれない．

ところで，ウィルスの脱殻とライソゾーム酵素の関係を示唆する報告はいくつかある[17][28]が，pox virus の脱殻に関する詳細な機作は，現在なお不明である．著者は，上述の細胞粗抽出液と CPV との反応にみられた感染価上昇という現象に着目し，宿主細胞の保有する CPV 外膜の脱殻活性の本態を解析し，ライソゾーム酵素が重要な役割を演じていることをつきとめ得た．しかも，この中間的部分的脱殻の結果と思われる感染価の上昇は，蛋白分解酵素の基質であるカゼインまたはヘモグロビンによって，拮抗的に阻害される[29]ことから，CPV の外膜脱殻活性の本態は，蛋白分解酵素であることが考えられた．しかし，Sarov らの報告[27]によれば，pox virus の外膜脱殻のメカニズムは不明だとしながらも，蛋白分解酵素の関与はないとされている．それ故，ライソゾーム由来の蛋白分解酵素が，CPV 粒子の凝集 (aggregation) 解離 (dispersion)に働き，粒子数の増加をきたして CPV-S抗原産生の増強となった可能性も否定できない．しかし，CPV は使用直前に必ず音波処理し，凝集解離を予め行っていること，および既報のトリプシン効果[9]などを考えると，この可能性は少いと思われる．しかしながら，確実な CPV 脱殻に関与する本態解明には，ラジオアイソトープラベルウィルスの使用など，より定量的分析が今後必要と思われた．

以上，HVJ 持続感染細胞上での，CPV-S 抗原産生増強の機作を，CPV 感染初期段階に焦点を合わせて解析してきた．近年，pox virus 誘導の S 抗原が，感染細胞より分離され[30]，その性状も次第に明らかにされつつある．とりわけ，かゝる分離 S 抗原が，細胞性免疫の成立と密接に関係していることが示された[7]．これらを背景にして，如何なるがん細胞にも効率よく CPV-S 抗原産生を行いうる方法を，既報のトリプシン効果[9]と共に，HVJ 持続感染化を通してこゝに明らかにし得たので，かゝる CPV 誘導 S 抗原によるがん細胞（THEL）膜抗原の変換という，著者らの最終目的にも明るい見通しが切り開かれた．

総　　括

著者は，ハムスター肺由来移植性培養細胞：THEL に比べ，その HVJ 持続感染化細胞（THEL-HVJ）上で，CPV-S 抗原合成が，著明に増強される機作を

解明するため，HVJ 野生株および ts（温度感受性）変異株持続感染の影響を検討し，以下の成績を得た．

1．ts 変異株（HVJpits および HVJpits-E）による持続感染化は，極めて速やかに成立し，それに重感染した CPV の S 抗原産生も，著明に増強された．しかし，野生株（HVJo）による持続感染化は，ts 変異株に比べ，より長時間を要し，持続感染細胞内に ts 変異株の検出される頃（HVJ 感染後継代20代頃）から重感染 CPV の S 抗原産生は増強に転じた．

2．これら ts 変異株持続感染細胞を，ts 変異株遺伝子発現の non permissive な37℃で，72時間培養後，CPV を重感染すると，持続感染細胞の CPV-S 抗原産生増強能は，全く消失した．これより，持続感染細胞における CPV の S 抗原産生増強能は，ts 変異株遺伝子機能によることが示唆された．

3．親（THEL）細胞およびその HVJ 持続感染細胞への CPV 吸着率には有意の差はなかったが，親細胞における CPV 増殖初期にみられた吸着感染性 CPV の細胞内蓄積は，持続感染細胞に殆ど認められなかった．

4．至適濃度の NP-40 を作用させると，CPV はその degradation の初期過程で，いったん感染価の上昇をみた．同じ現象は，細胞粗抽出液と CPV との *in vitro* の反応でも認められ，特に，持続感染細胞粗抽出液との反応に著しくかつ速やかに出現した．これより，NP-40 作用による CPV 外膜の部分的除去（脱殻）と同様の機作が，細胞の HVJ 持続感染化により増強されたと考えられた．

5．この CPV 感染価の上昇（外膜の部分的脱殻）は，細胞のライソゾーム分画と反応させた時，特に著明であった．

かくして，HVJ，特に ts 変異株持続感染成立に伴うライソゾーム酵素活性の増強と，脱殻の促進，さらに，CPV の S 抗原産生増強の動きには，ほゞ比例関係が認められた．

稿を終るに臨み，御指導，御校閲を賜わった波多野基一教授に謝意を表するとともに，御助言，御協力いただきましたウィルス部の皆さんに心から感謝いたします．

文　　献

1) **Tevethia, S. S. & Rapp, F.** : Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), **120**, 455 (1965).

2) **Irlin, S. L.** : Virology, **32**, 725 (1967).

3) **Fagraeus, A. & Espmark, A.** : Nature (Lond.), **190**, 370 (1961).

4) **Ito, M. & Barron, A.** : J. Immunol., **3**, 711 (1972).

5) **Ueda, Y., Ito, M. & Tagaya, I.** : Virology, **38**, 180 (1969).

6) **Miyamoto, H. & Kato, S.** : Biken J., **11**, 343 (1968).

7) **上田義明，多ケ谷勇**：第20回日本ウィルス学会総会，演説抄録，2055 (1972).

8) **浜田忠弥，植竹久雄**：第21回日本ウィルス学会総会，演説抄録，2078 (1973).

9) **Tanaka, J. & Hatano, M.** : J. gen. Virol., **21**, 413 (1973).

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

11) **矢吹朗彦**：金大がん研年報，**2**，113 (1968).

12) **Yamada, T. & Hatano, M.** : GANN, **63**, 647, (1972).

13) **Yasumura, Y. & Kawakita, Y.** : Nippon Rinsho, **21**, 1201 (1963).

14) **Joklik, W. K.** : Biochim. Biophys. Acta, **61**, 290 (1962).

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

16) **浜島義博，京極方久**：免疫組織学，64頁，東京，医学書院，1965.

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

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

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

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

21) **森田修行**：十全医会誌，**84**，397 (1975).

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

23) **Joklik, W. K.** : Annual Review of Microbiology, **22**, 359 (1968).

24) **Easterbrook, K. B.** : J. Ultrastruct Res., **14**, 484 (1966).

25) **田中淳之，梶　哲夫，波多野基一**：第21回日本ウィルス学会総会，演説抄録，2029 (1973).

26) **Joklik, W. K.** : J. Mol. Biol., **8**, 263 (1964).

27) **Sarov, I. & Joklik, W. K.** : Virology, **50**, 593 (1972).
28) **Allison, A. C. & Mallucci, L.** : J. Exptl. Med., **121**, 463 (1965).
29) **田中淳之, 小倉 寿, 波多野基一** : 第22回日本ウイルス学会総会, 演説抄録, 3014 (1974).
30) **Ueda, Y., Tagaya, I., Amano, H. & Ito, M.** : Virology, **49**, 794 (1972).

Abstract

In our previous reports we described an enhanced formation of cowpox virus-specific cell surface antigen (CPV S-ag) in HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan) -carrier THEL cells superinfected with CPV. In order to analyze this enhancement an establishment of carrier state with HVJ wild type (HVJo) and temperature-sensitive (ts) mutants was newly done in THEL cells. These newly established ts-carrier cultures reproducibly gave the enhanced formation of CPV S-ag when cultured at 32-35°C, but not at 37°C. No enhancement was observed even at 35°C in new HVJo-carrier cultures until more than half HVJo in them turned into ts mutants after subsequent passages. This evidence seemed to suggest that enhancement might be due to the gene function of ts mutant rather than HVJo.

Concerning the enhancement of CPV S-ag formation, an intracellular CPV growth at the initial stage of infection was compared between THEL and HVJ-carrier cells. It was revealed thereby that the eclipse phase of CPV in HVJ-carrier cells came about in shorter periods than that in THEL cells, suggesting their higher activities to cause CPV uncoating. In the course of artificial disruption of CPV particle by optimal concentration of detergent: NP-40 in vitro, infectivity of treated CPV was made to increase first and to decrease later. These changes of infectivity appeared to depend on the grade of degradation of CPV outermembrane (uncoating). In the similar reaction of CPV with crude cell extracts or lysosomal fraction from HVJ-carrier cells the CPV infectivity changed more rapidly and markedly than that with parental ones. The results indicated that the cellular or lysosomal enzyme activities causing disruption of CPV outermembrane (uncoating) were significantly accelerated only in ts-carrier cells at their permissive temperature (35°C). Following these accelerations, synthesis of early m-RNAs and proteins coded by CPV genome, which seemed to be essential to CPV S-ag formation, was shown to be promoted remarkably in the same cells.