

Title	Mousepox Virusの増殖に及ぼす細胞代謝阻害剤5, 6-dichloro-1- β -D ribofuranosyl benzimidazole及びproflavine) の影響に関する研究
Author(s)	池上, 信子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/28199
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	池 上 信 子 いけ かみ のぶ て
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 0 2 号
学位授与の日付	昭 和 35 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 病 理 系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	Mousepox Virus の増殖に及ぼす細胞代謝阻害剤 5,6-dichloro-1-β-D ribofuranosyl benzimidazole 及び proflavine) の影響に関する研究 (主 査) (副 査)
論文審査委員	教 授 釜 洞 醇 太 郎 教 授 天 野 恒 久 教 授 奥 野 良 臣

論 文 内 容 の 要 旨

研究目的

DNA をもった pox group virus の一つである mousepox virus (ectromelia virus)が細胞内で増殖する場合 host cell に与える影響の一つとして、感染細胞の細胞分裂を抑制する現象を以前に発表した。更に感染細胞内の virus 増殖と host cell metabolism の相互関係を知る目的の一方法として host cell の代謝阻害剤を用いて、virus 増殖に及ぼす影響を生物学的な立場から解析を行った。

方 法

組織培養法により、L 細胞 -ectromelia virus の system で二つの代謝阻害剤を用いた。

5, 6-dichloro-1-β- D-ribofura nosyl benzimidazole (DRB) は、RNA 合成の阻害剤といわれ、proflavine は cytoplasma の protein 合成に対し抑制作用をもつと言われている。

両阻害剤の細胞増殖に及ぼす影響を基準として、細胞増殖を抑制しない濃度 DRB 20r/ml Profleavine (0.5r/ml) 細胞増殖を抑制する濃度)DRB 40r/mlproflavine 2.5r/ml) を用いて virus 増殖に及ぼす効果を見た。

1 test-tube あたり 2.5×10^5 /ml の L 細胞を分散し、48時間後に 10^7 PFU (plaque forming unit) の virus (mouse 感染肝乳剤遠沈上清) を感染させ、2 時間吸着後、細胞を三回洗滌して余剰 virus を除去。virus の one step growth の期間内に属する感染後16時間で、virus 増殖度を、補体結合抗原価(CFA) 封入体出現率、plaque count による virus 感染価等の測定で判定した。

阻害剤の投与時期により、四つの実験群に分けた。

実験 (1) virus 感染24時間前に阻害剤投与、virus 感染後16時間まで作用さす。

実験 (2) virus 感染24時間前のみ投与、感染時以後阻害剤除去。

実験 (3) virus 吸着期 2 時間のみ投与。

実験 (3) virus 感染後 4 時間より阻害剤投与。

結 果

(1) DRBによる virus 増殖抑制効果について。

20r/ml 及び 40r/ml DRB は、実験 3 で CFA 価、封入体出現率、感染価を抑制しなかった。

この事は、virus 粒子自体に或いは virus が細胞に吸着侵入する過程で、DRB の阻害作用のない事を示している。

a) 細胞増殖を抑制しない濃度 (20r/ml) での virus 増殖に及ぼす効果。

virus 感染に先立ち、細胞を 24 時間前処置した実験 (1) 及び (2) において、CFA 価及び、封入体出現率は $\frac{1}{2} \sim \frac{1}{3}$ に、感染価は約 $\frac{1}{10}$ に減少して virus 増殖は抑制された。次に progeny virus の再合成の始まっている時期である感染 4 時間後より投与した 20r/ml DRB は、virus 増殖を抑制しなかったこの結果より、未感染細胞の増加を許す 20r/ml DRB で、host cell を前処置した時、細胞増殖に影響を与えない程度の細胞の RNA 合成の阻害が、RNA をもった virus の再合成を抑制しており、しかも progeny virus 形式の素材と考えられている CFA 生成以前の所を抑制しているものと思われる。そして細胞の RNA 代謝が DNA をもった動物 virus の合成にも極めて密接な関係がある事を推定させる。

b) 細胞増殖を抑制する濃度 (40r/ml) での virus 増殖に及ぼす効果。

実験 (1) 及び (2) における virus 抑制効果をみると CFA、封入体出現率、感染価の減少度が 20r/ml の場合より更に増加された。更に実験 (4) で、感染後に投与しても CFA 価、封入体出現率は $\frac{1}{2}$ に、感染価は約 $\frac{1}{10}$ に減少し、virus 増殖は抑制された。

細胞増殖を抑制する DRB 濃度では、Progeny virus の素材形成期の代謝をも阻害していると思われる。

(2) proflavine による増殖抑制効果について。

実験 (3) で proflavine 0.5r/ml 2.5r/ml が virus 粒子或いはその細胞への吸着侵入を阻害しない事を確めた。

a) 細胞増殖を抑制しない濃度 (0.5/ml) での virus 増殖に及ぼす影響 proflavine はこの濃度においては、投与時期に関係なく CFA 価、封入体出現率を殆んど抑制しなかった。併し感染価の抑制が特長的で前処置のみで $\frac{1}{3}$ に、感染後投与で約 $\frac{1}{10}$ proflavine の作用時間の長い実験 (1) では $\frac{1}{8}$ に減少した。

b) 細胞増殖を抑制する濃度 (2.5r/ml) での virus 増殖に及ぼす効果。

感染価の抑制のみが特異的に強まっているのが特長的であった。併し実験 (1) の場合には、CFA 価、封入体出現率は $\frac{1}{2} \sim \frac{1}{3}$ に減少した。この濃度の proflavine 存在下で生じた封入体の形態学的観察で、封入体は初期の小さな Compact B 型封入体にとどまり、diffuse type への発展が抑制されているが、DNA を含み、蛍光抗体法で特異的に染色され、virus 増殖の場である性格を持っていた。proflavine 除去によりこの封入体は diffuse type に発展し、それと平行して感染価の上昇を認めた。

以上の結果より、proflavine は、progeny virus の素材が形成された以後の所で virus 感染粒子への発展過程において、特異的に、可成直接的、且可逆的に virus 増殖を抑制している事が推定出来る。

結 論

組織培養法で virus の one step growth における細胞内増殖機構と host cell の代謝との相互関係の一端を解析し、DNA type の virus 合成が、host cell の RNA 代謝と極めて密接な関係にある事を明らかにした。

更に virus 増殖度の測定を CFA 価、封入体出現率 plaque count の三者併用で行う事により、二つの代謝阻害剤が細胞内 virus の合成過程で、異った態度で抑制作用を及ぼす事を知った。

論文の審査結果の要旨

virus の増殖機構を研究するにあたって、virus 増殖とその host cell metabolism との相互関係を分析する事は、一つには、virus 性疾患の chemotherapy に関する基礎的研究としての意義を有し、他面、生化学的には、核酸生成の機序を研究する一つの system を提供するものであり、更に virus 性腫瘍の研究が大きく取上げられて来ている今日、発癌、制癌の問題を解明してゆく道にも通じる等、多くの重要な、かつ興味ある命題を含んでいる。

著者が研究に用いた mousepox virus (ectromelia virus) は、他の多くの pox virus と同様に、感染初期より細胞質に封入体を形成する。この封入体は、virus reproduction に必要な素材として合成された DNA 及び specific virus antigen 等を pool した場所であり、その形態的変化が virus 増殖の進展と並行している事は既に明らかにされている。一方、感染をうけた host cell は、virus 増殖によってその mitosis は抑制され、最後には崩壊するに至る。

この様な virus-host relationship を更に host cell metabolism との関連性から解析をすすめる事を試みた。その目的の一手段として、本研究において、host cell の代謝阻害剤を用いて、virus の one step growth に与える影響を分析し、更に阻害剤投与の時間的關係から、virus 増殖の過程で、阻害剤が抑制的に作用する stage を分析した。

実験は組織培養の system で行い、L 細胞を host cell とした。mousepox virus 感染、16時間において、封入体出現率、補体結合抗元価、plaque count 法による感染価測定等によって、virus 増殖度を測定し、対照群と比較して virus 増殖過程に及ぼす阻害剤の inhibitory activity を判定した。用いた阻害剤は、RNA 代謝阻害剤である 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosyl benzimidazole (DRB) と、protein 代謝阻害剤の proflavine である。尚核酸分解酵素として、ribonuclease も用いた。

両阻害剤及び酵素の細胞に対する toxicity は細胞数増加に及ぼす影響によって判定した。

その結果は次の様である。

1) DRB は、細胞増殖を抑制しない 20r/ml の濃度で、virus 感染前24時間投与によってのみ、測定された3つの virus component は共に並行して抑制された。然し DRB 存在下で出現した封入体の発展過程は抑制されなかった。

40r/ml の濃度では細胞増殖を抑制する toxicity を示すが、virus 増殖に対して、感染前投与の抑制作用に加えて、感染後投与によっても、virus 増殖を抑制した。又封入体の発展過程に対しても多少抑制効果を及ぼしている。

2) ribonuclease 1mg/ml 及び 2mg/ml は細胞増殖を抑制しない。virus 増殖に対する作用は、20r/ml

の DRB の場合と殆んど同じであった。

これらの結果より。DNA typeのvirus の素材形成は、host cell の RNA 代謝阻害によって抑制されているものと考えられ、host cell の RNA 代謝の activity は、virus 増殖に重要な役割を果している事を明らかにした。

3) proflavine の virus 増殖に及ぼす抑制作用は、DRB と異っている。

細胞増殖を抑制しない 0.5r/ml の濃度では、proflavine の投与時期に関係なく、感染価の抑制のみがみられ、補体結合抗原、及び封入体の形成等は抑制されなかった。併し、出現した封入体の発現過程は多少抑制された。

2.5r/ml の濃度では、細胞増殖を抑制する。virus 増殖に対しては、感染前投与した場合に、感染価に対する抑制が特に顕著であり、出現した封入体もその発現過程が著明に抑制されて、殆どが感染初期にあらわれる形態のものであった。この様な抑制作用は、proflavine 除去によつて、可逆的に解除されて virus 増殖は進行した。

この結果は、proflavine による細胞代謝障害は、virus 増殖に対して、virus の素材形成に及ぼす抑制作用でなく、形成された素材から mature virus に進展する過程で抑制的に作用しているものと考えられる。

以上の研究に使用した阻害剤及び酵素の濃度は何れも virus 粒子自体を不活化する作用は有していない。

以上の如く、specific な2つの細胞代謝阻害剤を使用して、virus 合成の過程を host cell metabolism との関連性において解析した本研究は、virus 増殖機構の解明という点から、又 virus chemotherapy の研究を進めてゆく上において、unique な一つの方法を提供した意味でも、他方核酸研究の面からも、極めて興味ある研究であり、学会等においても高く評価されているものである。