



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

(20×20)

脚注

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、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、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 BHK 21/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探索した。

実験材料及び実験方法

1. 細胞並びに細胞培養法

仔シリウスレ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2 mM 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。

これらの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 15 ml を 90 mm 径ガラスペトリ皿に植え込み, 5% CO_2 培養器中で 37°C 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 MV 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 2 3 回洗浄し、増殖培養液を加え 37°C 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、 $300\times g$ 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 とともに、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°C 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、50 mm 径ガウスペトリ皿に植之込み、5% CO_2 培養器中で 37°C 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 0.1 ml

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ねて、5% CO₂ 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0.2 ml を寒天培養液上加え、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、NDV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90 mm径ガウ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

スを除去了。その後、増殖培養液を15mlを加え、5%CO₂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週間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ながら、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 細胞とは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. 間接蛍光抗体法

BHK (MV) 細胞における ムンプスウイルス抗原の存在を間接蛍光抗体法により検索した。細胞を 24×32 mm のカバーグラス上で 37°C 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°C に冷却した D-PBS にて 3 回洗浄した後、冷アセトン (4°C) 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°C 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、蛍光色素フルオレセンス・インチオシアネイト (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°C 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(pH 9.5)にて封入し、蛍光顕微鏡(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25 μ l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カ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25 μ lをD-PBSにて2倍階段希釈した後、等容量の4単位のHAカ価を保有するウイ

ルス標品を各々の希釈抗血清と混和し、 37°C で1時間反応させた。その後0.33%の1日冷じココ赤血球浮遊液50 μl 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率をもって表現した。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0.5 ml に対しコレウ菌異型株558の培養液より得た Receptor destroying enzyme(RDE, 武田薬工, 大阪) 1.5 ml を加え 37°C で一夜処理した。その後 56°C 30分間熱不活化することにより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0.3 ml 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°C

で1時間反応させた。その後、反応混合液0.1 ml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ねた。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、抗血清の代わ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 25 μ l をバロナール緩衝液 (pH 7.5) に 2 2 倍階段希釈したものに、等容量の 4 倍の CF 抗体カ価を保有する抗ムンブスウイルス血清と 50 μ l の補体カ価 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 $^{\circ}$ C で 18 時間反応させた。この反応混合液に対し、あらかじめバロナール緩衝液に 2.3% (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兔血清 (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 50 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C 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。ムンブスウイルス標品の保有する CF 抗原カ価は、溶血反応を示さないウイルス標品の最高希釈倍数をもって表現した。なお反応には、56 $^{\circ}$ C 30 分間熱不活化した抗血清を使用した。

10. ムンブスウイルス精製法

Vero 細胞を用いて 1 度増殖させた弱毒化ムンブ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MPV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 $17,000\times g$ で30分間遠心して細胞残渣を除去した後、 $100,000\times g$ 2時間超遠心してウイルスを沈漬とした。この沈漬を少量の10 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）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

0.5 ml を cellulose nitrate ultracentrifuge tube

（Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA）

中で形成した4 ml の15-60%（w/w）蔗糖密度勾配溶液上に重層し、 $68,500\times g$ 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カ価或いはCF抗原カ価を測定し、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 (4×10^6 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 の方法に準じて測定した³³⁾。

40mM トリス塩酸緩衝液 ($\text{pH } 8.0$), 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.), $10\mu\text{Ci}$ ^3H -TTP (Specific
 Activity $1.76\text{ Ci}/\text{mmol}$, New England Nuclear,
 Boston, Mass., USA), 0.05% Triton X-100

石井製薬, 大阪) および精製ウイルス標品を

含む全量 100ml 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 100 μ g のウシ胸腺 DNA (Sigma Chemical Co.) を加え, 少なくとも 10 分間 0℃ で氷冷後, 300ml の冷蒸留水を加え 1,000 $\times$ 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ろ過装置にてニトロセルローズ・メムブランフィルター (孔径 0.45 μ m, 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質量は, Lowry の方法にて測定した³⁴⁾。

B. 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) 4 ml に懸濁し, 10% のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 0.2 ml と NET 緩衝液にて飽和したフェノール 2 ml および 4% イソアミルアルコールを含むクロロフォルム 2 ml を加え, 10 分間室温で振盪した。2,000xg 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, 17,000xg 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, 0.1xSSC (1xSSC 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)ール反応あるいはOD_{260nm}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(4×10^7 個)を0.15M NaClと0.1MEDTA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分間加熱し、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、 $2,000 \times g$ 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 $800 \times g$ で10分間遠心して沈渣とした。この沈渣を5 mlの $0.1 \times \text{SSC}$ 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 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加え 37°C で4時間処理した。更に $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の RNase A (Sigma Chemical Co.) に 37°C で1時間処理することにより残存する 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2 mlの $0.1 \times \text{SSC}$ に溶解して 4°C で保存した。抽出した DNA の $\text{OD}_{260/280 \text{ nm}}$ 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 0.01 M EDTA を含む水溶液 ($\text{pH } 7.5$) 4 ml 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稠になった水溶液に、最終濃度 1 M になるように 5 M の NaCl 水溶液を1 ml 加え緩徐に混和した。 4°C で少なくとも8時間

以上静置後, 4°C で $17,000 \times g$ 30 分間遠心を行ない, 分離した上清に $10 \times \text{NTE}$ 緩衝液を $1/10$ 容量加え染色体外 DNA (extra-DNA) 画分とし, 沈澱は $1 \times \text{NTE}$ 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 法で行なう, たと同様に順次 Protease, RNase, フェニール処理を行なって得た精製 DNA 標品は $0.1 \times \text{SSC}$ 中に溶解し, 4°C で保存した。なお, DNA 量はジフェニルアミン反応あるいは $\text{OD}_{260\text{nm}}$ 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 のトランスフェクション法により検定した³⁹⁾。 $0.1 \times \text{SSC}$ に溶解した DNA $100 \mu\text{g}$ を 26 ゲージ注射針を 6 回通過させて切断した後, 25 mM のトリス塩酸緩衝液に 8.0 g/l NaCl , 0.37 g/l KCl , $0.125 \text{ g/l Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ および 1.0 g/l dextrose を含む水溶液にて 10 倍希釈し, 最終濃度が 125 mM にな

まよう 2 M 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記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 500 μl 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 30 μg 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

末0.1XSSC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, 0.1XSSC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 (1,200 cpm) とウイルスRNA 48 μg とを100℃で10分間熱処理して急冷後, この反応混合液を4XSSC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_1 ヌクレアーゼ (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 (pH 4.5) 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，予過吸引装置にてニトロセルロース・メンブランフイルター上に採取し，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³H標識 cDNA に対する S1 スクリーニング抵抗性を示す³H標識 cDNA の割合を放射活性の比で表わした。R_{0t} は RNA 量を OD_{260nm} の吸光度で測定して， $OD_{260nm} / 2 \times \text{反応時間} = R_{0t}$ の式により算出した⁴¹⁾。なお，実験に使用した S1 スクリーニング抵抗性の力価は 520 単位であり，この力価では一本鎖の³H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 (extrachromosomal DNA) および染色体 DNA (chromosomal DNA) と MV-RNA 間の相補性の検定

BHK (MV) 細胞を 90 mm 径ガラスペトリ皿上に 37°C で 2 日間培養して，ほぼ密に増殖した単層培養細胞を 10 μ Ci/ml の³H-チミジン (Specific Activity 2.0 Ci/mmol, New England Nuclear, USA) を含む 15 ml の培養液を用いて，さらに 37°C 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 ^3H 標識 extract-DNA (^3H -extract-DNA) および ^3H 標識 ch-DNA (^3H -ch-DNA) とに分けて抽出した。20 μg の ^3H -extract-DNA ($1 \times 10^4 \text{ cpm}$) 或いは 15 μg の ^3H -ch-DNA ($30 \times 10^4 \text{ cpm}$) と MV-RNA 50 μg とを 100 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間熱処理して氷浴中で急冷後, 0.1% SDS を含み 4xSSC になるように反応混合液の塩濃度を調整し, 全量を 600 μl とし 66 $^{\circ}\text{C}$ 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, た。すなわち, 反応混合液を 2xSSC に調整し, これに硫酸セシウムを密度が 1.56 g/cm^3 とするように加えた後, Beckman SW 50.1 ローターを用いて 15 $^{\circ}\text{C}$ で 130,000 $\times g$ 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 の代わりにイースト RNA (Sigma Chemical Co.) 50 μg 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 細胞とほぼ同様な神経芽細胞であった。

この BHK(MV) 細胞における MV 特異抗原の存在を間接蛍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 特異蛍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蛍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、 $68,500 \times g$ 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画分に分離した。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/cm^3 と 1.12 g/cm^3 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抗原カ価は画分6では64倍、画分14では128倍であった。このムンブスウイルス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/25 μ l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ヒムンブスウイルスを上記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 $1.198/\text{cm}^3$ にHAカ価256単位/25 μ l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抗原カ価は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へ

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 MV_{pi} 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 MV_{pi} 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る性格を示す MV_{pi} 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 MV_{pi} 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 MV_{pi} ウイルス標品を蔗糖密度勾配遠心法により分離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 抗原を含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、 MT_{pi} 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/cm^3 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 MT_{pi} 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。 3H -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(MT)細胞より産生されている MT_{pi} 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 MT_{pi} 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、 MT_{pi} ウイルス遺伝子はMT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

ていふと考えられる。そこで、MT_{pi} 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、MT_{pi} ウイルス RNA を鋳型として合成した³H 標識 DNA (³H-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³H-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³H-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、MT_{pi} 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 MV pi 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、MV pi 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 50-100 μ g 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査した。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、間接蛍光抗体法を用いて、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蛍光が認められた。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蛍光抗体法にて、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 4.2×10^5 PFU/ml の感染力価を示す
ウイルス粒子を産生するが、DNase 10 μ g/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 μ g/ml で前処
理したDNAでは、その感染性は失われなかつ
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) あるいは 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/25mlのHAカ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 $4.2 \times 10^5 - 1.2 \times 10^4$ PFU/ml の感染カ価を、HeLa(MV-DNA)ウイルスのクローン2, 7, 9では $3.1 \times 10^3 - 2.6 \times 10^2$ 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²²⁾における報告並びに、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 (MT-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 (MT-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、MT 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。この結果は表 5 に示したごとく、親株ウイルスである MT 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 MT 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 MT と各々のクローンの HA カ価を 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、クローレ-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(MV) 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(MV) 細胞 DNA を ^3H -チミンにて標識した後、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 MV-RNA との間でハイブリット形成を行なった。形成された DNA-RNA ハイブリットは、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 ^3H -チミン標識した染色体外 DNA (^3H -extrach-DNA) と MV-RNA 間のハイブリット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 の両方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(MV) 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 ^3H -extrach-DNA との間で上に述べたと同様にハイブリット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 の密度を示す両方のみ放射活性のピークが存在した(図 11

(b))。存お³H標識 MV-RNA の密度は 1.62 g/cm^3 であり, extract-DNA のそれは 1.49 g/cm^3 であった。以上の実験結果より, 密度 1.56 g/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 extract-DNA に存在している事を強く示唆した。

一方, ³H標識染色体 DNA (³H-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、以下の実験を行った。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 ^3H 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 ^3H 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、仔ニリアンハムスター腎由来の株化細胞である BHK21/WI-2 細胞に弱毒化ムシ

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、ムレプスウイルス 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)} 等があげられている。

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。VSV⁴⁾ 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⁾、ムレプスウイルス DI 粒子を分離・固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。NDV⁸⁾, VSV⁹⁾ 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存し、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), 49)}。しかし本研究で利用したPHK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ウチノマイシン 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存した。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毒性 RNA 型ウイルスでは、Zhdanov 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、ラットの歯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、宿主細胞に存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。Cremer⁵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-0-853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-0-853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中間体の存在が明らかになった。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、核酸ハイブリット形成法にてムンプス変種株ウイルスに相補性を示す DNA の存在部位を探索したところ、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 に組み込まれずに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

はアフリカ緑ガール由来の LLC-MK₂ 細胞

胞を用いた風疹ウイルスの持続感染系で、核酸ハイブリット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-MK₂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 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 はアライノマイシンDで宿主細胞を処理すると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⁽³⁾。また、Jacobson は、リンパ球性脈絡膜炎ウイルスについて、野全株ウイルスとも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⁽⁴⁾。本研究で逆転写酵素活性を伴有するム

コプス変種株ウイルスは、宿主細胞に潜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、今後ムンブスウイルスの持続感染機構を解明するためには、このムンブ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

生体におけるムンブ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 細胞にムンブ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、ムンブスウイルス 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蛍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 ムンプスウイルス占部株 (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 と宿主細胞に存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、感染性のウイルスの産生を認めた。HeLa 細胞にトランスフェクショナル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 の方法に従っ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、RNA 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的教室員の方々に感謝いたします。

文 献

- 1) Sultz, H.A., Hart, B.A., Zieleznig, 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): Characterization 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 Parfahovich, 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 erythematosus. Nature, 275, 667-669.
- 18) Norval, M. (1979): Mechanism of persistence of rubella virus in LLC-MK₂ 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, 11, 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): Cytopathic 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 SV₄₀ の研究. 日本臨床, 21, 1201-1215, 昭和38.

- 27) Gay, G., Coffman, W. and Kubicek, 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 hominis type 2 and rubella virus in variants isolated from the colonies of BHK21/WF-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. Biological 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): ウイルスの細胞凝集反応. ウイルス実験学総論(国立予防衛生研究所学会編). 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会編). 2版, 丸善株式会社, 東京, 247-252, 昭和48.

- 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, 山岸孝夫, 藤永恵, 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 provirus 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): ラット歯胚由来の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 Sprague-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 immunofluorescence antibody technique.

Virus from the BHK(MV) culture media harvested 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 仔シリアルヘルムスター腎由来の BHK21/WI-2 細胞とそのムレプスウイルス持続感染細胞

(a) ムレ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 Ig G を用いた間接蛍光抗体法にて (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蛍光を認めた。(b) BHK21/WI-2 細胞には特異蛍光を認めなかった。

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) 抗原カ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, $100,000 \times g$ 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 0.01 M 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, $68,500 \times g$ に22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 抗原カ価ならびに逆転写酵素活性を測定した。

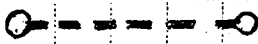
●————● : CF抗原カ価
○-----○ : 逆転写酵素活性
——— : 蔗糖密度

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

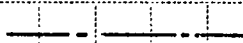
MVを感染したVero細胞の培養上清(300 ml)を超遠心して得た粗MV標品を15-60% (w/w)蔗糖密度勾配液上に重層し、遠心後分画・分取した。各々の画分について、1日令ヒヨコ赤血球に対する凝集能(HAカ価)ならびに逆転写酵素活性を測定した。なお、実験に使用したMVはBSR単層培養細胞上に形成されたプラックより分離したクローンであり、本研究を通じてこのクローンを実験に使用した。



: HA カ 価



: 逆 転 写 酵 素 活 性



: 蔗 糖 密 度

図 5 精製 MVpi ウィ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 $2.3\mu\text{g}$ のウィルス粒子を含む反応混合液 $100\mu\text{l}$ を 37°C で反応させた。経時的に反応を停止し、酸不溶性画分への ^3H -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。
(キムザ染色, 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
間接蛍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蛍光を認めた。
(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)

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

間接蛍光抗体法により検索した。

(倍率 400 倍)

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
ブラック

図 11 BHK (MV) 細胞の ^3H 標識染色体外 DNA (^3H -extrach-DNA) と MV-RNA 間の ハイブリット形成

BHK (MV) 細胞を $10 \mu\text{Ci/ml}$ の ^3H 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 ^3H -extrach-DNA ($1 \times 10^4 \text{ cpm}$) と (a) MV-RNA ($80 \mu\text{g/ml}$) 或いは (b) イースト RNA ($80 \mu\text{g/ml}$) との間で, 0.1% SDS を含む $4 \times \text{SSC}$ 中で 66°C 24 時間ハイブリット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, $13,000 \times \text{g}$ 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。

————— ; ^3H -extrach-DNA の放射活性
 ———— ; 硫酸セシウム密度

$\rho = 1.62$ は MV-RNA の密度を示す。

図 12 BHK (MV) 細胞の ^3H 標識染色体 DNA (^3H -ch-DNA) と MT-RNA 間の ハイブリット形成

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

————— : ^3H -ch-DNA の放射活性

- - - - - : 硫酸セシウム密度

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 ^3H チミジン $10 \mu\text{Ci/ml}$ にて 24 時間標識後,
Hirt の方法に準じて ^3H -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, $120,000 \times g$ 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。

————— : ^3H -extrach-DNA の放射活性
----- : 塩化セシウム密度

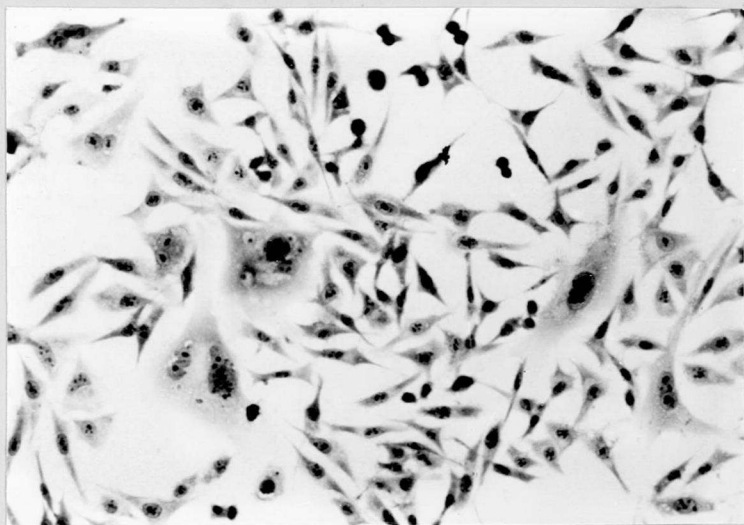
図 14 塩化セシウム平衡密度勾配遠心法にて
検出した BHK(MV) 細胞に特異的な ^3H -extrach-
DNA と MV-RNA との間ハイブリット形成

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

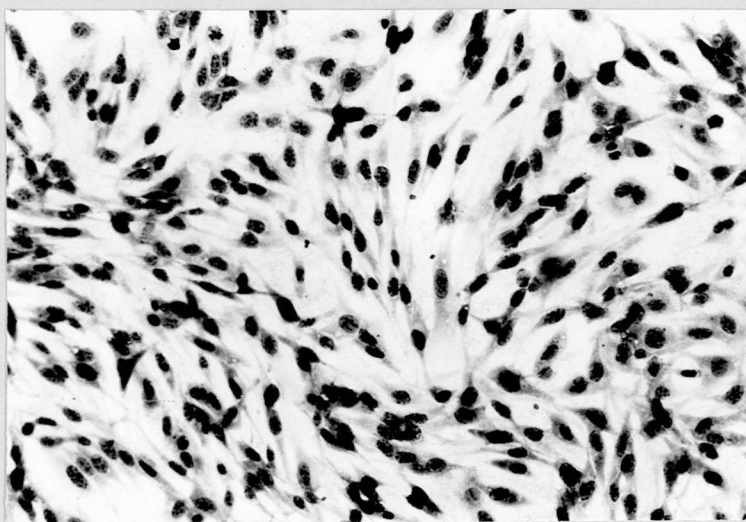
————— ; ^3H -extrach-DNA の放射活性

----- : 硫酸セシウム密度

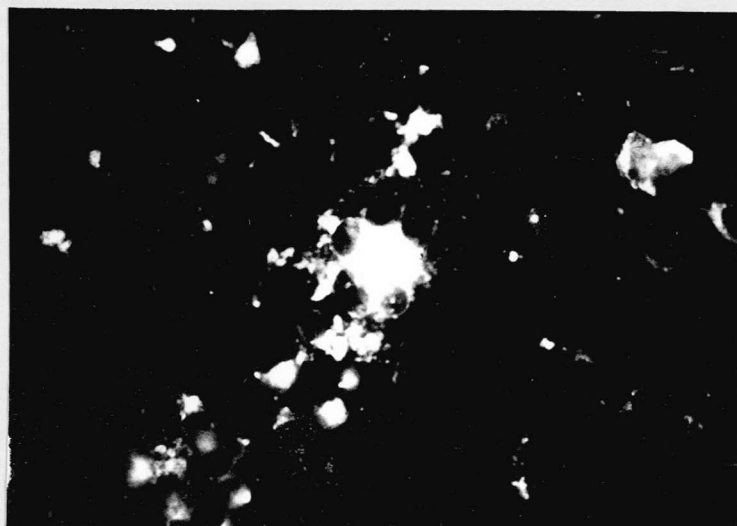
$\rho = 1.62$ は MV-RNA の密度を示す。



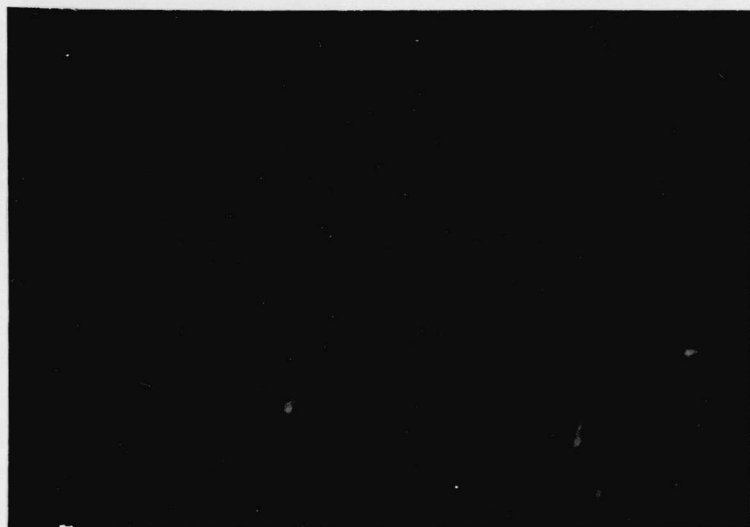
(a)



(b)



(a)



(b)

図 3

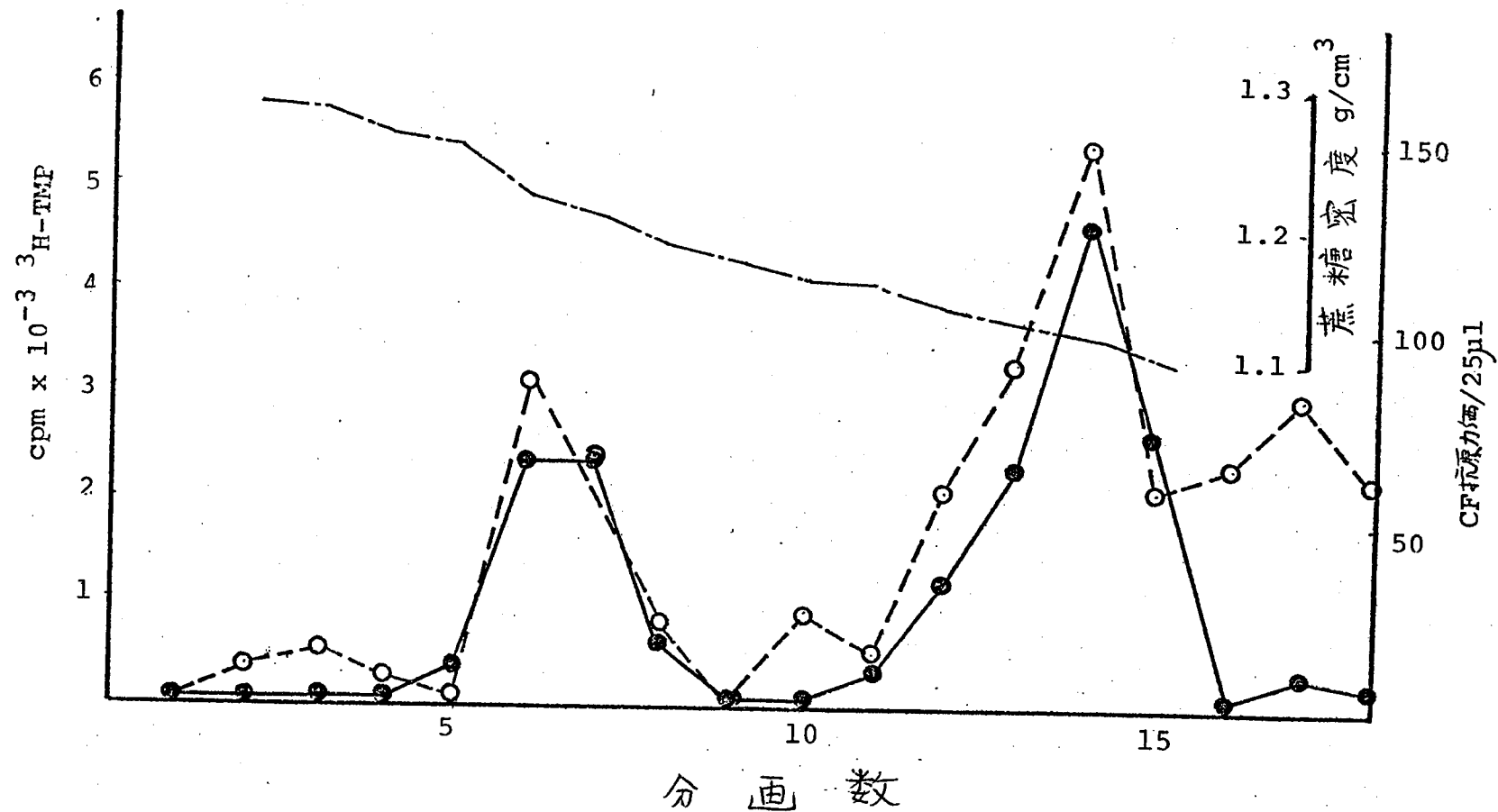
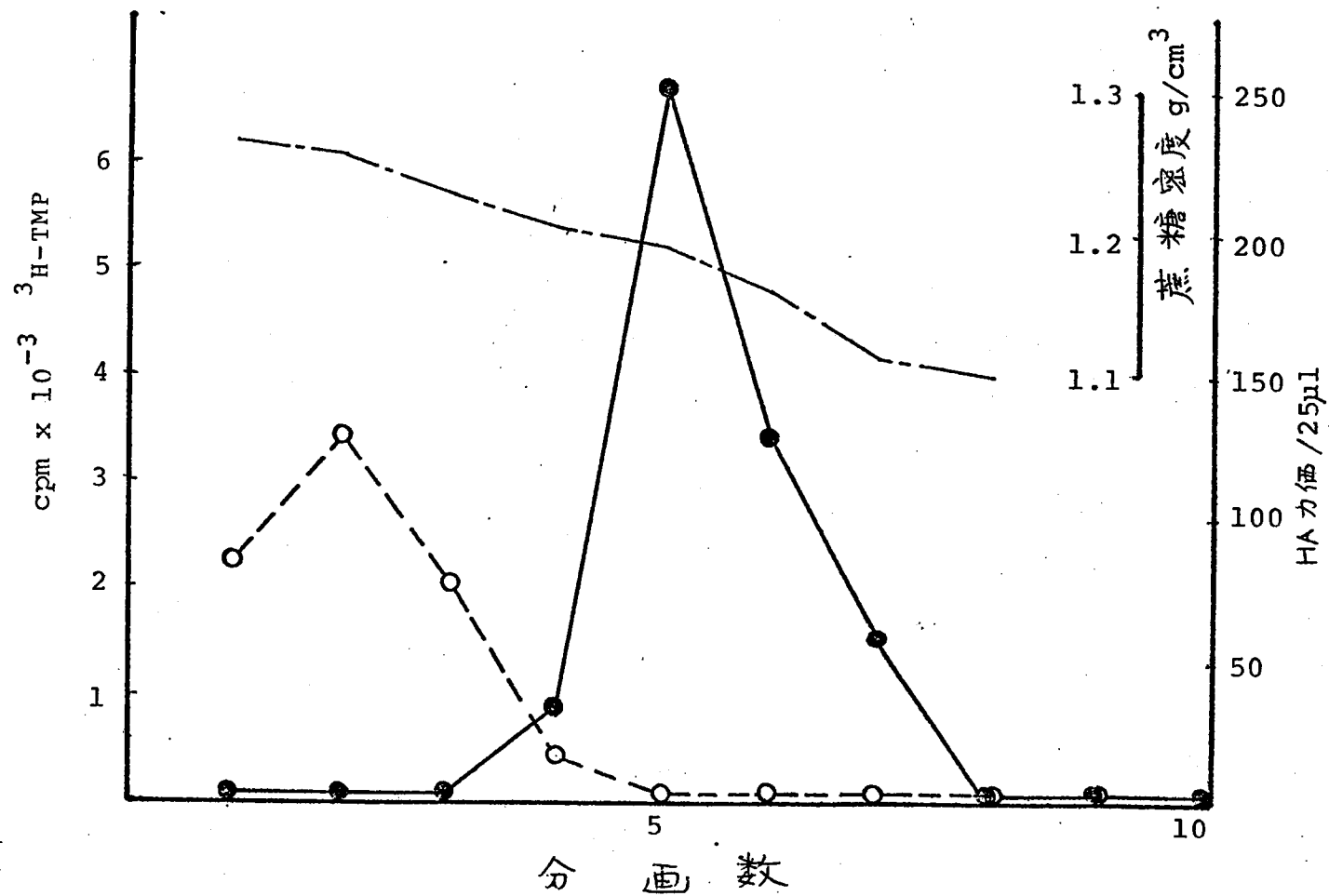


図 4



5

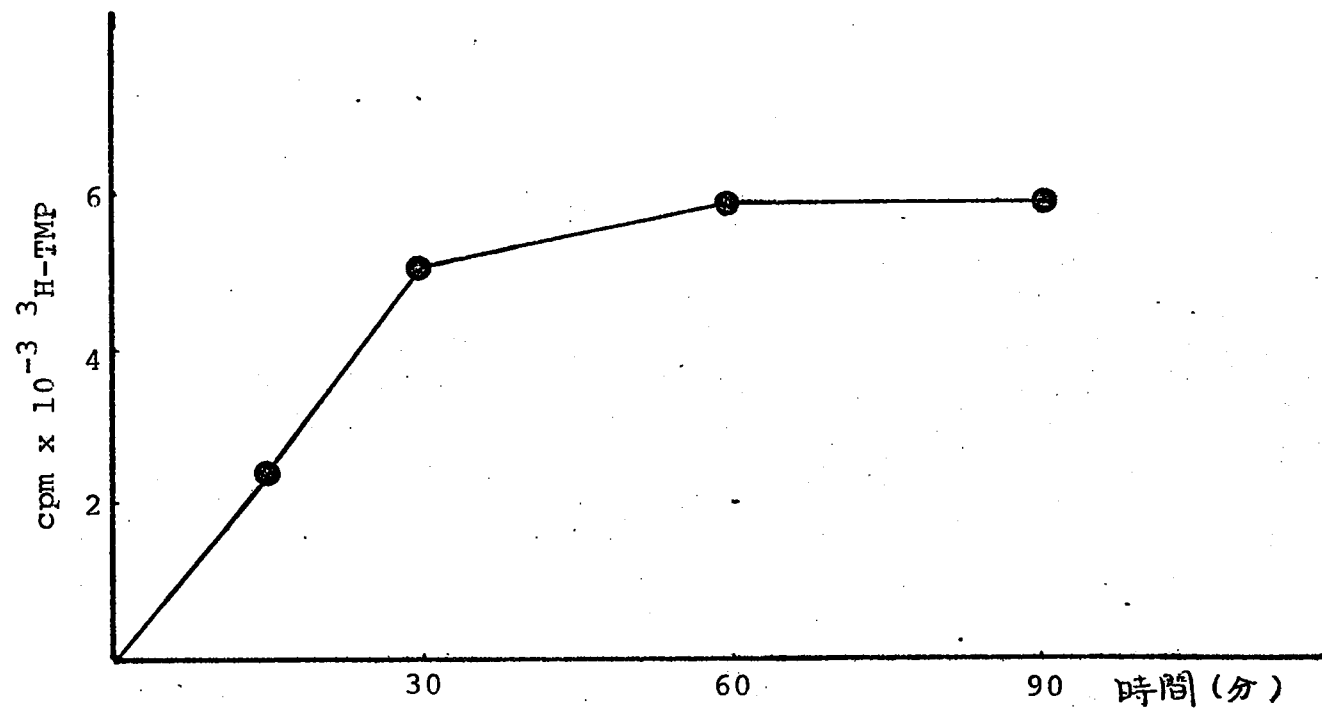


图 6

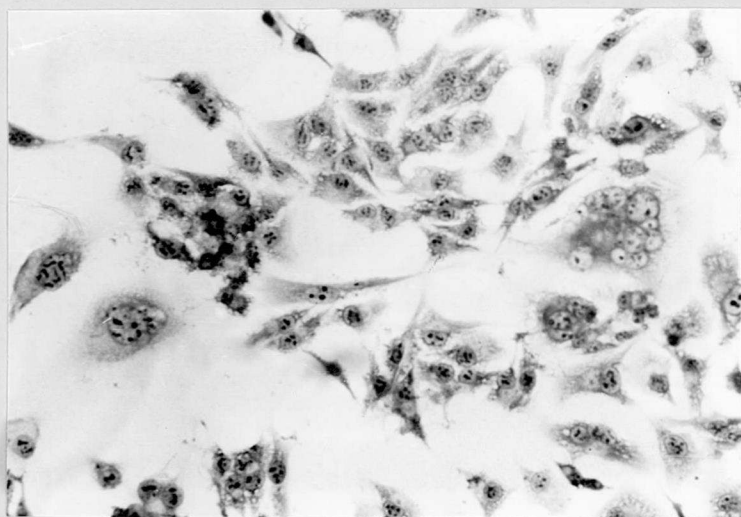


図 7

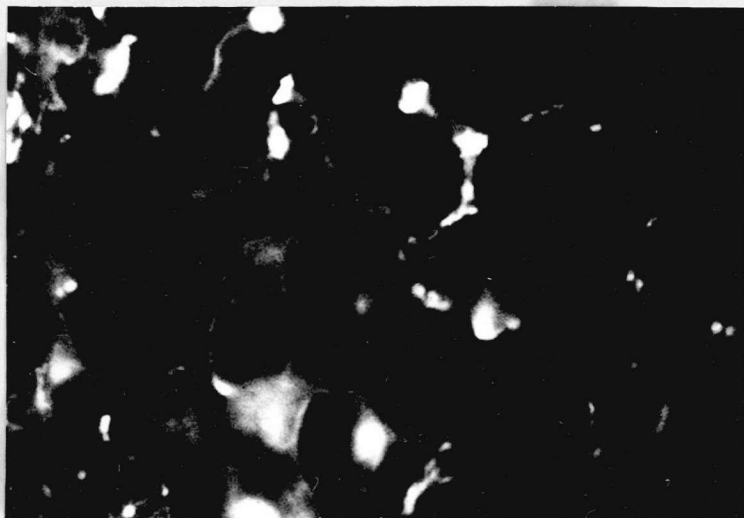
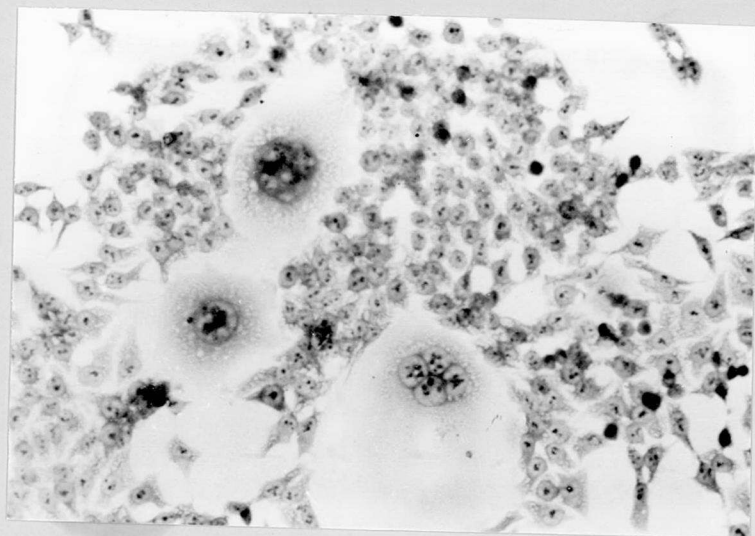
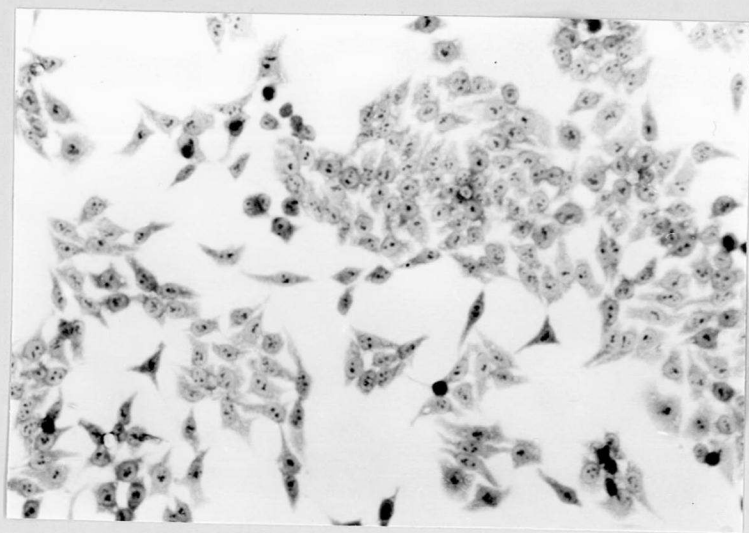


图 8



(a)



(b)

図 9

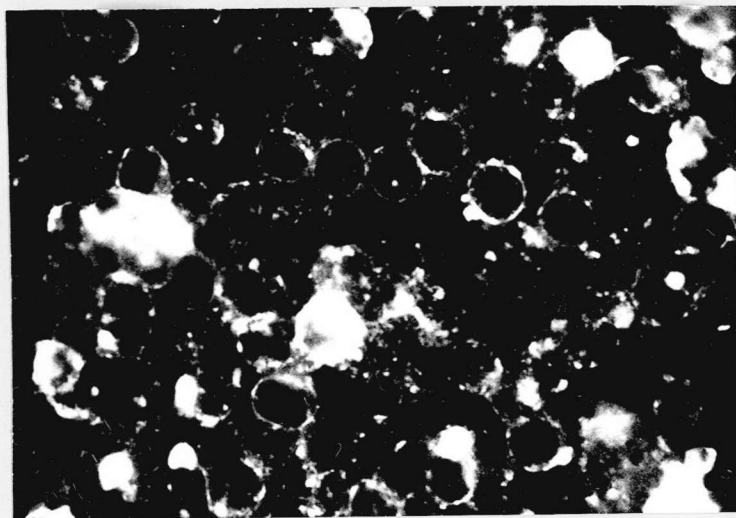


图 10

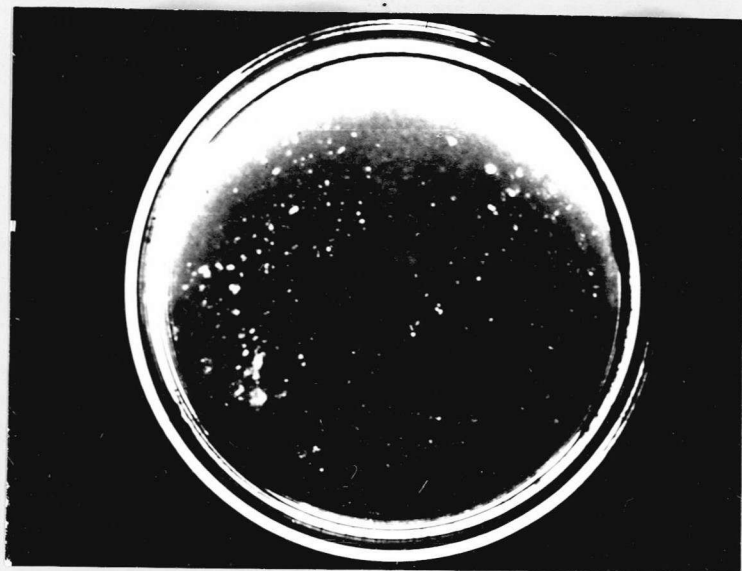


図 11
(a)

cpm ^3H -thymidine

300
200
100

10

20

30

40

分 画 数

$\rho = 1.62$



硫酸セシウム密度 g/cm^3

1.7
1.6
1.5

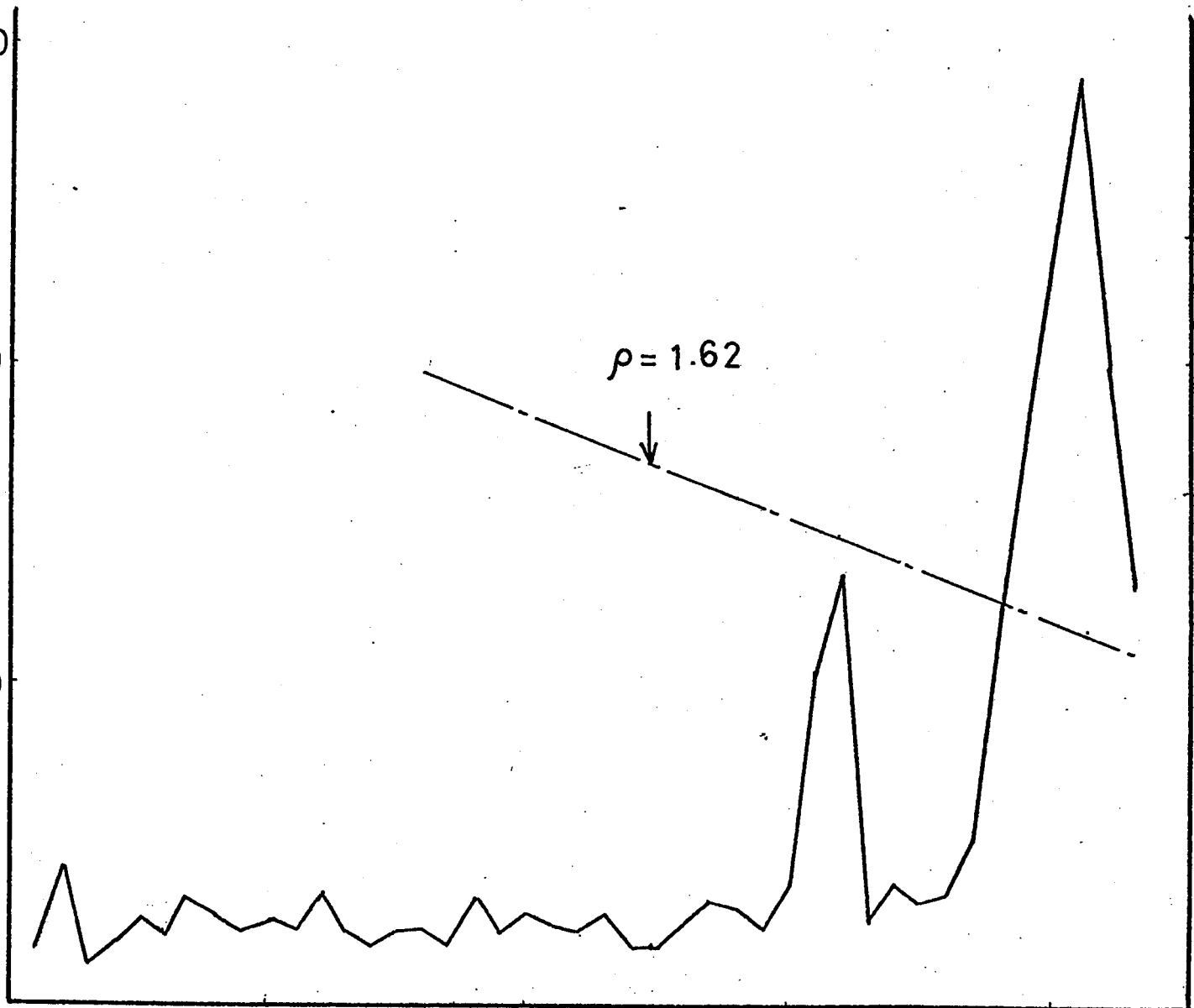


図 11 (b)

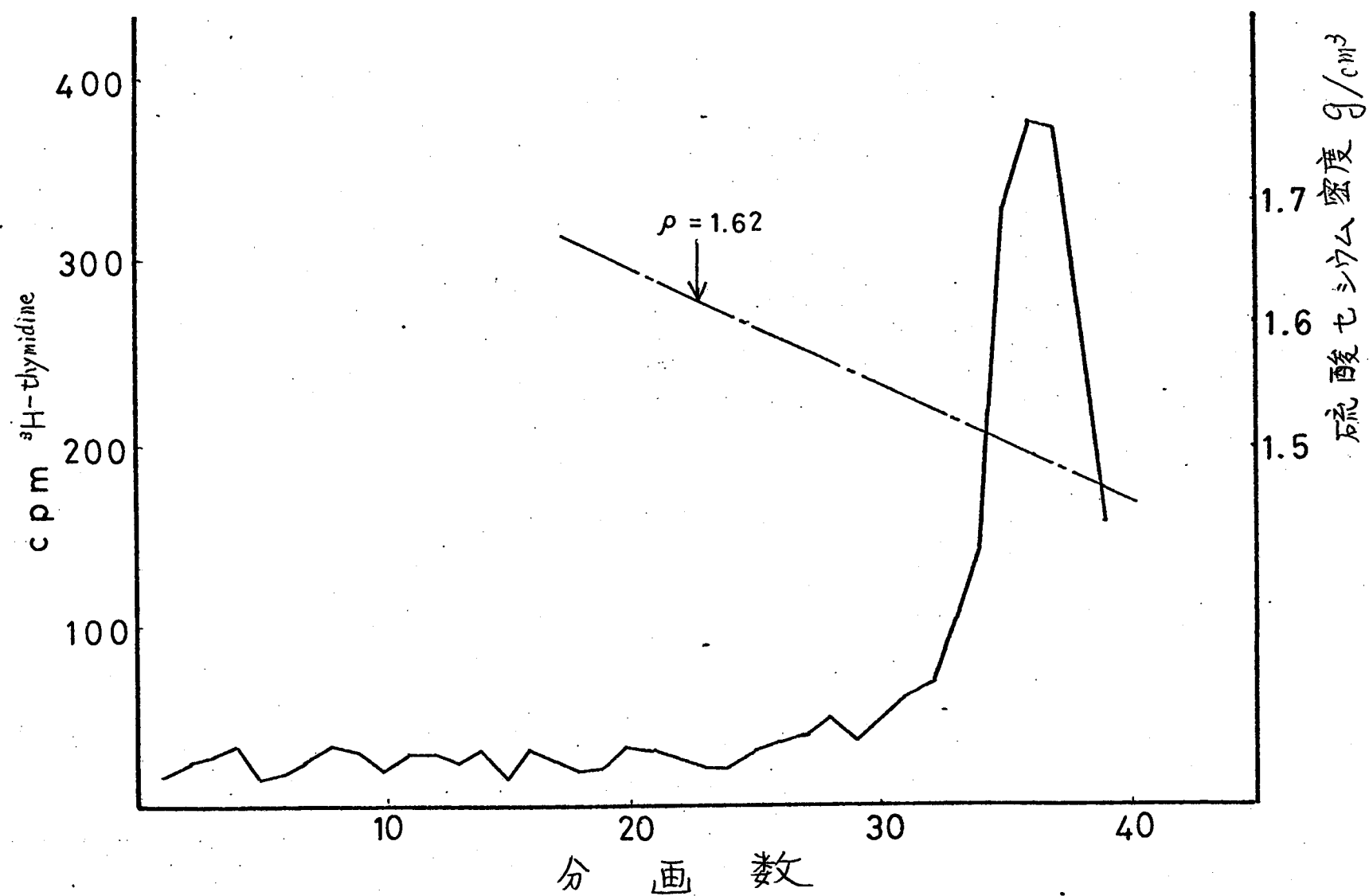


図 12 (a)

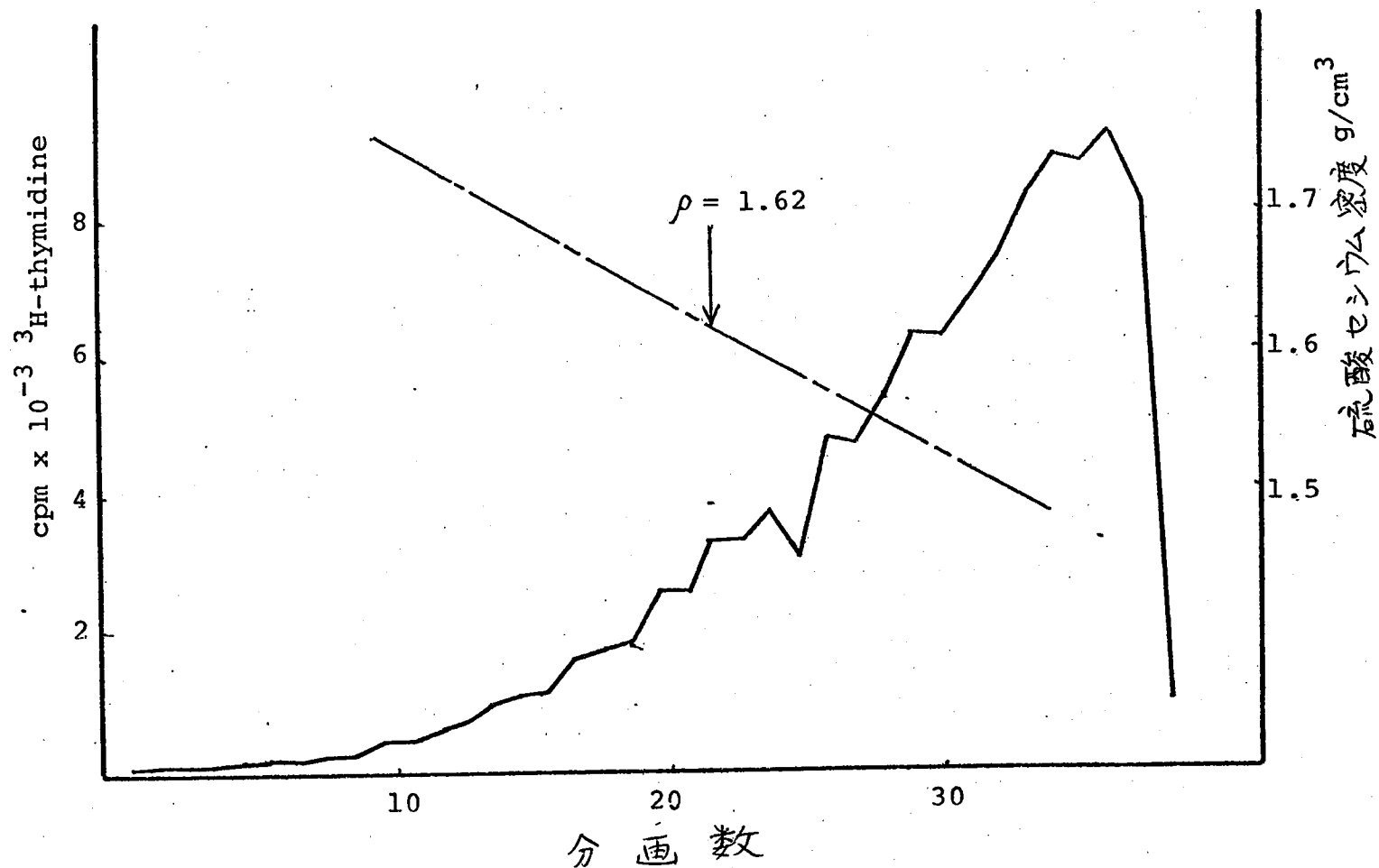


図12(b)

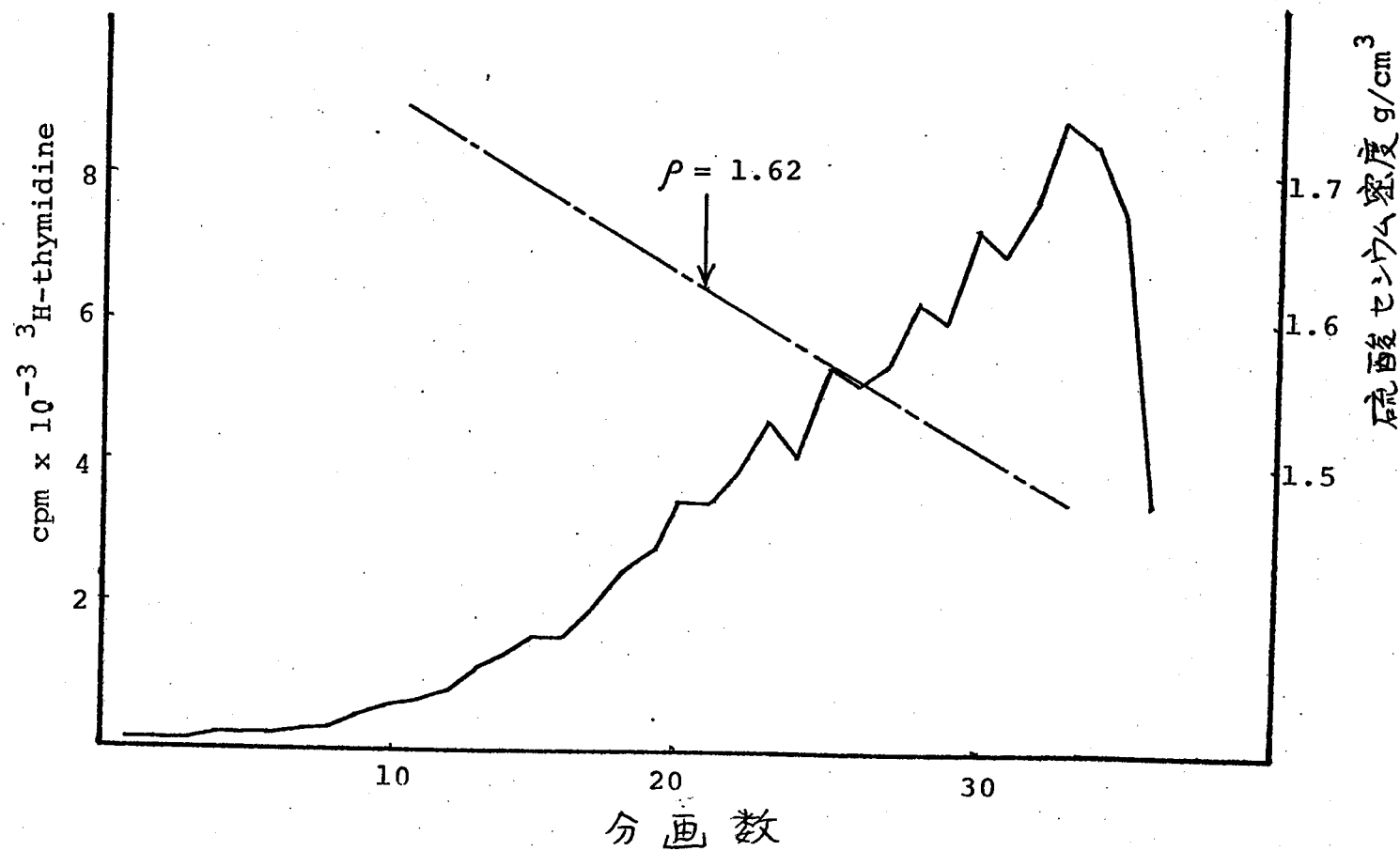


図13(a)

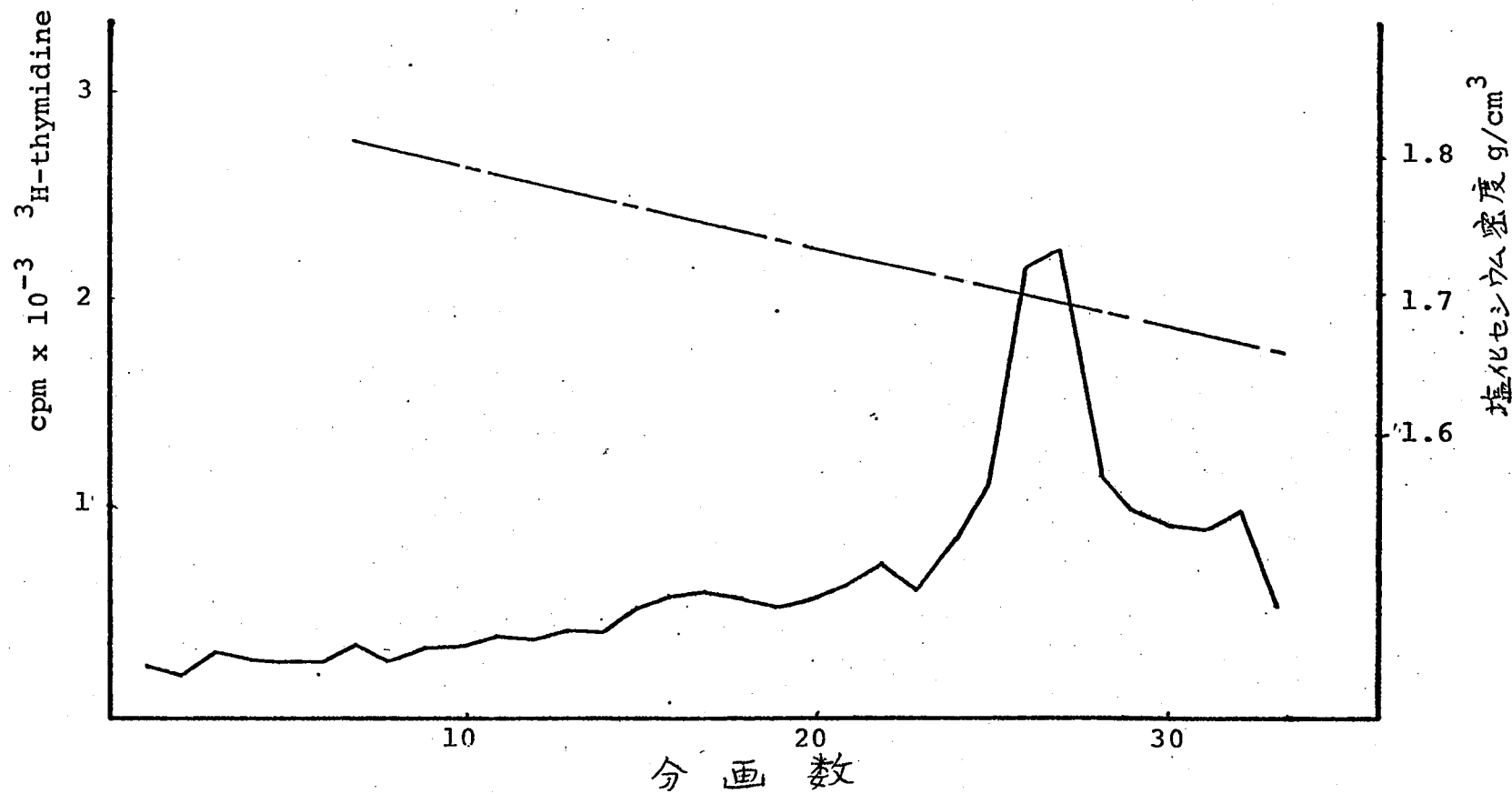


図13(b)

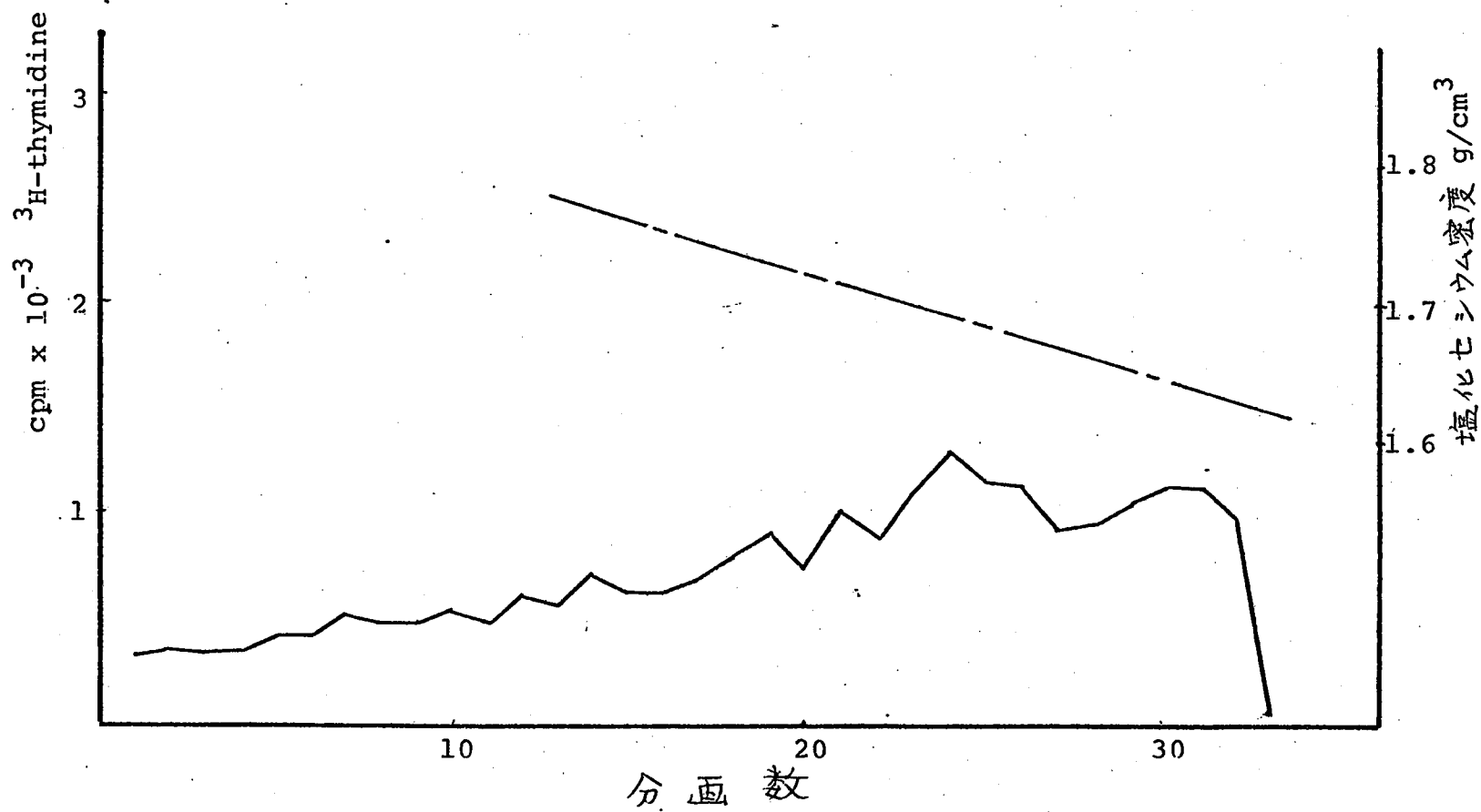


図 14(a)

c.p.m. ^3H -thymidine

200

100

10

20

30

40

分 画 数

$\rho = 1.62$

硫酸セシウム密度 g/cm^3

1.7

1.6

1.5

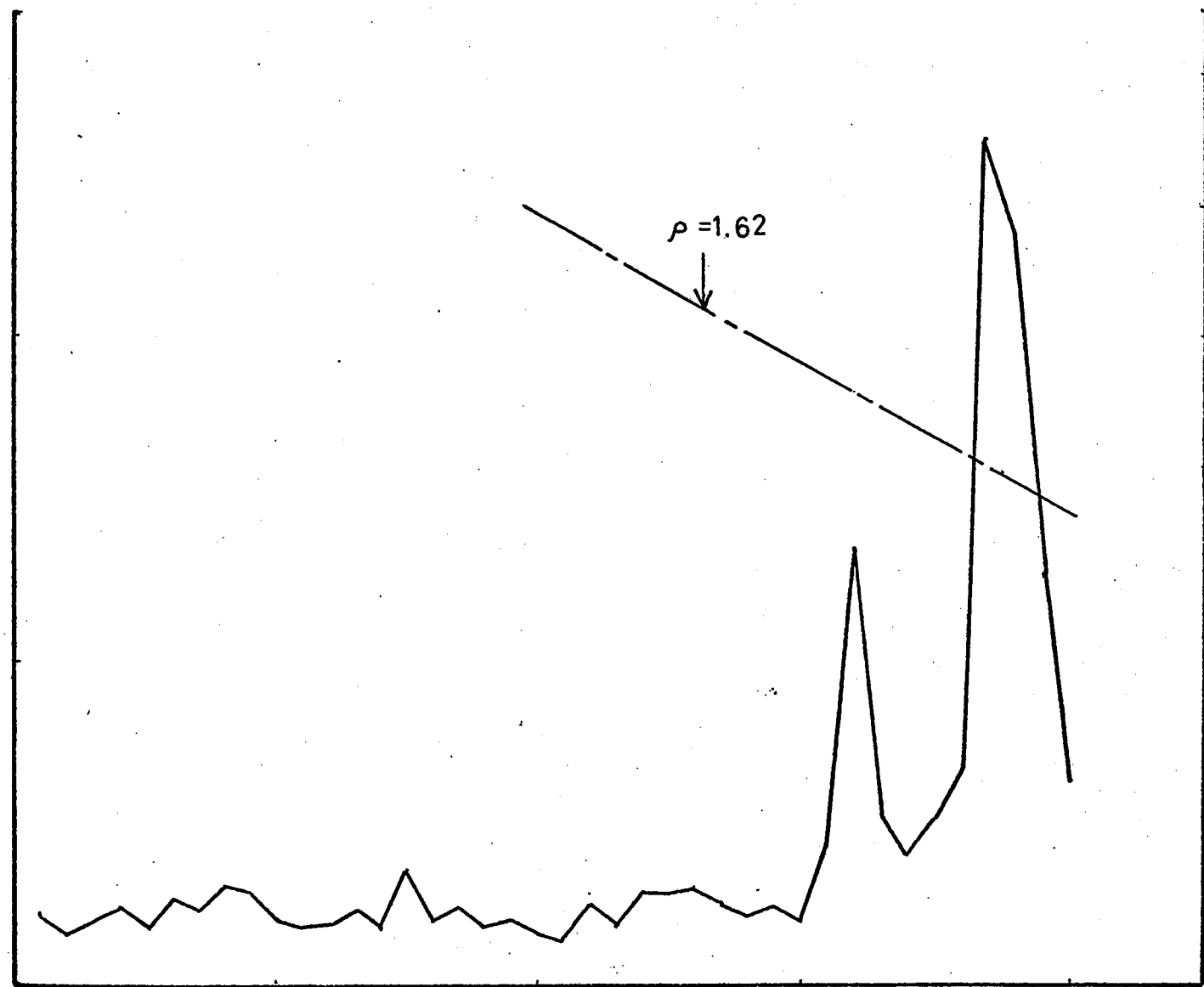


図14(b).

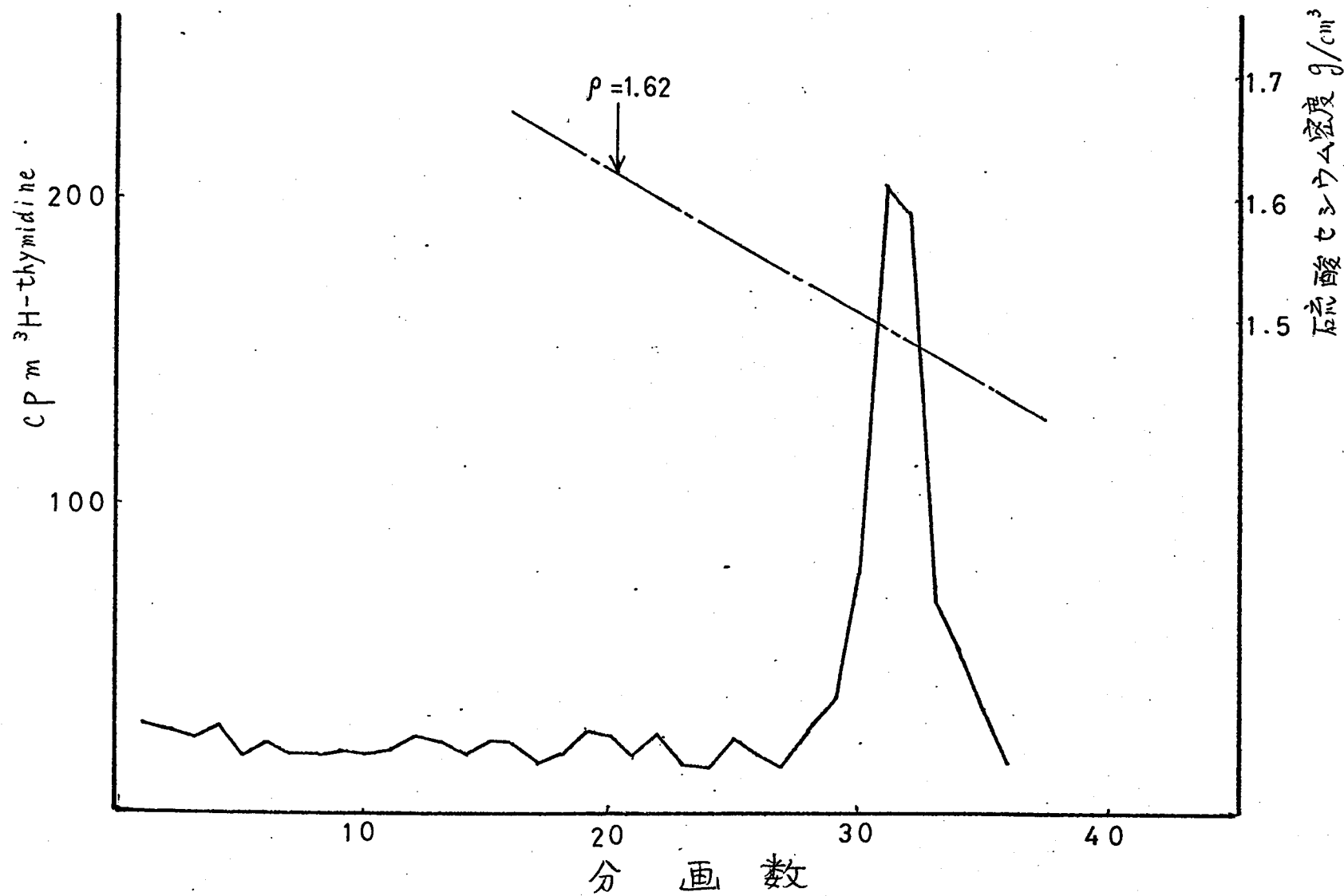


表1 BHK(MV)ならびにBHK21/WI-2細胞における
NDVのフラック形成能

細胞	ウイルス希釈	フラック数		平均フラック数
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°C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°Cで
培養した。フラック数は、培養4日目、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(MV_{pl})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。

MV_{pl}ウイルスの内因性逆転写酵素反応により生成した
³H-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
S₁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 (50-100 μ g) を, あらかじめ 50mm 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 (50 μ g/ml) 或いは, DNase (10 μ g/ml) にて 37°C 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蛍光抗体法にて, また培養上清中へのウイルス粒子の産生は, 培養上清の 10% 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カ価とプラック形成能

ウイルス		HAカ価	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カ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	x 20	0	690	52	300
ラット血清	x 40	2	658	42	158
	x 80	4	560	37	248
	x 160	18	678	55	308
抗BHKレトロウイルス家兔血清	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) : プラック数ハ 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ものを実験に使用した。

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ねた。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細胞ウイルス血清
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細胞ウイルス 家兔血清	< 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 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。