

# ECHO ウイルス11型の HeLa 細胞の染色体に及ぼす 形態的変化

平 伸 明

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学部門 (主任: 林 薫 教授)

(Received for Publication February 10, 1973)

## Morphological Study on Chromosomes of HeLa Cells Infected with ECHO Virus Type 11.

Nobuaki TAIRA

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

(Director : Prof. Dr. K. Hayashi)

### Abstract

Karyotype pattern of the cells persistently infected with small plaque variant viruses isolated from ECHO virus type 11 (gregory strain) was studied after several passages of subculture. The results are as follows.

1. The mode of chromosome number in infected HeLa cells was 67 (28%) with the range from 62 to 69, while those in uninfected cells (control) was 68 with the range from 66 to 68.
2. The karyotype analysis of infected cells revealed a decrease in groups B, C and D, and an increase in group A, F and G.
3. Such chromosome aberrations as double minutes and dicentrics were observed in infected cells.

### 緒 言

Hamper and Ellison (1961) は chinese hamster 胎児由来の,すでに異数化している株化細胞を用い, Herpes simplex virus を感染し細胞変性や分裂抑制

現象をみないが,感染細胞の染色体数の変動や染色体の欠失及び切断などの形態異常が認められることを始めて報告した.その後,同様の現象は Nichols and

Levan (1962), Aula (1963) (1965), Kuroki (1966), Aya and Makino (1966) などによって直接患者材料について観察され、また、培養細胞とウイルスとの組合せでは Koprowski (1962), Nichols and Levan (1964), Utsumi (1965) などによって観察されている。これらの報告から一般的に言えることは、ウイルス感染の結果認められる染色体異常は、染色体切断、染色体細分化、紡錘体形成異常が主な変化である。ウイルスによる染色体の切断は放射線やアルキル化剤など化学物質によって誘発されるものと多少異なり、delayed isolocus chromatid-type breaks (Östergren and Wakonig 1954) とよばれる染色分体レベルの切断または Gap を主とし、通常切断端の再結合はほとんどみられないという。実際に Makino (1965) は無菌性

髄膜炎患者の血液培養で高い比率に染色体異常、特に切断が認められることを報告している。

さきに、教室の陳 (1971) は ECHO ウイルス 11 型標準株である Gregory 株に大 (Lp), 小 (Sp) 2 種の plaque 変異ウイルスが含まれていることを指摘し、次いで Lp 及び Sp ウイルスと HeLa 細胞の組合せで持続感染系を得て、その機作について若干の解析を行なった。因みに 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その流行例が報告されている (多ヶ谷)。著者はウイルス感染細胞の染色体変化を系統的に追究する目的で実験を行なっているが先ず今回は上記の持続感染系について染色体の形態変化を概察し、興味ある 2, 3 の知見を得たので予報としたい。

### 実験材料と実験方法

**ウイルス:** 教室の陳 (1971) によって plaque 純化した Small plaque (Sp) 変異ウイルスを HeLa 細胞で継代し、実験のたびに large plaque (Lp) 変異ウイルスの混在しないことを確かめた。

**細胞及び持続感染系の樹立:** 10%牛血清及び 0.5%ラクトアルブミン加 Hanks 液で継代した HeLa 細胞を使用した。150ml 容の培養瓶に培養した単層培養細胞の培養液のをすて、磷酸緩衝生理食塩水 (PBS)pH 7.4 でよく洗條し、Spウイルス ( $10^{5.5}$ TCD<sub>50</sub>/0.2ml) 2ml を接種した。37°C 1 時間保った後、維持培地、2%仔牛血清加 Hanks 液を加え、37°C に培養を続けた。約 2 週間後 CPE をまめがれた細胞を残し、維持液を更新して培養を続けた。約 2 ヶ月後細胞集落をトリプシンで消化し、新めて継代培養した。増殖した細胞を更らに継代し、実験には 7 ないし 10 代目のものを使用した。その際の放出ウイルスの値は約  $10^{4.0}$ TCD<sub>50</sub>/0.2 ml であった。

**染色体の検査:** Sp ウイルス持続感染 HeLa 細胞並びに未感染の対照の HeLa 細胞は 10%牛血清及び 0.5%ラクトアルブミン加 Hanks 液で 150ml の plaque 用培養瓶を用いて 37°C で培養した。培養液 10 ml に

コルヒチン (0.5 $\mu$ g/ml) を注射針で 4~5 滴加え metaphase の状態で細胞分裂を止めた。コルヒチン滴加後 3 時間目に培養液をすて、0.2%トリプシン液を加え 37°C に 10 分間保温し、続いて瓶をふり細胞をガラス壁から剝離した。染色体の検査のための標本作製は Morehead (1960) の変法を用いた。すなわち上記の剝離した細胞浮遊液を遠心管に移し、遠心分離後上澄液のトリプシンを除き、0.8%クエン酸ソーダ液と 0.1MKCl 溶液を 4:1 に混合した液で 10 分間低張処理を行なった。これを再度遠心し、上清を捨て、メタノールと酢酸を 3:1 に混合したカルノア液で固定した。遠心分離によって固定液を 2 回交換し、細胞をカルノア液に再浮遊して、スライド上に毛細管ピペットで 2~4 滴おとした後細胞を含む液が一様に広がった頃をみはからって、ガスバーナー上で乾燥した。続いて位相差顕微鏡で染色体の拡がり具合を観察し Giemsa 液で染色し標本作製した。

**染色体の観察:** 持続感染 HeLa 細胞並びに未感染の対照 HeLa 細胞の metaphase をそれぞれ 40 個及び 20 個ずつ検鏡し顕微鏡写真とした後詳細に分析した。

### 実験成績

先ず未感染の対照 HeLa 細胞株の染色体数モードは 68 で、marker として B 群、G 群に 1 個ずつの異常を有していた (Fig. 1)。

**染色体数の分布:** Table 1 に示すように未感染対照 HeLa 細胞の染色体数の分布は 66-68 に集中し 8 を示す細胞が 65% を占めた。一方、ECHO ウイルス

**Table 1** Distribution of chromosome number in the cells of carrier state with ECHO virus type 11 and non-infected HeLa cells.

Cells	Chromosome	hexoploid	triploid							total of cells	
			62	63	64	65	66	67	68		69
non-infected		1	0	0	0	0	1	5	13	0	20
carrier state		1	1	4	6	5	9	11	2	1	40

**Table 2** Karyotyping in non-infected HeLa cells.

number of cell	group							ungrouped	Total
	A	B	C	D	E	F	G		
1	9	6	22	9	9	6	7		68
2	9	6	23	9	8	7	6		68
3	9	5	24	8	9	7	6		68
4	9	5	21	8	8	7	7		66
5	9	6	19	10	10	7	7		68
6	9	6	17	9	13	7	7		68
7	9	6	19	9	13	6	6		68
8	10	6	19	10	11	7	5		68
9	10	6	17	9	11	7	7		68
10	10	7	17	10	10	7	7		68
11	10	4	20	10	10	7	7		68
12	12	5	19	7	10	7	7		67
13	10	5	22	8	12	6	5		68
14	10	5	17	9	13	7	7		68
15	10	6	19	9	10	7	6		67
16	9	6	21	8	10	7	5	1	67
17	9	5	20	9	11	7	6		68
18	9	6	20	9	11	6	6		67
19	9	6	19	10	11	6	7		68
20	hexaploid								128
number of increase	8				15	14	10		
	19				19	19	19		
number of decrease		7	18	5					
		19	19	19					

Remarks : In the column of number of increase and decrease, numerator mean the total cells examined and denominator mean cells associated with changing the chromosomes.

**Table 3** Karyotyping in carrier state HeLa cells.

number of cell	group							ungrouped	Total
	A	B	C	D	E	F	G		
1	10	5	18	9	9	7	6		64
2	12	5	18	9	8	6	6		64
3	12	5	16	9	11	6	6		65
4	12	6	14	8	9	8	7		64
5	12	4	16	10	9	7	9		67
6	10	5	20	8	8	6	6		63
7	11	5	18	8	7	9	9		67
8	9	4	20	7	9	8	7	2	66
9	10	5	16	10	7	7	8		63
10	10	5	21	8	7	7	6		64
11	10	6	20	10	7	7	5		64
12	10	5	19	9	9	7	7		66
13	9	7	18	10	7	8	6		65
14	9	5	21	9	8	7	7		66
15	10	5	19	12	10	7	4		67
16	12	6	18	12	8	7	4		67
17	11	5	18	9	8	7	5		63
18	11	5	18	7	11	7	6		65
19	11	5	17	10	9	7	8		67
20	9	6	18	9	10	8	7		67
21	10	5	17	8	10	7	7		64
22	9	6	18	9	10	7	7	1	65
23	10	4	19	9	7	7	7		63
24	10	4	19	9	7	7	9		65
25	9	6	16	10	9	7	9		66
26	10	6	16	8	10	8	8		66
27	10	6	19	9	10	6	7		67
28	10	6	17	9	10	7	8		67
29	10	6	18	11	9	8	7		68
30	9	6	15	9	8	7	9		62
31	9	5	17	10	9	7	9		68
32	Dicentric and acentric								66
33	texasaploid								118
34	10	6	20	8	9	7	7		67
35	9	6	19	9	10	7	6		67
36	10	6	18	8	10	7	7		66
37	11	6	19	8	8	7	7		67
38	11	5	19	9	11	7	7		69
39	10	6	20	9	9	7	6		68
40	10	6	18	9	9	7	7	Double minutes	66
number of increase	29				13	34	25		
	38				38	38	38		
number of decrease		25	38	12					
		38	38	38					

Remarks : see Table 2.

**Table 4** Summary of variability in number of karyotyping of noninfected and carrier state HeLa cells with ECHO virus type 11.

HeLa Cells		Karyotype (number)						
		A	B	C	D	E	F	G
non-infected	increase	8/19				15/19	14/19	10/19
	decrease		7/19	18/19	5/19			
carrier-state	increase	29/38				13/38	34/38	25/38
	decrease		25/38	38/38	12/38			

11型持続感染細胞の分裂像では、62-69と広く分布し67のモード数を示す細胞が28%であった。また対照群も持続感染細胞群もそのほとんどが3倍体域に属し6倍体はそれぞれ1個ずつであった。

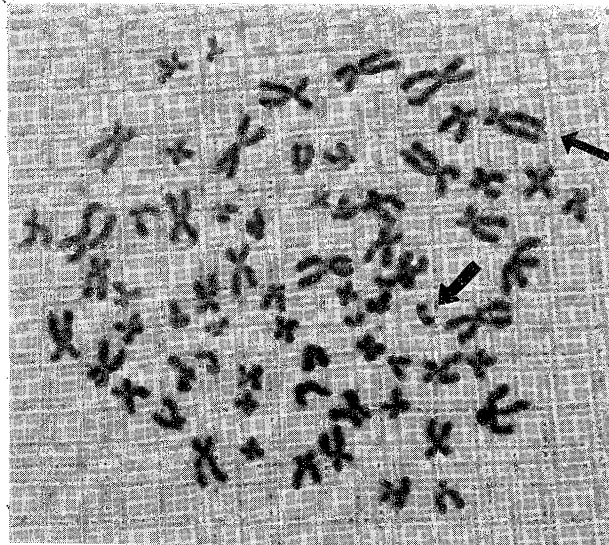
**核型分析：**非感染 HeLa細胞20個及び ECHO ウィルス11型による持続感染 HeLa 細胞40個について観察された染色体の群別とその数をそれぞれ Table 2 及び Table 3 に示し、これらをまとめて Table 4 に掲げた。

非感染 HeLa 細胞20個のうち、6倍体細胞1個が混在していたのでこれを除いた3倍体細胞19個について染色体数の増減を各群別毎に調べた結果、A群では8個、E群は15個、F群は14個、G群は10個の細胞にそれぞれ染色体数が増加しているのを認めた。また、B群染色体は被検細胞19個中7個、C群では18個、D群は5個の細胞に染色体数の減少を認めた。

それに反して ECHO ウィルス11型による持続感染細胞40個中に6倍体細胞1個と multiple aberration を示し核型分析が出来なかった細胞1個が含まれていたため、これらを除いた残りの38個の細胞について観察したところ、A群染色体は29個、E群は13個、F群は34個、G群は25個の細胞で染色体数が増加し、特にE群を除く各群染色体数の増加は非感染細胞の場合より著明であると考えられた。一方、B群は25個、C群は被検全細胞(38個)、D群は12個の細胞に染色体数の減少を認め、これは非感染細胞の場合に比べて3群ともその減少の傾向が著しいことが明らかであった。

以上の所見から、ECHO ウィルス11型の持続感染 HeLa 細胞では、B群、C群、D群染色体の著明な減少とこれを代償するかのようになり、A群、F群及びG群の染色体数の増加がみられた。

**染色体の形態的变化：** Fig. 1, 2, 3, に示すように持続感染細胞群の5%に二動原体 dicentric と断片の double minutes の染色体異常を見た。



**Fig 1** marker chromosomes

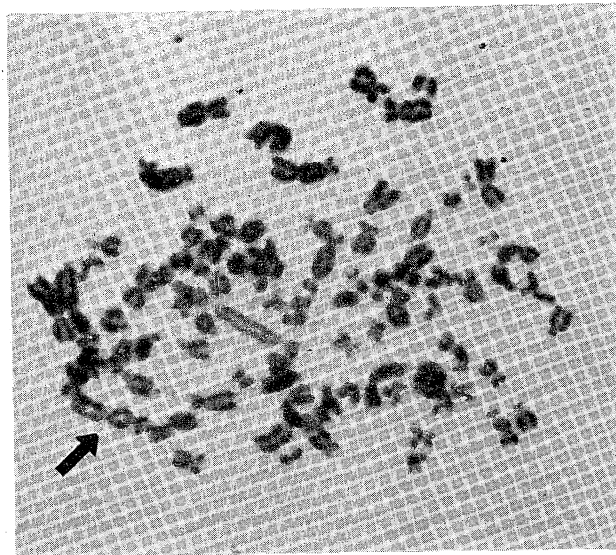


Fig 2 dicentric and acentric chromosomes

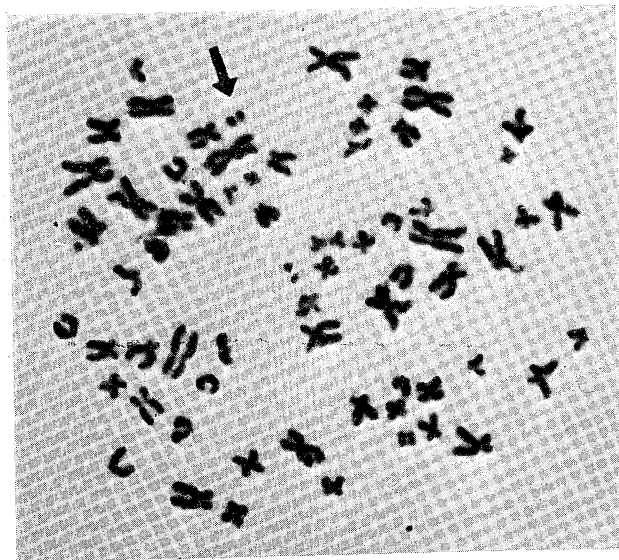


Fig 3 double minutes

### 考 察

著者はウイルス感染における組織培養細胞の染色体変化を系統的に追究したいと考え、先ず、その形態変化に主眼をおいて、ECHO ウイルス11型による持続感染 HeLa 細胞の場合について観察を行なった。本実験に使用した持続感染系は  $10^{4.0}$  TCD<sub>50</sub>/0.2ml の ECHO 11 型ウイルスを放出しているので培養期間中

に未感染細胞は放出ウイルスの感染をうけることが考えられる。そして細胞によっては lytic cycle を示すことも当然予想されるわけであるが、染色体標本作成に当っては、浮遊細胞はすべて洗い去って、ガラス壁に充分に固着している細胞だけを剝離して用いることに努めた。本持続感染 HeLa 細胞はその分裂娘細胞の

すべてに ECHO ウイルス 11 型の genom が保持されているかどうかは直接確めているわけではない。このような持続感染細胞を用いて核型の分析を行ない、対照として未感染の継代 HeLa 細胞について同様のことを行なったのであるが、核型分析をすべき被検細胞数を十分に多く（対照非感染 HeLa 細胞 20 個及び持続感染細胞 40 個）観察するとによって異常の有無を検定することが出来ると考えた。核型分析は Denver の方式に従って染色体の太さや centromere の位置によって未感染細胞及び持続感染細胞の核型分析を比較する一方、染色体数の変動を観察した。既述のように、ECHO ウイルス 11 型による持続感染 HeLa 細胞では未感染細胞の場合より B 群、C 群及び D 群染色体がそれぞれ減少し、それを代償するかのよう A 群、F 群及び G 群染色体が増加している。しかもこれには dicentric や double minutes の形態変化 (Fig. 2, 3) を伴っていることが注目すべき現象であった。ECHO ウイルス 11 型による HeLa 細胞染色体のこのような異常所見は Saksela 等 (1965) や、海老名、高橋等 (1969) のパラインフルエンザ HA2 ウイルス感染ヒト胎児細胞や HeLa S3 細胞でも G 群及び F 群の染色体の

変動という範疇では一致していた。一方 Nicholes and Levan 等 (1962) は麻疹患者, Aurea (1963, 1965) は水痘, 流行性耳下腺炎及び麻疹患者, Makino and Sasaki (1966) は無菌性髄膜炎症例及び Kuroki et al (1966) は風疹感染例についてそれぞれ患者の白血球の核型分析を行ない切断像や細粉化像を観察し特に, Nicholes and Levan 等 (1962) によると A 群 C 群染色体のあるもの及び E 群に二次狭窄部分の切断があるのではないかという。このように、ヒトのウイルス感染の場合、直接患者の末梢白血球の核型変化を観察した所見は著者の実験例でも観察されたように頻度の差はあるけれども dicentric や double minutes の所見と共通している。しかし、各染色体群内での変動や形態変化は著者の場合を含めて一様でなく、一定の関連を見出すことは今のところ困難である。しかし、今後実験材料としてウイルスや細胞の種類を増すと共に最近著しく進歩しつつある染色体分析の技法や観察法及び整理法を導入し、ウイルス感染に伴う感染細胞の染色体の形態変化だけでなく生物活性の変化をも指標とすることによって一定の関連づけが得られるものと考えられる。

## 結

## 論

ECHO ウイルス 11 型と HeLa 細胞の組合せで得られた持続感染細胞の染色体の形態変化を未感染細胞のそれと比較検討した結果次のような所見を得た。

- (1) 持続感染細胞の染色体数は未感染細胞のそれより分散度が広いことが判った。
- (2) 持続感染細胞の染色体は B 群、C 群及び D 群が減少し、それを代償するかのよう A 群、F 群、G 群の染色体が増加した。

(3) 持続感染細胞では dicentric や断片の double minutes の異常を伴っていた。

稿を終るに当たり、終始ご懇切なるご指導並びにご校閲を賜りました教室主任林教授、並びに種々御助言を賜りました三舟助教授、ABCC 鎌石博士に対し、深甚なる謝意を表すと共に、ご協力いただいた教室員各位に深謝を表します。

## 参 考

## 文 献

- 1) Aula, P.: Chromosome breaks in leukocytes of chickenpox patients. Preliminary communication, *Hereditas* **49**: 451—453, 1963.
- 2) Aula, P.: Virus-associated chromosomes breakage. A cytogenetic study of chickenpox, measles, and mumps patients and of cell cultures infected with measles virus. *Ann. Acad. Sci. Fenn. Series A, IV. Biologica* **89**: 1—78, 1965.
- 3) 陳境津: 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, *熱帯医学*, **13**: 45—52, 1971.

4) 陳境津: ECHO ウイルス 11 型の性状に関する研究. II. Large plaque (Lp) 及び Small plaque (Sp) 変異ウイルスと HeLa 細胞の系における持続感染について, *熱帯医学*, **13**: 53—60, 1971.

5) 海老名卓三郎, 高橋公毅, 加茂功, 本間守男: 持続感染系 S3/HA2 に関する研究, 特異的染色体変化に伴うアルカリフォスファターゼ活性の低下, 第 17

回日本ウイルス学会総会記録, ウイルス, 19巻, 第5号; 74, 1969.

6) **Hamper, A.** and **Ellison S. A.** : Nature, 192, 145—147, 1961.

7) **Koprowski, H. Ponthen, J. A. Jensen, F. Moohead, P.** and **Saksela, E.** : Transformation of cultures of human tissue infected with simian virus SV40. J. Cell. and Comp. Physiol. 59 : 281—292, 1962.

8) **Kuroki, Y.** : Chromosome abnormalities in cultured leukocytes from rubella patients. Jap. J. Human Genet. 11. : (1) 17—23. 1966.

9) **Makino, S.** and **Sasaki, M.** : A further study of chromosomes in cultured leucocytes from aseptic meningitis patients. Proc. Jap. Acad. 42 : 270—274. 1966.

10) **Mauler, R.** and **Hennessen, W.** : Virus-

induced alteration of chromosomes. Arch. ges. Virusforsch. 16 : 175—181. 1965.

11) **Nichols, W. W. Levan, A. Hall, B.** and **Österqren, G.** : Measles-associated chromosome breakage. Preliminary communication. Hereditas. 84 : 367—370. 1962.

12) **Rapp, F.** and **Hsu, T. C.** : Viruses and mammalian chromosomes. IV. Replication of herpes simplex virus in diploid chienesese hamster cells. virology, 25 : 401—411. 1965.

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

14) **Utsumi, K. R. Kitamura, I.** and **Trenten, J. T.** : Karyological studies of normal cells and of adenovirus type 12 induced tumor cells of the Syrian hamster. J. Nat. Cancer Inst. 35 : 759—769. 1965.