ウイルス性疾患に於ける封入体のbiology関する研究*

第3報 エクトロメリア・ウイルス-エールリツヒ

癌細胞系に就いて**

土 肥 清 一***

SEIITI DOHI: STUDIES ON THE BIOLOGY OF INCLUSION BODIES IN VIRUS DISEASES. (3)

〔受稿 6月7日 1955〕

I. 序

第2報¹⁾²⁾に於て、我々はエクトロメリア・ウイルスのマウス腹腔内接種に際し、腹水に常在する単球がこれに親和性を有し、併も此時に容易に胞体内に封入体を形成する事を報じた。又此腹水穿刺によつて得られた単球内の封入体の形態、発現過程及び機能に就いても暗視野、紫外線、位相差及普通顕微鏡所見を基に論及した。斯る感染単球、換言すれば簡單化されたウイルス・宿主細胞系が新にもたらした実験上の利点は、人工産物の介入する余地のない無傷の単離細胞内のウイルス増殖像の観察を可能ならしめる事であつた。更にこの細胞の腹腔中に於ける浮游状態は液状培地に培養される細菌にも比較され、従つて細菌ウイルスによる各種のモデル実験の如くウイルス感染機構解析に好材料を提供するかに見えた。然し乍ら、一匹の小動物から得られる腹水は高々数滴に過ぎないために、経時的な形態学的観察より進んで、更に、ウイルス増殖態度を量的に取扱う動的な実験に入ることは一応見送りの状態にあつた。

一方、腫瘍細胞がウイルスの好宿主たり得る事は、既に Levaditi and Nicolau (1922)³⁾以来、幾つかの報告があり、近年各種の腫瘍株が実験室で容易に保存されると共にこの方面の関心が再び高まつて来た。即ちマウス肉腫180なる系に就いて、Tunner and Mulliken (1947)⁴⁾が牛痘ウイルスが、又 Moore (1949) が Russian Far East 脳炎ウイルスが親和性を有する事を報

じ、又組織培養法を用いては、この方面に賞用されている He La 細胞分離者の Gey は Bang と共に 1952 年に各種の線維肉腫を正常線維細胞と比較しつつ、Eastern equine encephalomyelitis ウイルスに対する親和性を検討し、共に親和性を有し乍らも二三の点に就いての相違を詳細に検討している。此等の事例を通覧するに、その多くは向神経性ウイルスを取扱つたものであるが、特に我々の注意を惹いたものは、マウス腹水中で増殖するエールリツヒ癌⁵⁾⁶⁾に就いての知見である。即ち Ackermann and Kuntz (1952)⁷⁾⁸⁾は向神経性インフルエンザNWS株の親和性を証明し、Koprowski^{9,10)11)12)}一派は10数種のウイルスを用いた広範な実験から 1953年に Mengo の脳炎を始め二、三の脳炎ウイルスの増殖を見出した。

驛つて、若しエクトロメリア・ウイルスがこの遊離癌細胞内で増殖し得るならば、腫瘍細胞の持つ自律的な無限の増殖力を利し得て、腹水単球の実験に於て遭遇した量的不足の第一障碍は少くとも一応突破出来よう。既に我々はエクトロメリア・ウイルスが皮膚上皮細胞は勿論、接種様式を工夫変化する事により、気管上皮、腸上皮夫々の細胞内に封入体を形成しつつ増殖する高度の向上皮性を特徴とすることを経験している。幸にエールリツヒ癌¹³⁾³⁵⁾細胞内にエクトロメリア・ウイルスを増殖せしめる企ては成功し、我々は単球の場合と同様に、胞体内に封入体を形成しつつ増殖する知見を得る事が出来た。即ちマウス腹腔中で 10⁶個に達し得る細胞を舞台に、エクトロメリア・ウイルスの細

* 本研究には文部省科学研究費の補助を得た。

** 本報の内容は昭和30年4月2日第3回日本ウイルス学会に於て報告した。

*** 京都大学医学部病理学教室 (指導: 天野重安)

胞内増殖態度を再び詳細に検討する端緒を得た。

依つて、此度は従来の各種検査術式に加えて、新たに超薄切片の電子顕微鏡像による形態学的観察及び感染細胞の数量的変化等に基づいてウイルス増殖態度を検討すると共に、同時に単球の変化をも対比する事とした。

II. 材料及び方法

使用ウイルスは前報と同じく、マウス腹腔内接種によつて2乃至3日で死亡した肝乳剤で、生理的食塩水又はTyrode氏液で 10^{-2} 及び 10^{-5} に希釈接種した2群に就いて実験を行つた。

使用動物は我々の入手出来た nA2, DNK なる二系のマウス及び普通の雑系マウスを用い、特に腫瘍接種の場合は動物の個体差による変動を避ける意味で、生後約10週の雄性均一系マウスを使用した。

エールリッヒ腹水癌の株は京大病理学教室に数年来保存されているものである。

接種液は常に1匹当り、 $1 \sim 1.5 \times 10^7$ 個の癌細胞を0.2ccに浮遊せしめる如く適当に希釈、接種し、単なる腫瘍累代の場合も大体同様用量を用いた。斯くて、接種後6乃至8日で腹水は多量の粘稠な乳白液と化し、理想的な腹水癌状態となる。前記の数及び量に於ては、僅少の場合に腹壁に大きな腫瘍塊を形成し、腹水癌状態に達する事なしに、全身血行性転移を起したり、又は非常に遅れて腹水内増殖を示したりする等の成績の不統一を免れるべく経験的に余裕を持たせて決定した我々の基準であり、接種直後の一時的減少も防止可能である。尚10日以後に至ると、血液混入により、腹水は次第に桃色から紅桃色へと変化し、白血球混在及び腹腔内細菌湧出による腹膜炎を必発するに至る。従つて止むを得ざる場合は抗生剤の附加により、細菌発育を押えて使用したが、可及的斯かる材料は棄却した。以上により、自発的癌細胞の減少、消失は殆ど経験しない。只、増殖の遅延する事は時々経験する事であり、マウスの系統を変えても大同小異の感が強く、この点の詳細な分析は今後追求すべき問題であるが、動物の栄養状態、特に水分補給に留意すべき印象を得ている。

位相差顕微鏡観察は前報と同様、Dark Medium 90 倍油浸対物レンズを使用し、超生体で行つた。

超薄切片作製は注射筒内に吸引した腹水を直ちに2%オスミウム酸及びペロナル緩衝液 (pH=7.2) 等

量の固定液に1時間混じ、遠沈後水洗、脱水を経てn-butyl methacrylate に包埋し、小林島津型ウルトラミクロトームを用い、安全剃刀刃又はガラスナイフ¹⁵⁾にて大凡 0.05μ 前後を目標として切断した。観察は原則として包埋剤未除去のまま行つたが、時に除去を行い、クローム蒸着試料とした。この場合醋酸アミールを用いた。(本稿の写真説明には除去試料の場合のみその旨を附記した)。使用電子顕微鏡は島津 C-2 型及び日本電子光学 JEM-5C 型で1900乃至3500倍で撮影した。

腹水癌細胞全数の計算は、背位に固定、麻酔死せしめたマウス腹水を注射器にて吸引し、赤血球用メンヂュール、Türk 氏液、Fuchs-Rosenthal 計算盤を用いて数を読み、その全数を換算、更に同機操作を1乃至2ccの生理的食塩水の洗滌液に就いて行い、通常5回程度の反覆によつて80倍酪大の1視野に数枚以内の細胞数に達すれば腹壁を開き、後膜附近に残留せる細胞を更に洗い、前述の如く細胞消失迄算定し、総和を求めた。以上の操作には1匹のマウスに対し約20乃至30ccを要する。同時に塗抹ギムザ染色による細胞分類及封入体有無の百分率を作成し、又必要に応じて之を腫瘍細胞数値の補正に利用した。この場合介入して来る誤差因子として次の三点を考慮せねばならない。即ち、1. 各動物による個体差、2. 洗滌及計算操作法による誤差及び、3. 癌細胞以外の単球及び炎症性細胞、特に好中球の関与の三点である。この中、2.3.に

Text-Fig. 1. Quantitative changes of Ehrlich mouse ascites tumor cells after ectromelia virus inoculation.

Text-Fig. 2. Quantitative changes of Ehrlich mouse ascites tumor cells after ectromelia virus inoculation.

関する誤差は Klein and Révész (1953), Lucké and Berwick (1954) 及び我々の検討では 10%以下に押えられるが、個体差は Lucké 等は 15%, Klein 等は 33.3%とし、被験動物数匹の平均値を以て、誤差の増大を抑えるべき点を指摘している。この点を考慮して、我々は 2 乃至 5 匹のマウスに就いて計算値を plot し、正常腹水癌増殖曲線に対するウイルス接種癌細胞増殖曲線の意義を検討し、少くとも 1/3 以下の差を以て増殖抑制の意義を認めた。この点の誤差吟味の詳細は後報の予定である。

III. 成 績

1) ウイルス感染腫瘍細胞数の腹腔に於ける数的消長 (第 1, 2 図)

10^7 個内外のエールリッヒ癌細胞を腹腔に移植すれば、4 日後には脾臓等の腹腔に接した諸臓器及び脂肪組織等に播種性の転移が生ずるが、腹水中に浮遊増殖する細胞は第 1 及 2 図に示す如き曲線を描いて増殖し、10 日後では最大値 $1,500 \sim 2,000 \times 10^6$ 個に達する。本実験に於ては、接種後 2 乃至 3 日に癌細胞数が所期の 50×10^6 乃至 100×10^6 程度に増加せるを確かめて、ウイルス感染肝乳剤の 100 倍 (約 10^6 LD₅₀) 及び 10^8 倍 (10^8 LD₅₀) 各稀釈液を腹腔に接種し、癌細胞の経日の数量的消長を調べた。

第 1 及び 2 図に示した曲線がそれである。之に依れば、何れの場合も死亡前 24 乃至 48 時間頃より、対照実

験と比較して、我々の設定した 30% の正常変動域を超えた有意の減少値を示し、下降の一途を辿る。この事実は後に述べる塗抹標本による知見、即ち (a), 核分割像の減少と共に消失、(b), 封入体出現率の急激な上昇及び之による細胞変性像の出現と時期的な一致を示し、ウイルス感染によるエールリッヒ癌細胞發育障碍の結果として矛盾なく説明出来る。只、接種されたエクトロメリア・ウイルスはエールリッヒ癌細胞の外に肝臓、脾臓等の諸臓器に対しても親和性を持つ為に、癌細胞に吸着を免れたウイルスは之等諸臓器に達し、増殖する為に、接種ウイルス濃度に応じて、図に示す如き死亡過程をとる。為に続いて期待される癌細胞の劇的な減少期に迄追跡し得なかつた。

2. 塗抹標本による観察 (第 1, 2 図)

A. 10^{-2} ウイルス稀釈液接種の場合： 10^{-1} ウイルス液接種の際、単球胞体内封入体の出現は 6 乃至 8 時間後であるに対し、この場合は 24 時間後に至つて、単球の 24% に封入体が出特して来る。此等の細胞は既報の如く、胞体の好塩基性が失われ、胞体は稍膨化し、変性空胞の出現を来し、封入体は橢円形的好アズール性物質として、胞体の辺縁部に出現して来る。一方エールリッヒ癌細胞は、単球との比率、核分割像も殆ど正常増殖の範囲内に止り、細胞の形態も正常で、好塩基性強く、殆ど脂肪変性顆粒の出現も認めない。48 時間後には単球の封入体は増加し、76.9% に達する。エールリッヒ癌細胞に於ては、単球との比率及び核分割像数にも依然変化を認めないが、極く僅かの細胞 (5% 内外) の胞体内に単球のそれと殆ど同性格の封入体の出現を見るに至る。此封入体は直径約 2μ 位のアズールに濃く染る境界鮮明で、稍円滑ならざる輪廓を持つ小体で、矢張り好塩基性の減退せる細胞内に選択的に認められる。処が時間の経過による出現率の上昇と共に、単球のそれと多少異なつた在り方を示して来る。

即ち、72 時間後に至れば出現率は 12.5% に上昇し、その形態も輪廓の凹隙な橢円形乃至凹凸ある細長い小体として、而も単球の場合とは逆に核に接して現れる傾向が大であり、又胞体の好塩基性が保たれ、細胞障像の全く認められない細胞に寧ろ多数現れる。時には核分裂途上の細胞、2 核細胞及び粘液変性細胞にも認められる。又 1 個の細胞に 2 乃至 3 個の封入体を含む事も多い。核分割像は減少し、腫瘍増殖の抑制が既に始まつている事を物語っている。単球の封入体は勿論増加の一途を辿る、

斯くて動物は4日前後に斃死するがこの時期には単球、エールリッヒ癌細胞共に100%に近い封入体出現を見る。腫瘍細胞の好塩基性は減退著しく、脂肪顆粒の出現も目立ち、封入体の緊密な染色性は次第に網状に淡くなり、周囲との境界も次第に不鮮明となる。

斯る時期に於て、好アズール封入体内部に特有な変化が出現する。即ち直径 2μ 前後の円形乃至橢円形の輪廓の円滑な、ギムザ染色で淡青色に染る稍脂肪滴とまぎらばしい封入体が集団性に発生して来る。更に時間が経過すれば、好アズール封入体が減退して行くと共に、淡青封入体は容積を増大し、1個のエールリッヒ癌細胞内に数ヶ、時には10個迄も達し、胞体を占拠し、核を圧排するに至る。時に淡青封入体の外層にはある厚さを持った被膜の存在を思わしめる。即ち、感染後期に於て、好アズール封入体の内及び之に接して、淡青封入体が発生し、前者の輪廓が不鮮明化し、瀰蔓化すると平衡して、後者の増大へと進行し、その極期には淡青封入体内部に、かすかの好アズール性の小粒子の見極め得るものも現われる。

B. 10^{-5} ウイルス稀釈液接種の場合：エールリッヒ癌細胞の1400万個を移植して2日後に 10^{-5} ウイルス移液0.1ccを腹腔に接種して24時間間隔でその腹水塗抹標本を観察すれば、72時間後に始めて前記の特徴を示す封入体が先ず単球に出現する。即ち単球の20%に認められる。一方エールリッヒ癌細胞は全腹水細胞の93.7%を占めるが、封入体はその0.48%に証明され、又核分割像も1.44%と略正常増殖時の値をとる。96時間後に於ては単球の80%に封入体を認めるに至るが、エールリッヒ癌細胞は3.42%と低く、明らかに単球に較べて封入体出現の時期的遅延が目立つ、而も高濃度ウイルス液接種に比して、特に顕著な差を示す事を知る。

斯くてマウスは5日後に典型的な肝臓、脾臓の病変を呈して死亡するが、この期に至ればエールリッヒ癌細胞内の封入体出現は前群実験と同様に、急激に増加し、単球に於てもそうであるが、殆どの全腫瘍細胞内に現われ、而も遙かに多彩な像を呈する。即ち、1個の細胞内にも2乃至3個の好アズール封入体及び薄青く染る円形乃至橢円形の前記淡青封入体を包含するものが多く、此封入体の胞体内位置も前述の如く、単球の場合と異なつて、種々の位置を占める。勿論この時期には核分割像は殆ど認められない。

今上記2種類の封入体の出現せる腹水塗抹標本を

FeulgenのDNA染色を試みると、核側に出現する好アズール封入体は淡く陽性の紫色を呈する。而もその陽性度はアズール色調の濃淡に比例し、後者が瀰蔓性で染色性が微弱になれば、Feulgen反応も殆ど顕微鏡観察に掛つて来ない。単球の場合も略同様の結果を得た。一方ギムザ液に淡青く染る封入体は塗抹標本のFeulgen染色では陽性成績を得ていない。即ち、瀰蔓性になり、Feulgen反応弱陽性になつた好アズール封入体に接して、全く陰性の滴状物としての存在が指摘出来る。切片標本に於ける成績と関連して考按の項で再び触れるが、兎に角Feulgen反応は同一細胞に於て、好アズール封入体には陽性に、淡青封入体には陰性に現われる知見は確かに捉える事が出来る。

3. 位相差顕微鏡による観察

単球内封入体像は前報に於て、可成詳細に報告したが、エールリッヒ癌細胞に於ても質的には全く同一像を呈する。只塗抹標本で指摘したと同じく、2乃至 4μ 更に 10μ と種々の大きさを示す封入体が単一細胞内に5乃至6個も発現する点がこの癌細胞に目立つた特徴である。勿論その何れも等しくその内部乃至表面に均一の大きさを接つたウイルス粒子が充満して見える。

4. 電子顕微鏡による超薄切片の観察

前項に述べた光学顕微鏡の知見を他面から吟味する目的で、各時期に於けるエールリッヒ癌細胞のエクトロメリア・ウイルス感染像を電子顕微鏡学的に観察した。本方法では15乃至 25μ 位の直径を有する癌細胞を、厚さ 0.1μ 内外の目盛で切片として観察するが故に、飽く迄も細胞の薄い一断面を見るに止る点を像の解釈に當つて留意せねばならない。

核には電子線を強く散乱する核膜及び核網構造が認められ、特に所謂 marginated chromatin 像が顕著である。核仁も同様に明瞭な像を示すが、肝細胞のそれに認められる如き紐状の内部構造を示さない為、核網が核仁に纏絡して現れる場合には両者の鑑別は困難となる。核の外形は切断される場所によつて、当然大小及び形態が種々である。胞体内に散在する糸粒体は位相差顕微鏡の所見と同様に、胞体内に瀰蔓性に存し、位置的には胞体辺縁部に存する。大凡棒状の形態を採り、多少彎曲し、横断による円形像も多い。その内部には所謂 Crista mitochondriale の構造を認める。尚、胞体の一局処に曲折した紐状の濃く、太い線維構造が大凡平行して出現し、多くの場合周囲に糸粒体が存する。太い endoplasmic reticulum に該当するもの

で、末端は盲端で袋状を呈するが、その個々の線維は一般に太く、胞体の一局処に限局する傾向が強いものと見做される。又胞体外に小突起を出すものが多い。尙 Selby⁽¹⁸⁾ (1954) が正常エールリッヒ癌細胞に認めた closed-packing 排列を採る 60m μ 大の均一な粒子像なるものを我々は認めた経験はない。

尙、好アズール封入体を出現せしめる感染初期の癌細胞に於ては、胞体辺縁部に電子濃度の強度な小体を認める。即ち、星芒状乃至円形の外廓鮮明な、直径 1.5 μ 内外の小体が数個存し、一般にその末梢部が中央部に較べて濃潤であるが、時には内部も濃く、均質で、内部に特別な細構造を認めない。時に 200 $\times$ 100m μ 程度の細長い空胞像を含む事もある。之等の細胞内の在り方は孤在性で、いつれの細胞有形成分とも位置的な特殊関係を誌め得ない (Fig. 7, 8, 9, 11)、之等粒子の性質に関しては同時期の塗抹標本との比較によつて (Fig. 1, 2) ウイルス感染に特異的变化ではなく、変性脂肪滴であると考えられる。

次に該時期の細胞に認められる最も注目すべき所見は、胞体内の位置、発現率及形態等に亘る塗抹標本との比較によつて、前記脂肪顆粒と区別され、好アズール封入体と同定される構造の発現である。その電子濃度は脂肪滴より弱く、時に胞体成分との境界不鮮明な雲架状形態を呈する。(Fig. 7~14) 之等は時に胞体辺縁部に出現するが、多くの場合核に密接した位置を採り、内部には 300 $\times$ 200m μ 、橢円形乃至円形のウイルス粒子が散在するが、之と同大若しくは稍大にして、同様の形態を採り、その内部は均質な極淡い濃度を示すものから、中空、更に濃淡各種程度の中心体を認める未熟型ウイルスも存し、数量的には寧ろ後者が圧倒的に多い。又この封入体に近く、胞体内に小集団的にウイルス粒子を認める事も多く (Fig. 13)、その他 Fig. 9 の如く、散在性のウイルス像をも認める。この他 Fig. 14 では 150 $\times$ 100 m μ 大の中空円形~橢円形粒子の集塊を見る。核及び胞体一般は顕著な変化に乏しく、endoplasmic reticulum の出現は貧弱で、糸粒体は封入体周囲に高密度に現れ、軽度の膨化を示す場合もある。

続いてギムザ染色で淡青の小封入体が出現して来る。脂肪滴の存在は前述と略同様であるが、雲架状の好アズール封入体に接して、又はその内部に遙かに濃度の弱い、均質円形の封入体が 1 個乃至数個現れる。その位置的関係からギムザ染色による淡青封入体の

初期像に当るものである。斯る封入体表面には成熟型ウイルスが附着像として捕えられ、内部は多くの場合、未だ全く無構造に止まっているか、時に 600~750 $\times$ 300~500m μ の橢円形空泡で充満されている。該時期の核及び胞体成分の性状は 72 時間後のそれに略等しく、核内部に小空泡が出現する事がある。糸粒体は膨化し、前記二種封入体に接近する傾向を示す。endoplasmic reticulum は胞体一局処に認められる。

感染極期に達すれば、淡青封入体がギムザ染色で多数現われ、殆ど全細胞の 90% 以上が封入体を含有するに至るが、該時期には、此淡青封入体自体にも多彩な電顕的構造が指摘されるに至る。

先に述べた中等度の電子濃度を有する好アズール封入体は次第に減量し、淡く、その境界も益々不明瞭となる傾向を示すが、内部には依然未熟型を主としたウイルスを擁している。而して之に接する所謂淡青封入体の肥満な限界膜面には成熟型ウイルスを認めるのである。従つて封入体の構造と関連してウイルスの増殖状態にも相違があることは明かである。

扱、所謂淡青封入体の電顕的構造を、その發育に応じて今少しく詳述する。即ち、(A) は (Fig. 13, 15, 16) 内部にウイルスを含まない淡い均質の基質からなり、表層部は比較的電子濃度が強い。該部分は Fig. 16 の如く、20m μ ~40m μ 程度の小粒子の濃密層である、この型に属するものでも、被膜にウイルスの乏しいものでは表層の濃密化傾向が少く、一様に均質な淡い基質のみで構成されている。(B)、(Fig. 17, 19) 次に (A) 型と同様に中心部及び末梢部が電子濃度の明確な差を示し、外層は約 1 μ 程度の濃密圈をなしている。而して此外層圈には成熟ウイルスの少数に、未熟型ウイルス及前記巨大型空泡の充満像が目立つ。又 Fig. 19 の如く、殆ど成熟型ウイルスに依つて占められる場合もある。何れの場合も電子濃度の弱い中央部には極少数の成熟型ウイルス散布像を認めるに過ぎない。次に (C)、(Fig. 18) 末梢部の容積が更に増大し、巨大空泡の密度も益々増大し、中央部の成熟ウイルスも相対的に増加を示している。更に (D)、(Fig. 14, 20, 21) に於ては、内部濃度は(時に淡いが)一般に強度の傾向を示し、(B)、(C) の外層圈の濃密状態が平等に封入体内部に行き渡つた様相を示す。時に封入体被膜輪廓の明瞭を缺くものも存する。(Fig. 20) その内部は巨大空泡を均等、高密度に分布せしめて居り、空胞壁は種々の厚さを示し、内部も全く中空のものか

ら、瀰漫性に淡い構造を呈するものがあり、Fig. 21の如くその壁は濃密部の基質形成粒子と略同大なもの¹⁰⁾が薄排列をしている。次に (E) (Fig. 23, 24) 内部の濃度が均質様に高く、その内部に成熟型ウイルスが多数散在し、基質に埋没されている。この場合にはFig. 23の如く僅かに辺縁部に巨大空泡像を認める事もあるが、基質の濃度が増加するにつれて減少し、又ウイルス密度も基質濃度と平行関係にある事を示している。

以上の如く、淡青封入体も電顕的観察によつて大体5種類に分類され得るが、時と共に同一細胞内に之等が各種の組合せにより出現し、好アズール封入体と組合されて複雑な像を採る。極期に於て、核は辺縁に圧排され勝ちで、標本上では核を外れた細胞質像に接する事も多い。残存糸粒体は少く、而も膨化し、時に局所的な endoplasmic reticulum 像を見る。その他一般に胞体構造の網状の荒れた感が強い。

IV. 総括的考按

1. ウイルスと癌細胞との増殖拮抗

エールリッヒ癌細胞とウイルスの関係を13種の向神経ウイルスに就て調べた Koprowski 等 (1953) に依れば、4種は陰性、6種は細胞障害なしにウイルスを増殖せしめ、West Nile 脳炎、Mengo脳炎、Bunyawera の3種ウイルスが同細胞内で増殖し、著しい障害、変性を惹起する点を指摘している。Ackermann 等 (1952) もインフルエンザ向神経性株で細胞の障害による減少を報じ、永田氏 (1954) の追試も同様の結果である。Koprowski 等は塗抹標本中の正常細胞に対する腫瘍細胞の比を、永田氏は0.1ccの腹水中の細胞数を以て前記の結論に達している。そのデータの甚だしい減少値から見て、根本的な疑義を持つものではないが、誤差の点を考慮せねばならない。例えば Bunyanwera ウイルス実験に於ける Love 等 (1953) の Chart 2は減衰波的曲線であつて、腹水腫瘍の永年の研究家 Klein の風に指摘している様に全細胞計算が望ましい。

現、エクトロメリア感染エールリッヒ癌細胞は確かに減少の方向を辿る。時に腹水が粘稠性を失ひ、接種数の1/10以下に落下する事を経験するが、統計的に有意な例数に確実に現出せしめる迄に我々に至っていない。腫瘍細胞の障害が全細胞に高度に及ぶ前に、肝臓その他の重要臓器の病変が死にせしめる点に問題があ

り、この点の工夫を試みつつ重ねて実験を続けている。更に今一つの原因として封入体の形成が細胞障害及びウイルス放出抑制に働く事も考えなければならない。

前記実験結果が示す如く、癌細胞内封入体出現は単球のそれに較べて遅れ、而も感染後期に於ては遙かに大型の而も多数の封入体を出現せしめる。一方腹水細胞内ウイルス量は24時間では明らかに増加を示し、逐時上昇を辿る。(詳細は後報予定)従つて、電顕像をも考慮して、封入体増加はウイルス量のそれと考へて差支へはない。

而らば、単球及び癌細胞の封入体像の発現期のずれに窺われる矛盾を如何に解すべきかの問題が残る。現在我々はこのデータ¹¹⁾を説明し得る段階に達していないが、作業仮説として代謝拮抗の概念を抱いている。即ち、腫瘍と云えば発育力がとりわけて問題となり、正常細胞に比較して組材合成の異常亢進が特質といえる。斯る特異な新陳代謝系にウイルス感染が起つた場合、ウイルス合成系との間に当然競争合いが起るものと考えられ、而もこれが比較的合成力の弱い正常細胞よりも激しく展開される事は想像に難くない。かくて、一旦ウイルス材料合成の方向に転向せしめられれば、元来豊富な高分子物質は活潑にウイルス増殖に利用されて行くのではないかと考えられる。勿論ウイルスの栄養要請因子に対する考慮が払われるべきことは当然であるが、腹水細胞封入体所見の解釈として、一応の我々の予想を述べた。

2. 癌細胞内ウイルス封入体のギームザ染色性

エールリッヒ癌細胞に出現するエクトロメリア封入体は形態学的特徴に於て、本質的に単球のそれと同一である。只その特徴がエールリッヒ癌細胞の場合には特に強調されている。即ち、ギームザでアズールに染る所謂好アズール封入体の出現に遅れて淡青色均質に染る円乃至楕円形で、輪廓鮮明な被膜に包まれた所謂淡青封入体の出現がそれである。この両者は染色性が異なり、而も同一細胞に同時に出現し得る事は確実である。この知見に立つて単球の塗抹標本を詳細に観察すれば、確かに好アズール封入体に近接し、之とは別に円形乃至楕円形の封入体に気付く。染色態度は青色調が更に微弱で、時には殆ど不染色でアルコール固定で流失した非特異性変性脂肪顆粒の抜け殻との鑑別は容易でなく、我々は両封入体関係の明かなエールリッヒ癌細胞に於ける所見より顧みて始めて感染単球に於て

も同様の関係の成立する事を確認出来た。嘗て我々が報告した単球封入体に関する紫外線、暗視野、位相差の各種光学顕微鏡による超生体観察所見は、封入体発現初期の8~14時間のものは別として、その大部分は好アズール封入体自身ではなく、淡青封入体のそれであると云わねばならない。この事実は、我々と無関係にエクトロメリアウイルスがエールリッヒ癌細胞及びマウス腹腔内吉田肉腫細胞に親和性を有する事実を見出した加藤氏も注意している。即ち、氏は封入体含有細胞をギームザ染色で確認、マークした後に脱色し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、淡青封入体が好エオジン性で、好アズール封入体は此際不染である事、更に塗抹乾燥の位相差顕微鏡観察で前者にウイルス像に当るものを認めるが、後者に之を認めない点を挙げ、夫々にA型、B型の名称を与えている。確かに淡青封入体はギームザ染色時に好塩基性に非ざる構造物で、例えば Russell 小体の如きも亦ギームザ染色時に此様な染色態度を示す故に、実は好酸性封入体と呼ぶのが至当であろう。之に対し好アズール封入体は核酸の存在と関係することが多く、此物は通常のヘマトキシリン・エオジン染色時に必ずしも強塩基性を発揮せしめる事は出来ない。然しここに我々は乾燥標本の位相差顕微鏡観察では、超生体の湿潤材料に比較して、位相差効果が甚だしく減弱することを指摘したい。事実、円形、鮮明な封入体周囲に、その内部に於けると同様のウイルス粒子像を認める場合がある。只この方法ではウイルスと同定すべきその形態の詳細に触れる事は解像力の限界を超えるので、封入体とは無関係のウイルスの存在に就いては断定を控えるべきと考える。尙ウイルス感染皮膚表皮細胞を塗抹ギームザ染色で観察した場合にも前記二種類の封入体が識別され得ることも我々は検討している。

然らば次に、この両者は同一物が示す染色性の時期的相違による像か、或は全く異質の物質であるかが問題となる。この点に就いては好アズール封入体内部に又は之に接して極く小型、円形の淡青封入体を認める所見から案じて、後者の見解を採るが、両者の関係に対する回答はしかく簡単なものではないと考えられる。此等のウイルス感染時に特異的な細胞内反応は如何なる過程をとつて発展し来るであろうか。それにはウイルス粒子の形態が確実に把握出来る超薄切片の電子顕微鏡像を基として解析を進めなければならない。

3. 癌細胞ウイルス封入体の電顕的検討

此方法のウイルス学への応用は Morgan and Wyc-koff²¹⁾ (1950) 以来活潑に行われ、最近の技術的進歩は顕著なものであるが、中でも牛痘及びエクトロメリア・ウイルス感染組織の時期を考慮し、特に封入体の成立過程に就いては我々と殆ど同時に同様の結論を得た Gaylord and Melnick²²⁾ (1953) の業績が注目される。

扱、エールリッヒ癌細胞観察に依れば、好アズール封入体は胞体内位置及感染後の時間的關係より案じて、胞体より稍濃い雲架様物質として同定される。而もその内部に見出されるウイルス像は電子密度の濃いものも存するが、大部分は淡く、中空乃至内部に一定の構造を示すものである。この後者の意味に就いて、Gaylord 等は自己の牛痘感染角膜及膀胱上皮細胞の所見に Leventhal and Fisher²³⁾ (1952), Anderson (1953) の細菌ウイルス及び Schlesinger and Werner (1952) のインフルエンザ不完全ウイルスの知見を加えて、電子密度の高いものを成熟型、中空乃至内部構造を示すものを发育段階にある未熟型として取扱つている。前述の好アズール封入体は形態学的に彼等の指摘した matrix region と全く一致し、且時期的にもこれが正しく早期に出現する事実からして、この見解を支持し度い。Dawson and McFarlane²⁴⁾ (1948) は精製した牛痘ウイルスを pH=7.2 で数時間 DNA ase 処理を行つて、同ウイルスの中心体が電子密度の減少を示す事、従つて中心体の DNA 構成を示唆している。勿論細菌ウイルスから得られた一般通念に依れば、核酸にしろ蛋白にしろ、ウイルスより抽出された基質は容易に酵素で作用されるが、生のウイルスのままでは作用され難いといわれている点を無視するものではないが、彼等の知見は我々の持つ形態学的材料の説明に好都合な資料を与える。即ち、早期に出現する好アズール封入体内域の中空のウイルスは未熟型で DNA の稀薄乃至非含有のものが大部分であると云える事になる。従つて、Feulgen 反応陽性を呈するこの封入体内の DNA 部分はウイルス自身の DNA ではなく、寧ろ細胞側に属す物質に外ならない事となる。

ウイルスと核酸の問題に詳細を極めた研究領域であるが、形態学的考慮が素朴であつた為に、ウイルス感染細胞の DNA 物質の出現を直ちにウイルスそのものと同定した研究者が多い。Hydén²⁵⁾ (1947), Caspersson²⁶⁾ (1950) 等がそうであり、Wolman²⁷⁾ (1954) も同様立場からウイルスに依らない封入体との相違を Feulgen 反応の陽性、陰性で分類している。嘗て得た我々の紫

外線顕微鏡による封入体所見 (1951) と Scott²⁸⁾ (1950) の Feulgen 反応の精度とウイルス核酸量との関係に対する比較考察からして、以上の連断論に対して我々は疑問を抱いて来た。此度好アズール封入体の組織化学及び電顕像から、ウイルス感染により細胞側で合成された DNA プールがウイルス粒子完成に先行し、ウイルス核酸の組材となるであろうと考察し度い。

細菌ウイルス増殖機構に就いてのモデル実験によれば、核酸の宿主内注入に続いて、之を中心としたウイルス産生が予想されるにも拘らず、現在の処核酸を含んだ未熟ウイルスが P⁸² を用いての追求で捕まらず、寧ろ之を含まない未熟型が証明されている²⁹⁾。この一見矛盾した知見に対して、我々の得た未熟型ウイルスと胞体内核酸との位置的関係は何等かの示唆を与える様に思われる。併も此所見が好アズール封入体辺縁乃至外部に該封入体と密接な関係を保つて、やがて現われる淡青封入体並にその表面に吸着されて認められるウイルスの所見に先行する事は興味の懸るところである。

4. 特に淡青封入体の電顕的構造に就いて

好アズール封入体は次第に構造が稀薄不正形化する意味で、封入体を造らない一般細胞内ウイルス増殖の様式に次第に接近するものと考えられるが、淡青封入体は最後迄次第に發育する。従つて、本症特有の封入体として、改めてその發育段階に就いて検討を加えておく必要がある。

淡青封入体の名は最初ギムザ染色時に淡青を呈する事からかく呼んでいるが、元来此様な構造は後述の如く蛋白性マトリックスであり、電子濃度及びウイルス分布様式から案じて4乃至5型に分つことが出来る。

(第3図)

(A)は電子濃度の弱い均質封入体で、時に極表面のみが濃く、此表面に成熟ウイルスが疎に吸着して存する。(E)は此様な封入体が全体に濃くなり、且その全域に成熟ウイルスを分布せしめたものである。此等の二型式の中間乃至傍系の現象(B)として(A)の外層圏

が中等度の電子濃度を示し、此中に成熟、未成熟及び空胞状ウイルスの三者が混在したものである。(C)に於てはその外層圏が厚く発達したものである。又(D)は(B)型の外層圏が完全に全封入体に及んだものである。此等のうちで(B),(C)の内部は電子濃度が弱いにも拘らず、成熟型のウイルスが少数散在し、明かに楕円乃至煉瓦状の形態を窺わしめている。(D)は(B),(C)の表層の接面断とも解し得られるが、その大きさが頗る大きな場合も認められるので、これを単なる接面断的存在と見做し難いので、独立せしめ一つの型としたのである。

扱、此等の中最も理解を困難ならしめたのは、今回の我々の検索で初めて把えられた750×500mμにも達する空胞型のウイルスの存在である。此ものは未熟ウイルスとの間に大きさ及び内部密度の点に於て移行性が認められ、未熟ウイルスの変性型と解することも可能である。その大型のものに於ても、クローム蒸着試料にて、依然として被膜様のものが認められ、此部分には粒状物が一二層並んで明かに周囲と異なつた性質を示している。然し、此部分の検討によつても、既に巨大な空胞に達したものでは、再び発芽様の賦活現象を思わせる部分的な発芽等を示す傾向はなく、従つて大型空胞状のものが新に断裂して幼弱ウイルスに賦活せられると解すべき所見は把えられず、のみならず大型空胞は封入体表面より脱落してゆく像をも示している。故に泡状のウイルスは未熟型が偶々成熟への道を阻まれて、変性する状態にあるものと解せよう。然らば何故に淡青封入体に此様なものが高度に生じて来るか、我々の観察を以てすれば、ウイルスの刺戟による宿主細胞の一部からの畸形的産物とも見做すべきものである。即ち、細胞質の合成酵素系は好アズール封入体では、好アズール物質(前にそのDNAに当ることを述べた)を専ら合成する方向に進められるに對し、淡青封入体では淡青色に染色する(後にその主体が蛋白であることを述べる)物質の方向に進行する。而も後者は単純な蛋白ではなく、電子濃度の次第に増して来るものでは、之又後に論ずる如く、核酸物質の混入度を増して来るものと解される。

従つて淡青封入体に於けるウイルスの意義は、最初は先ず細胞の一部構造(之を前回は糸粒体と解したが、此場合これを否定すべき理由は得ていない)に附着した成熟型ウイルスによつて、封入体マトリックス合成が発せしめられる事にあ

Text-fig. 3. Schematic diagrams representing the development of the pale bluish staining inclusion body and its correlation ectromelia virus.

る。併し乍ら電子濃度の弱い無構造のマトリックスの合成が急速に進展するに於ては、ウイルス合成に必要な総合的資材を欠く関係で、成熟ウイルスは僅かに封入体表層の電子濃度の強い部分で増殖を営むに止まらざるを得ない(A)型。然し何等かの条件で、封入体形成の初期からマトリックスの電子濃度が強い場合には(これはウイルス自身の合成関与に負うものと解されるが)その内部でも強く成熟ウイルスの増殖を招く事が出来、之が即ち(E)型に当るものであるが、この場合のマトリックス合成は弱く、故に封入体の大きさが相当に制限されている様である。

他方、大型の淡青封入体は専らマトリックス合成が先行し、然る後ある時期から表層ウイルスの増殖が起るにつれて、電子濃度の稍強い外層圈を作り、ここに未熟ウイルスを擁する域を現出する。然し、此様に電子濃度の弱いマトリックスとして急速に发育した封入体では総合的組材に恵まれないうえに、未熟型ウイルスの多くが次第に abortive form となり変性、空泡化して行くものであろう。

結局、空泡型ウイルスの発現は淡青封入体の急速なマトリックス发育に伴う偏寄した組材構成の為に未熟ウイルスが中途にて落伍する像に当るものと解すべきである。従つて、(B)、(C)、(D)型等に於て、成熟及未熟ウイルスを擁する電子濃度の中等度の圈が、同時に空泡型ウイルスの分布を示していることとなるのである。従つて好アズール封入体と淡青封入体とは細胞内ウイルスの偏寄した合成制戦の二型を極端に表わすものである。此事は同時にウイルスの側から見ても、二種の増殖様式、即ち、前述の DNA 床からの未熟ウイルスのケオスの発生と斯る未熟型ウイルスの乏しい増殖様式を表わすものである。

5. 淡青封入体中の各種ウイルスに就て

次に淡青封入体中の巨大な空泡型ウイルスに就ては、今少しくウイルス構造論的に検討して置く必要がある。此種の粒子は好アズール封入体の末期に於て、細胞質内にも僅少散見されることもあるが、原則的には淡青封入体の(B)、(C)、(D)型に集団的に認められる。此が形態的に未熟ウイルスと移行性を示すことから、未熟ウイルスの何等かの条件に於ける変性型と解すべき事は既に述べて置いた。

従来から不完全ウイルスの形態に就いての資料が提出されているが、此空泡型も又此群で取扱われてよいものであろう。我々の観察中此種のものが賦活され

て、分芽増殖に移る如き像は得られず、従つて何等かの環境的变化によつて賦活されると云う事は主張し難い。

兎も角、好アズール及淡青封入体を通じて、前者の中に、(1)内容の電子濃度の低い、殆ど限界膜のみの未熟ウイルス、(2)内容の濃度が次第に増し、(3)核様の中心体を現わすもの、更に(4)濃度の最高に達した成熟ウイルスをも認る。又後者中にも、同様前記の4種類のウイルスを認めるのであるが、前項に述べた条件の為に、或物は成熟型をもつ小型のものとして止り、又或物は此等4種を同時に擁する大型のものとして現われる。而も後者程空泡型ウイルスを高率に含む傾向がある。又一個の癌細胞内に多数の淡青封入体を容れる場合には、(B)、(C)、(D)型のものによつて占められている事も此間の関係を表わすものと云えよう。斯る特徴は癌細胞の特性とする蛋白合成系と応じてマトリックスの急速な发育が可能であることと関連してをり、今後生化学的に興味を抱かせる方面であらう。

擬、空泡型のウイルスは、インフルエンザウイルスの猴尿腔大量接種に依つて Werner and Schlesinger⁸¹⁾、深井氏等⁸¹⁾の得た不全型ウイルスと同解釈に立つものは今後の問題である。

先に我々は好アズール封入体内のウイルス増殖を論じたが、淡青封入体でも別個にウイルス成熟過程が追求されるから、此等を仮に夫々ウイルス増殖の第一、第二段階と呼ぶこととする。Gaylord 等が牛痘接種猴尿膜観察で封入体を認めず、而超薄切片では好アズール封入体に該当する像を得ている事は、第一階段を証明し得て、而もこれから第二段階に移行する何等かの条件の排除しているものと云うべく、我々は此点に興味を覚える。先に我々が指摘した如く、エクトロメリア感染肝細胞が封入体形成能弱く、而も電顕的に好アズール封入体型の像を呈していることも亦これと類同的に解せられよう。

6. 淡青封入体と細胞化学

此淡青封入体の化学的組成に関しては、我々は腫瘍形成部(腹壁)切片標本で Feulgen 反応陽性を得、尾崎氏⁸²⁾も皮膚上皮細胞で階性成績を得ている。とは云え、必ずしも封入体全部が常に陽性でない事も事実で、塗抹標本では好アズール封入体の陽性と異なり陰性である。現在迄得られた我々の成績に依れば、淡青封入体は PAS 染色及び Toluidinblue のメタクロマジー反応でも、媒質の pH 値変動下で陰性に終始し、脂

Text-Fig. 4. Diagrams representing the multiplication of ectromelia virus within the two types of inclusion bodies, azurophilic and pale bluish.

肪類も含まない。只精度は低いが、確実な蛋白反応たるビユーレット及びミロン反応陽性を示す。従つてこの封入体基質は我々の嘗て予想した蛋白を多量に含む事が明かになった。此点 van Rooyen (1939) の伝染性軟毛腫封入体及び三井氏 (1953) のトラコーマ小体に於けるグリコーゲン陽性所見と比較して又異つた興味を呼ぶものがある。

扱、この組織化学的所見を電顕像と比較観察すれば、電子濃度の低い基質は蛋白と同定される。成熟型及未成熟型ウイルス、更に大型空泡が常に電子濃度の高い基質層と不可分関係を保つて出現する事は、前記切片標本の Feulgen 反応陽性所見と併せて、尙同封入体の DNA 分布に就て、何等かの術式により、新たな角度から検討を加えるべきであろう。(第4図)

V. 結 論

1. エクトロメリア・ウイルスはエールリッヒ癌細胞質に大別二種の封入体、即、1. 好アズール封入体及淡青球状封入体を形成しつつ増殖し、癌細胞を破壊し、その發育を抑制する。

2. 該封入体の形態学的特徴に就いて、特に細胞化学的並に電子顕微鏡による超薄切片観察を行つた。好アズール封入体は DNA を主体としたマトリックスよりなり、此雲状物質内に薄膜の輪廓によつて鑑別される電子濃度の甚だ弱い種々の形の未熟ウイルスの集団が現われ、これは次第に電子濃度の高い内容を有する成熟ウイルスへの發育像を認める。

3. 即、早期に於ては感染による細胞代謝系の変動により、先ずウイルス組材たる DNA 物質が細胞質内

に局所的に合成され、ここに前記未熟型ウイルスの生成が始まる。

4. 好アズール封入体と密接な関係の下に、その崩壊期に當つて、淡青封入体が出現する。同封入体はその含むウイルスの分布様式に依つて、単に表面にウイルスを吸着せしめた電子濃度の薄いもの、及び次第に内部にウイルスを満した稍濃度の高いもの、更に両者の中間的構造のものとの数種に分ち得る。

5. 淡青封入体では、内容が単なる蛋白性マトリックスよりなる均質なものに於て、既に表面に成熟ウイルスの吸着像が認められ、そのマトリックスの濃度の増加に応じて、表層から次第に内部に亘つてウイルスが分布するに至る。その中、電子濃度の高いものでは成熟ウイルスが、又弱いものでは未熟の、但し多くは空泡型ウイルスが強く分布する傾向がある。

6. 好アズール封入体の DNA マトリックスと云い、淡青封入体の蛋白マトリックスと云い、何れも細胞内ウイルスの増殖と関連して、宿主細胞酵素系の関与が偏寄せしめられた二形式を代表するものと云うことが出来よう。

電子顕微鏡観察に御援助を与えられた京大東助教授、同小林助教授及び島津製作所外村技師並びに協同研究者岩片氏に対して深謝する。

最後に御指導、御校閲を得た天野助教授に深謝する。

文 献

- 1) 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。第1報。エクトロメリア封入体に就いて。VIRUS, 1: 127~133, 1951.
- 2) 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。第2報。封入体の発生と構造に関する位相差顕微鏡的研究。VIRUS, 3: 307~313, 1953.
- 3) Levaditi, C. and Nicolau, S.: Vaccine et néoplasmes. Compt. Rend. Acad. Sc., 174: 1649~1652, 1922.
- 4) Turner, J. C. and Mulliken, B.: Parasitization of mouse sarcoma 180 by vaccine virus and its effect on tumor growth. Canc. Res. 7: 774~778, 1947.
- 5) Scherer, W. F. and Syverton, J. T.: The viral range in vitro of a malignant human epithelial cell. (Strain HeLa, Gey) 1. Multiplication of herpes simplex, pseudorabies and vaccinia viruses. Am. J. Path., 30: 1057-1074, 1954.
- 6) Bang, F. B. and Gey, G.

- O. : Comparative susceptibility of cultured cell strains to the virus of Eastern equine encephalomyelitis. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 91 : 427-461, 1952. 7) Ackermann, W. W. and Kuntz, H. : A new host-virus system. *Proc. Exp. Biol. and Med.*, 81 : 421-423, 1952. 8) Wagner, R. R. : Influenza virus infection of transplanted tumors. *Canc. Res.*, 14 : 377-385, 1954. 9) Koprowska, I. and Koprowski, H. : Effect of Mengo encephalitis virus on the Ehrlich ascites tumor of the mouse. *J. Nat. Canc. Inst.*, 14 : 627-644, 1953. 10) Koprowska I. and Koprowski, H. : Morphologic and biologic changes in a mouse ascites tumor following induced infection with certain viruses. *Canc. Res.*, 13 : 651-660, 1953. 11) Love, R., Koprowski, H. and Cox, H. R. : Cytological studies on the Ehrlich ascites tumor before and after infection with Bunyamwera virus. *Canc. Res.*, 13 : 350-356, 1953. 12) Koprowski, H., Koprowski, I. and Love, R. : Ascites tumor-virus system as a biological tool. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 39 : 1147-1149, 1953. 13) 天野重安, 土肥清一, 岸哲雄 : ウイルス性炎の基本型に関する研究, 第6報エクトロメリア感染の病理, 日病会誌, 41 : 202-203, 1952. 14) 天野重安, 土肥清一 : エクトロメリア・ウイルス感染細胞の形態学的研究, ウイルスの総合的研究班報告. 昭和29年(印刷中) 15) Latt, H. and Hartmann, F. : Use of a glass edge in thin sectioning for electron microscopy. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 74 : 436-438, 1950. 16) Klein, G. and Révész, L. : Quantitative studies on the multiplication of neoplastic cells in vitro. I, Growth curve of the Ehrlich and MCIM ascites tumors. *J. Nat. Canc. Inst.*, 14 : 229-279, 1953. 17) Lucké, B. and Berwick, M. : Quantitative relation between growth of Ehrlich ascites tumor and reduction of liver catalase activity. *J. Nat. Canc. Inst.*, 15 : 99-112, 1954. 18) Seiby, C. C., Gey, C. E., Lichtenberg, S., Friend, C., Moore, A. E. and Bieseke, J. J. : Submicroscopic cytoplasmic particles occasionally found in the Ehrlich mouse ascites tumor. *Canc. Res.*, 14 : 795-801, 1954. 19) 永田育也, 小野三郎, 服部菟彦 : ウイルスと腫瘍, 最新医学, 10 : 154-161, 1954. 20) 加藤四郎 : 細菌学会西部地方会発表及私信, 1954. 21) Morgan, C. and Wyckoff, R. W. G. : The electron micrography of fowl pox virus within the chorio-allantoic membrane. *J. Immunol.*, 65 : 285-295, 1950. 22) Gaylord, W. H. and Melnick, J. L. : Intracellular forms of pox viruses as shown by the electron microscope (vaccinia, ectromelia, molluscum contagiosum). *J. Exp. Med.*, 98 : 157-171, 1953. 23) Dowson, I. M. and McFarlane, A. S. : Structure of an animal virus. *Nature*, 161 : 464-466, 1948. 24) Leventhal, C. and Fisher, H. : The structural development of bacterial virus. *Bioch. et Bioph. Acta*, 9, 419-429, 1952. 25) Hydén, H. : The nucleoprotein in virus reproduction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 12 : 104-114, 1950. 26) Caspersson, T. U. : Cell growth and cell function. W. W. North, N. Y. 1950. 27) Wolman, M. : On the absence of desoxyribonucleic acid from some chemically-induced cytoplasmic and intranuclear inclusions, with reference to a special type of false positive staining by Feulgen's nuclear technique. *J. Path. and Bact.*, : 159-164, 1954. 28) Scott, T. F., Mc Nair, Blank, H., Coriell, L. L. and Crouse, H. : Pathology and pathogenesis of the cutaneous lesions of variola, vaccinia, herpes and varicella. "The pathogenesis and pathology of viral diseases." edited by Kidd, J. G., Col. Univ. Press., 73-98, 1950. 29) Maalø, O. and Symonds, N. : Radioactive sulfur tracer studies on the reproduction of T4 bacteriophage. *J. Bact.*, 65 : 177-182, 1953. 30) Werner, G. H. and Schlesinger, R.W. : Morphological and quantitative comparison between infectious and non-infectious forms of influenza virus. *J. Exp. Med.*, 100 : 203-216, 1953. 31) 深井孝之助 : 私信. 32) 尾崎良克 : 私信. 33) van Rooyen, C. E. : The chemical composition of the molluscum contagiosum inclusion body. *J. Path. and Bact.*, : 345-349, 1939. 34) 三井幸男, 田中智恵 : Roller tube 法による人結膜の長期培養とトラコーマ・ウイルスの培養実験, *VIRUS*, 3 : 198-199, 1953. 35) 土肥清一 : エクトロメリア感染の病理, 殊にその接種様式による臓器障害の種々相, *VIRUS*, 2 : 131-139, 1952.

Explanation of plate

All photographs show Ehrlich mouse ascites tumor cells which are infected with ectromelia virus.

Fig. 1, 2. After 72 hours : The azurophilic inclusion bodies are seen in cytoplasm which are scattered with small fat droplets and whose basophilicity are not declined. The inclusion is apt to take place near the nucleus. The inclusion within the right upper cell (Fig. 1) possesses the indistinct edge. The right upper cell (Fig. 2) contains two inclusions on the both sides of the nucleus. Giemsa's stain. $\times 1570$.

Fig. 3. After 96 hours : Two pale bluish staining inclusion bodies in contact with a diffusely formed azurophilic inclusion body are seen on the right side of the nucleus. Giemsa's stain. $\times 1570$.

Fig. 4. After 5 day : Typical pale bluish staining inclusion bodies are present in most cells. Giemsa's stain. $\times 1570$.

Fig. 5. After 5 days : The cell shows several inclusions containing numerous elementary bodies and shows a diffuse blister. The inclusions have considerable variation in diameter. Phase contrast microscopy. $\times 1570$.

Fig. 6. After 96 hours : A typical inclusion body and two irregularly shaped dense bodies compatible with the azurophilic inclusion are present near the nucleus. The cell is scattered with mitochondria and some fat droplets. Phase contrast microscopy. $\times 1570$.

Fig. 7. After 72 hours : There are mitochondria characterized by their internal structures, and homogeneous granules which compatible with fat droplets, and endoplasmic reticulum as scattered within the cytoplasm. Chrome shadowing. $\times 5220$.

Fig. 8. After 72 hours : At the right perinuclear zone several azurophilic inclusions are present. They contain some mature viruses and many developmental bodies which represent the characteristic internal structures. Chrome shadowing. $\times 5830$.

Fig. 9. After 72 hours : Immature viruses within the irregularly formed A-inclusion in the lower part of the left cell. Note some mature viruses in left upper. Chrome shadowing. $\times 8700$.

Fig. 10. After 72 hours : There are developmental bodies characterized by membranes surrounding homogeneous material of low electron density within the area of more increased density than the cytoplasm. Mitochondria are distributed around it. $\times 10440$.

Fig. 11, 12. After 72 hours : There are developmental bodies which show thin boundary membranes surrounding centrally or excentrically located granules (central body) in the azurophilic inclusion. Fig. 12 illustrates the various central bodies. Chrome shadowing. $\times 8700$. (Fig. 11), $\times 20000$. (Fig. 12).

Fig. 13. After 96 hours : Two round homogeneous B-inclusion bodies lie in contact with a amorphous A-inclusion on the left side of nucleus. Mature viruses attached to and surrounded the former which are structureless and low to electron density. The latter, containing the developmental bodies in various stage of maturation, has indistinct edge. Note swollen mitochondria and localized ergastoplasms. $\times 6960$.

Fig. 14. After 96 hours : An inclusion of low density, containing oval shaped vacuoles 500 to 750 m μ in diameter, is in touch an area occupied by closed packing of immature viruses in various developmental stages. Near the lower border of the figure lies a cluster of round granules whose size are a little smaller than ectromelia virus. $\times 6960$.

Fig. 15. After 5 days : There are two round B-inclusions with adherent mature viruses within the cytoplasm. Some viruses are distributed diffusely in the cytoplasm. In the left large inclusion the density of peripheral zone is higher than the inner portion. $\times 8000$.

Fig. 16. After 5 days : In the upper half of this figure lies a inclusion whose peripheral zone is comp-

osed by closed packing of fine granules. No particle corresponding with virus is found within it. Swollen mitochondria and ergastoplasms are present in the left border. Chrome shadowing. $\times 8700$.

Fig. 17. After 5 days : A large B-inclusion occupied almost half part of the cell. It is clear cut divided in two parts, namely, (1) the outer dense zone containing many empty looking immature viruses and large vacuoles, (2) the inner less dense one, containing few mature virus. Chrome shadowing. $\times 6790$.

Fig. 18. After 5 days : In the B-inclusion it appears that the outer dense zone expands toward the center. The large vacuoles in this zone show variation in volume, shape, internal structure and thickness of enclosing membrane. At the left border some mature viruses and tranditional bodies may be seen. In the central zo e there is a greater number of oval or brick shaped viruses than in Fig. 17. Chrome shadowing. $\times 15660$.

Fig. 19. After 5 days : For the four inclusions the same relation of inner electron density holds as for those in Fig. 17. However, a majority of virus particles in the outer zone belongs to the mature type and only few large vacuoles are present. $\times 12180$.

Fig. 20. After 5 days : At the left border lies a relatively dense inclusion body which is filled up by the large vacuoles, few mature viruses and few developmental bodies. $\times 8700$.

Fig. 21. After 5 days : This figure illustrates a inclusion with its whole interior-occupied by large number of the vacuoles. The enveloping membranes also show the fine granular structure. Chrome shadowing. $\times 10880$.

Fig. 22. After 5 days : Four inclusions demonstrate varying structures in a single cell. Swollen mitochondria can be seen around the upper right inclusion. $\times 6960$.

Fig. 23, 24. After 5 days : Two typical inclusions show the homogeneous dense inner ground material diffusely distributed by virus particles belonging mainly to the mature type. They demonstrate that the number of mature viruses is parallel to the electron density of inner matrix. Fig. 23. $\times 9740$. Fig. 24. Embedding material was removed. $\times 8700$.

土肥論文附圖 1

土肥論文附图 2

土肥論文附図 3

土肥論文附图4

土肥論文附圖 5.

土肥論文附圖 6

土肥論文附図 7

土肥論文附図 8

土肥論文附図 9