

氏 名 (本 籍) ^{おお}大 ^{ひら}平 ^{まさ}政 ^こ子

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 5 1 0 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 4 3 年 3 月 4 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 3 5 年 3 月
福 島 県 立 医 科 大 学 卒 業

学 位 論 文 題 目 Specific Chromosome Aberrations in Cells
Persistently Infected with Type 2 Hemad-
sorption Virus.
(ヒラ細胞と H A 2 型 ウィルスとの間に樹立
された持続感染系の染色体分析)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 石 田 名 香 雄 教 授 山 根 績

教 授 高 橋 吉 定

論 文 内 容 要 旨

〔 緒 言 〕

Parainfluenza I 型に属する Hemadsorption 2 型ウイルス (HA 2) は猿腎細胞に感染し完全な成熟粒子を放出する。この猿腎継代 HA 2 を HeLa 細胞に接種すると、認むべき細胞変性は出現せず、また細胞内には少ないながらも成熟粒子を検出し得るにかゝらず (通常平均一個の細胞当り 0.9 個以下) 成熟粒子の培養液中への放出は殆んど見られない。一方この細胞は蛍光抗体法ならびに赤血球吸着試験により個々の細胞がウイルス抗原を細胞内に取り込んでいる事が明らかで、個々の細胞を指示細胞である猿腎細胞培養に接種すると感染粒子の産生がみられる。即ちすべての細胞は完全なゲノムを細胞内に取り込んでいる。電子顕微鏡の観察によれば、細胞質内には、ウイルスの nucleocapsid が層状の配列をなして塊りとして存在し、細胞表面にはスパイク状の構造をみるが、その中に nucleocapsid が取り込まれて成熟するような像を見る事はできない。即ちこの細胞に於ては完全なウイルスゲノムが存在し、ウイルス素材の合成は行なわれているにかゝらず、何らかの宿主細胞の抑制機構によつて成熟過程が進行しないような状態にあると考えられる。このようなウイルスゲノムを取り込んだ細胞は細胞分裂能を失なう事なくウイルスとの共存状態即ち持続感染系 (HeLa/HA 2) を保持している。この系を非感染細胞と比較した場合、明らかにウイルスゲノムの発現と思われるもののほかに細胞の解糖能の亢進とか、インターフェロン産生能の低下およびそれに対する感受性の低下といった本来の細胞と異なつた形質の発現を伴なつている。このような形質変化を伴なつた持続感染細胞が、細胞の遺伝的変化を随伴するか否かを直接染色体分析によつて調べた。

〔 実 験 方 法 〕

既に述べた持続感染系 HeLa/HA 2 は樹立以来 7 年を経過しており、この間に或る特定の細胞集団が選択されている可能性が当然予想される。また wild type の HeLa 細胞は染色体のばらつきが多いので核型の分析は殆んど不可能である。そこで新たに HeLa のクローン細胞である S 3 細胞に HA 2 ウイルスを感染させ新しい持続感染系 S 3/HA 2 を得、これについて染色体の分析を行なつた。この系は前に述べた HeLa/HA 2 に見られた virus carrier cell としての特徴を全部そなえている。染色体分析に供した S 3/HA 2 は、ウイルス感染後、トリプシン消化により継代を続けた約 10 ヶ月目のものである。対数増殖期にある S 3/HA 2 の単層培養に 2×10^{-8} M のコルヒチンを加え 16 時間 37 ° C 処理を行ない、トリプシン分散により細胞を集め、水処理、カルノア液固定を行なつた後浮遊細胞を -30 ° C 冷却したスライドガラスに落とし直ちに加熱して空気乾燥伸展し、ギムザ染色を行なつた。この標本を顕微鏡撮影し Denver 方式に従つて核型分析を行なつた。

〔 実 験 成 績 〕

1. 染色体数の分布：対照S3, S3/HA2 共にモードは68で全体の50%以上を占め, 95%以上が3倍域に分布している。 2. 核型分析：染色体数68個を持つ種族細胞について分析した結果, 対照S3ではD-15がdisomicであるほかは全部がtrisomicである。これに対しS3/HA2ではX-染色体と考えられるものおよびG-22がtrisomyからdisomyに変わり, これを代償するようにF-19, F-20がtrisomyからtetrasomyに変つてゐる。このような或る特定の部位の変化は種族細胞以外の細胞についても恒常的に見られ, 今迄分析可能なものについて調べた限りでは100%に出現している。また今迄200個以上の対照S3について調べたが, S3/HA2に見られたような核型を示すものは一個も見られなかつた。以上の事からS3/HA2の核型は対照のS3と全く異なつてゐる事は明らかになつたが, 果たしてこれがウイルス感染に伴う変化なのか, 或いは単に感染細胞に於いて, このような核型をもつ突然変異が起こりそれが選択されたのかが問題となる。 3. 核型変化がウイルス感染に伴う変化であることの証明：既述の核型変化はウイルス感染後7時間で約40%出現し, 40時間では殆んど100%に出現する。また感染の際の細胞当りのウイルス量を10個, 2個, 0.1個にして40時間目に分析した結果夫々95%, 45%, 2%の割りに核型の変化が見られた。またこの変化の出現率はウイルスを紫外線で40秒, 300秒照射することにより夫々30%, 0%に減弱した。

〔 考 察 〕

以上の結果からS3/HA2では対照S3と異なる核型を示すことが明らかで, しかもこの変化は染色体の或る特定の部位に起つてゐる。このような変化が対照S3に於いては一個も見られないこと, ウイルスの感染量に応じた出現率を示すこと, および紫外線照射ウイルスにはこのような変化を起こす力がないことなどから, ウイルス感染によつてある特定の核型集団が選択されたのではなく, ウイルス感染に伴う特異的な変化と考えられる。今迄文獻的にはウイルス感染に伴う染色体の変化は, 主としてDNAウイルス特に動物ウイルスについて多くの報告がなされ, 全般的に見て或る方向性をもつた変化が見られ, 特にX-染色体の欠失はしばしば観察されるようである。しかしながら果たしてこれらの変化がウイルス感染に伴う直接の結果なのか——ウイルス学的見地からの批判に耐え得るような仕事はWolmanらのSV40の仕事を除き見当たらない。一方RNAウイルスに関してはMeasles, RubellaおよびRous Sarc-omavirus等についての報告があるが, いずれも染色体切断を基調とするrandomな変化である。著者の報告は 1) RNA型ウイルスが 2) 或る細胞に 3) 殆んど100%の効率でしかも 4) 特定の核型変化を起こしたと云う意味で, ウイルス学的にも染色体学的にも重要な意義をもつてゐる。しかしここに述べられた核型変化が, ウイルス感染の際細胞を持続感染に導びくものであるか否かは今後に残された課題である。

審 査 結 果 の 要 旨

パラインフルエンザI型ウイルスに属するHA2ウイルス(hemadsorption virus type 2)をヒラ細胞に感染させると持続感染系が成立するが、この系に於て染色体の構成に変化の起つている事を見出し、しかもそれが何故起るかを考察した仕事である。

先ず7年間にわたつてウイルスのゲノムと細胞のゲノムとが共存共栄をつづけているHela/HA2について染色体分析を行なつたところ、正常のHelaとは異なつていることを見出した著者は、これがウイルスの直接影響の結果か、或いは7年間の選択による結果かを見わけけるためにS₃というヒラ細胞のクローンをえらび、新たにS₃/HA2という持続感染系を樹立し、これがHela/HA2と多くの生物学的性状に於て共通する持続感染系であることを確めた。

次にそのクロモソーム構成を正常のS₃と比較すると両者は同じく68個の分布をとるに拘らず、正常S₃では3個の1622クロモソームとXクロモソームが各々2個に減少し、その代り1619と1620に相当するクロモソームが対照では3ケのものが4ケに増加している事を見出した。

しかも、この変化は感染後24時間で見出されるのであるから、明らかにウイルス感染に伴う直接的な影響であつて、持続感染系が樹立されたあと二次的に選択が起つて生じた変化ではない。

以上呼吸器ウイルスのひとつであるパラインフルエンザウイルスが細胞レベルで染色体に変化を直接的に起しうる事を見出した事は偉大な発見であり、本論文は学位に値するものと認める。