



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	大阪大学, 1960, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28199
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	池上信子
学位の種類	医学博士
学位記番号	第102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) 教授 釜洞醇太郎 教授 天野 恒久 教授 奥野 良臣
論文審査委員	

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が、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-ribofuranosyl 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 20 μ g/ml Proflavine 0.5 μ g/ml (細胞増殖を抑制する濃度) DRB 40 μ g/ml proflavine 2.5 μ g/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 10⁷PFU (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、補体結合抗元価(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時間まで作用ます。

実験 (2) virus 感染24時間前ののみ投与、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 値、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 値及び、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 値、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 値、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 $\frac{1}{6}$ 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 値、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、螢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 値, 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, 核酸生合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関係から, 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, 補体結合抗元値, plaque count 法による態染値測定等によって, 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 20 μ /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。

40 μ /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, 20 μ /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 $0.5r/m1$ の濃度では, proflavine の投与時期に關係なく, 感染価の抑制のみがみられ, 補体結合抗元, 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展過程は多少抑制された。

$2.5r/m1$ 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展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。