

雑種サル肝細胞株によるヒト糞便A型肝炎 ウイルスの分離と増殖

新潟大学医学部第三内科 (主任: 市田文弘教授)

原 秀 範

Primary Isolation and Propagation of Hepatitis A Virus
in Hybrid Liver Cell Line.

Hidenori HARA

*The Third Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Fumihiko ICHIDA)*

S.la/Ve-1 cells, a hybrid cell line between marmoset liver and Vero cells, have been reported to be highly susceptible to HAV (hepatitis A virus). To examine the susceptibility of the cell line to field HAVs and compare the susceptibility with that of other monkey kidney derived cell lines, S.la/Ve-1 cells, together with BSC-1, LLC-MK₂, BGM and Vero cells, were inoculated with 11 human fecal HAV specimens (5 positive and 6 negative for HAV Ag) and development of the viral antigen in cells was monitored by radioimmunoassay (RIA) and immune fluorescent antibody technique (IFA). In addition, virus growth experiments were conducted with a tissue culture-adapted HAV to assess the kinetics of development of virus infectivity in these various cell lines. Results obtained are summarized below. 1) Of the 11 fecal specimens, 7 (5 positive and 2 negative for HAV Ag) induced significant elevation of the virus Ag activity in S.la/Ve-1 cells. 2) Of the 7 HAV isolates, 6 were confirmed to be transmissible to the fresh S.la/Ve-1 cells by blind passage. 3) Of the 4 monkey kidney-derived cell lines, BSC-1 and LLC-MK₂ cells were inoculated with 6 fecal specimens (3 positive and 3 negative for HAV Ag), and BGM and Vero cells were inoculated with 4 fecal specimens (2 positive and 2 negative for HAV Ag), resulting in a single isolation of HAV by BGM cells from a HAV Ag-positive specimens. 4) In the subcultures of persistently HAV-infected S.la/Ve-1 cells, a plateau level of HAV Ag activities was reached by T.T. isolate on the 1st passage and by Ku-1~4 isolates on the 10th passage, indicating that the kinetics of cell culture adaptation of HAV was distinctive by isolates. 5) In the growth experiment of T.T. isolate in various

Reprint requests to: Hidenori HARA,
The Third Department of Internal
Medicine, Niigata University School
of Medicine Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部第三内科学教室
原 秀 範

cell lines, plateau level titers of virus infectivity were attained at 8 days post infection, when the virus infectivity titers were $10^{7.5-8.25}$ TCID₅₀/ml in S.la/Ve-1, BGM and BSC-1 cells and $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml in LLC-MK₂ and Vero cells. 6) In S.la/Ve-1 cells, the growth kinetics of cell culture-adapted T.T. isolate were accelerated in the subculture passage of persistently infected cells giving a plateau level infectivity ($10^{7.5}$ TCID₅₀/ml) at 6 days post infection, as compared with that in the inoculation passage of the virus, where the plateau level infectivity resulted at 8 days post infection. Taken these findings together, S.la/Ve-1 cell line, in comparison with other conventional cell lines established from monkey kidney cells, was considered to be highly susceptible to the human fecal HAVs and to be quite useful for the virus isolation from clinical specimens. In addition, the cell line was revealed to be advantageous for obtaining lots of virus and viral antigens in persistent infection.

Key word: hepatitis A virus, hybrid liver cell line, primary isolation of virus, virus growth, monkey kidney-derived cell lines.

A 型肝炎ウイルス, 雑種サル肝細胞株, ウイルス直接分離, ウイルス増殖, サル腎由来細胞株.

A型肝炎ウイルス (Hepatitis A virus: HAV) に関しては, 1940年代後半より培養細胞を用いウイルス分離の試みがなされているが¹⁾, 当初ウイルス増殖追跡の手法が確立されておらず信頼性に欠けるところがあった. 1967年 Deinhardt 等は患者糞便を接種材料とし, マーモセットにおける HAV 感染の成立を報告し²⁾, 以降マーモセットおよびチンパンジー等動物固体を用いた HAV 感染実験がなされるようになった^{3) 4) 5) 6) 7) 8)}. 一方, 1973年 Feinstone らはA型肝炎患者の糞便中に免疫電顕法で HAV 粒子を確認し⁹⁾, 又, 感染固体由来 HAV を材料として同ウイルス抗原, 抗体検出系が開発され, このことを背景として, 1979年 Provost と Hilleman はマーモセット肝由来 HAV を接種材料とし, 同肝初代培養細胞およびアカゲザル胎児腎培養細胞における HAV の明確な増殖を報告した¹⁰⁾. 以降, サル継代ウイルスを出発材料とする各種培養細胞での HAV 増殖が報告されている^{11) 12) 13) 14)}. さらに1979年 Frösner 等はヒト肝癌細胞株を用いヒト糞便材料より HAV の直接分離に初めて成功した¹⁵⁾. 次いで1980年 Flehmig 等はアカゲザル胎児腎低継代歴培養細胞により¹⁶⁾, 又, 1981年 Daemar 等はアフリカミドリザル腎初代培養細胞を用い同様に HAV の直接分離を報告している¹⁷⁾. しかし, サル固体はその繁殖, 飼育が特殊な施設に限られ, 近年入手が困難となっている. 又, サル腎初代培養細胞には, しばしば宿主動物由来ウイルスが潜在, 培養期間に細胞

変性を惹起する^{10) 11) 13) 17) 27)}. 樹立サル腎細胞株ではウイルス潜在の可能性は少ないが HAV 感受性が初代培養細胞に比べて劣り^{12) 13) 14) 16) 18) 19) 20) 21) 22)}, 糞便材料からの直接分離には不適當である. 以上の理由で現時点でも HAV に感受性高く, 分離効率に優れた培養細胞株の樹立が望まれている.

1987年芦田はマーモセット (*Saguinus labiatus*) 肝細胞と Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎由来樹立細胞株) とをポリエチレングリコール法で融合, 試験管内で継代可能な雑種サル肝細胞株を得, 当該細胞株が HAV に高度に感受性であることを報告した²³⁾. 著者は, 同雑種サル肝細胞株と各種の既存サル腎由来樹立細胞株とを用い, ヒト便 HAV の直接分離効率, 並びに培養細胞馴化 HAV の増殖動態について比較, 雑種サル肝細胞における安定したウイルス増殖を認めた. 本稿では, 現在までに得られた実験結果を述べるとともに, 試験管内培養細胞における HAV 感受性の特性について考察を加える.

材料と方法

1) 糞便検体

Table 1 に示すA型肝炎患者由来の糞便11検体を検索対象とした. その内訳は, 1978年京都市内某施設におけるA型肝炎集団発生に際し, 潜伏期間中に採取し得た2検体 (T.T., Y.T.), 1983年新潟市に於ける家族内

Table 1 Characterization of Fecal Specimens

Specimens	Type of incidence	Location	Year	RIA titer (cpm) of HAV Ag ^{a)}
T. T. Y. T.	Epidemic	Kyoto	1978	11,356 11,446
K-5 K-9 K-10 K-11	Familial	Niigata	1983	12,816 193 391 241
Ku-1 Ku-2 Ku-3 Ku-4	Sporadic	Kurume	1986 1984 1985 1979	247 135 8,518 11,652
N871	Sporadic	Niigata	1987	327

a) HAV Ag activities (cpm) with a cut-off value of 473.

感染例で潜伏期間中に採取し得た4検体 (K-5, K-9, K-10, K-11), 1979~1986年筑後地方における散发例で久留米大学第二内科由来の4検体 (Ku-1~4), および1987年新潟県白根市における散发例で肝炎発症2週後に採取し得た1検体 (N871) である。京都市検体は0.01M トリスー塩酸緩衝液 (Tris-HCl buffered saline: TBS) pH7.5 に, その他の検体は0.15M リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline: PBS) pH7.2 に5~10%に磨砕, 浮遊, 使用時まで-70℃で凍結保存した。

2) 細胞および培養液

使用株化細胞5種を **Table 2** に示す。S.la/Ve-1 細胞はムネアカタマリン (*Saguinus labiatus*) 肝細胞と8-アザグアニン耐性 Vero 細胞との融合雑種細胞株で, 細胞融合後40代以上継代したものである。BSC-1 細胞はアフリカミドリザル腎 (African green monkey kidney: AGMK) 由来細胞株, LLC-MK₂ 細胞はアカゲザル腎 (Rhesus monkey kidney) 由来細胞株, BGM 細胞はバッファローミドリザル腎 (Buffalo green monkey kidney) 由来細胞株で, ともに大日本製薬社 (大阪) より入手した。Vero 細胞は当研究室で準備した8-アザグアニン耐性株で, クローニング後52代継代したものである。細胞培養液はペニシリンGカリウム (200u/ml; 万有製薬社, 東京), ストレプトマイシン (200µg/ml; 明治製薬社, 東京), リンコマイシン (60µg/ml; 日本アップジョン社, 東京) を含む D-MEM (Dulbecco-modified minimum essential medium of Eagle; ニッスイ社, 東京) を基本とし, 10%および1%に牛胎児血清 (FCS;

Table 2 Cell Lines

Cell	Origin
S.la/Ve-1	Hybrid cell between marmoset liver and Vero cells
BSC-1	African green monkey kidney
LLC-MK ₂	Rhesus monkey kidney
BGM	Buffalo green monkey kidney
Vero ^{a)}	African green monkey kidney

a) Selected to grow in the presence of 8-Azaguanine.

GIBCO 社 U.S.A.) を添加したものをそれぞれ増殖用および維持用培養液として使用した。

3) 接種試料の調整および各種細胞株による HAV の分離

接種糞便試料の調整, 細胞への接種, 並びに感染細胞の増殖実験は **Fig. 1** に示す手順によった。凍結試料は37℃温浴槽で融解, 10,000回転30分遠心, 上清を音波処理1分の後接種試料とした。各細胞をプラスチック培養瓶 (培養面積25cm²; Nunc 社, デンマーク) に培養, 細胞単層とし, 同単層に便抽出試料0.5mlを接種, 37℃2時間吸着, 細胞面を D-MEM で2回洗浄, 10%牛胎児血清含有 D-MEM 5mlを添加, 5%炭酸ガス恒温器内37℃24時間培養, 翌日1%血清含有培養液に交換, 以降, 適宜液交換を行いつつ8週間培養を継続した。この間2週毎に瓶内容を回収, 凍結融解, 音波処理1分後,

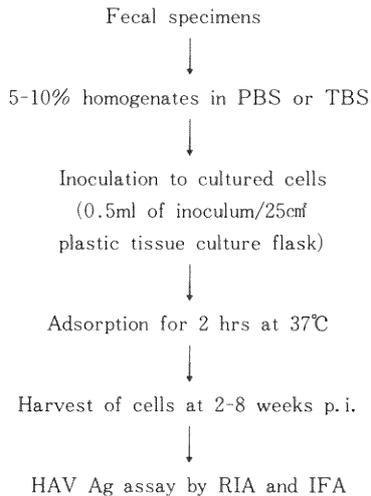


Fig 1 Protocol for Primary Isolation of HAV

2,000回転5分の遠心上清につき HAV 抗原活性をラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay : RIA) により測定した。また、瓶培養と別にカバースリップ培養を調整、蛍光抗体法 (immunofluorescent antibody technique : IFA) 試料とした。すなわち、レイトン管 (Leighton tube : Wheaton 社, U.S.A.) 中のカバースリップ (培養面積4.5cm²) に細胞を単層培養、糞便試料0.2 ml を接種、プラスチック瓶同様に吸着、培養、回収、カバースリップは PBS, pH7.2 で洗浄、氷冷アセトンで5分間固定、風乾した。

便抽出試料接種培養細胞については6~8週後の時点で細胞抽出液を用い盲継代を行った。培養細胞は凍結融解、1分間音波処理、2,000回転5分遠心後その上清を継代試料とした。25cm²プラスチック培養瓶単層細胞に試料0.5ml を接種、37°C 2時間吸着、D-MEM で2回洗浄後、維持培養液を5ml 添加、5%炭酸ガス恒温器内37°C で培養、適宜培養液交換を行いつつ、4週間培養を継続した。この間、1週毎に瓶内容を回収、便試料感染実験と同様に、抗原活性を RIA 法で測定した。

4) S.la/Ve-1 細胞における HAV の持続感染

S.la/Ve-1 細胞 HAV 継代2代目2週の感染細胞を出発材料とし、同細胞を EDTA (Ethylenediaminetetraacetate)-トリプシン混液で分散、増殖用培養液を加え、同サイズ培養瓶3個に均等分散培養した。2日後維持培養液に交換、2週後、2個は RIA 法による HAV 抗原活性測定に回収、残余1個は上記同様に増幅継代した。

5) ラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay : RIA)

HAV 抗原活性は、HAVAB-M キット (Abbott 社 ; U.S.A.) を用い測定した。抗ヒト IgM ヤギ抗体被覆ビーズに HAV 抗体液 (キット陽性対照標品) を加え、室温一晚反応、洗浄、次いで被検試料を加え、室温一晚反応、洗浄、最後に¹²⁵I 標識 HAV 抗体液を加え、45°C 4時間反応、洗浄の後、ビーズの放射活性をガンマシンチレーションカウンターで測定した。切り捨て値 (Cut-off value) は非感染対照複数試料測定値平均の2倍と規定、被検試料測定値がそれを超える時、抗原価有意陽性とした。

6) 蛍光抗体法 (immunofluorescent antibody technique : IFA)

アセトン固定カバースリップ培養細胞を湿室に置き、抗 HAV サル血清 (5倍希釈液) と室温1時間反応、洗浄、次いで FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識抗ヒト・ヤギ Igs 抗体液 (Boehring 社, 西独 : 10倍希釈液) と同条件で反応、洗浄、最後に80%グリセリン-PBS 液 pH7.2 に包埋、蛍光顕微鏡 (BH-2 ; オリンパス社, 東京) により鏡検した。細胞は100~200個々を検索、非感染細胞が非特異蛍光を与えないことを確認の後、明確な蛍光を認めた感染細胞を抗原陽性とし、陽性細胞の占める割合から100%, 75%, 50%, 25%および0.5%未満をそれぞれ4+, 3+, 2+, 1+および-と表した。

7) 培養細胞馴化 HAV 増殖実験

京都 T.T. 株を S.la/Ve-1 細胞で持続感染、56代継代した HAV を接種試料とした。各細胞単層培養瓶 (25cm²プラスチックフラスコ) に試料0.5ml を接種、2時間吸着、2回洗浄後、37°C 5%炭酸ガス恒温器内で2週間培養、その間瓶内容を2日おきに回収した。回収試料は凍結融解、音波処理、低速遠心後感染価測定試料とした。

HAV 感染価の測定は、固相化 EIA (enzyme immunoassay) 法によった。手順を Fig.2 に示す。即ち、測定試料は、1% FCS 含有 D-MEM で10倍階段希釈例とし、96穴マイクロプレート (Falcon 社, U.S.A.) 単層培養 S.la/Ve-1 細胞に1穴当たり100 μ l を接種、一晚吸着後、37°C 5%炭酸ガス恒温器内で2週間培養を継続した。感染細胞は培養液を捨て、細胞面を PBS で洗浄、80%メタノールにより固定、0.03%過酸化水素水液で4°C一晚処理した。1%牛血清アルブミン含有トリス緩衝液で非特異反応を抑制、一次抗体として抗 HAV モノクローナル抗体 (抗体価10⁴倍以上 : 5倍希釈液) を添加、室温2時間反応、二次抗体としてペルオキシダー

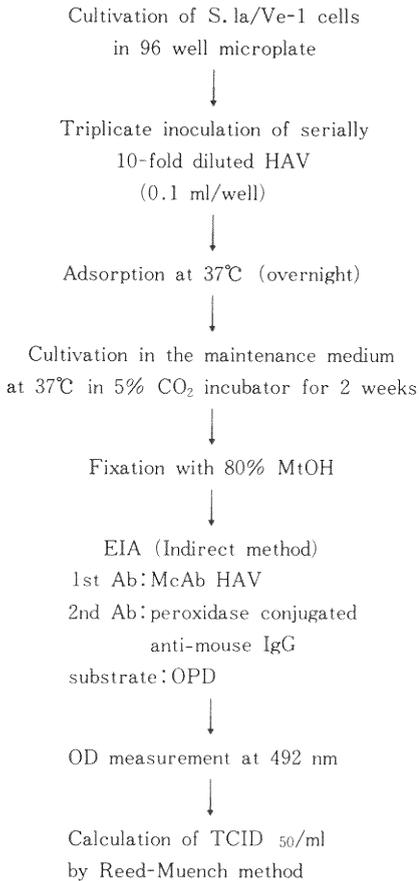


Fig. 2 Procedure for the the Titration of HAV

ゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体 (BIO-RAD 社, U. S.A.: 3,000倍希釈液) を添加, 室温 1 時間反応後, OPD (orthophenylenediamine) で発色, 吸光度計で波長 492 nm の吸光度 (optical density; OD) を測定した. 非感染細胞 OD 平均値の 2 倍標準偏差値以下を切捨て値として設定, 同値を越える試料を HAV 抗原活性陽性とし, 各希釈の陽性率から Reed-Muench 法²⁴⁾ により TCID₅₀ 値 (50% tissue culture infectious dose) を算出した.

結 果

1) 雑種サル肝細胞株 (S.la/Ve-1 細胞) によるヒト糞便 HAV の分離成績

Table 1 に示した 11 糞便検体を対象とし, S.la/Ve-1 細胞を用い, HAV の分離を試みた. 糞便抽出試料の HAV 抗原活性は 5 検体陽性 (T.T., Y.T., K-5, Ku-3, Ku

-4), 6 検体陰性 (K-9, K-10, K-11, Ku-1, Ku-2, N871) であった. 試料接種後細胞内ウイルス抗原の増生を RIA 法および IFA 法により追跡した (Table 3). 京都試料 2 検体 (T.T., Y.T.) はともに HAV 抗原活性陽性検体で, T.T. 接種細胞群は 4 週目より有意の抗原活性 (RIA: 1,450cpm) 発現を認め, 6 週で RIA: 8,271cpm/IFA: 2+, 8 週で RIA: 12,561cpm を呈し, 又 Y.T. 接種細胞では 6 週目に有意のウイルス抗原活性発現を認めた (RIA: 7,327cpm/IFA: 2+). 新潟試料中家族内感染例 4 検体 (K-5, K-9, K-10, K-11) は 2 名の不顕性感染小児より採取した検体で, 糞便中ウイルス抗原活性は 1 検体 (K-5) のみ陽性であった. 当試料接種細胞は 4 週目より抗原活性陽性 (RIA: 6,911cpm/IFA: 2+) となり, 同活性は週を追って上昇, 8 週後には高力価 (RIA: 23,579cpm) を呈するに至った. 一方, 他の陰性試料 (K-9, K-10, K-11, N871) 接種細胞では培養 8 週間中, 有意のウイルス抗原活性は検知できなかった. 久留米 Ku-1 および Ku-2 は両検体とも抗原活性陰性試料であったが, 2 週目の感染細胞ですでに Cut-off 値を上回るウイルス抗原活性 (Ku-1; RIA: 869cpm, Ku-2; RIA: 1,094cpm) が発現, 以後漸増, 8 週目に高い抗原価 (Ku-1; RIA: 13,880cpm/IFA: 1+, Ku-2; RIA: 14,619cpm/IFA: 1+) が検出された. 検体 Ku-3 および Ku-4 は抗原活性陽性試料であり, 同試料接種細胞には 2 週目に有意の抗原活性 (Ku-3; RIA: 911cpm, Ku-4; RIA: 1,045cpm) 発現を認め, Ku-3 接種細胞では 8 週目で RIA: 6,770cpm/IFA: 1+, 又 Ku-4 接種細胞では 6 週目で RIA: 9,423cpm/IFA: 2+ の抗原活性を呈するに至った. 以上総括すると, S.la/Ve-1 細胞では HAV 抗原活性陽性全 5 検体と陰性検体 6 検体中 2 検体につきウイルス抗原の有意増生を認めた. 尚, この間ウイルス抗原増生細胞における細胞変性効果 (cytopathic effect; CPE) の発現は認められなかった.

2) S.la/Ve-1 細胞における HAV の継代および持続感染

ウイルス分離確認のため, 感染細胞抽出液を新鮮細胞に接種継代, ウイルス増殖の有無を検索した. 結果を Table 3 に示す. 京都 T.T. 株は糞便ウイルス接種 8 週目の細胞抽出液を, Y.T. 株は 6 週目のそれを継代, それぞれ 1 週目よりウイルス抗原の有意増生を認めた (T.T.: 1,061cpm, Y.T.: 8,412cpm). 久留米 Ku-1 ~-4 株は接種後 6 週目の感染細胞抽出液を継代, すべて 2 週目に 1×10^3 cpm 以上のウイルス抗原活性を検出し得た. 表示のごとく継代 HAV は糞便ウイルスに比

Table 3 Primary Isolation and Blind Passage of HAV from Fecal Specimens Using S.la/Ve-1 Cells

Specimens	HAV Ag in specimens	Primary Isolation				Blind Passage		
		2 W	4 W	6 W	8 W ^{c)}	1 W	2 W	4 W
T. T. /Kyoto	11,356 ^{a)}	372 ^{b)}	1,450	8,271/2+ ^{c)}	12,561	1,061	5,137	NT
Y. T. /Kyoto	11,446	NT ^{d)}	317	7,327/2+	NT	8,412	14,377	NT
K-5/Niigata	12,816	451	6,911/2+	28,072/2+	23,579	NT	NT	NT
K-9/Niigata	193	468/-	NT	508/-	466/-	NT	321	429
K-10/Niigata	391	NT	401/-	NT	473/-	NT	322	359
K-11/Niigata	241	621/-	446/-	395/-	584	NT	189	421
N871/Niigata	327	NT	383	336	362/-	NT	NT	NT
Ku-1/Kurume	247	869	2,093	8,620/1+	13,880/1+	NT	2,039	NT
Ku-2/Kurume	135	1,094	7,305	9,304/1+	14,619/1+	NT	2,347	NT
Ku-3/Kurume	8,518	911	6,145	5,230/1+	6,770/1+	NT	1,379	NT
Ku-4/Kurume	11,652	1,045	6,126	9,423/2+	8,196/2+	NT	1,850	NT

a) RIA titer (cpm) with a cut-off value of 473

b) HAV Ag activities (cpm) with a cut-off value of 823

c) + and - signals show the IFA results (-: <0.5%, 1+: 5%, and 2+: 25% fluoresive cells)

d) NT: not tested

e) Incubation time by weeks post infection

Table 4 Persistent Infection of HAV in S.la/Ve-1 Cells

HAV strain ^{a)}	Passage Number ^{b)}						
	1	2	3	4	5	10	15
T. T.	25,048	NT	7,389	24,160	NT	NT	25,040
Ku-1	3,322	7,831	6,586	6,317	3,154	16,321	8,456
Ku-2	3,735	7,745	7,754	6,963	4,700	21,523	10,611
Ku-3	3,925	9,067	6,029	4,791	3,045	18,391	17,697
Ku-4	3,040	8,808	5,540	5,744	4,909	16,329	15,141

a) Origin of fecal HAV for persistent infection.

b) Persistently infected cells were subcultured by 3-fold dilution at 2 week intervals.

c) HAV Ag activities presented as cpm.

d) NT; Not tested.

し、細胞内抗原の急速な増生を誘発したが、CPE は観察されず、HAV の持続感染が成立しているものと解された。この可能性を検索するために、ウイルス継代2週間の感染細胞を出発材料とし、同細胞を2週毎増殖継代、継代培養細胞のウイルス抗原を追跡した (Table 4)。T. T. 株由来 HAV は持続感染初代より高い抗原活性を誘発、以降、3代目を除き15代目まで同レベル抗原活性の持続を認めた。Ku-1~4 株由来 HAV は低継代 (1~5代) では $3 \sim 9 \times 10^3$ cpm の抗原力価を呈したが、10代目にいずれも 1.5×10^4 cpm 以上に上昇、ウイルスの

培養細胞への完全馴化を認めた。

3) サル腎由来各種樹立細胞株による分離成績

S.la/Ve-1 細胞の HAV 分離効率を既存サル腎由来樹立細胞株と比較するため、同じ糞便試料を4種類の細胞株 (BSC-1 細胞, LLC-MK₂ 細胞, BGM 細胞, Vero 細胞) に接種、抗原増生の有無を RIA 法で追跡した。サル腎細胞株の由来は Table 2 に示すとおりで、いずれも培養細胞馴化 HAV に対し感受性が報告されているものである^{13) 14) 20) 21) 25)}。分離成績を Table 5 に掲げる。因みに、京都 T. T., 新潟 K-5, 同 K-9, 同 K-10,

Table 5 Primary Isolation of HAV from Fecal Specimens Using Monkey Kidney-derived Cell Lines.

Specimen (cpm)	Cell Lines			
	BSC-1	LLC-MK ₂	BGM	Vero
Y. T. (11,446) ^{b)}	— ^{c)}	—	NT ^{d)}	NT
Ku-1 (247)	—	—	—	—
Ku-2 (135)	—	—	—	—
Ku-3 (8,518)	—	—	4,360(4W) ^{a)}	—
Ku-4 (11,652)	—	—	—	—
N871 (327)	—	—	NT	NT

- a) Maximal cpm of HAV Ag activities (Incubation time). Cut-off value calculated from uninfected BGM cultures : 1,020.
- b) HAV Ag activities (cpm) with a cut-off value of 473.
- c) —;cpm value not significant during 8 weeks incubation.
- d) NT;Not tested.

同 K-11 は検体不足のため、当実験には供し得なかった。表示のごとく、有意の抗原増生知見を与えたのは、久留米 Ku-3 接種 BGM 細胞のみであった。同細胞は接種 4 週目に抗原活性 4,360cpm を示し、盲継代により 1 週後高力価の抗原活性、18,425cpm を与えた。ま

た同細胞では RIA 法抗原活性陽性時点に一致して、IFA 法でも強陽性の蛍光が観察された。

4) 分離ウイルスの S.la/Ve-1 細胞および各種サル腎由来細胞における増殖

各種細胞の HAV 感受性検討の一環として、S.la/Ve-1 細胞で分離継代したウイルスを前出のサル腎由来細胞株並びに S.la/Ve-1 細胞株に接種、各細胞株におけるウイルス増殖の動態を追跡、比較した (Fig. 3)。接種材料は京都 T.T. 株を S.la/Ve-1 細胞で分離56代持続感染継代したウイルスで、RIA 法で 23,412cpm の抗原力価を示したものである。全細胞で接種後 4 日目よりウイルス感染価有意上昇を認め、8 日目、感染価はほぼ極限に達し、以降14日に至るまではほぼ同等のレベルを維持した。ただし感染価極限レベルについては細胞ごとに差があり、接種後14日の時点におけるそれは、BGM 細胞で 10^{8.25}TCID₅₀/ml, S.la/Ve-1 細胞で 10^{8.0}TCID₅₀/ml, BSC-1 細胞で 10^{7.5}TCID₅₀/ml で比較的高力価を示し、これに対し、LLC-MK₂ 細胞および Vero 細胞では 10^{5.5}TCID₅₀/ml で、比較的低レベルに留まった。因みに LLC-MK₂ 細胞、Vero 細胞が、他の細胞株に比べ有意に低極限レベルの感染価を呈することは、再度の実験により確認した。

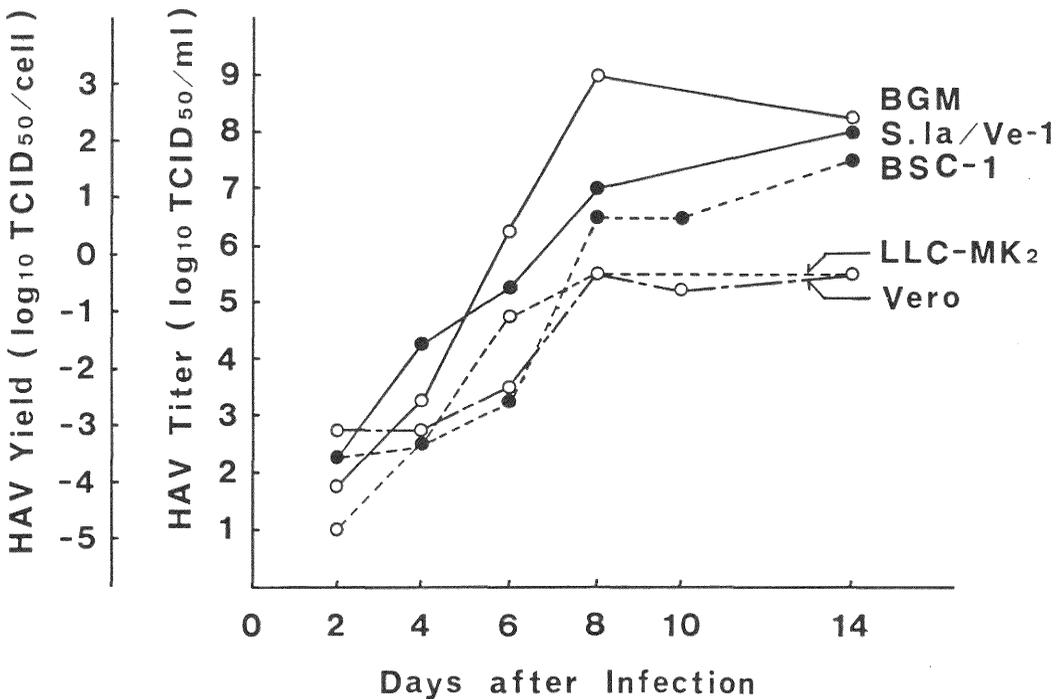


Fig. 3 Growth of Cell-adapted HAV in Various Cell Lines

考 察

本研究では雑種サル肝細胞株 (S.la/Ve-1 細胞) と既存サル腎由来各種細胞株を用い、ヒト糞便 HAV の分離効率および培養細胞馴化 HAV の増殖動態を比較検討した。S.la/Ve-1 細胞は芦田が既に HAV に対する高度感受性を報告、その中で臨床検体を対象とするウイルス検索に際しての有用性を示唆している²³⁾。そこで3地域 (京都, 新潟, 久留米) より不顕性感染を含む9人のA型肝炎患者から採取した糞便11検体を5~10%抽出液とし S.la/Ve-1 細胞に接種, ウイルス分離を試みた。京都試料2検体 (T.T., Y.T.) は採取後9年経過していたが共に RIA 法で高力価のウイルス抗原活性を有し, 接種後6週目の感染細胞に明確な抗原活性の増生を検知した。新潟試料は K-5 検体のみ HAV 抗原活性陽性検体で, 当試料接種細胞で4週目にウイルス抗原が検出されたが, 他の陰性検体 (K-9, K-10, K-11, N 871) では有意のウイルス抗原活性の増生は認められなかった。久留米試料4検体中2検体 (Ku-1, Ku-2) は RIA 法で抗原活性が陰性であったが, 4検体とも接種2週目よりウイルス抗原が有意に発現, 週を追って明確な力価に上昇した。以上 S.la/Ve-1 細胞では, 抗原活性陽性5検体全例および陰性6検体中2検体よりウイルス分離に成功した (Table 6)。一方, サル腎由来樹立細胞株に同試料を接種したところ, BGM 細胞は Ku-3 接種群が4週後抗原活性陽性となったが, BSC-1 細胞, LLC-MK₂ 細胞および Vero 細胞では全検体を通じ, 培養8週に至るも有意の抗原活性は検出できなかった。S.la/Ve-1 細胞のヒト便 HAV 感受性は既存サル腎由来細胞株に比しはるかに優れていると考えられる。

これまでにヒト便中からの HAV 分離はサル個体に接種後, 肝ウイルスを既存培養細胞株で増殖させる方法

^{10) 11) 12) 13) 14)}と, 初代または低継代歴サル腎細胞に直接接種, 増殖させる方法とが報告されている。後者の方法で, Daemer 等がアフリカミドリザル腎初代培養細胞 (AGMK) を用い, 抗原活性陽性3検体中2検体からウイルスを分離¹⁷⁾, また Binn 等から同細胞で7検体中5検体からウイルスを分離したと報告している¹³⁾。アカゲザル胎児腎低継代歴細胞 (FRhK-6) を用いた分離実験では Provost 等が3検体中2検体²⁶⁾, Binn 等が5検体中1検体の成功を報告している¹³⁾。その他, Frösner 等が HBs 抗原産生肝癌細胞株 (PLC/PRF/5) を用い1検体中1検体¹⁵⁾, Flehmig 等がアカゲザル胎児腎由来細胞株 (FRhK-4) を用い3検体中3検体¹⁶⁾, Kojima 等が Vero 細胞を用い2検体中2検体のウイルス分離を報告している²⁰⁾。いずれの報告も少数の検索試料で, 検体も異なり, 一概に比較できないが, ウイルス抗原活性陰性検体からの分離報告はない。今回陰性検体からウイルスを分離できたという点で S.la/Ve-1 細胞のヒト便 HAV に対する感受性は初代または低継代歴サル腎細胞のそれと同等, 若しくはそれに勝るものと解される。サル腎初代培養細胞は累代継代ができず, しばしば宿主動物内在ウイルスが迷入, 実験の障害となる^{10) 11) 13) 17) 27)}。加えて近年, 宿主個体の供給が制限され, 入手が極めて困難となった。それに対し, 株化細胞である S.la/Ve-1 細胞は培養継代が可能で, 維持も容易なことからウイルス分離に至適と考える。

分離ウイルスの S.la/Ve-1 細胞および各種サル腎由来細胞株における増殖動態を比較検討した。接種ウイルスは京都 T.T. 株由来, S.la/Ve-1 細胞で56代持続感染継代した細胞馴化 HAV である。全細胞株でウイルス増殖が認められ, ウイルス接種8日目に感染価は極閾レベルに達し, 2週目の最終力価は S.la/Ve-1 細胞で $10^{8.0}$ TCID₅₀/ml, BGM 細胞で $10^{8.25}$ TCID₅₀/ml, BSC-1 細胞で $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml と比較的高力価を呈した。これに対し, LLC-MK₂ 細胞, Vero 細胞では各々 $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml と有意に低い感染価に留まった。Binn 等は AGMK 細胞では馴化 HAV 接種2週後 $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml の感染価を報告¹³⁾, Provost は FRhK-6 細胞で接種6日後極閾の感染価を得, 10^{8} TCID₅₀/ml であったという¹¹⁾。これらの実験系では接種ウイルスの細胞当りの感染多重度 (multiplicity of infection; MOI) が規定されておらず, したがって結果を直接比較はできないが, S.la/Ve-1 細胞と AGMK 細胞, FRhK-6 細胞, BGM 細胞および BSC-1 細胞では培養細胞馴化 HAV に対する感受性には有意差はないものと解される。

Table 6 Efficiency of Various Primate Cells for Primary Isolation of HAV.

Cell line	No of caces (success/trial)		Total (%)
	HAV Ag of inoculum positive	negative	
S.la/Ve-1	5/5	2/6	7/11 (64)
BSC-1	0/3	0/3	0/6 (0)
LLC-MK ₂	0/3	0/3	0/6 (0)
BGM	1/2	0/2	1/4 (25)
Vero	0/2	0/2	0/4 (0)

S.la/Ve-1 細胞が糞便 HAV に高度感受性を有する理由として次のことが考えられる。第一に、S.la/Ve-1 細胞を含め分離効率に優れた細胞は HAV に対する特異受容体活性が高く、当該受容体を介し多数のウイルス粒子が細胞に吸着、侵入できる可能性である。また、Fig. 3 に示したとおり、S.la/Ve-1 細胞は LLC-Mk₂ 細胞、Vero 細胞に比し、細胞当りのウイルス産生量が有意に高い。このことから、今一つの可能性としてウイルスの細胞内増殖を促進する細胞側要因の存在が予想される。これらの要因はともに S.la/Ve-1 細胞がマーマセット肝細胞分化形質の一端として獲得した可能性が高い。確証を得るためには今後の検討が必要と考える。

これまで多くの報告で、HAV は培養細胞に CPE を誘発しないとされている。今回の検索でも S.la/Ve-1 細胞においてウイルス増殖に伴う CPE の発現は認められなかった。同細胞ではウイルス増殖が維持されながら、細胞の生理活性は損なわれることなく、持続感染が成立しているものと解される。同様の知見は、HAV 感染ヒト胎児肺線芽細胞²⁸⁾ やアカゲザル胎児細胞株 (FRhk-4/R) についても報告されており¹⁹⁾、芦田もマーマセット肝ウイルスを用い S.la/Ve-1 細胞で HAV 持続感染の成立を報告している²³⁾。そこでこの持続感染の特性を利用し、S.la/Ve-1 細胞において各種分離ウイルス

の増殖動態を検討した。すなわち、糞便ウイルスを接種、継代2代目2週 of S.la/Ve-1 感染細胞を出発材料とし、同細胞を培養継代 (各2週間培養)、継代培養細胞におけるウイルス抗原価を追跡した (Table 4)。京都 T.T. 株接種感染細胞では継代当初より 2×10^4 cpm 以上の高い HAV 抗原活性を認め、15代継代後も極閾レベルの抗原増生が維持された。一方、久留米 Ku-1 ~ -4 株では、感染細胞増殖継代5代目までは $3 \sim 9 \times 10^3$ cpm の抗原価に留まり、10代目に 1.5×10^4 cpm 以上の力価に上昇した。つまり、HAV 野生株の細胞に対する馴化動態は京都株と久留米株で差が認められ、ウイルス株によって培養細胞親和性に差があるものと解された。

さらに培養細胞馴化ウイルスの S.la/Ve-1 細胞における持続感染増殖動態ならびに接種継代による増殖動態を HAV (T.T. 株) 持続感染67代目 (8WT67) を用い、比較検討した (Fig. 4)。持続感染増殖では、培養2日目より $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml の感染価が認められ、6日目には極閾感染価 $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml を検知、同感染価は実験期間14日目まで維持された。一方、接種継代では、接種2日目の感染価は $10^{2.25}$ TCID₅₀/ml で、持続感染継代のそれに比し、有意に低力価であり、以降感染価は培養期間とともに上昇したが、極閾レベル $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml に達するのに接種後8日を要した。S.la/Ve-1 細胞では、

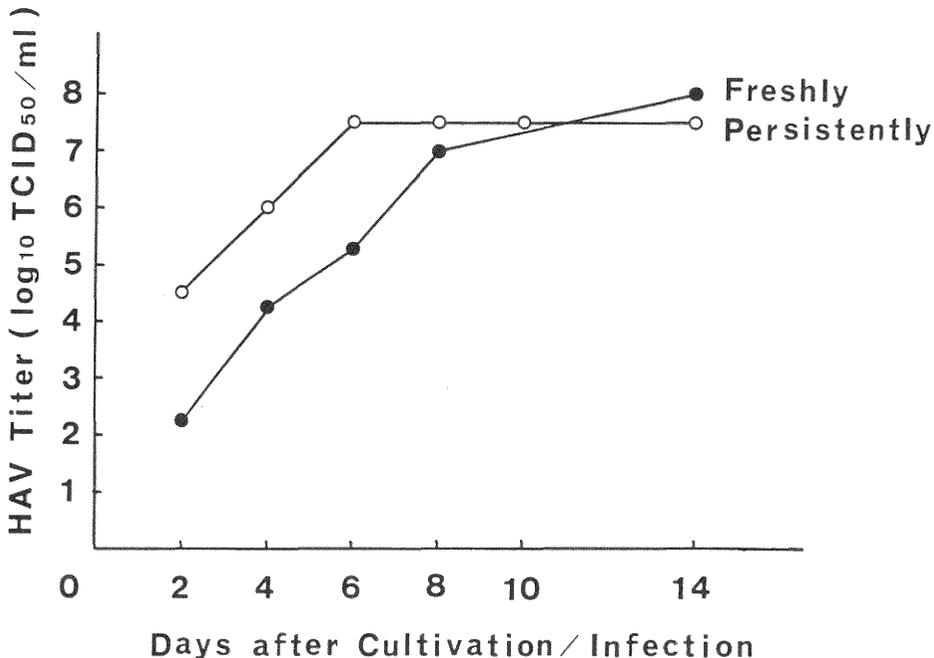


Fig. 4 Growth of HAV in Persistently and Freshly injected S.la/Ve-1 Cells

Table 7 Negative Results in Primary Isolation of HAV from Fecal Specimens (Kyoto area) Stored for Long Using S.la/Ve-1 Cell Line.

Specimen (cpm)	Primary Isolation			Blind Passage 4 W ^{d)}
	4 W	6 W	8 W	
T. Y. (222) ^{b)}	567 ^{a)}	652	426	573
IM. (156)	509	NT ^{c)}	443	673
N. N. (4,036)	432	NT	476	611
K. Y. (739)	491	711	499	593
U. Y. (3,312)	522	NN	502	655
F. T. (747)	525	675	508	608

a) HAV Ag activities (cpm) with a cut-off value of 823.

b) HAV Ag activities (cpm) with a cut-off value of 473.

c) NT; Not tested.

d) Incubation time by weeks post infection.

培養細胞馴化ウイルスを用いる時、多量のウイルス並びにウイルス抗原の調整には、持続感染細胞を出発材料とするのが有利と考えられる。

今回 S.la/Ve-1 細胞でウイルス分離に成功した京都株 2 検体 (T.T., Y.T.) は、ともに接種試料中の抗原活性が 1×10^4 cpm を超え高力価のものであった。Table 7 に示す京都試料 6 検体はそれぞれ同流行時に採取し得た別患者の糞便検体で、試料中ウイルス抗原活性が比較的低力価であった。これらの試料については S.la/Ve-1 細胞に接種後、盲継代を含め培養 12 週に至るも有意のウイルス抗原活性の増生は検出できなかった。サル腎由来樹立細胞株でも同様、抗原活性陽性細胞は認められなかった (成績略)。因みに上記 6 検体中 3 検体 (N.N., K.Y., U.Y.) は採取 3 年後免疫電頭法により 60 倍濃縮試料中に HAV 粒子が観察されている²⁰⁾。今回低力価抗原検体でウイルス分離陰性に終わった理由は、長期にわたる保存期間において、ウイルス感染価が低減、不活化されたことによると思われる。Binn 等の報告でも AGMK 細胞でウイルスが分離できなかった検体は採取後長期の年数が経過したものであった¹³⁾。また、抗原活性陰性検体中ウイルス分離に成功した 2 検体 (久留米 Ku-1, Ku-2) は、保存期間がそれぞれ 1 年と 3 年で比較的短期の保存試料であった。したがって、HAV に関しては、 -70°C の凍結保存状態でも長期経過すると感染価が不活化される可能性があり、ウイルス分離には検体採取後、少なくとも 2~3 年以内の材料が望ましいと考えられた。

結 語

雑種サル肝細胞株 (S.la/Ve-1 細胞) において野生株 HAV に対する感受性を検討するため、同細胞と既存のサル腎由来樹立細胞株 (BSC-1 細胞, LLC-MK₂ 細胞, BGM 細胞, Vero 細胞) にヒト糞便 HAV 検体を接種、ウイルス抗原活性の増生を RIA 法および IFA 法で追跡、各細胞株のウイルス分離効率を比較した。さらにこれらの細胞株の培養細胞馴化 HAV 感受性を比較検討するため、それぞれに S.la/Ve-1 細胞継代 HAV を接種、ウイルス増殖の動態を追跡した。得られた知見を以下にまとめる。

1) A 型肝炎患者糞便 11 検体を S.la/Ve-1 細胞に接種、HAV 抗原活性陽性 5 検体接種細胞全例と、同陰性検体 6 検体接種細胞中 2 例に HAV 抗原活性の有意増生を認めた。

2) 糞便検体接種によりウイルス抗原活性陽性となった S.la/Ve-1 の細胞 6 試料を同新鮮細胞に継代、共に再度のウイルス抗原活性増生を認め、ウイルス分離を確認した。

3) 既存 4 種サル腎由来細胞株については、BSC-1 細胞および LLC-MK₂ 細胞に糞便検体 6 試料 (ウイルス抗原活性陽性検体 3 試料, 同陰性検体 3 試料), BGM 細胞並びに Vero 細胞に 4 試料 (ウイルス抗原活性陽性検体 2 試料, 同陰性検体 2 試料) を接種、その内、BGM 細胞により 1 試料 (ウイルス抗原活性陽性) からウイルスを分離した。

4) S.la/Ve-1 細胞による分離ウイルス持続感染細

胞の培養継代において極閾レベルのウイルス抗原価には、T.T. 株で初代、Ku-1〜4 株では10代で到達、ウイルス株により培養細胞馴化の動態に差のあることを認めた。

5) 前記5種の細胞株に培養細胞馴化 HAV を接種、ウイルス増殖動態を比較した。全細胞株で接種8日後ウイルス感染価は平衡値に達した。同値は S.la/Ve-1 細胞、BGM 細胞および BSC-1 細胞で $10^{7.5-8.25}$ TCID₅₀/ml であったが、LLC-MK₂ 細胞および Vero 細胞では $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml に留まった。

6) S.la/Ve-1 細胞を宿主とし、培養細胞馴化 T.T. 株 HAV により、持続感染継代および接種継代におけるウイルスの増殖動態を比較した。極閾レベル ($10^{7.5}$ TCID₅₀/ml) の感染価に到達するのに、持続感染継代では6日、接種継代では8日を要することを認めた。

以上の所見より、S.la/Ve-1 細胞株はヒト便 HAV に対する感受性が既存サル腎由来細胞株に比しはるかに優れ、ウイルスの分離検索に極めて有用と考えられた。又、同細胞株は HAV 持続感染状態で、多量のウイルス並びにウイルス抗原の採取に有利であると考えられた。

本研究は厚生省科学研究費の援助を受け、本論文の要旨は昭和62年度厚生省肝炎連絡協議会A型肝炎班会議で発表した。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました本学第三内科学教室市田文弘教授、並びに同ウイルス学教室浜田忠弥教授、芦田雅彦博士に深く感謝申し上げます。また、貴重な検体を分与いただきました本学第三内科学教室小島秀男博士、長岡赤十字病院内科広瀬慎一博士、白根健生病院内科高橋邦明先生、並びに久留米大学医学部第二内科学教室谷川久一教授、佐田通夫博士に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Hersey, D.F., and Eugene, D.S.: Viral agent in hepatitis. *Lab. Invest.*, **19**: 558~572, 1968.
- 2) Deinhardt, F., Holmes, A.W., Capps, R.B., and Popper, H.: Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. *J. Exp. Med.*, **125**: 673~688, 1967.
- 3) Mascoli, C.C., Ittensohn, O.L., Villarejos, V.M., Arguedas, J.A., Provost, P.J., and Hilleman, M.R.: Recovery of hepatitis agents in the marmoset from human cases occurring in Costa Rica. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **142**: 276~282, 1973.
- 4) Shibayama, T., Kojima, H., Ashida, M., Hirose, S., Sato, A., Kamimura, T., Hamada, C., Shimizu, Y., Suzuki, S., and Ichida, F.: Localization of hepatitis A virus in marmoset liver tissue during the acute phase of experimental infection. *Gastroenterol. Jpn.*, **20**: 564~572, 1985.
- 5) Maynard, J.E., Bradley, D.W., Gravelle, C.R., Ebert, J.W., and Krushak, D.H.: Preliminary studies of hepatitis A in chimpanzees. *J. Inf. Dis.*, **131**: 194~197, 1975.
- 6) Dienstag, J.L., Feinstone, S.M., Purcell, R.H., Hoofnagle, J.H., Barker, L.F., London, W.T., Popper, H., Peterson, J.M., and Kapikian, A.Z.: Experimental infection of chimpanzees with hepatitis A virus. *J. Inf. Dis.*, **132**: 532~545, 1975.
- 7) London, W.T., Alter, H.J., Lander, J., and Purcell, R.H.: Serial transmission in rhesus monkeys of an agent related to hepatitis-associated antigen. *J. Inf. Dis.*, **125**: 382~389, 1972.
- 8) LeDuc, J.W., Lemon, S.M., Keenan, C.M., Graham, R.R., Marchwicki, R.H., and Binn, L.N.: Experimental infection of the new world owl monkey (*Aotus trivirgatus*) with hepatitis A virus. *Inf. Immun.*, **40**: 766~772, 1983.
- 9) Feinstone, A.M., Kapikian, A.Z., and Purcell, R.H.: Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness. *Science*, **182**: 1026~1028, 1973.
- 10) Provost, P.J., and Hilleman, M.R.: Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **160**: 213~221, 1979.
- 11) Provost, P.J.: In vitro propagation of hepatitis A virus. In Gerety, R.J. (ed): "Hepatitis A." Orlando: Academic Press, pp. 245~261, 1984.

- 12) Bradley, D.W., Schable, C.A., McCaustland, K.A., Cook, E.H., Murphy, B.L., Fields, H.A., Ebert, J.W., Wheeler, C., and Maynard, J.E.: Hepatitis A virus. Growth characteristics of in vivo and in vitro propagated wild and attenuated virus strains. *J. Med. Virol.*, **14**: 373~386, 1984.
- 13) Binn, L.N., Lemon, S.M., Marchwichi, R.H., Redfield, R.R., Gates, N.L., and Bancroft, W.H.: Primary isolation and serial passage of hepatitis A virus strains in primate cell culture. *J. Clin. Microbiol.*, **20**: 28~33, 1984.
- 14) Purcell, R.H., Feinstone, S.M., Ticehurst, J.R., Daemer, R.J., and Baroudy, B.M.: Hepatitis A virus. In Vyas, G.N., Dienstag, J.L., and Hoofnagle, J.H. (eds): "Viral hepatitis and liver disease." Orlando: Grune & Stratton, pp. 9~22, 1984.
- 15) Frosner, G.G., Deinhardt, F., Scheid, R., Gauss-Muller, V., Holmes, N., Messelberger, V., Siegl, G., and Alexander, J.J.: Propagation of human hepatitis A virus in a hepatoma cell line. *Infection*, **7**: 303~305, 1979.
- 16) Flehmig, B.: Hepatitis A virus in cell culture. I. Propagation of different hepatitis A virus isolates in a fetal rhesus monkey kidney cell line (FrhK-4). *Med. Microbiol. Immunol.*, **168**: 239~248, 1980.
- 17) Daemer, R.J., Feinstone, S.M., Gust, I.D., and Purcell, R.H.: Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: Primary isolation and serial passage. *Infect. Immun.*, **32**: 388~393, 1981.
- 18) Venuti, A., diRusso, C., del Grosso, N., Patti, A.-M., Ruggeri, F., de Stasio, P.R., Martiniello, M.G., Paguotti, P., Degener, A.M., Middulla, M., Pana, A., and Perez-Bercoff, R.: Isolation and molecular cloning of a fast growing strain of human hepatitis A virus from its double stranded replicative form. *J. Virol.*, **56**: 579~588, 1985.
- 19) Flehmig, B.: Hepatitis A virus in cell culture. II. Growth characteristics of hepatitis A virus in FrhK-4/R cells. *Med. Microbiol. Immunol.*, **170**: 83~89, 1981.
- 20) Kojima, H., Shibayama, T., Sato, A., Suzuki, S., Ichida, F., and Hamada, C.: Propagation of human hepatitis A virus in conventional cell lines. *J. Med. Virol.*, **7**: 273~286, 1981.
- 21) Locarnini, S.A., Coulepis, A.G., Westaway, E.G., and Gust, I.D.: Restricted replication of human hepatitis A virus in cell culture. Intracellular biochemical studies. *J. Virol.*, **37**: 216~225, 1981.
- 22) Lemon, S.M., Binn, L.N., and Marchwicki, R.H.: Radioimmunofocus assay for quantitation of hepatitis A virus in cell culture. *J. Clin. Microbiol.*, **17**: 834~839, 1983.
- 23) 芦田雅彦: 雑種肝細胞株におけるA型肝炎ウイルスの増殖. *新潟医学会雑誌*, **101**: 46~57, 1987.
- 24) Reed, L.J., and Muench, H.: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, **27**: 493~497, 1938.
- 25) Provost, P.J., Hughes, J.V., Miller, W.J., Giesa, P.A., Banker, F.S., and Emini, E.A.: An inactivated hepatitis A viral vaccine of cell culture origin. *J. Med. Virol.*, **19**: 23~31, 1986.
- 26) Provost, P.J., Giesa, P.A., McAleer, W.J., and Hilleman, M.R.: Isolation of hepatitis A virus in vitro in cell culture directly from human specimens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **167**: 201~206, 1981.
- 27) Parry, J.V., Richmond, J.E., and Garner, S.D.: Polyoma-virus in fetal rhesus monkey kidney cell lines used to grow hepatitis A virus. *Lancet*, **I**: 994, 1983.
- 28) Vallbracht, A., Hofmann, L., Wurster, K.G., and Flehmig, B.: Persistent infection of human fibroblasts by hepatitis A virus. *J. gen. Virol.*, **65**: 609~615, 1984.

(昭和63年1月16日受付)