

ECHO ウイルス11型の性状に関する研究

I. Plaque 変異ウイルスについて

陳 境 津

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学部門

(前主任: 福見 秀雄 教授)

(現主任: 林 薫 教授)

(Received for publication May 18, 1971)

Studies on Mutants of ECHO Virus Type 11

I. Characteristics of Plaque Variant Viruses

Jeng Jieng CHEN

*Department of Virology, Institute for Tropical Medicine,
Nagasaki University*

(Ex-Director: Prof. H. FUKUMI, and Director: Prof. K. HAYASHI)

Abstract

Gregory strain of ECHO virus type 11 contained two types of plaque variant viruses. The distinguishable characteristics between them are presented as follows: the properties of large plaque (Lp) variant virus are that 4.0 to 6.0 mm in diameter of plaque size, less titer of the virus produced in infected HeLa cells than that of small plaque (Sp) variant virus, poor adsorption onto HeLa cells, weak cytopathogenicity, thermolability at 50°C, sensitivity to the interferon-like substance prepared from culture fluids of Sp virus carrier HeLa cells and to be easily neutralized with anti-Lp and anti-Sp rabbit serum are observed. On the other hand, the peculiarity of the Sp variant virus is that 0.5 to 1.0 mm in diameter of plaque size, high adsorption onto HeLa cells, intensive cytopathogenicity, thermostability at 50°C, weak sensitivity to the interferon-like substance and remarkable breakthrough-phenomenon are demonstrated.

は じ め に

ECHO ウイルス 11型は無菌性髄膜炎や発疹症の原因ウイルスとして知られ我国でも上記症状を示した患児の散発例から本ウイルスの分離が報告されている(多ヶ谷 1970)。

また本ウイルスは組織培養細胞を用いた風疹ウイルスの増殖を知るための干涉ウイルスとして日常使用され、そのウイルス原株は広く各地の研究機関や検査部門の施設で保存され実験に供されている現況である。

著者は ECHO ウイルス 11型と HeLa 細胞の系における持続感染の機作に関する研究経過中に ECHO

ウイルス11型の原株に plaque の大きさを異にする2種の変異ウイルスが混在しているのを認めた。これらの二種の変異ウイルスは HeLa 細胞に対する変性効果や耐熱性、特に変異ウイルスの持続感染細胞が産生するインターフェロン様物質に対する感受性などで相互に著しく異った性状を有していることを知った。

上記の変異ウイルスの性状に関する研究は ECHO ウイルスによる持続感染の解析や腸管系ウイルス相互の感染様式の分析的考察に重要な資料を提示するので以下にその実験成績を報告する。

実 験 材 料 と 実 験 方 法

ウイルス： ECHO ウイルス 11型 (Gregory 株) は国立予防衛生研究所腸内ウイルス部から風疹ウイルス M 33株は熊本、化学及び血清研究所からそれぞれ分与をうけた。

細胞： HeLa 細胞及びミドリザル腎細胞の初代及び二代継代培養のものを用いた。前者は当研究室で継代されたものであり、後者は熊本化学及び血清研究所から使用のたびに分与を受けた。HeLa 細胞は 10% 牛血清加 Hanks 液、ミドリザル腎細胞は 10% 牛血清加 Eagle 液で培養し、維持培地は HeLa 細胞には 2% 仔牛血清加 Hanks 液、ミドリザル腎細胞には 2% 仔牛血清加 Eagle 液を使用した。

Plaque 法： Barron 等 (1965) の方法に準じて行った。50 ml の Plaque 用培養瓶で培養された単層の HeLa 細胞を Puck 液で二回洗滌後ウイルス液 0.2 ml を加え 37°C 1時間吸着した。吸着後 2% 仔牛血清、1% Difco Noble 寒天、0.1% 酵母エキス、0.5% ラクトアルブミン水解物加 Earle 液を 4.5 ml ずつ一次重層した。37°C で 6 日間静置培養した後、0.1% 中性紅溶液 16.5 ml を上記一次重層寒天培地 200 ml に加えたものを 4.5 ml ずつ二次重層し、20°C 一夜保った後、plaque の性状を観察すると共にその数を算定した。

Plaque 変異ウイルスの純化： 発育培地を除いて Puck 液で洗滌した HeLa 細胞の単層培養に ECHO ウイルス 11型保存株の 10 倍階段稀釈液 0.2 ml を加え上記の plaque 法に従って培養した。この際、生じた大、小二種の plaque の中心を白金耳で穿刺し維持培地に替えた HeLa 細胞培養の試験管に接種し、37°C で培養した。増殖したウイルスを再び単層培養の

HeLa 細胞を用い plaque 法を行った。本法を数回反覆して単一性状の plaque のみ出現することを確かめて plaque 変異ウイルスの純化株とした。

一段増殖実験： 発育培地をすてて、Trypsin 消化し Puck 液で洗滌した HeLa 細胞を維持液に再浮游したものを二分し、それぞれに大小の plaque を示した変異ウイルス液を $moi=1$ の割合に加え、37°C の恒温槽の中でゆるやかに振盪しつつ 1 時間吸着感染した。これに 10 倍稀釈抗血清を等量に加え 37°C 30 分保って未吸着ウイルスを中和し、再び遠心洗滌して維持培地に再浮游した。この感染細胞浮游液を 5 ml ずつ、予め温めておいた 50 ml 容の plaque 用培養瓶に分注し 37°C に静置して培養した。その後、所定の時間に 2 本ずつ取り出して維持液を別に保存した後、細胞を Ruber-policeman で剥離し新しい維持液 5 ml に再浮游してウイルス量の測定に供するまで -70°C に保存した。ウイルス量の測定は HeLa 細胞培養の試験管法で行った。保存した培養維持液及び細胞の凍結融解遠心上清 (富永製 No.90UV 冷却遠心機 No. 30 ロータを使用 7000 r.p.m. 30分遠心上清) をそれぞれ 10 倍階段稀釈し、その 0.2 ml ずつを接種した。Plaque 法では吸着後一次寒天培地を重層した後、6 日後に二次寒天を重層し、生じた plaque を算えた。試験管法ではそのまま 37°C に培養、4 日目に細胞変性の有無を指標として観察し、ウイルス量はいずれも Reed and Munch 法で算定した。

吸着試験： 単層の培養細胞を使用した実験では、plaque 用培養瓶の HeLa 細胞培養を Puck 液で洗滌し、これに 100 PFU/0.5 ml のウイルス液を加え

37°C で所定の時間吸着させた。本法では未吸着ウイルスを算定するため、培養液を別に -70°C に保存した。所定の時間、ウイルスの吸着を行った細胞は Puck 液で再び洗滌して一次寒天を重層し 37°C で 6 日間培養した後、二次寒天培地を重層、20°C にて一夜保った後 plaque 数を算えた。浮游細胞を使用した実験では単層培養の HeLa 細胞を Trypsin で消化、洗滌し、維持液に再浮游したものに $moi=1$ の割合にウイルス液を加え 37°C の恒温槽で振盪し所定時間吸着させた。これを富永製 CR-85E 遠心機で 1500 回転 15 分間遠心し上清中の未吸着ウイルスを plaque 法で算定したほか、沈渣の細胞は維持液に再浮游して予め plaque 用培養瓶に単層培養された HeLa 細胞の上に移しそのまま一次寒天を重層し常法の plaque 法で培養した。

変異ウイルスによる細胞変性効果の比較： 維持培地に再浮游した HeLa 細胞に $moi=0.45$ の割合にウイルス液を加えそのまま 5 ml ずつ培養瓶に分注し 37°C に静置培養した。所定日数毎に培養瓶 2 本ずつ取り出し維持液を除き静かに洗滌した後ガラス壁に附着している細胞を Trypsin 消化して集め血球計算盤でその数を算えた。

実 験 成 績

Plaque 変異ウイルスの分離： ECHO ウイルス 11 型として保存されている標準株の Gregory 株は Fig. 1a に示された様に直径 4.0~6.0 mm “Large plaque variant (Lp)” 及び直径 0.5~1.0 mm “Small plaque variant (Sp)” の plaque 性状を示す 2 種の変異ウイルスが認められ、当研究室保存の原株では Lp ウイルスは 1.6×10^3 PFU/0.2 ml, Sp ウイルスは 8.4×10^4 /0.2 ml の割合に含まれ、その比は Lp : Sp = 1 : 52 であった。既述のように HeLa 細胞を用いて変異ウイルスを plaque 純化したのが、それらは 60 代継代を重ねても Lp ウイルス及び Sp ウイルスが相互に混在して出現することなく純化した 2 種の変異ウイルスは HeLa 細胞で継代する限り同一形態の plaque のみ出現しその plaque 性状は安定していることがうかがわれた (Fig. 1a, 1b, 1c)。

変異ウイルスの HeLa 細胞内増殖： 浮游細胞を用いて $moi=1$ で感染を行った際の一段増殖実験の成績は Fig. 2 である。Lp 及び Sp 変異ウイルスは細胞内ウイルス量及び放出ウイルス量とも 4 時間目から

熱抵抗試験： 単層培養の HeLa 細胞にウイルスを接種し十分に細胞変性が発現した後細胞を Ruberpoliceman で剝離し、低速遠心によって集めた沈渣の細胞を $MgCl_2$ 及び $CaCl_2$ を除いた磷酸緩衝液に浮游し再び数回遠心洗滌した後、同液に再浮游した。これを凍結融解し、その遠心上清（一段増殖実験の場合に準じた方法）をウイルス液として供試した。このウイルス液 1 ml ずつを試験管に分注し 50°C の浴槽で振盪しつつ加温し、所定時間後に 2 本ずつ試験管を取り出して直ちに氷冷した後、-70°C に保存した。ウイルス量の測定は HeLa 細胞を使用した試験法によった。

免疫血清の作成と中和試験： Plaque 純化したウイルス液 (Lp は 10^6 PFU/ml, Sp は 6×10^6 PFU/ml) の 5 ml を 1 週間隔で家兎に 3 回静注し、最終注射から 10 日後に採血した。

中和試験には試験管培養の HeLa 細胞を用い、抗血清及びウイルスの混液を 37°C 1 時間保った後、その 0.2 ml ずつを各稀釈 3 本の細胞培養の試験管に接種し、逐日細胞変性の程度を観察した。そして 100 TCID₅₀/0.2 ml を中和するに要する抗血清の最高稀釈度を中和抗体価とした。

急上昇するのが認められるが Log 10 の指数を指標として細胞内ウイルス量をみると 4 時間目 Lp 3.75, Sp 4.75, 8 時間目 Lp 4.50, Sp 5.50, 14 時間目 Lp 4.75, Sp 6.0, 24 時間目 Lp 5.50, Sp 6.75 と Lp ウイルスの増殖は Sp ウイルスのそれに比べてわずかに低い値を示している。しかし、放出ウイルスは 4 時間目 Lp 4.25, Sp 4.50, 14 時間目 Lp 4.50, Sp 5.25, 24 時間目 Lp 5.25, Sp 5.50 であって、ウイルスの放出にはほとんど差がないことを示している。

変異ウイルスの HeLa 細胞への吸着： 成績は Fig. 3 に示されるが実験 1 では単層培養細胞を実験 2 では浮游細胞を使用した場合である。いずれも同様の傾向を示し、Sp ウイルスの吸着率は 10 分で 44~67.7%、20 分で 68~70.5%、60 分で 73~88.8%、Lp ウイルスは 10 分で 13.3%、20 分で 26.3%、60 分で 37.7% を示し、Lp ウイルスの HeLa 細胞への吸着は Sp ウイルスのそれに比べて著しく悪いことが明らかであった。

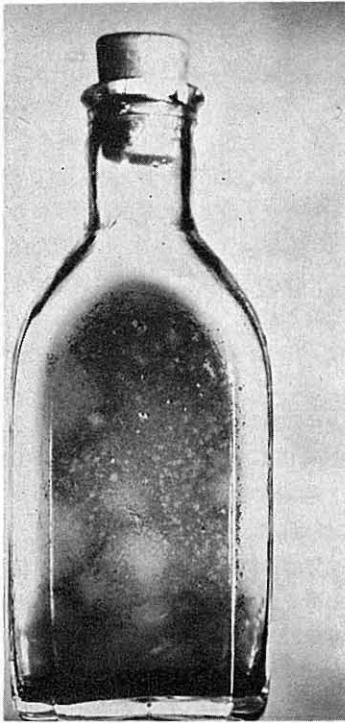


Fig. 1a Plaque formation of ECHO virus type 11, Gregory strain.

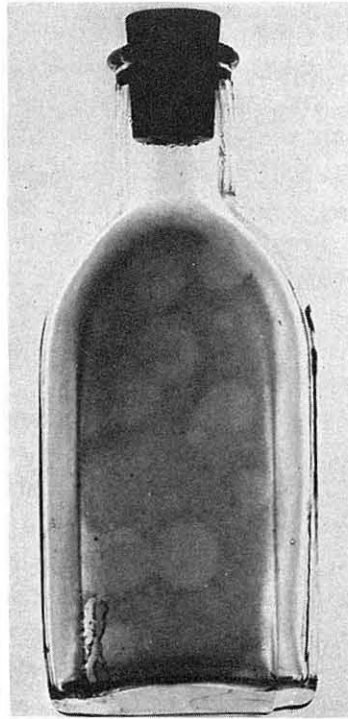


Fig. 1b. Large plaque formation of plaque purified strain.

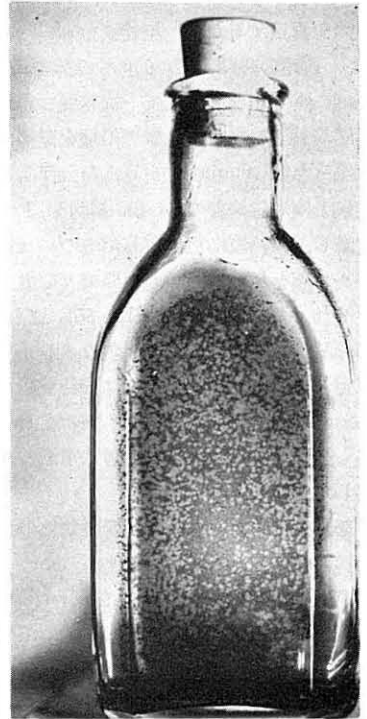


Fig. 1c Small plaque formation of plaque purified strain.

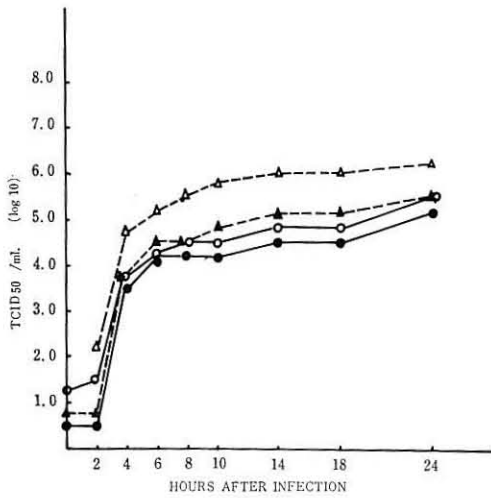


Fig. 2. Growth curve of Lp and Sp variant viruses in HeLa cell culture(moi=1.0).
 ○—○ cell associate } large plaque variant (Lp).
 ●—● fluid }
 △.....△ cell associate } small plaque variant (Sp).
 ▲.....▲ fluid }

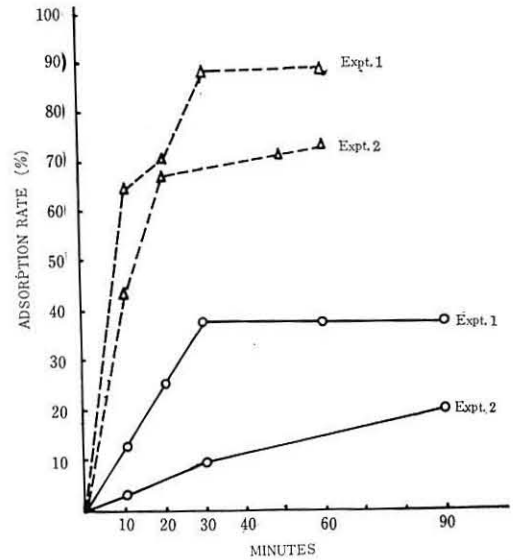


Fig. 3. Adsorption rate of Lp and Sp variant viruses to HeLa cells. Experiment 1 and 2 are presented in the text.
 ○—○ Lp variant virus
 △.....△ Sp variant virus

変異ウイルスの細胞変性効果： Lp 及び Sp 変異ウイルスをそれぞれ $moi=0.45$ で浮游 HeLa 細胞に感染し 37℃ で静置培養した後ガラス壁に附着し増殖する細胞数を算定した結果を Fig. 4 に示した。Sp 変異ウイルスによる細胞変性は著明で3日目では $1 \times 10^4/ml$ 以下の生細胞数であったが、Lp 変異ウイルスでは $1.1 \times 10^5/ml$ の細胞がなお算定された。3日目の培養液内のウイルス生産量は Sp 及び Lp 変異ウイルスともそれぞれ 2.4×10^6 PFU/ml, 2.0×10^6 PFU/ml を示し放出ウイルス量には大差を認めなかった。

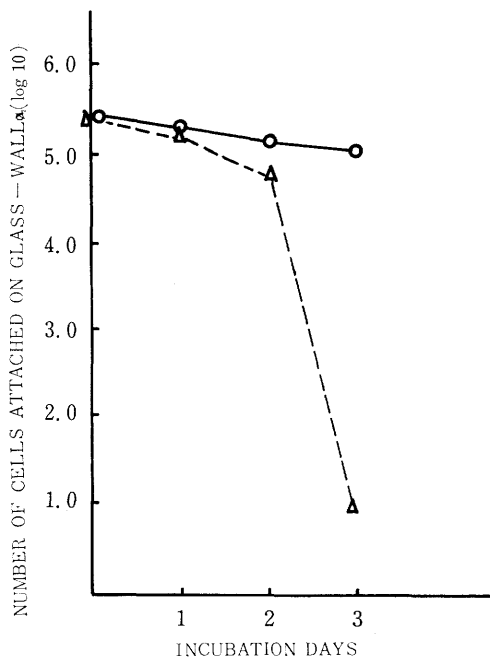


Fig. 4. Cytopathic effect of Lp and Sp variant viruses to HeLa cells.

○—○ Lp variant virus
△……△ Sp variant virus

変異ウイルスの熱抵抗性： Lp 及び Sp 変異ウイルスを $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 及び $CaCl_2$ が添加された磷酸緩衝液に浮游した場合 60℃ 30分の加熱ではウイルス量の低下はほとんど認められず、腸管系ウイルス一般の性状を示した。しかし Mg 及び Ca イオンを除いた磷酸緩衝液を用いた場合 Lp変異ウイルスは 50℃ 15分ではほとんど不活化され、 $10^{1.5}$ TCID₅₀ 以下を示し、Sp 変異ウイルスは非加熱で $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml, 50℃ 20分加熱で $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml を示し、両変異ウイルス間に著しく耐熱性に差が認められた。

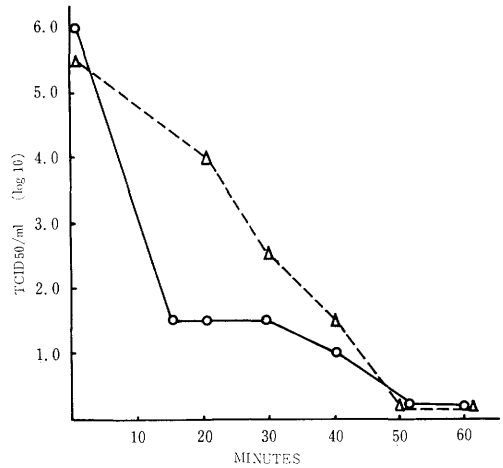


Fig. 5. Effect of heat on infectivity of Lp and Sp variant viruses.

○—○ Lp variant virus
△……△ Sp variant virus

変異ウイルスの血清学的性状： Lp 及び Sp ウイルスとその抗血清の組合せで行った中和試験の成績は Table 1 である。本表で特に注目されることは、抗 Lp ウイルス血清は Lp ウイルス及び Sp ウイルスともよく中和するが、抗 Sp ウイルス血清によって Lp ウイルスはよく中和されるにもかかわらず、自原の Sp ウイルスは却って中和され難いことである。即ち、Sp ウイルスは自原の抗血清による中和の場合、著しい breakthrough 現象を認め、培養5日目では僅かに 10倍稀釈血清でのみ中和された。

Table 1. Neutralization test between Lp or Sp variant virus and homologous or heterologous antiserum.

virus	antiserum against					
	Lp virus			Sp virus		
	incubation days					
	4	5	6	4	5	6
Lp	320	320	320	160	88	80
Sp	320	160	160	80	10	10

The inoculation of 100 TCID₅₀ of Lp and Sp variant virus have been presented complete cell destruction at the 4th day after inoculation.

変異ウイルスのインターフェロン様物質に対する感受性： 次報で詳細に述べられるが Sp 変異ウイルスの持続感染細胞で 102代継代で既にウイルスの放出を認めなくなった細胞の培養液中にはインターフェロン様活性があることが判った。インターフェロンの調製は常法に従って上記の培養液から作成した試料を用い、その 10倍稀釈溶液で処置した HeLa 細胞培養にそれぞれ Sp ウイルス及び Lp ウイルスを感染し 24時間後のウイルス産生量を測定した。Table 2 にみるように Sp ウイルスでは 16%、Lp ウイルスは 68%以上ウイルス産生が抑制され上記の試料のインターフェロン様活性に対する Lp ウイルスの感受性は Sp ウイルスのそれより著しく高いことが判った。

Table 2. Effect of interferon-like substance on the yield of Lp and Sp variant viruses in HeLa cells.

HeLa cells	virus	24 hours	% of decrease
treated with IF	Sp	3.17×10^4 PFU/ml	16%
not treated	Sp	3.73×10^4 PFU/ml	—
treated with IF	Lp	2.35×10^4 PFU/ml	68%
not treated	Lp	7.25×10^4 PFU/ml	—

IF…… interferon-like substance.

風疹ウイルスの増殖と変異ウイルスの被干渉能：

ミドリザル腎培養細胞に風疹ウイルス M 33株を感染させ 4 日間培養後、維持液を更新してさらに 4 日間培養後、Lp 及び Sp ウイルスをそれぞれ 100 TCID₅₀ 及び 1000 TCID₅₀ を接種し細胞変性の有無を観察した。風疹ウイルスを接種していない細胞では Lp 及び Sp ウイルスによる CPE は 4 日目に完全に発現したが、風疹ウイルスが増殖している試験管では Lp 及び Sp ウイルスによる CPE は発現せず、風疹ウイルスによる Lp 及び Sp ウイルス増殖が干渉されるのを認めた。(Table 3)

Table 3. Interference of rubella virus to the infection of Lp and Sp variant viruses in Green monkey kidney cells.

first challenge virus	second challenge virus	degree of CPE
rubella		0
rubella	Lp variant	0
Lp variant		卍
rubella	Sp variant	0
Sp variant		卍

卍： complete cell destruction.

考 察 と ま と め

ECHO ウイルスの中には同一ウイルス型に属しながら抗血清に中和される程度が異なる変異株が知られ、特に ECHO ウイルス 4 型及び 6 型について詳しいが、ECHO ウイルス 2, 5, 7, 11, 13, 15, 17, 22, 24, 25, 29, 30 及び 31 型にも同様の現象が認められ日常行う検査に当って ECHO ウイルスの同定の際、特に留意すべきことが指摘されている(多ヶ谷, 下条, 中野 他 1967)。しかし、これらの血清学的性状の変異の経験以外に ECHO ウイルスの変異に関する基礎的研究は意外に少く、Karzon, Pollock, and Barron (1959), Barron and Karzon (1965), Suto, Karzon and Bussell (1965) の ECHO ウイルス 6 型に関する一連の研究と Barron and Karzon (1961) による ECHO ウイルス 4 型に関する研究をみるにすぎない。ECHO ウイルス 11 型のサル腎細胞継代に伴う変異に関して須藤 (1963) が ECHO ウイルス 6 型の変異に類似の現象を認めると指摘しているが、それらにつ

いての詳細な記載を欠いているので明らかでない。

著者は ECHO ウイルス 11 型の感染形式の追究を目的とした ECHO ウイルス 11 型の持続感染に関する研究を進めるうち、須藤 (1963) が指摘したと思われる plaque 変異ウイルスが ECHO ウイルス 11 型の標準株である Gregory 株に混在するのを認めた。ECHO ウイルス 11 型の標準株は 1965 年当研究室で分与を受けて以来 HeLa 細胞で継代し保存ウイルス株として取扱っている。従って Barron and Karzon (1959) が明らかにした ECHO ウイルス 4 型の Pesascek, Du Toit 及び Shropshire の各株の性状変異や Barron and Karzon (1965) によって記載されている ECHO ウイルス 6 型の m 及び m⁺ 変異ウイルスがサル腎細胞で継代された場合の所見であるのと事情を異にしている。

サル腎細胞を用いて風疹ウイルスの増殖による Lp 及び Sp ウイルスの被干渉能は細胞変性を指標とする

限り両者の間に異った態度はみられなかったが、風疹ウイルスによって産生されるインターフェロンに対する Lp 及び Sp ウイルスの態度については明らかでない。

一方 plaque の形態性状を基にして ECHO 11, 4, 6, 各型の変異ウイルスについて比較対比すると ECHO ウイルス 11型の Lp ウイルスは, plaque の性状では ECHO 6型の B-phase である m⁺ 変異ウイルスや ECHO ウイルス 4型の Du Teit 株に相当し, 細胞変性作用が弱く, 細胞内ウイルス量が低いなどの点では類似の傾向といえる。

また ECHO ウイルス11型の Sp ウイルスは ECHO ウイルス 6型の S-phase である m 変異ウイルスや ECHO ウイルス 4型の Pesascek 株や Shropshire 株に相当し細胞変性作用が強く高い感染価を示すなどの点では同様の傾向である。

しかし, ECHO ウイルス11型の Lp 及び Sp ウイルスの血清学的性状は, ECHO ウイルス 4型や 6型の場合とやや趣を異にしている。即ち ECHO ウイルス 6型の S-phase (m 変異ウイルス) は自原抗血清ではよく中和され, B-phase (m⁺ 変異ウイルス) の抗血清では中和され難いが, m⁺ 変異ウイルスは両血清でよく中和されることが述べられている。(Barron and Karzon, 1959, 1965)。しかし, ECHO ウイルス 11型の Sp ウイルスは自原の抗血清では breakthrough が著しく中和され難いにもかかわらず, 抗 LP ウイルス血清で Lp ウイルスの場合と同じく却ってよく中和される特異な現象を示した。一方 Lp ウイルスは自原のみならず抗 Sp ウイルス血清でもよく中和された。これらの所見は ECHO ウイルス 6型の S-phase と Sp ウイルス及び B-phase と Lp ウイルスとはそれぞれ plaque 性状では類似であったが, 血清学的性状では全く逆の立場をとっていることを示している。

稿を終るに当り福見前教授の御指導に感謝し, 本研究に関する直接の御指導, 御校閲を得た林教授に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) Barron, A. L., and Karzon, D. T. : Studies of mutants of echovirus 6. I. Biologic and serologic characteristics. Amer. Jour. Epid., 81 : 323-332, 1965.
- 2) Barron, A. L., and Karzon, D. T. : Cha-

以上の所見から, ECHO ウイルス 11型の同定には Sp ウイルスを考慮した上で抗 Lp ウイルス血清を使用する必要があると考える。

著者が今回明らかにした ECHO 11型ウイルスの plaque 変異株の性状をまとめると次のようである。

1 Lp ウイルスの性状

- (1) plaque の大きさは 4.0~6.0 mm である。
- (2) HeLa 細胞内のウイルス量は Sp ウイルスより低い, 放出ウイルス量は Sp と変わらない。
- (3) HeLa 細胞への吸着は著しく悪い。
- (4) HeLa 細胞に対する変性作用は弱い。
- (5) 50°C 20分の加熱 (Ca, Mg イオンを除いた緩衝液) で著しく不活化される。
- (6) Rubella ウイルスによる被干渉は著明である。
- (7) Interferon 様物質に対して感受性である。
- (8) breakthrough 現象はない。
- (9) 抗 Lp ウイルス血清は自原ばかりでなく Sp ウイルスをも良く中和する。

2 Sp ウイルスの性状

- (1) plaque の大きさは 0.5~1.0 mm である。
- (2) HeLa 細胞内のウイルス量は Lp の 10倍以上であるが放出ウイルス量は Lp と変わらない。
- (3) HeLa 細胞への吸着はよい。
- (4) HeLa 細胞に対する変性作用は強い。
- (5) 50°C 20分の加熱 (Ca, Mg イオンを除いた緩衝液) では不活化され難い。
- (6) Rubella ウイルスによる被干渉は Lp と同じく著明である。
- (7) Interferon 様物質に対する感受性は弱い。
- (8) breakthrough 現象は著しい。
- (9) 抗 Sp ウイルス血清でも Sp ウイルスは中和され難い。

racteristics of ECHO 4 (Shropshire) virus isolated during epidemic of aseptic meningitis. J. Immunol. 87 : 606-617, 1961.

- 3) Karzon, D. T., Pollock, B. F., and Barron, A. L. : Phase variation in ECHO virus type 6.

Virology 9 : 564-576, 1959.

4) Suto, T., Karzon, D. T., Bussell, R. H., and Barron, A. L. : Studies of mutants of echovirus 6. II. Isolation from human alimentary tract. Amer. Jour. Epid., 81 : 333-340, 1965.

5) 多ヶ谷 勇 : 医学のあゆみ (WHO report) 72 : 369, 1969.

6) 多ヶ谷 勇, 下条寛人, 中野 稔 : 国立予防衛生研究所学友会編, ウイルス学実験学各論, P207, 1967, 東京.

7) 須藤恒久 : 猿腎細胞継代に伴う ECHO 11型ウイルスの変異, 第11回日本ウイルス学説会演説要旨, P44, 1963.