馬伝染性貧血ウイルスの培養に関する研究

Ⅲ. ウマ白血球培養に於けるウイルスの増殖*

小 林 和 夫**

KAZUO KOBAYASHI: STUDIES ON THE CULTIVATION OF
EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS IN VITRO

III. PROPAGATION OF THE VIRUS IN HORSE LEUCOCYTE CULTURE

〔受稿 12月9日1960〕

緒 言

第2報⁸⁾に於て馬伝染性貧血以下(伝貧と略)ウイルスが幼駒から得た赤色骨髓のTrypsin消化細胞培養に於てCPE所見と思われる細胞の変化を示して増殖することを述べた。さらに同培養に於けるウイルス感受性細胞は増殖旺盛な繊維芽細胞様細胞(F)ではなく、増殖の認められない円形の細胞であろうと云うことも記載した。

しかし前報でも触れたように良好なウマの赤色骨髓の入手は必ずしも常に容易でなく実験に支障を来す面の多いところから、さらに容易に入手出来る感受性細胞の探究が望まれた。この点を解決するものとして解剖することなく生体から直接採取し得る骨髓穿刺液の使用も挙げられるが前報で述べたように良い結果が得られなかつたのでWoodliff¹³⁾(1958)によつても記載されたように骨髓の円形の細胞と同様な培養所見を示す末梢血液内の白血球を用いて実験を行つた。

白血球の培養に関してはこれまでヒト¹⁰⁾¹³⁾ニワトリ²⁾⁵⁾¹²⁾ブタ⁵⁾⁹⁾ウシ⁵⁾などについて記載されているがウマについては見られないようである。

本報告に於てはウマの白血球を前報の骨髓の細胞培養と同様な方法で培養し伝貧ウイルスを接種観察した結果骨髓の培養に於ける円形の細胞が示したと同様なCPE所見を認め、その所見を指標とする累代培養実験に於て明らかに伝貧ウイルスが累代され増殖したことが認められたのでその成績を報告する。

材 料 と 方 法

1) 供試ウイルス材料: 前報と同様にすべて人工感染伝貧馬の初回熱発時に得られた血清を用いた。対照の健康血清には同一馬の接種直前に得られたものを使用した。

本実験に用いられた主な血清はTable 1に示した。

2) 白血球の培養: 長期間の検査で全く健康と認められた生後1年前後の幼駒からHeparinを加えて採血し(Heparin 0.5mg/ml 食塩水溶液を血液10mlにつき0.5ml 加える)室温で10~20分静置後上層に分離して来る血漿層を吸集し、4℃に冷却されたHanks液を5倍前後に加えて攪拌した後1000~1500rpm 7分遠心し沈渣白血球は同様のHanks液で1回遠心洗滌された後、培養液に浮遊された。

培養液に浮遊させる白血球の濃度は血球計算盤で測定しper ml, 10^7 前後とされた。(通常血液50mlから得た白血球を20ml前後に浮遊させた)

培養液並培養方法はすべて前報の骨髓細胞の場合に準じておこなわれた。

すなわち培養液にはウシ血清を40%に加えたMorganらのNo.119を用いCarrel flask (33×15mm容量10ml.)に2ml あて分注し37℃で静置培養した。

3) ウイルス接種、累代並観察の方法: 前報に記載した方法に従い培養の翌日古い培養液を除去した後、ウイルス血清0.2mlを接種し37℃ 10~20分感作後新鮮な培養液を1.8ml 加えた。接種後は通常翌日全量液交

* この研究は第50回日本獣医学会(1960.大阪)において発表された。

** 農林省家畜衛生試験場馬伝染性貧血研究部(部長:星修三博士)

Table 1 Virus sera and healthy controls used for the experiment.

Source	Serum*	Obtained on			Remarks
		Date	Fever °C	Days of fever	
H 231	CS VS	31/3/59 15/4	— 41.2	— 1st	} Used for serial cultivation
H 250	CS VS	28/7/59 10/8	— 40.8	— 2nd	
H 263	CS VS	3/12/59 14/12	— 41.3	— 2nd	
H 279	CS VS	25/1/60 10/2	— 41.1	— 3rd	
H 281	CS VS	1/3/60 15/3	— 41.7	— 3rd	
H 264	CS VS	14/3/60 24/3	— 40.8	— 2nd	

CS : Control serum ; collected at immediately before virus inoculation.

VS : Virus serum (Wyo, strain) ; Collected at early stage of the first febrile attack.

* : Each sera were stored at -20°C .

換を行い以後2～3日ごとに液交換を反覆しつつ培養した。

観察は通常顕微鏡弱拡大で行い同時に同様な方法で対照血清を接種された培養と比較された。又短冊硝子をあらかじめFlask内に入れて培養して附着した細胞の染色鏡検も実施した。

累代培養はウイルス接種後 CPE を示した時期の液相（交換液）かまたはその時期の培養全部を凍結して細胞も加えて採取し -20°C に凍結保存し次代接種用の材料とした。次代接種に際しては保存材料をピペットで充分攪拌した後1500rpm 5分遠心しその上清を前述の方法で次代に接種した。

対照血清を接種された培養もウイルス接種群と同時に材料を採取し同様に累代された。

4. 馬体復帰試験は前報と同様に保存された培養材料の遠心上清を接種し感染の有無が観察された。

成 績

1) 白血球の培養所見：培養された白血球は翌日の観察で硝子壁一面に密に附着して見られ骨髓の細胞培養と同様に初期は小型で透明な所見を示したが2～3日頃より細胞は大きさを増し若干顆粒性を示しこのような細胞はよく硝子壁に附着した状態で培養された。

しかし極めて稀な例外を除いてこれらの細胞には増殖が認められず漸次脱落減少が見られ多くは2週間前後で少数となつた。しかし良好な培養に於ては3週間以上にわたつて綺麗な状態で維持された。

ギムザ染色によつて観察すると培養初期に於ては多数の好中球、単球、好酸球などが所見されたが数日以後の培養に於ては大部分が大型の単核細胞によつて占められ少数の好酸球に若干の多核巨大細胞等も混じて認められた。これらの所見は前報で述べた骨髓の円形の細胞によく一致していることを示した。

2) ウイルス接種所見：接種された培養は前報の骨髓の円形の細胞に認めたと同様に7～10日後培養細胞の萎縮、凝集、変性等の変化が認められ急速に細胞の脱落減少消失を示し対照血清接種例と差を示した。

(写真1. 2.)

このような CPE 所見は白血球の培養が少くとも10日以上良好な状態で培養維持されることが必要な条件とされ不良な培養に於ては対照の細胞も早期に変性脱落し差を見出すことは不可能に終つた。一般に白血球の培養に於ては骨髓の培養に比し附着細胞の少ないことによつて CPE 発現の不明瞭な例が比較的多く見られる傾向を示した。

このような認められる CPE 所見を程度に従つて(+)で表現し今回実施された代表的なウイルス血清によつて得られた成績を Table 2 に示した。各血清はおおむね接種後8日前後で CPE を発現することが認められ、同時に1例の Titration の成績も示されたが2週間の観察で 10^{-3} まで CPE を示し 10^{-2} 以上に稀釈された材料ではその発現が著るしく遅延することが認められた。

このような認められる CPE 所見を程度に従つて(+)で表現し今回実施された代表的なウイルス血清によつて得られた成績を Table 2 に示した。各血清はおおむね接種後8日前後で CPE を発現することが認められ、同時に1例の Titration の成績も示されたが2週間の観察で 10^{-3} まで CPE を示し 10^{-2} 以上に稀釈された材料ではその発現が著るしく遅延することが認められた。

3) CPE を指標とするウイルス累代培養試験：ウイルス血清接種後 CPE を示した培養の液相を次代に接種した場合骨髓の細胞培養に於けると同様に次代培養にも CPE を発現させた。

今回 H231-VS を原接種ウイルス材料として、接種

Table 2 Development of cytopathic change after the virus inoculation in horse leucocyte culture.

Source of cell	Date of inocul.	Inocula	Dilution	Days									
				4	6	7	8	9	10	11	12	13	14
H234	18/9/59	CS	10 ⁰	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		H231 VS	//	—	—	—	—	+	+	+	+	+	
H265	31/10	CS	//	—	—	—	—	—					
		H250 VS	//	—	—	+	+	+					
H274	24/3/60	CS	//	—	—	—	—	—	—	—			
		H263 VS	//	—	—	+	+	+	+	+			
H294	6/7/60	CS	//	—	—	—	—	—					
		H279 VS	//	—	—	+	+	+					
		CS	//	—	—	—	—	—					
		H281 VS	//	—	—	+	+	+					
		CS	//	—	—	—	—	—					
		H264 VS	//	—	—	—	+	+					
H294	26/8/60	H250 VS	10 ⁰	—	—	+	+	+	+	+			
			10 ⁻¹	—	+	+	+	+	+	+			
			10 ⁻²	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
			10 ⁻³	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
			10 ⁻⁴	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
				—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

後発現した CPE を指標としてウイルス累代培養実験をおこなった。

その成績は Table 3 に示す通りである。いずれも対照累代群と比較して明らかな CPE を認めることによつて累代された。

各代に於ける CPE 発現までの期間は 6～11 日にわたり若干差が見られたが特に累代による影響は認められなかった。

累代に用いたそれぞれの接種材料は大部分原液を用いたが一部は Titration の意味も含めて稀釈して接種した。

この場合はおおむね 10⁻² 程度まで CPE が認められた

が累代に際しては大事をとり 10⁻¹ が用いられた。

なお稀釈された接種材料によつては血清の場合と同様に CPE 発現時期の遅延が認められた。現在まで 17 代 154 日に亘つて累代された。

この間ウイルス接種後おこなわれた全量液交換は各代 2～6 回計 70 回におよんだ。

したがつて最初に接種されたウイルス材料の継代稀釈 10⁻²² はさらに遙かに高稀釈となることが考えらる。

4) 累代培養材料の馬体復帰試験：累代培養材料のウイルス証明の目的で 7 代、14 代、17 代の材料が健康馬に接種された。

同時に対照累代培養材料も念の為に14代17代について実施された。

その成績は Table 4 に示す通りである。

ウイルス累代培養材料の接種によつてはその 1 ml, (7代, 14代) および 10^{-1} 1 ml (17代材料) でことごとく感染発症を示したが対照累代材料ではその 1 ml 接

Table 3 Serial cultivation of the virus by marking cytopathic changes in horse leucocyte culture.

Passage No.	Date	Number of flasks		Dilutions of inocula		Appearance of C. P. E. (day)		Cultivation days	Times of medium exchange	Cumulative dilution of the original viral material
		V	C	V	C	V	C			
1	18/9/59	2	2	—	—	+ 9	—	10	4	$> 10^{-1}$ †
2	31/10	2	2	—	—	+ 7	—	7	3	$> 10^{-2}$
3	19/11	1	2	—	—	+11	—	11	5	$> 10^{-3}$
4	1/12	2	2	—	—	+ 8	—	8	4	$> 10^{-4}$
5	18/12	2	2	—	—	+ 7	—	7	3	$> 10^{-5}$
6	10/2/60	2	2	—	—	+ 6	—	7	4	$> 10^{-6}$
7	19/2	2	2	10^{-1}	—	+10	—	10	4	$> 10^{-8}$ *
8	1/3	2	2	10^{-1}	—	+10	—	10	6	$> 10^{-10}$
9	11/5	2	2	—	—	+ 9	—	9	4	$> 10^{-11}$
10	27/5	2	2	—	—	+ 7	—	10	5	$> 10^{-12}$
11	7/6	2	2	—	—	+10	—	11	5	$> 10^{-13}$
12	21/6	3	2	—	—	+ 9	—	10	5	$> 10^{-14}$
13	1/7	2	2	—	—	+ 8	—	9	4	$> 10^{-15}$
14	10/7	3	3	10^{-1}	—	+ 8	—	9	4	$> 10^{-17}$ * §
15	26/7	4	2	10^{-1}	—	+ 6	—	8	2	$> 10^{-19}$
16	4/8	2	2	10^{-1}	—	+ 7	—	8	2	$> 10^{-21}$
17	24/8	2	2	—	—	+ 8	—	10	6	$> 10^{-22}$ * §
				Total				154 days	70 Times	

V : Virus passage series (Original viral material : H231-VS.)

C : Control passage series (Original inoculum : H231-CS)

† : Medium exchanges in each generations were carried out several times showed in the table, therefore the total dilutions must be calculated in higher log number than that of designated in each passage dilution in the table.

* § : Horse inoculation tests were advanced using cultured materials (fluids) of virus series (*) and of control series (§).

Table 4 Results of horse inoculation tests using cultured materials in the serial cultivations.

Series	Passage No.	Test horse		Inoculation			Cumulative dilution of the original viral material	Infection	Incubation or (observation) days
		No.	Age (month)	Dosis (ml)	Route	Date			
V	7	H281	9	1	S. C.	1/3/60	$> 10^{-8}$	+	12
	14	H295	14	1	S. C.	19/7	$> 10^{-17}$	+	12
	17	H293	16	1×10^{-1}	S. C.	3/9	$> 10^{-23}$	+	12
C	14	H293	14	1	S. C.	19/7/60	—	—	(46)
	17	H292	17	1	S. C.	3/9	—	—	(70)

種で46~70日間にわたって全く変化が認められず陰性を示した。

これらの感染した試験馬の所見はFig. 1に示すと共に次にその概要を記載する。

H281 (7代10日培養材料 1 ml 接種例) : 接種後12日で発熱し約10日間にわたる熱稽留(最高体温 41.6°C) 後下降期に入り弛張性の熱型を示し25日後に虚脱のために解剖された。

Fig. 1 Temperature records and hematological findings of horses inoculated with the cultured materials.

T : Body temperature (°C)

E : Number of erythrocytes in million.

L : Number of leucocytes in thousand.

Sidero : Appearance of siderocytes in ca. 50000 leucocytes counts.

- : Negative ± : Less than 1. + : 1~4. ++ : 5~20.
 +++ : 21~50 ++++ : 51~100 ##### : more than 100.

貧血は極めて軽微であつたが（最低 615万）明瞭な Leucopenia（最低3800）、多数の Siderocyteを証明し（白血球 6 万個中最高120個）また熱発後に著明な Monocytosis も見られ（最高18%）伝貧感染と診断された。また病理組織学的検査の結果も伝貧感染病変を認めた。

なお解剖時に実施した脾、肝、腎、淋巴節、肺等について実施した細菌培養の結果は陰性であつた。

H295（14代9日培養材料1ml接種例）：接種後12日で熱発し約8日間にわたって41℃前後の高熱を持続し（最高体温41.7℃）下降期に入り虚脱の為解剖された。

貧血は熱発初期に見られ（最低572万）明瞭な Leucopeniaを示し（最低4600）Siderocyteも熱発とともに明らかに証明された（白血球5万個中最高15個）、これらの所見にあわせて病理組織学的病変も認め伝貧感染と診断した。

H293（17代10日培養材料 10^{-1} 1ml接種例）：本試験馬は14代対照累代材料を接種され46日間にわたって全く変化を示さなかつたもので本材料接種後は12日で熱発し6日間にわたる初回熱発作を示した（最高体温41.4℃）貧血は初期不明瞭、遅れて稍明瞭に認められ（最低455万）明瞭な Leucopenia（最低4000）と明らかな Siderocyte の出現を示し（白血球5万個中最高19個）さらに本例は熱分利後著明な Monocytosis を所見した（25%）。また本例は43日後に最高体温40.7℃を持つ第2回目の明瞭な熱発を示した。これらの所見から本試験馬も伝貧感染と診断された。

以上の成績から今回の累代培養実験に於ては17代後まで確実に伝貧ウイルスが累代されたことを示し原接種ウイルス材料の稀釈 10^{-23} 以上で陽性を認めたことは明らかにウイルスが増殖したものと認められた。

総括と考察

伝貧ウイルスが組織培養で増殖するか否か、もし増殖するとすれば感受性細胞は何であろうかと云う疑問は今日まで極めて興味ある重要な問題とされて来た。

著者はこの問題を解明する為唯一の感受性動物であるウマ組織を用いて実験を進め、第1報⁷⁾では肝臓の Maitland 培養が若干注意された外は脾、淋巴節、腎、肺、副腎等の培養でほとんど陰性に終つた成績から第2報⁸⁾に於てはさらに感受性が期待される骨髓の培養をおこない検討した結果、同培養に於てはF性の増殖細胞には感受性が認められなかつたが増殖の認め

られない円形の細胞は明らかに感受性を示しウイルスの増殖をおこすことが認められた。

今回はさらに骨髓の円形の細胞に類似した培養所見を示す末梢血液内の白血球を培養し実験をおこなつた。

白血球の培養所見についてはWoodliff¹³⁾(1958)がヒトの細胞について記載し増殖を示すF性細胞を除いては骨髓の細胞培養とよく一致することを述べて居り、今回著者の実施したウマの白血球の培養に於ても前報で述べたウマ骨髓の培養と比較してF性増殖細胞を欠いた点以外はよく一致して居り2週間前後乃至それ以上にわたって培養される円形の細胞は大部分Bermanら¹¹⁾(1955)のRound cell phaseまたWoodliff¹³⁾(1958)の第2期の細胞に一致するものと考えられる。

このような細胞の所見はさらに伝貧ウイルスの接種累代によるCPE所見に於ても同様の態度を示すことが認められた。すなわちウイルス血清接種後1週間頃からCPEを示しその時期の培養液相を次代に接種することにより累代出来ることが認められた。

このような所見を指標として今回17代累代培養をおこなつた。累代培養材料の馬体復帰試験の結果は7代、14代、17代とも陽性を示し対照累代材料では14代、17代で全く陰性を示した。この結果から17代まで伝貧ウイルスが継代され70回におよぶ液交換を度外視しても 10^{-23} の稀釈まで馬体を発病させたことになり、この培養で伝貧ウイルスが増殖したことは明らかである。

したがって培養されたウマ白血球も骨髓の円形の細胞と同様に伝貧ウイルスに対する感受性細胞であることが認められ、その発現するCPE所見は恐らく伝貧ウイルスの増殖に基く所見であろうと考えられる。

今回用いられたウイルス血清はそれがいづれもWyoming系ウイルス感染馬から得られた点については、第1報の成績から比較的ウイルスTiterの高いことが認められた理由により前報の実験で専ら用いられその後は新鮮なウイルス材料と云う点から実験によつて感染した復帰試験馬からの血清が選択的に用いられたことによるものである。

伝貧ウイルスについてはそれぞれの分離株によつて差を示すか否かその詳細な点は今後の研究に待たねばならないがSteinら¹¹⁾(1950)はその中和実験の結果から若干の免疫学的な差も考えられるとして居り、この点今後それぞれのウイルス株による培養態度も比較検討する必要がある。またこれらの実験に於てその

CPE に主体を置く場合、すでに骨髓の培養に於ても述べたように稀釈されたウイルス材料によつてはその変化の発現がいちじるしく遅延し、明瞭な成績が得られ難い欠点があり、長期にわたつて良好な細胞を維持する培養条件の検討並個々の細胞に特異的な変化を証明することも重要な課題とされる。

つぎにこのような細胞に於けるウイルスの増殖に関しては最近Dunne⁵⁾ (1958)らによりブタ、ニワトリ、ウシの白血球培養でそれぞれブタコレラウイルス、NDV, Infections bovine stomatitis virusの増殖が記載され、又前報告でも引用したようにMalmquist⁸⁾ (1960)らによりブタの骨髓および白血球の培養がAfrican swine fever virus (ASFウイルス)に感受性を示すことが記載された。

これらのうちASFウイルスによるCPE所見は著者の成績と類似している点で興味を持たれる。すなわちASFに於てはウイルス材料として急性発病ブタの血清を接種するとブタの骨髓および白血球の培養でCPE所見が見られ骨髓で増殖するF性細胞には変化を与えないと記載された。このような所見の類似はさらに本病と伝貧との疾病学的類似性を知ることによつて一層興味を持たれる。

すなわちASFはブタコレラ類似のウイルス病として1910年以来アフリカに認められて来たが本ウイルスの抵抗性の高いこと、他の動物はほとんど感受性を示さないこと、特に興味ある点は急性致死を免れた病ブタはCarrierとして血中にウイルスを保持し排泄を続け、免疫抗体の証明されないことなど伝貧と極めて類似していることが推定される。このような所見からDetray⁴⁾ (1957)によつてもASFは伝貧および人の血清肝炎に類似すると述べられている。

またASFに於ける病ブタは著明なLeucopeniaおよび相対的Lymphopeniaを示すことが記載されているが³⁾伝貧に於てもこれらの所見は多くの例に認められる点であり⁶⁾、骨髓ならびに白血球の培養細胞が示すウイルス感受性と病性との間に何等かの関係を有することも想像される。

結 論

ウマの末梢血液内白血球を培養し伝貧ウイルスの増殖試験をおこない次の成績を得た。

1. ウシ血清を40%に加えたNo.199の培養液でウマの白血球が2〜3週間にわたつて硝子壁に附着培養された。
2. ウイルス材料として感染馬熱発時血清を接種さ

れた培養細胞は接種後7〜9日で細胞の萎縮、変性、脱落などの変化を示した。

3. その細胞変化の発現性は継代されることを認め、それを指標として17代154日にわたつて累代培養をおこなつた。

4. 累代培養材料を用いて馬体復帰試験を実施した結果原接種ウイルス材料の 10^{-23} 以上の稀釈で陽性の感染を示した。

以上の成績からウマの白血球培養に於て伝貧ウイルスが累代され増殖したことを認めた。さらにこの成績からウイルス接種後に発現する細胞変化は恐らくウイルスの増殖に伴う所見と考えられる。

稿を終えるに臨み御懇篤なる御指導を賜つた東大農学部越智教授および家畜衛生試験石井場長、星部長に衷心より感謝致します。また終始御助言御援助をいただいた田淵研究室長、甲野技官ならびに伝貧研究部各位に深謝致します。

文 献

- 1) Berman, L., Stulberg, C. S. & Ruddle, F. H. (1955): Long-term tissue culture of human bone marrow. I. Report of isolation of a strain of cells resembling epithelial cells from bone marrow of a patient with carcinoma of the lung. Blood, J. Hemat., 10, 896.
- 2) Carrel, A. & Eberling, A. H. (1922): Pure culture of large mononuclear leukocytes. J. Exp. Med. 36, 365~377.
- 3) DeTray, D. E. & Scott, G. R. (1957): Blood changes in swine with african swine fever. Amer. J. Vet. Res. 18, 484~490.
- 4) DeTray, D. E. (1957): Persistence of viremia and immunity in african swine fever. Amer. J. Vet. Res. 18, 811~816.
- 5) Dunne, H. W., Luedke, A. J. & Hokanson, J. F. (1953): The growth of animal leukocytes and their use in the cultivation of animal viruses. Amer. J. Vet. Res. 19, 706~711.
- 6) 葛西外 (1950): 馬の伝染性貧血, 下巻, 養賢堂, 東京.
- 7) 小林 (1961): 馬伝染性貧血ウイルスの培養に関する研究, I 種々なウマ組織の培養によるウイルス累代培養試験. ウイルス, 11, 177~189.
- 8) 小林 (1961): 馬伝染性貧血ウイルスの培養に関する研究, II ウマの骨髓細胞培養に於けるウイルスの増殖. ウイルス, 11, 189~201.
- 9) Malmquist, W. A. & David Hay (1960): Hemadsorption and cythopathic effect produced by african swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. Amer. J. Vet. Res. 21, 104~108.
- 10) Osgood, E. E. & Brooke, J. H. (1955): Continuous tissue culture of leukocytes from human leukemic blood by application of "Gradient" principles. Blood, J. Hemat. 10, 1010.
- 11) Stein, C. D. &

Gates, D. W. (1950) : The neutralizing effect of antiserum from recovered carriers of equine infectious anemia on the virus of the disease. *Vet. Med.* **45**, 4. 12) Weiss, L. P., & Fawcett, D.W. (1953); Cytochemical observation of chicken

monocytes, macrophages and giant cells in tissue culture. *J. Histochem. & Cytochem.* **1**, 47. 13) Woodliff, H. J. (1958) : Glass substrate cultures of human blood and bone marrow cells.; *Exp. Cell Res.* **14**, 368.

Explanation of plates

Microphotographs of horse leucocytes cultivated on glass surface ; by phase contrast microscopy, 24×7 .

Fig. 1 Control culture 7 days after inoculation of the normal horse serum, including large number of fine round cells.

Fig. 2 Infected culture 7 days after inoculation of the virus serum; Round cells show cytopathic changes noted by damage and desquamation of the cells.