Poxvirus A 型封入体の遺伝的性質

市 橋 康 夫

GENETIC CHARACTER OF POX VIRUS A-TYPE INCLUSION.

Yasuo ICHIHASHI

Institute for Virus Research, University of Kyoto.

[受付: 4月13日, 1968年]

総 括

1. 痘瘡群ウイルスのワクチニア亜群に属するエクトロメリア、牛痘、ワクチニアの各株は鶏胚細胞におけるプラーク型に特色がありこれによつて同定することができる。

2. プラーク型とA型封入体型を遺伝マーカーとして混合感染を行つた結果、A型封入体の形質は封入体基質を形成する因子 (In^+ , In^-) と基質にウイルス粒子を附着させる因子 (V^+ , V^-) とに区別しうることが明らかとなつた。

3. ワクチニア IHD 株はA型封入体を形成しないが (In^+V^-) の遺伝子組成をもつ株と混合感染した時、 V^+ 型封入体を形成し (In^-V^+) の遺伝子組成をもつと考えられる。

4. In 遺伝子と V 遺伝子間の組みかえ体は子孫ウイルスの200クローンから見出されなかつたが、プラーク型とA型封入体型の間の組みかえ体は見出された。

緒 言

痘瘡群ウイルスのワクチニア亜群に属するエクトロメリアと牛痘は、感染過程の後期にそれぞれ Marchal 小体、Downie小体とよばれる細胞質内封入体を形成する。これらA型封入体は感染細胞内で新たに合成される蛋白質からなり、共通した抗原性をもっている (Ichihashi and Matsumoto 1966)。また成熟ウイルス粒子の完成後に現れるのでウイルスの増殖には直接的な役割をもたないと考えられる。一方、ワクチニア IHD 株はA型封入体を形成しない点も既に知られている。

エクトロメリア、牛痘ウイルスにはA型封入体の形態的特徴を異にする株が知られており、その差は位相差顕微鏡で容易に識別される。すなわち、既報のごとくエ

クトロメリア Hampstead 株の Marchal 小体は内部に成熟ウイルス粒子を包含しているが石橋株の Marchal 小体はウイルス粒子を全く含まない (Matsumoto 1958)。

又、牛痘 CPR 株の Downie 小体は成熟ウイルス粒子を含まないが CP58 株の小体は包含している (Kato et al. 1963)。

予備的な実験においてウイルス粒子を内包する V^+ 型封入体を形成する株と、内包しない V^- 型封入体を作る株とを混合して感染させた時、個々の細胞内に形成されるA型封入体は V^+ 型か V^- かのいずれかであつて両者が同一細胞内に共存することはなかつた。この事実に対して次の2つの可能性が考えられる。即ち、両者は近縁のウイルスであるにも拘らず強い干渉現象があるのか、あるいは V^+ 型形質が V^- 型に対して優性ではないかという可能性である。この点の解明には混合感染によつて生じた子孫ウイルスがどちらの株に属するかを定量的に明瞭に認知できねばならない。すでに一部報告したごとく、培養鶏胚細胞でのプラーク型を子孫ウイルスの同定に利用できる事がわかつたので、このプラーク型とA型封入体の形態を検査形質として以下に述べる混合感染実験を行つた。

材料と方法

ウイルス

実験に用いたウイルスのプラーク型とA型封入体の形態を図1、表1に示した。6株とも鶏胚細胞に作つたプラークにより3回クローニングし、牛痘とワクチニアの継代には静置培養 HeLa 細胞、エクトロメリアの継代には振盪培養 L 細胞を用いた。細胞は両者とも仔牛血清 10% を加えた YLE 培地で培養した。ウイルスは Fluorocarbon 処理により精製し仔牛血清 3% を含む 磷酸緩衝生理食塩水 (PBS) に浮遊し -20° で保存した。使用する前に音波処理 (29 KC, 40 W, 30 sec) により分散し

低速遠心の上清を用いた。

ウイルス力価はブランク法により測定した。9日鶏胚より調製した 3.0×10^6 /ml の細胞を 6 cm ペトリ皿に 5 ml まいて培養2日目にウイルスを感染させる。寒天培地で重層し感染後4日目に neutral red を重層、翌日ブランク型の判定と算定を行った。

A 型封入体の分離

Marchal 小体と Downie 小体はそれぞれ L 細胞と HeLa 細胞から前報にのべた方法により分離した (Ichihashi and Matsumoto 1966)。

混合感染実験 1

牛痘 CP58 株と CPRC1 株を等量混合し合計 20PFU/cell の重複度で HeLa 細胞に加え 37° 40 分間吸着させる。細胞を仔牛血清 3% を含む PBS で 3 回洗滌したのち抗血清 2% を含む YLE 培地を加えて 37° 30 分間処理する。トリプシンにより細胞を分散させ、再び抗血清を含む培地で 2 回洗滌し細胞の単離状態をたしかめ 100 cells/0.1 ml づつ鶏胚細胞シートにまく。この時の細胞浮遊液も抗血清 2% を含み、以上の過程により感染性未吸着ウイルスは完全に中和されている。鶏胚細胞上にまいて 10 分後に寒天培地を重層し4日後に neutral red を含む寒天培地を2次重層する。形成されたブランクをクローニングし HeLa 細胞で増殖させたのちブランク型と A 型封入体の形態によつて、元のブランクの感染中心となつた細胞が重感染をうけていたか否かを判定する。

同時に鶏胚細胞の上にまいた細胞の一部をそのまま抗血清を含む培地で培養し、24 時間後に各細胞の A 型封入体型を調べる。

エクトロメリアの Hampstead 株と石橋株の組み合わせで、振盪培養 L 細胞を用い同様な実験を行った。

混合感染実験 2

牛痘 CPRC1 株と CP58 株の混合比を変えて、両株の合計した重複度が 10 となるよう HeLa 細胞に混合感染した時の Downie 小体の形態を調べた。感染後 24 時間目に各細胞内で形成されている Downie 小体が V+ 型か V- 型かを判定し、同時に細胞を収穫して産生されているウイルスの株をブランク形により区分した。

ワクチニア IHD 株と CPRC1 株の組み合わせで同様な実験を行った。

組みかえの検出

CPRC1 株と CP58 株および CPRO6 株とワクチニア IHD 株の混合感染における子孫ウイルスから、A 型封入体型とブランク型をマーカーとして組みかえ体を検出した。HeLa 細胞に両株のウイルスを 10PFU/cell づつ 30 分間吸着させ PBS で洗ったのち 48 時間培養した。産生されたウイルスのブランクをクローニングし HeLa 細

胞で増殖させたのちブランク型と A 型封入体型を判定した。

結 果

ブランクと A 型封入体の形態

実験に使用した 6 種類のウイルス株は鶏胚細胞上のブランク形態と A 型封入体の性質により互に明瞭に区別できる (表 1, 図 1)。

表 1

	A 型封入体型	ブランク型
Vaccinia IHD	形成せず	大型, 周辺 turbid 直径 4.0 mm
エクトロメリア Hampstead	V+	極小, 透明, 0.8 mm
石 橋	V-	極小, 透明, 1.6 mm
牛 痘 CP58	V+	中型, turbid, 2.5 mm
CPRC1	V-	大型, 透明, 4.0 mm
CPRO6	V-	大型, turbid, 4.2 mm

ワクチニアウイルス IHD 株のブランクは中央部が neutral red をとらないため白く、周辺へ向つて neutral red 顆粒を含む細胞がより多く残るため滲んだように turbid になる。時に周辺にそつてより赤染する細胞帯が形成されたブランクが見られるがこれは鶏胚細胞の状態による変化であつてクローニングしてもこのブランク型は分離できない。A 型封入体は形成されない。

エクトロメリア Hampstead 株、石橋株は共に小さな clear ブランクを形成する。Hampstead 株の Marchal 小体は V+ 型であるが、石橋株の Marchal 小体は V- 型である (Ichihashi and Matsumoto 1966)。

牛痘ウイルス CP58 株、CPR 株は大阪大学微生物病研究所、加藤博士から分与をうけた。CP58 株は中型の turbid ブランクを作りブランク中央部に周囲より赤染する点が形成される。Downie 小体は V+ 型である。CPR 株はブランク形態の差によつて次の 2 株に分離した。CPRC1 株は直径 4 mm の clear ブランクを生ずる。CPR-O6 株は元の CPR 株の 90% を占めていたが直径 4.2 mm の turbid ブランクを形成する。このブランク内は均一な turbid であるが、長期間培養を続行すると中央

a

d

b

e

c

f

図 2 エクトロメリア Hampstead 株に感染 24 時間後の HeLa 細胞

M: V⁺型 Marchal 小体, mv: 成熟型ウイルス粒子

iv: 未成熟ウイルス粒子 ×44000

図 1 鶏胚細胞における感染 5 日後のブランク

a: CPRC1 株, b: CP58 株, c: CPRC1 株と CP58 株

d: ワクチニア IHD 株, e: CPRO6 株, f: ワクチニア IHD 株と CPRO6 株

図 3 牛痘 CP58 株に感染 24 時間後の HeLa 細胞
D: V⁺型 Downie 小体 ×17500

図 4 牛痘 CPRC1 株に感染 24 時間後の HeLa 細胞
D: V-型 Downie 小体 ×13200

部が neutral red を放出して白くなり ワクチニア IHD 株のプラーク形態に近い形態を示す。C1 株 O6 株ともに Downie 小体は V⁻ 型である。

CP58 株, CPR O6 株のプラーク域内の細胞は neutral red 顆粒をもった細胞が多く残っておりこれによつてプラークは turbid の性質を示すが neutral red 顆粒をもった細胞にも Downie 小体が形成されている。これに対し CPR-C1 株では鶏胚細胞に対する強い細胞毒性のため感染した細胞は neutral red を急速にとらなくなるため鋭い周辺をもったプラークとなる。

CP58 株に感染した HeLa 細胞の Downie 小体は V⁺ 型であつて, 多数の成熟ウイルス粒子の附着, 包含がみとめられ (図3), この性質はエクトロメリア Hampstead 株の Marchal 小体と全く一致している (図2) (Matsumoto 1958)。これに対し CPRC1 株は細胞質内に多数の成熟ウイルスが認められるにも拘わらず, Downie 小体にウイルス粒子は全く附着していない (図4)。

混合感染細胞に現れる A 型封入体の形態

プラークと A 型封入体の形態をマーカーとして CP-RC1 対 CP58, CPRC1 対 ワクチニア IHD, Hampstead 対石橋, CPRO6 対 ワクチニア IHD の4つの組み合わせで混合感染実験を行つた。どの組み合わせにおいても V⁺ 型と V⁻ 型の A 型封入体が同一細胞内に混在することはなかつた。

Hampstead 株と石橋株とを重複度が各々 10 となるよう, L 細胞に感染させた時 Marchal 小体はウイルス粒子の附着数に多少の差はあるがすべて V⁺ 型であり CPRC1 株と CP58 株の混合感染では V⁺ 型 Downie 小体が 86.4 型, V⁻ 型が 13.6 % の細胞に見られた (表3)

表2 混合感染した細胞を感染中心とした
プラークに形成されるウイルス

1. エクトロメリア (Hampstead+石橋)

総プラーク数	Hampstead	石 橋	混 合
44	2.3%	11.4%	86.4%

2. 牛痘 (CPRC1+CP58)

総プラーク数	CP58	CPRC1	混 合
72	4.2%	26.4%	69.4%

すなわち, これらの混合感染では V⁺ 型封入体出現率が著しく高い。

上の実験と同一の材料において個々の細胞で増殖しているウイルスがどちらの株かを調べるため前節に述べた方法で混合感染した細胞を感染中心としてプラークを作りクローニングしてみると Hampstead 対石橋では 86

表3 混合感染時の A 型封入体

	V ⁻ 型	V ⁺ 型
エクトロメリア		
Hampstead	0%	100%
石 橋	100	0
混合感染	0	100
牛 痘		
CP58	0	100
CPRC1	100	0
混合感染	13.6	86.4

表4 混合感染時の HeLa 細胞における各株の増殖

① Vac IHD-CPRO6	総 力 価	Vac IHD	CPRO6
Inoculum	6.8×10 ⁷ PFU/ml	52.9%	47.1%
Progeny	2.3×10 ⁷	49.8	50.2
② Vac IHD-CPRC1	総 力 価	Vac IHD	CPRC1
Inoculum	4.0×10 ⁷	87.5	12.5
Progeny	6.6×10 ⁷	77.3	22.7
③ Vac IHD-CP58	総 力 価	Vac IHD	CP58
Inoculum	1.4×10 ⁸	83.3	17.7
Progeny	5.8×10 ⁶	77.6	22.4
④ CPRC1-CP58	総 力 価	CPRC1	CP58
Inoculum	1.1×10 ⁷	62.8	37.2
Progeny	9.7×10 ⁶	62.9	37.1
⑤ CPRO6--CPRC1	総 力 価	CPRC1	CPRO6
Inoculum	2.6×10 ⁷	57.7	42.3
Progeny	6.8×10 ⁷	58.8	41.2

%, CPRC1 対 CP58 の場合は 69 % が双方の親ウイルスを産生し重感染をうけていたことを示した (表2)。

重感染をうけた細胞でのウイルス産生量を知るため接種材料および産生ウイルスにおける両株のウイルス力価をプラーク型によつて区分して測定した (表4)。その結果は両株の間に考えられたような干渉現象が起つていない事を示した。この事実をさらに厳密に検討するため CPRC1, CP58 両株の等しい力価をもつ溶液を両者の比率を段階的に変えて混合し合計した重複度が 10 になるよう HeLa 細胞に感染させ, 24 時間後に収穫して各株の力価, Downie 小体が V⁺ 型である細胞の % を調べた (図5)。CP58 株の子孫ウイルス産生量中の比率は接種したウイルス中の比率より低下しており混合感染時に CPRC1 株より増殖率がやや劣ることを示した。し

混合ウイルス中のCP58株

図5 混合比を変えて重感染した時のV⁺型Downie小体出現率

CP58株とCPRC1株を合計した重複度10でHeLa細胞に感染させる。24時間後にV⁺型Downie小体を形成している細胞の%と、産生されたウイルス中にCP58株の占める%を縦軸に表わした。

●: 子孫ウイルス中のCP58株の%

Δ: V⁺型Downie小体を形成している細胞の%。

かしV⁺型Downie小体は混合比5:5まで95%以上の細胞に見られCPRC1株9:CP58株1の混合比で感染させた時にも50%の細胞に認められた。

したがってCPRC1対CP58の混合感染においてCPRC1株の増殖率がCP58株より高いことに起因する弱い干渉があるが重感染は生じている。Downie小体はCP58株の産生量が低くてもV⁺型になっている。すなわち重感染細胞内でA型封入体がV⁺型となる現象はV⁺型の形質がV⁻型の形質に対し優性であることによつてい

A型封入体は感染細胞内で互いに融合する(Kato et al 1962, Habernehl und Diefenthal 1962)。したがって重感染した細胞のA型封入体がV⁺になる現象はV⁺型とV⁻型の封入体の融合によつて生ずる可能性がある。もし融合によつてV⁺型を示すのであれば重感染細胞のA型封入体に附着しているウイルス粒子は元来V⁺型封入体を形成する株のみのはずである。この点を明らかにするためCP58株とCPRC1株をそれぞれ単独あるいは混合感染した細胞からA型封入体を分離し音波処理により封入体から遊離するウイルスのプラーク型を調べた。その結果は表5に示すようにCPRC1株単独感染の場合は10⁸PFU/ml、CP58株単独感染した時のDownie

表5 A型封入体中のウイルス

1. 牛痘	Cell homogenate		A型封入体	
	CPRC1	CP58	CPRC1	CP58
CPRC1	PFU/ml 6.5×10 ⁷	—	1.0×10 ⁸	—
CP58	—	1.5×10 ⁷	—	1.3×10 ⁷
混合感染	1.5×10 ⁷	1.0×10 ⁷	5.6×10 ⁶	4.0×10 ⁶
2. Vaccinia 牛痘	Cell homogenate		A型封入体	
	Vac IHD	CPRO6	Vac IHD	CPRO6
Vac IHD	2.9×10 ⁸	—	—	—
CPRO6	—	3.4×10 ⁷	—	1.0×10 ⁸
混合感染	3.2×10 ⁷	3.2×10 ⁷	1.5×10 ⁷	1.7×10 ⁷

小体からは10⁷PFU/ml、両者の混合感染した時は10⁷PFU/mlでその中の両株の比はほぼ1:1であつた。したがって混合感染した細胞のDownie小体においてV⁺型がV⁻型に対し優性である現象は単なる融合によるものではなく重感染細胞で産生される双方の株のウイルス粒子がA型封入体に附着している事を示す。

A型封入体へ附着包含されるのは成熟型ウイルス粒子のみに限られる点で非常に特異性の高い現象であるが、上記の結果から附着現象を支配するのはウイルス粒子そのものの性質によるものではなく何か別の因子(V⁺因子)が作用している可能性を強く示唆する。この解釈はワクチニアIHD対CPRO6の重感染細胞を検討することによりさらに支持される。

すなわち、ワクチニアIHD株はA型封入体を形成せずMarchal小体に対する抗体による蛍光抗体反応、オクタロニイ反応が陰性であるからその基質成分も合成していない(Ichihashi and Matsumoto 1966)。一方CPRO6株のDownie小体はV⁻型である。この両者を混合し重感染をおこせると形成されるA型封入体はすべてV⁺型であつた。これらの重感染細胞からA型封入体を分離し附着しているウイルスを遊離せしめてそのプラーク型を見ると双方の株とも10⁷PFU/ml以上が検出され、CPRO6株単独感染細胞からのDownie小体に検出される10⁸PFU/mlに比して10⁴倍に達するCPRO6株ウイルスを証明した(表5)。さらにCPRC1対CP58株で行つたと同様の混合比を変えた重感染実験をワクチニアIHD対CPRC1について行くと牛痘2株におけると同様な結果が得られ(図6)ワクチニアIHD株がCP58株と共通するV⁺因子をもつことを示した。エクトロメリア石橋株とワクチニアIHD株との間でも同じ現象が見られるからエクトロメリア・牛痘・ワクチニアに認めら

図 6 混合比を変えて重感染した時の V⁺ 型 Downie 小体出現率

ワクチニア IHD 株と CPRC1 株を合計した重複度 10 で HeLa 細胞に感染させる。24 時間後に V⁺ 型 Downie 小体を形成している細胞の % と、産生されたウイルス中にワクチニア IHD 株の占める % を縦軸に表わした。

● : 子孫ウイルス中のワクチニア IHD 株の %

△ : V⁺ 型 Downie 小体を形成している細胞の %。

れる V⁺ 因子に何れも共通な作用をもっている。すなわちワクチニア IHD 株の場合は A 型封入体基質の形質は欠除しているが、A 形封入体にウイルス粒子を附着させる因子は保有する。

以上の事実から成熟ウイルス粒子を A 型封入体に附着させる V⁺ 因子は痘瘡群ワクチニア亜群の遺伝的に安定した形質であつて A 型封入体基質を形成する形質 In⁺ とは別の独立した形質と考えることができる。

A 型封入体型とブラーク型をマーカーとした組みかえ体の検出

牛痘、ワクチニアの各株は先にのべたごとくブラーク型と A 型封入体型によつて同定できる。ブラーク型と A 型封入体に関する 2 つの形質、封入体基質形成を支配する In⁺ と封入体へウイルス粒子を附着させる形質 V⁺ 等の間に組みかえ体が生ずるか否かを検討した。

CP58 対 CPRC1 の混合感染によつて得た子孫ウイルスのブラークを 100 個分離し、各々のクローンのブラーク型と Downie 小体の型により分類した (表 6)。CP58 株型の turbid ブラークを作り V⁻ 型の Downie 小体を形成する組みかえ体と考えられるクローンが 6 個得られた。しかしこの組みかえ体に対応すると考えられる V⁺

表 6 牛痘混合感染子孫ウイルス中の組みかえ体

A 型封入体型	ブラーク型		
	CPRC1	CP58	
CPRC1 V ⁻ 型	45	6	0
CP58 V ⁺ 型	0	39	0
V ⁺ V ⁻ 混在	0	0	7†
形成せず*	0	0	3*

* この 3 クローンはすべて小型透明ブラークを形成 V⁺ 因子はもたない。

† 7 クローンのうち 4 クローンは CPRC1 型ブラーク 3 クローンは CP58 型ブラークからクローニングした。

表 7 ワクチニア IHD と CPRO6 の混合感染子孫ウイルス中の組みかえ体

A 型封入体型	ブラーク型		
	CPRO6	Vac IHD	中間型
CPRO6 V ⁻ 型	33	7	0
ワクチニア IHD (形成せず)	7*	32	0
V ⁺ V ⁻ 型混合	0	0	32

* この株 7 はすべて V⁺ 因子をもっている。

型 Downie 小体・CPRC1 株型ブラークをもつクローンは得られなかった。ブラーク型で親ウイルスの双方と異つた clear ブラークのクローンが 3 個得られ Downie 小体は形成せず V⁺ 因子をもっていなかった。さらに 7 個のブラークは双方の親ウイルスを産生し、これは同一ブラーク内に双方の株が感染したかあるいは異型接合体と考えられる。

ワクチニア IHD 株と牛痘 CPRO6 株との混合感染で得た子孫ウイルスのブラーク 111 個のうち組みかえ体としての形質を示したクローンが 14 個得られた (表 7)。そのうち 7 個はワクチニア型ブラークで V⁻ 型封入体を形成し 7 個は CPRO6 型ブラークで封入体を形成しないが V⁺ 因子はもっている。32 個は CPRO6 株のブラークより大きく turbid ではあるが、neutral red の色が薄く形態的に区別できるブラークを形成した。このブラーク型のクローンからはワクチニア IHD 株と CPRO6 株の双方を生じ、親の双方が凝集して感染していたか、あるいは異型接合体により形成されたブラークと考えられる。

CPRC1 対 CP58、ワクチニア IHD 対 CPRO6 の子孫ウイルスにおける組みかえ体にブラーク型と封入体型の組みかえ体は得られたが、封入体因子 In⁺ と V⁺ 因子間の組みかえ体は得られていない。In⁺ と V⁺ とは強く連関していると考えられる。

考 察

痘瘡群ウイルスの遺伝学的研究はすでに多くの形質についてなされている (Fenner and Sambrook 1964, McClain and Greenland 1965, Dubbs and Kit 1964). この報告においてわれわれはワクチニア亜群のA型封入体について検討した.

エクトメリアウイルス感染細胞に感染過程の後期に現われる Marchal 小体は特異的な抗原性を有する蛋白質であつて Marchal 小体内に成熟ウイルス粒子を含む株と含まぬ株で抗原性に共通部分があり遺伝的にも安定している (Ichihashi and Matsumoto 1966). 牛痘ウイルスの Downie 小体も同様な性質を示すが、これらA型封入体の形質を混合感染により解析し次の3つの結果を得た. 1) V^+ 型および V^- 型A型封入体を作るウイルス株の重感染細胞には V^+ 型封入体が形成され、その封入体には V^- 型封入体を作る株のウイルスも包含されている. 2) ワクチニア IHD 株はA型封入体を形成せずこれに関係した遺伝子は欠除あるいは機能を発揮できない状態にあるが、ワクチニア IHD 株と V^- 型封入体を作るエクトメリア、牛痘の各株との重感染細胞では V^+ 型封入体が形成され、双方の株のウイルス粒子が共にその封入体に附着包含されている. 3) プラーク型とA型封入体型との間で組みかえ体が見出された. これらの結果からA型封入体の形質はウイルスの遺伝形質であつてA型封入体基質を合成する形質 In^+ とこれに成熟ウイルス粒子を附着する形質 V^+ の2部分に区別しようといえよう.

ワクチニア IHD 株と V^- 型のA型封入体を作る株の重感染細胞に V^+ 型封入体が形成される現象は、したがつて相補的な Marker rescue 現象である. このメカニズムとして遺伝子の間の相互作用の段階に応じて次の3つが考えられよう. 1) Rescue をされるマーカーの遺伝子間で組みかえ体が生じ In^+V^+ 遺伝子組成となつたウイルスが V^+ 型封入体を形成する. 2) 表現されない形質の遺伝子をもっているが、単独感染ではその形質を発現できない条件があつて、重感染の結果双方の遺伝子が機能を回復する. 3) 封入体基質、 V^+ 因子の各々がその遺伝子をもつウイルスの感染細胞により作られ、細胞質内でこの両因子とウイルス粒子が反応して V^+ 型封入体を形成する. V^+ , In^+ の両遺伝子間の組みかえ体が見出されていないにも拘らず重感染細胞はすべて V^+ 型封入体を形成するから、1)の可能性は低い. また、フーアージの Amber mutants に知られている宿主細胞による Rescue (Brenner et al. 1965) は、A型封入体に関して

認められず、重感染によつて Rescue されるのであるから宿主 t-RNA はこの場合機能回復の因子ではない. したがつて2)の可能性が正しいならば、重感染したウイルス自身の感染過程で産生する因子が Rescue に関与することになろう. (In^+V^-)の遺伝子組成をもつ株で V^- 型封入体が形成されることは In^+ 遺伝子が単独で形質を発現していることを示すがワクチニア IHD 株のごとく (In^-V^+)の遺伝子の組成をもつウイルスの V^+ 遺伝子が単独で V^+ 因子を形成しているか否かは明らかではない. 2)と3)のいずれが正しいかは、なお検討しなければならない.

使用した各株でプラーク型がそれぞれ特有の形態を示すのでウイルス株の同定に用いたが、このようなプラーク型の多様性はウイルス株と宿主細胞の多くの形質を反映していると考えられる. その因子の一つとしてA型封入体型の変化がプラーク型の変化を生ずるか否かが問題となる. CPRC1 対 CP58 の混合感染でA型封入体の形成能を欠き、プラーク型の特異なクローンが見出された. しかし、同様な極小の Clear プラークを示しながら、A型封入体を形成するクローンがあり、封入体形質の欠失がプラーク型を変えたものではなく別の要因によると思われる. 2組の混合感染のほとんどの子孫ウイルスは親ウイルスのプラーク型を示し、A型封入体に関する形質の組みかえ体のプラーク型も親ウイルスと完全に一致した. したがつて、プラーク型の形質は多因子性であるが封入体形質とは別の遺伝子群に支配されていると考えられる.

感染させるウイルスの重複度が低い時に CP58 株と CPRC1 株の増殖率は混合感染においてもほぼ等しい. しかし、図4に見られるように重複度が10以上の場合には CPRC1 株の増殖率が CP58 株に比べて高くなる現象が見られる. これは、各株の増殖曲線で CPRC1 株が CP58 株より急速に増加するから、重感染細胞内での増殖速度の差に基づく干渉と考えられる. ワクチニア IHD 株と CPRC1 株の混合感染では両者の重複度をかえても増殖率がほぼ一致し、この両株の HeLa 細胞における増殖に干渉現象は認められない. 混合感染がこのように異つた条件にあるから、組みかえについてこの報告にのべた2組の結果の比較は困難であるが、共通点としてプラーク型の遺伝子とA型封入体型の遺伝子群間の距離はA型封入体に関する In 遺伝子と V 遺伝子間の距離より大きいと考えられる.

ワクチニア IHD 対 CPRO6 の混合感染で多数の異型接合体様のクローンが生じた. Neurovaccinia IHD-T 株と Dermovaccinia Dairen 1株のL細胞における増

殖性と Hemoadsorption をマーカーとした時に異型接合体が10%生じた (Oda et al. 1965) ことと類似している。CP58 対 CPRC1 株の時は異型接合体様のクローンは7%であった。これらのクローンは親ウイルスの双方を完全に形成しうるから1感染単位内に双方のゲノムをもつと考えられる。ワクチニアウイルスの1プラーク形成単位が通常数個のウイルス粒子と対応すること (Gallasso and Sharp 1964) から見て、これらのクローンは2株のウイルス粒子の凝集体の感染によって生じた可能性も無視できないであろう。

謝 辞

この論文に使用した電子顕微鏡写真は、松本清一教授の御厚意によるものであります。研究に当って懇切に指導していただいた教授に深く感謝いたします。

Summary

Mixed infection experiments of vaccinia subgroup viruses were done using plaque types and characters of A type inclusion as genetic markers. It revealed that A type inclusion marker could be divided into two parts; formation of inclusion matrix (In^+ and In^-) and virus attaching factor (V^+ and V^-). Recombinant between V and In markers was not found in over 200 progeny clones of mixed infection, but recombinants between plaque types and A type inclusion types were detected. Vaccinia IHD, which does not form A type inclusion by single infection, can rescue all V^- type inclusion in mixedly infected cells and it results in formation of V^+ type inclusion.

文 献

- 1) Brenner, S., Stretton, A. O. W., Caplan, and Kaplan, S. (1965) : Genetic code: The "nonsense" triplets for chain termination and

- their suppression. *Nature*, **206**, 994-998.
- 2) D. R., and Kit, S. (1964) : Isolation and properties of vaccinia mutants deficient in thymidine kinase-inducing activity. *Virology*, **22**, 214-225.
- 3) Fenner, F., and Sambrook, J. F. (1964) : The genetics of animal viruses. *Ann. Rev. Microbiol.*, **18**, 47-94.
- 4) Galasso, G. J. and Sharp, D. G. (1964) : Relative plaque forming, cell-infecting and interfering qualities of vaccinia virus. *J. Bacteriol.*, **88**, 433-439.
- 5) Habenehl, K. O. und Diefentahl, W. (1962) : Kinematographische Untersuchungen an Fibroblasten nach Infektion mit Ektromelievirus (Mäusepocken). *Archiv für Gesamte Virusforschung*, **9**, 629-643.
- 6) Ichihashi, Y., and Matsumoto, S. (1966) : Studies on the nature of Marchal bodies (A-type inclusion) during ectromelia virus infection. *Virology*, **29**, 264-275.
- 7) Kato, S., Hara, J., Ogawa, H., and Kamahora, J. (1963) : Inclusion markers of cowpox and alastrim virus. *Biken's J.*, **6**, 233-235.
- 8) Kato, S., Aoyama, Y., and Kamahora, J. (1962) : Phase contrast microscopy and phase contrast cinematography of viral inclusion produced by pox virus. *Biken's J.*, **5**, 253-258.
- 9) McClain, M. E. and Greenland, R. M. (1965) : Recombination between rabbitpox virus mutants in permissive and nonpermissive cells. *Virology*, **25**, 516-522.
- 10) Matsumoto, S. (1958) : Electron microscope studies of ectromelia virus multiplication. *Ann. Rept. Inst. Virus Res., Kyoto Univ.*, **1**, 151-184.
- 11) Oda, A., Mitamura, K., and Hishigaya, T. (1965) : Rescue phenomenon of pox virus during mixed infection. *Virus*, **15**, 290.