

組織培養による Coxsackie B₅ Virus に関する研究

第 1 編

犬腎臓細胞を用いた Coxsackie B₅ Virus の 感染及増殖に就いての検討

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上栄教授)

前 田 正 利

[昭和 39 年 10 月 22 日受稿]

緒 言

組織培養による Coxsackie Virus に関する研究報告は、尠くないが、殆ど既知の細胞系を利用して細胞に対する病原性及び増殖過程を究明している。感受性細胞株として、Hela 細胞¹⁾ 猿腎臓細胞²⁾ FL細胞³⁾ に続き、羊膜細胞⁴⁾ 猿の睪丸細胞⁴⁾ 人の胎児組織⁵⁾ 等が用いられ夫々に特異な細胞変性作用を標識として、Coxsackie Virus の感染及び発育増殖の形式と経過を詳細に検討され報告せられた。

本邦に於いても、組織培養による Coxsackie の研究報告は少なくないが、就中 1960 年全国各地で発生した無菌性髄膜炎の流行に当り、Coxsackie B₅ が分離され、甲野⁶⁾、日沼⁷⁾、坪崎⁸⁾、等によりその性状が明らかにされ、従来報告されていた Coxsackie に関する報告に更に広汎な流行を惹起する Coxsackie B₅ が、重要な病原ウイルスとして注目されるに至つた。

著者は Coxsackie B₅ Virus の分譲を受けたので、俵等 (1964)⁹⁾ の既に一部を報告した成績に倣い、犬腎臓細胞を用い、その特異な細胞変性作用 (Cytopathic effect) を利用し、詳細に Coxsackie B₅ Virus の増殖過程を検討して、興味ある知見を得たので茲に報告する次第である。

実験材料及び方法

Virus: 実験に用いた Coxsackie B₅ Virus の株は本学小児科教室喜多村博士より分譲を受けたもので、累代には Hela 細胞を用いて行なわれたものであつて TCID₅₀ は 10^{6.0}/ml であつた。

Cell: 実験には総て犬腎臓細胞 (以下 CS と略す) を用いた。CS 細胞は細胞分離後現在に至る迄 300 代以上累代保存されたものである。培養瓶 (10×5×

5cm) の CS 細胞培養から培養液を捨て、燐酸緩衝液で洗い、トリプシン、EDTA、溶液 (0.02% EDTA と 0.25% トリプシンを夫々 PBS で溶解し等量混合) 4~5 ml を添加、37°C に数分間保ち、瓶を軽く動揺して細胞をガラス壁より脱落せしめ、得た細胞浮游液を 1,000 r. p. m. 3 min、遠心沈澱して上清を捨て、培養液に細胞を浮游させ、試験管 (1.5×18 cm) 又は培養瓶に分注する。試験管は適度の傾斜で、孵卵器内で静置培養を行なう。培養液は、0.5% ラクトアルブミン水解物を加えた Hanks 氏液 (M-H 液) に牛血清 20% を添加して用いた。培養液にはストレプトマイシン 200 γ /ml、ペニシリン 100 u/ml を用いた。又夫々の試験管には 1.0 ml、培養瓶には 10.0~12.0 ml を分注した。1~2 日培養し充分細胞が増殖してから実験に用いた。ウイルス接種後は小牛血清を 2~5% に添加した Medium 199 (千葉血清製品) と換えた。

光学顕微鏡染色標本の作製: 予め短冊状に切断したカバー硝子を培養管に投入しおき、その表面に培養した 2~3 日培養の細胞について旧培養液を捨て、1 回 PBS で洗滌したる後にウイルス接種を行なつた。尚接種量は 100 TCID₅₀ を用いた。(CS 細胞ではウイルスの馴化に伴い、細胞の離脱は非常に速く、詳細に細胞変化を観察し得ないからである)。37°C で 1 時間吸着の後、直ちに PBS で洗い、次に維持培地 (M. 199) を添加して、37°C で静置培養を続けた。接種後経時的に、カバー硝子を取り出し、PBS で一度洗滌、アルコール、エーテル等量液による固定を行ない、ヘマトキシリン、エオジン染色により (以下 H-E 染色と記す) 検鏡した。

増殖実験: ウイルスを犬腎臓細胞に一定時間吸着せしめてから、未吸着残存ウイルスを除去し、(吸

着実験)次に経時的に感染細胞及び維持培養液を別々に集め、それぞれの含有するウイルスの感染価を TCID₅₀ で算定し、細胞内ウイルス (Cell associated Virus) 細胞外ウイルス (Free Virus) の量的変化を測定した。

a) 吸着実験 培養2~3日のCS細胞(細胞数は 5×10^6 bottle) を感染に用いた。ウイルス接種するに際し、予め陳旧培養液を除き、細胞層を数回 PBS で洗滌した。続いて維持培養液で適宜に希釈したウイルス液を接種する。37°C で1時間孵卵器内に保存放置して十分に吸着せしめたる後、接種ウイルスを除き、更に残存する未吸着ウイルスを除くために、冷却した PBS で細胞洗滌を4~5回反覆して行ない、その後新しい維持培地 10.0~12.0 ml/bottle を添加して培養を続けた。従つてウイルス接種時が感染時間0であり、洗滌に要した時間は感染時間に含まない。

増殖実験では、大量の細胞を用いて同時感染による1回増殖実験を行なうために、ウイルスの大量接種が必要であるが、この実験では、 $5 \times 10^6.0$ の細胞に対し、 $10^6.0$ TCID₅₀/bottle のウイルスを接種したから、Multiplicity 5である。

b) ウイルスの感染価測定ウイルスの感染後時間をおき、得られた感染細胞を集め、凍結融解を再三行ない、ウイルスの遊出に努め、1 bottle の内容を1.0 ml のウイルス浮游液として、1,500r. p. m. 5 Min の遠心上清を原液と定めた。次で維持培養液でウイルス原液の10倍階段希釈の系列を作り、各希釈毎に1.0 ml 宛を4本の試験管内培養細胞に接種して、37°C で静置培養を行なつた。ウイルス接種後毎日細胞変性効果 (C. P. E.) の出現を記載し、感染価は TCID₅₀ により表示して、最後の判定は7日後の C. P. E. に拠つた。

培養液内ウイルスの TCID₅₀ は各時間如の感染細胞維持培養液の 1,500r. p. m. 5 Min の遠心上清 1.0 ml より希釈し、以下は時間を追つて細胞内ウイルスの定量と同様に実施した。

尚、Virus Yield は上記の方法により各時間毎に、培養液内又は細胞内ウイルスを定量してそれぞれの場合の TCID₅₀ を求めておき、それぞれの総和の平均値を得 per cell 当りの Virus の yield として表示した。

実験成績

1) Coxsackie B₅ Virus の CS 細胞による増殖

先づ CS 細胞に Coxsackie B₅ を培養すると、一般に特有の C. P. E. を起して増殖する。若い時期の累代では通常 C. P. E. を惹起するに3~4日を要したが、CS 細胞に馴化するに伴ない、2~3日で著明な C. P. E. を発現し、細胞は管壁より脱離する。従つて馴化により、細胞変性も高度となり、感染価も上昇する傾向がある。この事實は、CS 細胞の適応と一応推測出来る。

又 C. P. E. に就いては既に他の細胞を用いた実験成績と良く類似する。即ち試験管で培養したものを弱拡大で観察するに、先づ細胞の円形、又は類円形に変化するが、培養後48時間で大部の細胞が扁平な印象を受ける様になり、それぞれの細胞の周囲に細胞の破片を思はず小体を多数附着し、ポリオと比較して非常に汚く見えるものが少くない。是等の変性細胞は徐々に管壁より脱離して来る。

尚 CS 細胞に累代を重ねに従い、前に認めた C. P. E. の所見が多少変り、細胞の間隙を生じ疎となり円形化した細胞が次第に増加するが、細胞周辺の細胞質の破片と推測された小体の附着が少くなるか、又は認められなくなる傾向がある。

これ等の C. P. E. を感染標識として、累代毎に感染価を測定し比較した。(第1表)

この成績では CS 細胞初代に於いて $10^{4.5}$ と感染

Table I Infective titer of Coxsackie B₅ Virus on strain CS cells

No. of transfer	C. P. E.(days)	TCID ₅₀ /ml
1	4-5	10 ^{4.5}
2	4	10 ^{4.5}
6	4~5	10 ^{5.0}
10	3-4	10 ^{5.0}
15	3-4	10 ^{6.25}
20	3-4	10 ^{5.5}
25	2-3	10 ^{6.0}
30	2-3	10 ^{6.0}
42	2-3	10 ^{6.0}
4	2-3	10 ^{6.0}
50	2-3	10 ^{6.25}
62	2	10 ^{6.0}
	2	10 ^{6.0}
76	2	10 ^{6.0}

価を示し、C. P. E. は尚4~5日を要するも、次第に累代を重ねるに従い、感染価の上昇を辿り而もC. P. E. 発来日数も短縮される。15~20代の累代により、全く感染価は安定し、 $10^{6.0}$ 程度を保持し、C. P. E. も従つて2~3日で著明に認められる。要するにCS細胞は、従来用いられた既知細胞株と比較して、いささかも遜色のない感受性を示すことが示唆された。

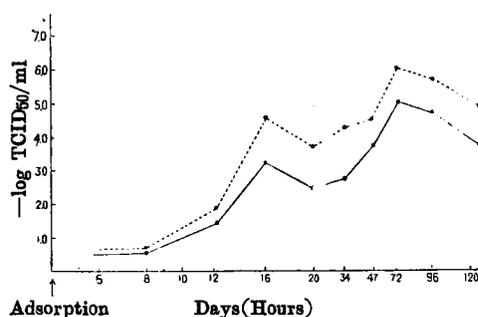
2) 光学顕微鏡上の所見とウイルス増殖

予め短冊状に載つたカバー硝子を培養管に用意し、Coxsackie B₅を感染せしめて、細胞変化を窺つた。

累代10代以上の場合は早く細胞変化が發来し、細胞の離脱を招くので、詳細に観察することが困難である。よつて比較的長時間細胞を維持する目的で、接種ウイルス量を加減し、100 TCID₅₀/mlのウイルスを感染させて、検討を行なつた。と同時に同時期のウイルス量の量的変化と消長を知る意味から、それぞれの時間毎に感染価の測定を行ない、表示比較した (Fig. I)。先づ光学顕微鏡上の所見であるが、H-E染色標本では、細胞のウイルス感染後10時間迄に於いては、細胞の配列がやや不明となり、稀に間隙を生ずる程度であるが、14~16時間を経過すると俄かに細胞の収縮に伴う細胞間層の間隙が著明となり、配列は乱れるに至る。細胞のシートの端に位置する細胞は円形若しくは類円形の細胞が出現する。而も斯る細胞群にあつては細胞質内にエオジンに好染する封入体の出現が認められる。75時間に至ると、細胞の脱落は可成り激しくなり、細胞間は激しく疎となり、残存する細胞それぞれは、次第に形状を変え、核周辺のエオジン濃染部が明瞭となるものが増加の気配を示す。エオジン濃染部 (小体) の存在位置は核に近接して、明らかに円形又は類円形の小体として認められ、漸次その部分がエオジン染色の濃度を増す傾向がある。この傾向は時間の経過と共に増々強くなり、封入体の存在する部分と細胞質の間が生ずるものが認められた。この所見は100時間を経ると、次第に波及して、視野全般に亘り観察されるに至つた。而し乍ら細胞の全部の離脱には時間を要し、漸次細胞の脱落を惹起しつつも、全般の脱離には3~4日を要する。この所見は対照としたHela細胞、FL細胞ともに殆ど同様な変化を認めた。

次にこれらの所見と、平行して行つたウイルス増殖実験に於ける所見とは、相関連してウイルスのCS細胞に於ける増殖過程をも窺い得られた (Fig. I)

Fig. I Growth curve of Coxsackie B₅ virus on strain CS cells (Inoculum dosis: $10^{4.0}$ /ml)



Remarks: 1. - - - - - C-A-V. (Cell Associated Virus)
2. F.V. (Free Virus)

ウイルスの増殖形式を窺うに、CS細胞に感染後ウイルスの増殖は概ね8-10時間を経て始り、12~16時間で激しい増加が細胞内で惹起する。この時間では細胞の変性が多少とも認められた時期であり、細胞外への游出も当然認められる。

次の20~24時間ではウイルスの量的変化は余り見られないが、細胞の変性は募り、封入体の散見せられる時期に該当する。72時間に至れば、ウイルスの増量はピークに達し、それぞれ $10^{6.0}$ 、 $10^{6.2}$ と示され、細胞の脱落は著しく、エオジン濃染部 (小体) の著明な増加を誘発する。この時期を過るとウイルスの量は次第に減量の一途を辿るかの如くに、曲線は下降する。細胞変化の上では、細胞の脱落は甚しく、細胞の変性の程度も亦激しいものがある。残存した細胞の形態は変化し、エオジンに濃染した部分に細胞核が浮き出た感があるもの、核は濃縮され圧迫されてエオジン濃染部のみに占められているもの、等の所見が広い視野に拡がって認められた。これらウイルスの量的変化については次に検討されるが、一般にウイルスの増殖様式は、略々細胞変性の程度に応じて惹起することが推測された。

3) 増殖曲線に認める細胞内ウイルス量の消長

多量のCS細胞に比較的ウイルスの大量を同時感染せしめて、ウイルスの細胞内ウイルス量の消長を窺つた成績である。ウイルスの細胞への吸着後一定のウイルス増殖休止時期 (2~4時間) を経て、増加する。その際の増殖曲線は、先の感染実験と比較して急激であり、時間を経るに従い上昇の程度は著しい事実が認められた (Fig. I)

Fig. II. Growth curve of Coxsackie B₅ Virus on strain CS cells

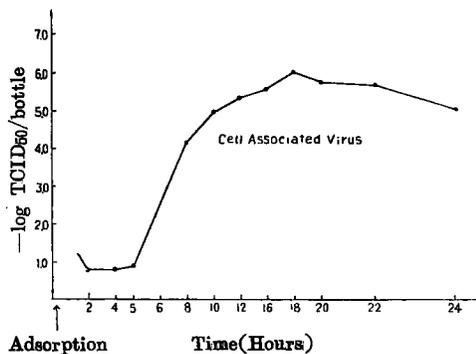


Fig. III Growth curve of Coxsackie B₅ Virus on strain CS cells

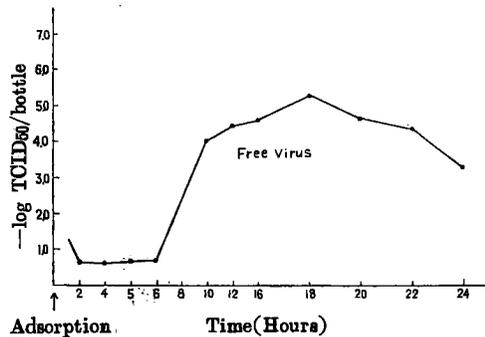
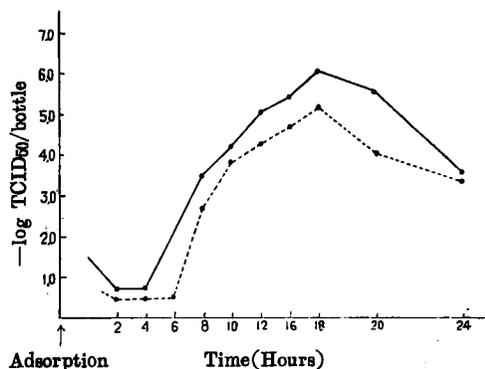


Fig. IV. Growth curve of Coxsackie B₅ Virus on strain CS cells (Inoculum dosis 10^{6.0}/ml)



Remarks: 1 C-A-V (Cell associated virus)
2 (Free virus)

4) 細胞外に游出するウイルス量の消長
培養液中に游出するフリーウイルス (以下 F-V と記す) の増加は 8~10 時間の間にあり, 10 時間で著しく 10^{4.0} と急激に増加する。その間に至る時

間ではウイルス吸着時期から 2~6 時間では, ウイルスの増量は極めて緩慢な経過であり, 全くウイルス量の上昇が認められない時期であるが, 細胞内増殖時期から見て, 8~10 時間で急激に増加したウイルスは感染性新ウイルスであることは理解し得る。その後については 6~10 時間における急激なウイルス量の増加 12 時間からの緩い曲線, 20 時間からのやや緩い下降の曲線等を考慮してウイルス増殖の第一周期は 10 時間であつて, 次の 12 時間より, 第二周期, 更に第三の周期が反覆して繰返されるものと判断された (Fig. II)。

これらの所見により, 各時間毎に細胞内外のウイルス感染価をそれぞれに表示し, その感染価の平均値を求めて per cell 当りのウイルスの Yield を算出すると, 5,500~6,000 TCID₅₀ となり, CS 細胞では可成り高い Virus の Yield を示すものであることが認められた。

この実験は繰返し 3 回全様な条件を行なつたが, 殆ど同様な成績を得た。只ウイルスの吸着より 6~8 時間に至る第 1 周期までに, ウイルス量の上昇の緩慢な時期があり, 接種ウイルスの未吸着の残存が考えられるので, この時期を選び, PBS で反覆洗滌した後に, B₅ 家免疫血清 10 倍希釈を用いて, 37°C 1 時間処理し, あとで同様な感染価の測定を行ない確かめた (Fig. IV)。

この実験成績でも, 殆ど同様な感染曲線が得られた。その結果残存ウイルスを 1.0/bottle 以内にまで抑えられることが証明された。

総括及び考按

Coxsackie B₅ と CS 細胞系のレベルに於いて, 感染とその過程, 同時感染による一段増殖実験を試み, CS 細胞を特に用いた意義を明らかにした。既に Coxsackie B₅ に対して特異な感受性を有し, 特異な C. P. E. を発現して来る事実は俵等 (1964)⁹⁾ の記載に詳しいが, CS 細胞が分離以来比較的容易に累代され, 而も安定した細胞系であることを認めていたので, 実験が円滑に進行したことも, 指摘される利点であつた。又感染細胞の経時的なる観察による形態学的変化と, それに附随するウイルス増殖の過程が比較的良く一致した形で捉えられた。即ち CS 細胞に累代された Coxsackie B₅ は約 20 代の累代により安定した感染価を示すに至り, 10^{6.0} と表示される。その後の累代により感染価の動揺は殆ど認められない。と同時に C. P. E. の発現が著しく迅く

なり、詳細に形態学的所見を窺い得ないので、ウイルス用量を 100 TCID₅₀ と定めて感染を行ない、感染過程を追跡した。その所見では一定の潜伏期を経て、細胞の軽度の変性の発来が窺い得られ、細胞変性作用は72時間迄に著明に進行を続ける。ウイルスの増殖も亦これに平行して増量し、ピークに達する。この間の Coxsackie B₅ の発育の場は明瞭に、宿主細胞質に限定される。即ちエオゼン濃染部（小体）は初め薄いエオゼン好染性部分の次第に発展し、核の周辺にエオゼン濃染小体として発現する。この小体は細胞質内に限局した形で、明らかに細胞質と区別されるものである。これらの所見は明らかにウイルスの増殖を推測されるものである。

次に大量の細胞に、ウイルスを同時感染させて行なつた一段増殖実験では、増殖曲線の示す如く、エクリップス期は約6時間一段増殖周期は約16時間であつて、液層内にウイルスの游出は、細胞内新生ウイルスの出現時間と殆ど同時に増量する点から見て、新生ウイルスの細胞外への游出は可成り早いものと推定された。

結 論

CS 細胞を用いて、Coxsackie B₅ Virus の増殖機構を検討した。その結果 CS 細胞は高い感受性を示

し、特異な細胞変性作用を発揮して増殖することが注目された。その大要を要約すれば次の如くである。

1) Coxsackie B₅ Virus 対 CS 細胞の感染形式により、強い感受性を示して増殖し細胞の形態学的変化とウイルス増殖の過程は比較的一致した成績を発揮した。ともにウイルス感染後72時間にして細胞変性と感染価は高度となり、細胞の漸次脱離と共にウイルスの感染価は減少した。

2) CS 細胞の大量を用い、ウイルス量を増量して同時感染を成立せしめて行なつた一段増殖実験では、一定のエクリップスの時期（4～6時間）を経て、一段増殖の周期は約16時間、爾後反覆して感染に伴なう周期があるものと推定せられた。新生ウイルスの液層内への游出は、7時間で始まり、細胞内新生ウイルスの増加と前後し、非常に早く進行するものと判断された。

稿を終るに当り、始終御教導と御鞭撻を受け、而も御校閲の勞を給つた村上教授並びに御支援を頂いた藤原博士に厚く感謝の意を表す次第である。

参 考 文 献

- 1) Sickles. G. M. et. al.: Proc. soc. exp. Biol. Med. 95 637~639 1957
- 2) Duncan D, et. al.: Canad. J. Pub. Hlth 46 1~8 1955.
- 3) Wiet. J. C. et. al.: Canad. J. pub. Hlth 47 433~437 1956.
- 4) Duncan D, et al.: Canad. J. pub. Hlth 45 55 ~63 1954
- 5) Weller. T. H et. al: J. Immunol. 71: 92~97 1953
- 6) 甲野他：第八回日本ウイルス学会演説要旨。
- 7) 日沼他：第九回日本ウイルス学会演説要旨。
- 8) 坪崎他：第九回日本ウイルス学会演説要旨。
- 9) 俵. 内海. 水原. 山本.: 医学と生物学第68巻 第2号1964.

Studies on Coxsackie B₅ Virus by Tissue Cultures
Part 1. A Study on the Infection and Multiplication of Coxsackie
B₅ Virus in Dog Kidney Cells

By

Masatoshi MAEDA

Department of Microbiology, Okayama University Medical School, Okayama
(Director: Prof. Sakae Murakami)

Author's Abstract

The mechanism of infection and of multiplication of Coxsackie B₅ virus was studied using dog kidney cells (to be abbreviated CS cells). As the result it has been found that Coxsackie B₅ virus has a high susceptibility to CS cells and proliferates by demonstrating a specific cytopathic effect. The results may be summarized as follows.

1. In the infection pattern of Coxsackie B₅ virus to CS cells, the virus is found to proliferate with a high susceptibility to the cells. In addition, morphological changes of the cell and the course of virus multiplication parallel relatively well with each other. Namely, both cell degeneration and the virus infectivity reach to their peak on 72 hours after infection, and the infectivity decreases along with gradual detachment of the cells in cultures.

2. In one-step growth experiment conducted after simultaneous infection of a large number of CS cells with increasing amounts of virus, the cycle of the one-step multiplication after a eclipse phase (4-6 hr) is found to be about 16 hours and it is assumed that the cycle is repeated following the infection. Furthermore, it is presumed that the release of regenerated virus into liquid layer commences within 7 hours and it proceeds very rapidly along with the proliferation of the intracellular regenerated virus.
