The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ムンプスウイルス持続感染細胞におけるウイルス遺伝子の存在様式ならびに発現調節機構
Author(s)	由良, 義明
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/32611
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

ムンプスウイルス持続感染細胞におけるウイルス遺伝子の存在様式ならびに発現調節機構

由良義明

昭和55年1月14日受付

緒言

ムンプスウイルスは生体に慢性感染した場合糖尿病[1]，心内膜線維弾性症[2]，中枢神経系の疾患[3]などの病因になり得ることが明らかにされている。それゆえに，これらムンプスウイルス慢性感染によると考えられる疾患の病因を明らかにするためには，慢性感染の成立機構を解明することが必要である。このウイルス慢性感染確立機構の解析は，ムンプスウイルスのみならずその他の非腫瘍原性

脚注

No.

RNA型ウイルスにおける重要な課題である。そこで生体での慢性感染のモデルシステムとして培養細胞を用いたin vitroの実験系で，持続感染に関する研究が進められている。現在までに，RNA遺伝子欠損型ウイルス粒子[4~7]，温度感受性変異株ウイルス[8~10]及びインターフェロン[11,12]など，いくつかの持続感染確立機構に関与すると考えられる因子が提示されている。その中で，持続感染したウイルスのRNA遺伝子が逆転写され，DNA中間体を形成することが持続感染系確立のために必須であるという報告がある[13~16]。すなわち持続感染細胞に潜在するレトロウイルスの逆転写酵素の働きにより，持続感染したウイルスRNAはDNAに逆転写された後，宿主細胞の染色体DNAにproviral DNAとして組み込まれて，安定な状態で宿主細胞内に存在し続けると考えられている。しかしながら，このようなDNA中間体を介した非腫瘍原性RNA型ウイルスの持続感染様式に関して，異論を唱える報告も

ある[17,18]。

一方外因性レトロウイルスであるトリ骨髄芽球症ウイルスが感染している細胞に，ラブドウイルス群に属する水胞性口内炎ウイルス（VSV）等の他のRNA型ウイルスが重感染した場合には，両ウイルス間の表現型モザイクウイルスが出現することが明らかにされている[19～21]。また風疹ウイルスが持続感染し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細胞において，宿主細胞に潜在する内因性レトロウイルスと風疹ウイルスとの合の子が形成されたという報告がある[10,22～24]。この事は，レトロウイルスの発現が認められる培養細胞に非腫瘍原性RNA型ウイルスを感染させた時，このウイルスRNAはproviral DNAに逆転写されるという可能性を強く示唆している。

そこで本研究は，生体におけるムンプスウイルス慢性感染のモデルシステムとしてBHK21/WI-2細胞を用いてin vitroで確立した持

続感染細胞系において，ムンプスウイルスRNA遺伝子の宿主細胞での存在様式を検索した。

実験材料及び実験方法

1. 細胞並びに細胞培養法

仔シリアルハムスター腎由来の株化細胞であるBHK21/WI-2細胞[25]，アフリカミドリザル腎由来の株化細胞であるVero細胞[26]，ヒト子宮頸癌由来の株化細胞のHeLa細胞[27]，及び軟寒天中で形成されたBHK21/WI-2細胞のコロニーよりクローニングして得たBSR細胞[28]を使用した。BHK21/WI-2，Vero並びにBSR細胞はイーグルの最少必須培地[29](MEM)(日水製薬，東京)に5%の仔牛血清(大阪大学微生物病研究会製，大阪)と2mMのL-グルタミンを加えて調製した増殖培養液を用いて培養した。

これら細胞の継代培養は以下に述べるよう

に行なった。すなわち，密に増殖した単層培養細胞をCa^{++}，Mg^{++}脱リン酸緩衝液（pH 7.2）に1.4%にエチレンジアミン四酢酸ナトリウム（EDTA，石津製薬，大阪）と0.5%のトリプシン（大阪大学微生物病研究会）を含むように調整した水溶液（EDTA－Trypsin）にて室温で約3分間処理し，細胞を採取した。その後，EDTA－Trypsinを除去するために細胞をMEMにて洗浄し，増殖培養液を用いて20×10^4個/mlとなるように細胞浮遊液を調整した。この細胞浮遊液15mlを90mm径ガラスペトリ皿に植え込み，5%CO_2培養器中で37℃にて培養した。なお細胞の継代は3～4日間隔で行なった。

2．ウイルス

実験には弱毒化ムンプスウイルス占部株[30]（大阪大学微生物病研究所奥野良臣博士より恵与された）とNewcastle disease virus（NDV）[21]を使用した。弱毒化ムンプスウイルス占部株（以下MTと略記する）はVero細胞で，NDVは

BHK21/WI-2 細胞で増殖させた。すなわち，単層培養細胞に感染多重度（MOI）が1になるようにウイルスを接種し，1時間吸着させた。その後，未吸着ウイルスを除去するために感染単層培養細胞をMEMにて3回洗浄し，増殖培養液を加え37℃にて培養を継続した。ウイルス感染により生じた細胞変性が感染単層培養細胞の70～80％に出現した時点で，培養上清を採取し，300×gで10分間遠心して細胞残渣を除去した上清を種ウイルスとした。MV並びにNDVとも，感染3日目に培養上清を採取した。なお，実験に使用するまで−80℃に保存した。

3．ウイルス感染力価測定法

MVおよびNDVの感染力価はBSR単層培養細胞でのプラック形成能により測定した。細胞を10^6個，50mm径ガラスペトリ皿に植え込み，5％CO_2培養器中で37℃にて2日間培養した。その後，密に増殖した単層培養細胞に，MEMにて10倍階段希釈したウイルス溶液を0.1ml

接種し，37℃で1時間吸着させた。その後，単層培養細胞をMEMで洗浄して未吸着ウイルスを除去し，最終濃度1%の割合に寒天(Special Agar Noble, Difco, Laboratories, Detroit, Mich., USA)を含む増殖培養液を重層して，5% CO_2 培養器中で37℃にて培養した。形成されたプラックは，Dulbecco のリン酸緩衝液(D-PBS，pH 7.2)にニュートラルレッドを0.33%(w/v)の割合に含むように調整した染色液0.2mlを寒天培養液上に加え，37℃で約3時間染色した後算定された。ウイルスのプラック形成能は plaque forming unit (PFU/ml) で表現した。なおプラックの出現には，MTで6日間，NDTでは4日間の培養を必要とした。

4. ムンプスウイルス持続感染細胞の確立

BHK21/WI-2 細胞(3×10^6個)を90mm径ガラスペトリ皿に植え込み，37℃にて2日間培養して密に増殖した単層培養細胞にMTをMOI 1にて接種した。37℃にて1時間吸着後，感染単層細胞をMEMを用いて洗浄し，未吸着ウイル

スを除去した。その後，増殖培養液を15mlを加え，5%CO_2培養器中で37℃にて培養した。培養4日目にはウイルス感染により生じた巨細胞形成を特徴とする細胞変性が出現し，培養1週間後には，ほとんどの細胞が死滅してガラス面より遊離した。しかしながら，さらに培養を継続すると，一部生残している細胞が増殖し約3週後には細胞集落を形成した。そこで，この細胞集落をEDTA-Trypsinにて処理し，採取した細胞を継代培養した。継代を重ねるに従い巨細胞の出現は減少し，しだいに安定した増殖を示す細胞系が確立された。この細胞をムンプスウイルス持続感染BHK21/WI-2細胞（以下BHK(MV)細胞と略記する）として実験に供した。BHK(MV)細胞の継代数約15代迄は，著明な巨細胞の出現を認めたが，以降しだいに変性細胞の出現は減少し細胞継代数50代を越える頃には，BHK(MV)細胞は形態学的に非感染BHK21/WI-2細胞とほとんど同じとなった。なお実験には，継代数75～80代の

BHK(MV) 細胞を使用した。

5. 間接螢光抗体法

BHK(MV) 細胞におけるムンプスウイルス抗原の存在を間接螢光抗体法により検索した。細胞を24×32mmのカバーグラス上で37℃にて2日間培養した。カバーグラス上に粗に増殖した単層培養細胞を4℃に冷却したD-PBSにて3回洗浄した後，冷アセトン(4℃)にて10分間固定した。固定細胞からアセトンを完全に除去するために室温で1時間放置した後，アセトン固定細胞標品にD-PBSで10倍希釈した抗ムンプスウイルスラット血清を加えて，湿度100%の容器中で37℃にて1時間反応させた。未反応の抗血清は振盪器上で1時間D-PBSで洗浄することにより除去した。その後，螢光色素フルオレセイン・イソチオシアネイト(FITC)を結合させた抗ラットγ-グロブリン家兎IgG (Miles Laboratories, Elkhart, Ind, USA)と37℃で1時間更に反応させた。再びD-PBSを用いて未反応IgGを洗浄により除去し，90

%グリセリン(V/V)を含む0.5M炭酸緩衝液(pH9.5)にて封入し，螢光顕微鏡(日本光学，東京)を用いてUV励起下で観察した。写真撮影にはKodak high speed extachrome (ASA 200)を使用した。

7. 赤血球凝集反応および同抑制反応

ムンプスウイルス粒子の保有する赤血球凝集能(HA)は，1日令ヒヨコ赤血球を使用してマイクロタイター法にて測定した[31]。ウイルス標品25μlをD-PBSにて連続的に2倍階段希釈したものに，等容量のD-PBSを用いて0.33%(V/V)の割合になるように調整した1日令ヒヨコ赤血球浮遊液を加えた。室温に1時間静置後，赤血球の凝集像を観察した。HA力価は赤血球凝集反応を示すウイルス標品の最高希釈倍数でもって表現した。

抗ムンプスウイルス血清の赤血球凝集抑制(HAI)抗体価は以下に述べるように測定した。抗血清25μlをD-PBSにて2倍階段希釈した後，等容量の4単位のHA力価を保有するウイ

ルス標品を各々の希釈抗血清と混和し，37℃で1時間反応させた。その後0.33%の1日令ヒヨコ赤血球浮遊液50μlを加え，室温で1時間静置して赤血球凝集像を観察した。抗血清のHAI力価は，赤血球凝集反応を阻止する抗血清の最高希釈倍数でもって表現した。なお抗血清は実験に使用するまえに，抗血清中に含まれる非特異的赤血球凝集阻止物質を除去するために，抗血清0.5mlに対しコレラ菌異型株558の培養沪液より得たReceptor destroying enzyme(RDE，武田薬工，大阪) 1.5mlを加え37℃で一夜処理した。その後，56℃30分間熱非働化することによりRDEをも不活化した処理抗血清を実験に使用した。

8. 中和試験

感染性ウイルス粒子の抗原性を解析するために，種々の抗血清を用いてウイルスのプラック形成能の中和試験を行なった。

ウイルス標品0.3mlと等容量のMEMにて10倍階段希釈した希釈抗血清とを混和し，37℃

で1時間反応させた。その後,反応混合液0.1mlをBSR単層培養細胞に接種した。37℃にて1時間吸着後,未吸着ウイルスと抗血清を除去するために感染単層培養細胞をMEMにて3回洗浄し,寒天増殖培養液を重層した。その後,37℃にて約6日間培養を行なって出現したプラックを算定した。対照としては,抗血清の代りにウイルス標品とMEMとを混和し,抗血清を用いた中和試験と同様に処理した。なお実験に使用したウイルス標品の感染力価は対照において,約100－600個のプラックを形成するように調整した。抗血清のウイルスのプラック形成能を中和する力価は,対照と比較して50%のプラック形成減少率を与える抗血清の最高希釈倍数で表現した。

9. 補体結合反応

ムンプスウイルス標品の補体結合(CF)抗原力価は,既知のCF抗体力価を保有する抗血清を用いて,補体結合反応を利用したマイクロタイター法にて測定した[32]。

ウイルス標品25μlをベロナール緩衝液（pH 7.5）にて2倍階段希釈したものに，等容量の4倍のCF抗体力価を保有する抗ムンプスウイルス血清と50μlの補体力価2単位となるように調整したモルモット血清とを混和し，4℃で18時間反応させた。この反応混合液に対し，あらかじめベロナール緩衝液にて3%（V/V）に調整した羊赤血球浮遊液と3単位の溶血力価を保有する抗羊赤血球家兎血清（Flow Laboratories, Inc., Rockville, Md., USA）とを等容量ずつ混和して調製しておいた感作赤血球を50μl加え，37℃で1時間反応させた。反応後，羊赤血球の溶血像を観察した。ムンプスウイルス標品の保有するCF抗原力価は，溶血反応を示さないウイルス標品の最高希釈倍数でもって表現した。なお反応には，56℃30分間熱非動化した抗血清を使用した。

10. ムンプスウイルス精製法

Vero細胞を用いて1度増殖させた弱毒化ムンプスウイルス占部株および持続感染BHK(MV)

細胞が産生するムンプスウイルス（以下MVpiウイルスと略記する）は以下に述べるように精製した。

ウイルス粒子を含む培養上清を17,000×gで30分間遠心して細胞残渣を除去した後，100,000×g 2時間超遠心してウイルスを沈渣とした。この沈渣を少量の10mMトリス塩酸緩衝液（pH8.0）に懸濁し，約500倍に濃縮した粗ウイルス標品を調製した。粗ウイルス標品0.5mlを cellulose nitrate ultracentrifuge tube (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA) 中で形成した4mlの15－60%（w/w）蔗糖密度勾配溶液上に重層し，68,500×gで2時間遠心した。その後，遠心管底を穿刺し，流出液を18－20画分に分取した。その各々の画分について，ムンプスウイルスのHA力価或いはCF抗原力価を測定し，最も高いムンプスウイルス抗原の存在を示す画分を精製ウイルス標品とした。

II．抗血清の調製法

精製した弱毒化ムンプスウイルス占部株の0.5ml(4×10⁶ PFU/ml)を毎週1回ずつ計4回成熟ラット腹腔内に接種し，最後の接種を行なってから1週間後に心臓穿刺により採血し，分離した血清を弱毒化ムンプスウイルス占部株に対する抗血清として実験に供した。

BHK21/WI-2 細胞のレトロウイルス(以下BHKレトロウイルスと略記する)に対する抗血清の調製法はすでに報告されている[22]。

12. 逆転写酵素活性の測定法

レトロウイルス粒子の保有する逆転写酵素活性は Green らの方法に準じて測定した[33]。

40mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)，5mM dithiothreitol (Sigma Chemical Co., Saint Louis, Mo., USA) 30mM NaCl，5mM $MgCl_2$，0.1mMデオキシリボヌクレオチド(dATP, dCTP, dGTP, Sigma Chemical Co.)，10μCi ^{3}H-TTP (Specific Activity 1.76 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, Mass., USA)，0.05% Triton X-100

石津製薬，大阪)および精製ウイルス標品を

含む全量100μlの反応混合液を，37℃で一定時間反応させた。反応は氷浴中にて急冷し10%過塩素酸(PCA)，(石津製薬)を加えて停止させた。反応産物であるDNAを沈澱し易くするために，担体として100μgのウシ胸腺DNA(Sigma Cemical Co.)を加え，少なくとも10分間0℃で氷冷後，300μlの冷蒸留水を加え1,000×gで10分間遠心した。反応産物の沈澱を0.2M NaOHにて溶解し，さらにPCAによる沈澱形成とNaOHによる溶解操作を行なった後，最終的には10%トリクロル酢酸(TCA)で沈澱させた。その後，この酸不溶性反応産物を吸引沪過装置にてニトロセルローズ・メンブランフィルター(孔径0.45μm，TM-2，東洋濾紙)上に採取しトルエン系液体シンチレーターにて溶解後，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，東京)を用いて放射活性を測定した。

実験に使用したウイルス蛋白量は，Lowryらの方法にて測定した[34]。

13. ウイルスRNAの抽出法

RNA型ウイルス粒子よりウイルスRNAの抽出は以下に述べるように行なった。精製ウイルス標品を0.1M NaClと0.001M EDTAを含む0.01Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.4)(以下NTE緩衝液と略記する)4mlに懸濁し、10%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)0.2mlとNET緩衝液にて飽和したフェノール2mlおよび4%イソアミルアルコールを含むクロロフォルム2mlを加え、10分間室温で振盪した。2,000×gで20分間遠心して有機溶媒層と水層とに分離し、水層を採取した。さらにフェノールによる除蛋白操作を2回行ない、採取した水層に1/10容量の1M NaClと2倍容量の95%エタノールを加えてRNAを沈澱させた。−20℃で2時間以上静置した後、17,000×gで10分間遠心して得たRNA沈澱をNTE緩衝液に溶解した。その後95%エタノールで再沈澱させたRNAは、0.1×SSC(1×SSCは0.15M NaClと0.015Mクエン酸ナトリウムを含む水溶液である)に溶解させ、

4℃にて保存した。RNA量はオルシノール反応あるいはOD260nmの吸光度を測定することにより定量した[35]。

14. 細胞DNAの抽出法

細胞全体のDNAはMarmurの方法に準じて抽出した[36]。

細胞が8オンス培養角瓶に密に増殖している単層培養細胞（4×10⁷個）を0.15M NaClと0.1M EDTAを含む0.05Mトリス塩酸緩衝液（pH 8.0）で2回洗浄した後，この緩衝液に1%の割合にSDSを含む水溶液10mlを加えた。間歇的に振盪を与えながら60℃の恒温槽で10分間加温し，細胞を溶解した。室温まで徐冷した後，この細胞溶解液から除蛋白するために4%イソアミルアルコールを含むクロロホルム10mlを加え，30分間室温で間歇的に振盪した。その後，2,000×gにて20分間遠心して水層と有機溶媒層とに分離し，水層を採取し再び除蛋白操作を繰り返して得た水層に2倍容量の95%エタノールを加えた。4℃にて10分間

静置後，生じた不溶物を800×gで10分間遠心して沈渣とした。この沈渣を5mlの0.1×SSCに溶解した後，残存している蛋白質を分解するため，Protease (Sigma Chemical Co.) を500μg/mlになるように加え37℃で4時間処理した。更に50μg/mlのRNase A (Sigma Chemical Co.) にて37℃で1時間処理することにより混在するRNAを破壊した後，フェノールで除タンパクを行ない精製DNA標品を調製した。DNAは2mlの0.1×SSCに溶解して4℃で保存した。抽出したDNAのOD260/280nm吸光度比率は1.9であった。

細胞の染色体DNAと染色体外DNAとの分離抽出は，Hirtの方法に準じて行なった[37]。

細胞2×10^7個に対し0.6%SDSと0.01M EDTAを含む水溶液(pH 7.5) 4mlを加え，室温にて15分間静置して細胞を溶解した。この細胞が溶解して粘調になった水溶液に，最終濃度1Mになるように5MのNaCl水溶液を1ml加え緩徐に混和した。4℃で少なくとも8時間

以上静置後，4℃で17,000×g 30分間遠心を行ない，分離した上清に10×NTE緩衝液を1/10容量加え染色体外DNA(extra-DNA)画分とし，沈澱は1×NTE緩衝液に懸濁して染色体DNA(ch-DNA)画分とした。それぞれの画分について，Marmur法で行なったと同様に順次Protease，RNase，フェノール処理を行なって得た精製DNA標品は0.1×SSC中に溶解し，4℃で保存した。なお，DNA量はジフェニルアミン反応あるいはOD260nmの吸光度を測定することにより定量した[38]。

15. トランスフェクション

BHK(MV)細胞よりMarmurの方法に準じて抽出したDNAの感染性はGrahamらのトランスフェクション法により検索した[39]。0.1×SSCに溶解したDNA 100μgを26ゲージ注射針を6回通過させて切断した後，25mMのトリス塩酸緩衝液に8.0g/l NaCl，0.37g/l KCl，0.125g/l $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$および1.0g/l dextroseを含む水溶液にて10倍希釈し，最終濃度が125mMにな

るよう2M $CaCl_2$ を加えた。室温に25分間静置して，DNA-リン酸カルシウムの沈澱混合物を形成させた。あらかじめ粗に増殖したBHK 21/WI-2 あるいはHeLa単層培養細胞を調整し，この単層培養細胞を上に述べたリン酸を含むトリス塩酸緩衝液にて3回洗浄後，DNA-リン酸カルシウム沈澱物で処理した。37℃にて25分間処理した後，37℃で13時間培養した。その後，この処理細胞から過剰の $CaCl_2$ を除くためMEMで2回洗浄し37℃で培養を継続した。

16 核酸ハイブリッド形成法

逆転写酵素活性を保有するRNA型ウイルスの内因性逆転写酵素反応により合成したDNA（以下cDNAと略記する）とウイルスRNAとの相補性はDNA-RNAハイブリッド形成法により検定した[40]。cDNAは500μlの逆転写酵素活性測定用反応混合液に精製ウイルス粒子30μgを加え，37℃で1時間の反応にて形成させた。反応後，最終濃度0.1%になるようにSDSを含

む0.1×SSCを加え全量を1mlとし，0.5mlの4%イソアミルアルコールを含むクロロホルムと蒸留水で飽和したフェノール0.5mlを加えて除蛋白した。この操作を3回繰り返した後，0.1×SSCに対して4℃で一夜透析した。その後，0.1Mになるように$NaOH$を加え，37℃で1時間加温し，残存するRNAを分解して3M NaH_2PO_4で中和した。このようにして調製した^3H標識cDNA(1,200cpm)とウイルスRNA 48μgとを100℃で10分間熱処理して急冷後，この反応混合液を4×SSCで0.1%SDSを含むように調整して，66℃で24時間反応を行なった。形成された^3H標識cDNAとウイルスRNAとのハイブリッドは，Sマクレアーゼ（Sigma Chemical Co.）を使用して検出した[40]。すなわちこの反応混合液に対し，11倍容量の0.13M NaClと2×10^{-4}M $ZnSO_4$とを含むように調整した0.033M酢酸緩衝液（pH4.5）を加えて，45℃で75分間反応させた。反応後，等容量の30%TCAを加え氷浴中で15分間静置して形成した酸不溶

性産物を，沪過吸引装置にてニトロセルロース・メンブランフィルター上に採取し，その放射活性を測定した。ハイブリッド形成率は，反応に使用した^{3}H標識cDNAに対するS$_1$ヌクレアーゼ抵抗性を示す^{3}H標識cDNAの割合を放射活性の比で表わした。RotはRNA量をOD$_{260nm}$の吸光度で測定して，OD$_{260nm}$/2×反応時間＝Rotの式により算出した[41]。なお，実験に使用したS$_1$ヌクレアーゼの力価は520単位であり，この力価では一本鎖の^{3}H標識cDNAを95％分解する酵素活性を示した。

17. BHK(MV)細胞の染色体外DNA(extrach-DNA)および染色体DNA(ch-DNA)とMT-RNA間の相補性の検定

BHK(MV)細胞を90mm径ガラスペトリ皿上に37℃で2日間培養して，ほぼ密に増殖した単層培養細胞を10μCi/mlの^{3}H-チミジン(Specific Activity 2.0 Ci/mmol, New England Nuclear, USA)を含む15mlの培養液を用いて，さらに37℃で24時間培養した。その後，この単層培養

細胞をMEMにて3回洗浄し，Hirtの方法に準じて^{3}H標識extrach-DNA（^{3}H-extrach-DNA）および^{3}H標識ch-DNA（^{3}H-ch-DNA）とに分けて抽出した。20μgの^{3}H-extrach-DNA（1×10^4cpm）或いは15μgの^{3}H-ch-DNA（30×10^4cpm）とMV-RNA 50μgとを100℃で10分間熱処理して氷浴中で急冷後，0.1％SDSを含み4×SSCになるように反応混合液の塩濃度を調整し，全量を600μlとして66℃で24時間反応を行なった。DNA-RNAハイブリッドの検出は，硫酸セシウム（三津和化学薬品，大阪）を用いた平衡密度勾配遠心法による分析による，た。すなわち，反応混合液を2×SSCに調整し，これに硫酸セシウムを密度が1.56g/cm^{3}となるように加えた後，Beckman SW 50.1ローターを用いて15℃で130,000×gで48時間遠心した。その後遠心管底を穿刺し，流出液を約40画分に分取した。この各々の画分について放射活性を測定した。なお対照としては，MV-RNAの代りにイーストRNA（Sigma Chemical Co.）50μgを使用

して，上に述べたと同様に処理した。各画分の密度の測定は，屈折計（Carl Zeiss, oberkochen, West Germany）を用いて25℃での屈折率を測定し，International Critical Table にて密度を算定した。

実験結果

1. ムンプスウイルス持続感染 BHK(MV) 細胞におけるムンプスウイルス特異抗原の発現及びNDV重感染に対する抵抗性

BHK21/WI-2 細胞に弱毒化ムンプスウイルス占部株(MV)を感染させて確立した持続感染 BHK(MV) 細胞は，細胞継代数15代までは図1(a)，(b)に示すような巨細胞形成を特徴とする細胞変性を散発的に示した。さらに継代を重ねていくと，BHK(MV) 細胞での巨細胞の出現はしだいに減少した。実験に使用した細胞継代数75－80代の BHK(MV) 細胞の形態は，親株

細胞であるBHK21/WI-2細胞とほぼ同様な線維芽細胞であった。

このBHK(MV)細胞におけるMV特異抗原の存在を間接螢光抗体法を用いて検索すると，ウイルス感染により出現した巨細胞のみならず細胞変性を示さない細胞でも，細胞質にMV特異抗原の存在を認めた。図2は，継代数15代のBHK(MV)細胞でのMV特異抗原の存在様式を示している。細胞継代数75代でのBHK(MV)細胞のMV特異螢光陽性細胞の占める割合は，85%であった。対照としたBHK21/WI-2細胞では，ムンプスウイルス抗原の存在を示す特異螢光は認められなかった。

一般にウイルスが持続感染している細胞に，その野生株ウイルス或いは同種属のウイルスが重感染すると，重感染したウイルスの増殖は抑制されることが知られている[42,24]。そこでMVと同じパラミクソウイルス群に属するNDVをBHK(MV)細胞に重感染させ，NDVの増殖をBHK(MV)単層培養細胞上でのプラック形

成を指標として検索した。その結果，表1に示すように，非感染 BHK21/WI-2 細胞で 4.3×10^6 PFU/mℓ の感染力価を保有する NDV 標品を持続感染細胞に重感染すると，2×10^3 PFU/mℓ の感染力価しか示さなかった。すなわち，BHK(MV) 細胞での NDV の増殖は非感染親株細胞と比較して，99% 以上抑制されていることが示唆された。

2. BHK(MV) 細胞の産生する感染性ムンプスウイルス粒子 ($MV_p i$) の生物学的特性および酵素学的検索

BHK(MV) 細胞を37°Cで4日間培養して得た培養上清から調製した粗ウイルス標品を，15－60%(w/w) の蔗糖密度勾配液上に重層し，68,500×g で2時間遠心した。その後遠心管底を穿刺して，その流出液を17から18画分に分取した。その各々の画分につきムンプスウイルス抗原を検索した。その結果，図3に示した如く，蔗糖密度 1.21 g/cm³ と 1.12 g/cm³ を示す画分6と14に，ムンプスウイルス特異CF抗原の

ピークが認められた。すなわち，CF抗原力価は画分6では64倍，画分14では128倍であった。このムンプスウイルスCF抗原を保有する画分6で1日令ヒヨコ赤血球に対する凝集能を測定すると4単位/25μlであり，その他の画分には赤血球凝集素を認めることが出来なかった。なお，この画分をピークとしてBHK 21/WI-2 細胞に対して細胞変性効果を示す感染性ウイルスが存在していた。

実験に使用した親株ウイルスである弱毒化ムンプスウイルスを上に述べたと同様に蔗糖密度勾配遠心法にて分画し，HAを指標としてMVの存在する画分を検索すると，画分5で蔗糖密度1.19g/cm³にHA力価256単位/25μlをピークとする一峰性のHAパターンを示した（図4）。また，この画分5のCF抗原力価は64倍であった。なお，このMV粒子は逆転写酵素活性を保有しない事も明らかになった。画分2に見られる逆転写酵素活性のピークは，Vero細胞のレトロウイルスに起因するものと考え

られる。これらの実験結果より，持続感染細胞が産生しているMVpiウイルス粒子の密度は親株ウイルスのそれより重くなっており，またMVpiのHA能は低下していることが明らかになった。そのため，MVがBHK21/WI-2細胞に持続感染する過程で修飾を受け，親株ウイルスとは異なった性格を示すMVpiという変種株ウイルスが形成されたものと考えられた。

すでに，佐藤らは風疹ウイルスが持続感染したBHK21/WI-2細胞は，宿主細胞に潜在するレトロウイルスと風疹ウイルス野生株との合の子ウイルスを産生していることを報告している[22]。そこでBHK(MV)細胞が産生しているMVpiウイルスについても，親株ウイルスと宿主細胞のレトロウイルスとの合の子形成の結果生じたウイルスであると推論して，粗MVpiウイルス標品を蔗糖密度勾配遠心法により分画した各々の画分について，逆転写酵素活性を測定した。その結果，ムンプスウイルス特異CF抗原を保有する画分に一致して逆転写酵

素活性のピークを認めた（図3）。すなわち，MVpiウイルス粒子は逆転写酵素活性を保有するムンプス変種株ウイルスであることが示唆された。なお，密度1.12 g/cm³で逆転写酵素活性を保有するムンプスウイルスには感染性を認めることが出来なかった。故にこのウイルス粒子は，核酸を一部欠失している欠損型ウイルス粒子であると考えられる。図5は精製MVpiウイルスの内因性逆転写酵素活性を反応時間を追って測定したものである。^{3}H-TMPの酸不溶性画分への取り込みは，反応時間60分まで経時的に増量したが，それ以後は平衡に達した。

3．BHK(MV)細胞より産生されているMVpiウイルスの内因性逆転写酵素反応により合成されたDNAの遺伝解析

もしMVpiウイルス粒子の逆転写酵素がBHKレトロウイルスに由来しているとするならば，MVpiウイルス遺伝子はMVのRNAとBHKレトロウイルスRNA遺伝子との両者から構成され

ていると考えられる。そこで，MTpiウイルスを用いた内因性逆転写酵素反応により合成されたDNAのムンプスウイルスRNA（MT-RNA）或いはBHKレトロウイルスRNAとの相補性を核酸ハイブリッド形成法を用いて検索した。すなわち，MTpiウイルスRNAを鋳型として合成した^{3}H標識DNA（^{3}H-cDNA）と精製ムンプスウイルス及びBHKレトロウイルスより抽出したRNAとでハイブリッド形成反応を行なった。反応後，一本鎖DNA及びRNAを特異的に分解するS1ヌクレアーゼで反応産物を処理し，S1ヌクレアーゼ抵抗性を調べた。その結果，表2に示すように^{3}H-cDNAとMT-RNAとの間で50.3%のハイブリッド形成が，またBHKレトロウイルスRNAとの間では10.6%の相補性を示した。なお対照としたイーストRNAと^{3}H-cDNAとのハイブリッド形成率は3.1%であった。以上の結果より，MTpiウイルスRNAはMTとBHKレトロウイルスRNAとの遺伝子レベルでの合の子であることが示唆された。

4. BHK(MV)細胞から Marmur 法により抽出した細胞DNAの感染性

in vitro におけるMVpiウイルスRNA遺伝子に相補性を示すDNAの合成を明らかにした実験結果は，持続感染BHK(MV)細胞の中でもこのような相補性DNAが形成され，MVpiのproviral DNAが存在している可能性を示している。

一般にレトロウイルスのproviral DNAを細胞に接種すると，細胞内でDNAから再びRNAに転写されRNAウイルスとして増殖する[43,44]。この実験手技はトランスフェクションと呼ばれている。そこで，BHK(MV)細胞より抽出したDNAの感染性をトランスフェクションにより検討した。すなわち，Marmur 法により抽出した細胞全体のDNA 50－100μg を BHK21/WI-2 或いは HeLa 単層培養細胞に接種して，ウイルス産生の有無を検索した。DNAを接種した BHK21/WI-2 細胞を37℃で培養を続けると，約2週間後で細胞継代数3代目に，ウイルスの増殖によると思われる巨細胞形成を主体とし

た細胞変性が出現した（図6）。そこで，ウイルス増殖の結果として，このような細胞変性が生じたことを明らかにするために，間接螢光抗体法を用いて，BHK(MV)細胞のDNAをトランスフェクションした細胞のムンプスウイルス抗原の存在につき検索した。その結果，図7に示す如く，BHK(MV)細胞のDNAを接種したBHK21/WI-2細胞の細胞質に，ムンプスウイルス抗原の存在を示す特異螢光が認められた。またHeLa細胞にDNAを接種した場合にもトランスフェクションが成立し，細胞継代数3代目に巨細胞が出現し，その細胞質内にムンプスウイルス特異抗原が認められた（図8(a)，(b)と図9）。そして，この細胞培養上清中には，BSR単層培養細胞上でプラック形成を示す感染性ウイルス粒子が産生されていた（図10）。表3はBHK(MV)細胞より抽出したDNA標品の生物学的活性を検討したものである。DNA処理後，継代3代目の細胞について，MV特異抗原の発現を間接螢光抗体法にて，ま

た培養上清中へ産生されたウイルス粒子は，1日令ヒヨコ赤血球に対する凝集能及びBSR単層培養細胞上でのプラック形成能で検出した。その結果，DNA処理した細胞はMT特異抗原を発現し，その培養上清中には赤血球凝集素を産生した。更にまた，この細胞は2.6×10^3から4.2×10^5PFU/mlの感染力価を示すウイルス粒子を産生するが，DNase 10 μg/mlで1時間前処理したDNAにはMT特異抗原ならびに感染性ウイルス粒子の産生を認めることが出来なかった。なおRNase 50 μg/mlで前処理したDNAでは，その感染性は失われなかった。以上の結果は，DNA自身にウイルス産生能の存在することを強く示唆している。表4はBHK21/WI-2あるいはHeLa細胞にBHK(MT)細胞のDNAをトランスフェクションして産生されたウイルス（以下BHK(MT-DNA)或いはHeLa(MT-DNA)と略記する）をBSR細胞に感染し，形成されたプラックよりクローニングしたウイルスのHA力価とプラック形成能を測定して

得た値を示している。その結果，プラック形成能を保有する感染性ウイルス粒子はすべて，HA能を持っている事が明らかとなった。すなわち，8単位／25μlのHA力価を示すウイルス標品において，BHK(MV-DNA)ウイルスのクローン1と2は4.2×10^5－1.2×10^4 PFU/mlの感染力価を，HeLa(MV-DNA)ウイルスのクローン2，7，9では3.1×10^3－2.6×10^2 PFU/mlの値を示した。

5. トランスフェクションにより産生されたHeLa(MV-DNA)ウイルスの抗原性

BHK(MV)細胞のDNAを用いて，HeLa細胞でトランスフェクションが成立した。そこで，産生されたHAと感染性を有するHeLa(MV-DNA)ウイルスの各々のクローンについて抗原性を検討した。この場合，先に述べた風疹ウイルス持続感染 BHK21/WI-2 細胞系における報告[22]並びに，ムンプス変種株ウイルスであるMV piはMVとBHKレトロウイルスとの遺伝子レベルの合の子であることを示唆する核酸ハイブリッ

ド形成の結果より，トランスフェクションにて産生されたHeLa(MV-DNA)ウイルスもそのウイルス形成の過程で，内因性レトロウイルスの関与を受けていると推論した。そこで，HeLa(MV-DNA)ウイルスのクローン2，7，9をそれぞれHeLa細胞で増殖して得たウイルス標品の抗原性を検討するために，MVおよびBHKレトロウイルスに対する抗血清を用いて，ウイルスのプラック形成能に対する中和試験と赤血球凝集阻止反応を行なった。その結果は表5に示したごとく，親株ウイルスであるMVのプラック形成能を100%中和する抗ムンプスウイルス血清でさえも，すべてのクローンのプラック形成能は全く中和されなかった。しかしMVのプラック形成能は抗BHKレトロウイルス血清で全く影響を受けないが，クローン2，7，9のプラック形成能は，20倍希釈した抗BHKレトロウイルス血清でそれぞれ62.2%，92.3%，99.2%中和された。

一方MVと各々のクローンのHA力価を4単位

1/25μlに調整したウイルス標品について，抗ムンプスウイルス血清によるHAI反応を行なった（表6）。その結果，MVに対して64倍のHAI抗体価を保有する抗ムンプスウイルス血清で，クローン2，7，9ではそれぞれ32倍，8倍，4倍のHAI抗体価を示した。しかしながら，MVを含むすべてのクローンのHA能は4倍に希釈した抗BHKレトロウイルス血清で全く抑制されなかった。すなわちHeLa（MV-DNA）ウイルスのクローンはMV特異赤血球凝集能を保有しているが，そのムンプスウイルスとしての特異性は低下している事が明らかになった。

6．核酸ハイブリッド形成法による持続感染BHK（MV）細胞内でMVのウイルスRNA遺伝子に相補性を示すDNAの検出とその存在部位の検索

トランスフェクションによる実験で，持続感染したMVのRNAはDNAに逆転写され宿主細胞内に存在することが明らかになった。そこ

で，このDNAのBHK(MT)細胞内における存在様式を明らかにするために，以下に述べる実験を行なった。すなわち，BHK(MT)細胞DNAを^{3}Hチミジンにて標識した後，Hirtの方法に従って染色体外DNA(extrach-DNA)と染色体DNA(ch-DNA)を調整し，それぞれのDNAとMT-RNAとの間でハイブリッド形成を行なった。形成されたDNA-RNAハイブリッドは，硫酸セシウム平衡密度勾配遠心法を利用して検出した。図11(a)は^{3}H-チミジン標識した染色体外DNA(^{3}H-extrach-DNA)とMT-RNA間のハイブリッド形成反応の実験結果を示した。密度1.56 g/cm^{3}と1.49 g/cm^{3}の画分に放射活性のピークを示す二峰性の分布を認めた。一方，BHK(MT)細胞DNAとは相補性を持たないと考えられるイーストRNAと^{3}H-extrach-DNAとの間で上に述べたと同様にハイブリッド形成反応を行ない硫酸セシウム平衡密度勾配遠心法により分析すると，1.49 g/cm^{3}の密度を示す画分にのみ放射活性のピークが存在した(図11

(b))。なお^{3}H標識MV-RNAの密度は1.62g/cm^{3}であり，extrach-DNAのそれは1.49g/cm^{3}であった。以上の実験結果より，密度1.56g/cm^{3}の画分に存在するピークはDNA-RNAハイブリッドであると考えられる。すなわち，MV-RNAより逆転写されたDNAはextrach-DNAに存在している事を強く示唆した。

一方，^{3}H標識染色体DNA（^{3}H-ch-DNA）とMV-RNA或いはイーストRNAとの間ではハイブリッドの形成を認めることが出来なかった（図12(a)，(b)）。以上の実験結果より，MVのウイルスRNA遺伝子に相補性を示すDNAは，持続感染細胞の染色体外DNA画分に存在していることが明らかとなった。

7. 持続感染BHK(MV)細胞の染色体外部における特異的DNA合成

BHK(MV)細胞の染色体外DNA画分に，MVのウイルスRNA遺伝子に相補性を示すDNAが存在していることを明らかにした。そこで，非感染BHK21/WI-2細胞には存在しない特異的

DNAがBHK(MV)細胞で合成されていると考えて下の実験を行なった。すなわち，持続感染BHK(MV)及びBHK21/WI-2細胞の4×10^7個を同一条件で^{3}Hチミジンにて標識後，染色体外DNAを抽出して塩化セシウム平衡密度勾配遠心法にて分析した。その結果，BHK21/WI-2細胞には認められない^{3}Hチミジンの取り込みのピークがBHK(MV)細胞において，密度1.70 g/cm^{3}を示す画分に認められた（図13(a)，(b)）。この特異的DNA合成がウイルス相補性DNAの合成に関係するものと思われた。ちなみに，このピークを示す画分26と27より回収したDNAもまた，MV-RNAとの相補性が認められた（図14(a)，(b)）。

考　察

本研究は，仔シリアンハムスター腎由来の株化細胞であるBHK21/WI-2細胞に弱毒化ムン

プスウイルスを感染させて確立した持続感染系において，ムンプスウイルスRNA遺伝子がDNAに逆転写されて，DNA中間体として存在することを明らかにした。一般にRNA型ウイルスの持続感染系確立の機構に関する因子としては，このようなウイルスRNAより逆転写されたDNA中間体以外に，ウイルスRNAの一部欠損したウイルス(DI)粒子[4~7]，温度感受性変異株(ts)ウイルス[8~10]，インターフェロン(IF)[11,12]等が掲げられている。

DI粒子は自己増殖能を欠き，その増殖のために感染性ウイルスの共存を必要とし，同時に感染性ウイルスの増殖を抑制する性格を有する，ウイルスRNAの一部を欠損したウイルス粒子である。VSV[4]をはじめ，センダイウイルス[5]，麻疹ウイルス[6]，狂犬病ウイルス[7]等でもこのDI粒子の存在が知られている。ムンプスウイルスの場合も，DI粒子は存在すると推測されているが[45]，ムンプスウイルスDI粒子を分離・同定したという報告はない[46,47]。

ts変異株ウイルスは，高温で増殖できない温度感受性を示す突然変異ウイルスである。NDV[8]，VSV[9]並びに風疹ウイルス[10]等の持続感染細胞が産生している感染性ウイルスはこのts変異株ウイルスであると報告されている。Truantらはムンプスウイルスの持続感染系を検索し，持続感染機構成立に必須の因子はDI粒子ではなくts変異株ウイルスであると述べている[47]。

IFはウイルスの感染した細胞より産生されるタンパク性のウイルス増殖抑制因子であり，このIFが持続感染確立の過程に存在すると，非感染細胞へのウイルス伝播は抑制される結果細胞は生残し，ウイルスと細胞の増殖のバランスが保たれると考えられている[48,11,12]。しかし本研究で使用したBHK細胞或いはVero細胞といったインターフェロン産生能の低い細胞でも持続感染系は成立する[46,49]。

非腫瘍原性RNA型ウイルスによる持続感染成立の機構を司どるものとして提示されてい

るもう一つの要因は proviral DNA である。すなわちウイルスRNA遺伝子はDNAに逆転写された後，宿主細胞染色体DNAに組み込まれて存続すると考えられている[49,50]。この感染様式については，レトロウイルスにおいて非常によく解析されている。Temin は外因性レトロウイルス群に属するラウス肉腫ウイルスの産生がアクチノマイシンD処理により抑制されることから，DNA中間体を介するウイルスRNAの存在様式を想定し，逆転写酵素を発見した[52]。この場合，レトロウイルスはDNA中間体に逆転写された後，宿主細胞の染色体DNAに組み込まれ，proviral DNA の状態で存在することが明らかになった。そのため，細胞分裂によってもそのウイルス遺伝子は失われることなく，安定な持続感染状態を成立する。レトロウイルス以外の非腫瘍原性RNA型ウイルスでは，Zhdanov らが麻疹ウイルスの持続感染系で，このウイルスRNAが proviral DNA として宿主細胞の染色体DNAに組み込まれて

いると報告した[13,14]。たとえば，麻疹ウイルスの慢性感染の結果発生すると考えられている全身性エリテマトーデスに罹患した組織には，麻疹ウイルスの proviral DNA が存在していると報告されている。その後，ダニ媒介脳炎ウイルス[15]，RSウイルス[16]の実験でも proviral DNA の存在が示されたが，一方でレトロウイルス以外のRNA型ウイルスがこのような感染様式を示すことはないとする報告もあり[17,18]，ムンプスウイルスの持続感染系においてもその存在は明らかにされていなかった[46]。しかしながら，RNA型腫瘍ウイルスに属するレトロウイルスに関する研究の進歩により，多くの培養細胞で内因性レトロウイルスが発現されていることが明らかにされている。すなわち，腫瘍細胞にのみ存在すると考えられていたレトロウイルスがヒト，サル，ラットの正常胎盤組織，マウスの造血臓器，ラットの胚胚などにも確認され，in vitro で組織培養した場合発現が更に著明になることが知られてい

る[53~56]。現在では正常組織にもレトロウイルス遺伝子が染色体DNAに組み込まれた形で存在し，通常はその発現が抑制された状態にあるとする考えが支持されている[57]。それゆえ，培養細胞を用いたムンプスウイルスの持続感染系においても，宿主細胞に潜在する内因性レトロウイルスの存在を考慮に入れて検索を進める必要がある。Cremer らもまた，亜急性硬化性全脳炎患者の病巣より麻疹ウイルスを分離し，このウイルスをBHK O-853 細胞に感染させて持続感染成立の過程を研究した結果，BHK O-853 細胞の内因性レトロウイルスが持続感染成立に関与している可能性を示唆している[58]。

本研究において宿主細胞である BHK21/WI-2 細胞には内因性レトロウイルスの発現が認められているので[59,60]，ムンプスウイルス持続感染 BHK21/WI-2 細胞はムンプスウイルスとBHKレトロウイルスとの両者のウイルスの増殖が同一の場で生じている系である。そこで，ムン

プスウイルス持続感染BHK21/WI-2細胞が産生する感染性ウイルス粒子の生物学的特性を解析すると，BHKレトロウイルスと合の子形成をしたと考えられる逆転写酵素を保有するムンプス変種株ウイルスを分離・同定した。レトロウイルス以外で逆転写酵素を保有する非腫瘍原性RNA型ウイルスとしては，他に逆転写酵素を持たない野生株NDV及び風疹ウイルスが持続感染した細胞の産生する感染性ウイルス粒子から分離されたという報告がある[22,61]。特に佐藤らは，風疹ウイルス持続感染BHK21/WI-2細胞より産生されている風疹ウイルス変種株は抗原性において，風疹ウイルス野生株とBHKレトロウイルスとのモザイクになった合の子ウイルスであることを明らかにしている[22,23]。そこで本研究では，ムンプス変種株ウイルスの合の子形成の機作を明らかにするため，核酸ハイブリッド形成による遺伝子レベルでの解析を行なった。その結果，ムンプス変種株ウイルス遺伝子はその核酸の塩基配列

において，ムンプスウイルス並びにBHKレトロウイルスの両者の遺伝子に相補性が認められた。すなわち，ムンプスウイルス持続感染BHK21/WI-2細胞の産生する感染性ウイルスは，遺伝子レベルで両ウイルス間での合の子であることが強く示唆された。またin vitroの実験において，ムンプス変種株ウイルスのDNA中間体が合成されることを明らかにしたので，持続感染細胞内にもDNA中間体の存在する可能性があると考えた。そこで，BHK(MV)細胞より抽出したDNAをBHK21/WI-2或いはHeLa細胞にトランスフェクションしたところ，ムンプスウイルスとBHKレトロウイルスとの抗原性モザイクウイルスの産生を認め，持続感染細胞内における感染性DNA中間体の存存が明らかになった。すなわち，BHK21/WI-2細胞に持続感染したムンプスウイルスRNA遺伝子は，内因性レトロウイルスとの合の子形成を通じてDNA中間体に逆転写され，BHK(MV)細胞に存在することが示唆された。さらに，

このDNA中間体の存在様式を明らかにするために，核酸ハイブリッド形成法にてムンプス変種株ウイルスに相補性を示すDNAの存在部位を検索したところ，このDNAは宿主細胞染色体DNAでなく，染色体外DNAとして存在していることを明らかにした。そのため，このムンプス変種株ウイルスはレトロウイルスと同一の存在様式を示すのではなく，papovaウイルス群に属するBKウイルス[62]が示すような染色体DNAに組み込まれない形で持続感染する可能性が示唆された。しかしながら，本研究で用いた実験方法においては，染色体に組み込まれているかもしれない微量のDNAの検出が不可能であるという事も否定出来ない。ともあれ，レトロウイルスの発現しているBHK21/WI-2細胞でのムンプスウイルス持続感染系において，DNA中間体を介するウイルス遺伝子の存在様式を明らかに出来たと考える。

Norvalはアフリカ緑ザル由来のLLC-MK_2細

胞を用いた風疹ウイルスの持続感染系で，核酸ハイブリッド形成法にて風疹ウイルスの proviral DNA を検出できなかったと報告している[18]。しかし同時に，その細胞系において，逆転写酵素活性も認めることが出来なかったとしている。それゆえ，LLーMK_2 細胞の系では，逆転写酵素活性を示す内因性レトロウイルスの発現が認められず，風疹ウイルス遺伝子も DNA 中間体に逆転写されなかったと考えられる。一方，Truant らが報告した ts 変異株ウイルスについて，このムンプス持続感染 BHK(MV) 細胞を 34℃ と 39℃ で培養しムンプスウイルス抗原の発現を検索したところ，39℃ ではその発現が抑制される傾向を示し，BHK(MV) 細胞でも ts 変異株ウイルスの関与する可能性が認められた。佐藤らは持続感染系における風疹ウイルスの合の子ウイルスが示す温度感受性について，合の子形成にあずかる内因性レトロウイルスが ts であるためであるとしている[22]。また，BHK(MV) 細胞の培養上清中

に産生されているウイルス粒子を精製する過程で，親ウイルスに比べ密度の低いウイルス粒子の存在を示すムンプスウイルス抗原と逆転写酵素活性のピークを生じたことから，このBHK(MV)細胞でも欠損型ウイルス粒子が生ずるとも考えられた。すなわち，これらの実験結果を通じて言えることは，それぞれ単一の因子によってRNA型ウイルスの持続感染系が確立されるのではなく，各々の因子が相互関係を持つ結果，持続感染が確立されると推察できる。Allan らはアラチノマイシンDで宿主細胞を前処理すると DI粒子が産生されないと報告し，DI粒子が形成されるためには宿主細胞の関与が必要であることを示している[63]。また，Jacobson らは，リンパ球性脈絡膜炎ウイルスについて，野生株ウイルスとも DI粒子とも違った感染性の弱いSPウイルスがL細胞への持続感染の過程で形成され，持続感染機構確立に重要な役割りを果たすと述べている[64]。本研究で逆転写酵素活性を保有するム

ンプス変種株ウイルスは，宿主細胞に潜在するレトロウイルスの関与のもとに形成され，しかも感染性の弱いウイルスであった。それゆえ，今後ムンプスウイルスの持続感染機構を解明するためには，このムンプス変種株ウイルスがDI粒子，SPウイルス或いはts変異株ウイルス等と，どのような関係にあるのか，その生物学的な性格を更に比較検討し，解析する必要があると思われる。

結　語

生体におけるムンプスウイルス慢性感染の機構を解析するためのモデルシステムとして，仔シリアンハムスター腎由来のBHK21/WI-2細胞にムンプスウイルスを感染させて確立した in vitro の持続感染系［BHK(MV)］において，ムンプスウイルスRNA遺伝子がいかなる存在様式を示すか検索を行ない，次のような結

果を得た。

1) 持続感染BHK(MV)細胞の細胞質には，ムンプスウイルス特異抗原の存在が間接螢光抗体法により確認された。BHK(MV)単層細胞におけるNDVの増殖を，NDVのプラック形成能を指標として検索すると，非感染BHK21/WI-2細胞の場合と比較してNDVのプラック形成能は99%以上抑制された。

2) BHK(MV)細胞の産生する感染性ウイルス粒子(MV_{pi})は親株ウイルスとして使用した弱毒化ムンプスウイルス亜株(MV)に比較して，1日令ヒヨコ赤血球に対する凝集能(HA)の低下と粒子密度の増加を示す変種株ウイルスであった。このMV_{pi}はムンプスウイルス特異補体結合抗原と逆転写酵素活性を保有していた。

3) MV_{pi}ウイルスの内因性逆転写酵素反応により合成されたMV_{pi} RNAに相補性を示すDNAは，ムンプスウイルスRNAと宿主細胞に潜在するレトロウイルス(BHKレトロウイルス)RNA

との間で核酸の塩基配列における相補性が認められた。

4) BHK(MV)細胞より Marmur の方法により抽出したDNAで BHK21/WI-2 及びHeLa細胞を処理すると，トランスフェクションが成立し，感染性ウイルスの産生を認めた。HeLa細胞にトランスフェクションした結果産生されたウイルスクローンは，すべて抗原性においてムンプスウイルスとBHKレトロウイルスとのモザイクであった。

5) BHK(MV)細胞より Hirt の方法に準じて抽出した染色体及び染色体外DNAとムンプスウイルスRNAとの間で核酸ハイブリッド形成にて相補性を検索した結果，染色体外画分にムンプスウイルスRNAに相補性を示すDNAの存在を認めた。

以上の結果は，BHK21/WI-2 細胞に持続感染したムンプスウイルスRNA遺伝子は，ムンプスウイルスとBHKレトロウイルスとの間で生じた合の子形成を通じて，DNAからDNAに

逆転写され，宿主細胞の染色体外DNAにDNA中間体として存在している事を示唆している。

稿を終えるにあたり，本研究課題を与えられご指導を賜わった宮崎　正教授，本研究の実施に際し，終始かわらぬご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。ご校閲と適当なご助言をいただいた生化学講座鈴木不二男教授，口腔外科学第二講座作田正義教授に深謝します。また研究の円滑な進展のために特別のご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。

文　献

1) Sultz,H.A., Hart,B.A., Zielezng,M. and Schlesinger,E.R. (1975): Is mumps virus an etiologic factor in juvenile diabetes mellitus? J. Pediatr., 86, 654-656.

2) St.Geme,G.R., Noren,S.R. and Adams,P. (1966): Proposed embryopathic relation between mumps virus and primary endocardial fibroelastosis. N. Engl. J. Med., 275, 339-347

3) Timmons, G. D., and Johnson, K. P. (1970): Aqueductal stenosis and hydrocephalus after mumps encephalitis. N. Engl. J. Med., 283, 1505-1507.

4) Holland, J. J., Villarreal, L. P. and Breindl, M. (1976): Factors involved in the generation and replication of rabdovirus defective T particles. J. Virol., 17, 805-815.

5) Kingsburg, D. W., Portnor, A. and Darlington, R. W. (1970): Properties of incomplete Sendai virions and subgenomic viral RNAs. Virology, 42, 857-871.

6) Hall, W. W., Martin, S. J. and Could, E.(1974): Defective interfering particles produced during the replication of measles virus. Med. Microbiol. Immunol., 160, 155-164.

7) Kawai, A., Matsumoto, S. and Tanabe, K.(1975): Caracterization of rabies virus recovered from persistently infected BHK cells. Virology, 67, 520-523.

8) Youngner, J. S. and Quagliana, D. O.(1975): Temperature-sensitive mutants isolated from hamster and canine cell lines persistently infected with Newcastle disease virus. J. Virol., 16, 1332-1336.

9) Youngner, J.S., Dubani, E. J., Quagliana, D. O., Kelly, M. and Preble, O. T.(1976): Role of temperature-sensitive mutants in persistent infections initiated with vesicular stomatitis virus. J. Virol., 19, 90-100.

10) 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. Virol., 54, 333-343.

11) Vilcek, J., Yamazaki, S. and Havell,E. A.(1977): Interferon induction by vesicular stomatitis virus and its role in virus replication. Infect. Immun., 18, 863-865.

12) Marcus, P. I. and Sekellick, M. J.(1978): Persistent infection 1. Interferon-inducing defective-interfering particles as mediators of cell sparing: Possible role in persistent infection by vesicular stomatitis virus. Virology, 85, 175-186.

13) Zhdanov, V. M. and Parfanovich, M. I.(1974): Integration of measles virus nucleic acid into the cell genome. Arch. ges. Virusforsch., 45, 225-234.

14) Zhdanov, V. M.(1975): Integration of viral genomes. Nature, 256, 471-473.

15) Zhdanov, V. M., Bogomolova, N. N., Gavrilov, V. I., Andzhaparidze, O. G., Deryabin, P. G. and Astakhova, A. N. (1974): Infectious DNA of tick-borne encephalitis virus. Arch. ges. Virusforsch., 45, 215-224.

16) Simpson, R. W. and Iinuma, M.(1975): Recovery of infectious proviral DNA from mammalian cells infected with respiratory syncytial virus. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 72, 3230-3234.

17) Viola, M. V., Gann, K., Scott, C. and Rothfield, N. (1978): Absence of measles proviral DNA in systemic lupus erythematosis. Nature, 275, 667-669.

18) Norval, M.(1979): Mechanism of persistence of rubella virus in LLC-MK_2 cells. J. gen. Virol., 43, 289-298.

19) Witte, O. N. and Baltimore, D.(1977): Mechanism of formation of pseudotypes between vesicular stomatitis virus and murine leukemia virus. Cell, II, 505-511.

20) Zavada, J.(1972): Pseudotypes of vesicular stomatitis virus with the coat of murine leukemia and of myeloblastosis viruses. J. Virol., 15, 183-191.

21) Sato, M., Urade, M., Yoshida, H., Maeda, N., Yura, Y., Shirasuna, K. and Miyazaki, T. (1978): Evidence for pheotypic mixing between Newcastle disease virus (NDV) and a latent virus of BHK21/WI-2 cells in the early passaged BHK21/WI-2 cells persistently infected with NDV. Arch. Virol., 56, 157-162.

22) Sato, M., Yamada, T., Yamamoto, K. and Yamamoto, N. (1976): Evidence of hybrid formation between rubella virus and a latent virus of BHK21/WI-2 cells. Virology, 69, 691-699.

23) Sato, M., Urade, M., Maeda, M., Miyazaki, T., Watanabe, M., Shibata, T. and Yamamoto, N. (1978): Isolation and characterization of a new rubella variant with DNA polymerase activity. Arch. Virol., 56, 89-103.

24) 浦出雅裕 (1976): 風疹ウイルス持続感染細胞確立の機構. 阪大歯学雑誌, 21, 1~19, 昭和51.

25) Vaheri, A., Sedwick, W. D., Plotkin, S. A. and Maes, R. (1965): Cytophathic effect of rubella virus in BHK 21 cells and growth to high titers in suspension culture. Virology, 27, 239-241.

26) 安村美博, 川喜多愛郎 (1963): 組織培養による SV_{40} の研究. 日本臨床, 21, 1201-1215, 昭和38.

27) Gay, G., Coffman, W. and Kubiceck, M. (1952): Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer, Res., 12, 264-265.

28) Sato, M., Maeda, M., Yoshida, H., Urade, M., Saito, S. Miyazaki, T., Shibata, T. and Watanabe, M. (1977): Plaque formation of herpes virus homnis type 2 and rubella virus in variants isolated from the colonies of BHK21/WI-2 cells formed in soft agar. Arch. Virol., 53, 269-273.

29) Eagle, H. (1959): Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science, 130, 432-437.

30) Yamanishi, K., Hosai, H., Ueda, S., Takahashi, M. and Okuno, Y. (1979a): Studies on live attenuated mumps virus vaccine. II. Biologocal characteristics of the strains adapted to the amniotic and chorioallantoic cavity of developing chick embryo. Biken J., 13, 127-132.

31) 井上栄, 水谷裕迪 (1973): ウイルスの赤血球凝集反応. ウイルス実験学総論(国立予防衛生研究所学会会編). 2版, 丸善株式会社, 214-225, 昭和48.

32) 石田慶蔵 (1973): 補体結合反応; ウイルス実験学総論(国立予防衛生研究所学友会編). 2版, 丸善株式会社, 東京, 247-252, 昭和48.

(20×20)

33) Green, M., Rokutand, M., Fuginaga, K., Ray, R. K., Rokutand, H. and Gurgo, C.(1970): Mechanism of carcinogenesis by RNA tuomr viruses. I. An RNA-dependent DNA polymerase in murine sarcoma viruses. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 67, 385-393.

34 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.

35) Schneider, W. C.(1957): Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis; Methods in Enzymology. (Colowick, S. P. and Kapaplan, N. O.,editors), Academic Press, New York , 3, 680-684.

36) Marmur, J.(1961): A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. J. Mol. Biol., 3, 208-218.

37) Hirt, B.(1967): Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. J. Mol. Biol., 26, 365-369.

38) Burton, K.)1968): Determination of DNA concentration with diphenylamine; Methods in Enzymology.(Grossmann, L. and Moldave, K., editors), Academic Press, New York, 12, 163-166.

39) Graham, F. L. and Van der eb, A. J.(1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology, 52, 456-467.

40) Benveniste, R. E. and Scolnich, E. M.(1973): RNA in mammalian sarcoma virus transformed nonproducer cells homologous to murine leukemia virus RNA. Virology, 51, 370-382.

41) 今本文男，山岸秀夫，藤永蕙，関川賢二，山崎洋子(1975)：ハイブリッド形成：核酸の化学工(日本生化学会編)．1版，東京化学同人，東京，271－321，昭和50．

42) Bratt, M. A. and Rubin, H.(1968): Specific interference among strains of Newcastle disease virus. III. Mechanism of interference. Virology, 35, 395.

43) Hill, M. and Hillova, J.(1972): Recovery of the temperature-sensitive mutant of Rous sarcoma virus from chicken cells exposed to DNA extracted from hamster cells transformed by the mutant. Virology, 49, 309-313.

44) Hsu, I. C. and Yang, W. K.(1977): DNA transfection of ecotropic murine leukemia viruses in mouse cell cultures. Cancer Res., 37, 1709-1714.

45) St.Geme, J. W., Martin, H. L. and Holland, J. J.(1978): Analysis of mumps virus defectiveness in vitro. Life sci., 23, 341-344.

46) Truant, A. L. and Hallum, J. V.(1977): A persistent infection of baby hamster kidney-21 cells with mumps virus and the role of temperature-sensitive variants.
J. med. Virol., 1, 49-67.

47) Truant, A. L. and Hallum, J. V.(1977): A latent infection of baby hamster kidney-21 cells with mumps virus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 156, 470-475.

48) Issacs, A. and Lindenman, J.(1957): Virus interference I. Interferon. Proc. Roy. Soc., B147, 258-267.

49) Desmyter, J. , Melnick, J. L. and Rawls, W. E.(1968): Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). J. Virol., 2, 955-961.

50) Markham, P. D. and Baluda, M. A.(1973): Integrated state of oncornavirus DNA in normal chick cells and in cells transformed by avian myeloblastosis virus.
J. Virol., 12, 721-732.

51) Wrong-Staal, F., Gillespie, D. and Gallo, C.(1976): Proviral sequences of baboon endogenous type C RNA virus in DNA of human leukemic tissue.
Nature, 262, 190-194.

52) Temin, H. M.(1971): The protovirus hypothesis: speculations on the significance of RNA-directed DNA synthesis for normal development and carcinogenesis. J. Nat. Cancer Inst., 46-2, III-VII.

53) Feldman, D., Gross, L. and Swarm, R. L.(1976): Electron microscopic study of virus particles in yolk sac and placenta and hematopoietic organs of newborn C3Hf mice. Cancer res., 36, 1814-1820.

54) 永井哲夫, 高野利也, 田村隆明, 野田亮 (1978): ラット胚胎由来のC型ウイルスの性状, 日本癌学会総会記事, 233, 昭和53.

55) 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.

56) Gross, L., Schidlonsky, G., Feldman, D., Dreyfuss, Y. and Moore, L. A.(1975): C-type virus particles in placenta of normal healthy Spragne-Dawley rats. Pro. Nat. Acad. Sci. USA., 72, 3240-3244.

57) Hubner, R. J. and Todaro, G. J.(1969): Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 64, 1087-1094.

58) Cremer, N. E., Oshiro, L. S. and Hagens, S. J.(1979): Cyclic expression of antigen and infectious virus in a BHK cell line(0-853) persistently infected with an SSPE strain of measles virus. J. gen. Virol., 42, 637-640.

59) Shipman, C., Weide, G.C. V. and Ilma, B.(1969): Prevalence of type R virus-like particles in clones of BHK-21 cells. Virology, 38, 707-710.

60) Mayo, J., Lombardo, J. L., Klein-Szanto, A. J. P., Coni, C. J. and Moreira, J. L.(1973): An oncogenic virus carried by hamster kidney cells. Cancer Res., 33, 2273-2277.

61) Furman, P. A. and Hallum, J. V.(1973): RNA-dependent DNA polymerase activity in preparations of a mutant of newcastle disease virus arising from persistently infected L cells. J. Virol., 12, 548-555.

62) Takemoto, K. K., Linke, H., Miyamura, T. and Freed, G. C.(1979): Persistent BK papovavirus infection of transformed human fetal brain cells. J. Virol., 29, 1177-1185.

63) Allan, R. and Kang, C. Y.(1978): Host function-dependent induction of defective interfering particles of vesicular stomatitis virus. J. Virol., 25, 202-206.

64) Jacobson, S., Dutko, F. J. and Pfau, C. J.(1979): Determinants of spontaneous recovery and persistence in MDCK cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus . J. gen. Virol., 44, 113-121.

THE MODIFICATION OF MUMPS VIRUS RNA GENOME AND REGULATION OF THE GENOMIC EXPRESSION IN BHK21/WI-2 CELLS PERSISTENTLY INFECTED WITH MUMPS VIRUS

Yoshiaki Yura

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

Persistent infection of syrian baby hamster kidney BHK/21-2 cells with attenuated mumps virus strain Urabe(MV) was established. These persistently infected cells, BHK(MV), were found to produce the infectious virus particles and to express MV specific antigen in the cytoplasm as demonstrated by indirect immunofluorescene antibody techique.

Virus from the BHK(MV) culture media havested was pelleted by ultracentrifugation at 100,000xg for 2 hours and then centrifuged on a 15-60 %(W/W) sucrose density gradient at 68,500xg for 2 hours. Thereafter, aliquots from each fraction were collected from the bottom of the centrifuge tube and assayed for MV specific complement fixation(CF) antigen and reverse transcriptase activity. Consequently, a peak of the CF antigen was coincident with the peak of reverse transcriptase activity. This

indicates that the virus particles released from BHK(MV) cells, MVpi, carry reverse transcriptase activity, whereas the parental virus clone used does not contain this enzyme.

The above data suggest that MV specific RNA in the BHK(MV) cells may be reverse-transcribed into DNA and the infectious proviral DNA may be present in the host cells.

Thus, whole-cell DNA preparation isolated from BHK(MV) cells were tested for infectious activity in BHK /WI-2 and HeLa cells. Consequently, the infectious virus particles were recovered from both transfected cells. The infectious property of the DNA from BHK(MV) cells was abolished by exposure of the DNA preparation to DNase but not RNase. When the antigenicity of progeny virus from the HeLa transfection was examined, anti-MV rat serum inhibited the hemagglutinating activity of the progeny viruses and neutralized the plaque forming ability of the parental Urabe but not that of the progeny viruses. However, the progeny viruses were neutralized with antiserum against the retrovirus of BHK21/WI-2 cells, whereas the parental Urabe was not affected by the same serum. These findings let us to suggest that the recombinant DNA of the proviral DNAs of MV and BHK retrovirus exists in the host cells. Thus, the DNA complemetary to MVpi RNA, cDNA, was formed by endogenous reverse transcriptase reaction and this cDNA was hybridized with viral RNAs of MV and BHK retrovirus. Consequently, this cDNA hybridized

both RNAs from MV and BHK retrovirus. Furthermore, this infectious DNA in the BHK(MV) was demonstrated by DNA-RNA hybridization to exist as extrachromosomal DNA but not chromosomal DNA.

図1　仔シリアンハムスター腎由来のBHK21/WI-2細胞とそのムレプスウイルス持続感染細胞

(a)　ムンプスウイルス持続感染BHK21/WI-2細胞〔BHK(MV)〕

細胞継代数15代目のBHK(MV)細胞で，巨細胞形成を特徴とする細胞変性が認められる。

(b)　BHK21/WI-2細胞

(ギムザ染色，倍率150倍)

図2　BHK(MV)　細胞におけるムンプスウイルス抗原の存在

(a)　BHK(MV)　細胞（細胞継代数15代目）

(b)　BHK21/WI-2

抗ムンプスウイルスラット血清とFITCを結合させた抗ラットγグロブリン家兎IgGを用いた間接螢光抗体法にて(a) BHK(MV)　細胞の細胞質にムンプスウイルス抗原の存在を示す特異螢光を認めた。(b) BHK21/WI-2　細胞には特異螢光を認めなかった。

図3の説明

No.

図3　BHK(MV)細胞の産生する感染性ウイルス(MVpi)の粗ウイルス標品を蔗糖密度勾配遠心法で分画して得た各画分のムンプスウイルス補体結合(CF)抗原力価ならびに逆転写酵素活性

MVpiウイルスを含むBHK(MV)細胞の培養上清(300 ml)から細胞残渣を除去した後，100,000×gで2時間超遠心し，沈渣として得られたウイルス標品を0.6 mlの0.01Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に懸濁した。この粗MVpiウイルス標品0.5 mlを4 mlの15－60%(w/w)蔗糖密度勾配上に重層し，68,500×gにて2時間遠心した後，遠心管底を穿刺して，その流出液を18画分に分取した。各々の画分につきムンプスウイルスCF抗原力価ならびに逆転写酵素活性を測定した。

●———●　：CF抗原力価

○- - - - - - -○　：逆転写酵素活性

—·—·—　：蔗糖密度

(20×20)

No.

図4　弱毒化ムンプスウイルス占部株(MV)を蔗糖密度勾配遠心法で分画した各画分のHA力価と逆転写酵素活性

MVを感染したVero細胞の培養上清(300ml)を超遠心して得た粗MV標品を15－60%(w/w)蔗糖密度勾配液上に重層し，遠心後分画・分取した。各々の画分について，1日令ヒヨコ赤血球に対する凝集能(HA力価)ならびに逆転写酵素活性を測定した。なお，実験に使用したMVはBSR単層培養細胞上に形成されたプラックより分離したクローンであり，本研究を通じてこのクローンを実験に使用した。

●———●：HA力価

○- - - - -○：逆転写酵素活性

—·—·—：蔗糖密度

図5　精製MVpiウイルスが保有する逆転写酵素活性の反応時間曲線

蛋白量として2.3μgのウイルス粒子を含む反応混合液100μlを37℃で反応させた。経時的に反応を停止し，酸不溶性画分への^{3}H-TMPの取り込みを測定した。

図6　BHK(MV)　細胞より抽出したDNAをトランスフェクションしたBHK21/WI-2　細胞

トランスフェクション後3代継代培養したBHK21/WI-2細胞。巨細胞形成を特徴とする細胞変性が認められる。

（ギムザ染色，倍率200倍）

図7　トランスフェクションしたBHK21/WI-2細胞におけるムンプスウイルス抗原の発現

間接螢光抗体法にて細胞質にムンプスウイルス抗原の存在を示す特異螢光を認めた。（倍率400倍）

図8　BHK(MV)細胞より抽出したDNAをトランスフェクションしたHeLa細胞に生じた細胞変性

(a)　DNAをトランスフェクションしたHeLa細胞（細胞継代数3代目）

巨細胞形成を特徴とする細胞変性を認める。

(b)　HeLa細胞

細胞は上皮細胞様の形態を示す。

（ギムザ染色，倍率200倍）

No.

図9　BHK(MV)細胞より抽出したDNAをトランスフェクションしたHeLa細胞におけるムンプスウイルス抗原の発現

間接螢光抗体法により検索した。

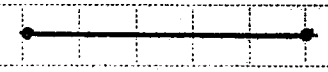
（倍率400倍）

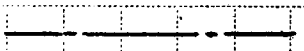
(20×20)

図10 BHK(MV) 細胞より抽出したDNAをHeLa細胞にトランスフェクションして産生されたウイルスのBSR単層培養細胞上に形成されたプラック

図 11　BHK(MV)　細胞の ^{3}H 標識染色体外 DNA (^{3}H-extrach-DNA) と MV-RNA 間のハイブリッド形成

BHK(MV)　細胞を 10 μCi/ml の ^{3}H チミジン (Specific Activity 2.0 Ci/m mol) にて 24 時間標識後，Hirt の方法に準じて調製した ^{3}H-extrach-DNA (1×10^4 cpm) と (a) MV-RNA (80 μg/ml) 或いは (b) イースト RNA (80 μg/ml) との間で，0.1% SDS を含む 4×SSC 中で 66°C 24 時間ハイブリッド形成反応を行なった。その後，硫酸セシウムにて反応液の密度を 1.56 g/cm^3 に調整し，130,000×g で 48 時間平衡密度勾配遠心を行ない，遠心管底より分取した各画分について放射活性を測定した。

 ; ^{3}H-extrach-DNA の放射活性

 ; 硫酸セシウム密度

ρ = 1.62 は MV-RNA の密度を示す。

図12　BHK(MV)細胞の^{3}H標識染色体DNA(^{3}H-ch-DNA)とMV-RNA間のハイブリッド形成

^{3}Hチミジン標識後，Hirtの方法で調製した^{3}H-ch-DNAは(a)MV-RNA或いは(b)イーストRNAとの間でハイブリッド形成反応を行ない，硫酸セシウム平衡密度勾配遠心法にて分析した。

●———●：^{3}H-ch-DNAの放射活性

- - - -

図13　BHK(MV)　細胞における染色体外DNAの特異的合成

(a)　BHK(MV)　細胞及び(b)　BHK21/WI-2　細胞を^{3}Hチミジン10 μCi/mlにて24時間標識後，Hirtの方法に準じて^{3}H-extrach-DNAを抽出した。塩化セシウムにてこのDNA溶液の密度を1.71g/cm^{3}に調整した後，120,000×gで48時間平衡密度勾配遠心を行ない，その後遠心管底より分画・分取し，各画分について放射活性を測定した。

●———●　：^{3}H-extrach-DNAの放射活性

—·—·—　：塩化セシウム密度

図14 塩化セシウム平衡密度勾配遠心法にて検出したBHK(MV)細胞に特異的な^{3}H-extrach-DNAとMV-RNAとの間のハイブリッド形成

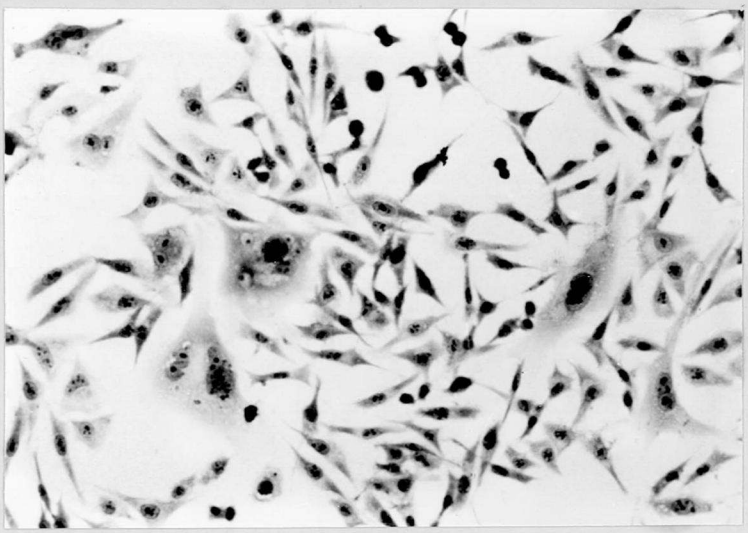
図13(a)の画分26と27より調製した^{3}H-extrach-DNA(5×10^{3} cpm)と(a) MV-RNA(100 μg/ml)或いは(b) Vero細胞RNA(100 μg/ml)との間で図11と同様の操作でハイブリッド形成反応を行ない，硫酸セシウム平衡密度勾配遠心法にて分析した。

——— : ^{3}H-extrach-DNAの放射活性

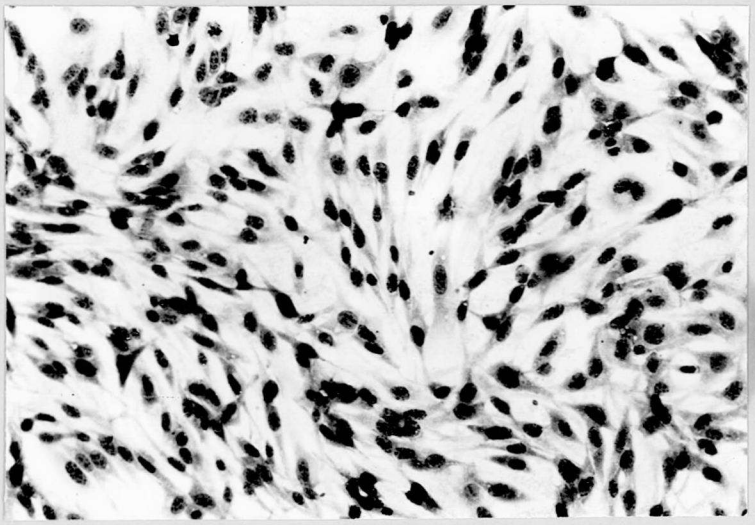
—·—·— : 硫酸セシウム密度

ρ = 1.62はMV-RNAの密度を示す。

図 1

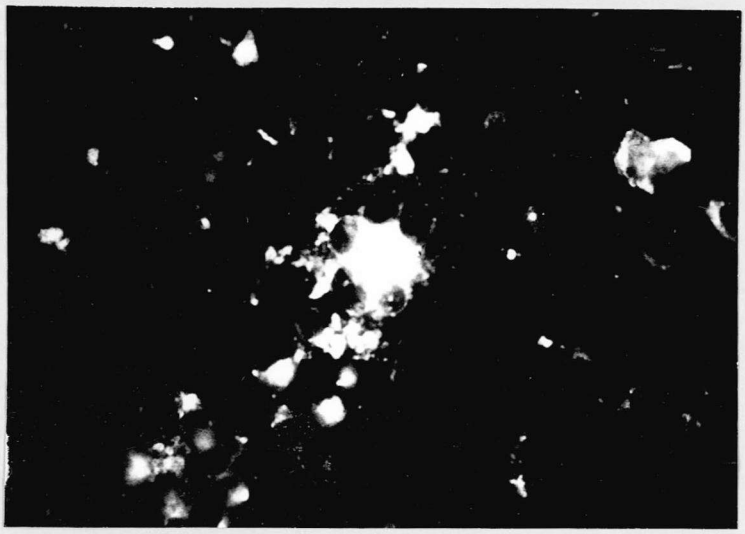


(a)

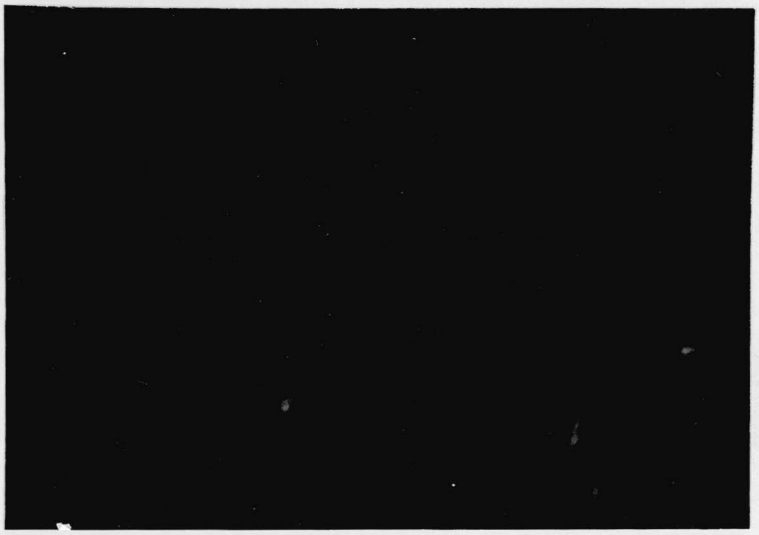


(b)

図2



(a)



(b)

図 3

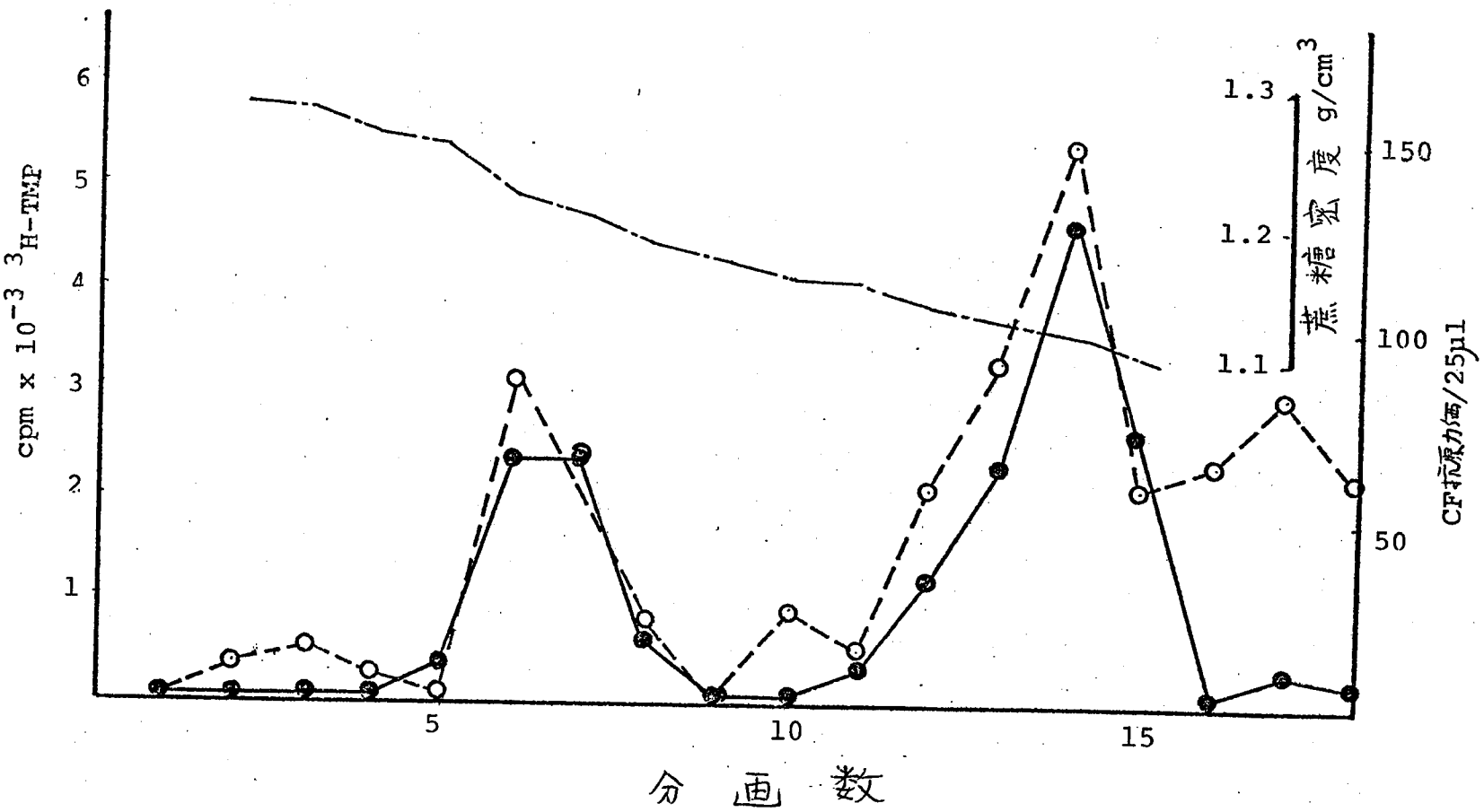

cpm x 10^{-3} ^{3}H-TMP
6
5
4
3
2
1
5
10
15
分画数
1.3
1.2
1.1
蔗糖密度 g/cm^3
150
100
50
CP抗原力価/25μl

図4

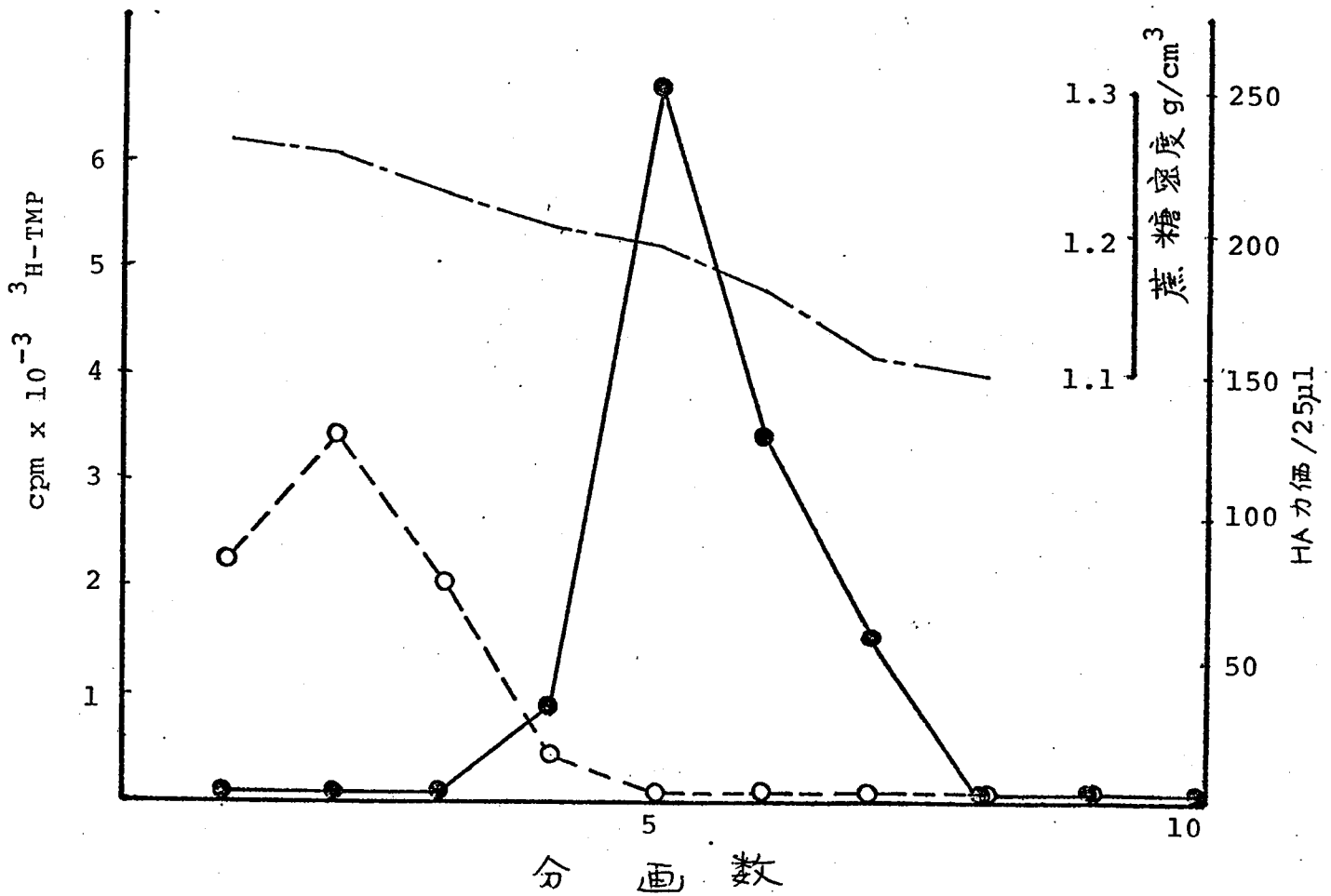

cpm x 10^{-3} ^{3}H-TMP
6
5
4
3
2
1
5
10
分画数
1.3
1.2
1.1
蔗糖密度 g/cm^3
250
200
150
100
50
HA力価/25μl

図5

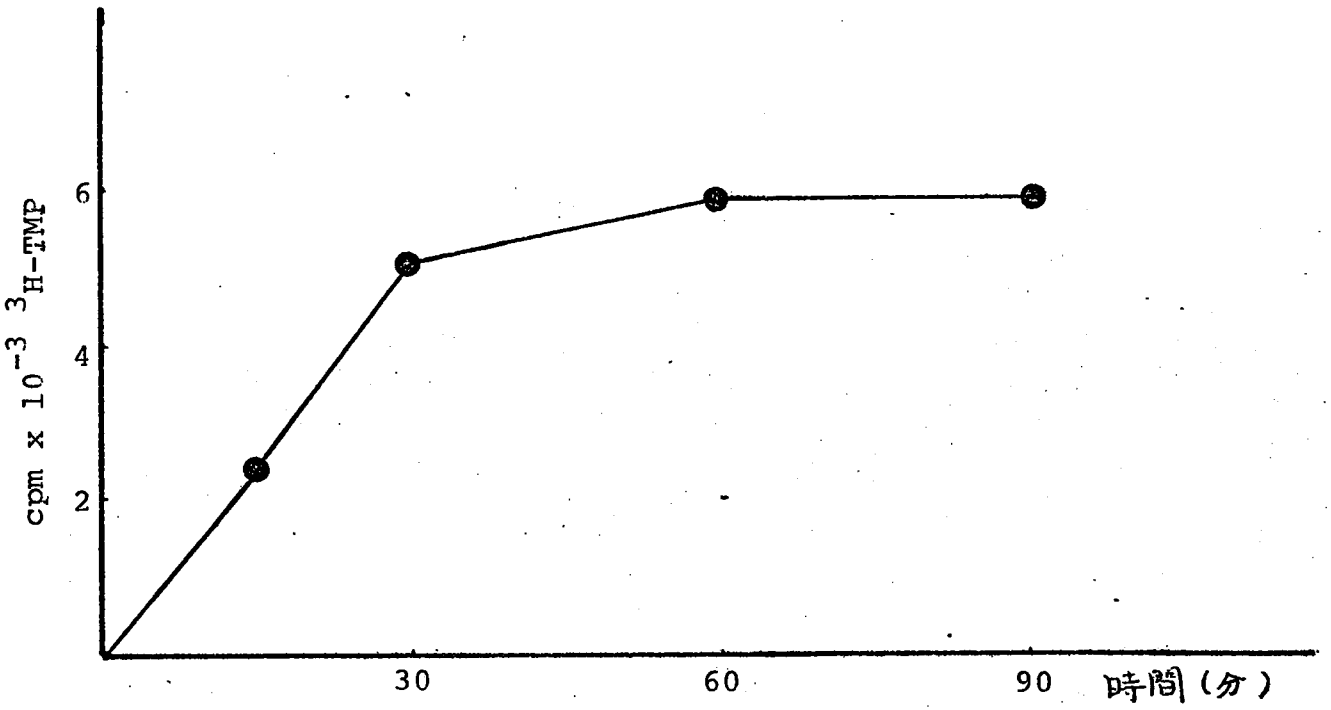


図 6

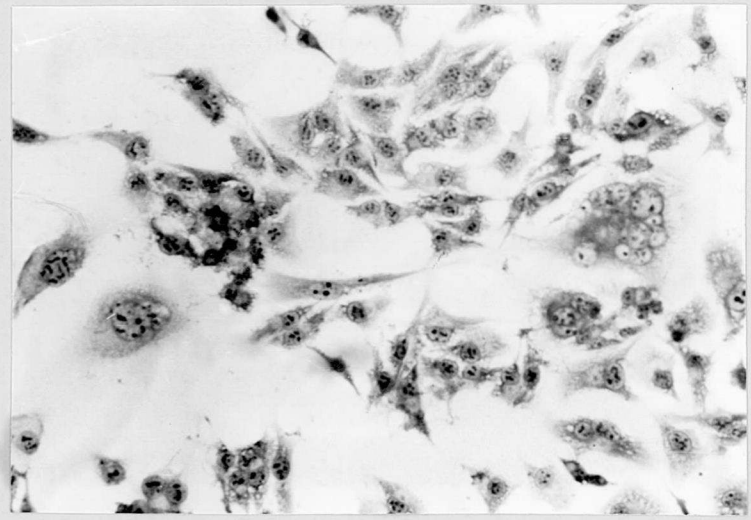
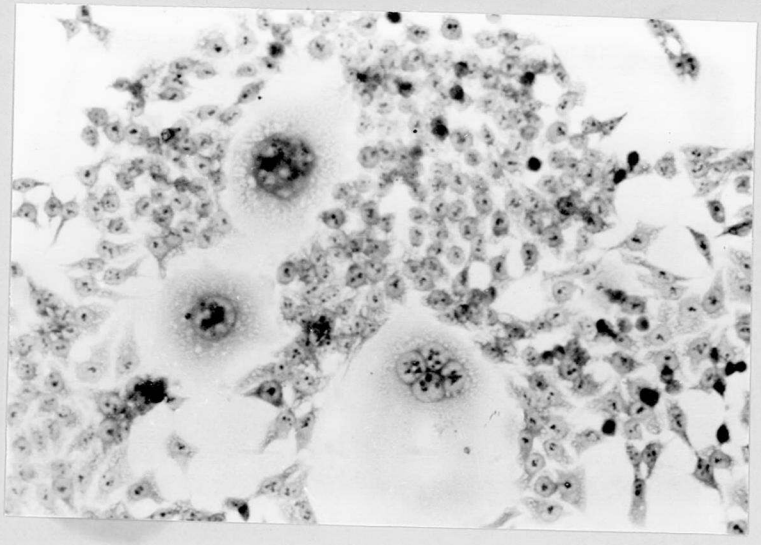
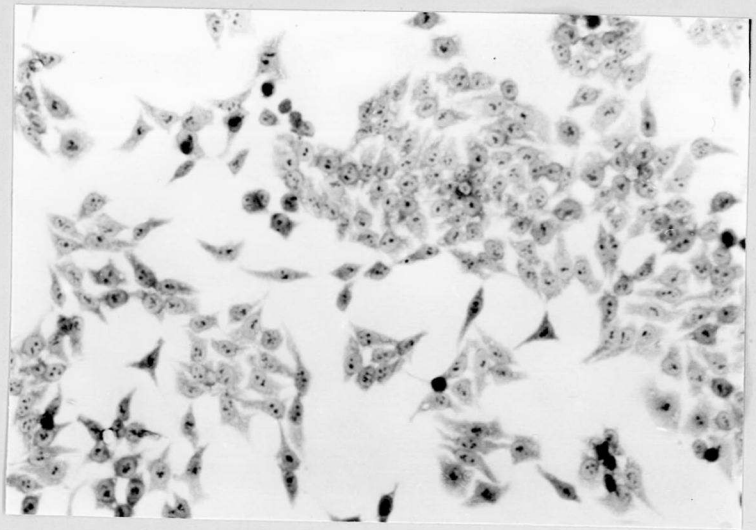


図7

図8



(a)



(b)

図9

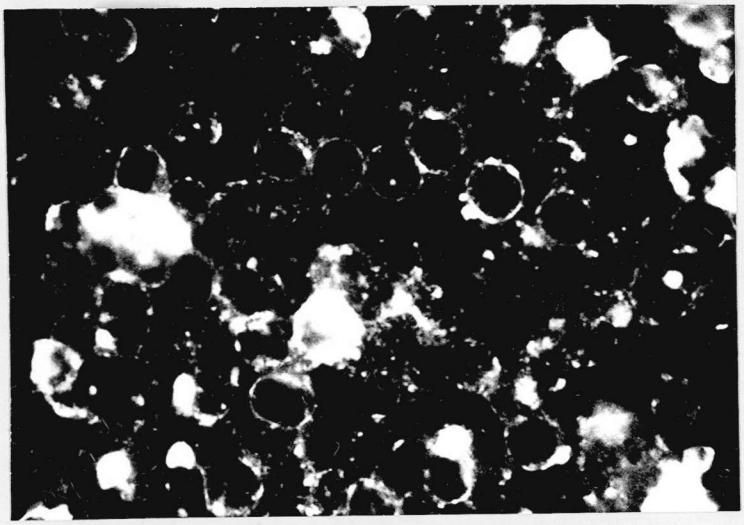


図 10

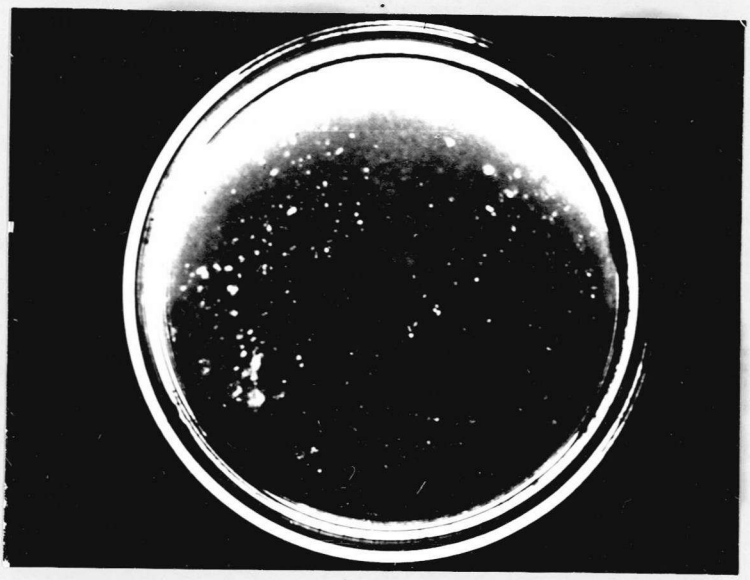


図11
(a)

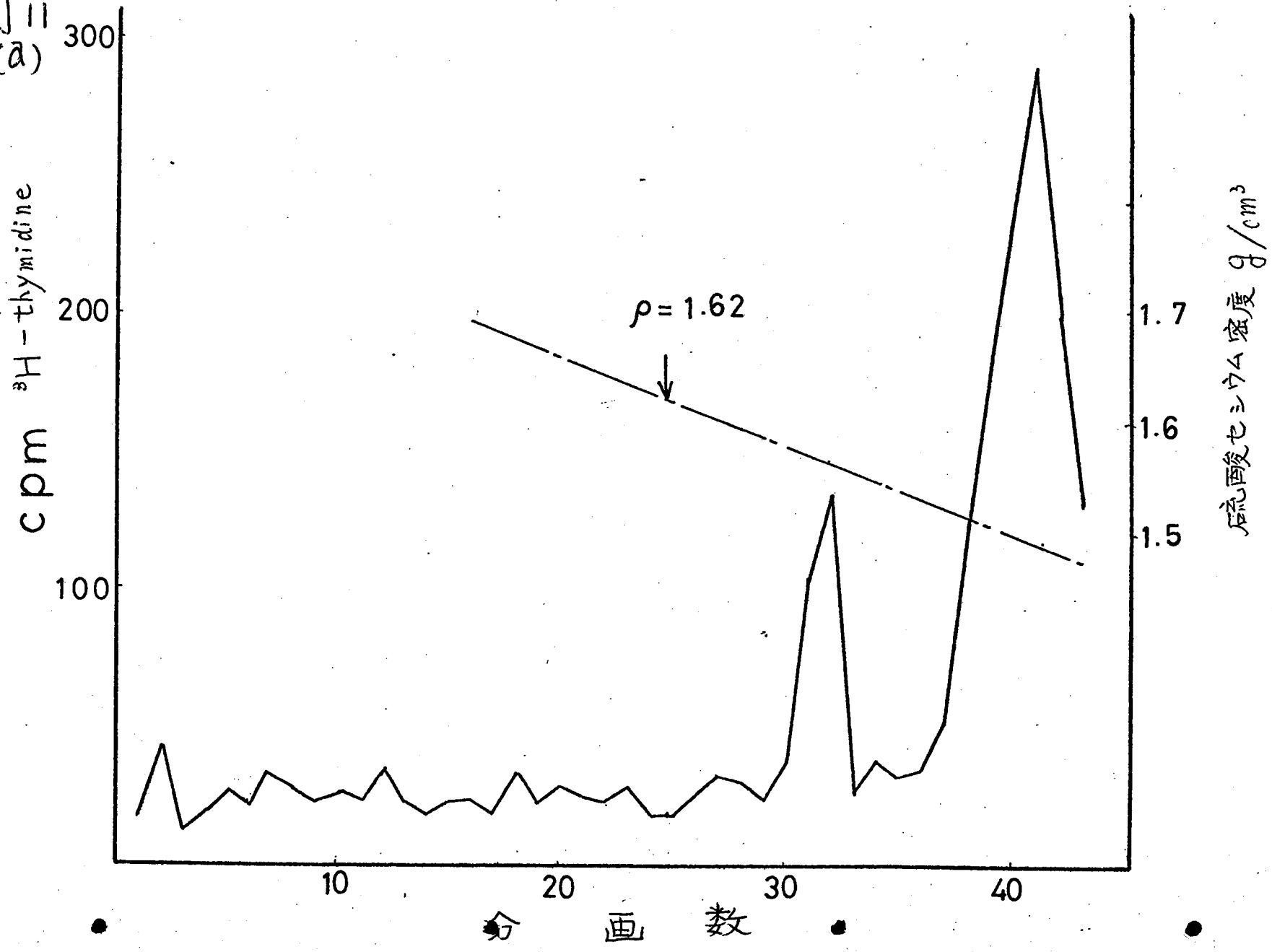

300
200
100
cpm ³H-thymidine
ρ = 1.62
1.7
1.6
1.5
硫酸セシウム密度 g/cm³
10
20
30
40
分画数

図11(b)

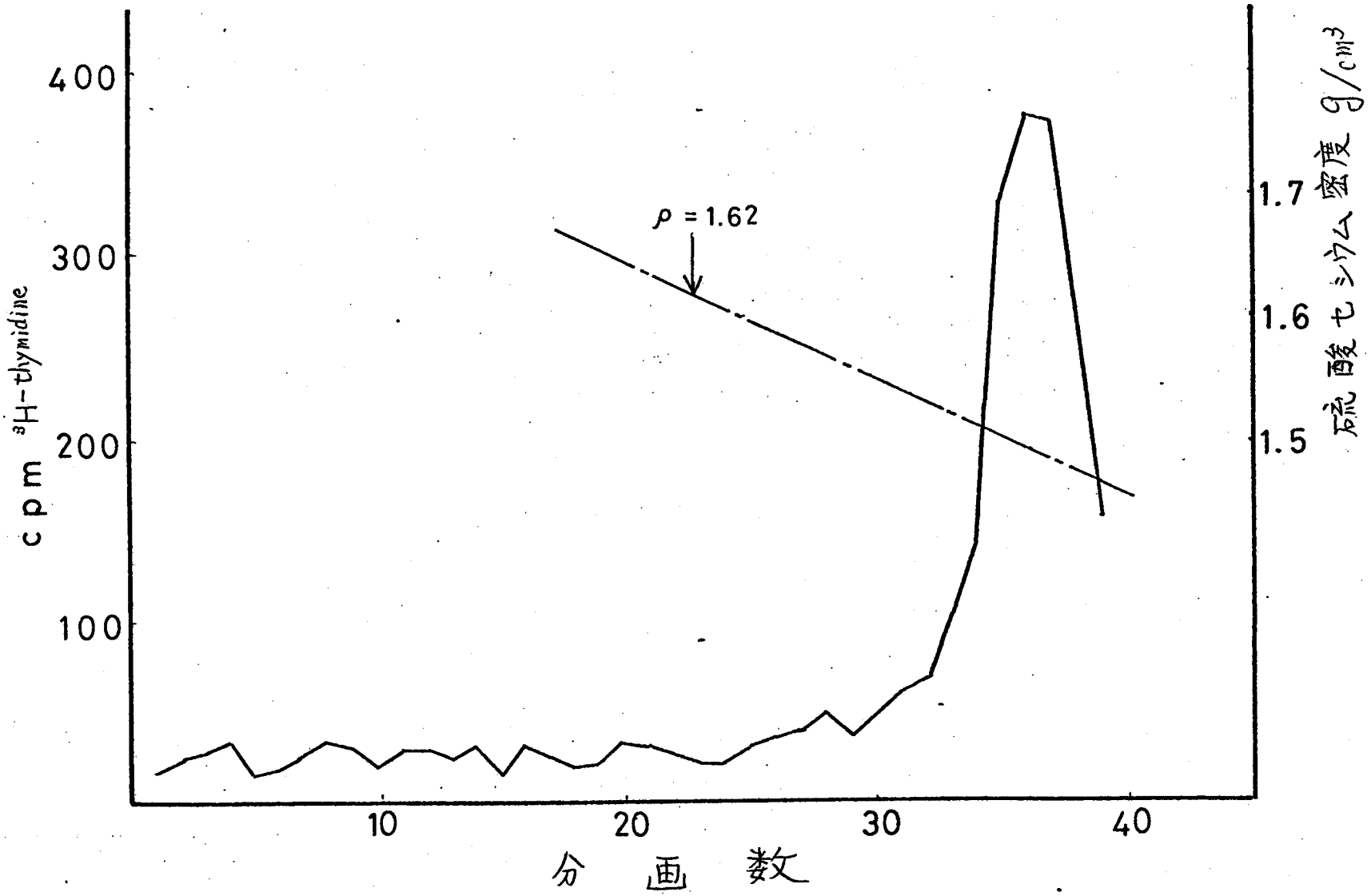

400
300
200
100
cpm ³H-thymidine
ρ = 1.62
1.7
1.6
1.5
硫酸セシウム密度 g/cm³
10
20
30
40
分画数

図12(a)

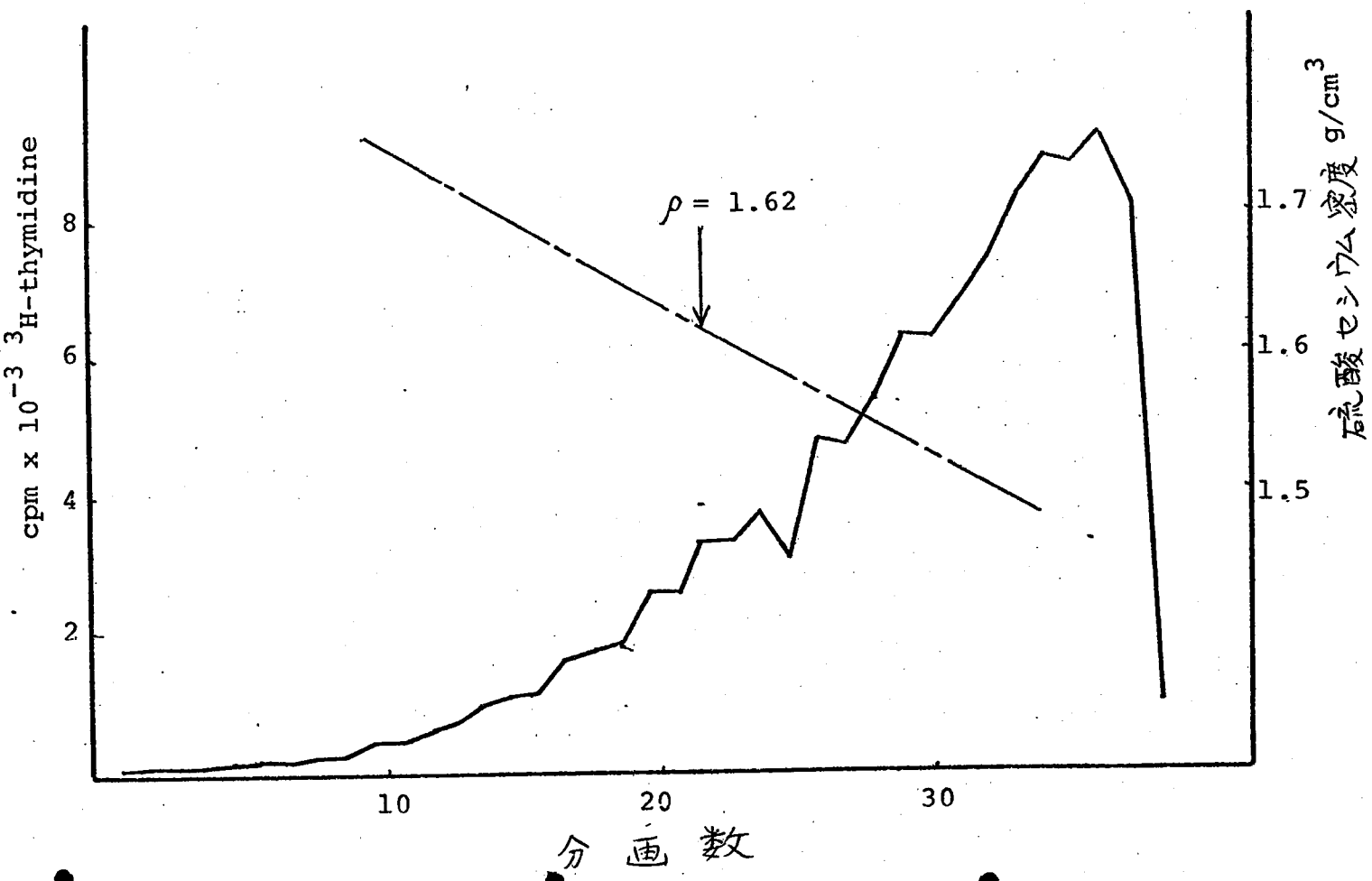

cpm x 10^{-3} ^{3}H-thymidine
8
6
4
2
ρ = 1.62
1.7
1.6
1.5
硫酸セシウム密度 g/cm^3
10
20
30
分画数

図12(b)

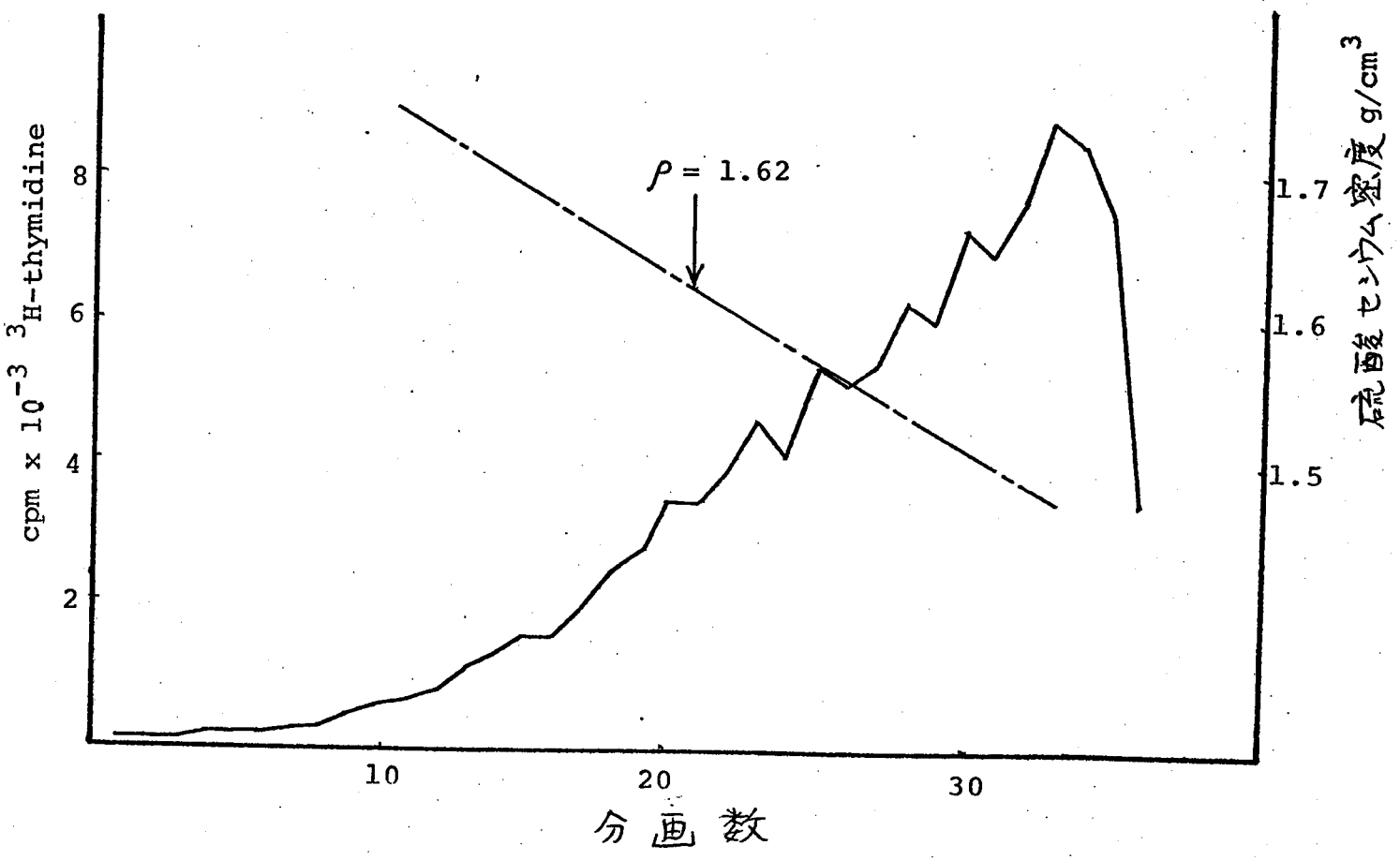

cpm x 10^{-3} ^{3}H-thymidine
8
6
4
2
ρ = 1.62
1.7
1.6
1.5
硫酸セシウム密度 g/cm^3
10
20
30
分画数

図13(a)

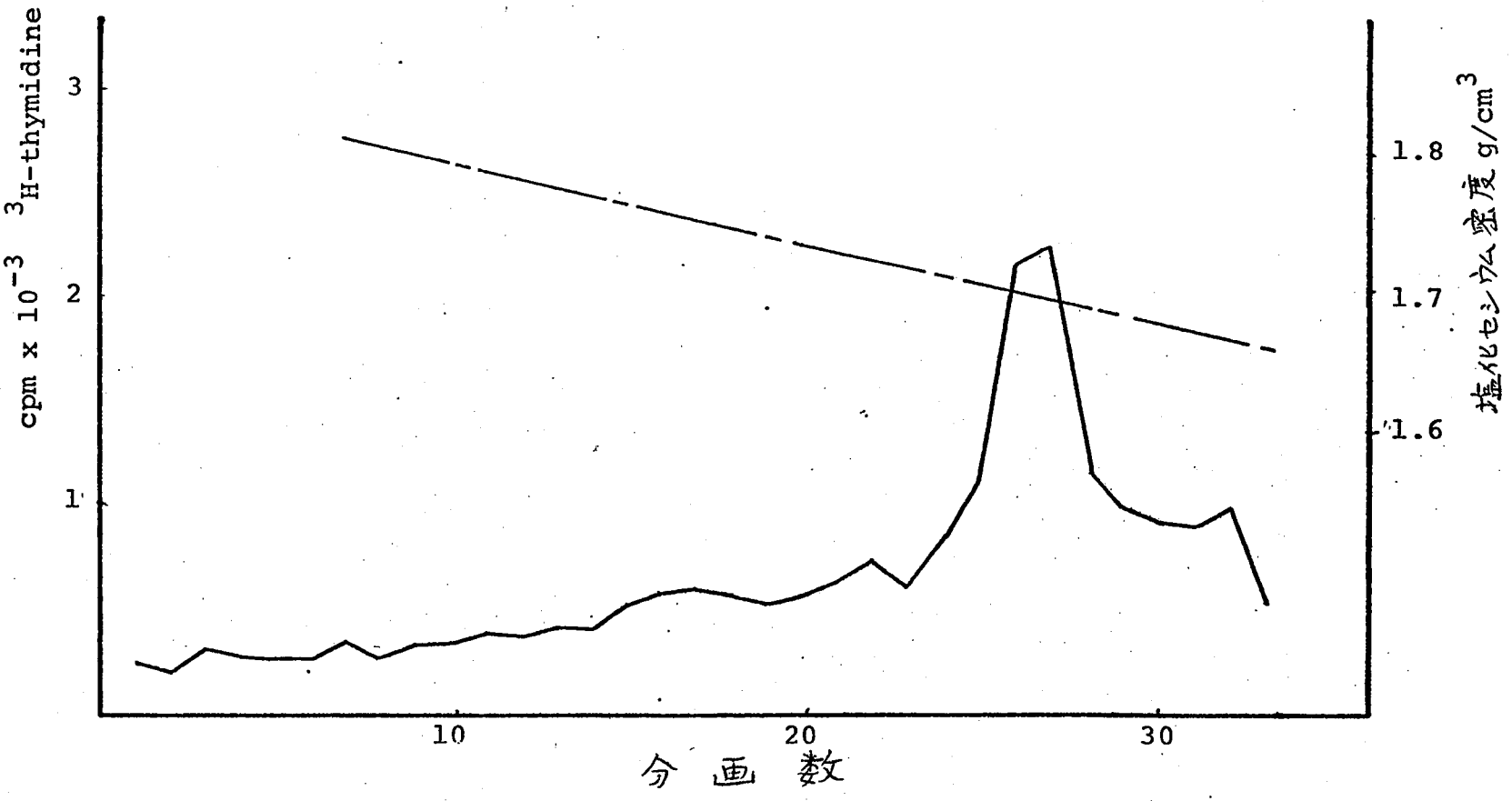


図13(b)

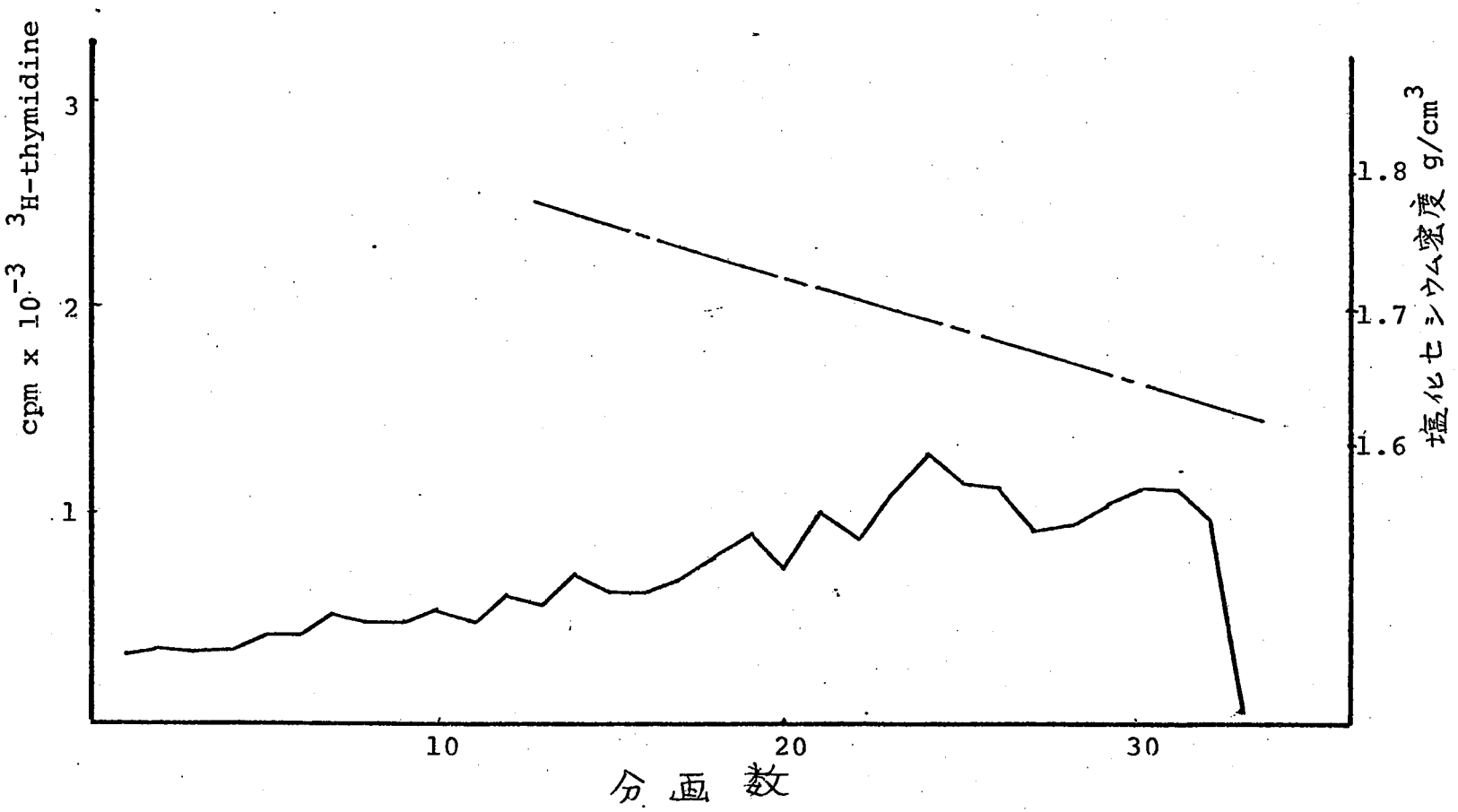


図14(a)

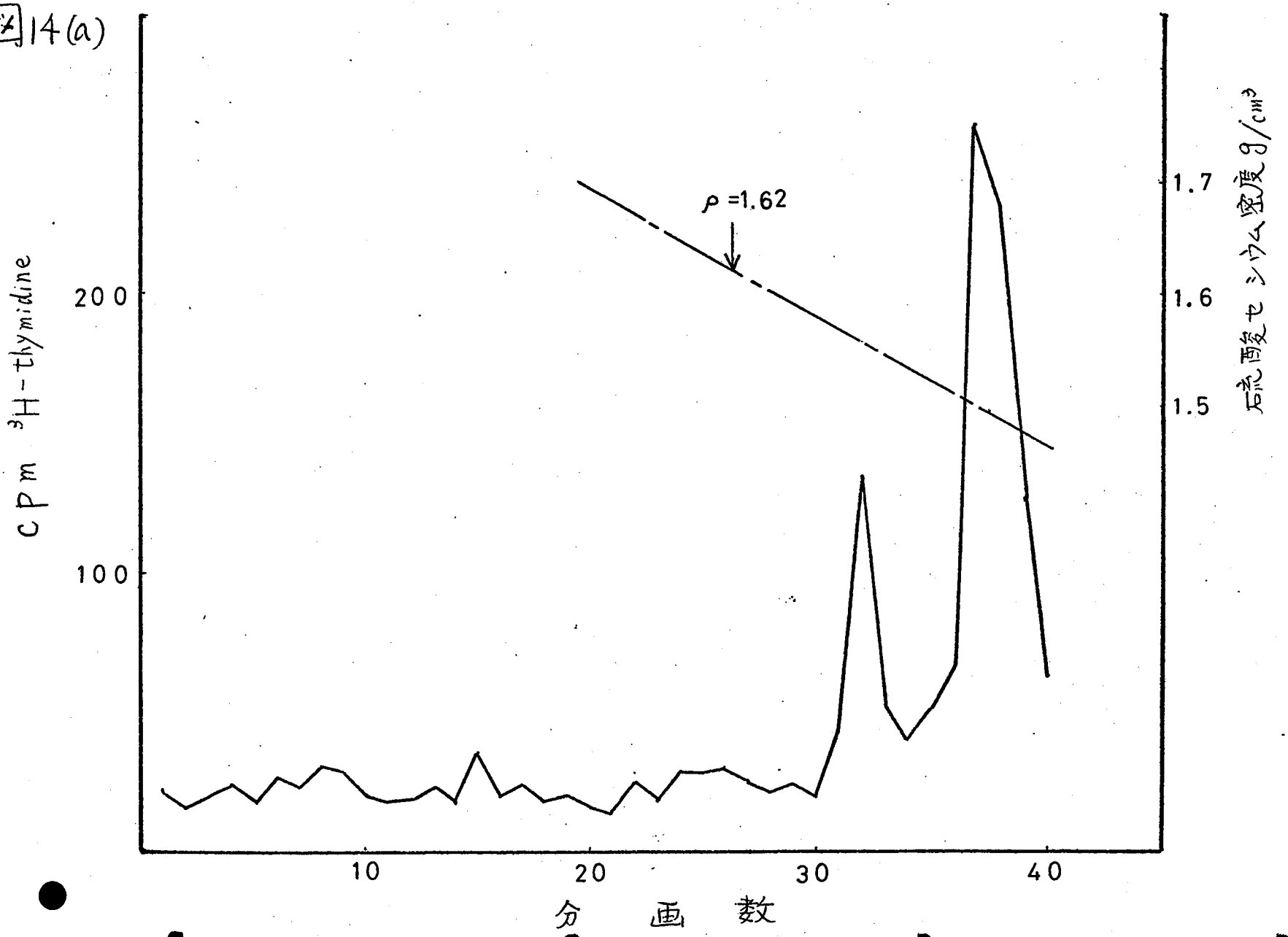

CPM ³H-thymidine
200
100
ρ =1.62
1.7
1.6
1.5
臭酸セシウム密度 g/cm³
10
20
30
40
分画数

図14(b).

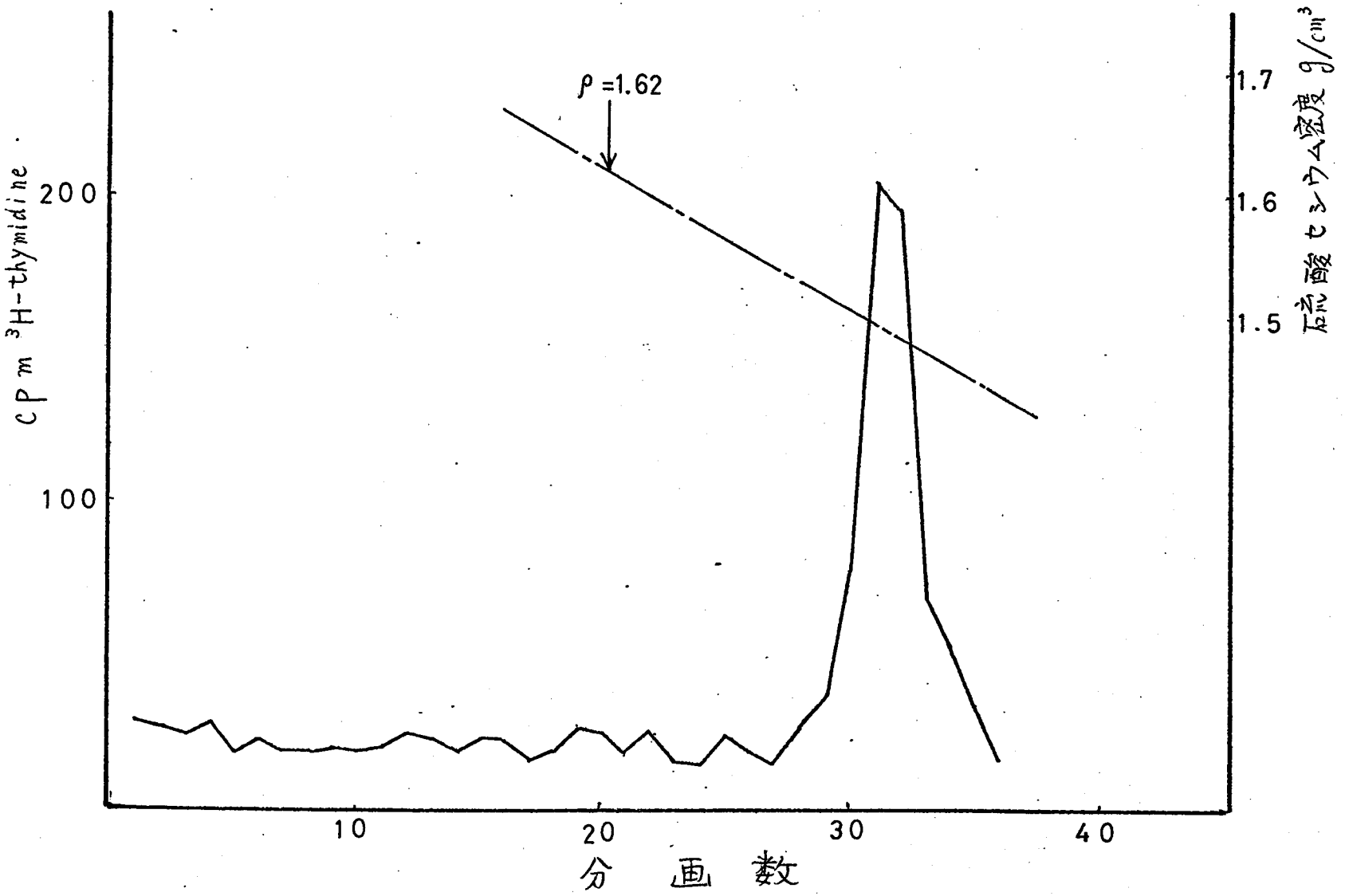

ρ =1.62
CPm ³H-thymidine
200
100
1.7
1.6
1.5
臭酸セシウム密度 g/cm³
10
20
30
40
分 画 数

表1　BHK(MV)ならびにBHK21/WI-2細胞におけるNDVのプラック形成能

細胞	ウイルス希釈	プラック数		平均プラック数
BHK(MV)	10^{-2}	4	0	2
	10^{-3}	0	0	0
	10^{-4}	0	0	0
BHK21/WI-2	10^{-2}	1344	920	1132.0
	10^{-3}	406	450	428.0
	10^{-4}	44	41	22.5

MEMにて10倍階段希釈したNDVを50mm径ガラスペトリ皿に密に形成したBHK(MV)ならびにBHK21/WI-2単層培養細胞に接種した。37℃で1時間ウイルスを吸着させた後，MEMで単層細胞を2回洗浄して未吸着ウイルスを除去し，1%の割合で寒天を含む増殖培養液を重層して37℃で培養した。プラック数は，培養4日目に0.33%(w/v)ニュートラルレッド溶液にて染色後，算定した。

表2 BHK(MV)細胞の産生する感染性ウイルス(MVpi)RNAに相補性を示すDNAとムンプスウイルスRNAならびにBHKレトロウイルスRNAとの間のハイブリッド形成

ウイルスRNA	RNA量	Rot[b)]	ハイブリッド形成率[c)]
MV-RNA[a)]	48μg	18.0	50.3
BHKレトロウイルスRNA	3μg	1.8	10.6

a) MV-RNA: 弱毒化ムンプスウイルス占部株より抽出したRNA

b): RNAを83μg/ml用いて1時間ハイブリッド形成反応を行なった場合を1 Rot mol・sec・liter^{-1}とした。

c): ハイブリッド形成率は

$$\frac{S_1\text{ヌクレアーゼ抵抗性}\ ^3\text{H-cDNAの放射活性(cpm)}}{\text{反応に使用した}\ ^3\text{H-cDNAの放射活性(cpm)}} \times 100$$

で表現した。対照としてイーストRNAとの間で反応を行なった場合のハイブリッド形成率は3.1%であった。

MVpiウイルスの内因性逆転写酵素反応により生成した^{3}H-cDNA(1,200 cpm)とMV-RNAおよびBHKレトロウイルスRNAとの間で0.1% SDSを含む4×SSC中で66°C 24時間ハイブリッド形成反応を行なった。その後,11倍容量のS$_1$ヌクレアーゼ520単位を含む酢酸緩衝液(pH 4.5)を加え,45°Cで75分間反応させ未反応の一本鎖核酸を分解した。

表 3

BHK(MV)細胞より抽出したDNAによるBHK21/WI-2及びHeLa細胞へのトランスフェクション

DNA処理細胞	DNAに対する前処理	MV抗原[c)]の発現	HA産生[c)]	感染性ウイルス[c)]の産生 (PFU/ml)
BHK21/WI-2	DNA[a)]	+	+	1.3×10^5
	DNA+RNase[b)]	+	+	4.2×10^5
	DNA+DNase[b)]	-	-	0
HeLa	DNA	+	+	3.8×10^4
	DNA+RNase	+	+	2.6×10^3
	DNA+DNase	-	-	0

a)：BHK(MV)細胞より marmur 法に準じて調製したDNA標品(50－100μg)を，あらかじめ60mm径ガラスペトリ皿に増殖させたBHK21/WI-2及びHeLa単層培養細胞へ接種した。

b)：BHK(MV)細胞DNAをRNase A(50μg/ml)或いは，DNase(10μg/ml)にて37℃で1時間前処理した後，トランスフェクションに使用した。

c)：トランスフェクションされたBHK21/WI-2及びHeLa細胞内におけるムンプスウイルス特異抗原の発現は間接螢光抗体法にて，また培養上清中へのウイルス粒子の産生は，培養上清の1日分とヒヨコ赤血球に対する凝集能とBSR単層培養細胞上でのプラック形成能により検索した。

表4　BHK(MV)細胞より抽出したDNAで処理した細胞の産生する感染性ウイルスのHA力価とプラック形成能

ウイルス		HA力価	プラック形成能
BHK(MV-DNA)[a]	cl 1[c]	8	4.2×10^5
	cl 2	8	1.2×10^4
	cl 3	2	1.6×10^4
HeLa(MV-DNA)[b]	cl 1	1	ND[d]
	cl 2	8	3.1×10^3
	cl 3	1	ND
	cl 4	1	ND
	cl 5	2	ND
	cl 6	4	ND
	cl 7	8	2.6×10^2
	cl 8	1	ND
	cl 9	8	2.6×10^3
	cl 10	4	ND

a) BHK(MV-DNA)：DNA処理BHK21/WI-2細胞の産生するウイルス

b) HeLa(MV-DNA)：DNA処理HeLa細胞の産生するウイルス

c)：BHK(MV-DNA)及びHeLa(MV-DNA)ウイルスがBSR単層培養細胞に形成したプラックを分離することにより，ウイルスクローンを得た。

d) ND：実験が行なわれなかった。

各々のウイルスクローンを2mlのMEMに懸濁した後，HA力価とプラック形成能を測定した。

表5

抗ムンプスウイルス及び抗BHKレトロウイルス血清による HeLa (MV-DNA)ウイルスの プラック形成能中和試験

抗血清	血清希釈	ムンプスウイルス	HeLa (MV-DNA)ウイルス cl 2[b]	cl 7	cl 9
	対照	240[a]	629	53	396
抗ムンプスウイルスラット血清	x 20	0	690	52	300
	x 40	2	658	42	158
	x 80	4	560	37	248
	x 160	18	678	55	308
抗BHKレトロウイルス家兎血清	x 20	215	238	2	3
	x 40	198	200	4	6
	x 80	284	234	6	7
	x 160	205	606	10	14

a)：プラック数は2プレートの平均値を示す。

b)：ウイルスクローンは一度Vero細胞にて増殖させたのち実験に使用した。

希釈抗血清0.3mlと等容量のウイルス標品(100~600PFU/ml)とを37°Cで1時間反応させた後，この混合液0.1mlをBSR単層培養細胞に接種し，37°Cで1時間吸着させた。MEMにて2回洗浄し未吸着ウイルスと抗血清を除去した後，寒天増殖培養液を重層した。形成されたプラック数は，ニュートラルレッド溶液で染色後，算定した。

表6

抗ムンプスウイルス及び抗BHKレトロウイルス血清によるHeLa(MV-DNA)ウイルスの赤血球凝集能抑制反応(HAI)

抗血清	ムンプスウイルス	HeLa(MV-DNA)ウイルス cl 2	cl 7	cl 9
抗ムンプスウイルスラット血清	64 x[a)]	32 x	8 x	4 x
抗BHKレトロウイルス家兎血清	<4 x	<4 x	<4 x	<4 x

a) ：ウイルスによる赤血球凝集を完全に抑制する抗血清の最高希釈倍数をHAI力価とした。

HA抗原の4単位と等容量の2倍階段希釈した抗血清とを37°Cで1時間反応させた後，この反応混合液と等容量の0.33%1日令ヒヨコ赤血球浮遊液を加え，室温で1時間反応させた。