

人胎児諸組織の培養とそのアデノウイルス 12型に対する感受性の比較的研究

II.

人胎児諸組織培養細胞のアデノウイルス12型に対する感受性

岡山大学医学部微生物学教室 (主任：村上 栄教授)
指導：矢部芳郎講師
岡山大学医学部産科婦人科学教室 (主任：橋本 清教授)

大学院 森 山 雍 方
学 生

〔昭和39年10月17日受稿〕

緒 言

Enders, Weller, Robbins による組織培養細胞における細胞変性効果の発見¹⁾以来組織培養細胞のウイルス学領域における応用は急速に進んで来ている。その最も顕著なものが初代培養のものでは猿腎細胞であり継代株細胞では HeLa 細胞である。その他にも研究目的に従って他の動物 或は人の組織の初代培養細胞が使用され、又他の継代株細胞がつくられて来たことは多数の報告にみる通りである²⁾。アデノウイルスの最初の発見は全く組織培養に負うものであり^{3) 4)}、この群のウイルスが実験動物に対して感受性を示さないために以後の研究も全く組織培養法のみにより進んで来たといえる^{5) 6)}。そしてアデノウイルスに関しては猿腎細胞での継代培養は困難であることが報告されており、従ってアデノウイルスの実験には一般には HeLa, KB 等の人由来の上皮性継代株細胞が使用されて来ている^{5) 6)}。然し最近実験動物に対して発癌性を示すことの証明された 12型^{7) 8) 10)} およびこれについてハムスターにおける造腫瘍性の証明された 18型⁹⁾ はこれらの継代株細胞を使用した場合でも他の型に比しウイルスの分離が困難であり、又増殖も極めて弱い^{11) 12)}。従ってこれらの型の分離あるいは培養に対してより高い感受性をもつ細胞が要求されてくる。そして事実このウイルスに対して人胎児の腎細胞が HeLa 細胞より優れた感受性を示すことが既に報告されている^{13) 14)}。著者は本実験において腎及び腎以外の人胎児諸組織の初代培養細胞にアデノウイルス12型を接種し、各培養細胞の本ウイルスに対する感受性を比較検討した。

実験材料および方法

供試細胞

人胎児細胞：第1編において得られた4カ月人胎児諸組織の初代培養細胞を使用した。

HeLa 細胞：本学小児科教室より分与されたものを使用した。HeLa 細胞の培養には20%牛血清含有 YLE (yeast extract, lactalbumin hydrolyzate 含有 Earle 氏液)¹⁵⁾を使用した。

ウイルス：アデノウイルス12型、Huie 株を使用した。YLE を維持液として HeLa 細胞に本ウイルスを培養し、細胞が細胞変性効果 (cytopathogenic effect 以下 CPE と略す)¹⁾を起して完全に剥脱した後、7回凍結融解を行い毎分1000回転で5分間遠沈してその上清をとり、この上清を chamberland 型濾過器 (日本化学陶業株式会社製) を濾過することにより無細胞濾液とした。尚濾過前にウイルス液に Escherichia coli を添加し、濾過前後の液を培養することにより濾過管の完全性を確めた。対照培養液も同様に処理された。以上の実験においてはすべてこの無細胞濾液を使用した。

ウイルス力価測定

HeLa 細胞を 4×10^5 個/cc となる如く培養液 (YLE と牛血清とを 8 : 2 の割合に混和したもの) に浮游させ、この浮游液を試験管当り 1cc ずつ分注し、36.5°C で48時間培養した後、一度細胞の発育増殖を確めたものをウイルス力価の測定に使用した。即ち培養液をすて PBS を試験管当り 1cc ずつ加えて1回洗浄した後 YLE を試験管当り 1cc ずつ維持液として加えた。他方ウイルス液を YLE で10倍ずつ系列的に稀釈した。各稀釈のウイルス液 0.1cc ずつ

を前記の HeLa 細胞に加え 36.5°C の孵卵器中に静置し、5 日目に CPE を観察することによりウイルス力価を測定した。尚 HeLa 細胞の試験管を各希釈につき 4 本使用し、又力価 (50% 組織培養感染価-TCID₅₀) の計算は Reed & Muench 法によつた¹⁶⁾。

その他の実験材料および方法

第 1 編におけると同様である。尚培養細胞の形態学的観察はすべて生標本について行なわれた。

実験結果

I. 人胎児諸組織の培養細胞におけるアデノウイルス 12 型接種による変化

1. 腎細胞

第 1 編に述べた如く培養 5 日目に上皮形細胞とそれを島状に取り囲んだ線維芽形細胞とよりなるシートを形成した。この時期にウイルスを接種した。即ち培養液をすて、5 本に 1 TCID₅₀/0.1cc のウイルス液 0.2cc と YLE 0.8cc を、又残り 5 本に对照液 0.2cc と YLE 0.8cc を加え、36.5°C の孵卵器に静置し 2 日後に液換えを行なつた。液換えに当つては古い培養液全量を取り去り 2% の割合に牛血清を含む YLE を 1cc ずつ試験管に加えた。尚以後の液換えは 2 乃至 4 日おきに同様の方法により行なわれた。ウイルス接種後 1 日目にはウイルス接種群と对照群のいずれにも変化は認められなかつたが、2 日目に 1 部の上皮形細胞が丸くやや大型化しているのが認められた。同様の変化は急速に増強し、5 日目には上皮形細胞の 50~60% におよんだ。然しこの時期には線維芽形細胞には未だ殆んど変化は認められず依然として網様構造を保ち、その周囲に細胞変性を起して丸くなつた上皮形細胞が凝集して附着しているのが特徴的に観察された。その後同様の変化は次第に増強し、更に線維芽形細胞の一部にも及び、9 日目には殆んどすべての上皮形細胞は変化をおこし、わずかに蜘蛛の巣状にのこつた線維芽形細胞によりつながりあつているという所見を呈していた。然しこれも 10~22 日で完全に剥脱した。

对照液接種群においてはこの間上皮形細胞の多少の脱落と線維芽形細胞の増強がみられたがウイルス接種群にみられたような特異な変化は全く認められず細胞はよく維持された。尚観察はウイルス接種群の細胞の完全脱落とともに打切られた (図 1, 2)。

2) 肺細胞

第 1 編に於て述べた如く培養 5 日目には線維芽形細胞の良好なシートを形成したのでウイルスを接種

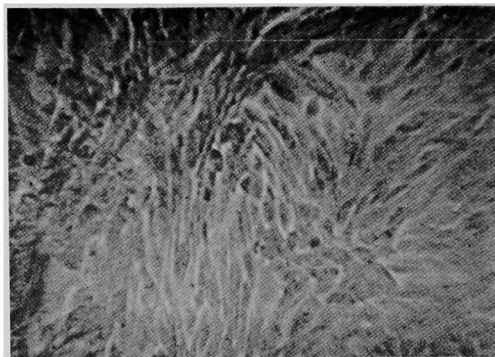


図 1. 4 カ月胎児腎細胞。对照液接種後 5 日目。細胞に格別の変化を認めず。

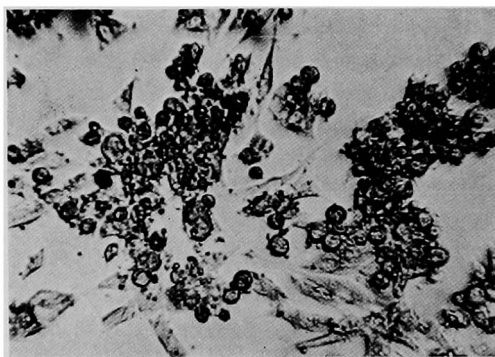


図 2. 同上。アデノウイルス 12 型接種後 5 日目。上皮形細胞は球形化し、線維芽形細胞の周囲に凝集す。

した。ウイルスの接種および接種後の細胞の維持は腎細胞の場合と同様であつた。

ウイルス接種後 5 日目に少数の細胞がやや大型に球形化しているのが認められ、同様の細胞は 7 日目には数を増し、互に凝集しあつて特徴ある像を呈した。変化は更に増強し、9~11 日目には細胞シートの約 50% に、14 日目には 70~80% に及ぶとともにその一部のものは漸次剥脱していつた。17~21 日で殆んどすべての細胞は変化を起し脱落した。

对照液を接種したものではウイルス接種群の細胞にみられたような変化は全く認められず細胞はよく維持された (図 3, 4)。

3. 肝細胞

培養 13 日目に漸く線維芽形細胞のシートを形成したのでウイルスを接種した。ウイルスの接種および接種後の細胞の維持に関してはすべて腎細胞におけると同様であつた。ウイルス接種後 5 日目に極く少数の球形細胞と、更に少数の扁平な円形乃至橢円形の大型の細胞が認められた。同様の細胞変化は以後

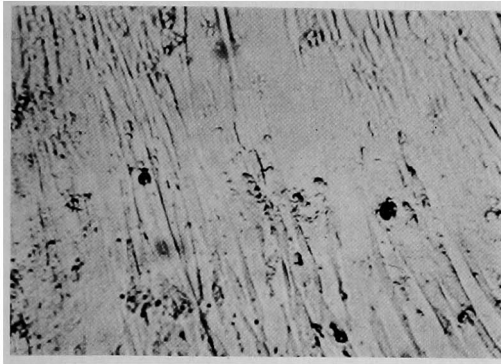


図 3. 4ヵ月胎児肺細胞。対照液接種後9日目。細胞に格別の変化を認めず。

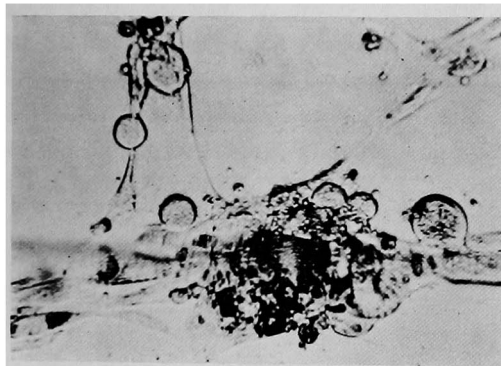


図 4. 同上。アデノウイルス12型接種後9日目。細胞は球形化し凝集す。

の4日間程で軽度が増強したがそれ以後格別増強することなく経過した。この間対照液を接種したものではウイルス接種群の細胞に認められたような変化は全くみられなかつた。培養60日でウイルス接種群と対照群の何れもが自然変性をおこし脱落した(図5, 6)。

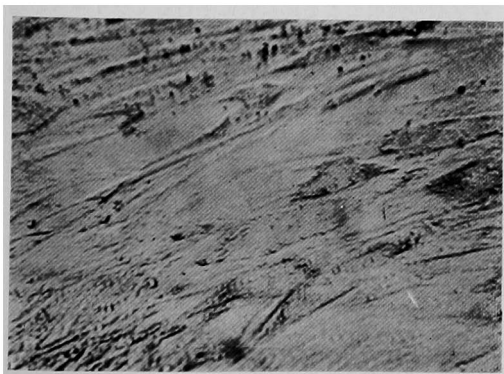


図 5. 4ヵ月胎児肝細胞。対照液接種後7日目細胞に格別の変化を認めず。

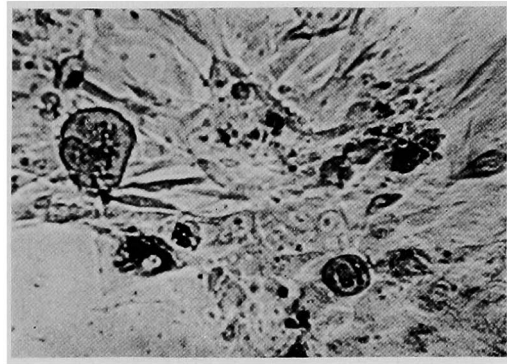


図 6. 同上。アデノウイルス12型接種後7日目。少数の球形細胞と扁平な大型の円形細胞をみる。

4. 筋皮細胞

第1編において述べた如く培養5日目には線維芽形細胞の良好なシートを形成した。この時期に前記諸細胞と同様の方法でウイルスを接種した。ウイルス接種後5~7日目に極く少数のやや大型の球形化した細胞と更に大型の扁平な円形乃至楕円形の細胞が認められた。この様な変化はそれ以後増強することなく経過し、逆に脱落により次第に減少していった。尚この様な変化は対照群の細胞においては全く認められなかつた。又ウイルス接種後14日頃より紡錘形の細胞が若干認められるようになったが、同様の細胞は対照群においても認められた。尚培養72日で細胞はウイルス接種群および対照群の何れにおいても殆んど脱落したので培養を打切つた(図7, 8)。

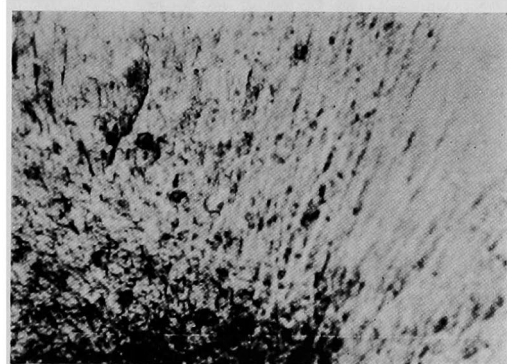


図 7. 4ヵ月胎児筋皮細胞。対照液接種後7日目。右上方に線維芽形細胞の盛り上がり部分をみる。細胞自体に格別の変化を認めず。

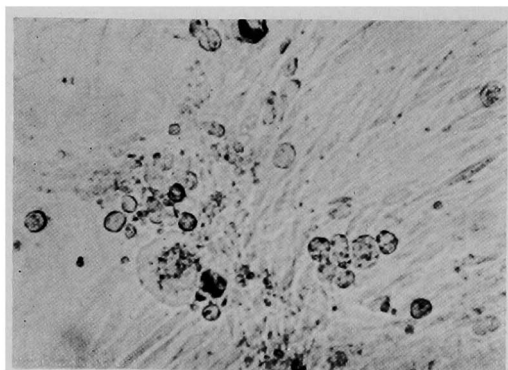


図 8. 同上。アデノウイルス12型接種後7日目。少数の球形化した細胞と1個の扁平な大型円形細胞をみる。

表 1. 胎児組織の培養細胞におけるアデノウイルス12型による変化とウイルスの増殖

培 養 組 織		培 養 日 数							
		0 日	2 日	5 日	7 日	9 日	11日	14日	18日
腎	CPE* TCID ₅₀ **	— 2×10°	+	++	+++ 102.5	+++	+++ 101.5		
肺	CPE TCID ₅₀	— 2×10°	—	+	+	++	++	++	++
肝	CPE TCID ₅₀	— 2×10°		±	±	±	±	—	—
筋 皮	CPE TCID ₅₀	— 2×10°		±	±	±	±	—	—

* 細胞変性効果。

** 1cc 当りの50%組織培養感染価。

総 括 お よ び 考 按

人胎児諸組織の各組織別培養細胞にアデノウイルス12型を接種した場合、細胞の大型球形化及び凝集或は大型扁平円形乃至楕円形化が起つたが、これらの変化は対照液を接種したものにおいては全く観察されなかつた。従つてこれらの変化は一応アデノウイルス12型による所謂細胞変性効果と考えられる。而して腎及肺の培養細胞に於いてはアデノウイルス12型接種により細胞はやや大型の球形細胞となり凝集したが、肝および筋皮の培養細胞においては少数のやや大型の球形細胞と大型の円形乃至楕円形の扁平な細胞がみられた。この変性細胞の形態の差は、存在する培養細胞の差によるものと考えられる。

一般にアデノウイルス感染細胞ではウイルスの増殖に伴つて真のウイルス粒子とは異なるところの可溶性抗原が産生されることが報告されている¹⁷⁾。而

II. 人胎児諸組織の培養細胞におけるアデノウイルス12型接種による変化とウイルス増殖との関係

表1はアデノウイルス12型接種による人胎児諸組織の培養細胞における変化とウイルス増殖との関係を示す。即ちウイルス液接種による細胞の変化は腎細胞において最も早期にしかも強く発現し、次いで肺、肝、筋皮の各細胞の順であつた。殊に肝および筋皮の細胞における変化は培養5～11日の間で極く軽微に観察されたのみで以後格別増強することなく逆に減弱していつた。この間腎細胞ではCPEの発現とともにウイルスの良好な増殖がみられたが他の細胞では少なくとも現在行なわれた定量方法で測定し得るだけのウイルスの増殖は認められなかつた。

してこの可溶性抗原にはA, B, Cの3種があり、そのうちのB抗原がウイルス接種後初期の特徴ある細胞変性を起すものであることが報告されている⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾。現在の実験に於いて腎細胞では著明な細胞変性効果の早期の発現とともにこれに平行してウイルスの増殖が認められたが、肺、肝、筋皮の諸組織の培養細胞、殊に肺の培養細胞では腎細胞に次ぐ著明なCPEの発現がみられたにも拘らずウイルスの増殖は殆んど認められなかつた。これは、一つにはウイルス量の測定方法の感度の低さによることを考えねばならないであろう。然し前述の可溶性抗原の問題も当然考慮されなければならない。即ち12型においても他の型のアデノウイルスにおけると同様に可溶性抗原が産生され、腎細胞においてはこの可溶性抗原による細胞変性とウイルス感染によるウイルスの増殖との両方が起るのに対し、肺細胞においては可溶性抗原による細胞変性はかなり強くおこるがウイルス自

体の増殖は弱く、肝或は筋皮細胞ではその両者とも極めて弱いか或は起らないものと考えられる。

腎細胞がアデノウイルス12型に対して強い感受性を有することに関しては既に他にも報告がある¹³⁾¹⁴⁾。現在の実験に於いても腎細胞に於いてはウイルス接種後早期に良好なウイルスの増殖がみられた。然しアデノウイルスの感染増殖の場として、より一般的に考えられるところの肺細胞においてはウイルスの良好な増殖は認められなかつた。Rosen等も人体よりのアデノウイルスの分離実験において、12型は糞便より分離されたが、上気道より分離されたことはないと報告している¹¹⁾。供試した4つの人胎児組織中、細胞自体の培養あるいは増殖の良好であつたのは筋皮であり、ついで肺、腎、肝の順であつたが筋皮あるいは肺の培養細胞ではウイルスの増殖が不良であるので、細胞の培養およびウイルスの増殖の両面からみて、矢張り腎の組織培養細胞がアデノウイルス12型の分離あるいは増殖等の目的には最も優れたものであると考えられる。

文

1. Enders, J. F., Weller, T. H., and Robbins, F. C.: Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science*, 109, 85~87, 1949.
2. 中井, 岡本, 山田, 井上, 小川, 堀川編: 組織培養—基礎と応用. 朝倉書店.
3. Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H., and Ward, T. G.: Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 84, 570~573, 1953.
4. Hilleman, M. R., and Werner, J. H.: Recovery of a new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 85, 183~188, 1954.
5. Rowe, W. P., Huebner, R. J., Hartley, J. W., Ward, T. G., and Parrott, R. H.: Studies of the adenoidal-pharyngeal-conjunctival (APC) group of viruses. *Am. J. Hyg.*, 61, 197~218, 1955.
6. Ginsberg, H. S.: Identification and classification of adenoviruses. *Virology*, 18, 312~319, 1962.

結 論

4 カ月人胎児の腎、肺、肝及び筋肉と皮膚の各組織の初代培養細胞にアデノウイルス12型を接種すると、

1. 腎及び肺細胞では細胞の球形化と凝集が認められ、肝及び筋皮細胞では球形細胞のほかに扁平な大型の円形乃至橢円形細胞が出現した。対照群の細胞ではこのような変化は全く認められなかつた。
2. このような変化は腎細胞において最も早期にしかも強く発現し、次いで肺細胞であり肝及び筋皮細胞においては極めて軽微であつた。
3. これらの細胞のうち、ウイルスの良好な増殖がみられたのは腎細胞のみにおいてであつた。

稿を終えるにあたり終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師村上栄教授、橋本清教授並びに矢部講師に深甚の謝意を表します。

献

7. Trentin, J. J., Yabe, Y., and Taylor, G.: The quest for human cancer viruses. *Science*, 137, 835~841, 1962.
8. Yabe, Y., Samper, L., Bryan, E., Taylor, G., and Trentin, J. J.: Oncogenic effect of human adenovirus type 12, in mice. *Science*, 143, 46~47, 1964.
9. Huebner, R. J., Rowe, W. P., and Lane, W. T.: Oncogenic effects in hamsters of human adenovirus types 12 and 18. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 48, 2051~2058, 1962.
10. Huebner, R. J., Rowe, W. P., Turner, H. C., and Lane, W. T.: Specific adenovirus complement-fixing antigens in virus-free hamster and rat tumors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 50, 379~389, 1963.
11. Rosen, L., Hovis, J. F., and Bell, J. A.: Observations on some little-known adenoviruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111, 166~171, 1962.
12. 矢部博士よりの私信.
13. Rafajko, R. R.: Antibody response in rabbits to adenovirus type 12. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 113, 238~240, 1963.

14. Pereira, M. S., and MacCallum, F. O.: Infection with adenovirus type 12. *Lancet*, 1, 198~199, 1964.
15. 伝染病研究所学会編: 細菌学実習提要, 全訂改版 (昭和33年), 丸善K. K., p. 421~422.
16. Jawetz, E., Melnick, J. L., and Adelberg, E. A.: Review of medical microbiology. Lange Medical Publications, 1960, p. 274~275.
17. Huebner, R. J., Rowe, W. P., Ward, T. G., Parrott, R. H., and Bell, J. A.: Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents. A newly recognized group of common viruses of the respiratory system. *New England J. Med.*, 251, 1077~1086, 1954.
18. Pereira, H. G., Allison, A. C., and Farthing, C. P.: Study of adenovirus antigens by immunoelectrophoresis. *Nature*, 183, 895~896, 1959.
19. Wilcox, W. C., and Ginsberg, H. S.: Purification and immunological characterization of types 4 and 5 adenovirus-soluble antigens. *Proc. Nat Acad. Sci.* 47, 512~526, 1961.

Studies on Tissue Culture of Human Embryonic Tissues and Their Susceptibility to Adenovirus Type 12

Part II.

Studies on the Susceptibility of Human Embryonic Tissue-Culture Cells to Adenovirus Type 12

By

Yasukata Moriyama

Department of Microbiology Okayama University Medical School

(Director: Prof. Sakae Murakami and Dr. Yoshiro Yabe)

Department of Obstetrics and Gynecology Okayama University Medical School

(Director: Prof. Kiyoshi Hashimoto)

Upon inoculation of adenovirus type 12 onto the primary culture cells of each of the kidney, the lung, the liver and the skin-muscle of a four-month-old human embryo, the following changes were observed:

1. In the cells of the kidney and the lung, rounding and aggregation of cells were observed. In those of the liver and the skin-muscle, rounding of cells was observed and, besides this, flat-round or -oval big cells appeared.
 2. Such changes appeared earliest and strongest in the culture of kidney cells, next in that of lung cells and were very weak in those of liver and of skin-muscle cells.
 3. Of these four human embryonic tissues, good multiplication of the virus was observed only in the culture of kidney cells.
-