Osaka University Knowledge Archive

Title	サイトカラシンDによる亜急性硬化性全脳炎（SSPE）ウイルス感染細胞からの感染性粒子の誘出
Author(s)	綾田, 稔
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/35299
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

主論文

サイトカラシンDによる亜急性硬化性全脳炎（SSPE）ウイルス感染細胞からの感染性粒子の誘出

Induction of infectious cell-free particles from a non-productive subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus-infected cells by treatment with cytochalasin D

大阪大学微生物病研究所感染病理学部門

Dep. of Pathology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka Univ.

綾田稔 (Minoru Ayata)

（指導：加藤四郎教授）

20 × 20

86. I ~ 19

和文抄録

感染性遊離ウイルス粒子を産生できない亜急性硬化性全脳炎（ＳＳＰＥ）、ウイルス微研株を感染させたヒト胎児肺（ＨＥＬ）細胞をサイトカラシンＤ（ＣＤ）で処理することにより感染性のある粒子を誘出させることができた。この粒子（ＳＳＰＥ／ＣＤ粒子）は遠心や凍結，ろ過実験から麻疹ウイルスとほぼ同様の粒子であることが示唆された。さらに，このＳＳＰＥ／ＣＤ粒子はハムスターに強い神経病原性を示すと共に，その感染性は細胞依存性であったことから，ＳＳＰＥウイルスとしての特徴を保持したままの感染性粒子であることが明らかになった。また，このＳＳＰＥ／ＣＤ粒子を用いることにより，従来不可能であった中和試験を行うことができた。

英文抄録

Infectious cell-free particles were obtained from human embryonic lung cell cultures infected with a defective, cell-associated strain of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus (the Biken strain) by treatment with cytochalasin D.

The particles (SSPE / CD particles), like measles virus, were not precipitated by centrifugation at 3,000 rpm (900 x G) for 10 min at 4 °C, resisted to freezing at -20, -70 and -120 °C, and filtered through a membrane filter with a pore size of 0.22 μm. Furthermore, the SSPE / CD particles retained strong neurovirulence to adult hamsters and cell-associated infectivity, which were characters of the parent strain. The SSPE / CD particles were also neutralized by measles antibody.

Key words : subacute sclerosing panencephalitis virus
cytochalasin D
infectious cell-free particle

はじめに

亜急性硬化性全脳炎（subacute sclerosing panencephalitis, SSPE）は遅発性ウイルス感染症の1つで，麻疹ウイルスの変異株（SSPEウイルス）の脳内持続感染に起因する[1-5]。

病因となっているSSPEウイルスは稀な場合を除いて，通常は感染性遊離ウイルス粒子を産生しない[6,7]。この変異は麻疹ウイルス構成タンパクのうち，M（matrix）タンパクが合成されないことに起因することが明らかにされ[8]，そして，それはMタンパクの遺伝子に突然変異があり，mRNAが合成されても，タンパク合成にまで至らないことが示唆されるようになった[9]。

SSPEウイルスの感染性粒子が，このように得られないことは，感染細胞を扱わねばならぬことになり，ウイルス分離は成功しても，その後のSSPEウイルスの生物学的治

性の解析や動物実験における量のコントロールなどを極めて困難にしてきた。

サイトカラシンは細胞の microfilament に作用し，細胞膜の波動運動を止めたり，細胞膜から突起を隆起させること（zeiosis）[10,11]，また，ウイルスとの関連では，HVJ による細胞融合を抑制したり[12]，麻疹抗体存在下での SSPE ウイルスの感染価を低下させたり[13]，あるいは麻疹ウイルスの成熟を抑制する[14]ことが知られている。

今回，サイトカラシンD（CD）による細胞膜の zeiosis に注目し，SSPE ウイルス感染細胞を CD 処理することによって，SSPE ウイルスのヌクレオカプシドが細胞膜の突起内に取り込まれれば，擬似ウイルス粒子（pseudovirion）が形成され，SSPE ウイルスの取扱いや生物学的活性の解析が容易になるであろうことを期待して検討を行った。以下には，CD 処理による感染性粒子の誘出とそれによって得られた感染性粒子の性状に

ついて報告する。

材料と方法

1. 細胞

ヒト胎児肺（HEL）細胞とVero細胞（アフリカ・ミドリザル腎由来）を用いた。HEL細胞はSSPEウイルスの継代に用い，Vero細胞はウイルスの定量に用いた。細胞増殖用培養液は，Vero細胞には5%，HEL細胞には10%牛胎児血清（FBS）を加えたMedium 199とEagle's minimal essential medium（MEM）の等量混合液（199/MEM）を用いた。

2. ウイルス

SSPEウイルス微研株[7]を用いた。ウイルスの培養はHEL細胞で行い，保存は感染HEL細胞を液体窒素中に凍結して行った。SSPEウイルス微研株は他の多くのSSPE

ウイルスと同様，感染性が細胞依存性で，感染性粒子を産生しない[7,15]。

3．サイトカラシンD（CD）

シグマ社（Sigma Chemical Co., Ltd., USA）製を用いた。DMSOで1mg/mlの濃度に溶解し，ダルベッコの0.01Mリン酸緩衝生理食塩水（PBS，pH 7.2）で200μg/mlに希釈した後，ポアサイズ0.45μmのメンブレン・フィルターでろ過して用いた。

4．SSPEウイルス感染細胞のCD処理

SSPEウイルス感染HEL細胞と非感染HEL細胞とをプラスティック・ディッシュに混合培養し，2～3日後細胞層に融合巨細胞が多数出現した時点で，培養液を増殖用から維持用に交換した。液量は直径10cmのディッシュで4mlにし，これにCDを最終濃度5μg/mlになるように加えた。次いで，ディッシュを37℃の炭酸ガス培養器内に30分間保

温後，細胞表面をピペッティングで洗い，液中に感染性粒子（以下，これをSSPE/CD粒子と略す）を誘出させた。

5. SSPEウイルスの細胞依存性感染性の定量

測定は感染中心測定法によった[16]。すなわち，SSPEウイルス感染HEL細胞浮遊液の原液，10倍および100倍希釈の0.2 mlを各希釈あたり2枚の直径60 mmプラスティック・ディッシュに培養したVero細胞に接種し，37 ℃の炭酸ガス培養器内で3日間培養した後，PBSで1回洗浄し，メタノールに溶解したギムザ液で染色後，生じたプラーク数から計算し，plaque forming units（PFU）として表した。

6. SSPE/CD粒子および麻疹ウイルスの感染価測定

SSPE/CD粒子あるいは麻疹ウイルス

を希釈液（PBS に0.2％ゲラチンと200 μg/ml カナマイシンを加えた液）で10倍段階希釈し，各希釈の 0.025 ml ずつをマイクロプレート（コーニング社製U底）の4穴に分注後，増殖用培養液に浮遊させた Vero 細胞を 0.1 ml ずつ混和し，37 ℃ の炭酸ガス培養器内で静置培養した。5日間観察し，細胞変性（多核融合巨細胞形成）の有無から Reed - Muench 法でウイルス感染価（$TCID_{50}$/ml）を測定した。

7. 動物および動物への感染

6週齢メスのゴールデン・ハムスターを用いた。

感染はハムスターをエーテルで軽く麻酔し，右大脳半球内に，SSPE ウイルス微研株感染 HEL 細胞浮遊液，あるいは SSPE/CD 粒子を 0.05 ml 注射して行った。

8. 中和試験

麻疹ウイルス長畑株[17]で免疫したアフリカ・

ミドリザルの血清を麻疹抗体として用いた。SSPE/CD　粒子を希釈液で10倍段階希釈し，各希釈の0.025 ml ずつを4穴のマイクロウエルに分注後，一定倍数に上記希釈液で希釈したサル免疫血清を0.025 ml 加えて，よく混和後，37 °C の炭酸ガス培養器内に静置保温した。30分後，各ウエルに増殖用培養液を浮遊させたVero細胞を0.1 ml ずつ混和し，37 °Cの炭酸ガス培養器内で静置培養した。5日後，細胞変性の有無からReed - Muench 法によってウイルス感染価（$TCID_{50}$/ml ）を測定した。対照には長畑株を用いた。

成　績

1. 遠心条件

SSPE/CD　粒子サンプル中の細胞破片を除くための遠心で感染価がどの程度影響を受けるかを検討した。プラスティック遠心管を用い低速遠心後，上清の半量を遠心上清と

し，残る半量で沈渣を浮遊させたものを沈渣として，それぞれの感染価を測定した（表1）。 表1

遠心を室温（20 ℃）で行った実験1では500 rpm（25 x G），10分間の遠心と1000 rpm（100 x G），5分間の遠心とで感染価にほとんど差はなかった。上清（S）と沈渣（P）では約10倍沈渣の方が高い感染価を示したが，上清中には$10^{3.6}$～$10^{3.9}$ TCID$_{50}$/mlの感染価が得られた。

遠心を4℃で行った実験2では，1000 rpm（100 x G），10分間の遠心と3000 rpm（900 x G），10分間の遠心で，上清の感染価に$10^{0.5}$ TCID$_{50}$/ml（3倍）の差が出たが，3000 rpm，10分間でも上清中に$10^{3.6}$ TCID$_{50}$/mlの感染価が得られたので，以後の実験では，4℃で3000 rpm，10分間遠心した上清をSSPE/CD粒子として用いた。

2．凍結保存

SSPE/CD　粒子が不安定な構造をとっておれば，凍結によって粒子が破壊される可能性があるので，SSPE/CD　粒子が凍結に耐えうるか否かを検討した。

表2aに示したのは，4℃での3000 rpm，10分間の遠心上清について，-20℃と-70℃での凍結操作による感染価の低下である。温度差に関係なく，2日間凍結したことによって感染価に$10^{0.7}$ TCID$_{50}$/ml の低下があった。この値は通常の麻疹ウイルスに比べると$10^{0.2}$（1.6倍）程度大きいが，SSPE/CD　粒子が充分凍結に耐えることを示している。

表2bには-120℃での長期凍結保存結果を示した。超低温ではあったが，5ヵ月間の凍結では全く感染価は低下しなかった。

3．SSPE/CD　粒子の大きさ

通常の麻疹ウイルスは粒子径が150〜300 nmである。SSPE/CD　粒子の大きさがこれとどれくらいの差異があるかを知るために，

SSPE/CD 粒子サンプルをポアサイズが0.45μmと0.22μmのメンブレン・フィルターでろ過し，感染価の低下を，対照として用いた麻疹ウイルスの感染価と比較した（図1）。 図1

麻疹ウイルス，SSPE/CD 粒子ともに，0.45μmフィルターろ過後は約$10^{1.5}$ $TCID_{50}$/ml，0.22μmフィルターろ過後は約$10^{2.5}$ $TCID_{50}$/mlの感染価の低下があった。感染価低下のパターンの相似性から，3000 rpm，10分間の遠心上清中に得られるSSPE/CD 粒子は麻疹ウイルスとほぼ同じ大きさの粒子と考えられる。

4. SSPE/CD 粒子の感染性の細胞依存性

直径35mmのプラスティック・ディッシュに2日間培養したHEL細胞にmoi（multiplicity of infection）0.1 $TCID_{50}$/cellでSSPE/CD粒子を感染させ，翌日から5日間，培養液を4℃で3000 rpm，10分間遠心した上清中の感染性（感染性遊離ウイルス，$TCID_{50}$/ml で表

示），感染細胞の数（PFUで表示）およびCD処理によって得られる感染性（SSPE/CD粒子，$TCID_{50}$/mlで表示）を測定した（図2）。図2

図2に明らかなように，感染細胞数は感染1日後から増加したが，培養液中には感染性は認められなかった。しかし，このような系でも，感染細胞をCD処理すると感染性は2日後から出現し，感染細胞数の増加に平行して，感染価が上昇した。この結果から，SSPE/CD粒子の感染性は細胞依存性であることが明らかになった。

5. SSPE/CD粒子の神経病原性

感染性が細胞依存性のSSPEウイルス微研株はサルやフェレットを含めて，実験動物に強い神経病原性を示す[18-20]ので，SSPE/CD粒子も強い神経病原性を保持しているか否かを検討した。陽性対照として，SSPEウイルス微研株感染HEL細胞を用いた。

感染HEL細胞を200 PFU脳内接種した場

合，表3に示したとおり，6匹中6匹（100%）のハムスターに感染1週後に，過敏反応，ミオクローヌスが現われた。さらに，発病後3日以内に全身性強直性痙攣が現われ，4～6日間で発病した全ハムスターが死亡した。 表3

一方，SSPE/CD粒子を1000 $TCID_{50}$脳内接種した場合には，6匹中4匹（66.7%）が1週後に上記神経症状を呈した。発病した4匹は，感染HEL細胞を接種した場合と同様，4～6日間で死亡した。

6. 麻疹免疫血清による中和試験

感染性が細胞依存性のSSPEについては中和試験を行うことは従来不可能であった。しかし，CD処理によって感染性のある粒子を得ることができるようになったので，麻疹ウイルス（長畑株）で免疫したアフリカ・ミドリザルの血清を用いて，SSPE/CD粒子の中和を試みた。対照として，麻疹ウイルス（長畑株）を用いた。

中和試験は 3000 rpm ，10分間の遠心上清をそのまま抗原として用いた場合と，0.45 μm のメンブレン・フィルターでろ過したものを抗原とした場合について行った。

図3

結果は図3のごとく，麻疹ウイルスもSSPE/CD粒子も中和曲線は同様のパターンを示したが，メンブレン・フィルターろ過によって凝集した粒子が除かれたサンプルについてはSSPE/CD 粒子の方が中和され易い結果であった。

考　察

感染性遊離ウイルス粒子を産生できないSSPE ウイルス微研株を感染させたHEL細胞をサイトカラシンDで処理することにより感染性のある粒子を誘出させることができた。この粒子（SSPE/CD 粒子）は遠心や凍結，メンブレン・フィルターを用いたろ過などの実験から麻疹ウイルスとほぼ同様の

ウイルス粒子であることが示唆された。さらに，この SSPE/CD 粒子は親株と同様，実験動物に強い神経病原性を示すと共に，その感染性は細胞依存性であったことから，SSPE ウイルスとしての特徴を保持したままの感染性粒子であることが明らかになった。これによって，今まで感染細胞を取り扱わざるを得なかったため困難であった SSPE ウイルスの種々の解析も可能になるであろう。

例えばその1つとして中和試験が可能になったわけであるが，今回の成績では SSPE/CD 粒子は免疫血清を得るために抗原として用いた麻疹ウイルス株よりも中和され易かった。このことは，SSPE/CD 粒子表面における H（hemagglutinin，赤血球凝集素）や F（fusion protein，溶血素）の分子数が麻疹ウイルスに比べて少ないことを示唆する。今後，モノクローナル抗体を用いて中和試験を行えば，H や F の生物活性にあずかるエピトープの解析も可能となり，定性と定量両面の検討

から，SSPE ウイルスがもつ強い神経病原性の解明にも寄与できるものと期待できる。

また，今回の実験には感染細胞表面にHが出現するSSPEウイルスを用いたが，Hが出現しないSSPEウイルス（ただし，Fは出現する[15]）でも，SSPE/CD粒子は感染性を有することが判明した（データは提示しなかった）ので，感染初期段階でのHやFの役割を検討することも可能になった。

以上，簡単な操作で得られるSSPE/CD粒子の利用価値は高いと考え報告した。

謝辞

本研究を進めるにあたり，御指導いただいた加藤四郎教授，岡田善雄細胞工学センター長，内田驍細胞工学センター教授，上田重晴助教授，御協力いただいた渡辺倫子氏はじめ教室の諸氏に深謝いたします。

文献

1. Bouteile M, Fontaine C, Vedrenne Cl, Delarue J.: Sur un cas d'encéphalite subaiguë à inclusions. Étude anatomo-clinique et ultrastructurale. Rev. Neurol. 113 : 454-458, 1965.
2. Connolly JH, Allen IV, Hurwitz LJ, Millar JHD.: Measles-virus antibody and antigen in subacute sclerosing panencephalitis. Lancet. 1: 542-544, 1967.
3. Sever JL, Zeman W, eds.; Measles virus and subacute sclerosing panencephalitis. Neurology. 18(part 2): 1-192, 1968.
4. Horta-Barbosa L, Fuccillo DA, Sever JL, Zeman W.: Subacute sclerosing panencephalitis : isolation of measles virus from a brain biopsy. Nature (London). 221: 974, 1969.
5. Payne FE, Baublis JV, Itabashi HH.: Isolation of measles virus from cell cultures of brain from a patient with subacute sclerosing panencephalitis. New Engl. J. Med. 281: 585-589, 1969.
6. Katz M, Koprowski H.: The significance of failure to isolate infectious virus in cases of subacute sclerosing panencephalitis. Arch. ges. Virusforsch. 41: 390-393, 1973.

7. Ueda S, Okuno Y Jr, Okuno Y, Hamamoto Y, Ohya H.: Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE): Isolation of a defective variant of measles virus from obtained at autopsy. Biken J. 18: 113-122, 1975.
8. Hall WW, Choppin PW.: Measles-virus proteins in the brain tissue of patients with subacute sclerosing panencephalitis. Absence of the M protein. New Engl. J. Med. 304: 1152-1155, 1981.
9. Cattaneo R, Schmid A, Rebmann G, Baczko K, ter Meulen V, Bellini WJ, Rozenblatt S, Billeter MA.: Accumulated measles virus mutations in a case of subacute sclerosing panencephalitis: Interrupted matrix protein reading frame and transcription alteration. Virology. 154: 97-107, 1986.
10. Miranda AF, Godman GC, Deitch AD, Tanenbaum SW. : Action of cytochalasin D on cells of establishd lines. I. Early events. J. Cell Biol. 61: 481-500, 1974.
11. Godman GC, Miranda AF, Deitch AD, Tanenbaum SW. : Action of cytochalasin D on cells of established lines. III. Zeiosis and movements at the cell surface. J. Cell Biol. 64: 644-667, 1975.

12. Miyake Y, Kim J, Okada Y.: Effects of cytochalasin D on fusion of cells by HVJ (Sendai virus). Cell-cell fusion is separable from cell-virus fusion. Exp. Cell Res. 116: 167-178, 1978.

13. 上田重晴: 麻疹抗体存在下におけるSSPE ウイルスの感染拡大機構 ―サイトカラシンBによる感染拡大防止―. 厚生省特定疾患「遅発性ウイルス感染」に関する研究班. 昭和56年度研究報告書: 93-102, 1982.

14. Stallcup KC, Raine CS, Fields BN.: Cytochalasin B inhibits the maturation of measles virus. Virology. 124: 59-74, 1983.

15. Breschkin AM, Morgan EM, Mckimm J, Rapp F.: SSPE-BIKEN: A naturally arising hemagglutination-defective mutant of measles virus. J. Med. Virol. 4: 67-80, 1979.

16. Ueda S, Uchida T, Okada Y.: Selective killing of subacute sclerosing panencephalitis virus-infected cells by liposomes containing fragment A of diphtheria toxin. Exp. Cell Res. 132: 259-263, 1981.

17. Ueda S, Takahashi M, Kurimura T, Minekawa Y, Suzuki N, Yamanishi K, Baba K, Okuno Y, Sasada T, Onishi K, Konobe T, Takaku K, Yamada Y, Tanami Y, Kusano F, Hayakawa Y, Kurose T. : Development of extremely attenuated live measles virus vaccine (CAM-EX). Biken J. 15: 173-177, 1972.

18. Ueda S, Otsuka T, Okuno Y.: Experimental subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) in a monkey by subcutaneous inoculation with a defective SSPE virus. Biken J. 18: 179-181, 1975.

19. Albrecht P.: Immune control in experimental subacute sclerosing panencephalitis. Am. J. Clin. Pathol. 70: 175-184, 1978.

20. Thormar H, Mehta PD, Brown HR.: Comparison of wild-type and subacute sclerosing panencephalitis strains of measles virus. Neurovirulence in ferrets and biological properties in cell cultures. J. Exp. Med. 148: 674-691, 1978.

Table 1. Infectivity of infectious cell-free (SSPE/CD) particles obtained from a non-productive SSPE virus-infected HEL cells by treatment with cytochalasin D

Time (min)		Speed x rpm (G)		
		500 (25)	1000 (100)	3000 (900)
5	S*1	ND	3.9*3	ND
	P*2	ND	4.9	ND
10	S	3.6*3	4.1*4	3.6*4
	P	4.9	≧ 5.1	≧ 5.1

Infectivity : $\log_{10}TCID_{50}$/ml

Samples of SSPE/CD particles were clarified by centrifugation in plastic tubes and the supernatant fluid was divided into two parts (S*1: upper half, P*2: lower half with cell debris)

*3 : Experiment 1 (Centrifuged at 20 °C)

*4 : Experiment 2 (Centrifuged at 4 °C)

ND : Not done

Table 2. Effect of freezing on infectivity of SSPE/CD particles

(a) Short-term freezing at -20 °C or -70 °C

Infectivity ($log_{10}TCID_{50}$/ml)	Before freezing		2 days after freezing (-20°C)	2 days after freezing (-70°C)
	5.4*P	3.1*S	2.4*S	2.4*S

(b) Long-term freezing at -120 °C

Infectivity ($log_{10}TCID_{50}$/ml)	After freezing	
	1 day	5 months
	4.9*S	4.9*S

SSPE/CD particles were clarified by centrifugation at 3000 rpm for 10 min at 4 °C and divided into *S and *P parts as described in the footnote of Table 1.

Table 3. Neurovirulence of SSPE/CD particles in adult hamsters

Virus (Dose)	No. of hamsters diseased/No. tested (%)	No. of hamsters dead/No. diseased (%)
Parent virus*1 (200 PFU)	6/6 (100)	6/6 (100)
SSPE/CD particles (1000 $TCID_{50}$)	4/6 (66.7)	4/4 (100)

*1 : SSPE virus-infected HEL cell suspension

図の説明

Fig. 1. Decrease of infectivity of SSPE/CD particles by membrane filtration. SSPE/CD particles (●—●) and measles virus (▲-----▲) were filtered through a membrane filter (pore size : 0.45 or 0.22 μm) and the infectivity was assayed.

Fig. 2. Cell-associatedness of SSPE/CD particles. HEL cells were infected with SSPE/CD particles at a m.o.i. of 0.1 $TCID_{50}$ / cell. (▲ : No. of infected cells of the culture, ■ : Infectivity of the culture treated with CD, ● : Infectivity in the culture fluid)

Fig. 3. Neutralization kinetics of SSPE/CD particles.
S-CD (○, ●) : SSPE/CD particles
N-HB (△, ▲) : The Nagahata strain of measles virus
Open marks : Samples filtered through 0.45 μm membrane filter
Solid marks : Samples without filtration

図 1.

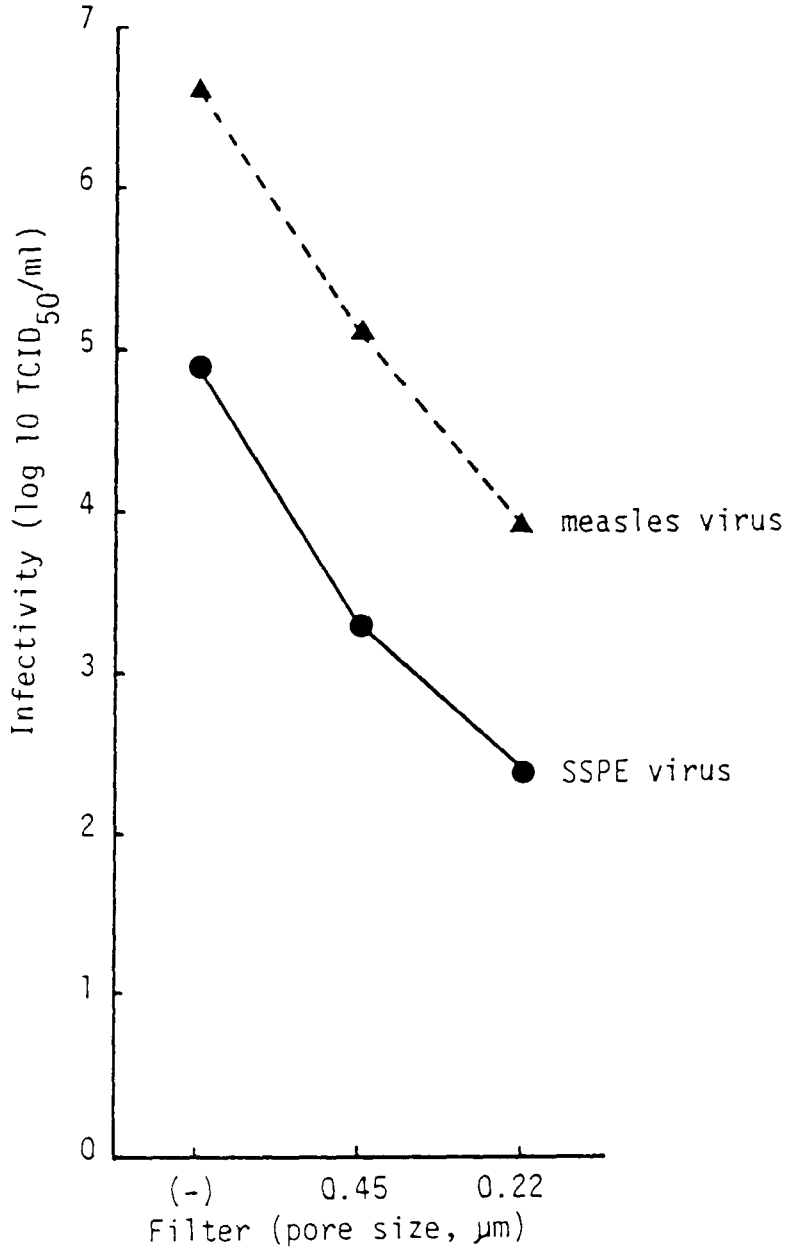

7
6
5
4
3
2
1
0
Infectivity (log 10 TCID50/ml)
measles virus
SSPE virus
(-)
0.45
0.22
Filter (pore size, μm)

図 2

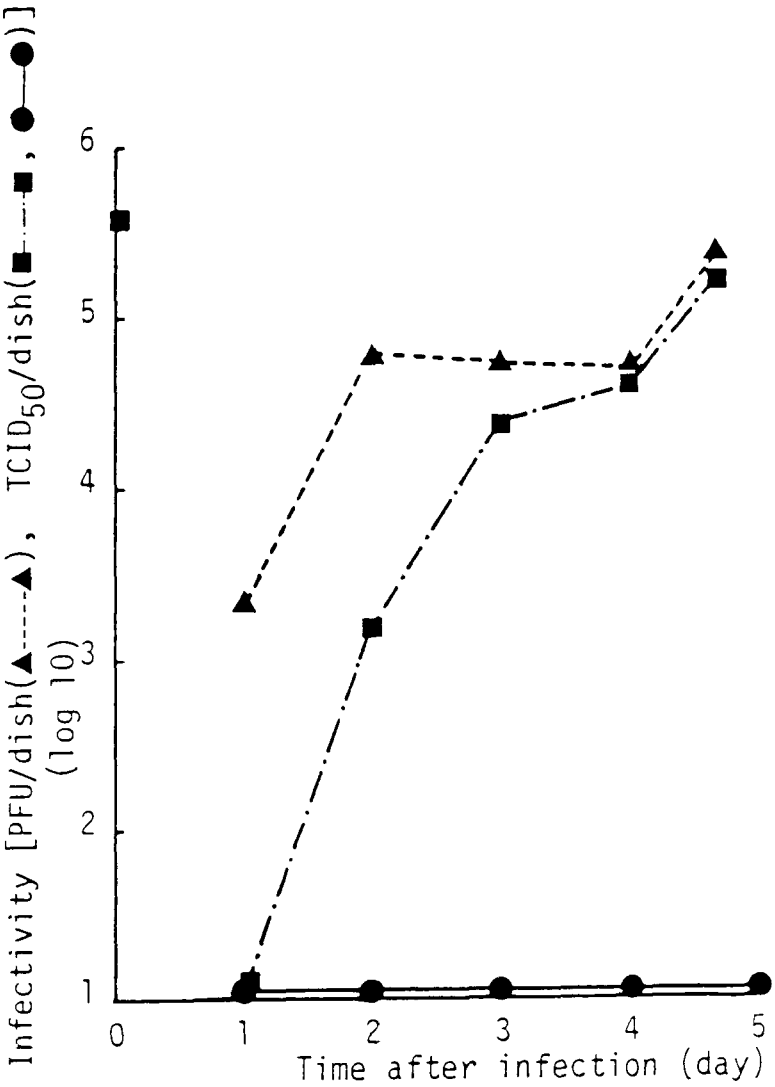
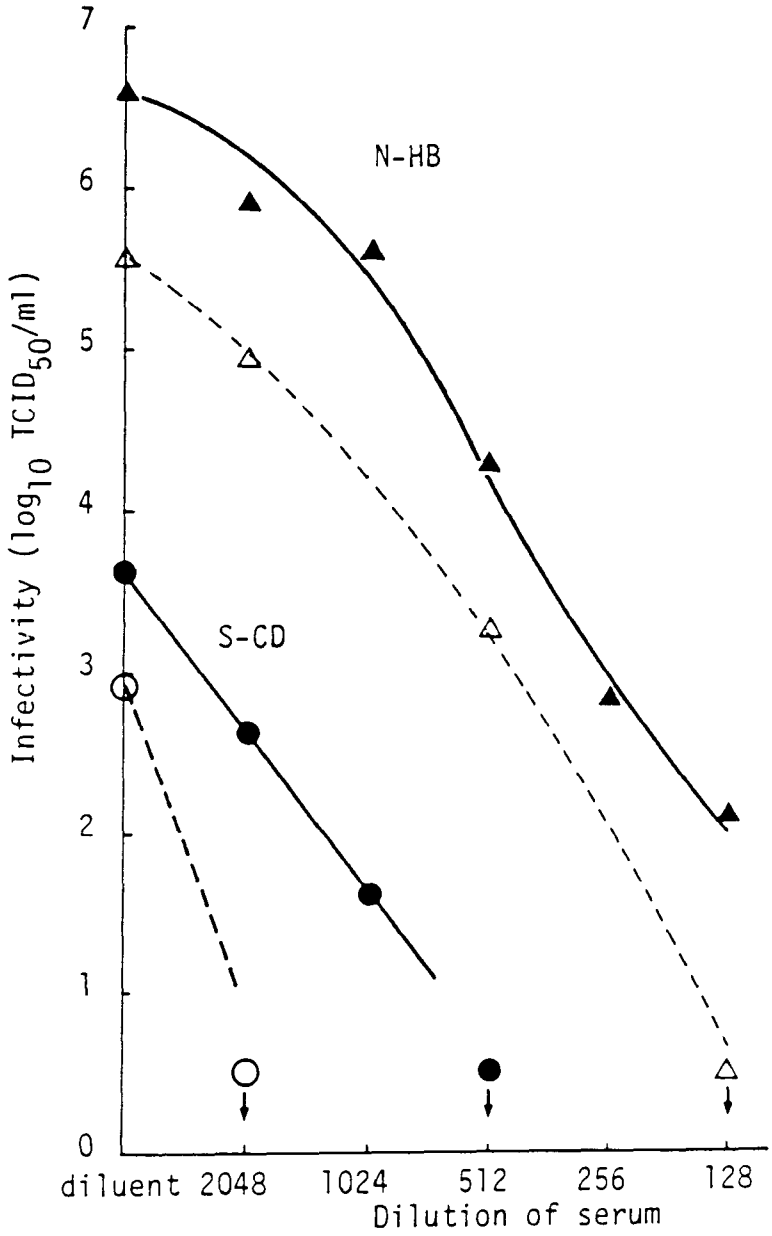

Infectivity [PFU/dish(▲----▲), TCID50/dish(■-·-■, ●—●)]
(log 10)
6
5
4
3
2
1
0
1
2
3
4
5
Time after infection (day)

図 3


7
6
5
4
3
2
1
0
Infectivity (log_{10} $TCID_{50}$/ml)
N-HB
S-CD
diluent
2048
1024
512
256
128
Dilution of serum