

氏 名	佐 藤 信 夫
	さ とう のぶ お
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 165 号
学位授与の日付	昭 和 44 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 動 物 学 専 攻
学位論文題目	ニワトリ肉腫細胞より Rous 肉腫ウイルス(RSV)の放出機構

論文調査委員 (主 査) 教 授 岡 田 節 人 教 授 加 藤 勝 教 授 加 藤 幹 太

論 文 内 容 の 要 旨

RNA型腫瘍ウイルスである肉腫ウイルス（以下RSVと略す）がニワトリ細胞に感染して肉腫を形成させることは、ウイルスによる腫瘍化の例として最も古くから知られたものである。特に、ラウス肉腫において最も特徴的といえる現象として、感染した細胞はウイルスを産生、放出しながら、変性、死に至ることなく増殖を続けてゆく、という事実がある。RSVそのものの本性、感染機構などについて、数多くの研究が行なわれてきたにも拘らず、この特徴的な現象についての分析は全く行なわれていない。特に細胞からのRSV放出の機構は、この腫瘍の細胞生物学的理解のために重要なものであるが、過去においては細胞質、或いは細胞膜で成熟し、細胞膜で被われたウイルス粒子が細胞表面から出芽して放出される、という想定が行なわれていたにすぎない。

申請者の論文は、このようなRSVの細胞からの放出を取扱ったものであって、特に放出を制御する細胞の生理的条件に始めてふれたものである。

実験はRSVのSchmidt-Ruppin 株を白色レグホン・ヒナの翼に注射して得た肉腫細胞の組織培養について行なわれている。元来、肉腫細胞はガラス器内での組織培養が一般的に困難とされているので、申請者はかなり特別な方法を案出している。それはニワトリ胚の細胞を培養して得た繊維芽細胞と混合して肉腫細胞を培養する、という方法であり、これによって肉腫細胞は培養条件においても十分維持することができる。

このような実験条件を設定したのち、まず培養肉腫細胞からのウイルス放出量を時間的に追跡した。ウイルス量の測定は、細胞を完全に除去した培養に使用した液をニワトリ漿尿膜上に接種した7日目に生じたPockの数を算える方法によって行なわれた。培養によって液中に放出されるRSVは培養後8時間目まで急速に増加し、以後24時間まではほぼ一定の放出率を続けている。しかし、放出されたRSVは培養液中で当然失活するから、孵卵器中に回収した液のみをにおいて失活率をみると、4時間毎に約13%である。

従って、4時間という間隔では失活率をほぼ無視してもよいと考え、4時間毎に培養液を新鮮なものと

とりかえて、その間に放出されるRSV量を測定した。その結果、新鮮培養液に交換することによって、RSV放出量が誘導的に増加するという重要な知見がえられた。たとえば24時間目の培養においてRSV放出量は 2×10^5 PFU/mlであるが、新鮮液に交換することによって、4時間には（つまり28時間後） 1×10^6 PFU/mlまで増加している。このような新鮮培養液によるウィルス放出の誘導は、液交換後に速やかに起こるものでなく、少なくとも2時間のlag phaseを要することが知られた。培養後24時間にわたって4時間毎に液交換を行なった場合に回収される積算RSV放出量は、この間全く交換を行なわなかった場合の約3.5倍に達することが示された。

以上のような新鮮液交換によるRSVの誘導的放出という現象は、一方ではRSV放出を抑制している機構の存在を示唆している。古い培養液にはウィルス放出を抑制する要因が含まれているのであろうか？これを検するために18時間培養したものを二グループに分け、一方を新鮮培養液に、一方を予め18時間培養に用いた液に交換した。4時間後のウィルス放出量は、後者では前者の1/25量であって、古い培養液に放出抑制効果が存在することは明らかである。

以上に述べた各実験では、放出されたRSV量の測定法として、尿膜上のPock数算出という方法がとられた。しかし、培養液中には活性RSVと失活RSVが混在していると見做さざるをえないから、厳密な測定はこれら全RSV量について行なう必要があり、この目的にはPock算出法はふさわしくない。そのために ^3H -ウリジンでラベルされたウィルスの放出量を放射能カウントによって測定する方法がとられた。この方法は、結果をより量的に正確に表現するためにもPock数算出法よりすぐれているのは当然である。これには、まず ^3H -ウリジンを加えて培養し、培養液を回収したのち細胞、細胞破片を除き、密度勾配遠心法によってRSV粒子を集め、その放射能を測定した。この方法によっても、新鮮培養液交換によるウィルス放出の誘導のあることがよく確かめられたのである。さらに、この ^3H -ウリジン標識法とPock数算出法の両方を併用して、培養液中に放出されるRSVの活性粒子と非活性粒子の割合が明らかにされた。液交換後4時間までに放出されるのは殆んどが活性粒子である。8時間以後は非活性粒子が増加し、16時間目で活性：非活性の割合は1：15となる。

以上のような実験結果から、申請者はRSV放出が細胞の外的条件によって制御されることを明らかにし、このような放出を規定する諸条件についての考察を試みている。

論文審査の結果の要旨

RSVは腫瘍性ウィルスとして最も古くから知られた例であって、現在まで多方面から数多くの研究が行なわれてきた。特にRSVの本性や、RSVと宿主細胞との感染における相互関係、RSVの遺伝的研究などが研究の中心課題となっているが、RSVの細胞からの放出についての研究は殆んど行なわれていない。特に、RSVで感染された肉腫細胞の特徴が、感染後も、変性、死を伴うことなく、ウィルスを放出しつつ正常調節から逸脱した様式で増殖を続ける点にあることを考え合わせると、ウィルス放出に関する研究は重要である。

申請者の研究は、このテーマを取扱ったものであって、放出量を制御する外的要因を指摘しえた業績として評価されるべきものである。すなわち組織培養という実験系を十分に駆使しうることによって、培養

液を新鮮なものに交換することによって細胞からのRSV放出への誘導の起こる事実を指摘しえた。このことからRSV放出の抑制機構の存在を示唆し、古い培養液と交換する実験によってよくこの点を確認しているのである。実験資料の最も重要な部分をなす放出ウィルス量の測定についても、古典的なPock数算法と、放射性ウィルス測定法をよく併用して、実験結果を信頼度の高いものとしている。

これらの結果は、ウィルス学的見地からのみでなく、細胞生物学上の現在の中心課題の一つである培養細胞の生理活性と培養条件との相互関係を示す一例として興味あるものと言わねばならない。

申請者の研究において、主な結果以外に、次の二つの技術的な点で重要な貢献のあったことが指摘されるべきである。その第一は、繊維芽細胞と混合培養することによって、従来極めて困難視されてきたRSVで感染された肉腫細胞のガラス器内培養の技術を完成した点である。第二は、申請者の発見した4時間毎の新鮮液交換という方法をとることによって、少数の肉腫細胞の培養液から放出される多量のRSVを容易に集めることが可能になった点である。これらの技術の改良は、将来RSVの分子生物学的、生化学的研究を、非常に容易にするものであって、事実、参考論文において、申請者は、この方法を駆使して、多量のRSVを得ることによって、その詳細な生化学的研究を遂行することができたのである。

以上の審査結果から、申請論文は理学博士の学位を授与するにふさわしいものと認められる。