

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学的研究

東

昇

Studies on the Etiological Agent of the So-called Thai Haemorrhagic Fever, Particularly Associated with the Electron Microscopy of the Multiplication of the Chikungunya Virus in Cell Cultures

by

Noboru HIGASHI

ウイルス性のいわゆるタイ出血熱患者の87%はデング熱ウイルスにより、残り13%はチクングニアウイルスを原因とする (S. B. Halstead ら, 1962¹⁾)。チクングニアウイルスによる疾病がチクングニア病として独立疾病の名を与えられたのは、Tanganyika において最初に認められて (1952~1953) 以来のことで、比較的新しい人のウイルス病である。チクングニアという名称は臨床症状からきたもので激烈な関節痛のために患者が“doubled-up”の姿勢をとるところに由来している。

本病の病原ウイルスが分離されたのは1956年のことで、Ross²⁾により急性患者の血液および野生の蚊から分離された。1958年に Spence らにより A 群アルボウイルスに属することが明らかにされた。³⁾

タイ国においては1962年にかなりの流行があり、毎年散发性の流行を、特に小児に流行している。その病原ウイルスの性状については全く知られていない。著者は1965年8月、タイ国立ウイルス研究所の Tuchinda Prakov 博士、伊藤利根太郎博士らの協力を得て、⁴⁾チクングニアウイルスの培養細胞内増殖様式を電子顕微鏡学的に研究して、ウイルスの大きさ、形、構造、増殖の場所、増殖のメカニズム等を明らかにし得たのでここに報告する。

材 料 と 方 法

供試したウイルスは BaH 306 株で、乳呑みマウスの脳を7代、ハムスター腎細胞を3代通過したものである。培養細胞はサル (タイ国産の Cynomolgus) の腎細胞を2代培養したもので培養2日の細胞をウイルス感染に供した。培養液は2% calf serum を含む YLE, 感染時の培養温度は 37°C であった。

感染15時間を経過すると、細胞変性（CPE）が現れ始め、20時間後には著明となり、30時間を経ると細胞はガラス壁より脱落する。

電子顕微鏡用の感染細胞は CPE 顕著な感染後20時間を経たもので、これをオスミック酸固定後、メタクリル樹脂に包埋した。メタクリル樹脂は今は必ずしも良好な包埋材ではないけれども、現地でこの樹脂以外の包埋材が得られなかったので、専らメタクリル樹脂を使用した。しかし、細胞は別として、ウイルス粒子の構造、増殖のメカニズム等は、写真に示すように、極めて良好な成果を得ることができた。

包埋した感染細胞は Porter-Blum 型超ミクロトームで切り、JEM 6C 電子顕微鏡で観察した。なお切片は鏡検前に鉛-ウラニウムの二重染色を施した。

実 験 成 績

増殖様式、粒子の形、大きさと構造、不完全ウイルス粒子、ウイルス結晶の形成について述べる。

1. チクングニアウイルスの増殖様式

このウイルスは細胞内（細胞質および核質）に“ほとんど全く”といってよい程、現れないという特徴をもっていることが見出された。

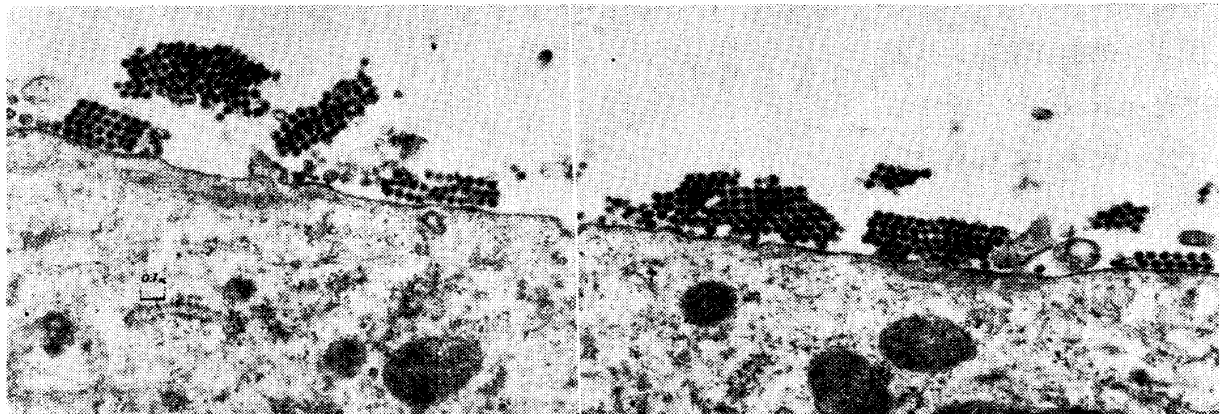


図1 サル腎細胞で増殖した Chikungunya virus. 細胞表層及び細胞外にウイルス粒子集団を認める。集団の多くは2次元結晶構造を示す。なお左端の膜面に不完全ウイルス粒子を認める。細胞質内にはウイルス粒子を認めない。メタクリル樹脂包埋。

図1に示すように、ウイルス粒子はすべて細胞質膜に接して、あるいは細胞外に遊離の状態で存在する。細胞内には全くウイルス粒子を認めることができない。ウイルス粒子のこのようなありかたは、チクングニアウイルスの増殖様式がいわゆる“budding of plasma membrane”であろうことを強く示唆するものである。そこで plasma membrane の隆起部の発見に鏡検の主力を注いだ。

図2はそのような意図に沿った鏡検結果を示すものである。まず図2でも、細胞内にウイル

ス粒子が全然出現していないことを指摘しておきたい。本図の矢印の部に見るように、細胞質膜が隆起している。注目すべきは、隆起した細胞質膜の内部は球状に electron dense であることである。ウイルス粒子の core を示すものと見てよい。換言すれば、粒子は膜面で形成される際、粒子の shell (あるいは limiting membrane) 形成、所定の形、大きさをとるだけでなく、同時に core の形成もおこなわれていることを物語る。

図3は細胞質膜部より脱落した microvilli におけるウイルス粒子の膜面発育を示す。2個の粒子のうち、上方の粒子は発育がかなり進んでいる。しかし、粒子の膜は microvilli の膜と連続している。下方の粒子は図2の矢印のそれよりは発育が進行しているが、同時

に core の形成が見られることに留意したい。この所見および上方の粒子即ち両者（粒子と細胞質膜）の膜は連続していて且つ粒子が core をもつことが見出されたことは、2, 3のガンウイルスの膜面発育との根本的相違を示すものであって興味深い。

図4でも同様のウイルス粒子の膜面発育が認められる。microvilli より数個の粒子、また細胞質の膜面より数個の粒子が発育している。一方細胞質内には全くウイルス粒子を認めない。

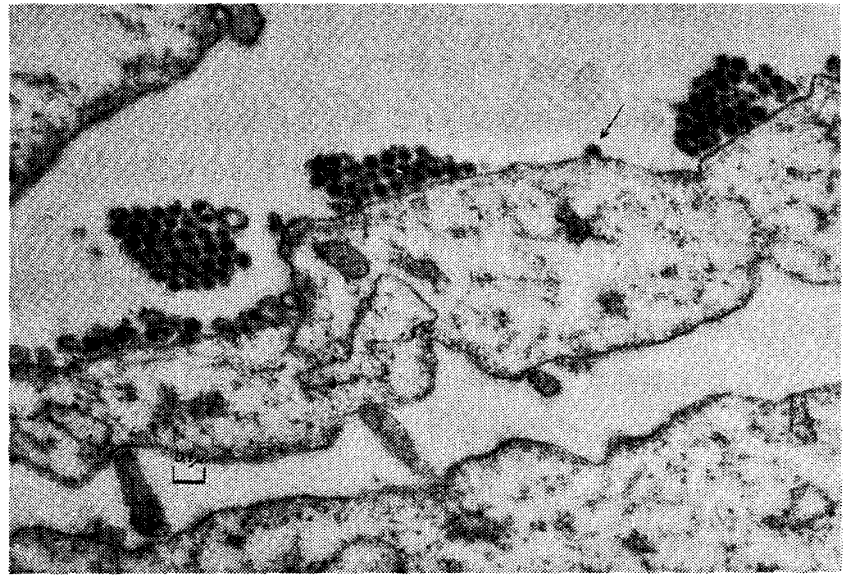


図2 ウイルス粒子の膜面発育 “budding of plasma membrane” を認める (矢印)。

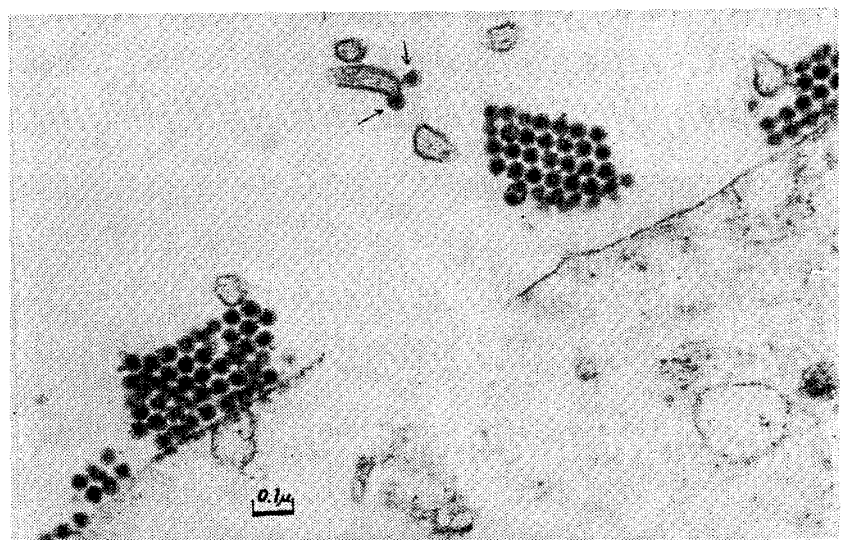


図3 microvilli 膜面 (矢印) でのウイルス粒子の発育を示す。上方の粒子では発芽がかなり進行しているが、粒子の膜と microvilli の膜とは連続性である。

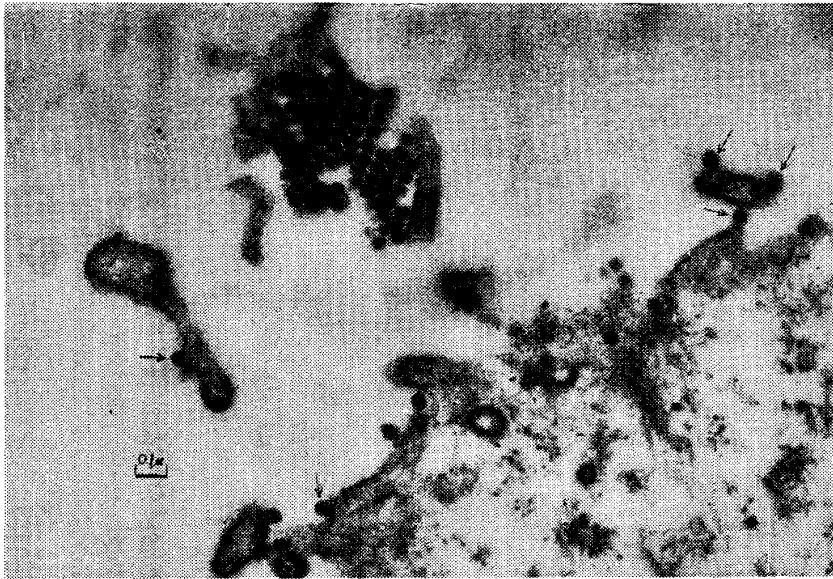


図4 細胞質膜と microvili における粒子の発育を示す (矢印)。

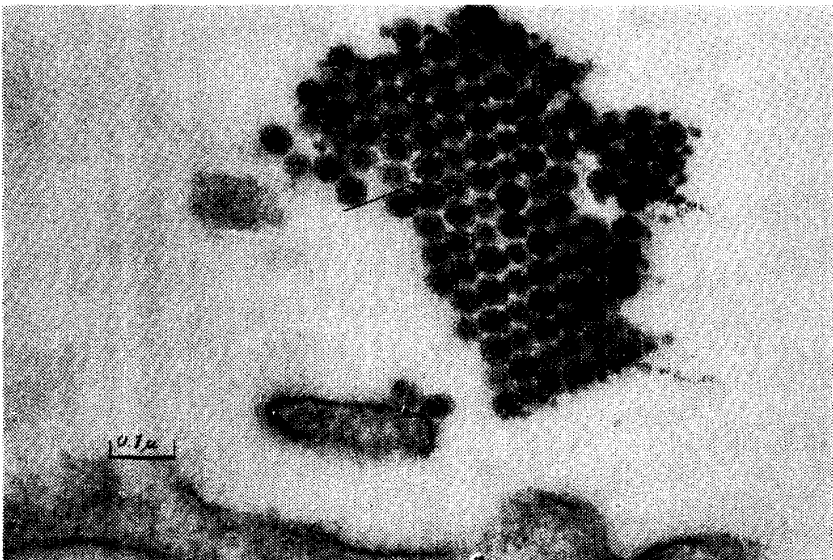


図5 ウイルス粒子の形と構造を示す。矢印は3個のウイルス粒子が共通の limiting membrane に包まれていることを示す。

以上の諸図はいずれもこのウイルスの増殖様式、もっと詳しく言えば、粒子形成の場は膜面であることを強く示すものである。

2. 粒子の形、大きさと構造

オスミック酸固定の粒子の超薄切片で測ったウイルス粒子の大きさは $50\text{m}\mu$ である(図5)。しかも粒子に大きさの分布がないことが見出された。このことはこのウイルスは適当な条件下では結晶をつくるであろうことを強く示唆する。

ウイルス粒子の形は一見球状に見えるがよく見ると六角形を呈する。構造は limiting membrane と core の2成分という単純なものであるが、特記すべきは core は均質でなくて、core の中心部位は電子密度が低いことである。このウイルス独特の構造といつてよい。なおこの図で矢印に

示すように、3個の粒子の limiting membrane が連続していることは興味深い。これは粒子が膜面で形成される際、同一均所で次々につくられて細胞外へ放出されたためであると考えられる。なおこの図で microvili の膜に2個の粒子が接触しているのはやはり膜面発育を完了した結果であろう。偶然にここへ粒子が接触しているのではあるまい。

3. 不完全ウイルス粒子

ウイルス粒子は上述のような大きさと構造とを常に示さない。稀に大きさが $50\text{m}\mu$ より大き

く、同時に構造として内部 core を欠く粒子が出現する。内部 core を欠くことは核酸を含まないと見てよいであろう。図6の膜面に見られる2カ所の粒子集団（矢印）は、すべてこのような性格の粒子である。（なお、この切片では細胞質膜部は切線に切られているので膜は平面を呈する。）このような粒子は不完全ウイルス粒子、未熟ウイルス粒子ないし abortive form のカテゴリーに入るものである。

4. ウイルス結晶の形成
さきにウイルスの大きさ、形、構造の項で、粒子の大きさに分布の存在しないこと、粒子は膜面の同一場所からつぎつぎに細胞外に放出されて連鎖をつくる傾向のあることを述べた。これらのことは、このウイルスが結晶をつくるであろうことを強く示唆するもの

である。図7に細胞間隙に見出された2次元のウイルス結晶を示す。特に画面左側の大きい結晶は、いくつかの結晶面を示し、各結晶面におけるウイルス粒子は実にみごとな規則正しい配列を示している。ただし、矢印の部分の面は明らかに結晶の dislocation を示し、且つこの面の粒子には層のずれがあるために粒子個々の電子密度が均一でない。また○印のついた矢印の示すふたつの面はいわゆる screw dislocation を示している。

このような大きいみごとな結晶が“細胞外”に自然につくられているのはウイルスとして外

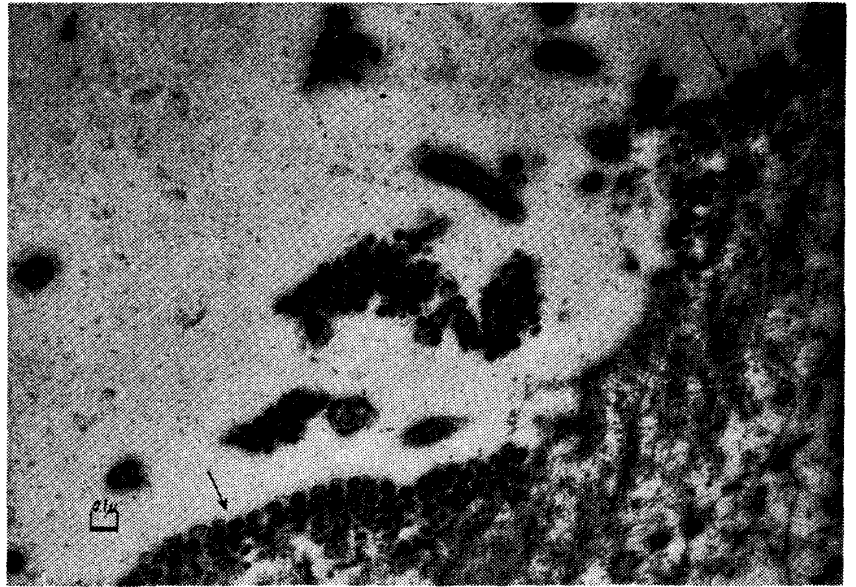


図6 膜面での不完全ウイルス粒子の形成を示す（矢印）。

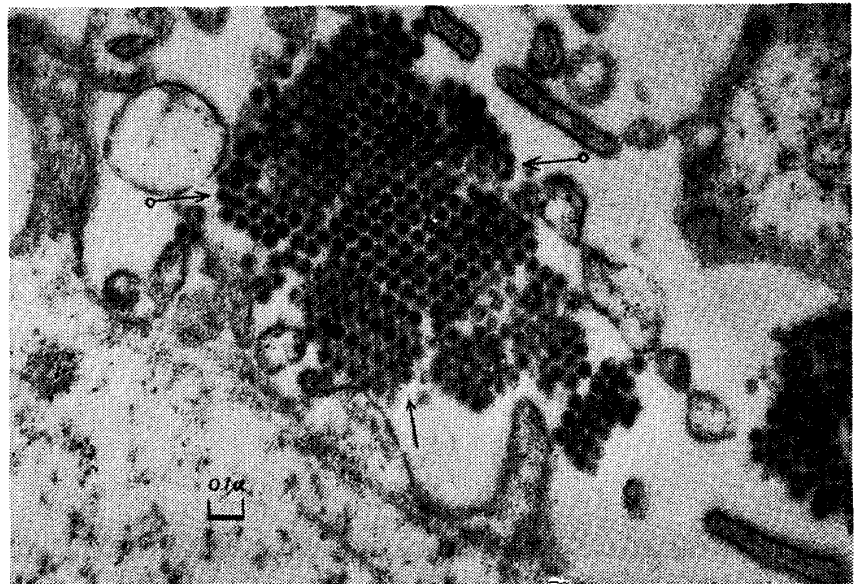


図7 細胞間隙に見出された大きいウイルス結晶。矢印は結晶面の dislocation を、○印のついた矢印は screw dislocation を示す。

に類をみないことで興味深い。

考 察

チクングニアウイルスの超形態学、増殖様式はこれまで全然知られていなかった。著者らは培養細胞内増殖に関する研究から、このウイルスの大きさ、形、構造と増殖メカニズムを明らかにすることができた。

大きさは $50\text{m}\mu$ でアルボウイルス A 群に属するアメリカ西部馬脳炎ウイルスの大きさに相当し、B 群に属する日本脳炎ウイルスの大きさ⁵⁾ ($38\text{m}\mu$) よりは大い。形が六角形を呈することは日本脳炎ウイルスと同様である。その構造は上記 2 種のウイルスと異なって core が中空であるという特徴を示している。

増殖メカニズムで得られた興味深い知見は、その膜面発育において粒子が細胞外に放出される以前に core の形成を示すことである。このことを示すみごとな写真はこれまでアルボウイルスにおいては未だ報告されていない。

一方この知見は、同じく膜面粒子形成をもつ、Bittner の乳ガンウイルス、2, 3 の白血病ウイルスのようないわゆるガンウイルスのそれと本質的に異なるものである。これらのガンウイルスにおいては、粒子の core は粒子が完全に細胞外に放出されてから、細胞外において core がつくられるのである。

このウイルスにおいても既にミクソウイルスで知られているようないわゆる不完全粒子ないし未熟粒子がその発育過程において出現することが見出された。未熟粒子は大きさが大きくて核酸 core をもっていない（図 1 の細胞質膜部の左端に 3 個、図 6 の膜に多数矢印で示すように認めることができる）。

このウイルスのひとつの大きい特徴は細胞外にみごとな大きい結晶をつくることである。これは粒子の大きさに分布のないこと、粒子が膜面の各部においてそれぞれの部位においてつぎつぎに細胞外に放出されることによって結晶形成が容易なのであろう。図 7 に示すようなみごとな 2 次元結晶の電顕写真は、もしこのウイルスを精製して適当な化学的条件を与えれば 3 次元の結晶を試験管内でうることができるであろうことを強く示唆する。

結 論

チクングニアウイルス BaH 306 株をタイ国産 *Cynomolgus* サルの腎細胞に培養し、その感染細胞の電顕的研究から次のような成績を得た。

1. ウイルス粒子形成の場は細胞質膜であり、細胞質膜の隆起、出芽により粒子が形づくられる。
2. 粒子は microvilli の表層部においても形成される。

3. 粒子形成の際に core も同時につくられる。
4. 粒子の大きさは $50\text{m}\mu$, 形は6角形である。core は中空である粒子が多い。
5. 未熟粒子と推定される粒子が細胞表面に配列している。core を欠き（核酸欠除）大きさも上述の値より大きい。
6. 粒子は同一膜面からつぎつぎに細胞外に放出されて連鎖をつくる。
7. その結果として, 細胞外において, 粒子は規則正しく配列しみごとな 大小の2次元結晶構造を示す。

謝 辞

本研究は京都大学東南アジア研究センターおよびタイ国立ウイルス研究所の援助により遂行された。タイ国立ウイルス研究所においては伊藤利根太郎, 緒方隆幸, 清水明諸博士の援助を, また当研究室では松本明博士, 藤原栄一氏の協力を得た。記して以て感謝の意を表する。

文 献

- 1) S. B. Halstead, C. Yamarat, and J. E. Scanlon, "The Thai haemorrhagic fever epidemic of 1962. A preliminary report," *J. of the Med. Ass. of Thailand*. (1962), Vol. 46, No. 8.
- 2) R. W. Ross, "The Newala epidemic. III. The virus; isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic," *J. Hyg.* (1956), Vol. 54, pp. 177—191.
- 3) T. M. Rivers & F. L. Horsfall, *Viral and Rickettsial Infections of Man*. (3rd ed.; Philadelphia: 1959), p. 298.
- 4) 東昇, 伊藤利根太郎, 松本明, 緒方隆幸, 清水明, 藤原栄一「Chikungunya virus の増殖に関する電子顕微鏡学的研究」, 『熱帯医学会報』(1966) 第7巻第1号, p. 41.
- 5) 東昇, 井上幸重, 松本明, 藤原栄一「日本脳炎ウイルスの増殖に関する電子顕微鏡的研究」, 第12回日本ウイルス学会総会1964, 記録 p. 41.