erythrocytes which follow treatment with influenza and Newcastle disease virus, *J. Bact.*, **55**, 183~196, 1948 58) Tamm, I. and Flucker, D. J.: The effect of ultraviolet radiation on the infectivity and hemagglutinating ability of the influenza virus type A strain PR8, *J. Bact.*, **59**, 449~461, 1950 59) 中西謙三: インフルエンザ・ウイルスの赤血球凝集能と感染能及び免疫能との関連性, *I. インフルエンザ・ウイルスの感染能と赤血球凝集能及び免疫能とに関する考察*, *Virus*, **4**, 193~194, 1954 60) 中西謙三, 吉岡勇雄, 大久保つる: 同上, *II. インフルエンザ・ウイルスの感染能, 赤血球凝集能の解離*, *Virus*, **4**, 195

~197, 1954 61) 吉田才造: ウイルスの血球凝集阻止物質に関する研究, 第Ⅱ報, *N.M.B. 阻止物質による GD VII 株ウイルス血球凝集阻止の作用機序について*, *久留米医誌*, **19**, 45~51, 1956 62) 観見膠一: ムコ蛋白と癌, *生体の科学*, **7**, 88~96, 1955 63) 山添三郎: 血清及び尿のムコ蛋白と膠質反応, *医学の歩み*, **21**, 303~321, 1956 64) Von Magnus, P.: Properagation of the PR8 strain of influenza A virus in chick embryos. *I. The influence of various experimental conditions on virus multiplication*, *Act. Path. Microbiol. Sc. and.*, **28**, 250~277, 1951

超薄切片法による牛痘感染培養細胞の電子顕微鏡的観察

水 口 要 子 *

YOOKO MIZUGUCHI: ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES ON THE THIN SECTIONS OF CULTURED CELLS INFECTED WITH VACCINIA VIRUS.

[受稿 2月8日 1957]

I. 緒 言

細胞内ウイルスの増殖に関する研究は電子顕微鏡の発達と共にその発展は著しいものがある。一方組織培養法も各方面に應用され特にウイルスの研究に於ては重大な役割を果している。殊に細胞質封入体形成の難易は宿主・ウイルス相関関係により決定され、同一ウイルスに対する細胞質封入体形成の容易な組織と一方同じ組織に対して封入体形成の容易なウイルスがある。此等宿主・ウイルス相関関係を知る研究の上にも組織培養法は不可欠のものである。

培養組織細胞の電子顕微鏡的研究は1945年 Porter, Claude & Fullam¹⁾ によつて始めて鶏胎児の腺維芽細胞様細胞について行われた。牛痘ウイルス感染培養細胞の研究は1949年 Wirth & Athanasin²⁾ によつて成長家兎の腎上皮について行われ、これが組織培養法がウイルスの電子顕微鏡的観察に應用された創めであ

る。その後 Bang, Murphy^{3)~5)} 等が各種ウイルスについての研究を行い、我が国では木村, 清水, 尾崎⁶⁾ ~¹¹⁾ は鶏胎児心臓及び漿尿膜の培養細胞に牛痘ウイルス及びエクトロメリア・ウイルス等を感染せしめて電子顕微鏡的研究を行つている。然し上記の実験の方法では培養細胞の周縁部の非常に薄い部分が最適であつて中心部は不適であるが為、細胞に於ける観察範囲が限局されるという困難があつた。然るに1948年 Pease & Baker により考案されて以来長足の進歩を逐げ各分野に應用されるに至つた超薄切片法を用いる事によりその短所がのぞかれた。Borysko¹²⁾, 木村¹³⁾, 尾崎・大山¹⁴⁾, 堀井¹⁵⁾, はこの超切片法を用いて培養細胞の観察を行つて良い成績を得ている。Reissig & Melnick¹⁶⁾ は Dulbecco & Vogt¹⁷⁾ 及び Youngner¹⁸⁾ によるトリブシン処理法を用いた分散細胞の培養によつて原組織の混入を去け猿の腎上皮の培養細胞にヘルペスB・ウイルスを感染させ、堀田¹⁹⁾ は同培養による

* 京都大学医学部微生物学教室 (主任 木村廉教授)

デング熱ウイルスの研究を行っている。

著者²²⁾³³⁾はさきに牛痘ウイルスを鶏卵漿尿膜及び家兎角膜に接種しその超薄切片法による電子顕微鏡的観察に於て Gaylord 等²⁰⁾, Morgan 等²⁹⁾の認めた所謂封入体とマトリックス地域とを認め、これ等封入体及び多様のウイルス粒子について報告したが、この超薄切片法を組織培養法に應用して鶏胎児肺臓の培養細胞に牛痘ウイルスを接種しその電子顕微鏡的観察を試みた結果次の成績を得たので報告する。

II. 実験材料及び実験方法

1. 感染材料を固定するまで

組織培養法：組織培養法の詳細は木村教授の“組織培養¹³⁾”，勝田²³⁾並びにCameron²⁴⁾の著者にゆずるが簡単にその方法を述べる。

1. 培養器：凹窩硝子と被覆硝子は 75×45mm のものを用いた。

2. 培養組織片：肺組織は孵化 14 日目の鶏胎児から摘出して用いた。

3. 胎児圧搾液：孵化 8 日目の鶏胎児の圧搾液を使用した。

4. 培養基：鶏の Heparin 加血漿の一滴を被覆硝子の上に薄く円形に広げ、その上に組織 3 個を置き、更に一滴の栄養液（胎児圧搾液，馬血清，Tyrode）を添加して両液を混和，血漿を凝固せしめて培養に供した。

5. 培養方法：栄養液或いは血漿の補充，ウイルス接種に便ならしめる為に，又顕微鏡観察が容易な為，Double coverslip method により 37°C にて培養を行った。

6. ウイルス接種：用いたウイルスは阪大微研より分与された痘苗を家兎睾丸累代通過後更に孵化漿尿膜に馴化させたものである。磨砕した感染漿尿膜に Tyrode を加え遠心上清の ×1000～×5000 の稀釈液を使用した。

接種方法は培養後 24 時間をへて Tyrode にて組織を十分に洗滌し Plasma, Extract を追加同時に Tyrode で適当に稀釈した上記ウイルス浮游液を添加した。

2. 固定から鏡検までの操作

ウイルス接種後 24 時間～72 時間培養後，被覆硝子に組織を付着させたままで Tyrode 液で洗滌後 1% オスミツク酸磷酸緩衝液 (pH 7.4) で固定した。固定は被

覆硝子が入り得る小型秤量瓶の中で密栓して一時間室温で放置後蒸留水で一時間点滴水洗した。培養組織を被覆硝子から剝離する事は組織が菲薄なる為困難であつたが，大山²⁵⁾は脱水末期の 99% エタノールの液中で小鏡で注意しながら組織を損傷する事なくして剝離する事に成功し堀井も亦この方法を用いている。この際必ずエタノール液中で操作をする。空气中で操作をする場合は常に液で浸しながら終始乾燥を防がなければならない。一旦乾燥した組織の剝離は困難で失敗に終る。又剝離時に同時に原組織を切り取り新生細胞のみの試料と原組織を加えたものの二種類作製した。包埋時に新生細胞のみのものはそのまま或いは立位で包埋し，原組織の付着した試料はカプセルを随意に変形する事により立位で包埋し，何れも野竹の方法によつた。

電子顕微鏡は明石製作所製の小型電子顕微鏡で鏡検撮影は野竹邦弘学士によつてなされた。

III. 実験成績

鶏胎児肺臓を培養した場合通常主に肺上皮細胞と次いで線維芽細胞の増殖を見る。電子顕微鏡で観察した結果，前者は類円形をとり後者は細長い形を呈していた。これらは堀井²³⁾が鶏胎児の心臓及び虹彩の培養細胞の電子顕微鏡的観察で得た像に一致している。第 1 図は線維芽細胞の縦断像である。細胞は細長く柳葉形であり，核は楕円形を呈し核の内部には微細な顆粒が充満して居り電子密度の大きい核小体を認める。原形質の中には大小不同の円形顆粒を認めるが，大きい顆粒は大部分脂肪顆粒と思われ，他はミトコンドリアであろう。此処ではミトコンドリアの内部構造は鮮明に見る事は出来ない。この図は右の方の延長部に母細胞を有する線維芽細胞の正常に近い縦断像であろうと思われウイルスによる細胞の変化を認める事は出来ない。

第 2 図は新生肺上皮細胞の超薄切片像である。上皮細胞は線維芽細胞の如く細長いものは少く，多くは類円形であり核の大きさは他の細胞に比して原形質との比が大である。核は均等な微細顆粒で充され中央に電子密度の大きい不正形の 2 個に別れた核小体を認める。細胞質中には所々に円形顆粒を認め又多数のミトコンドリアの出現を見る。これ等ミトコンドリアの中には限界膜と Cristae mitochondriales を認め細胞質から明かに識別される。細胞間に電子密度の大きい不規則な構造を認めるがそのものの意義については

不明である。第1図と同じく牛痘ウイルス接種による細胞内の形態学的な変化を認め得ず、これも正常に近い新生細胞の像と思われる。

第3図は、牛痘ウイルスの侵襲を受けたと思われる鶏胎児培養肺上皮細胞の超薄切片法により得た電子像である。細胞質内に所々空胞の出現を見るが核質は均等であり核膜によつて囲まれその中に電子密度の大きい核小体を認める。核に接近して中等度の電子密度を有する円形の構造物として明確に細胞質から識別される個所がある。これはGaylord & Melnick²⁰⁾, Morgan等²¹⁾が Pox group のウイルスの研究で得た封入体の所見よりはむしろ土肥²⁶⁾, 尾崎^{27,28)}がエクトロメリア・ウイルスの研究で得た封入体に似て居り、内部の所々に電子密度の大きい内部構造を認める。又、核に接近してミトコンドリアの存在を認めるがその関係は明かではない。本実験では、しばしば核小体の変化に遭遇した。核小体は著しく膨化して居り核質の大部分は核小体によつて占められ数も2個のものが多く電子密度の大きいドーナツ状を呈するもの又、その中に空隙を有し多様な変形を呈しているものを認めた。これら核小体の変化を認める場合に多く細胞質内に電子密度の極めて高い内部構造の無い均等な物質に遭遇し、それらは限界膜を持たず大いさのから核の大きさに至るものまでであり、脂肪顆粒よりは識別出来、Gaylord等²⁰⁾が牛痘感染角膜内及びエクトロメリア・ウイルス感染膀胱膜に認めた封入体を思わせる像を得たが細胞質内にウイルス粒子を認め得なかつた為本編では言及しない。これら封入体様物質の出現は線維芽細胞よりも上皮細胞に多く認めたがこれらの関係も明かではない。

IV. 考 察

1. 実験方法について

培養組織の超薄切片作製中最も注意を払わなければならないのは菲薄な培養細胞を損傷する事なくガラス面より剝離する事である。これ等の為に諸家はそれぞれ工夫をこらして居り、木村、東、清水³¹⁾はこの為に種々の方法を考案して居り新生細胞をガラス面より剝離する目的の為にコロザオン膜を使用した。著者は大山等²²⁾の方法により鶏血漿の薄膜を張りその上に培養した組織をそのまま固定、水洗し脱水途上に於て小筵で剝離する事が出来た。この場合最も注意すべきは上述の如くガラス面上の培養組織の乾燥を防ぐ為、液中

操作をする事であり組織が菲薄な為水洗時に組織がガラス面より剝がれない様に点滴水洗した。固定は1% オスミック酸磷酸緩衝液で時間は1時間以内がよい。

次に新生細胞と母細胞との識別である。これらは電子像に於て識別が困難な時に遭遇する。この難を避ける為に種々の方法が考慮され、Borysko等は円板形包埋物を培養組織面に直角に切截して居り、Reissig等¹⁶⁾はDulbecco¹⁷⁾によるトリプシン処理培養法により原組織の混入を去けている。著者は脱水途上原組織をガラス面より剝離する時に原組織を新生細胞よりのぞくか又はカプセルの変形により立位に包埋した樹脂棒より光学顕微鏡の下に原組織を除去した。

2. 実験成績について

培養肺臓細胞に牛痘ウイルスを接種して得た上記の電子顕微鏡所見に於て核の近くに見られた電子密度の大きい構造物はGaylord等²⁰⁾, Morgan²¹⁾等が牛痘ウイルスの感染膀胱膜及び角膜で認めた細胞質封入体よりも、土肥²⁶⁾, 尾崎^{27,28)}がエクトロメリア・ウイルスをエールリツヒ癌及び吉田肉腫に感染せしめて得た封入体に似ている。

V. 結 論

牛痘ウイルスを鶏胎児肺臓の組織培養細胞に接種し、これを超薄切片法を用いて電子顕微鏡的に観察した。

類円形を呈した上皮細胞と細長い線維芽細胞を認め、新生上皮細胞質内に電子密度の大きい内部構造を有する封入体様物質を得た。

拙筆にあたり御懇篤なる御指導御校閲を賜った恩師木村廉教授に深甚の謝意を表する。又超薄切片の作製、電子顕微鏡による実験等に対する東教授の御指導に感謝する。なお組織培養法は大山学士の御指導を戴き、尾崎、野竹両学士より与えられた御助力に御礼を述べたい。

付 図 説 明

第1図- 正常に近い線維芽細胞の縦断面を示す。

第2図 正常に近い培養肺上皮細胞であり、細胞質内に Cristae mitochondriales の出現を示す。

第3図 封入体様構造物を認める鶏胎児肺培養上皮細胞

第4図 正常に近い培養肺上皮細胞。

第5図 第4図の拡大像。

第 1 图

第 2 图

第 3 图

第 4 图

第 5 図

文 献

- 1) Porter, K. R., Claude, A. & Fullam, E. F., *J. Exp. Med.*, **81**, 233, 1945. 2) Wirth, J. & Athanasia, P., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **70**, 59, 1949. 3) Bang, F. B. & Gey, G. O., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **71**, 78, 1949. 4) Murphy, J. S., Karzon, D. T. & Bang, F. B., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **73**, 596, 1950. 5) Bang, E. B., *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **92**, 291, 1953.
- 6) 木村廉, 清水勉, 尾崎良克, *東京医事新誌*, **67**, 3, 昭25. 7) Shimizu, T., *Acta Schol. Med. Univ. Kyoto*, **23**, 77, 1950. 8) 清水勉, *日新医学*, **38**, 703, 昭26. 9) 木村廉, *Virus*, **2**, 1, 1952.
- 10) 木村廉, 清水勉, 尾崎良克, *Virus*, **2**, 249, 1952. 11) Shimizu, T., *Acta Schol. Med. Univ. Kyoto*, **29**, 145, 1952. 12) Borysko, E. & Sapranauskas, P., *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **95**, 68, 1954. 13) 木村廉, *組織培養* (改訂版), 共立出版, 昭30. 14) 尾崎良克, 大山昭夫, 未発表.
- 15) 堀井章市, *Virus*, **6**, 83, 1956. 16) Reissig, M. & Melnick, J. L., *J. Exp. Med.*, **101**, 341, 1955. 17) Dulbecco, R. & Vogt, M., *J. Exp. Med.*, **99**, 167, 1954. 18) Youngner, J. S., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **85**, 202, 1954. 19) 堀田進, *日本医事新報*, 1657号, 32, 1956. 20) Gaylord, W. H. & Melnick, J. L., *J. Exp. Med.*, **93**, 157, 1953. 21) Morgan, G. & Wyckoff, R. W. G., *J. Immunol.*, **65**, 185, 1950. 22) 水口要子, *Virus*, **5**, 324, 1955. 23) 勝田甫, *組織培養法*, 千代田出版, 1955. 24) Cameron, G.; Academic press Inc. New York, 191, 1950. 25) 大山昭夫, 未発表. 26) 土肥清一, *Virus*, **5**, 242, 1955. 27) Ozaki, Y., *Acta Schol. Med. Univ. Kyoto*, **33**, 168, 1956. 28) 尾崎良克, 金石伊, 堀井章市, *Virus*, **6**, 173, 1956. 29) Morgan, C., Ellison, S. A., Rose, H. M. & Moore, D. H., *J. Exp. Med.*, **100**, 301~310, 1954. 30) Morgan, C., Ellison, S. A., Rose, H. M. & Moore, D. H., *Exp. Cell Res.*, **9**, 572, 1955. 31) Shimizu T., *Acta Schol. Med. Univ. Kyoto*, **23**, 77, 1950. 32) 堀井章市, *Virus*, **6**, 166, 1956. 33) 水口要子, *Virus* 掲載予定.