

Adenovirus 12型に関する研究

第 III 編

年令別ハムスターに於ける Adenovirus 12型の増殖性について

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

Adenovirus 12型を接種したハムスターの新生仔に高率に腫瘍を発生せしめる事が発見され¹⁾²⁾³⁾⁶⁾, 其後 Huebner 等⁴⁾ に依つて Adenovirus 18型が, Girardi⁵⁾ 等によつて7型がそれぞれ低率ではあるが動物に発癌性を有するという事実が発表され最近では3型か, 又 pereira 等⁷⁾ によつて31型もハムスターに低率に腫瘍を作る事が明らかにされており, Adenovirus の発癌に対する今後の進展はさらに興味あるものとなつている. 此の様子 virus 接種に依り, 全く新しい腫瘍が生じた場合, その virus に依る発癌機序解明の一端として, 発癌にいたる接種 virus の消長を追求することは他の事項解明の一端をなしていると思われる.

それで著者は新生仔ハムスター, 生後14日, 45日, 65日のハムスターに本 virus を接種した後, 経目的に動物を殺し臓器内の virus の消長を斜面寒天を用いて細胞集落培養法⁸⁾ を行つて検討した.

I 実験材料及び実験方法

Virus 材料: 5%牛血清添加 YLE 液を維持液として HeLa-S₃ 細胞に Adenovirus 12型 (Adv. 12, Huie株) を接種培養し, 15回凍結融解したものを使用した.

動物: 生後24時間以内の市販シリアンハムスター新生仔, 生後14日, 生後45日, 生後65日の同じ系統のシリアンハムスターを用いた. 飼育にはアデノウイルスの感染をふせぎ, 固型飼料 (市販, 実験動物用) と水を与えた.

接種方法: 新生仔ハムスターと生後14日ハムスターは Virus 量 3×100 TCID₅₀/0.2ml, 生後65日のものは 6×100 TCID₅₀/0.2ml 宛, 腹腔内へそれぞ

れ2~3匹宛に接種した.

virus 検出に対する準備: 動物はエーテル麻酔のもとにヨーチンアルコールでふいてかわかし, 心臓穿刺で脱血して解剖し, 肺, 脾, 腎, 肝, 子宮精系周囲の骨盤組織部と腸間膜の各々1部を無菌的に切除し, 切除各臓器は PBS (phosphate-buffered-saline) でよく洗つた後, PBS 1ml を混入してホモゲナイザーで2,000 r. p. m 2分間で乳剤にした.

virus 検出方法: 乳剤臓器は寒天斜面培養法⁸⁾ により virus の検出を行つた. 即ち大型角瓶に培養された HeLa-S₃細胞をトリプシンで分散, 遠沈 (1,000 r. p. m 1分間) 後上清をすて, PBS で細胞を再び分散沈澱し, 遠心沈澱後 PBS で細胞を浮遊し約 6×10^5 細胞数を取り前記臓器乳剤上清部を 0.2ml 取つて混和し, 2時間後遠心して沈澱を2エーゼずつ6ヶ所に寒天斜面上に細胞集落を作り, 各臓器に2本宛培養した. (写真1) 培養法は 37°C で静置し, 1週間を1代として次代新寒天斜面に継代し, 3代目より2本の培地からそれぞれ半分ずつ細胞集落をかき取り, 1本ずつの新寒天斜面培地に継代し, 次代継代とし, 残りの細胞集落を2本からかき取り混じて5%牛血清添加 YLE 0.5ml に浮遊, 凍結融解15回を行い軽く遠心し, その上清全部を新しく培養しておいた中型試験管 HeLa-S₃細胞組織培養 (4~5日目のもの) の培養液をすてた後, 注入し2時間後5%牛血清添加 YLE 1.5ml を入れて CPE の発現を2週間観察した. 同様の操作で継代を続けた.

実験成績

1. 新生仔ハムスターに Adenovirus 12を接種した成績.

新生仔に Adenovirus を接種し, 24時間後に殺し

て腎、肝、腹膜、肺中の virus を検べたものでは、斜面寒天細胞集落培養の3～4代で単層培養細胞に接種し、CPE 出現の観察から virus の増殖を確認することが出来た。

Virus 接種3日後の動物臓器からは、総べて3代で Virus の増殖を確認し、7日後の動物臓器からも3～4代で、又11日後の動物臓器からも4～6代で Virus の増殖を認めた。18日、24日、30日後の動物臓器からは継代6代の間には virus の増殖を認めなかつた。virus 接種1日後の動物の中、肺の一例が3代で100% CPE を認めたが、他は4～6代で100% CPE を認めたのに対し、3日後の臓器では総べて3代で100% CPE を示し、7日後の動物では3日後のものより稍、virus 量少く、更に11日後の動物では6代で始めて virus を認めたことから、明らかに virus 量がより減少しているものを考えられる。即ち virus 接種後3日目頃に virus 量が最高に達するものと推測される。

表1 新生仔に Virus を接種した成績

臓器	動物別	1日	3日	7日	11日	18日	24日	30日
腎	A	4(3)	3	4(3)	6(4)	—	—	—
	B	4(3)	3	4(3)	6+	—	—	—
肝	A	6(4)	3	4(3)	6+	—	—	—
	B	6(4)	3	4(3)	6+	—	—	—
腹膜	A	4	3	3	6(4)	—	—	—
	B	4	3	3	6+	—	—	—
肺	A	4	3	4(3)	6(4)	—	—	—
	B	3	3	4(3)	6+	—	—	—

表の記入法は100% CPEを示した代をアラビア数字で示し、()内の数字は50% CPEを示した代を示した。6～7代の終末で100% CPEを示さなかつたものはその%で示した。

— CPEの変化を認めないもの

+ 20%, ++40%, +++60%, ++++80%, +++++100%の CPE の変化を認めたもの。

2. 生後14日目ハムスターに Adenovirus 12 を接種した成績

生後14日目のハムスターに Adenovirus 12 を接種した動物では接種後1日目の臓器から4～5代で細胞の50%以上に CPE を認め、接種後3日の動物では4～6代で細胞の20%以上に CPE を認めた

が、臓器内の virus 量は1日後の動物に比べて少々少いと推測される。而して7日、11日、18日、24日、30日後の動物からは細胞集落継代6代までの間では virus の証明は出来なかつた。

表2 生後14日目に Virus を接種した成績

臓器	動物別	1日	3日	7日	11日	18日	24日	30日
腎	A	6(5)	6+	—	—	—	—	—
	B	6(5)	6+	—	—	—	—	—
肝	A	6(4)	6+	—	—	—	—	—
	B	6(4)	6+	—	—	—	—	—
腹膜	A	5(4)	6(4)	—	—	—	—	—
	B	5(4)	6+	—	—	—	—	—
肺	A	6(4)	6(4)	—	—	—	—	—
	B	6(4)	6+	—	—	—	—	—

3. 生後45日及び65日目のハムスターに Adenovirus 12 を接種した成績

生後45日、65日目の動物に virus を接種したものでは、接種後1日目のもの、その他のものも総べて virus の検出は継代6代までの間では不成功に終わった。

総括及び考案

著者は第1及び2編に於ける研究成績から継代も比較的簡単で、而も好成績が得られることを知つたので、斜面寒天細胞集落培養法を用いて Adenovirus 12 接種動物臓器から経日的に virus の分離培養を行つたのであるが、新生仔に接種したものでは、1日、3日、7日、11日後までの臓器から virus を証明することが出来た。そして臓器内 virus 量の最も多い時期は、接種後1日～7日の間であり、多少 virus は増殖するものと考えられる。そして18日、24日、30日後の動物臓器からは、virus 分離に成功しなかつた。尚30日目に剖検した2匹中2匹に精系周囲の骨盤部に大豆大の腫瘍を認めた。(写真2)

生後14日目の動物に virus を接種したものでは1日及び3日後の臓器から virus を証明することが出来た。そして7日以後の臓器からは virus の分離は不成功に終わった。尚30日目に剖検した動物には腫瘍の発生は認めなかつた。

矢部等³⁾の行つた年令別ハムスターに於ける腫瘍発生率を見ると生後5日のハムスターに virus を接

種したものでは 5/7, 8 日のものでは 2/9, 14 日のものでは 1/8 に腫瘍の発生を認め、21 日以後のものでは全く発生を認めなかつた。著者の実験では 14 日目の動物では virus 接種後、3 日間は少くとも体内に virus の存在を確認され、それ以上を経過した動物からは virus を証明出来なかつたことから腫瘍の発生の為には virus の感染の成立が必要であらうと考えられる、

結 論

年令別ハムスターに Adenovirus 12 を接種し経日に殺して各種の臓器から斜面寒天上細胞集落培養法を用い virus 分離を行い次の成績を得た。

1. 新生仔に virus を接種したものは、接種後

11 日までの臓器から virus を分離することが出来た、そして臓器内 virus 量の最も多い時期は接種後 1 ~ 7 日の間であり、多少 virus の増殖を来す。

2. 生後 14 日目の動物では virus を接種した後 3 日までの臓器から virus を分離することが出来た。

3. 生後 45 日、65 日目の動物では virus 接種後 24 時間内に生 virus は消失した。

4. 新生仔に virus を接種したものでは 30 日後に剖検した時腫瘍の発生を認めたが、生後 14 日以上経つて virus を接種したものでは之を認めなかつた。

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

文 献

- 1) Trentin J. J., Yabe Y., Taylor G.: Science 137, 835, 1962
- 2) Yabe Y., Trentin J. J., & Taylor G.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111, 343, 1962
- 3) Yabe Y.: 最新医学. 第 18 卷, 第 3 号, 1963
- 4) Huebner R. T., Rowe W. P. & Lone W. T.: Proc. nat. Acad. Sci. 48, 2051, 1962
- 5) Girardi A. T., Hilleman M. R., & Zwichey R. E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115, 1141, 1964
- 6) 医学のあゆみ: 55, No. 4, 1965
- 7) Pereira: Lancet. 7375, 21, 1965
- 8) 日本細菌学会中四国支部会, 1959 年発表
- 9) Yabe Y., Trentin J. J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111, 343, 1962
- 10) Yabe Y., Samper L., Taylor G., Trentin J. J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113, 221, 1963
- 11) Betts A. O., Tenningo. A. R., Lamont D. H. & Page Z.: Natures 193, 1962
- 12) Pereira H. G.: Natures 180, 615, 1957
- 13) Flening S. K.: J. Am. Vent. Med. Assoc. 136, 481, 1960
- 14) Pereira H. G., Allison A. C., & Niren S. F.: Nature 196, 244, 1962
- 15) 小川勝士等: 医学のあゆみ, 53, 11, 1965

Studies on Adenovirus Type 12

3. Proliferation capacity of adenovirus 12 in hamsters of different age

By

Kozo FUJITA

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

ABSTRACT

Since the discovery that adenovirus type 12 inoculated into newborn hamsters develop tumor in a high percentage of the animals, other types 18, 7 and 31 were also found to induce tumors to a lesser extent. In the elucidation of the mechanism of carcinogenesis due to virus the study of changes in virus growth appears to be most important. For this reason, adenovirus type 12 was inoculated to hamsters ranging in age from newborn to 14, 45 and 65 days old. These animals were sacrificed at different time intervals after the inoculation, and the kidney, liver, peritoneum and lung were removed, and examined for virus. For the detection of virus in these organs, the method of s'ant agar culture was employed as it was found to be simple and easy to manipulated, as reported previously.

As a result it was found that:

1. In the inoculation of this virus to newborn hamsters, the virus could be isolated from various organs up to 11 days after the inoculation. In this instance, the virus was found to be most active in the organs 1-7 days after the inoculation, indicating some proliferation of the virus.
 2. With the hamsters 14 days old, it was possible to isolate the virus for 3 days after the inoculation.
 3. In the case of animals 45 and 65 days old, the virus disappeared within 24 days of the inoculation.
 4. In the inoculation of the virus to newborns, the tumor growth was noted at autopsy 30 days later, while no tumor could be observed in those animals over 14 days old.
-

藤田論文附図

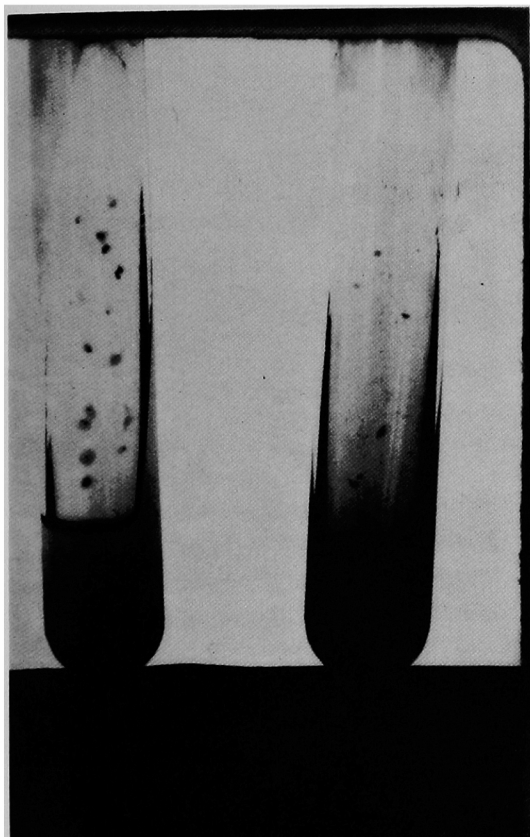


写真 1

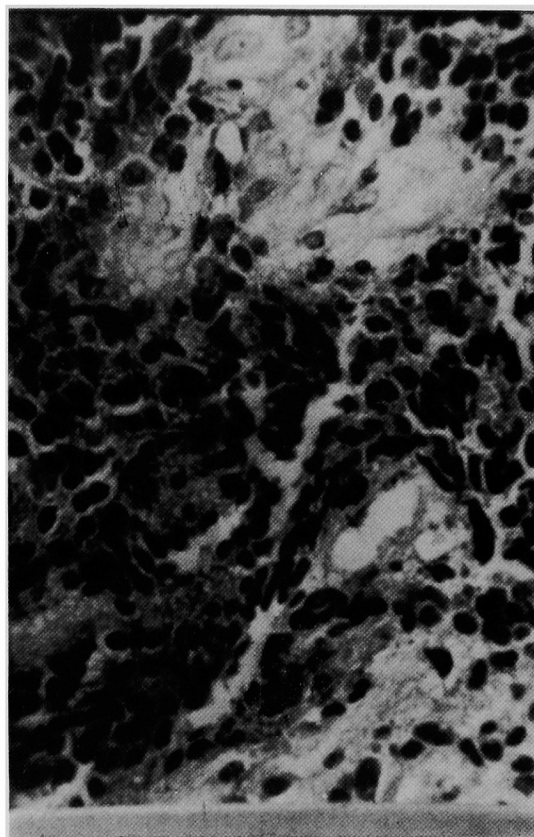


写真 2