Osaka University Knowledge Archive

Title	ムンプスウイルスのマウス由来培養細胞における不完全増殖 : 電子顕微鏡的研究
Author(s)	安田, ゐう子
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33492
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【48】

氏名・(本籍)	安田ゐう子（やすだゆうこ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5926 号
学位授与の日付	昭和58年3月3日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**ムンプスウイルスのマウス由来培養細胞における不完全増殖：電子顕微鏡的研究**
論文審査委員	(主査) 教授 深井孝之助
	(副査) 教授 高橋 理明　教授 加藤 四郎

論文内容の要旨

〔目　的〕

ムンプスウイルスはヒトに耳下腺炎をはじめ多くの感染症をひきおこす。このウイルスは，in vitroでヒト，サル，ニワトリ胎児繊維芽細胞においてよく増殖するが，ヒトやサル由来細胞で分離したウイルスを発育鶏卵羊膜腔や漿尿腔で継代すると弱毒株となり，ほ乳類由来の細胞で増殖しにくくなる。このような弱毒株は，ワクチン株として利用される。

ムンプスウイルス感染防禦における細胞性免疫の役割を研究するため免疫遺伝学的性質のよくわかっているマウスの系を利用してこの問題を解析することを計画した。そのため，まず，マウス由来細胞でのウイルス増殖のパターンを知る必要があった。本研究においては，ムンプスウイルスの完全増殖型を示すニワトリ胎児繊維芽細胞（CEF）を比較の対照としてムンプスウイルスの不完全増殖型を示すマウス由来細胞での増殖を生物学的方法，分子生物学的方法，電子顕微鏡観察法等により総合的に研究した。

〔材料と方法〕

① ウイルス：ムンプスウイルス占部株Am9，② 細胞：マウス由来細胞（L929細胞，P815細胞，MC57G細胞），CEF，Vero細胞，③ 感染価測定法：感染価はPAP（Peroxidase-anti-Peroxidase）法により染色されるfocus数を数え算出した。④ HA価，赤血球吸着能およびノイラミニダーゼ活性測定法：ウイルス液を二倍階段希釈し，0.5%トリ赤血球を凝集する最終希釈数の逆数をHA価とした。赤血球吸着量測定にあたり，感染細胞に吸着した赤血球を0.045Mアンモニア水で溶血後，ヘモグロビン量をO.D.415nmで測定した。また感染細胞表面のノイラミニダーゼ活性測定には基質として

Neuramin- Lactoseを用い，Aminoffの方法により測定した。⑤ゲル電気泳動：^{35}S-methionineで標識した感染細胞を可溶化し，抗ウイルス血清とプロテインA—黄色ブドウ球菌を用い，抗原—抗体複合物を得，可溶化ののち10%ゲルのSDS-PAGEで泳動し，fluorographyで^{35}S-methionineを含むウイルスタンパク質を同定した。⑥電子顕微鏡観察：Karnovsky固定-OsO_4固定の二重固定後，uranyl-acetate でブロック染色，エポン包埋後，超薄切片を作り，uranylacetate-Pbで二重染色し，電顕観察を行った。免疫電顕は，感染細胞を0.5% glutaraldehydeで5分間固定し，抗ムンプスウイルス・ウサギ血清，つづいてフェリチン結合抗ウサギIgGヤギ血清と反応させ，その後の操作は上述の方法に従った。

〔成　　績〕

1．ウイルス生育曲線：感染性ウイルス粒子産生は，マウス由来の不完全増殖系では感染後24時間で，完全増殖系のCEFでは48時間で最高値に達した。培養上澄での最高値は，L929細胞では$10^{3.7}$FFU/mℓ，P815細胞では$10^{5.4}$FFU/mℓ，MC57G細胞では$10^{5.4}$FFU/mℓ，CEFでは$10^{6.6}$FFU/mℓで，細胞結合ウイルス粒子産生は上清より少なかった。感染性ウイルス粒子産生の多いCEFにおいてのみ，培養上清でHA価を検出できた。

2．感染細胞内のウイルス蛋白質合成：^{35}S-methionineで標識した感染L929細胞内のウイルス蛋白質をゲル電気泳動-fluorographyで同定するとウイルス構成蛋白質6種ともすべて合成されていた（L, HN, NP, F_1, P, M)。感染CEF内のウイルス蛋白質を同様の方法で同定するとNPを除く他の5種の蛋白質はその合成が検出された。感染CEFの電顕観察で，ヌクレオカプシド形成が認められるので，この所見は技術的原因—感染細胞抽出液の調製に際して不溶画分へのNP構造物の残存という可能性が強い。

3．感染細胞表面へのウイルス糖蛋白質の表出：不完全増殖系，完全増殖系ともに赤血球吸着能とノイラミニダーゼ活性が感染細胞表面に認められた。赤血球吸着能の出現は不完全増殖系の方が完全増殖系より早くあらわれたが，ノイラミニダーゼ出現においては差が認められなかった。融合細胞の形成も両増殖系において観察された。これらのことは，活性をもつHN, F 糖蛋白質がともに感染細胞表面に表出することを意味する。

4．感染細胞の電子顕微鏡的観察：不完全増殖系，完全増殖系ともに感染後15時間以後の細胞において細胞質にはヌクレオカプシッド（直径約15nm）が形成され，そして細胞膜上にはフェリチン粒子の結合が認められた。また細胞膜上にフェリチン粒子の広汎な集積とその直下にヌクレオカプシッドの配列が認められた。フェリチン粒子の集積は抗体処理前に細胞を固定したことと，抗体未処理感染細胞でもスパイク状構造の集積とその直下にヌクレオカプシッドの配列が観察されることから人工的Cap形成ではないと考えられる。これらの結果は両増殖系の感染細胞中ではヌクレオカプシッドのassemblyとそれに続くウイルス膜抗原とヌクレオカプシッドの細胞膜上での会合を示唆する。両系の唯一の違いは不完全増殖系において発芽粒子が認められなかったことである。

〔総　　括〕

マウス由来細胞におけるムンプスウイルスの増殖に関する生物学的，分子生物学的，電子顕微鏡的

解析を行い，次のような結論を得た。

① マウス由来細胞は完全増殖系にくらべ，ウイルス産生量が低かった。

② マウス由来細胞でもウイルス構成々分は合成され発芽準備段階までのassemblyは進行した。しかし発芽粒子は殆ど観察されなかった。この発芽の欠損がウイルス産生の低い理由と思われる。

論文の審査結果の要旨

おたふくかぜウイルスに対する感染防禦における細胞性免疫応答の役割に関しては未知の部分が多い。本研究は免疫遺伝学的性質のよく分析されているマウスから由来した，H-2 haplotypeの異なる三種の細胞におけるムンプスウイルスの増殖について生物学的，分子生物学的手法に電子顕微鏡による形態学的実証を加え，これらの細胞ではすべてのウイルス粒子構成要素が合成され，細胞表面にウイルス糖蛋白の表出が認められるに拘らず，粒子放出が阻害されて，不完全増殖系が成立していることを明らかにした。この新知見は，これら細胞が細胞性免疫応答の研究に於て，標的細胞あるいは抗原刺戟細胞となり得ることを示す重要性をもつものであり，この領域における新生面の開拓に寄与するものと判断される。