

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 培養細胞におけるC反応性たん白質（CRP）の産生機構と風疹ウイルスのCRP誘導能に関する研究                                      |
| Author(s)    | 吉田, 秀夫  |
| Citation     | 大阪大学, 1979, 博士論文  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/32323">https://hdl.handle.net/11094/32323</a> |
| rights       |   |
| Note         |   |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

1

培養細胞における C 反応性たん白質  
(CRP) の産生機構と、風疹ウイルスの  
CRP 誘導能に関する研究

吉田秀夫

(昭和 年 月 日受付)

緒言

C 反応性たん白質 (CRP) は、1930 年に  
Tillet と Francis により、A 群化膿連鎖状球菌  
あるいは黄色ブドウ球菌に感染した患者の血  
清中に出現し、肺炎双球菌の C 多糖体と沈降  
反応を呈する異常たん白質として発見、記載  
された<sup>1)</sup>。

CRP が血清中に特に高頻度に出現する疾患  
としては、自己免疫疾患である慢性関節リウ

マチおよび全身性紅斑性狼瘡 (SLE) <sup>2,3)</sup>、あ  
るいは悪性腫瘍などがある <sup>4-9)</sup>。しかし CRP が  
なぜある種の疾患に高頻度に現われるのか、  
あるいは CRP 出現の起源あるいは機序につい  
ては、全くと言ってよい程明らかでない。た  
だ病勢の推移と患者血清中の CRP 量の変動が  
よく一致することから、臨床上重要な検査と  
なっている <sup>10-13)</sup>。

近年、これら自己免疫疾患および悪性腫瘍  
の病因については、ウイルスが発症と関連し  
ている可能性が指摘されている。すなわち、  
慢性関節リウマチにおける風疹ウイルス <sup>14-20)</sup>  
、全身性紅斑性狼瘡での麻疹ウイルス <sup>21-23)</sup>、  
悪性腫瘍における内因性 C 型ウイルス等であ  
る <sup>24-29)</sup>。

また慢性関節リウマチ患者の滑液嚢膜組織  
には CRP が検出されており、あるいは風疹ウ  
イルスに感染したアフリカミドリザル腎由来  
の培養細胞は、その培養上清中に CRP を産生  
すると報告されている <sup>30,31)</sup>。

以下に述べる研究は、慢性関節リウマチにおける風疹ウイルスの関与について血清疫学的に解析するとともに、各種の動物株化細胞とその風疹ウイルス感染系を用いて、CRPの産生機構をin vitroでいろいろな角度から検討を加えたものである。

## 実験材料ならびに実験方法

### I 被検血清

CRP テスト陽性を示す慢性関節リウマチ患者血清としては、昭和50年9月から昭和53年9月までの3年間に、大阪大学医学部附属病院を訪れた患者から、臨床検査のために採取した血清の一部を同附属病院中央臨床検査部、新井加余子技官の好意により分与を受け、実験に供した。なおこれらの血清22検体は、いずれも、臨床所見、その他の臨床検査結果に基づいて慢性関節リウマチの確定診断がな



された患者より、同附属病院での治療開始前に得たものであり、実験に使用するまで、 $-20^{\circ}\text{C}$ にて凍結、保存された。

一方頭頸部悪性腫瘍患者の血清は、昭和51年5月から昭和53年8月までの約2年間に大阪大学歯学部附属病院第一口腔外科外来を訪れた頭頸部悪性腫瘍患者から、治療開始前に採血して分離されたものであり、そのうちからCRPを保有する血清10検体を選んで実験に供した。ちなみにこれら悪性腫瘍の病理組織学的診断は、全例、扁平上皮癌であった。また妊婦の経過を逐って採血した妊婦血清のうち、妊娠8週に風疹を発症した妊婦より、発症前から風疹の消退にいたるまでの間、経時的に採取したものを選んで実験に供した。これらの血清も、実験に用いるまで $-20^{\circ}\text{C}$ にて凍結、保存した。

なお対照としては、昭和46年9月から昭和51年9月までの5年間にわたり、主に大阪府下に居住する健康成人より採取した血清のう

ちから、先に述べた慢性関節リウマチ患者に近い年齢層由来の177検体を使用した。

## II C 反応性たん白質 (CRP) の定量法

### 1 毛細管法

被検血清と抗ヒト CRP ウサギ血清 (日本凍結乾燥研究所, 東京) とを, 長さ 90 mm, 内径 0.8 mm のガラス毛細管に各々 30 mm の長さ分を入れ, 毛細管中で混合法により反応させた。すなわち毛細管をゴム粘土に垂直に立て, 37℃で2時間, ついで4℃で18時間静置後に, 反応の有無, 程度を判定した。被検血清中の CRP 量は18時間後の判定の際に, 形成された沈降物の高さより, 次の基準に従って, 区分した。すなわち, 沈降物の認められないものは陰性, 沈降物の高さが 1 mm 以下のものは土, 1 mm 以上 2 mm 未満のものは1+, 2 mm 以上 3 mm 未満のものは2+とし, 以下同様に 5 mm 以上 6 mm 未満のものは5+とし, 6 mm 以上のものは6+とした。<sup>32)</sup>

### 2 寒天ゲル内沈降反応

Dulbecco のリン酸緩衝液<sup>33)</sup> (pH, 7.2) (以下 D-PBS と略す) に 1% の割合に溶解した寒天 (Special Agar Noble, Difco Laboratory, USA) を 26 mm × 76 mm 大のスライドグラスに流し、厚さ約 2 mm の寒天ゲル層を作った。中央に 1 mm 径の穴を 1ヶ設け、その周囲に、中心穴から 2 mm の距離を隔てて 6ヶの 1 mm 径の穴を正六角形の頂点の位置に穿った。中央の穴には被検標品の 5  $\mu$ l を、周囲の穴には生理食塩水で 2 倍階段希釈した 5  $\mu$ l ずつの抗ヒト CRP ウサギ血清を加えた。この寒天ゲル層を温室中に入れて、4℃で、24 時間から 72 時間反応させた後、沈降線の出現の有無、仕方などを観察した。

Ⅲ リウマトイド因子のヒト IgG 吸着ラテックス結合試験 (RA) ならびに変性ウサギ IgG 感作ヒツジ赤血球凝集反応 (RAHA)

慢性関節リウマチ患者血清中のリウマトイド因子のラテックス結合反応 (RA) は、Singer<sup>34)</sup>らの方法により、ヒト IgG 吸着ポリスチレン・ラテックス浮遊液 (日本凍結乾燥研究所

) を用い、スライドグラス法により判定した。すなわち 56℃ 30 分間、加熱、非動化した被検血清をグリシン緩衝液 (pH, 8.2) で 20 倍に希釈し、この希釈血清の 50  $\mu$ l を等容量の上記ラテックス浮遊液と混和し、1 分後に凝集の有無を観察した。

慢性関節リウマチ患者血清が示す、変性ウサギ IgG 感作固定ヒツジ赤血球凝集反応 (RAHA) は以下に述べるように行なった<sup>35)</sup>。非動化した被検血清の 0.1 ml に、まず非特異的な赤血球凝集素を除去するために、ホルマリン固定ヒツジ赤血球と煮沸ウシ赤血球を含む赤血球凝集素吸収液 (富士臓器, 東京) の 1.9 ml を加え、4℃ で、30 分間反応させた。この混合液を 2,500  $\times$ g で 5 分間遠心して得た上清を 20 倍希釈血清として、次のテストに用いた。すなわちこの血清を、0.2% (w/v) 牛血清アルブミン (Flow Lab. USA) D-PBS (pH 6.6) により 2 倍階段希釈し、この希釈血清の 0.5 ml に、加熱変性ウサギ IgG を吸着させたホルマリン固

定ヒシヅ赤血球（富士臓器）を D-PBS に 0.025% (V/V) の割合に調製させたものの 0.1 ml ずつを加えて、十分に混和した。室温に 18 時間静置後、赤血球凝集の有無を観察した。被検血清の RAHA 力価は、明確な凝集反応を示す、血清の最高希釈倍数により示した。

#### IV 細胞ならびに培養法

ヒト無色素性黒色腫由来の株化細胞である MEC 細胞（大阪大学医学部皮膚科，谷垣武彦博士より分与された）ならびにアフリカミドリザル腎由来の株化細胞である vero 細胞<sup>36)</sup> は、いずれも、5% 仔牛血清（阪大微生物病研究会，大阪）と 2 mM<sup>L-</sup> グルタミンを添加した Eagle の最小必須培地<sup>37)</sup>（MEM，日水製薬，東京）を用いて、5% CO<sub>2</sub> 空气中で、37℃ で培養された。仔シリアンハムスター腎由来の株化細胞である BHK21/WI-2 細胞<sup>38)</sup>，ならびに寒天増殖培地中で形成された BHK21/WI-2 細胞のコロニーをパスツール・ピペットで分離することにより得たクローンで、風疹ウイルスのブラック

形成に好適な BSR 細胞<sup>39)</sup>の両者は、MEM に 5% 仔牛血清、2mM L-グルタミンおよび 10% トリプトースホスヘイトブロス (Difco Lab.) を加えた増殖培養液を用い、5% CO<sub>2</sub> 培養器中、37°C で培養した。

継代はこれらの単層培養細胞を Ca<sup>++</sup>、Mg<sup>++</sup> を含まないリン酸緩衝液 (pH, 7.2) にトリプシンおよびエチレンジアミン四酢酸をそれぞれ 0.05% および 1.6% の最終濃度に加えた溶液 (EDTA-Trypsin) によって室温で 3 分間処理し、細胞を採取した。ついで浮遊細胞を MEM で 2 回洗浄後、増殖培養液で細胞数が  $20 \times 10^4$  /ml に浮遊し、この浮遊液を 90 mm 径のペトリ皿に 15 ml づつ入れて培養した。継代培養は 3 - 4 日間隔で行なった。

一方風疹に罹患した妊婦から人工妊娠中絶手術時に得た胎生 10 週の胎児の初代培養は、以下に述べる方法で行なった。すなわち無菌的に取り出した胎児組織の一部を MEM により洗浄後、ハサミで細切し、この細切組織片を

50 mm 径プラスチック製ペトリ皿 (Falcon Co, USA) に入れた。室温で約2時間静置し、組織片がプラスチック面に付着するのを待ち、20% 仔牛血清および2 mM L-グルタミン加 MEM 増殖培養液の5 ml を添加し、5% CO<sub>2</sub> 培養器中、37℃ で培養した。培養2週間後、組織片の周辺より増殖してきた細胞がペトリ皿面に密な単層培養細胞層を形成した。この初代単層培養細胞も、上に述べたのと同様、EDTA-Trypsin 溶液で処理して、浮遊細胞を採集し、継代培養を行なった。細胞の継代は4-5日間隔で行い、実験には継代数3-5代のものを用いた。

なお口蓋形成手術時に得た口蓋組織は、ヒト胎児組織の初代培養と同様な方法により、培養した。

## V ウイルス

風疹ウイルス M-33 株<sup>40)</sup> (大阪大学微生物病研究所、峰川好一博士より分与された) ならびに風疹ウイルスと BHK21-WI-2 細胞の内因性

Retro ウィルスとの合の子である風疹ウィルス変種株 HPV-RV<sup>41)</sup> を使用した。すなわちこれらウィルスを感染多重度 (MOI) 1 で感染した BHK21/WI-2 単層培養細胞を 5% CO<sub>2</sub> 培養器中, 37℃ で培養し, 培養後 6 日目で感染単層培養細胞にウィルス感染により生じた細胞変性が単層培養細胞の 70-80% に現われた時点で, 培養上液を採集した。この上液を低速遠心して細胞残渣を除いた上清を種ウィルスとして使用した。なお種ウィルスは実験に使用するまで -70℃ に保存した。

Ⅴ. 風疹ウィルス変種株持続感染 MEC 細胞の確立

ヒト無色素性黒色腫由来の MEC 細胞を 90 mm 径のガラスペトリ皿に単層培養したものに, 風疹ウィルス変種株 HPV-RV を MOI 1 で接種した。1 時間吸着後, 増殖培養液を 15 ml 加え, この感染単層培養細胞を 5% CO<sub>2</sub> 培養器中, 37℃ で培養した。培養後約 6 日目に HPV-RV の細胞変性効果が感染単層培養細胞に出現し, さ



らに培養を続けると大部の細胞は死滅したが、培養約1ヶ月後に一部生残した細胞が再増殖して集落を形成した。この細胞集落を EDTA-Trypsin によつて処理後、継代培養を行うことにより、HPV-RV による細胞変性のほとんど出現しない風疹ウイルス変種株 HPV-RV 持続感染細胞が確立された〔以下この細胞を MEC (HPV-RV) と略す〕。ちなみに、実験には、継代数8代から20代の MEC (HPV-RV) 細胞を用いた。

## VII 風疹ウイルスならびにその変種株の感染力価測定法

風疹ウイルス野生株 M-33<sup>17-33</sup>、風疹ウイルス変種株 HPV-RV、ならびに風疹ウイルス変種株持続感染細胞 MEC (HPV-RV) より產生されているウイルス〔以下このウイルスを HPV-RVpi (MEC) と略す〕の感染力価は、BSR 単層培養細胞におけるプラック形成を指標として測定した。すなわち MEM により10倍階段希釈したウイルス液の0.1 ml を 50 mm 径ペトリ皿に形成された均一な BSR 単層培養細胞に接種し、37°C に1時間静

置した後，未吸着のウイルスを除くために感染単層培養細胞を MEM で3回洗浄した。ついで寒天を1%の割合に含む増殖培養液を重ねし，5% CO<sub>2</sub>培養器中，37℃で培養した。6日目に，感染単層培養細胞を0.33% (w/v) = ニートラールレッド D-PBS 溶液によつて染色し，感染の結果生じたプラック数を数えた。この値に基づいて，ウイルス原液の0.1 ml が形成するプラック数 (Plaque forming Unit, PFU) を算出し，ウイルス感染力価とした。

#### Ⅳ 風疹ウイルス赤血球凝集反応 (HA) ならびに同抑制反応 (HAI)

Stewart らの方法に準じて測定した<sup>42)</sup>。

HA 力価の測定：まず  $10^4$  乃至  $10^5$  PFU/0.1ml の感染力価の風疹ウイルス溶液に1/10容量の1.25% Tween 80 (石津製薬，大阪) D-PBS (pH, 6.6) 溶液を加えて0℃で5分間混和し，ウイルス粒子を破壊した。このウイルス溶液に1/2容量のイキルエーテルを加え，4℃で15分間，よく混和した後，400 × g で10分間遠心した。分

離した2層のうち、抗原も保有する下方の水層部分を採集した。残余のエチルエーテルを減圧除去した後、この水層部のHA力価をマイクロ定量法により測定した。すなわちこのようにして得たHA抗原標品を0.2%牛血清アルブミンD-PBS (pH, 6.6) により2倍階段希釈し、この希釈HA抗原液の25  $\mu$ lに等容量の0.33% (v/v) 1日令ヒヨコ赤血球浮遊D-PBS液を加えた。混合液を4℃に1時間静置して反応させた後、赤血球凝集の有無を調べた。完全凝集を示すHA抗原標品の最終反応段階での最高希釈培数をHA力価とした。

HAI力価の測定：被検血清に含まれている非特異的凝集抑制物質を除く目的で、血清100  $\mu$ lをD-PBS (pH, 7.1) により2倍に希釈した後、100  $\mu$ lづつの1M塩化マンガン溶液およびパーリン溶液 (500 単位/ml) を加え、0℃で15分間混和し、沈殿を生成させた。ついで非特異的凝集素を除くために、D-PBSにより50% (v/v) に調製した1日令ヒヨコ赤血球液の50  $\mu$ lを加え、

0℃で30分間混和した後、300 xgで10分間遠心した。上清として得られた処理血清の25 mlを前記の牛血清アルブミン D-PBS (pH, 6.6) 溶液により2倍階段希釈し、希釈液に等容量の抗原 (4単位 / 25 ml) を加えて室温に1時間静置した。ついで0.33% (v/v) 1日令ヒヨコ赤血球浮遊液の50 mlを加えて、さらに1時間静置した後、赤血球凝集のパターンを観察した。被検血清の HAI 力価はヒナ赤血球の凝集を完全に阻止する血清の最終反応における最高希釈倍数として表現された。

#### Ⅷ ウイルスのプラック形成能に対する中和反応

ウイルス液0.3 mlに、MEMにより2倍階段希釈した等容量の抗血清を加え、この混合液を37℃の温浴中で1時間反応させた。この反応混合液の0.1 mlをBSR単層培養細胞に接種し、形成されたプラック数を算定した。対照として、抗血清の代わりにMEMとウイルス液との混合液を同様に反応させたものについてプラ

ツク数を算定した。なお実験に使用したウイルス液は、対照においてペトリ皿あたり100-200のプラツクを形成するようにウイルス濃度を調製した。また抗血清は中和反応を行う前に56℃、30分間加熱して非働化した。

### Ⅴ ウイルス精製法

MEC細胞より産生されているヒトRetroウイルスは、次のようにして精製した(ちなみに、逆転写酵素を保有する内因性ウイルスは、現在一般に、Retroウイルスと分類されている)。すなわち5日間培養したMEC細胞の培養上清300mlを採取し、10,000 $\times$ gで1時間遠心して細胞残渣を除いた上清をさらに100,000 $\times$ gで2時間超遠心した。得られた沈殿を1mlの0.01Mトリス塩酸緩衝液(pH, 8.0)に懸濁し、粗ウイルス標品とした。この標品の0.5mlをcellulose nitrate ultracentrifuge tube, (Beckmann Co, USA)に入れた蔗糖密度勾配溶液〔上記トリス塩酸緩衝液で15-60%(w/w)に調製〕4ml上に重層し、56,000 $\times$ gで2時間遠心した。遠心管底を穿孔し

、流出液を16画分として分取した。これらの各画分について DNA 合成酵素活性を測定し、高い酵素活性を示す画分を精製ウイルス標品とした。なおウイルスたん白量は Lowry の方法により、定量した<sup>43)</sup>。

風疹ウイルス変種株 HPV-RV は BHK21/WI-2 細胞で増殖したウイルス標品より、ヒト Retro ウイルスの場合と同様、蔗糖密度勾配遠心法により精製した。この際分取した画分のうち、HA 力価と感染力価と両者が一致して最高値を示す画分を精製 HPV-RV 標品とした。

## VI 抗血清の調製法

風疹ウイルス変種株 HPV-RV に対する抗血清は、精製 HPV-RV 標品 1 ml ブツを1週間に1回の割合で3回、ウサギの耳静脈内に注射することにより調製した。最終注射1週間後、採血し、得られた血清を分注して実験に使用するまで、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

抗ヒト Retro ウイルスに対する抗血清は、MEC 細胞の培養上清より精製したウイルス標

品 0.5 ml ヲツを, 1 週間間隔で3回, 成熟ラットの腹腔内に注射することにより, 調製した。

## XII 間接蛍光抗体法 (FA)

培養細胞に生成した CRP は, 間接蛍光抗体法を利用し, 次のようにして検出した。すなわち 24 mm × 32 mm のカバーガラス上に, 37 °C で 2 日間培養した粗単層培養細胞を, 4 °C に冷却した D-PBS (pH, 7.1) で 3 回洗浄後, アセトンにより室温で 10 分間, 固定した。空气中に 1 時間放置してアセトンを完全に除いた後, 固定された細胞に抗ヒト CRP ウサギ IgG (Dukopatts, Copenhagen, Denmark) を, 湿室中で 37 °C, 1 時間反応させた。D-PBS により十分洗浄して未反応の抗血清を除き, ついでフルオレスセンス・イソチオシアネイト (FITC) を結合させた抗ウサギ IgG ブタ血清 (Dukopatts) を 37 °C で 1 時間反応させた。未反応抗血清を洗浄して除いた後, 90 % (V/V) グリセリンを含む 0.5 M 重炭酸緩衝液 (pH, 9.5) 中に封入した

。この標本は蛍光顕微鏡（日本光学，FL型，東京）を用い，UV励起下にて観察した。写真撮影には，Kodak high speed extachrome (ASA 160) を用いた。

風疹ウイルスあるいは風疹ウイルス変種株 HPV-RV が持続感染した細胞に発現したウイルス抗原も，上記と同様，間接蛍光抗体法により検索した。この際，抗風疹ウイルスウサギ IgG (Flow Lab., USA) あるいは抗 HPV-RV ウサギ血清ならびに FITC を結合させた抗ウサギ IgG ブタ血清を用いた。

### XIII DNA 合成酵素活性測定法

ヒト Retro ウイルス粒子の保有する逆転写酵素ならびに DNA 依存性 DNA 合成酵素の活性は，Green らの方法に準じて測定した<sup>49)</sup>。

逆転写酵素活性測定のために使用した反応混合液 (100  $\mu$ l) の組成は次のようであった：  
40 mM トリス塩酸緩衝液 (pH, 8.0) ， 5 mM デキ  
オアレートール (Sigma Chemical, USA) ， 30 mM NaCl ，  
0.1 mM デオキシリボヌクレオチド (dATP, dCTP,



dGTP, Sigma Chemi. ) ならびに<sup>3</sup>H-TTP 200  $\mu$ Ci (放射能: 16.9 Ci/mM, new England Nuclear, USA), 被検精製ウイルス標品ならびに 0.01% (V/V) トライトン X-100 (石津製薬)。この反応混合液を 37°C の温浴中で反応させ、所定時間後に 1 N の過塩素酸の 150  $\mu$ l を加えて反応を停止させた。反応生成物の粗体として仔牛胸腺 DNA (Sigma Chemi.) の 100  $\mu$ g と 10% トリクロル酢酸 (石津製薬) の 3 ml とを加え、0°C で 30 分間静置した後、酸不溶性画分を millipore メンブレインフィルター (HA 型, 孔径 0.45  $\mu$ m, Millipore, Massachusetts, USA) 上に集めた。乾燥させた酸不溶性画分を、トルエンを主体とした液体シンチレーターに溶解し、この画分にとりこまれた放射活性を Aloka 液体シンチレーションカウンター (LSC-673 型, 日本無線医理学研究所 東京) により測定した。なお DNA 依存性 DNA 合成酵素活性は、DNA の鋳型としてエンドヌクレアーゼで処理されている仔牛胸腺 DNA 10  $\mu$ g を使用し、上記と同様の方法で、測

定した。

#### XIV ラジオイムノアッセイ <sup>45)</sup>

0.1 M リン酸緩衝液 (pH, 7.4) に対して1夜透析した精製ウイルス標品の 50  $\mu$ l に,  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (放射能濃度: 512 mCi/ml New England Nuclear) の 50  $\mu$ Ci ならびにクロラミン T (和光純薬, 大阪) の 50  $\mu$ g を加え, 4 $^{\circ}$ C で5分間混和して反応させた。ついでメタ重亜硫酸ソーダ (和光純薬) 50  $\mu$ g を加えて,  $^{125}\text{I}$  とウイルスたんぱく質との反応を停止させ, 上記のリン酸緩衝液に対して一夜透析して遊離の  $\text{Na}^{125}\text{I}$  を除去した。このようにして得た  $^{125}\text{I}$  標識ウイルス標品を, 0.125 M ホウ酸緩衝液 (pH, 8.1) の 90  $\mu$ l に, 約 5000 cpm の放射活性を与えるように希釈し, ついで前記のホウ酸緩衝液により10倍階段希釈した抗ヒト CRP ウサギ IgG の 90  $\mu$ l と 37 $^{\circ}$ C で, 18時間反応させた。その後さらに抗ウサギ IgG ブタ血清 (Dukopatts) の 90  $\mu$ l を加えて, 4 $^{\circ}$ C で3時間静置し, 生じた沈殿物の放射活性をよカウンタ - (Aloka PS-201, 日本無線医理学

研究所) により測定した。

なお<sup>125</sup>Iで標識されたHPV-RVpi(MEC)と、抗ヒトCRPウサギIgGとの反応の特異性を検定するために、上記ホウ酸緩衝液により最終濃度が1 mg/mlとなるように調製したヒトCRP (Behringwerke, W.Germany) 50  $\mu$ lを上記の反応系に加え、<sup>125</sup>Iの結合阻止率を算定した。

#### XV 電子顕微鏡による観察

ヒト無色素性黒色腫由来のMEC細胞に内在するRetroウイルスは、以下に述べるようにして観察した。

すなわち37°Cで5日間培養されたMEC単層培養細胞を5 mM塩化カルシウムを含む0.1 Mリン酸緩衝液(pH, 7.3)で3回洗浄後、上記緩衝液に最終濃度が2.5%に存在するように希釈したグルタルアルデヒド(石津製薬)を用いて3時間固定した。固定されたMEC細胞をラバーポリスチレンを用いてガラス面より採集し、上記のリン酸緩衝液で洗浄してグルタルアルデヒドを除去した。この細胞を、さらに2%

四酸化オスミウム溶液 (E. Merck, Darmstadt, West Germany) により 2 時間,  $4^{\circ}\text{C}$  で固定し, ついで通法により, 冷エタノールの減水系列を通過させて脱水した。その後, プロピレンオキシド (石津製薬) を浸透させた後, 固定細胞を Luft 法<sup>46)</sup> によりエポキシ樹脂 (応研商事, 東京) に浸して,  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $45^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$  の恒温器で順次, 各 20 時間ずつ, 加熱重合させた。包埋ブロックは, LKB 型ウルトラトームを用いて  $600-800\text{ \AA}$  の超薄切片とし, 4% 酢酸ウラニールならびに氷酸化鉛により二重染色した。染色標本は電子顕微鏡 (HU-12A 型, 日立製作所, 東京) を用い, 直接倍率 4,000 倍ないし 30,000 倍で観察した。写真撮影には富士電子顕微鏡フィルム FG を用いた。

## 実験結果

### I 慢性関節リウマチ患者血清中の風疹ウ

イルスに対する HAI 抗体価

慢性関節リウマチの病因として、風疹ウイルス<sup>14)</sup>の慢性感染が、近年、示唆されている<sup>20)</sup>

。また慢性関節リウマチ患者の滑液囊膜組織<sup>30)</sup>には、CRP が検出されると報告されている

。そこで CRP を保有する慢性関節リウマチ患者血清 22 検体について、風疹ウイルス HAI 抗体価を測定するとともに、この値と血清中の CRP 量、RAHA 価、および RA 試験の結果との相関関係を調べた。

表 1 と図 1 に示すように、慢性関節リウマチ患者の風疹ウイルス HAI 抗体価の平均（以下特に断らない限り、幾何平均）は 181.1 倍であり、対照健康成人 177 例の風疹ウイルス HAI 平均抗体価 30.2 倍と比較して、高値を示し、この差は推計学的に有意であった ( $P < 0.01$ )。一方これら慢性関節リウマチ患者 22 例の血清中の平均 CRP 量は 2.8/+, RA 試験の結果は 20 例は陽性、残り 2 例は偽陽性であり、また RAHA の平均値は 3.4 倍であった。また慢性関

節りウマチ患者の風疹ウイルス HAI 抗体価の分布 (図1) をみると, HAI 抗体価 5/2 倍を示すものが7例と最も多く, HAI 抗体価 8 倍以下のものは2例のみであった。一対照の健康成人では (図2), 風疹ウイルス HAI 抗体価 8 倍未満のものが39例と最も多く, 5/2 倍以上の値を示すものは23例にすぎなかった。

以上述べた血清疫学的調査結果は, 慢性関節りウマチの発症に風疹ウイルスが, 何らかの風に関与する可能性を示唆すると考えられる。ただし, 慢性関節りウマチ患者血清中の CRP 量と風疹ウイルス HAI 抗体価の相関関係を相関係数を求めて検討したところ, この値は0.35となり, 推計学的に有意の相関関係は認められなかった (図3)。

さらにまた血清中に CRP を保有している頭頸部悪性腫瘍患者10例について風疹ウイルス HAI 抗体価を測定したところ, 風疹ウイルス HAI 抗体価 8 倍未満のものが4例, 8 倍のも

のが6例で、その平均抗体価は3.48倍であった(表2)。なお個々の血清についても HAI 価と CRP 量との間に関連は認められなかった。すなわち、CRP の産生は、風疹ウイルス感染に必ずしもよるものでないことが明らかなることを付言しなければならぬ。

## II 風疹に罹患した妊婦の血清中 CRP 量と風疹ウイルス HAI 抗体価の推移

慢性関節リウマチ患者において、風疹ウイルス HAI 抗体価と CRP 量との間に有意の相関関係は認められなかった。しかし血清中の CRP 量を経時的に測定すると、病勢の推移にもなつて、その値が大きく変動することは、临床上よく知られている<sup>10-13)</sup>。また風疹ウイルス HAI 抗体価は、風疹に罹患してその抗体価が最高値に達した後、長期間にわたって高値を持続することが知られている<sup>47, 48)</sup>。したがって、ある一時点に採取した血清について測定した風疹ウイルス HAI 抗体価と CRP 量との間に有意の相関関係が認めらぬ事實は

必ずしも風疹ウイルスと CRP との生物学的因果関係を明確にすることはつながらない。

そこで風疹ウイルスが感染した Vero 細胞は培養上清中に CRP を産生するという最近の報告<sup>31)</sup>を参考にして、*in vitro*における風疹ウイルス感染が CRP 産生の誘導因子になり得るが否かについて、検討を加えた。風疹に罹患した1例の妊婦について、臨床所見、血清中の CRP 量と風疹ウイルス HAI 抗体価との関係を、表3に示した。すなわち、この症例では、妊婦自身の発症14日前に同居者に風疹ウイルス感染による皮疹が顔面に出現し、また発熱、後頭部リンパ節腫脹が認められた。この同居者の皮疹は次第に胸部、上肢に広がり、解熱とともに癒合し、妊婦の発症7日前に消退した。この時点での妊婦の血清中の風疹ウイルス HAI 抗体価は8倍であり、CRP は認められなかった。妊婦の発症は、同居者の発症より14日後に、顔面部皮疹、発熱、後頭部なら



びに頸部リンパ節の腫脹という形で出現した。この時の風疹ウイルス HAI 抗体価は8倍であった。発症7日目に皮疹は消退し、発熱は平熱に復したが、四肢、腰部の関節痛が出現し、また風疹ウイルス HAI 抗体価は32倍と発症時の4倍に上昇した。さらに発症より14日後に妊婦血清の風疹ウイルス HAI 抗体価は1024倍と急上昇し、CRP量は毛細管法で2+を示した。なおこの女性の風疹発症後28日目の風疹ウイルス HAI 抗体価は1024倍、CRP量は2+であり、90日後での風疹ウイルス HAI 抗体価は512倍、CRP量は1+であった。

一般に風疹ウイルス胎内感染による先天性風疹症候群の出現は、妊娠前三半期においてその頻度が一番高いと報告されている<sup>49, 50)</sup>。この妊婦においても先天性風疹症候群児出産の恐れが非常に大きいと判断されたので、妊娠10週で、風疹ウイルスの感染が血清学的に確定と考えられた時点において、人工妊娠中絶が行われた。

摘出された胎児組織の一部を組織培養して得た培養細胞について、風疹ウイルス抗原と CRP の存在が間接蛍光抗体法により検索された。その結果、培養細胞の細胞質に風疹ウイルス抗原の存在が明らかにされるとともに、抗ヒト CRP ウサギ IgG と反応する特異抗原の存在が認められた（図 4, 5）。なお対照として用いたヒト口蓋組織の初代培養細胞には、これらの特異抗原は検出されなかった。

以上述べた所見は、風疹ウイルス感染が CRP 産生の誘導因子になり得ることを示唆している。

### Ⅲ 各種培養細胞における風疹ウイルスの CRP 誘導能に関する検索

風疹ウイルスの CRP 誘導能ならびに CRP の産生機構を *in vitro* の系で解析するために、以下に述べる実験を行なった。

風疹ウイルス感染により CRP の誘導がすでに報告されている Vero 細胞を陽性対照として、ヒト口蓋裂患児より得た培養細胞（HPF）

、ヒト無色素性黒色腫由来の MEC 細胞、および風疹ウイルスの増殖に好適な BHK21/WI-2 細胞について、風疹ウイルスの CRP 誘導能を間接蛍光抗体法により調べた。

表 4 に示すように、Vero 細胞のみならず、MEC 細胞ならびに HPF 細胞についてもまた、風疹ウイルス感染により、細胞質内、また一部は核内に、CRP が誘導されることが明らかにされた。さらに MEC 細胞は、風疹ウイルスが感染していない場合にも CRP が存在することが判明した (図 6)。一方 BHK21/WI-2 細胞では、風疹ウイルス感染の有無を問わず、間接蛍光抗体法により CRP を検出することが出来なかった。

以上述べた実験結果より、風疹ウイルスはある種の宿主細胞に CRP を誘導するが、ウイルス遺伝子自身に CRP を産生する遺伝情報が保有されているわけではないことが示唆された。

IV MEC 細胞における CRP の産生とその誘

## 導因子

風疹ウイルスが感染してゐない MEC 細胞で CRP が間接蛍光抗体法により検出されたので、その培養上清中に CRP が産生されてゐる可能性について検討を加えた。すなわち MEC 細胞の培養上清の 300 ml を集め、低速遠心にて細胞残渣を除去して得た上清、この上清をさらに 100,000 xg 2 時間超遠心して分離した沈渣および上清について、それぞれの CRP の存在をゲル沈降法により調べた。その結果、100,000 xg で 2 時間、超遠心して得た沈渣を生理食塩水に懸濁したものののみが抗ヒト CRP ウサギ IgG と反応して沈降線を生じるのが観察された(図 7)。この実験結果は、CRP が MEC 細胞培養上清中で浮遊密度の高い粒子として存在していることを示している。

そこで電子顕微鏡により、無色素性黒色腫由来の MEC 細胞の超微細構造を観察したところ、細胞質内に多数の電子密度の高い粒子が存在することが明らかにされた(図 8)。こ

これらの粒子は、その形態に基づいて、内因性 A、  
B および C 型ウイルスと同定された<sup>51-53)</sup>。す  
なわち直径 70-80 nm で中央に電子密度の低い  
領域が存在し、群をなしている A 型ウイルス  
、核がやや中央から偏在し、外殻にスパイク  
を有する B 型ウイルス、ならびに直径 100 nm で  
中央に電子密度の高い核を有し、周囲を二重  
膜構造の外殻で被われている C 型ウイルスで  
ある。この電子顕微鏡による観察所見は、

MEC 細胞培養上清中に DNA 合成酵素活性を保  
有するヒト Retro ウイルス粒子が産生されてい  
ることを示唆する。そこで MEC 細胞の培養上  
清より、蔗糖密度勾配遠心法を用いて精製ウ  
イルス標品を調製し、精製したウイルス粒子  
(たん白量にして 3  $\mu$ g) を用いて逆転写酵素  
と DNA 依存性 DNA 合成酵素活性を測定した。  
図 9 に示すように、反応時間 60 分まで経時的  
に酸不溶分画への H-TMP の取りこみは増量し  
、それ以後プラトーに達した。すなわち MEC  
細胞の培養上清中に上記酵素活性を保有する

ヒト Retro ウイルスの存在することが明らかにされた。以上の結果より、MEC 細胞より産生されている CRP は、この細胞より産生されている Retro ウイルス粒子の一構成部分として、あるいはこのウイルス粒子に結合した状態として、存在していると考えられる。

#### Ⅴ 風疹ウイルス変種株 HPV-RV 持続感染

MEC 細胞より産生されているウイルスの生物学的特性

風疹ウイルスが Retro ウイルスを保有する BHK 細胞に持続感染した場合、持続感染細胞より産生されているウイルスは風疹ウイルスと BHK Retro ウイルスとの合の子であることが報告されている<sup>54)</sup>。したがってヒト無色素性黒色腫由来の MEC 細胞に風疹ウイルスを持続感染させた際にも、持続感染 MEC 細胞より産生されるウイルスは風疹ウイルスと MEC 細胞の Retro ウイルスとの合の子であり、その抗原としての特性は両ウイルスのモザイクになっていると考えられる。すなわち CRP が MEC 細

胞の Retro ウイルス粒子の構成成分の一部として存在するならば、風疹ウイルスが持続感染した MEC 細胞より産生されている感染性合の子ウイルス粒子は CRP を保有していることが予想される。この可能性を検討するために、風疹ウイルス変種株 HPV-RV が持続感染した MEC 細胞より産生されているウイルス粒子 HPV-RV<sub>pi</sub>(MEC) の抗原性を解析した。

HPV-RV ウイルス粒子の抗原としての特性を、風疹ウイルス M-33 株と比較して、表 5 に示した<sup>4)</sup>。すなわち HPV-RV は、風疹ウイルスに特異的な補体結合抗原を保有しているが、そのプラック形成能および赤血球凝集能は、抗風疹ウイルス血清によつてではなく、抗 BHK Retro ウイルス血清によつてそれぞれ中和され、抑制される。また HPV-RV は、野生株 M-33 に較べてより著明なプラックを BSR 単層培養細胞で形成し、感染力価が測定しやすいので、本項に述べる実験では、HPV-RV を使用した。

HPV-RV が持続感染した BSR 単層培養細胞〔

MEC(HPV-RV) ] には線維芽細胞が多数出現し、主に上皮様細胞よりなる親株 MEC 細胞と比較し、MEC(HPV-RV) 細胞の形態は多形性を示した(図10)。この MEC(HPV-RV) 細胞が HPV-RV の持続感染細胞であることを証明するために、抗 HPV-RV ウサギ血清を用いる間接蛍光抗体法により、HPV-RV ウイルス抗原を検索した。図11に示すように、MEC(HPV-RV) 細胞の主に細胞質、あるいは一部は核内に、HPV-RV ウイルスの特異抗原の存在が認められ、MEC(HPV-RV) 細胞が HPV-RV 持続感染細胞であることが明らかにされた。

なお MEC(HPV-RV) 細胞は、感染性ウイルス HPV-RV<sub>pi</sub>(MEC) を自発的に産生しており、このウイルスは BSR 単層培養細胞に対して、親株ウイルス HPV-RV と比べ非常に小さなプラックを形成した(図12)。そこで抗ヒト Retro ウイルス血清の HPV-RV<sub>pi</sub>(MEC) ウイルスのプラック形成能に対する中和作用を調べた。表6に示すように、10倍に希釈された抗血清により HPV-RV<sub>pi</sub>(MEC) ウイルスのプラック形成能の 83.6



%が、また4倍希釈抗血清により38.5%のプラック形成能が中和されることが明らかになった。すなわち、HPV-RVpi(MEC)ウイルス粒子の外殻は、MEC細胞のRetroウイルス粒子の外殻の、少なくとも一部を保有していることが、示された。

このような所見が得られたので、つぎにHPV-RVpi(MEC)ウイルスのプラック形成能に対する抗ヒトCRPウサギIgGの影響を中和反応により検討したところ、8倍希釈抗血清では93.8%、32倍希釈抗血清では44.1%におよぶウイルスのプラック形成能の中和が観察された(表7)。一方対照として用いた親株ウイルスHPV-RVのプラック形成能は、抗ヒトCRPウサギIgGにより、全く中和されなかった。

以上、ヒト無色素性黒色腫由来のMEC細胞に風疹ウイルス変種株HPV-RVが持続感染した細胞から産生されているウイルスHPV-RVpi(MEC)は、その外殻にCRPを保有しており、このCRPはMEC細胞の内因性Retroウイルス粒子の

一構成部分であることを強く示唆する結果が得られた。

## Ⅵ 抗ヒト CRP ウサギ IgG と CRP との特異反応のラジオイムノアッセイによる検定

HPV-RVpi (MEC) ウイルスのプラック形成能を中和する抗ヒト CRP ウサギ IgG 中に CRP に対する特異抗体が存在することを明らかにし、その特異抗体と HPV-RVpi (MEC) ウイルス粒子との反応性を示す目的で、次の実験を行なった。

すなわち精製 HPV-RVpi (MEC) ウイルス粒子を<sup>125</sup>Iにより標識した標品と抗ヒト CRP ウサギ IgG との反応を、ラジオイムノアッセイにより測定するとともに、精製ヒト CRP 標品による、この反応の阻害について検討を加えた。精製 HPV-RVpi (MEC) ウイルス標品は次のようにして調製した。すなわち図 13 に示すように、MEC (HPV-RV) 細胞の培養上清より得た HPV-RVpi (MEC) ウイルスの粗ウイルス標品を蔗糖密度勾配遠心法を用いて分画分取し、各画分について HA 力価と BSR 細胞でのプラック形成能による感

沫力価を測定した。HA力価と感染力価が一致して最高値を示す画分7をHPV-RVpi(MEC)の精製ウイルス標品として、 $^{125}\text{I}$ で標識した。この得られた標品と抗ヒトCRPウサギIgGとの反応性を解析するため、硼酸緩衝液により $10^{\circ}$ から $10^{-6}$ まで希釈した抗ヒトCRPウサギIgGと $^{125}\text{I}$ で標識したHPV-RVpi(MEC)との結合率を測定した。その結果(図14)、標識HPV-RVpi(MEC)が $10^{\circ}$ から $10^{-2}$ 希釈の抗ヒトCRPウサギIgGによって、その約70%が結合されて沈澱すること、 $10^{-3}$ から $10^{-6}$ 希釈の抗血清では約24%が結合することが判った。またこの反応系に $50\mu\text{g}$ の精製CRP標品を加えた時に、抗ヒトCRPウサギIgGによる標識ウイルスの結合率は、 $10^{\circ}$ から $10^{-3}$ までの抗血清の希釈域においても約26%に低下し、HPV-RVpi(MEC)ウイルス粒子と抗ヒトCRPウサギIgGとの反応が、精製ヒトCRPにより、特異的に阻害されることが確認された。

## 考察

Tillet と Francis によつて 1930 年 CRP が発見されて以来、種々の疾患に罹患した患者の血清中に CRP が出現することが明らかにされている<sup>1-13)</sup>。すなわち細菌あるいはウイルス感染症、全身性紅斑性狼瘡 (SLE) や慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患、ならびに悪性腫瘍などの患者血清中に CRP が検出され、さらに妊婦血清中にも CRP が出現することが報告されている<sup>55-57)</sup>。しかしながら、CRP が一体、どの臓器組織、あるいは細胞で、どのような目的で作られるかについて、全く不明であり、また産生された CRP の生物学的特性に関しても、ほとんど明らかにされていらない。

CRP が特に高頻度に検出される疾患として自己免疫疾患と悪性腫瘍がある。最近これらの疾患において、その病因として内因性 Retro ウイルスの関与が話題となっている。すなわち

自己免疫疾患である SLE では、その病巣組織の細胞 DNA に RNA ウイルスである麻疹ウイルスがプロウイルス DNA の形で組込まれていることが Zedhanov によって示された<sup>23)</sup>。麻疹ウイルス RNA 遺伝子が DNA に逆転写される時、宿主細胞に内因性ヒト Retro ウイルスが発現し、この Retro ウイルス粒子の保有する逆転写酵素が利用されると考えられる。また SLE の動物実験系のモデルシステムとして、Newzeland Black mouse があるが<sup>58-60)</sup>、このマウスは生後 SLE を自然に発症する。その後このマウスは、白血病になり死に致るが、SLE 発症に際して、マウス C 型ウイルスである Gross の白血病ウイルスが発現する。また腎糸球体の病巣部には、Gross の白血病ウイルス抗原が存在することが、蛍光抗体法により明らかにされている。以上のべた事実は、自己免疫疾患の誘導因子として内因性 Retro ウイルスが関与することを、強く示唆している。

一 元悪性腫瘍の発現機構として、Todaro と

Huebner により、Oncogene theory が提唱されてい  
 る<sup>61)</sup>。彼らによると、すべての動物細胞の染  
 色体 DNA には oncogene を保有する DNA 領域が存  
 在し、この DNA が内因性 Retro ウィルスとして  
 誘導される結果、発癌すると言う。この内因  
 性 Retro ウィルスは動物の腫瘍細胞に認められ  
 、またヒト癌組織、たとえば白血球、悪性リ  
 ンパ腫、骨肉腫、肺癌などの腫瘍組織に、発  
 現することが明らかにされている<sup>62-69)</sup>。また  
 ヒト腫瘍細胞について、電子顕微鏡による観  
 察では内因性 Retro ウィルス粒子の存在が認め  
 られない場合にも、その染色体 DNA がサル内  
 因性 Retro ウィルス RNA 遺伝子に相補的な DNA  
 領域を保有していることが報告されている<sup>70)</sup>  
 。したがって近年ヒト悪性腫瘍もまた、内因  
 性 Retro ウィルスの発現により発症するという  
 viral carcinogenesis の概念が大きくクローズア  
 ップされている。以上のことを総合的に勘案  
 すると、CRP の産生機構ならびにその生物学  
 的特性を研究する場合にも、上に述べた両疾

患の病因に関与している可能性がある内因性ヒト Retro ウイルスとの関係を解析の対象とすることは、当を得ていると言えよう。一方正常胎盤組織においても内因性 C 型ウイルスの発現が明らかにされており<sup>31)</sup>、また妊婦血清では高頻度に CRP が検出されるという事実より、CRP と内因性 Retro ウイルスとの関連性は興味ある研究対象と考えられる。

著者けまず、自己免疫疾患の一つであり、また病因として風疹ウイルスの慢性感染が示唆されている慢性関節リウマチ患者血清で CRP 陽性のものについては、風疹ウイルス HAI 抗体価が、対照として用いた健康成人のそれに比べて有意の差で高値を示すことを明らかにした。ちなみに Cappel らは、風疹ウイルスが感染した vero 細胞の培養上清中には、CRP が産生されていると報告している<sup>31)</sup>。

さて佐藤らは、風疹ウイルス慢性感染のモデルシステムとして、風疹ウイルス持続感染細胞を確立し、その確立機構を検索した<sup>41, 54)</sup>

72) 。その結果、風疹ウイルスの RNA 遺伝子が DNA に逆転写され、宿主細胞染色体 DNA に組み込まれていることを示唆する所見を得るとともに、この持続感染細胞より産生されているウイルス粒子は宿主細胞の Retro ウイルスと風疹ウイルスとの合の子であることを明らかにしている。さらに風疹ウイルスが感染すると、その宿主細胞の染色体 DNA から内因性 Retro ウイルスが誘発されることも示した。これらの事実を念頭において著者は、風疹ウイルスを CRP の誘導因子とし、培養細胞を用いて CRP 産生機構と CRP の生物学的意義を、*in vitro* の実験により解析しようとした。その結果、風疹ウイルス粒子自身は CRP を保有していないこと、しかしヒトあるいはサル由来の細胞に風疹ウイルスが感染した時のみ、浮遊密度の高い粒子形態をとった CRP が産生されることを明らかにした。またヒト無色素性黒色腫由来の細胞で、かつヒト Retro ウイルスを発現しているトランスホーム細胞は、風



疹ウイルス感染の有無に関係なく、自発的に産生しているRetroウイルス粒子の外殻にCRPを保有していることを示した。すなわち、風疹ウイルスの感染により誘導されるCRPは、風疹ウイルスの宿主細胞染色体DNAに対する障害の結果発現される内因性Retroウイルス粒子の保有するCRPと同一のものと考えられる。なお、内因性Retroウイルスを発現しているハムスター由来のBHK21/WI-2細胞では、CRPが全く検出されなかった。その理由としては、この細胞の内因性Retroウイルスは、CRPを産生する遺伝子を欠失している可能性が考えられる。もっとも、この細胞が本研究で使用した実験手技では検出されない程の微量のCRPも保有している可能性も否定できない。

もちろん、一般にヒト血清中に出現するCRPは、Retroウイルスの外殻に組み込まれた形態としてではなく、均一なタンパク質として検出される<sup>1)</sup>。この矛盾については、次のように説明できるのではないかと考えられる。

すなわち、最近ヒト血清中で補体活性を示す  
ある画分がヒト Retro ウイルスに対して破壊的  
に働き、その結果、ヒト癌組織あるいはその  
血清中には、形態学的に完全なヒト Retro ウイ  
ルス粒子は認められないとの報告がある<sup>7)</sup>。

これによると、もし自己免疫疾患が発症し、  
あるいは発癌の結果ヒト Retro ウイルス粒子が  
発現したとしても、直ちにそのウイルス粒子  
は破壊され、その結果、破壊されたヒト Retro  
ウイルス粒子の構成成分が血清中に遊出し、  
その一部が CRP として検出される可能性があ  
る。

内因性 Retro ウイルス発現機構に関しては、  
現在のところ全く不明といつてよい。しかし  
一般に、細胞の染色体 DNA に障害を与える因  
子は内因性 Retro ウイルスを誘発する<sup>54, 74-80)</sup>。

すなわち 5 ブロモ 2 " オキシウリジンあるいは  
5 イヌド " オキシウリジン等、宿主細胞染  
色体 DNA と直接作用する化学物質、または細  
胞染色体異常を誘発する風疹ウイルスやヘル

ペスウイルス等は、代表的な内因性 Retro ウィルスの誘導因子である。

また細菌感染において炎症反応が惹起された時、その感染病巣部では細胞の染色体が障害される可能性がある。そうとすれば、急性感染症のある時期に検出される CRP もまた、誘発された内因性 Retro ウィルス粒子の一構成成分と考えられるかもしれぬ。

ともあれ CRP の医学、生物学的意義として、ある疾患の血清中に CRP が検出された時には、内因性 Retro ウィルスの発現という観点にたって、その疾患の病因ならびに予後を注意深く観察し、理にかなった治療法を考慮する必要がある。

## 結語

C 反応性たんぱく質 (CRP) の産生機構および CRP の生物学的意義を明らかにするために

慢性関節リウマチ患者血清について CRP 量、風疹ウイルス HAI 抗体価の関係などについて調べるとともに、各種培養細胞における CRP の産生を、風疹ウイルスを CRP の誘導因子として、検討した。その結果、以下に述べる結果と結論が得られた。

I CRP を保有する慢性関節リウマチ患者血清 22 例の風疹ウイルス HAI 平均抗体価は 181 倍であり、対照として用いた健康成人血清 177 例の風疹ウイルス HAI 平均抗体価 30 倍に比べて、その間に統計学的に有意の差が認められた ( $P < 0.01$ )。しかし、それぞれが示す CRP 量と風疹ウイルス HAI 抗体価との間には、有意の相関関係は認められなかった。一方 CRP を保有する血清でも、頭頸部悪性腫瘍患者血清 10 例では風疹ウイルス HAI 平均抗体価は 3.5 倍に過ぎなかった。

II 風疹に罹患した妊婦血清の 1 例において、風疹ウイルス HAI 抗体価の上昇に伴って CRP 量が增量するのが認められ、この妊婦

を人工妊娠中絶して得た胎児培養細胞には風疹ウイルス抗原と CRP が細胞質に存在することが、間接蛍光抗体法により明らかにされた。

Ⅲ 既に報告のあるアフリカミドリザル腎由来の Vero 細胞のほか、ヒト口蓋組織より得た初代培養細胞でも、風疹ウイルス感染により CRP が誘導された。一方ヒト無色素性黒色腫由来の MEC 細胞においては、風疹ウイルス感染の有無に関係なく、CRP が検出された。

一方仔シリアンハムスター腎由来の株化細胞である BHK21/WI-2 細胞は、風疹ウイルスを感染させた後にも、CRP は全く検出されなかった。

Ⅳ 上記 MEC 細胞の培養上清を  $100,000 \times g$  で 2 時間、超遠心して得た沈渣に CRP が検出され、他方 MEC 細胞には内因性 A, B および C 型ウイルスが存在し、培養上清中には逆転写酵素活性を保有する Retro ウイルス粒子が認められた。なおこの Retro ウイルス粒子は蔗糖密

度勾配速心法により精製した。

V 風疹ウイルス変種株 HPV-RV が持続感染した MEC 細胞より産生されている感染性ウイルス HPV-RVpi(MEC) のプラック形成能は、上記精製ヒト Retro ウイルスをラットに授与することにより得た抗血清ならびに抗ヒト CRP ウサギ IgG の兩者により、中和された。

VI <sup>125</sup>I で標識された精製 HPV-RVpi(MEC) ウイルス標品は抗ヒト CRP ウサギ IgG と反応し、その反応は精製ヒト CRP により阻害された。

以上のようにして、ヒト無色素性黒色腫由来の MEC 細胞が産生する CRP が、MEC 細胞の Retro ウイルス粒子の外殻の構成成分であることが強く示唆された。

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えられ御指導を賜わった宮崎正教授、本研究の実施に際し、始終かわらぬ御指導をいただいた口腔外科学第一講座佐藤光信博士に心から謝意を表します。御校閲と適切な御助言をいた

だいた口腔細菌学講座小谷泊三教授に深謝いたします。また研究の円滑な進展のために特別の御配慮をいただいた口腔外科学第一講座の教室員の方々に感謝いたします。

- 1) Tillet, W.S. and Francis, T. (1930) : Serological reaction in pneumonia with a nonprotein somatic fraction of pneumococcus. J.Exp.Med. 52, 561-571.
- 2) 富田 仁 (1976) : CRP : その数値をどう読むか. 日本臨床. 34, 821-830. 昭和 51.
- 3) Craig, H.W., Kerby, G.P. and Persons, E.L. (1957) : Results of a modified rheumatoid hemagglutination test : Correlation of results with occurrence of C-reactive protein. J.Lab. & Clin.Med. 49, 635-640.
- 4) Roantree, R.J. and Rantz, L.A. (1955) : Clinical experience with the C-reactive protein test. A.M.A.Arch.Int.M. 96, 674-682.
- 5) Sprunt, D.H., Hale, W.M., Chang, F.C., Richmond, S.G. and Erickson, C.C. (1955) : Present status of cancer tests. Science. 122, 273-274.
- 6) Sprunt, D.H. and Hale, W.M. (1955) : A method of evaluating cancer tests. Proc.Am.Asso.Cancer Res. 2, 47-48.
- 7) Graf, L. and Rapport, M. (1958) : C-reactive protein in cancer : A study of 216 patients. Cancer. 11, 255-258.
- 8) Holm, S.E. and Pompeius, R. (1961) : C-reactive protein in carcinoma of the kidney and renal cyst. Acta Chir.Scand. 122, 502-510.
- 9) Baruah, B.D. and Gogoi, B.C. (1975) : C-reactive protein in malignant tumors. Ind.J.Cancer. 12, 39-45.
- 10) MacLeod, C.M. and Avery, O.T. (1941) : The occurrence



during acute infections of a protein not normally present in the blood. 2. Isolation and properties of the reactive protein. J.Exp.Med. 73, 183-190.

- 11) Anderson, H.C. and McCarty, M. (1950) : Determination of C-reactive protein in the blood as a measure of the activity of the disease process in acute rheumatic fever. Am.J.Med. 8, 445-455.
- 12) Stollerman, G.H., Glick, S., Patel, D.J., Hirschfeld, I. and Rusoff, H. (1953) : Determination of C-reactive protein in serum as a guide to the treatment and management of rheumatic fever. Am.J.Med. 15, 645-655.
- 13) Shetlar, M.R., Bullock, J.A., Shetlar, C.L. and Payne, R.W. (1955) : Comparison of serum C-reactive protein, glycoprotein and seromucoid in cancer, arthritis, tuberculosis and pregnancy. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 88, 107-109.
- 14) Johnson, R.E. and Hall, A.P. (1958) : Rubella arthritis : report of cases studied by latex tests. New Engl.J.Med. 258, 743-745.
- 15) Yanez, J.E., Thompson, G.R., Mikkelsen, W.M. and Bartholomew, L.E. (1966) : Rubella arthritis. Ann.Int.Med. 64, 772-777.
- 16) Hildebrandt, H.M. and Maassab, H.F. (1966) : Rubella synovitis in a one-year-old patient. New Engl.J.Med. 274, 1428-1430.
- 17) Cooper, L.Z., Ziring, P.R. and Weiss, H.J. (1969) : Transient

- arthritis after rubella vaccination. *Am.J.Dis.Child.* 118, 218-225.
- 18) Grayzel, A.I. and Beck, C. (1970) : Rubella infection of synovial cells and the resistance of cells derived from patients with rheumatoid arthritis. *J.Exp.Med.* 126, 367-371.
- 19) Ogra, P.L., Chiba, Y., Ogra, S.S. and Dzierba, J.L. (1975) : Rubella-virus infection in juvenile rheumatoid arthritis. *Lancet.* 1, 1157-1161.
- 20) Ogra, P.L. and Herd, J.K. (1971) : Arthritis associated with induced rubella infection. *J.Immunol.* 107, 810-813.
- 21) Phillips, P.E. and Christian, C.L. (1970) : Myxovirus antibody increases in human connective disease. *Science.* 168, 982-984.
- 22) Hollinger, F.B., Sharp, J.T., Lidsky, M.D. and Rawls, W.E. (1971) : Antibodies to viral antigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 14, 1-11.
- 23) Zhdanov, V.M. (1975) : Integration of viral genomes. *Nature.* 256, 471-473.
- 24) Dmochowski, L. and Grey, C.E. (1957) : Electron microscopy of tumors of known and suspected viral etiology. *Tex.Rep. Biol. Med.* 15, 704-753.
- 25) Dmochowski, L., Taylor, H.G., Grey, C.E., Designer, E., Dreyer, D.A., Sykes, J.A., Langford, P.L., Rogers, T.S., Shullenberger, C.C. and Howe, C.D. (1965) : Viruses and

- mycoplasma (PPL0) in human leukemia. *Cancer*. 18, 1345-1368.
- 26) Dmochowski, L., Seman, G. and Gallager, H.S. (1969) : Viruses as possible etiologic factors in human breast cancer. *Cancer*. 24, 1241-1249.
- 27) Morton, D.L., Malmgren, R.A., Hall, W.T. and Schidlovsky, G. (1969) : Immunologic and virus studies with human sarcoma. *Surgery*. 66, 152-161.
- 28) Theilen, G.H., Gould, D., Fowler, M. and Dungworth, D.L. (1971) : C-type virus in tumor tissue of a woolly monkey (*Lagothrix*) with fibrosarcoma. *J. Nat. Cancer Inst.* 47, 881-889.
- 29) Nooter, K., Aarssen, A.M., Bentvelzen, p., De Groot, F.G. and Van Pelt, F.G. (1975) : Isolation of infectious C-type oncornavirus from human leukaemic bonemarrow cells. *Nature*. 256, 595-597.
- 30) Gitlin, J.D., Gitlin, J.I. and Gitlin, D. (1977) : Localization of C-reactive protein in synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 20, 1491-1499.
- 31) Cappel, R., Sehluederberg, A., Gifford, R.H. and Horstman, D.M. (1974) : Characterization of a human acute phase protein found in association with rubella virus infection. *J. Exp. Med.* 139, 497-511.
- 32) Nilsson, L.A. (1968) : Comparative testing of precipitation methods for quantitation of C-reactive protein in blood serum. *Acta Path. Micro. Scand.* 73, 129-144.

- 33) Dulbecco, R. and Vogt, M. (1954) : Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J. Exp. Med. 99, 167-182.
- 34) Singer, J.M. and Plotz, C.M. (1956) : The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. Amer. J. Med. 21, 888-892.
- 35) 福岡良男, 安藤清平 (1972) : 慢性関節リウマチの間接赤血球凝集反応; 臨床検査法講座: 17, 血清学. (清水文彦, 秋吉正豊編) 医歯薬出版, 東京, 273-274. 昭和47.
- 36) 安村美博, 川喜多愛郎 (1963) : 組織培養によるSV40の研究. 日本臨床. 21, 1201-1215. 昭和38.
- 37) Eagle, H. (1959) : Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science. 130, 432-437.
- 38) Vaeheri, A., Sedwic, W.D., Plotokin, S.A. and Maes, R. (1965) : Cytopathic effect of rubella virus in BHK21 cells and growth to high titers in suspension culture. Virology. 27, 239-241.
- 39) Sato, M., Maeda, N., Yoshida, H., Urade, M., Saito, S., Miyazaki, T., Shibata, T. and Watanabe, M. (1977) : Plaque formation of herpes virus hominis type 2 and rubella virus in variants isolated from the colonies of BHK21/WI-2 cells formed in soft agar. Arc. Virol. 53, 269-273.
- 40) Parkman, P.D., Buescher, E.L. and Artenstein, M.S. (1962) : Recovery of rubella virus from army recruits. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 11-, 225-230.

- 41) 佐藤光信, 浦出雅裕, 宮崎正 (1976) : 風疹ウイルス変種株 (HPV-RV) 遺伝子の発現様式. 阪大歯学誌. 21, 234-240. 昭和 51.
- 42) Stewart, G.L., Parkman, P.D., Hopps, H.E., Douglas, R.D., Hamilton, J.P. and Mayer, H.M. Jr. (1967) : Rubella-virus hemagglutination-inhibition test. New Eng. J. Med. 276, 554-557.
- 43) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) : Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- 44) Green, M., Rokutanda, M., Fujinaga, K., Ray, R.K., Rokutanda, H. and Curge, C. (1970) : Mechanism of carcinogenesis in murine sarcoma viruses. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 67, 385-393.
- 45) Claus, D.R., Osmand, A.P. and Gewurz, H. (1976) : Radioimmunoassay of human C-reactive protein and levels in normal sera. J. Lab. Clin. Med. 87, 120-128.
- 46) Luft, J.H. (1961) : Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 409-414.
- 47) Brody, J.A. (1966) : The infectiousness of rubella and the possibility of reinfection. Am. J. Publ. Hlth. 56, 1082-1087.
- 48) Horstmann, D.M. (1971) : Rubella : The challenge of its control. J. Infect. Dis. 123, 640-654.
- 49) Plotkin, S.A., Oski, F.A., Hartnett, E.M., Hervada, A.R., Friedman, S. and Gowing, J. (1965) : Some recently recognized manifestations of the rubella syndrome. J. Pediatrics. 67, 182-191.

- 50) Sever, J.L., Nelson, K.B. and Gilkeson, M.R. (1965) : Rubella epidemic, 1964: Effect on 6,000 pregnancies. *Am.J.Dis.Child.* 110, 395-407.
- 51) Bernhard, W. (1958) : Electron microscopy of tumor cells and tumor viruses. *Cancer Res.* 18, 491-509.
- 52) Bernhard, W. (1960) : The detection and study of tumor viruses with the electron microscope. *Cancer Res.* 20, 712-727.
- 53) Weinstein, R.S. and Moloney, W.C. (1965) : Virus-like particles associated with chloroleukemia in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 118, 459-461.
- 54) Sato, M., Yamada, T., Yamamoto, K. and Yamamoto, N. (1976) : Evidence for hybrid formation between rubella virus and a latent virus of BHK21/WI-2 cells. *Virology.* 69, 691-699.
- 55) Nesbitt, R.E., Hays, R.C. and Maura, J. (1960) : The behavior of C-reactive protein in pregnant and puerperal women, fetal blood and in the newborn infant under normal and abnormal conditions. *Obstet. Gynec.* 16, 659-666.
- 56) Tyler, C.W. and Roess, T.J. (1957) : C-reactive protein in pregnancy. *Am.J. Obstet. Gynec.* 73, 837-842.
- 57) Hansen, L.A. and Nilsson, L.A. (1962) : Studies on C-reactive protein. 2. The presence of C-reactive protein during the pre- and neonatal period. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 56, 409-414.
- 58) Mellors, R.C., Aoki, T. and Huebner, R.J. (1969) : Further

- implication of murine leukemia like virus in the disorders of NZB mice. *J.Exp.Med.* 129, 1045-1062.
- 60) Yoshiki, T., Mellors, R.C., Strand, M. and August, J.T. (1974) : The viral envelope glycoprotein of murine leukemia virus and the pathogenesis of immune complex glomerulonephritis of New Zealand mice. *J.Exp.Med.* 140, 1011-1027.
- 61) Huebner, R.J. and Todaro, G.J. (1969) : Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA.* 64, 1087-1094.
- 62) Sato, M., Sakuda, M., Morimoto, M., Shirasuna, K., Urade, M., Yanagawa, T., Kubo, K., Miyazaki, T. and Hasegawa, K. (1977) : Existence of C-type viral particles in a biopsy specimen of a lymphoma patient. *J.Osaka Univ.Dental School.* 7, 35-42.
- 63) Gallagher, R.E. and Gallo, R.C. (1975) : Type C RNA tumor virus isolated from cultured human acute myelogenous leukemia cells. *Science.* 187, 350-353.
- 64) McAllister, R.M., Nelson-Rees, W.A., Peer, M., Laug, W.E., Isaacs, H., Gelden, R.V., Rongey, R.W. and Gardner, M.B. (1975) : Childhood sarcomas and search for type-C virus. *Cancer.* 36, 1804-1814.
- 65) Priori, E.S., Dmochowski, L., Myers, B. and Wilbur, J.R. (1971) : Constant production of type C virus particles in a continuous tissue culture derived from pleural effusion cells of lymphoma patient. *Nature.New Biology.* 232, 61-62.
- 66) 白砂兼光 (1977) : ヒト唾液腺多形性腺腫由来の上皮細胞の生物学的特性. *阪大歯学誌.* 22, 174-194, 昭和 52.

- 67) McAllister, R.M., Nelson-Rees, W.A., Johnson, E.Y., Rongey, R.W. and Gardner, M.B. (1971) : Disseminated rhabdomyosarcomas formed in kittens by cultured human rhabdomyosarcoma cells. *J.Nat.Cancer Inst.* 47, 603-611.
- 68) Stewart, S.E., Kasnic, G., Draycott, C., Feller, W., Golden, A., Mitchell, E. and Ben, T. (1972) : Activation in vitro, by 5-iododeoxyuridine, of a latent virus resembling C-type virus in a human sarcoma cell line. *J.Nat.Cancer Inst.* 48, 273-277.
- 69) Benveniste, R.E. and Todaro, G.J. (1976) : Evolution of type C viral genes : evidence for an asian origin of man. *Nature.* 261, 101-108.
- 70) Schidlovsky, G. and Ahmed, M. (1973) : C-type virus particles in placentas and fetal tissues of rhesus monkeys. *J.Nat. Cancer Inst.* 51, 225-231.
- 71) Kalter, S.S., Helmke, R.J., Heberling, R.L., Panigel, M., Fowler, A.K., Strickland, J.E. and Hellman, A. (1973) : C-type particles in normal human placentas. *J.Nat.Cancer Inst.* 50, 1081-1084.
- 72) Sato, M., Tanaka, H., Yamada, T. and Yamamoto, N. (1977) : persistent infection of BHK21/WI-2 cells with rubella virus and characterization of rubella variants. *Arch.Virology.* 54, 333-343.
- 73) Ono, K., Matsuoka, H., Ohashi, A. and Yamamoto, A. (1978) : Effect of human serum on C-type virus particles estimation



of virus inactivation by reverse transcriptase assay and its application to human sera. Proceeding of the Japanese Cancer Association the 37th Annual meeting (Abstract) p232.

- 74) Lowy, D.R., Rowe, W.P., Teich, N. and Hartley, J.W. (1971) : Murine leukemia virus : High-frequency activation in vitro by 5-iododeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine. Science. 174, 155-156.
- 75) Aaronson, S.A., Anderson, G.R., Dunn, C.Y. and Robbin-, K.C. (1974) : Induction of type-C RNA virus by cycloheximide : Increased expression of virus-specific RNA. Proc.Nat.Acad. Sci.USA. 71, 3941-3945.
- 76) Aaronson, S.A. and Dunn, C.Y. (1974) : High-frequency C-type virus induction by inhibitors of protein synthesis. Science. 183, 422-424.
- 77) Aksamit, R.R. and Long, C.W. (1977) : Induction of endogenous murine type C virus by an arginine analog : L-canavanine. Virology. 78, 567-570.
- 78) Sato, M., Tanaka, H., Yamada, T. and Yamamoto, N. (1974) : virus induction from cell cultures persistently infected with rubella virus. Proceedings of the first intersectional congress of IAMS. 3, 153-157.
- 79) Hamper, B., Aaronson, S.A., Derge, J.G., Chakrabarty, M., Showalter, S.D. and Dunn, C.Y. (1976) : Activation of an endogenous mouse type C virus by ultraviolet-irradiated herpes simplex virus types 1 and 2. Proc.Nat.Acad.Sci.USA.

73, 646-650.

80) Reed, C.L. and Rapp, F. (1976) : Induction of murine p30  
by superinfecting herpesviruses. J.Virology. 19, 1028-1033.

MECHANISM OF PRODUCTION OF C-REACTIVE PROTEIN(CRP)  
FROM THE CULTURED CELLS  
AND CRP INDUCING ABILITY OF RUBELLA VIRUS

Hideo YOSHIDA

The first Department of Oral and Maxillofacial Surgery,  
Osaka University Dental School,  
3-48, Nakanoshima 4-chome, Kita-ku, Osaka, Japan

C-reactive protein(CRP) is well known as a protein reactive to C-polysaccharide of pneumococcus which appears in the sera of patients affected by various types of diseases including malignant tumors and autoimmune diseases.

Recently, it has been reported that african green monkey kidney Vero cells infected with rubella virus produced CRP and that rubella virus infection functions in pathogenesis of rheumatoid arthritis.

Thus, when 22 rheumatoid arthritis patients containing CRP were assayed for the antibody level against rubella virus by hemagglutination-inhibition test(HAI), 181.1 fold of the geometric mean HAI titer was observed. This value was found to increase significantly as compared with 30.2 fold in the controls( $P < 0.01$ ).

Moreover, the HAI titer and CRP in pregnant woman affected by rubella virus were found parallely to increase.

In addition, the culture cells grown from the fetus of this woman were demonstrated to express CRP and rubella virus antigen in their cytoplasm.

Therefore, the origin of CRP and its biological properties were studied by using various cultured cells such as human amelanocytic melanoma MEC cells, primary human cells (HPC) and baby syrian hamster kidney BHK21/WI-2 cells including Vero cells, and their rubella virus infected cells. Consequently, infection of Vero and HPC cells with rubella virus resulted in the induction of CRP whereas BHK21/WI-2 cells were not detected for CRP even in rubella virus infection.

The uninfected MEC cells were found spontaneously to express CRP and this CRP activity was observed in the pellets which were obtained by ultracentrifuging the cultured media at 100,000 xg for 2 hrs. In addition, MEC cells spontaneously produced the Retrovirus particles carrying reverse transcriptase activity. Thus, to examine association of CRP with this Retrovirus, MEC cells persistently infected with rubella variant HPV-RV were established and their released virus HPV-RVpi (MEC) were antigenically analyzed.

As a consequence, 83.6% of the plaque forming ability of HPV-RVpi (MEC) virus was neutralized by a ten-fold dilution of anti-human Retrovirus rat serum. Moreover, an eight-fold dilution of anti-human CRP rabbit serum neutralized 93.8% of plaque forming ability of HPV-RVpi (MEC) virus whereas the same concentration of serum did not affect that of wild type HPV-RV

Furthermore, <sup>125</sup>I-labelled HPV-RVpi(MEC) virus were found to be bound with anti-human CRP rabbit IgG and the reaction was inhibited by purified human CRP.

From these findings, it is strongly suggested that HPV-RVpi(MEC) virus particles carry the viral components of the Retrovirus and CRP, and that this Retrovirus has CRP in its viral envelope.

図 1 説明

慢性関節リウマチ患者血清 22 例中の風疹ウイルス HAI 抗体価の分布

(幾何平均 HAI 抗体価 : 181.1 倍)

図 2 説明

健康成人血清 177例中の風疹ウイルス HAI  
抗体価の分布

(幾何平均 HAI 抗体価 : 30.2 倍)

図3 説明

慢性関節リウマチ患者血清22例中のCRP量  
と風疹ウイルス HAI 抗体価との相関

● : 個々の血清例を示す

相関係数  $r = 0.35$



図4 説明

風疹に罹患した妊婦より得たヒト胎児初代培養細胞における CRP の検出

ヒト CRP 特異抗原は、抗ヒト CRP ウサギ IgG と FITC を結合させた抗ウサギ IgG ブタ血清を用い、間接蛍光抗体法により、検索された。

培養細胞の細胞質ならびに一部の細胞の核に特異蛍光がみられる。

倍率：400倍

図5 説明

風疹に罹患した妊婦より得たヒト胎児初代培養細胞における風疹ウイルス抗原の発現

風疹ウイルス特異抗原は、抗風疹ウイルスウサギ IgG と FITC を結合させた抗ウサギ IgG ブタ血清を用い、間接蛍光抗体法により、検索された。

倍率：400倍

図 6 説明

培養細胞での CRP の発現

- a) : ヒト無色素性黒色腫由来の MEC 細胞
- b) : BHK21/WI-2 細胞

MEC 細胞を 37℃ で 2 日間培養した後、間接  
蛍光抗体法により CRP を検出した。なお  
BHK21/WI-2 細胞には、風疹ウイルスを MOI 1 で  
感染させた

倍率 : 400 倍

図 7 説明

寒天ゲル内沈降法による MEC 細胞の培養上清中の CRP の検出

MEC 細胞の培養上清 300 ml を低速遠心にて細胞残渣を除去した上清を、さらに  $100,000 \times g$  2 時間超遠心して沈渣を 1 ml の生理食塩水に懸濁したものを被検標品とした。なお抗ヒト CRP ウサギ IgG は生理食塩水により 2 倍階段希釈した。

図 8 説明

MEC 細胞の内因性ウイルス

a) : 倍率 : 9,000 倍

b) : 倍率 : 70,000 倍

→ : A 型ウイルス

→ : B 型ウイルス

→ : C 型ウイルス

図9 説明

MEC 細胞の培養上清に産生されている内因性 Retro ウイルスの DNA 合成酵素活性 (反応時間曲線)

—●— : 逆転写酵素

○- - -○ : DNA 依存性 DNA 合成酵素

たん白量  $3 \mu\text{g}$  の精製ウイルス標品を含む反応液の  $100 \mu\text{l}$  を  $37^\circ\text{C}$  に静置した。経時的に  $1 \text{ N}$  の過塩素酸の  $150 \mu\text{l}$  を加えて反応を停止させ、酸不溶画分にとりこまれた  $^3\text{H-TMP}$  の放射活性を測定した。

なお DNA 依存性 DNA 合成酵素活性の測定に当っては、DNA の鋳型として、エンドヌクレアーゼで処理されている仔牛胸腺 DNA  $10 \mu\text{g}$  を反応液に添加した。

図 10 説明

風疹ウイルス変種株 HPV-RV 持続感染 MEC 細胞 [MEC(HPV-RV)] の形態の親株のそれとの比較

a) MEC(HPV-RV) 細胞

b) MEC 親株細胞

倍率 : 200倍

図 11 説明

MEC (HPV-RV) 細胞における HPV-RV 抗原の発現

MEC (HPV-RV) 細胞の HPV-RV ウイルス抗原は、抗 HPV-RV ウサギ血清と FITC を結合させた抗ウサギ IgG マウス血清を用いて、間接蛍光抗体法により、同定した。

HPV-RV ウイルス抗原が細胞質あるいは核内に認められる。

倍率：400倍



図 12 説明

HPV-RVpi (MEC) ウィルスならぬに HPV-RV ウィルスのプラック

a) HPV-RVpi (MEC) ウィルスのプラック

b) HPV-RV ウィルスのプラック

図 13 説明

粗 HPV-RVpi (MEC) ウイルス標品を蔗糖密度勾配遠心法により分取した各画分の風疹ウイルス HA 力価ならびに感染力価

○—○ : HA 力価

\*-----\* : 感染力価

粗 HPV-RVpi (MEC) ウイルス溶液の 0.5 ml 蔗糖密度勾配溶液 [15-60% (w/w)] の 4 ml に重層し、56,000 xg で 2 時間超遠心した。管底を穿孔することにより分取した 16 の画分について、HA 力価ならびに BSR 単層培養細胞でのプラック形成を指標とした感染力価を測定した。

図 14 説明

$^{125}\text{I}$  で標識された精製 HPV-RVpi (MEC) 標品の抗ヒト CRP ウサギ IgG との結合

- \*-----\* :  $^{125}\text{I}$  標識精製 HPV-RVpi (MEC) と抗ヒト CRP ウサギ IgG との反応
- : 精製ヒト CRP による反応阻害

約 5000 cpm の放射活性を示すように調製した  $^{125}\text{I}$  標識精製 HPV-RVpi (MEC) 標品の 90  $\mu\text{l}$  を等容量の希釈抗ヒト CRP ウサギ IgG と 18 時間, 37  $^{\circ}\text{C}$  で反応させた。抗ウサギ IgG プラズマ 90  $\mu\text{l}$  を加え, 4  $^{\circ}\text{C}$  で 3 時間静置した後, 反応系全体の放射活性, ならびに 3,000  $\times g$  で 10 分間の遠心で得られた沈澱物に取込まれた  $^{125}\text{I}$  の放射活性を測定した。

$^{125}\text{I}$  結合率は  $\frac{\text{沈澱に取込まれた放射活性 (cpm)}}{\text{反応系全体の放射活性 (cpm)}} \times 100$  により算定した。

なお精製ヒト CRP による上記の反応阻害を

調べる際には、上述の系に精製ヒト CRP (50  
μg) を加えた

图 1

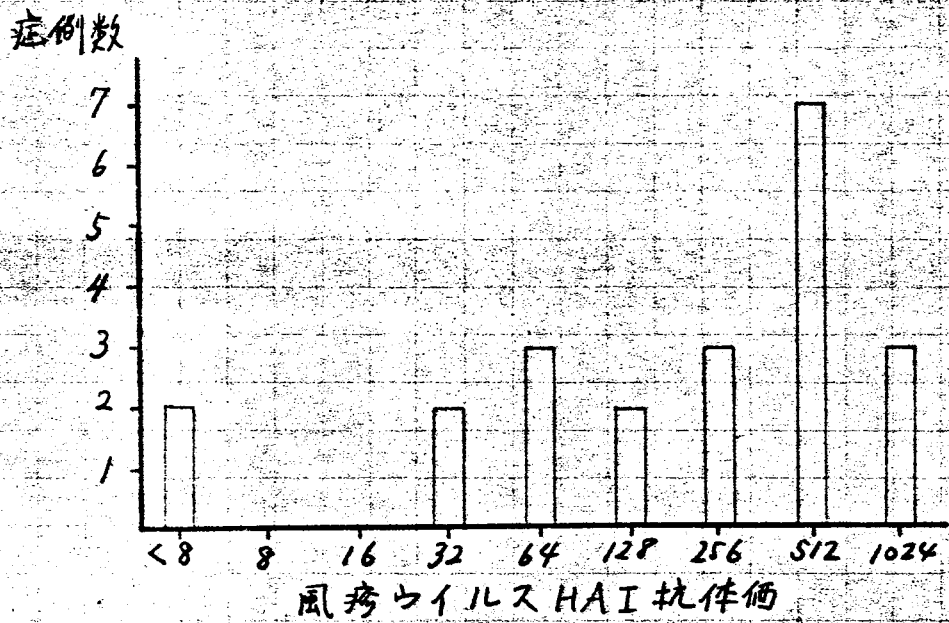
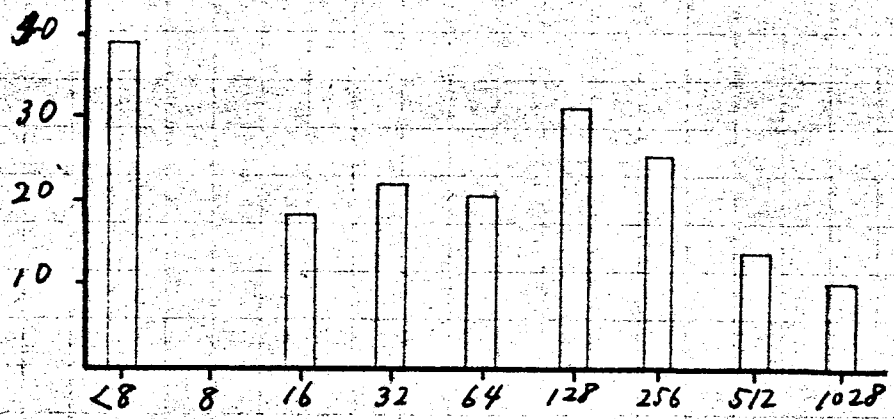


圖2

症例数



風疹ウイルスHI抗体価

圖3

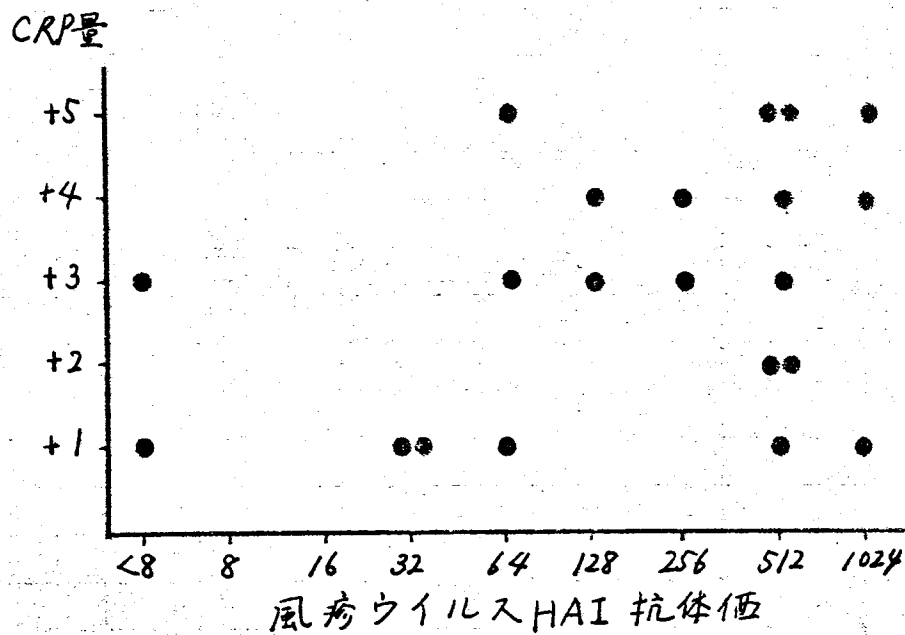


图4

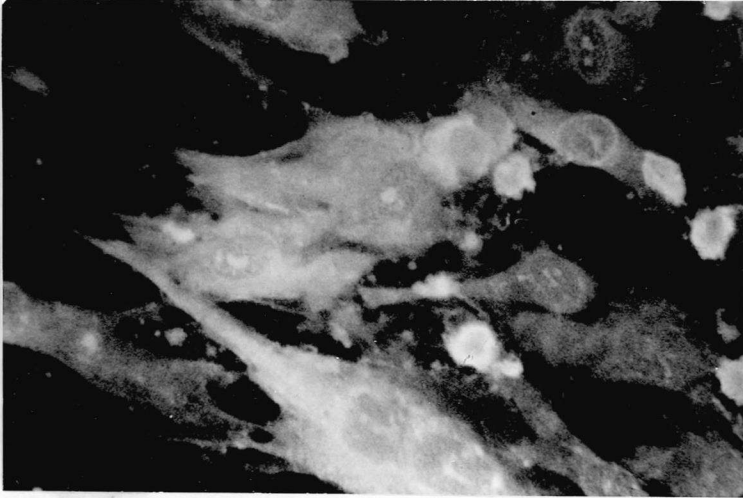




图 5

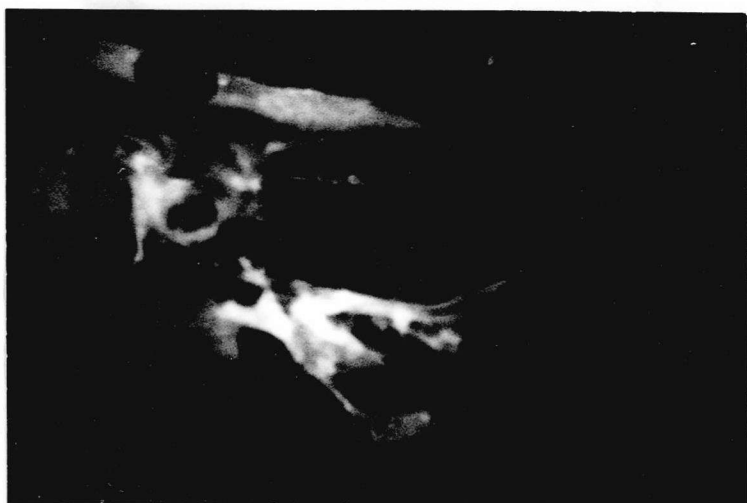
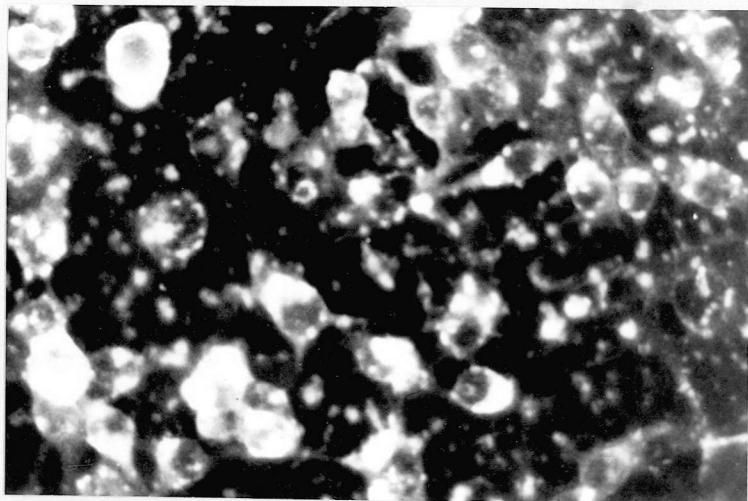


图6

(a)



(b)

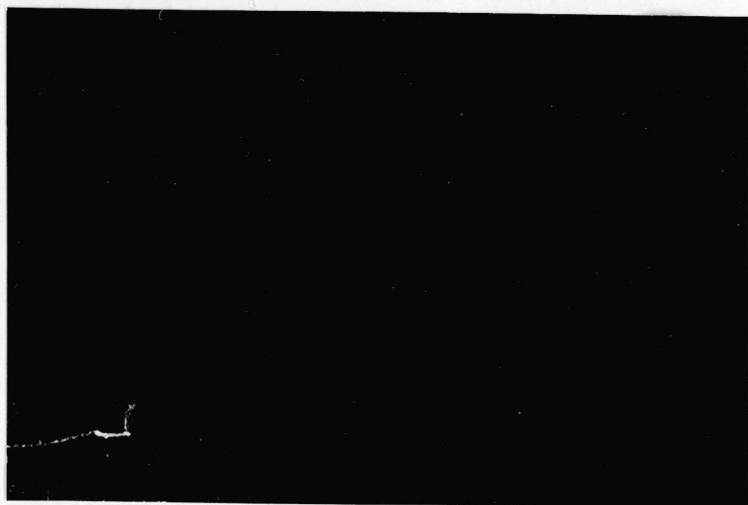


図 7

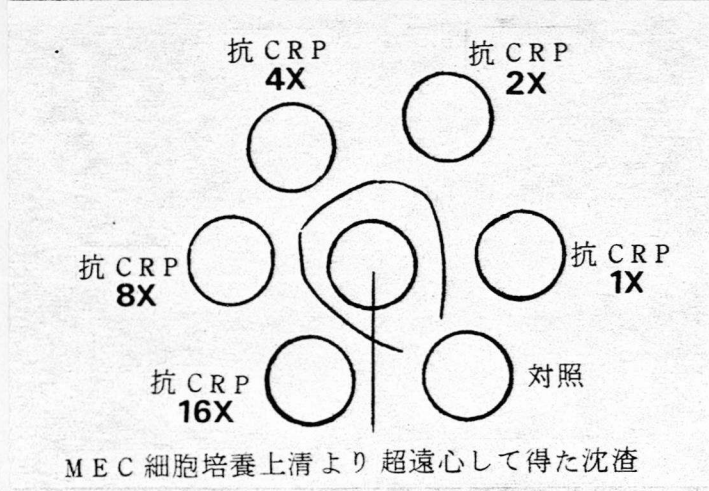
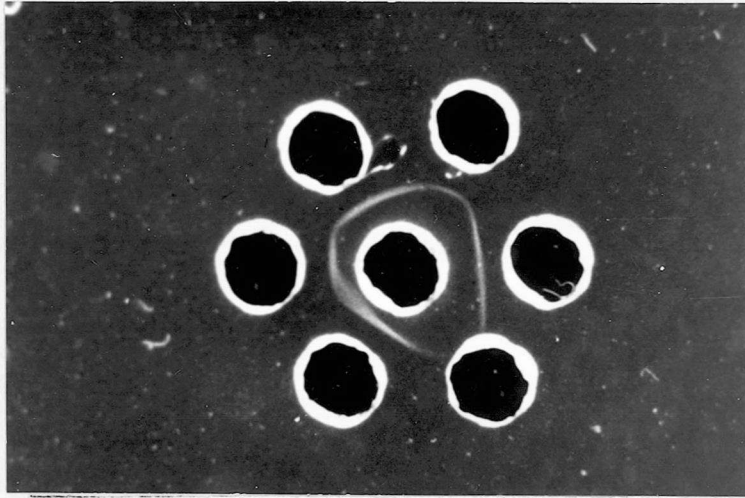
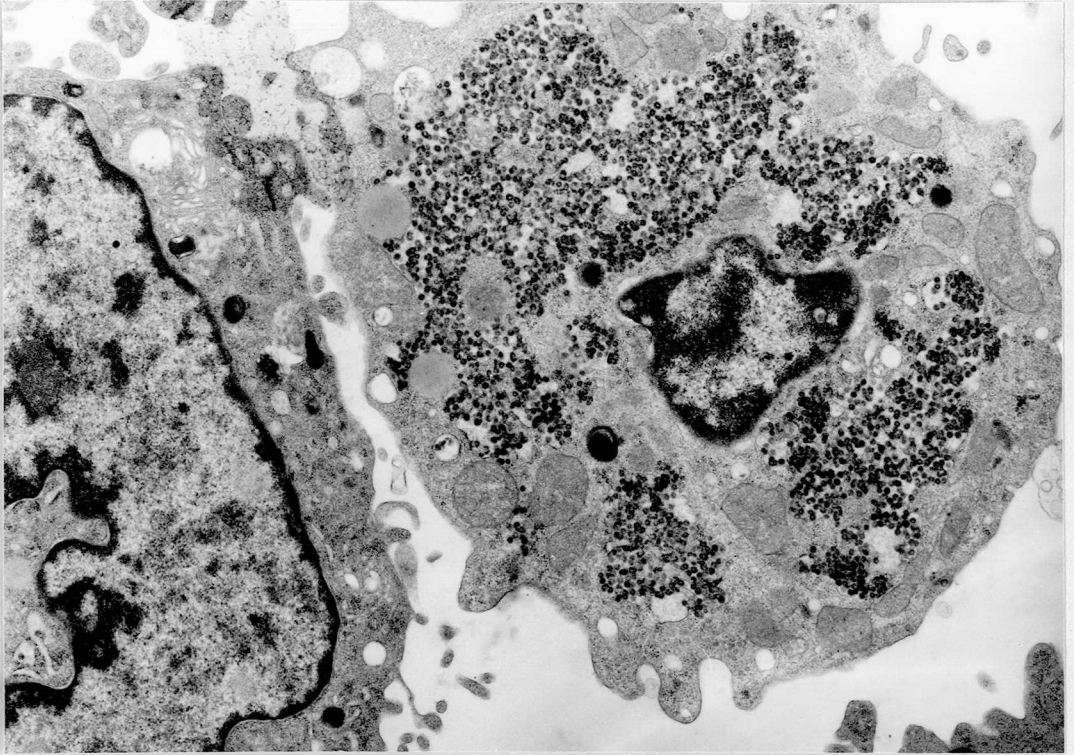


图 8

(a)



(b)

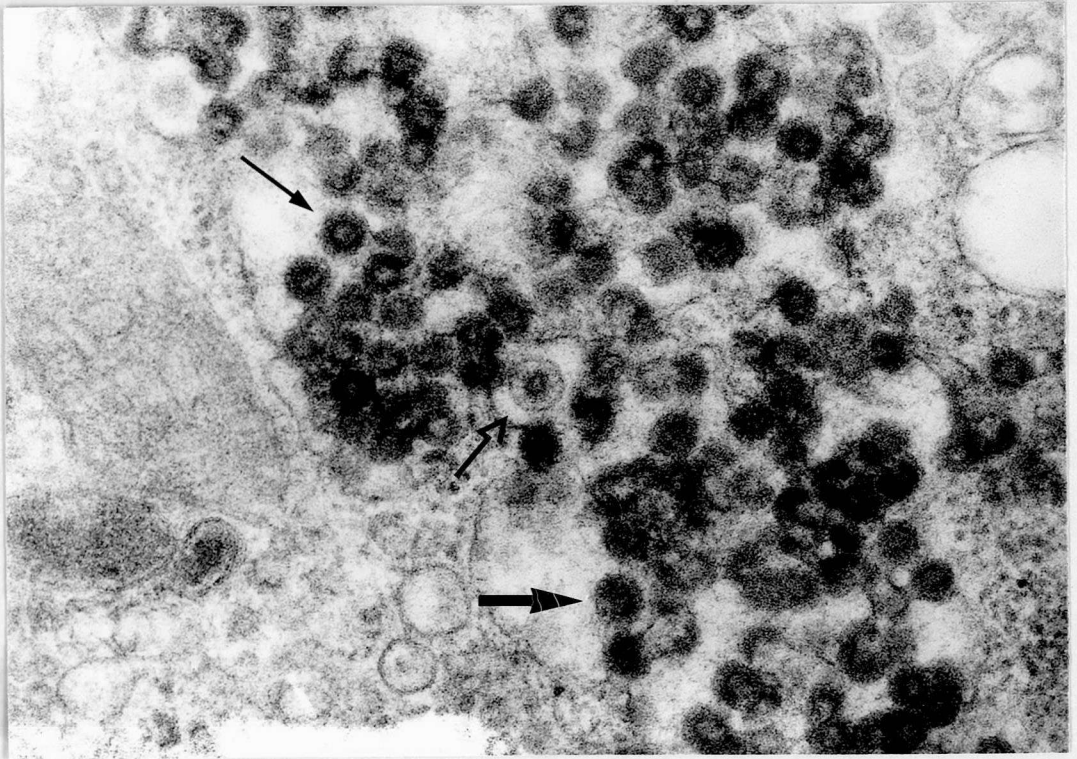
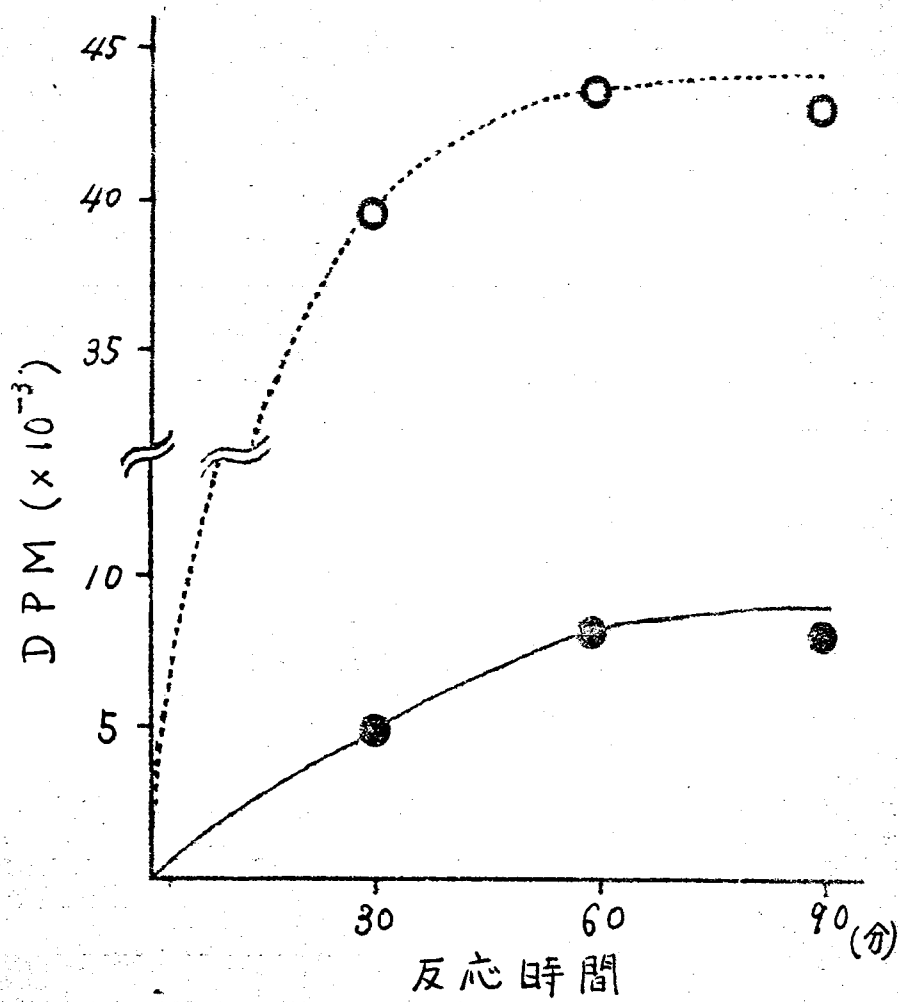


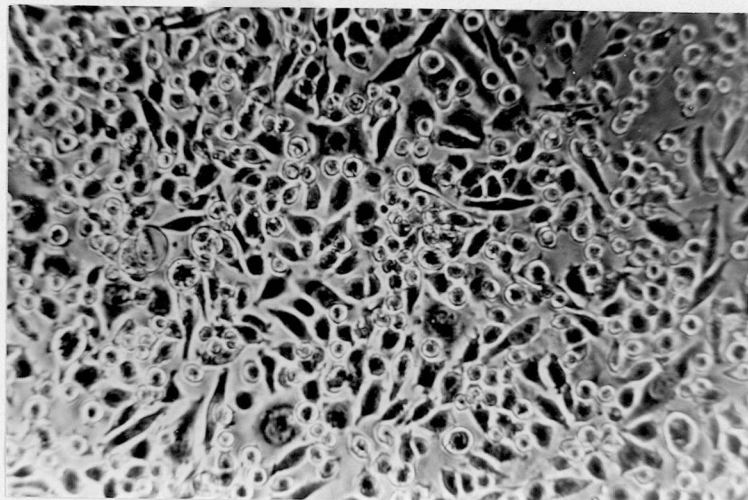
圖 9



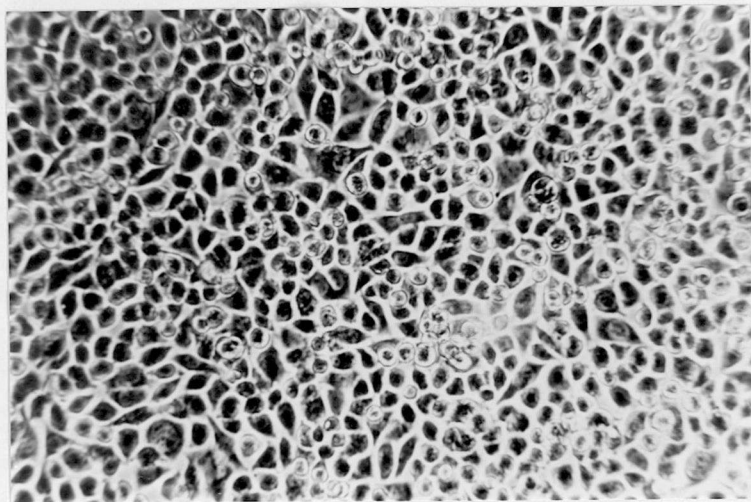


☒ 10

(a)



(b)



四 11

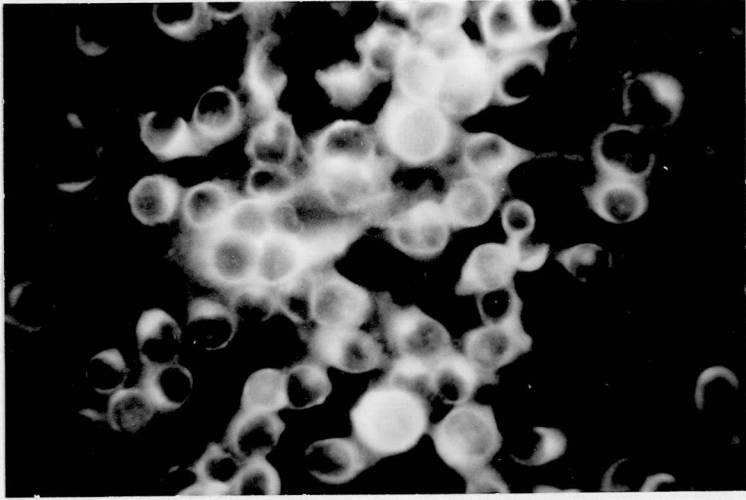


图 12

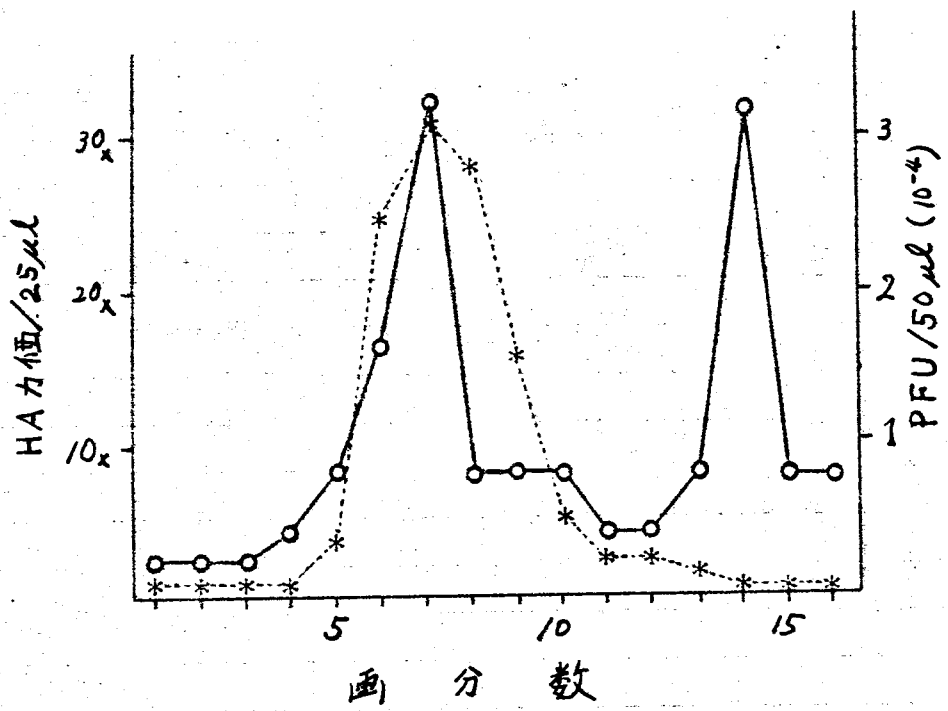
(a)



(b)







14

14

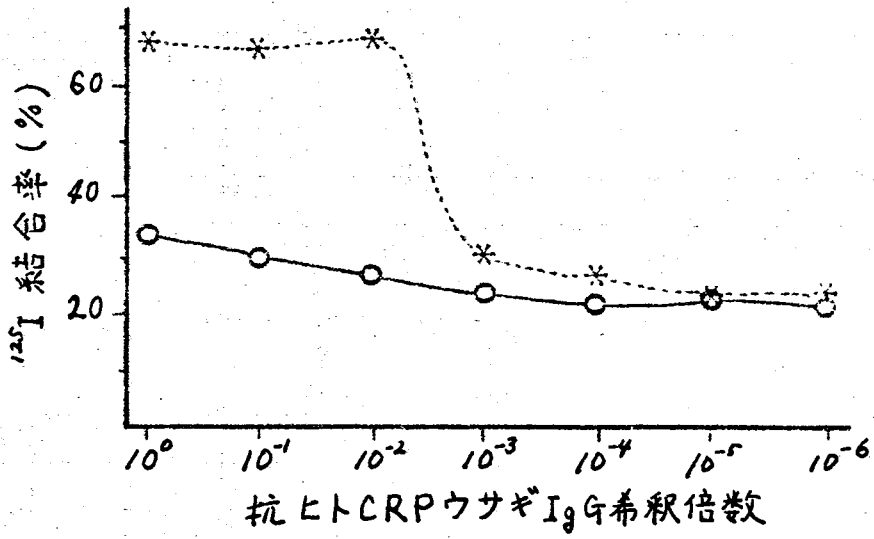


表1 慢性関節リウマチ患者血清中のC反応性たん白質(CRP)量  
と風疹ウイルス赤血球凝集抑制(HAI)抗体価,変性ウサギIgG  
感作ヒツジ赤血球凝集(RAHA)価ならびにラテックス結合(RA)試験

| 症 例   | CRP   | RA | RAHA  | RV-HAI |
|-------|-------|----|-------|--------|
| 1     | 5+    | ±  | 20480 | 512    |
| 2     | 4+    | ±  | 20480 | 256    |
| 3     | 2+    | +  | 40    | 512    |
| 4     | 3+    | +  | 320   | <8     |
| 5     | 4+    | +  | 20480 | 1024   |
| 6     | 4+    | +  | 40    | 256    |
| 7     | 1+    | +  | 40    | 64     |
| 8     | 5+    | +  | 160   | 512    |
| 9     | 1+    | +  | 20    | 32     |
| 10    | 4+    | +  | 40    | 512    |
| 11    | 3+    | +  | 2560  | <8     |
| 12    | 1+    | +  | 40    | 32     |
| 13    | 5+    | +  | 20480 | 1024   |
| 14    | 4+    | +  | 20    | 128    |
| 15    | 3+    | +  | 160   | 256    |
| 16    | 3+    | +  | 160   | 64     |
| 17    | 4+    | +  | 80    | 1024   |
| 18    | 5+    | +  | 640   | 64     |
| 19    | 3+    | +  | 10240 | 128    |
| 20    | 3+    | +  | 640   | 512    |
| 21    | 1+    | +  | 320   | 512    |
| 22    | 2+    | +  | 20    | 512    |
| 幾何平均値 | 2.81+ | —  | 330.2 | 181.1  |

CRP : C反応性たん白質 (毛细管法により測定した)

RA : リウマトイド因子のヒトIgG吸着ラテックス結合試験

RAHA : 変性ウサギIgG感作ヒツジ赤血球凝集価

RV-HAI : 風疹ウイルス赤血球凝集抑制抗体価

表2 頭頸部悪性腫瘍患者血清中の  
C反応性たん白質(CRP)量と  
風疹ウイルスHAI抗体価

| 症 例   | CRP   | RV-HAI |
|-------|-------|--------|
| 1     | 1+    | 8      |
| 2     | 1+    | 8      |
| 3     | 2+    | 8      |
| 4     | 5+    | <8     |
| 5     | 3+    | 8      |
| 6     | 2+    | <8     |
| 7     | 4+    | <8     |
| 8     | 2+    | <8     |
| 9     | 1+    | 8      |
| 10    | 1+    | 8      |
| 幾何平均値 | 1.854 | 3.48   |

表3 風疹に罹患した1例の妊婦の臨床所見,  
血清中のCRP量並びに風疹ウイルスHAI抗体価

| 風疹罹患病日<br>(日) | 妊娠期間<br>(週) | 臨床所見                         | RV-HAI, | CRP <sup>a)</sup> |
|---------------|-------------|------------------------------|---------|-------------------|
| -14           | 6           | 同居者に風疹発症<br>(発熱, 皮疹, リンパ節腫脹) |         |                   |
| -7            | 7           | 同居者の皮疹消退                     | 8x      | (-)               |
| 0             | 8           | 妊婦に風疹発症<br>(発熱, 皮疹, リンパ節腫脹)  | 8x      |                   |
| 7             | 9           | 妊婦の皮疹消退<br>関節痛出現             | 32x     |                   |
| 14            | 10          | 人工妊娠中絶                       | 1024x   | (2+)              |
| 28            |             |                              | 1024x   | (2+)              |
| 90            |             |                              | 512x    | (+)               |

a) : CRP は毛細管法により測定した

表4 間接蛍光抗体法による風疹ウイルス感染  
培養細胞でのC反応性たん白質(CRP)の検出

| 細胞                              | 風疹ウイルス<br>感染群 | 風疹ウイルス<br>非感染(対照)群 |
|---------------------------------|---------------|--------------------|
| ヒト無色素性<br>黒色腫細胞(MEC)            | +             | +                  |
| Vero 細胞 <sup>a)</sup>           | +             | -                  |
| 初代ヒト培養細胞 <sup>b)</sup><br>(HPF) | +             | -                  |
| BHK21/WI-2細胞 <sup>c)</sup>      | -             | -                  |

+ : CRP が検出されたもの

- : CRP が検出されないうもの

a) : アフリカミドリザル腎由来の株化細胞

b) : ヒト口蓋組織に由来する初代培養細胞

c) : 仔シリアンハムスター腎由来の株化細胞

各種培養細胞に風疹ウイルスをMOI 1で接種し、5% CO<sub>2</sub>培養器中で37℃にて培養した。培養2日後、感染単層培養細胞について、CRPの有無を抗ヒトCRPウサギIgGとFITCを結合させた抗ウサギIgGブタ血清を用いて、間接蛍光抗体法により、検索した。

表5 風疹ウイルス変種株(HPV-RV)の抗原的特性

| 抗血清<br>ウイルス       | 抗風疹ウイルスウサギ血清 |     |    | 抗BHK Retro ウイルス<br>ハムスター血清 |     |    |
|-------------------|--------------|-----|----|----------------------------|-----|----|
|                   | Neut.        | HAI | CF | Neut.                      | HAI | CF |
| 風疹ウイルス野生株(M-33)   | +            | +   | +  | -                          | -   | -  |
| 風疹ウイルス変種株(HPV-RV) | -            | -   | +  | +                          | +   | -  |
| BHK Retro ウイルス    | ND           | -   | -  | ND                         | +   | ND |

Neut. : 中和反応

HAI : 赤血球凝集反応

CF : 補体結合反応

ND : 実験が行なわれなかった

+ : 反応陽性

- : 反応陰性

表6 抗ヒト Retro ウイルスラット血清による風疹ウイルス  
変種株 HPV-RV 持続感染 MEC 細胞より産生された  
HPV-RVpi (MEC) ウイルスのプラック形成能の中和反応

| 抗血清<br>希釈倍数 | プラック数    | 平均   | プラック形成 <sup>a)</sup><br>抑制率(%) |
|-------------|----------|------|--------------------------------|
| 10x         | 21, 19   | 20   | 83.6                           |
| 20x         | 35, 38   | 36.5 | 70.1                           |
| 40x         | 71, 79   | 75   | 38.5                           |
| 対照          | 117, 127 | 122  | -                              |

$$a) : \text{プラック形成抑制率} = \left(1 - \frac{\text{中和試験群の平均プラック数}}{\text{対照群の平均プラック数}}\right) \times 100$$

HPV-RVpi (MEV) ウイルス溶液の 0.3 ml と等容量の希釈抗血清との混合液とを、1 時間 37℃ で反応させた。ついで混合液の 0.1 ml を BSR 単層培養細胞に接種し、プラック形成能を測定した。なお対照群は、抗血清の代わりに MEM を用いた。



表7 抗ヒト CRPウサギ IgGによる HPV-RVpi (MEC) ウイルスならびに HPV-RV ウイルスのプラック形成能の中和反応

| 抗血清<br>希釈倍数 | HPV-RVpi (MEC) ウイルス |       |                  | HPV-RV ウイルス |       |                  |
|-------------|---------------------|-------|------------------|-------------|-------|------------------|
|             | プラック数               | 平均    | プラック形成<br>抑制率(%) | プラック数       | 平均    | プラック形成<br>抑制率(%) |
| 8x          | 8, 13               | 10.5  | 93.8             | 153, 141    | 147   | 3.3              |
| 16x         | 32, 45              | 38.5  | 77.2             | 134, 155    | 144.5 | 4.9              |
| 32x         | 92, 97              | 94.5  | 44.1             | 137, 147    | 142   | 6.6              |
| 64x         | 115, 117            | 116   | 31.4             | 158, 159    | 158.5 | 0                |
| 128x        | 168, 162            | 165   | 2.4              | 149, 158    | 153.5 | 0                |
| 256x        | 171, 172            | 171.5 | 0                | 150, 164    | 157   | 0                |
| 対照          | 173, 165            | 169   | -                | 144, 160    | 152   | -                |