

Varicella-Zoster Virus (VZV) の増殖に関する研究

1. ヒト胎児線維芽細胞培養の長期維持法

川崎医科大学 微生物学教室
別 所 徹 子
(昭和55年3月19日受付)

Studies on the Growth of Varicella-Zoster Virus (VZV)

1. Long-Term Maintenance of Human Embryo Fibroblasts

Hiroko Bessho
Department of Microbiology, Kawasaki Medical School
(Accepted on March 19, 1980)

Varicella-zoster virus (VZV) の感染実験に用いる宿主について検討する目的で実験を行ない次のような結果を得た。

1. ヒト胎児皮膚筋由来の線維芽細胞 (HEF) はヒト胎児肺線維芽細胞 (HEL) より VZV に対する感受性が高い。
2. HEF は初代細胞系であり、老化は不可避である。この HEF の植継ぎ回数を抑制して、長期維持培養を行ない、老化までの期間を延長させることに成功した。増殖用培地として 10% ウシ胎児血清を加えた **Eagle's minimum essential medium (MEM)**、維持培地として 2% 仔ウシ血清を加えた MEM を用いた。植継ぎ 2 週後に増殖用培地から維持培地に換えて、以後 3～4 週ごとに培地交換を行なった。その結果 HEF の細胞シートは 1 回の植継ぎで 11 カ月にあたって維持できた。
3. 本法は細胞の早急な実験への供給を可能にし、長期保存法として有用な方法であることが判った。

The experiments were done to find out the way of maintaining and supplying the host cells without subcultivation for the study of varicella-zoster virus (VZV), and the following results were obtained.

1. Human embryo fibroblasts (HEF) from embryo skin-muscle tissue were more susceptible to VZV than human embryo lung cells (HEL).
2. Since HEF are primary cell line, they have a finite lifetime due to their aging. An attempt to maintain HEF monolayer longer without subcultivation was made and the prolongation of their aging was succeeded. HEF were cultured in growth medium [Eagle's minimum essential medium (MEM) with 10% fetal calf serum] for two weeks. Then the cells forming a monolayer were kept in maintenance medium [MEM with 2% calf serum], which was replaced with

new one every 3 or 4 weeks. As a result the HEF monolayer with only one time subcultivation was maintained for a period of 11 months.

3. This culture method enabled us to obtain quick supply of cells in the experiments. In addition, it ascertained its usefulness in the storage of cells for a longer period without rapid progress of their aging.

はじめに

ウイルスの1つの特徴は生きた宿主細胞内でのみ増殖することである。ウイルスの宿主となりうる細胞はウイルスの種類によって異なる。従って試験管内に培養した細胞を用いてウイルスの感染実験を行なうには、用いるウイルスに感受性の高い細胞の使用が不可欠である。今日では非常に多くの細胞が試験管内で培養されウイルス実験に用いられるようになった。

培養細胞のうち性質の変換なく無限に増殖し、継代を重ねることができる細胞を株化細胞という。株化細胞のうち特にクローン分離細胞は試験管内で増殖できる1個の細胞に由来するものである。それ故、その細胞集団は遺伝的に均一であるためウイルスに対する反応も細胞によって異なることがない。今日ではヒト由来として HeLa (子宮癌由来), FL (羊膜由来), Hep-2 (咽頭癌由来), KB (鼻咽腔癌由来) 細胞などが、他の動物由来として L (マウス由来), BHK-21 (ハムスター腎由来), Vero (ミドリザル腎由来) 細胞など多くの株化細胞が分離され、ウイルス感染実験に広く用いられている。これらの株化細胞は試験管内で適当な条件下におけば無限に増殖するからこれに感染増殖できるウイルスの実験へ細胞を供給することは容易である。

ある種のウイルス例えば水痘—带状疱疹ウイルス (varicella-zoster virus, 以下 VZV と略す) は株化細胞の中では増殖しにくい。このようなウイルスの感染増殖実験には必要に応じて組織から試験管内で増殖できる細胞をとり出して宿主細胞として用いなければならない。組織からとり出して試験管内で培養した細胞を初代

培養細胞といい、この初代培養細胞を継代培養した細胞を初代細胞系 (Primary cell line) という¹⁾。初代細胞系の細胞は株化細胞と異って、その由来した動物組織内での細胞分裂回数にはほぼ一致した分裂増殖は可能であるが、その一定回数の分裂の後、増殖性は激減してはや増殖できなくなってしまう。例えばヒト胎児組織由来の細胞では約 50 回の分裂で増殖が停止する。この現象は細胞の老化 (Aging) と呼ばれている²⁾。従って初代細胞系にのみ感受性のあるウイルスの感染実験には常にこの宿主細胞の老化を考慮しながら実験を進めなければならない。それ故、一旦ウイルスに感受性の高い初代細胞系が分離できたら、できる限り老化の進行をおさえて実験系に供給することが必要となる。初代細胞系の保存はディープフリーザー (-60°C ~ -80°C), あるいは液体窒素 (-196°C) に凍結保存し、実験を行なう場合には凍結しておいた細胞を融解して、増殖状態に戻し、老化をきたすまでに使ってしまう方法がごく一般的である。しかしこの方法では凍結による細胞傷害を抑えるジメチルサルフォキシド (DMSO) やグリセリンなどの安定剤を加えて凍結しても、融解時の生存細胞数は数%~十数%と低く、実験に供するためには細胞をさらに増殖させる必要がある。これはとりもなおさず分裂回数を増すことになり、老化をはやめることにつながる。矢追³⁾ はニワトリ胚細胞を使用して、直径 10 cm のシャーレに 1000 個程度の過疎状態で細胞を植継ぐと増殖が停止してやがて細胞は死滅してしまうが、これを分散させず 1 カ所に集めて培養すると個々の細胞はよく増殖することを観察した。この結果から、彼は細胞が集団を形成することにより増殖に対する

相利効果が生ずると考え、このような現象を“細胞増殖の集団効果”と名づけた。このように細胞を増殖させるには常に一定の細胞密度で継代しなくてはならない。従って初代細胞系細胞を維持し、実験系へ安定な供給を行なうには、①生存細胞数の減少がないこと、②分裂回数を増さないこと、③必要時に直ちに増殖させようことの3つの条件を満たせば凍結保存の必要がなくなる。

VZV に感受性のある培養細胞としてこれまで、HeLa 細胞⁴⁾、Vero 細胞⁵⁾、FL 細胞⁶⁾などの株化細胞や、ヒト胎児肺線維芽細胞⁷⁾ (以下 HEL と略す)、ヒト胎児皮膚筋線維芽細胞⁸⁾ (以下 HEF と略す)、ヒト包皮線維芽細胞⁴⁾、ヒト腎細胞⁴⁾、ヒト甲状腺細胞⁹⁾、リーサスザル腎細胞¹⁰⁾、ミドリサル腎細胞⁴⁾、ウサギ腎細胞⁴⁾ およびモルモット胎児線維芽細胞¹¹⁾ などの初代細胞系が報告されている。しかし一般には HEL が、VZV の株のいかなをとわず感受性が最も高いとされている^{6,12)}。しかし著者の経験では HEF の感受性は HEL より高く、安定した細胞増殖性を示すため、この細胞の培養維持は HEL に比べ容易である。HEF や HEL は株化できないと同時に先に述べた細胞増殖の集団効果が顕著に認められ、凍結保存によって生存細胞数が減少すると融解後の細胞増殖速度が減少する。このため VZV 感染実験に使用する単層状態に戻すまでにはかなりの日数を要し、実験への早急な細胞の供給は困難となる。これらの細胞の実験への安定供給は解決されなければならない基本的な課題である。

今回、HEF や HEL を単層状態で11カ月にわたり維持できることを見出した。この方法によれば細胞の生存率が100%維持し、かつ細胞分裂を全く抑制するので、先に挙げた3つの条件を満足する。従来行なわれている一般的な細胞培養法を改良して、増殖用培地でシートを形成させた後、植継ぐことなく3~4週間に1回培地を交換して培養を続ける方法である。以下に HEF および HEL 両細胞の VZV に対する感受性の比較検討とこれらの細胞の長期維持法について報告する。

材料と方法

1 細胞: HEF は小野義三博士によって分離され、分与いただいたものである。この細胞の由来する胎児は1976年5月風疹流行の際、風疹に対する高い HI 抗体価を有する妊婦から、先天性風疹症候群を疑われて人工流産により得られたものであるが、この胎児細胞からは風疹ウイルスは検出されていない。分離後3年間にわたり、継代培養と凍結保存をくりかえし、現在まで19~33回の植継ぎを行なっている。凍結保存は増殖用培地に10% DMSO を加え、これに細胞を浮遊して、ディープフリーザー(-75°C)に凍結保存した。凍結保存細胞を再び培養する場合には凍結細胞を37°Cの恒温槽にて融解し、300×g、5分の遠心後、沈渣に集った細胞を増殖用培地に浮遊して25ml プラスチック培養瓶に植込み、炭酸ガスフラン器内(5% CO₂, 37°C)で培養した。8時間後細胞がプラスチック面に付着したことを確かめ、増殖用培地を交換して、浮遊細胞を除去したのち培養を続行した。

HEL も小野博士より分与されたもので、HEF とは異なる胎児に由来するものである。3年間にわたり HEF と同様、植継ぎと凍結保存をくりかえし、現在まで17~20回の植継ぎを行なった。

2 細胞培養

(1) 増殖用培地: 10% ウシ胎児血清(以下 FCS と略す)を加えた Eagle's minimum essential medium (MEM) を用いた。

(2) 維持培地: 2% 仔ウシ血清(以下 CS と略す)を加えた MEM を用いた。

(3) トリプシン液: 植継ぎ時に HEF や HEL を分散させるためトリプシン液を用いた。Dulbecco and Vogt¹³⁾ の PBS(-) [Mg⁺⁺, Ca⁺⁺ を含まず] にトリプシン0.25% 及びエチレンジアミン四酢酸三ナトリウム塩(EDTA-3Na)0.02%を溶解して作成した。

(4) 細胞の植継ぎおよび培養法: 800 ml 用ルー培養瓶(以下ルー瓶とする)あるいは200 ml 角型培養瓶(以下中角とする)を用い

て 37°C で培養した。

細胞シート上にトリプシン液を層積して1～2分放置後、トリプシン液をとり除き細胞の剥離を待った。3～4分後、細胞がガラス壁から剥離しはじめたら、増殖用培地を所定量加え、よくピペティングして、均一な細胞浮遊液を得た。この方法によるとトリプシン液で剥離した細胞を集めるための遠心操作の必要がなく、遠心操作と、そのための時間を短縮できるため細胞の損傷が少ない。植継ぎにルー瓶を使用した場合は 10^5 cells/ml の細胞浮遊液を作り、35 ml 宛3本に植込んだ。中角使用の場合には 10^5 cells/ml の細胞浮遊液 10 ml を分注した。いずれも密栓を施したのち 37°C にて静置培養した。培養4日目、細胞はシートを形成した。なお増殖曲線を求める実験では 50 ml 角型培養瓶(以下小角とする)に 10^5 cells/ml の細胞浮遊液を 4 ml 宛分注して、炭酸ガス培養あるいは密栓をして静置培養を行ない継時的にとり出して、トリプシン液で細胞浮遊液を作成し小角当りの細胞数を血球計算盤にて測定した。

長期維持培養の場合は植継ぎ2週間後に培地を増殖用培地から維持培地に交換した。以後は培地の pH の極端な低下をみた場合やシートを形成している細胞の状態(後述)が悪化した時に培地を全量交換した。

(5) 炭酸ガス培養: pH の変動を抑えて培養するために炭酸ガスを 5% に調整した 37°C フラン器を使用した。培養にプラスチック培養瓶を使用した場合はスクリュウキャップをゆるめた。小角の場合はゴム栓の代りにシリコ栓を用いた。

(6) 老化細胞の調整: 老化細胞観察のために HEF を 2 週おきに 32 回連続的に植継いだ。植継ぎ時に細胞を 3～4 倍に希釈して植継いだので、実際の世代数はおよそ 52 代に相当し、増殖性が顕著に減少した。この老化細胞と著者による長期維持培養による健全な細胞を形態並びに細胞数の推移に関して比較した。

(7) 光学顕微鏡観察: 培養細胞の観察には倒立顕微鏡を用いた。

(i) トリパンブルー染色: 死細胞の観察の

ため Dulbecco and Vogt の PBS (+) [Mg^{++} , Ca^{++} 含有] に 1% トリパンブルーを溶解して用いた。染色する際には中角内の細胞シートから培地をぬきとり、10 ml の染色液を層積し、15 分放置後、染色液をぬき取り PBS (+) で 1 回洗って観察した。細胞浮遊液の場合は細胞浮遊液 1 ml に染色液 0.5 ml を混合したのち血球計算盤にて計測した。トリパンブルーで青色に染色された細胞を死細胞とみなし、その百分率を算定した。

(ii) 分裂係数の測定: カバーガラスを入れたレイトン管に 10^5 cells/ml の細胞浮遊液を 1 ml ずつ分注して培養した。培養3日目カバーガラスをとり出し、固定液(エタノール5容、氷酢酸2容、蒸留水3容の混液)で5分間処理、水道水で2回ゆるやかに洗浄した。次いでクリスタル紫染色液(1% 氷酢酸に 0.02% のクリスタル紫を溶解)に5分間浸して染色し、1回水洗、乾燥ののち、油浸オイルで封入して顕微鏡で観察した。約 1000 個の細胞数を数え、その中に含まれる分裂期(分裂前期から末期)の細胞数の百分率を算定した。

3 VZV の感染実験

(1) VZV: 带状疱疹患者の水疱液より HEL を用いて分離継代¹⁴ 後、10% DMSO を含む増殖用培地に感染細胞を浮遊し -75°C にて保存した。ウイルスの継代に際しては 37°C 恒温槽にて融解後、遠心操作を行なった後感染細胞を維持培地に浮遊して、接種材料とした。

(2) VZV の接種法: 実験には凍結保存しない新鮮な感染細胞をトリプシン処理で均一な浮遊液としたのち、これを接種材料として用いた。

カバーガラスを入れたレイトン管に HEF あるいは HEL の 4×10^5 cells/ml を 1 ml ずつ分注して 37°C で 2 日間培養し、これに新鮮な VZV 接種材料を 0.2 ml ずつ接種して 37°C で 2 時間吸着させた。吸着の後 PBS (+) で 2 回洗浄、その後維持培地を加えて培養を行なった。継時的にとり出して、ギムザ染色を施し、核内封入体の観察ならびに focus 算定を行な

った。

(3) ギムザ染色: VZV の感染細胞に特異的に出現するA型核内封入体を検出するために用いた。レイTON管内のカバーガラスに培養したVZV感染細胞をとり出して、PBS(+)で洗浄後、メタノールで5分間固定後、ギムザ液(市販のギムザ原液を水道水で1:40に希釈)で20分間染色。水道水で水洗、乾燥後油浸オイルで封入し、顕微鏡下に観察した。

4 血清および試薬類

FCSはGIBCO社製(Grand Island Biological Company, U. S. A.), CSはPerfreez社(Irvin Scientific Sale Co, Inc., U. S. A.)および阪大微研のBovine serum (BS)(阪大微生物病研究会)を使用した。

MEMは日本水薬製MEM No. 1粉末(カナマイシン60mg/lを含む)で、所定量の再蒸留水に溶解し、高圧滅菌ののち、L-グルタミン292mg/lを加え、7.5%重炭酸ナトリウム液でpH 7.2に調整した。

トリプシンはDifco製(Difco Laboratories, Detroit, U. S. A.) 1:250を用いた。ギムザ原液、トリパンブルー、およびクリスタル紫はMerck製(E. Merck, Darmstadt, Germany), EDTA, メタノール, エタノールおよび水酢酸はいずれも半井化学製特級を用いた。

結 果

1 VZV に対する感受性の検討

著者が保存しているヒト初代細胞系HELおよびHEFの2種の細胞のVZVに対する感受性を検討した。両細胞に同量のVZVを接種して、感染による細胞変性効果CPE, CPEを来した細胞のGiemsa染色像およびfocus数を比較した。

ウイルスを接種して培養3日目のGiemsa染色像をFig. 1 a, bに示す, aはHEL, bはHEFである。HELとHEFは形態的に非常に似た細胞であり、両細胞シートは密に並んだ細長い細胞により形成されているがFig. 1 a, bに見られる濃く染った丸い細胞(図中の矢印で示された)はVZV感染により細胞変性を来した細胞である。VZVのCPEは図に見られるごとく、focus状に出現した。aのHELでは変性細胞は少なく、focusの大きさは $320 \times 120 \mu^2$ であった。他方bのHEFでは変性細胞数はaよりはるかに多く、focusの大きさは $800 \times 320 \mu^2$ であった。従って無染色のfocusはHEFでは比較的容易に検索できるが、HELでは困難であった。しかし5日目にはfocusはHEFの3日目程度の大きさに広がったので検出は容易であった。この感染5日目の両細胞におけるfocus形成細胞の核内にはVZVに特

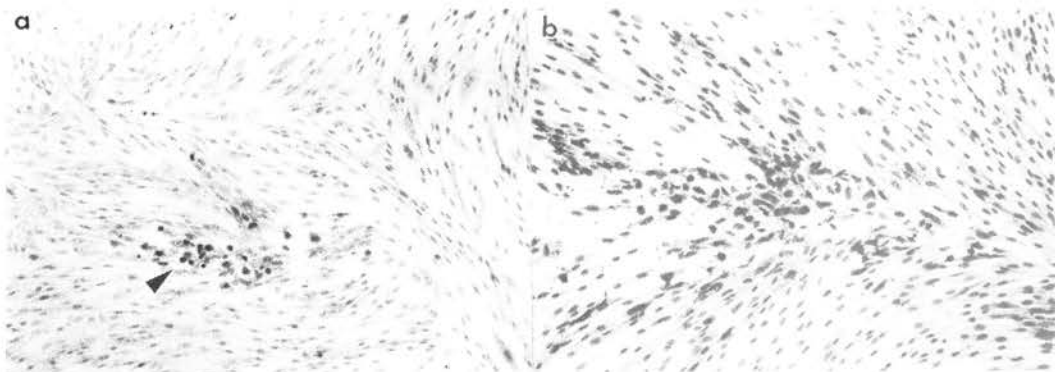


Fig. 1. A focal lesion in monolayer of human embryo lung fibroblasts (HEL) (a) and human embryo skin-muscle fibroblasts (HEF) (b) produced with varicella-zoster virus at 72 hrs after infection. (Giemsa staining) $\times 60$. The arrow points a focus region composed of rounded cells showing the cytopathic change.

微的なA型核内封入体が観察されたが、HELにおける封入体の方がHEFより明瞭であった。

VZVに対する感受性を比較するために、VZVの同一感染材料をそれぞれの細胞シートに感染させ5日目および7日目のfocus数を顕微鏡下で算定した。その結果5日目ではHELで23コ/レイトン管、HEFで90コ/レイトン管であった。7日目のfocus数はHELで26コ/レイトン管、HEF76コ/レイトン管であった。両細胞に同量のウイルスを接種したにもかかわらず、HEFでのfocus数はHELにおけるその約3倍の高い値を示し、HEFがHELに比べVZVに対する感受性が高いことが判った。また細胞シートを形成するまでの時間や形成されたシートの形状が均一であるなどの点から、継代維持はHEFの方がHELより容易であることが判った。これらの結果から以後の実験にはHEFを用いた。

2 増殖用培地と培養条件の検討

MEMに加える血清のHEF増殖に対する影響を判定するために、FCSおよびCSを各々10%加えた培地で密栓静置培養して比較した。その結果をFig. 2に示す。10% FCS-MEMと10% CS-MEMの間には培養2日目から細胞数に顕著な差が認められ、植継ぎ3～6日目では

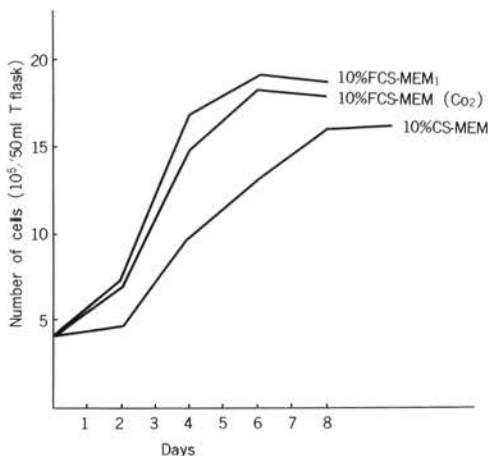


Fig. 2. Rate of growth of human embryo fibroblasts (HEF) under various conditions.

約2倍の差が認められた。FCSの場合は6日目からほぼプラトーに達した。この時の細胞の状態は細長い細胞がその長軸で相互に平行になるような配列をなし、密なシートを形成した。一方、CSの場合には8日目までほぼ直線的に増殖が認められたが8日にプラトーに達し、8日目ではCSでの細胞数はFCSでの細胞数より小角あたり 3×10^5 程度少なかった。細胞の倍加時間(doubling time)はFCSで約40時間、CSでは67時間であった。しかしCSでの細胞形態を見る限りFCSとほとんど差異は認められず、FCS同様の配列を示す密な細胞シートを形成した。なお2%CSを含むMEMを培地として用いた場合は細胞の増殖は完全に停止し、細胞シートの形成は認められなかったが、その状態の細胞を10%FCS-MEMに移すと直ちに増殖することが認められた。以上の結果より閉鎖系で培養する限り10%FCS-MEMを培地として用いることが適当であることが判った。

Fig. 2に示した10%FCS-MEMを用いた時の細胞形態を継時的に観察したところ、培養1日目では円形もしくは類円形の細胞が多く認められた。これらは植継ぎに用いたトリプシンの影響と思われる。2日後の細胞は細長く伸展し、1日目で認められた円形ないし類円形の細胞はわずかであった。3日後には細長く伸展した細胞の間に再び円形の細胞が観察された。これらの円形細胞はFig. 2の細胞の増殖曲線から分裂期の細胞と推測される。培養3日後の細胞の分裂係数をクリスタル紫による染色体染色を行ない顕微鏡下に観察したところ、分裂係数は約4%であった。顕微鏡下で観察する限り、植継ぎ4日目に細胞シートが形成された。

ヒト初代細胞系ではpHの変動が細胞の増殖に大きく影響することが報告されている。密栓静置培養の結果FCS、CSいずれの場合も植継ぎ直後にフェノールレッドの色は赤く、時間の経過とともに黄色に変化する。このpHの変動が細胞の増殖性に影響を及ぼしているか否かを調べるために10%FCS-MEMを用いて、

閉鎖系培養と炭酸ガス培養を行なった。その結果、Fig. 2 にみるごとく閉鎖系培養と炭酸ガス培養の間にはわずかな差異しか認められなかった。炭酸ガス培養の場合2日目以降常に閉鎖系よりいくぶん低い値を示した。この結果は用いた HEF が pH の変動によってほとんど影響をうけないことを示している。従って HEF の培養には 10% FCS-MEM を用いて、密栓静置培養が適当であることが判った。

3 維持培地の検討

10% FCS-MEM で密なシートを形成した細胞を無血清 MEM に移すと、かろうじて1週間は維持できた。この間、トリパンブルーで死細胞の出現は認めなかったが、その後急速にトリパンブルー陽性細胞が出現し、無血清 MEM に交換後10日目には全細胞がトリパンブルー陽性となって死滅した。従ってシートを形成した状態の HEF の維持には血清が不可欠であることが判明した。一般にウイルス感染細胞の維持培地として血清を2%添加した培地が用いられる。これは細胞を積極的に増殖させることなく長時間ほぼ同数の細胞を維持させるためである。このことから HEF の密なシートの維持培地として必要な血清濃度の検討を行なった。即ち2% CS-MEM と先の増殖用培地(10% FCS-MEM)を細胞シート(4×10^6 cells/中角)に加えて密栓静置培養を行なった。血清の種類と濃度の違いにかかわらず、両培養液とも培地交換後3週間で pH は低下した。この時の細胞シートの状態は各々の細胞間隙がやや明瞭となった。3週間以上経過すると細胞はシートのままガラス壁から剝離した。この結果から10% FCS-MEM と2% FCS-MEM は細胞シートの維持に関して有意の差がないと考えられる。次に維持培地に用いた血清のロットによる差異の有無をしらべた。用いた血清は Perfreez 社の CS と阪大微研の BS である。2% 濃度を用いて、両者の間には全く有意の差は認められず、培地を新たに交換することなく、少なくとも3週間細胞を維持することが可能であった。以上の結果からシートを形成した HEF の維持に

2%血清を加えた MEM が適当であることが結論できたのでこれを用いて HEF の長期維持を試みた。

Fig. 3 に長期維持培養の結果を示す。増殖用培地で細胞浮遊液を作り、その35ml(細胞 4.8×10^6 個を含む)を植込んだ。6日目に細胞はル

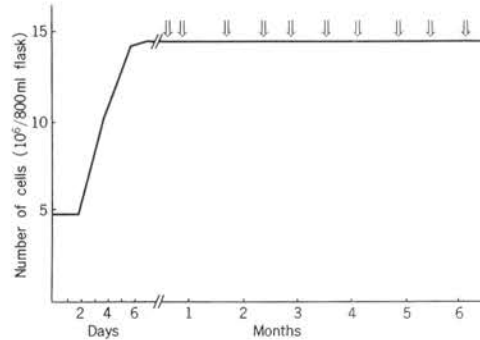


Fig. 3. Diagram representing the long-term maintenance of human embryo fibroblasts (HEF). Arrows show replacement of the maintenance medium.

一瓶当たり 13.4×10^6 個のプラトローに達し、細胞は密なシートを形成した。植込み2週間後に培地を維持培地(2% CS-MEM)に交換して、以後細胞の状態および培地の色調の変化を考慮して3~4週ごとに維持培地を交換した。図中の矢印は培地の交換時を示し、この細胞は6カ月にわたり維持され現在に至っている。この細胞シートの単位面積(1 cm^2)当りの細胞数は 1×10^6 個であった。この密度は用いた培養瓶のサイズに関係なく、中角においても同じであった。これら長期維持培養された細胞は短期間培養の細胞に比べ形態にほとんどみるべき差は認められないが、長期維持培養細胞では植継ぐ際のトリプシン処理に要する時間が短期間培養のそれに比べわずかに長く、約10分であった。長期維持 HEF をもとに植継ぐと、細胞は6日目には密なシートを形成し、3日目での分裂係数は4%、倍加時間は49時間であった。ウイルスに対する感受性も短期培養の細胞と有意の差はなかった。

Table 1 は Fig. 3 で示した方法で長期維持した HEF の培養例である。例1, 3において

Table 1. Examples of long-term maintenance of human embryo skin-muscle fibroblasts (HEF) and human embryo lung fibroblasts (HEL).

	primary passage	second passage	third passage	splitting frequency	bottle type used
HEF					
Series 1	1979 Jan. 22,	1979 July 17,	1980 Jan. 21.	19	800 ml-flask
Series 2	1979 Mar. 10.			20	"
Series 3	1979 Aug. 7.			19	"
Series 4	1978 Dec. 25,	1979 July 3.		22	200 ml-T-flask
Series 5	1979 Mar. 11,	1979 July 14.		22	"
HEL					
Series 1	1979 Jan. 11,	1979 June 16.		17	800 ml-flask
Series 2	1979 Dec. 11.			20	200 ml-T-flask

は6ヵ月、例2では11ヵ月、例4、5では7ヵ月の長期にわたり維持して現在に至っている。例1、2、3はルー瓶、例4、5は中角を使用している。

4 老化細胞

VZVの宿主としてHEFを実験に用いる以上HEFの老化は避けられないので、その老化を予知する必要がある。細胞の老化による増殖の低下は継代回数が増すと急速に起るものでなく、すでに若い継代においても非増殖性細胞の出現があり、その蓄積によって徐々に増殖度の低下をもたらすとされている^{2,15)}。HEFを3乃至4倍希釈で30回連続的に植継ぐと本来細胞が一定方向に並ぶ特異な細胞シートの形成は認

められるが、その中に膨化した細胞が混在して観察されはじめ、同時に飽和密度が減少する。さらに3回植継いだところもはや細胞は増殖せず、細胞シートも形成されなくなった。連続的な植継ぎによって細胞が老化を来したものと考えられる。植継ぎ32回の老化細胞の細胞数はルー瓶当たり 5×10^6 個で、長期維持培養した細胞数 13×10^6 個に比べ著しく少なく老化細胞の増殖が顕著に低下していることが判った。両細胞の植継ぎ4日目の状態をFig. 4 a, bに示す。aの長期維持培養後植継いだ細胞が密なシートを形成しているのに反し、bの老化細胞は著しく巨大化し、多くの顆粒状物質が細胞表面に付着していた。細胞間の間隙が顕著であると



Fig. 4. Optical micrographs of human embryo fibroblasts (HEF) after 19 subcultivations (a) and 33 subcultivations (b). a: Note that the cells are arrayed in thin layer with parallel orientation. b: Note that the disarrangement of cell orientation is remarkable and the cells are extremely enlarged. $\times 125$.

時に細胞の方向性も乱れていた。大型化した細胞は増殖能を欠失した老化細胞であると考えられる。従って大型細胞の出現頻度は老化の程度のマーカー細胞となり、たとえ細胞シートが形成されてもその中に大型細胞が観察されはじめると、それによってその細胞集団 (cell population) はほどなく老化に至ることを認知できると考えられる。

HELについても HEF 同様の長期維持法を試みたところ8カ月にわたって維持が可能であった (Table 1 参照)。

考 察

VZV の実験に最も広く使用されているのは正常2倍体 WI-38 を含めたヒト胎児肺線維芽細胞であるが、これらの細胞とヒト胎児皮膚筋線維芽細胞の VZV に対する感受性を比較した報告はない。今回の実験で VZV に対する感受性はヒト胎児肺由来線維芽細胞 HEL に比べヒト胎児皮膚筋由来線維芽細胞 HEF の方が高い結果を得た。また植継ぎ維持も HEL より HEF の方が容易であった。このように VZV に対する感受性と細胞自体の培養維持の安易度の両面から VZV の感染実験には HEF を用いることが有利と考えられる。しかし HEF が初代細胞系であるため老化は不可避で、このことがこの細胞を用いて VZV 感染実験を行なう上で大きな障害であった。著者は老化を抑える方法として細胞の植継ぎ回数を抑制して長期間細胞を維持することに成功した。

これまで本報告に匹敵するような長期維持培養は株化ニジマス生殖腺由来 RTG-2 細胞について Wolf ら¹⁶⁾ の報告があるにすぎない。彼らの報告によれば RTG-2 細胞では増殖用培地のまま 4°C で9カ月保存が可能であるという。今回著者の行なった方法は3~4週間に1回ずつ培地の交換を行なって、11カ月以上の維持が可能であった。HEL も本法によって長期維持が可能であったので、HEF や HEL 以外の細胞にも応用できる方法であろうと推測される。

Hayflick¹⁷⁾ は、多数の HEL を用いた実験に

おいて最多継代回数 55 回、最長継代期間 11 カ月と報告している。細胞シートを形成したら次の植継ぎを行なうような一般的培養法で植継げば 11 カ月は分離から老化に至る期間に相当する。長期維持法ではその期間にわずか 1 回の植継ぎで、2 回の分裂回数にとどめることができた。老化の延長に有利な方法であることがわかった。しかもこの方法で VZV の感受性が低下することはなかった。老化の延長のために Packer ら¹⁸⁾ は細胞内の不飽和脂肪酸の酸化を阻止するといわれているビタミン E を培地に添加して WI-38 細胞を培養することにより、ビタミンを添加しない対照群では分裂回数 50 回で老化が起るのに、分裂回数を 100 回にさせ得たと報告している。この方法によれば、細胞の供給期間は 2 倍に延びるが、一般的植継ぎを行なう限り、細胞の長期保存という面では十分でない。

細胞の長期保存法として DMSO あるいはグリセリン存在下で凍結保存する方法が一般的である。この方法ではたとえ DMSO あるいはグリセリンを加えても融解時の生存細胞数は数%~十数%と低く、ウイルス感染実験のため細胞シートにするには少なくとも2週間を要する。この点ここで報告した長期維持培養法はすでに細胞シートを形成しているので、直ちに実験に使用することができる。さらに増殖させて用いる場合でも細胞の生存率は 100% であるため、これを出発材料としてあらたに植継いでも 6 日目には細胞シートが形成される。

Lovelock¹⁹⁾ ら、Niwayama²⁰⁾ らは凍結保存の安定剤としてグリセリンより DMSO の方が粘度が低く、膜透過性が高く、かつ毒性が少なくすぐれていると報告している。これらの報告にもとづいて、DMSO が細胞の凍結防止剤としてよく用いられているが、培養細胞における潜存ウイルスの誘導に関する Stewart²¹⁾ ら、Weinstein²²⁾ ら、Orenstein²³⁾ らの報告によると、bromodeoxyuridine (BUdR) やそれと DMSO の併用によって完全に無ウイルス状態の培養細胞に潜在ウイルス (主として C 型ウイ

ルス)が容易に誘導されるという、ここに報告した長期維持培養法は全く DMSO を用いないので、潜在ウイルスを誘導する可能性がなく、この点においても安全性の高い、優れた方法といえる。

培養されてガラス壁を動いている細胞は他の細胞と接触すると他の細胞を乗り越えて進むことはなく運動は停止する²⁴⁾。細胞の増殖によって単層シートが培養瓶の底面にすき間なく広がると細胞の増殖も停止する。従って一定の広さの増殖の場合—例えば培養瓶の増殖面—では細胞は各々の細胞の占める面積によって一定の数まで増殖したのちに相互に接触し合い、もはや増殖しなくなる。この現象を接触阻止 (contact inhibition) という²⁵⁾。HEF の場合もルー瓶当たり 13×10^6 個の細胞でシートが形成されると、たとえ増殖用の 10% FCS を含む培地で培養しても細胞の増殖は停止した。従って長期維持培養した細胞は接触阻止の状態でも維持したことになる。

接触阻止下での細胞は世代周期 G_1 期で停止して、細胞シートをトリプシン処理すると接触阻止は解除されて、RNA 合成、DNA 合成が開始して、そのあとで細胞は分裂期に入るとされている²⁶⁾。長期維持された HEF は恐らく G_1 期にあると推察される。 G_1 期の細胞の維持には 2% CS で十分であることが示されたわけで、細胞シートを形成して接触阻止に至るまでは 10% の血清が必要であることが判った。

Ceccarini ら²⁷⁾ は pH 変動の少ない TES (tris-methyl-aminoetane-sulfonic acid)、HEPES (hydroxyethylpiperazine-ethane-sulfonic acid) 緩衝液を培地に用いてヒト線維芽細胞の飽和密度を、重炭酸ナトリウム緩衝液を用いた場合の数倍に増加させている。HEF を pH 7.2 の 10% FCS-MEM を用いて、炭酸ガス培養で pH の変動を抑えた場合には閉鎖的培養よりむしろ低い飽和密度を示した。HEF においては pH の変動は増殖に大きな影響は与えないと思われる。

細胞シートを形成した HEF の培地を無血清 MEM に交換した場合は 1 週間しか維持できな

かった。血清を添加しない維持培地としては Eagle より 199 培地の方が適しているとされている。Hayflick ら¹⁷⁾ は飽和密度に達した HEL の維持に 1 週間に 1 回無血清 199 培地で培地交換を行ない 4 週間維持させたと報告している。現在まで 11 カ月の長期にわたる HEF の維持に比べれば Hayflick の培養期間は極めて短かく、HEF の細胞シートをこのように長期にわたり安定に維持するためには血清の添加が不可欠な条件であると思われる。また維持培地として 10% FCS-MEM と 2% CS-MEM において特に 10% FCS-MEM の方が有利な点は見つからず、2% CS-MEM で 3~4 週間の維持が可能であった。3~4 週間の維持は 2% 以上の血清を用いる限り、血清の濃度に関係なく、他の栄養素即ち MEM の消耗によって規定されるものと推察される。従って維持培地としての経済性を考慮すれば 2% CS-MEM を用いるのが有利である。

Todaro ら²⁸⁾ はマウス胎児線維芽細胞を使用して、細胞をペトリ皿当たり 3×10^5 個に希釈して 3 日ごとに植継いだ 3T3 系、 6×10^5 個で 3 日ごとに植継いだ 3T6 系、および 12×10^5 個で 3 日ごとに植継いだ 3T12 系において継代をくりかえしたところ、各々の系は決った飽和密度で増殖が停止することを報告した。それによると 9 カ月継代培養後の各々の細胞の大きさは 3T3 が $16.8 \mu\text{m}$ 径、3T12 が $17.9 \mu\text{m}$ 径であるにもかかわらず飽和密度は 3T3 が 0.5×10^6 cells/cm²、3T12 で $10 \sim 12.5 \times 10^6$ cells/cm² であったという。これらの結果は同一の細胞でも培養条件によって接触阻止のかかり方が異なることを示唆している。1 回の植継ぎで長期維持培養を行なった HEF は次の植継ぎでも倍加時間 49 時間、分裂係数 4%、飽和密度 1.0×10^5 cells/cm² であって、長期維持培養によって、倍加時間の延長、分裂係数の変動、飽和密度の変動は認められず、HEF の形質は安定に維持されていると思われる。この飽和密度は Rudiger ら²⁹⁾ のヒト胎児皮膚細胞の大量培養における飽和密度 1×10^5 cells/cm² と全く同一で、ここで用いた HEF が一般的なヒト胎児由

来線維芽細胞の増殖性を有していることが示唆された。

稿を終るにあたり、御懇切な御指導と御鞭撻を賜った東昇教授に謹んで深謝致します。本実験を通じて種

々なる御助言、御討論、御校閲を頂きました松本明助教授に心から感謝の意を表します。また本学に在職当時、細胞を分与いただいた高知学園短大小野義三教授に厚く感謝いたします。

文 献

- 1) 北村 敬: ウイルス検査のための組織培養技術. 近代出版 p. 128, 1976
- 2) Hayflick, L.: The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 37: 614—636, 1965
- 3) 矢追義人: 細胞増殖の集団効果. *自然* 26(12): 30—37, 1971
- 4) Weller, T. H., Witton, H. M. and Bell, J. E.: The etiologic agents of varicella and herpes zoster. Isolation, propagation and cultural characteristics *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 108: 843—868, 1958
- 5) Caunt, A. E. and Shaw, D. G.: Neutralization tests with varicella-zoster virus. *J. Hyg.*, 67: 343—352, 1969
- 6) Taylor-Robinson, D. and Caunt, A. E.: *Varicella Virus*. *Virology Monographs*. Springer Verlag. p. 21—22, 1972
- 7) Rapp, F. and Benyesh-Melnick, M.: Plaque assay for measurement of cells infected with zoster virus. *Science*, 141: 433—434, 1963
- 8) Taylor-Robinson, D.: Chickenpox and herpes zoster III Tissue culture studies. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 40: 521—532, 1959
- 9) Caunt, A. E.: Growth of varicella-zoster virus in human thyroid tissue cultures. *Lancet*, 2: 982—983, 1963
- 10) Slotnick, V. B. and Rosanoff, E. I.: Localization of varicella virus in tissue culture. *Virology*, 19: 589—592, 1963
- 11) Söltz-Szöts, J.: Virologische und serologische Untersuchungen beim Herpes zoster. *Arch. Klin. Exp. Der.*, 220: 105—128, 1964
- 12) 本藤 良: 水痘ウイルス. *臨床検査* 19: 1302—1308, 1975
- 13) Dulbecco, R. and Vogt, M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.*, 99: 167—182, 1954
- 14) 別所敏子, 小野義三, 三好 薫: ネガティブ染色を応用したウイルス性皮膚疾患の診断. *皮膚科の臨床* 20: 255—260, 1978
- 15) 山田正篤: ヒトの正常細胞を培養する. *科学* 34: 295—300, 1964
- 16) Wolf, K. and Quimby, M. C.: Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. *Science*, 135: 1065—1066, 1962
- 17) Hayflick, L. and Moorhead, P. S.: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 25: 585—621, 1961
- 18) Packer, L. and Smith, J. R.: Extension of the lifespan of cultured normal human diploid cells by vitamin E. *Pro. Nat. Acad. Sci. USA*, 71: 4763—4767, 1974
- 19) Lovelock, J. E. and Bishop, M. W. E.: Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. *Nature*, 183: 1394—1395, 1959
- 20) Niwayama, G., Johnson, C. F., Grace, J. T., Fiden, E. and Miller, M.: The kinetics of dimethylsulfoxide (DMSO) and glycerol in cultured cells during preincubation and washing for cell storage. *Cryobiology*, 3: 385—386, 1967

- 21) Stewart, S. E., Kasnic, G. and Draycott, C.: Activation of viruses in human tumors by 5-iododeoxyuridine and dimethyl sulfoxide. *Science*, 175: 198—199, 1972
- 22) Weinstein, I. B., Gebert, R., Stadler, U. C., Orenstein, J. M. and Axel, R.: Type C virus from cell cultures of chemically induced rat hepatomas. *Science*, 178: 1098—1100, 1972
- 23) Orenstein, J. M. and Weinstein, I. B.: Filamentous forms of enveloped A particles in cell cultures from chemically induced rat hepatomas. *Cancer Res.*, 33: 1998—2004, 1973
- 24) Abercrombie, M. and Heaysman, J. E.: Observations on the social behaviour of cells in tissue culture II "Monolayering" of fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, 6: 293—306, 1954
- 25) Stocker, M. G. and Rubin, H.: Density dependent inhibition of cell growth in culture. *Nature*, 215: 171—172, 1967
- 26) Macieira-Coelho, A.: Influence of cell density on growth inhibition of human fibroblast *in vitro*. *Pro. Soc Exp. Biol. Med.* 125: 548—552, 1967
- 27) Ceccarini, C. and Eagle, H.: Induction and reversal of contact inhibition of growth by pH modification. *Nature New Biol.*, 233: 271—273, 1971
- 28) Todaro, G. J. and Green, H.: Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established line. *J. Cell Biol.*, 17: 299—313, 1963
- 29) Rüdiger, H. W.: Method to culture diploid fibroblasts on a large scale. *Methods in Cell Biology* vol. IX p. 15 Academic press, New York, 1975