

氏名(本籍)	なかむらきよと 中村喜代人
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第 780 号
学位授与年月日	昭和 50 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専門課程	東北大学大学院医学研究科 (博士課程)病理学系専攻
学位論文題目	Cell fusion by HeLa cells persistently infected with haemadsorption type 2 virus. (持続感染細胞(HeLa/HA2)による細胞融合)

(主査)

論文審査委員 教授 石田 名香雄 教授 山根 績

教授 笹野 伸昭

論 文 内 容 要 旨

は じ め に

ウイルスによる細胞変性効果には2つの型がある。一つは、感染細胞個々の破壊変形であり、もう一つは感染細胞と非感染細胞が融合する結果起る死である。ところが、Hemadsorption type 2 virus (HA2ウイルス)をHeLa細胞に感染させた場合、いずれによる細胞変性も起らず、すべての感染細胞は持続感染状態に陥いる。HA2ウイルスは細胞融合能をもっているため、この系に、感染細胞と非感染細胞の融合を妨げている機構が存在すると推察される。この論文は、この細胞融合からの防御機構を解析する事により、HA2ウイルスのHeLa細胞における持続感染成立の機構の理解を志したものである。

材 料 と 方 法

1. 細胞：HA2ウイルス持続感染HeLa細胞(HeLa/HA2)並びに正常HeLa細胞の増殖用培地としてYLEに10%牛血清を添加したもの、維持液としてYLEに2%馬血清を添加したものをを用いた。2. ウイルス：初代猿腎細胞で継代したHA2ウイルス59-34株を用いた。3. 抗ウイルス血清：発育鶏卵で増殖させたHVJを家兎に免疫し抗血清を得た。4. 融合の定量：HeLa細胞にHeLa/HA2を加え融合を起させた後細胞数を数え、岡田の式に従いFusion Index (F·I)を求めた。

成 績

1. キャリアー細胞による巨細胞形成：HeLa/HA2を0.05%トリプシンと0.05%EDTAで分散し、正常HeLa細胞上にのせると数時間の内に巨細胞の出現が認められた。この巨細胞の大きさは接種するキャリアー細胞の数によって決まり、接種細胞数が多い時、例えば被接種細胞の50%以上の細胞を加えると、全細胞が一つの巨細胞に置き換ってしまう。接種細胞数が少い時、例えば被接種細胞200個につき1個の割合で接種すると、30~40個の核をもつ均一な大きさの巨細胞が生じる。しかも、この時生じる巨細胞の数は接種細胞数と略一致する。この事は、1個のキャリアー細胞が30~40個の核をもつ一つの巨細胞を形成する能力をもっている事を示している。しかし、被接種細胞としてHeLa/HA2を用いると巨細胞形成は認められない。従って、この融合は感染細胞と非感染細胞の間でのみ起り、感染細胞同志はこの様な操作によっても決して融合しないと考えられる。

2. 分散方法による差：0.05%トリプシン、0.05%EDTA並びにパイペッティング、以上の3つの方法で分散したHeLa/HA2を正常HeLa細胞上加え、37°Cで5時間インキュベートした後F·Iを調べたところ、トリプシンで分散した時にのみ著明な巨細胞形成が起り、EDTA或いはパイペッティングで分散した時には巨細胞形成はほとんど認められなかった。この事は、巨細胞形成の為には、HeLa/HA2をトリプシンで分散する事が必要条件である事を示している。

3. 抗血清の影響：HeLa/HA2の細胞表面には常にウイルス抗原が存在している。そこで、このウイルス抗原が巨細胞形成を引き起しているのではないかと考え、抗ウイルス血清の影響を調べた。トリプシンで分散したHeLa/HA2を種々の濃度の抗血清で浮遊した後、正常HeLa細胞上に接種し、37°Cで5時間インキュベートした後F・Iを求めたところ、40倍希釈の抗血清で巨細胞形成は完全に抑制された。この事から、巨細胞形成に何らかの形でウイルス抗原が関与していると判断される。

4. 巨細胞形成の時間的経過：トリプシンで分散したHeLa/HA2を正常HeLa細胞上加え37°Cでインキュベートした。適時分散してF・Iを求めたところ、融合はすでに接種後一時間めに認められ始め、その後急速に進展し4～5時間ではほぼ完了する事が分った。一方、巨細胞における赤血球吸着現象の出現はこれより遥かに遅れ、HeLa/HA2接種後24時間めに初めて赤血球吸着陽性の巨細胞が認められ、すべての巨細胞が陽性になる為には3日を必要とした。この事は、巨細胞形成に新しくウイルス抗原が合成される必要のない事を強く示唆している。

5. サイクロヘキシミドの影響：トリプシンに分散したHeLa/HA2を種々の濃度のサイクロヘキシミドを含む培地で浮遊しHeLa細胞に接種した。37°Cで5時間インキュベートした後F・Iを調べたところ、50μg/mlのサイクロヘキシミドでさえ巨細胞形成に対する抑制効果は全く認められなかった。2μg/mlのサイクロヘキシミドがHeLa細胞におけるHA2ウイルスの増殖を完全に抑制するので、巨細胞形成に新しいウイルス抗原の合成は不必要である事が認められた。従って、巨細胞形成は既にHeLa/HA2の細胞表面に存在するウイルス抗原によって引き起されると結論される。

6. HA2ウイルス初感染HeLa細胞による巨細胞形成：HA2ウイルスをHeLa細胞に感染させた後2系に分け、一系はYLEで、もう一系はMEMで培養した。YLEで培養した感染細胞は赤血球吸着が陽性になる24時間めには強い巨細胞形成能を示した。しかしMEMの系では、終始赤血球吸着も巨細胞形成能も認められなかった。ところが、感染後24時間めにMEMをYLEで置き換えると、赤血球吸着の出現と同時に巨細胞形成能を獲得した。しかも巨細胞形成能と赤血球吸着の強さは極めて平行な関係にあった。この事は、初感染細胞が巨細胞形成能をもつ為には、キャリアー細胞の場合と同様に細胞表面にウイルス抗原が出現する必要がある事を示している。また、キャリアー細胞において認められたトリプシン効果は、この系にも同様に認められた。

結 論

HeLa/HA2による巨細胞形成は、細胞表面に存在するウイルス抗原のある成分によって引き起される。しかし、この成分は通常非活性の状態が存在しており、トリプシン処理をうける事によって初めて活性化されると考えられる。この事は初感染細胞に関しても同様である。従って、初感染において感染細胞と非感染細胞が融合出来ないのは、感染細胞表面に出現する細胞融合に関与する成分が非活性の状態が存在する為と結論される。

審査結果の要旨

パラインフルエンザウイルス1型に属するHemadsorption 2型ウイルス(HA2)は細胞融合能をもつが、HA2で持続感染したHeLa細胞(HeLa/HA2)は融合能をもたない。この論文はその理由を解明しようとしたものである。

生ずる第1にHeLa細胞の単層にHeLa/HA2細胞を接種すると接種細胞数に応じた巨細胞(30-40の有核細胞)を生ずる。ところが接種する単層細胞がHeLa/HA2ではこの様なフォーカスを形成しない。次に接種するHeLa/HA2を分散するためにはトリプシンが必要条件でEDTAや単なるピペettingではフォーカス形成がHeLaの単層上で起らない。第3にウイルスに対する抗血清が存在するとこのフォーカス形成は起らない。第4にフォーカス形成はHeLa/HA2を接種後ほぼ4時間で完成し、サイクロヘキシミドに抑制効果はない。第5にHA2ウイルスをHeLa細胞に初感染させ、YLEで培養するとフォーカス形成能を24時間以内に獲得するがメジウムがMEMではこの形成能を獲得しない。しかも前者と後者は細胞膜表面に赤血球吸着能の出現の有無で区別される。

以上の事実からHeLa/HA2の表面にはウイルス抗原が存在するが不断は不活性の状態でありトリプシン処理によって始めて活性化されると正常細胞と融合反応を起しフォーカス形成に導かれるという一連の反応に於ける抗原の関与の状態が把握されるにいたった。

以上本論文は学位授与に値するものと認める。