痘瘡群ウイルスの遺伝学的解析

市 橋 康 夫 ・ 松 本 清 一

GENETIC STUDY OF POXGROUP VIRUSES.

Yasuo ICHIHASHI and Seichi MATSUMOTO

Institute for Virus Research, Kyoto University

〔受付：7月30日，1969年〕

総 括

前報においてA型封入体の形成は痘瘡群ウイルスの遺伝的形質であつて，ワクチニア亜群では重感染実験により基質形成因子 (In) と成熟ウイルス粒子を基質へ附着させる因子 (V) の二つの形質よりなることが推測された。本実験ではこの推測を証明するためA型封入体の二形質 (In, V) とプラーク型及びL細胞における増殖性をマーカーとして，これらの形質間の関係を遺伝学的に検討した。

In, V両形質間の組みかえ体 (In⁺ V⁺) がワクチニア IHD 株 (In⁻ V⁺) と牛痘 CPR Cl 株 (In⁺ V⁻) の混合感染による子孫ウイルス中に 1.8% 見出された。したがつて両形質は別個のウイルス自身の遺伝子により支配されている。

検討した4種類のマーカー間には組みかえが生じ，従つてどのマーカーも独立したウイルス自身の遺伝形質である。

プラーク形質は各々の株に明瞭な特徴があるが，組みかえ体は大きさ及び形態の特徴の変化する場合があります，そのような組みかえ体同志の混合感染で元の親ウイルスのプラーク型を組みかえ体として見出しうる。したがつてプラーク形質は多因子性の形質である。

牛痘 CPR-Cl 株がL細胞において増殖率の低い原因はウイルス DNA 合成期前の段階にあると考えられる。

序 文

痘瘡群ウイルスの遺伝学的研究にはすでに多くの報告がある。Rabbit pox ウイルスの pock 型に関する変異体の解析によつてこの形質を支配する遺伝子が直線的に配列し変異体同志の組みかえ体の中に野生株型の形質が現われること (Gemmell and Fenner 1959), Pk-2 細

胞で増殖できない欠損ウイルスがワクチニアウイルスの重感染によつて子孫ウイルス中に多数の野生株型ウイルスを生ずること (McClain and Greenland 1965), 不活化ウイルスを救助する能力は近縁ウイルスほど高い (Fenner and Woodroffe 1960) 等の実事が知られている。ワクチニア亜群内での遺伝学的相互作用は高率に生じ，ゲノムの相同性が高いことを予想せしめる。

我々はワクチニア亜群のウイルスがプラーク型に明瞭な特徴をもちそのA型封入体形質は基質形成因子 (In) と成熟ウイルス粒子を附着させる因子 (V) の2形質に区別しうることを明らかにした (市橋, 松本 1968)。これらの形質が遺伝学的に独立した形質であることを確認するため，組みかえ体の検出を試みた。更に，牛痘 CPR-Cl 株はL細胞における増殖率が低いことを見出し，その性質について検討した。

材料と方法

ウイルス：ワクチニア IHD 株，牛痘 CPR-Cl 株及び CP-58株を用いた。各株の性質については前報にのべている。力価の測定は鶏胚細胞によるプラーク法を使用した。

細胞：HeLa 細胞とL細胞を用いた。増殖培地は10% 仔牛血清を含む YLE 培地，ウイルス感染後は仔牛血清 3% を含む YLE 培地を使用した。

混合感染：組みかえ体を分離するためのウイルスストックには，あらかじめ等量混合した2株のウイルスを HeLa 細胞に重複度各々10で40分間吸着し PBS で3回洗滌，3% 仔牛血清を含む YLE 培地で24時間培養した細胞から得た子孫ウイルスを用いた。収穫した細胞を音波処理 (29kc, 40W, 30秒) し，低速遠心にかけて細胞崩壊物を除いたのち上清を Joklik (1962) の方法で精製した。プラーク法で判定して両株の増殖がほぼ等しい材料をストックとした。混合感染する双方の株の増殖率に

差がある時は感染させるウイルス液中の混合比を調節し産生量が等しいこと、100%の細胞にV⁺型A型封入体が形成されること、精製前の粗ウイルス材料で定量して20PFU/cell以上の産生量を示した試料を選んだ。

クローニングと分類：鶏胚細胞にウイルスを接種し寒天培地で4日間培養したのち、中性赤を含む寒天培地でプラークを現像する。20プラーク/ペトリ皿以下の試料を選んでプラーク域の寒天をステンレスリングで切り除いたのち白金耳で細胞をかき取ってHeLa細胞浮遊液(20万cell/ml, 1.5ml)を入れた試験管にうつす。そのHeLa細胞を48時間培養し細胞変性が生じた試験管をその細胞変性がR型(Cell-Rounding type)かG型(Giant Cell-formation type)かを判定したのち凍結保存する。

分離したクローンを3回凍結融解し 10^{-8} に希釈して再び鶏胚細胞上でプラークを形成させて、力価とプラーク型を測定する。この時プラーク型が混合していたクローンは除外した。Lマーカー(L細胞の感受性)を判定する時は測定した力価に基き0.5PFU/cellのウイルスをHeLa細胞及びL細胞に感染させ48時間後の力価を測定して両者の比が 10^3 以上のクローンをL⁻と判定した。

A型封入体型はHeLa細胞に各クローンを感染させてから48時間後に位相差顕微鏡によって判定した。この時封入体形成が認められない場合にはそのクローンを0.2mlと 10^6 PFUのCPR-CI株ウイルスを混合して再びHeLa細胞に感染させる。V⁺型のA型封入体が形成されれば(In⁺V⁺)と判定した。

CPR-CI株とワクチンIHD株の変化混合感染

牛痘CPR-CI株とワクチニアIHD株の力価を等しくして0~100%まで10%きざみに11段階のウイルス混合液を作る。混合した2種ウイルスの合計した力価はどの段階でも等しい混合ウイルスを重複度10でL細胞に吸着させたのち(37°60分間)PBSで3回洗滌した。3%仔牛血清を含むYLE培地で48時間培養し、2オンス瓶各2本の細胞を集めてプラーク法により力価を調べた。CI株とIHD株はプラーク型により区別するが、組みかえ体が予想されるから検定のためCI株型プラークをクローニングして分類した。同時にカバーグラスに培養した試料により各混合比のウイルスによってL細胞に形成されたA型封入体型を判別して各々の型の出現頻度を調べた。

紫外線不活化ウイルスとの混合感染：2.1× 10^8 PFU/mlのワクチニアIHD株ウイルスをペトリ皿に1mmの深さまで入れ、15W殺菌灯で23cmの距離から照射する。5、10、20、30、40、60秒の各時点で2mlずつ分取して 10^7 PFU/mlのCPR-CI株ウイルスとそれぞれ等量混合した。混合したウイルスをHeLa細胞とL

細胞に不活化前の感染価で合計した重複度が10となるよう接種し48時間培養したのち収穫する。各試料中のウイルスをプラーク型によって判定し同時にA型封入体型の判別、出現率の計測を行った。

オートラジオグラフ：カバーグラス上に培養したHeLa細胞、L細胞にCPR-CI株、ワクチニアIHD株及び両者の混合をそれぞれ接種したのち3時間目から6時間目迄 ^3H -チミジン $10\mu\text{Ci/ml}$ を含むYLE培地にうつして培養した。メチルアルコールで固定後5%TCAに20分浸してとりこまれなかつた ^3H -チミジンを除き、アルコールで洗滌後そのカバーグラスを細胞を上面にしてスライドグラスに貼りつける。接着剤が乾燥したのちサクラNR-2を2倍希釈したエマルジョンを塗付、乾燥後1週間露出した。X線用現像後直ちにギムザ染色した。

成 績

マーカーの種類と性質

1. プラーク型

CPR-CI株、CP-58株、IHD株はいずれも鶏胚細胞上でのプラーク形態を異にしている。その細部についてはすでに報告した(市橋、松本、1966, 1968)。どの2種類の株が混合された場合にもプラーク型によって各々を明瞭に同定できる。これらのプラーク型は遺伝的に安定であり継代を20代重ねたのちも保たれている。

CPR-CI株のHeLa細胞における細胞変性の形態は巨細胞形成を特徴としワクチニアIHD株は細胞の円形化を強く生ずる。両者の細胞変性形態とプラーク型とはよく対応していて組みかえ体においてもCI株型の

Fig. 1 a: ワクチニアIHD株に感染後48時間目Helaの細胞細胞は円化し、巨細胞の大きさはCPR-CI株による変性より小さい。
b: 牛痘CPR-CI株に感染後48時間目のHela細胞。巨細胞形成が著しい。

Clear プラークを示したクローンはすべて巨細胞の形成を強く生じた (Fig. 1)。CP-58株の HeLa 細胞に対する細胞変性も細胞の円形化傾向が強く turbid プラークを形成する。プラーク域が turbid であることと細胞変性における細胞の円形化とは関連した形質と思われる。この様にプラークの形態はウイルス感染細胞の一定の病変と対応しているが、同様に各株におけるプラーク形態の多様性がそれぞれ安定して発現されることは宿主細胞の関連下にウイルスの多くの性質が反映されていると考えられるから、ウイルス株のプラーク形態は Visual マーカーとして使用できる。表現型を支配する遺伝子が多因子性であることを考慮してプラーク型は各株の名前をマーカー名とした。

2. A型封入体

CP-58株と CPR-CI 株は共に A型封入体を形成するが各々の株の A型封入体は形態学的に明らかな違いを示す (Kato, et al. 1963)。この点に関し前報で詳細に報告したがその概略は次の様である。A型封入体形態の違いは CP-58株が A型封入体基質形成因子 (In) とこれに成熟ウイルス粒子を附着包含させる因子 (V) の双方を有するのに対し、CPR-CI 株は V 因子を欠く点である。ワクチニア IHD 株は A 型封入体を形成しないけれども、CPR-CI 株との重感染細胞では成熟ウイルス粒子を包含する A型封入体が形成される。両株間に A型封入体形質に関して相補現象が生ずるのであるからワクチニア IHD 株は V 因子のみを有すると予想される。

3. L細胞における増殖性

CPR-CI 株は L細胞上にプラークを形成できない。同じウイルス試料を HeLa 細胞上でのプラーク形成により測定すると力価は 10^8 以上であり、ワクチニア IHD 株はどちらの細胞を用いた場合にもほぼ等しい力価を示した。ワクチニア IHD 株と CPR-CI 株を等量に混合して HeLa 細胞と L細胞でのプラーク数を比較すると L細胞でのプラーク数は HeLa 細胞に形成された数の $\frac{1}{2}$ であり、この時 L細胞上のプラークからウイルスを分離してみるとどのクローンもワクチニア IHD 株であった (Table 1) この結果は CPR-CI 株が L細胞上で

増殖しないことを示すと考えられるのでこのマーカーの性質を検討した。

CPR-CI 株は HeLa 細胞を宿主とした場合ワクチニア IHD 株よりわずかに高い増殖率を示すが (市橋, 松本 1968) L細胞においては増殖が非常に遅く且、最終力価も低い。重複度 3 での増殖曲線では宿主を L細胞と HeLa 細胞にした時の 48 時間後における力価の差は 10^8 に達し (Fig. 2) HeLa 細胞には A 型封入体がすべて

Fig. 2 牛痘 CPR-CI 株の HeLa 細胞と L細胞における増殖曲線重複度 3。

の細胞に見られるのに比べて L細胞では 0.2%の細胞が A型封入体を形成したにすぎない。

L細胞が感染中心となるか否かを調べるため HeLa 細胞と L細胞に CPR-CI 株を同量接種し吸着後トリプシン処理によって細胞浮遊液とし、300 メッシュのステンレス網を通して細胞が単離していることを確めたのち鶏胚細胞上に播いて寒天培地により被覆した。HeLa 細胞と L細胞との感染中心となつた細胞数の比は 3750 : 1 であった。

一方ワクチニア IHD 株は L細胞においても HeLa 細胞においてもよく増殖する。CRP-CI 株とワクチニア IHD 株の重感染細胞では V⁺ 型の A 型封入体を生ずるから (市橋, 松本 1966), V⁺ 型の A 型封入体形成はその細胞における重感染の成立を示す。したがって CRP-CI 株とワクチニア IHD 株を L細胞に混合感染して V⁺ 型封入体の出現頻度を観察しプラーク型によって各々の

Table 1 HeLa 及び L細胞のワクチニア及び牛痘ウイルスに対する感受性

	HeLa	HeLa+L	L
Vaccinia IHD	2.5×10^8 *	6.4×10^8	5.5×10^8
Cowpox CPR-CI	1.4×10^8	9.8×10^7	10^3
Vac. IHD+CPR-CI	8.3×10^7	9.1×10^7	4.0×10^7

* PFU/ml

Fig. 3 ワクチニア IHD 株と牛痘株 CPR-CI の混合比を変えて L 細胞に感染させた時の 48 時間後のウイルス力価、重複度は合計 10.

株の産生ウイルス量を調べることににより CPR-CI 株の L 細胞における増殖性を検討できるはずである。

ワクチニア IHD 株と CPR-CI とを方法に述べた如く比率をかえて混合し L 細胞に感染させた。CPR-CI 株単独での HeLa 細胞感染では 1.4×10^7 PFU/ml, L 細胞では 8.2×10^8 PFU/ml を産生したが、IHD 株と重感染した場合は等量混合比で、CI 株 9×10^4 PFU/ml, IHD 株 2×10^6 PFU/ml であった。CI 株の産生ウイルス量が接種ウイルス混合液中のパーセントに従って山型のカーブを画く。この所見から、混合感染の結果 CPR-CI ウイルスの増殖がワクチニア IHD ウイルスによって救助された事が明かとなった (Fig. 3)。又、V⁺ 型の A 型封入体を形成する L 細胞の出現頻度も同じ性格の山型曲線を示し、間接的に、両ウイルス重感染によって L 細胞内で CPR-CI ウイルスの増殖が高純率に起つた事を裏書きした (Fig. 4)。この重感染実験では、既述の如く、細胞当りのウイルス感染価 (HeLa 細胞に対する) を一定にして、一応 L 細胞当りのウイルス量をそろえる様に考慮された。然し、両ウイルス共に M.O.I. の非常に高い場合にはウイルスの増殖の起る前に非特異的な細胞変性が起る事実が知られており、而もその程度は両ウイルスに差がある。前記実験にはこの要素が加わる為に、細胞対ウイルスの関係は厳密な意味で企図された同

Fig. 4 ワクチニア IHD 株と牛痘 CPR-CI 株の混合比を変えて L 細胞に感染させ 48 時間後に V⁺ 型 A 型封入体を形成していた細胞の %。感染条件は Fig. 4 の場合と同一である。

一条件を完全には備えていない。Fig. 3 及び 4 の CPR-CI ウイルス感染価及び V⁺ 型封入体の出現頻度のカーブが、共に略山型であるが、完全な対照型を示さないのは、以上の理由によるものであろう。

この点を考慮して、細胞当りのウイルス絶対数と両ウイルスの比率 (略等量) を一定にした感染系をつくり、L cell に感受性のあるワクチニアウイルスを不活化して、前実験と同様な観察を試みた。

即ち、方法の項で述べた様に、時間を変えて紫外線で色々な程度に不活化したワクチニア IHD ウイルスと活性の CPR-CI ウイルスを混合して、L 細胞及び HeLa 細胞に夫々接種した。48 時間後に収穫してウイルス感染価と V⁺ 型 A 型封入体を形成した細胞の出現頻度を調べた。HeLa 細胞を宿主とした時にはワクチニア IHD 株の不活化時間に比例してワクチニア IHD 株の産生量は低下し、同時に CPR-CI 株の産生量は上昇している。即ち HeLa 細胞において CI 株、IHD 株は共に接種した活性ウイルス量と産生されるウイルス量とが比例関係にある。これに対し L 細胞を宿主とした場合、CPR-CI 株の増殖はワクチニア IHD 株の産生量が高い時のみ認められ混合したワクチニア IHD 株の不活化が強い場合には接種ウイルス中の CI 株の割合が相対的に増加しているにも拘らず CI 株の増殖率はかえって低下している (Fig. 5)。V⁺ 型の A 型封入体も L 細胞を宿主とする場合ワクチニア IHD 株の不活化が 0 ~ 20 秒の時のみ生ずる点も CI 株の L 細胞における増殖が IHD 株の増殖を条件として生ずることを示している (Fig. 6)。

しかし A 型封入体及びプラーク型を別々に検定してい

Fig. 5 紫外線不活化したワクチニア IHD 株と等量の牛痘 CPR-CI 株を混合感染した時の48時間後の力価. ワクチニア IHD 株の不活化時間は横軸に示されている. 重複度は合計10.

るからL細胞での CI 株型プラークを示すクローンの増殖が救助によるのか組みかえ体の増殖によつて生ずるのかについての問題が残る. そこで, L細胞に IHD 株と CI 株を重感染した時の子孫ウイルスから CI 株型のプラーク36個を分離してA型封入体の形態, L細胞における増殖性を調べたが35個は元の CI 株の形質を示した. (Table 5). 即ち, CPR-CI 株はL細胞においてワクチニア IHD 株により救助されて増殖率が上昇する.

L細胞に CI 株を単独感染した時一旦細胞変性が生じても培養液を交換していれば次第に細胞の形態学的変化は回復し継代することができる. 初代の感染後4日目の細胞からは $10^3 \sim 10^4$ PFU/ml のウイルスが証明されるが, 継代を重ねる毎に力価は低下して行く. 5代目には 10^4 PFU/ml が見出されるのみであるが, この細胞に HeLa 細胞を重ねてうえると 10^4 PFU/ml 以上に回復する. (Table 2). CI 株のL細胞に対する感染がごくわずかながら持続しており, そのウイルスが HeLa 細胞に感染することによつて回復したものであろう.

Fig. 6 Fig. 5 と同一条件下で見た V⁺ 型の A 型封入体を形成していた細胞の%.

オートラジオグラフで ^3H -チミジンのとりこみを見ると CI 株に感染した HeLa 細胞では B 型封入体に一致して細胞質内に銀粒子の集中が見られるのに対し L 細胞

Table 2 CPR-CI ウイルスに対する L 細胞の感受性

L+CPR-CI Subculture	Days after inoculation	Cell associated virus (PFU/ml)
I	2	5.2×10^3
II	4	1.4×10^3
III	8	2.5×10^2
IV	14	9.0×10^1
V	46	1.0×10^1
V+HeLa	34	4.5×10^2
V+HeLa	36	1.5×10^3
V+HeLa	46	1.7×10^4
VI	48	4.8×10^1

Fig. 7 a: HeLa 細胞に牛痘 CPR-C1 株を感染させたのち3時間目から6時間目まで $10 \mu \text{ ci/ml}$ の ^3H チミジンをとりこませた。銀粒子はほとんど細胞質内B型封入体に一致している。
b: L細胞に牛痘 CPR-C1 株を感染させたのち3時間目から9時間目まで $10 \mu \text{ ci/ml}$ の ^3H チミジンをとりこませた。銀粒子はほとんど細胞核にとりこまれているが、ごくわずかに細胞質内にも見出される (矢印)。

を宿主とした時には細胞質内へのとりこみは少い (Fig. 7)。同条件下にワクチニア IHD 株を同量接種した時にはL細胞においても強いとりこみが生ずる。L細胞において C1 株はウイルス DNA 合成期前の初期過程に何らかの阻害をうけており、この段階はワクチニア IHD 株の重感染により救助されるのであろう。

Table 3 ワクチニア及び牛痘ウイルスの性質一覧

Virus strain	Plaque type	Inclusion matrix	Virus attaching	Growth in L	Growth in HeLa
Vaccinia IHD	IHD	—	+	+	+
Cowpox CPR-C1	C1	+	—	—	+
Cowpox CP 58	58	+	+	—	+

以上4種類のマーカーを各ウイルス株について示した (Table 3)。

重感染子孫ウイルスの遺伝学的解析

1. CPR-C1 株と CP-58株

CPR-C1 株と CP-58 株とは共に A 型封入体を形成する。遺伝的マーカーとしてV因子とプラーク形質に両者の差が認められるが双方とも In 因子をもつため、A型封入体に関する2つのマーカー In とVの間の組みかえ体は検出できない。しかしプラーク型とA型封入体形の2形質については組みかえが期待できる。

混合感染によって生じた子孫ウイルスから方法にのべた如く 200個のクローンを分離し上記2種類のマーカーについて分類した (Table 4)。

Table 4 CPR-C1, CP 58 の混合感染による組みかえ体出現

		Plaque type		
		CPR-C1	CP-58	Mixed
inclusion type	In ⁺ , V ⁻	105	11	
	In ⁺ , V ⁺	7	96	
	Mixed			11

プラーク型とA型封入体間の組みかえ体は C1 株型プラークから 3.2%, 58株型のプラークから 5.0%見出された。親ウイルスのプラークに較べて小さなプラークを作るクローンが3個得られたが、この場合にもプラーク域が clear 又は turbid となる性質は明瞭に識別され、継代しても変化しない。親ウイルスの単独感染ではこのような小プラークは見出されず、3個の小プラーククローンは組みかえ体と判定した。遺伝的に見てプラーク形質には turbid, clear 型の外にその大きさを規定する遺伝子の存在を予想させる。即ち、プラークの形質はいくつかの因子により決定されているのであろう。

尚、分離した 200 個のプラークのうち 11 個からは CPR-C1 株と CP-58株の双方を生じた。ウイルスは接種前に音波処理をし 10^5 に希釈しているから異型接合体とも考えられるが、双方のウイルス粒子が近接してあるいは凝集して感染した可能性も否定できない。単に両株のウイルスを混合して同様にクローニングを行つた場合にも 4.0%のプラークは混合感染を生じていた。

2. ワクチニア IHD 株と CPR-C1 株

この組み合わせの重感染では4種類のマーカーについて分析できる。子孫ウイルスの 285個のクローンを各マーカーについて分類した (Table 5)。

どのマーカー間にも組みかえが生じている。特に強調したいのは、我々が前報で予想した如く A型封入体に関

Table 5 ワクチニア IHD ウイルスと牛痘 CPR-CI ウイルスの組みかえ体解析

Recombinants between Vaccinia IHD and Cowpox CPR-CI						
Plaque	In	V	L	HeLa	L	98×104
Vac IHD	+	+	+	4	1	0
	+	+	—	0	0	0
	+	—	+	33	1	65
	+	—	—	10	0	0
	—	+	+	87	10	5
	—	+	—	4	1	1
	—	—	+	0	0	0
	—	—	—	0	0	0
CPR-CI	+	+	+	1	0	0
	+	+	—	0	0	0
	+	—	+	4	0	2
	+	—	—	129	32	6
	—	+	+	6	1	9
	—	+	—	7	2	49
	—	—	+	0	0	0
	—	—	—	0	1	0
				285	49	137

する形質として区分した In と V マーカー間での組みかえ体として $In^+ V^+$ の形質を示すクローンは 5 個得られた点である。($In^+ V^+$) の組みかえ体と対応する ($In^- V^-$) の組成をもったクローンは 285 個中に見出されず、A 型封入体に関する In, V の 2 種類のマーカー間で組みかえ率は 1.8% となる。

ワクチニア IHD 株型プラークで Cl 株型の A 型封入体形質を示すクローン (turbid プラーク, $In^+ V^-$) が 15.1% 見出されたが対応する Cl 株型プラークで IHD 株型の A 型封入体形質 ($In^- V^+$) をもつクローンは 4.6% であつた。Cl-58 株の混合感染では (Cl 株型プラーク, $In^- V^+$) を示す組みかえ体が 3.2% であつて IHD 株—Cl 株の場合の 4.6% とほぼ一致するからワクチニア IHD 株型プラークを決定する遺伝子と Cl 株プラークの遺伝子とは対立していないのであろう。あるいは、ワクチニア IHD 株型プラークで ($In^+ V^- L^+$) の遺伝子組成を示すクローンはプラークが大型であることから推測されるように増殖率が高いことにより見かけ上の組みかえ率が高くなっているのかもしれない。

プラーク型と L マーカー間の組みかえは双方のプラーク型についてほぼ同数得られた。ワクチニア IHD 型プラークとして分類した 14 個のうち 4 個の L^- のクローンはプラーク域が turbid で IHD 株型ではあるがプラーク

クサイズが親ウイルスより小さく HeLa 細胞での増殖率も低い。

A 型封入体型とプラーク型の組みかえで見られた著しい偏りのため 4 種類のマーカーを遺伝子地図として矛盾なく配列できない。

3. Rec 98 と Rec 104

プラーク型は各株で特徴があつて遺伝的にも安定しているから十分にマーカーとして用いるのであるが、前項の混合感染子孫ウイルスに見られたように A 型封入体の形質について組みかえの起っているクローンのプラーク型が親ウイルスと同一でない場合がある。Rec 104 はワクチニア IHD 株と CPR-CI 株の混合感染から得られた組みかえ体であつて ($In^- V^+ L^-$) の遺伝子組成を示しプラークは透明で Cl 株型であるが Cl 株よりはるかに小さく HeLa 細胞における増殖性も Cl 株より低い。このプラークサイズの変化が組みかえの結果であるならば対応する組みかえ体との混合感染により親ウイルスと同じ形質をもった組みかえ体を生じ得るはずである。

Rec 98 は Rec 104 と対応する組みかえ体の一つであつて turbid プラークであるがプラーク周辺部の赤染帯部分がなくワクチニア IHD 株と区別できる。その他のマーカー組成は ($In^+ V^- L^+$) である。

この両株の混合感染子孫ウイルス 137 個を分離して分類した (Table 5)。

組みかえ体としてプラーク型、A 型封入体型、L 形質について元の親ウイルスであるワクチニア IHD 株と一致するクローンは 5 例、Cl 株と一致するものが 6 例得られた。したがつて Rec 104 と Rec 98 はプラーク型の変化にも抱らずワクチニア IHD 株と CPR Cl 株の間の A 型封入体形質に関する組みかえ体と考えられる。プラーク形質が組みかえ体において変動することは Cl 株、IHD 株のプラーク型形質が多因子に支配されていることを物語っている。

組みかえ体同志の混合感染における組みかえ率と Cl 株—IHD 株間の組みかえ率との共通点は A 型封入体形質 In と V 間の組みかえが少く両者が強く連関していること、ワクチニア型封入体形質 ($In^- V^+$) と L^+ とは連関性が高い点があげられよう。

考 察

ワクチニア IHD 株と CPR-CI 株の重感染細胞では双方の株の成熟ウイルス粒子を包含した V^+ 型の A 型封入体が形成される (市橋, 松本 1968)。重感染細胞で V^- 型の A 型封入体が V^+ 型となる現象は IHD 株ばかりでなくワクチニア Lister 株, Biken 株, Dairen I

株, エクトロメリア Hampstead 株, 牛痘 CP-58株等に共通している。V⁺ 因子が (In⁻ V⁺) 株と (In⁺ V⁻) 株の双方のウイルス粒子に作用して A型封入体に附着包含させる反応は宿主細胞の種類には依存しないからファージの Amber mutant における救助とは異りウイルス自身の遺伝的形質の作用である。A型封入体形質の異なる2株を混合感染した時の子孫ウイルスは親ウイルスと同一形質をもつクローンが大部分を占めるのであるから (In⁺ V⁻) 株と (In⁻ V⁺) 株の重感染細胞に In⁺ V⁺ 型の A型封入体が形成される現象は前報で述べた如く相互的なマーカー救助であつて組みかえ体の増殖によるのではない。

本実験は In と V の両形質がそれぞれ別個の遺伝子に支配されているか否かの検討を一つの目的として計画された。In と V の両遺伝子間で 1.8% の組みかえ体 (In⁺ V⁺) を生じたが、どのクローンも中間的な性質を示さない。In, V は独立した別個のウイルス 遺伝子によつて支配されていると考えられる。この結果は従来主張して来た如く A型封入体形質がウイルス自身のゲノムによるものであつて宿主細胞の反応産物ではないことも示している。

ワクチニア Dairen I 株は L 細胞で増殖しないことが報告されている (Oda 1965, Ando and Matumoto 1968)。Dairen I 株は L 細胞において IHD 株との組みかえ体の増殖により救助されるが組みかえ体の細胞における増殖性はクローンによつて異なるからこの形質が多因子性であると結論された。これに対し CPR-CI 株は L 細胞での増殖性は低くワクチニア IHD 株に救助される点は同様であつても、L 細胞での重感染子孫ウイルスはほとんどが親ウイルスと一致する形質を示し、ウイルス DNA 合成期前の初期過程が更に前の吸着過程における欠陥を救助されるのであつて、むしろ再活性化現象に類似している。

即ち、CPR-CI 株とワクチニア IHD 株との重感染細胞では A型封入体形質、L 形質の双方について救助が生ずるがいずれも Dairen I 株や Rabbit pox U2 株 (McClain and Greenland 1965) の場合に結論されたような組みかえ体の増殖による救助ではない。

CPR-CI 株は L 細胞において低いながらも増殖が生ずるから初期過程における欠陥は完全な欠失ではないと思われる。この欠陥は HeLa 細胞を宿主とする場合には現われなから CPR-CI 株の感染初期過程には宿主の関与する段階があると考えられよう。

ワクチニア IHD 株, CPR-CI 株のプラーク形態は HeLa 細胞に対する細胞変性の形態とよく対応している。プラーク域が turbid である性質は Neutral red 顆

粒を含んだ細胞が崩壊せずに残ることによつている。痘瘡群ウイルスで鶏胚細胞上に turbid プラークを形成する株は CP 48株, CPR-06株, ワクチニア IHD 株, Lister 株, Dairen I 株, Biken 株等があるが、CP 58株はやや小さくプラーク中央部に赤染する部分がありワクチニアウイルスはどの株も周辺部にリング状に赤染する帯が形成され、又 CPR-06株はプラーク全域が均一に turbid である。このように形態に多少の相違はあるが turbid プラークを形成するどの株も HeLa 細胞の円化を強く生ずる。CPR-CI 株のプラーク域が clear である性質は単に細胞の崩壊が急速であることによるばかりでなく巨細胞形成が強く生ずるため域内の細胞数が減少することも作用している。プラークの性質は組みかえ体においてサイズ及び形態の変化する場合があることから見て多因子に影響をうける形質であり、したがつて厳密な遺伝学的解析には更にこのマーカーの素過程を確める必要がある。ただ、プラーク域が clear であるか turbid であるかは組みかえ体にも中間的な性質を示すものがない。予備的な実験において CPR-CI 株ウイルスが電気泳動度・熱不活化速度等の点でもワクチニア IHD 株と異なることが見出されている。これらの事実は coat 蛋白に違いがあることを示唆しているが、プラーク形態、L 細胞における増殖性等との関連は今後に残された問題である。

ワクチニア IHD 株, CPR-CI 株, CP 58株はいずれも自然発生した変異体を分離しているため多数の対立形質をもつことが予想される。したがつてここにとりあげた4種類のマーカー間に additive な組みかえ率を期待できないが組みかえ体は多数見出された。細胞質内でのウイルス DNA 増殖が B型封入体に局限されて生じ且、その数は細胞に感染したウイルス粒子数より小い。2株のウイルスを時間差をつけて追加感染した時にも重感染が容易に成立することは V⁺ 型の A型封入体形成によつて知ることができる。これらの近縁ウイルス間では絶対的な干渉はないのであろう。更に B型封入体での DNA 合成は ³H-TdR のとりこみによつて判定すると感染後長時間にわたつて特続している。これらの諸条件が組みかえの生ずる機会を高めていると思われる。

遺伝子地図の作成には前提条件として組みかえ体がすべて等しい増殖率、検出率を示すことが要求されるが、この論文でとりあげた株では組みかえ体の増殖率が低下する場合があつたり、対応する組みかえが検出できない場合もある。プラーク分離の段階で双方の親ウイルスを産生するクローンが7%あるがウイルス凝集体による感染の可能性を考慮して除外したけれども、異型接合体である可能性もないわけではない。我々の痘瘡群ウイルス

の遺伝学的研究は自然発生したマーカーの安定性を利用して行われて来たが、これ等のマーカーについても更に mutagen 処理して得られた変異体を蓄積し解析する道が残されている。

Summary

It was previously suggested that the character of the A-type inclusion can be separated into two markers: the capability to include mature progeny virions within or on the inclusion body (V), and the formation of ground substance of the inclusion body (In). In addition, another difference in the susceptibility to the L cells was found between the vaccinia IHD strain virus and the CPR-Cl cowpox virus (L). The low growth rate of CPR-Cl virus calculated about 3 logs can be rescued by vaccinia IHD virus in mixedly infected L cells.

The recombinants among these markers were found in variable percentages of the progeny viruses of mixed infection with a combination of vaccinia IHD and cowpox CPR-Cl viruses, using the plaque types as control markers. Especially our prediction that the phenotypes of the A-type inclusion is controlled by two viral genes was proved by the appearance of V⁺In⁺ recombinants of 1.8%. Concerning the plaque types being of polygenic nature, morphological features of cytopathic effect in HeLa cells were coincided with plaque types of all recombinant clones.

文 献

- 1) Bablanian, R. (1968). The prevention of early vacciniavirus-induced cytopathic effects by inhibition of protein synthesis. *J. Gen. Virol.* **3**, 51-61.
- 2) Fenner, F. and Woodroffe, C. M. (1960). The reactivation of poxviruses. II. The range

- of reactivating viruses. *Virol.* **11**, 185-201.
- 3) Gemmel, A. and Cairn, J. (1959). Linkage in the genome of an animal virus. *Virol.* **8**, 381-383.
- 4) Hanafusa, H., Hanafusa, T. and Kamahora, J. (1959). Transformation phenomena in the pox group viruses. II. Transformation between several members of pox group. *Biken J.* **2**, 85-91.
- 5) Ichihashi, Y. and Matsumoto, S. (1966). Studies on the nature of Marchal bodies (A-type inclusion) during ectromelia virus infection. *Virol.* **29**, 264-275.
- 6) Ichihashi, Y. and Matsumoto, S. (1968). The relationship between poxvirus and A-type inclusion body during double infection. *Virol.* **36**, 262-270.
- 7) Joklik, W. K., Woodroffe, G. M., Holmes, I. H. and Fenner, F. (1960). The reactivation of poxviruses. I. Demonstration of the phenomenon and techniques of assay. *Virol.* **11**, 168-184.
- 8) Joklik, W. K. (1962). The prepatation and characteristics of highly purified radioactively labelled pox virus. *B. B. A.* **61**, 290-301.
- 9) Kato, S., Hara, J., Ogawa, M., Miyamoto, and Kamahora, J. (1963). Inclusion markers of cowpox virus and alastrim virus. *Biken J.* **6**, 233-235.
- 10) McClain, M. E. and Greenland, R. M. (1965). Recombination between rabbitpox virus mutants in permissive and nonpermissive cells. *Virol.* **25**, 516-522.
- 11) Oda, M. (1965). Rescue of dermovaccinia abortive infection by neurovaccinia virus in L cells. *Virol.* **25**, 664-666.
- 12) Ando, N. and Matumoto, M. (1968). Genetic recombination between vaccinia virus strains distinct in hemagglutinin production and plaqueing efficiency. *Japan J. Microbiol.* **12**, 495-504.