特 集

持続感染と風疹ウイルス**

Persistent Infection and Rubella virus

菅 沼 優*

MASARU SUGANUMA, M.D.

風疹ウイルスの妊娠初期感染によって、発生する先天性風疹症候群については、いくつかの調査報告^{1)~8)} および成書⁹⁾ に詳しい。

風疹ウイルスによる畸形発生機序については、器官形成期（妊娠初期—3カ月位まで）における風疹ウイルスの慢性持続感染¹⁰⁾ とそれによる細胞増殖の抑制^{11),12)} が原因であろうと想定されるのみである。事実、風疹感染回復期に、母体からウイルスが分離出来なくなった後も、胎盤および胎児からは、分離され^{13),14)}、症候群児からは、生後約1年間は、咽頭・尿・髄液などでウイルスが証明できる³⁾ という。

そこで、風疹ウイルス持続感染細胞とは何か、持続感染細胞内で、ウイルス粒子は、どのような存在様式をしているか、また、そのウイルス粒子と細胞との相互関係はどうかを、まず、組織培養（細胞培養）レベルで、調べ始め、現在いくらかの知見を得ているので、その大略について述べるとともに、現在組織培養レベルで、持続感染をどう考えているか、風疹ウイルス持続感染は、その中でどんな位置にあるかについて、述べてみたい。

風疹ウイルス粒子の性状

現在知られている粒子の性状を、まとめて表1に示す。以前 Arbo — arthropod-borne 節足動物媒介 — virus group と呼ばれていた一群のウイルスは、その形態的特徴その他から、既知の各ウ

Rubella virus

Toga virus group, A subgroup (Alpha virus)

virion : 60nm (50-85nm)^{15),16),17)} pleomorphicsedimentation : 342 S¹⁷⁾density : 1.16¹⁸⁾-1.19¹⁹⁾g/mlcore : 30nm^{15),16)}150 S²⁰⁾envelope (+)^{16),21)}nucleic acid : single stranded linear RNA²²⁾molecular weight : 3.4×10^6 daltons²⁰⁾39 S²⁰⁾1.634 g/ml²⁰⁾structural protein²³⁾

major : 63000, 60000……glycoprotein

32000, 29800……protein

minor : 56000, 54000, 52000, 47000……gly-

coprotein

stability

pH : 6.0-8.0 stable

heat : labile

ether, SDS, SDC : sensitive

表1 風疹ウイルス粒子の性状

イルス群に再分類され、そのうちで、どこにも分類できない一群が Toga virus group とされた。A, B subgroup とも大部分は、脳炎を主症状とする群で、その A subgroup に風疹ウイルスは、今日、分類されることが多い。

持続感染の考え方——その1

細胞培養レベルで、ウイルスと細胞双方が共存している状態を、持続感染 persistent infection と呼んでいる。それは大別して、細胞集団全体からみて、持続感染とみなし得る場合と、個々の細胞レベルで、持続感染している場合とが考えられている²⁴⁾。

* 順天堂大学医学部助教授（組織培養研究室）

Department of Tissue Culture

Juntendo University, School of Medicine.

** 第204回順天堂医学会学術集会（March, 1, 1978）

（March, 25, 1978 受付）

ウイルス細胞系	成立・維持の条件	報告者
ウイルス細胞		
HSV chinese hamster kidney	抵抗性細胞 ウイルスおよび細胞の変異	Hampar
WEE L	干渉	Chamber ら Lockhart ら
HSV L	干渉物質	Blackmore ら
NDV MCN	インターフェロン産生	Henle ら
HSV HeLa	抗体の存在	Hinze ら Wheeler
ポリオ HeLa	抗体の存在	Ackerman ら

表 2 細胞集団としての持続感染系の例

- 註 1) HSV : herpes simplex virus (Herpes virus group)
 WEE : western equine encephalitis virus (Toga virus group)
 NDV : newcastle disease virus (Paramyxovirus group)
 ポリオ : (Picorna virus group)
- 註 2) 新ウイルス学より一部改変して転載²⁴⁾

a) 細胞集団としての持続感染

少数の感染細胞と多数の非感染細胞からなり、感受性細胞が常に補充されて、carrier state (持続感染状態)を保つ。通常、抗ウイルス因子を必要とすると考えられている。その代表例を表2に示す。

b) 細胞レベルでの持続感染

細胞集団中、大部分が感染状態にあり、通常抗ウイルス因子を必要としない。細胞増殖とともに、娘細胞に受けつがれて行く。その代表例を表3にあげる。

いくつかの特徴を拾いあげてみると、

1) 持続感染をおこすウイルスは、分類上Paramyxovirus group と Toga virus group に属するウイルスが大部分を占めている。

2) 安定した持続感染系では、全部または大部分の細胞が感染していて、多くの場合、各細胞にウイルス抗原が証明できる。

3) carrier state を維持するために、培養液中に抗血清その他の抗ウイルス因子を加える必要はなく、また、抗血清を加えても cure しない。

4) 持続感染細胞系から、感染細胞のクローンを得ることができ、その細胞は、感染したまま分裂増殖し、コロニーを作る。

5) 同種ウイルスの重感染に resistant であることが多く、他種ウイルスの重感染に対する反応は、まちまちである。

6) 持続感染細胞から放出される感染性粒子は一般に $10^4 \sim 10^6$ 細胞につき1感染単位で、感染細胞内粒子数も、極めて少ないのが普通。しかし、infective center (感染中心—ウイルスが感染していて、感染性粒子を作り得る細胞)としてみると、ほとんど全ての細胞が infective center に成り得る。それは、感染細胞内でウイルスは、増殖過程 (growth cycle) の色々な stage にあり、synchronize していないためと考えられている。

7) 持続感染細胞から放出されてくるウイルスの virulence に変化がおこる例が多い。例えば、表3に示すように、Paramyxovirus group に属する NDV (newcastle disease virus) とマウス由来株細胞である L 細胞との系 L_{NDV}²⁸⁾では、この系からとれるウイルス NDVpi は、PCE (primary chick embryo) 細胞上で small plaque を作り、マウスや孵化鶏卵に対する virulence が低下しているといわれる。同様な例は、mumps virus (流行性耳下腺炎ウイルス)—Paramyxovirus group—とヒト結膜細胞²⁹⁾、coxsackievirus (Picorna virus group) A9 と HeLa 細胞 (ヒト子宮癌株細胞³⁰⁾)、麻疹ウイルス (Paramyxovirus group) と HeLa 細胞³¹⁾など、多く報告されている。

8) Paramyxovirus group に属する HVJ (sendai virus) と HeLa 細胞とでできた HeLa/HVJ の系²⁵⁾では、インターフェロン産生能および感受性ともに低下しているという。

9) Paramyxovirus group に属する HA 2 (hemadsorption virus type 2) と HeLa 細胞からなる HeLa/HA2 では、正常 HeLa 細胞 (3n) に比較して、X染色体とG群染色体の1つに ch-

ウイルス細胞系		特 徴	報 告
ウイルス	細胞		
HA 2 HVJ	HeLa	感染中心 100% 非感染性ウイルス産生 インターフェロンの産生および感受性の低下 染色体の変化およびそれに伴う形質発現の変化	石田 ら 1964 前野 ら 1965
mumps virus	C-M	感染中心 98—99% 血球吸着細胞 1—5% ウイルス増殖と細胞分裂の非同調性	Walker ら 1962
麻疹ウイルス	HeLa	感染中心 86—99% 完全ウイルスゲノムを保持 ウイルスは娘細胞に分配される 抗体中で培養すると不完全ウイルス保持の持続感染系を得る	Rustigen 1966
風疹ウイルス	サル腎	細胞質内封入体の存在 ECHO-11 に対する干渉現象 抗血清の治療効果なし ウイルスは細胞分裂で娘細胞へ移行	Massb ら 1966
EB virus	P3J (パーキット・リンパ腫細胞)	ウイルス抗原保持細胞 1—5% 細胞膜抗原保持細胞 30—50% 100% ウイルスゲノム保持 immunoglobulin 産生 ウイルス増殖と細胞増殖の非同調性 マーカー染色体の存在	Henle ら 1966 Klein ら 1967 Hinuma ら 1967
NDV	L	NDV pi (表 4 参照)	Thacore and Youngner 1969

表 3 細胞レベルでの持続感染の例

- 註 1) HA 2 : hemadsorption virus type 2 (Paramyxovirus group)
 HVJ : hemagglutinating virus of Japan (sendai virus) (Paramyxovirus group)
 mumps virus : Paramyxovirus group
 EB virus : Herpesvirus group
- 註 2) 新ウイルス学より一部改変して転載²⁴⁾

chromosomal aberration が起こる²⁶⁾という。即ち $3X \rightarrow 2X$ に、 $3G_{21} \rightarrow 2G_{21}$ に、それとは逆に、 $3F_{19} \rightarrow 4F_{19}$ 、 $3F_{20} \rightarrow 4F_{20}$ に。これは、 $X+G_{21} \rightarrow 2F$ と考えることができるとされた。そして G_{21} 上に存在すると想定される alkaline phosphatase の活性が HeLa/HA2 では 1/5 に低下している²⁷⁾ という。

持続感染の考え方——その 2 (最近の考え方)

a) 持続感染系から温度感受性変異株 ts (temperature sensitive) mutant が分離できるという例。

前述した表 3 の中で NDV-L 細胞の系 (L_{NDV}) で、この系から放出されてくるウイルス NDVpi

virus	cell	characteristics	reference
NDV	L	NDVpi small plaque formation heat labile low elution from RBC attenuated to chick embryo virulent to L cells interferon produced	Thacore and Youngner ²⁸⁾ 1969
		NDVpi ts mutant RNA ⁻	Preble and Youngner ³²⁾ 1972
sindbis virus	Aedes albopictus	SV-C small plaque formation heat labile ts mutant 19 out of 20 clones : RNA ⁺ 1 out of 20 clones : RNA ⁻	Shenk et al ³³⁾ 1974

表 4 持続感染系から温度感受性変異株が分離出来る例
sindbis virus : Toga virus group

の性状を調べたところ, plaque size や virulence の変化の他に, NDVpi は培養温度 37°C で PCE 細胞およびウシまたはイヌ 腎細胞に増殖するが, 42°C 培養では, 増殖できない ts mutant であることが示された。そして, 温度感受性となる欠陥部位は, 初期反応部位にあり, RNA 合成能を欠いた RNA⁻-mutant であることが分った³²⁾。同様な例が今日多数報告されるに至っている³⁴⁾。

それらの中から, 2 例を表 4 に示す。

持続感染細胞から ts mutant が分離できる例は in vitro の場合のみでなく, in vivo の系として foot-and-mouth disease (口蹄疫) virus³⁵⁾, 多発性硬化症 (multiple sclerosis) と CV-1サル腎株細胞との融合細胞から分離された 6/94 ウイルス³⁶⁾, レオウイルス³⁸⁾ などの報告がある。

これらの事実から Preble and Youngner は, ts mutant が select されることが, 持続感染の成立と維持に必要なのだと論じている³⁴⁾。

b) DI—defective interfering—粒子が持続感染に関係するという例。

VSV (vesicular stomatitis virus—Rhabdo virus group) は弾丸型粒子をしているが, その弾丸型の短いものが知られてきた。それは, envelope が短いのみでなく, 中味の RNA も短く, 標準型と違って, 子孫を作ることができない (defective)。しかし, この defective virion は標準型ウイルスの増殖を抑える (干渉 interference) ことが知られ, このために DI 粒子と呼ばれている。持続感染系からこの DI 粒子が分離され, これが適度に標準型ウイルスの増殖を干渉し, その結果, 持続感染が成立, 維持されると考える^{39), 40), 41), 42)}。

この時 VSV では, wild type, ts mutant とともに CPE (細胞変性効果) が起こり, 持続感染系はできないが, ある ts mutant を用いると, 単独では CPE で完全に細胞は破壊されてしまうが, この ts mutant の標準型ウイルスに, この ts mutant の DI 粒子を混ぜて感染させると, 容易に持続感染系が得られるという。このことから持続感染状態が成立するためには, ts mutant であることより

virus	cell	characteristics	reference
VSV rabies virus	BHK-21	interference with DI particles ts mutant not make the carrier state without DI particles no viral RNA-cellular DNA hybridization	Holland et al ⁴³⁾ 1974
LCM	mouse	DI particles	Huang and Baltimore ³⁹⁾ 1970
JE	MH-111 (rabbat kidney cell line)	DI particles no ts mutant isolated	Schmaljohn et al ⁴⁴⁾ 1977

表 5 DI 粒子が持続感染に関係するといわれる例

VSV : vesicular stomatitis virus.....Rhabdo virus group

rabies virus : Rhabdo virus group

LCM : lymphocytic choriomeningitis virus..... Arena virus group

JE : Japanese encephalitis virus.....Toga virus group

DI 粒子の存在が重要としている⁴³⁾。DI 粒子の存在が持続感染の成立，維持に主役を演じているという例を表5に示す。

c) ウイルス RNA からウイルス DNA が合成され，その DNA が provirus として細胞 DNA に integrate していると考えられる例。

表3にかかげた L_{NDV} の系で，精製された NDV_{Pi} に RNA から DNA を合成する酵素 reverse transcriptase (逆転写酵素)の活性が証明された⁴⁵⁾ (表6)。

このことはRNA腫瘍ウイルス (Oncorna virus) で知られてきた provirus の考えを持続感染系に導入する結果となり，にわかに興味をひくところとなった。即ち NDV・RNA→NDV・DNA が作られ，このNDV・DNA が provirus として細胞核染色体に integrate されると考えられた。なお，元の wild type NDV (NDVo) には，逆転写酵素の活性は証明できなかった。このことから，この酵素の由来について，(1)細胞由来，(2)細胞内に contamination していると考えられる他の Oncorna virus のもつ逆転写酵素由来——NDV_{Pi} との recombination で，この酵素を NDV_{Pi} がもらう

——，(3)NDV・RNA (genome) が本来もっていて，NDVo では，repress されていて，発現しないが，NDV_{Pi} では，derepress され発現し，酵素活性をもつ，が考えられるとされた⁴⁵⁾。

その後，この考えは zhdanov によって，更に進められ，TBEV (tick-borne encephalitis virus——Toga virus group) とヒト由来 HEp-2 細胞の系で，持続感染細胞 DNA を，このウイルスに感受性のある SPEV (ブタ腎株細胞) 細胞に感染させる (transfectionという) ことに成功した⁴⁶⁾。更に，この系および麻疹ウイルスとPCE細胞系⁴⁷⁾ または，SLE (systemic lupus erythematosus 全身性エリテマトーデス) の腎細胞やリンパ組織の細胞で，TBEV-HEp-2 系では TBEV・RNA と細胞 DNA の間に，麻疹ウイルス-PCE 細胞または SLE 系では，麻疹ウイルス・RNA と細胞 DNA との間に，hybridization が起こることを示した。即ち，細胞染色体 DNA 中に，持続感染ウイルスと同じ塩基配列が存在することとなる。一歩表現を進めれば，持続感染ウイルスの provirus が，細胞染色体上に存在すると考えられるに至った。染色体上に存在する provirus は，細胞分裂と

virus	cell	characteristics	reference
tick-borne encephalitis virus	HEp-2	actinomycin D-sensitive RNP synthesized viral RNA-cellular DNA hybridization (12-16 viral genomes/cell) cellular DNA transfectable to SPEV cells (pig kidney cell line)	Zhdanov et al ⁴⁶⁾ 1974
measles virus	PCE	viral RNA-cellular DNA hybridization (8 viral genomes/cell)	Zhdanov et al ⁴⁷⁾ 1974
measles virus	systematic lupus erythematosus (lymphatic node, kidney cells)	viral RNA-cellular DNA hybridization	Zhdanov ⁴⁸⁾ 1975
RS virus	bovine embryonic kidney cells	DNA extracted from the carrier cells transfectable to HEp-2 cells ts mutant (BEK/RSts)	Simpson and Iinuma ⁴⁹⁾ 1975
SV ₅	L	cellular DNA transfectable to RH and HEp-2 cells	Cherednichenko et al ⁵⁰⁾ 1977
NDV	L	NDVpi virion associated reverse transcriptase activity	Furman and Hallum ⁴⁵⁾ 1973

表 6 ウイルス RNA からウイルス DNA が合成され provirus となると考えられている例

tick-borne encephalitis virus : Toga virus group

RS virus : respiratory syncytial virus.....Paramyxo virus group

SV₅ : Paramyxo virus group

ともに、染色体として、次ぎの娘細胞へと移され、更に、この状態では、抗体は勿論、インターフェロンの作用も受けにくく、長く安定した持続感染系が存在することになる。この例のいくつかを表6に示す。

なお Zhdanov は、actinomycin D sensitive RNP(ribonucleoprotein)の存在をみている^{46), 48)}。これは、TBEV の急性感染では、actinomycin D は RNA 合成を阻害しないことと考え合わせて、TBEV・DNA (染色体上に integrate) → TBEV・RNAの存在 (actinomycin D は DNA→RNA transcription の阻害) を暗示しているものと思われる。

風疹ウイルス (M33株)-HeLa 細胞持続感染系 HeLa-M33 細胞の例。

a) 一般的性状⁵¹⁾

風疹ウイルスをHeLa-S3細胞に感染させると、CPEを示すことなく、容易に持続感染系を得ることができる。この系は、現在、感染後、約5年、継代数約190代で、細胞内に、 $5 \sim 10 \times 10^4$ PFU/ 10^7 cells, 培養上清に $2 \sim 8 \times 10^4$ PFU/ml (培養液量 50ml), infective center として約50%の細胞がウイルスを持った安定した状態を続けている。現在までのところ、この細胞の増殖速度については、doubling time を測っていないので詳しくは不明だが、正常 HeLa-S3 細胞より、常にき

HeLa M33 cells

passage level : 190

5 years after infection

1. normal morphological appearance
2. slower cell growth
3. interfere replications of measles, vaccinia and vesicular stomatitis viruses
4. existence of interferon, undetectable by ordinary assay method
5. HM virus (released virus)
 - small plaque formation
 - ts mutant
 - heat labile, but both stable and labile clones isolated
 - RNA⁺
 - no hemagglutinating activity
 - late function defective
 - virion-associated reverse transcriptase ?
6. transfection of DNA from the carrier cells
7. viral DNA-cellular DNA hybridization, in progress
8. partial inhibition of viral growth by actinomycin D
9. chromosomal aberration, in progress

表 7 風疹ウイルス-HeLa 細胞持続感染 HeLa-M33 細胞の性状

れいな monolayer を作っていることから、いくらか遅くなっている可能性を考えている。畸形発生機序として、細胞増殖の抑制が考えられているので、この点も、詳しく調べてみたい。

b) 干渉 interference^{51,52)}.

この HeLa-M33 細胞に、他種ウイルスを重感染させると、重感染ウイルスの増殖が抑制され、干渉がおこる。その程度は、測定方法によって、違ってくるが、どの方法を用いても、RNA ウィルスでは、VSV に強く、麻疹ウイルスに、より弱く働く。更に DNA ウィルスであるワクチニアウイルスをも抑制する。このことは、この干渉が、インターフェロンによるであろうことを想像させるが、VSV の plaque reduction という普通に用いられる方法では、測定できなかった。しかし、持続感染細胞と正常 HeLa 細胞とを混合し、interfering state が、HeLa 細胞に移るのを actinomycin D が抑えることから、極めて少量のインターフェロンが、この系に存在しているものと考えている。

c) HeLa-M33 細胞から放出されて来る HM ウィルスの性状^{53),54)}

HM ウィルスの性状および HeLa-M33 細胞の性状を、進行中のものも含めて、表 7 に示す。

(i) HM ウィルスは、感染に用いた M33 株ウィルスに比べて、SIRC-5E 細胞(ウサギ角膜株細胞を 2 回クローニングした細胞)上で、不明瞭な小さい plaque を作る。

(ii) HeLa-M33 細胞を 39.5°C に温度を上げて培養すると、図 1 に示すようにウィルス増殖が抑えられる。このことは、HM ウィルスが、温度感受性変異株 ts mutant であることを暗示している。そこで、HM ウィルスを SIRC-5E 細胞上でクローニングして、使用し得る 8 株を拾って、各々について、増殖曲線を書いた。その 1 例を示すと図 2 のようになり、ts mutant であることが明らかとなる。ちなみに、HM-C10 クローンの 39.5°C 培養 3 日の感染価を、35°C 培養のそれで割った値は、 7.1×10^{-5} 以下で、他クローンでも、 $9.1 \times 10^{-4} \sim 2.3 \times 10^{-4}$ 以下で、ts mutant と考えている。なお、W4/1 クローンでは、 3.5×10^{-1} であった。(W4/1 クローンは wild type を 2 回クローニングしたもの)。

(iii) HM ウィルスの熱安定性を 45°C でみる

図1 39.5°C 培養における HeLa-M33 細胞より放出される感染性粒子の動向.
HeLa-M33細胞 (35°C培養) を3回, 培養液で洗い (0 time), 一方を35°C (●) で, もう一方を39.5°C (▲) で培養, その培養上清を1日ごとに取り, SIRC-5E 細胞上で plaque assay.

と, W4/1 クローンに比べて, 熱に不安定であったが, 各 HM クローンで調べると, W4/1 より強いクローン, (HM-C6), 弱いクローン (HM-C9, C10) など, まちまちな結果が得られた. ちなみに, 熱不活化定数 K (hr^{-1}) でみると, W4/1 クローンは 6.90 で, HM クローンは, 1.45~17.4 を示した.

(iv) 次に, ts mutant とすると, 39.5°C (nonpermissive temperature) で, ウイルス増殖のどの部位が欠陥 defect になっているかをみると, 各クローンとも RNA 合成能 (+), 赤血球凝集素 (HA) 合成能 (-) の late function が

defect であることが分った. なお, 培養温度を, 途中で上下させる temperature shift up および down の実験からも, eclipse (16時間) の後期, 感染後約 12 時間に defect が存在することが分った.

(v) virion associated reverse transcriptase の存在については, (+) のデータが出たようにみえたが, control に問題があったので, 目下, 再検討中である.

d) 持続感染細胞 DNA の transfection

HeLa-M33 細胞からクロロホルム-イソアミルアルコールで DNA を抽出し, SIRC-5E 細胞に transfect すると, 条件がむずかしいと思われ, 現在まで一度成功したのみである. なお, transfect した細胞から, 分離されたウイルスの性状については, 目下検討中である.

e) viral DNA-cellular DNA hybridization.

風疹ウイルス粒子 RNA を Oncorna virus reverse transcriptase で DNA に読みかえ, それと持続感染細胞 DNA との hybridization の実験が, 現在, 進行中である.

f) actinomycin D による風疹ウイルス増殖の部分抑制

風疹ウイルスの増殖は, 本来 actinomycin D で抑制を受けない. しかし, 風疹ウイルス感染細胞を actinomycin D で処理すると, 逆にウイルス産生量が増加する (enhance). これは, 多分, actinomycin D によるインターフェロン産生抑制のためと考えられている. ところが, 次の条件下で, 処理をすると, 風疹ウイルス産生抑制がみられる. 即ち, HeLa-M33 細胞を, まず3日間 39.5°C で培養して, 細胞内感染性ウイルス量を低下させる (図1参照). 次に3日目の最後の2時間に actinomycin D 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加える. その後で, 培養液を捨て, 良く洗って, 新しい actinomycin D (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含んだ培養液を加えて, 今度は 35°C で培養する. そこで, 培養液中に放出されてくる感染性ウイルス量を測定すると, 図3のようになる. 35°C に移した初期に actinomycin D 未処理 control に対して, 60%以上にのぼる抑制

図 2 HM-C10 クローンの39.5°Cでの増殖
SIRC-5E 細胞に w4/1 クローン (A), または HM-C10 クローン (B) を
input multiplicity 各々 0.67 および 0.1 (PFU/cell) で感染させ、
35°C (●) または 39.5°C (▲) で培養, その培養上清を 1 日ごとに取り、
感染価を plaque assay

がみられる。その後 5～6 時間に、逆に処理細胞より放出されるウイルス量が増加し、更に 24 時間後に、再び逆転がみられる。これは次のように説明される。初期の抑制は、前述のように、風疹ウイルスの増殖は、actinomycin D で抑制されないことと、actinomycin D は DNA→RNA transcription を抑制することを考え合わせると、風疹 RNA (親)→風疹 DNA (provirus)→風疹 RNA (子) の反応系が持続感染系に存在すると考えられる。(actinomycin D はこの反応系の後半部分を抑える)。5～6 時間の第 1 の逆転は、actinomy-

cin D によるインターフェロンの産生抑制によるものと考えられ、このことは、この処理によっても、細胞はウイルスを十分産生し得る活性を保っていることを示している。24 時間前後の第 2 の逆転は、この頃になって、actinomycin D のこの処理で、細胞のウイルス産生活性が低下し始めたことを示している (おそらくは死ぬ)。

g) chromosomal aberration

現在コルヒチン処理で中期の染色体を写真にとり、分類中である。

h) HeLa-M33 細胞内風疹ウイルスの存在様式

図3 HeLa-M33 細胞内風疹ウイルス増殖の actinomycin D による部分抑制。HeLa-M33 細胞を 39.5°C に 3 日間培養，その最後の 2 時間に actinomycin D (1 µg/ml) を加え，0 time で 3 回洗った後，同濃度 actinomycin D を含む，新しい培養液を加え，35°C で培養，示された時間に培養上清を取って，SIRC-5E 細胞上で plaque assay (▲)。control は actinomycin D を含まない培養液で，同様に処理した (●)。

のモデル。

以上不完全なデータから，HeLa-M33 細胞中風疹ウイルスの存在様式を推論すれば，図4のようになると思われる。即ち，風疹ウイルス増殖は，風疹 RNA (親)→風疹 RNA (子) の主反応—actinomycin D で抑制されない—と，風疹 RNA (親)→風疹 DNA (provirus)→風疹 RNA (子) の副反応—actinomycin D で抑制される—とが存在しているものと考えられる。この時，両反応は，同一細胞内でおこっているのか，違った細

図4 HeLa-M33 細胞内風疹ウイルス合成のモデル。

胞で行なわれているかは不明であり，また，風疹 RNA→風疹 DNA の合成を行なう逆転写酵素は，風疹ウイルス粒子がもっているのか，HeLa 細胞がもっているのか，現在不明——自然界に存在する風疹ウイルスによって畸形が起こることを考えると，後者である方が考え易いが——である。provirus DNA が細胞染色体上に存在するかどうかは hybridization の実験の結果によるが，持続感染が Paramyxo virus および Toga virus group におこり易いのは，細胞染色体 DNA とこの種のウイルス RNA との間に塩基配列に似た部分が多く存在する可能性を暗示しているものと思われる。

HeLa-M33 細胞系からは，ts mutant が分離されるが，Vero 細胞 (サル腎株細胞) でできた Vero-M33 持続感染細胞系からは ts mutant は分離されない。

この点不明なことが多いが，ts mutant であることは，そのままでは，風疹ウイルスの場合，持続感染の成立・維持に関係がないように考えられる。なお，なぜ ts mutant が select されたり，されなかったりするのかが問題点は残るが。

i) 畸形発生機序へのアプローチ

以上の in vitro における考えが，そのまま，in vivo にあてはまるかどうか問題が多いが，一つの考えられ得る仮説的モデルを提供してくれる。

provirus として染色体上に存在する風疹ウイルス DNA が, oncogenic RNA, DNA ウイルスと似た方法で(但し, 作用は逆に), 例えば, 染色体上の regulator gene または, operator gene として, 機能し, 細胞増殖を抑える(腫瘍ウイルスでは, 促進する)可能性が考えられる得る. また, 風疹provirus が, 染色体上に integrate する部位および, その機能の発現が起こる時期——多分感染する時期と関係があると考えられるが——によって, 眼・心臓・耳その他と色々な部位に畸形がおこると考える. 前述のように, 風疹ウイルスによって起こる畸形が, 慢性持続感染と細胞増殖の抑制によるとすれば, provirus が細胞増殖を抑えるという証拠は今のところないが, 解明への一つの手がかりを与えてくれるものと考えている. 畸形発生をみる手頃な実験動物系が今のところないという点をも含めて, 問題は多いが, 持続感染 HeLa-M33 細胞系を通して, 畸形発生機序を, もう少し, はっきりさせて行きたいと考えている.

参 考 文 献

- 1) 植田浩司ほか: 1965年~1966年沖縄地方に多発した先天性風疹について: 小児科, **8**, 834-841, 1967.
- 2) Heggi, A.D.: Rubella. Current concepts in epidemiology and teratology: Pediatric Clinic of North America, **13**, 251-266, 1966.
- 3) Krugman, S. and Ward, R.: Infectious diseases of children. 279-295, C.V. Mosby Co., 1968.
- 4) Rendle-Short, J.: Maternal rubella: Lancet, **2**, 373-376, 1964.
- 5) Lundström, R.: Rubella during pregnancy: Acta pediat. Suppl. **133**, 1962.
- 6) 植田浩司ほか: 沖縄地方の先天性風疹患児の追跡調査: 医学のあゆみ, **69**, 86-88, 1969.
- 7) Dudgeon, J. A.: Maternal rubella and its effect on the foetus: Arch. Dis. Child., **42**, 110-125, 1967.
- 8) 加藤裕久ほか: 先天性風疹症候群における心疾患: 医学のあゆみ, **63**, 64-69, 1967.
- 9) 奥野良臣, 高橋理明: 麻疹・風疹(朝倉), 1969.
- 10) Alford, C.A. et al.: Virologic and serologic studies on human products of conception after maternal rubella: New Engl. J. Med., **271**, 1275-1281, 1964.
- 11) Naeye, R.L. and Blanc, W.: Pathogenesis of congenital rubella: J.A.M.A., **194**, 1277-1283, 1965.
- 12) Plotkin, S.A., Boue, A. and Boue, J.G.: The in vitro growth of rubella virus in human embryo cells: Amer. J. Epidem., **81**, 71-85, 1965.
- 13) Selzer, G.: Virus isolation, inclusion body and chromosomes in rubella-infected human embryos: Lancet, **2**, 336-337, 1963.
- 14) Monif, G.R.G. et al.: Isolation of rubella virus from products of conception: Amer. J. Obst. Gynec., **91**, 1143-1146, 1965.
- 15) C-H. Bonsdorff and Vaheri, A.: Growth of rubella virus in BHK21 cells: Electron microscopy of morphogenesis: J. gen. Virol., **5**, 47-51, 1969.
- 16) Holmes, I.H. and Warburton, M.F.: Is rubella an Arbovirus?: Lancet, **2**, 1233-1236, 1967.
- 17) Russell, B., Selzer, G. and Goetze, H.: The particle size of rubella virus: J. gen. Virol., **1**, 305-310, 1967.
- 18) Hovi, T. and Vaheri, A.: Rubella virus-specific ribonucleic acids in infected BHK21 cells: J. gen. Virol., **6**, 77-83, 1970.
- 19) Suganuma, M.: unpublished data.
- 20) Fraenkel-Conrat, H.: Compr. Virol. **1**, 45-46, 1974.
- 21) Best, J. M., Banatvala, J. E., Almeida, J. D. and Waterson, A.P.: Morphological characteristics of reublla virus: Lancet, **2**, 237-239, 1967.
- 22) Hovi, T. and Vaheri, A.: Infectivity and some physicochemical characteristics of rubella virus ribonucleic acid: Virology, **42**, 1-8, 1970.
- 23) Liebhafner, H. and Gross P.A.: The structural proteins of rubella virus: Virology, **47**, 684-693, 1972.
- 24) 東 昇, 石田名香雄: 新ウイルス学 I (朝倉), 1972.

- 25) Maeno, K., Yoshii, S., Nagata, I. and Matsu-
moto, T : Growth of newcastle disease virus
in a HVJ carrier culture of HeLa cells : Viro-
logy, **29**, 255-263, 1966.
- 26) Homma, M., Ohira, M. and Ishida, N.: Spe-
cific chromosome aberration in cells persistently
infected with Type 2 hemadsorption virus:
Virology, **34**, 60-68, 1968.
- 27) Ebina, T., Takahashi, K., Homma, M. and
Ishida, N : Alkaline phosphatase activity of
HeLa-S3 cells persistently infected with hem-
adsorption Type 2 virus: Virology, **39**, 597-599,
1969.
- 28) Thacore, H. R. and Youngner, J. S. : Cells
persistently infected with newcastle disease
virus. I. Properties of mutant isolated from
persistently infected L cells : J. Virol., **4**, 244-
251, 1969.
- 29) Walker, D.L. and Hinze, H.C. : A carrier
state of mumps virus in human conjunctiva
cells. I. General characteristics. J. Exp. Med:
116, 739-750, 1962.
- 30) Takemoto, K. and Habel, K. : Virus-cell
relationship in a carrier culture of HeLa cells
and Cocksackie A9 virus : Virology, **7**, 28-44,
1959.
- 31) Minagawa, T. : Studies on the persistent
infection with measles virus in HeLa cells. II.
The properties of carried virus : Jap. J. Micro-
biol., **15**, 333-340, 1971.
- 32) Preble, O.T. and Youngner, J.S.: Tempera-
ture-sensitive mutants isolated from L cells
persistently infected with newcastle disease
virus : J. virol., **9**, 200-206, 1972.
- 33) Shenk, T.F., Koshelnyk, K.A. and Stoller,
V. : Temperature-sensitive virus from *Aedes*
albopictus cells chronically infected with sind-
bis virus : J. Virol., **13**, 439-447, 1974.
- 34) Preble, O.T. and Youngner, J.S. : Tempera-
ture-sensitive viruses and the etiology of chron-
ic and inapparant infections : J. Inf. Dis., **131**,
467-473, 1975.
- 35) Straver, P.J. and van Bakkum, J.G.: Plaque
production by carrier strains of foot-and-mouth
disease virus in BHK-monolayers incubated at
different temperatures : Arch. gesamte Virus-
forsch., **37**, 12-18, 1972.
- 36) ter Meulen, V., Koprowski, H., Iwasaki, Y.,
Kackell, Y. M. and Müller, D. : Fusion of
cultured multiple sclerosis brain cells with
indicator cells : Presence of nucleocapsids and
virions and isolation of a parainfluenza type
virus : Lancet, **2**, 1-5, 1972.
- 37) Lewandowski, L. J., rief, F. S.. verini,
M. A., Pienkowski, M. M., ter Meulen, V.
and koprowski, H.: Analysis of a viral agent
isolated from multiple sclerosis brain tissue :
Characterization as a para-influenza virus type
1. J. virol., **13**, 1037-1045, 1974.
- 38) Field, B.N. : Genetic manipulation of reovi-
rus-a model for modification of disease : New
Eng. J. Med., **287**, 1026-1033, 1972.
- 39) Huang, A. S. and Baltimore, D. : Defective
viral particles and viral disease procosses :
Nature, **226**, 325-327, 1970.
- 40) Huang, A. S. : Defective interfering viruses
: Annal rev. Microbiol., **27**, 101-117, 1973.
- 41) Huang, A.S. and Baltimore, D. : Defective
interfering animal viruses. Compr : Virol., **10**,
73-116, 1977.
- 42) Huang, A.S. : Viral pathogenesis and mole-
cular biology : Bact. Rev., **41**, 811-821, 1977.
- 43) Holland, J.J. and Villarreal, L.P.: Persistent
noncytotoxic vesicular stomatitis virus infecti-
ons mediated by defective T particles that
suppress virion transcriptase : Proc. Nat. Acad.
Sci., **71**, 2956-2960, 1974.
- 44) Schmaljohn, C. and Blair, C.D. : Persistent
infection of cultured mammalian cells by Japa-
nese encephalitis virus : J. Virol., **24**, 580-589,
1977.
- 45) Furman, P. A. and Hallum, J. V. : RNA-
dependent DNA polymerase activity in prepa-
rations of a mutant of newcastle disease virus
arising from persistently infected L cells : J.
Virol., **12**, 548-555, 1973.

- 46) Zhdanov, V.M., Bogomolova, N.N., Gavrilov, V.I., Andzhaparidze, O.G., Deryabin, P.G. and Astakhova, A.N.: Infectious DNA of tick-borne encephalitis virus : *Archiv gesam. Virusforsch.*, **45**, 215-224, 1974.
- 47) Zhdanov, V.M. and Parfanovich, M.I : Integration of measles virus nucleic acid into the cell genome : *Archiv gesam. Virusforsch.*, **45**, 225-234, 1974
- 48) Zhdanov, V.M.: Integration of viral genomes. *Nature*, **256**, 471-473, 1975.
- 49) Simpson, R.W. and Inuma, M.: Recovery of infectious proviral DNA from mammalian cells infected with respiratory syncytial virus : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 3230-3234, 1975.
- 50) Cherednichenko, Y.N., Orlova, N.G., Demidova, S.A. and Orlova, T.G.: Infectivity of DNA recovered from cells persistently infected with SV 5 Paramyxovirus : *Acta virol*, **21**, 412-416, 1977.
- 51) 菅沼, 山地, 渡理 : HeLa 細胞における Rubella virus の干渉現象について : 第20回日本ウイルス学会, ウイルス, **22**, 244, 1972.
- 52) 菅沼, 岩口, 山地, 渡理 : Rubella virus 感染 HeLa 細胞における干渉現象について : 第21回日本ウイルス学会, ウイルス **23**, 365, 1973.
- 53) 菅沼, 岩口, 山地, 渡理 : HeLa-M33持続感染細胞より得た Rubella virus の性状について : 第22回日本ウイルス学会, ウイルス **24**, 206-207, 1974.
- 54) 菅沼, 岩口, 山地, 渡理, 長島 : 風疹ウイルスによる持続感染細胞と, 分離ウイルスの性状について : 第23回日本ウイルス学会, ウイルス **25**, 131, 1975.