

# 日本脳炎ウイルス感染 LLCMK 2 細胞の 透過型電子顕微鏡による研究

赤塚 和也・宇野 文夫・宇野 直道・黒木 郁代  
山西 重機・富永 晃・筒井 潔・新居 志郎  
(岡山大学医学部ウイルス学教室)

## 緒 言

著者らは先に LLCMK 2 細胞に日本脳炎ウイルス (JEM) を接種し、細胞変性効果 (CPE) の顕著に出現した細胞について高分解能走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察を行いその所見について報告した<sup>1)</sup>。この研究の中で、感染後球形化直前の細胞内に意義不明の多数の円形の斑点様構造の出現を認めることができた。そこで今回はこの構造の本態を明らかにしたいと考え、感染細胞の透過型電子顕微鏡 (TEM) による研究を行った。この結果について報告する。

## 材料と方法

細胞：当研究室で継代培養中の Flow Laboratories Inc. 由来 LLCMK 2 細胞を日本脳炎ウイルス感染の宿主細胞とし、電顕用試料作製には 50ml 容量のプラスチック瓶に用意した単層培養細胞を使用。増殖培地は 10% 仔牛血清加 MEM であり、ウイルス接種後の維持培地としては 3% 牛胎児血清加 MEM を用いた。

ウイルス：日本脳炎ウイルス中山株を使用。感染マウス脳の PBS 乳剤を作り、その低速遠心上清をウイルス材料とした。

MOI 約 0.5 で LLCMK 2 単層培養細胞上に接種し、数日後 CPE が顕著になったとき電顕観察用試料作製のための細胞採取を行った。

TEM 用試料作製と観察：まず感染細胞を培養容器壁面から剝離し、低速遠心によりペレットを作製。1% グルタルアルデヒド液による前固定 (1 時間) と 1% オスミウム酸に

よる後固定 (1 時間) を行った後、以下常法に従って包埋試料を作製。ダイヤモンドナイフまたはガラスナイフで超薄切片を作製し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛の 2 重染色を行った後、H-700H (日立製作所) で観察。

## 結 果

ウイルス粒子の観察：外径が 45~50nm で一層の膜様構造と 30nm 前後のコアを内包する、すなわち形態学的に成熟ウイルスと考えられる粒子が多数細胞質内の空胞内部に観察された。

写真 1 はゴルジ体と考えられる滑面小胞体内部に散在するこれらの粒子を示す。その内 1 個 (矢印) は 2 個のコアが融合した異常粒子と考えられる。左方の粗面小胞体内部には 2 個の水泡様構造と不規則な線維状構造を認めるがウイルス粒子は存在しない。

写真 2 では、写真 1 と同様の滑面小胞体内部に 2 個の粒子が存在し (小矢印)、また出芽中と思われる 2 個の粒子 (大矢印) が見られる。左側の恐らく粗面小胞体と考えられる内腔の狭い空胞構造の内部には 8~9 個の粒子が存在する。

写真 3 の空胞内部には、5 個のウイルス粒子と水泡様構造が共存して見られる。

以上のようにウイルス粒子は滑面ならびに粗面小胞体内部に認められるほか、核膜腔内にもまた phagosome の内部にも観察されたが、細胞外粒子を認めることは今回実験の感染細胞材料では極めて稀であった。

小胞体と脂肪滴の観察：感染細胞内に高頻

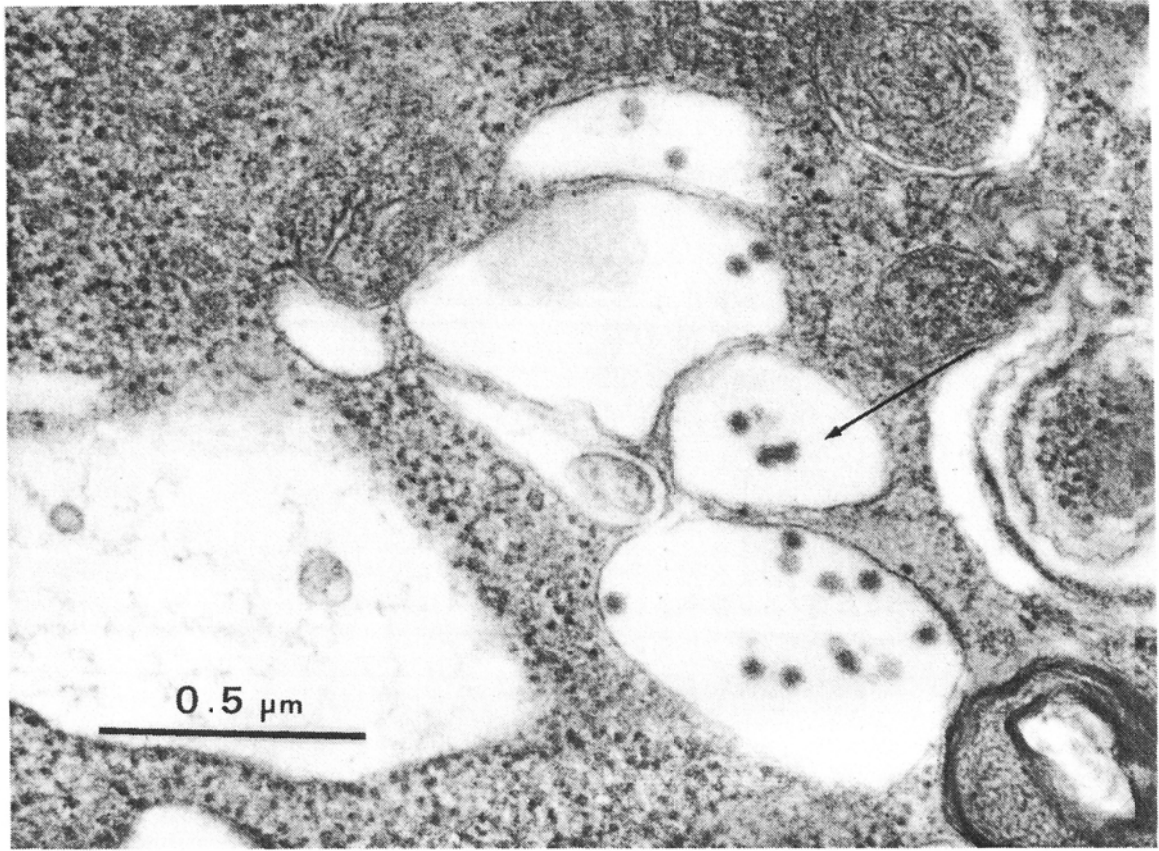


写真1

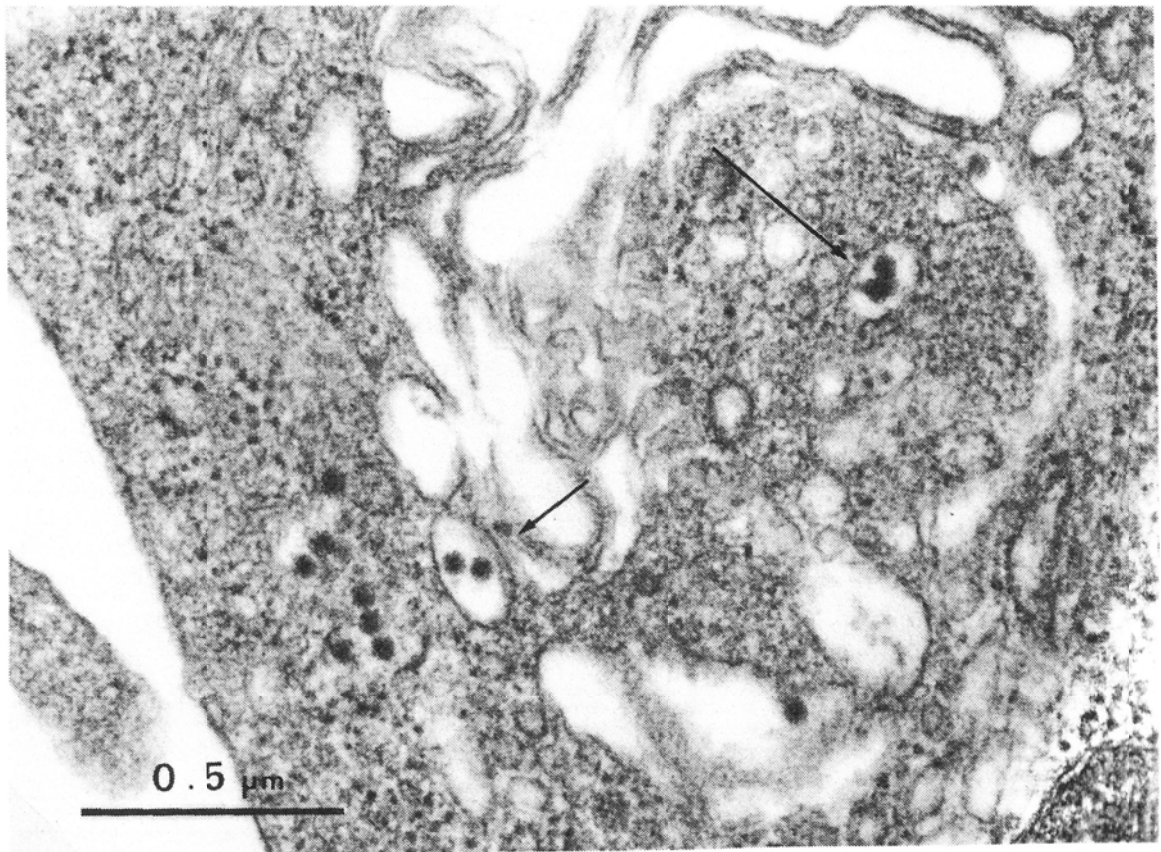


写真2

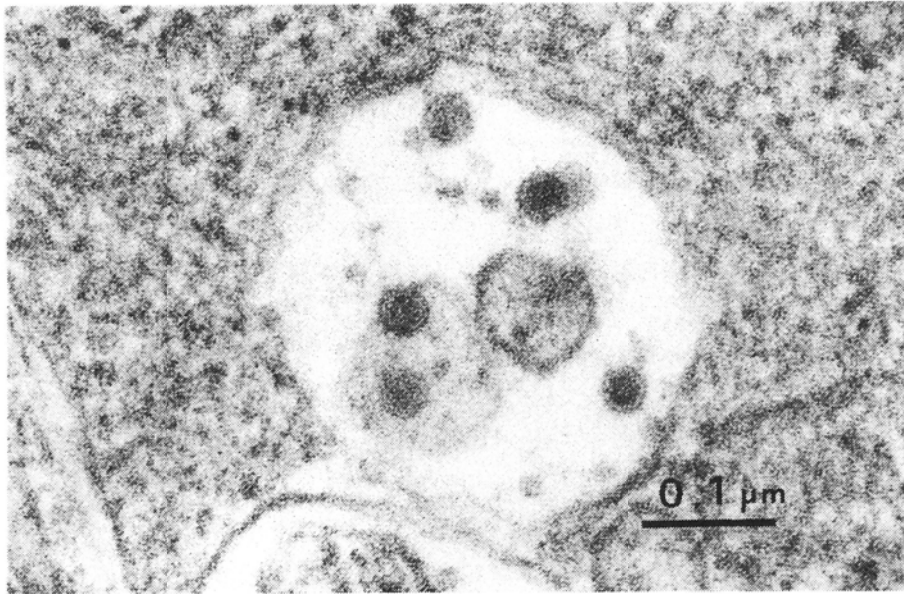


写真3

#### 写真説明

写真1. 日本脳炎ウイルス感染 LLCMK 2 細胞の細胞質部。ゴルジ体と考えられる滑面小胞体内部にウイルス粒子が散在している。矢印は2個の粒子が結合状態にあると考えられる異常型を示す。

写真2. 日本脳炎ウイルス感染 LLCMK 2 細胞の細胞質部。ゴルジ体と考えられる滑面小胞体内部にウイルス粒子（小矢印）が見られる。大矢印はほぼ出芽を完結したと思われる2個の粒子を示す。

写真3. 日本脳炎ウイルス感染 LLCMK 2 細胞の細胞質部。滑面小胞体内部に5個のウイルス粒子と水泡様の膜様構造が観察される。

度で観察される空胞様構造としては、上述したゴルジ体に関連があると思われる滑面の空胞様構造と、粗面小胞体の膨化したと思われる構造の2種がある。そのほか多少の大小はあるが1 $\mu$ m前後の脂肪滴が多数観察された。

### 考 察

去年われわれは、日本脳炎ウイルス感染LLCMK 2細胞のSEM観察によって白濁して見える平均径0.9 $\mu$ mの斑点様構造を認め、その後これが同ウイルス感染BHK細胞においても見られるが、非感染のLLCMK 2細胞ならびにBHK細胞においては極めて稀にしか出現しないことを明らかにした<sup>1)</sup>。そこで今回はこの構造の本態を明らかにする目的で感染LLCMK 2細胞の超薄切片法によるTEM観察を行った。

従来からA群ならびにB群アルボウイルス感染細胞の形態学的特徴点として、多数の空胞様構造の細胞質内出現と、これらの膜構造や細胞表面膜からの出芽によるウイルス粒子の成熟という少なくとも2点が挙げられていたが<sup>2)</sup>、本研究においてもこれを確認することができた。

SEM観察で白濁して見える斑点様構造が何であるかについての一つの可能性は、前報においても述べたように成熟日本脳炎ウイルスを充満した小胞体がexocytosisによって細胞表面に向いつつある状態のものということである<sup>1)</sup>。すなわち電子密度の稍高いウイルスが多数空胞内に含有されているために、2次電子の発生効率を高めているという考えである。

他の可能性は脂肪滴である。先の報告において斑点様構造の平均径が0.9 $\mu$ mであるという成績は<sup>1)</sup>、TEM観察で1 $\mu$ m前後の脂肪滴が多いという事実とよく符合する。また脂肪滴が適度の電子密度を有し、内部構造が均質である点もこの可能性をより支持している。

なお感染LLCMK 2細胞のTEM所見で、ウイルス粒子を内包する空胞構造は多数存在するが粒子を充満している像は比較的少なく、またあったとしても200~300nm径の比較的小型の空胞構造が大部分を占めている事実も先の可能性を不都合にしている。

更にわれわれは過去3年間単純ヘルペスウイルス感染細胞のSEMによる観察を続けてきたが、TEMでウイルス粒子を内包する空胞構造を多数認めているが、SEMで斑点様構造を観察したことがないという事実も脂肪滴の可能性の方を支持している。

今後の課題としては、斑点様構造の本態を更に明確にすることと、この構造のウイルス増殖との因果関係、すなわち直接的なものか副次的なものであるかを追求する必要があると考えられる。

### 結 論

日本脳炎ウイルス中山株感染LLCMK 2細胞について超薄切片法を用いたTEM観察を行い、とくにウイルス粒子の存在状態、細胞内空胞様構造ならびに顆粒構造に着目し、同一感染系のSEM観察で去年報告した斑点様構造との関連について考察した。

その結果ウイルス粒子は滑面ならびに粗面小胞体内部ならびに核膜腔などに認められたが、これら膜構造がウイルス粒子を充満する像は200~300nm大の比較的小型の空胞構造において稀に見られるにすぎず、したがってむしろ脂肪滴がSEM観察上の斑点様構造に対応するものと推論した。その本態については更に検討の必要がある。

### 謝 辞

本研究の細胞培養に関して技術面での御協力を下さった当教室の技官・坂本鈴恵氏に謝致します。

## 文 献

- 1) 宇野直道・宇野文夫・赤塚和也・新居志郎  
・高木光生・合田英雄・久保隆：日本脳炎  
ウイルス感染LLCMK2細胞の走査型電子  
顕微鏡による研究，岡山医学会雑誌，第92  
巻，第1・2号別巻，23-27，1980
- 2) Matsumura, T., Stollar, V. and  
Schlesinger, R. W. : Studies on the  
nature of dengue viruses. V. Structure  
and development of dengue virus in Vero  
cells. *Virology* 46, 344-355, 1971

A transmission electron microscopic study of LLCMK2 cells  
infected with Japanese encephalitis virus

Kazuya Akatsuka, Fumio Uno, Naomichi Uno, Ikuyo Kuroki,

Shigeki Yamanishi, Akira Tominaga, Kiyoshi Tsutsui and Shiro Nii

Department of Virology, Okayama University Medical School, Okayama, Japan

LLCMK2 cells infected with Japanese encephalitis virus were studied by transmission electron microscopy, with a special consideration on the nature of white round granules of 0.4-1.3  $\mu\text{m}$  diameter with a scanning electron microscope.

Virus particles were detected in cytoplasmic vacuoles with smooth-surfaced membranes, in those with rough-surfaced membranes and also in the perinuclear space. Besides the virus-enclosing vacuolar structures many lipid droplets were observed in the cytoplasm of infected cells, although they were few in control non-infected cells. These droplets were supposed to correspond to the white granules observed by a scanning electron microscope.