

Title	Herpes Simplex Virusの組織培養上実験について
Author(s)	新居, 志郎
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28277
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【43】

氏名・(本籍)	新 居 志 郎 に い し ろう
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 182 号
学位授与の日付	昭 和 36 年 3 月 23 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 病 理 系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	Herpes Simplex Virus の組織培養上実験について
論文審査委員	(主 査) (副 査) 教 授 釜 洞 醇 太 郎 教 授 天 野 恒 久 教 授 奥 野 良 臣

論 文 内 容 の 要 旨

目 的

- 1) ウイルスの増殖に及ぼす virus strain の差異と cell strain の差異
- 2) Herpes simplex virus 感染細胞の形態変化及びウイルス核酸合成のラジオオートグラフィーに依る研究

方 法

○細胞 FL 細胞, L細胞を主として使用

○培養液 1) LE……Earle's solution に0.5%の割にラクトアルブミン水解物を加えたもの

2) YLH…Hanks' solution に0.5%の割にラクトアルブミン水解物, 0.1%の割にイーストエキス含有

FL 細胞培養には LE 90 牛血 10, L細胞培養には YLH 95 牛血 5の割合に混合して培養した。

○ウイルス材料深山株, HF 株を使用, 深山株は一昨年 *Herpes labialis* の患者より分離し, 本ウイルスの諸種生物学的諸性質及び予研吉野氏より分与された HF 株に対する家兔免疫血清との中和実験により Herpes simplex virus と同定し, 深山株と命名した。以後 FL 細胞上にて継代培養 (200ml角瓶 cell count 約 $6 \times 10^6 \sim 10^7$) 40代以上に及ぶ。細胞変性が極大に達せる時の培養液上清の感染価は $10^7 \sim 10^8$ /ml である。

○ラジオオートグラフィー, Specific activity は H^3 -thymidine (4.4C/mM) H^3 -cytidine (1.0C/mM) で LE medium 中に夫々 per ml $1\mu C$ 及び $2\mu C$ に溶存せしめて使用, cover slip 上に殖やした細胞を, Isotope 含有培養液にて適当なる期間培養する。coverslip を引き出し数回塩類溶液にて洗滌の後, 乾燥, メタノール固定, Autoradiographic stripping film AR10 (Kodak) を使用

○核内封入体観察には、主として、ブアン氏固定、ハリスヘマトキシリンエオジン染色を施行
成 績

1) 深山株2種 substrain の分離について

Herpes simplex virus の組織培養上感染細胞の形態変化の一つに巨細胞形成が既に報告され、Scott は去年それが virus の genetic marker となると報じている。

深山株分離当初、巨細胞形成を認めえなかったが、継代を重ねるにつれて、可成りよく見られるに至り Limiting dilution にて細胞融合の烈しいものを繰り返して継代培養の結果、次の二つの substrain を分離することができたのである。即ち巨細胞形成を伴う CPE を示して増殖する strain, G(+) と巨細胞形成を呈することなく細胞の円形化のみの CPE を示す strain, G(-) である。上記2種 strain は Herpes simplex virus HF strain に対する家兔免疫血清によって同様の中和対数を示して中和された。

2) G(+) strain, G(-) strain の増殖曲線

G(+) strain は細胞数 2.35×10^6 のFL細胞 ウイルス量 2×10^7 per 2 ml

G(-) strain は細胞数 3.6×10^6 のFL細胞 ウイルス量 2×10^8 per 2 ml の実験条件で増殖曲線を描く。G(+) は G(-) より per cell に少量のウイルス量で出発したにも拘らず、感染16時間頃より細胞破壊が烈しく cell-associated virus の量も20時間にして低下を示す。

G(-) は、40時間に至るも細胞の円形化を示すのみで破壊せず cell-associated virus は16時間以後も漸次増加を示す。

3) 2種 Substrain の Marker の安定性

FL細胞で分離し、継代して得られた深山株2種の strain の Marker の安定性は、HeLa細胞で保持されたが、L細胞では両 strain とも巨細胞形成を認めることなく、感染して核内封入体を形成するにも拘らず G(+) の Marker は発現されなかった。

4) Radioautography による感染細胞の研究

control として非感染細胞の H^3 -thymidine の incorporation は 2時間の Isotope 含有培地で約40%の細胞に認めることができる。銀粒子の配列は chromatin の網状構造に一致して、核全体に比較的均一に分布している。

感染群は、ウイルスを high multiplicity にて感染せしめその後適当な時期を選んで2~3時間 Isotope 含有 medium で置換した。感染後、4時間~6時間置換した時約95%の細胞に label され、ウイルス感染により核内の DNA 合成が始まっていることが分かる。形態的には、核内に島状、或いは輪状に発生してくることが多い。核小体とは無関係である。輪状構造は核膜に近く、而も一定の距離を有する位置にある。初期に Incorporation の盛んな位置は、初期核内封入体の eosinophilic mass の出現する部位に一致するものと思われる。

5) L細胞上において、深山株を継代したところ FL細胞上におけるより1 Log unit 低値を示した。又L細胞継代ウイルスを、FL細胞、L細胞で、感染価測定をしたところ、L細胞は1 Log unit 低値を示した。

総 括

深山株の2種の substrain はFL細胞上で異った細胞変性効果を示し、又増殖曲線上でも差異を認めた。

同一人体材料に出発せるウイルスの中に、原因は不明であるが遺伝的に異なるものが存在し増殖態度を異にした。又深山株は、FL 細胞上において、L 細胞におけるより良好な増殖を示した。ここにウイルス増殖に及ぼすウイルス側、宿主側の影響を見ることを得る。

Radioautography に依り、ウイルスの増殖の場所を DNA 合成の点から追求した。島状、輪状更に diffuse に Incorporation の部位は拡大する。核内封入体の周辺に存する marginated chromatin に label されることは少い。封入体物質を囲む chromatin に沿う如く銀粒子の配列をみる。このことは Morgan の電顕所見と比較して興味深い。

論文の審査結果の要旨

ウイルス学の研究分野に組織培養技術の導入を見てから、細胞単位でのウイルス感染の研究に飛躍的な発展が招来された。即ち従来の生体での細胞学的考察がより一層明瞭に為されたばかりでなく、更に生体とは無関係に組織培養実験自体からウイルス学上の種々の問題が新たに提起された。ウイルス増殖が細胞内で行われる以上、ウイルスと感染宿主細胞との相互関係によってウイルス増殖態度が異なることは想定され得る所であるが、著者は自ら分離したヘルペスウイルス（深山株）を使用し組織培養実験によって、この点に極めて明確な実験成績を呈出した。

著者は herpes simplex virus 深山株を FL 細胞単層培養上にて継代中、感染細胞の形態変化即ち細胞病原性効果を異にする 2 種類の Substrain を分離することに成功した。感染によって巨細胞形成を惹起する型と、只単に感染細胞の円形化を来す 2 種のものであり、この事は Scott T.F. McNair によって著者と別個に指摘されている。著者はこの 2 種の substrain を使用して増殖実験を行った結果、両者の間に増殖様式に差異を認めた。更にこの 2 種の細胞反応の相違を他の組織培養細胞にて研索した。

次に従来行われている核内封入体の組織化学に依る研究に加えて、 H^3 -thymidine を使用し herpes simplex virus 感染細胞の核内変化について autoradiography により新たな興味ある成績を報告した。

その成果の要点は以下の如くである。

FL 単層培養細胞に深山株二種 substrain の高濃度ウイルスを接種して試みた増殖実験の結果、+GC strain (巨細胞形成を惹起するウイルス) は -GC strain (感染細胞に円形化のみの形態変化をもたらすウイルス) より早期に細胞破壊を起し、その為に細胞側ウイルスの感染価は約 20 時間頃より下降の傾向を示す。一方 -GC strain は 40 時間以上の長期にわたり細胞破壊をみることなく、ウイルス増殖は遷延して持続される。

この 2 種の型の細胞反応は FL 細胞及び HeLa 細胞で保持されたが、L 細胞は +GC strain を接種しても只単に細胞の円形化を伴い後に破壊に陥るのみで巨細胞は形成されない。

又感染 L 細胞のウイルス産生量は、FL 細胞より 1~1.5 log unit/ml 低値を示す。又細胞破壊は FL 細胞より速やかに起る。

Radioautography により感染初期に核内に島状或いは輪状に H^3 -thymidine の Incorporation のあることが認められた。感染後期に短時間 H^3 -thymidine 含有培地で培養する時、核の既存の DNA 成分を

含有している筈の condensed chromatin 或いは marginated chromatin に isotope は label されず、fine reticular fibre に関連を有する位置に label された。

以上著者の実験の中、細胞反応を異にするウイルスの研究は、動物ウイルスの遺伝学的研究に一つの手掛りを得たものと考えられる。Autoradiography の所見は Morgan の電子顕微鏡所見 Lebrun の蛍光抗体法による研究、Crouse の組織化学染色所見と共に、herpes simplex virus の感染核内の変化を追求した意義深い研究業績であり、感染の時間的推移と共に H³-thymidine の incorporation の部位の変化する過程を精細に報告した点で、他に例を見ない研究報告と思われる。