

[総説] 非腫瘍原性 RNA ウイルス持続感染とその意義

波 田 野 基 一*

(昭和56年11月2日受付)

要 旨

ウイルス感染細胞の結末は、ウイルスと細胞の組み合わせで一般に異なってくる。その中で、感染ウイルスが細胞と共存して増殖可能な所謂持続感染は、極めて特徴ある感染といえる。この持続感染の一方には、ウイルスがん（動物）があり、非がんウイルスの場合でも一般に難病が多い。ここで対象として、特に非がん RNA ウイルス持続感染をみると、その成立と維持の機作には未だ多くの不明点が残されている。

そこで、我々も HVJ（仙台ウイルス）と風疹ウイルスの持続感染実験を行ったが、持続感染化ウイルスには多くの変異出現がみられた。その中でも、温度感受性変異、弱病原性変異などが持続感染成立と維持にある役割を果たしていた。同時に、これら持続感染腫瘍細胞では、HVJ または風疹ウイルス構成成分が細胞膜へ組みこまれ、細胞膜抗原の異物化が生じていた。その結果、同種動物接種で細胞性免疫が強く誘発され、造腫瘍性の低下、時に消失がみられた。また、かかる HVJ 持続感染化により、本来 semi-permissive に過ぎない牛痘ウイルス感染が完全に permissive に変換せしめられた。

かくて、造腫瘍性消失の持続感染腫瘍細胞の生がん細胞ワクチンへの可能性及び内在持続感染ウイルスの除去（治癒）方法追求などが、がん及び難ウイルス病治療への一つのアプローチになるであろうと我々は考えている。

Key words: HVJ, 風疹ウイルス, 牛痘ウイルス, 持続感染, 変異, 造腫瘍性, 異物化

I. ま え が き

一般にウイルス感染細胞のたどる運命は、ウイルスと細胞の組み合わせで大きく異なる。その様相を細胞のウイルス感受性とウイルスの性格の面より眺めてみると、Table 1 のごとくなる。この中で、ウイルス病との対応で考えれば、lytic infection (Li.; 細胞崩壊感染) と persistent infection (Pi., 持続感染) が問題になる。急性顕性感染症としての局所的（インフルエンザのごとき）または全身的（天然痘のごとき）ウイルス病は、細胞レベルで考えれば Li. の好例である。しかし、これらには今日ワクチンが開発され、その接種による予防が成功しつつ、よほどの変異ウイルスの出現なき限り、その発生・流行は抑制されているといえよう。

これに比し、著明なウイルス性細胞変性 (CPE) を欠きつつ、細胞とウイルス増殖の共存と一応定義づけ得る¹⁻³⁾ Pi. は、今日多くの問題ウイルス病の主役をなしつつ、さらにウイルス発がんにおけるウイルスの在り方に相通ずるものをもっている。この Pi. もウイルス分離・症状などとの関連で Table 2 のパターンにさらに別け得る。

この様な Pi. の問題点とそれらに関連した 2・3 の我々の実験結果をさらに概説してみたい。

II. 持続感染成立・維持因子について

生体レベルの持続・潜伏感染に対応し得る細胞レベルの実例は、今日、Table 3 のごとく数多く知られている¹⁻³⁾。これをみると、現在はほとんどのウイルスが Pi.

* 金沢大学がん研究所ウイルス部

Motoichi HATANO: Significances Involved in Some Events of Persistently Infected Cells with Non-oncogenic RNA Viruses.

Department of Virology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 920.

Received for publication, November 2, 1981.

Table 1. Fate of virus-infected cells in relation to pattern of virus infection

Cells	Virus	Production of progeny virus	Fate of infected cells	Pattern of virus infection
Susceptible	Cytocidal or virulent virus	+++	CPE*.....Cytolysis.....Death	: Lytic infection
	Moderate virus	++	Cell growth without CPE	: Persistent (chronic) infection
Partially susceptible	Many viruses	+	Weak CPE.....Coexistence of both cells and viruses growth	: Persistent infection (Carrier state)
Insusceptible	Many viruses	—	CPE.....Occasional death	: Incomplete infection
	"	—	Survival without CPE	
	Tumor virus	—	Survival with transformation	
	Every virus	—	No changes	: No Infection

* CPE: Cytopathogenic effect

Table 2. Pattern of virus persistent infection

Type of virus infection	Virus release onset late		Symptom	Antibody	Examples
Latent infection	(+)	(—)	Recurrent type	(+)	Herpesviridae
Chronic infection	(—)	(+)	(—)	(+)	Many DNA viruses, Hepatitis B virus
	(+)	(+)	Late type	(+)	Animal Leukemia virus, Viruses related to autoimmune diseases (LCM*virus etc.)
Slow infection	(+)	(+)	Progressive and chronic type	(+)	Hepatitis B virus (chronic case)
	(+)	(+)	Progressive and lethal type with immune anomalies	(+) or (—)	SSPE,* Scrapie, Kuru etc.

* Lymphocytic choriomeningitis virus, Subacute sclerosing panencephalitis.

可能といえる。ただ、実験的に容易なもの(Paramyxo-, Rhabdo-, Toga-, Arena-viridae など)と若干困難なもの(Myxo-EBVを除く Herpes-viridae), 本来腫瘍原性があり細胞がん化に伴う Pi. の当然なもの(Retro-, Adeno-, Papova-, Pox-viridae など), やや特殊なケースとしての B 型肝炎(HBV)と Epstein-Barr ウイルス(EBV)がある。この中、腫瘍原性ウイルスによる当然の Pi. は別のカテゴリーなので省いて、ここでは非腫瘍原性ウイルスの Pi. につき論じたい。

DNA 型ウイルスの Pi. または潜伏感染は、一般にウイルスゲノム DNA が宿主細胞染色体へ何らかの形で組みこまれて成立・維持されている^{1,3)} (HBV; EBV やサイトメガロウイルスなどの Herpes-viridae)。しかしながら、RNA 型ウイルスの場合は、DNA 型のごときゲノム内在機作の明快な実証は現在ない。RNA 型ウイルス Pi. の in vitro 研究の中心をなす Paramyxo-(HVJ, NDV, 麻疹, おたふくかぜなど), Rhabdo-

(VSV, 狂犬病など) 及び Toga- (風疹など) viridae で得られた考えを整理すると Table 4 になる。

この中、1) の温度感受性 (temperature sensitive = ts) 変異株—弱病原性と小型ブラック形成能を併せもつ—の重要性 (Prebled Youngner, 1975⁴⁾) と、2) の欠損性干渉性粒子 (Defective Interfering Particle = DIP) の干渉能—ウイルス RNA またはその mRNA 合成能への干渉—を重視する説 (Holland & Villareal, 1974⁵⁾) が有力である。ただ、両者ともウイルスゲノムの細胞内の存在・持続様式にはふれていない。それが上述 DNA 型ウイルス Pi. と同じという 3) の説²⁾ は、否定する人も多く追試で確認されていない。その他、4), 5) の生体レベルでの因子も実証性に乏しい。

III. RNA 型ウイルス持続感染細胞の特性

今日得られているものをあげると Table 5 になる。この中、1) ~ 3) は Pi. 細胞の同定にも頻用される

Table 3. Virus persistent infection *in vitro*

RNA Virus	DNA Virus
1) Paramyxoviridae : HVJ (Sendai V., Maeno et al. 1966) HA 2 (Ishida et al. 1964) PIV 3 (Cole et al. 1972) NDV (Henle et al. 1958) Measles V. (Rustigian 1962) Mumps V. (Walker et al. 1962)	1) Adenoviridae : Adeno V. (Rowe et al. 1953)
2) Myxoviridae : Influenza V. (Gavrilov et al. 1972)	2) Herpesviridae : HSV-1 (Douglas et al. 1970) HSV-2 (Rawels et al. 1969) EBV (Schneider et al. 1975) CMV (Rapp et al. 1975) VZV (Hope-Simpson 1965)
3) Rhabdoviridae : VSV (Holland et al. 1974) Rabies V. (Fernandes et al. 1964)	3) Papova viridae : Papilloma-Polyoma-SV 40 Human Papova V. JCV (Padget et al. 1971) BKV (Gardner et al. 1971)
4) Togaviridae : JBV (Gavrilov et al. 1974) WEEV (Shimizu, et al. 1969) Sindbis V. (Pelleg 1969) Rubella V. (Rawels et al. 1972)	4) Poxviridae : Rabbit myxoma & fibroma V.
5) Arenaviridae : PARANA & LCM V. (Staneck, et al. 1972)	5) HBV : (Alexander et al. 1976)
6) Retroviridae : Oncovirinae : Avian & Mammalian V.	

Table 4. Factors involved in the establishment and maintenance of RNA virus persistent infection.

1) Temperature-sensitive (ts) mutant : Preble & Youngner, 1975 (low virulent or cytopathogenic mutant) (small plaque mutant)
2) Defective interfering particle (DIP) : Holland & Villareal, 1974 (interfering activity····transcription depression, IF (-)) (subgenomic RNA) ; (less mRNA) ; (low infectivity····helper virus)
3) Integration of viral complementary DNA into carrier cell's DNA viral RNA······cDNA by 1) cellular RDDP 2) endogeneous virus RDDP Transfection···· positive ; Zhdanov 1975, Simpsom et al. 1975 negative ; Holland et al. 1976 RDDP (+) mutant isolation : Furman et al. 1973, Sato et al. 1976
4) Disorder of last virus assembly in membrane (virus envelope glycoprotein ?)
5) Low response of immune system in vivo

特性で、或る意味の定義にもなり得る。例えば、1) のウイルス抗原の検出は、ウイルス特異的蛍光抗体染色で通常の増殖・形態を示す全または一部細胞内に可能である (Fig. 1)。

さらに、2) の特異抗体またはインターフェロンを作らせても細胞内ウイルス抗原は少なくなるが完全に消失 (治癒) せず、3) 同一ウイルスの再感染に抵抗性を示しつつ、もとの非 Pi. 親細胞とほぼ同じ形態と増殖能

Table 5. Characteristics of virus persistently infected cells

virus carrier cells; regulated infection; symbiotic infection
1) Detection of viral antigen & infectious virus (every or some cell; antigen alone or both)
2) Effect of specific antibodies or interferon (non-yielder-state, antigen(+), cure(-))
3) Effect of superinfection (immunity against homologous virus; growth of heterologous virus)
4) Block in viral late maturation (regulative inhibition of virus assembly)
5) Xenogenization of cell antigenicity by virus-coded components (interferon production; augmented induction of cellular immunity; reduced transplantability)
6) Possible mutation of carrying virus (ts; DIP; low CPE; molecular weights of viral components.....M, P etc. in HVJ; protease activation mutant in HVJ)

をもっているというのが多くのウイルス Pi. 細胞の共通特性である。さらによく調べると、Table 5, 4), 5), 6) などの性質がみられる場合がある。しかし、これらは各ウイルス個々に特有の現象で、一般性は少ないかもしれない。

私どももこれら Pi. の特異的問題を HVJ (Hemag-

glutinating Virus of Japan = 仙台ウイルス) と Rubella virus (風疹ウイルス) Pi. 化各種細胞で追求して来た。その中、異種ウイルスの増殖促進効果 (permissive cell 化); Pi. 化腫瘍細胞の造腫瘍性の低下または消失; Pi. ウイルスの諸変異-ts, 構成蛋白分子量またはその活性化機構—など前述 Table 5 の 3), 5), 6) に相当する問題を以下述べてみたい。

IV. HVJ 持続感染の異種ウイルス = 牛痘ウイルス (cowpox virus=CPV) 増殖促進効果

CPV 感染 2~6 時間の初期に細胞膜表面に見出される CPV 特異的 S 抗原 (cell surface antigen⁶⁾) を腫瘍細胞膜抗原の異物化⁷⁾—腫瘍免疫療法への応用—として用いるために、いくつかのヒト及びハムスター腫瘍細胞で CPV S 抗原産生を試みた。ところが、この産生は細胞種依存性が強く、特にハムスター腫瘍細胞 (THEL) は低産生能を示し、異物化の所期の目的にはそぐわなかった。

そこで高産生能への変換の試みがいくつか行われ、至適濃度 trypsin 添加による増強が見出された⁸⁾。その外に、HVJ の同時重複感染⁹⁾及び Pi.⁹⁻¹¹⁾が、さらにより強い促進効果を引き起こした (Table 6)。この増強促進効果には、HVJ ゲノム発現の必要ことが HVJts Pi. 細胞培養温度を 35°C→39°C に上昇させた CPV 感染実験で証明されている¹⁰⁾ (39°C は ts に非許容温度)。

さらに、この増強機作解明を試み、CPV 吸着は変らないのに、HVJ Pi. または同時感染 THEL 細胞では細胞内初期 CPV 増殖過程の著しい促進^{10,11)}が見出された。特に、初期増殖の第一歩: 脱殻過程に働らく THEL 細胞内蛋白分解酵素 (lysosomal 酵素も含む) 活性は、HVJ

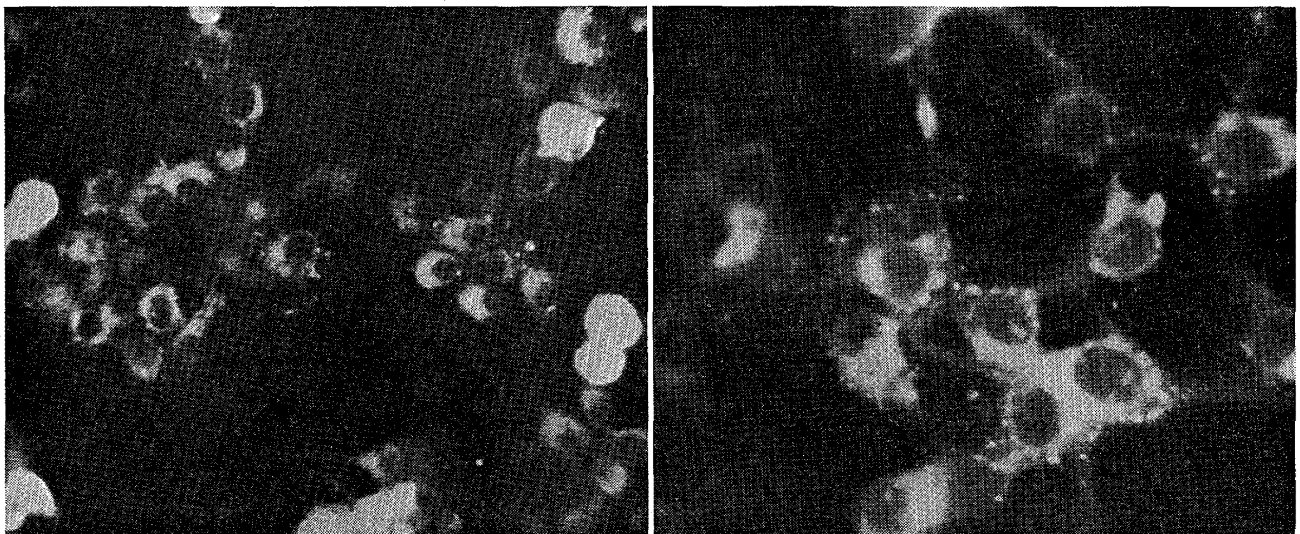


Fig. 1. Fluorescent antibody staining of acetone-fixed (A) HVJ (200×)- and (B) rubella virus (400×)- carrier cells.

Table 6. Relationship between establishment of persistent infection with HVJ wild type or ts mutant and CPV S-antigen formation by CPV, 5 p.f.u./cell.

Cells	HVJ infected ⁺	% S-antigen positive cells (ratio)*					
		Control (uninfected)	Passage numbers of THEL cells after HVJ infection*				
			2	7	10	20	40
THEL	/	39.0(1.0)#	/	/	/	/	/
	HVJ _{TS}	/	47.0(1.2)	59.1(1.5)	82.1(2.1)	89.9(2.3)	85.9(2.2)
	HVJ _{TSE} **	/	62.4(1.6)	/	70.0(1.8)	74.1(1.9)	78.1(2.0)
	HVJ _o **	/	/	/	27.3(0.7)	59.2(1.5)	74.2(1.9)
THEL-HVJ	/	76.2(2.0)#	/	/	/	/	/

* Observation at 8 hs after CPV infection by fluorescent antibody staining

+ At 35° C with m.o.i.=1.0 c.i.u./cell

Mean of 5 experiments

** HVJ wild type (HVJ_o) and HVJ_{ts} grown in developing chick embryo (HVJ_{TSE})

・感染または Pi. により明らかに増強されていた¹¹⁾。そこで、¹⁴C-thymidine ラベル CPV をマーカーに、³H-thymidine ラベル CPV の THEL 及び Pi. 細胞 = THEL-HVJ 細胞内脱殻過程を sucrose gradient centrifugation で比較した (Fig. 2)。Fig. 2 にみる通り Pi. 細胞内では感染後 2 時間で CPV はより軽い粒子を示す位置にカウントのピークがみられ、3 時間後ではさらに軽量化した。

しかし、親 THEL 細胞内では、マーカー：¹⁴C-ラベル CPV と同じ密度粒子の位置に ³H-CPV のピークが止まり、変化しなかった。このことは、脱殻第一段階：CPV の外側膜と内側膜除去¹²⁾による軽量化が HVJ Pi. により促進されたことを示している。かくて、脱殻関与酵素活性の上昇、初期増殖 (脱殻) 過程促進が HVJ Pi. 化 (同時感染でも) により惹起せられ、その結果、CPV S 抗原産生増強促進に至ったと結論づけられた。

V. ウイルス持続感染腫瘍細胞の造腫瘍性低下・消失

腫瘍細胞の一般にもともと低い免疫原性を人工的に高めて、生体で抗腫瘍性免疫誘発を増強させ、がんの免疫療法までに発展させんとする試みがなされている。ウイルス感染^{13,14)}、化学物質処理¹⁵⁾、異種細胞との融合¹⁶⁾などである。この中、ウイルス感染を用いた方法は、いずれもウイルス感染により生じた腫瘍細胞膜抗原の変換¹⁴⁾・異物化¹⁷⁾をもたらす故と一般に考えられている。

上述の CPV S 抗原産生の問題もかかる目的であったが、それには不適と判断された。しかし、Table 7 に示すごとく、ハムスター腫瘍細胞 (*in vitro* 自然がん化細

胞 = THEL と *in vivo* メチルコラントレイン誘発がん細胞 = GM 2) は、HVJ Pi. 化により、明らかにその造腫瘍性を低下または消失していた¹⁷⁻²⁰⁾ (allogeneic または syngeneic 両系で)。さらに、HVJ 同様の RNA 型被膜ウイルス：風疹ウイルス (Matv 株、阪大微研由来弱毒生ワクチン株) Pi. 化も同様の効果をもたらした^{18,19)}。しかも、HVJ_{ts} Pi. 細胞の培養温度を HVJ_{ts} 非許容温度 39°C に変換した後の接種実験で、本現象にも Pi. 化 HVJ_{ts} ゲノム発現の必要なことが証明された¹⁸⁻²⁰⁾。同様の低下消失現象は、ハムスターのみならず、マウス腫瘍細胞への HVJ_{ts} または風疹 Matv 株 Pi. でも観察された¹⁹⁾。

本現象が生体の免疫反応と関連するであろうことは、X線照射ハムスターに接種すると、HVJ Pi. 細胞造腫瘍性が部分的に回復することからも推察できた¹⁹⁾。そこで、正常、THEL または THEL-HVJ_{ts} 細胞接種ハムスター脾細胞の細胞障害活性 (CMT) が両細胞を標的細胞として比較検討された。

Table 8 に示すごとく、HVJ_{ts} Pi. 細胞接種ハムスター脾細胞は、ほとんどの場合有意の活性を示したが、非 Pi. 親細胞接種のそれは逆に陰性が多かった¹⁸⁻²⁰⁾。同様のマクロファージ遊走阻止試験 (MMIT) でも、HVJ_{ts} Pi. 系でより強い活性がみられた¹⁸⁻²⁰⁾。さらに、ここでも HVJ_{ts} 非許容温度 (39°C) 培養により、HVJ 抗原の消失及び造腫瘍性の回復と連動して、陽性 MMIT の陰性化が認められた¹⁸⁻²⁰⁾。

これらを総合すると、造腫瘍性低下消失は、Pi. 化 HVJ_{ts} ゲノム発現により細胞膜に組みこまれた HVJ

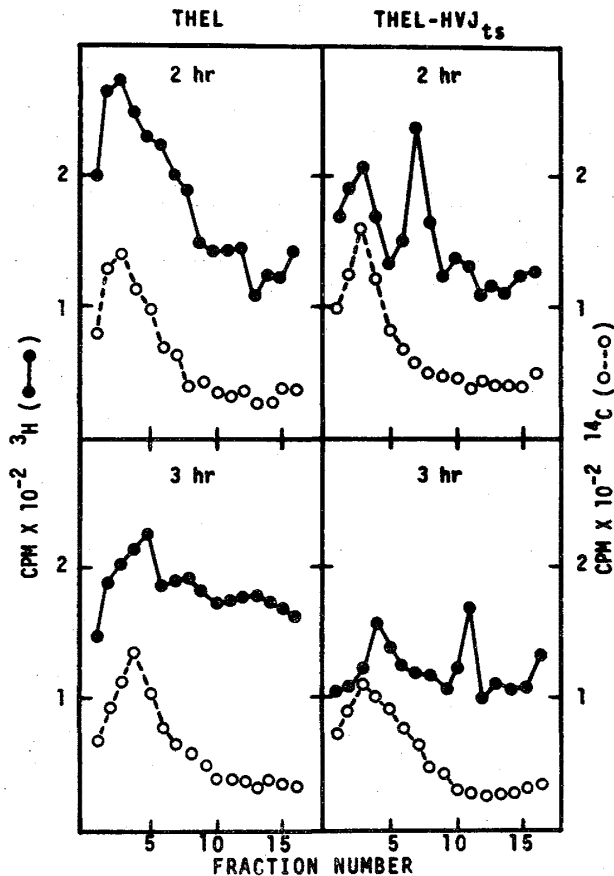


Fig. 2. Sucrose density gradient analysis of intracellular CPV in THEL or THEL-HVJ_{ts} cells infected with ³H-thymidine-labelled CPV in the presence of 20 μ g/ml cytosine arabinoside.

³H-thymidine-labelled CPV was adsorbed onto THEL or THEL-HVJ cells ($3-6 \times 10^7$) for 40 minutes at 34°C at an input multiplicity of 50 pfu/cell in the presence of 20 μ g/ml cytosine arabinoside. The cultures were incubated in the presence of the drug further for 80 (total 2 h) or 140 min (total 3 hr) after unabsorbed CPV was well removed by the washing the infected cells. The infected cells were scraped off, collected by low speed centrifugation and suspended in SSC (0.15 M sodium chloride, 0.015 M sodium citrate, pH 6.8). After addition of ¹⁴C-thymidine-labelled CPV, the samples were sonicated in a Branson'sb sonifier, U.S.A. in the cold. The subsequent procedures were the same as privously described. (12). ³H-thymidine-labelled CPV (●—●); ¹⁴C-thymidine-labelled CPV (○---○).

構成成分 (Fig. 1 及び SDS 電気泳動法で確認可能^{21,22}) が腫瘍細胞膜抗原性を 変換—異物化²¹ した結果と考えられる。かかる異物化が生体に細胞性免疫 (CMT, MMIT など) を強く誘発し、腫瘍形成抑制—低下消失に至ったのであらう。なお、HVJ Pi. 細胞は *in vitro* で正常ハムスター脾細胞と co-culture すると、インターフェロンを産生させ得る^{23,24}。となると、生体内でもインターフェロンによる NK (natural killer) 細胞活性増強が本現象に関与している可能性も否定できず、今後の検討に残されている。

VI. HVJ 持続感染に伴う変異 HVJ の出現

(1) P 蛋白, 温度感受性 (ts) 並びに弱病原性各変異 negative strand RNA ウイルスの一つである HVJ は、粒子内に RNA polymerase を含み、感染細胞内のウイルス特異的 RNA 合成の端緒をなしている。この RNA polymerase 蛋白 (P 蛋白) は、精製濃縮 ³⁵S-メチオニンラベル HVJ の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で他のウイルス構成蛋白 (HN, F₀, NP, M など) と共に検出可能である (Fig. 3)。

そこで前述 THEL-HVJ Pi. 及び G2 (ヒト骨巨細胞腫由来細胞)—HVJ Pi. 細胞より分離・クローニングした HVJ Pi. を SDS-PAGE で調べた。その結果、G2-HVJ Pi. 由来6クローンはすべて (代表: HVJ_{piG} cl-14), THEL-HVJ Pi. 由来6クローン中1クローン (HVJ_{pit} cl-27) 各々は、Fig. 3 に示すごとく、P 蛋白が野生株 (HVJ₀) の 79K より軽い分子量の 77K となっていた²¹。しかし、他の構成蛋白分子量は、親 HVJ₀ と同じで変化なかった。さらに、これら全クローン HVJ Pi. はすべて、ts 変異株に既に変異し、温度交換実験でその ts 部位は増殖初期にあることが判明した²¹。HVJ_{piG} cl-14 の HVJ 特異的 RNA 合成をみると、Fig. 4 に示すごとく、非許容温度: 39°C では mRNA (18S) も viral RNA (50S) 合成もほとんど見られなかった (RNA-変異)。許容温度 (32°C) でもこの ts 変異株 (HVJ_{piG} cl-14) の RNA 合成能は、野生株 (HVJ₀) のそれらの約 1/2 以下と減少し、P 蛋白軽量化との関連を示唆していた。また、この HVP_{piG} cl-14 は、HVJ₀ に比べると低~弱病原性で、容易に細胞を Pi. 化し得た^{21,22}。この変異株は、HVJ₀ の CPE 出現増殖を強く干渉抑制し、HVJ₀ よりの ts 変異株出現にも一役買って、ts Pi. 化をより容易ならしめる機作^{4,25}の一つをなしていた²²。

(2) protease activation 変異

Table 7. Tumorigenicity of HVJTs- or Rubella virus (Matv) -carrier tumor cells.

Exp.	Cells	Dosis (cells/hamster)	Tumor incidence at			Latent periods (days)
			2 w	4 w	8 w	
1#	THEL	10 ⁴	9/14 (2.1±1.5)*	14/14 (13.5±7.8)	14/14 (43.5±10.2)	10-18
	THEL-HVJ _{Ts}	10 ⁴	0/14 (0)	2/14 (2.0)	6/14 (8.6±4.3)	28-42
		10 ⁴⁺	4/6 (1.5±0.9)	6/6 (15.8±4.7)		10-18
	THEL-Matv	10 ⁴	0/11 (0)	2/11 (1.0)	2-11 (5.8)	23-28
2#	GM2	10 ⁶	1	4/4 (18.0±2.5)		7
	GM2-HVJ _{Ts}	10 ⁶	1	0/4 (0)		0
	GM2-Matv	10 ⁶	1	1/3 (5.0)		7

Exp. 1: Allogeneic system of non-inbred golden hamster; Exp. 2: Syngeneic system of inbred golden hamster, GN strain.

* Mean diameter of tumor (mm) ± S.D.

+ THEL-HVJ_{Ts} cells cultured at non-permissive temperature of HVJ_{Ts}, 39°C, for 5 days

Table 8. Cytotoxicity test by spleen cells from hamsters bearing THEL or THEL-HVJ_{Ts} tumors

Exp. Target cells	Attackers (spleen cells) from						
	Normal hamster Total lysis (%)	THEL bearer			THEL-HVJ _{Ts} bearer		
		Total lysis (%)	Net (%)	P<	Total lysis (%)	Net (%)	P<
1. THEL	29.1±1.6	32.9±3.2	3.8	NS	39.5±2.6	10.4	0.005
THEL-HVJ _{Ts}	24.9±1.4	24.2±2.4	-0.7	NS	34.2±6.5	9.3	0.005
2.*THEL	17.7±2.9	16.9±2.7	-0.8	NS	31.5±4.4	13.8	0.005
THEL-HVJ _{Ts}	16.7±2.8	14.5±1.3	-2.2	NS	27.6±3.1	10.9	0.005
3. THEL	32.3±3.8	35.9±2.0	3.6	0.05	43.7±3.0	11.4	0.005
THEL-HVJ _{Ts}	18.3±4.7	17.4±2.8	-0.9	NS	29.0±2.7	10.7	0.005
4. THEL	46.4±1.2	40.0±3.0	-6.4	NS	55.2±1.0	8.2	0.005
THEL-HVJ _{Ts}	32.3±2.3	19.8±2.4	-12.5	NS	46.4±6.0	14.1	0.005
5. HEKII	36.9±4.1	21.3±3.0	-15.6	NS	38.3±2.3	1.4	NS
HEKII-HVJ _{Ts}	32.6±2.4	20.4±2.4	-12.2	NS	37.4±1.2	4.8	0.010

* Attackers (spleen cells) were used after preculture for overnight at 37°C.

Attacker cells (spleen cells) were obtained at 14 days after inoculation of 1×10⁴ THEL or THEL-HVJ_{Ts} cells.

Attacker: Target cell ratio was 5:1. NS: Not significant at P<0.05

HVJ は一般に trypsin など protease 作用で構成糖蛋白 F₀ が cleavage をうけ、F₁ と F₂ となって種々の生物活性(感染性, 溶血, 細胞融合など)を示す²⁶⁾。この cleavage に必要な protease をもつ細胞は, 所謂増殖許容 (permissive) 細胞になり得て, 感染価の as-

say などに使われている。

そこで, trypsin のみが cleavage enzyme である HVJ cl-1 より, 異なる protease: elastase で cleavage 可能な変異株 (HVJ_e) の分離を HVJ cl-1 の Pi. 細胞上で試みた。同時に, mutagen: ニトロソクアニジン

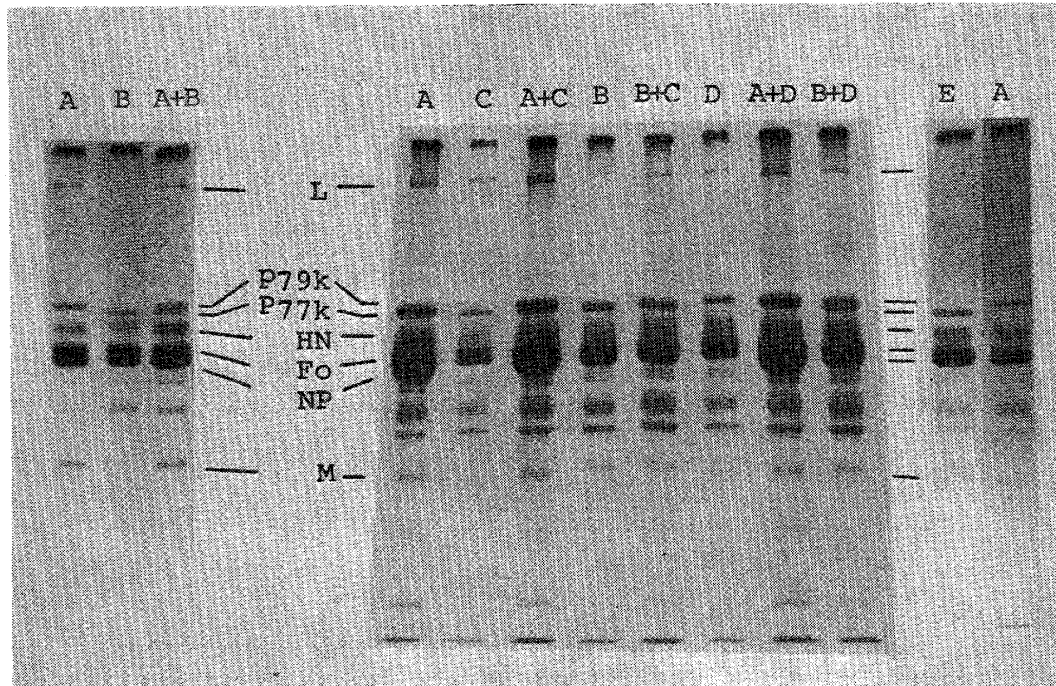


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of HVJ_o (A), HVJ_{piG} cl-14 (B), HVJ_{piT} cl-27 (C) and HPJ_{piT} cl-15 (D). Infected LLMK 2 cells were incubated at 32°C for 48 hours and labelled with ³⁵S-methionine (10 uci/ml) for 3 hours. At 24 hours after labelling, virus released in the medium was harvested and purified. The virus samples were subjected to electrophoresis and processed for autoradiography as previously described (21, 22). Migration is from top to bottom.

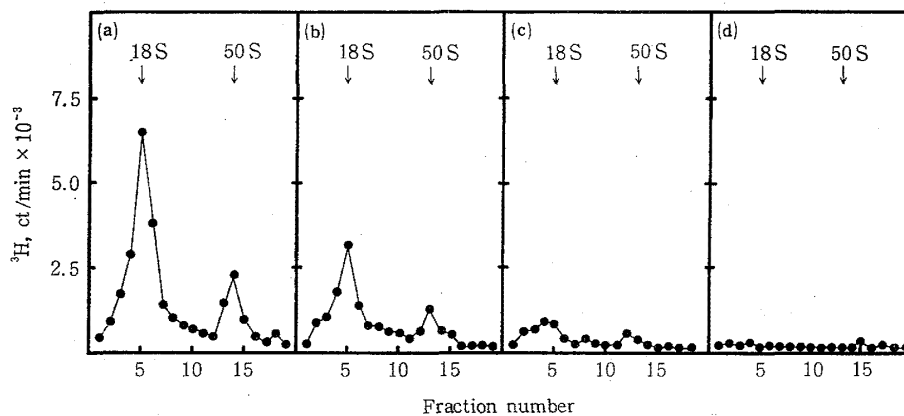


Fig. 4. SDS-sucrose density gradient analysis of virus specific RNA from CEF cells infected with HVJ_o (wild type) or HVJ_{piG} Cl-14. CEF cell monolayers were infected with virus, 5 p.f.u./cell and incubated at 32°C. At 24 hours after infection, one group of cultures was shifted to 39°C. After 3.5 h-incubation, each group was treated with 20 µg/ml of Actinomycin D for 30 minutes and labelled for 2 hours with 20 uci/0.5 ml of ³H-uridine in the presence of the drug. RNA extraction, centrifugation and radioactivity determination were carried out as previously described (21, 22). The sedimentation positions of 50_s and 18_s RNAs were determined by ³H-uridine-labelled CEF RNAs extracted in the same way as described above.

(a) cells infected with HVJ_o and labelled at 32°C; (b) cells infected with HVJ_{piG} cl-14 and labelled at 32°C; (c) cells infected with HVJ_{piG} cl-14 and labelled at 39°C; (d) mock-infected cells and labelled at 32°C.

Table 9. Mutation frequency of elastase-activated mutants in culture media of lytically or persistently HVJ cl-1-infected cells

(a) Lytically infected with HVJ cl-1	In the presence of MNNG ($\mu\text{g/ml}$)			
	0	2.5	5.0	10.0
GM 2	7.1×10^{-6}	1.4×10^{-5}	2.8×10^{-5}	3.6×10^{-5}
Vero	$< 6.7 \times 10^{-7}$	6.7×10^{-6}	3.6×10^{-5}	2.1×10^{-5}
LLCMK 2	$< 6.7 \times 10^{-7}$	3.3×10^{-6}	4.2×10^{-6}	1.9×10^{-5}

(b) Persistently infected with HVJ cl-1 [#]	Passage number			
	12	31	50	100
GM 2-HVJ cl-1	2.5×10^{-4}	5.0×10^{-5}	1.0×10^{-4}	1.0×10^{-4}
Vero-HVJ cl-1	$< 1.0 \times 10^{-5}$	1.0×10^{-5}	2.5×10^{-5}	NT [†]
LLCMK 2-HVJ cl-1	$< 1.0 \times 10^{-5}$	5.0×10^{-5}	1.0×10^{-4}	NT

* Cell monolayers were infected with HVJ cl-1 at an input multiplicity of 5 p.f.u./cell and incubated in serum-free media at 34°C in the absence or presence of MNNG. After 72 h, culture media were harvested and assayed for mutation frequency at 32°C.

[#] Cell monolayer were incubated in serum-free media at 34°C. After 24h, culture media were harvested and assayed for mutation frequency at 32°C.

[†] Not tested.

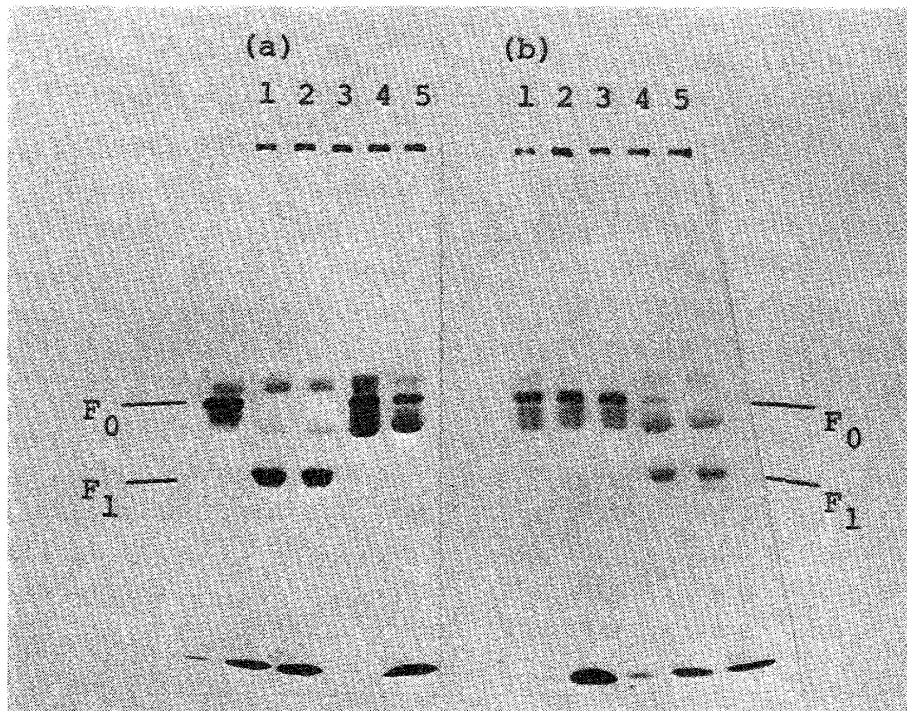


Fig. 5. Cleavage of F_0 glycoprotein of HVJ cl-1 (a), and HVJ_{pi-e} cl-5003 (b) by trypsin and elastase. ^3H -glucosamine-labelled virions grown in LLCMK 2 cells were incubated with no protease (1), 4 $\mu\text{g/ml}$ (2), or 8 $\mu\text{g/ml}$ (3) trypsin and 20 $\mu\text{g/ml}$ (4) or 40 $\mu\text{g/ml}$ (5) elastase. All these samples were analyzed by 10% polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography as previously described (21, 22).

(MNNG) 2.5~10.0 $\mu\text{g/ml}$ 存在下²⁷⁾で lytic infection (Li.) を起させ, elastase 変異株 (HVJ_e) の出現を計った (Table 9)。得られた HVJ_e は, Fig. 5 に示すご

とく, elastase のみで $F_0 \rightarrow F_1$ (F_2 は検出できぬ SDS-PAGE の条件) への cleavage をうけるが (Fig. 5, (b), 4), 5)), trypsin では F_0 の cleavage はない

(Fig. 5, (b), 2), 3)). その結果, HVJ_eは elastase 存在下でのみ LLCMK₂細胞で plaqueをつくり, trypsin は無効である (HVJ cl-1 は逆)。かくて調べた変異出現頻度を比較すると, Table 9 に示すごとく, Pi. 継代培養では Li. 時 (MNNG, 0 µg/ml) より HVJ_e 発生が高く (約10倍), MNNG 存在下での Li. に近いかさらにややまっていた。また, その発生頻度は細胞種でも異なり, GM 2 は他の 2 種より高い傾向を示した。

以上, HVJ Pi. 細胞からは, ts-, P 蛋白-, elastase activation-, 及び弱病原性変異株などが分離可能で, Pi. における HVJ 変異の起り易さを示していた。これら各変異の相関関係は不明であるが, 各々独立して生ずる例—HVJ_e と HVJ_{ts} の間で—も知られている。ただ, 我々の場合, M 蛋白変異株²⁸⁾や VSVpi. でいわれる DIP²⁹⁾は検出できなかった。

VII. 考 察

上述 Pi. 関連現象 (IV~VI) 各々につき, 一般的に考察したい。HVJpi. 細胞における異種ウイルス CPV 増殖促進は, 一般化すれば二種ウイルスの重複感染で, 干渉よりもむしろ一方のウイルスの増殖が増強された例である。同様の例として, HVJ が NDV 増殖を促進し²⁹⁾, SV 40 とアデノウイルス間で hybrid 形成による増殖³⁰⁾, ラウス肉腫 (RS) 細胞で defective RS ウィルス (RSV) が helper virus: ニワトリ白血病ウィルス (ALV) に rescue されて表現型混合ウィルスとして検出³¹⁾される例がある。我々の例は, この中の潜伏化がんウィルスゲノムの rescue-検出とは若干異なるが, non-又は semi-permissive な細胞を他ウイルス感染で permissive に変換し得る可能性—一つの helper ウィルスの役割—として意義がある。同様にマウス白血病ウィルス Pi. 細胞は SV 40 でがん化され易い³¹⁾, また潜在性内在ウィルスとの hybrid 形成がある風疹ウィルス Pi. の例³²⁾も知られているのでウィルスがん化に Pi. が相通ずる所以は, かかる面よりも見直されてよいであろう。

次に, Pi. による腫瘍細胞抗原性の異物化と造腫瘍性低下消失はがん細胞ワクチン創製への一つのアプローチかもしれない。そのために, 異物化用ウィルスはヒトに弱病原性でかつ Pi. 化の容易なものが望ましい。それと生体接種後造腫瘍性のないままに出現の予想される抗腫瘍免疫が腫瘍形成を拒否し得る程強力であってほしい。これら必要条件の中, 我々の HVJ_{ts} または RV-Matv 株は弱病原性で Pi. 容易はよいが, 抗腫瘍免疫誘導が陽性というものの小林ら⁷⁾の Friend ウィルス Pi. のもの

より弱かった¹⁹⁾。最近, 生体内で HVJpi. が “cure” される^{23,24)}ことが判明したので, かかる “cure” がなくて強力なゲノム発現=異物化の強い変異株が今後さらに必要と思われる。

さらに, Pi. に伴う諸変異の発生で, ヒトウィルス病と関連して注目すべきは, 遅発性感染の代表: subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) を起している麻疹ウィルス (MV) であろう。この SSPE-MV は野生株とは甚だ性格を異にして, SSPE に Pi. 化している³³⁾。我々のケースも含めて, Pi. または Lai. はそのウィルスに本来 semi-permissive な細胞で一般に成立している。SSPE も脳細胞という MV には不適格な細胞での Pi. である。かかるウィルス Pi. 細胞は, 生体の NK 細胞の標的として一般に排除の運命にあるが, それを免れての Pi. 中に Pi. ウィルスの変異が生じたのであろう。そして Pi. による変異発生頻度が mutagen 作用下と同等或いはそれ以上という我々の HVJpi. はその点興味深いといえよう。

終りに本文掲載の機会を与えて下さった編集委員会並びに微生物学教室桑田次男教授に厚く感謝致します。

SUMMARY

Among the various fates of virus-infected cells, the ones of virus persistently infected cells seem to be important, because this type of infection is usually found to be correlated closely to many serious human viral diseases. Frequent occurrences of several virus mutations during the persistent infection are now presented to be candidate responsible for the establishment and maintenance of this unique infection with non-oncogenic RNA viruses.

Using the persistently infected tumor cells with HVJ (Sendai virus) or Rubella virus, we have demonstrated an important role of temperature-sensitive mutant having lowered pathogenicity in this persistent infection. In addition, the above two viruses carrying tumor cells showed decreased transplantability after their inoculation to homologous animals. Moreover, the HVJ persistent infection could make hamster cells convert to a completely permissive state for Cowpox virus growth from a semi-permissive one before HVJ carrier establishment.

The perspective involved in these evidences

of our virus carrier cells were discussed with a relation to some problems for researches of human cancer and serious human viral diseases.

文献

- 1) Mims, C. A.: Factors in the mechanism of persistence of viral infections. *Prog. Med. Virol.* **18**, 1-14, 1974.
- 2) Rima, B. K. and Martin, S. J.: Persistent infection of tissue cultured cells by RNA viruses. *Med. Microbiol. Immunol.* **162**, 89-118, 1976.
- 3) Gibbs, C. J. Jr., Memo, G. J. and Diwan, A. R.: Immunology of persistent and recurrent viral infections. In: *Immunological aspects of infectious diseases*. Dick, G. ed., pp. 453-496. MTP Press Lim., Lancaster, 1979.
- 4) Preble, O. T. and Younger, J. S.: Temperature-sensitive mutant viruses and the etiology of chronic and inapparent infections. *J. Inf. Dis.* **131**, 467-473, 1975.
- 5) Holland, J. J. and Villarreal, L. P.: Persistent noncytotoxic vesicular stomatitis virus infections mediated by defective T particle that suppress virion transcriptase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **71**, 2956-2960, 1974.
- 6) Ueda, Y., Ito, M. and Tagaya, I.: A specific surface antigen induced by poxvirus. *Virology* **38**, 180-182, 1969.
- 7) Kobayashi, H. and Senda, F.: Immunogenicity of viable xenogenized tumor cells. In: *Immunological xenogenization of tumor cells*, GANN monograph on Cancer Research No. 23, Kobayashi, H. ed., pp. 27-40, Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo and Univ. Park Press, Baltimore, 1979.
- 8) Tanaka, J. and Hatano, M.: The effect of trypsin on the formation of virus-specific surface antigen in cowpox virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* **21**, 413-416, 1973.
- 9) Tanaka, J., Ogura, H., Fukuda, S. and Hatano, M.: Effect of double infection of cowpox virus-infected cells with paramyxovirus (Sendai virus) on formation of cowpox virus specific cell surface antigen. *Microbiol. Immunol.* **22**, 765-773, 1978.
- 10) Tanaka, J., Morita, O. and Hatano, M.: Factors involved in the expression of cowpox virus-specific antigen on Sendai virus carriers cells. *J. Gen. Virol.* **33**, 87-97, 1976.
- 11) Tanaka, J., Ogura, H. and Hatano, M.: Cellular protease increased in paramyxovirus (Sendai virus) carrier cells possibly responsible for enhanced formation of cowpox virus-specific cell surface antigen. *Arch. Virol.* **53**, 87-99, 1977.
- 12) Joklik, W. K.: The poxviruses. *Ann. Rev. Microbiol.* **22**, 359-390, 1968.
- 13) Svet-Moldavsky, G. J. and Haumburg, V. P.: Quantitative relationship in viral oncogenesis and the possibility of artificial heterogenization of tumors. *Nature* **202**, 303-304, 1964.
- 14) Burns, W. H. and Allison, A. C.: Surface antigens of virus-infected cells. In: *Virus infection and the cell surface*, Cell surface reviews Vol. 2, Poste, G. and Nicolson, G. L., eds., pp. 213-247, North-Holland Pub. Comp., Hague, 1977.
- 15) Czajkowski, N. P., Rosenblatt, M., Gushing, R. R., Vasquez, J. and Wolf, P. L.: Production of active immunity to malignant neoplastic tissue (chemical coupling to an active antigenic protein carrier). *Cancer* **19**, 739-749, 1966.
- 16) Watkins, J. F. and Chen, L.: Immunization of mice against Ehrlich ascites tumor using a hamster/Ehrlich ascites tumor hybrid cell line. *Nature* **223**, 1018-1022, 1969.
- 17) Yamada, T. and Hatano, M.: Lowered transplantability of cultured tumor cells by persistent infection with paramyxovirus (HVJ). *Gan* **63**, 647-655, 1972.
- 18) Hatano, M., Ogura, H., Sato, H. and Tanaka, J.: Decreased transplantability of cultured tumor cells persistently infected with non-oncogenic viruses. In: *Immunological xenogenization of tumor cells*, GANN monograph on Cancer Research No. 23,

- Kobayashi, ed., pp. 91-95, Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo and Univ. Park Paess, Baltimore, 1979.
- 19) 波田野基一, 小倉 寿: センダイウイルス持続感染腫瘍細胞の膜抗原変換, 京大ウイルス研編: ウイルス学の進展—1979—, pp. 20-38, 京都大学ウイルス研究所, 京都, 1979.
- 20) Ogura, H., Sato, H., Tanaka, J., Hatano, M., Fukuda, S. and Morita, O.: Relationship between tumor formation and cell-mediated immunity in hamsters with transplanted HVJ (Sendai virus)-carrying tumor cells. *Gan* **71**, 325-332, 1980.
- 21) Ogura, H., Sato, H. and Hatano, M.: Temperature-sensitive HVJ (Sendai virus) with altered polypeptide derived from persistently infected cells. *J. Gen. Virol.* **55**, 469-473, 1981.
- 22) Sato, H., Ogura, H. and Hatano, M.: An intracellular interaction between temperature-sensitive mutant and original wild type HVJ (Sendai virus) is responsible for the establishment and maintenance of HVJ persistent infection. *J. Gen. Virol.* **55**, 459-468, 1981.
- 23) Ogura, H., Sato, H. and Hatano, M.: Curing of virus persistent infection in HVJ (Sendai virus) carrier hamster tumor cells by transplantation. *Gann* **72**, 498-503, 1981.
- 24) Ogura, H., Sato, H. and Hatano, M.: *In vitro* curing of persistent infection in HVJ (Sendai virus) carrier tumor cells by spleen cells. *Gan* **72**, 504-511, 1981.
- 25) Preble, O. T. and Younger, J. S.: Selection of temperature-sensitive mutants during persistent infections: role in maintenance of persistent Newcastle Disease Virus infections of L cells. *J. Virol.* **12**, 481-491, 1973.
- 26) Homma, M. and Ohuchi, M.: Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. III. Structural difference of Sendai viruses grown in eggs and tissue cultured cells. *J. Virol.* **12**, 1457-1465, 1973.
- 27) Scheid, A. and Choppin, P. W.: Protease activation mutant of Sendai virus: Activation of biological properties by specific protease. *Virology* **69**, 265-277, 1976.
- 28) Yoshida, T., Nagai, Y., Moeno, K., Iinuma, M., Hamaguchi, M., Matsumoto, T., Nagayoshi, S. and Hoshino, M.: Studies on the role of M protein in virus assembly using a ts mutant of HVJ (Sendai virus). *Virology* **92**, 139-154, 1979.
- 29) Maeno, K., Yoshii, S., Nagata, I. and Matsumoto, T.: Growth of Newcastle Disease Virus in a HVJ carrier culture of HeLa cells. *Virology* **29**, 255-263, 1966.
- 30) Lewis, A. M. Jr.: Defective and nondefective Ad 2-SV 40 hybrids. *Prog. Med. Virol.* **73**, 96-139, 1977.
- 31) Benyesh-Melnick, M. and Butel, J.: Oncogenic viruses. In: *The molecular biology of cancer*, Busce, H. ed., pp. 403-485, Academic Press, New York, 1974.
- 32) Sato, M., Yamada, T., Yamamoto, K. and Yamamoto, N.: Evidence for hybrid formation between rubella virus and latent virus of BHK-21/WI-2 cells. *Virology* **69**, 691-699, 1976.
- 33) Hamilton, R., Barbosa, L. and Dubois, M.: Subacute sclerosing panencephalitis measles virus: study of biological markers. *J. Virol.* **12**, 632-642, 1973.
-