Bact., 62, 293-300. 3) Burne, F. M., 1932, Lysogenicity as a normal function of certain *Salmonella* strains. J. Path. & Bact., 35, 851-4) Rounr, P. M., 1948. Les staphylocoques lysogènes. Colloques internationaux du centre

national de la recherche scientifique. 5) 内田清二郎, 寺島二, 寺島東洋三, 1952, フォージ産生大腸菌株の検出成績. 日本細菌学雑誌, 7, 6, 591-594.

悪性腫瘍を宿主とする ectromelia virus の 封入体に関する研究*

加 藤 四 郎**

SHIRO KATO: STUDIES ON THE INCLUSION BODIES OF ECTROMELIA VIRUS PROPAGATED IN THE ASCITES TUMOR CELLS

[受稿 4月8日 1955]

動物virusに於けるhost-virus interactionに関する研究は、宿主細胞の条件が複雑不定で、定量も困難であり、研究上多くの障害がある。然し近年種々の向神経性 virus によつて認められた Ehrlich 腹水癌細胞⁽¹⁻³⁾に対する oncolytic action に関する業績は、宿主が均一で而も単一遊離細胞であり、従つて定量的研究はもとより、形態学的研究も容易なる点、今後の動物 virus 感染機構の研究に一方向を与えるものと思う。吾々は ectromelia virus を用いて、腹水腫瘍に対する感染実験を試み、此の virus が Ehrlich 腹水癌細胞のみならず、吉田肉腫細胞をも好適な宿主として増殖すると云う事実を見出した。此の2つの新たな host-virus system は、宿主細胞内に封入体を形成する等、従来の system とは異なる多くの利点を有しており virus 増殖様式の研究上有力な手段たり得ると信ずる。

本論文は主として此等癌細胞内に出現せる ectromelia virus 封入体に関する新知見を報告する。

ectromelia virus の封入体⁶⁾に関しては、Marchal が本 virus を発見して以来、mouse の種々の組織細胞の細胞質内に好酸性封入体を形成する事が、知られている。Fenner⁷⁾によれば Mooset は此の virus を腹腔内に接種して、腹水中に封入体を認めている。土肥^{8,9)}は、腹水単球内に、Giemsa 染色で、azurophyl な細胞質内封入体

を認め、此の封入体は超生体観察により、基本小体を含むものとして、克明に其の発展過程を発表している。

吾々は、形態学的観察の容易な腫瘍細胞を用いて、ectromelia virus の封入体を研究し、此の virus は、その生活環に於いて、形態学的には直接移行の見出し得ない且つ染色態度の全く異なる二種類の封入体を形成する事を知つた。

実験材料及実験方法

実験動物：15~20g 市販白色 mouse ectromelia virus：京大土肥博士より分与を受けたもの及び阪大微研ウイルス学部¹⁰⁾に於て分離せるものを用いた。

Ehrlich 腹水癌及び吉田肉腫：阪大微研外科芝博士より分与を受けた。

Virus の接種材料としては、ectromelia virus を mouse の腹腔内に接種し、死亡直前の肝の生理的食塩水乳剤、又は該乳剤を超遠心器にて精製したものを用いた。本実験のために用いた virus titre は $10^{6.5}$ LD₅₀ 程度である。

腹水癌細胞を mouse の腹腔内に接種後更に上記 ectromelia virus 浮游液を接種し、経時的に毛細管ピペットで吸引した腹水材料を、観察のために用いた。

塗抹標本に於ては、Giemsa 染色、谷口・細川 virus

* 本研究の内容は、1954年10月9日日本細菌学会関西支部総会に於て報告した。

** 大阪大学微生物病研究所感染病理学部（主任 釜洞醇太郎教授）

染色, hematoxylin-eosin 染色, 脂肪染色, 多糖類染色, Feulgen 反応等を行うと共に, 塩酸, 三塩化酢酸或は酵素処理を行つた後の染色態度を比較した。

超生体観察のためには, 位相差顕微鏡及び暗視野顕微鏡を併用した。

実験結果

1) 塗抹 Giemsa 染色による観察

上記経時的に採取せる腹水材料を塗抹し, Giemsa 染色による観察を行うと, 早きは6時間頃より, 此等腫瘍細胞及び腹水単球の細胞質内の主として辺縁部に, 円形, 楕円形又は棍棒状の輪廓鮮明な好酸性小体を認める。其の数は殆んど1ヶであるが, 極稀に2ヶ認める事もある。構造は均一且つ compact である。経時的観察により, 始め数 μ 程度の此の封入体は逐次其の大きさを増加するものと思われる。16時間頃観察すると, 此の封入体と別個に, 空胞状の小体の発生を認める。腹水単球や, Ehrlich 腹水癌細胞では元来空胞にしばしば遭遇するが, 此等の空胞は, 一般に Giemsa 染色により完全に抜けて不染である。然し新に認められた空胞様の小体は, Giemsa 染色で薄い青紫の色調を取っており, 輪廓は極めて鮮明である。其の内部は辺縁のみに, 好酸性の微細均一顆粒が配列して, 内部の無構造なものより, 此等の微細顆粒で全く充滿されたものに至る迄の種々段階を認める。此の Giemsa 染色によつて青紫に染つた封入体は, 従来記載の無かつたものであり, 今後の研究の便利のために, 本小体をA型封入体, Giemsa染色で赤く染る早期出現の小体をB型封入体と名付けた。A型封入体は, 殆ど1細胞内に2ヶ以上認められる。其の発生個所は不定で, 細胞質内の到る所より発生する。即ちB型封入体とは位置的に一定の関係を認め難く, 全く別個に発生する事もあり,

B型封入体に隣接したり又しばしばB型封入体内部に発生している像も認められる。A型封入体は, 初期数 μ に満たないが, 逐次直径を増し, 遂には, 核の大きさを凌駕するものもある。48時間頃には, 大小種々多発しており, 多きは10数ヶに達する。一方B型封入体は, A型封入体の発生の進むにつれて, 大きさを増すと共に, 逐次輪廓の鮮明度を欠き, 内部構造は, 粗造となる。末期には, 粗い網状構造を細胞質内に diffuse に分散させて, 色調も不鮮明である。此頃A型封入体は, 内部に好酸性均一粒を充滿し, 細胞質外に遊離せんとする像を認め得る。

宿主細胞は, 此等の経過に従い変性の一路を辿り, 遂に破壊する。

此等兩封入体の発生過程を schema で示せば第1図の如くである。

Boswell¹⁰⁾によれば, ectromelia virus の大きさは210~300m μ と云われている。即ち最低限界ではあるが, 光学顕微鏡可視の範囲に存在する。谷口細川染色による染色も可能であり, 吾々はA型封入体内部の微細均一顆粒は, ectromelia virus 基本小体に他ならないと考える。

2) AB 兩型封入体と超生体観察下に認められる小体との関係

経時的に採取せる腹水材料を, 塗抹標本による Giemsa 染色観察を行うと同時に, wet preparation を作製し, 暗視野及び位相差顕微鏡下に観察した。

早期 Giemsa 染色標本下にB型封入体のみ認められる腹水材料は, 超生体観察により, 殆んどそれに相当する様な小体を区別し難い。やがて Giemsa 染色標本下にA型封入体の出現する時期に至ると, 同時に作製した wet preparation の暗視野及び位相差顕微鏡下に於ても, 輪廓の極めて劃然とした円形小体の出現を容

Fig. 1. Development of two kinds of inclusion bodies A and B. Giemsa staining.

易に認め得る。内部顆粒もその充満度に於ては種々の段階を認めるが、個々の輝点として、明瞭に認められる。試みに、同一腹水材料の塗抹乾燥標本を無染色で、位相差又は暗視野顕微鏡下に観察すると、容易に wet preparation 同様の小体を認め得る。而も少々困難ではあるが、内部微細顆粒も認め得る。此の細胞を、mark して、Giemsa 染色を行うと、其の小体は、A 型封入体に他ならない事を知った。

尙 A 型封入体及び其の基本小体は、wet preparation の明視野顕微鏡下に於ても、condensor を下げる事により観察は容易である。

3) AB 両型封入体と組織細胞内に 報告 されている所謂 Marchal 小体との関係

Marchal 以来、ectromelia virus 封入体は、種々の組織切片の hematoxylin-eosin 染色又は Mann 染色で好酸性であり、其の標本では内部構造を知り得ないが、超生体観察すれば、基本小体の充満像を得ると云われている。

吾々の見出した腫瘍細胞内或は単球内の AB 両型封入体の何れが、Marchal 小体に相当するやを検討した。

先ず AB 両型封入体出現時期の腹水材料を塗抹乾燥後 Giemsa 染色で薄く染めて観察し、AB 両型封入体の位置を確認した後、水、Alkohol 等で完全に脱色した後、組織の場合に準じて H. E. 染色及び Mann 染色を行つた。

結果は意外に、A 型封入体のみが、より eosin の色調をとつて contrast が鮮明となつているのに反して、B 型封入体は、他の細胞質構造と殆ど区別し難い。即ち H・E 染色又は Mann 染色によつて認め得る封入体は A 型のみであり、而も Giemsa 染色の場合と逆に、明に好酸性に染る事を知った。第 2 図に Schema で示した。

次で吾々は、solid な組織を形成している細胞に於て、此の virus 感染時に AB 両型封入体が如何に出現

Fig. 2. Reverse action of eosin.

するか又その染色態度について検討した。

此の研究のためには、同一種類の細胞を用いて、組織発育と浮游状態発育の場合の形成封入体を比較する事が望ましい。

吾々は、Ehrlich 腹水癌細胞或は吉田肉腫細胞を孵化鶏卵の漿尿膜上に発育せしめた後、^{11,12)} ectromelia virus を接種し、ectodermal layer の細胞と同様、切片標本 H・E 染色、Mann 染色で好酸性の封入体形成に成功した。

此の感染漿尿膜材料を用いて、上記の問題を研究した。

即ち此の切片標本を Giemsa 染色し、封入体の染色態度を見ると、腹腔浮游状態発育の場合と同様、H・E 染色で赤い小体即ち Marchal 小体は、青紫の色調を呈した。然し塗抹標本に於いて認められる B 型封入体の如く判然と、好酸性の色調をとる小体は、殆ど認め難い。此の事実は、切片を Giemsa 染色すると云う事の技術的困難性を物語るものか？それとも組織発育の感染細胞内には、B 型封入体が、存在しないのであらうか？

此の疑問を追求するために上述の方法で腫瘍を増殖せしめた漿尿膜に ectromelia virus を感染せしめ、此の lesion を摘出し、ectodermal layer を object glass の一端で剝離して塗抹標本作製し、Giemsa 染色による観察を行つた。一般に変性のみならず、機械的な外力によると思われる細胞破壊像が多いが、明に形態学的に腫瘍細胞と認められるものがあり、而もその中に、AB 両型封入体を含有する事を確認した。

猶此の場合 A 型封入体は宿主細胞が浮游状態に発育する場合より遙に大きいものにしばしば遭遇した。又 B 型封入体は一般に輪廓構造に於て、鮮明度を欠く様に思われる。

4) AB 両型封入体の細胞化学的研究

此の研究に際しては、常に塗抹 Giemsa 染色で両封入体をそれぞれ確認 marka した後脱色し同一封入体に関して染色性の変化を比較した。

a) AB 両型封入体と核酸。

PNA を選択的に除去すると云われている塩酸処理 (1N HCl 60°C 5~10分) ¹³⁾を試みた後 Giemsa 染色を行つた。結果は、もとより腫瘍細胞の細胞質の豊富な PNA は全く除去されて、抜けているが、依然として、A 型封入体の基質は青紫に、内部顆粒は好酸性に赤く染り、B 型封入体の赤い色調も変らない。即ち此等封

PLATE I

加藤論文附図

PLATE II

PLATE III

写真説明

倍率は、総て900倍。10, 11, 14を除いては、Giemsa染色。

Plate I

- 1) Ehrlich 腹水癌細胞細胞質内に認められる小型で compact なB型封入体。赤く染る。
- 2) 少々大きなB型封入体。
- 3) AB 両型封入体が共存している。
- 4) 左側 Ehrlich 腹水癌細胞内にA型封入体が2ヶ発生しているがB型封入体は少々輪郭が不鮮明となっている。右側単球内B型封入体。
- 5) 少々大きなA型封入体。B型封入体は更にdiffuse になっている。

6) 48時間頃になると、何れの腫瘍細胞にもA型封入体の多発している像を認める。B型封入体は、可成りdiffuseに分散している。

Plate II

7) 破壊された Ehrlich 腹水癌細胞。A型封入体は内部に好酸性微細均一顆粒を充して遊離せんとしている。B型封入体は粗な網状構造を呈する。

8) 吉田肉腫細胞に認められるB型封入体。

9) 吉田肉腫細胞に認められる多数のA型封入体。内部には何れも無数の微細顆粒を認める。B型封入体は、殆ど細胞質内全般に拡がっている。

10) 位相差顕微鏡下に認められる Ehrlich 腹水癌細胞のA型封入体。基本小体は明瞭である。

11) 明視野顕微鏡下に condensor を下げて観察してもA型封入体及び基本小体は明瞭に認められる。

12) 塩酸処理後 Giemsa 染色を行つた Ehrlich 腹水癌細胞。細胞質のPNAは完全に抜けているが、AB両封入体、基本小体は、染色性に变化を認めない。

Plate III

13) 三塩化酢酸処理後 Giemsa 染色を行つた。Ehrlich 腹水癌細胞。核、細胞質はもとより、B型封入体及び基本小体は何れも認め難いが、A型封入体の基質のみ依然青紫に染つている。

14) 孵化鶏卵の殻尿膜に増殖せる Ehrlich 腹水癌細胞内に認められるA型封入体。切片標本 hematoxylin-fuchsin 染色。

入体構成物質の大部分は、PNA と無関係である様に思われる。

次に PNA 及び DNA を共に選択的に除去すると云¹⁴⁾われている三塩化醋酸処理 (10% T.C.A. 90°C 15分) 後 Giemsa 染色を行つた。此の処理にあつては、両核酸は全く除去されているので、核及び細胞質は殆ど不染であるが、A 型封入体に相当する部分のみ依然 dense な青紫の色調を呈しており、contrast は著しい。然し A 型封入体内部顆粒及び B 型封入体は全く他の部分と contrast を認め難い。即ち A 型封入体の基質に関する限り、大部分の成分としては、DNA、PNA 共に無関係であるらしい。A 型封入体内部顆粒及び B 型封入体に関しては、DNA が除去されたために不染となつたのか、或は此の化学処理によって、染色性の変化を来したのかは不明である。

そこで DNA を選択的に染める Feulgen 反応を行¹⁵⁾つた。市川の方法により pH 3 に規正せる Schiff 氏液を用いた。AB 両封入体及び基本小体は何れも殆んど陰性に終つた。然し時として、B 型封入体の compact なものに微弱陽性を示すものがある。何れにせよ此の反応の限界を示すものであろう。

以上の実験により少くとも B 型封入体は、DNA を含んでいる可能性があると思像される。此等の関係は Schema として第 3 図に示した。

Fig. 3. Histochemical study.

b) AB 両型封入体と蛋白質

腹水塗抹標本に対し、Trypsin 37°C 処理後、Giemsa 染色を行つた。両封入体とも容易に消化されるが、作用時間を追うと、先ず A 型封入体基質、次で B 型封入体の消化があり、基本小体は強い抵抗を示す。

c) 其の他多糖類、脂肪染色は両封入体とも陰性である。

5) 吉田肉腫細胞に対する ectromelia virus の態度

吾々は、Ehrlich 腹水癌細胞と併行して、rat の腹腔内に増殖せる吉田肉腫細胞に対して、ectromelia virus の attack を試みた。此の実験は相互の量を変えて再三行つたが、吉田肉腫細胞に封入体を形成せしめる事は出来なかつた。次で吾々は、吉田肉腫細胞を rat より採取し mouse 腹腔内に移植せしめた後に、再度此の virus の attack を試みた。此の結果は、Ehrlich 腹水癌細胞に於けると全く同様の過程を経て、AB 両型封入体並びに、virus 基本小体形成のある事を知つた。

本実験により、ectromelia virus の更に新たな宿主を、病理学上肉腫と云う特殊な細胞に見出したのみならず、同一細胞が、その宿主動物の環境の差のみで、virus に対する、susceptibility を変化し得ると云う興味ある示唆を得た。

考 接

吾々は、ectromelia virus-Ehrlich 腹水癌細胞 system 及び ectromelia virus-吉田肉腫細胞 system と云う 2 つの新たな host-virus system を見出した。此等の system は、動物 virus 感染機構の研究のために従来見られない多くの利点を有している。

即ち宿主側について云えば、

1) 宿主が、同一細胞集団からなる均一な system である事。

2) 宿主が、浮游状態に増殖しているので、定量が容易であり、又 virus が細胞を attack する機会は均等である。

3) 宿主細胞の増殖力は旺盛で短時日に $10^8/\text{cc}$ の order に迄増殖するので、virus との相関関係の研究に於て数的に適當である事。

4) 宿主細胞は、動物の体細胞として、最も大きなものの 1 つであり、形態学的観察の容易な事等が挙げられる。

virus 側について云えば、

1) 此の virus は、感染宿主細胞内に封入体を形成して増殖するので、個々の細胞の感染の指標たり得る。

2) 此の virus は、強い oncolytic action を有しており、宿主細胞よりの封入体の放出は、細胞の破壊を意味する。

3) 此の virus の size は大きく、光学顕微鏡可視である。

即ち此等 system の利用は、動物 virus 感染機構の研

究に新たな面を開拓するものと信ずる。

吾々は先ず此等の宿主細胞内に於ける virus の発生過程を形態学的に追求したが、従来単一と考えられていた此の virus の封入体は、実は発展過程を異にする2種類の封入体に別つべき事を知った。一定の潜伏期の後 Giemsa 染色により赤く染る封入体が出現し、次で二次的に輪郭鮮明な青紫に染る封入体の出現がある。後者は基本小体と思われる均一微細顆粒によつて充満されている。両封入体は、形態学的には直接移行は認められず、別個のものと考えられる。

吾々は前者をB型封入体、後者をA型封入体と名付けた。Marchal 以来本 virus の封入体として記載されたものの中、hematoxylin-eosin 染色、Mann染色、或は超生体観察下に見出されたものは、総てA型封入体であり、Giemsa 染色で、好酸性に認められたものは、B型封入体である。

細胞化学的には、両封入体ともに、脂肪、多糖類は証明されない。核酸に関しても、殆んど証明し難いが、B型封入体の中に Feulgen 反応の微弱陽性を思わせるものがある。蛋白分解酵素に対する作用より考えても、両封入体とも主成分は、蛋白質と思われる。

此等 AB 両型封入体の機能的意義は、尙不明であるが、想像を許されるならば、B型封入体は、virus 生成のための能動的な産物であり、恐く virus 素材たる核蛋白質の集団であり、此れより細胞内の各所に、物質の分配が行われ、virus 粒子の完成、それに伴う virus の溜り場としてのA型封入体形成となつて、細胞より離脱するのではなからうか。

此の機能的意義に関しては尙研究を続けている。

結 論

吾々は ectromelia virus が Ehrlich 腹水癌細胞及吉田肉腫細胞を好適なる宿主として増殖する事を見出した。此等の新たな2つの host-virus system は、従来に見られない多くの研究上の利点を有しておる。

此の system を利用し、virus 感染腫瘍細胞内に於ける形態学的変化を追求した。その結果此の virus はその生活環に於て、形態学的に性質の全く異なる2種類の

封入体を形成する事を知った。早期に出現する Giemsa 染色で赤く染るものをB型封入体、後期に出現し、同染色で青紫に染り、内部に好酸性の微細均一顆粒を充すものを、A型封入体と名付けた。所謂 Marchal 小体は、A型封入体を意味する。AB 両型封入体は、機能的には、関連性を想像せしめるが、同一封入体の時期による差ではない。

文 献

- 1) Koprowska, I. and H. Koprowski; Morphological and biological changes in mouse ascites tumors following induced infection with certain viruses. Fed. Proc., 11 : 420 1952.
- 2) Ackermann, W. W. and H. Kurtz; A new host virus system. Proc. So. exp. Biol., 8 : 421 1952.
- 3) Love, R., H. Koprowski and H. R. Cox; Cytological studies on the Ehrlich ascites tumor before and after infection with Bunyamwera virus. Cancer Research, 13 (4-7) : 350 1953.
- 4) Koprowska, I. and H. Koprowski; Morphologic and biologic changes in a mouse ascites tumor following induced infection with certain viruses. Cancer Research, 13(9) : 651 1953.
- 5) Koprowska, I. and H. Koprowski; Effect of Mengo encephalitis virus on the Ehrlich ascites tumor of the mouse. J. Natl. Canc. Ins., 14(3) : 627 1953.
- 6) Marchal, J.; Infectious ectromelia. J. Path. and Bact., 33 : 713 1930.
- 7) Fenner, F.; Mouse pov (infectious ectromelia) J. Immunol. 63 : 341 1949.
- 8) 土肥清一, ウイルス性疾患に於ける封入体の biology に関する研究 [I]. VIRUS, 1(2) : 127 1951.
- 9) 土肥清一; ウイルス性疾患に於ける封入体の biology に関する研究 [II]. VIRUS, 3(4) : 307 1953.
- 10) Boswell, F. M.; Electron microscope studies of virus elementary bodies. Brit. J. Exper. Path., 28 : 255 1947.
- 11) 古沢英一, 萩原喜一, 和田笑子; エールリツヒ腹水癌のフ化鶏卵漿尿膜への移植実験, 第6回日本病理学会西部地方会, 1954.
- 12) 山本正, 曾根正藏, 藤岡小太郎; 吉田肉腫の發育鶏卵内培養に就て. 癌, 41. 1950.
- 13) 柴谷篤弘; 動物学雑誌, 58 : 199 1949.
- 14) Pollister, A. W., Ris, H., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 12 : 147 1947.
- 15) Itikawa, O. and Y. Ogura; Simplified manufacture and histochemical use of the Schiff reagent. Stain Technology, 29(1) : 9 1954.