

## 日本脳炎ウイルスの電子顕微鏡的研究

## 第 1 編

## 日本脳炎ウイルス粒子の形態

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木 潔教授)

大学院学生 六 車 昌 士

〔昭和 42 年 7 月 12 日受稿〕

## 内 容 目 次

第 1 章 緒 言	ii 線維構造
第 2 章 実験材料ならびに実験方法	iii 細胞学的変化
第 1 節 実験材料	第 4 章 総括および考按
1, ウイルスおよび PS 細胞	1, JE ウイルス粒子の形態について
第 2 節 実験方法	2, ウイルス粒子を含む空胞附近の PS 細胞の細胞質内に認められた微細顆粒について
1, 組織培養法	3, JE ウイルス感染細胞の上記微細顆粒附近に認められた線維構造について
2, ウイルスの増殖	第 5 章 結 論
3, 電子顕微鏡による観察	参考文献
第 3 章 実験成績	写真説明
I 正常 PS 細胞	写 真
II JE ウイルス接種後 21.5 時間の PS 細胞	
1, JE ウイルス粒子の形態	
2, 細胞学的所見	
i 細胞質内の微細顆粒	

## 第 1 章 緒 言

日本脳炎 (JE) の病原がウイルスであることは林<sup>1)</sup> (1935) の屍体材料をサルへ接種した実験により最初明らかにされ今日では確認された事実になっている。しかしながら JE ウイルス粒子の性状についてはまだ不明の点が多い。

JE ウイルス粒子の大きさはグラドコール膜を用いた測定によれば 10~30 m $\mu$  であり (Yaoi et al<sup>2)</sup> (1939), 深井 (1962), 野島<sup>3)</sup> (1962), 北岡<sup>4)</sup> (1963) 等により報告された精製ウイルス粒子のシャドウ法による電顕的測定値はこれよりやや大きい値を示しており, かつウイルス粒子は円形であるという。

教室太田ら (1963<sup>5)</sup>), 高橋 (1965<sup>6)</sup>) は JE 感染マウス脳をフルオロカーボンにより処理し粗精製ウイルス粒子を得, これをシャドウ法により電顕的に

観察して JE ウイルス粒子は六角形の外形を有すること, および初生ヒナ赤血球表面に吸着された JE ウイルス粒子は超薄切片上直径 30~40 m $\mu$  であることを示している。又安澄<sup>7)</sup> は JE ウイルス感染マウス脳を超薄切片法により電顕的に観察し, JE ウイルスは核内, 細胞内の空胞内の空胞内等に認められ直径 30~36 m $\mu$  であることを報告し, 東<sup>8)</sup> は JE ウイルス感染 PS 細胞を同じ方法で観察して, 平均直径 38 m $\mu$  であることを報告している。

本研究では井上ら<sup>10)</sup> (1962) により報告された非常に安定した JE ウイルス増殖を示す PS 細胞を利用して JE ウイルスを培養し, ウイルスの経時的増殖の解析とともに, 第 1 編では先ずウイルス粒子の形態を電顕的に観察した成績を報告する。

## 第 2 章 実験材料並びに実験方法

## 第 1 節 実験材料

## ウイルスおよび PS 細胞

実験に使用した JE ウイルスおよび培養細胞は京都大学ウイルス研究所井上幸重助教授より分与されたウイルス向井株および PS 細胞 (野生型) である。PS 細胞は同氏ら<sup>10)11)12)</sup> (1962) により JE ウイルスに高い感受性があり細胞変性効果 (CP) およびブラック法によりウイルスの定量が可能であることを示された豚腎継代細胞である。

## 第 2 節 実験方法

1, 組織培養法: PS 細胞は井上ら<sup>10)11)12)</sup> (1962), の方法に従い 10% 牛血清加 0.5% Lactalbuminehydrolysate Earle 液の培地により 36°C で単層培養をおこなった。細胞継代は通常 7 日目におこなったが, ウイルス接種には発育が盛んであり, 微細構造上まだ細胞変性のほとんど認められない 3~5 日目の細胞を使用した。その時の細胞数は約  $15 \times 10^4$ /ml であった。

## 2, ウイルスの増殖

接種ウイルスには組織培養法によりほぼ全細胞が CP を示した後の培養液を低速遠沈した上清を用い, その時の感染価は約  $10^6$  TCID<sub>50</sub> であった。ウイルスの接種には PS 細胞にウイルス液 1cc を加え, 36°C で 1 時間吸着させた後その液を捨て新しい培養液を加え, 36°C で静置培養をおこなった。CP はウイルス接種後約 24 時間で現われ始め, 48 時間で全層剥離を示した。ローラーチューブを使用し, ウイルスを接種後 5 日目に CP により測定した細胞内ウイルスの 1 段階増殖曲線は Fig. 1 に示す通りである。

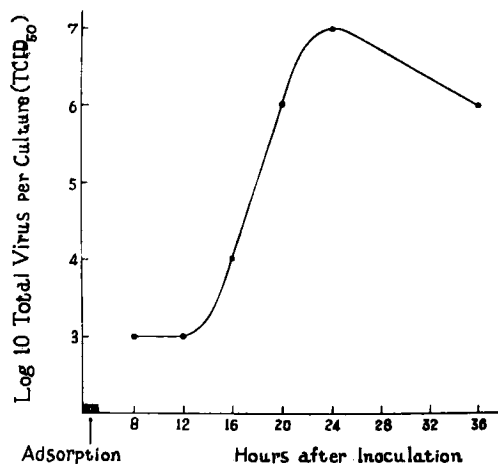


Fig. 1 細胞内 JE ウイルスの 1 段階増殖曲線

## 3, 電子顕微鏡による観察

正常 PS 細胞および最も JE ウイルス増殖が盛んであると考えられる時期であるウイルス接種後 21.5 時間の PS 細胞を観察の対象とした。電顕的観察のためには PS 細胞を 0.02% EDTA 溶液および 0.2% トリプシン溶液の等量混合液により剥離し, 短時間低速遠沈後生じた細胞沈渣を取り出して細切し, Palade 液<sup>13)</sup> により 4°C 40 分間固定後 70%, 90%, 95% および無水アルコールによりそれぞれ 10 分間脱水, メサクリレート (ブチル対メチル: 4 対 1) に包埋, Leitz 製ウルトラマイクロトームで超薄切片とし, ホルンパール支持膜に乗せ, 醋酸ウラール飽和水溶液で 8~10 時間電子染色<sup>14)</sup> 後, 日立 HU 11 型電子顕微鏡により直接倍率 5,000~50,000 で観察した。

## 第 3 章 実験成績

## I. 正常 PS 細胞

培養 3~5 日目の対照 PS 細胞は微細構造上ほとんど変性を示していない。細胞および核はほぼ円形で核小体は明瞭, 細胞質内には桿状の糸粒体, 小胞体および空胞が散在し細胞表面には小数の小突起を認める。なお, ウイルスと考えられるような粒子は認められない。

## II. JE ウイルス接種後 21.5 時間の PS 細胞

## 1, JE ウイルス粒子の形態

この時期の JE ウイルス感染 PS 細胞にはその形態より考えて JE ウイルスと考えられる粒子を多数認める。ウイルス粒子は PS 細胞の細胞質内に存在する空胞構造の内部に電子密度の高い等大の粒子として多数認められ (Fig. 4) ごく少数の粒子は細胞外にも観察される。

時に空胞内部ではウイルス粒子は結晶状に配列してみられる (Fig. 5)。PS 細胞の核内および細胞質基質の内部にはウイルス粒子を認めない。倍率を充分大きくして JE ウイルス粒子の形態を詳細に観察するとウイルス粒子は多くの場合多少角ばつた一方向にやや長い楕円形である。原形が最もよく保存されたと思われるものは Fig. 6, 7 に見られるように一方向にやや長い六角形であり, その最長対角線は平均  $40\mu$ , 最短径は平均  $32\mu$  である。ウイルス粒子の外周はきわめて薄い 2 重の層構成より形成されているように見える外膜によつて包まれ, 外膜の幅は約  $20\text{\AA}$ , その内部には電子密度の低い 1 層の Viroplasm が存在し幅約  $30\text{\AA}$ , 中心部には電子密度

の高い無構造の Nucleoid が存在し長径約 $25\mu$  である。時に Nucleoid の周囲に内膜が存在することを暗示する所見を認める。以上を模式的に図示すると Fig. 2 のようになる。

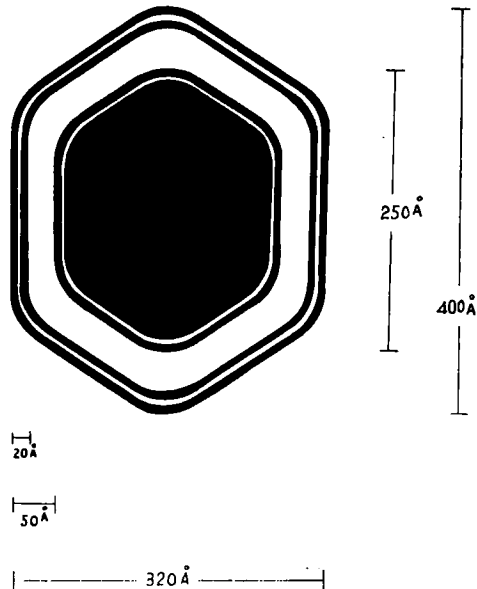


Fig. 2 JE ウイルス粒の構造, 外膜は幅 $20\text{Å}$ で2重膜より成るように見え, Viroplasm は幅 $30\text{Å}$ , 内部の Nucleoid は長径 $250\text{Å}$ で, 周囲には内膜が存在するらしい。

ウイルス粒子の断面が六角形であることは立体的にはウイルス粒子は正多面体恐らく正20面体であると考えられる。ウイルス粒子は先に述べたように空胞内では時に結晶状に配列しているが Fig. 6, 7 にみられるようにウイルス粒子が散在性に空胞内に存在する場合にも2, 3集合して六角形の一辺をもつて互に接着し結晶構造の最小単位と見なすことの出来る集団を形成していることがある。

更に Fig. 8 の下部に示す3個のウイルス粒子はたがいに外膜および Viroplasm の連結により生じた短い細管状構造によつて連つており, 最下部のウイルス粒子は一見尾を有するように見える場合もある。

## 2. 細胞学的所見

### i 細胞質内の微細顆粒

ウイルス粒子を含む空胞が認められる附近の PS 細胞の細胞質内にしばしば多数の円形微細顆粒が観察される。多少の大小不同が認められるが, 大きいものは直径 $180\text{Å}$ , 電子密度が高く構造は認めない

(Fig. 9)。2列に規則正しく配列していることがあり, また空胞壁に接して並ぶこともある。結晶配列は認めない。細胞質内の RNA 顆粒と異なるように思われる。

### ii 線維構造

上記微細顆粒が認められる附近にはほぼ平行に走る大量の線維構造が観察される (Fig. 9), 線維の幅は約 $60\text{Å}$ である。この線維構造はウイルス粒子形成に関係があるものかも知れない。

### iii 細胞学的変化

JE ウイルス接種細胞に現われた非特異的細胞反応と思われるものとして糸粒体の膨化, ミエリン像を思わせる円形の層状構造 (Fig. 10), ゴルジ野附近に見られる Honeycomb 状の構造 (Fig. 11) 等を細胞質内に認める。

核内に時に電子密度の高い小顆粒の小集団を散在性に観察することがある (Fig. 12), これは JE ウイルスと関連がある可能性が強い。

## 第4章 総括及び考按

### 1. JE ウイルス粒子の形態について

JE ウイルス粒子の形は定形的な場合には断面がやや一方向に長い六角形であり, その長径は平均 $40\mu$  である。JE ウイルス粒子が六角形の外形を有することは教室太田ら<sup>5)</sup> (1963) 高橋<sup>6)</sup> (1965) の報告に一致し, これは Crick および Watson<sup>15)</sup> (1956) により理論的に推定されたように, JE ウイルス粒子も立体的には正多面体おそらく正20面体であろうことを示すものと考えられる。

JE ウイルスの直径は深井 (1962) 野島<sup>3)</sup> (1962) 北岡<sup>4)</sup> (1963) 等のシャドウ法による電顕的測定値に一致するようであるが, シャドウ法による測定値は乾燥条件等の影響を受け易く, かなりのばらつきが通常認められるので超薄切片上測定した $40\mu$  の値は基準値を与えるものと思われる。東<sup>9)</sup> (1965) および安澄<sup>7,8)</sup> (1963) もほぼ同様の値を報告している。他の Arbovirus では西部馬脳炎ウイルス $45\sim 48\mu$ <sup>16)</sup>, 黄熱ウイルス $38\pm 5\mu$ <sup>17)</sup>, ベネズエラ馬脳炎 $40\sim 45\mu$ <sup>18)</sup> であり, JE ウイルス粒子の直径も近似の値をとつていることが知られている。

### 2. ウイルス粒子を含む空胞附近の PS 細胞の細胞管内に認められた微細顆粒について

Nunẽz-Montiel 等<sup>19)</sup> は1961年コクサツキウイルス B 5 で感染させた猿腎細胞中に $18\pm 1\mu$ , 顆粒間の平均距離 $24\mu$  で Rosette を形成している顆粒

を認め、従来のウイルス粒子の大きさと比較すると小さいのは固定乾燥上の相異によるものであろうとし、結局細胞内のウイルス結晶形成過程への初段階であろうと考えている。PS 細胞内に認められた顆粒と氏らの観察したものと大きさの点および Rosette 形成を認めた点ではほぼ一致するが、これらを細胞内未熟ウイルス粒子とするためには更に検索が必要であると考えらる。

3, JE ウイルス感染細胞の上記微細顆粒附近に認められた線維構造について

1960年 Howatson<sup>20)</sup>らはポリオーマウイルスの感染を受けたハムスター腎細胞の核内にポリオーマウイルスと同時に線維構造を認め、同年 Granboulan<sup>21)</sup>は AKR 系マウスの胸腺およびリンパ腺の白血病細胞の核内に線維構造の束を認め感染と関係があるものであろうといっている。Bernhard ら<sup>22)</sup>はポリオーマウイルスによつて感染を受けたマウスの線維芽細胞の核内に結晶状に並んだウイルスと同時に線維構造の束をみているが、その意味については触れていない。同様の線維構造を Dourmashkin<sup>23)</sup>はポリオーマウイルス感染細胞核内に著者ら<sup>24)</sup>は Strong A 系マウスに自然発生した乳癌の細胞内に乳癌ウイルス粒子に隣接して認めた。J. Fogh 等<sup>25)</sup>は 1961年ポリオーマウイルスの感染を受けた HeLa 細胞中にポリ

オウイルス粒子の結晶に接して線維構造を認め、その内部にある粒子は形態学的にポリオーマウイルスとはほぼ一致するところより発育段階にある未熟粒子、又は成熟ウイルス粒子の異型と考えており、この線維構造はウイルス粒子と関係が深いことを示している。

従つて感染 PS 細胞でウイルス粒子を有する空胞附近にみた線維構造もウイルスの発育過程と何らかの関係の有する可能性がある。

## 第5章 結 論

PS 細胞を用いて日本脳炎ウイルス 向井株を培養し、日本脳炎ウイルス粒子の形態を超薄切片法により電顕的に追求した。日本脳炎ウイルス粒子は切片上一方向に長い六角形であり、その長径は平均 40 m $\mu$ 、外膜、Viroplasm および中心部の長径 25m $\mu$  の電子密度の高い Nucleoid よりなる像を観察した。

擧筆するに当り御懇篤なる御指導御校閲を賜つた恩師平木潔教授並びに大藤真助教授に又終始御指導を頂いた教室太田善介講師、高橋建次博士に深甚なる謝意を表します。

## 参 考 文 献

- 1) Hayashi, M.: Übertragung des Virus von Encephalitis epidemica auf Affen. Folia psych. et neurol. japonica, 1 : 419, 1935.
- 2) Yaoi, H., K. Kanazawa, M. Murai and S. Arakawa : On the size of Japanese epidemic encephalitis virus as determined by "gradocol" membrane. Jap. J. Exp. Med., 17 : 375, 1939.
- 3) 野島徳吉, 美濃部侑三, 高橋千代, 吉田啓子 : 日本脳炎ウイルス (中山株) の精製について. 最新医学, 17 : 2026, 1962.
- 4) 北岡正見, 西村千昭, 清水昭, 野村正子 : 濃度勾配遠心法による日本脳炎ウイルスの精製. 特に HA, CF 抗原とウイルス粒子の関係について. ウイルス, 13 : 571, 1963.
- 5) 太田善介, 小塚堯, 加原雅教, 高橋建次 : 蛍光抗体ならびに電子顕微鏡による日本脳炎ウイルスの研究. 日本臨床, 21 : 1939, 1963.
- 6) 高橋建次 : 日本脳炎ウイルスの電子顕微鏡及び蛍光抗体法による研究. 岡山医学会雑誌, 77 : 1121, 1965.
- 7) G. Yasuzumi and I. Tsubo : Analysis of the Development of Japanese B Encephalitis Virus with the Electron Microscope. 奈良医学雑誌, 14 : 9, 1963.
- 8) G. Yasuzumi, I. Tsubo, R. Sugihara and Y. Nakai : Analysis of the Development of Japanese B Encephalitis (JBE) Virus. J. Ultrastructure Research, 11 : 213, 1964.
- 9) 東昇 : ウイルス増殖に関する電顕微鏡学的研究. 日本医師会雑誌, 53 : 3, 1965.
- 10) Kanda, Inoue, Y and R. Ogura : Studies on Japanese Bencep halitis virus. III. Propagation and assay of Japanese Bencep halitis virus in a stable line of porcine kidney cells. Virology, 18 : 500, 1962.
- 11) Kato, H. and Y. Kanda Inoue : Studies on Japanese B encephalitis virus. IV. Plaque assay of Japanese B encephalitis virus in a stable line

- of porcine kidney cells. *Virology*, **18** : 500, 1962.
- 12) 井上幸重 : 日本脳炎ウイルス研究の進歩—組織培養法による新しい時代—最新医学, **17** : 1326, 1962.
- 13) Palade, G. E. : A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.*, **95** : 285, 1952.
- 14) Watson, M. L. : Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys and Biochem. Cytology*, **4** : 475, 1958.
- 15) Crick F. H. and J. D. Watson : Structure of small viruses. *Nature*, **177** : 473, 1956.
- 16) Morgan, D., C. Howe and H. M. Rose : Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. V. Western equine encephalitis virus. *J. Exp. Med.*, **113** : 219, 1961.
- 17) Bergold, G. H. and J. Weibel : Demonstration of yellow fever virus with the electron microscope. *Virology*, **17** : 554, 1962.
- 18) Mussgay, M. and J. Weibel : Electron microscopic and biological studies on the growth of Venezuelan equine encephalitis virus in KB cells. *Virology*, **16** : 52, 1962.
- 19) Nùñez-Montiel, O., J. Vitelli-Flores and J. Weibel : Finding of Virus Particles in Cultivated Monkey Kidney Cells infected with Coxsackie Virus B<sub>5</sub>. *Virology*, **14** : 147, 1961.
- 20) Howatson A. F. and J. D. Almeida : An Electron Microscopic Study of Polyoma Virus in Hamster Kidney Cells. *J. Biophys. and Biochem. Cytology*, **7** : 753, 1960.
- 21) 22) W. Bernhard and N. Granboulan : Tumor viruses of murine origin. Ciba Foundation Symposium. Little, Brown and Company. 1962.
- 23) R. R. Dourmashkin : Tumors Induced by Viruses : Ultrastructural studies. Academic Press, New York & London, 1962.
- 24) 六車昌士, 太田善介, 平木潔 : Strong A系マウスに自然発生した乳癌の電子顕微鏡的研究. 第25回日本癌学会総会について発表. 1963.
- 25) J. Fogh : Filamentous Organization of Poliovirus Particles. *Virology*, **14** : 495, 1961.

## 写 真 説 明

- Fig. 3 空胞内を充滿した無数のウイルス粒子(VP). JE ウイルス接種後21.5時間. 倍率 :  $\times 53,000$
- Fig. 4 空胞内ウイルス粒子(VP). 外膜および Nucleoid が明瞭である. JE ウイルス接種後21.5時間. 倍率 :  $\times 140,000$
- Fig. 5 空胞内に生じた JE ウイルス粒子の結晶(VC). 上部の結晶では軸はほぼ直交し, 左下部の結晶では  $60^\circ$  に交叉する. ウイルス接種後21.5時間. 倍率 :  $\times 53,000$
- Fig. 6 ウイルス粒子は外膜, Viropiasm および Nucleoid より成り, 矢印に示す粒子は六角形である. 右の矢印の粒子は外膜が2重に見える. 左の矢印の部では3個の粒子が六角形の一辺によりたがいに接し, 結晶の最小単位を形成する. ウイルス接種後21.5時間. 倍率 :  $\times 170,000$
- Fig. 7 矢印は六角形のウイルス粒子を示す. 右下部に中空粒子が見られる. ウイルス接種後 21.5 時間. 倍率 :  $\times 170,000$
- Fig. 8 下部の3個のウイルス粒子は細管構造(矢印)により連絡する. 写真最下部の粒子は空胞壁より形成されているところで, 立体的には上部の粒子と連つていると思われる. ウイルス接種後 21.5 時間. 倍率 :  $\times 170,000$
- Fig. 9 細胞質内には多数の微細顆粒(FG) および大量の線維構造(F)を認める. 矢印は2列に並んだ微細顆粒を示す. ウイルス接種後19時間. 倍率 :  $\times 50,000$
- Fig. 10 細胞質内に現われた糸粒体の膨化ミエリン像(MY)を思わせる円形層状構造を示す. ウイルス接種後21.5時間. 倍率 :  $\times 53,000$
- Fig. 11 細胞質内ゴルジ野附近に認められた Honeycomb 状の構造(HC). ウイルス接種後20時間. 倍率 :  $\times 40,000$
- Fig. 12 核内の小顆粒の集団(G). N : 核小体ウイルス接種後19時間. 倍率 :  $\times 50,000$

Electron Microscopic Study of Japanese Encephalitis Virus  
Part I. A Study on the Ultrastructure of JE Virus

By

Masahito MUGURUMA

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School  
(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

An electron microscopic study was performed on the ultrastructure of the Mukai strain of Japanese encephalitis virus propagated in vitro on PS cells.

PS cells were cultivated in bottles containing 10% calf serum and 0.5% lactalbumin hydrolysate in Earle's balanced solution. Titration of cell-associated virus was estimated by cytopathic effect. At various intervals following infection, the cells were fixed in buffered 1% osmium tetroxide solution, embedded in methacrylates and cut on a Leitz ultramicrotome. After the sections were stained in saturated uranyl acetate solution, they were observed in the Hitachi type HU11 electron microscope.

It is suggested that the JE virus particle is hexagonal in shape and approximately 40  $\mu$  in the longest diameter, it is composed of an outer membrane 20  $\text{A}^\circ$  thick viroplasm 30  $\text{A}^\circ$  thick, and an electron dense nucleoid 25  $\mu$  in diameter.

---

