エクトロメリア・ウイルス感染漿尿膜の 電子顕微鏡的研究

和田 倭 子*

SHIZUKO WADA: ELECTROMICROSCOPIC STUDIES ON THE
CHORIOALLANTOIC MEMBRANE INFECTED WITH
ECTROMELIA VIRUS.

[受稿 9月6日 1956]

緒 言

感染組織細胞内の封入体は、ウイルス増殖と宿主細胞に密接な相関々係をもち、細胞内ウイルスの生態を形態学的に追求する上に多くの利点を有している。ウイルス粒子の大きさは光学顕微鏡下の分解能一杯か、又はそれ以下であるが、封入体の大きさは光学顕微鏡下でも十分に識別する事が出来るので、常にウイルス増殖の一つの指標を我々に提示してくれる。その意味に於てエクトロメリア・ウイルスに就ても1930年 Marchal が本病毒を発見し、Marchal Body を認めて以来、既にこの封入体の性状に関して、多くの研究が重ねられてきた。Barnard は本封入体を紫外線顕微鏡下にとらえてこれがウイルス基本小体の集団即ち、一種の Viral colony である事を示し、又 Himmelweit は duck egg の漿尿膜に感染した細胞内に生ずる封入体を特殊な光学系を用いて living cell のまま観察し、封入体内の基本小体集積の様式につき経時的な観察を進めるに致つた。

この様な形態学的研究と並んで、Baumgartner は分離封入体の接種により明らかに発症するという事実を認めて、形態学的観察の成績を裏書している。斯くの如く光学顕微鏡時代に於て、既にエクトロメリア封入体と称するものが、ウイルスの基本小体の集団を示すものである事が、認められるようになった。

最近土肥氏は、本ウイルスをマウスの腹腔内に接種し、復水の単球内に封入体の形成を認め、染色、位相差顕微鏡所見等から封入体の發育段階について、その性状を異にするものである事を、主張するに至つた。然し乍ら光学顕微鏡の分解能の制限は、封入体の内部

構造及び細胞内ウイルスの生態に関して詳細を究明する事が困難であり、こゝに高い分解能をもつ電子顕微鏡の応用は、かかる研究に飛躍的な発展を与えたのである。

尾崎氏は分離封入体の電子顕微鏡像より本封入体が、ウイルスの集団である事を知り、光学顕微鏡時代の成績と一致する事を認めた。其の後超薄切片法が進歩するに及んで、Gaylord 等は Poxgroup virus の發育様式、封入体の發育過程等につき興味ある結果を得ている。尾崎氏はマウスの皮膚に生ずる封入体について検討し、Gaylord 等と稍々異なる成績を示した。即ち Gaylord 等はエクトロメリア封入体は、極めて dense でその最終段階に於て崩壊する迄、内部に基本小体を認めなかつたのに拘らず、尾崎氏は大抵の封入体に基本小体の存在を認め、その density も Gaylord が認めたもののほど dense でない事を報告している。又土肥氏は Ehrlich 癌細胞に本ウイルスが親和性を有する事を認め、この癌細胞に出現する封入体を電子顕微鏡的に観察し、封入体の發育様式に関して興味ある分類を示している。他方加藤氏もやはり本ウイルスが、Ehrlich 癌、吉田肉腫細胞に親和性を有し、細胞質内に封入体を形成することを認め、しかもそれ等封入体には Giemsa 染色により、赤染するものと淡青染するものとを区別し、二型の存在につき報告している。Gaylard の述べた Matrix region と封入体なる表現が、この両型に相当する事も明らかにされるようになった。このようにエクトロメリア封入体は光学顕微鏡時代にはその形態学的、ウイルス学的意義に於て、一応の結論が与えられたかの如き観があつたが電子顕微鏡的研究により、再びその形態学的問題はとりあげ

* 京都大学医学部微生物学教室 (主任 木村廉教授)

られたのである。

著者は、エクトロメリア・ウイルスが孵化鶏卵漿尿膜内で如何なる態度を示すか、果して Gaylord の示した成績と一致するか否かを知る目的で超薄切片を応用して、研究を進めたところ封入体の形態は、Gaylord の示したものとほぼ同じような結果を得たのであるが、多くの写真が示すように Gaylord の Schema をそのまま適用する事が出来ない事が分つた。

実験材料及び方法

孵化鶏卵：孵化第11日卵を使用した。

ウイルス：大阪大学微生物病研究所の奥野博士より分与を受けたエクトロメリア・ウイルス（石川株）を使用に際しては、当教室に於て孵化漿尿膜に10代継代したものである。そのLD₅₀は 10^{-7} — 10^{-8} である。

ウイルス接種：感染した漿尿膜の一部を切除、磨碎し Tyrode 氏液 (pH 7.4) で10%乳剤とし、2,000廻転10分間遠心沈澱を行いその上清の 10^{-2} 稀釈液0.2mlを、漿尿膜上に Burnet の方法に従い接種をおこなつた。36°Cに96時間培養し、開卵後感染漿尿膜部を取り出し、生理食塩水ですみやかに洗滌し、その感染部位（白斑部）について一部は電子顕微鏡試料作製に又一部を組織標本作製に用いた。

電子顕微鏡試料作製：白斑部切除後直ちにpH 7.4の1%オスミツク酸 Söhrensens 氏磷酸緩衝液で、氷室4°C内1時間固定。型の如く蒸留水で水洗、エタノール系列により脱水。包埋は Newman, Borysko の合成樹脂包埋法によつた。使用の Methacrylate 樹脂は、n-butyl methacrylate monomer 8分に対し methyl methacrylate monomer 2分を混合したものである。これ等 monomer に対して1~1.5%の Benzoin peroxide を触媒として添加した。

即ち脱水終了後の組織片を次の如き系列によつて包埋を行つた。

- (1) 50%—50% EtOH-Monomer 1時間室温。
- (2) 100% Monomer I. 1時間氷室内。
- (3) 100% Monomer II. 1夜 氷室内。
- (4) カプセル (No. 00) 内で重合。
45°C 18~24時間。

重合する際に漿尿膜の縦断切片を得る為に4~5時間後、半重合状樹脂内で、水平位をとつている組織片を木綿針でそつと立たせる。重合がうまく進めばその操作は一度でよいが、5分間放置して横に倒れれば再び

同操作を繰返す。その際気泡を入れないように木綿針の挿入は慎重に行わねばならない。もし気泡が入れば野竹氏の方法によつて除去する。しかる後に重合の完了をまつ。

Cutting は Spencer のウルトラマイクロトム (No. 821) でマイクロトム用安全剃刃を使用。包埋剤除去は醋酸アミル溶液によりおこなつた。電子顕微鏡は、JEM-5C 型で、検鏡、撮影は東教授によつてなされた。

組織標本作製：10%中性 Formalin 溶液で、24時間固定、Paraffin 包埋で5μの厚さに切断、染色は Haematoxylin-Eosin によつた。

実験成績

ウイルスに就て：最初当教室保存のエクトロ・ウイルス（ハムステッド株）を使用した場合は、白斑形成を認めにくかつたが、阪大微研の石川株にかえてからは白斑の形成は容易に認められた。即ち孵化鶏卵漿尿膜上接種後96時間培養で接種部位を中心とする直径約3cm 大の溷濁肥厚が肉眼的に見られ、その部には径0.3mmの白斑が中央部では融合性に周辺部では散在性に、多数存在するのが認められた。

組織標本に就て：病理組織学的変化として、外胚葉は増殖変化をきたして、多層性となり、又所々剝離した像も見られた。外胚葉部と、中胚葉部で特に外胚葉部に接近した部分に Haematoxylin-Eosin で赤く染る小体を、多数に観察した。

電子顕微鏡の所見に就て：最も著明な変化は、光学顕微鏡下で観察したものと同じく、外胚葉部の細胞層 (chorionic layer) であつた。ここに多数の封入体と、集団的なウイルス粒子を認めたのである。

封入体は、細胞質内に限られ決して核内に見られる事なく又細胞質内での位置は、核に接してみられる場合 (Fig. 1, 2, 3, 4) が屢々あるが、それも決して一定した関係があるのではなく単なる偶発的なものと思われる。従つて細胞質での特定の位置を認める事は出来ない。たまたま核に接して見られる場合は核の変形 (Fig. 4) を見るが、その場合でも核膜の破壊像はみられず単なる機械的の圧迫に起因するものと解釈される。封入体の大きさは不同にして1μ~5μ程度であるが切断の方向により、決して真の大きさを示すものではない。その数時1ヵの細胞に多くの場合1ヵである (Fig. 2, 3, 4, 5) が、時には2ヵと認められるような像 (Fig. 1-a) も認めた。然し切断方向によるので

はないかとも考えられる。形は大体楕円形、円形のものが多いが時には不正形 (Fig. 1-c,) を呈し蜂窩状 (Fig. 7-a) を示すものも存在する。その細胞質との境界は、極めて明瞭であるがそれ等は決して限界膜を持たない。次に此等封入体の density については、これも亦極めて特徴的である。即ち Gaylord 等の *Vaccinia* 及び *Ectromelia* で示したように細胞質内にみられる他の何れの構造よりも dense であり、その大小に拘らず一見して直ちに封入体と識別出来る特徴を示している。而も封入体の内部は全く均一で、何等基本小体の存在を認める事が出来ない。勿論このような高い density はたとへ内部に基本小体を含んでいたとしても、その Contrast に覆われて基本小体の存在を認知し得ないと云う可能性も考えねばならない。併しナイフマーク等で極めて薄く切られた部分に於て (Fig. 1-b, 4-a) も基本小体の輪廓を認める事が出来ない事実は、この様な型の封入体は基本小体の包蔵を否定するものと考えられるのである。

細胞質内で周囲と比較して稍々 density が高く、境界の不鮮明なる領域 (Fig. 3-a, b-c. 1-e) が認められる。即ち Gaylord 等がウイルス発育の最初の徴を示す場所であると云う Matrix region である。この部分は density の高い成熟粒子、density の低い均一の粒子、中空の膜様の粒子、外壁の厚い粒子等により構成されている。

次に注目すべき事は細胞内或は細胞間内に非常に多数の density の高い成熟したウイルス粒子の存在することである。集団状に (Fig. 1, 3, 5, 6), packet 状 (Fig. 4), 或は散在性に認められる。これ等の粒子の大きさはほぼ一定して 200~250m μ で、卵円形、主に方形を呈し一見精製標本にみられるが如きウイルス粒子の像を呈している。

Fig. 4, 7に於て細胞質内300~500m μ 大の多数の空泡が存在する。これはウイルスの侵襲による変化か又は人工的によるものであるかは不明である。

考 察

当教室保存ウイルス株と阪大石川株に於て、同一条件下で孵化鶏卵漿尿膜に接種継代を行つた結果、後者に於ては容易に白斑の形成を認めた。両株ともマウスに対しては同様の親和性を示したにも拘らず、鶏胎児に対するこのような親和性の相違は両者の間に差のある事を認めざるを得ない。尾崎氏によれば、前者に於ても孵化鶏卵漿尿膜の Haematoxylin-Eosin 染色に

よつて明かに封入体を認めている点、又著者も鶏胎児のウイルス接種による斃死等を認める事から勿論前者も鶏卵漿尿膜細胞に親和性をもたないと云うわけではないが、少くとも両者にある程度の差のある事は否定出来ない。このような理由に基づいて本研究は後者を用いる事にした。

電子顕微鏡的のみた封入体の形態、及び発育様式の解釈に於て Gaylord 等は、細胞内ウイルスの発育、増殖の場として封入体と Matrix region の二つを想定した。

それによると封入体は大小によらず常に極めて dense であり、その内部は均一で、ウイルス基本小体を認めない。封入体が発育し最終段階に於て崩壊し、その中に存在するウイルス基本小体を細胞質の中に放出する形式に於て、ウイルス増殖の役割を果し又 Matrix region はその density は余り高くなく且つその境界も亦明かでないが、その中にはその時期に応じて種々の形態を示すウイルス粒子の存在する事を明かにした。これに反して尾崎氏は、マウスの表皮細胞内に存する封入体について Gaylord 等とは違い、封入体はその density は余り高くなくその中に基本小体を含まないものと、基本小体を含むものとを認め、それ等は発育段階の差による結果である事を示し、封入体の中に存在するウイルス粒子の数、形態等は種々で、完成された封入体に於ては一つの Viral colony である様にみられ、ウイルス基本小体の集団として認めている。又土肥氏は Ehrlich 癌細胞内に生ずる封入体の微細構造を追求し、その中の基本小体の数、位置、density 等から封入体の発育段階に応じて各五型を区別している。この様に尾崎、土肥氏は明かにウイルス増殖の場として封入体の存在を認めているのに反して、Gaylord 等の示した density の高い封入体の所見は、彼等が述べているように基本小体形成の場としての封入体として解する事が、困難のように思われる土肥氏は Gaylord の示したような封入体を Ehrlich 癌細胞内に出現せしめ、その型の封入体が全くウイルス基本小体の形成に関係のない封入体である事を明かにし、又水口氏は *Vaccinia* を感染させた孵化鶏卵漿尿膜の電子顕微鏡像について、Gaylord 等の示したような封入体を認め、内部に基本小体を認める事は出来なかつたがこれは封入体が発育初期段階にある為であろうと述べている。

著者の今度の研究に於て得られた成績は、Gaylord

等が得た成績と全く一致したものであつて、封入体はその大小を問わず常に一定の density は極めて高いものであり、それは全く均一であつてウイルス粒子の存在を認める事が出来なかつた。若しこれ等が Gaylord の如くウイルス増殖の場として考えるならば、封入体の何れかに基本小体を含むものを認めてもよい筈であるが、すべて同様の形態を示している事実から、これ等がウイルス増殖の場としての封入体よりもウイルス感染によつて生じた宿主側の一種の反応としての封入体と考えた方が適当ではないかと考えられる。併しこゝに一つの矛盾を認めるのは、Fig. 7 に於て一部崩壊しかけた封入体 (a) 及び三ヶの不規則な蜂窩状の構造である。先づ一部崩壊しかけた封入体 (a) に就てのべるならば、半月形に全く dense な領域には他に示した多くの封入体と全く同一の構造をあらわすものであるに拘らず、それに隣接する他の半月部は種々なる形態を示すウイルス粒子を含み、粗造な外観を呈しつゝ、恰も前者と移行しているような像である。

この像から推定が許されるならば、右半分は左半分の封入体と無関係のものでなく dense な封入体が崩壊していく場合に右半分にみられるようなウイルス粒子が形成され乍ら、崩壊して行く即ち、dense な封入体はウイルス形成の何等かの組材を有し、それが崩壊と同時にウイルスの形成が促進され、右半分の如き形態をとるのではないかと考えられる。若し Gaylord のようにかかる dense な封入体の中でウイルスが既に形成され、その中に存在していた基本小体が崩壊と同時にウイルス粒子を放出するとすれば左右両部分の移行部の dense の Material の側にウイルス粒子を多数認めてよいと考える。もしこの様な封入体がウイルスを形成するとなれば、崩壊と同時に起こなわれる事が想像されるのである。しかしながら又逆の考えも成り立つ、一度 Matrix region で形成されたウイルス粒子を細胞の防禦反応として、細胞側がとり囲み、最後に dense な Body と化すると云う考え方であるが、多くの像からそのような解釈は少し無理なようにも思われる。これ迄示した如く dense な Body が一応ウイルス形成と全く無関係のものとして考えられるが、それに対してもやはり一つの疑問点を見出さねばならない。

結 論

エクトロメリア・ウイルス感染漿尿管を電子顕微鏡

的に観察し次の如き所見を得た。

1. 感染漿尿管の細胞質内に多数の封入体と、集団或は散在性に存在するウイルス粒子を認めた。
 2. 封入体は大小の如何に拘らず density が高く均一で内部には基本小体を認める事は出来なかつた。封入体の数は、通常 1 ヶの細胞に 1 ヶであるが、2 ヶと認められるような像も認められた。これ等の成績は Gaylord 等の結果と一致しているが、彼等の如くすべての封入体をウイルス増殖の場として、考える事は出来なかつた。
 3. Matrix region には、成熟粒子と種々の発育段階にあるウイルス粒子を認めた。
 4. 細胞質内には、一定の大きさを示した density の高い成熟粒子が、集団状に存在するのを認めた。
- 擱筆にあたり御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師木村廉教授に深甚の謝意を捧げる。実験等に対し種々なる御指導と御助言を戴いた東教授に感謝する。又尾崎博士、野竹学士より与えられた御協力に御礼を述べる。尚エクトロメリア・ウイルス (石川株) を分与された奥野助教授の御厚意及び楠本博士の御助言に対し感謝する。

附 図 説 明

Fig. 1-7.

エクトロメリア・ウイルス接種96時間後の漿尿管

Fig. 1. 封入体 (a, b, c, d.) と成熟ウイルス粒子の集団。(e) は matrix region.

Fig. 2. 封入体 (矢印) と細胞質内に散在するウイルス粒子。

Fig. 3. density の高い封入体と種々のウイルス粒子を含む matrix region. (a, b, c.)

Fig. 4. 核は変形して、凹部には封入体を見る。細胞質内に Packet 状をした成熟ウイルス粒子の集団がみられる

Fig. 5. 矢印は matrix region. 細胞質内に多数の空泡が存在している。

Fig. 6. 封入体と細胞質内の成熟ウイルス粒子の拡大像。

Fig. 7. 崩壊しかけた封入体 (a) と3ヶの蜂窩状構造がみられる。半月形の dense な封入体に隣接する部に、種々の形態を示すウイルス粒子の包含像 (矢印) を認める。

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Fig. 7.

文 献

- 1) Marchal, J.: Infectious ectromelia. *J. Path. and Bact.*, **33**, 713, 1930. 2) F. Baumgartner.: Infektionsversuche mit isolierten Einschlusskörperchen der Hühnerpocken und Ectromelia. *Zbl. f. Bact. Iabt, Orig.*, **133**, 282, 1935. 3) Himmelweit, F.: Observations on living vaccinia and ectromelia virus by high power microscopy. *Brit. J. Exp. Path.*, **19**, 108, 1938.
- 4) Barnard, J. E.: The causative organism in infectious ectromelia. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B*, **109**, 360-380, 1931. 5) Boswell, F. M.: Electron microscope studies of virus elementary bodies. *Brit. J. Exper. Path.*, **28**, 255, 1947.
- 6) Borysko, E. and Bang, F. B.: The fine structure of the chorionallantoic membrane of the normal chick embryo. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **92**, 257-265, 1953. 7) Woodruff, A. M. and Goodpasture, E. W.: Susceptibility of chorio-allantoic membrane of chick embryos to infection with fowl pox virus. *Am. J. Path.*, **7**, 209, 1931. 8) Gaylord, W. H., & Melnick, J. L.: Intra cellular forms of pox viruses as shown by the electron microscope. (*Vaccinia, Ectromelia, Molluscum contagiosum*). *J. Exp. Med.*, **98**, 157, 1953. 9) Pease, D. C. and R. F. Baker.: Sectioning techniques for electron microscopy. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* **67**, 470, 1948. 10) Bang, F. B.: Cellular changes in the chick chorio-allantoic membrane infected with herpes simplex and vaccinia. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **87**: 511, 1950. 11) 土肥清一: ウイルス性疾患に於ける封入体のピオロジーに関する研究, 第一報, エクトロメリア封入体に就て, *Virus*, **1**, 127-133, 1951. 12) 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, 第二報, 封入体の発生と構造に関する位相差顕微鏡学的研究, *Virus*, **3**, 307-313, 1953. 13) 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. 14) 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3報, エクトロメリア・ウイルスエールリッヒ癌細胞系に就いて. *Virus*, **5**, 242, 1955. 15) Palade, G. E.: A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.* **95**, 285, 1952. 16) Morgan, C., and Wyckoff, R. W. G.: The electronmicroscopy of fowl pox virus within the chorioallantoic membrane. *J. immunol.*, **65**, 285, 1950. 17) 東昇: 電子顕微鏡及びウルトラマイクロームによる病理組織学的ウイルス学的研究. 米国におけるウルトラマイクローム技術の現状. (1) 日本医師会雑誌. **26**, 144-153, 1951. 18) 東昇: 米国におけるウルトラ・マイクローム技術の現状. (2) 日本医師会雑誌. **26**, 412-414, 1951. 19) 東昇: 米国におけるウルトラ・マイクローム技術の現状. (3) 日本医師会雑誌. **26**, 544-549, 1951. 20) 東昇: 第14回日本医学会総会特別講演集. P253-265, 1955. 21) 東昇, 徳田正夫: ムンプスウイルス増殖の電子顕微鏡的予備実験. *Virus*, **4**, 64-74, 1954. 22) 東昇: 生物組織及び微生物乃至遊離細胞の電子顕微鏡用超薄切片をつくる最も新しい方法. *Virus*, **6**, 69, 1956. 23) Gaylord, W. H., Melnick, J. L. & Bunting, H.: Intra cellular development of vaccinia virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **80**, 24, 1952. 24) 尾崎良克: エクトロメリア・ウイルスの電子顕微鏡用標本作製簡易法. *Virus*, **3**, 158-159, 1953. 25) 尾崎良克: エクトロメリア・ウイルス感染細胞の電子顕微鏡的観察. *Virus* 学会特別号, **5**, 1, 1955. 26) 尾崎良克, 金石伊, 堀井章市: エクトロメリア・ウイルス感染吉田肉腫細胞の電子顕微鏡的研究. *Virus*, **6**, 173-180, 1956. 27) Newmann, S. B. & Borysko, E.: New sectioning techniques for light and electron microscope. *Science*. **110**, 66, 1949. 28) Newmann, S. B., Borysko, E. & Swerdlow, M.: Ultramicrotomy by a new method. *J. Res. Natl. Bureu. Stand.* **43**, 183, 1949. 29) Morgan, C. Ellison, S. A., Roose, H. M., & Moore, D. H.: Structure and development of. viruses as observed in the electron microscope. I. Herpes-simplex virus.: *J. Exp. Med.* **100**, 195, 1954. 30) 加藤四郎, 萩原喜一, 馬場英三, 佐藤洋太郎, 釜洞醇太郎: Fowlpox virus の新封入体に関する研究. *Virus*, **5**, 318, 1955. 31) Morgan, C. Ellison, S. A., Roose, H. M. and Moore, D. H. Structure and development of Virus observed in the electron microscope. II. Vaccinia and fowlpox virus. *J. Exper. Med.*; **100**, 301, 1954. 32) 加藤四郎: 悪性腫瘍を宿主とせる ectromelia virus の封入体に関する研究. *Virus*, **5**, 111, 1955. 33) Yoshikatu Ozaki.: Electron microscopic studies on ectromelia virus. I. Studies on the isolated inclusionbodies and elementary bodies. *Acta Schol. Med. Univ. Kioto*, **33**, 3-159-167. 34) Yoshikatu Ozaki.: Electron microscopic studies on ectromelia virus. II. Studies on the inclusion bodies and elementary bodies within the host cell. *Acta Schol. Med. Univ. Kioto*, **33**, 3-168-183. 35) 野竹邦弘: 電子顕微鏡検用組織片包埋樹脂内にできる気泡を除去する一新法. *Virus*, **4**, 179, 1954. 36) 水口要子: 超薄切片法による牛痘ウイルス感染組織の電子顕微鏡的研究. (1) 封入体に関する研究. *Virus*, **5**, 324, 1955. 37) 萩原喜一: 腹水癌細胞を宿主とするエクトロメリア・ウイルスの増殖周期に関する研究. *Virus*, **6**, 23, 1956.