



Title	培養細胞におけるC反応性たん白質 (CRP) の產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	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

1

培養細胞における C 反応性たん白質  
(CRP) の產生機構と、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

2  
2,3)  
マチおよび全身性紅斑性狼瘡 (SLE) ; あるいは悪性腫瘍などがある。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 出現の起源ないしは機序については、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。  
4-9)  
10-13)

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、  
14-20)  
慢性関節リウマチにおける風疹ウイルス  
21-23)  
全身性紅斑性狼瘡での麻疹ウイルス、  
悪性腫瘍における内因性 C 型ウイルス等であ  
24-29)  
る。

また慢性関節リウマチ患者の滑液囊膜組織には 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 を產生すると報告されている。  
30, 31)

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 の產生機構を *in vitro* でいざな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°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年間に大阪大学医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。また妊婦の経過を追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°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  
近い年令層由来の 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 °C で 2 時間、ついで 4 °C 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 十、2 mm 以上 3 mm 未満のものは 2 十とし、以下同様に 5 mm 以上 6 mm 未満のものは 5 十とし、6 mm 以上のものは 6 十とした。<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 ケ設け, その周囲に, 中心穴から 2 mm の距離を隔てて 6 ケの 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 ずつの中性 CRP ウサギ血清を加えた。この寒天ゲル層を湿室中に入れて, 4 °C 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> 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

）を用いてスライドグラス法により判定した。すなわち 56 °C 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) <sup>35)</sup> は以下に述べるように行なった。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、木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 °C 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 を吸着させた木ルマリン固

定上シジ赤血球（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 細胞ならべに培養法

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）ならべ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-1</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> 空気中で、37°C 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> 、ならべに寒天増殖培地中で形成された BHK21/WI-2 細胞のコロニーをバスツール・ピペットで分離することにより得たクローンで、風疹ウイルスのプラック

形成に好適な BSR 細胞<sup>39)</sup> の両者は、MEM に 5% 仔牛血清、2 mM L-グルタミン および 10% トリペ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>2+</sup>、Mg<sup>2+</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  $20 \times 10^4 / \text{ml}$  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。すなは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、ハサミで細切り、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 ペトリ皿面に密に 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、 繼代 培  
 養を行なつた。細胞の 繼代は 4-5 日 間隔で  
 行い、 実験には 繼代数 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 同様の 方法により、  
 培養した。

### 立 ウイルス

風疹ウイルス M-33 株 (40) (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ウイルスとの合の子である風疹ウイルス  
 変種株 <sup>41)</sup> HPV-RV を使用した。すなはちこれら  
 ウイルスを感染多重度 (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  
 °C で培養し, 培養後 6 日目で感染単層培養細  
 胞にウイ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  
 養上液を採取した。この上液を低速遠心して  
 細胞残渣を除いた上清を種ウイルスとして使  
 用した。なお種ウイルスは実験に使用するま  
 で -70°C に保存した。

#### Ⅴ 風疹ウイ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來の 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,  
 風疹ウイルス変種株 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  
 °C で培養した。培養後約 6 日目に <sup>HPV-RV</sup> 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、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) より產生されていふウイルス【以下のウイルスを 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单層培養細胞を 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層し、5 % CO<sub>2</sub> 培養器中、37 °C で培養した。6 日目に、感染单層培養細胞を 0.33 % (v/v) = エートラルレット 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。

#### 四 風疹ウイルス未血球凝集反応 (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<sup>4</sup> ないし 10<sup>5</sup> PFU/0.1ml の感染力価の風疹ウイルス溶液に初容量の 1.25 % Tween 80 (石津製薬、大阪) D-PBS (pH, 6.6) 溶液を加えて 0 °C 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初容量のエチルエーテルを加え、4 °C 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、抗原を保有する下の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 力値をマイクロ定量法により測定した。すなは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倍数を HA 力値とした。

HAI 力値の測定：被検血清に含まれてゐ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 1 M 塩化マンガン溶液およびヘパリン溶液 (500 単位/ml) を加え、0℃ で 15 分間混和し、沈殿を生成させた。ついて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°Cで30分間混和した後, 300 ×gで10分間遠心した。上清として得られた処理血清の25 µlを前記の牛血清アルブミン D-PBS (pH, 6.6) 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 µl 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。

#### IV ウィルスのプラック形成能に対する中和反応

ウィルス液 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°C 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, 抗血清の代りに MEM とウィ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、対照においてベトリ皿あたり 100-200 のプラツクを形成するよう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  $56^{\circ}\text{C}$ 、30 分間加熱して非働化した。

## 五 ウイルス精製法

MEC 細胞より產生されているヒト 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）。すなはち 5 日間培養した MEC 細胞の培養上清 300 ml 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 1 ml の 0.01 M 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 0.5 ml 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/v) に調製] 4 ml 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<sup>43)</sup>の方法により、定量した。

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3画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。

## XI 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1mlずつを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°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 づつを、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。すなはち  $24 \text{ mm} \times 32 \text{ mm}$  のカバーガラス上に、 $37^{\circ}\text{C}$  で 2 日間培養した粗な单層培養細胞を、 $4^{\circ}\text{C}$  で冷却した 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。空気中に 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  $37^{\circ}\text{C}$ 、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  $37^{\circ}\text{C}$  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。

。この標本は螢光顕微鏡（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、間接螢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>44)</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 デオキシヌクレオチド (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 Ch mi. ) ならびに  $^3\text{H}$ -TTP 200  $\mu\text{Ci}$  ( 基放  
 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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{g}$  と 10 % トリクロル酢酸 ( 石  
 津製薬 ) の 3 ml 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  
 ンフィルター ( HA 型, 孔径 0.45  $\mu\text{m}$ , 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 の鉄型としてエン  
 ドヌクレアーゼで処理されていない仔牛胸腺  
 DNA 10  $\mu\text{g}$  を使用し, 上記と同様の方法で, 測

定した。

#### 45) **XIV ラジオイムノアッセイ**

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 °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,  $^{125}\text{I}$  とウイルスたん白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 °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 °C で 3 時間静置し, 生じた沈殿物の放射活性をカウンター (Aloka PS-201, 日本無線医学

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は、上記ホウ酸緩衝液により最終濃度が 1 mg/ml となるよう調製したヒト CRP (Behringwerke, W.Germany) 50 µl 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。

#### 四 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% に存すよう希釀したグルタルアルデヒド (石津製薬) を用いて 2 時間固定した。固定された MEC 細胞をラバーポリスマンを用いてガラス面より採取し、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 °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, テロビレンオムニド (石津製薬) を浸透させた後, 固定細胞<sup>46)</sup>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 °C, 45 °C, 60 °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  $\mu$  の超薄切片とし, 4% 酢酸ウラニルならびに水酸化鉛による二重染色した。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、風疹ウイルスの慢性感染が、近年、示唆されて<sup>14-</sup><sup>20)</sup>いる。また慢性関節リウマチ患者の滑液囊膜組織には、CRP が検出されると報告されている<sup>30)</sup>。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 2.81 ± 1.01 mg/l、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 3.6 倍であった。また慢性關

節リ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 512 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。一方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、512 倍以上の値を示すものは 23 例にすぎなかつた。

以上述べた血清疫学的調査結果は、慢性関節リ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、慢性関節リ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つた（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つた。すなやち、CRPの產生は、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つた。しかし血清中のCRP量を経時的に測定すると、病勢の推移とともにあって、その値が大きく変動することは臨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、長期間にわたつて高値を維持する<sup>47, 48)</sup>ことが知られてゐる。したがつて、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なければ事実は

、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にはつながらない。

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か否かについて、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 日後に妊娠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>。この妊娠においても先天性風疹症候群児出生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、人工妊娠中絶が行なわれた。

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、これららの特異抗原は検出されなかつた。

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は、以下に述べる実験を行なつた。

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 を產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 の產生とその誘

## 導因子

風疹ウイルスが感染していなか 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 が産生されていける可能性について検討を加えた。すなはち 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  $100,000 \times g$  2 時間超遠心に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、 $100,000 \times g$  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、無色素性黒色胞由来の 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 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 分まで経時に酸不溶分画への H-TMP の取りこみは増量し、それ以後プロトナーに達した。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 ウィ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 細胞より產生されていいる CRP は、この細胞より產生されていいる Retro ウィルス粒子の一構成部分として、あるいはこのウィ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。

#### 又 風疹ウィルス変種株 HPV-RV 持続感染

MEC 細胞より產生されてい子ウィルスの生物学的特性

風疹ウィルスが Retro ウィルスを保有する BHK 細胞に持続感染した場合、持続感染細胞より產生されていウィルスは風疹ウィルスと BHK Retro ウィ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 細胞に風疹ウィルスを持続感染させた際にも、持続感染 MEC 細胞より產生されるウィルスは風疹ウィルスと MEC 細胞の Retro ウィルスとの合の子であり、その抗原としての特性は両ウィルスのモザイクになつ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 細胞より產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は、風疹ウイルス変種株 HPV-RV が持続感染した MEC 細胞より產生されているウイルス粒子 HPV-RVpi (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>41)</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ってではなく、抗 BHK Retro ウイルス血清によっ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は、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-RVpi(MEC) を自発的に產生しており、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-RVpi(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-RVpi(MEC) ウイルスのプラック形成能の 83.6

%が、また40倍希釀抗血清により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、少くとも一部を保存していることが、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倍希釀抗血清では 93.8%，32倍希釀抗血清では 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、全く中和されなかつた。

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。

#### Ⅴ 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) ウィルスのプラツ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) ウィ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) ウィルス粒子を <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) ウィ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) ウィ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 効価と BSR 細胞でのプラツク形成能による感

染力価を測定した。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 $10^0$ 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 $10^0$ から $10^{-2}$ 希釈の抗ヒトCRPウサギIgGによつて、その約70%が結合されて沈殿すること、 $10^{-3}$ から $10^{-6}$ 希釈の抗血清では約24%が結合することが判つた。またこの反応系に $50\text{ }\mu\text{g}$ 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、 $10^0$ 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。

## 考案

Tillet と Francis によって 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、また產生された CRP の生物学的特性に關しても、ほとんど明らかにされていない。

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。最近これら疾患において、その病因として内因性 Retro ウィ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、その病葉組織の細胞 DNA に RNA ウィ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 ウィルスが発現し、この Retro ウィ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、Newzealand 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、白血病にたり死に致るが、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。また腎糸球体の病葉部には、Gross の白血病ウイルス抗原が存在することが、螢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 ウィルスが関与することを、強く示唆している。

一方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<sup>61)</sup>いる。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, たとえば白血病, 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<sup>62-69)</sup>いる。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る場合にも, 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<sup>70)</sup>いる。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ふ 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 の產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ることは、当を得ていいと言えよう。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>41)</sup>、また妊娠血清では高頻度に CRP が検出されるという事実より、CRP と内因性 Retro ウィルスとの関連性は興味ある研究対象と考えられる。

著者はまず、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<sup>42)</sup>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<sup>43)</sup>ると報告している。

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

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產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 產生機構と 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、しがれ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にのみ、浮遊密度の高い粒子形態をとった CRP が產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、自発的に產生していゝ Retro ウイルス粒子の外殻に CRP を保有していゝことを示した。すなはち、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ゝ 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つた。その理由としては、この細胞の内因性 Retro ウイルスは、CRP を產生する遺伝子を欠失していゝ可能性が考えられる。もつとも、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 を保有していゝ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、均一な人白質として検出される。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 ウィ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 ウィ  
ルス粒子は認められないとの報告がある<sup>73)</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 ウィルス粒子が  
発現したとしても、直ちにそのウィルス粒子  
は破壊され、その結果、破壊されたヒト Retro  
ウィ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 ウィ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 ウィルスを誘発する<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 イミド 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ィルスやヘル

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。従うとすれば、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ない。

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 反応性たん白質 (CRP) の产生機構および 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 の產生を、風疹ウイルスを CRP の誘導因子として、検討した。その結果、以下に述べた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、その間に推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 倍に過ぎなかつた。

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 抗体価の上昇に伴なつて CRP 量が増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、ヒト口腔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つた。

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、他で 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 ウィルス粒子が認められた。なおこの Retro ウィルス粒子は庶糖密

度勾配遠心法により精製した。

Ⅳ 風疹ウイルス変種株 HPV-RV が持続感染した MEC 細胞より產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投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 の両者により、中和された。

Ⅴ  $^{125}\text{I}$ 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 細胞が產生する 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いた口腔外科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

いた口腔細菌学講座小谷尚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. ~~820~~ 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(PPLO) in human leukemia. *Cancer.* 18, 1345-1368.

26) Dmochowski,L., Seman,G. and Gallagher,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 bone marrow 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) Vaheri,A., Sedwic,W.D., Plotkin,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. 既大歯学誌. 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。 *大阪歯学誌.* 22, 174-194, 昭和 52.

- 67) McAllister, R.M., Nelson-Rees, W.A., Johnson, E.Y., Ronney, 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 Japnese 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.Scie.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 parallelly 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 cytoplasms.

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,  $^{125}\text{I}$ -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.

図説明 1

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)

図説明 2

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

相関系数  $r = 0.35$

図説明4

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

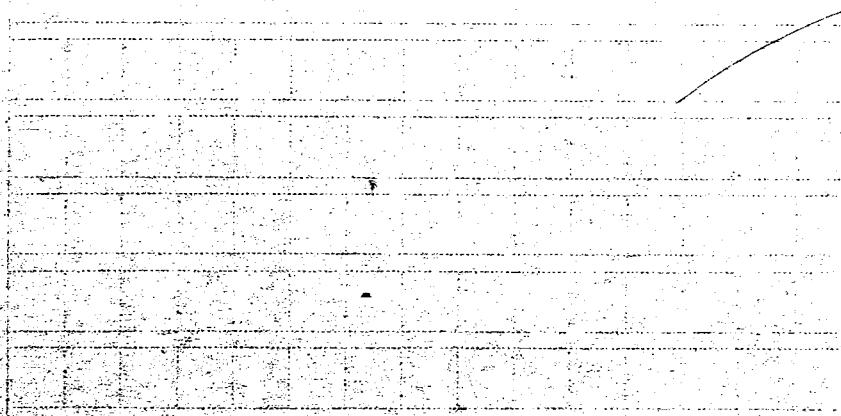
図説明5

図5 説明

風疹に罹患した妊娠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



クヨーマルX20

図説明

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  $37^{\circ}\text{C}$  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

## 回ク 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 細胞の培養上清に產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つては、DNA の鉢型として、エンドヌクレアーゼで処理されていない仔牛胸腺 DNA  $10\ \mu\text{g}$  を反応液に添加した。

図説明10

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

図説明11

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 ウィルス抗原は、抗 HPV-RV ラサビ血清と FITC を結合させた抗ラサビ IgG デタ血清を用いて、間接螢光抗体法により、同定した。

HPV-RV ウィ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) ウィルスならびに 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 力値ならびに感染力値

○—○ : HA 力値

\*---\* : 感染力値

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/v) ] の 4 ml に重層し, 56,000 × g 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 力値ならびに BSR 単層培養細胞でのプラック形成を指標とした感染力値を測定した。

## 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°C で反応させた。抗ウサギ IgG ブタ血清 90  $\mu\text{l}$  を加え、4°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殿物に取込まれた  $^{125}\text{I}$  の放射活性を測定した。

$^{125}\text{I}$  結合率は  $\frac{\text{沈殿に取込まれた放射活性(cpm)}}{\text{反応系全体の放射活性(cpm)}} \times 100$  % 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

図説明15

調べる際には、上述の系に精製ヒト CRP (50  
μg) を加えた

図1

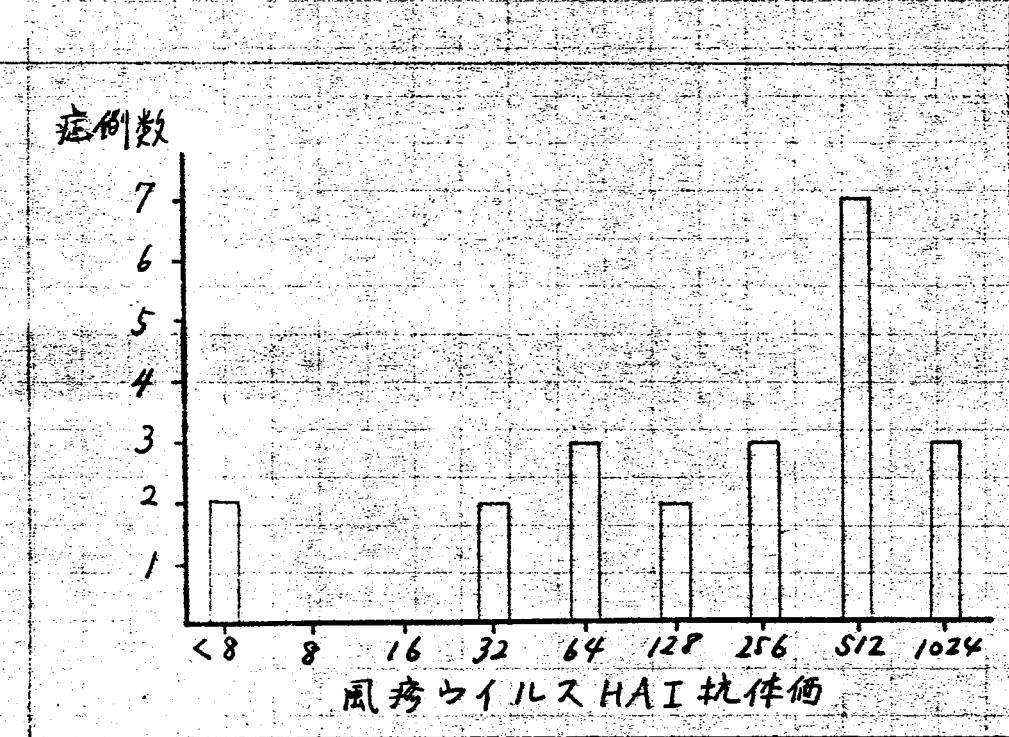


図2

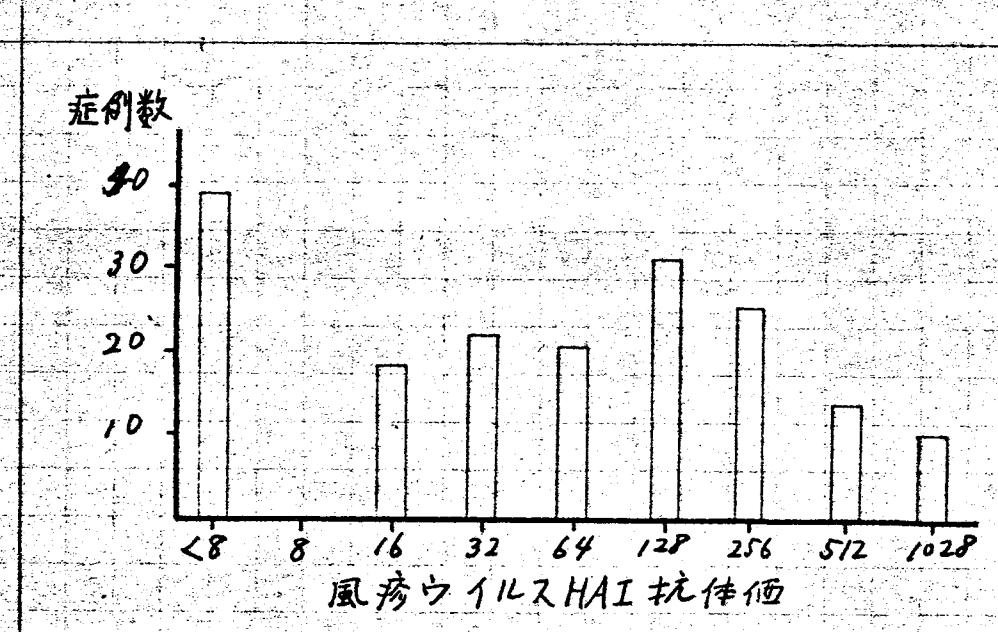


図3

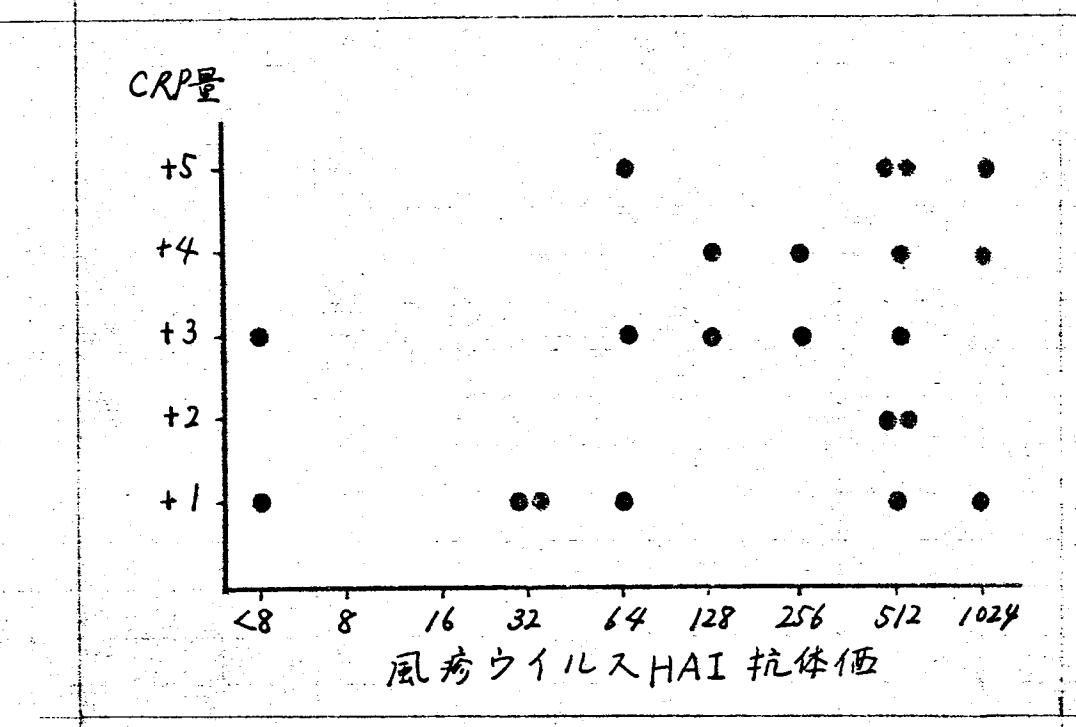


図4

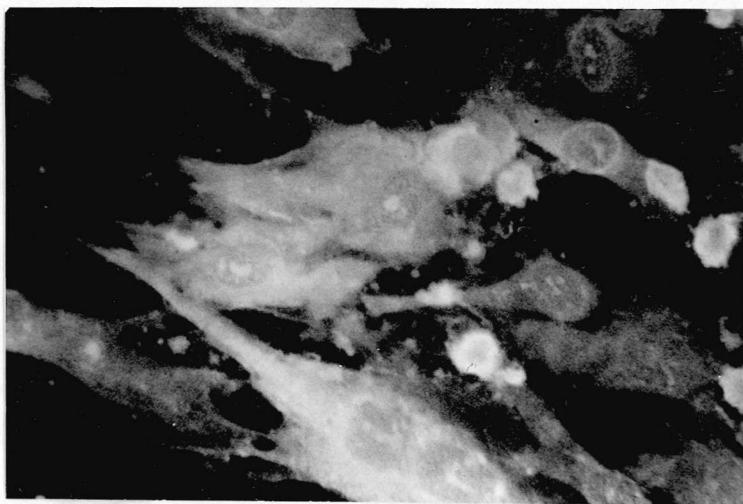
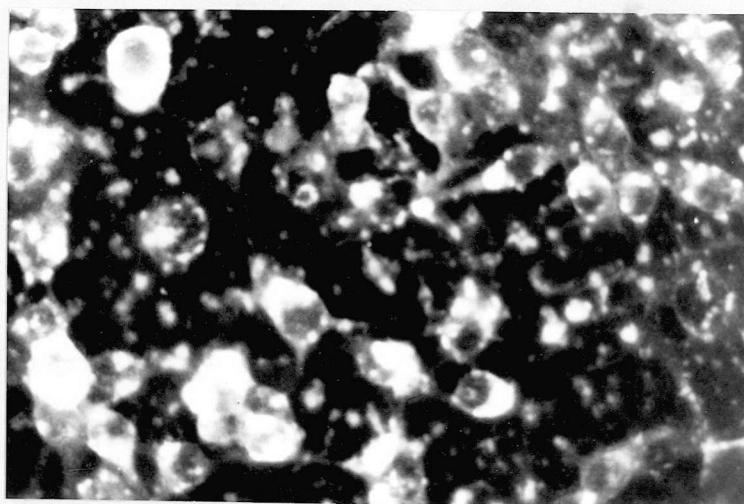


圖 5



図6

(a)



(b)

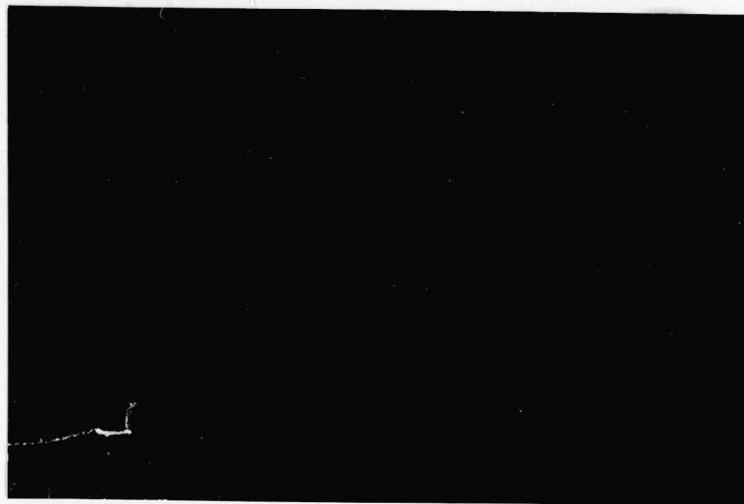
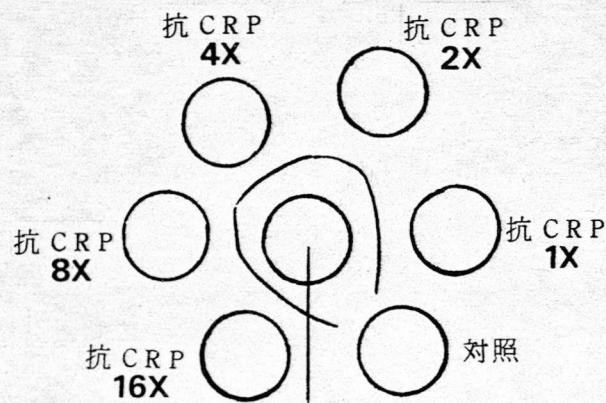
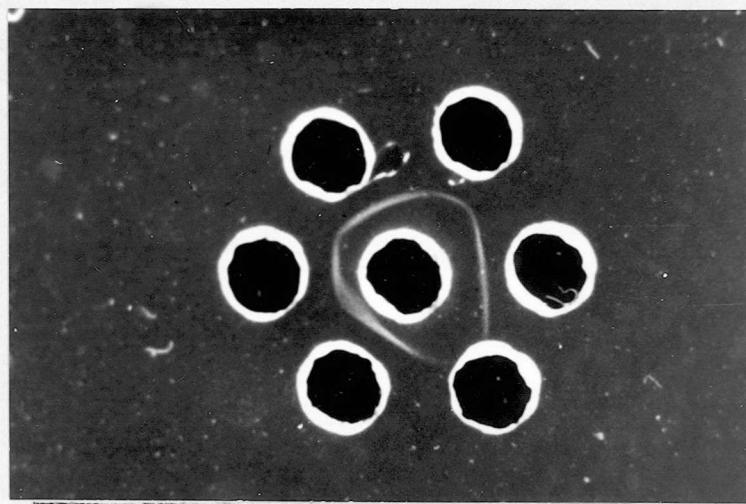


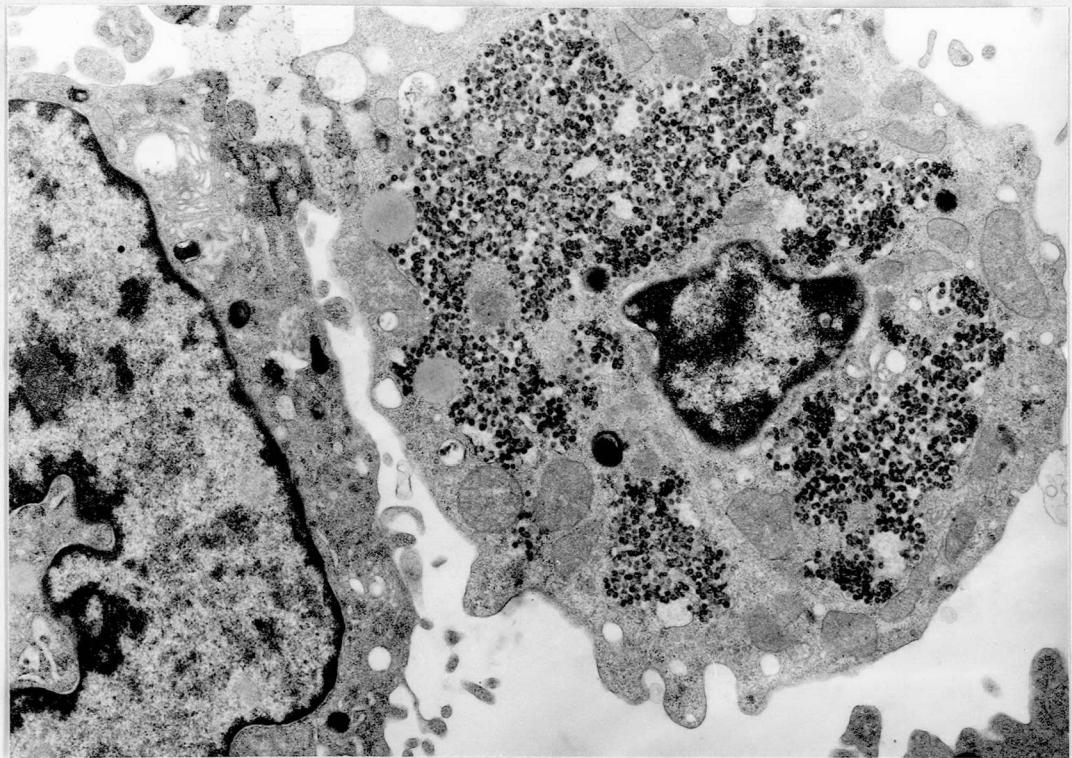
図 7



M E C 細胞培養上清より 超遠心して得た沈渣

☒ 8

(a)



(b)

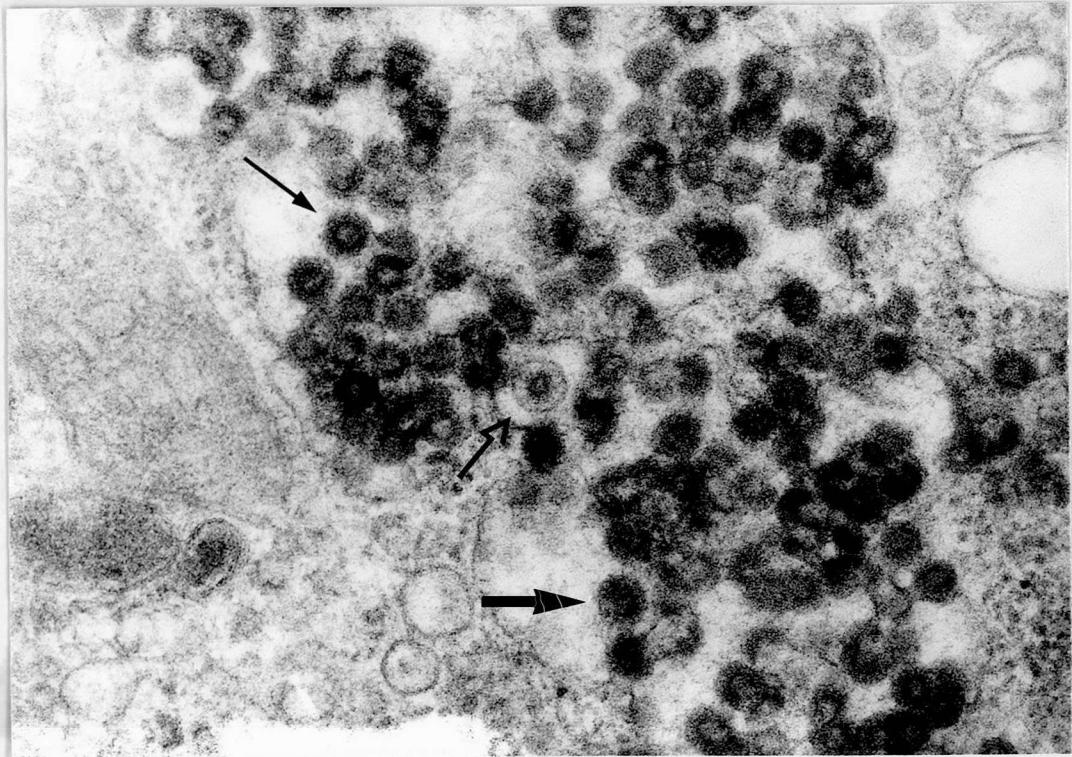


図9

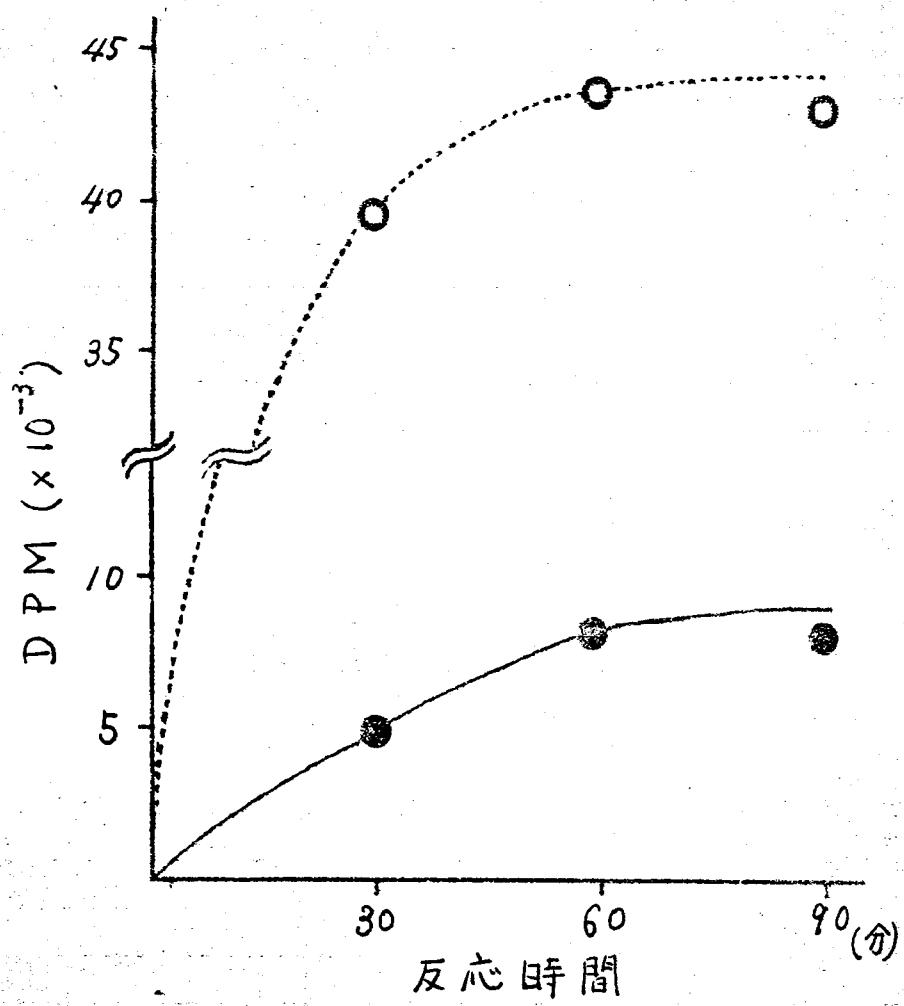
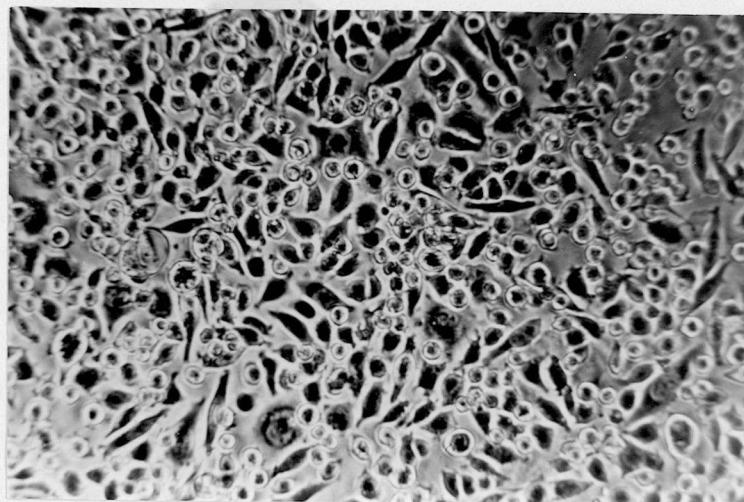


図 10

(a)



(b)

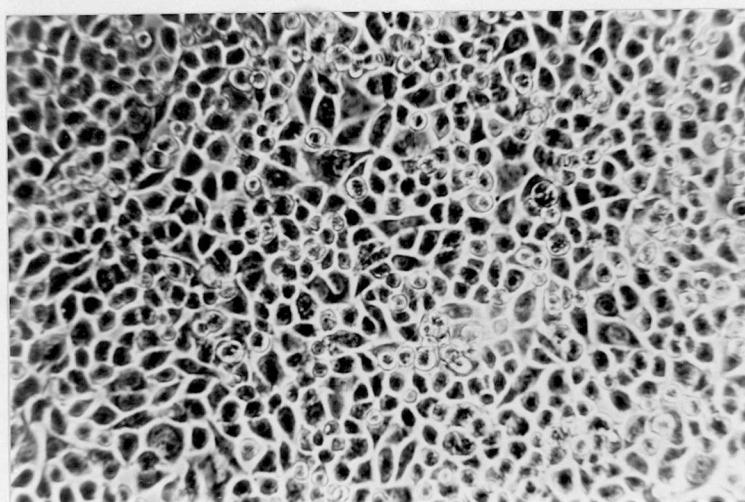


图 11

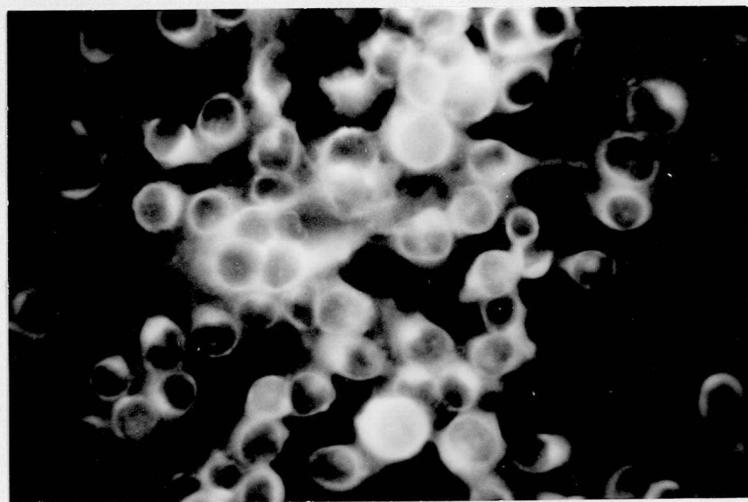


図12

(a)



(b)



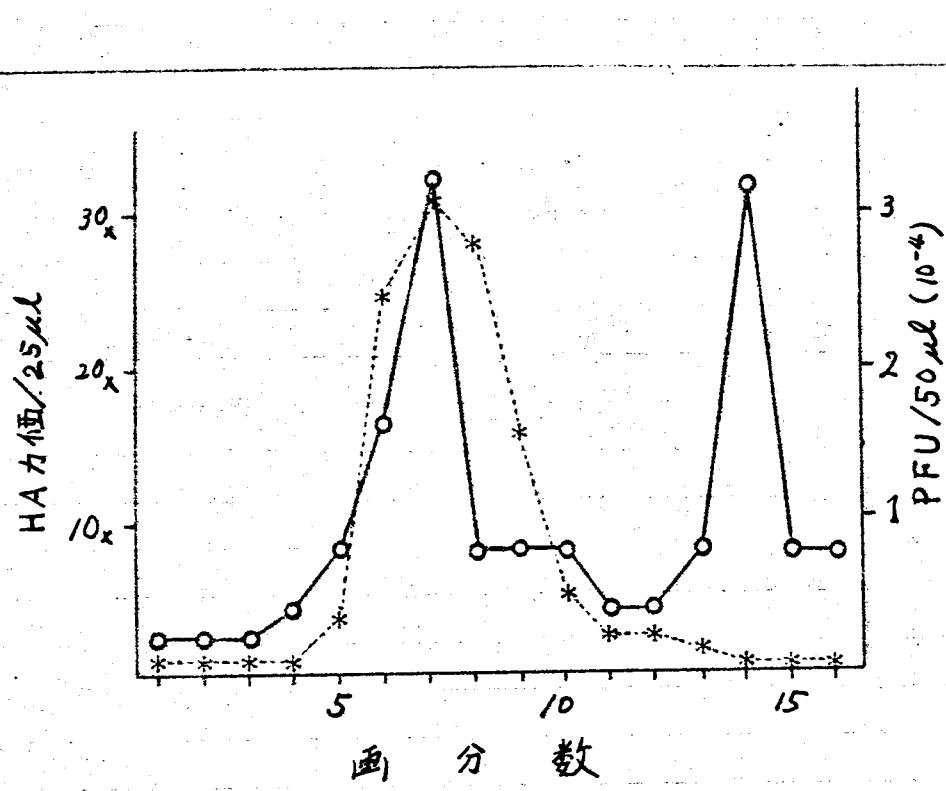


図14

図14

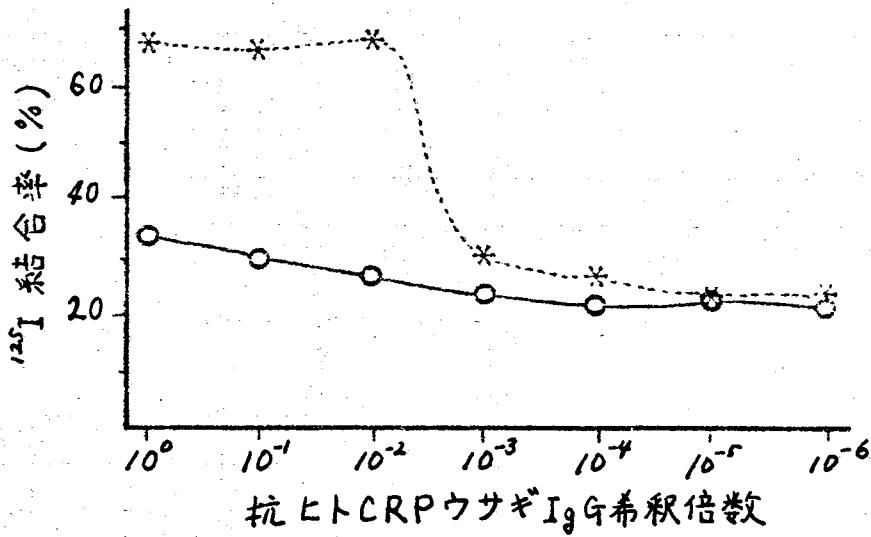


表1 慢性関節リウマチ患者血清中の C 反応性たん白質 (CRP) 量  
と風疹ウイルス赤血球凝集抑制 (HAI) 抗体価, 変性ウサギ IgG  
感作ヒツジ赤血球凝集 (RAHA) 価ならびにラテックス結合 (RA) 試験

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
差	平均値	2.81+	—	330.2
				181.1

CRP : C 反応性たん白質 (毛細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抗体値

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例の妊娠の臨床所見、  
血清中のCRP量ならびに風疹ウイルスHAI抗体価

風疹罹患病日 (日)	妊娠期間 (週)	臨床所見	RV-HAI, CRP <sup>a)</sup>
-14 - 6		同居者に風疹発症 (発熱, 皮疹, リンパ節腫脹)	
-7 - 7		同居者の皮疹消退	8x (-)
0 - 8		妊娠に風疹発症 (発熱, 皮疹, リンパ節腫脹)	8x
7 - 9		妊娠の皮疹消退 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 感染群	風疹ウイルス 非感染(対照)群
ヒト無色素性 黒色腫細胞(MEC)	+	+
Vero 細胞 <sup>a)</sup>	+	-
初代ヒト培養細胞 <sup>b)</sup> (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

ウイルス	抗血清			抗風疹ウイルスウサギ血清			抗BHK Retroウイルス ハムスター血清		
	Neut.	HAI	CF	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つた

+: 反応陽性

-: 反応陰性

表6 抗ヒト Retro ウィ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 細胞より產生された  
HPV-RVpi (MEV) ウィルスの プラック形成能の中和反応

抗血清 希釈倍数	プラック数	平均	プラック形成 <sup>a)</sup> 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) : 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) ウィルス溶液の 0.3ml と等容量の希釈抗血清  
との混合液とを、1時間 37°C で反応させた。ついで混合液の  
0.1ml 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、抗血清の代りに MEM を用いた。

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

抗血清 希釈倍数	HPV-RVpi (MEC) ウィルス			HPV-RV ウィルス		
	プラック数	平均	プラック形成 抑制率(%)	プラック数	平均	プラック形成 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	-