チクングニアウイルスに感染したヒトスジシマカ（オアフ系） 唾液腺におけるウイルス増殖の電子顕微鏡的観察

山西 浩

神戸学院大学栄養学部（〒651-2180 神戸市西区伊川谷町有瀬 518 番）

（受領：2008 年 3 月 26 日；登載決定：2008 年 7 月 28 日）

Electron microscopic observations of virus multiplication in the salivary glands
of *Aedes albopictus* (Oahu strain) infected with chikungunya virus

Hiroshi YAMANISHI

Kobe Gakuin University Faculty of Nutrition, 518 Arise, Ikawadani-cho,
Nishi-ku, Kobe, 651-2180 Japan

(Received: 26 March 2008; Accepted: 28 July 2008)

Abstract: The distribution of viruses at day 14 post-infection were observed in the salivary glands of *Aedes albopictus* (Oahu strain) orally infected with chikungunya virus by electron microscopy. Various virus particles were observed in the basal labyrinth that advances to the inside of the cell with various branches. Newly produced viruses were observed in the basal labyrinth. The virus particles were observed in large numbers in the vacuole around the salivary gland cells. Near the basal labyrinth where virus particles were observed, the accumulation of electron dense-thin particles was recognized. Viral morphogenesis in mosquito salivary glands was similar to that in cell cultures. The virus particles appeared to be formed in the epithelial cells of the salivary glands.

Key words: *Aedes albopictus*, chikungunya virus, salivary gland

はじめに

東 昇 (1966) はチクングニアウイルスの感染培養細胞を電子顕微鏡的に観察して、ウイルスの形態、増殖の場所、増殖の機序などを明らかにしている。ウイルスの大きさは約 50 μm で日本脳炎ウイルスより大きく、形は六角形を呈し、芯部が中空で、ウイルス粒子成熟の場は細胞膜であり、細胞膜の隆起、出芽により粒子が形成されること、細胞外に放出された粒子は規則正しく配列し、みごとな大小の 3 次元的結晶構造を示すことなどを報告している。その後、培養細胞におけるチクングニアウイルスの増殖の電子顕微鏡的観察は Higashi (1973)、松本 (1979) や五十嵐、一ノ瀬 (2003) によって報告されている。

一方筆者は、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*)、リバースシマカ (*Ae. riversi*)、ネッタイイエカ (*Culex fatigans*)、チカイエカ (*Cx. pipiens molestus*)、コガタアカイエカ (*Cx. tritaeniorhynchus*) と 6 系統のヒトスジシマカ (*Ae. albopictus*) でチクングニアウイルス感受性を報告した (山西ら, 1983)。その後、デングウイルスに感受性の高いヒトスジシマカ・オアフ系を入手して、ヒトスジシマカ・兵庫系とチクングニアウイルスとの感受性を比較したところ、ヒトスジシマカ・オアフ系は、チクングニアウイルスにも高い感受性を示した (山西ら, 1984)。更にオアフ系と兵庫系のヒトスジシマカ、ネッタイシマカ、コガタアカイエカでウイルス感染後の中腸、中腸以外の腹部、頭胸部のウイルス価の変動を比較すると共に、ウイルス感受性の高いオアフ系の脳、唾液

Fig. 1. An electron micrograph of a salivary gland cell. CA, intracytoplasmic canaliculi; NU, nucleus; LAB, basal labyrinth; RER, rough surfaced endoplasmic reticula. Virus particles (V) were observed at the edge of the cell. Bar = 5 μ m.

腺、中腸の前部、後部とヘモリンプのウイルス価の変動を調べた (山西, 小西, 1988). これらのデータに基づいてヒトスジシマカ中腸におけるウイルス増殖の電子顕微鏡的観察が報告された (山西, 1999). この報告は, 山西, 小西 (1988) で非常に高いウイルス価を示した唾液腺細胞におけるウイルス増殖過程を分析するため電子顕微鏡で観察したものである.

材料および方法

実験に使用したヒトスジシマカはハワイ大学, Arbovirus Program, Rosen 研究室で累代飼育されていたオフ系統で, 1983 年より筆者の研究室で累代飼育している. チクングニアウイルスは大阪大学微生物病研究所より分与されたアフリカ株で, 乳のみマウス脳で分離後 174 代継代されたものを BHK-21 単層培養細胞で継代している. 蚊のウイルス感染は山西, 小西 (1988) にしたがって行い, およそ 1.3×10^9 PFU/ml のウイルス培養液と馬脱繊維血 1 ml (日研生物医学研究所) を混合させたものを蚊に吸液させて行った. 吸液させた蚊は 26°C で 14 日間飼育後に唾液腺を摘出し, 2% グルタルアルデヒドで前固定し, 2% 四酸化オスミウムで後固定

した. 固定時間はそれぞれ 1 時間とした. アルコール脱水後エポキシ樹脂包埋して超薄切片標本を作製し, 酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色し, 日本電子 JEM-100 S 型透過電子顕微鏡で観察した. 蚊の唾液腺は 3 本の葉 (Lobe) で構成されているが, 今回観察した部分は, Wright がシナハマダラカの唾液腺の構造で示した側葉 (Lateral Lobe) の先端部 (Distal Portion) である (Wright, 1969). なお, 感染実験は 1995 年から 1997 年にかけて神戸大学医学部医動物学講座で行われ, これらの包埋標本は, 山西 (1999) が報告した中腸の感染標本と同じ実験によるものである.

結 果

チクングニアウイルスを経口感染させて 14 日後の感染蚊の唾液腺側葉の先端部分 (Lateral lobe of distal portion) 小葉にみられる細胞では細胞奥まで陥入している原形質陥入部や核の周辺に随所に縦走し発達した粗面小胞体が観察された (Fig. 1). 細胞の周辺部には, 集積したウイルス粒子群がみられた. 細胞質内で縦走している原形質陥入部はリボゾームの付着した粗面小胞体とほぼ同じ幅に観察された.

Fig. 2. An electron micrograph of virus particles in two or three lines of the basal labyrinth (LAB). Double arrows indicate particles of light electron density. RER, rough surfaced endoplasmic reticula; MI, mitochondria; A, electron dense-thin particles in RER. Bar=1 μ m.

Fig. 2 では数本の原形質陥入部がみられ、粗面小胞体は原形質陥入部に沿って、あるいは所々に散在していた。ミトコンドリアも散在しているのが観察された。原形質陥入部には2列あるいは3列に整頓よく並列しているウイルス粒子が観察され、その陥入部の上方や下方でも少数のウイルス粒子が見られた。この原形質陥入部の左側に粗面小胞体の断片が集まり、リボゾームが密集し、それに隣接して電子密度の薄い粒子群が観察された(2重の矢印に示されている付近)。原形質陥入部は、明瞭な二重線で観察される部分と不明瞭な部分があったので、多方向に陥入を形成している状態と推定された。ウイルス粒子は原形質陥入部内で観察されるケースが多かったが、粗面小胞体内にもウイルス状の粒子の存在を認めた(Fig. 2A)。

Fig. 3 には原形質陥入部に多くのウイルス粒子が集積している部位を示した。この部位でも粗面小胞体、リボゾーム、ミトコンドリアが多く観察された。原形質陥入部の中央には約30個のウイルス粒子群がみられた。ウイルス粒子が塊状で観察される部位に向かって、4方向からの陥入が集合しているように観察された。ウイルス粒子の高倍率の観察では出芽直後の痕跡がみられた。このような痕跡のあるウイルス粒子を新生ウイルスと称した。Fig. 3のAには、ウイルス粒子が増えて原形質陥

入部が風船状に膨らんだ状態を示した。楕円形にみられる陥入部の上方の原形質膜は明瞭である。同様に出芽の痕跡のあるウイルス粒子、新生ウイルスが観察された。ウイルス粒子は原形質陥入部内、つまり陥入部の二重膜の内側に観察されたが(Fig. 2)、4個のウイルス粒子が陥入部の外側に隣接している像も認められた(Fig. 3B)。この現象はウイルス粒子成熟の動向をみるうえで興味深い。またFig. 3Cで示したように細胞質内にもウイルス粒子が観察された部位もあり、ウイルス前駆体様の小粒子が馬蹄形に並んでいた。

感染した唾液腺の外縁部では、空胞の周辺部に高密度にウイルス粒子が分布しており、原形質陥入部と粒子の密集している空胞がつながっている部分も認めた(Fig. 4)。それぞれの空胞は細胞の内側に観察されるが、ウイルス粒子群の密集している空胞は細胞質の外側と判定できる。この領域(米印)でもFig. 2で示された薄い電子密度の粒子群が観察された。また周辺部を拡大して観察すると、ウイルス粒子の出芽を認めた(Fig. 4A 矢印)。

チクングニアウイルスに感染した中腸細胞と唾液腺細胞のウイルス粒子の観察される部位で500 μ m²当たりのウイルス粒子数をランダムに5回数えてTable 1にまとめた。ウイルス粒子の密度が、中腸では平均5粒子のところ唾液腺では平均38.8粒子と約8倍の高値で

Fig. 3. An electron micrograph of numerous virus particles in the basal labyrinth (LAB). Arrow indicates a newly budding particle. RER, rough surfaced endoplasmic reticula. Bar=200 nm. A, virus particles in the balloon like basal labyrinth. Bar=200 nm. B, four virus particles observed outside the basal labyrinth (LAB). Arrow indicates LAB. Bar=100 nm. C, numerous small particles (precursor particles) arranged in the shape of a horseshoe (Arrow). Bar=250 nm.

あった。

考 察

松本(1979)は、BHK細胞にチクングニアウイルス(BaH 306)を感染させると、感染直後に細胞質内に感染細胞特有の封入体が形成され、その封入体内部にウイルス前駆体であるヌクレオカプシドが出現し、細胞膜あるいは細胞内空胞膜下へ移動して、出芽によって粒子形成を完了し、成熟ウイルス粒子として放出されることを報告している。細胞内に形成されたヌクレオカプシドに、直径42~45 nmの定型的ビリオンと、桿状粒子および数個のヌクレオカプシドを含む非定型的粒子の3種類あることを明らかにしている。チクングニアウイルスに感染した蚊唾液腺細胞では、封入体と認められる部位は観察出来なかった。また、チクングニアウイルスに感染したVERO細胞では、細胞質が極度に空胞化して、単層の空胞膜は大部分がウイルス前駆体にとりこまれて、狭いルーメンとして観察されると報告されているが(Higashi, 1973), Fig. 3のCの馬蹄形の小粒子はそれによく似た所見であった。

五十嵐, 一ノ瀬(2003)は、BHK21細胞のウイルス感染2日目に内部に成熟ウイルス粒子と小型膜様構造物を含む空胞と内部が空の空胞を観察している。この空胞をウイルスファクトリーと名付けている。そして、チクングニアウイルスに感染したBHK21細胞の観察で、ウイルスファクトリーと称した膜で囲まれた構造物(空胞)内でウイルス粒子形成に必要なすべての過程が進行し、この空胞が細胞外に運ばれた後に破壊されると成熟ウイルス粒子が放出されると推測している。唾液腺細胞においてウイルス粒子が観察された部位の近くに、淡い電子密度の粒子群の集合した領域がみられた(Fig. 2, Fig. 4)。五十嵐, 一ノ瀬(2003)の指摘している培養細胞におけるウイルスファクトリーとは形態的な違いはあるが、唾液腺におけるウイルス形成に関与している部位であるように推定された。

蚊の唾液腺におけるウイルス増殖の電子顕微鏡的研究の報告は多い。Hase et al. (1987)はデングウイルスと日本脳炎ウイルスの細胞内における形成を比較している。デングウイルスは粗面小胞体でヌクレオカプシドが形成され、細胞膜あるいは空胞の膜でエンベロップを獲

Fig. 4. An electron micrograph of numerous virus particles in vacuole C1 and C2. Arrows indicate the connection of the basal labyrinth (LAB) and vacuole. Asterick (*) indicates accumulation of electron dense-thin particles. RER, rough surfaced endoplasmic reticulum; MI, mitochondria; BL, basal lamina. Bar = 500 nm. A, magnification of budding virus (arrows). Bar = 200 nm.

Table 1. Number of virus particles in 500×500 nm of midgut and salivary gland cells.

	Virus particles in 500×500 nm	Mean number of virus particles
Midgut	6, 7, 3, 4, 5	5.0
Salivary gland	46, 36, 33, 34, 45	38.8

得して出芽で形成する。デングウイルスでは粗面小胞体内でウイルス粒子を完成し、空胞に移動して、空胞とともに細胞膜まで移動して細胞外に放出されるという。Fig. 2 の A に示された粗面小胞体内の粒子が、これに該当するのかもしれない。このように培養細胞で観察されたウイルスの増殖過程が一部、蚊の唾液腺細胞におけるウイルス感染でも観察できたことは興味深い。

Janzen et al. (1970) はネッタイシマカにおけるチクングニアウイルスの増殖を観察している。唾液腺で membrane-bound vesicle という状態を報告している。球形の空胞で満ちた小囊の外側にウイルス粒子の前駆体である微小粒子が取り巻いている。Whitfield et al. (1971, 1973) による *Ae. triseriatus* の唾液腺における Eastern equine encephalomyelitis ウイルス像や Cx.

p. pipiens 唾液腺の St. louis encephalitis ウイルス像では、腺細胞内に夥しい数の粒子像や分泌液でのウイルス結晶像が報告されている。空胞でのウイルス形成では、*Ae. triseriatus* の空胞形成は小さく区切られていることと、空胞内一面にウイルス粒子が観察される点などで本報告とやや異なっていた。蚊の唾液腺におけるウイルス像は、蚊の種類、ウイルスの種類によって異なるようである。これらの違いは蚊の種類やその系統のウイルス感受性によるものと考えられるが、特に蚊の唾液腺細胞はアルボウイルスの感受性が高く、増殖・伝播に適応していることが認識された。

山西, 小西 (1988) は、コガタアカイエカ、ネッタイシマカ、兵庫系とオアフ系のヒトスジシマカにチクングニアウイルスを一定の濃度で血液とともに吸血させ、体内におけるウイルスの消長を報告した。中腸、腹部（中腸を取り除いた残部）と頭胸部の3部分に分けて、感染後のウイルス量を測定した。チクングニアウイルス感受性のないコガタアカイエカでは感染後2日目に中腸でウイルスは消滅した。ネッタイシマカでは感染後2日目に、一部で中腸にウイルスが認められた。感受性の低いヒトスジシマカ・兵庫系では、多くの個体で中腸に

ウイルスが存在していたが、感染7日後にはウイルス検出される器官は少なかった。ウイルス感受性の高いヒトスジシマカ・オアフ系では中腸をはじめ腹部、頭胸部でもウイルス増殖がみられた。感染7日目以降に唾液腺を含む頭胸部のウイルス量が 10^6 PFU以上の個体が観察された。中腸と唾液腺における $500\text{ }\mu\text{m}^2$ におけるウイルス粒子数の違いは(Table 1)、増殖ウイルス量を反映した結果と推定される。

蚊の中腸細胞では、芯部の形成→細胞膜の獲得→ウイルス粒子の形成というウイルス出芽の過程が観察された(山西, 1999)。唾液腺細胞ではウイルスが出芽している痕跡は観察できたが、細胞膜を獲得してウイルス粒子を形成する過程は観察できなかった。両細胞においてウイルス増殖プロセスが異なっていることが推定された。また原形質膜陥入部におけるウイルス出芽の痕跡が観察されたことは原形質陥入部内のウイルス粒子は、移動中の粒子と新しく形成された粒子、新生ウイルスを含んでいることが推定された。

ま と め

経口的にチクングニアウイルスに感染させたオアフ系ヒトスジシマカの感染14日後の唾液腺側葉(Lateral Lobe)先端部分(Distal Portion)の細胞を観察した。ウイルス粒子は原形質陥入部で種々の状態で観察された。唾液腺の外縁部では、原形質陥入部と繋がっている空胞にウイルス粒子が高密度の状態で観察された。いずれの場所でも、ウイルス粒子が出芽で形成された痕跡(新生ウイルス)が観察された。原形質陥入部のウイルス粒子群や空胞の高密度ウイルス粒子群の近くの細胞質に、低い電子密度の粒子の集合している領域が観察された。これらはいわゆるウイルスファクトリーと推察された。

謝 辞

1995～1997年に行ったチクングニアウイルスの感染

実験に協力して頂いた元・神戸大学医学部医動物教室松村武男教授及び同実験を共同で進めてきた現・神戸大学医学部保健学科 小西英二准教授に謝意を表します。

文 献

- 東 昇. 1966. いわゆるタイ出血熱の病原体チクングニアウイルスの増殖に関する電子顕微鏡的研究. 東南アジア研究, 4: 88-94.
- Hase, T., Summers, P. L., Eckels, K. H. and Baze, W. B. 1987. Maturation process of Japanese encephalitis virus in cultured mosquito cells in vitro and mouse brain cells in vivo. *Arch. Virol.*, 96: 135-151.
- Higashi, N. 1973. The togavirus family. In: *Ultrastructure of Animal Viruses and Bacteriophages: An Atlas* (ed. Dalton, A. J. and Haguenu, F.), pp. 173-195. Academic Press, New York and London.
- 五十嵐章, 一ノ瀬昭豊. 2003. トガウイルス, 電子顕微鏡ウイルス学(畑中正一編), pp. 102-110, 朝倉書店, 東京.
- Janzen, H. G., Rhodes, A. J. and Doane, F. W. 1970. Chikungunya virus in salivary glands of *Aedes aegypti* (L.): an electron microscope study. *Can. J. Microbiol.*, 16: 581-586.
- 松本 明. 1979. トガウイルス, 電子顕微鏡図説ウイルス学(松本 明, 保阪康弘編), pp. 164-174, 朝倉書店, 東京.
- Whitfield, S. G., Murphy, F. A. and Sudia, W. D. 1971. Eastern equine encephalomyelitis virus: an electron microscopic study of *Aedes triseriatus* (Say) salivary gland infection. *Virology*, 43: 110-122.
- Whitfield, S. G., Murphy, F. A. and Sudia, W. D. 1973. St. Louis encephalitis virus: an ultrastructural study of infection in a mosquito vector. *Virology*, 56: 70-87.
- Wright, K. A. 1969. The anatomy of salivary glands of *Anopheles stephensi* Liston. *Can. J. Zool.*, 47: 579-589.
- 山西 浩. 1999. チクングニアウイルスに感染したヒトスジシマカ(オアフ系)中腸におけるウイルス増殖の電子顕微鏡的観察. 衛生動物, 50: 257-265.
- 山西 浩, 小西英二. 1988. チクングニアウイルス感染蚊の体内におけるウイルスの消長. 衛生動物, 39: 221-228.
- 山西 浩, 小西英二, 松村武男. 1984. 2系統のヒトスジシマカにおけるチクングニアウイルス感受性の比較. 衛生動物, 35: 361-365.
- 山西 浩, 小西英二, 沢山俊子, 松村武男. 1983. 数種の蚊のチクングニアウイルス感受性について. 衛生動物, 34: 229-233.