伝染性軟疣腫の電子顕微鏡的研究

和田 倭 子*

SHIZUKO WADA: ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES ON
THE MOLLUSCUM CONTAGIOSUM.

〔受稿 2月8日 1957〕

I. 緒 言

Virus 性疾患に於ける感染細胞内の形態学的変化として、現れる封入体の本態或はウイルスの発育、増殖の様式に関しては、多くの研究がおこなわれている。

Molluscum contagiosum Virus により感染細胞殊に上皮の棘細胞層にあらわれるところの形質内封入体、即ち Henderson-Patterson molluscum body に就ては Goodpasture, Wodruff は fowlpox の Bollinger 小体に発育様式と構造が酸似している事を示した。1938年に Van Rooyen は microdissection, 生体染色或は組織化学的検索によつて、成熟した球状の封入体はゲラチン様の matrix の中に多数の基本小体の充満像を示し、その後 Rake, Blank は初期の封入体の原形質内にはRNAが増大するが、後にはDNAの著明なる蓄積を認めている。そして封入体内の隔壁はRNAからなると述べている。

最近では、超薄切片技術と電子顕微鏡の研究により Banfield, Bunting 等は初期の細胞内に存在する基本小体は封入体の中にあるそれとは形を異にし、成熟封入体になると隔壁で区分された多くの小室に分れ、その中に基本小体が充満している事を認めている。

Gaylord, Melnick も Banfield の追試を行つて、同様の結果を得ている。

著者はさきに Ectromelia Virus による感染漿尿膜の電子顕微鏡的観察を行つたが、Molluscum contagiosum Virus による形質内封入体は前者とは趣を些か異にし、その中に見られる基本小体の発育様式に就て、研究を行つたので報告する。

II. 実験材料

材料は、大阪市立大学医学部皮膚科の門脇学士の御

厚意により、分与を受けたもので、患児(4才、女児)の上脊部に散在性に発症した伝染性軟疣腫の中、中央部に小凹窩を有する粟粒大から米粒大の小腫瘍を数コ撰び、カプセル毎搔爬、切除をおこなつたものを使用した。

III. 実験方法

精製ウイルス試料作製は、尾崎の方法に従つた。即ち上述の材料数個を凍結切片法で厚さ約20 μ 程度の切片を作り、細胞の破壊、ウイルス粒子の遊離を計る目的で、それ等を蒸溜水中に浮遊させ、4°Cの氷室内に24時間放置、1,000 r. p. m. 1分間軽く遠沈し、粗大な細胞破壊産物を除きその上清液について更に3,000 r. p. m. 約1時間遠沈をおこない、メザウム中に浮遊せるウイルス粒子を集めた。そしてその出来た沈渣を元量の1/5程度の蒸溜水で再浮遊し、これをそのままコロザオンを張つた mesh の上に1滴載せ、自然乾燥の後に鏡検、撮影をした。

超薄切片試料作製は、カプセル毎に取り出した組織を、生理的食塩水、或は磷酸緩衝液で、軽く洗滌後、直ちに Palade の方法により pH 7.4 の1%オスミウム酸 Sørensen 氏磷酸緩衝液で氷室内固定を行つた。即ち組織の小塊をそのまゝで、先づ表面の固定を計り、3時間後に細切して同液中にて更に固定を継続して、全体として計7時間の固定をおこなつた。次で蒸溜水で水洗、エタノール系列に順次に移して、脱水、包埋は型の如く methacrylate 樹脂で包埋した。即ち n-butylmethacrylate と methylmethacrylate を8:2の割合に混合したもので、触媒には、Benzoyl-Peroxide を1.5%の割合に添加した。45°Cの恒温器内で18時間放置し、重合を完了せしめた。切片作製には Spencer の超ミクロームとガラスナイフを使用

* 京都大学医学部微生物学教室 (主任 木村廉教授)

した。包埋材料は、電子線により、昇華除去をした。鏡検及び撮影にはJEM-5C型電子顕微鏡を用いた。

IV. 実験成績

精製法による観察は、感染細胞から分離されたウイルス粒子の群在する像が得られた。斯かるウイルス基本小体の集団像は封入体内に充満された基本小体が蒸溜水的作用により、そのまま遊離した結果と解釈され、本封入体が、基本小体の集積からなることを示唆するものである。殊に個々の粒子が単離することなく互に或種の物質で結合され、或は包まれているのは基本小体を包蔵する封入体の基質成分であろうと思われる。ウイルス粒子の個々は楕円形又は方形を呈し、大きさは $330\sim 230\text{ m}\mu$ 略々一定している内部は非常に dense で内部構造は明らかでないが、周囲は稍々 less dense である。基本小体の表面は shadowing を施していないので、明確な事は分らない。

組織標本を Haematoxylin-eosin 染色により、観察すると、上皮の棘細胞は、膨大して核は細胞の一侧におしやられる。細胞の内部は細い隔壁に胞状に分割され、そしてこの部分は、Eosin で赤く染まり Feulgen 陽性である。隔壁は Haematoxylin に弱染し、Feulgen 陰性であった。

超薄切片の電子顕微鏡的観察によつても、組織標本でみられた所見と略一致して、棘細胞に於て、著明なる変化が認められた。即ち細胞は膨大し、核は一侧におしやられて変形を呈し、ミトコンドリア並びに原形質の諸構造も周辺部に僅かばかり存在して認められる。封入体は核内には認められず、又細胞質内に限局されずに恰も細胞質がウイルス粒子と置換されたかの如き像を呈する。

封入体の中には内部が隔壁により、幾つかの小室に区割され、塊状、房状に群在する成熟ウイルス粒子を包含しているのが認められる。Fig. 3, 5, 6, 7, 8. 成熟ウイルス粒子は、周囲の基質に比べると、一般に density が高い。その形状は方形、練瓦状を呈して大きさは平均して $330\sim 230\text{ m}\mu$ である。時に粒子の内部構造として、線状のかんめき様の像がみられる。Fig. 9-a, b, c.)

封入体内特に中心には、群在する成熟ウイルス粒子の他に、隔壁や、周辺部の原形質内で density の稍々高い、境界不鮮明な所謂 Gaylord 等の云つてゐる matrix-region に相当するところに①膜状を呈し、中

心に dense な顆粒のある粒子。(Fig. 6, 7, 8-a.) ②膜状をして中心部は density の低い顆粒をもつ粒子。(Fig. 6, 7, 8-b.) ③膜状で内部は均質な粒子。(Fig. 6, 8, -c.) ④中空で壁の厚いドーナツ型をしている粒子。(Fig. 8-d.) 等が存在し、又これら粒子の間には夫々移行型も認められる。

封入体は屢々隔壁によりて、幾つかの小室に区分されるものがある。(Fig. 3, 6, 7, 8) この隔壁は凸凹があるが、大体輪状をなしている。Fig. 4, 5, の封入体には隔壁は認められない。

周辺部に圧排された核は、変形して不整なる半月状 (Fig. 3) 或は鎌状 (Fig. 5) を呈して、核仁内に数個の小空胞が認められた。細胞質内殊に周辺部にある原形質内に多数の小空胞 (Fig. 3) が認められるが、これもウイルスの侵襲によつて出来たものかどうかは不明である。

V. 考察

固定について；

伝染性軟疣腫は、割合に厚いカプセルを有し内容は白粥状の腫瘍であるために、固定の場合に組織をあらかじめ、細切して固定するよりも、そのまま固定し、表層部がオスミウム酸により固定された後に細切する方が、内容物の損失が少ないように考えられる。その為著者は予め3時間固定し細切後更に4時間固定を行い良好な結果を得る事が出来た。

組織標本について；

Haematoxylin-eosin 染色及び Feulgen 染色を用い伝染性軟疣腫の封入体を染色し、封入体の隔壁は Haematoxylin に弱染、Feulgen 陰性、封入体の内部は Eosin をとり、Feulgen 陽性なる結果を得た。この Feulgen 陽性の所見から封入体の内部は DNA を豊富に含んでいる事が想像されるが、その DNA が果して封入体の基質に含まれるのか、基本小体の含有する DNA が Feulgen 陽性の結果を招いたのか分らない。

Rake, Blank の Pyronin methyl green 染色による結果から隔壁は RNA を含むことを示している。これは細胞質中に存在する RNA が封入体の形成時に生じた隔壁の構成にあづかるものと想像される。その際細胞質の RNA がそのまゝの形で隔壁の中に存在する即ち隔壁が単なる機械的の変形によるものか、それとも隔壁としての特異な形態と機能を営む上に必要な

構成成分としての RNA であるか分らないが、次に述べる電顕的観察から、隔壁は細胞質の残存に外ならないものとの解釈から、その RNA も特殊なものでなく、単なる細胞質の RNA を示すに過ぎないと解釈した方が適切と考えられる。

電子顕微鏡所見について；

本ウイルス感染細胞内に生ずる細胞質内封入体の所見については、先きに Banfield, Bunting, Gaylord 等の示した成績と略々一致するものであつた。Gaylord 等は Vaccinia, Ectromelia Virus について感染宿主細胞内に於けるウイルス発育の場として、density の高い封入体と、境界の稍不鮮明な matrix region の形成を認め、これ等ウイルスによる封入体は極めて density が高く、多くの場合は、内部に基本小体の存在をみる事が出来ないが、ウイルスの発育増殖が進展して封入体の崩壊をきたす際に始めて基本小体の放出の起ることを示して居り、他方 matrix region については、その density、形態等からは明らかに封入体と区別出来るにも拘らず、ウイルス増殖の場としての役割と云う面からは、質的には封入体との差を認めていない。

この様に細胞内ウイルス増殖の場を封入体、或は matrix region のように細胞内に現われる特殊な構造を求める場合、同じ封入体形成ウイルスでもその種類により如何なる差を生ずるであろうかは興味深い。このような観点から Molluscum contagiosum の封入体について、電顕的観察を行い、Ectromelia, Vaccinia の封入体との異同を求め、且つこの封入体の発育及びその中にみられる基本小体の発育様式について、研究を進めたのである。

本ウイルスは動物移植が成功しておらず、その材料を、患者から直接求めねばならない関係上、継時的な追求には自ら制限をうける。斯る理由から得られた像より、逆に継時的な解析が行われた。

この封入体は細胞質内に生じ、決して核内にみられないのは、他の Pox group のウイルスによる封入体と同様であるが、その形態は非常に特徴的で Ectromelia, Vaccinia Virus の感染により惹き起される封入体とは全く趣を異にする。即ちその最も大きな特長は封入体即ち基本小体の集積であり、封入体として細胞質内に限局された位置を占めると云うよりも、細胞質の殆んど領域がウイルス基本小体と入れかわつた像を呈することである。又細胞質の本来の構造は細胞

の周辺部に僅かに残り核は圧迫されて著明なる変形を来す点も特異的である。従つて density の高い Homogeneous な限局性の封入体でなく、density の低い基質の中に明瞭な輪廓を有する基本小体が、充満し、恰も空の袋に胡麻を詰めたかの如き像が即ち封入体に他ならない。

而も基本小体を包蔵する封入体基質と細胞質との間には、確然たる境界をみず、封入体の細胞質との限界はそこに並んだ基本小体によりつくられているのは Ectromelia, Vaccinia の封入体と異り特徴的である。

次に本封入体を輪状に区分する隔壁の存在がその特徴となる。その隔壁が果して如何にして生じたのであろうか。その像より見れば封入体が隔壁により、幾室かに区分されている様にみえるが、それを構成する構造は細胞の周辺部に残存する細胞質の構造と一致する点から、隔壁は大きな封入体を分割する壁の役割を果すものでなく残存細胞質に他ならないものと解釈される。即ち封入体形成が一個の細胞内で数ヶ所から起り、夫々の位置に於て、その部の細胞質を利用しつつ封入体の増大と基本小体の蓄積を行い、細胞質と封入体の置換が限局的に起る結果隣接封入体の間に細胞質が残存し、隔壁の如き形態を示すのであろうと解される。随つて封入体の発育の初期に於てはその大きさも小さく、封入体は限局性で隔壁と称する構造はみられず、封入体を区分するものは細胞質であることは明らかである。処が封入体が次第に増大して、封入体内にある細胞質の部分が減少して行くに従つて隣接封入体を隔てる細胞質は恰も壁様の構造として見られるのである。この状態が更に進むと隔壁を形成する物質迄も消費され、隣接封入体は癒合し一個の封入体として観察される様になる。

上述の事から Molluscum contagiosum の封入体は細胞質とウイルス粒子の置換を示し、隔壁はその発育過程に於ける残存細胞質であろうと考えられる。然らば封入体の発育は如何なる過程をたどるものであろうか。前述のように経時的な段階を求めることは出来なかつたが、封入体隔壁で囲まれた基本小体の集団を一個の封入体の単位と解釈して、その大部分は成熟基本小体の集団像を呈するが、その周辺部、即ち隔壁又は細胞周辺の細胞質部に移行する領域に於て屢々 density の高い部位を認める。この領域は他の Pox group Virus の際の Matrix region にも相当すべき像で、この中には基本小体の developing form と

も解釈される empty circle から、内部に種々なる構造を示す大小様々な粒子を認める。

斯る所見から封入体の発育は先づ matrix region のように density の高い領域を細胞質内に生じ、時の経過と共にその領域は周囲に拡大する。その中で形成された基本小体はその位置で成熟過程を完了し、density に富んだ物質は基本小体の成熟のために消費され、成熟ウイルスに進んだ部位は基質の density は低下し、その部は基本小体の巣となる。斯る過程が中心部から周辺部に向つて拡大されてゆくために封入体の中心部は成熟粒子からなるにも拘らず周辺部は density の高い基質の中に種々なる形態を示す developing form の基本小体を認めるのである。

上述の解釈からこの場合の封入体形成は、Gaylord が Ectromelia, Vaccinia Virus の場合にみられる matrix region の形成と軌を一にするものと考えられる。Molluscum contagiosum Virus の発育が極めて旺盛なるため、Ectromelia, Vaccinia の場合の matrix region が限局性であつたのに反し、これが細胞質中を expansive に拡大し上述の様な封入体を形も造るものと考えられる。而も matrix substance の基本小体への置換がこの場合完全に loss なくおこなわれる結果、最終段階では封入体は完全にウイルス粒子の巣と化し、その基質の density は著明に低下するものと思われる。

Ectromelia, Vaccinia の場合では Matrix substance の基本小体への置換が充分でなく随つてこの場合はこのような領域に於て生ずる基本小体の数も少く、且つ基質の density の低下がそれ程著明でない様に思われる。

基本小体の発育段階については前述の様に封入体周辺部にみられる粒子について①～④型に分け、その何れもが封入体中央部の成熟粒子と異り発育過程にある未成熟粒子であることは疑ないと思うが、その各段階を知ることは出来なかつた。又これ等 developing form と思われる粒子がきまつて density の高い領域にみられるのは、高木及び鈴木等が感染初期に細胞質内に dense な微細顆粒物質の擾塊の出現を指摘し、これからウイルス粒子が発育するものであるとの意見に一致するものと考えられる。

VI. 結 論

伝染性軟疣腫の電子顕微鏡的研究を行つた次の如き結

果を得た。

1. 精製法による観察に於ては、感染細胞から分離されたウイルス粒子の群在する像が得られた、即ち楕円形乃至方形を呈して、大きさは平均して、 $330 \times 230 \text{ m}\mu$ のものである。

2. 超薄切片像に於ては、細胞質内封入体 (Henderson-Patterson molluscum body) と、その内容に多数房状、塊状に群在するウイルス粒子を認めた。

3. 封入体には封入体を輪状に区分する隔壁の存在が認められ、この中には多数の成熟ウイルス粒子を認めた。その周辺部には各種の発育段階のウイルス粒子も認められた。

4. 細胞の原形質は、僅かに周辺部に残存し核は一側に圧排されて、核の変形が認められた。

拙筆にあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師本村教授に深甚なる感謝の意を捧げる。直接御指導と御助言を戴いた東助教授に深謝する。又電子顕微鏡写真撮影に援助を戴いた尾崎助手に感謝の意を表する。

文 献

- 1) Banfield, W. G., Bunting, H., Strauss, M. J., and Melnick, J. L.; Electronmicrographs of thin sections of molluscum contagiosum. Proc. Soc. Exp. Biology and Med. **77**, 843, 1951.
- 2) Gaylord, W. H., & Melnick, J. L.; Intracellular forms of pox Viruses as shown by the electron microscope (vaccinia, ectromelia, molluscum contagiosum). J. Exp. Med., **98**, 157, 1953.
- 3) Goodpasture, E. W., and Woodruff, C. E.; A comparison of the inclusion bodies of fowlpox and molluscum contagiosum. Am. J. Path., **7**, 1, 1931.
- 4) 東昇.; 電子顕微鏡によるウイルス研究の今日の焦点. 電子顕微鏡, **4**, 121, 1956.
- 5) 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法, Virus **3**, 158, 1953.
- 6) 市川収, 磯部暁.; 伝染性軟疣腫病変の組織化学的研究. 医学と生物学, **17**, 5, 300, 1950.
- 7) 松野正徳, 井田正丈.; Virus 性皮膚疾患の電子顕微鏡的研究. 皮膚科性病科雑誌, **61**, 304, 1951.
- 8) 松井滋.; 伝染性軟疣腫の実験的研究. 第45回日本皮膚科学会総会録, 1955.
- 9) Morgan, S. A., Ellison, S. A., Rocse.; Structure and development of Virus observed in the electron microscope. II. Vaccinia and fowlpox Viruses. J. Esp. Med., **100**, 301, 1954.
- 10) van Roogen, C. E.; The chemical composition of the molluscum contagiosum inclusion body. J. Path. and Bact., **49**, 345, 1938.
- 11) Rake, G., and Blank, H.; the

relationship of host and Virus in Molluscum contagiosum. J. Invest. Dermat., **15**, 81, 1950. 12) Boswell, F. W.; Electron microscope studies of Virus elementary bodies, Brit. J. Exp. Path. **28**, 253, 1947. 13) Green, R. H., Anderson, T. F. and Smadel, J. E.: Morphological structure of the Virus of vaccinia. J. Exp. Med. **75**, 651, 1942. 14) Lipschutz, B., Zur Kenntnis des Molluscum contagiosum. Wien. Klin. Wchnschr., **20**, 253, 1907. 15) Goodpasture, E. W., and King, H., A cytologic study of molluscum contagiosum. Am. J. path. **3**, 385, 1927. 16) 東昇, 徳田正夫; ムンプスウイルスの増殖の電子顕微鏡的予備実験, Virus, **4**, 64, 1954. 17) Palade, G. E.: A study of fixation for electron microscopy. J. Exp. Med. **95**, 285, 1952. 18) Morgan, C., Ellison, S. A., Rose, H. M., and Moore, D. H.; Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. I. Herpes simplex virus. J. Exp. Med. **100**, 195, 1954. 19) Newmann, S. B. and Borysko, E.; Techniques for use in the preparation of thin section. J. Applied piys. **22**, 114, 1951. 20) Gaylord, W. H., Melnick, J. L. and Bunting, H.; Intra cellular development of vaccinia virus. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **80**, 24, 1952. 21) Yoshikatu Ozaki; Electronmicroscopic studies on ectromelia virus. I. Studies an the isolated inclusionpodies and elementary bodies. Acta. Schol. Med. Univ. Kyoto. **33**, 159. 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) 東昇: 最近のウイルス学進歩の腫瘍ウイルス説に及ぼす影響. 日本外科宝函, **24**, 553, 1955. 24) 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Ⅲ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. 25) Ormsby, M. D. and Montgomery, H.; Diseases of the skin. Lea & Febiger. 7 版, 595, 1948. 26) 安原稔; Molluscum contagiosum の核酸. 大阪医科大学雑誌 **14**, 39, 1953. 27) 江上不二夫(編集); 核酸及び核蛋白質, 下巻, 共立出版 K. K. 384, 55, 1953.

附 図 説 明

Fig. 1. 精製法による伝染性軟疣腫のウイルス粒子の群像である.

粒子の中心部は density は高く周囲は less dense である.

Fig. 2. Fig. 1 の拡大像.

Fig. 3—Fig. 9. 超薄切片法による像である.

Fig. 3. 原形質内封入体 (Henderson-Patterson molluscum body) である.

形質内は群在するウイルス粒子で置換されたかの如き観を呈し, 核は上方に圧排されている.

Fig. 4. 同じく形質内封入体で隔壁はこの像では認められない.

Fig. 5. Henderson-Patterson molluscumbody である.

Fig. 6—8. 封入体内部のウイルス粒子の拡大像である.

Fig. 6. density の高い方形, 楕円形をした成熟ウイルス粒子と, 各種発育段階にあるウイルス粒子(a, b, c,)がみられる.

(**Fig. 7.** Fig. 6. と同じ所見で図の上方に圧排され変形して, 鎌状をなした核が認められる.

Fig. 8. 輪状を呈した隔壁の像がみられ, 細胞の周辺部の原形質内にいろいろの段階をした未成熟のウイルス粒子がみられる.

Fig. 9. 更に拡大した像で, 粒子内部には“かんぬき”様の構造も認められる.

第1図 Molluscum contagiosum virus の精製標本の電顕像

第2図 Molluscum contagiosum virus の精製標本の電顕像

第3図 Molluscum contagiosum の超薄切片の電顕像

第4図 Molluscum contagiosum の超薄切片の電顕像

第5図 Molluscum contagiosum の超薄切片の電顕像

第6図 Molluscum contagiosum の超薄切片の電顕像

第7図 Molluscum contagiosum の超薄切片の電顕像

第8図 Molluscum contagiosum の超薄切片の電顕像

第9図 Molluscum contagiosum の超薄切片の電顕像