

## ECHO ウイルス 11型の性状に関する研究

### II. Large plaque (Lp) 及び Small plaque (Sp) 変異ウイルスと HeLa 細胞の系における持続 感染について

陳 境 津

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学部門

(前主任: 福見 秀雄 教授)

(現主任: 林 薫 教授)

(Received for Publication May 18, 1971)

## Studies on Mutants of ECHO Virus Type 11

### II. Properties of Carrier Culture of HeLa Cells Infected with Large (Lp) and Small (Sp) Plaque Variants of ECHO Virus Type 11

Jeng Jieng CHEN

*Department of Virology, Institute for Tropical Medicine,  
Nagasaki University*

(Ex-Director: Prof. H. FUKUMI, and Director: Prof. K. HAYASHI)

#### Abstract

Carrier culture of HeLa cells persistently infected with ECHO virus type 11, Gregory strain, produced large plaque (Lp) and small plaque (Sp) variant viruses at the initial period of carrier state. After several passages of subculture, however, Lp virus was eliminated from carrier state and only Sp virus was released in the culture fluid. Such phenomenon was also investigated in case of Sp virus carrier culture challenged with Lp virus. On the other hand, Lp virus carrier culture challenged with Sp virus produced only Sp virus. In order to maintain an equilibrium

of such carrier culture, antibody need not be supplied in culture medium. Generation time of Sp virus carrier HeLa cells was given 38.6 hours as same as that of normal HeLa cells. The proportion of infected cells in Sp virus carrier culture was 88.8% at the 11th passage and it reduced to 51.9% at the 25th passage. The subcultures of HeLa cells persistently infected with Sp virus became not produced the virus after the 102nd passage (HeLa sp 102). The adsorption of Lp or Sp virus onto that cells was allowed at the rate of 35% or 85% respectively, and the cells escaped from cytopathic effect caused by virus infection. Culture fluid of HeLa sp 102 cells was adjusted pH to 2.0 by adding N-HCl solution, then, kept at 4°C for 4 days. After readjusting pH to 7.4, the fluid was centrifuged at 100,000 g for 2 hours and the supernatant was used for the test of interferon-like activity. The yield of Sp virus particularly Lp virus in normal HeLa cells treated with the supernatant was markedly reduced. On the other hand, these events were not investigated by heating the supernatant at 60°C for 1 hour. No effect of the supernatant prepared from normal HeLa cells on the yield of Lp or Sp viruses was observed. Consequently, it would be said that the substance prepared from culture fluid of HeLa sp 102 cells indicated the interferon-like activity and Lp virus was more sensitive to it than Sp virus.

## は じ め に

人または動物間におけるウイルス病の流行では原因ウイルスの行方を把握することはさほど困難なことではない。しかし、最も重要なのは流行期以外にウイルスがどのようにして自然界で存続しているかであって、このことは特定のウイルス以外にはほとんど判っていない。人から人へ或いは動物相互間で小規模の感染が繰返えされているであろうことが推定されるが、長期及び短期の持続感染によるウイルスの存続は次の流行の足場となる。腸管系ウイルスの疫学も例外ではなく、感染の繰返えしや持続感染による種の保持が考えられ、環境と宿主の好適条件がととのえば流行例まで発展することも推察されるわけである。このような考えから、特に持続感染に焦点をおいて無菌性髄膜炎や発疹症の原因ウイルスとしてあげられる ECHO ウイルス 11型と HeLa 細胞の系における持続感染について解析を試みた。腸管系ウイルスの持続感染に関しては

Ackermann and Kurtz (1935) は Polio ウイルスと HeLa 細胞の系で抗体存在下での持続感染の成立について述べ、Crowell and Syverton (1961) 及び Crowell, R.L. (1963) は Coxsackie ウイルス B 3 及び B 5 と HeLa 細胞の系で、大量のウイルスの接種による変性細胞が増殖培地で回復し、持続感染となるが、培地内血清濃度を低めると細胞変性が起るといふ培養条件について触れている。Ho and Enders (1959) は Polio ウイルスと人腎及び羊膜細胞の系では interferon 様物質が持続感染の成立の一要因であろうと示唆している。腸管系ウイルスの持続感染については多くの研究があるが、上記のようにその成立は一様でなくかつその機作もまだ明らかでない。

著者は ECHO ウイルス 11型と HeLa 細胞の系の持続感染について実験し若干の知見を得たので報告する。

## 実験材料及び実験方法

ウイルス： ECHO ウイルス 11型 Gregory 株、ECHO ウイルス 6型 D'Amoi 株、Coxsackie ウイ

ルス B 1 型及び Respiratory syncytial (Rs) ウイルスは国立予防衛生研究所腸内ウイルス部から分与をうけ、

前3者はHeLa細胞で後1者はHep 2細胞で継代した。またPolioウイルス1型Mahoney株は久留米大学医学部微生物学教室から分与をうけHeLa細胞で継代した。ECHOウイルス11型Gregory株に混在していたLarge plaque(Lp)及びSmall plaque(Sp)変異ウイルスはplaque純化し単一性状のplaqueのみ出現することを確認した純化株であって、その詳細は前報に記載した。

**細胞：** 教室で継代保存されたHeLa細胞の増殖培地は10%牛血清加Hanks液、維持培地は2%仔牛血清加Hanks液が使用され、仔牛血清はECHOウイルス11型に対する抗体のないのを確めて用いた。

**Generation time：** 正常HeLa細胞及び持続感染HeLa細胞の2日培養の単層培養細胞を0.2% Trypsin液で消化しガラス壁から細胞を剝離し、遠心洗滌した後、増殖培地に再浮游した。細胞数を $1 \times 10^5$ /mlに調節した後1mlずつ試験管に分注し、静置して培養した。4本ずつの試験管を12時間毎に取出し、各管1mlの0.2% Trypsin液で細胞を管壁から剝離し、細胞浮游液を合併し、直ちに血球計算盤で細胞総数を算えた。また、細胞浮游液に0.5% Trypan blue液を等量加え生細胞を分別して算定した。

**Infectious center assay：** 持続感染細胞の単層培養をTrypsin消化して遠心洗滌し、放出ウイルスを中和するため20倍稀釈の抗血清を含むHanks液に再浮游し、37°C 30分保った。これを再び遠心洗滌した後血球計算盤で細胞数を数え、維持液を使用して倍数稀釈した。稀釈液の0.2mlを単層培養の未感染HeLa細胞上に接種し、37°C 1時間静置した後、前報に記載したplaque法に従って、一次寒天培地を重層し、更に6日後に二次寒天培地を重層して、20°C一夜静置した後生じたplaque数を算えた。対照には上記の細胞稀釈液0.2mlをplaque用培養瓶の増殖培地5mlに接種し、生じた細胞集落を観察し算定した。

**Superinfection：** 試験管培養の持続感染細胞をPuck液で洗滌し、維持液に替え、これに、それぞれPolioウイルス1型、CoxsackieウイルスB1型、ECHOウイルス6型及びRSウイルスの100 TCID<sub>50</sub>/0.2mlを接種し、37°Cに静置培養した後、逐日細胞変性の有無を観察した。

**Interferon 様物質の調製法：** HeLa細胞のSpウイルス持続感染系で102代継代培養を重ねたもので

は、もはや放出ウイルスを検出することが出来なかった。しかし、本細胞系はLpウイルス及びSpウイルスの感染をうけないことが確かめられている。本細胞を200mlの培養瓶に単層培養し、増殖培地を除いて、細胞をPuck液でよく洗滌した後、維持液10mlを加えて培養を継続した。3日間培養後、維持液を集め、1規定塩酸液でpH 2.0とし4°Cに4日間放置した。これに7%重曹液でpH 7.4とした後、富永冷却遠心機90 UV, No.30ローターを使用し、100,000g 2時間遠心し、その上清をInterferon様物質とした。使用に際してはmilipore-filter HA 0.45  $\mu$  Grid 25 mm, で濾過滅菌した。実験は次のようにして行った。試験管培養のHeLa細胞単層培養をPuck液でよく洗滌した後、Interferon様物質を維持液で倍数稀釈したもの1mlを加え37°C 24時間静置培養した。次いで維持液を除き、Puck液で再び洗滌し、Lpウイルス及びSpウイルスの100 TCID<sub>50</sub>/mlを接種し所定時間培養後にInterferon様物質の各稀釈液で処理した3本ずつの培養試験管を取出した。細胞をrubber policemanで剝離した後維持液と共に凍結融解後、その低速遠心上清についてplaque法でウイルス量を算定した。この際、正常細胞の培養液についても上記のInterferon様物質の作成と同様の方法で試料を得て細胞を処理し対照とした。

**Interference assay：** 正常HeLa細胞の単層培養にそれぞれLp及びSpウイルスを接種し、細胞変性が十分に発現したときガラス壁から細胞を剝離し遠心して、上清を除き、沈渣の細胞をMgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O及びCaCl<sub>2</sub>を除いた磷酸緩衝食塩水(PBS)に浮游させた。これを凍結融解して低速遠心した上清をウイルス液としたが、その感染価はそれぞれLp  $2 \times 10^5$  PFU/0.2ml及びSp  $1 \times 10^6$  PFU/0.2mlであった。このウイルス液を50°C 30分間加熱し、一部をplaque法に供試し活性ウイルスのないことを確めて、熱不活化ウイルス液として使用した。試験管培養の単層の未感染HeLa細胞の培養液を除いて、Puck液で洗滌した後、上記の熱不活化したLpウイルスを0.2ml Spウイルスを0.2mlそれぞれ接種し37°C 60分及び一夜静置して吸着を待った。これに維持液1mlを追加した後、交叉的に活性ウイルス100TCID<sub>50</sub>/mlを接種しそのウイルスの産生を試験管法で測定した。

## 実 験 成 績

## 持続感染細胞系の成立：

(1) **Gregory 株 (原ウイルス) の場合：** Lp ウイルスと Sp ウイルスが 1:52 の割合で混在している原ウイルス液をそのまま使用し、Moi=1 の割合で HeLa 細胞に感染させ、200 ml の細胞培養瓶内で 37°C に静置培養した。この際、感染細胞のほとんどは細胞変性を示したがガラス壁に附着して生残した少数の細胞はそのまま増殖を続け、正常細胞とほとんど同一形態を示していた。4 日ないし 7 日ごとに増殖培養液を替え、そのたびごとに培養液中のウイルス量を plaque 法で測定した。生残した細胞が集落を形成した時の培養上清に含まれるウイルスの plaque 性状はすべて Sp ウイルスのそれに一致するものであった。本持続感染系は 24 ヶ月で 90 代継代され、放出ウイルス  $1.7 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml であった。

(2) **Lp ウイルス及び Sp ウイルスの場合：** 前報に記載したように、Lp ウイルス及び Sp ウイルスは plaque 純化されたものである。Moi=1 の割合でそれぞれ Lp ウイルス及び Sp ウイルスを HeLa 細胞に感染させ、生残した細胞に由来する集落から持続感染細胞を得た。ただし、Sp ウイルスの場合、感染細胞の多くは変性におちいり、生残細胞数が著しく少く、集落形成から単層培養細胞を得るまで約 9 週を要したが、Lp ウイルスの場合、変性細胞は Sp ウイルスの場合に比べて少く、生残細胞による集落形成及び単層培養を得るまでの期間は約 4 週であった。

Sp ウイルス持続感染細胞を継代し、48 時間後の放出ウイルスは  $3 \times 10^4$  PFU/ml、Lp ウイルスのそれは  $1.0 \times 10^3$  PFU/ml であった。

Sp ウイルス持続感染細胞の 102 代 (HeLa Sp 102) 及びそれ以後の継代では放出ウイルス及び細胞ウイルスとも、たまたま証明出来なくなっていた。この HeLa Sp 102 の細胞系は Sp ウイルス及び Lp ウイルスの重感染でも細胞変性を認めず、かつ Infectious center assay 及び細胞の凍結融解液を用い plaque 法を試みても、いずれも感染性ウイルスを検出することは出来なかった。

**持続感染細胞の Generation time：** Sp ウイルス持続感染細胞と正常細胞の Generation time は全く差がなく、両者とも 38.6 時間であった。(Fig. 1)。

**Infectious center assay：** Sp ウイルス持続感染の 11 代及び 25 代継代のものについて Infectious

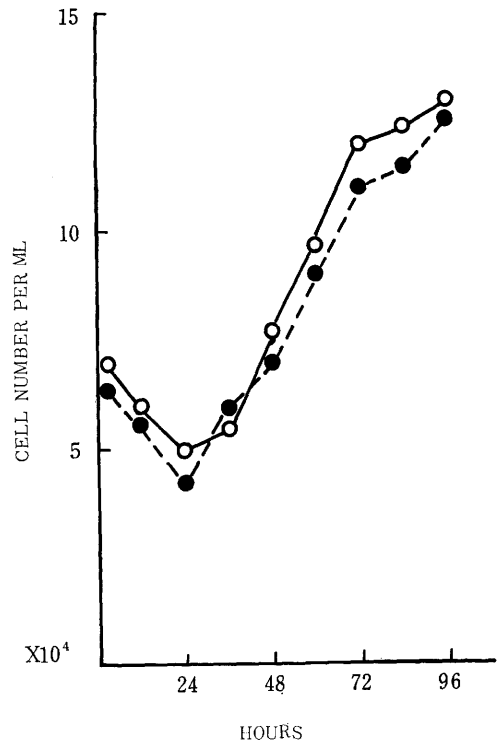


Fig. 1. The generation time of both normal and carrier cells was given 38.6 hours.

## Generation time of HeLa Cells

- normal cells
- ……● carrier state cells (Sp variant)

center assay を試み、活性ウイルスの保有している細胞の割合は前者で 88.8%、後者では 51.9%であることが判った。この所見は、持続感染細胞の継代培養が重なるにつれて活性ウイルスを有する細胞数が減じてゆくことを物語っている。事実、102 代継代細胞は、もはや放出ウイルスも細胞の凍結融解液や Infectious center assay でも plaque は全く証明されなかった。このような細胞に Sp ウイルス及び Lp ウイルスの再感染を試みたが、光顕的に細胞にも何等の変化も認められず、かつ培養液中にも、また、細胞の凍結融解液中にも plaque 法によって活性ウイルスの検出を確認することは出来なかった。(Table 1)

**Table 1.** Infectious center assay of Sp virus carrier cells

passage	cells inoculated	number of plaques (carrier cells)	percent of carrier cells
11th	630	560	88.8
25th	980	513	51.9

**Superinfection:** Lpウイルス持続感染細胞は33代継代のもの、Spウイルスのそれは60代継代のものを用いた。重感染を行ったウイルス及び重感染後のLp及びSpウイルスの生産量を測定していないという不備があるが、一応細胞変性を指標としてウイルス増殖を推定するとTable 2に示される通りである。本表で特に注目される事実はPolioウイルスや、ECHOウイルスと同一範疇に入るCoxsackieウイルスB1型が持続感染細胞で増殖することであった。(Table 2).

**持続感染細胞の交叉重感染:** Lpウイルス及びSpウイルス持続感染細胞の単層培養をPuck液で十分に洗滌し、Lpウイルス及びSpウイルスを交叉して感染させ維持液を加えて培養した。細胞の継代ごとに、その一部を凍結融解し低速遠心上清をウイルス液としplaque法で生産ウイルスの性状を検査すると共にウイルス量をも調べた。

**Table 2.** Superinfection of carrier cells

Virus	Appearance of CPE in carrier cells of	
	Lp virus	Sp virus
Polio 1	No	No
Cox. B1	Yes	Yes
RS	Yes	Yes
ECHO 6	No	No
ECHO 11	No	No

(1) **Lpウイルス持続感染細胞におけるSpウイルスの感染:** この場合、光顕的に細胞変性その他の外見上の変化を認めなかったが次代の継代では細胞の凍結融解液についてplaque法を行い、Spウイルスのみ検出され、Lpウイルスは全く認められなかった。

(2) **Spウイルス持続感染細胞におけるLpウイルスの感染:** 光顕的には細胞に何等の変化を認めなかったことは上記の場合と同様であったが、初代培養細胞を継代する際、培養液及び培養細胞の一部凍結融解液について行ったplaque法ではSpウイルスに混ってLpウイルスが検出された。しかし継代3代目ではLpウイルスによる大plaqueは著しくその数が減少し、継代5代目では放出ウイルス及び細胞内ウイルスともLpウイルスは検出されず、Spウイルスのみ

**Table 3.** Effect of interferon-like substance on the yield of Lp and Sp variant viruses.

Treatment with IF diluted at	yield of Lp virus (PFU/ml.)	% of virus yield	yield of Sp virus (PFU/ml.)	% of virus yield
1 : 2	$1.0 \times 10^2$	1.0	$5.5 \times 10^4$	29.5
1 : 5	$7.0 \times 10^2$	7.0	$7.5 \times 10^4$	41.6
1 : 10	$7.0 \times 10^2$	7.0	$8.5 \times 10^4$	46.2
1 : 20	$2.0 \times 10^3$	20.0	$1.85 \times 10^5$	100
not treated	$1.0 \times 10^4$	—	$1.8 \times 10^5$	—
Treatment with non-IF diluted at	yield of Lp virus (PFU/ml.)	% of virus yield	yield of Sp virus (PFU/ml.)	% of virus yield
1 : 2	$5.5 \times 10^2$	55.0	$1.1 \times 10^5$	60.1
1 : 5	$7.4 \times 10^2$	74.0	$1.35 \times 10^5$	75.0
1 : 10	$9.5 \times 10^2$	95.0	$1.8 \times 10^5$	100
1 : 20			$2.3 \times 10^5$	100
not treated	$1.0 \times 10^3$	—	$1.8 \times 10^5$	—

IF ..... interferon-like substance.

non-IF ..... substance prepared from normal HeLa cell culture.

認められた。

**HeLa Sp 102 細胞における Lp ウイルス及び Sp ウイルスの再感染：**試験管培養の monolayer に Lp ウイルス及び Sp ウイルスを再接種し、吸着の有無を検出すると共に CPE の発現の有無を観察した。Lp ウイルス及び Sp ウイルスの HeLa Sp 102 細胞への吸着は 1 時間目のみの成績であるが Lp ウイルス 35% Sp ウイルス 85% を示し、正常細胞の場合とほとんど差がないものと推定された。一方、7 日間観察を行ったがその間 CPE の発現も認めなかった。

**持続感染細胞の培養液にみられる Interferon 様の活性と Lp ウイルス及び Sp ウイルスの感受性：**

持続感染細胞の培養液から調製した試料で前処理した場合、Table 3 の上段に示れるさるよりに、Lp ウイルスの産生は著しく抑制され 20 倍稀釈でもなお正常細胞の場合の 20% しか産生されなかった。これに反して、Sp ウイルスの産生は 2, 5 及び 10 倍稀釈液処理でやや抑制されたが Lp ウイルスの産生と比較すると 6 ないし 7 倍の収量であって特に 20 倍稀釈液の前処置では全く影響を認めなかった。因みに、正常細胞の培養液から作成した試料では両ウイルスとも同様な傾向を示し、2 倍及び 5 倍稀釈液の前処理の場合やや抑制されたが、10 倍稀釈では全く影響がなかった。

**Table 4.** Effect of heat on the action of Interferon-like substance referring to the yield of Lp virus.

Treatment with IF diluted at	yield of Lp virus(PFU/ml.)	percent of virus yield
1 : 2	$4.0 \times 10^4$	5.4
1 : 5	$1.2 \times 10^5$	16.0
1 : 10	$2.3 \times 10^5$	32.0
1 : 20	$2.7 \times 10^5$	37.0
heated*(at 1:5)	$1.30 \times 10^6$	>100
not treated	$7.25 \times 10^5$	

\* IF was heated at 60°C for 1 hour and HeLa cell monolayers was pretreated with heated IF at a dilution of 1:5.

上記の成績から持続感染細胞の培養液には Lp 及び Sp ウイルスの産生を抑制する因子が含まれていることが明らかであって、特に Lp ウイルスは感受性が高いといえる。

本物質は先ず培養液から調製されたものであること、その作成は pH 2.0 で 4℃ 4 日間放置され、かつ、pH 7.4 に復整後 100,000 g 2 時間超遠心されていること及び 60℃ 1 時間加熱によりその活性が失われることから (Table 4) Actinomycin に対する反応態度を検査していないが、本物質で処理された細胞で Sp ウイルス特に Lp ウイルスの産生が抑制されるのは、一応本物質の Interferon 様の作用によるものと考えてよい。(Table 3, 4)

**熱不活性ウイルスによる Inrerference：**不活化ウイルスを 37℃ 60分及び 1 夜 HeLa 細胞に吸着させた後活性ウイルスを接種した場合、成績は吸着時間の長短にかかわらず同傾向であったので、Table 5 には不活化ウイルス吸着が 37℃ 60分の場合を代表して掲げた。本表から不活性化ウイルスの吸着如何にかかわらず Lp 及び Sp ウイルスの産生量には変りがないことが明かであった。(Table 5)

**Table 5.** Interference assay

Incubation day	Adsorpt with	Infect with	Virus titer (TCID 50/ml)	
			cell-associated	fluid
2	Lp inactivated	Sp	7.0	5.0
		Sp	7.0	5.0
	Sp inactivated	Lp	5.0	4.0
		Lp	5.0	4.0
3	Lp-inactivated	Sp	7.0	6.0
		Sp	7.0	6.0
	Sp inactivated	Lp	4.0	3.0
		Lp	3.0	3.0
control	Lp inactivated		0	0
	Sp inactivated		0	0

考

Ackermann et al (1955) は Polio ウイルス 1, 2, 3 型と HeLa 細胞の R 系との組合せでの持続感染系の成立には抗 Polio ウイルス血清の存在を必要とし抗

察

血清が除かれると持続感染系は細胞変性を起すという。しかし、Ho and Enders (1959) は Polio ウイルス 2 型と初代培養の人腎細胞や羊膜細胞及び継代培養の

HeLa 細胞の組合せで, Takemoto and Habel(1959) は Coxsackie ウイルス A 9 と HeLa 細胞の系で, また Crowell and Syverton (1960) は Coxsackie ウイルス B 3 と HeLa 細胞の系で持続感染の成立には必ずしも抗血清を必要としないことを述べている。

著者の場合, ECHO ウイルス 11型の原株及び Lp ウイルスまたは Sp ウイルス と HeLa 細胞の組合せでは抗血清を含まない維持培地で持続感染が得られた。Sp ウイルス持続感染系の場合, 持続感染細胞の割合は全細胞の約 90%を占めていたが, 継代を重ねるに従って活性ウイルスを有する持続感染細胞の割合は25代で約 52%に減少し, 102代目では, たまたま活性ウイルスを検出し得ない状態になっていた。この102代継代の持続感染細胞 (HeLa sp 102) には Lp ウイルス及び Sp ウイルスとも正常細胞の場合と同じように吸着はするが活性ウイルスの検出や細胞変性は認められなかった。Crowell and Syverton (1960) によれば Coxsackie ウイルス B 3 と HeLa 細胞の系で成立した持続感染細胞に B 5 ウイルスは吸着するが B 1 ウイルスは吸着しない。両ウイルスは共に B 3 ウイルス持続感染細胞内で増殖しないのであるが, B 5 ウイルスは侵入後に増殖の抑制が起っているわけで, B 1 ウイルスに対する細胞表面の Receptor 欠如と大きな違いがあると述べている。

著者の場合, HeLa sp 102 に Lp ウイルス及び Sp ウイルスとも吸着することが明らかであったので, ウイルス増殖の抑制は侵入後の過程で起っているものと考えられる。

Glasgow and Habel (1962) の記載に従って, HeLa Sp. 102 の培養維持液から作成した物質には interferon 様の作用を認め, 特に Lp ウイルスは感受性が高いことは既に述べた通りであるが, HeLa Sp 102 細胞のこのような特異な性状は持続感染の機序を究明するための新たな試料として注目すべきであろう。

ECHO ウイルス 11型 Gregory 株(原ウイルス液)を使用して得た持続感染 HeLa 細胞は持続感染の成立の当初は Lp ウイルス 及び Sp ウイルスが混在したが, わずかに数代の継代で Lp ウイルスは消失し

Sp ウイルスのみ検出されるようになった。同様の現象は Sp ウイルス持続感染細胞に Lp ウイルスを重感染した場合にも認められた。また Lp ウイルス持続感染が成立した系では反覆した実験で Lp ウイルスのみを放出することが確認されたが, これに Sp ウイルスを重感染すると Lp ウイルス持続感染は直ちに Sp ウイルス持続感染へと転換し Sp ウイルスのみを放出するようになった。いずれにしても, Sp ウイルスの持続感染が成立した下では Lp ウイルスは生産されなくなることを示している。このような現象は Sp ウイルス持続感染細胞内に産生される interferon 様物質に Lp ウイルスの感受性が高いことに一部の要因があって, そのため Sp ウイルス持続感染細胞内で Lp ウイルスの増殖が抑制されるためによるものと考えることが出来る。また, 上記の interferon 様物質に Sp ウイルス自身も或る程度感受性があることは Sp ウイルスの持続感染細胞系の成立に何等かの関連を推察することも可能であろう。

このような見解は Ho and Enders (1959) によっても一部提出され, Polio ウイルス 2型と初代人腎細胞及び羊膜細胞の組合せで成立した持続感染細胞には interferon 様物質の存在を認め, 本因子がこれらの細胞の持続感染に重要な役割を果していると述べている。しかし, Polio ウイルス 2型と HeLa 細胞の組合せでは interferon 様物質の役割を立証出来なかったという。また, Mifune(1970) によれば, 風疹ウイルスの場合, interferon を産生し得る BSC 細胞でも, また, interferon を産生しない Vero 細胞でも持続感染は成立し, 風疹ウイルス持続感染系の維持には interferon は特に必要ではないであろうという。

以上のように持続感染の成立にはウイルス及び細胞の種類によってそれぞれ異った機序が求められるであろう。著者の場合 Sp ウイルス持続感染の成立には interferon 様物質にその一部の要因があると考えられたが, 一方 Sp ウイルス持続感染系から得た HeLa Sp 102 細胞はウイルスの放出を欠くと共に Sp ウイルス及び Lp ウイルスの再感染をうけないという特異な性状を示し, 今後持続感染の成立に関与するウイルス Genom の動態を究明するれめ好適の試料を提示したものと考える。

## ま と め

ECHO ウイルス 11型 Gregory 株と HeLa 細胞の系で得た持続感染細胞は, Sp ウイルス及び Lp ウイ

ルスを放出していたが, 数代の継代で Sp ウイルスのみを検出した。Plaque 純化した Lp ウイルス及び Sp

ウイルスによってそれぞれ持続感染系を得ることが出来、かつその持続感染細胞からは同系のウイルスのみ放出した。これらの持続感染系の成立に抗血清は必要でない。また、Sp ウイルス持続感染細胞内では Lp ウイルスの増殖は抑制され遂には Lp ウイルスは検出されなくなった。これは Sp ウイルス持続感染細胞内に産生される interferon 様物質に Lp ウイルスの感受性が高いことに一部の要因があるように考えられた。一方、Sp ウイルス自身もその interferon 様物質に或る程度感受性があるということは Sp ウイルスによ

る持続感染の成立に何等かの関連があるのではないかとの推察も可能である。

Sp ウイルス持続感染系の継代によって得た HeLa Sp 102 細胞はウイルスの放出は認められないにもかかわらず、Sp ウイルス及び Lp ウイルスの再感染をうけない特異な細胞系であり、その培養維持液中には interferon 様物質が含まれることを証明することが出来た。このような細胞系は今後持続感染の成立に関与するウイルスの Genom の動きを追究するのに役立つと考える。

稿を終るに当り福見前教授の御教示と御指導に感謝し、本研究に関する直接の御指導、御校閲を得た林教授に深甚の謝意を表します。

### 参 考 文 献

- 1) Ackermann, W. W. and Kurtz, H. : Observations concerning a persisting infection of HeLa cells with poliomyelitis virus. *J. Exp. Med.*, 102 : 555-565, 1955.
- 2) Chen, J. J. : ECHO ウイルス 11型の性状に関する研究. I. plaque 変異ウイルスについて 熱帯医学, 13 : 45~52, 1971.
- 3) Crowell, R. L. and Syverton, J. T. : The mammalian cell-virus relationship. VI. Sustained infection of HeLa Cells of superinfection. *J. Exp. Med.*, 113 : 419-435, 1961.
- 4) Glasgow, L. A. and Habel, K. : The role of interferon in vaccinia virus infection of mouse embryo tissue culture. *J. Exp. Med.*, 115 : 503-512, 1962.
- 5) Ho, M. and Enders, J.F. : Further studies on an inhibitor of viral activity appearing in infected cell cultures and its role in chronic viral infections. *Virology*, 9 : 446-477, 1959.
- 6) Mifune, K., Desmyter, J. and Rawls, W. E. : Effect of exogenous interferon on rubella virus production in carrier cultures of cells defective in interferon production. *Infection and Immunity*, 2 : 132-138, 1970.
- 7) Takemoto, K. K. and Habel, K. : Virus-cell relationship in a carrier culture of HeLa cells and coxsackie A 9 virus. *Virology*, 7 : 28-44, 1959.