“lipovirus” の増殖におよぼす温度の影響

塩 見 俊 朗* 長 谷 川 文 男

INFLUENCE OF TEMPERATURE TO MULTIPLICATION OF “LIPOVIRUS”

Toshiro SHIOMI and Fumio HASEGAWA

[受稿 7 月 2 日, 1963]

lipovirus は細胞変性を起し得る継代可能な新しいウイルスであつて、流行性肝炎患者の急性期の血液より分離されたものである (Chang, 1961-a). 本ウイルスは次の様な特異な性質を有する. すなわち、外膜が主として lipid よりなる DNA ウィルスであつて (Chang and Humes, 1962), 感染細胞の核内には、直径約 15 m μ の電子濃度の濃いリング様構造物が認められ、細胞質に移動して集合し、直径約 100 m μ の海綿様小体を形成する (Dunnebacke, 1963). 人細胞の DNA および thymine を分解する性質を有し (Chang and Liepins, 1962), lipogenic toxin を産生して培養細胞に脂肪変性を生ぜしめる (Chang, Geyer and Andrus, 1962). また、本ウイルスに対する抗体が、流行性肝炎患者に証明された (Chang and Owens, 1964).

Kaplan (1955) および Kunin and Jordan (1961) は、組織のポリオウィルスに対する感受性が、in vitro と in vivo において相違することを指摘しているが、同様な差異が lipovirus についても、Chang and Humes (1962) によつて観察された. すなわち、鶏胎児初代培養細胞を 2~3 日で変性せしめ得る量の lipovirus を接種しても、鶏胎児を感染死せしめることができない. また、Sarcoma 180 は lipovirus の感染によつて in vitro にて 2~3 日で変性に陥るが、lipovirus を感染させた sarcoma 180 をマウスに接種すると、腫瘍細胞は増殖を続けて肉腫を形成した.

in vitro における細胞培養の温度に比べて、鶏胎児の孵化温度やマウスの体温が高く、また、培養温度の上昇

はウィルスの増殖に抑制的に作用することが観察されている. 本論文においては、lipovirus の増殖におよぼす温度の影響を in vitro, in ovo および in vivo について検討した.

材料と方法

細胞培養: Chang (1954) の人肝細胞株 (Lich-1) あるいは 10 カ月人胎児胎盤より採取した羊膜を 0.2 % trypsin にて処理し、直接硝子面に単層に発育せしめた. 非働性犢血清を 5 % に加えた Eagle 基礎培地 (Eagle, 1955) を発育および維持培地としたが、Chang (1961-b) に従い若干の修正を加えた. 抗生物質としては、penicillin 100 u/ml, streptomycin 100 γ /ml および mycostatin 100 u/ml を用いた.

lipovirus: 1954 年に分離されて以来、鶏胎児初代培養を用いて 12 代以上継代されたものである. 変性を示した感染細胞は、0~4°C にて少くとも 2 年間はその感染力を保持することができる. 感染実験に使用した stock virus は次のように作製した. すなわち、変性を示した感染鶏胎児初代細胞培養瓶をよく振盪して硝子面より細胞をはがし、この細胞浮游液を 2,500 rpm, 20 分間遠心沈澱する. lipovirus は主として細胞に随伴しており、沈澱を原液の $\frac{1}{10}$ 量の上清に再浮游させたものの力価は約 10^7 TCID₅₀/ml であつた. 上清をさらに 20,000 rpm, 1 時間遠心沈澱して原液の $\frac{1}{10}$ 量に濃縮した無細胞ウィルス液の力価は約 10^8 TCID₅₀/ml であり、その遠沈上清には感染力を証明することはできなかった.

ウィルスの定量: Hanks 液にて試料の $10^{-0.5}$ 倍稀釈列を作製し、それぞれの 0.1 ml ずつを 2~4 本の Lich-1 培養管に接種し 33°C にて回転培養に付し、14 日後においてなお CPE (細胞変性効果) を示さない培養管を

* 三重県立大学医学部微生物学教室 (主任: 塩見俊朗教授)

Department of Microbiology, School of Medicine, Mie Prefectural University (Chief: Prof. T. Shiomi)

Table 1 Onset and progression of CPE in infected human cell cultures kept at different temperatures

Cell culture	Inoculum (ID ₅₀)	Incubation temperature (°C)					
		25	33	36	37	38	39
Lich-1	300		3-5	5-10	6-9	none ²⁾	none
	30	5-9 ¹⁾	4-5	8-12	14-21	none	none
	3		5-7	9-12	16-21	none	none
Primary amnion	300	7-10	6-8	6-9	12-16	none	none

1) CPE was first recognized on the 5th day and completed by the 9th day after inoculation.

2) No specific degeneration after 21st day.

陰性とした。ID₅₀ は Reed and Muench に従って計算した。

温度：33°C および 39°C は孵卵器 (±0.5°C) を、36°C, 37°C および 38°C は温浴 (±0.1°C) を、また、25°C は空気調節された実験室 (±2°C) を使用した。マウスの体温は、thermister 温度計を直腸内に 20 mm の深さに挿入することにより測定した。

実験成績

I. 感染細胞培養にあらわれる CPE と培養温度との関係

第1表は、Lich-1 および人羊膜初代培養に種々の量の lipovirus を感染させて、種々の温度に培養した場合の細胞変性の出現に要する日数を示したものである。

細胞変性を起し得る至適培養温度は 33°C であつて、25°C および 36°C には明らかに CPE の発現がおくれ、37°C にはさらに著しい遅延が認められた。しかして、38°C および 39°C には、CPE が培養 21 日後にも出現しなかつた。同様な成績は鶏胎児初代培養にても認められたが、いずれの場合にも、非感染細胞培養は 39°C にて進行性の細胞変性を示さなかつた。

II. ウイルスの増殖および CPE の発現におよぼす培養温度の影響

ウイルスの増殖と CPE との関連性をみるために、次の実験を行つた。すなわち、Lich-1 培養管に 300 ID₅₀ の無細胞 lipovirus を接種して 33°C に 2 時間保温し、吸着されなかつたウイルスを Hanks 液にて 2 回洗滌して除く。各培養管に 1 ml の維持培地を加え、その 2 本についてウイルス量を測定し O-time の値とする。他の培養管は 25°C, 33°C および 38°C に保温した後、毎日 CPE の有無を観察する。維持培地は更新することなく、5 日目に 1 ml を培養管に追加し、3, 5 および 7 日目に各培養温度の 2 本ずつの培養管について、培養液および細胞随伴ウイルスの定量を行つた。すなわち、培養

Table 2 Relation between specific cell degeneration and virus production of infected culture kept at several temperature

Incubation temp. (°C)	Day after infection	CPE ¹⁾	Virus titer ²⁾		
			Fluid phase		Cells ³⁾
	0	—	0.8	<0.3	2.0/4.3 2.3/4.6
25	3	—	1.5	1.8	1.3/4.1 1.5/5.1
	7	+	3.0	2.5	3.8/4.9 3.5/5.0
33	3	+	2.3	3.0	3.0/4.4 3.8/5.4
	5	++	2.8	3.0	5.0/4.9 5.8/5.1
	7	++	3.3	2.5	6.3/5.2 6.5/5.3
38	3	—	0.5	<0.3	0.5/4.6 1.8/5.8
	5	—	0.3	0.3	1.5/5.0 1.5/4.8
	7	—	<0.3	<0.3	1.0/4.9 1.0/5.8

1) —, + and ++: No, early and advanced degeneration.

2) Tissue culture infectious doses per culture, expressed as the negative logarithm of the highest dilution which gave rise to specific degeneration in half of the inoculated cultures.

3) logarithm number of infectious cells/logarithm total cell number.

管を暫時直立静置して管壁より剝離した細胞を沈降させた上清について力価を測定し、培養液のウイルス力価とした。かくして培養液を除いた培養管に Hanks 液の一定量を加え、著しい細胞変性を示した培養管では、激しく培養管を振盪することにより細胞を硝子面より剝離して細胞浮游液を作製し、また、軽度の細胞変性を示した培養管および細胞変性を示さない培養管では、細胞分散剤として培養管に trypsin を 0.2% の割に加えて細胞浮游液を作製し、これらについて、感染細胞数の定量と共に、総細胞数の測定も実施した。lipovirus は主として変性細胞に随伴しており、1 回の凍結融解によつてその力

価は激減し, また 0.2% trypsin によつて 37°C で少くとも 24 時間は影響を蒙らないことから, 上述の定量方法を採用した。

第 2 表はその成績を示したものであつて, CPE の認められた培養管では, 液相, 細胞内ともにウイルス量の増加が認められたが, 38°C の保温にて CPE を示さなかつた培養管では, ウイルス力価の上昇が全く認められなかつた。

III. 38°C 培養時における interferon 産生の有無

前節の実験では, lipovirus を接種した細胞培養を 38°C に保温すると, CPE もウイルスの増殖も認めることができなかったのであるが, この現象が感染細胞から産生された interferon に基因するものであるか否かを検討した。すなわち, 4 本(A, B, C および D)の Lich-1 培養管を準備し, A および C 管には 30 ID₅₀ の lipovirus を接種し, B および D 管は非接種対照とする。A および B 管は 38°C に, C および D 管は 33°C に保温すると, 4 日後には C 管のみに著しい CPE が認められる。この時期に, 各管の液相部を採取して, lipovirus を除去するために, 20,000 rpm, 1 時間の遠心沈澱を行い, その上清を滅菌 cellophane tube に収めて蒸溜水に対して 4°C, 24 時間透析した後風乾にて蒸発濃縮させ, Eagle 基礎培地に再浮遊させて原量の 1/10 量の濃厚液とした。80% の維持培地に 20% の遠沈上清あるいは 10 倍濃度の遠沈上清を加えたものを Lich-1 培養管に 1 ml 加えて, これに攻撃ウイルスとして coxsackie B-1, vaccinia および lipovirus のそれぞれ 30 ID₅₀ を感染せしめた。しかしながら, いずれの例においても, A 培養管の液相部に, 攻撃ウイルスに対する防禦効果を認めることができなかった。さらに, B および D 管の液相部の遠沈上清に lipovirus を加えて 38°C, 24 時間保温することによつても, その感染価の低下は認められなかつた。

IV. 38°C 培養時におけるウイルスの運命

30 ID₅₀ のウイルスで感染させた Lich-1 培養管を種々の期間 38°C に保温した後に 33°C に移すと, 第 3 表に示す成績が得られた。

すなわち, 38°C に保温した感染培養管を培養開始後 32~35 日以内に 33°C に移すと CPE が認められるが, CPE の出現に要する日数が, 33°C の培養温度では通常 3~5 日であるのに対して, 38°C 保温の前処置により 6~21 日に延長した。38°C に 53~60 日以上保温すると, たとえ 33°C にこの培養管を移しても CPE は最早出現しなくなつたが, ウイルスの再接種に対して感受性を有し, CPE を示した。しかして, 細胞内に侵入したウイルスは, 38°C にて 32~35 日間生存しているのに反して,

Table 3 Transfer of infected cultures kept at 38°C for varying duration to 33°C

Expt.	Day of ¹⁾ transfer	Onset of ²⁾ CPE	Infectivity ³⁾ in fluid
1	3	6	+
	14	18	—
	32	21	—
	53	none ⁴⁾	—
2	24	14	—
	35	18	—
	60	none	—

1) Day of transfer from 38°C to 33°C.

2) Day after transfer to 33°C when cytopathic change appeared.

3) Infectivity in the fluid phase at the time of transfer from 38°C to 33°C.

4) No specific degeneration after 28th day.

液相中のウイルスは 3 日までは証明できたが, それ以後は比較的速に不活化された。また, 33°C の培養で中等度の CPE を示した培養管を 38°C に移すと, 3~7 日後には CPE が消失し, この感染治癒を示した培養管は, ウイルスの再感染に感受性を保持していた。従つて, 細胞培養にて培養温度を交互に変化させることにより, lipovirus は少くとも数か月間はその感染力を保持することができるのである。

V. 鶏胎児に対するウイルスの病原性におよぼす温度の影響

Chang and Humes(1962)は, 鶏胎児に対し in vitro にて著しい CPE を示す lipovirus が, in ovo にて全く病原性を発揮し得ないことを指摘した。一般に孵化鶏卵

Table 4 Effect of incubation temperature on the mortality of chick embryo infected with the "lipovirus"

Route of inoculation	Inoculum	Embryo mortality ¹⁾	
		33°C	38°C
Amniotic cavity	500 ID ₅₀	24/24	2/16
	Medium control	9/20	0/18
Allantoic cavity	500 ID ₅₀	7/8	0/8
	Medium control	0/8	0/8
Chorioallantoic membrane	500 ID ₅₀	18/18	0/16
	Medium control	3/14	0/10
Yolk sac	500 ID ₅₀	16/44	1/10
	Medium control	12/42	0/10

1) Expressed as number dead/inoculated.

は 37~39°C に保温されるが、これらの温度が lipovirus の増殖に不適当と考えられるので、33°C に保温した鶏胎児に対して lipovirus が病原性を有するか否かを検討した。第4表はその成績を示したものであつて、羊膜腔および卵黄の接種には7日孵化卵を、尿膜腔および漿尿膜接種には10日孵化卵を用い、ウイルス接種後それぞれ 33°C および 38°C に保温した。接種後2日以内に斃死したものは成績から除外し、また、孵化開始後21日目に鶏胎児の生死を判定した。

表に示す様に、500 ID₅₀ の lipovirus を羊膜腔、尿膜腔および漿尿膜に接種して 33°C に保温すると、胎児に対して明らかに致死的に作用するが、38°C の保温ではその致死効果は著しく減弱した。感染後 33°C に保温した場合には、胎児は感染4~7日後に斃死し、その羊水および尿膜腔液には、1 ml につき少くとも 10⁴ ID₅₀ のウイルスが証明された。培地を接種した対照胎児を 33°C に保温することによつて、0~45%の死亡率が認められたが、感染胎児に比べて遅れて斃死した。感染後 38°C に保温した場合には、大多数の胎児は孵化開始後21日まで生存し、これらの生存卵からは稀に、また、少数の斃死卵からは毎常少量のウイルスが回収されたが、いずれの場合にも増殖の傾向は認められなかった。ウイルスを卵黄のうに接種した場合には、33°C に保温しても、対照に比べて胎児の死亡率に変化は認められず、また、lipovirus に卵黄を加えて 33°C に24時間保温した後にも元の感染価を保持していた。

VI. 低体温マウスにおけるウイルスの増殖

乳のみおよび成熟マウスに、10⁶ ID₅₀ の大量の細胞随伴ウイルスを腹腔内接種した場合には、毎常脾から、また、不規則に肝その他の臓器よりウイルスを分離することができた。前節において、感染鶏胎児を 33°C に保温すると、ウイルスの増殖に伴つて胎児の感染死が認められたことから、マウスの体温降下が lipovirus の増殖におよぼす影響を調べるために次の実験を行った。

すなわち、成熟マウスの腹腔内に 10⁶ ID₅₀ の細胞随伴ウイルスを接種して7日目に、対照として2例の脾・肝のウイルスを定量し、これを実験開始時のウイルス量とする。残余のマウスを2群に分ち、1群には barbital sodium を皮下注射して低体温を起させ、他の1群は無処置対照とした。低体温群のマウスは直腸温を12時間毎に測定し、その体温に応じて barbital sodium を1日1~2回投与し、満足すべき低体温(33°C 以下)を5~18日間持続させた後に、その脾および肝のウイルス量を定量した。すなわち、缺いて細切した組織に 0.2% trypsin を加え、37°C の水浴中に時々振盪しながら60分間作用させる。粗大組織片を除去するために暫時静置し

Table 5 Virus contents of spleens and livers from infected mice subjected to hypothermia.

Expt.	Day tested ¹⁾		Virus contents ²⁾	
	Hypothermia	Normal	Spleen	Liver
1		0	3.5 ; 3.5	2.5 ; 3.8
		7	2.5 ; 3.0	1.8 ; 2.8
	5		2.5 ; 4.0	2.3 ; 3.8
	7		5.5	3.3
2		0	1.5 ; 2.5	1.8 ; 1.8
		18	1.5 ; 2.0	1.8 ; 1.8
	7		2.5 ; 3.0	1.8 ; 2.8
	10		2.5	1.3
	18		3.5	3.8

- 1) Mice were given single dose of lipovirus at 10⁶ ID₅₀. After 7 days, 2 animals were sacrificed and the results considered that of zero day. Artificial hypothermia were induced in one group with the remainder acting as control.
- 2) Expressed as infectious doses per organ. Each figure represented result of one organ.

て混濁した上清を定量材料とする。ウイルスは粗大組織片にも残存しているので、実際のウイルス量は本法にて得られた成績よりも大である。第5表に示す成績から、低体温マウスにおいては、ある程度のウイルスの増殖が認められたと考えられる。

総括および考案

Enders and Pearson(1941), Wheeler(1958), Walker and Boring(1958), Lwoff(1959)は、培養温度の上昇はウイルスの増殖に抑制的に作用することを明らかにしている。lipovirus の増殖も培養温度によつて著しく影響される。本ウイルスの至適発育温度は 33°C であり、25°C および 36°C では中等度に、37°C では強度に発育が抑制される。感染細胞培養を 38°C に保温すると、ウイルス増殖が全く阻止されるが、その感染力は少くとも35日後においても保持されていた。この臨界温度は人の生理的体温より僅か高いにすぎないものであり、また、in vitro における人由来細胞の生存ならびに増殖になんら障害作用をおよぼさないものであることは、興味のある点である。しかし、この特異な性状を有する lipovirus に対する細胞感受性は、環境温度の僅かの变化によつて、完全に逆転するのであるが、その機転に関しては不明である。しかしながら、少くとも interferon 様物質や、細胞外 inhibitor の游出によるものでなく、

また、細胞外ウイルスが急速に不活化されることによるものでもない。細胞抵抗性は可逆的のものであるので、抵抗性変異細胞株の出現によるものでもない。

温度による細胞感受性の変化は、鶏胎児においても同様に認められた。羊膜腔、尿膜腔および漿尿膜經由で鶏胎児を感染せしめて 33°C に保温すると、通常 4~7 日後に斃死したが、38°C の保温では死に至らなかった。しかし、卵黄のうにウイルスを接種した場合には胎児は斃死せず、その理由は不明である。lipid に富んだ外膜を有する本ウイルスが、鶏胎児の lipid に富んだ卵黄のう内にて増殖し得なかつたという成績は興味のある処である。低体温マウスにてウイルスの充分な増殖が認められなかつたが、これは、満足すべき低体温の状態を永続させることが困難なことに基因するものと考えられる。

lipovirus による細胞変性が、in vitro にて、25°C においても認められることから、本ウイルスの定量を非常に簡略化することができる。すなわち、細胞培養は 25°C の保温にて、培地を更新することなく 14 日後にても比較的正常的の状態に止まっているので、ウイルスの定量にさいして、多数の培養管の培地を更新するという手数を省略することができるものである。

結 論

lipovirus は流行性肝炎患者の急性期の血液より分離された、細胞変性を起し得る継代可能な新しいウイルスである。

lipovirus が感染細胞培養に特異的細胞変性を起し得る至適温度は 33°C であり、37°C では部分的に、38°C では完全にその作用は抑制される。鶏胎児の羊膜腔、尿膜腔および漿尿膜に lipovirus を接種して 33°C に保温すると、ウイルスの増殖に伴つて胎児は感染死を来すが卵黄のう内に接種したり、また、感染胎児を 38°C に保温すると、ウイルスの致死効果が認められなくなる。感染マウスに低体温を持続せしめると、若干のウイルスの増殖が認められる。

従つて、lipovirus は in vitro, in ovo および in vivo にて、33°C という比較的低温でよく発育増殖するが、温度の上昇は発育阻止的に作用するものであるといえる。

Summary

Lipovirus is a new transmissible cytopathic agent, possibly isolated from the acute phase blood of an infectious hepatitis patient.

The optimal temperature for the development of specific degeneration in lipovirus-infected culture was 33°C. Partial and complete suppression was noted at 37°C and 38°C respectively. The lipo-

virus was lethal to chick embryos if the virus was inoculated into the amniotic or allantoic sacs or onto the chorioallantoic membrane and the embryos then incubated at 33°C. Inoculation into the yolk sac or elevation of incubation temperature to 38°C nullified the lethal action of the lipovirus on chick embryos. A little lipovirus replicated in the spleen and liver of artificial induced hypothermic mouse.

Consequently, the replication of the lipovirus in vitro, in ovo and in vivo was powerfully accelerated at 33°C, relatively low temperature and temperature elevation generally resulted in the suppression of virus multiplication.

References

- 1) Chang, R. S. (1954): Continuous subcultivation of epithelial-like cells from normal human tissues., *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, **87**, 440-443. — 2) Chang, R. S. (1961-a): Properties of a transmissible agent capable of inducing marked DNA degradation and thymine catabolism in human cell., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **107**, 135-138. — 3) Chang, R. S. (1961-b): A comparative study of the growth, nutrition and metabolism of the primary and the transformed human cells in vitro., *J. Exp. Med.*, **113**, 405-417. — 4) Chang, R. S. and Liepins, H. (1962): A study of the mechanisms of DNA and thymine degradation in cultured human cells infected with a lipovirus., *J. Exp. Med.*, **115**, 967-976. — 5) Chang, R. S. and Humes, M. (1962): The biological, immunological and physicochemical characterization of a transmissible agent capable of inducing DNA and thymine degradation in cultured human cells., *J. Exp. Med.*, **115**, 937-958. — 6) Chang, R. S., Geyer, R. P. and Andrus, S. B. (1962): A lipogenic toxin released through the interaction of a new cytopathic agent (Lipovirus) and cultured human cell., *J. Exp. Med.*, **115**, 959-966. — 7) Chang, R. S. and Owens, S. (1964): Patterns of "lipovirus" antibody in human populations., *J. Immunol.*, **92**, 313-319. — 8) Dunnebacke, T. J. (1963): Electron microscope observations of liver cells inoculated with lipovirus., *Virology*, **21**, 203-209. — 9) Eagle, H. (1955): Nutritional needs of mammalian cells in tissue culture., *Science*, **122**, 501-514. — 10) Enders, J. F. and Pearson, H. E. (1941): Resistance of chicks to infection with influenza A virus., *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, **48**, 143-146. — 11) Kaplan, A. S. (1955): Comparison of susceptible and resistance cells to infection with poliomyelitis virus., *Ann. N. York Acad. Sc.*, **61**, 830-839. — 12) Kunin, C. M. and Jordan, W. S. (1961): In vitro absorption of poliovirus by noncultured tissues. Effects of species, age and malignancy., *Amer. J. Hyg.*, **73**, 245-257. — 13) Lwoff, A. (1959): Factors influencing the evolution

of viral diseases at the cellular level and in the organism., Bact. Rev., **23**, 109-124. — 14) Walker D. L. and Boring, W. D. (1958) : Factors influencing host virus interaction. III. Further studies on the alteration of coxsackie virus infection in adult

mice by environmental temperature., J. Immunol., **80**, 39-44. — 15) Wheeler, C. E. (1958) : The effect of temperature upon the production of herpes simplex virus in tissue culture., J. Immunol., **81**, 98-106.