

氏 名	田 邊 清 勝
	た な べ き よ かつ
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医 博 第 536 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研 究 科・専 攻	医 学 研 究 科 病 理 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Characterization of Multi-Layered Membrane Generated by Rabies Virus (ネグリ小体内に出現する多層膜構造の性質)

論文調査委員 教授 植竹久雄 教授 徳田正夫 教授 松本清一

論 文 内 容 の 要 旨

要約：1. 狂犬病ウイルス増殖の電顕観察中，細胞の培養温度を 31℃ に下げると封入体（ウイルス RNA-蛋白の集積）に限局して，多層膜構造物が多数出現する事を観察し，その性質を調べた。

2. 多層膜は電子密度の濃い薄膜と淡く幅広い層の交互排列からなる。その形態的性状はウイルス粒子の膜及びスパイク層の切片像によく似ている。

3. 細胞を破碎して部分的に精製した多層膜はゲル泳動によってウイルス G たん白及び M₂ たん白を含んでいる事が示唆された。

4. フェリチン免疫電顕観察によって，多層膜は，G 及び M₂ 蛋白を含む事が証明された。

目的：Rhabdovirus 群の形態形成の大筋は形態学的には略明かになったが，ウイルス増殖后期の被膜機構には未知の問題が多い。Hummeler (1967) は狂犬病ウイルス感染の后期に 2～3 層の膜が封入体内に出現する事を報告したが，その本態を探る方法がない。之と同じ構造の多層膜が多量に得られたので，これがウイルス増殖に伴う二次的変性物か，ウイルス形成に関連ある特異構造であるかどうかを検討した。

材料と方法

ウイルス：狂犬病ウイルス (HEP 株)

細胞：単層培養 BHK 細胞

細胞内多層膜分離法：10⁹⁻¹⁰ 個の細胞を破碎，洗滌を繰返し，最終的には 33, 32, 31, 30% の蔗糖液の discontinuous gradient で 64,000 g 140 分の遠心沈澱を行い，各層間に生じたバンドを集め，別々に超薄切片として電顕によって調べた。

免疫電子顕微鏡：多層膜沈渣をフォルマリンで固定后，フェリチン抗体間接法で処理し観察した。免疫血清は 4 つのウイルス主要たん白 (G, N, M₁, M₂) に対する抗血清 (家兎) からグロブリン分画を調製した。

成績：(1)ウイルス感染后 48 時間培養温度を 31℃ に下げると 3 層膜が僅か許り感染細胞の 1% に認め得た

ものが、10～20層の膜が封入体内部に多数出現し、その頻度は感染細胞の60%以上となる。

(2) 5 nm の濃い膜と 8 nm の淡い層とが交互に平行に排列し、産生されるウイルス粒子及び既存の細胞質内膜と形態上の繋りは認められない。

(3) 多層膜分離では30%、31%蔗糖液界面のバンドに最も多量得られたが、ゴルジ膜破片もあって純品は未だ得られない。フェリチン抗体法を試みるに十分な分離と判断した。

(4) 分離多層膜について行ったポリペプチド分析 (Laemmli 泳動法) 及び間接免疫電子顕微鏡観察によってG及び M_2 が多層膜に関与している事が明かとなった。

考察：培養温度の下降が感染細胞内に如何なる変化を起し、それが多層膜形成にどう関係するかについては知見は得られていない。

マトリックスたん白としてウイルス表面に露出していない M_2 が多層膜ではGたん白と同側に免疫電顕観察で証明される点が、この構造の差当っての問題点と思はれる。類似所見としてはマウス白血病或いはインフルエンザウイルス感染細胞表面にMたん白が露出している (Nowinski, 1976; Biddison, 1977)。

論文審査の結果の要旨

狂犬病ウイルス HEP 株に感染した BHK-21 細胞の培養温度を 31℃ に下げるとウイルス RNA 蛋白の集積である封入体 (Negri 小体) 内に局限して多層膜構造が出現する所見を電子顕微鏡観察によって得られた。同構造は濃い薄膜と淡く幅広い層の交互排列からなり、形態的に狂犬病ウイルスの膜及びスパイク層の排列に類似する。その本態を知るため、細胞破碎液から分離、精製した多層膜の電気泳動及びフェリチン免疫電顕法により、ウイルスG及び M_2 蛋白の存在が認められた。従ってこの多層膜構造は細胞傷害による非特異的反応産物ではなく、ウイルス形成過程における膜形成が低温環境下で異常に進行した結果生じたと結論された。

以上の成績から、従来狂犬病ウイルス膜に関係あるM蛋白には M_1 と M_2 の二種類があるとする定説に対し、 M_1 は寧ろウイルス内部に局在する別種蛋白である可能性を示唆される。又、マトリックス蛋白としてウイルス表面に露出しない M_2 が多層膜ではG蛋白と同側に証明される所見も、ウイルス芽出における細胞膜の蛋白分布の新しい知見である。

よって、本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。