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:〔II〕増殖増強の機作と活性因子の性状.

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/2297/4598

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

〔II〕 増殖増強の機作と活性因子の性状.

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45回日本細菌学会総会（1972），第7回および第10回日本細菌学会中部支部総会（1970,1973）で発表した．

我々は，これまでの報告[1)2)]で，接種 Influenza virus(IV)(NWS株) の赤血球吸着誘発感染価（HAD_{50}）と培養液中への産生ウイルスの赤血球凝集価（HA価）測定法を主として用い，Polyoma virus (PV) による NWS 増殖増強現象を明らかにし，その機作解明を試みてきた．その結果，NWS 側よりみれば，PV 処理により細胞が NWS を特に吸着し易くなったのではないこと，これら処理細胞で増殖した NWS は，正常未処理細胞で増殖したものと免疫学的な差がないこと，また PV 存在下では NWS の自家干渉 (autointerference) が減弱回復されること，更にこの自家干渉には interferon の産生放出がないことなどを見出した．一方，PV 側よりみれば，PV 処理で細胞が NWS 増殖に促進的に働く stimulon や enhancer のような増殖促進物質[3)]を産生するのではなく，かつ紫外線（UV）不活化 PV でも増強活性があることから，むしろ PV サンプル中に，活性ウイルス粒子以外の活性因子が存在する可能性を指摘してきた．

そこで，この第2報では，UV 半不活化 NWS も含めて，NWS のG2細胞感染増殖過程に及ぼす PV の影響，PV サンプル中の活性因子が，PV 粒子自身なのか或いは PV 増殖に用いたマウス胎児細胞の by-product なのかなどを中心に検討を加えた．前報では多用できなかった NWS の plaque assay[4)] もその後改良され，再現性が確実になったので，本実験ではこの方法が NWS の定量に多く用いられた．得られた結果について以下述べてみたい．

材料と方法

I．使用細胞

ヒト骨巨細胞腫由来の継代培養細胞である G2 細胞を用いた．培養条件は前報[1)2)]と同じく，Eagle MEM 培地にコウシ血清を10%に添加したもので培養し，継代は通常の EDTA と trypsin を用いる分散法[5)]によった．ウイルス感染後の細胞の維持液 (maintenance medium : MM) には，Eagle MEM を用いた．

II．ウイルス

Influenza virus (IV)：A/NWS/39株 (NWS) の発育鶏卵増殖継代株を用いた．赤血球凝集価 (HAU/0.5ml) は，128～256，plaque forming unit (PFU/ml) による感染価は，$2.6\sim5.0\times10^7$のものを実験に供した．

Polyoma virus (PV)：4B5-6株およびSE株を用いた．何れも Swiss 系マウス胎児（ME）初代培養細胞で増殖した継代株で，主として用いた 4B5-6株は，HAU/0.5mlが1,024，感染価が tissue culture infective doses ($TCID_{50}$/0.2ml) で$10^{7.5}$を示した．SE 株は1,024 HAU/0.5ml のものを使用した．

Cow pox virus (CPV)：LBR株で，VERO 細胞で増殖継代した 1.0×10^6 PFU/ml のものを実験に供した．

ウイルスの稀釈には，すべて Eagle MEM を用いた．

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.

Ⅲ. NWS の定量

1．培養液中の産生 NWS の HA 価測定：Micro titer法[6] によったが，ニワトリ赤血球濃度を0.4％にした外は，前報[1)2)]と同じく，凝集像を示す NWS の最高稀釈をもって HA 価とした．

2．NWS 感染による赤血球吸着陽性細胞率（HAD %)の算定 ： 既述の方法[7)]によった．即ち， NWS を細胞に接種し，37°C 3時間吸着させた後，適宜の時間に，感染細胞を EDTA (Ethylenediamine tetra-acetate) および trypsin を用いて分散させた．Hanks 液で分散細胞を1回洗滌後，細胞を1.0×10^6/ml 前後に Eagle MEM に浮遊し，これに等量の0.5％新鮮モルモット赤血球液（M/15リン酸塩緩衝化食塩水（PBS)，pH7.2，に浮遊）を加えた．4°C に1夜放置後，血球計算板を用い鏡検し，1,000個以上計数した細胞に対する赤血球吸着（HAD）陽性細胞の割合を HAD ％とした．この場合，鏡検で細胞の全面または一部に3個以上の赤血球が「イガグリ」状に付着したものを HAD 陽性細胞とした．

3． Plaque assay による感染価（PFU）測定：直径50mm の Petri dish に単層培養したG 2 細胞を Hanks 液で2回洗滌し，測定材料（NWS含有）を1.0ml接種した．37°Cで3時間吸着後，接種材料を捨て，更に Hanks 液で洗滌し，第1次 Overlay medium (OM) を重層後， 5％ CO_2-incubator で 34°C に培養した．3日後に Neutral Red を含む第2次 OM を重層し，翌日プラックを計数した．重層用の medium は，前報[2)]のプラック瓶用処方を改良し，CO_2 培養用として次の処方のものを使用した．

第1次重層用medium： Medium-199 または Eagle MEM の10倍濃縮液10，0.5M Tris-buffer (pH7.6) 2，5％ Bovine Plasma Albumin Fraction V (Armour) 2，1％ DEAE Dextran (Pharmacia) 1，7.5%炭酸水素ナトリウム液 2，蒸溜水（3回）33， 2％ Special Agar Noble (DIFCO) 50，全量100 を 6 ml/dish 用いた．

第2次重層用 medium： Medium-199 または Eagle MEM の10倍濃縮液 10，7.5%炭酸水素ナトリウム液 2，0.2% Neutral Red (DIFCO) 5，蒸溜水 33，2％ Special Agar Noble 50，全量100を 2 ml/dish 更に重層した．

これら重層用 medium は，何れも使用時混和し，42°C に保温しながら用いた．

Ⅳ. 紫外線（UV）による NWS の半不活化

前報[2)]と同じ方法で，種々の時間照射を行い，半不活化された NWS を用いた．

その他必要な実験方法は，各項目でふれることゝする．

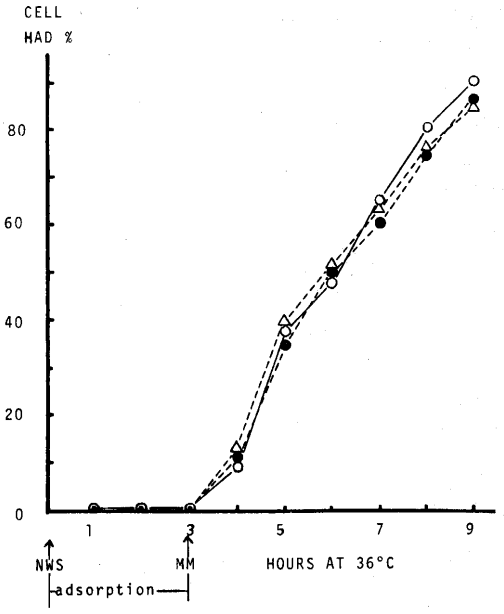
成 績

Ⅰ. NWS 吸着に及ぼす PV 処理または共存の影響

前報[2)]で， PV 処理は細胞の NWS 吸着率を特に上昇せしめないことをみたが，この点を更に鋭敏な方法を用いて再検討した．というのは，吸着率の単なる上昇が増殖増強の機作なのかどうかは，最も本実験の基本的問題に連ると考えたからである．従ってこゝでは， PV 処理または共存細胞への実際の吸着度，および未吸着残存 NWS の plaque assay という2つの面より追求してみた．

まず，NWS を moi (multiplicity of infection) ＝1.0で，PV処理または共存および対照の3群のG 2 細胞に接種，37°Cで3時間細胞に吸着させ，各群で感染細胞の数を示す HAD ％の経時的変化を測定した．これは，実際に吸着した NWS の時間的増殖に

Fig. 1. Hemadsorption of G2 cells caused by adsorbed NWS virus, m.o.i.＝0.1



(○)：untreated cells (control),
(●)：cells pretreated with PV(10^{-1}),
(△)： cells inoculated with NWS in the presence of PV(10^{-1})

つれ，吸着感染成立細胞には HAD が必ず出現することに基ずいている．その結果を Fig. 1 に示した．

これをみると，HAD 陽性細胞は，各群何れも接種後4時間で始めて出現し，以後9時間までほゞ直線的に増加しながら，85～90%の値となり，3群の間に著明な差はみられなかった．(なお，この条件で，PV はG2細胞で増殖せず，かつ吸着しても HAD を起さないことを確めてある)．

一方，この実験時の未吸着 NWS 自身の HA 価および感染価 (PFU/ml) を測定したのが，Table 1 である．吸着（接種）前，32 HAU/mlおよび4.3×10^6 PFU/ml を示した NWS は，3時間吸着後，HA 価は2未満～4 HAU，感染価は$1.8\sim2.1\times10^4$ PFU を示す未吸着 NWS となり，各群細胞間に吸着の有意な差を見出し得なかった．以上の Fig. 1，Table 1の2つの結果から，PV 処理または共存は，G2細胞への NWS 吸着に殆んど無影響といえる．このことは，前報[2]の結論を更に正確に再確認したことになるであろう．

II．PV 共存下の NWS 増殖の時間的経過

前報[1)2)]以来 NWS 増殖増強効果のみられた PV 処理操作のうち，上述の吸着に無影響で，しかも効果が最も著しかった PV 存在下（NWS 接種後の MM 中に PV を含ませる）という方法を主として用い，以下の実験が行われた．

まず，こゝで NWS 接種（感染）後の早期も含めて，PV 存在下における NWS の増殖を時間的に観察した．そのため，NWS の細胞内増殖の反映である接種細胞の HAD %と，培養液中への産生 NWS 放出量を示す培養液の HA 価を測定した．この実験では，NWS の moi を 1.0，0.1，0.01，0.001 の4段階に変えて，(NWS 粒子数/細胞）の割合が異なる感染を行った．37°C 3時間吸着後，MM (PV (10^{-1}) に含むものと含まないものゝ何れか）にかえ，以後12時間までは3時間毎，12時間以降は12時間毎72時間まで観察した．その結果は Fig. 2 に示してある．

moi＝1.0では，細胞 HAD %の推移も，培養液中への産生 NWS の HA 価の推移も，NWS 吸着以降24時間までは，PV を加えない対照の方がむしろやゝ高い値を示した．この理由は明らかでないが，接種 NWS 自身に関係する強い自家干渉（moi が高い程強い）と PV 自身に含まれる若干の interferon の相乗作用が，NWS 増殖早期には，PV による増殖増強効果を上回るためかもしれない．しかしながら，36時間以降では，HAD %も HA 価も PV 存在下の方が若干高くなり，従来観察されてきた PV 効果を示すに至った．

moi を0.1に下げると，感染増殖細胞数を示すHAD %は，12時間までは両群とも同じであったが，24時間以降の PV 存在（添加）群は，対照群より常に高い値を示し，著しい差が見出された．これはmoi＝0.1の対照群においては，1段増殖（約12時間)後，約36時間，次の2段増殖（新しい感染成立）が抑えられ，HAD %の増加は極めて鈍いが，48時間目にようやく再感染による増殖が始まり，HAD %の増加も生じたのに比べ，PV 添加群では，それが既に24時間目におきたことを意味している．従って，PV 存在下では，NWS の1段増殖が，対照群に比べ約24時間短縮され，結果的には以後の増殖が増強されてきた．

この傾向は，moi を更に0.01，0.001に下げても全く同様で，その短縮時間は各々異なるが，HAD %，HA 価の差は，更に顕著となった．

こゝで，対照，PV 添加両群とも，細胞 HAD %が20～30%以上になって，ある一定時間経過後始めて培養液中の HA 価が陽性になることからみると，PV 存在が細胞内増殖 NWS の細胞外放出を特に促進し

Table 1. Assay of NWS virus before and after adsorption on G2 cells pre-treated or co-existed with Polyoma virus

G2 cells	NWS virus			
	before adsorption		after adsorption (3hrs., 36℃)	
	HAU/ml	PFU/ml	HAU/ml	PFU/ml
untreated (control)	32	4.3×10^6	< 2	1.8×10^6
pre-treated with PV (10^{-1}) for 1 day	32	4.3×10^6	< 2	2.1×10^6
in the presence of PV (10^{-1})	32	4.3×10^6	4	——

ているとは考え難かった．

Ⅲ．UV照射半不活化 NWS の増殖に及ぼす PV の影響

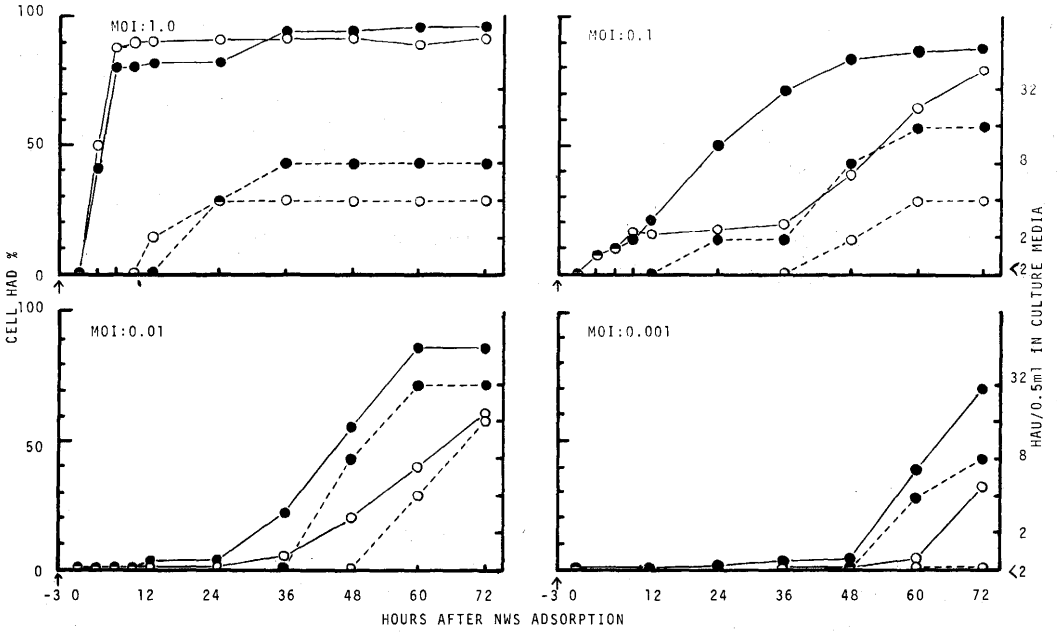
このように，moi が0.1の場合，NWS 増殖の過程に second stage が出現し，そこでの増殖が PV 添加のない対照群で遅いことについては，増殖の first stage に現われるウイルスの中に，不活化乃至不完全粒子が一部含まれ，これによる細胞性自家干渉の結果ではないかと考えられた．既に前報[2]で述べたように，UV 完全不活化 NWS で細胞を前処理すると，細胞性自家干渉が生じ，その後で接種された NWS の増殖は強く抑制されたが，PV を共存させると，この増殖抑制（自家干渉）は殆んど回復（減少）された．そこで，NWS を人工的に UV で一部不活化し，活性と不活性の mixture ウイルスとしての増殖に，PV が如何なる影響を与えるかについて検討を加えた．

1．UV 半不活化 NWS の moi との関係．

4.0×10^7 PFU/mlの NWS を10～30秒 UV 照射して半不活化し，(10^{-1}～10^{-6}) に稀釈し，moi をかえてG2細胞に接種感染させ，PV 存在の有無で，感染4日後にみられる細胞 HAD %を比較した．(Fig. 3)．その結果，未照射対照（0秒）も含め，UV 照射の何れでも感染細胞数を示す HAD %は，PV (10^{-2}) 添加群の方が，接種 NWS の稀釈（moi の差）の如何に拘らず，常に無添加群より高い価を示した．これら両群の差は，接種 NWS の高稀釈（低moi）でより顕著に認められた．一方，低稀釈（高moi）接種のところでは，より強い自家干渉を受けているため，PV による HAD %の増強，即ち増殖増強（自家干渉回復）効果は，低 moi に比べるとやゝ少なかった．同じく，より強い自家干渉は，UV 照射が長くなる程顕著になり，従って，UV 照射30秒の NWS の (10^{-1}) 稀釈（高 moi ）接種が，出現 HAD %値としては最も低い値（32%）を示した．これら UV 半不活化 NWS の低 moi 接種程，PV 効果が著明であることは，Fig 2に示した未照射 NWS の場合と極めて類似しているといえよう．

図示は略したが，感染4日後の培養液に産生されてくるNWSのHA 価の比較でも，PV 効果は Fig. 3

Fig. 2. Effect of the presence of Polyoma virus on the kinetical multiplication of NWS in G2 cells infected with a different m.o.i. of NWS



(○) : maintained with MM alone (control),
(●) : maintained with MM containing PV(10^{-1}),
(————) : cell HAD %, (·····) : HAU in culture media

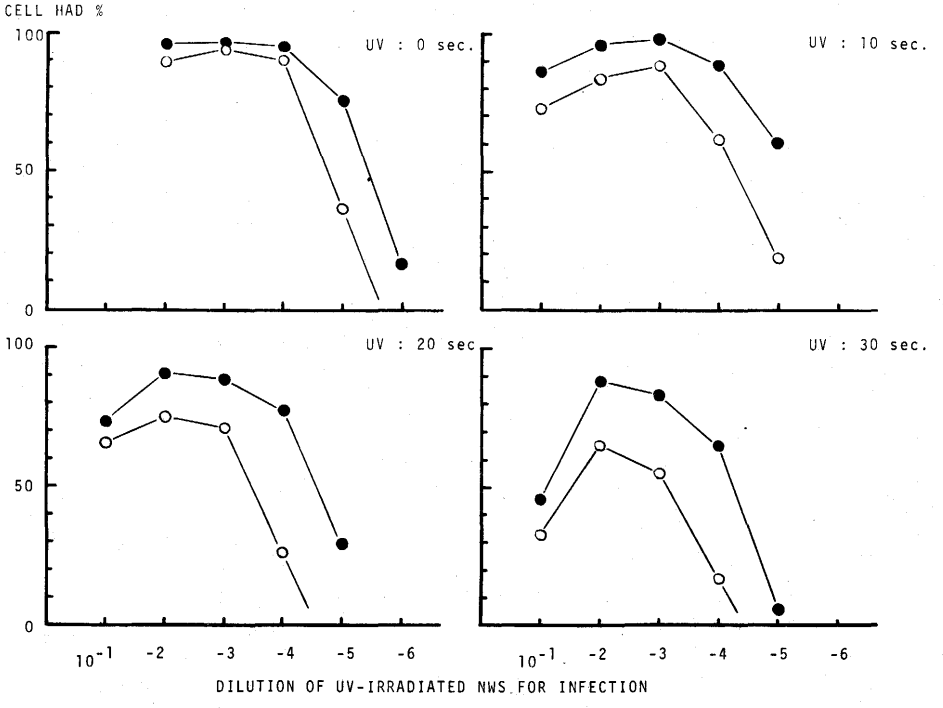
と極めて類似したパターンで認められた．またこのFig. 3に示した実験で，感染4日後の培養液へ産生されたNWSの感染価をplaque assayで求めたのがFig. 4である．こゝでも，上記HAD %（Fig. 3）やHA価と全く同様の結果が，低moiのところで更に大きな差となって得られた．

2．接種NWSのUV不活化度（UV照射時間）との関係

次に，前項のmoiによる差も考慮して，4段階（10^{-2}～10^{-5}）に稀釈したNWSに，Fig. 5のごとく，10～30秒UV照射を行い，半不活度との関連より，PV効果を検討した．そのうち，比較的高moi（0.1）と低moi（0.001）の結果のみをFig. 5に示した．

感染4日後の感染細胞数を示すHAD %（Fig. 5，1）は，何れのmoiでもUV照射時間が増すにつれ急激に低下し，NWS感染性の不活化がみられた．しかし，この場合，PV添加群は，不活化の進んだ（UV照射の長い）NWSの何れのmoiにおいても，HAD %の10～100倍近い回復がみられた．同様の現象は，PV存在または非存在の感染4日目に培養液に産生されるNWSのplaque assay（PFU測定）でも認められた(Fig. 5，2)．この高moi（0.1）接種群の産生NWSのassayにおいて，未照射（0秒）NWSによるウイルス産生量が10秒照射のものより，PVの有無に抱らず，低いPFUとなった理由は明らかでない．おそらく，NWS中に自家干渉をより強く起す不活化乃至不完全粒子が多かったためであろうと考えられる．何れにせよ，この実験においても前項と全く同一の結論，即ち半不活化NWSによる自己干渉のPVによる回復が，NWSの高低両moiで，不活化の進む程（照射時間の長い程），より明確に示された．

Fig. 3. Effect of the presence of Polyoma virus on HAD of G2 cells infected with partially UV-irradiated NWS virus.



NWS (before UV-irradiation) : 4.0×10^{7} PFU/ml
(○) : control cells without PV,
(●) : cells infected in the presence of PV(10^{-2})
Cell HAD % was determined at 4 days after NWS infection.

Ⅳ. NWS 増殖増強をもたらす PV サンプルの条件.

次に，このような PV 処理による NWS 増殖増強が，使用サンプルの差で，どの程度異なるか検討を加えた．同一の PV サンプル(128HAU)を(10^{-1}～10^{-5})に稀釈して（PV 感染 moi を変えて），種々の条件で細胞に与え，NWS 感染4日後の感染陽性細胞数を示す HAD %をみた（Fig. 6，1）．細胞を1日前処理した場合には（10^{-1}）稀釈で，維持液に加えた場合には（10^{-2}）稀釈で最も高い NWS 増殖増強を示し，それぞれ（10^{-2}），（10^{-3}）稀釈まで有効であった．この効果は，PV 液を UV で不活化しても，ウイルス粒子の一部をモルモット赤血球で吸着して除き，HA 価を32 HAU に低下させてもほゞ同様に残存していた．これら細胞処理法に関しては，前報[2]でも一部ふれたが，HAD %測定というより敏感な方法でも，こゝに再確認できた．

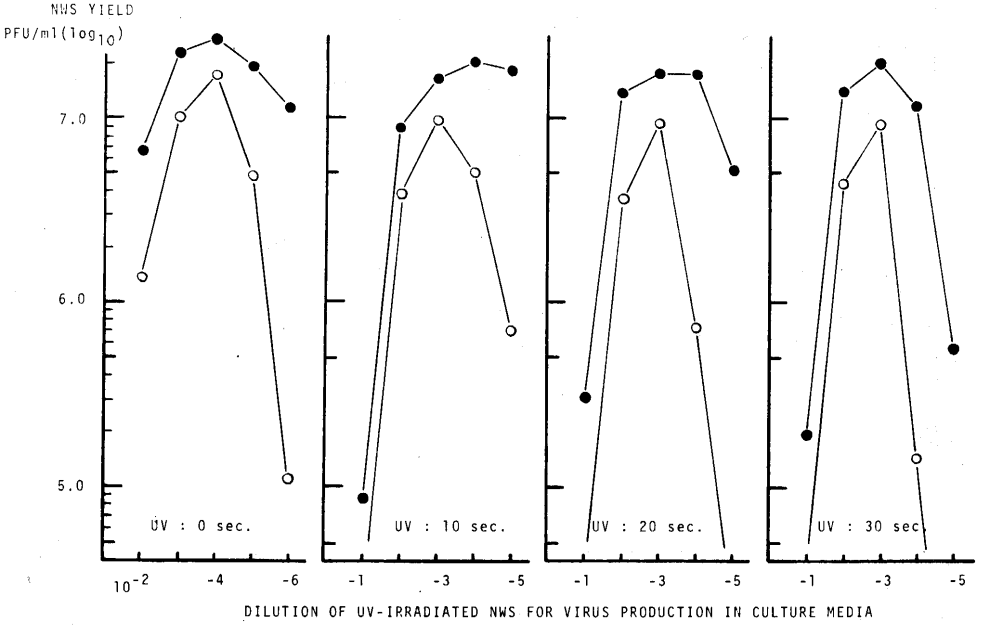
次に4℃に1～6年保存の PV サンプルを各々稀釈して維持液に加え，前実験と同じく，生ずる HAD %で比較した（Fig. 6，2）．これら各サンプルの HA 価は，何れも作製直後に比し1/4に減少していたが，NWS 増殖増強活性は，6年保存のものを除き，1～3年間保存でも充分残存していた．これより，活性因子はウイルス粒子自身よりも低温でかなり安定なものと思われる．また，PV 感染マウス胎児細胞を glycin buffer および borate buffer で室温30分処理後抽出して得た PV サンプル[8]（かなり純粋な PV 粒子と考えられる）を用いると，glycin buffer 抽出液（8 HAU）の（10^{-1}）稀釈は活性を示したが，borate buffer 抽出液（32HAU）には，活性が見出されなかった．

Ⅴ. NWS 増殖増強活性の PV 特異性.

1．Pox virus との比較

このような NWS 増殖増強効果が，果して PV 特異的かどうかについて，同様の DNA 型ウイルス：Cow pox virus (CPV) を PV と同じ条件でマウス

Fig. 4. Effect of the presence of Polyoma virus on NWS yield in culture media of G2 cells infected with partially UV-irradiated NWS virus



NWS (before UV-irradiation) : 4.0×10^{7} PFU/ml
(○) : control cells without PV,
(●) : cells infected in the presence of PV(10^{-2})
NWS yield in culture media was measured at 4 days after NWS infection

胎児初代培養（ME）細胞に感染増殖させ採取したものについて比較した．対照には，同一条件の非感染細胞の培養液(CM_{ME})を用いた．

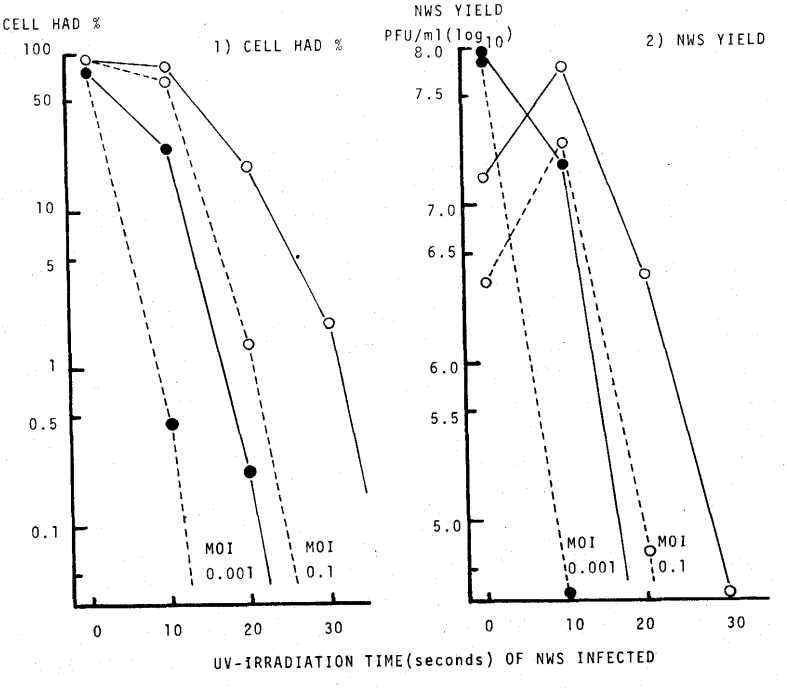
まず，各サンプルを第1次重層 medium 中に，(10^{-3}) に添加した．無添加対照の NWS のプラック数を100とすると，従来用いてきた PV（4B5－6）では132～139，新たに用いた PV (SE)でも126に増加がみられた．しかし，CPV や CM_{ME} を加えても，99～103と全く変化はなかった（Table 2，1）．

一方，NWS 接種後，細胞の維持液に PV，CPV，CM_{ME} を (10^{-3}) に加え，4日培養し，その培養液中に産生されてくる NWS の PFU 価をみたのが（Table 2，2）である．同様に，無添加対照維持培養液へ出現する NWS の PFUを100とすると，PV（4B5－6）では178と増強されているのに，CM_{ME} 添加では79，CPV 添加の時は21と，逆に NWS 増殖の抑制（CPV による NWS の増殖干渉）がみられた．これらから，NWS 増殖増強は，PV に特有のものと考えられる．

2．PV 中和の影響．

そこで次に，このような PV サンプルに特有と思われる NWS 増殖増強能が，抗 PV 血清で PV 粒子を中和した場合どうなるかについて検討した．これは前報[2]および Fig. 6，1)の実験で，UV 不活化 PV も有効であることが示されて，その PV サンプルのもつ活性は，少なくとも活性 PV 粒子自身ではなさそうであることが予想されたからである．そこで，PV (256HAU) 1容に．1/10容の非働化抗 PV 家兎免疫血清(20.480 HAI unit/ml)を加え，37°C 1時間中和した（HA 価からみると充分中和が成立する条件であ

Fig. 5. Effect of the presence of Polyoma virus on the assay of kinetical inactivation of NWS by UV-irradiation



1) cell HAD % at 4 days after NWS infection
2) PFU of NWS produced in culture media at 4 days after NWS infection
(○) : NWS inoculum＝4.0×10^5 PFU/ml (m.o.i.＝0.1)
(●) : NWS inoculum＝4.0×10^3 PFU/ml (m.o.i.＝0.001)
(————) : in the presence of PV(10^{-2}),
(----------) : control without PV

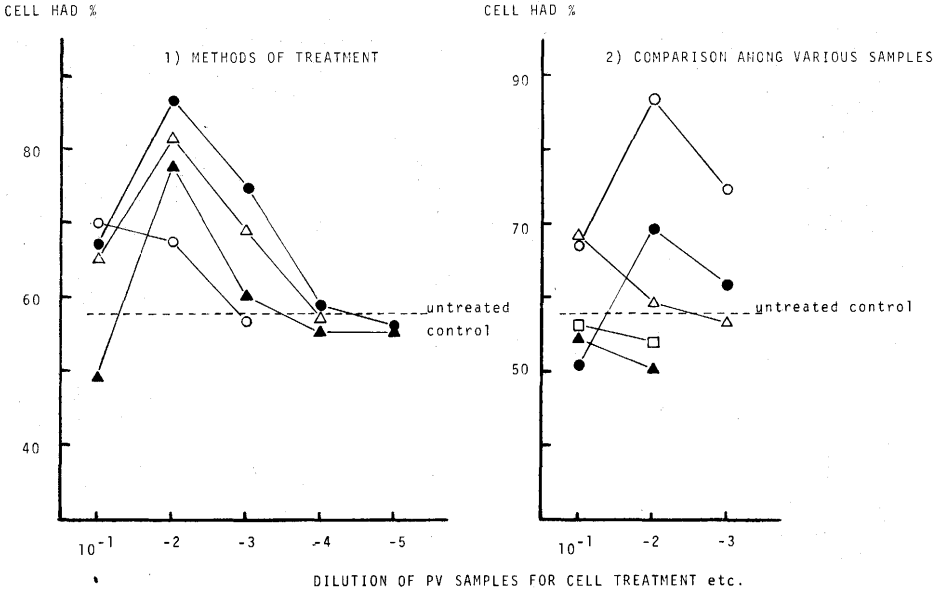
る). その後, PV-抗血清混合液中の PV が (10^{-2}) になるように重層 medium に加えるという条件で, 中和 PV サンプルの NWS 増殖増強活性をみた. 対照には, PV (10^{-2}), または抗 PV 血清 (10^{-3}) 添加重層 medium を用いた.

異なる NWS サンプルを用いて行った 3 回の実験結果が, Table 3 に示されている. 無添加のものに見出されるプラックを100とすると, 抗 PV 血清添加で87～115 (平均98), PV (10^{-2}) 添加で141～170 (平均160), PV 中和サンプル添加で140～153 (平均148) となり, PV 粒子中和後もなお NWS 増殖増強活性は充分残存することが確認された. この結果から, PV サンプル中の活性因子は, PV 粒子そのものよりも, むしろ PV が ME 細胞に感染したことによって生じた細胞側のある product であることが強く示唆された.

Ⅵ. PV サンプルにおける NWS 増殖増強能の差異—ME細胞の PV 感染初期と後期サンプルの比較.

上述のごとく, PV サンプル中の NWS 増殖増強活性因子は, PV 特有で, PV 粒子を中和してもなお残存し, かつ Fig. 6 にみられるごとく低温ですこぶる安定であった. 従って, PV 粒子以外の PV 感染 ME 細胞の by-product の可能性が考えられたの

Fig. 6. Characteristics of Polyoma virus required for the enhancement of NWS virus multiplication. NWS (inoculum) : m.o.i.=0.01



1) Various methods of treatment of G2 cells with PV samples
(○) : pretreated with PV(128 HAU), for 1 day
(●) : maintained with PV (128 HAU)
(△) : maintained with PV irradiated by UV(128 HAU),
(▲) : maintained with PV partially removed by adsorption on GRC (32 HAU)
2) Comparison among various samples added to maintenance medium
(○) : PV-67 (1,024 HAU(at harvested time)------256 HAU (at test time)),
(●) : PV-69 (128 HAU--------32 HAU),
(□) : PV-64 (64 HAU--------16 HAU),
(△) : PV extracted with glycin buffer (8 HAU),
(▲) : PV extracted with borate buffer (32 HAU)
Cell HAD % was measured at 4 days after NWS infection.

で，もしそうだとすると，その産生は，PV 感染後の時期で異っているかもしれない．そこで，PV 感染後異る時期に採取した PV サンプルの比較検討を行った．

サンプルとしては，PV（4096HAU）をME細胞に接種し，感染2日後（初期）および10日後（後期）に採取した2つの PV サンプルを用いた（それぞれ PV_{2d}，PV_{10d}と略）．

その HA 価は，PV_{2d} が32HAU，PV_{10d}が2048HAUと，両者の間には64倍の差がみられた．対照には，非感染のME細胞の培養2日目の培養液(CM of ME_{2d})を用いた．これら PV サンプルの検討には，NWS や PV の moi，更に NWS 感染後の日数などにより，培養液中に産生される NWS の HA 価や感染価

Table 2. Polyoma virus specificity for the induction of enhanced multiplication of NWS in G2 cells

1) NWS diluted and overlayed with medium containing		Exp. 1 plaque numbers (ratio)	Exp. 2 plaque numers (ratio)
None		95 (100)	139 (100)
PV (4B5−6)	10^{-3}	125 (132)	193 (139)
PV (SE)	10^{-3}	/ /	176 (126)
CPV_{ME} *	10^{-3}	98 (103)	137 (99)
CM_{ME} +	10^{-3}	97 (102)	141 (101)
2) NWS production # in the presence of		PFU/ml	(ratio)
None		28×10^5	(100)
PV (4B5−6)	10^{-3}	50×10^5	(178)
CPV_{ME} *	10^{-3}	6×10^5	(21)
CM_{ME} +	10^{-3}	22×10^5	(79)

* Harvested at 10 days after inoculation of CPV with the same conditions for PV growth in mouse embryo cells.
CPV (Cowpox virus) : 1.0×10^6 PFU/ml in VERO cells
\+ Culture media of mouse embryo cells as control to PV or CPV
\# Culture media harvested at 4 days after NWS inoculation

Table 3. Effect of Polyoma virus neutralization on its enhancing activity for NWS multiplication

overlay medium containig	plaque numbers of NWS virus inoculated to G2 cells and their ratios		
	Exp. 1. NWS-D	Exp. 2. NWS-D4	Exp.3. NWS-D44
none (control)	61 (100)	93 (100)	199 (100)
anti-PV(10^{-3})	56 (92)	107 (115)	177 (87)
PV (10^{-2})	104 (170)	157 (169)	280 (141)
PV (10^{-2}) + anti-PV (10^{-3}) *	93 (152)	142 (153)	278 (140)

* Anti-PV serum : 20,480 HAI unit/ml, PV : 256 HA unit/ml, neutral ization for 1 hour 37°C

が著しく異なることを考慮に入れ，次の方法によった．即ち，NWS を moi ＝0.001で接種したG２細胞の維持液に，各 PV サンプルを（10^{-1}～10^{-3}）に添加して培養し，毎日液交換しながら，日を追って培養液を採取し，その HAU と PFU を測定した．

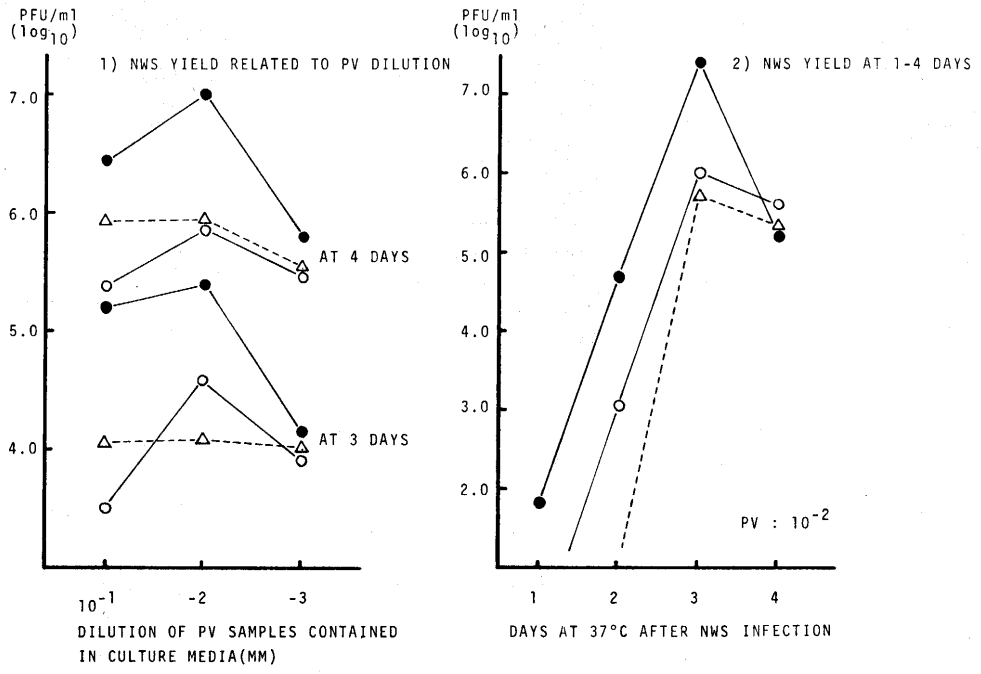
1．PV_{2d}，PV_{10d}サンプルの至適濃度（PV の moi との関係）

（10^{-1}，10^{-2}，10^{-3}）に稀釈した２つの PV サンプルの存在下で，培養液中に増殖した NWS の PFU を，接種後３日と４日目に測定した結果をFig.７，１）に示した．これを見ると，PV_{2d}，PV_{10d} 何れも，（10^{-2}）稀釈添加で最も高い NWS 増殖増強効果を示した．PV_{2d}とPV_{10d}の比較では，HA 価の低いPV_{2d}サンプルの方が，HA 価の高いPV_{10d}サンプルより常に強い増強効果を与えた．また，対照の CM of ME_{2d} の添加は，無添加維持培養液に比べ若干高い値を示した（図示は略）が，稀釈による増強効果の変動は少く，有意な差ではなかった．ほゞ同様の傾向は，NWS 接種３日と４日後の培養液の HAU 測定でも観察された（図は略）．

2．NWS 産生の経日的変化に及ぼすPV_{2d}，PV_{10d}添加（10^{-2}）の影響．

次に，これらPVサンプルを（10^{-2}）に添加した培養維持液に産生される日毎のNWSを，感染価（PFU）より観察した（Fig.７，２）．両サンプルの増強効果は，対照の CM of ME_{2d} 添加では未だ培養液に感染価が見られない感染後１～２日で既に著明に現われ，それは３～４日まで続いた．しかも，PV_{2d} と PV_{10d} を比較すると，PV_{2d}の方が１日早く感染価を出現させ，３日後まで PFU 価も約10～100倍高かった．これと全く同様な結果が，培養液中の HA 価でも観察されたことは，前項の実験と全く同じであった（図

Fig. 7. Comparative enhancing activity of PV_{2d} and PV_{10d} samples for NWS yield in culture media of G2 cells infected with NWS (m.o.i.=0.001)



1) NWS virus yield at 3 and 4 days after NWS infection in the presence of PV_{2d} (32 HAU) (●), PV_{10d} (2,048 HAU) (○) and CM of ME_{2d} (△) diluted from 10^{-1} to 10^{-3}, respectively

2) NWS virus yield at 1-4 days after NWS infection in the presence of PV_{2d} (32HAU) (●), PV_{10d} (2,048 HAU) (○) and CM of ME_{2d} (△) diluted to 10^{-2}, respectively

は略).

かくて，PV 粒子に比例する HA 価の低い PV_{2d} サンプルの方が，HA 価が高い PV_{10d} サンプルより著明な増強効果を示したことは，やはり，活性因子が PV 粒子そのものでないことを意味し，中和実験の考察ともよく一致している.

Ⅶ. PV サンプルのG2細胞増殖維持に及ぼす影響.

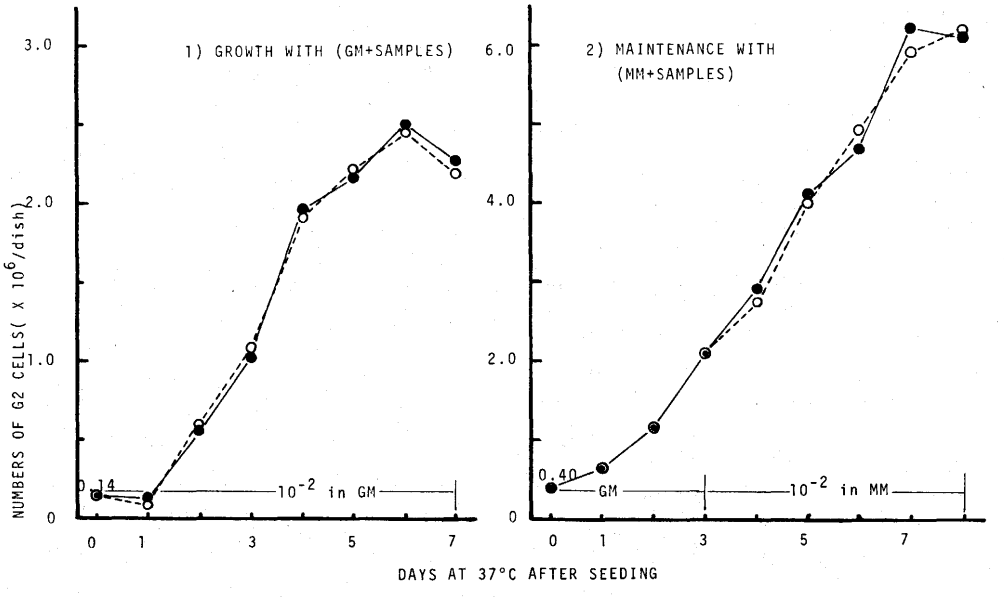
一方，このような PV サンプルは，NWS 増殖の母体であるG2細胞の増殖や維持に好影響を及ぼし，その結果，NWS 増殖増強がおきたのではないかと考えて，本実験を計画した．細胞数測定には，同一条件の30mm径 Petri dish 3枚の数を平均して求め，培養は5％ CO_2 培養で，液交換は毎日行なった.

PV_{2d} を (10^{-2}) に増殖培養液 (GM)に加え，1.4×10^5 cells/dish (2ml) から出発した培養7日までのG2細胞増殖曲線を Fig. 8，1) に示した．これをみると，PV_{2d} および対照の CM of ME_{2d} 添加は，無添加培養液と有意の差は全くなかった．次に4.0×10^5 cells/dish (2ml) で無添加培養を行い，3日目に2.1×10^6/dish と増殖したところで，PV_{2d} と CM of ME_{2d} の添加された維持液と無添加維持液に交換し，以後5日間維持培養を行った (Fig. 8，2)．通常，かゝる増殖維持培養法が，PV の NWS への効果をみる時に使われている．しかしながら，この実験でも，PV_{2d} および CM of ME_{2d} の添加維持は，細胞数の増加，細胞形態の維持，多少の出現は不可避な細胞の自然変性の量などに何ら著差を認めることはできなかった．従って，これらの結果から，PV サンプルはG2細胞の増殖維持には全く無影響で，かゝる問題が PV 増強効果の本態ではないことが明らかとなった.

Ⅷ. NWS 増殖増強活性に影響する PV サンプル処理について—活性因子の性状.

先の実験で，より高い活性を示した PV_{2d} サンプルを主として用い，その性状の検討を行った．そのた

Fig. 8. Effect of Polyoma virus sample on 1) the growth or 2) the maintenance of G2 cells



1) PV_{2d} (32 HAU) (●) or CM of ME_{2d} (○) samples were supplemented to growth medium (GM) at 10^{-2} and medium changed every day with GM containing each samples.
2) G2 cells grown with GM for 3 days were maintained with maintenance medium (MM) containing PV_{2d} (32 HAU) (10^{-2}) (●) or CM of ME_{2d} (10^{-2}) (○) for following 5 days. Medium changed every day with MM containing each samples.

め，Table 4，5，6に示すような各種の処理を施した後，NWS 感染後の維持培養液に，対照の未処置サンプルと同じく（10^{-2}）に添加した．NWS 感染2日および3日後，2枚の Petri dish より採取した培養維持液への産生 NWS の HAU と PFU を測定した．更に処理対照として，CM of ME_{2d} の処理前後のものも，必要に応じて使用した．結果は，Table 4，5，6に示した．

1．熱に対する抵抗性（安定性）

Fig. 6に示されたごとく，この PV サンプル中の活性因子は低温保存には安定であった．そこで，56°C30分および100°C10分加熱による失活の有無をみた．かゝる処理で，PV_{2d} 自身の HA 価は，56°C30分加熱では変らなかったが，100°C10分加熱では消失した．一方，増強活性は，56°C30分では，なお大部分が残存するが，100°C10分では全く消失した．

2．PH2.0に対する抵抗性

PV_{2d} 0.5mlに 1N HCl を0.011ml加えpH 2.0と

Table 4. Effect of various treatments of PV_{2d} sample on its enhancing activity for NWS multiplication in G2 cells

Treatment of PV 2d sample		(HAU/ml)	Ratio of NWS yield ** in culture media to control one at 2 days (after NWS inoculation) at 3 days			
			(HAU/ml)	(log PFU/ml)	(HAU/ml)	(log PFU/ml)
none		(32)	> 8 (16)	147 (5.3)	8 (256)	47 (6.9)
heat	56℃, 30 min.	(32)	> 4 (8)	62 (4.9)	8 (256)	35 (6.7)
	100℃, 30 min.	(<2)	1 (<2)	2 (3.4)	2 (64)	1 (5.0)
pH 2.0 for overnight at 4℃		(16)	> 2 (4)	50 (4.9)	4 (128)	24 (6.6)
ultraviolet irradiation		(32)	> 2 (4)	62 (4.9)	8 (256)	33 (6.7)
dialyzation with PBS for overnight at 4℃		(16)	> 4 (8)	57 (4.9)	8 (256)	10 (6.2)
neutralization with anti PV serum		(<2)	> 2 (4)	53 (4.9)	4 (128)	34 (6.7)
absorption on GRC		(16)	> 8 (16)	60 (4.9)	8 (256)	37 (6.8)
elution from absorbed GRC		(4)	1 (<2)	1 (3.2)	1 (32)	1 (5.4)
culture media of ME cells (control)		/	1 (<2)	1 (3.2)	1 (32)	1 (5.2)

* Treated PV samples or culture media of ME cells were added to maintainance medium at 10^{-2}.

** NWS virus produced in culture media of NWS-infected G2 cells in the presence of each samples treated.

Table 5. NWS virus growth enhancing activity of supernatant of PV_{2d} sample centrifuged at 105,000g for 2 hours

samples added to maintenance medium at 10^{-2}		(HAU/ml)	Ratios of NWS * yield in culture media to control ones at 2 days (after NWS inoculation) at 3 days			
			(HAU/ml)	(log PFU/ml)	(HAU/ml)	(log PFU/ml)
PV_{2d}	original	(32)	> 4 (16)	74 (5.4)	8 (512)	8.9 (7.2)
	supernatant	(<2)	> 4 (16)	80 (5.5)	8 (512)	10.7 (7.3)
CM. of ME.	original (control)	/	1 (<4)	1.0 (3.6)	1 (- 64)	1.0 (6.3)
	supernatant	/	1 (<4)	1.0 (3.7)	1 (64)	1.0 (6.3)

* NWS virus produced in culture media of NWS-infected G2 cells in the presence of each samples

Table 6. Effect of trypsin treatment of PV samples on their enhancing activities for NWS multiplication

PV samples added to maintenance medium at 10^{-2}	NWS yield in culture media of G2 cells at 3 days after NWS inoculation in the presence of				Reduction (%) of PFU in the presence of trypsin-treated PV sample
	Untreated PV samples		Trypsin-treated PV samples		
	HAU/ml	PFU/ml ($\times 10^5$)	HAU/ml	PFU/ml ($\times 10^5$)	
PV_{2d} (original)	128	214	32	17	92
PV_{2d} (supernatant) *	128	240	16	10	96
CM of ME (original)	32	29	32	25	14
CM of ME (supernatant)	32	35	32	26	13
PV_{10d}	32	45	32	33	27
PV-67	256	309	16	15	95
none (control)	32	35	(32) **	(40) **	(+11) **

* Supernatant after centrifugation for 2 hours at 105,000g

** In the presence of trypsin and trypsin inhibitor used for treatment

し，4℃で1夜放置後，1N NaOH 0.005mlと7.5% $NaHCO_3$ 0.013mlを加え，pH 7.6にもどした．この処理により PV の HA 価は半減し，増強活性もおよそ1/2に低下したが，対照（CM of ME_{2d}）に比べれば，まだ充分の活性を示した．

3．紫外線に対する抵抗性．

前報[1)2)]，Fig. 6でも，この問題にふれたが，plaque assay による確認を行った．UV は2分間照射して実験に供したが，HA 価も増強活性も殆んど消失せず，前報の結論の正しさが裏付けられた．

4．透析の影響

PV_{2d} 0.5mlをセロファンチューブに入れ，PBS（pH7.2）300mlを外液として，4℃で1夜透析を行い，その透析内液を材料とした．この透析で，HA 価は半減したが，増強活性はなお残存し，透析し尽されなかった．

5．抗血清による中和の影響

Table 3で，中和は増強活性に無影響なことが明らかにされたが，増強活性の異なるPV_{2d} を用い，Table 3とやゝ異なる方法での再確認のため行った．中和法は Table 3に示した方法と同一である．この結果，中和後 HA 価はなくなったが，増強活性は前と同じく充分残存していた．

6．PV 粒子のモルモット赤血球吸着除去後およびそれより遊出した PV による増強活性．

この問題も一部Fig. 6で行ったが，中和と同じく，異なる活性を示す PV サンプルでの確認のため再び行った．PV_{2d} 0.5mlに新鮮モルモット赤血球を充分（10%）に加え，4℃1夜放置後の遠心上清を PV 除去サンプルとした．かゝる吸収の結果，PV の HA 価は半減したが，増強活性に大きな変化はなかった．この PV 吸着モルモット赤血球を冷 Hanks 液で2回洗滌後，1/10量の Eagle MEM を加え，37℃で4時間 PV 遊出を行い，その遠心上清を遊出 PV とした．このサンプルの HA 価は，4 HAU と低かったが，その増強活性は全く見出されなかった．この吸着または遊出サンプルには，予想した程の PV の吸着乃至遊出が伴わなかったが，活性因子はむしろモルモット赤血球には吸着せず，従って遊出 PV サンプル中にも含まれてこないことを示す結果と解釈された．

7．超遠心の影響

これまでの幾つかの結果のうち，特に PV の HA 価と増強活性が比例しないこと（PV_{2d} と PV_{10d} の例）や中和試験の成績などから，増強活性因子は，PV 粒子そのものではなく，むしろそれ以外のものである可能性は益々強くなってきた．そこで，PV_{2d} サンプル中の PV 粒子を完全に除く目的で，105,000g 2時間の超遠心操作を行い，その上清（Sup）について増強活性をみた．結果は，Table 5に示した．

この超遠心で，PV_{2d} のHA価は全く消失し，PV粒子をほゞ完全に除くことができた．この対照には，CM of ME_{2d} の同様の超遠心上清を用い，それぞれ超遠心前後の対応サンプル間で比較した．3回の実験

ともほゞ同じ結果であったが，代表例を Table 5 に示した．有意の NWS 増殖増強活性は，観察データの何れにおいても，常に PV_{2d} Sup に認められ，かつ超遠心前より更に若干上昇した（PFU 価の増強比率が74から80，8.9から10.7と，遠心後の Sup で僅かではあるが常に高くなった）．このような現象は，対照に用いた CM of ME_{2d} の Sup には全く認められなかった．これらの結果からも，活性因子の本体は，PV粒子自身よりも，PV感染マウス胎児細胞が産生する by-product であることが更に明白となった．

8．トリプシン処理による影響

各種PVサンプルの（10^{-1}）稀釈0.2mlに trypsin（2× crystalline，Sigma）200μg/ml，0.2ml を加え，37°C 1時間放置後，更に trypsin inhibitor (Soybean, Sigma) 150μg/ml，0.3 ml を加えて反応を止め，この mixture 0.7mlを維持培養液2 ml中に含むように添加して用いた．この条件で PV サンプルの最終濃度は（10^{-2}）であり，またトリプシンの作用は充分抑制されている．対照には，PVサンプルに対応する CM of ME_{2d} を同様にトリプシン処理した．これらトリプシン処理前後の各サンプルの添加存在下で，3日培養の液中に産生される NWS のHA価および感染価（PFU）を比較したのが，Table 6 である．

トリプシン処理により，PV_{2d}，PV_{2d}Supの増強活性は，処理前の1/10以下に減少（92～96%の減少）したのに，CM of ME_{2d} およびそのSup，更にもともと増強活性の弱いPV_{10d}での減少は，10～30%に止まり，有意とは思えなかった．また4°Cの保存で長く活性のみられたPV-67(1967年作製）も，PV_{2d}などと同じく95%の減少を示した．なお，処理に用いた trypsin, trypsin inhibitor 自身の存在による影響は，表のごとく有意な変化を与えなかった．これらより，活性因子の本態は，ウイルス粒子以外のトリプシン感受性の蛋白であると考えられた．

考　　察

Polyoma virus (PV)の存在もしくは処理で，Influenza virus：NWS 株の増殖が促進増強されることは，既に前報[1)2)]でも明らかであったが，こゝでは特にその機作と活性因子の本態についての解明を試みた．この増殖促進の第1前提として，PVにより細胞への NWS の吸着が増強されるのかどうかについては，既に未吸着 NWS の HAD_{50} assay などから否定された[2)]が，更に plaque assay 法，感染細胞数を示す HAD %法などにより，より正確に再確認できた．

かくて，吸着段階に差がないとすると，その後の増殖過程ではどうであろうか．そこで，次に観察された接種後の感染細胞数を示す HAD %の時間的推移をみると，moi＝1.0の完全な1段増殖 (one-step or single cycle growth) における PV存在の有無は，特に NWS 増殖に有意の影響を与えなかった．ところが moi を下げて2段階 (two-step or cycles) 以上の増殖条件にすると，PV存在下の NWS 増殖過程は，明らかに約24時間程短縮されてきた．これは，PV非存在の時通常みられる2段階目の増殖へのlag（潜伏期)が，PV存在下では消失し，それが PVによる NWS 増殖促進増強につながっていることは疑う余地がない．とすると，PVによるこのlag解消の機作の本態は何であろうか．細胞内増殖 NWS の細胞外放出が PV 存在で促進され，低 moi 接種時の2段増殖に必要な再感染成立が早くなるという機作も，Fig. 2 に論じたごとく考え難い．たゞ，この放出に関しては，時間的促進は否定できても，放出量 (burst size) が PV で増大させられる可能性は，これまでの実験結果からは全く否定できない．しかし，moi＝1.0の1段増殖での液中産生 NWS の HA 価を比較すると，特に著差は見出せず，これも余り積極的な機作とは考え難かった．

次に考えられるのは，上述の lag が何故低 moi の時現われるのか，またそれへの PV 効果の本態は何なのかという問題である．これに関しては，moi＝0.1以下の NWS 感染において，その増殖の第1段階で不活化乃至不完全粒子が比較的多く出現し，これらによる自家干渉の結果が第2段階以降の増殖遅延 (lag)であり，これがPV存在で解消されるという解釈も成立つ．既に前報[2)]で，UV 完全不活化 NWS による細胞性自家干渉の成立，PVによるその回復，更にその間に interferon 産生は関与しないことなどが明らかにされた．そこで，この前報の結果もふまえて，今回は不活化 NWS が種々に含まれるサンプル，即ち半不活化 NWS を UV 照射で人工的に作り，低 moi NWS 接種後の第2段階増殖と同じような実験系での PV 効果を検討した．その結果は，上述のUV非照射時の NWS 増殖過程にみられたのと全く同一で，高 moi の時より低 moi 接種時に，より強い PV 効果（NWS 増殖促進増強）が見出された．このことは，活性，半不活化を問わず，NWS 粒子数が細胞数に比し著しく少い低 moi の場合，即ち全細胞の感染が成立するには数 step の増殖を必要とするような場合，更に換言すれば，自家干渉がより起り易いよ

うな場合のPV効果が，より著明であることを示している．同時に，UV照射が進み，不活化程度が大きい程，即ち，自家干渉が起り易い時程，PV効果が顕著に現われたことを併せ考えると，かゝる自家干渉の回復乃至減少が，前述の lag 短縮の本態であろうと考えられる．それが，何故，如何にして生ずるかを明らかにするには，次の別の追求が必要と思われ，将来に残された問題である．

ひるがえって，PVのかゝる効果を示す活性因子の本態を中心に，PV側より本現象を眺めてみると，こゝにも様々の問題がある．例えば，PVサンプルの至適濃度についてみると，(10^{-2}) 稀釈添加で最も高い増強効果を示した．この場合 (10^{-1}) 添加での効果が低いのは，PV (10^{-1}) サンプル中に含まれるコウシ血清(0.2%)がもつ NWS 増殖抑制効果が，より強く現われた結果，PVの効果が相殺されたことによると思われた．また，この NWS 増殖増強活性は，PVの4B5-6株以外に SE 株にも認められたが，PVと同じ条件で増殖させた Cow pox virus (CPV) には全くみられず，また PV 増殖母体となったマウス胎児初代培養 (ME) 細胞自身の培養液 (CM of ME) にも陰性であった．しかも，このような PV サンプル自身は，NWS 増殖の母体であるG2細胞の増殖維持に何の影響も与えず，G2細胞における NWS 増殖過程に特異的に働く活性を有していると考えられた．たゞ，その活性は，常に PV 感染価自身より遥かに低かった．

かくて，PVサンプル中の NWS 増殖増強をきたす活性因子が，PV粒子自身か否かが問題になり，我々もその追求に努めた．その結果，抗 PV 血清による中和，UV による PV 粒子の完全不活化，超遠心によるPV粒子の完全除去やモルモット赤血球吸着による PV粒子の一部除去などでも，上述の PV 活性は何ら消失せず，更に，PV粒子自身（活性，不活性を問わず）と考えられるHA活性[9)10)]の低い PV 感染初期のサンプルの方が，むしろ NWS 増殖活性が高いことなどからみても，PV感染の比較的初期にME細胞が産生する PV 特異的かつ非ウイルス性の by-product であることが確認された．更にトリプシン処理効果の結果から，活性物質は蛋白であることも明らかにされた．

このように，あるウイルスが感染することにより，細胞が産生する非ウイルス性のウイルス増殖促進因子としては，既に幾つかが知られている．即ち，加藤ら[11)12)]と岡田[13)]の "enhancer", Isaacs ら[14)] の "blocker", 太田[15)16)] の "Interferon depressor" (ID), Chany ら[17)18)] の "stimulon" などがそうで，他にも "Interferon antagonist"[19)~21)] (IA) とか，"Tissue antagonist of interferon"[20)22)] (TAI) が報告されている (Table 7)．

これらウイルス増殖を促進する非ウイルス性の物質は，その作用機作からおよそ2つに大別できる．1つは enhancer, blocker, ID などで，共に interferon (IF) の産生を抑制する作用[14)16)23)]をもっている．これらは，何れもウイルス感染後，IF産生に先立って産生されるが，一面 IF 活性も有し，その IF 産生阻止能をみるためには，IF 産生能の高いウイルスによるIF産生が，これらサンプルを加えることにより，どの程度減弱されるかをみる間接的な方法に頼っている．今一つは，stimulon, IA, TAI などで，これらの物質は IF の産生を抑制しないが，IFの作用と拮抗するという．[19)~21)24)25)] (IFを直接中和するのではなく，作用点も異なる．) 従って，これらによるウイルス増殖促進は，stimulon の例のごとく，IF産生の少ないウイルス-細胞の系ではその効果は著明であるが，IF産生の高い系では効果が相殺されるため，その効果を見出すのは容易ではない．本報告に述べた PV の NWS 増殖増強活性の本体は，不活化または半不活化 NWS による細胞性自家干渉回復に常に作用すること，また，PVおよび NWS と G2 細胞の系は，IF産生がないか，もしくは極めて低いと考えられる系であることなどから，おそらくは，第2のグループに入れられると思われる．しかしながらこの点に関しては，今後高力価の IF を用い，実際に拮抗作用があるかどうかを確認する必要があろう．

これらウイルスの増殖増強活性を有する幾つかの物質の性状を，まとめて Table 7 に示した．これらの物質の共通性状としては，超遠心でも沈降しない non-viral factor であること，非透析性で，pH2.0で安定，そして核酸分解酵素では失活しない点などがあげられるが，これらは同時に IF にも共通した性状[26)~28)]でもある．たゞ，熱抵抗性，抗ウイルス血清や蛋白分解酵素に対する態度は，個々により若干異なっている．blocker, enhancer, ID, および TAI は，熱に安定で，抗血清で中和されず，トリプシン処理にも抵抗性を示す．しかし stimulon は，熱に弱く，抗血清で中和され，トリプシン処理で失活するなど，やゝ異なった性状をもっている．また IA はトリプシン処理で若干失活し，IFがトリプシン半感受性（ペプシンには高感受性）であるのと比べると，IA は blocker などと IF の中間的性質を有している．これら諸性状を比較検討すると，我々の PV サンプル

Table 7. Properties of non-viral factors that enhance virus growth

Factors	Production (cells infected with)	Test system	Inactivation by			Inhibition of	
			heat (56℃, 30min)	neutralization with anti-virus serum	trypsin treatment	IF production	IF action
Blocker (Isaacs, et al., '66)	d. c. e.; IV(B), NDV, FPV.	ChV in CEF	−	−	−	+	−
Enhancer (Kato, et al., '65)	d. c. e.; PIV-1, IV(A)	IV(A), PIV-1 in CAM	−	−	−	+	−
Interferon Depressor (ID) (Ohta, '67)	d. c. e.; PIV-1, NDV	NDV uv in CEF	−	−	−	+	−
Tissue Antagonist of Interferon (TAI) (Fournier, et al., '68)	normal human amnittic or chorionic membrane	VSV in L	−	/	−	−	+
Interferon Antagonist (IA) (Truden, et al., '67)	L; NDV	Mengo V in EAT	−	/	+	−	+
Stimulon (Chany, et al., '65)	HEK; Ad12	Kilham rat virus in REK	+	+	+	−	+
NWS enhancing factor by PV	ME; PV	IV(NWS) in G2	−	−	+	− ?	+ ?
Interferon (IF) (Isaacs, et al., '57)	CAM; inactivated IV(A)		−	−	+ partially		

IV(A) or (B) : Influenza virus A or B type ; PIV-1 : Parainfluenza virus type 1 ; NDV : Newcastle Disease Virus ; FPV : Fowl Plague Virus ; ChV : Chikungunya Virus ; VSV : Vesicular Stomatitis Virus ; Ad-12 : Adenovirus type 12 ; PV : Polyoma Virus.
d.c.e. : developing chick embryos ; CEF : Chick Embryo Fibroblast ; CAM : Chorioallantoic membrane ; L : L cells ; EAT : Ehrlich Ascites tumor cells ; HEK : Human Embryonal Kidney cells ; REK : Rat Embryonal Kidney cells; ME : Mouse Embryonal cells ; G2 : G2 cells

中の活性因子は，IA 乃至 IF に類似した性状といえよう(Table 7)．Truden ら[19]の報告によれば，NDV を L 細胞に感染させて得た粗 IF サンプルの中には，トリプシンで不活化され，核酸分解酵素では分解されない IA が混在してるという．また Paulin ら[29]は，PV 感染マウス胎児細胞にウイルス蛋白以外の新蛋白が合成されることを免疫学的な方法で確認している．これらの事実は，我々がこゝに示したような活性因子が存在し得る可能性を強く示唆しているものといえる．

これらの活性物質をトリプシン感受性で分けると，抵抗性のグループには，blocker，enhancer，ID，TAI などが，感受性のグループには，stimulon，IA，そして我々のPVサンプル中の活性因子などが入る．前者は，各々その性状が極めて類似しており，かつ IF 産生を抑制することからみると，TAI のように，本来正常な細胞にあるものなのではなかろうか．これに対して，後者は，stimulon の特殊性（抗ウイルス血清で中和され，熱に不安定）を除けば，IA に似ている．この性状はまた作用が相反する IF の性状でもあり，これらの物質はウイルス感染によって始めて細胞が産生する物質ではなかろうか．

今日までウイルス感染によって起きるのではないかと考えられてはいるが，その病因ウイルスの分離されていない例は数多い．これらの場合のウイルス分離には，多くの有効と思われる方法が駆使されているが，上述のごときウイルス増殖促進物質を用いるのも一つのアプローチであろう．また Chany らは，マウスやヒトの肉腫組織の中には，IA活性を有する物質が産生されていると報告している[20)30)]が，これは腫瘍の進行にこれら物質が関与していることを示唆し，かゝるIA物質の単離，作用機作の解明も，将来甚だ興味深いものといえよう．

総　　括

Polyoma virus (PV) サンプルの存在下で，Influenza virus : NWS 株のG2細胞における増殖増強の機作について検討を試み，次の結論を得た．この実験では，特に感染陽性細胞数を示す HAD %，培養液への産生 NWS のHA価および plaque assay による感染価測定が多用された．

1．PV の NWS 増殖過程に及ぼす影響．

1) NWS のG2細胞への吸着には何ら影響がない．

2) 高 moi NWS の1段増殖では，PVの影響はない．低 moi で，2段以上の増殖をさせると，PV添加のない時は，第2段階の増殖開始までに，著明な増殖の lag がみられた．この lag は，PV存在で消失し，増殖過程が24間前後短縮されて，結果的には増殖促進となって現われた．

3) UV半不活化 NWS の増殖において，PVの促進増強効果（自家干渉回復効果）は，2）とよく似て，NWS の moi が小さい場合，更に顕著であった．moi が高い場合には，自家干渉が強すぎて，PVによるその回復は弱かった．

2．PVサンプル中の NWS 増殖増強を示す活性因子について．

1) 増強活性は，PVの4B5-6株のほか SE 株でもみられたが，Cow pox virus などにはみられず，PV特異的と思われた．

2) PV感染後2日目の HA 価の低い PV サンプル（PV_{2d}）の方が，HA価のはるかに高い10日目のサンプル（PV_{10d}）より増強活性が強く，対照の非感染マウス胎児細胞の培養液は，かゝる活性を示さなかった．

3) このPVサンプルは，NWS の増殖母体細胞であるG2細胞の増殖や維持に，何ら影響しなかった．

4) 増強活性因子は，105,000g，2時間超遠心の上清に存在し，熱に比較的安定（56°C30分で不活化されず，100°C10分で不活化）で，非透析性，UV や pH2 にも安定，抗PV血清で中和されず，トリプシンにより失活する性状を有していた．これらの性状から，活性物質はPV感染マウス胎児細胞で産生される非ウイルス性のある種のトリプシン感受性の蛋白と結論された．

この稿を終るにあたり，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ると共に，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**，267 (1967).

2) **木村晋亮** : 十全医会誌．**84**，103(1975).

3) **Jawetz, E., Melnick, J. L. & Adelberg, E. A.** : Review of Medical Microbiology, p. 301, Tokyo, Maruzen Asian Edition, 1972.

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

5) **井上幸重，奥村秀夫** : 組織培養－基礎と応用－（中井準之助ら編）p.77，東京，朝倉書店，1964.

6) **須藤恒久** : ウイルスと疾患（甲野礼作・石田名香雄編）p.132，東京，朝倉書店，1969.

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

8) **Hallauer, C. & Konauer, G.** : Arch. Ges. Virusforsch., **15**, 433 (1965).

9) **Eddy, B. E. & Stewart, S. E.** : Can. Cancer Conf., **3**, 287 (1959).

10) **Crawford, L. V.** : Virology, **18**, 177 (1962).

11) **Kato, N., Okada, A. & Ohta, F.** : Virology, **26**, 630 (1965).

12) **Kato, N., Okada, A. & Ohta, F.** : Arch. Ges. Virusforsch., **17**, 631 (1965).

13) **岡田章子** : ウイルス，**15**，55 (1965).

14) **Isaacs, A., Rotem, Z. & Fantes, K. H.** : Virology, **29**, 248 (1966).

15) **太田不二人** : ウイルス，**17**，90 (1967).

16) **太田不二人** : ウイルス，**17**，96 (1967).

17) **Brailovsky, C. & Chany, C.** : Compt. Rend. Acad. Sci., **260**, 2634 (1965).

18) **Chany, C. & Brailovsky, C.** : Compt. Rend.

Acad. Sci., **261**, 4282 (1965).
19) **Truden, J. L., Sigel, M. M. & Dietrich, L. S.** : Virology, **33**, 95 (1967).
20) **Chany, C., Lemaitre, J., Galliot, B., Renard, N., Moreau, M. C., Rousset, S. & Fournier, F.** : Perspectives in Virology, **8**, 111 (1971).
21) **Galliot, B., Moreau, M. C., Renard, N. & Chany, C.** : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **142**, 266 (1973).
22) **Fournier, F., Rousset, S. & Chany, C.** : Compt. Rend. Acad. Sci., **266**, 2306 (1968).
23) **Kato, N., Eggers, H. J., Ohta, F. & Kobayashi, T.** : J. Gen. Virol., **5**, 195 (1969).
24) **Chany, C. & Brailovsky, C.** : Proc. Nat. Acad. Sci., **57**, 87 (1967).
25) **Chany, C. & Brailovsky, C.** : Perspectives in Virology, **5**, 107 (1967).
26) **Lindenmann, J., Burke, D. C. & Isaacs, A.** : Brit. J. Exptl. Pathol., **38**, 551 (1957).
27) **Burke, D. C. & Isaacs, A.** : Brit. J. Exptl. Pathol., **39**, 78 (1958).
28) **Isaacs, A. & Burke, D. C.** : Nature, **182**, **182**, 1073 (1958).
29) **Paulin, D., Perreau, J. & Cuzin, F.** : J. Virol., **13**, 699 (1974).
30) **Chany, C. & Robbe-Maridor, F.** : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **131**, 30 (1969).

Abstract

The multiplication of Influenza virus (NWS strain) in cultured cell lines, G2 cells(derived from the human giant cell tumor of bone), was clearly enhanced, when cells were pretreated with polyoma virus (PV, 4B5-6 strain) or cultured in the presence of PV as shown in our previous reports. Since the NWS adsorption on G2 cells was not affected by PV, a kinetical assay of the NWS multiplication in G2 cells was carried out in the presence of PV. It revealed that the low m.o.i. (multiplicity of infection) of NWS without PV reproducibly bring about a remarkable lag of virus multiplication until the initiation of its second cycle growth. This delay of growth was completely recovered by PV as shown in the fact that cell HAD % or HAU yield increased linearly. An appearance of this growth delay might possibly be due to a cellular autointerference caused by incomplete or inactive virus particles which seemed to occur in the first growth cycle of NWS with low m.o.i.. PV might rescue this cellular autointerference and result in the enhanced multiplication of NWS. In order to ascertain these concepts, experiments using various m.o.i.(s) of the partially inactive NWS irradiated by ultraviolet were done in the presence of PV. They showed more demonstrable rescues by PV than those observed in the low m.o.i. of active NWS.

The activity of PV samples did not affect the growth or the maintenance of G2 cells. However, it was PV specific, because no activities were observed in Cowpox virus samples or culture media of mouse embryonal(ME) cells prepared similarly as PV samples. PV samples harvested at 2 days after PV infection showed stronger activity than that of 10 days' samples, while HAU was lower in the former. Supernatant of PV samples ultracentrifuged, in which PV particles seemed to be free, still showed a strong activity, in spite of its negative HAU. Its activity remained unchanged after neutralization with anti-PV serum. This active factors were resistant to heating (56°C, 30m.) or treatment at pH 2.0 and not dialyzable, but inactivated by trypsin treatment. From these results, it was concluded that active factors were non-viral substances sensitive to trypsin, which were produced in the PV-infected ME cells and able to act on the G2 cells infected with NWS.