インフルエンザウイルスの一段増殖 (one-step growth) の研究

北 山 徹

国立予防衛生研究所細菌部 (部長 福見秀雄博士)

〔受付: 7月8日・1954年〕

まえがき

ウィルスの生活環の基本形態をバクテリオファージについて一段増殖法と云う見事な手技によつて解明したのは Delbrück と Luria を中心とする研究者達である。

所がこのファージで得られた基本形態が果してウィルス一般の形態として即ち動物ウィルスについても適用し得るかどうかと云う問題に先ず注目したのは Henle で彼は「インフルエンザウイルス発育鶏卵漿尿膜細胞系」を用い紫外線部分不活化ウィルスで未感染細胞感染を阻止する事によりファージと同じ様な一段増殖曲線を描かせる事が出来た³⁾⁴⁾。

此の増殖曲線の類似から彼はそれを生活様式の類似へとその概念を飛躍させているのである。所がファージと異り動物ウィルスに於ては、その増殖像を研究する条件は極めて複雑であり生体内でのウィルス増殖の足がかりとなる細胞はファージに於ける如くあくまでも個々に独立したものではなく、他の細胞と有機的な関係にあり、一つの複合体としての生命を保っているものであり、そこに各種の生体反応が存し働いているし且つその感染過程に於ける条件もファージとは可成り異なる。

この様な複雑な条件にある動物ウィルスの生活環を表面的類似性からファージで見られた形態そのままの姿で受け入れるのは危険でそう云う意味合からこゝに「イ・ビ」の一段増殖を更に詳細に考究して見た。

材料及び実験方法

原ウィルス: インフルエンザウイルスA型 PR8株及びB型 Lee 株を用いた。感染漿尿液の出来るだけ新鮮なものを使用した。

感染価及び赤血球凝集価測定法: 被検材料を普通ブイヨンで10倍階段希釈しその0.2cc宛を尿膜腔内に接種し48時間37°Cに培養しウィルス増殖の有無を赤血球凝集反応により判定し、Reed and Muench 法に従いID₅₀を求めた。

赤血球凝集価測定は被検液を倍数稀釈し、これに等量の0.25%鶏赤血球浮游液を加えて沈降像により終末点を読んだ。

紫外線部分不活化ウィルスの作成: B型Lee株感染漿尿液をpH7.0の緩衝食塩水50容に対しセロファン紙にて24時間透析し、あらかじめその干渉能力を殆ど失わずたゞ感染力のみを完全に失う条件を求めその条件下に(直径4.5cmのシャーレに透析漿尿液2cc宛入れ(液層の深さ2mm)9cmの距離からマッド殺菌ランプを用いて3分間照射する)紫外線照射を行つた。

実験成績

感染漿尿膜の形態学的研究:

先ずファージのバーストと云う形態が「イ・ビ」感染漿尿膜内胚葉細胞にも見られるかどうかを知る為に次の様な実験を行つた。

実験I: 13日発育鶏卵に「イ・ビ」接種後1日~4日に互り毎日6コ宛卵を開きその漿尿膜をとり、常法に従いフォルマリン固定後パラフィン切片を作製し鏡検した。更に感染卵の一部はそのまゝ残して孵化に至る迄培養を続け、その発育状況を観察した。

発育鶏卵はウィルスの感染を受けても順調に発育を続け、正常通り孵化し、又孵化した雛にも異常を認めなかつた。漿尿膜も肉眼的には何等特殊な変化を見ない。これを病理組織学的に詳細に鏡検すると第1図に示す様に24時間後には少いが48時間後になると明瞭に漿尿膜内胚葉細胞に原形質内空胞形成、膨化等を認め核も染色性が変化し、濃染、崩壊等が見られる様になる。この頃が極期で以後ある細胞は壊死におち入り、他は修復の路を辿る。

感染漿尿膜細胞のウィルス放出期間(放出様式)につ

KITAYAMA, Tōru: Studies one-step growth of the influenza virus. National Institute of Health. — Jap. J. of Bact., 9(12), 1077—1083, 1954.

いて：

次いでウィルスは果してバーストによりファージのその様に一時にはき出されて来るものかどうか知る為その放出期間を求めた。

実験 II： 13 日発育鶏卵尿膜腔内に「イ・ビ」PR 8 株感染漿尿液の 10^{-4} 稀釈液 ($10^{4.5}$ ID₅₀) 0.2 cc を接種し 37°C に培養しその後 1 日～孵化する迄毎日 6 コ宛卵を開きその漿尿膜をとり出す。得られた漿尿膜はその表面に附着しているウィルスを出来るだけ除く為充分ピンセットと鉗で抜けて多量の生理食塩水に 1/3 量のブイオンを加えた溶液中でよく洗滌する。(普通 500 cc, 20 分宛 3 回) 次いでその中 3 コを 1 コ宛タイロッド液 10 cc を入れた小型三角コルベンに入れ 37°C に培養し 24 時間後のタイロッド液中の産生放出ウィルス量を赤血球凝集反応にて測定した。尚お漿尿膜を浮遊させて 5 分後にその溶液の一部をとり膜表面に附着しているウィルスが洗い落されて居て、ウィルスが直ちに浮遊してこない事を赤血球凝集反応により確かめた。殆ど陰性であつたが時に原液で土のものもあつた。他の 3 コは一緒にしてその感染価を測定した。又同時に各卵より 1 cc 宛漿尿液を出血を避け採取混合しその赤血球凝集価及び感染価を求める。

2 回の同様な実験より得られた成績は第 2 図及び第 3 図に示される通りである。

第 2 図 感染細胞のウィルス放出期間及びウィルスの消長 (A)

細胞のウィルス放出は日をおつて急速に低下するが感

第 3 図 感染細胞のウィルス放出期間及びウィルスの消長 (B)

染 3～4 日後にも猶お若干行われて居る事が判る。しかし 5 日以後になるとウィルスは殆ど放出されて来ない。

猶お、漿尿液に見出されるウィルス量は接種ウィルス量から考えて 24 時間後にはすべての細胞が感染していると考えられるに拘らず、48 時間後に最高となるが漿尿膜ではやゝそれより先んずる様である。又培養を続けると感染価のみ低下してくるがこれは温度によるウィルスの不活化の為であろう。更に鶏胎児肺、孵化後の雛肺には可成りのウィルス量が見出される事が判る。

感染細胞のウィルス産生量とその栄養状態との関係について：

以上のような放出期間の長い事が果してその頃迄ウィルスが産生される為によるのか、或は又たゝ前に産生されていたウィルスが細胞外へ出るのをおくれ、その為出残ったウィルスがその頃出てくるのかと云う問題が起る。

それに関し各種力源やホルモンが如何なる時期に影響を及ぼすかを知る為次の如き実験を行つた。

実験 III： 1) 葡萄糖の影響、前法と同様にして小型三角コルベンに入れた漿尿膜 20 コを 2 群に分ちその培養液を半分は 0.1% の割合に葡萄糖の入つたタイロッド液他はタイロッド液より葡萄糖を除いたものとする。これを 37°C に培養し 24 時間後液中に産生されたウィルス量を赤血球凝集反応によつて測定し、此の漿尿膜を再

び洗つて新しい溶液中に入れ更に培養24時間後の産生ウイルス量測定を毎日繰返した。

2) アミノ酸の影響: 1, 2のアミノ酸を単独に用いたのでは殆ど影響が見られなかつたので10種のアミノ酸を混合して用いた。又多量のアミノ酸はかえつてウイルスの増殖を抑制すると云う Eaton 等⁵⁾の実験からその濃度に注意した。即ち0.01%の割合にアスパラギン酸, プロリン, アルギニン, ロイチン, アラニン, メチオニン, チスチン, チロゼン, トリプトファン, 0.05%にアスパラギン酸をタイロッド液より葡萄糖を除いた溶液中に加えた。

3) コーチゾンの影響, 使用したコーチゾンはアメリカ, メルク製品で醋酸塩となつてゐるもの。0.25 mg/ccの割合にタイロッド液に加える。第4図, 第5図及び第6図の如き成績を得た。いずれも初め1~2日の間では殆ど差が認められず3~4日目位よりそのウイルス産生能に好影響を及ぼした。

第4図 葡萄糖のウイルス産生量に及ぼす影響

1個の細胞のウイルス産生量について:

以上の様にインフルエンザ, ウィルスではバーストと云う現象は見られないが感染細胞のウイルス産生能には限度があり又生理的に見てもいつまでもウィルスを産生する事は当然不可能と思われる。そこで1個の細胞の全

第5図 アミノ酸のウイルス産生量に及ぼす影響

第6図 Cortisone のウイルス産生量に及ぼす影響

ウィルス産生量を知ろうとした。Henle²⁰⁾ は1個の細胞のウイルス産生量を表わすのに漿尿液中にのみ見出され

るウィルス量より計算し漿尿膜に残存するウィルスを無視しているが、ファージの様な増殖様式をとらない「イ・ビ」では当然考慮に入れるべき所で次の如く実験を行った。

実験 IV：13 日卵尿膜腔に 10^{-5} 稀釈 PR 8 株 ($10^{3.75}$ ID₅₀) 0.2 cc を接種し 37°C に培養し更に 1 時間後 B 型 Lee 株の紫外線部分不活化ウィルス 0.5 cc を注入し初めのウィルスで感染しなかつた残りの細胞のこの後の感染を防止する。(用いた紫外線部分不活化ウィルスが干渉作用を持つ事は第 1 表の如く証明した)。

その後時間毎に 3 コ宛卵をとり出血をさせて漿尿液を 1 cc 宛とり混合し、又漿尿膜もプールしてその感染価を測定する。

第 1 表 紫外線不活化異型ウィルスを用いての干渉実験

第一次接種	第 1 次接種 24 時間後第 2 次接種	赤血球凝集 (第 2 次接種後 48 時間)
紫外線不活化ウィルス (Lee) 0.5 cc	PR 8 ($10^{3.75}$ ID ₅₀) 0.2 cc	0/5*
正常漿尿液 (対照) 0.5 cc	PR 8 ($10^{3.75}$ ID ₅₀) 0.2 cc	5/5
紫外線不活化ウィルス (Lee) 0.5 cc	—	0/5

* 分母：接種卵数
分子：赤血球凝集陽性卵数

実験成績は第 7 図の通りである。

第 7 図 インフルエンザウィルスの一段増殖曲線

膜にはウィルスの増殖が早期に即ち 4 時間後には証明出来、これに対し漿尿液では 6 時間後に初めて証明される。この潜伏期の相違は細胞での増殖がある程度迄進ん

で初めてウィルスは細胞外へ放出されて来るためである。

又漿尿液中のウィルス量はその頂点に達する迄約 2 時間を要する事が判る。

次いでこゝで得られた実験値から 1 個の感染細胞にて產生されるウィルス量を計算し第 2 表の如き結果を得た。

第 2 表 1 個の感染細胞產生ウィルス量

	漿尿液 (EID ₅₀)	漿尿膜 (EID ₅₀)
(1) ウィルス接種量	28190	—
(2) 潜伏期ウィルス量	5012	—
(3) 細胞吸着量*	23178	—
(4) 一段増殖後ウィルス量	2819000	2512000
(5) 產生ウィルス量 (4)-(2)	2813988	2512000
(6) 產生ウィルス量 (5) 吸着ウィルス量 (3)	(a) 121**	(b) 108***
(7) 1 個の感染細胞の全ウィルス產生量 (6), (a)+(b), (b)	229 (平均產生量)	

*：感染細胞数

**：1 個の感染細胞よりのウィルス放出量

***：1 個の感染細胞内ウィルス残存量

考 察

ファージで見出された増殖環の基本形態を「イ・ビ」について更に形態学的、現象論的に詳細に研究し Henle の「イ・ビ」に見られた一段増殖曲線の表面的な類似性からのファージの生活環にアナロジーを見出そうとした仮説に批判を与え様とした。

ウィルス感染を受けた发育鶏卵は、全体として殆ど影響を受けずそのまゝ正常の发育をとげるのであつて、機能的に極めて重要な役割をもつ漿尿膜細胞が感染を受けてもウィルス感染は生理的に余り大きな障碍を与えない。

病理組織学的に感染漿尿膜を見ると感染後 48 時間を頂点として明かにその内胚葉細胞に病変を認める事が出来る。この病変についての記載は、今迄殆どなされて居ず、僅かに Burnet⁶⁾ Henle³⁾ 等が簡単に言及しているに止まつている。

何はともあれ一応細胞自身は障碍を受ける事は確かであるがバーストと云う現象の裏付けは形態上、「インフルエンザウィルス・漿尿膜細胞系」には出てこないと云える。

更に現象論的にもバーストと名付けられる現象は見出されなかつた。即ち細胞のウィルス放出期間は可成りの拡がりを持つのであつて、これが個々の細胞のウィルス

増殖週期に於ける差によるのか、或はその放出期間の長い為に作られるのかを考えると接種後 24 時間ではすでに総ての細胞が感染しているであろうから、個々の細胞の増殖週期にそうづれがあるとは思えず結局個々の細胞のウィルス放出期間の長きに亙る為と解釈し得る。その証明出来るウィルスが膜の表面に附着して居るものはなれて来たものでない事は感染 5 日以後の漿尿膜培養液には殆ど見出されない事で判る。それは Cairns⁷⁾ も述べている様にバーストと云うより細胞外へだらだらと放出されて来るのであつて、又その放出もファージの様に細胞がこわれる事によつて出てくるのか、或は何か他の機作でウィルスが放出され、その後漿尿膜細胞の前述した様な崩壊があるのかも簡単に結論し得ない。

漿尿膜に於けるウィルスの増量が漿尿液のそれに先んずると云う事も以上の様な考えを支持する。

そして葡萄糖⁹⁾、アミノ酸等の力源や、コーチゾン¹⁰⁾の様なホルモン性物質がウィルス産生量を増加させる事が云われているが、これ等が放出期のかなり後期に即ち細胞のウィルス合成に利用し得る力源の消費されてしまつた後に、好影響をあたえたと云う事はすでにつくられたウィルスがその時迄放出されずに残つて居り、それが出てくると云うより外からの力源等の影響で僅かではあるが猶おウィルス産生が続いていると見た方が妥当ではないかと考える。

しかし細胞は、ウィルス産生と云う機作によりかなりの変化をうけるか又はウィルスそのものの、¹⁾ 障 碍 的 な 影 響 を 受 け る か し て 細 胞 自 身 は 生 活 を 続 け て も そ の 産 生 能 力 は 失 わ れ る の で あ つ て 即 ち 細 胞 の ウィ ル ス 産 生 量 は き ま つ た も の で あ ろ う。

その 1 個の感染細胞のウィルス産生量を Henle は 60 ~ 100 ID₅₀ と計算しているが彼は漿尿液中のみのウィルス量を問題にして居るのであり「イ・ビ」の様な増殖様式をとるものでは漿尿膜に残存するウィルス量を見逃すわけには行かない。こゝで我々が一段増殖法により得られた値から Henle の如く計算して見ると 229 ID₅₀ となる。勿論この値は感染漿尿膜をいくら洗つても表面に附着したウィルスが残る為大きに過ぎる恐れはあるが、

少くとも Henle の示した値よりウィルス産生能は大きいものと見なさなくてはならない。

結 語

「イ・ビ」の一段増殖はファージのそれと可成り異りファージで見出された増殖環の基本形態をそのまま適用する事の出来ない事を述べた。

即ち「イ・ビ」感染漿尿膜内胚葉細胞にはバーストと云う現象は証明されず、又その様式も異つて、ウィルスは一時に細胞外へはき出されるのではなくて可成りの期間に亙つて放出されるものである事を明かにした。且つその放出期間の拡がりはその時迄細胞に残つて居るウィルスが少しづつはき出されて来るのではなく、猶お細胞内で僅かながらウィルスの産生が続いている為得られるものであると云う事実を思わせる結果が得られた。

又 1 個の感染細胞にて産生される全ウィルス量を漿尿膜に見出されるウィルス量も考慮に入れて計算した。

稿を終るに臨み絶えず御懇切な御指導を賜つた福見博士及び御援助下さつた加地博士、西川文雄氏に深甚なる謝意を表する。

文 献

- 1) Ellis E. L. and Delbrück M.: J. Gen. Physiol., 22, 365, 1939.
- 2) Delbrück M. and Luria S. E.: Arch. biochem., 1, 111, 1942.
- 3) Henle W., Henle G. and Rosenberg E. B.: J. Exp. Med., 86, 423, 1947.
- 4) Henle W. and Rosenberg E. B.: J. Exp. Med., 89, 279, 1949.
- 5) Eaton M. D., Magasanik B., Perry M. E. and Karibian D.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. Sc., 77, 505, 1951.
- 6) Burnet F. M.: Austral. J. Eqp. Biol. & Med. Sc. 19, 291, 1941.
- 7) Cairns H. J. F.: J. Immunol., 69, 168, 1952
- 8) Daniels J. B., Eaton M. D. and Perry M. E. J. Immunol., 69, 321, 1952.
- 9) Kilbourne E. D. and Horsfall F. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. Sc., 76, 116, 1951.
- 10) Southam C. M. and Babcock V. I.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. Sc., 78, 105, 1951.

第 1 図 インフルエンザウィルス感染漿尿膜の組織像

(1) 感染後 24 時間

(2) 48 時間後

(3) 72 時間後

(4) 96 時間後