雑種肝細胞株における A 型肝炎ウイルスの増殖

新潟大学医学部ウイルス学教室(主任: 浜田忠弥)

芦 田 雅 彦

Propagation of Hepatitis A Virus in Hybrid Liver Cell Lines

Masahiko ASHIDA

Department of Virology, Niigata University School of Medicine (Director: Prof. Chuya HAMADA)

Preferential growth of HAV (hepatitis A vivus) in the primate liver tissue is already To obtain established cell lines with a high susceptibility to HAV, marmoset liver cells were fused with CHO (Chinese hamster ovary) or Vero (a derivative of African green monkey kidney cells) cells by a cell fusion technique with polyethylene glycol. The experiment yielded 6 hybrid cell lines (C. ja/CHO-1 to -6) between the liver and CHO cells, and 4 cell lines (S. la/Ve-1 to -4) between the liver and Vero cells. Hybrid cell lines obtained were assessed for their susceptibility by inoculating two sources of HAV, one from an infected marmoset liver tissue (liver tissue virus) and another from a fecal specimen of patient, where the virus growth was monitored by RIA (radioimmunoassy) and IFA (immunofluorescent antibody technique), giving the following results. 1) Of 6 hybrid cell lines comprising the liver and CHO cells, three (C. ja/CHO-1, -3, and -4) were subjected to the HAV infection with the fecal virus, whereby two (C. ja/CHO-3, -4) of them were found to develop significant activities of the viral antigen transiently at 10 to 12th passages of cells. 2) Of 4 hybrid cell lines comprising the liver and Vero cells, three (S. la/Ve-1, -3, and -4) were equally susceptible to HAV, giving maximal activities of the viral antigen at 6 to 8 weeks post infection (pi) with the liver tissue virus and at 10 to 12 weeks pi with the fecal 3) In S. la/Ve-1 cells, a representative of the susceptible hybrid cell lines, passage of HAV was commenced with a ten fold concentrate of the liver tissue virus, resulting in the development of plateau level activities of the viral antigen at 4 weeks pi at the initial passage and at 1 week pi after the 6th passage consistently. 4) HAV-infected S. la/Ve-1 cells did not develop CPE (cytopathic effect) and could be subcultured in an equal efficiency to that of the uninfected counterparts, retaining the maximal growth of HAV. 5) In S. la/Ve-1 cells, the cell culture-adapted HAV grew to the plateau level at 7 days pi giving an infectivity of 108.5 TCID 50/ml, where the virus particles were confirmed in the cellular extracts in abundance

Reprints requests to: Masahiko Ashida, Department of Virology, Niigata University School of Medicine, Niigata City, 951, JAPAN. 別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町 新潟大学医学部ウイルス学教室 芦田 雅彦 by the immune electron microscopy. Taken these findings together, S. la/Ve-1, -3, and -4 cells were considered to be well susceptible to HAV and quite useful in the basic and clinical studies of HAV.

Key words: hepatitis A virus, hybrid liver cell lines, marmoset, Chinese hamster ovary cells, Vero cells.

A 型肝炎ウイルス, 雑種肝細胞株, マーモセット, チャイニーズハムスターオバリー 細胞, Vero 細胞

培養細胞を用いた A 型肝炎ウイルス (hepatitis A virus: HAV) 増殖の試みは1940年代後半に始まる¹⁾. しかし、当初の試みではウイルス増殖追跡の手法が確立 されておらず、報告に対する評価も定まらなかった。こ のことについて明確な結果が得られるようになったのは 1979年以来のことである. 同年, Provost と Hilleman はマーモセット肝初代培養細胞およびアカゲザル胎児腎 細胞にウイルス材料を接種、A型肝炎患者回復期血清を 用いたラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay: RIA), 並びに蛍光抗体法 (immunofluorescent antibodv technique: IFA) により感染細胞における HAV 抗原の増生と、同抗原増生要因が培養細胞を介し継代可 能であることを明らかにした20.以降,類似の手法によ り各種の培養細胞が HAV に感受性であることが確認さ れている3)4)5)6)7)8). しかし、これまでに記載された HAV 感受性細胞培養系についても、HAV 実験におけ る汎用を目的とする時, いくつかの不備が指摘されてい る. 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2)3)4)9). 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る 4)5)6)8)10)11) 12) 13) 14). HAV の増殖はヒト二倍体細胞でも報告されて いるが、ウイルスの増殖速度が緩慢で収量が少ない3)15) 16) 17). 最近, ヒト胎児線維芽細胞で効率のよい HAV の増殖が報告されたが7,細胞の入手に限界があり、汎 用には向かない. つまり、HAV 研究に広く、安定して 使用できるウイルス感受性細胞は未だ得られていないの が現状である.

一方、HAV をチンパンジーやマーモセットに接種するとウイルスは肝組織で効率よく増殖する^{18) 19) 20)}. 免疫組織学的検索によれば、主として肝実質細胞にウイルス抗原の集積が認められる. サル肝実質細胞は HAV に高い感受性を示すものと考えられる. 著者は HAV 研究に際し、汎用に耐えうる試験管内ウイルス増殖系を開発する目的で、マーモセット肝細胞と CHO (Chinese

hamster ovary) 細胞²¹, または Vero 細胞²² (アフリカミドリザル腎由来樹立細胞株) を融合, HAV 高度感受性雑種細胞株の樹立を試みた. 得られた細胞株のウイルス感受性, 同細胞株における HAV の増殖動態,並びにその細胞学的性状を記載, 併せて本方法論の肝炎ウイルス研究における有用性につき考察を加える.

材料と方法

1) 動物,細胞,および培養液

肝細胞供給源としてコモンマーモセット(Callithrix jacchus)をミドリ十字社(東京)より、ムネアカタマリン(Saguinus labiatus)を国立予防衛生研究所(東京)をかいし加商社(東京)より入手した. HGPRT (hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase)活性欠損(HGPRT⁻)細胞株は Littlefield の方法²³に準じ、CHO(Chinese hamster ovary)細胞、および Vero 細胞を 8-アザグアニン(20μg/ml)存在下で培養、採取した.細胞培養液はリンコマイシン(20μg/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%に牛胎児血清を添加したものをそれぞれ増殖用培養液 および維持用培養液として使用した.

2) ウイルス

使用した A 型肝炎ウイルス (hepatitis A virus; HAV) は顕性患者便由来の T.T. 株である. ウイルス 原液としては 2 種類を調整した. 一つは同便ウイルスを 静脈内接種によりマーモセットを 4代 (Callithrix jacchus 2代, Saguinus mystax 1代, Saguinus labiatus 1代) 継代したものである. マーモセット継代 ウイルスは最終動物の肝組織を10%重量比で 0.15M リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline: PBS) pH 7.2 に粗大切片として浮遊, ワーリングブレンダーにより細切破砕, 10,000回転 1 時間遠心の後, 上清を肝ウイルスとした. 因に, 便ウイルスおよび肝ウイルスの抗原

価はラジオイムノアッセイ(radioimmunoassay: RIA)でそれぞれ 8,350, および 48,881cpm(counts per minute)であった. ウイルス原液は使用まで -80° C に凍結保存した.

3) マーモセット肝細胞の初代培養

中村らの方法²⁴⁾ に準じた、マーモセットを麻酔下で開腹、門脈を介し肝組織を0.05% コラゲナーゼ(I型; Sigma 社, U.S.A.), 4mM CaCl₂ および 10mM HEPES を含む Hanks 均衡塩類溶液 pH7.2 で 37°C 15分間灌流、灌流後肝臓をシャーレに摘出、D-MEM 培養液に浸し、で細切、肝細胞を遊離した。遊離肝細胞は同培養液に浮遊、50×g 1分間の遠心により洗浄、次いで増殖用培養液に再浮遊し、プラスチック培養瓶に分注(2×10⁶個/5 ml/瓶), 5%炭酸ガス環境下、 37°C で培養、細胞単層を形成させた。

4) 細胞融合と雑種細胞の選択

培養 2 日目の肝細胞単層に、これと同数に HGPRT-CHO 細胞、または同 Vero 細胞を重層、増殖培養液を用い混合培養とした.12時間後、同混合培養に50%、25%、および12.5%ポリエチレングリコール(分子量 13,000~1,600; Sigma 社、または分子量 4,000; Merck 社、U.S.A.)を順次添加、各 1 分間浸漬、細胞融合を誘発、直ちに D-MEM 培養液で3回洗浄、HAT 培養液(100 μ M ヒポキサンチン、0.4 μ M アミノプテリン、および16 μ M チミジン含有増殖培養液)を加え、5%炭酸ガス環境、37°C で静置培養した、以降、適時培養液を交換、1 ケ月間培養、次いで HT 培養液(100 μ M ヒポキサンチン、および16 μ M チミジン含有増殖用培養液)で5日間培養の後、増殖用培養液に切り換えた。この間出現した細胞コロニーは各個に分離培養し、それぞれを独立の雑種細胞株とした。

5) 雑種細胞の HAV 感染実験

雑種細胞の HAV 感受性試験,同細胞における HAV の継代,並びに増殖実験は以下の手順によった.雑種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,細胞単層とした.同細胞単層にウイルス原液 0.5 ml を接種,5%炭酸ガス環境下,37°C 2 時間吸着,細胞面を PBS で洗浄後,維持培養液5ml を加え同条件で培養を続けた.以後,HAV 感受性試験では毎週,ウイルス増殖実験では毎日,培養瓶2個の内容を個別に回収,ラジオイムノアッセイ(radio-immunoassay: RIA)により各個のHAV 抗原価を測定した.培養瓶内容は,器壁付着細胞を機械的に培養瓶中に掻き落とし細胞浮遊液とし,同浮遊液を凍結融解3

回、音波処理 1 分の後、2,000回転10分間の遠心上清を抗原価測定試料とした。また、培養瓶培養と別に雑種細胞のカバースリップ培養を調整、蛍光抗体法(immunofiuorescent antibody technique: IFA)に供した。細胞はレートン管(Leighton; Wheaton 社、U.S.A.)中のカバースリップ(培養面積:4.5cm²)に単層に培養、同細胞単層にウイルス原液 0.2ml を接種、以降培養瓶と同条件で処理、培養の後、培養瓶試料と平行してカバースリップを回収した。回収時、カバースリップは PBS(phosphate buffered saline)pH7.2 に浸漬、氷冷アセトンで5分間固定、風乾した。

6) ラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay: RIA)

HAV 抗原価は 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,室温一晩反応,洗浄,次いで被検試料を加え,室温一晩反応,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. 切捨て値(cutoff value) は非感染対照複数試料測定値平均の2倍と規定,被検複数試料測定値平均がそれを超える時,抗原価有意陽性とした.

7) 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(1:5)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(1:10; Boehring 社,西独)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.対照試験として感染細胞の免疫前サル血清,非感染細胞の免疫前後,両サル血清による染色を実施,これら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た.

8) 抗血清

抗 HAV 血清はニホンザル(Macaca fuscata)により得た. 同サル, 体重 5kg, 雄にウイルス原液 10ml を静脈内接種, 4週後, 同量ウイルスを同経路により追加免疫, 1週後, 麻酔下心臓穿刺により採血,血清を分離, 抗 HAV 血清とした. 抗血清は非働化(56°C 30分)の後, 実験に供した. 抗血清抗体価は HAVAB RIAキット(Abbott 社, U.S.A.)により1:1,000 であった.

結 果

コモンマーモセット肝-CHO 雑種細胞の HAV 感受性

コモンマーモセット肝細胞と HGPRT-CHO 細胞の 融合により6株の雑種細胞, C. ja/CHO -1~-6 を 得た (表1). 得られた雑種細胞株はいずれも CHO 細 胞に類似し、線維芽細胞様の形態を示した. また、 C. ja/CHO -3, および -4細胞の染色体数モードはそれ ぞれ56、および60であり、親細胞のそれ(マーモセット 肝細胞: 46; HGPRT-CHO 細胞: 21) とは明らかに異 なった値を示した、これら6細胞株の内、増殖効率の優 れた3株.C. ia/CHO -1, -3, および-4に便ウイ ルスを接種、IFA によりウイルス抗原の増生を検索し た. ウイルス抗原は継代10代目の C. ja/CHO - 3 細胞 で接種1週後、約20%の細胞に、また、継代10~12代目 の C. ja/CHO - 4 細胞で接種 1 週後,約10%の細胞に 検出された.しかし、これらの細胞も継代を重ね12代以 降 (C. ja/CHO-3細胞), および15代以降 (C. ja/ CHO -4 細胞)では、同接種実験においてウイルス抗 原の増生は認められなかった(接種後2週間観察). ま た, C. ja/CHO -1 細胞では継代10代目細胞を用いた 実験でもウイルス抗原の増生は検知できなかった.

表 1 C. ja/CHO 細胞株の細胞学的性状と HAV 感受性

細胞株	細胞増殖	染色体数 モード	HAV抗原の増生 ¹⁾ (細胞継代数)
C. ja/CHO-1	良好	NT	陰性 (10代)
2	やや劣る	NT	NT ²⁾
3	良好	56	陽性 (10代),
			陰性 (12代)
4	良好	60	陽性 (10~12代),
			陰性 (15代)
5	やや劣る	NT	NT
6	やや劣る	NT	NT

¹⁾ 蛍光抗体法による。 2) NT:未検。

ムネアカタマリン肝-Vero 雑種細胞の 細胞学的性状

ムネアカタマリン肝細胞と HGPRT-Vero 細胞の融合により 4 株の雑種細胞、S. la/Ve -1~-4 を 得 た (表 2). 得られた細胞株はいずれも増殖効率に優れ、細胞数倍増時間は約 3 日で、通常の細胞培養法により容易に継代できた。以降の実験は各細胞株、継代 5~35代のものによった、雑種細胞株の形態はすべて両親細胞のそ

表 2 S. la/Ve 細胞株の細胞学的性状

		細 胞	. 株	
細胞学的性状	S. la/	S. la/	S. la/	S. la/
	Ve-1	Ve-2	Ve-3	Ve-4
形 態	上皮様	上皮様	上皮様	上皮様
染色体数モード1)	75	82	80	72
HAV 感受性	感受性	非感受性	感受性	感受性

¹⁾ Warton と Duff の方法 (1979年)²⁷⁾による。

れの中間型を示し、透明大型の核を持つ上皮細胞様であったが、S. la/Ve -1, -2, および -3 細胞はより H細胞に、また S. la/Ve -4 細胞はより Vero 細胞に類似していた(図 1). 染色体数モードは 75 (S. la/Ve -1), 82 (S. la/Ve -2), 80 (S. la/Ve -3), および 72 (S. la/Ve -4) であり、親細胞のそれ(マーモセット肝細胞:46; HGPRT Vero 細胞:93)とは明らかに異なった値を示した.以降の実験で、 S. la/Ve -1, -3, および -4 は HAV に感受性、S. la/Ve -2 は非感受性であった.

ムネアカタマリン肝-Vero 雑種細胞の HAV 感受性

ムネアカタマリン肝-Vero 雑種細胞の HAV 感受性 を知るため、雑種細胞各株に肝ウイルスおよび便ウイル スを接種、RIA および IFA によりウイルス抗原の増 生を追跡した (表3, AおよびB). 肝ウイルス接種群 (表3,A)では、HAV 抗原活性は接種2週後 S.la/ Ve -1 細胞 (RIA: 1,174/IFA: 1+) に, 4週後 S. la/Ve −3 細胞 (1,417/1+) と S. la/Ve −4 細胞 (17.639/3+) に有意に検出された. 以降, これらの細 胞ではウイルス抗原活性は週を追って上昇、接種後6週 (S. la/Ve -4:36,066/4+) ないし8週 (S. la/Ve -1:41,605/4+; S. la/Ve -3:20,890/3+)後には高 力価を呈するに至った. 便ウイルス接種群(表3,B) では、接種後 4 週後 S. la/Ve -1 細胞に IFA でウ イルス抗原の増生を検出、接種8週後には同細胞(1,993/ 2+) に加え、S. la/Ve - 4 細胞(19,474/3+) にも明 確なウイルス抗原の発現を認めた. しかし, 当実験群で は肝ウイルス接種群に比べ、検知されたウイルス抗原活 性が低く,発現頻度も低率であったので,試料を各細胞 株毎, 新鮮細胞に盲継代し, 結果の確認を試みた. 盲継 代実験では、継代2週後,S. la/Ve -1(8,372/3+), S. la/Ve = 3 (10.543/3+), および S. la/Ve = 4(3.589/2+) の各細胞に明確にウイルス抗原活性を検出、

表 3 S.la/Ve 細胞株の HAV 感受性

(A) 肝ウイルス接種細胞における HAV 抗原の増生

培養期間		細	胞 株	
(過)	S. la/Ve-1	S. la/Ve-2	S. la/Ve-3	S. la/Ve-4
1	8371) (-)2)	313 (-)	992 (-)	671 (-)
2	1,174 (1+)	605 (-)	1,005 (-)	785 (-)
3	1,106 (1+)	117 NT	252 (-)	595 (-)
4	5,961 (2+)	370 (-)	1,417 (1+)	17,639 (3+)
6	26,752 (3+)	393 (-)	6,869 (2+)	36,066 (4+)
8	41,605 (4+)	NT NT	20,890 (3+)	NT NT

(B) 便ウイルス接種細胞における HAV 抗原の増生

培養期	間		細	胞 株	
(週)		S. la/Ve-1	S. la/Ve-2	S. la/Ve-3	S. la/Ve-4
	2	661 (-)	490 (-)	370 (-)	464 (-)
初代	4 8	NT (2+) 1,993 (2+)	276 NT 159 (–)	334 (-) 1,874 NT	$ \begin{array}{c c} NT & (-) \\ 19,474 & (3+) \end{array} $
盲継代3)	2	8,372 (3+)	512 (-)	10,543 (3+)	3,589 (2+)
	4	15,674 (4+)	421 (-)	17,067 (4+)	12,877 (3+)

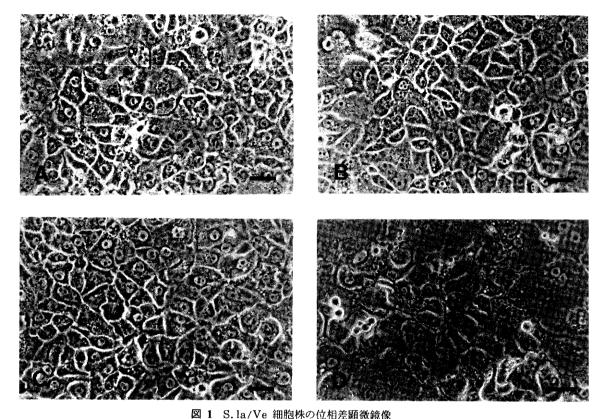
- 1) RIA による HAV 抗原活性:感染細胞抽出液0.2mlと反応した¹²⁵I-抗 HAV 抗体の放射活性(duplicate の平均値)を cpm(count per minute)で表わした。非感染細胞対照によるカットオフ値は 1,010cpm。
- 2) IFA による HAV 抗原活性:カバースリップ培養感染細胞を固定後、抗 HAV サル抗体、次いで FITC 標識抗 ヒト Igs ヤギ抗体と反応させた。蛍光陽性細胞の占める割合 100%、75%、50%、25%、および 0.5%未満をそれぞれ4+、3+、2+、1+、および と表わした。
- 3) 初代 8 週日感染細胞抽出液を、プラスチック瓶培養は 0.5 ml、カバースリップ培養は 0.2 ml、それぞれの新鮮細胞 に接種した。

表 4 S.la/Ve-1 細胞株における HAV の継代

継代数	HAV 抗 原 活 性				
和心工人女义	1 週	2 週	3 週	4 週	
初代	$1,539^{1}(1+)^{2}$	2,807 (2+)	8,330 (2+)	24,776 (4+)	
2代	5,591 (2+)	11,283 (4+)	28,824 (4+)	24,872 (4+)	
3代	5,250 (1+)	3,996 (4+)	19,248 (4+)	17,723 (4+)	
4代	15,516 (4+)	23,294 (4+)	NT	NT	
5代	16,856 (4+)	20,610 (4+)	NT	NT	
6代	25,397 (4+)	NT	NT	NT	
7代	27,555 (3+)	NT	NT	NT	
8代	23,502 (4+)	NT	NT	NT	
9代	42,502 (4+)	NT	NT	NT	
10代	27,883 (4+)	NT	NT	NT	
15代	28,198 (4+)	NT	NT	NT	
20代	18,206 (4+)	NT	NT	NT	

初代の接種材料は肝ウイルスを114,000×g、4 時間の超遠心により10倍濃縮したものである。下線で示した HAV 抗原活性を有する感染細胞抽出液を次代の接種材料とした。

1) RIAによる HAV 抗原活性。2) IFAによる HAV 抗原活性。NT:未検査。詳細は表 3 参照。



(A) S. la/Ve-1 細胞, (B) S. la/Ve-2 細胞, (C) S. la/Ve-3 細胞, (D) S. la/Ve-4 細胞. 図中のスケールは 50μm.

さらに接種後 4 週後,同活性は高力価(S. la/Ve -1: 15,674/4+; S. la/Ve -3: 17,067/4+; S. la/Ve -4: 12,877/3+) を呈することを観察した.この間,S. la/Ve -2 細胞では肝ウイルスによっても,また便ウイルスによっても有意のウイルス抗原の発現は認められなかった.

4) S. la/Ve -1 細胞における HAV の継代

HAV 感受性雑種細胞株, S. la/Ve -1, -3, および -4 より S. la/Ve -1 を選び, 同細胞により HAV の継代を試みた. 因みに本実験では継代当初のウイルス増殖促進を図り, 超遠心による10倍濃縮肝ウイルスを出発材料とした. 結果を表 4 に掲げる. RIA および IFA によるウイルス抗原活性は,初代ではウイルス接種1週後から有意(RIA: 1,539/IFA: 1+)に検出され,接種後4週後には RIA で cpm 値, 24,776を与え, IFA では100%の細胞にウイルス抗原の発現を認めた. この時点でウイルス増殖は極閾に達したものと解される. 同時

期の感染細胞より抽出試料を調整,次代継代材料とした. 以降,同様の手順により表4,下線試料を接種材料とするウイルス継代において,ウイルス抗原活性の極値は2~3代で接種3週後,4および5代で接種2週後,また6代以降20代では接種1週後に達せられた.

5) S. la/Ve −1 細胞における HAV の 持続感染

S. la/Ve -1 細胞における HAV の継代実験では、ウイルス増殖が極閾に達した時点でも感染細胞には細胞変性効果(cytopathic effect: CPE)は認められなかった、当感染系では、宿主細胞の生理活性を障害することなく、HAV の持続感染が成立しているものと解される。この可能性を表4、ウイルス継代2代目3週の感染細胞を出発材料とし、同細胞を1週毎3倍に増殖継代し、継代培養細胞におけるウイルス抗原を追跡することにより検討した。RIA による結果を表5に示す。感染細胞は非感染細胞と同等の増殖効率を示し、通常の培養法によ

om 85 oly 44 #4	HAV 抗 原 活 性		
細胞継代数	継代後1週	継代後2週	
1代	25,2541)	28,422	
2代	15,898	18,534	
3代	24,749	24,509	
4代	21,133	19,824	
5代	10,737	NT	
6代	32,700	NT	
7代	12,876	NT	
8代	24,459	NT	
9代	35,256	NT	
10代	35,274	NT	
15代	22,851	NT	
20代	20,225	NT	
25代	24,545	NT	
30代	10,765	NT	
3 5代	18,413	NT	

表 5 S.la/Ve-1 細胞における HAV 持続感染

プラスチック培養瓶に培養した HAV 感染細胞を、EDTA-トリプシンで分散、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。1 週後、2 個はRIA による HAV 抗原活性測定に回収、残余1 本は上記同様に増幅継代した。1) RIA による HAV 抗原活性(2 試料の平均値、cpm)。 非感染細胞対照から計算したカットオフ値は 932cpm。 NT:未検。

り容易に継代できた、継代感染細胞のウイルス抗原活性は、多少の変動はあるものの、初代から35代まで cpm値、1~3×10⁴ 台を示した、感染細胞は極関レベルのウイルス増殖を維持しながら継代されたものと思われる、この点につき、継代1~4代において一部の細胞の培養を継代2週まで延長したが、一週間培養のそれに較べ、ウイルス抗原活性には有意の変動は認められなかった。

6) S. la/Ve −1 細胞における HAV の増殖

S. la/Ve -1 細胞における HAV 増殖の詳細を知るため,表 4 , ウイルス継代 9 代目感染細胞の抽出液をS. la/Ve -1 細胞のプラスチック瓶培養およびカバースリップ培養に接種,ウイルス抗原の増生を RIA,並びに IFA により追跡した(図 2). RIA ではウイルス抗原活性は接種 2 日後より発現,以後次第に増強,接種 7 日後には平衡値, 2×10^4 台 cpm 値に達した。IFA でもウイルス抗原陽性細胞の割合は,RIA による抗原活性と並行して増加,接種 7 日後には $90\sim100\%$ の細胞が特異蛍光陽性となった。ウイルス増殖の極期(接種 7 日

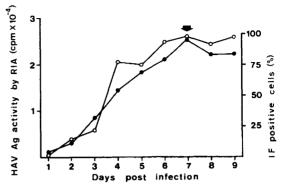


図 2 S.la/Ve-l 細胞における HAV 増殖動態

表3,9代目1週の感染細胞抽出液をプラスチック瓶およびカバースリップ培養S. la/Ve-1 細胞に接種、連日回収し、それぞれ RIA, IFA に供した。図中の矢印は稀釈終末点法により感染価を測定した試料を示す。感染細胞抽出液の10倍階段稀釈列をつくり、各稀釈列の0.1ml を S. la/Ve-1 細胞の96穴マイクロプレート(Corning 社、米国) 培養 5 穴、チェンバースライド(Miles 社、米国) 培養 5 穴、チェンバースライド(Miles 社、米国) 培養 5 穴、チェンバースライド(Miles 社、米国) 培養 5 穴、チェンバースライド培養は IFA により、チェンバースライド培養は IFA により、HAV 抗原活性を検索した。50 にはいているにはいている。50 にはいている。50 にはいる。50 にはいる。5

●:RIA による HAV 抗原活性 (cpm×10⁻⁴)○:蛍光陽性細胞比率 (%).

後)、ウイルス抗原は細胞質内、殊に核周辺部に点状、または、粒状の蛍光の集積として観察された(図3)、また、接種7日後の感染細胞については、その抽出液を対象としてウイルス粒子の存在を稀釈終末点法による感染価測定、並びに CsCl 平衡密度勾配遠心法により確認した(図2、矢印)、稀釈終末点法による感染価は RIAと IFA により、共に 10^{8.5} TCID₅₀(50% tissue culture infectious dose)/ml と算出された. CsCl 平衡密度勾配遠心法では浮遊密度1.32g/cm³に単一ピークを形成する HAV 抗原値が検出され(図4)、当該ピーク分画を免疫電顕法により観察、直径27nmの均等球形粒子多数の存在を認めた(図5).

老 图

本研究ではマーモセット肝細胞と既存細胞株を融合, HAV 高度感受性細胞株の樹立を試みた、当初の実験で は既存細胞株としてハムスター由来の CHO 細胞を用い た、既報²⁵⁾ に基づき同細胞より HGPRT⁻変異株の採

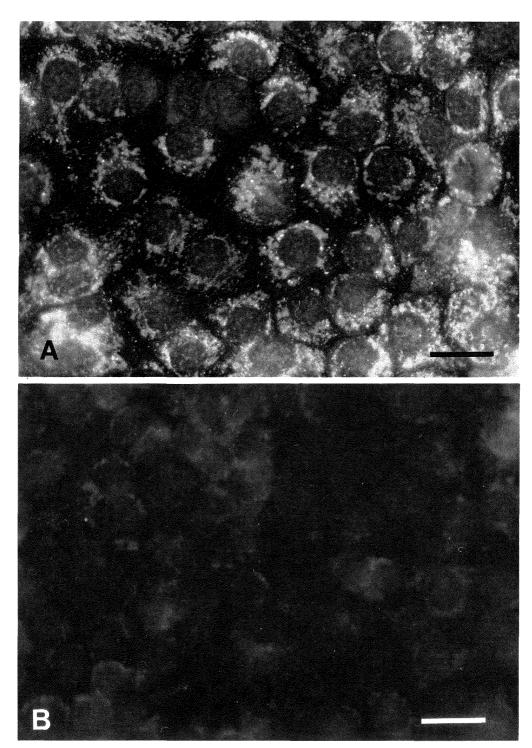


図 3 HAV 感染 S. la/Ve-1 細胞の蛍光顕微鏡像 (A) 感染 S. la/Ve-1 細胞 (表 3 の 5 代目 1 週細胞). (B) 非感染 S. la/Ve-1 細胞 図中のスケールは 30μ m.

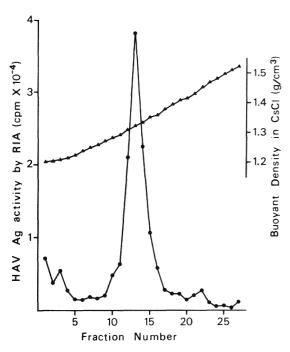


図 4 CsCl 平衡密度勾配遠心法による感染 S. la/Ve-1 細胞内 HAV 粒子の回収

プラスチック瓶 6 個分の感染細胞をその上清とともに回収,凍結融解,音波処理,フルオロカーボン処理し, $114,000 \times g$,4 時間遠心後,沈渣を $1.8 \mathrm{ml}$ の CsCl $0.01 \mathrm{M}$ Tris-HCl pH 7.4 溶液(密度 $1.19 \mathrm{g/cm}^3$)に浮遊,二相の CsCl 溶液(1.49, $1.34 \mathrm{g/cm}^3$)に重層し, $114,000 \times g$,22時間遠心した.各分画は 100 倍稀釈し,HAV 抗原活性を RIA で測定した.

●:RIA による HAV 抗原活性 (cpm×10-4)

▲: 浮揚密度 (g/cm³)

取が容易と考えたことによる。事実、CHO 細胞から 8-アザグアニン耐性細胞の採取は容易であった。しかし、同耐性細胞とマーモセット肝細胞の融合による雑種細胞株の内、継代 $10\sim12$ 代の時点でウイルス感受性であったもの(表1、C. ja/CHO -3 および -4 細胞)も、以降の継代により当該感受性を喪失した。両細胞由来動物種の懸隔によるものと考えられる。実際、同亜目に属するマーモセット肝細胞とアフリカミドリザル腎由来Vero 細胞の融合による雑種細胞株では、継代 5 代の時点で検知されたウイルス感受性は報告時点、継代35代に到るまで安定して保持された。

マーモセット肝-Vero 雑種細胞株, S. la/Ve $-1\sim$ -4 はいずれも透明, 大型の核を有し, 上皮細胞様で, 肝細胞と Vero 細胞の中間形態を示した. 一部の雑種

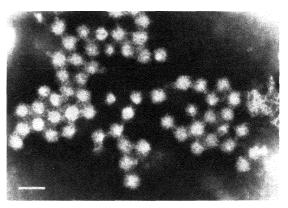


図 5 感染細胞抽出液中の HAV 粒子の 免疫電顕像

図4の HAV 抗原のピークを形成する分画(No. 12~14)をプール, 5ml の 0.01M Tris-HCl 溶液 pH 7.4 で稀釈, $114,000 \times g$, 4時間の遠心によりウイルスを沈 渣とし, 50μ l の蒸留水に浮遊, 等量の抗 HAV サル抗体(100倍稀釈)と混合, 37° C 1時間, さらに 4° C 一晩反応させた後, 10,000回転 1時間遠心, 沈渣を 50μ lの蒸留水に再浮遊し, 電顕グリッドに載せ, 2% リン酸タングステン酸で陰性染色し, 電顕観察した. 図中のスケールは 50nm.

細胞では IFA によりアルブミン産生を認めた(成績略). HAV 感受性雑種細胞株における HAV の増殖効率は、マーモセット肝初代培養細胞におけるそれに匹敵するものであった. Vero 細胞も HAV 感受性とされるが、同細胞におけるウイルス増殖は限定増殖に止まり、累代継代は困難である¹²⁾¹³⁾. マーモセット肝-Vero 雑種細胞の HAV 感受性は肝細胞形質に基づくものと考える.

マーモセット肝-Vero 雑種細胞の HAV 感受性は肝, 便両ウイルスを接種材料として検索した. 肝ウイルス接種実験では接種 2 週後 S. la/Ve -1 細胞, 接種 4 週後 S. la/Ve -3 および S. la/Ve -4 細胞がウイルス抗原陽性になり、接種 $6\sim8$ 週後にはいずれの細胞も同レベルの抗原活性, $2\sim4\times10^4$ 台の cpm 値,を与えるに到った. この傾向は便ウイルス接種実験でも同様であり,接種 4 週後 S. la/Ve -1 細胞,接種8週後 S. la/Ve -3 および S. la/Ve -4 細胞が抗原陽性となり,盲継代4週後にはいずれの細胞も 1×10^4 台の抗原価(cpm 値)を与えた. ウイルス材料接種後,抗原活性発現までの潜伏期に多少の長短はあるが,S. la/Ve -1, -3, および -4 細胞は同程度に HAV 感受性と解される

患者検体からの HAV 分離については、アカゲザル胎児 腎細胞由来の FRhK6 細胞が有用との Provost らの 報告がある261. 同細胞に患者便の4%抽出試料を接種, 継代を含め8週後、IFAよりウイルス抗原の発現を認 めたという。同じ見地から Binn らは FRhK6 細胞を 含め各種のサル細胞を比較、HAV に対してはアフリカ ミドリザル腎初代培養細胞(AGMK)が最も感受性に優 れるとした4). この場合は、検体(5,または10%便抽 出試料) 接種 4~12週後に IFA および RIA により有 意の抗原活性が検出されている. 先述の通り,マーモセッ ト肝-Vero 雑種細胞による時は、10%患者便抽出試料接 種4~8週後に抗原活性の発現を認めた. ウイルス材料 の由来を異にするため、一概の比較はできないが、これ ちの知見はマーモセット肝-Vero 雑種細胞が FRhK6 細胞、並びに AGMK 細胞と同等、またはそれ以上の HAV 感受性を具え、臨床検体の検索にも十分有用であ ることを示唆する.

マーモセット肝-Vero 雑種細胞における HAV の増 殖動態は、S. la/Ve -1 細胞により検索した. 接種ウ イルスは同細胞9代継代の馴化 HAV である. 感染細 胞における HAV 感染価は 108.5 TCID50/ml であっ た. Provost によれば HAV 高度感受性細胞の一つ, FRhK6 細胞における馴化 HAV の増殖は接種6日後 極閾に達し、同時期の感染価は 108TCID₅₀/ml であっ たという³⁾. Binn らは、AGMK 細胞における馴化 HAV の増殖を述べ、接種 2 週後の感染価、10^{6.5} TCID₅₀/ ml を報告している4). また、Vallbracht らは HAV 持続感染ヒト胎児肺線維芽細胞における最高感染価とし て $10^7 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ を記載している⁷⁾. これらの実験系 では、細胞当たりの感染多重度 (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.しかし,仮にウイルス増殖の極 期における単位面積当たりの感染価が、当該細胞のウイ ルス感受性を反映するとすれば、S. la/Ve -1 細胞の それはこれまでの報告例を上廻る最高値を記録しており. このことから同細胞は現時点で HAV に対し最も感受 性の高い細胞の一つと言えよう.

HAV は培養細胞に CPE を誘発しないとされている。マーモセット肝-Vero 雑種細胞でもウイルス増殖に伴う CPE の発現は認められなかった。さらに,HAV感染 S. Ia/Ve-1 細胞はウイルス増殖極期相当の抗原活性を保持して,非感染細胞と同等の効率で継代培養できた。同細胞では極関レベルの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。同様の知見が、HAV感染ヒト胎児肺線維芽細胞⁷⁾ やアカゲザル胎児腎細胞株 (FRhK4)¹⁰⁾についても報告されている。両細胞ともウイルス増殖最盛期相当の感染価、または抗原価を保持したまま継代が可能という。今回の S. la/Ve -1 細胞を含め、これらの HAV 持続感染細胞はウイルスやウイルス抗原の大量採取に有利である。

現時点で HAV の試験管内増殖は、主としてサル腎 初代培養細胞を宿主としている3)4)5)6)8). サル腎初代培 養細胞は HAV 感受性に優れるが、累代継代はできず、 また、しばしば宿主内在ウイルスの迷入を伴い実験の障 害となる^{2) 3) 4) 9)}. 加えて宿主個体の供給に限界があり, 入手が容易でない. サル腎由来樹立細胞株使用の報告4) 5) 6) 8) 10) 11) 12) 13) 14) もあるが、初代培養細胞に比べ感受 性に劣る. 既述の通り、マーモセット肝細胞に同亜目の アフリカミドリザル腎由来 Vero 細胞を融合、HAV 高度感受性雑種細胞株を得ることができた. 得られた細 胞株は HAV に対しサル腎初代培養細胞と同等、また はそれ以上の感受性を示し,通常の培養法により継代培 養が容易である. 雑種細胞株は HAV の試験管内宿主 として基礎, 臨床研究にきわめて有用と思われる.また, 一般に肝炎ウイルスは肝組織で効率よく増殖するが、通 常の培養細胞での増殖は難しい、雑種細胞の HAV 感受 性は肝細胞形質に基づくものと解される. 肝実質細胞を 既存樹立細胞株に融合させて肝細胞株を得るという今回 の方策は、HAV 以外の肝炎ウイルスの試験管内増殖 系開発にも適用の価値のあるものと考える.

結 註

ポリエチレングリコールを用いた細胞融合法によりマーモセット肝細胞に CHO 細胞、および Vero 細胞を融合、HAV 感受性雑種細胞株の樹立を試み、肝-CHO 雑種細胞として C. $ja/CHO-1\sim-6$ 0 6 株,肝-Vero 雑種細胞として S. $la/Ve-1\sim-4$ o 4 株を得た、これらの雑種細胞株にマーモセット肝由来 HAV (肝ウイルス) および患者便由来 HAV (便ウイルス) を接種、ウイルス増殖を RIA および IFA で追跡、以下の知見を得た。

- 1) 肝-CHO 雑種細胞株の内, C. ja/CHO -1, -3, および -4 細胞に便ウイルスを接種, その内 2 株 (C. ja/CHO -3, -4) に培養継代10~12代の時点で一時的なウイルス抗原の増生を認めた.
- 2) 肝-Vero 雑種細胞 4 株に肝および便ウイルスを接種, その内 3 株 (S. la/Ve -1, -3, および -4)

に同等にウイルス抗原の増生を認めた. ウイルス抗原活性は、肝ウイルス接種6~8週後、また、便ウイルスでは継体を含め接種10~12週後、極閾レベルに達した.

- 3) S. la/Ve -1 細胞に10倍濃縮肝ウイルスを接種,継代を試み,感染細胞におけるウイルス抗原活性平衡値が継代初代で接種後4週後,6代以降では,接種1週後に達せられることを認めた.
- 4) 肝ウイルス感染 S. la/Ve 1 細胞の培養継代を試み、同細胞が極閾レベルのウイルス抗原価を保持しながら、非感染細胞と同等の効率で継代可能であることを認めた。
- 5) S. la/Ve -1 細胞において培養細胞馴化肝ウイルスの増殖は、接種 7 日後平衡値に達し、感染価 $10^{8.5}$ TCID $_{50}$ /ml を与え、また、同時点で感染細胞抽出試料に多数のウイルス粒子の存在を確認した。

以上の所見より、S. la/Ve-1、-3、および -4 細胞は HAV に高度に感受性であり、同ウイルスの試験管内宿主として極めて有用と考えた。

辛 は

御指導いただきました浜田忠弥博士(本学ウイルス学教室教授),並びに市田文弘博士(同第三内科教授)に深く感謝申し上げます。また,電顕観察で御協力いただいた第三内科渡辺俊明博士に感謝いたします。

参考文献

- Hersey, D.F. and Eugene, D.S.: Viral agents in hepatitis. Lab. Invest., 19: 558~ 572, 1968.
- 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.
- Provost, P.J.: In vitro propagation of hepatitis A virus. In Gerety, R.J. (ed): "Hepatitis A." Orlando: Academic Press, pp. 245~261, 1984.
- 4) Binn, L.N., Lemon, S.M., Marchwicki, 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 cultures. J. Clin. Microbiol., 20:28~33, 1984.
- 5) Bradley, D.W., Schable, C.A., McCaustl-

- and, 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.
- 6) 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.
- 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.
- 8) Venuti, A., di Russo, C., del Grosso, N., Patti, A.-M., Ruggeri, F., de Stasio. P.R., Martiniello, M.G., Pagnotti, 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 doble stranded replicative form. J. Virol., 56: 579~588, 1985.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) Lemon, S.M., Binn, L.N. and Marchwicki, R.H.: Radioimmunofocus assay for quantitation of hepatitis A virus in cell cultures. J. Clin. Microbiol., 17: 834~839, 1983.
- 15) Flehmig, B., Vallbracht, A. and Wurster, G.: Hepatitis A virus in cell culture. III. Propagation of hepatitis A virus in human embryo kidney cells and human embryo fibroblast strains. Med. Microbiol. Immunol.. 170: 83~89. 1981.
- 16) Gauss-Mueller, V., Froesner, G.G. and Deinhardt, F.: Propagation of hepatitis A virus in human embryo fibroblasts. J. Med. Virol., 7: 233~239, 1981.
- 17) Provost, P.J., McAleer, W.J. and Hillemann, M.R.: In vitro cultivation of hepatitis A virus. In Szmuness, W., Alter, H.J. and Maynard, J.E. (eds): "Viral hepatitis" Philadelphia: Franklin Institute Press, pp. 21~30, 1982.
- 18) Deinhardt, F. and Deinhardt, J.B.: Animal models. In Gerety, R.J. (ed): "Hepatitis A" Orlando: Academic Press, pp. 185~204, 1984.
- 19) Shibayama, T., Kojima, H., Ashida, M., Hirose, S., Sato, A., Kamimura, T., Hamada, C., Shimizu, 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.

- 20) Karayiannis, P., Enticott, J.M., Moore, D., Pignatelli, M., Brenes, F., Scheuer, P.J. and Thomas, H.C.: Hepatitis A virus replication in tamarins and host immune response in relation to pathogenesis of liver cell damage. J. Med. Virol., 18: 261~276, 1986.
- 21) Puck, T.T., Cieciura, S.J. and Robinson, A.: Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. J. Exp. Med., 108: 945~956, 1958.
- 22) 安村 美博,川喜田愛郎: 組織培養に依る SV 40 の研究 日本臨床, 21:1201~1219, 1963.
- 23) Littefield, J.W.: Three degree of guanyl acid-inosinic acid pyrophosphorylase deficiency in mouse fibroblasts. Nature, 203: 1142~1144, 1964.
- 24) 中村敏一,青山和司,市原 明: 分離肝細胞の調整と初代培養法,蛋白質,核酸,酵素,別冊24:55~76.1981.
- 25) Siminovitch, L.: On the nature of heriditable variation in cultured somatic cells. Cell, 7: 1~11, 1976.
- 26) Provost, P.J., Giesa, P.A., McAleer, W.J. and Hilleman, M.R.: Isolation of hepatitis A virus in vitro in cell cultures directly from human specimens. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 167: 213~221, 1981.
- 27) Worton, R.G. and Duff, C.: Karyotyping. Methods Enzymol., 58: 322~344, 1979.
- 28) Reed, L.J. and Muench, H.: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg., 27: 493~497, 1938.

(昭和61年10月21日受付)