

犬腎培養細胞による麻疹ウイルスの研究

第 2 編

麻疹ウイルスに対する犬腎細胞と各種培養細胞との感受性
及び病理形態学的変化の比較岡山大学医学部微生物学教室 (主任:村上 栄 教授)
指導:俵寿太郎助教授)

内 海 武 夫

〔昭和39年11月17日受稿〕

内 容 目 次

緒 言

第1章 麻疹ウイルス接種初代細胞に於ける感受性

第1節 実験方法

第2節 実験成績

第2章 ウイルス継代による感染価の移動

第1節 実験方法

第2節 実験成績

第3章 各種感染細胞にみられる細胞変性効果

第1節 実験方法

第2節 実験成績

第4章 犬腎細胞に於ける麻疹ウイルス増殖曲線
実験

第1節 実験方法

第2節 実験成績

第5章 考 按

結 語

文 献

緒 言

麻疹ウイルスは、1954年に Enders & Peebles¹⁾ により人胎児及び猿腎細胞を用いた組織培養法で分離されて以来、その研究方法が確立されたことは第1編に述べた通りであるが、その後多種類の培養細胞を用いた実験が多く報告されてきた。

即ち KB 細胞²⁾, Hep-2 細胞³⁾, Chang の肝細胞⁴⁾, FL 細胞⁵⁾, HeLa 細胞⁶⁾, Henle および Denhardt の腸管細胞⁷⁾, Chang の結膜細胞⁸⁾, Walter Reed AMC の骨髓細胞 (H 946 系)⁹⁾, 牛腎細胞¹⁰⁾, 鶏胚細胞¹¹⁾ 及び Högman の人胎児肺細胞 (Lu 106)¹²⁾ などがその主なるものである。

このように各種の培養細胞に麻疹ウイルスを感染せしめた実験の目的は、主としてワクチン製造に対する変異株の探索がその大半であろうが、他方ウイルスの実験に各種動物の諸臓器細胞が試験管内培養状態で使われる場合には、ウイルスに対する感受性が高い細胞を探求してそれを使用することが何よりも望まれるわけである。この目的のために第1編で試みた犬腎細胞に対する麻疹ウイルスの感染実験で

は、これが強い感受性を示した。

そこで麻疹ウイルスの犬腎細胞に対する感受性を、他の培養細胞と比較観察するべく、既に感染可能として報告されている数種類の固定株細胞と、未報告又は感染不成功として報告されている数種類の培養細胞について比較感染実験を試みたので、この結果について報告する。

第1章 麻疹ウイルス接種培養細胞
に於ける感受性

第1節 実験方法

使用麻疹ウイルスは、FL 細胞系及び犬腎細胞系で継代している Edmonston 株であり、使用細胞種は、FL 細胞、HeLa 細胞、L 細胞、MS 細胞及び JTC-3 細胞¹³⁾ の固定株細胞と、余が分離継代中の犬腎細胞及びハムスター腎細胞である。そしてこれらの細胞数が、ウイルス接種時に全て 2-3 × 10⁵ cell/ml になるように分散培養した培養管をそれぞれ使用した。

接種ウイルス材料は、FL 細胞系麻疹ウイルス及び犬腎細胞継代10代目の麻疹ウイルス感染10日目の

表 3 ウイルス継代による感染価の変動

ウイルス	細胞名	継代数	感染価 $-\log_{10}TCID_{50}/mL$							
			1	2	3	4	5	6	7	8
犬腎細胞系	FL	1	8	7	6	5	4	3	2	1
	HELa	1	8	7	6	5	4	3	2	1
	L	1	8	7	6	5	4	3	2	1
	JTC-3	1	8	7	6	5	4	3	2	1
	MS	1	8	7	6	5	4	3	2	1
	犬腎	1	8	7	6	5	4	3	2	1
	ハムスター腎	1	8	7	6	5	4	3	2	1

ムスター腎細胞では感染価は低く、FL 細胞系ウイルス接種の場合と同じ様な結果であった。

結局 FL 細胞は他の細胞と比較して、麻疹ウイルスに対する感受性が特に優れている細胞の如く、HeLa 細胞、JTC-3 細胞、MS 細胞及び犬腎細胞は麻疹ウイルスがこれらに感染馴化される迄の経過に多少の差はあるが終局に於ては FL 細胞と同じレベルの感染価を示した。即ちここに使用した全ての細胞に麻疹ウイルスを感染させることが出来たわけで、麻疹ウイルスは広範囲にわたる感染スペクトルを有していることが判った。

第3章 各種感染細胞にみられる細胞変性効果

第1節 実験方法

FL 細胞、JTC-3 細胞、HeLa 細胞、MS 細胞、L細胞、犬腎細胞及びハムスター腎細胞の各々を5%仔牛血清加培養液で培養し、全培養管には各系細胞が同数存在するようになるまで発育するのを待つてウイルスを接種し、CPE の発現順序を時間を追つて観察した。即ち各細胞系列毎に多数の短冊入り培養管を作り、いわゆる input multiplicity が1になるようにウイルスを接種し、毎日各細胞系の3本の培養管から3枚の短冊を取り出し、生理的食塩水で洗滌後、エーテル、アルコール等量液で固定し、

ヘマトキシリン・エオジン染色を行つた標本を鏡検観察した。尚培養液は4日ごとに交換し、観察期間はウイルス接種25日後迄行つた。

第2節 実験成績

結果を総括したものは表4である。

一般的に述べれば、CPE 出現の順序は第1編で述べた如く、線維芽様細胞変性、多核巨大細胞形成、細胞質内封入体形成核内封入体形成そして管壁よりの脱落である。即ち線維芽様細胞変性はウイルス接種後3-4日で認められたが、ハムスター腎細胞では一般に著明でなく、わずかにみられる場合もあり、L細胞では全く認めることが出来なかつた。その他の細胞でも種類により程度の差はあつたが、最もよくみられたのは FL 細胞、HeLa 細胞及び JTC-3 細胞等であつて、犬腎細胞では幾分軽度であり乍ら観察された。この CPE が現れる頃には、所々に多核巨大細胞が混在してみられるようになり、早いものではウイルス接種3日後より始まり、遅ければ5日後頃になつてみとめられたものもある。この多核巨大細胞は、いずれの細胞にも認められ又、この頃には全て線維芽様細胞にも、多核巨大細胞にも細胞質内封入体が観察され、これは核の近くで透明帯を有したり或は有していないエオジン嗜好性の不規則塊として存在していた。そして多核巨大細胞の大きさはまちまちで2核しか含まぬ最少のものから30個以上の核を有する大きなものまで存在した。さらに日を経てウイルス接種7日から10日後頃になれば線維芽様変性細胞は全く消失し、全細胞が円形化してきて巨大細胞内の核にはエオジン嗜好性の核内封入体を有するようになった。ただL細胞及びハムスター腎細胞では核内封入体形成はおそく、その数も少なかつた。その頃から巨大細胞の核は細胞中央部に集まつて環状配列をし、大きく融合した細胞質内封入体がこれ等を囲み、その周囲に収縮した細胞質

表 4 各種細胞にみられる細胞変性効果

細胞名	細胞変性効果				
	線維芽様細胞	巨大細胞	細胞質内封入体	核内封入体	細胞脱落
FL	3-4日	3-4日	4-5日	7-10日	10日~
HeLa	3-4日	3-4日	3-5日	7-10日	10日~
L	みられず	4-5日	5-7日	10日~	10日~
JTC-3	3-4日	4-5日	4-5日	7-10日	10日~
MS	3-4日	3-4日	4-5日	7-10日	10日~
犬腎	3-4日	3-4日	4-5日	7-10日	14日~
ハムスター腎	著明ならず	4-5日	4-5日	10-20日	10日~

がエオジン嗜好性となつてわずかにみられるいわゆる円形化した多核細胞となつて、次第に管壁から脱落してゆくのであるが、完全に脱落してしまう迄の時間的關係は、まちまちであつて総括して言うことは困難であつた。FL細胞、HeLa細胞、JTC-3細胞等は割に早く、ウイルス接種後2週間もすれば細胞は完全に脱落して皆無の状態になつたが犬腎細胞は3週間後でも、尚管壁に固着したものもあり、組織培養の実験には都合のよいものであつた。L細胞及びハムスター腎細胞は、可成り長期間管壁を離れずにいるものもあつたが、感染価が低く、CPEの現われ方に不規則性があり、この実験に関する限り良好なる細胞ではなかつた。

第4章 犬腎細胞に於ける麻疹ウイルス増殖曲線実験

第1節 実験方法

少量接種法による増殖曲線実験を次の如く行つた。接種ウイルス材料には犬腎細胞系麻疹ウイルスの100 TCID₅₀のものをを用いた。まず犬腎細胞を単層培養した150×15mmの培養管から培養液を捨て、BSSで洗滌したのち上記ウイルス液の0.2mlを各培養管に接種し、この時を以て染感開始時とした。これを35°Cで2時間吸着させ、その間5分毎に培養液を振盪してウイルスを細胞に充分吸着せしめ、しかる後に新しい培養液1.8mlを加え、35°Cで一週間培養した。これで接種ウイルス濃度はさらに1桁稀釈されたことになり、途中培養液の交換は行わなかつた。

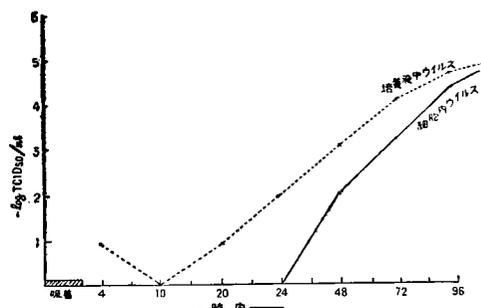
以後は一定の時間的間隔で3本の培養管から培養液をとり混合して培養液中ウイルスの感染価を測定し、細胞内ウイルスについては、培養液を除去して、BSSで細胞を軽く洗つた後トリプシンで細胞を剥がし、遠心沈澱管に集め、BSSで遠心沈澱と再浮游の操作によつて洗滌を行い、最後に集めた細胞を元の液量に浮遊させ凍結融解を30回行つた後、3000 r. p. m. で15分間遠心沈澱を行い上清についてウイルス力価を測定した。

第2節 実験成績

ウイルス増殖曲線は表5の如くで、麻疹ウイルスを犬腎単層培養細胞に接種後、4時間で測定した培養液中残存ウイルスのTCID₅₀/mlは1.0前後であつた。しかし10時間目に於て0となり、20時間で遊離ウイルスが現われ始めて、24時間経過したところで2.0前後であつた。そして除々にウイルス量を増し、

48時間目では3.25、72時間で4.0前後の感染価を示し、その後曲線はゆるやかになつたが尚次第に上昇し、96時間で4.75乃至5.0に達した。そして細胞内ウイルス量は48時間後に始めてみられ、その後は大体培養液中ウイルスと併行した曲線を示した。即ち、ウイルスの増殖はウイルス接種4日前後からみるべき価を示し、7日前後迄継続した。そして、光学顕微鏡的にCPEを認識する頃には既にウイルスの游出は開始されていることが判つた。

表5 犬腎細胞に於ける麻疹ウイルス増殖曲線



第5章 考 按

麻疹ウイルスが組織培養法で分離されて以来、このウイルスに感染可能なる培養細胞として報告されてきた細胞は、緒言に於て述べた如く多種類のものがあるが、この種の実験が末報告の細胞及び報告はあるが再検討を要するものとして確認されていない細胞も可成り多い。而して犬腎細胞を麻疹ウイルスの感染実験に使つた詳細の報告はない。そこで、このウイルスの犬腎細胞に対する感受性を知るべく、多種類の細胞のそれとを比較しつつ実験を行つてみた次第である。

その結果、犬腎細胞は麻疹ウイルスによりおこる特異的CPEを全て示したが、その中に主たるCPEである大きな多核巨大細胞を作ることと、鮮明で大きな細胞質内及び核内封入体を作ることとは、感染標識として判定が容易であり、しかも高い感染価を示し、且つ生存力が長く、ウイルスの游出は接種4日後から強まり、従来よく報告されてきたFL細胞及びHeLa細胞等と同様に、麻疹ウイルスの感染実験に使用して大変便利な細胞であることが判つた。

尚、麻疹ウイルスによる感受性が疑わしく再検を要するものとされていたL細胞及びハムスター腎細胞¹⁴⁾、そして感染実験未報告のMS細胞及びJTC-3細胞等も特異的CPEを示し、エオジン嗜好性の封

入体を有する多核巨大細胞の形成も著明で、たとえそれ等の示す感染価に高低の差はあるとしても感染は可能であり、麻疹ウイルスは可成り多くの種類の培養細胞に対して感染性を有するウイルスであることも判つた。

以上犬腎細胞に対するこれらの事実から、今後麻疹ウイルス、牛痘ウイルス及びジステンパーウイルスの間の関連性の研究及びワクチンの研究に対しても多分役に立つであろう結果を得たものと信ずる。

結 語

麻疹ウイルスに対する犬腎細胞の感受性及び病理形態学的変化を、各種培養細胞に於けるそれらと比較観察しつつ検討してみた。

使用した細胞種は従来麻疹ウイルスの感染実験によく用いられている FL 細胞及び HeLa 細胞と、麻疹ウイルスによる感受性が陰性又は陽性としても尚疑わしく再検を要するものとされていた L 細胞及びハムスター腎細胞、そしてこの種の感染実験が未報告の MS 細胞、JTC-3 細胞でこれらを同一条件下で実験して比較した。

異細胞系ウイルスによる接種第 1 代に於ては FL

細胞が最も高い感染価を示し、L 細胞及びハムスター腎細胞が低い感染価を示した外は、いずれの細胞も同程度の感染価を示した。又各細胞系列に継代した時の感染価の移動は第 3 代目で殆どのが安定した感染価を示し、遅いものでも 5 代目以後で変動したものはなかつた。ただ L 細胞及びハムスター腎細胞は低い感染価で多少不安定性があるようであつた。この実験で犬腎細胞は FL 細胞に次いで早く馴化する傾向を示し良い結果を得た。

又特異的 CPE の観察による判定は、多核巨大細胞及び封入体形成が著明な為容易であつたし、ウイルスの増殖は、接種 4 日後から 7 日後頃の間でよく行われた。

以上の結果から麻疹ウイルスによる犬腎細胞の感受性は甚だよく、今後の実験に使用して便利な細胞の一つであると思われる。

稿を終るにあたり、この実験に終始御懇篤なる御指導を賜った村上 栄教授及び俵寿太郎助教授に深湛の感謝を捧げ、又本研究に対し麻疹ウイルス (Edmonston 株) を御分与下さった伝染病研究所松本稔教授に心より感謝いたします。

文

- 1) Enders, J. F. and Peebles, T. C.: Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86: 277—286, 1954.
- 2) Dekking, F. and McCarthy, K.: Propagation of measles virus in human carcinoma cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 93: 1—2, 1956.
- 3) Frankel, J. W. and West, M. K.: Cultivation of measles virus in stable line of human amnion cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 97: 741—742, 1958.
4. 5) Toyoshima, K., Hata, S., Takahashi, M., Kunita, N. and Okuno, Y.: Virological studies on measles virus. II Growth of Toyoshima strain in four established cell lines. *Biken's Journal*, 2: 313—320, 1959.
- 6) Kallman, F., Adams, M., William, R. and Imagawa, D. T.: Fine structure of cellular inclusions in measles virus infection. *Jour. Bioph. Bioch. Cyto.* 6: 379—382, 1959.

献

7. 8. 9) Mutai, M.: Isolation and identification of measles virus. *Japan. Jour. Exp. Med.* 29: 283—295, 1959.
- 10) Wako, H., Kawana, R., Kaneko, M., Matsu-moto, M., Mutai, M., Saburi, Y. and Nakamura, M.: Clinical and antigenic effects in children of measles virus adapted to bovine kidney cell culture. *Japan. Jour. Exp. Med.* 31: 481—485, 1961.
- 11) Katz, S. L., Milovanovic, M. V. and Enders, J. F.: Propagation of measles virus in culture of chick embryo cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 97: 23—29, 1958.
- 12) Norrby, E.: Hemagglutination by measles virus. III Identification of two different hemagglutinins. *Virology*. 19: 147—157, 1963.
- 13) 堀田 進, 大山昭夫: 組織培養の基本と実際. 永井書店, 大阪, 1963, 100.
- 14) 東昇, 石田名香雄: ウイルス学, 755, 1964.

写 真 説 明

写真は全てヘマトキシリン・エオジン染色による顕微鏡写真であり、対照細胞は全てウイルス無接種対照で感染細胞固定日と同日のものである。

- 図1) 及び2) : 2) は麻疹ウイルス接種7日後にみられた感染犬腎細胞で、多核巨大細胞の一部の強拡大写真であり、大きな細胞質内封入体 (ci) と核内封入体 (ni) を示す。1) はその時の対照細胞である。
- 図3) 及び4) : ハムスター腎細胞で4) はウイルス接種9日後のもの。3) は対照細胞である。
- 図5) 及び6) : MS 細胞で6) はウイルス接種10日後のもの。5) は対照細胞である。
- 図7) 及び8) : JTC-3 細胞で8) はウイルス接種5日後のもの。7) は対照細胞である。
- 図9) 及び10) : L細胞で10) はウイルス接種10日後のもの。9) は対照細胞である。
- 図11) 及び12) : HeLa 細胞で12) はウイルス接種9日後のもの。11) は対照細胞である。
- 図13) 及び14) : FL 細胞で14) はウイルス接種8日後のもの。13) は対照細胞である。

The study of measles virus in dog kidney cultured cells.

Part II. Comparative observation of sensitivity and pathogenic morphological changes to measles virus infection of dog kidney cells and other kinds of cultured cells.

By

Takeo UTSUMI

Department of Microbiology, Okayama University Medical School, Okayama, Japan

(Chief: Prof. Sakae Murakami)

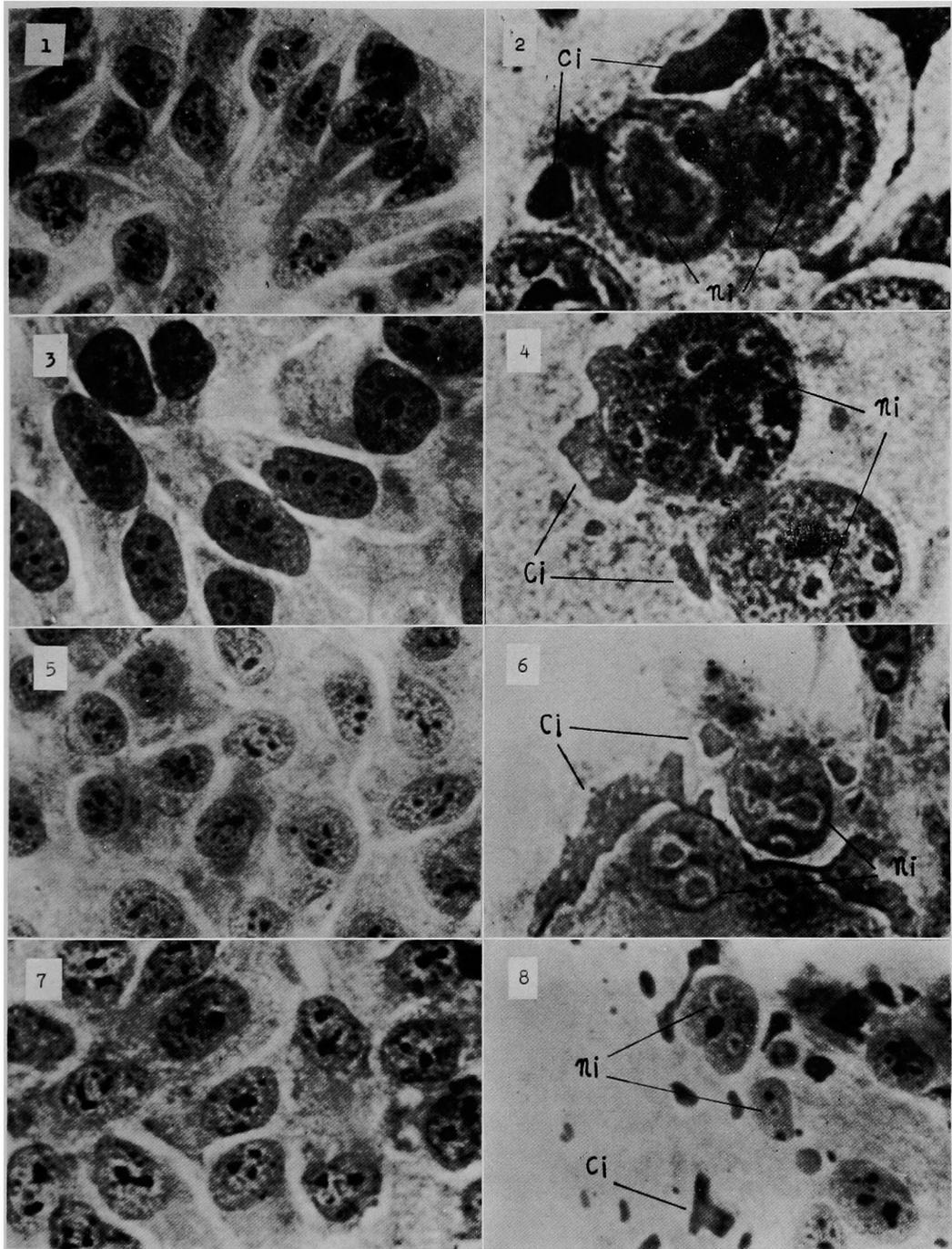
(Director: Ass. Prof. Jutaro Tawara)

Author's abstract

A comparative study on the susceptibility of measles virus and pathological changes of cells in culture was carried out with dog kidney cells and many other cultured cells by inoculating measles virus into the media of cultures. As the result it was found that FL cells and HeLa cells demonstrated the highest infectivity, followed by that of dog kidney cells. Monkey cells (MS cells) and human amnion cells (JJC-3 cells) also showed a fair degree of infectivity to measles virus (the report on such cells has not yet been made public). On the other hand, L cells and hamster kidney cells, what had been generally reported to be readily infected by measles virus were found to show a low infectivity only, indicating them to be not suitable cells for such a study.

In the case of dog kidney cells infected with measles virus, viral proliferation could be observed clearly during the period 4 to 7 days after the inoculation.

内海論文附図



内海論文附図

