L細胞内に於けるエクトロメリアウイルスの増殖*

古沢 英一**, 亀山 達**, 金 相 基**

岩 恭 三**, 樋谷 純也**, 宮 川 正**

EIICHI FURUSAWA, SUSUMU KAMEYAMA, SANKI KIM, KYOZO IWA, JUNYA OKETANI, TADASHI MIYAGAWA: MULTIPLICATION OF ECTROMELIA VIRUS IN CULTURE OF STRAIN L CELLS

〔受稿 8月6日 1958〕

動物ウイルス増殖のメカニズムを研究するに当つて、宿主が純な単一細胞であれば細菌・細菌ウイルス系の如く色々な分析に都合がよい。そのためか最近の傾向は宿主として動物や孵化鶏卵よりもむしろ、組織培養細胞を用いるようになってきた。更に細胞も継代可能な固定株が要求され、日本にも現在数種の株が保存されている。例えばL細胞, HeLa, Detroit 6細胞等である。この中で、培養条件の最も簡単なものはL細胞であり、而もこの細胞は1948年以来 Single cell より出発した生物学的に Pure な固定株である¹⁾。我々はここ数年來、エクトロメリアウイルスの増殖の在り方をエールリッヒ腹水癌細胞を宿主としてマウス腹腔内即ち in Vivo で追求してきたが²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾、更に詳しくその増殖機構を知るべく、closed systemとしての組織培養系を探した。たまたま、大日本製薬の加納氏よりL細胞, HeLa, Detroit 6細胞の分与を受け、之等の細胞にエクトロメリアウイルスを接種したところ、三つの細胞共、著明な細胞変性を示し、且つウイルスの継代を重ねることができたので報告する。但し三つの細胞共にウイルス感受性に関して大差を認めなかつたので、ここでは特にL細胞に就いて述べる。

実験材料及方法

○ウイルス：当研究室保存の Hampstead 株及び微研株を用いた。両株間には実験成績に関して特に差異を認めなかつた。之等はマウス腹腔内接種により継代しているもので、斃死直前又は直後の10%肝乳剤、3000 rpm, 15分間遠心上清をウイルス原液とした。その感染価は $10^8 \text{LD}_{50}/\text{ml}$ の order である。

OL細胞：大日本製薬の加納氏より分与いただき、5%牛血清加 YLH 又は YLE 培養液で大型角瓶 (40×100×40mm) に静置培養による継代をする。medium の組成は次の通りである。

medium	Hanks 又は Earle 氏液	950ml
	イースト・エキス	1gr
	ラクトアルブミン水解物	5gr
	牛血清	50ml

更にストマイ 100μg, ペニシリン 100単位/ml を含む。大角瓶には 8~10ml, 小角瓶 (30×50×30mm) には 3~4ml, 小試験管 (15×150mm) には 1~2ml の medium を通常は入れる。

○ウイルス継代：細胞分散後5~7日頃で、cell-sheet を作った小角瓶にウイルスを継代する。継代は7~10日間隔で medium の遠沈上清 0.3ml を新培地に接種する。medium の交換は3~4日毎に行うので、一代毎に少なくとも 10^{-2} づつ原のウイルスは稀釈されて行くことになる。

○ウイルスの感染価測定：約 $3 \times 10^5/\text{ml}$ の細胞を小試験管に分散し培養3~5日後のものを Tissue Culture Dosis (TCD₅₀) 測定に用いる。ウイルスの 10-fold dilution の各段階を3本の試験管と4匹のマウスに接種し、TCD₅₀ と MLD₅₀ とを比較した。

○封入体数の測定：試験管培養の細胞にウイルス原液を接種し経時的に細胞をピペットでガラス面より剝離し遠沈管でおとし、medium を捨てた後、毛細管ピペットで細胞を吸引し、デッキグラス上に塗抹標本を作る。メタノール固定、Giemsa 染色を施す。細胞は恰も腹水細胞の如く単離しているので容易に封入体数

* (本論文の一部は昭和32年11月、日本ウイルス学会西部地方会 (京都) において発表した)

* 大阪大学微生物病研究所感染病理学部 (主任 釜洞醇太郎教授)

を計算できる。

○補体結合抗原の測定：

a) 抗原：大角瓶に cell-sheet を作った細胞にウイルス原液 1ml を接種し、感染後色々な時間にピペットで細胞を剝離し、Hanks 液で3回洗滌、遠沈後、体積 0.1ml の細胞（大角瓶2ヶ）を Hanks 2ml に浮游、ドライアイス・アセトンで凍結融解10回後の遠沈上清を20倍稀釈の抗原とする。

b) 抗体：紫外線不活化ウイルスで4回免疫注射を施し、生ウイルス接種に耐え得た免疫マウスに Ehrlich 腹水癌を移植し、貯溜してきた腹水の遠沈上清を抗体原液として使用する。その補体結合価は80～160倍であるので、40倍稀釈液を抗原測定に使用した⁴⁾⁵⁾。

c) 測定方法：0.25ml づつ各段階に稀釈された抗原を試験管に入れ、0.25ml の2単位モルモット補体を入れ、次に 0.25ml の40倍稀釈抗体を入れて一夜 4°C で放置す。次に感作血球を 0.25ml 混じ 37°C 1時間で判定する。

実験成績

1) 細胞変性効果とウイルス継代

小角瓶に cell-sheet を作った L 細胞に先づ、ウイルス原液の 10^{-3} 稀釈 0.1ml を接種すると3日後より明らかな細胞変性が起つてくる。即ち培地の各所に局在して、正常では fibroblast 様の菱形の細胞が細胞質突起を消失して円形となり、各所で融合して巨細胞を形成してくる。検鏡的には細胞質内に B 型及び A 型封入体を認める。以後次第に細胞変性は高度となり周辺に波及してくると中心部の変性細胞はガラス面より剝離脱落する。かくて5日後には培養面の各所に 0.5～1mm 直径の「穴」即ち細胞欠損部が現われてくる。この「穴」は漸次拡大してゆくと共に数も増してゆき、遂にはお互いに融合してくる。かくして細胞は到る所で脱落し、約10日後には殆んど細胞がガラス面より剝離してしまう。ウイルス継代はこの変性が高度になり、未だ全細胞が脱落しない時期即ち5～7日頃に主として継代した。このような細胞変性効果を利用してウイルス量の測定をした。即ち第 I 表はマウス肝ウイルスと継代培養せる組織培養ウイルスとを TCD₅₀ と従来のマウス LD₅₀ とで測定したものである。

之をみるに TCD₅₀ は MLD₅₀ に比べて同等の感受性を有し且つ正確度に於ては細胞の均一性を考えれば

Table 1. Comparison between TCD and MLD of liver-Virus and of passaged Virus

Virus Source	TCD ₅₀ /ml	MLC ₅₀ /ml	MLD/TCD
*liver No. 1	4×10^5	4×10^7	10
No. 2	6×10^7	2×10^7	0.3
No. 3	6×10^7	6×10^7	1
No. 4	4×10^6	4×10^6	1
No. 5	5×10^6	2×10^5	4
**8-passaged	2×10^5	2×10^5	1
15- //	1×10^5	2×10^5	0.5
18- //	2×10^5		
20- //	2×10^5		
21- //	3×10^4	3×10^4	1
25- //	5×10^4		

* Virus infected mouse liver

** Culture media containing 8-passaged virus

マウスよりも優れている。又この表からこのウイルスは継代を重ねてもマウスに対する病原性を減弱しないことが分る。

2) 封入体増加曲線

エクトメリア・ウイルスがマウスの体細胞又は Ehrlich 癌細胞に感染すれば2種類の封入体出現する²⁾。同じくこの L 細胞にも Giemsa 染色により B 型及び A 型の封入体出現してくる。cell-sheet を作った試験管にウイルス原液 0.1ml (約 10^7 LD₅₀) を接種する。以後経時的に細胞の塗染標本を作り Giemsa 染色で封入体数を計算する。

Fig. 1 Growth curve of inclusion bodies

Fig. 1 の Curve I に示す如く、multiplicity を高め濃厚感染をさすと、B 型封入体が既に感染6時間後には20%以上も出現し、12時間後では殆んど全細胞に B 型封入体を認める。14時間以後になると B 型封入体の内部又は周辺の細胞質に A 型封入体出現しその大きさ及び数は次第に増してきて24時間以後になると

典型的なマーシャル小体に至る。2日以後になると細胞質の崩壊が甚しくなりA型封入体は細胞外に放出されてくる。なお、B型封入体も1ヶの細胞内に3~5ヶ又はそれ以上多発しているものが多く、一度に多数のウイルス感染があつたことがうかがわれる。かくの如く高濃度の感染では Curve I のような封入体を指標とした one-step growth curve が描かれてくる。Curve II はウイルス原液を20倍稀釈して、その0.1ml を接種したものである。

3) ウイルス増殖曲線

○実験 I: ウイルス継代第18代、7日培養の medium をとり、3000 γ pm, 5分の上清を小角瓶の細胞に0.4 ml 接種し新 medium 3.6ml を追加した後、経時的に medium 側を 0.1ml づつとつて感染価を測定した。結果を Fig. 2 に示す。

○実験 II: 第20代5日後培養の medium 0.3ml を大角瓶の細胞に接種し30分後、新 medium 10ml を入れ、以後経時的に medium 側の感染価を測定する。Fig. 3 がその結果である。

Fig. 3 Growth curve of virus. II

実験 I, II, よりウイルスは24時間以内に増殖して medium 内に放出されることを知つたので更に細かく点をとつてみたのが実験 III である。

○実験 III: 第17代20日後の medium 1ml と新 medium 2ml とを混じて小角瓶に接種し、2時間後に medium を捨て Hanks 氏液で2回細胞を洗滌した後、新 medium 3ml を入れる。更に 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24時間、2, 3日後に同じく Hanks で2回洗滌する。感染価は夫々の時間に細胞洗滌前に元の medium 0.1ml をとつて計る。Fig. 4 に示す如く、感染8時間後には medium 内に次代のウイルスが放出されている。

Fig. 4 Growth curve of virus. III.

○実験 IV: そこで、細胞内では何時間からウイルスができ始めるかを試してみた。第21代5日後の medium 12ml と新 medium 24ml とを混じて小角瓶12ヶに夫々 3ml づつ接種し実験 III と同じく、2, 3, 4, 5, 20, 44時間の点では洗滌した後に新 medium を入れ培養した。感染価測定の各点では細胞をビベットで浮遊させ2回洗滌後 1ml の Hanks 液に浮遊させ凍結融解10回後の遠沈上清を測定した。結果を Fig. 5 に示す。即ち細胞内でも8時間より次代のウイルスが証明され始める。

Fig. 5 Growth curve of virus IV.

○実験 V: 無細胞の培地では 37°C で何日でウイルス

が不活化されるかを試べた。即ち第25代5日後の medium を 1ml づつ5本の試験管に入れ 37°C で放置したところ、Fig. 1 に破線で示す如く2日後には99%、3日後には99.9%のウイルスが不活化した。

4) 補体結合抗原の増加曲線

大角瓶に cell-sheet を作った細胞にウイルス原液 1ml を接種し経時的に補体結合抗原 (C. F. A.) を測定す。結果を Fig. 6 に示す如く、感染5時間より C.F.A. が細胞内に検出されてくる。

Fig. 6 Growth curve of CFA

考 察

以上の実験からL細胞はエクトロメリア・ウイルスの好適な宿主であると云える。このL細胞・ウイルス系は従来、我々が用いてきた Ehrlich 癌細胞・ウイルス系或いはマウス・ウイルス系と比べて次の如き特長を有する。

1) 感染価測定に際して：従来のマウス・ウイルス系での MLD_{50} に比べて、この系を利用した TCD_{50} はその感度に於て同等の値を有し、その精度に於ては遙かに優れている点は、他のウイルスの TCD_{50} による測定方法と全く同値である。最近に至り、教室の新居はこのL細胞を用いてエクトロメリアウイルスの plaque 形成に成功した。その感度は MLD_{50} 又は TCD_{50} と全く同値を示す点、その応用範囲は広いものがあると思われる。

2) 感染の同時性に関して：この系は1ヶの細胞当たり100ヶ前後のウイルスを接種できるので感染の出発点を Synchronize することができる。即ち Ehrlich 癌・ウイルス系はマウス腹腔内で進行するため、細胞の検出可能な最小量として約 10^7 ヶの細胞を必要とするが、L系では closed system であるため 10^6 ヶの細胞があれば塗抹標本が作製できる。而も Ehrlich 系では多量のウイルスが腹腔の他の場所へ逃げ、実際に

は接種ウイルスによつて生ずる所謂 "one-step" の封入体は30%前後しか出ないのに反して、L系では invitro であるため感染の効率が良く、12時間で既に90%以上の細胞に封入体を生ずる。即ち接種時、既に全細胞を一度に感染させることができるためウイルス増殖過程が synchronize している。特に電子顕微鏡で細胞内を経時的に追跡するには極めて便利な系と予想される。

3) 細胞の純粋性に関して：L細胞は single cell より出発しているので生物学的に完全に pure である点は純系マウスや少数の単球を含む Ehrlich 癌に比べて優れている。

さて、L細胞に関しては今までに数種のウイルスが感染するという報告がある。即ち、1953年 Scherer⁶ は Pseudorabies 及び Herpes simplex が増殖すると報告し、1957年 Chambers⁷ は WEE ウイルスが増殖するという。何れもその増殖曲線を TCD_{50} では計っていない。

エクトロメリア・L系で C.F.A. が5時間、封入体が6時間、感染粒子が8時間より出現するところは全く Ehrlich 癌内での増殖とよく一致している。但し血球凝集素に関しては未だ実験していない。なお、他の Pox group として研究室保存の Vaccinia 及び fowl pox virus をL細胞に接種したが増殖しないようであつた。但し Vaccinia では多ヶ谷の報告⁸と同じく C.F.A. の出現を認めた。又、neurotropic Vaccinia IHD 株では金沢の報告⁹の如く、L細胞内で良く増殖し、大多数の細胞にB型封入体を認めた。

結 論

1) L細胞はエクトロメリア・ウイルスの好適な宿主であり、その増殖によつて生ずる細胞変性効果はウイルスの感染価測定に利用できる。

2) ウイルスは細胞内でB型及びA型の二種類の封入体を作る。

3) 感染後5時間で細胞内に補体結合抗原を、6時間で封入体を、8時間で感染粒子を検出できる。

4) L細胞で継代されたウイルスはマウスに対する病原性を減弱していない。

稿を終るに臨み、細胞の分与と培養技術に御懇篤なる御指導をいただいた大日本製薬加納博士に心より感謝の意を表す。

参 考 文 献

- 1) Sanford, K.K., Earle, W.R. and Likely, G.D.: The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **9**, 229~246, 1948.
- 2) Kato, S., Hagiwara, K. and Kamahora, J.: The mechanism of the growth of ectromelia virus propagated in the ascites tumor cells. I. Study on the inclusion bodies of ectromelia virus. *Med. J. Osaka Univ.*, **6**, 39~46, 1955.
- 3) Hagiwara, K., Kato, S., Furusawa, E., Baba, E. and Kamahora, J.: The mechanism of the growth of ectromelia virus propagated in the ascites tumor cells. II. Studies on the growth curves in vivo and in vitro. *Med. J. Osaka Univ.*, **7**, 561~569, 1956.
- 4) Furusawa, E., Hagiwara, K. and Kamahora, J.: The effect of antibody on intracellular virus multiplication. *J. Med. J. Osaka Univ.*, **7**, 551~560, 1956.
- 5) Furusawa, E., Baba, E., Toyoshima, K. and Kamahora, J.: The effect of antibody on intracellular virus multiplication. II. *Med. J. Osaka Univ.*, **7**, 701~708, 1957.
- 6) Scherer, W. F.: The utilization of a pure strain of mammalian cells (Earle) for the cultivation of viruses in vitro. I. multiplication of pseudorabies and herpes simplex virus. *Am. J. path.* **29**, 117~137, 1953.
- 7) Chambers, V.C.: The prolonged persistence of West Nile Equine Encephalomyelitis in cultures of strain L cells. *Virology* **3**, 62~75, 1957.
- 8) 多ヶ谷 勇: ワクチニア・ウイルスの鶏赤血球凝集素産生に就いて. 第4回ウイルス増殖シンポジウム, 1957.
- 9) 金沢謙一: HeLa 細胞, L細胞における Vaccinia Virus, NDV, WEE Virus の増殖について. 第5回ウイルス学会総会, 1957.

- 1) Desruption of cell layer seen 3 days after infection.
- 2) Normal cells of L strain
- 3) B type inclusion bodies seen 10 hours after infection
- 4) A type inclusion bodies seen 20 hours after infection