

Adenovirus 12 型 に関する 研究

第 II 編

Adenovirus 12型の寒天斜面組織培養法及び単層
組織培養法による増殖について

岡山大学医学部微生物学教室 (主任: 村上 栄教授)

藤 田 耕 三

【昭和43年7月10日受稿】

緒 言

著者は前編において HeLa-S₃ 細胞の単層培養、斜面寒天培養を行つて Adenovirus 12 型の増殖態度を追究した。即ち感染 virus 量は TCID₅₀ の $\frac{1}{2}$, 10^{-1} , 2×10^{-2} , 10^{-2} , 2×10^{-3} , 10^{-3} とし、7 日毎に継代する方法で実施したのであるが本研究では感染 virus 量をより微量の範囲に広げ、継代間隔を30日として継代した場合、又同じ、系列継代で7日と30日の間隔で継代した場合等の virus の増殖の関係を比較検討した。

I 研究材料及び方法

1) 実験材料

Virus は前編と同じ Adenovirus 12 型を用いた。使用細胞も同様に HeLa-S₃ 細胞を用いた。組織細胞培養液も同様に増殖用培養液としては 20% 牛血清加 Y. L. E を用い、之に streptomycin 250 mg/l 及び Penicillin 10 万単位/l を加え、維持培養液としては 5% 牛血清加 Y. L. E 液を使用した。

斜面寒天培地は前編の実験と同じものを用いた。

2) 実験方法

前編の実験では Adv. 12 感染細胞を単層培養法と斜面寒天培地による細胞集落状培養法で7日毎に継代を行つて virus の増殖状態を追究したが、本編では、第1は同様な実験を行い virus の微量をもつて感染せしめ、継代を30日毎に行つて C. P. E を認めるに至るまで続けた。感染に用いた Virus 量は 10^{-4} , 10^{-5} , $10^{-6} \times \text{TCID}_{50}$ である。第2は略同様な実験を行つたのであるが、継代を7日毎に行つた場合と30日毎に行つた場合の2系列について virus の増殖状態を比較検討した。但し本実験では感染細胞の単層培養を行つたものは継代は凍結融解した上

清を新単層培養細胞に接種した。

第1実験操作は先づ大型角瓶2本に HeLa-S₃ 細胞の単層培養を行い、トリプシン液で細胞を分散し、P. B. S で2回遠心洗滌し、此の時3本の試験管に細胞を3等分して入れ、沈澱上清を捨てた後、 10^{-4} , 10^{-5} , $10^{-6} \times \text{TCID}_{50}$ の virus 量を加えた5%牛血清加 Y. L. E をそれぞれ各管に注入し細胞を浮遊させ 37°C の孵卵器中に3時間置き、その間30分毎に軽く振盪して感染させた。そして各管を 2,000r. p. m 2 分間遠心し、この感染細胞沈澱を出来る限り細胞量が等しくなる様に各管の細胞を2本の斜面寒天と2本の試験管にとつて培養した。

継代は斜面寒天上に細胞集落状に培養した感染細胞は2本の各管から夫々半量宛細胞を白金耳でとり次代斜面寒天2本に各々培養し、残りの各半量の細胞は混合して5%牛血清加 Y. L. E に浮遊して、15回凍結融解して 1,000r. p. m 2 分遠心し、上清を新しく準備した単層培養に接種して CPE の発現の有無を2週間観察し検べた。感染細胞を単層培養したものは、継代に当つては各 virus 濃度の各試験管の半数はトリプシンで次代に継ぎ、半数は維持液をすてて、新しい維持液を加え凍結融解13回後、遠心沈澱してその上清を2本の新単層培養細胞に接種し、CPE の出現をみた。

II 実験成績

1. 単層組織培養法と斜面寒天細胞集落培養法との30日毎継代による virus の増殖の比較

斜面寒天上に細胞集落状に Adv. 12 感染細胞を培養する方法と、単層組織培養で Adv. 12 感染細胞を維持する (多少増殖する) 方法との二法によつて細胞を保持し、凡そ30日毎に継代して感染 virus の増

表 1

継 代 数	斜面寒天上に培養						単層培養					
	斜面寒天培養細胞			凍結融解上清を単層培養細胞に接種し, CPE 観察			単層培養細胞			凍結融解上清を単層培養細胞に接種し, CPE 観察		
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4	+±	--	--	#####	#####	--	---	---	---	---	---	---
5	++	+-	--	###	#####	--	-+	---	---	#####	---	---
6		+-	--		###	--	###	###	---	---	---	---
7		+	--		###	--			---	---	---	---
8			--			--			---	---	---	---

CPE: +20-30%, ++40-50%, +++60-70%, ####80%以上の細胞に CPE を認める。

斜面寒天: +は培地の赤色(細胞増殖少ない), ±は僅かに赤色を示す。

殖を計ると共に、他方継代毎に単層培養細胞に接種して CPE 発現の有無を観察して増殖状態を比較検討した。

その成績は表1に示した。

即ち斜面寒天培養法で継代したものでは3代までは virus 量 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ 何れも全く CPE の発現を認めなかつたが4代では virus 量 10⁻⁴, 10⁻⁵ 共に各系列共に CPE ###, で virus の増殖を CPE 発現から確認出来たが, 10⁻⁶ では全く CPE 発現を認めなかつた。而も継代8代に至るまで CPE の発現を認めなかつた。尚 CPE が発現する継代の所で斜面寒天培養に於ても細胞の増殖が多少阻止され培地が稍赤色に止つていることの多い点は virus の増殖して来たことを予知するに或る程度役立つものと考えられる。

単層組織培養法で継代したものでは4代まで何れの virus 量を感染させたものも総べて CPE の発現を認めなかつた。5代では 10⁻⁴ で3本の中1本に CPE+ を認め、此の3本の凍結融解上清を接種した単層培養細胞では何れも CPE### を認めた。然れ

ども virus 量 10⁻⁵, 10⁻⁶ では8代に至るまで全く CPE 発現を認めなかつた。

2. 斜面寒天細胞培養及び単層組織培養による継代日数を異にする(7日及び30日)場合の virus 増殖態度の比較

1) 斜面寒天細胞培養による成績

斜面寒天上に細胞集落状に Adv. 12 を 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ virus 量を用いて感染させた細胞を培養し、7日毎に継代した時と30日毎に継代した時の virus 増殖の状態を検べた。

実験成績は7日毎に継代したものでは5代で10⁻⁴, 10⁻⁵, virus 量を用いて感染させたものでは virus の増殖を CPE 発現の上から確認することが出来た。10⁻⁶ では6代で確認した。そして30~35日毎に継代したものでは6代で 10⁻⁴, 10⁻⁵, は CPE 発現を認めた、10⁻⁶ では極めて小数に CPE を認め次代で確認することが出来た。

2) 単層細胞培養による成績

感染 virus 量は 1) 実験と同じ 10⁻⁴, 10⁻⁶ を用い、継代も7日と30~35日で 1) 実験と同様であ

る。

実験成績は7日毎に継代したものでは6代で 10^{-4} , 10^{-5} ではCPEを認めしたが 10^{-6} では6代, 7代でもCPEの発現を認めなかつた。30~35日で継代したのも殆んど同様な成績を示し, 6代で 10^{-4} , 10^{-5} ではCPEを認めしたが, 10^{-6} では6代, 7代でもCPEを認めることが出来なかつた。

III 総括及び考案

Adv. 12 を感染させた HeLa-S₃ 細胞を単層組織培養法と斜面寒天上に細胞集落状に培養する方法で30日毎に継代して virus 増殖を CPE の発現を認めることによつて確かめ, 此の場合感染 virus 量を微量 (10^{-4} , 10^{-5} , $10^{-6} \times \text{TCID}_{50}$) 用いると確認までに数代継代を続けることが必要であつた。斜面寒天継代では virus 量 10^{-4} は4代で, 10^{-5} は5~6代で virus の増殖が確認され, 10^{-6} は8代まで増殖が認められなかつた。之に対して単層培養継代では, virus 量 10^{-4} は5~6代で virus の増殖が確認出来たが 10^{-5} , 10^{-6} は8代継代まで増殖を認めなかつた。即ちこれらの成績から Adv. 12 の微量 virus 材料からの virus 分離には斜面寒天で感染細胞を継代する方が感染細胞を単層培養継代する法よりも有利であると考えられる。之は斜面寒天培養の場合は細胞集落を白金耳で継代されるので増殖しつつある virus の継代時の脱落が少い為ではなからうか, 或は細胞が集落状に増殖しているので virus の増殖によりよい環境となるか, 又新細胞への感染が容易な為かとも推測される。

次に感染細胞を斜面寒天細胞培養及び単層組織培養を行い7日毎に継代したものと, 30~35日毎に継代したものの virus 増殖を CPE で確認し得るま

での継代数を比較して見た成績では斜面寒天培養で7日毎に継代した時と30~35日毎に継代した時とで大差はないが前者は5代で後者は6代で virus 量 10^{-4} , 10^{-5} で virus の増殖を確認し, 10^{-6} でも同じ様な関係が見られた。即ち virus の増殖確認までの日数は7日毎に継代した場合が著しく短い。単層組織培養した時は7日毎に継代した時と30~35日毎に継代した時も差なく 10^{-4} , 10^{-5} 何れも6代で増殖を認めた。即ち此の場合も virus の増殖を確認するまでの日数は7日毎に継代したものは著しく短い。 10^{-6} では両培養共に7代までの間では増殖を確認出来なかつた。

結 論

Adv. 12 型の微量を感染させた HeLa-S₃ 細胞を斜面寒天上に細胞集落状に継代した場合, 又感染細胞を単層培養継代した場合の virus の増殖状態を比較検討した。

1. 微量 virus 感染細胞から virus の増殖を CPE で確める場合, 斜面寒天培養, 単層培養の両操作の中, 前者が少々良好な成績が得られた。而し両操作共に virus の増殖を確認するには数代 (4~5代) の継代が必要であつた。

2. 上記と同じ操作で行はれた実験において, 斜面寒天培養で継代を7日毎, 30~35日に行つた場合, 共に Virus 増殖の確認までに数代 (5~6代) の継代が必要であつた。又単層培養凍結融解継代においても略同様の成績が見られた。

稿を終るにあたり, 終始御指導並びに御校閲を賜つた恩師, 村上栄教授に謹んで謝意を捧げます。

文 献

- 1) 藤田・俵・村上: 日本細菌学会中国・四国支部総会演題抄録集, 1964年11月
- 2) Puck T. T., & Marcus P. I.: Proc. Nat. Acad. Sci. 41, 432, 1955
- 3) Goto M. & Sato H.: Sci. Rep. Rev. Inst. Tohoku Univ. 12, 319, 1965
- 4) Macpherson I.: Virology 23, 291, 1964

Studies on Adenovirus Type 12

2. On the proliferation of the virus in tissue culture by slant agar and monolayer methods

By

Kozo FUJITA

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

ABSTRACT

In the present experiments minute quantities (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} TCID₅₀) of adenovirus type 12 were used for the infection of culture cells, HeLa-S. After infecting the cells with virus, the tissue cultures were conducted by the slant agar and monolayer methods, to compare the degree of virus proliferation for successive generations in each experimental group. The results of the study are summarized as follows.

1. When HeLa S₃ cells were infected with minute quantities of virus for successive generations (30 days each generation), the virus proliferation, as determined by cytopathic effect (CPE), was better in the case of the slant agar culture than in the monolayer culture.

2. Similar cultures were conducted by two methods in which the culture period was changed to 7 days or 30-35 days for each generation. As a result it was found that the proliferation of the virus could be detected only at the fifth or sixth generation in all the experimental groups.

Both the slant agar culture and the monolayer culture of infected HeLa-S₃ cells gave the results similar to those obtained in the successive cultures conducted by the freezingthawing method (reported in Part 1).
