ポリオウイルスの rct マーカーの疫学的意義

II. 組織培養によるポリオウイルスの rct マーカーの 変動に関する研究

札幌医科大学衛生学教室 (主任: 金光教授)

浦 沢 价 子

EPIDEMIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF RCT MARKER OF POLIOVIRUS

II. CHANGE IN THE RCT MARKER OF POLIOVIRUSES IN-VITRO

Tomoko URASAWA

Department of Hygiene, Sapporo Medical College

(Chief: Prof. M. Kanamitsu)

[受付: 1月5日, 1967年]

序

前報¹⁾でポリオの流行拡大とその際分離された野生株ウイルスの rct マーカーの性状との間に密接な関係があることを報告した。これはポリオの疫学において重要な知見と思われる。そこで流行の経過に伴い生じたこの rct マーカーの変動をより詳細に解析する目的で in vitro の実験を試みた。

実験方法

ウイルス: 前報で使用したポリオ 1 型野生株の中から選択使用した。

ウイルスの継代: 約 10^6 TCD₅₀ per 0.1 ml の感染価を有するウイルス 0.1 ml を初代猴腎 (MK) 細胞に接種して, 37°C 1 時間吸着した後, 0.1% gelatin 加 phosphate buffered saline (pH 7.3) で 5 回洗滌し, 1 ml の maintenance medium (Sabin's lactalbumin Earle) に置き換えて, 37°C および 40°C で培養した。48 時間後 3 回の凍結融解を行ない, 3,000 回転 10 分間の遠心で細胞残渣を除去してウイルスを作成した。これを各温度における一代継代ウイルスとし, この操作を繰り返して種々の継代ウイルスを作成した。

ウイルスクローンの作成: 直径 60 mm のペトリ皿に培養した MS 細胞にウイルスを感染させ, 37°C 1 時間の吸着の後, 寒天重層液 (1.1% Agar, 5% コウシ血清加 YLE) を重層して, 37°C の CO₂ 孵卵器に 48 時間静置した後, 2 次重層 (コウシ血清を除き neutral red を 0.01% に加えた寒天重層液) を行なった。その後約 8

時間後に, 出現したプラークを毛细管ピペットで, 採取して 1 ml の 0.1% gelatin-PBS に浮遊してクローンウイルスとした。各クローンあたりのウイルス量は約 10^4 - 10^5 PFU であった。

rct/40 マーカーの測定および判定: 前報に記載した方法にしたがった。各クローンウイルスを 0.1 ml ずつ初代 MK 細胞培養試験管 4 本に接種し, 2 本を 35°C の孵卵器に, 残りの 2 本を 40°C の恒温水槽におき, CPE の有無で rct/40 の性状を判定した。

実験成績

1. 40°C および 37°C での継代培養にともなう rct/40 マーカーの変動

第一篇で rct/40 マーカーが流行の拡大にともなつて ± から + へと転化する傾向を示し, これは発熱患者の体内をウイルスが通過することにより生じた可能性を示した。そこでこの可能性を検討する目的で以下の実験を試みた。すなわち 1 型野生株を 40°C および 37°C 下で数代 MK で継代増殖させた後, rct/40 マーカーを測定した。表 1 に示すごとく 37°C では 5 代継代の後でも本マーカーの著明な変動は認められなかつた。一方 40°C 下では rct/40 ± あるいは - の 7 株のウイルスは継代の初期には完全な CPE を示さなかつたが blind に継代するに伴つて 40°C でも明らかな CPE が認められるようになり, Kay と Mog 株以外の 5 株は rct/40 マーカーが + に変化した。なお対照として Sabin 1 型を同様の条件で継代したが, このウイルスの 40°C 下での増殖は

Table 1. Rct/40 Character after in Vitro Passages of Wild Type 1 Polioviruses at Different Temperatures

Strains	EOG ratio	rct character	After 5 Passages in MK cells at			
			37°C		40°C	
			EOG ratio	Character	EOG ratio	Character
Kay.	0.76~0.83	—	0.79	—	>0.55	± or —
Kon.	0.70~0.73	±	0.81	—	0.09*	+
Sai.	0.84~0.91	—	0.78	—	0.00	+
Kam.	0.62~0.75	± or —	0.87	—	0.09	+
Wat.	0.46~0.55	±	0.43	±	0.04	+
Eza.	0.12	+	0.09	+	N. D.	
Tak.	0.60	±	N. D.		0.09	+
Mog	0.64	±	N. D.		0.33*	±

* Four Passages in vitro.

N. D. : Not done.

Table 2. Rct/40 Character on the Virus Clones Obtained from Wild Type 1 Polioviruses

Strain	EOG ratio	rct character	Virus clone		
			Total	rct/40+	rct/40—
Ita. (feces)	0.21	+	21	0	21
Mat. (CNS)	0.05	+	32	32	0
Mat. (feces)	0.00	+	38	35	3
Tak (feces)	0.00	+	15	15	0
Tak (CNS)	0.08	+	35	34	1
Taka (feces)	0.05	+	14	13	1
MAHONEY	0.00	+	35	35	0

不可能であつた。すなわち $10^6\text{TCD}_{50}/0.1\text{ ml}$ の大量のウイルスを感染させたにもかかわらず、合成は抑制された。この事実は Sabin 1 型ワクチンウイルス液中には rct/40 + のウイルス粒子は存在しないことを示すものと思われる。一方、野生株の場合にはその EOG ratio がいずれも Sabin ウイルスの値 1.0 よりも小さいことから、これらのウイルス株は rct/40 マーカーが + のものと — のものの mixed population であり、40°C の培養条件下で rct/40 + の粒子が選択的に増殖した結果、そのウイルス株としてのマーカーが — から + へ変換したのではないかと考えられる。この推定が正しいとすれば、流行の拡大に伴って急激に増加して行く発熱患者の体内で増殖可能な rct/40 + のウイルスの出現機序を合理的に説明することができる。よつてこの推定を野生株ウイルスについて検討した。

2. 野生株から得たクローンウイルスの rct マーカー
1 型野生株から rct/40 マーカーが + のものを 6 株選

び、前に記載した方法で各株からクローンウイルスを得、それぞれの rct/40 マーカーを測定した。実験には本マーカーが + の標準株として Mahoney 株を用いた。表 2 はその成績である。野生株が rct character の異なるウイルス粒子の mixed population であり、その population 全体としての EOG ratio がそれぞれの野生株の rct/40 マーカーの性格を決するものと仮定すると、前報に述べた EOG ratio の算出方法から理解されるように本マーカーが + の株はそれを構成するウイルス粒子がすべて + のものから、+ の粒子とその数十倍の — 粒子から構成されているものまでを含むことになる (Sabin ウイルスの EOG を 6.0 とするとその EOG が 0 より 1.8 までのものは rct/40 + と判定される)。この仮定に立つて表の成績を見ると Ita. (feces) 株のように EOG ratio からみて 40°C で増殖不能なウイルスが可成り混在すると考えられる例では、調べた 21 clone の全てが rct/40 — であり、これは少なくとも + のウイルス粒子 1 に対し

一のウイルス粒子 20 以上を含む population であることを思わせる。また Mat. (CNS) 以下の 5 株のごとく EOG ratio が 0 あるいはそれに近い野生株では、これより得たクローンウイルスのすべて、あるいは大部分が+の性格を示し、ウイルスの population としての EOG ratio すなわち rct/40 マーカーと、その構成ウイルス粒子のマーカーの成績とはよく対応するように思われる。標準株として実験室内でクローニングして継代している Mahoney 株の 35 クローンのすべてが rct/40 + を示したことは、このウイルスの遺伝的安定性を示すものであるが野生株では EOG ratio が Mahoney 株とほぼ等しいものでも rct/40 - 粒子を含む例の多いことは野生株が一般的に mixed population より成ることを示唆するものと思われる。

以上の成績から野生型ポリオウイルスは人体通過の過程での種々の選択により様々の性状のウイルス粒子が生じ、それが集団としてそれぞれの野生株の rct character を決定すると考えられる。

3. 人体を通過した生ワクチンウイルスの rct マーカー

前項までは rct character に関して種々の性状の粒子より構成された野生株を対象に研究を行なった。それでは野生株と異り 40°C で完全な合成抑制を示し、rct/40 + 粒子の混在しない均一なウイルス集団より構成され、またその感染により発病(体温上昇)のない生ポリオワクチンウイルスでは、人体通過によりその rct マーカーはどのような影響をうけるであろうか。われわれは 1961 年に Sabin ワクチンの野外投与実験を行ない(浦沢他, 1963⁹⁾), その際被投与者の糞便から分離されたポリオウイルスを保存していたのでこれについて rct マーカーを検討した。表 3 は 1 型ワクチン投与後 2 および 4 週目に MK 細胞で分離し、そのまま保存したウイルス (1 代液) についての成績である。2 週目に分離した 14 株の EOG ratio は原ワクチンウイルスの ratio (1.0) に比べてやや小さくなる傾向があるが、rct マーカーはすべて - の範囲にある。4 週後に分離した 8 株では、6 株は同様に rct - であるが 2 株は±に変化しており、ワクチン投与後の時間の経過と共に、いいかえれば腸管内増殖期間が長くなる程、マーカーの変化したウイルスの出現率が高くなることを示している。

表 4 は 2 型および 3 型ワクチン投与から 4 週後の分離ウイルスの成績で、2 型株の殆どはワクチンウイルスと同じ EOG ratio を示した。これに対し 3 型には高度にマーカーの変化したウイルスの出現が見られた。

以上の成績は、これらのワクチンウイルスが当初 rct/40 - 粒子のみの均一な population であったと仮定すれ

Table 3. Rct/40 Character of Type 1 Polioviruses Isolated from Vaccinees 2 or 4 Weeks after Feeding.

rct character	EOG ratio	Number	
		after 2 weeks	after 4 weeks
-	1.0 —	9	3
	0.9 —	2	1
	0.8 —	2	2
	0.75—	1	0
±	0.7 —	0	1
	0.6 —	0	0
	0.5 —	0	0
	0.4 —	0	1
	0.3 —	0	0
+	0.2 —	0	0
	0.1 —	0	0
	0.0 —	0	0
Total		14	8

Table 4. Rct Character of the Type 2 and Type 3 Polioviruses from Vaccinees 4 Weeks after Feeding.

Strain No.	Type	EOG ratio	rct character
70	2	1	—
85	2	0.89	—
44	2	1	—
67	2	1	—
49	2	1	—
84	3*	0.14	+
54	3	0.17	+
145	3	0.57	±
32	3	1	—

* Examination of rct character on the type 3 poliovirus was made at 40.4°C

ば、その後の腸管内増殖により rct/40 + 粒子が生じ、その結果 EOG ratio の減少を来したものと考えられる。

考 察

現在までのところポリオウイルスでは、ミクソウイルス群に見られるような複雑な宿主細胞との相互作用は考慮する必要はないようであるし、またファージで多くみられ動物ウイルスでも 2, 3 観察されている宿主依存性変異(Hoskins, 1959⁸⁾, Ishida and Homma 1961⁴⁾)も報告されていない。しかし Sabin (1962)⁸⁾ はウイルスの性状と病原性との関係を研究する場合には分離後の継代に充分注意すべきことを述べている。1 および 2 篇の始

めに示したごとく 1) 使用したウイルスの継代数および細胞の種類と rct マーカー間には 相関関係がなく、2) 野生株を実験室内で 37°C 下で継代した限りでは rct マーカーの変動が認められなかったことは、第 1 篇で得られた流行に伴う rct マーカーの変動がウイルス分離後の継代の過程において出現したものでない事を示しておりさらに 1) 多くの野生株は rct/40 + および - の粒子からなる mixed population であり、2) これら野生株を 40°C の高温下で数代継代するとそのマーカーが + に変化する事実は、この変動が発熱した患者の体内通過により生じたことを積極的に裏づけるものである。また rct マーカーの意味について同じ + の性格を有するウイルスでも EOG ratio でみると 40°C での増殖能の異なる様々のものが存在し、表 2 に示した 6 株の rct/40 + のウイルスは + と - のウイルス粒子よりなる mixed population であり、rct マーカーはこれら粒子の混在比の表われであることが証明された。しかしポリオウイルスの本マーカーの全てが rct +, - の mixed population で説明できるとはいえない。均一の population の場合でもウイルスの高温における burst size の減少等の質的变化により EOG ratio が変化する場合も考えられる。しかし前述の実験結果をも含めて、野生株の場合には mixed population に因ることの方が大きいと考えたい。長い間培養細胞で増殖継代されて来た標準株 Mahoney あるいは Sabin ウイルスが比較的均一なウイルス粒子の集団であるのに対して、野生株のウイルス粒子は不均一であり、その増殖の場となる動物体内の条件によつて、集団としてのウイルスの性格が変わる可能性が大きいものと思われる。

人の腸管を通過したワクチンウイルスの性状に関しては、その問題の重要性から多くの研究がある (弱毒生ポリオウイルスワクチン研究協議会⁵⁾, 1963, Baron et al, 1960¹⁾, Friedman et al 1962²⁾). Kelly et al (1965)⁷⁾ は腸管内で増殖したワクチンウイルスの rct マーカーと被接種者の発熱との間に特に関係がないと報告している。これは本報の野生株の成績と一見矛盾するように見えるが、野生株ウイルスは伝播力が強いのに對して Sabin ワクチンウイルスでは接触感染が起り難いことが知られており、両ウイルスの伝播力の相異に基づくことかも知れない。あるいは発熱のない被投与者から分離したウイルスにも rct マーカーの変化が見られることから、Sabin ワクチンウイルスの場合には発熱以外の因子によつて生じたウイルスの変異がたまたま rct マーカーの変化を伴うという事も考えられる。人体内増殖後のワクチンウイルスの d マーカーあるいは E マーカーがかなりの頻度に変異する事実から見て (弱毒生ポリオウ

イルスワクチン研究協議会, 1963, 笠巻, 未発表⁸⁾), その可能性を否定することはできない。さらに発熱がなくても組織培養における Sabin ウイルスの至適温度 35°C より高温のヒト腸管内 (38°C) で増殖する間に、より高温で増殖可能なウイルスが生じ、その中には 40°C においても合成能を有する変異株の出現する可能性も考えられよう。

結 論

前報で述べたポリオの流行の経過に伴い分離ウイルスの rct マーカーが急激に変化する機序を in vitro の実験で検討した。

1. 多くの野生株は rct/40 + および - の粒子からなる mixed population であり、この + と - 粒子の混在比がその株のマーカーを定めることが明らかにされた。

2. rct/40 - の野生株を MK 細胞を用いて 37°C で 5 代継代した結果ではマーカーの変動は認められなかったが、40°C で継代すると大多数の株が + に変化した。

以上の成績は、第一篇で述べた流行の経過にともなう分離ウイルスの rct マーカーの変動は、ウイルスの発熱患者の体内通過による rct/40 + ウイルスの選択に基づくことを支持するものである。

3. Sabin ワクチン投与後に分離したポリオウイルスの中、1 型と 2 型の rct マーカーはワクチンウイルスと同じ性格を示したが、3 型ウイルスには原株とマーカーの性格が著しく異なるものが見出された。

(この研究は文部省機関研究費および特定研究「ウイルス」の研究費の補助をうけた)。

Summary

Factors influencing the rct character of poliovirus were studied in-vitro to elucidate the mechanisms of change in the character of type 1 wild polioviruses isolated at the 1960 epidemic.

The results were following:

1) It was demonstrated that the wild poliovirus strains were usually consisted of viral particles different in the rct character. Additional evidence were obtained suggesting that the proportion in the number of rct/40+ and rct/40- particles included in each strains might determine the character of the strain as a whole.

2) The wild strains of rct/40- did not change the character after 5 passages in MK cell cultures at 37°C. In contrast, most of the virus strains did change the character after serial passages in cell cultures at 40°C. These results are suggesting that the change in the character of wild polioviruses obtained at the epidemic may be due to the selection of rct/40+ particles by sequential passages of the

viruses in the body of febrile patients.

3) The stability of the rct character of attenuated polioviruses (Sabin strains) after human passage differed by the virus type. The type 2 virus was much more stable than type 1, while the type 3 virus was markedly unstable.

文 献

- 1) Baron, S., Friedman, R. M., Kirschstein, R. L., Borman, J. L., Murray, R. and Hottle, G. A. (1960) : Laboratory Investigations on the Attenuated Poliovirus Vaccines. 2. Tissue culture characteristics before and after gastrointestinal passage. Second Int. Con. Live Poliovirus Vaccines, Pan American Health Organization 124-131. — 2) Friedman, R. M., Kirschstein, R. L., Borman, G. S. and Robbins, F. (1962) : Characteristics of Sabin type 1 poliovirus after gastrointestinal passage in newborn infants. 1. Monkey neurovirulence and temperature marker findings. Amer. J. Hyg. 76, 137-143. — 3) Hoskins, J. M. (1959) : Host-controlled variation in animal viruses. Virus Growth and Variation, Cambridge Univ. Press 122-. — 4) Ishida, N. and Homma, M. (1961) : Host-controlled variation observed with Sendai virus grown in mouse fibroblast (L) cells. Virology 14, 486-488. — 5) 弱毒生ポリオウイルスワクチン研究協議会 (1963) : 生ワクチン投与後に分離されたウイルスの検討, ポリオ生ワクチン研究報告, 3. — 6) 笠巻明子 : 未発表. — 7) Kelly, S., Fox, J. P. and Spigland, I. (1965) : Poliovirus in febrile vaccinees. Arch. Envir. Health. 10, 16-20. — 8) Sabin, A. B. (1962) : Reproductive capacity of polioviruses of diverse origins at various temperatures. Perspectives in Virology, 2, 90-110. — 9) 浦沢正三, 小川幹雄, 菅野价子 (1963) : 生ポリオウイルスワクチンの野外投与実験, 札幌医誌, 23, 194-201. — 10) 浦沢价子 (1967) : ポリオウイルスの rct マーカーの疫学的意義, 1. ポリオ流行と分離ウイルス株の rct マーカーの関係. ウイルス, 17, 30-38.