

組織培養による Coxsackie B₅ virus に関する研究

第 2 編

犬腎臓細胞で得られた Plaque mutant

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

ウイルスの変異現象に関しては既に早くより注目され、変異に就いての諸条件若しくは種々の因子に対する論議が検討された。又実用的な方面では病原性の変異が研究せられ、今日の生毒ワクチンの基礎が拓かれた。而して乍ら之等の変異に関する研究を見るに、従来行なわれた方法は動物通過により得られた所謂経験的基礎に立つて得られたもので、変異の原理、条件、若しくは変異株出現の過程の詳細な追跡に関しては明らかにされなかつた。そのために自然界におけるウイルスの変異機構は殆ど不明であり、極めて単純なウイルスを用いての実験的な基礎研究で得られた知識よりの類推であつて、明瞭な、而も確実な方法が確立されていなかつたと判断されるのである。

その後ウイルス学の著しい進歩に伴ない、ウイルスを構成するウイルス粒子集団を、夫々のウイルス粒子に就いて詳細に検討する方法に始まり、各種のウイルスに就いて論議されるに至つた。即ちウイルス粒子の集団は、宿主から宿主への感染経過の内に変異個体を生ずる。これを新らしい宿主例えば組織培養による(細胞系)に接種した場合、細胞に定着増殖しないが、その内の一部の粒子が定着増殖するとすれば、新宿主に適応した変異ウイルスの子孫からなるウイルス粒子の集団だけになるか、更に数種の変異株を生ずるか、いづれにしても変異ウイルスを得られる訳で、その判定には、中和試験¹⁾²⁾³⁾⁴⁾ plaque Assay⁵⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾ が用いられている。就中 Enterovirus の領域では、Coxsackie B₄¹²⁾ ECHO 6¹³⁾ の変異が注目された。

著者は Coxsackie B₅ を用い、CS 細胞に対する感受性に就いて検討中、偶々 plaque Assay によりて、

二種の変異株を得たので、その性状を詳細に吟味したので茲に大要を報告する。

実験材料及び方法

ウイルス：既に第 1 編で著者の用いた Coxsackie B₅ を、CS 細胞に累代 20 代以上を経過したもので、TCID₅₀ は 10^{6.0} を示す。極めて良く CS 細胞に馴化し、而も安定したものである。

実験に用いるには、CS 細胞に良く増殖した Coxsackie B₅ を集め、pool した後、凍結融解を再三反覆して行ない、1,500 r. p. m. 15Min 遠心した上清を採取ウイルス原液として用い、増殖培地に接種した。増殖用培地としては 20% 牛血清加 M-H 液維持培地には 5% 小牛血清加 M. 199 液を用いた。

組織培養：既に第 1 編の記載したと同様である。只本編では Plaque Assay を行なつた関係で試験管内培養と小型角瓶 (10×5×5 cm) を併用した。試験管培養での細胞数は概ね 10⁶/ml を限度とし、小型角瓶では 5×10⁶/bottle を用いた。

ウイルスの感染価測定：CS 細胞にウイルス感染後一定時間をおき、得た感染細胞を集め、凍結融解によりウイルスの游出に努め、3~4本の試験管の内容を pool した後、1,500 r. p. m. 5 Min 遠心上清をウイルス原液とした。次で維持培地を用い、ウイルス原液の 10 倍階段稀釈の系列を作り、各稀釈毎に、0.1 ml 宛を 3 本の試験管内培養細胞に接種して 37°C で静置培養した。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 で表示し、最後の判読は 7 日後の C. P. E. によつた。

plaque Assay : Plaque の手技は Hsiung and Melnick (1955)¹¹⁾ の方法に倣つた。即ち前記小型角瓶に充分に増殖した CS 細胞の Monolayer を、

予め温めた PBS で再三洗滌し, Coxsackie B₅ の各稀釈液 0.2 ml をそれぞれに接種した。37°C で 1 時間吸着せしめたる後にウイルス液を捨て去り, verlay を 4.0 ml 宛に注加した。Overlay に用いる培養液の組成は次の通りである。

A. Neutral Red (1 : 100)	0.5 ml
dist. water	58.0 ml
Earle's 10×Salt Solution	18.0 ml
7.5% NaHCO ₃	5.4 ml
5.6% bovine serum albumin (Armor)	5.4 ml
Antibiotics	1.2 ml
B. Agar (special Agar-Noble Difco)	1.8 g
dist. water	90.0 ml

A 液中 Neutral Red を添加した dis. water と, B 液は Autoclave で 10 lbs. 10 Min 滅菌し, A 液の他の組成は予め Seitz 濾過滅菌しておき, Neutral Red 液を冷却した後添加する。A 液は Overlay 10 Min, 前に 36°C, B 液は滅菌後直ちに 45°C に保つ。

而してこの手技を行なう間, ウイルスの細胞に吸着せしめるには 15~20 min 毎に bottle を動揺して充分に吸着を行なう。その上で予め保温しておいた Medium を用いて被覆し, 寒天の固るのを待ち, 丁寧に bottle を逆転して 37°C で培養する。培養後 2~3 日目で plaque は認められる程になり, 4 日でその数は殆んど一定となつた。

増殖実験実験方法は第 1 編の記載と同様である。この実験では, 比較的大量の細胞にウイルスを吸着増殖せしめて, 吸着と増殖試験はそれぞれ同一の条件で行なつた。

a) 吸着実験細胞数は $5 \times 10^{6.0}$ 程度を用い小型培養瓶により培養した。接種ウイルスは 10 倍稀釈 ($TCID_{50} 10^{6.0}/ml$) を 0.5 ml 宛接種感染を行ない, その後液相と細胞層を分離, 細胞層は後結融解を再三反覆して実施して後に, それぞれに感染価を測定し, ウイルスの量的変化を知つた。

b) 増殖実験, 吸着実験と同条件で行ない, 経時的に取り出した液相と細胞層をそれぞれに処理して, 細胞内 (Cell Associated) と細胞外 (Release) に於けるウイルスの分布及び消長を確かめた。

家兔免疫血清の調製: CS 細胞に充分増殖した Coxsackie B₅ を集め, pool した後, 凍結融解を再三実施してウイルスを游出せしめ, 遠心 1,500 r. p. m. 10 Min. で上清を採取, 3 kg の家兔を用意しおき耳

静脈内に 0.2 ml より初めて 5 日間隔 10 数回接種し, 最後の注射より 7 日後に心臓穿刺により採血, 速かに血清を分離して -25°C に凍結保存し, 用に応じて取り出して用いた。

中和試験: 予め PBS を用いて家兔血清を 10× 階段稀釈を行なつた系列を作り, それぞれの稀釈液と, ウイルスの 100 $TCID_{50}/ml$ を同量混和, 時々振盪混和しながら 37°C 1 時間保ち, 維持培地に移した細胞培養管 3 本宛に 0.1 ml 接種し, あと毎日取出して中和の有無を定めた。判定には 7 日後の C. P. E. の出現によつた。抗体力価は $TCID_{50}$ で算出された。

実 験 成 績

1. 二種の Virus particles の分離: Coxsackie B₅ を CS 細胞に累代培養を継続している間 plaque Assay を試みた結果, 凡そ 10^5 PFU/ml であつたが, その内に二種類の Plaque の混在を認めた。大部分の plaque は Diameter 1~2mm の大きさを示すが, 時に 6~9 mm に達する plaque の出現があつた。これ等の plaque を詳細に検討した結果, 小型 plaque の形状は一般に不規則で, 濁濁を示しているが, 大型の plaque は概ね円型で, 小型と比較して形状は一般に整つた形を保有している場合が多く, 濁濁の程度も少ない。これ等の異なつた形で出現する二種の plaque より, それぞれに Clone を得, CS 細胞に 3 回以上累代を続け, 完全に Clone 化されたと推測された時期から実験を開始した。

実験に当りては, 小型 plaque より得たものを P_s, 大型 plaque より得たものを P_l と略記した。

2. P_s 及び P_l Virus particle & の培養性状

a) P_s の培養所見: CS 細胞を用いて, 小型 plaque より分離累代するに初代では, C. P. E. の高度なる発現に約 5 日を要したが, 次代より殆んど 3 日で著明なる C. P. E. の発現が認められ, 感染細胞は, 管壁より完全に剝離脱落するに至る。

この所見は Coxsackie B₅ の原株の C. P. E. の発来と全く同様である。その後の累代で感染価を測定した結果 $TCID_{50} 10^{5.5}/ml$ を示したが, 再三の感染価の測定により $TCID_{50} 10^{6.0}/ml$ が平均した価であつた。更に CS 細胞を用いて, 吸着実験及び増殖実験で検討した。

細胞内ウイルス量の消長を増殖曲線で確かめるに, P_s の場合も亦 B₅ 原株と殆んど同様な傾向があつて, 2~4 時間のウイルス量の上昇を認められない時期が観察されたが, その後は急激に増量を示すに至り,

既に6~8時間で最高に達し10^{5.8}/mlに示される。その後10~12時間まで持続することが判明した。

又細胞外游出ウイルスの消長は、8時間後上昇の気配を示し10~12時間で急激である。この事実は、ウイルス感染後8時間で既に感染性新ウイルスの出現があるもので、爾後の増量で明瞭となることが指摘された。P_sの場合ではウイルス増殖の第一周期は8時間であり、あと次の周期の反覆があるものと推測された。この実験では感染ウイルスの量を増し、細胞感染を同時感染する条件においた初期の感染所見を窺ったが、P_sではB₅原株と全く同様な増殖様式が観察された (Fig. I, II)。次にこの形式では、感染ウイルスの多いために、液内放出を阻止することも考慮する必要があるので、ウイルス量を10×希釈0.5 mlと加減して用い確めた。この実験では、未吸着ウイルスを洗滌せぬ場合と、洗滌した場合とに分ち、用いた成績では、それぞれに緩慢な増殖が認められた。即ち前者では感染後1時間でウイルス

Fig I Single-cycle growth curve of P_s Coxsackie B₅ virus in CS cells. (Inoculum dosis. 10^{6.0}/ml)

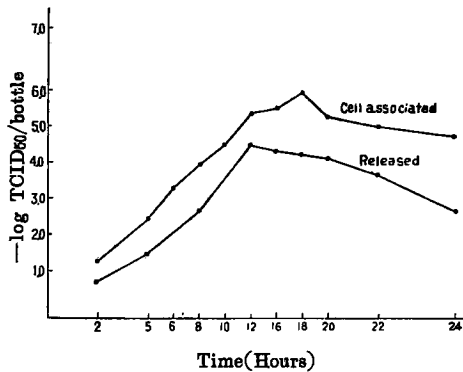
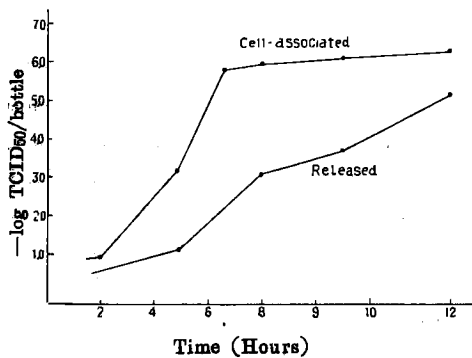
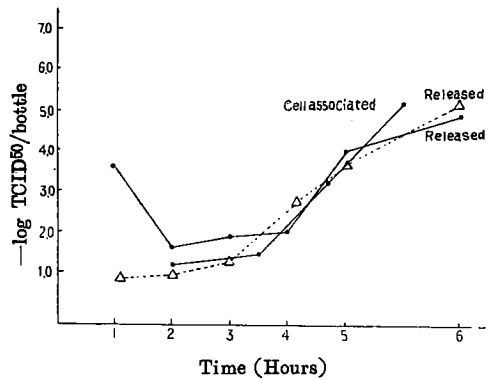


Fig II Growth curve of P_s Coxsackie B₅ virus in CS cells (Inoculum dosis 10^{6.0}/ml 0.5ml)



の未吸着が可成の量 (10^{3.8}) 保有され2時間で下降 (10^{2.0}) この時期は (2~4時間) で、緩い増量を見るが、真の増量は次の時期5~6時間で示される (10^{4.7}) 後者では、ウイルス感染後1~4時間殆んどウイルスの増加が認められないで経過するが、6時間で10^{5.0}と急激な増量がある。この実験でも明らかにP_sの細胞吸着は早い時期に行なわれ、新生ウイルスの液相中に出現するのは感染後約6時間で、この周期が次々と繰返されるものと予想された (Fig. III)。

Fig III Growth curve of P_s Coxsackie B₅ Virus in CS cells (Inoculum dosis 10^{6.0}/ml 0.5ml)



Remarks: ····· Release (no washed)
△-△-△ Release (washed)

b) P_Lの培養所見: CS細胞を用いて、大型のPlaqueより分離累代された。P_sの場合と比較して、CS細胞を用いての累代では、増殖が甚だ不良で、一様のC.P.E.を認めるに至る迄に10数代の累代を必要とした。尚P_Lの場合にはC.P.E.の発現がある場合でも、甚だ明瞭でなく、而も、全細胞に於いて変性が惹起すると云い難い。又累代によつては非常にC.P.E.の発現が弱い場合があつたが、累代を重ねるに従い、漸くTCID₅₀ 10^{5.0}/mlの感染価を証明し得た。しかしこの場合でも、細胞変性の出現時期、細胞変性の程度、管壁よりの細胞脱離の様相等に於いては全く異なる印象を抱かせるものであつた。即ちP_Lの感染価測定を行うに、CS細胞に対するC.P.E.の出現は約4日にして始まり、前述のP_sに認められる明瞭な変性は認められない。

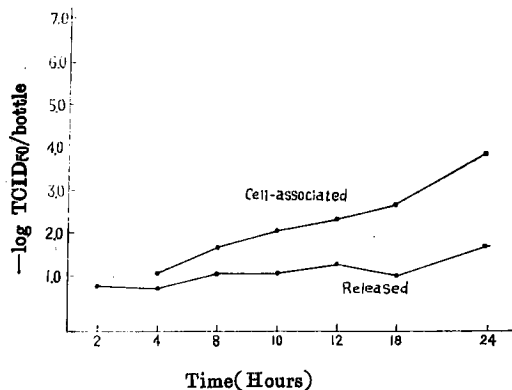
成績の判定は7日にC.P.E.の発現より判断したが、TCID₅₀ 10^{6.0}/mlの価であつた。一般に細胞変性の発来は遅れ、通常4日を要し、弱拡大で観察するに、細胞はそれぞれに類円形若しくは円形に膨大す

るが、Ps の如き細胞質周辺に細胞の破片を附着するための極めて汚く見える如き所見はない。細胞の脱落までに相当の日数を要し、7日以上を経過しても全細胞の脱離はない場合が多い。カバースリップを用いた H-E 染色標本では、先の細胞質内にエオジンに好染する封入体を屢見出し得るが、約4日を経て核に接した部分に円形の小体が出現、而もエオジン濃染部として発現するに尚数日を要するが、これらの所見も Ps の如く明瞭に認められない場合が多い。

封入体と推定される部分と細胞質との間を区劃する空隙部は明瞭に見られない場合が多く、而も一視野で多数認められる部分と全く認められない視野とあり、CS 細胞に定着後のウイルス増殖は甚だ遅延し、而も一様でない。

次に吸着及び増殖実験で検討するに、一般にウイルスの増殖は遅れ、細胞内ウイルスでは4時間後より漸くウイルスの増殖が見られ、爾後緩慢なる経過を辿り、徐々に上昇を示すが、漸く24時間で $10^{3.8}$ 程度の増殖を認めるに過ぎない。細胞外ウイルスでは、同様にウイルスの増殖は遅く10時間で $10^{1.2}$ 、24時間では $10^{1.8}$ と非常に低い増殖を認めるに過ぎない (Fig. IV)。一般に C. P. B. が認められる時期はウイルス接種後4日を要し、尚管壁より全部の細胞の離脱を見るに至らない。これらの事実より、PL では、吸着が遅れ、増殖は著しく遅い事実から、ウイルスの細胞外への遊離が不完全であり、ウイルス産生は甚だ低い点と、細胞変性も亦不確実であることが指摘されるのである。

Fig. VI. Growth curve of PL Coxsackie B₅ virus in CS cells (Inoculum dosis $10^{6.0}$ /ml 0.5ml)



3. 中和による Ps と PL Virus Particles の反応
Coxsackie B₅ Virus 及びその変異株と見做し得る Ps と PL のそれぞれの家兎免疫血清を用いて、B₅ 原株を中心に、Ps, PL の相互の交叉中和反応を行ない、その結果は表示した (Table. I)。これらの

Table I Cross-Neutralization test with Ps and PL Coxsackie B₅ Virus and Corresponding Rabbit Antiserum

Anti-Serum	virus		
	B ₅	Ps	PL
B ₅	2560<	2560<	2560
Ps	160<	2560<	640
PL	640	2560<	640<

中和反応の成績では、先づ B₅ 抗血清に対しては、B₅, Ps, PL のそれぞれの Virus を用いた抗原に良く高度まで反応し、抗体価はそれぞれ2560倍を示す。反之して Ps, PL 抗血清に対しては、抗体価が甚だ低い場合があり、又高い場合があり、一様でない (160~2560倍)。

この事実は B₅ 原株に対する抗血清では、全く完全なる抗体の形成があることが示唆されるが、B₅ 株より出現した Ps~PL のそれぞれの変異株に於いては、対する抗血清に一部の抗体の欠除若くは変化を惹起したものと推測されるのであつて、抗原構造の変化を意味するものと思考された。

総括及び考按

ウイルスの変異現象に就いては、殊にインフルエンザ B ウイルスの流行に際して、抗原構造の異なつた変異ウイルスが得られ、更にウイルス累代により用いる宿主によりても強い変異を示す報告がある。又、各種の諸因子、幾多の諸条件、若しくは環境等の支配を蒙り、それぞれ O-D 変異、P-Q 変異、病原性の変異、抗体による変異等が挙げられ、最近には、plaque-mutant が他のウイルス (脳脊髄炎ウイルス, ECHO-6, Coxsackie B₄) で報告されている。

初代猿腎細胞による累代を行なつた Enterovirus の変異に関しては、既に Coxsackie B₄ の a₁-a₈ の変異, ECHO-6 の m₊-m₋ の変異がそれぞれ報告がなされている。これらの両ウイルスの変異現象についてはそれぞれに共通の類似した性状が認められている。即ち両者ともに、plaque-mutant であること、而もこれらの mutant の間には、培養性状、中和抗体に見られる抗原構造のそれぞれ異なる性格を具備す

るに至っている事実である。自然界に分布していたものが、分離当時に於いて、それぞれに a_i 又は m_+ (若しくは他の原型ウイルス) であつて、MK 細胞の長期の連続した累代により、新宿主細胞に馴化し、漸次 a_s と m の出現があり、爾後 a_i と a_s の混在、又は m_+ と m の混合の儘で累代され、ある時期に於いては a_s と m の virus particles の集団が優勢となり、次第に置換されたとも予想された。この推定は而して a_s と m の出現の正当な理由となる訳でなく、他の幾多の条件も勿論考慮しなくてはならないが、この場合は分離当時に既に混在していたものでなく、MK 細胞累代によるむしろ偶発性のもので、宿主により惹起した mutant と解釈するのが妥当と思惟された。これらの現象が一種の変異と解釈するならば、細胞累代を継続することにより、又逆の変異を惹起する訳であり、環境、宿主、抗体の存在により、幾多の変異現象を出現する理である。更に MK 細胞に於いてのみ斯る変異が認められ、他の細胞系では、この変異が出現するに至っていないこと等未だ論議される迄になつていないが甚だ興味深い問題である。著者は Coxsackie B₅ ウイルスを CS 細胞に累代、主として感染の様相を検討中、偶々発現する plaque の種類に大小の別がある事実注目し、これらの plaque よりそれぞれ二種の Virus particle を分離し累代 Clone 化し得たので、先の報告に倣い、培養及血清学的性状についてそれぞれに検索を行なつた。

著者の得た Coxsackie B₅ 由来の P_s 、及び P_L の二種の Virus particles が、先の報告例と同様なものとすれば、当然 $P_s \rightarrow P_L$ の変異と判断され、而も培養性状は殆んど一致した成績を示すものであるが、多少とも、 P_L の性状に差があり、一様に断定し難い点がある。

先に報告されている Coxsackie B₄ に見られる $a_s \rightarrow a_i$ 変異に於いても、ウイルスの性状は著明に変化し、明らかに $a_s \rightarrow a_i$ の性状は類を異にするかの印象を受けるが、著者の実験でも同様に $P_s \rightarrow P_L$ の性状を区別することが可能であつた。

これらの $P_s \rightarrow P_L$ の変異が他の細胞系でも惹起するか否かを知るために HeLa, FL. 等の細胞を用いて、それぞれに実験を行なつたが、明瞭に認めることは出来なかつた。更にインフルエンザ、ウイルスの変異に倣い、殊に各抗血清の存在のもとに CS 細胞に累代して 5 代に及んだが、これらのそれぞれの性状に変化を認めなかつた。

これらの実験から $P_s \rightarrow P_L$ の変異は plaque-mutant として偶然にも見出されたものであつて Back-mutation の可能性は渺なく、その性状は累代によりても維持され、而も従来の変異株と趣を異にするものとして注目すべきものと思料された。

この変異現象が如何なる原因、若しくは条件のもとに発現するかは不明であるが、自然界に於いても、同様な変異現象も観察され得るかの推測も成立つ訳で、今後の Coxsackie B₅ の研究でも亦注目されるべきものと思料された。

結 論

著者は Coxsackie B₅ Virus の CS 細胞による増殖様式を検討中、偶然にも得られた plaque-mutant に就いて実験を行ない、次の所見を得た。

1) CS 細胞を用いて Coxsackie B₅ Virus を累代培養を行なうに、plaque mutant を得た。而もこの場合に大小二種の plaque が区別され、それぞれに CS 細胞累代により Clone 化することに成功した。

2) Clone 化して得たそれぞれの株の一般性状を検討した結果一応 $P_s \rightarrow P_L$ の変異現象と推測され得る所見を得た。

3) $P_s \rightarrow P_L$ 変異によりても、原株の性状が一応保有されるが、ウイルスの増殖様式、中和試験等により確め得られた性状は変化し、殊に P_L では著しい変異株と化し、而も抗血清の存在でも性状は変化せず、他の細胞株でも同様な変異株の出現は認められぬ。所謂一定の条件が常に必要であるものと推定し得た。

稿を終るに際し、始終御指導と御鞭撻を賜り、且御校閲の勞を辱うした村上栄教授並びに御支援を頂いた藤原博士に深謝する次第である

主 要 文 献

- 1) Wigand R. and Sabin A, B: Federation. proc, 17 538 1958
- 2) Wigand R.: Zentr. Bacteriol, Parasitenk. abt 1. orig 177 504~517. 1960
- 3) Archetti I. and Harsball F. L.: J. Exptl. Med, 92. 441~462. 1950
- 4) Harloe A, and Reenaas R: Acta, pathol, Microbiol, Scand. 46 266~272 1959.
- 5) Hirst, G. K.: J Exptl, Med, 78 407~423 1942.
- 6) Choppin P. W. and Tamm I.: Virology 8 539 ~542 1959.
- 7) Choppin P. W. and Tamm I.: J Exptl, Med, 112. 921~944 1960.
- 8) Karzon D. T. and Barron A. L.: Am, J, Discuses, children 102, 503~505 1961.
- 9) Karzon D. T. polloc K B. F. and Barron A. L.: Virology 9 564~576 1959.
- 10) Magill T. P. and Francis T. JR: Brit, J, Exptl, pathol, 19 273~824 1938.
- 11) Hsiung G. D. and Melnick J. L: Virology 1 533~535 1955.
- 12) Purnell W. Choppin and Hans J. Eggers: Virology 18 470~476 1992.
- 13) Suto T, Karzon D. T. and Russell R. H.: Bacteriol, proc, (SOC, Am, Bacteriologists,) p. 135 1962
- 14) Purnell W. Choppin: Virology 21, 342-352 (1963)

Studies on Coxsackie B₅ Virus by Tissue Cultures
Part 2. On the Plaque Mutants of Coxsackie B₅ Virus Obtained
with Dog Kidney Cells

By

Masatoshi MAEDA

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

Author's Abstract

This paper describes briefly the results of experiments conducted with plaque mutants accidentally obtained in the course of the study of the multiplication pattern of Coxsackie B₅ virus with dog kidney cells (CS cell).

1. In the course of successive cultures carried out by having Coxsackie B₅ virus multiply in CS cells, a plaque mutant was obtained. In this instance, the plaque mutant could be classified into two kinds, one large and the other small one, and it was possible to form other clones by successive inoculation of each plaque to CS cells in cultures.

2. In the observations of the general properties of each strain obtained after clone formation, the findings suggest on the whole a P_S→P_L mutation phenomenon.

3. Even judging from the P_S→P_L mutation phenomenon, properties of Coxsackie B₅ virus a, e fairly well preserved, but the characteristics of the virus as confirmed by experiments dealing with the multiplication pattern of virus and by neutralization tests have revealed some changes. Especially with P_L strain the mutation is firm, suggesting that a certain fixed condition is necessary under which the virus properties remain intact even in the presence of antiserum and similar mutant does not appear in the other cell strains.