

流行性肝炎の病原体に関する研究

第二編

遊離単一細胞を宿主とする肝炎ウイルスの研究

岡山大学医学部微生物学教室（主任：村上 栄教授）

仙 石 晃 久

〔昭和34年9月29日受稿〕

孵化鶏卵培養によつて、肝炎患者材料より肝炎ウイルスを分離する試みは、既に村上等により行われ、しかも分離ウイルスの諸性状に就ては、報告された所である¹⁾²⁾³⁾。之等の研究は、総て動物の組織（臓器）若くは発育鶏卵を宿主とするものであつたため、肝炎ウイルスの性質上、徒に複雑な手段を要し、詳細にその性状を把握し難い憾があつた。

最近に至り、従来の動物体を借りて行うウイルスの研究の簡易化を図る意味から Dulbecco の単層細胞及びその消化による遊離細胞浮游液⁴⁾⁵⁾、Hela 細胞⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾、L 細胞¹⁴⁾¹⁵⁾ 等が用いられ、他に本来の遊離単一細胞を宿主とするウイルスの研究には、Ehrlich 腹水癌細胞¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾、吉田肉腫細胞等が利用せられ、ウイルスの増殖形式を検討する試みとして、大きな効果を挙げていることは周知の事実である。

著者は分離した肝炎ウイルスを用い、第一編に於ては、ウイルス学的性状と血清学的性状を詳細に検討したが、本編に於ては、之等肝炎ウイルスの増殖様式を窺う目的で、Ehrlich 腹水癌細胞及び組織培養の容易に出来る Hela, L, 人羊膜等の細胞を用い、実験を行つたので、茲にその大要を報告する。

実験材料及び方法

供試ウイルス 実験に用いた肝炎ウイルスは、既に村上等により分離され、孵化累代により保存されている石原、小川株 No. 7, 8 株及び著者の新に分離して用いた春名、円原の諸株で、実験に用いたのは、総て精製肝炎ウイルスとして保存中のものを使用した。

実験方法： Ehrlich 癌細胞を、マウスの腹腔内に接種し、罹患せしめておき、肝炎ウイルスを夫々 0.3 ml 宛接種して観察し 7～9 日経過後マウスの頻死期に至つた時期に、腹腔液、肝臓を夫々採取し、

腹腔液はそのまま、肝臓は生理的食塩水（pH 7.6）を添加し、Homogenizerでよく細碎し、10%乳剤を得、1,500 r. p. m. 5 min. 遠沈上清を次代接種材料に用いた。腹腔液は塗抹標本により、Giemsa 染色を行い、観察し、更に他に肝臓を中心とする病理学的変化によつてウイルスの増殖を窺い累代10数代を重ねた。

組織培養： 培養液としては次の組成によりなる培地を使用した。

NaCl 7.18 gr, KCl 0.4 gr, CaCl₂ 0.2 gr,
NaH₂PO₄ 0.152, Dextrose 4.5 g, NaHCO₃
1.1 g, Aq. dest. 700 ml

以上を混和溶解し、更に蒸留水を添加して 1,000 ml とする。更に予め使用前に Seitz E. K. により濾過しておいた牛血清を20%に添加して用いた（YLE 培地）。なお使用に際しては Penicillin 100 u/ml, Streptomycin 100 µg/ml を添加して使用した。

之等各種細胞の培養には、小型角瓶を用い、4～5日培養した後、旧培養液を除き、Hank 氏液で再三洗滌し、0.25% Trypsin 液を加え、37°C 10～20分静置すると瓶壁より剥離する。斯くして得た細胞浮游液を遠心器に移し、ピペットを用い、細胞を充分に分離し、完全なる細胞浮游液とした後 800 r. p. m. 3～5 min. の遠心沈澱により細胞を集め、上清を捨て、沈澱した細胞を、新細胞培養液に入れ、十分に攪拌して、適宜の稀釈を行い、試験管に夫々 1.0 ml 宛分注（細胞数約 40,000～50,000 個）37°C で静置培養を行つた。各種細胞ともに、通常 2～3 日にて、細胞の単一層を得ることが可能であつた。

ウイルスの感染及び累代： 初代ウイルス接種に際しては、L細胞、Hela細胞、人羊膜細胞（以下 HA細胞と略す）ともに2～3日培養の細胞を用い

た。ウイルス接種に当り、陳旧培養液を除去し、Hanks 氏液で細胞を洗滌後、5%牛血清加 YLE 培地を添加して培養を行つた。第2代以後のウイルスの培養に於ては、夫々の試験管内に増殖した、細胞を含むウイルス液を集め軽く遠心して、上清液を0.2 ml 宛接種した。累代は7~9日間隔で、次代累代を行い、その間培地の交換は3~4日毎行つた。

実験成績

1) Ehrlich マウス腹水癌細胞に於ける肝炎ウイルスの増殖について

先づ癌細胞腹水の一定量を接種され約10日経過し、腹水の充分に溜溜したマウス4~5匹より、腹水を採取して pool した後、滅菌食塩水 (pH 7.6) で10倍希釈したものに、精製肝炎ウイルスの各株 10^{-2} 稀釈液同量を混合し、37°C 30 min. 孵卵器中に保ち置き、新に準備したマウスの腹腔内に 0.25 ml 宛接種した。7~10日後その腹水を採り、1,000 r. p. m. 10 min. 遠心した上清を用い、他のマウスに新に接種し、肝臓を中心とする病理学的変化をもとに、ウイルスの消長を窺つた。

腹水を接種した場合の各希釈毎に調べた病理変化については、累代毎に詳細に究明したが、各ウイルスともに、病変が甚だ軽度であることが認められた。稀に小壊死巣の形成若くは軽度の細胞浸潤が見られる程度で、ウイルスの増量は少いものと推測された。

なお同時に作製しておいた腹水の塗抹標本を Giemsa, Haematoxylin-Eosin 染色を行い検鏡をした結果、細胞変性と判断される原形質内の空胞形成等の所見が、一部の細胞に認められたが、その程度は弱く、又 oncolytic effect も勿論認めるに至らなかった。

次に斯るウイルスと接触させた癌細胞を接種したマウスの肝臓をとり pool した各希釈液を、新にマウスに復原した病理学的変化を窺うに、腹水を接種した場合と比較して、肝を中心とする病変は軽度ながら、比較的平等に認められた。即ち肝臓にあつては、限局性的小壊死巣の形成、実質又は間質周辺に於ける軽度の細胞浸潤が存在し、肺臓に於ては軽度の胞隔炎、血管及び気管周辺に於ける円形細胞の浸潤が示された。

之等の実験に於て、使用したウイルス株、石原、小川株を始め、新に分離した円原、春名株等にもほぼ同様な所見を得た点から、肝炎ウイルスは、Ehrlich 癌細胞を宿主とする時は、ある程度の増殖

はあるとしても、決して好適のものではないことを知つた。

続いてウイルスに罹患した癌細胞を大量に集め、10数回凍結融解を行い、細胞を破壊した後、マウスに接種したあと、マウスに復原して病理変化を検討した所見に於ても、ほぼ同様に病変は少く、前の実験を確認したにとどまつた。

斯る事実より Ehrlich 癌細胞を用いて、ウイルスを感染せしめ、本ウイルスの感染及び増殖を確めた結果 Ehrlich 腹水癌細胞に罹患したマウスに、肝炎ウイルスを接種した場合、一部のウイルスは腹水癌細胞を宿主とする増殖はあるが、殆んどウイルスは、マウスの肝に到達して侵入増殖することが明らかである。結局軽度の感染は惹起するが、好適の宿主ではないことを知つた。

2) 組織培養による実験

i) L細胞における肝炎ウイルスの増殖

分譲を受けたL細胞を用い、前記の実験と同様に、分離肝炎ウイルスを感染せしめて、細胞変性作用と、マウスに復原して、感染及び増殖の程度を、病理学的所見により判断することにした。

a. 実験には石原、小川、原、春名の諸株を用いた。L細胞の cell-Sheet を作った中試験管にウイルスを接種して培養し、7~10日間隔で、培地の遠心上清 0.25 ml 宛を次代接種材料として5~6代の累代を行つた。之の間毎日検鏡して、細胞変化を確めた。他に試験管内に短冊型に切つたガラス片を挿入して細胞を培養しておき、同様にウイルスを接種して、経日的にとり出し、Giemsa 染色、Haematoxylin-Eosin 染色を行い、細胞の変化を窺つた。

夫々のウイルス株を接種して観察するに、一般に Fibroblast 様の菱形の細胞は、経日とともに細胞質突起を失い、鑷て円形化して漸次増加する傾向を示すが、5~7日に於ても少数の細胞の管壁よりの剝離が認められるのみで、培地の変換に伴い、もとの状態となり、激しい細胞の剝離は認められない。之等の細胞変化の平等に起るのは円原、春名株に於て著しく、石原、小川株に於て少い。之の現象を若し弱いながらも、一種の細胞変性と解するならば、ある程度の細胞変性作用と推測されるが、この程度では、細胞変性効果 (cp-effect) と評価し難いものと判断された。

又短冊状ガラス片を用いた培養よりとり出した細胞を、燐酸緩衝液で再三洗滌し Metanol で固定し、Giemsa, Haematoxylin-Eosin 染色をした標本に於

ても、対照と比較し殆んど大差なく、細胞原形質内の空胞形成等が稀に認められるが、目標にすべき一定の変化に乏しく、封入体の如き存在も認められなかった。

b. マウス体内に復原した場合に於ける病理学的変化は、一般に累代数、ウイルス株によつて多少とも差はあつたが、軽度の場合が多い。

先に細胞変性の続いて認められた円原、春名株は、軽度ながら限局性小壊死巣の形成、又は細胞浸潤が認められたが、累代数の長期間に亘る石原、小川株に於ては殊に病変は少いようであつた。

之等の実験成績は、L細胞5～6代に亘る所見であるが、細胞の変化、マウスにおける復原実験の結果では、かならずしも好ましい宿主ではない事は明かであり、先述の軽度の細胞変化も、将来のL細胞を用いたウイルスの感染及び増殖の目標とするには、なお検討の要があると判定された。

ii) 人羊膜細胞及び Hela 細胞における肝炎ウイルスの増殖

人羊膜細胞 (HA と略す) 及び Hela 細胞を用いた実験も、先のL細胞と同様に、YLE 培地に牛血清を10～20%の割合に添加して用い、ウイルス培養に際しては、添加する牛血清を5%に下げて、細胞を維持し、培地の更新は同様に3～4日毎に行つた。別に短冊状ガラス片を挿入して培養したことは同様である。

a. HA 細胞に於ける肝炎ウイルス接種は次の如くであつた。即ち HA 細胞を試験管内に分散せしめて、静置培養を行うに、凡そ2日にして、細胞の単一層が得られるので、維持培地に移して、ウイルスを接種して毎日細胞の変化を観察した。

実験に用いた石原、小川、円原、春名の諸株に於ては、夫々の累代に伴い細胞の変化は極めて緩徐ではあるが、一様に認められた。即ちウイルス接種後3日前後より、部分的に小形の円形細胞が、細胞質に附着した如き形で現われ、経日とともに次第に増加の傾向を示し、部分的には多数集合した状態で、輝くように認められ、平等に細胞の構造が見え、5～7日に於ては内部構造は不鮮明となる。爾後7～8日にして、漸次細胞の管壁より離脱するが、急激ではなく、極めて緩慢である。10日に至つても、全部の細胞が剝離することは殆んどないが、細胞間に隙間が生じ、同様の円形細胞が、集合した形で残存する。若し3～4日毎に培地の更新を行わない場合は以上の変化は更に著明となる。斯る細胞変化に伴

う pH の低下は、pH 6.5～6.8 程度 (7～8日) にまで至るようである (第1表)。

第1表 肝炎ウイルスの HA 細胞に対する態度

ウイルス株	HA 細胞累代数	Cp 発現の程度 所要日数	マウス復原に於ける病変
石原株	5～6	1～2代 Cp+ 3～6代 Cp+ 7～8日	+
小川株	6～7	1～3代 Cp± 4代 Cp+ 5～7代 Cp+ 9～10日	±
春名株	5～6	1～6代 Cp+ 7～8日	+
円原株	5～7	1～2代 Cp+ 3～7代 Cp+ 7～9日	+

斯る細胞変化を、短冊状ガラスに附着した細胞の検鏡により確めた結果、円原、春名、小川株に於ては、7日培養に於ては、概ね核は圧迫され偏在する例が多く、原形質は空胞変性若くは更に進んで網状を呈する場合があり、又殆んどの場合 Eosin に好染する顆粒状物質が存在することが認められた。

一般に之等の所見は、各累代に於て認められた事実から、肝炎ウイルス特有の Cytopathogenic effect (以下 Cp-effect と略す) と判断された。

次に Hela 細胞を用いた場合では、殆んど同様の所見が認められたが、HA 細胞に比して、円形細胞の増加が少く、Cp-effect はやや軽度であることが認められた。

なお斯る Cp-effect を目標にして TCID₅₀ (組織培養感染価) を測定するに、春名、円原株がやや高く 10^{-6.4}～10^{-7.2} を示し、石原、小川株ではやや低く 10^{-5.6}～10^{-6.4} を示した。

b. HA 細胞を6代通過したウイルス株を用い、マウスに復原を行つた場合、先の実験と同様に病理学的変化は、一様に軽度であつたが、夫々細胞浸潤等の所見が認められた。この病変はマウスの累代に於て認められた病理所見と比較して極めて軽度なことが指摘された。

斯る Cp-effect が、HA 細胞に対して毎時平等に発現するとすれば、肝炎ウイルスの性状も明瞭な

形で把握出来ると考え、著者が第一編に於て行つた、肝炎ウイルスの特性として、殊に重要と判断された一般ウイルス学的性状を、Cp-effect を目標にして比較検討を行つた。

耐熱性試験：熱に対する低抗性については Havens 以来、殊に肝炎ウイルスの特性と注目されたが、耐熱に関する報告は総て、判定に対する方法が区々であつたがために、確実な結果が得られていない。分離した肝炎ウイルスについては、既に時末²⁰⁾、鈴木²¹⁾の報告があつて、マウスに示す病理学的所見より判定して抵抗の限度を 70°C 30 min. と示した。

著者は HA 細胞に増殖したウイルスを pool して、第一編に行つたと同様に、夫々の温度により熱処理を行い、HA 細胞の増殖した各試験管 3～4 本に 0.1 ml 宛接種して、14日に亘り観察を行い、その間 3～4 日毎に培地の更新をして、Cp-effect を調べ、その限界を求めた。

実験成績に於ては、用いたウイルス株ともに、56°C 30 min. の加熱に対してよく抵抗するが、60°C 30 min. では可成りの傷害を受け、65～70°C に於て殆んど抵抗せぬ事が、Cp-effect により判断された。特に 56°C 30 min. 加熱に対して、Cp-effect は可成り著明に、5～7日に発現されたことが注目された。この結果は、マウスに示す病理所見による判定と可成りの一致を示すことが認められた(第2表)。

第2表 温熱に対する抵抗試験

作用温度 時間	春 名 株	円 原 株	石 原 株	小 川 株	対 照
56°C 30 min.	++	++	+	+	+
60°C 30 min.	+	+	+	+	+
65°C 30 min.	+	+	±	±	+
70°C 30 min.	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
75°C 30 min.	—	—	—	—	+

注：i) 一群 HA 細胞 3～4 本を用いた。
ii) ウイルス稀釈は 10⁻² を用いた。
iii) (++)～(—) Cp-effect の程度を示す。

濾過試験：先の耐熱試験と同様に、HA 細胞に増殖したウイルスの濾過を行つた成績では、Seitz E. K. 及び Berkefeld N を容易に通過することが明かとなつた。之等の濾過管を通過することによりウイルスの減少は見られたが、HA 細胞を累代することにより恢復し、HA 細胞に対する Cp-effect が

発現したことで濾過性と判断された。

エーテル抵抗性：エーテルとウイルス感染 HA 細胞 10⁻² 稀釈液と同量を混和よく振盪し、4°C 24 時間保ち、滅菌シャーレ内に拡げ、エーテルを飛散せしめた後、1 群 3 本宛の HA 細胞に 0.1 ml 宛接種した結果、依然細胞変性は発現しエーテル処理による不活化は認められなかつた。

第3表 各種細胞の肝炎ウイルスに対する感受性

細胞の 種類	累代数累 代の有無	Cp- effect	染色 所見	マウス復原 による病理 学的所見
Ehrlich 腹水癌細胞	5～6代 可	—	—	軽度
L-細胞	5～6代 可	—	—	軽度
Hela 細胞	5～7代 可	++	+	軽度なるも 確実性あり
HA 細胞	6～7代 可	++	++	軽度なるも 確実性あり

総括及び考按

肝炎患者材料より分離したウイルスを用い、各種の遊離細胞即ち Ehrlich 腹水癌細胞と、他に培養に容易な L, HA, Hela 細胞等に対する感受性を窺つた。

ウイルスが斯る遊離細胞に侵入増殖するに伴い、寄生組織細胞が変性を招来し、崩壊するに至る事実は既に認められている⁽¹⁸⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾。又この細胞変性作用は、ウイルスの種類によつても異り、全く細胞障害作用を示さないで経過する場合もある。

著者は肝炎ウイルスが若し斯る各種細胞に対し感受性を示すとすれば、今後のウイルス学的研究も簡易化されるものと推測して、実験を行つた。既に Cp-effect を発揮するウイルスに就ては、大いに研究が進められているが、これは感染の目標ともなり、増殖形式を窺うに重要な標識となるからである。著者の目的も結局は Cp-effect を発揮する細胞の探索にあつた。

実験成績では、HA 細胞を用いた場合のみ、一応 Cp-effect と判断すべき所見を得たが、他の既知ウイルスの場合の Cp-effect と比較して、細胞変化が緩慢であり、又 7～9 日にして漸次発現する等の所見であつて、著明でない感もあるが、本実験の観察は、ウイルスの累代が 5～6 代と若く、固定した変性作用と判断すべきか、どうかに疑問がある。又ウイルス株により、この Cp-effect にやや差異が

見られる点があるが、先づ各累代毎に一樣に発現する事実から、可成り信頼するに足る所見と推測される。

次に斯る Cp-effect を HA 細胞に対する肝炎ウイルスの感染標識として、特に重要な性状とされる耐熱性、濾過性、エーテル抵抗性等の一部の性状を確めた。実験の結果 HA 細胞変性を利用して、充分に性状の検討を行うことが可能であることを知つたが、更に多数のウイルス株についても検討の要があるものと推測される。

結 論

孵化鶏卵培養により、肝炎患者材料を用いて分離したウイルスの、各種の遊離細胞に対する感受性を窺つた結果次の結論を得た。

参 考 文 献

- 1) 村上等：第2回日本ウイルス学会肝炎シンポジウム，1955.
 - 2) 村上等：第5回日本ウイルス学会講演要旨，1958.
 - 4) Dulbecco, R. & Vogt, M.: J. Exp. Med 99, 167~182, 1954.
 - 5) Dulbecco, R. & Vogt, M.: J. Exy. Med. 99, 183~199, 1954.
 - 6) Gey, G.O. Coffmann, W.O. & Kubieck, M.T.: Cancer. Reseach 12, 264~265, 1952.
 - 7) Scher, W.F. & Syverton, J.T.: Am. J. path. 30, 1057~1074, 1954.
 - 8) Scherer, W. F. & Syverton, J.T.: Am. J. path. 30, 1075~1083, 1954.
 - 9) Scherer, W.F. & Syverton, J.T.: Am. J. path. 30, 31~40, 1955.
 - 1) 実験に用いた各種の遊離細胞殊に Ehrlich 腹水癌細胞では、認むべきウイルスの感染及び増殖は少く、培養したL細胞に対しても、感受性は極めて低いものであつた。
 - 2) 人羊膜細胞に対しては、注目すべき Cp-effect と推測すべき所見を得た。実験に用いたウイルス株がほぼ同様な細胞変性を発揮する事実から一応の Cp-effect と評価し得るので、本ウイルスの性状中重要とされる耐熱性、濾過性エーテル抵抗性について、Cp-effect を目標にして吟味した結果、先の第一編の所見と可成りの一致を示すことが認められた。
- 終りに当り、御指導と御教示を得た恩師村上教授に深謝する次第である。
- 10) 加藤四郎：Virus 5, 111~118, 1955.
 - 11) 土肥清一：Virus 5, 242~264, 1955.
 - 12) 萩原喜一：Virus 6, 23~40, 1956.
 - 13) 林博他：Virus 7, 295~305, 1957.
 - 14) 古沢英一他：Virus 8, 499~503, 1958.
 - 15) 金沢謙一：第5回日本ウイルス学会総会，1957.
 - 16) Enders, J.F. Weller, T.H. & Robbins, F.C.: Feder. proc. 11, 467, 1952.
 - 17) Huang, C.H.: J. Exp. Med. 78, 111, 1943.
 - 18) Hillman, M.R. and Werner, J.H.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 85, 183, 1954.
 - 19) Henle, ginaldi, A. and Henle, W.: J. Exp. Med. 101, 25, 1955.
 - 20) 時末：岡山医学会雑誌，第69巻，第4号，1957.
 - 21) 鈴木：岡山医学会雑誌に掲載予定.

Studies on the Pathogene of Infectious Hepatitis
Part II Studies on the Hepatitis Virus being Parasitic on
Single Free Cells

By

Akihisa SENGOKU

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

Some properties of the hepatitis virus were reported already in part I. The author studied further the pathogenicity of the virus to single free cells. The virus used in this study was isolated from hepatitis patient and cultured in the chorio-allantoic cavity of chick embryo. and the following results were obtained.

1) The infection and the proliferation of the virus were scarcely found on various single free cells used in this study: this could be said especially in the case of EHRlich's ascites tumor cells. The same findings were also obtained on the cultured L-cells.

2) The hepatitis virus used in this study caused the changes what could suppose as Cp-effect. This concept was thought to be valid, since this virus could cause almost identical degeneration of cells. Then, the virological properties of the virus, i.e. heat-resistance, filtrability and resistance to ether, were studied again by the use of Cp-effect. And there were found a fairly good coincidence of the results with the part I.
