

氏 名 じげ た し るる
茂 田 士 郎

授 与 学 位 医 学 博 士

学位授与年月日 昭和40年3月25日

学位授与の根拠法規 学位規則第5条第1項

研究科・専攻の名称 東北大学大学院医学研究科
内科学系

学位論文題目 Interaction of Respiratory Syncytial
Virus to HEp-2cells (Respiratory Sync-
ytial) (RS) ウイルスとHEp-2細胞の相互作用

指導教官 東北大学教授 荒 川 雅 男

論文審査委員 東北大学教授 石 田 名 香 雄

東北大学教授 山 形 徹 一

論 文 内 容 要 旨

Respiratory Syncytial (RS)ウイルスは小児の呼吸器感染症の重要な病原のひとつであり、その粒子構造はMyxovirusと類似しているが赤血球凝集能のないRNAウイルスである。このウイルスを培養細胞へ感染させると巨大なシンシチウムを形成するという特徴がある。しかしこのウイルスは培養細胞内での産生量が少ないこと及び感染性が物理学的影響を受けやすく、不安定であるために取り扱い難いという理由によつてその細胞レベルでの研究はきわめて遅れている。本研究はRSウイルスをHEp-2細胞に感染させた場合のウイルス増殖と感染細胞の変化、特にシンシチウム形成との相互関係を明らかにする目的で蛍光抗体法を主な実験方法として解析を行なつたものである。

使用したRSウイルスはHEp-2細胞継代のLong株(感染価 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml)である。培養細胞はHEp-2細胞で、培養液はEagles MEMを用いた。蛍光抗体法は一次血清としてRSウイルス感染症患者の回復期血清を用いた間接法によつた。単層培養の細胞へウイルスを接種し37°C90分吸着后、未吸着ウイルスを洗い、新しい培養液に換えて33°Cで感染を進めた。以后時間を追つてウイルス感染価の測定、蛍光抗体法によつてウイルス抗原の発展及び抗原を持つた細胞の数と形態の変化を追跡した。

以上の様な実験条件で得られた結果は次の様にまとめることが出来る。1) 蛍光抗体法によつて感染細胞を数えることにより37°Cに於けるウイルスの細胞への吸着速度を測定したところ、1時間半で約3%、5時間でも約8%と非常に吸着効率が低いものであることを認めた。2) 感染経過におけるウイルス増殖曲線を、感染価測定によつて描いてみると、細胞内ウイルスは接種后10時間より28時間まで対数的に増加し、以后50時間までプラトウを保つ。一方培養液中には14時間ですでに感染価が認められ、細胞内ウイルスの約10%相当の感染価をもつてそれに平行しながら増加し、52時間で細胞内ウイルスとほぼ等しくなる。3) ウイルス抗原の合成は細胞膜に接した細胞質からはじまり、時間と共に細胞質全体に拡大するが、核内ウイルス抗原合成の積極的な証拠は得られないし、又細胞質内封入体ともウイルス合成部位は一致しない。更に感染が進行すると共にウイルス抗原は細胞質末梢又は細胞質膜に濃縮された状態となる。この傾向は単一の細胞においてもシンシチウムにおいても同様である。4) 感染后10時間で少数の細胞にウイルス抗原が認められ、この蛍光細胞数は以后増加を示すが16時間になつて蛍光融合細胞が出現し始める。即ちシンシチウム形成のはじまりであるが、これは時間と共に大きさ(核

数が増す)とその数も増加して来る。23時間をピークとしてこのシンシチウムの巨大化と共にその数は減少して来る。単核細胞及び多核のシンシチウムを問わず、その各々を1個の感染中心として数えて行くと16~18時間でその増加曲線に変曲点を得た。5) ウイルスを細胞へ90分吸着感染せしめた後、抗ウイルス血清をメジウム中に入れて感染を進めた場合においても、感染細胞は時間の進行と共に細胞融合を起しシンシチウム形成をみる。但しこの場合感染細胞内ウイルス抗原は細胞内に於て濃縮された形態を示す。一方ウイルス感染90分の細胞層をトリプシン消化で分散して、その細胞を新しい細胞層へ接種し、同様にメジウム中へ抗ウイルス血清を加えて培養を続け48時間後に蛍光抗体法によつてウイルス抗原保有シンシチウムの数を数えた。その結果感染価測定で得た感染中心数に近い数の蛍光シンシチウムの形成を認めた。

以上の様な実験結果からRSウイルスのHEp-2細胞への感染動態を次の様に結論した。

このウイルス感染をうけた細胞は最終的にその細胞表面にmodificationを来す。そして周囲の非感染細胞へ附着して融合し互の細胞質の交流を起す。その結果はシンシチウムとして表現される。そのシンシチウムは感染細胞となるわけであるから、まもなく再びその細胞質膜表面のmodificationと非感染細胞への附着融合を起し、かくしてこれをくり返して巨大なシンシチウムへと発展を続ける。この細胞融合機構にはウイルス抗体は阻碍を示さぬことからみて、RSウイルスの細胞集団における伝播は始めの感染細胞から放出された細胞外ウイルスの非感染細胞への吸着侵入という様式のみならず、cell to cell infectionという様式が実証されたことになる。

審査結果の要旨

小児期の呼吸器感染症の病原体のひとつである respiratory syncytial (RS) ウイルスの感染形式に関する実験的研究であり, cell to cell infection という様式をとることを実証した研究である。すなわちRSウイルス感染細胞は最終的には細胞膜の modification を来し, 周囲の非感染細胞へ附着しつついで融合して, 細胞質の交流を起す。その結果はシンチチウムとして表現されるわけである。この際RSウイルス抗血清の存在がこの細胞癒合には阻燐作用を示さないことを指摘している。

RSウイルスの細胞体内の局在の証明方法はRS感染患者回復期血清を使用した蛍光抗体間接法を用い, 感染細胞はHEp-2細胞を使用した。

尙本研究においては, RSウイルスの細胞への吸着効率はきわめて低いものであること, ウイルスの細胞内増殖に較べ周囲の培地への遊離はおくれること, 細胞内におけるウイルス抗原の合成は核膜に接した細胞質からはじまるものであり, 核内のウイルス抗原合成の証左はみとめられないことなどについて詳細な新しい知見を提供している。

よつて, 本論文は学位を授与するに値するものと認める。