—原 著—

ましんウイルス持続感染 Vero 細胞の長期培養 により得られるウイルスの性状

渡理 英二

日本医科大学微生物学免疫学教室 (主任: 木村義民教授)
指導: 山地幸雄教授

Nature of viruses from Vero cell cultures persistently infected
with temperature sensitive mutants of measles virus

Eiji Watari

Department of Microbiology and Immunology (Chief: Prof. Yoshitami Kimura,
Director: Prof. Yukio Yamaji), Nippon Medical School

The 448-PI-Vero, African green monkey kidney cell line (Vero) persistently infected (PI) with a temperature sensitive (ts) mutant, P-448 of measles virus has been studied in culture for 6 years.

The Edmonstone strain of measles virus induced interferon (IFN) in BSC-1 cells derived from African green monkey kidney, but the P-448 virus with which the persistent infection was established, did not produce IFN in BSC-1 cells. Both of the Edmonstone and P-448 viruses did not induce IFN in Vero cell culture.

Vero cell culture which was maintained during the 6 years, but not infected with measles virus, produced IFN by the infection of Newcastle disease virus, but another Vero cell line (Vero-F) obtained commercially did not.

The virus derived from the persistently infected 448-PI-Vero at 500 days (19 passages) after the initial infection showed decreased temperature sensitivity but did not produce IFN.

The virus derived at 558 days (20 passages) showed reversion to ts⁺ phenotype and produced IFN.

Viruses from 448-PI-Vero maintained longer than 715 days (29 passages) steadily had the IFN-inducing capacity and showed unstable temperature sensitivity. The culture showed definitely decreased cytopathic change, when excreted the ts virus.

In Vero-F cells, persistent infection was easily established with viruses from 448-PI-Vero which had been maintained for 558 to 1,500 days, only when the virus was inoculated at multiplicity of infection (MOI) of 0.08 or more.

From the results described above, it is concluded that firstly IFN-production is not necessary to establish the PI culture, and secondly the maintenance of the PI culture could be related to the IFN-production in cells and a selection of mutants with decreasing cytopathogenicity as well as presumably a development of defective interfering particles. 448-PI-Vero produced highly heterogeneous mutant viruses after a long incubation periods.

Key words : measles virus, ts mutant, persistent infection, interferon induction

緒 言

ましんウイルスは、他のパラミクソウイルス同様、種々の細胞培養系において、持続感染（以下 PI と略す）状態を樹立、維持させることができ^{7-13, 16, 25}、亜急性硬化性全脳炎（以下 SSPE と略す）をはじめとする遅発性ウイルス感染症の解明の手掛りを得る *in vitro* のモデルとして研究されている¹⁻⁶。これまでに、ましんウイルス PI 細胞を樹立し維持するための要因として、欠損干涉（以下 DI と略す）粒子の存在¹¹や温度感受性（以下 ts と略す）変異株の存在¹⁴、宿主 DNA へのウイルス遺伝子の integration⁵ が関与するとの報告があった。しかしながらパラミクソウイルスで報告されている interferon（以下 IFN と略す）の関与¹⁰、あるいは長期にわたる PI 細胞維持によるウイルス変異の過程を詳細に調べた研究は少ない。

著者らは以前、ましんウイルス ts 変異株を使い、IFN 産生能を欠くとされている Vero 細胞を用いて PI 細胞を樹立した¹⁶。

そこで今回は PI 細胞樹立における IFN の関与、および樹立に用いた ts 変異株の性状が樹立後 6 年間の間に变化してゆく過程を温度感受性、IFN 産生能を指標にして調べた。また PI 細胞より得られたウイルス集団については、クローン分析を行い、個々のウイルス性状を調べ、2, 3 の特異的性状を明らかにしえたので報告する。

研究材料および方法

(1) 細胞

(i) Vero 細胞：アフリカミドリザル腎由来株化細胞（国立予防衛生研究所より分与）。

(ii) Vero-F 細胞：Flow Laboratories, Glasgow, Scotland より購入した Vero 細胞。

(iii) BSC-1 細胞：Flow Laboratories より購入したアフリカミドリザル腎由来株化細胞。

(iv) FL 細胞：ヒト羊膜由来株化細胞。

(v) BHK-21 細胞：シリアンハムスター 仔腎細胞由来株化細胞。

FL 細胞および BHK-21 細胞は国立予防衛生研究所・河野博士より分与された。

(2) ウイルス

1) ましんウイルス

(i) R-5 : Edmonstone 株から分離された巨細胞形成ましんウイルスを、ブランク純化して得た温度感

受性の低いクローン^{18, 19}。

(ii) P-448 : R-5 よりプロフラビン処理により誘発され、分離された ts 変異株¹⁹。

2) Newcastle Disease Virus (NDV, 宮寺株)

感染価は初代ニワトリ胎児細胞培養で 5×10^6 PFU/ml であった。

3) Sindbis Virus

感染価は BHK-21 細胞で 2×10^6 TCID₅₀/ml であった。

(3) 細胞培養

細胞継代には 0.05% トリプシン-0.025% Ethylene diamine tetraacetic acid（以下 EDTA と略す）溶液を用いた。Vero 細胞、Vero-F 細胞、FL 細胞、BHK-21 細胞の増殖、維持培地は 10% コウシ血清 (Irbine, Scientific Sales. Co. Inc., California) 添加 Eagle Minimum Essential Medium（以下 Eagle-MEM と略す、日本製薬）にビタミン L-グルタミンを原法の 2 倍量添加した。BSC-1 細胞は 10% ウシ胎児血清 (Armour Pharmaceutical Co.) 添加 Eagle-MEM (Flow Laboratories Inc., U.S.A.) にビタミン、L-グルタミンを 2 倍量添加した培地を用いた。

培養温度は、特に記したほかは 37°C とした。

(4) 持続感染細胞培養

ts 変異株 P-448 株¹⁹を感染させた Vero 細胞の生き残り細胞を継代して樹立した 448-PI-Vero 細胞¹⁶を用いた。PI 細胞の継代と維持は Vero 細胞と同様に行った。448-PI-Vero 細胞は 1983 年 7 月現在、最初のウイルス感染より約 7 年を経た。

(5) ウイルス力価測定

ブランクアッセイ¹⁹は継代後 2 日目の Vero-F 細胞単層培養を用いた。Vero-F 細胞にウイルスを吸着させたのち、ビタミン、アミノ酸、L-グルタミンを 2 倍量加えた Eagle-MEM に 10% コウシ血清および 1.5% 寒天 (Agar Noble, Difco Laboratories) を加えた overlay を重層し 7 日間培養後に 0.006% 中性赤を加えた同じ組成の寒天培地を重層し、その翌日よりブランクを数えブランク数が増加しなくなった時点で感染価を決定した。

(6) 448-PI-Vero 細胞から分離されたウイルスのブランク純化とその温度感受性の測定

PI 細胞培養上清をブランクアッセイし、小瓶当たり 20 個前後のブランクより明白なブランクを取り出し小試験管中の Vero-F 細胞に接種した。Cytopathic Effect（以下 CPE と略す）が 75% 以上を示した時、

凍結融解し、その融解物（細胞破片を含む）を 50 ml 小瓶に接種し、再び 75% 以上を示した時、凍結融解し、4°C, 700 g, 10 分遠心した上清を PI 細胞より分離したクローンとして用いた。分離されたウイルスクローンの温度感受性は 35°C と 39.5°C について調べた。

efficiency of plaquing (以下 EOP と略す) ratio は次のようにして計算した。

$$\text{EOP ratio} = \text{PFU at } 39.5^\circ\text{C} / \text{PFU at } 35^\circ\text{C}$$

(7) ウイルスの熱安定性

PI 細胞培養よりのウイルス集団の熱安定性は 42°C の水槽中で 15 分間あるいは 45 分間放置後、直ちに 35°C でブラックアッセイを行った。この際、ウイルス試料は PBS で 1:10 に希釈したものを用いた。

(8) インターフェロンの産生と測定

IFN 産生細胞として、継代後 5 日間培養した BSC-1 細胞を用いた。BSC-1 細胞はウイルスを Multiplicity 0.1~1.0 で感染させ 37°C で 60 分吸着させた。未吸着ウイルスを洗浄することなく 5 ml の培養液を加え、37°C あるいは 39.5°C で培養した。CPE が最大になった時、培養液を採り、1 N HCl を用いて誘発ウイルス不活化のため pH 2 に調整し、さらに一部の試験では 4°C, 100,000 g, 90 分間遠心によりウイルス粒子を除去した。この試料は 4°C, 5 日間放置した。その後、最終濃度で 10 mmol になるように HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethane sulfonic Acid) を加えた後、1 N NaOH で pH を中性にした。

IFN 力価測定は²¹⁾、96 穴 Microplate (Falcon Labware) の全穴に 0.1 ml の 5% コウシ血清添加 Eagle-MEM を加え、第 1 管に 0.1 ml の IFN 試料を入れ 2 倍段階希釈を可変式マルチチャンネルピペットを用いて行った。直ちに FL 細胞を 4.0×10^5 個/ml の 0.1 ml を全穴に加え、24 時間培養した後、培養液を捨て PBS (Mg^{2+} , Ca^{2+} を除く) で細胞を洗浄した。攻撃ウイルスとしては Sindbis ウイルスの 1:150 希釈液の 0.1 ml を加え、5% CO_2 下 37°C にて 48 時間培養した。IFN 力価は CPE の 50% を抑制する希釈倍数を国際単位に変換して表した。

(9) 国際 IFN

国際標準ヒト、IFN (Human Leukocyte Interferon 69/19) 5,000 国際単位 (以下 IU と略す) を英国国立医学研究所 (NIMR) から入手し、0.5% ウシ血清アルブミン添加 Hank's Balanced Salt Solution で 100 IU/ml に希釈、-70°C に保存した。

(10) 448-PI-Vero 細胞より得られたウイルスによる PI 細胞培養の樹立

448-PI-Vero 細胞樹立後 558 日よりのウイルス集団と 1,531 日よりのウイルス集団を PBS で順次 10 倍段階希釈し、Vero-F 細胞に感染させた。培養液は 3 日ごとに換え感染後 14 日まで CPE を調べた。CPE は 1~4 まで順位をつけ、① CPE 1 は $\leq 25\%$ 、② CPE 2 は 25~50%、③ CPE 3 は 50~75%、④ CPE 4 は 75~100% とした。感染後 18 日に生き残り細胞を 0.02% ニュートラルレッド染色し、PBS で細胞を洗浄後 20~30% エタノールを含む 0.01 N HCl にて色素を溶出、その吸光度を 490 nm で測定した。

(11) ウイルスの RNA 合成能²⁰⁾

温度感受性を示したウイルスクローンの 39.5°C における RNA 合成は 5-aza-cytidine (以下 5-AC と略す) を用いた温度シフト法によった。BSC-1 細胞に低い multiplicity でウイルスを感染させ、37°C で吸着した後、培養液を加え 39.5°C で培養した。感染後 24 時間にて 25 μg の 5-AC を含む培養液に換え、35°C に温度シフトさせた。細胞は感染後 60 時間で凍結融解し、4°C, 700 g, 10 分遠心した上清についてウイルス感染価を求めた。

結 果

1. 448-PI-Vero 細胞の樹立に用いた P-448 ts 変異株の性状

P-448 株は親株である R-5 と同様、35°C で 1.0~1.5 mm の明瞭なブラックを Vero 細胞で形成した。35°C と 39.5°C における EOP (39.5°C/35°C) は 2.7×10^{-5} 以下であった。IFN 産生能を調べた結果は Table 1 に示した。R-5 は NDV 同様、許容 (37°C)、非許容 (39.5°C) 温度で IFN 産生を示したが、R-5 由来の ts 変異株 P-448 は両温度で IFN 産生は認められなかった。また連続未希釈で 5 回 Vero-F 細胞に継代を繰り返して得た 448-505 ウイルスの EOP (39.5°C/35°C) は 1.2×10^{-5} で、温度感受性の低下を示したが IFN 産生は認められなかった。

2. PI 細胞の樹立に用いた Vero 細胞の IFN 産生能

Vero 細胞に R-5 あるいは NDV を感染させ、37°C, 1 時間吸着後、培養し、CPE が最大となった時、培養液を採り、方法に記したように IFN 活性を測定した。その結果は Table 2 に示した。予防衛生研究

Table 1 Induction of interferon with various strains of measles virus and newcastle disease virus in BSC-1 cells

Virus	IFN titer* (IU/ml) induced at	
	37°C	39.5°C
NDV	200	200
R-5	200	50
P-448	<3	<3
P-448-505	<3	<3

BSC-1 cells were infected with each virus at a input MOI 0.1. When cells showed maximum cytophthic effect, fluid were collected and adjusted to pH 2 by addition of 1 N HCl and kept for 5 days at 4°C, and then acidic pH was neutralized. Diluted interferon specimens were added to FL cells suspended in the growth medium. When monolayer cultures were completed after 24 h incubation at 37°C, sindbis virus was added as the challenging virus, and cultures were incubated at 37°C or 39.5°C.

*: Interferon titers were expressed as international units /ml. NDV : Newcastle disease virus, R-5 : Rapp clone from Edmonotone strain of measles virus, P-448 : Temperature sensitive mutant of measles virus, P-448-505 : Virus obtained after fifth serial undiluted passages of P-448.

所分与の Vero 細胞はましんウイルス R-5 により IFN 産生能を示さなかったが, NDV では低単位の IFN 産生が認められた. 448-PI-Vero 細胞も同様 50 IU/ml の IFN 産生が認められたが, Vero-F 細胞では認められなかった.

3. 448-PI-Vero 細胞培養上清より得られたウイルス集団の温度感受性と IFN 産生

PI 細胞樹立後, 558~2,104 日までの各時期から得た 448-PI-Vero 細胞培養上清を新たな Vero-F 細胞

Table 2 IFN-inducibility of 448-PI-Vero cells and Various Vero cell lines

Cell Source	Inducer	Treatment	IFN titer(IU/ml)
Vero-F ⁺	NDV	pH 2, cfg*	<25
Vero-F	NDV	60°C, 2 h**	<25
Vero*	NDV	pH 2, cfg	50
Vero	R-5	pH 2, cfg	<25
448-PI-Vero [#]	NDV	pH 2, cfg	50
448-PI-Vero	NDV	60°C, 2 h	50

* pH 2, cent : Culture fluids were collected and adjusted to pH 2 by addition of 1 N HCl and kept for 5 days at 4°C and centrifuged at 39,000 rpm for 90 min. ** 60°C, 2 h : Culture fluids were heated in waterbath at 60°C for 2 h. + : Vero F cells were obtained from Flow Laboratories, Glasgow, Scotland. * : Vero cells were obtained from NIH of Japan. # : Persistent infected cells had been established with P-448 ts mutant.

に感染させた後, 得られたウイルス集団について, 温度感受性と IFN 産生を調べ結果を **Table 3** に示した. 樹立後 558 日で温度感受性の低下を示し, 669 日よりのウイルスは R-5 と同様の EOP (37°C/39.5°C) を示した. しかしながら 1,531 日よりのウイルスは再び温度感受性を示し, 2,104 日よりのウイルスは 558 日よりのウイルス同様温度感受性の低下を示した. 558 日以後分離されたウイルスは許容温度においてすべて IFN 産生を示した. 非許容温度では, 温度感受性を示した 1,531 日培養よりのウイルスは IFN 産生を示さなかった.

4. 熱不活化実験

448-PI-Vero 細胞の培養上清より得られたウイルス集団の熱不活化実験を行い結果を **Fig. 1** に示した. 温度感受性を示す P-448 株と継代 84 代よりの

Table 3 The efficiency of plaquing (EOP) and of induction of virus stocks isolated from 448-PI-Vero cells

Passage number of PI culture	PFU/ml at*		log ₁₀ EOP ^{39.5} / _{37.0}	IFN (IU/ml)	
	37°C	39.5°C		37°C	39.5°C
Parental virus P-448	2.7×10 ⁵	<10	<-5	<3	<3
P-20 (558 d**)	1.3×10 ⁵	5×10 ³	3.8×10 ⁻²	6	3
P-25 (669 d)	8.3×10 ⁴	1.5×10 ⁴	1.8×10 ⁻¹	12	12
P-84 (1531 d)	2.6×10 ⁵	<10	<-5	25	<3
P-94 (1677 d)	3.9×10 ⁵	6.1×10 ²	1.6×10 ⁻³	25	6
P-131 (2104 d)	6.0×10 ⁴	7.4×10 ³	1.2×10 ⁻¹	6	6

* : Virus from PI cultures were passaged once in Vero cell before IFN induction.

** : Days after the initial infection

Fig. 1 Heat inactivation of PI-Virus populations from 448-PI-Vero cell cultures
Virus Samples were diluted 1:10 in PBS and submerged in a waterbath at 42°C. At the indicated times, an aliquot was removed and placed on ice until all samples were plaque assayed on Vero-F cell.

ウイルス集団はほぼ同程度の易熱性を示した。継代 20 代および継代 131 代のウイルス集団は P-448 の親株である R-5 よりも抵抗性を示した。

5. ウイルスクローン分析

PI 培養上清ウイルスについて直接プラーク効率を調べる方法は、そのウイルス集団中の ts 変異株の存

在を知るには適さない²²⁾。そこで PI 培養上清中のウイルスについてクローン分析を行い、結果を Table 4 に示した。なお R-5 の EOP (37°C/39.5°C) は 10^{-1} であったので、 10^{-2} 以下の EOP を示したクローンを ts⁻ 株とした。その結果、500 日よりのウイルスは ts⁺ 株が 80% 以上を示していたが、715 日より ts⁻ の比率が高まり 1,193 日では分離したすべてのクローンが ts⁻ 株であった。1,677 日以降再び ts⁺ 株が出現し 50% 前後となった。

PI 細胞より分離したウイルスクローン 57 株について IFN 誘発能を調べた。樹立後 500 日で得られたウイルスは 15 株中 1 株のみ低単位の IFN 産生を示した。樹立後 558 日以後分離されたクローンは 2 株を除きすべて IFN 産生が認められた。

1,531 日よりのウイルスクローンのうち 5 株について RNA 合成を調べた。その結果、非許容温度でウイルス特異的 RNA 合成は認められなかった。

6. 継代 20 代および継代 80 代よりのウイルスを用いた PI 細胞の再樹立

448-PI-Vero 細胞樹立後 558 日の ts 性状の低下したウイルスと 1,531 日の ts 性状を示したウイルスを用いて PI 細胞の再樹立を試みた。ウイルスストックを 10 倍希釈より順次 10 倍段階希釈し IFN 非産生株と認められた Vero-F 細胞に感染させた。その結果、Table 5 に示したように 10^{-1} 希釈で感染させた場合、細胞は最大 50% の CPE を示し、以後生き残り細胞が増殖し感染から 2 週間で単層を形成した。ウイルスの希釈が高くなるにつれ生き残る細胞の比率は

Table 4 Ratios of EOP at 39.5°C and 35°C of viral isolates from supernatants of 448-PI-Vero and parental P-448 temperature sensitive mutant

EOP (39.5°C/37°C)	Numbers of plaque-purified clones from								
	Parental P-448 ts mutant	448-PI-Vero cultures							
		500*/19	558/20	715/29	1193/63	1531/84	1677/94	1846/108	2104/131
1~ 10^{-1}	0	2	8	2	0	0	1	0	1
10^{-1} ~ 10^{-2}	0	9	6	4	0	0	2	7	4
10^{-2} ~ 10^{-3}	1	4	0	3	0	2	1	1	3
10^{-3} ~ 10^{-4}	6	0	0	1	4	8	1	2	2
10^{-4} ~ 10^{-5}	0	0	0	0	0	3	2	2	0
Total number of clones	7	15	14	10	4	13	7	12	10
Percent of ts clones (EOP 10^{-2})	100	27	0	40	100	100	57	41	50
IFN Inducibility in BSC-1 (Positive clones/Total clones)	0/7	1/15	11/11	NT	NT	10/12	4/4	NT	10/10

*: Days after the initial infection/Passage number of PI cultures

Table 5 Reestablishment of PI cultures with PI viruses in Vero-F cells

	Virus Dilution (10 ⁻²)	MOI ⁺	Days after Infection(CPE)										OD 490 ⁹⁾
			2 d	4 d	8 d	9 d	10 d	13 d	14 d	18 d	18 d	18 d	
P-20	1	0.08	2*	3	3	3	3	2	2	0.44			
	2	0.008	1	2	4	4	4	3	3	0.21			
	3	4×10 ⁻⁴	1	1	4	4	4	4	4	0.08			
P-84	1	0.1	2	3	2	2	2	2	2	0.50			
	2	0.01	1	2	4	4	4	3	3	0.22			
	3	0.001	0	1	4	4	4	4	4	0.08			
	4	1×10 ⁻⁴	0	0	1	1	2	3	4	0.00			

⁺ MOI: Multiplicity of infection, * CPE: Cytopathic Effect (Grade of CPE is 1: less than 25%, 2: 25~50%, 3: to 75%, 4: more than 75% of cells). 3): Viable cells were stained with 0.02% neutral red at 18 days after infection. After washing, cells were extracted with 0.01N HCl containing 20% of ethanol the absorbance determined at 490 nm.

低下し、10⁻⁴ 希釈、10⁻⁸ 希釈では生き残る細胞は認められなかった。

考 察

448-PI-Vero 細胞は、EOP 10⁻⁴ 以下の P-448 ts 変異株¹⁹⁾ を Vero 細胞に感染後、その生き残り細胞より樹立された¹⁶⁾。このような生き残り細胞より得られた PI 細胞は、樹立初期には細胞変性 (Crisis) を伴い、これを繰り返すうちに安定した PI 細胞が得られることが多い。したがって以後は Crisis の起こっていた樹立後約 600 日までを樹立期、安定した細胞維持の可能な 600 日以降を維持期として考察する。

今回の実験は、PI 細胞の樹立と維持に関与する要因、および長期 PI 細胞維持により得られるウイルス性状の変化を経日的に調べた。

PI 細胞の樹立、維持に IFN が関与するとの報告がある¹⁵⁾。これに対し今回の著者の実験からは PI 細胞樹立期における IFN の関与は認めがたい。すなわち、樹立に用いたましんウイルスは温度感受性変異株 P-448 であり、Mckimm ら¹⁷⁾および著者ら¹⁶⁾は、ましんウイルス変異株のなかに IFN 産生の認められない株の存在することを報告しており、P-448 変異株も IFN 非産生であった。また、Vero-F 細胞に P-448 を 5 回連続継代を繰り返して得られた温度感受性の低下した P-448-505 ウイルスにおいても IFN 産生は認められないことから、遺伝的には安定した変異であることが示唆される。

Vero 細胞には、IFN 産生株と非産生株が知られて

おり^{22,24)}、非産生性の Vero 細胞は IFN 合成に関与する遺伝子が抑制または欠除していると考えられている。著者の PI 細胞株樹立に用いた国立予防衛生研究所分与 Vero 細胞株は、ましんウイルスにより IFN 産生は示さなかったが、NDV により低単位の IFN 産生を認め、そして Flow Laboratory 由来の Vero-F 細胞は IFN 非産生株と認められた。検出限界以下の IFN の存在により PI 細胞が樹立されたという考えを積極的に否定する証拠はないが、448-PI-Vero 細胞に heterologous interference は認められないこと²³⁾、また IFN 非産生性の Vero-F 細胞を用いて PI の再樹立ができたことから、IFN が PI 樹立に積極的な関与はしていないと著者は考えている。

PI 細胞樹立後 500 日以降より得られる株は、クローン分析からも明かなように、2 株を除きすべて IFN 産生株に変化していた。この理由については明らかではない。

ウイルス PI 細胞樹立あるいは維持に、ウイルスの ts 変異が関連しているとの主張が従来なされているが^{9,22,26,27)}、この見解が今回用いた 448-PI-Vero 細胞培養の系に必ずしも適用しえないことがウイルスクローン分析から推察される。すなわち樹立に用いた P-448 ts 変異株は、樹立後 500 日で温度感受性の低下が認められ、669 日よりのウイルスでは温度感受性を示さなかった。また 500 日目より分離された 16 ウイルスクローンは、1 株を除きすべて親株である P-448 ts 変異株同様 IFN 産生を示さなかった。このことは IFN 産生を誘発しない性状に関与するウイルス遺伝子は保存される一方、ts に関与する遺伝子に変異が起こったと考えられる。このように ts⁺ mutant が選択されてくる例は、ほかに Reovirus でも報告されている²⁸⁾。変異ウイルスを用いて PI 細胞培養を樹立する試みは、vesicular stomatitis virus (以下 VSV と略す) の ts 023 と ts 045 を用いて L 細胞で行われ PI 細胞が樹立されているが、これらの ts 変異株は非許容温度で RNA 合成をする²⁹⁾。ただしこの変異株で樹立された PI 細胞からは ts⁻ の変異株が選択されている。このように PI 細胞における ts 変異株の選択は、用いたウイルスと宿主の系により異なると考えられる³⁰⁾。したがって PI 樹立の容易性と ts 変異とは必ずしも相関しない。

PI 細胞維持に関しては、樹立後 715 日以降より分離されるウイルスは再び温度感受性を示し、細胞の Crisis も認められなくなり、安定した細胞維持が可能

となった。このことは PI 細胞の安定維持に ts 変異が関連していると考えられるが、この ts 変異は Ramseur⁸¹⁾ らの言うように IFN が PI 細胞からの ts 変異株の選択に関係したものかどうかは今後検討を要する。1,677 日以降より分離されたウイルスは、EOP を異にするクローンが不均一集団として存在する。Rowlands⁸²⁾ は 5 年以上たった PI 細胞では 100 以上の変異が存在すると報告しており、われわれの系においても広範な変異がウイルス遺伝子に蓄積していると考えられる。

PI 細胞より得られたウイルスによる PI 細胞再樹立化実験は、今回 IFN 非産生株と認めた Vero-F 細胞を用いて行った。10⁻⁸ に希釈したウイルスを新たな Vero-F 細胞に感染させた場合には PI は成立せず、10⁻¹ 希釈ウイルスの場合には多くの生き残り細胞が得られた。この事実は、448-PI-Vero 細胞培養上清より得られたウイルス試料中に多量の DI 粒子が存在していたか、ウイルス増殖を抑制する因子の存在を示唆する。Roux らは多量の DI 粒子を含むウイルス試料で感染させた細胞は大部分生き残ると報告している⁸³⁾。448-PI-Vero 細胞は① 大部分の細胞が抗原を保持し、② heterologous ウイルスに感受性があるが homologous virus には抵抗性を示す²⁹⁾。これらのことは Holland らのいう DI の関与する Carrier の性状を表すものと考えられる。

以上のことから、448-PI-Vero 細胞の樹立には IFN の関与は認め難く、またこの PI 細胞の安定した維持には細胞障害性の低下した変異株の出現、IFN 産生能を有するウイルスの存在、DI 粒子の存在が関係していることが示唆される。さらに長期 PI 細胞維持により温度感受性の異なる不均一な変異ウイルス集団が得られることが明らかになった。

結 論

温度感受性 (ts) 変異株 P-448 により樹立された、ましんウイルス持続感染 (PI) 細胞、448-PI-Vero より過去約 6 年間の間に分離されたウイルスの ts 性状とインターフェロン (IFN) 産生能について調べた。

1) ましんウイルス Edmonstone 株はアフリカミドリザル由来 BSC-1 細胞で IFN を誘発したが、Edmonstone 株由来の P-448 ts 変異株は、BSC-1 細胞で IFN を誘発しなかった。

2) PI 細胞樹立に用いた Vero 細胞は inducer として Newcastle Disease Virus を使うことにより

IFN を産生した。しかしながら他から由来した Vero-F 細胞は IFN 産生能を示さなかった。

3) ウイルス感染後 500 日の PI 培養液から得られたウイルスは温度感受性の低下を示した。

4) 558 日の PI 培養液から得られたウイルスは IFN 誘発能と ts⁺ への復帰形質を示した。

5) 715 日より長く培養した PI 細胞培養から得たウイルスは IFN 誘発能を持続的に示したが、ts 形質については不安定であった。そして ts⁻ ウイルスが増加したとき PI 細胞培養の細胞変性は減少した。

6) 558 日および 1,500 日の 448-PI-Vero 細胞からのウイルスを感染効率 0.08 あるいはそれ以上で Vero-F 細胞に感染させた時、持続感染が容易に成立した。

7) 448-PI-Vero 細胞を長期間培養することにより不均一な変異ウイルスが得られた。

以上の結果から、IFN は PI 細胞樹立には関係していない。そして維持には細胞変性の減少した変異株の選択、干渉粒子などが関係していると推論される。

稿を終るにあたり、本研究に御協力を頂いた微生物学免疫学教室鈴木博助手、草間みちる技術員ほか教室員各位に感謝致します。

なお、本論文の一部は第 43 回ウイルス抑制因子研究会 (昭和 57 年 11 月、京都) にて発表した。

文 献

- 1) Hall, W.W., and Choppin, P.W.: Measles virus proteins in the brain tissue of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *N. Engl. J. Med.*, **304**, 1152~1155, 1981.
- 2) Wechsler, S.L., Weiner, H., and Fields, B.N.: Immune response in subacute sclerosing panencephalitis; Reduced antibody response to the matrix protein of measles virus. *J. Immunol.*, **123**, 884~889, 1979.
- 3) Hall, W.W., and Choppin, P.W.: Evidence of lack of synthesis of the M polypeptide of measles virus in brain cells in subacute sclerosing panencephalitis. *Virology*, **99**, 443~447, 1979.
- 4) Katz, M., Rorke, L.B., Masland, W.S., Brodano, G.B., and Koprowski, H.: Subacute sclerosing panencephalitis; Isolation of a virus encephalogenic for ferrets. *J. Infect. Dis.*, **121**, 188~195, 1970.
- 5) Hall, W.W., Meulen, V.: RNA homology between subacute sclerosing panencephalitis and measles virus. *Nature*, **264**, 474~477, 1976.
- 6) Hall, W.W., Kiessling, W., and ter, Meulen, V.: Membrane proteins of subacute sclerosing panencephalitis and measles virus. *Nature*, **272**, 460~462,

- 1978.
- 7) Rustingen, R. : Persistent infection of cells culture by measles virus. 1. Development and characterization of HeLa sublines persistent infected with complete virus. *J. Bacteriol.*, **93**, 1792~1804, 1966.
- 8) Zhadanov, V.M., and Parfanovich, M.I. : Integration of measles virus nucleic acid into the cell genome. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **45**, 225~234, 1974.
- 9) Menna, J.H., Collins, A.R., and Flanagan, T.D. : Characterization of an in vitro persistent-state measles virus infection; Establishment and virological characterization of the BGM/MV cell line. *Infect. Immun.*, **11**, 152~158, 1975.
- 10) Minagawa, T., Sakura, T., Kuwajima, S., Yamamoto, T.K., and Iida, H. : Characterization of measles viruses in establishment of persistent infections in human lymphoid cell lines. *J. Gen. Virol.*, **33**, 361~379, 1976.
- 11) Rima, B.K., Davidson, W.B., and Martin, S.J. : The role of defective interfering particles in persistent infection of Vero cells by measles virus. *J. Gen. Virol.*, **35**, 89~97, 1977.
- 12) Knight, P., Duff, R., and Rapp, F. : Latency of human measles virus in hamster cells. *J. Virol.*, **10**, 995~1001, 1972.
- 13) Nakamura, K., Honma, M., and Ishida, N. : Growth of measles virus in culture of rat glioma cells. *Infect. Immun.*, **12**, 614~620, 1975.
- 14) Gould, E.A., and Linton, P.E. : The Production of a temperature sensitive persistent measles infection. *J. Gen. Virol.*, **28**, 21~28, 1975.
- 15) Ito, Y., Nishiyama, Y., Shimokata, K., Kimura, Y., Nagata, I., and Kunii, A. : Interferon production in L cells persistently infected with hemagglutinating virus of Japan (HVJ). *Virology*, **71**, 463~470, 1976.
- 16) Watari, E., Adachi, M., Yamanaka, M., and Yamazaki, Y. : Establishment of persistent infection of measles virus in Vero cells with special reference to the temperature sensitivity of parental viruses. *J. Nippon Med. Sch.*, **46**, 79~82, 1979.
- 17) Mckimm, J., and Rapp, F. : Variation in ability of measles virus plaque progeny to induce interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3056~3059, 1977.
- 18) Seligman, S.J., and Rapp, F. : A variant of measles virus in which giant cell formation appears to be genetically determined. *Virology*, **9**, 143~145, 1959.
- 19) Yamazi, Y., Black, F.L., Honda, H., Todome, Y., Suganuma, M., Watari, E., Iwaguchi, H., and Nagashima, M. : Characterization of temperature sensitive mutants of measles virus. *Jpn. J. Med. Sch. Biol.*, **28**, 223~229, 1975.
- 20) Haspel, M.V., Duff, R., and Rapp, F. : Isolation and preliminary characterization of temperature sensitive mutant of measles virus. *J. Virol.*, **16**, 1000~1009, 1975.
- 21) 京野昭二 : インターフェロンに関する基礎的研究;迅速簡便な測定法とそのマウス *in vivo* 誘発インターフェロン測定への応用. *日医大誌*, **47**, 488~496, 1980.
- 22) Ju, G., Udem, S., Rager-Zisman, B., and Bloom, B.R. : Isolation of a heterogeneous population of temperature sensitive mutants of measles virus from persistently infected human lymphoblastoid cell lines. *J. Exp. Med.*, **147**, 1637~1652, 1978.
- 23) Desmyter, J., Melnick, J., and Rowls, W.E. : Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J. Virol.*, **2**, 955~961, 1968.
- 24) Kohno, S., Kohase, M., Sakata, H., and Shimizu, Y. : Variable interferon productivity of Vero cells. *Arch. Gesmte. Virusforsch.*, **37**, 141~143, 1972.
- 25) 足立幹夫 : ましんウイルス持続感染 Vero 細胞;治療実験とウイルスの性状. *日医大誌*, **46**, 263~270, 1979.
- 26) Armen, R.C., Everman, J.F., Truant, A.L., Laughlin, C.A., and Hallum, J.V. : Temperature sensitive mutants of measles virus produced from persistently infected HeLa cells. *Arch. Virol.*, **53**, 121~132, 1977.
- 27) Chiarini, A., Ammatuna, P., Stefano, D., and Sinatra, A. : Latent measles virus infection in Vero cells depending on a temperature sensitive phenomenon. *Arch. Virol.*, **56**, 263~268, 1978.
- 28) Ahmed, R., Chakraborty, P.R., and Fields, B.N. : Genetic variation during lytic Reo virus infection; High passage stocks of Wild type reovirus contain temperature sensitive mutants. *J. Virol.*, **34**, 285~287, 1980.
- 29) Youngner, J., Preble, O.T., and Jones, E.V. : Persistent infection of L cells with Vesicular stomatitis virus; Evolution of virus populations. *J. Virol.*, **28**, 6~13, 1978.
- 30) Youngner, J.S., Jones, E.V., Kelley, M., and Friele, D.W. : Generation and amplification of temperature sensitive mutants during serial undiluted passages of vesicular stomatitis virus. *Virology*, **108**, 87~97, 1981.
- 31) Ramseur, J.M., and Friedman, R.M. : Prolonged infection of L cells with vesicular stomatitis virus; Defective interfering forms and temperature sensitive mutants as factors in the infection. *Virology*, **85**, 253~261, 1978.
- 32) Rowlands, D., Grabau, E., Spinder, K., Jones, C., Semler, B., and Holland, J. : Virus protein changes and RNA termini alterations evolving during persistent infection. *Cell*, **19**, 871~880, 1980.
- 33) 山中正信 : ましんウイルス持続感染 Vero 細胞. *日医大誌*, **47**, 135~144, 1980.

(受付: 1983 年 10 月 12 日)