

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

第 1 編

日本脳炎ウイルス精製とウイルス粒子の電子顕微鏡像

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木 深教授)

大 学 院 生 高 橋 建 次

〔昭和40年7月24日受稿〕

内 容 目 次

<p>第1章 緒言</p> <p>第2章 実験材料並びに実験方法</p> <p> 第1節 実験材料</p> <p> 1. ウイルス</p> <p> 2. Fluorocarbon 処理による精製ウイルス液</p> <p> 3. 赤血球浮游液</p> <p> 第2節 実験方法</p> <p> 1. Fluorocarbon 処理液の電顕的観察</p> <p> 2. 赤血球凝集反応の電顕的観察</p> <p>第3章 実験結果</p>	<p>1. Fluorocarbon 処理液の生物学的活性と電顕的観察</p> <p>2. 赤血球凝集反応に於ける凝集塊の電顕的観察</p> <p>第4章 総括並びに考按</p> <p>第5章 結論</p> <p> 写真説明</p> <p> 参考文献</p> <p> 写真</p>
---	---

第1章 緒言

日本脳炎ウイルスが、マウス脳を使用することによつて容易に分離されることが知られて以来、実験的研究は著しく進展し、ついでウイルスの組織培養による分離も可能となつたが、ウイルスの諸性状についてはまだまだ十分に明らかでない。日本脳炎ウイルス粒子の大きさについて矢追¹⁾らは、グラドゴル膜を用いた測定により 10~30 m μ と報告している。日本脳炎ウイルスを精製してウイルスの性状を明らかにする目的で、深井²⁾、野島、北岡³⁾等は感染マウス脳を粗精製した後、密度勾配遠心法によつてウイルスを高度に精製してシャドウ法により電顕的に観察し、日本脳炎ウイルス粒子は球形であり直径は 30~50 m μ 程度と報告した。これらの研究にもかかわらず日本脳炎ウイルス粒子の電顕的研究はまだ不十分であり、その細胞内形成過程については全く未知の状態である。本研究においては日本脳炎ウイルス粒子の形態の一端を明らかにすべく、現在迄に日本脳炎ウイルスについては 1, 2 の研究を除いて

殆んど使用されたことのない Epstein⁴⁾ に準じた Fluorocarbon 処理法をウイルス精製法に採用して、その有用性を検討すると共に Fluorocarbon 処理液及びそれによる赤血球凝集反応の電顕的研究を行ったので、それ等の成績を報告する。

第2章 実験材料並びに実験方法

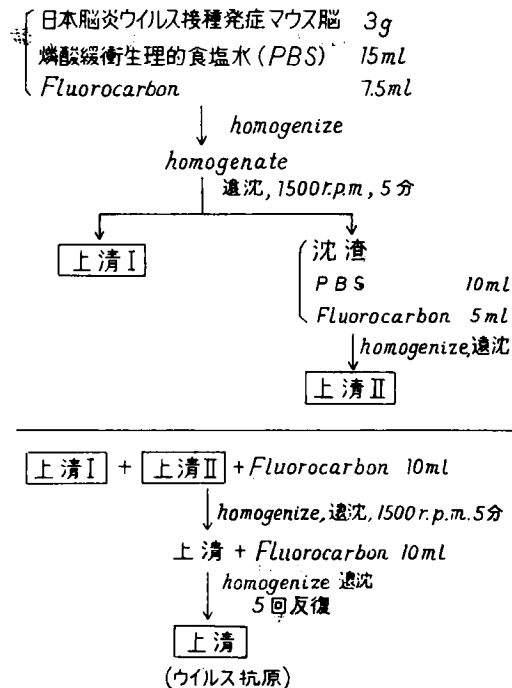
第1節 実験材料

1. ウイルス: 使用した日本脳炎ウイルスは岡山大学平木内科教室に於てマウス脳内接種によつて継代された中山株である。ウイルス株の保存にはマウス脳を-70度凍結保存或は50%グリセリ加生理食塩水に貯えて水室に保存した。マウス脳乳剤を緩衝生理食塩水 (pH. 7.0~8.0) で10倍稀釈し、1,500回転10分間遠沈分離した上清をマウス脳内に接種することによつて継代した。その期間は凍結保存の場合は3ヶ月毎、水室保存の場合は1ヶ月毎とした。ウイルス力価は Read-Muench 法に従つたマウスによる測定では平均 10⁻⁵ LD₅₀ (0.02 ml) であつた。

2. Fluorocarbon 処理による精製ウイルス液：日本脳炎ウイルスを接種し、脳炎を発症せしめたマウスを屠殺し、その脳を無菌的にとり出し、Epstein に準じた Fluorocarbon 処理法（第1表）を行つた。

3. 赤血球浮游液：孵化7日目のヒナより採血した。予め3.8%クエン酸ソーダ水 0.4ml を注射筒に入れておき 1.6ml の血液を採血し、このクエン酸ソーダを含む血液を目盛り遠沈管に入れ遠沈分離した。沈澱した血球にその5~10倍量の生理食塩水を加えて混和し、遠沈を2回行い血球を洗滌した。最後に1,500回転10分間遠心分離し、その沈澱した血球に9倍量の生理食塩水を加え10%赤血球浮游液を行つた。

表1 ウイルス抗原精製—Fluorocarbon 処理法 (Epstein による)



第2節 実験方法

1. Fluorocarbon 処理液の電顕的観察：ホルンバール膜を作り、カーボン補強を行つたメッシュ上に Fluorocarbon 処理液を噴露し、室温にて乾燥し、Cr を蒸着させて電顕観察を行つた。

2. 赤血球凝集反応の電顕的観察：10%ヒナ赤血球浮游液を原液として0.5%浮游液を作つた。凝集反応を行うため試験管にウイルス液 0.5ml を入れ、以下生理食塩水にて2段階階稀釈を行い、これに0.5%赤血球浮游液 0.5ml を加えて 10°~20°C 下

に4時間静置し観察した。使用した材料は8倍稀釈迄凝集反応を認めた。対照として生理食塩水を用いたが全く凝集反応は認めなかつた。試験管底に散乱した赤血球を集め、これを1%オスミウム酸緩衝液⁵⁾にて固定し、アルコール脱水して、メサクリレートに包埋し超薄切片にした後ウラニールアセテート飽和溶液にて電子染色⁶⁾を行い、日立 HU 11型電子顕微鏡で観察した。

第3章 実験結果

1. Fluorocarbon 処理液の生物学的活性と電顕的観察：Fluorocarbon 処理液の生物学的活性を確認するために、マウス脳に対する LD₅₀ (0.02ml) を行い 10⁻²~10⁻³ を得た。対照として正常マウス脳を Fluorocarbon 処理し、接種実験を行つたが、マウスに対する影響は認めない。

この Fluorocarbon 処理液を Cr によるシャドウ法によつて電顕的観察を行つた。シャドウ法では視野一面に無数の直径 60~100 μ m、平均 80 μ m の円形粒子を散在性に認めた（写真1）。蛋白粒子と思われるものは殆んど認めない。直接倍率を50,000倍にし詳細に観察すると、各粒子はやや隆起した外殻、及びやや低くなつた円形の核様体に相当すると思われる部分よりなり、後者は内部に1~数個の点状構造を有した（写真2）。粒子は略円形であるが、かなりの数の粒子は多角形の外形を呈し、原形が最もよく保存されたとと思われるものは、略正六角形の外形を示している。粒子の変形を考慮に入れると、対角線の長さは約 60 μ m、外殻は内外一重の殻を有し、その巾約 10 μ m、中央には円形の核様体があり直径約 40 μ m、その内部には点状構造が認められた（写真3）。稀に外殻を有しない核様体のみから成ると思われる直径約 40 μ m の粒子を認め、内部に同様の点状構造が認められた。対照として正常マウス脳の Fluorocarbon 処理液につき同様にシャドウ法を行い電顕的観察を行つたが、大きさの均一な粒子は認め得なかつた。以上の所見より、認め得た粒子が日本脳炎ウイルスであると考えられる。

2. 赤血球凝集反応に於ける凝集塊の電顕的観察：超薄切片で赤血球表面を観察すると、多数の略円形同太の電子密度の高い円形ないし楕円形粒子が、赤血球表面に密着した像を認めた（写真4, 5, 6）。しかし赤血球表面以外には同様の粒子は認めなかつた。粒子の直径は 30~40 μ m で内部の電子密度の高い核様体、及び前記外殻構造に一致すると思われ

る膜構造を認めた。対照の赤血球を同様に超薄切片としたが、同様の粒子は認められなかつた。以上の所見より赤血球表面の円形粒子は日本脳炎ウイルスと考える。

第4章 総括並びに考按

Fluorocarbon による日本脳炎ウイルスの精製は粗精製ウイルスを得る程度であろうと思われるが、その電顕像がほとんどウイルス粒子と思われる構造のみを明らかにしている点から、かなり純度は高いことが推定せられる。日本脳炎ウイルスの精製液をシャドウ法により観察した深井、野島、北岡等によると、その直径は 30~50 μ 程度であり、形は球形であると言う。私のシャドウ法の値はこの値より大きい、赤血球表面に附着した粒子は直径 30~40 μ で、上記諸氏の結果に一致する。シャドウ法では平均直径 60 μ の値を得たが、この方法による粒子の大きさはその溶液の性状、乾燥による粒子の扁平化、シャドウ法を行う金属及びその条件等によりかなりのばらつきが認められるのが普通であり、多くの場合真の値より大きい値が出る⁷⁾。従つて日本脳炎ウイルスの直径は約 40 μ 程度と推定される。なお後に我々の行つた他の方法によつてもウイルス粒子の大きさは約 40 μ であつた⁸⁾。

Sabin⁹⁾ 等により日本脳炎ウイルスは赤血球凝集

反応を起すことが明らかにされたが、赤血球凝集反応を起す物質がウイルスそのものかどうかに関しては議論がある。私の認めた赤血球表面に附着した粒子は上述の如く大きさ、形態がウイルス粒子に完全に一致すること、又その粒子に膜構造、核様体等が認め得る点から日本脳炎ウイルスそのものが赤血球凝集反応を起すと考えてよいと思われる。

第5章 結論

Fluorocarbon 処理法が日本脳炎ウイルスの精製に有用であることを明らかにし、精製したウイルス粒子及び、赤血球凝集反応を利用し、赤血球表面に吸着されたウイルス粒子を電顕的に観察した。ウイルス粒子は正六角形を有し、外殻は二重膜構造を示し、その内部に核様体に相当する部分を認める。ウイルス粒子の直径は 30~40 μ である。赤血球凝集反応は日本脳炎ウイルス粒子そのものにより起ると考えられる。

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、小塚亮講師、加原雅教博士に深甚なる謝意を表します。

(本論文の要旨は第3回臨床ウイルス談話会及び第37回日本伝染病学会総会に於て発表した。)

参 考 文 献

- 1) 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.
- 2) 深井考之助, 五十嵐章, 藤永 恵, 北野秀武: 蔗糖濃度勾配遠心法による日本脳炎ウイルス血球凝集能の分析, *ウイルス*, 13: 58, 1963.
- 3) Kitaoka, M., and Nishimura, C.: Non infectious hemagglutinin and complement fixing antigen of Japanese B encephalitis, *Virology* 19: 238, 1963.
- 4) Epstein: An investigation in to the purifying effect of a fluorocarbon on vaccinia virus, *Brit. J. Exptl. Path.* 39: 436, 1958.
- 5) Palade, G. Z.: A study of fixation for electron microscopy, *J. Exp. Med.*, 95: 285, 1952.
- 6) Watson M. L.: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 475, 1958.
- 7) Warner, G. H. and R. W. Shleisinger: Morphological and quantitative comparison between infectious and non-infectious forms of Influenza virus, *J. Exp. Med.*, 100: 203, 1954.
- 8) 太田善介, 高橋建次, 鈴木信也, 六車昌士: 日本脳炎ウイルスの PS 細胞内増殖に関する電子顕微鏡的研究, *日本伝染病学会雑誌*, 38: 66, 1964.
- 9) Sabin, A. B. and Busher, E. L.: Unique physicochemical properties of Japanese B encephalitis virus hemagglutinin. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 72: 224, 1953.

写 真 説 明

(写真1～3: Fluorocarbon 処理による精製ウイルス液をシャドウ法で電顕的に観察したもの)

写真1: 多数のウイルス粒子を認める。×17,300

写真2: 各ウイルス粒子には二重の外殻及び点状構造を有する核様体の部分を認める。×70,000

写真3: 写真2の一部拡大。×350,000

(写真4～6: 赤血球凝集反応を起した赤血球を超薄切片法で電顕的に観察したもの)

写真4: 赤血球表面に吸着された多数のウイルス粒子。×59,000

写真5: 同上拡大。115,000

写真6: 同上拡大。×115,000

Study on Japanese B encephalitis virus by means of electron
microscopy and fluorescent antibody method.

1. A study on purification of Japanese B encephalitis virus by
fluorocarbon deproteinization and electron microscopic
observation on the virus particle.

By

Kenji Takahashi

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School.

(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

The fluorocarbon deproteinization technique was demonstrated to be a useful method for the purification of Japanese B encephalitis (JE) virus from infected mouse brain.

Electron microscopic observation on purified virus particles by this method showed numerous particles which were presumed to be JE virus.

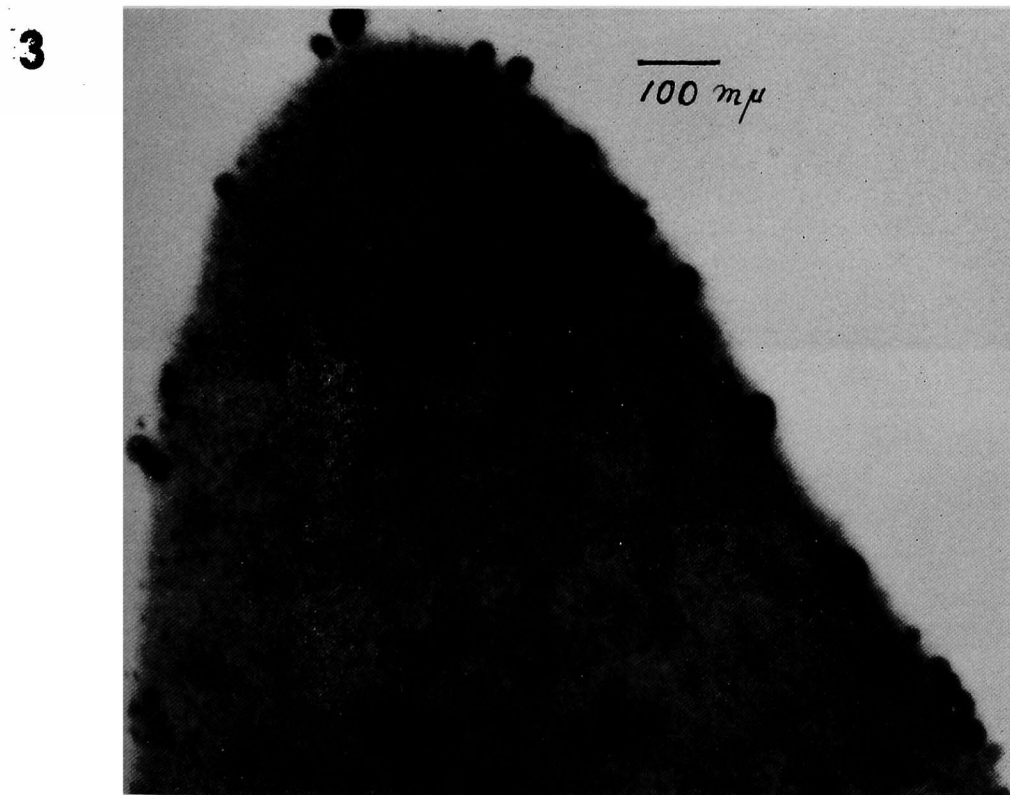
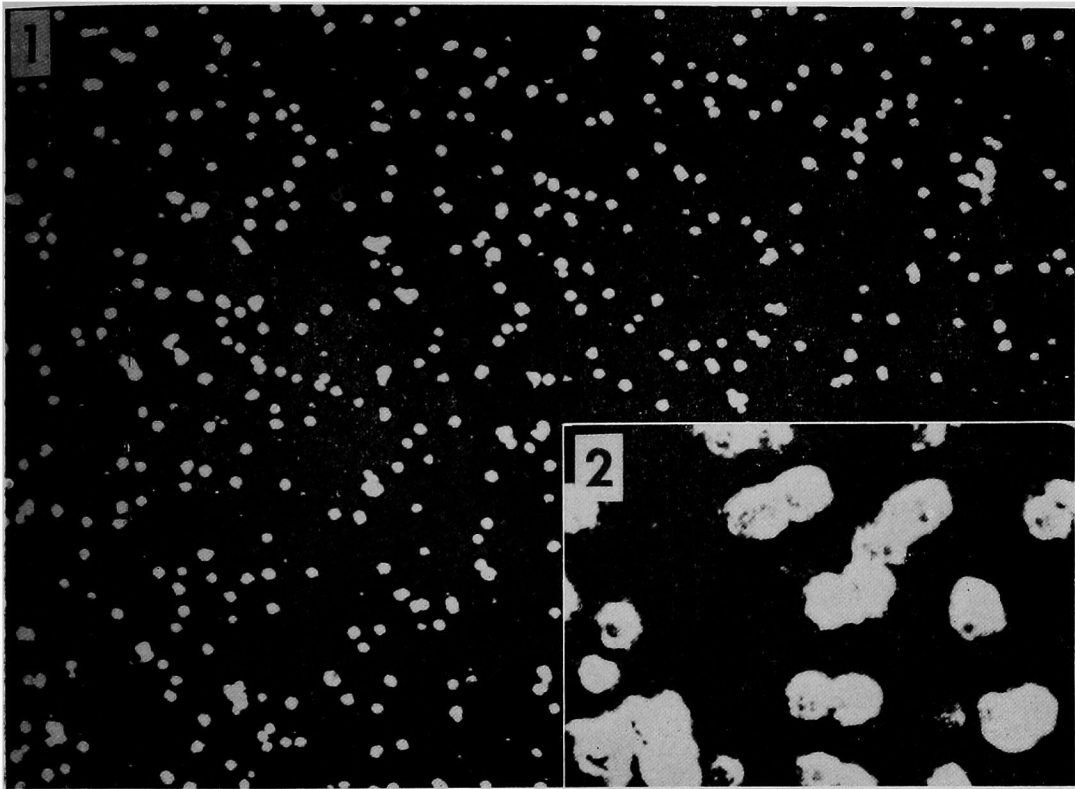
Electron microscopic observation on the surface of the chick red cells which were precipitated with purified virus (hemagglutination) displayed similar particles.

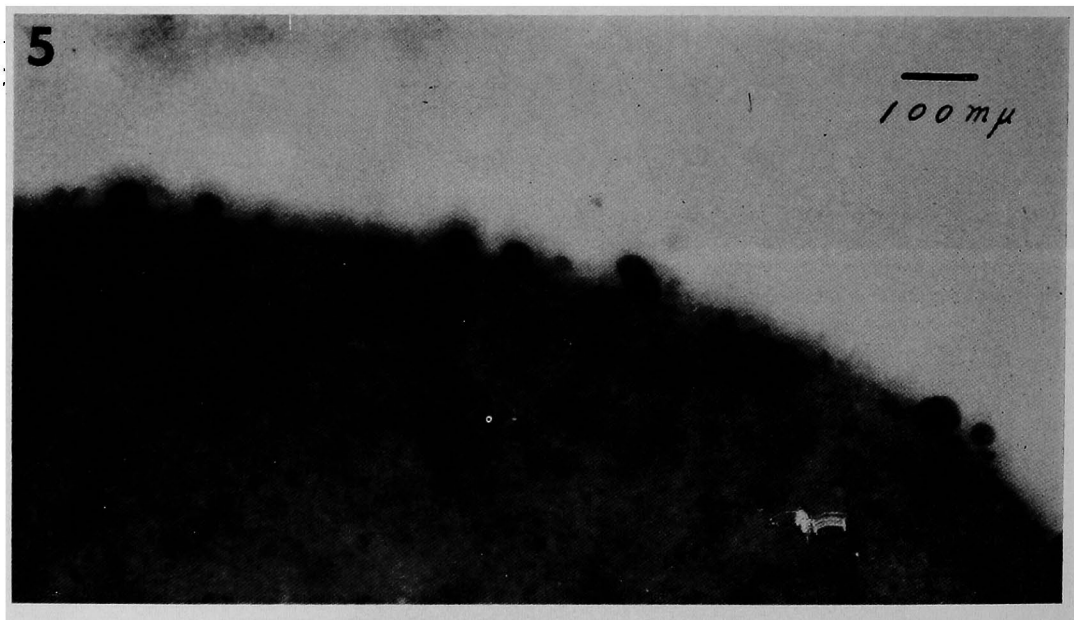
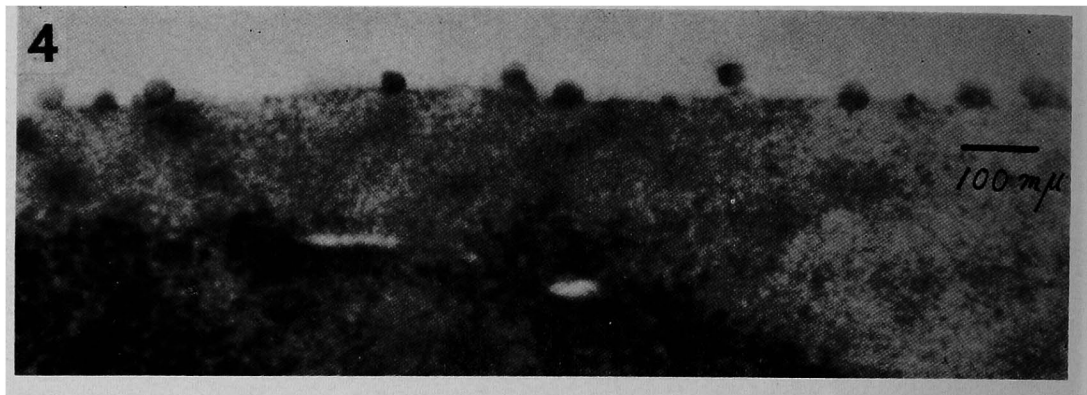
The JE particles were hexagonal in shape, and composed of an outer membranes and a centrally located nucleoid-like structure.

The size of the particle measured 30 to 40 $m\mu$ in diameter.

A substance which cause the hemagglutination was conservable to be the virus particle itself.

高橋論文附図





高橋論文附図

