

ネコカリキウイルスの増殖に関する基礎的研究

感染細胞の超微形態学的所見との
関連性を中心にして

原 元 宣

1981

ネコカリキウイルスの増殖に関する基礎的研究：

感染細胞の超微形態学的所見との
関連性を中心にして

原 元 宣

(麻布大学・家畜微生物学教室)

1981年

目 次

I	序 論	1
II	実験材料と方法	15
III	実験成績	30
	1. ウイルス産生と抗原の出現	30
	1) 感染細胞内ウイルスの産生と細胞外ウイルスの出現	30
	2) ウイルス抗原の出現部位と経時的変化	32
	3) ウイルス蛋白の合成時期	38
	4) DNA依存RNAポリメラーゼ阻害剤であるアクチノマイシンDの影響	45
	5) ヒコルナウイルスRNA合成レベルに作用するH	48

BB (2-(2-hydroxybenzyl)

-benzimidazole) の効果

2. 感染細胞の核の超微形態学的変化 51

1) 核膜外膜の形態学的変化 54

2) 核クロマチンの外側辺縁 56

部への集積と凹凸、及び

分葉化

3. 感染初期の細胞質の構造 59

1) 初期前駆構造の出現と特徴 59

2) 初期前駆構造の発展と膜の関連 63

4. 感染後期の細胞質の構造 69

1) Complex Membranous Body の出現 69

2) ウィルス粒子の出現 72

3) 形態像の経時的変化 74

5. ウィルス感染と細胞小器官 77

1) ミトコンドリアの変化と 77

呼吸の影響

2) 巨大変性ポリゾーム様物	79
3) ウイルスの放出	80
6. ウイルス感染細胞の三次元構造	81

IV 考察 87

1) カリキウイルスの細胞内増殖における基礎的条件の検討	87
------------------------------	----

2) ピコルナウイルス及びカリキウイルスの増殖における膜の関与	91
---------------------------------	----

3) ピコルナウイルスの前駆構造とカリキウイルスの前駆構造の形態学的比較	99
--------------------------------------	----

4) カリキウイルスの前駆構造の探索	111
--------------------	-----

5) カリキウイルスの蛋白合成様式	116
-------------------	-----

V 総括及び結論 119

VI 謝 辞 123

VII 参考文献 124

付図、付表

I 序 論

ネコのウイルス性上部呼吸器病は臨床的に *Feline influenza* [139]、*Feline viral Rhinotracheitis* [149] が挙げられたが、これらの原因ウイルスについては不明であった。1957年、FASTIER がネココロナウイルスを分離し、*Feline influenza* の原因を明らかにした。*Feline viral Rhinotracheitis* については CRANDELL と MAURER が1958年にヘルパスウイルスを分離した。これにより臨床的に区別のむずかしい上部呼吸器病の主要な両疾患を区別することができた[55]。その他、ネコの肺炎の原因にフラミジアが関与し、レスウイルス、マイコプラズマ等も起病性は弱い。呼吸器疾患の合併症に関連していると考えられている[98]。

現在までにネコから分離されたウイルスは POVEY (1976) [145] の報告によれば、*Feline*

ne rhinotracheitis virus (FRV), Feline herpes z. Pseudorabies virus, Feline panleukopenia virus, Feline calicivirus (FCV), Feline reovirus, Feline leukemia virus, Feline fibrosarcoma virus, 及び病原性との関連が不明な Feline syncytical forming virus. 最近 Coronavirus に属することが明らかになつた Feline infectious peritonitis virus が挙げられ、多彩な顔揃いといふ、といふ。

ネコカリキウイルスの一般的宿主はネコであるが、CRANDELL (1960) [42, 43] と SABINE (1970) [107, 156] はチーターから分離した。SPRADBROW (1970) [174], FABRICANT (1971) [54] はネコの尿石症 (Urolithiasis) から分離した。JENSEN (1977) は都会と田舎の感染状況を比較した [83]。

ネコカリキウイルス自然感染例は経鼻感染により軽い鼻炎、結膜炎、口蓋及び舌潰瘍を呈し、病巣は気管支肺炎を生じる [77]。感染

実験では比較的軽く一過性の病状を呈し〔143〕、回復するものが多いが、場合によっては間質性肺炎を伴い死亡する〔77, 109〕。F.P.V.-25 5株といわれる強毒株は、30%の死亡率を呈し全身感染症をなし、明らかに Viremia が証明されている〔84〕。看者はネコ腎初代培養細胞から直接ウイルスを分離した〔69〕。単独では死亡率が低いが、Panleukopenia が加わると82%に死亡率が上昇した〔14〕。

ネコカリキウイルスの感染源は回復した健康なネコが長期にわたってウイルスを排泄し続けることにある。口腔咽頭から2年以上にわたって排泄された例がある〔142, 190, 191, 192〕。

本ウイルスの抗体産生状況に関する報告は少く、OLSEN(1974)はCF抗体、CF阻止抗体、中和抗体、沈降抗体をそれぞれ急性、回復期の血清中に認めた〔133〕。このように実験感染によって低い発症率を示すので感染防御機構の研究、特に細胞性免疫の関与につい

ては検討されていない。一方、抗原分析の結果有効なワクチン開発が行なわれ、みるべき成果がある。沈降反応、CFテストでは一致した抗原性を持ち[71, 185, 186]、中和試験では非常にまちまちな成績が得られた[3, 25, 35, 44, 89, 177, 181]。POVEY(1974)は交叉性が強い点を考慮し一つの血清型の Variants とみなした[144]。この交叉性は人のライノウイルス[38, 39]で試みられた肝粉抹による吸収試験によらず吸収されなかった[26]。KALUNDA(1975)[88]は非常に強い交叉性を持つ7-9株を発見し、多くの血清型がありワクチン化が難しいとされてきた点を解決し、有効なワクチンを開発した[13, 15, 16, 88, 86, 96, 146, 162, 163]。

ネコ以外の感受性を持った細胞に関し検討が行なわれたが、ライオン、イルカ由来の腎細胞にのみ増殖しえた[42, 101]。ネコ由来の細胞以外に増殖がみられなく、厳密な増殖の実験系の確立の為には、再現性のよい安定し

た細胞が望まれる。著者も一部ネコ以外の細胞を検索したがうまくいかなかった。結局、本研究には主としてネコ腎初代培養細胞を用い、良好な結果を得るに致ったが、さらに詳細な生化学的研究を行なうにはウイルスの順化の進んだ株化細胞を使用することが望ましい。

ネコカリキウイルスの一般的な理化学的性状を著者の成績をもとに表(1)に一括した。ヘルペスウイルスと対照的であり両者の同定は容易である[70]。これ以外にさらに2-(*d*-hydroxybenzyl)-benzimidazole(HBB)、7 β アニン、トリホシン、Sodium deoxycholate(SDC)による感受性[24]、感染性RNAの抽出[108]、DEAE-Dextranによる感染性の上昇[1]、浮上密度[107, 178]の算定、熱、酸の影響[100]、フラックと緩衝液の影響[106]など20年の間に多くの知見が集積されてきた。この間はおもっぱらネコカリキウイルスの成績によるもので占められたが、SM-

ITH(1973)のSan Miguel Sea Lion Virus(SMSV)[168]の発見と人のカリキウイルス感染症の疑いがもたれ、遠い昔の話としてつまされてきた豚のVEVも新たに見直され、カリキウイルスは今日特に注目すべきウイルスとよって来た。

1972年、カリフォルニアの“San Miguel”島で多発したアシカの流産例から豚のVEVと似たウイルスを分離し、既知のピコルナウイルスとは異なっていた。これをSMSVと名付けた[168]。オットセイから分離したウイルスの物理化学的性状は、比重(1.37g/ml)、沈降定数(183S)、RNA分子量(2.6×10^6 daltons)、粒子(12×10^6 daltons)で[160]、免疫学的、電子顕微鏡的研究からも[20]オットセイ由来株とSMSVは一致しており、カリキウイルスのメンバーであることが確認された。AKERS(1974)は、鯨とヒレアシ類の血清が抗体陽性であり、たことを示し[2]、近辺の野性の豚がさらに抗体を保有していることを重視し、

海洋動物から陸上動物へウイルスが伝播されるという新知見を報告した。PRATO〔147〕、SMITH〔169〕及びSAWYER〔159〕らはかつて1932年から1934年において流行しその後消滅した豚のVEVの感染源が生のかぶ肉であった事実を指摘し、SMSVと豚のVEVの関連を主張した。これを支持する事実としてSMSVは豚にVEVと区別のできない水疱を形成することが認められ、野性の羊、豚、キツネ〔148〕、さらにロバ〔171〕が抗体を保有していることを確めた。

SMSVの発見が機会となり、豚のVEV、ネコカリキウイルスの三者の比較がさらに詳細に検討され、同時にコルナウイルスとはかなり異なったウイルスであることがわかってきた。交叉中和試験によって豚のVEVとSMSVは別の群として区別された〔171〕。形態学的及び約 65×10^6 の分子量をもつ単一キャプシドポリペプチドからなるウイルス粒子である点では区別されない。中和で三者は

区別され、ゲル内拡散沈降反応で SMSV と豚の VEV が密接に関係し、ネコカリキウイルスとは関係しない。ウイルス RNA の塩基組成は同じであつたが、ホモロジーテストにおいては上記と同様の傾向を示し、キャポシドペプチドのトリフィン分解ペプチドのマッピングも同様の結果であつた。結論として SMSV と豚の VEV とは非常に似てゐるが、ネコカリキウイルスとはかなり相違するものであつた〔28〕。まもなくして MADELEY (1976)〔11〕、FLEWETT (1976)〔60〕大石 (1977, 私信) らは幼児の嘔吐症状を示す患者糞便の電顕観察から、ネコカリキウイルスと区別のつかない粒子を発見した。さらに SMITH (1978) は SMSV が実験的にサルに水泡を形成させ、人に抗体を産生させる等の人への感染性の可能性を示唆した〔170〕。人のカリキウイルスの実情は全く不明であり、今後直接ウイルスの分離がなされなければならぬが、人のロタウイルスとして知られてゐる "Reo like age-

nt" の例もあり興味ある対象である。

以上のようにかリキウイルスの報告は多いが、かリキウイルスの増殖に関する研究は全く行われておらず、不明のまま残されてきた。これには二つの理由があると思われる。一つは最初に発見された豚のVEVが途中で消滅してしまい、重要なウイルスとして注目されなかったこと、もう一点は、かリキウイルスが最近までコロナウイルスに所属し、ポリオウイルスに代表されるめざましい研究成果の前に隠れ、光が当てられなかったことが挙げられる。そして、SMSVと人のかリキウイルスの発見以来、コロナウイルスとかリキウイルスの分類が見直されるようになり、た。本論文における増殖の研究は常にコロナウイルスと対比させながら行われ、分類学的な意義を持つものである。

コロナウイルスの分類は所属するメンバーが多く問題を含んでいた。"Nanivirus"と呼ばれていたのが、International No-

nomenclature Committee において " Picornavirus " と呼ぶよう提唱されたのは 1962 年であり [7]、ネコカリキウイルス、豚の VEV の記載は、1963 年に SHOEMAKER [165] によつて豚の VEV がヒコルナウイルス群に入れられた。ネコカリキウイルスは 1957 年から 1971 年までネコヒコルナウイルスと呼ばれた [22]。ヒコルナウイルスの分類は多くの変遷を経て長い歴史をもち [40, 67, 99, 183]、カリキウイルスは 1954 年の McClain [16] による豚の VEV の報告以来 20 数年を経過したばかりで、ようやく新しい科に独立させるにたる根拠が示されてきた。ヒコルナウイルスとカリキウイルスの相違点を理解することは両者の増殖態度を比較検討する上で大変参考になるものであった。

最初カリキウイルスがヒコルナウイルスに所属するという分類に疑問を投げかけたのはウイルス粒子の形態学的相違点からで [199] 新しい名称を提案し [5, 185, 198]、1971 年

WILDYはInternational Committee for the Nomenclature of Virusにおいて“Calicivirus”の名称を使用した[132, 194]。BURROUGHS(1974)はさらに新しい科として“Caliciviridae”を提案した[27]。このような分類群の試みと[56, 57, 58, 59]、SMSVの発見が加わり分子生物学的な検討がなされ、次の二つの知見は重要な発見であると同時にカリキウイルスの増殖に関し多くの示唆を与えるものであった。

EHRESMANA(1977)[53]はカリキウイルス感染細胞内には、分子量が 2.6×10^6 daltons(26S)と 1.1×10^6 daltons(26S)の二種類のポリプテール一本鎖RNAが合成されることを示し、ヒコルナウイルスがウイルスRNAの大きさに相当する一本鎖RNAのみを合成する点を考慮し[129]、ヒコルナウイルスよりむしろトガウイルスのAlpha virus に似ているとした。カリキウイルスRNAの3'末端にPoly(A)を持っていることが証明され、この部分

の役割に興味を持たれるが、ポリオウイルスも同様に Poly(A) を持っており、多様な性状を現わしている。感染性の発揮に必要であること [63]、ウィルス RNA の複製に必要なこと [173]、感染性 RF-RNA の Poly(A) は対応する (-) 鎖の 5' 末端の Poly(U) と塩基対をなす [54]。他にも多くの知見があり [8, 37, 51, 97, 129, 155, 195]、他のヒコルサウイルスでも確認されている [21, 110, 126, 141, 172]。

一方、細胞内侵入後に脱殻されたポリオウイルス RNA は膜に結合することが知られており、この Poly(A) が膜と結合するのに関与しているのではないかと考えられる。同様にカリキウイルスの場合も考えれば、カリキウイルスの脱殻後、RNA が膜に結合する可能性を示唆する。しかしその後の RNA の複製、転写の展開の過程には、ポリオウイルスの場合と大きく相違するものと想定される。

BACHRACH (1973) [9] はカリキウイルス粒子

のキャプシド蛋白がただ一種類のポリプロチンからなっていると報告した。ポリオウイルス〔151〕ライノウイルス〔76〕のキャプシド蛋白は4種類の VP_1 、 VP_2 、 VP_3 、 VP_4 、となりそれぞれ蛋白は、 $VP_4 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 1$ の順にmRNAを5'→3'方向に読みとられる。しかもこの蛋白は最初一つの巨大蛋白として合成される〔29, 112, 154, 179〕mRNAから3種の蛋白となり、これはさらに分割され前ビリオンを形成する。それから再度ビリオンのキャプシド蛋白の一つが分けられる〔82〕。この機構をフリーベージ機構というが、カリキウイルスが単一キャプシド蛋白からなるとすれば、フリーベージ機構のようなのは必要がはいように思われる。それ故、ウイルス構成の段階、蛋白合成の翻訳過程においても何らかの相違があるのでははいかと推察される。

しかしながら、これらの知見を考慮に入れた予想に反し、PETERSON(1970)〔137〕とEE(1967)〔196, 197, 198〕らによつてはされたカリ

キウイルスの形態学的な研究は、DALES (1965) [48] によるヒコルナウイルスの報告と充分比較しえず、両者の明瞭な相違点を見い出し得ないまま残されていた。

本論文はカリキウイルスの形態像を把握整理し、ネコカリキウイルスの前駆構造の発見により、独自の増殖様式をとることに最初のものである。

Ⅱ 材料と方法

細胞：実験に使用した細胞は一部をネコの肺の5～6代継代したものを用い、あとは初代のネコの腎臓細胞を使用した。供試ネコはいずれも1週令から4週令のものである。トリプシンにより分散された細胞はトリパンブルーに染められた生細胞を算定し、50～60万/mlの範囲で培養した。増殖培地はEagle M E M (日本社製) を75容、2.95% T P B 10容、Yeast Extract 5容、仔牛血清10%、7.5% NaHCO₃ 1-3容に100単位のペニシリン、ストレプトマイシンを添加して用いた。2日後、古い培養液を交換し、4日後の細胞にウイルスを接種した。本実験を開始した1970年当時、日本においては適当なネコ由来細胞がなく、一部外国で報告があったが、入手が困難なため初代細胞を使用する結果となった。ネコ以外のVero細胞で増殖するという報告もある

が疑問視されており、使用ウイルス株はVero細胞に増殖しなかった。他にHela, He-p-2, L細胞等の使用可能な細胞で増殖の成否を検査したが、増殖を認めるにいたらなかった。それ故に、ネコ腎初代培養細胞を使用する結果となった。実験毎に雑多な初代細胞を使うため、ウイルスの感受性が異なり、ウイルス自体が特定の細胞に順応し均一な増殖力を持つ実験系を得られないうらいがあるため、予備実験を充分行いこの点を補足した。再現性のない実験は除去し、矛盾する結果は再度追試を行い、信頼度を高めるようにした。実験全般において、初代培養の影響はウイルス産生に多少の増減があったが、再現性が良く、本実験の要求している精度を満たす結果を得た。これは経時的な検討を加えるため、3時間4℃の条件でウイルスの吸着をし37℃に復帰させる術式が非常にうまくいった結果ではないかと考えた。

ウイルス：使用されたウイルス株は秋元(1973)によつて分離され、供与を受けたF1V-1株である[3]。クローニングは限界希釈法で2回なされており、ネフ腎によつて11代から17代継代されたものを使用した。作成されたウイルスは -80°C に保存し、実験に際し供された。ウイルス価は $10^{5.5} \sim 10^6$ TCID₅₀/0.1mlになるよう調節された。

ウイルス量の検定法：試験管法のTCID₅₀算定法より精度の良いプラック法を検討し術式の確立を試みた[68]。一応の精度が得られ蛍光抗体法の実験段階ではMOIの算定を行うのに都合がよかったが、反面、操作が容易ではないので、以後のウイルス価の測定にはマイクロプレート法を用いた[84]。本法は開放系で培養を行い、試料を0.1ml細胞に接種するだけであり、簡便かつ経済的で省力的なため広く使用されている。経時的にウイルス産生量を測定するために、3時間 4°C

(A)

吸着時間も設定し、ウイルス液を除き Earle 液で2回洗浄した後、新しい37℃に保温しておいた維持液を加え、この時点を感染後あるいは吸着後の時間として表現するようにした。この程度の処理は全く細胞とウイルス産生に障害を与えることなく、良好な一段増殖の成績を呈した。

蛍光抗体法:

1) ウイルス抗原液の調整: ネコ腎細胞11代継代下1V-1株のMOI = 0.002を接種し吸着1時間後接種液を除去し、Earle液で1回洗った後、血清のかかりにラフトアルブミン加水分解産物2%溶液を3容加えた維持液 (Eagle 76容、2.95% TPB 10容、1% YE 5容、2% LA 3容、抗生物質1容、7.5% NaHCO_3 液、1~2容) を加えて37℃で培養した。培養24時間後、3000 rpm 20分遠心し上清を抗原液とし、-20℃に貯蔵した。ウイルスカ価は 2×10^4 TCID₅₀/ml と多少低かった。

たので類回免疫注射を行、た。

ii) 高度免疫血清の作成：免疫動物にイエウサギを使用した。免疫処理は1群ス匹にウイルス液5mlを腹腔内接種し、他の2匹にアルミフリー4アジユバントを等量添加し腹腔内接種した。5日間隔で4回接種し、最終接種20日後にブースター注射を行、た。ブースター注射5日後全採血した。中和抗体価は各々512～1024倍あ、た。アルミフリー4添加は中和抗体産生に思、た程効果がなかつたが、染色ではアルミフリー4添加の方が良好な結果が得られた。これはあくまでも螢光像からみた主観的たものであ、たが、本実験による観察にはアルミフリー4を添加した群から作成した標識抗体を用いた。

iii) 標識抗体の調整：全採血によつて得た免疫血清をフールし、硫酸塩析によりγ-Gロブリン画分を精製した(図1)。M₁₀₀P B₁₀₀にて透析後、抗体蛋白量1に対してFI T Cを1/100～1/150量の割合で炭酸・重炭酸緩衝液(

0.5 M Na_2CO_3 1 容、0.5 M NaHCO_3 3 容、pH. 9.5) に溶かし、蛋白量が 2% になるように生理食塩水で調節した後、 4°C 6 時間混合攪拌して抗体と FITC を結合させた。これを Sephadex G-25、DEAE セルローズを用い $\text{M}/100$ PBS により、て溶出精製した。この螢光色素標識抗体液にネコ肝アセトン粉末の生理食塩液の遠心沈降物を加え混合攪拌し、1 時間室温に放置し吸収した。再度同様の処理を加え繰り返した後、遠心上清を実験に供した。

iv) 螢光顕微鏡法：タンザフ上の感染培養細胞を PBS で 2 回洗い、乾燥、アセトン固定後標識抗体液をのせ、飽和蒸気下において 37°C / 時間染色した。この標本をオリンパス螢光顕微鏡装置 LS-II にて観察した。

v) ウイルス感染後の経時的細胞像の観察：タンザフ上の培養細胞にウイルス液の 4 段階 ($\text{MOI} : 3, 0.3, 0.03, 0.003$) を各々接種し、 4°C 3 時間の吸着後、維持培地を加え

37℃にて培養した。CPEは無染色のままに判定し、細胞の感染率はギムザ染色後、400倍拡大で観察した細胞数を100とし、蛍光細胞数との比から算出した。蛍光の強さはその程度により4段階(一、十、廿、卅)に区分した〔92, 142〕。

Ⅶ) ネコ高度免疫血清により作成した標識抗体：ウイルスを増殖させた細胞と同種の関係であるネコを免疫し非特異抗体の産生をなるべく抑制するため、培地成分を含まないでウイルス感染細胞を直接抗原にして用いた。感染後5時間の細胞をPTEで剥離し、PBS(一)で3回洗滌し、250ml 角ビン一本につき5mlのPBS(一)に再浮遊させ成ネコ一匹につき上述の接種スケジュール同様腹腔内へ投与した。得られた血清を標識抗体として吸収した最終的標識抗体は8単位のFA価を持っており、1単位を染色に用いた。

代謝阻害剤の応用法：使用薬剤は比較的よ

く常用され、作用点が明確で入手しやすいものを選んだ。使用薬剤は6剤である。アフラノマイシンD (Sigma社) はDNA依存RNA合成阻害剤、コユーロマイシン (Sigma社) は蛋白合成阻害剤、HBB (2-d(hydroxybenzyl)-benzimidazole) (和光社) はヒコルナウイルスのRNAレベルにおける阻害効果を得し、限定された条件下で使用されている。醋酸ヨード (和光社) はミフソウイルス等に応用され、膜のGlycolysisを阻害するので膜の関連性を検討するため〔125〕、又、アンテリニンB (三共社) を膜のステロールと作用するので使用し、 NaN_3 (和光社) はCytochrome Oxidaseの阻害剤として用いた。アフラノマイシンD、コユーロマイシン、醋酸ヨード、 NaN_3 について細胞障害性を示す濃度を検査し、障害性が低くウイルス産生を阻止する濃度を求めた。阻害剤は細胞そのものの代謝を抑制する訳であるから作用を受ける代謝のみが阻止され、他に全く影響を与えず異常

が認められたいという具合にはいかず、例えば蛋白合成を長時間阻止すれば、蛋白を素材とする機能、構造が影響を受け、ひいては細胞全体の生命活動に影響を及ぼすことになり、特定の機能、代謝の阻止が直接的に簡潔にウイルス増殖に影響したと言い切るだけの根拠に欠ける難点がある。しかしながら、少なくとも阻害作用との関連性をつかみ、波及する影響を充分考慮に入れ解釈すれば意味のある結論が得られるものと考ええる。

各薬剤は10倍段階希釈して%血清加維培養地に溶解させマイクロプレートに細胞へ、濃度毎に8個のホールへ加えた。24時間後細胞形態の変化を観察し、障害の有無を検査した。HBBは溶解性が非常に悪く、文献的に使用されている $219 \mu\text{M/ml}$ が一応の目安とされたのでこの濃度のみでネコカリキウイルスの産生効果を検討した。これ以上にはなかなか溶解しなかったもので細胞毒性に関し詳細な検査を行いませんでした。 $219 \mu\text{M/ml}$ の濃度では全

く細胞障害性はなかった。アンホテリシン B は市販のファンギーゾンを用いた。作用が溶血であったのでネコ赤血球を溶血する濃度を測定した。本薬剤は他の薬剤ほど作用機序がわかっておらず、膜の機械的破壊と考えるには無理があるかもしれないが、膜に微小孔を生ずることが確認されており、軽い膜の損傷がウイルス産生にどの程度効果を与えるのかを検討するため溶血の程度を測った。いわゆる合成阻害剤の添加により、ウイルス産生が抑制され、除けば復帰する性質のものとするようである。

電子顕微鏡試料作成法 [72]:

i) 感染細胞: 経時的に P T E によりすばやく剥離した細胞を 3000 rpm 10 分遠心後、沈澱細胞に 3 ~ 4 % の寒天液を 40°C に保温し数滴加え固定し、ブロックのまま固定に移した [128]。

ii) 固定: 前固定液には Karnovsky の 110 ラホ

ル4アルデヒド・グルタールアルデヒド混合固定液を使用した。

固定液の作成法

1. 0.2 M Cacodylate buffer, PH = 7.4

蒸留水 75 ml

Sodium Cacodylate 4.28 gm

0.1 N HCl 5.5 ~ 6.0 mlを加えて。

PH = 7.4 にする。

さらに蒸留水を加え全量を100 mlにする。

2. 2gのパラホル4アルデヒド粉末を60~70℃に加温した25 mlの蒸留水に溶解させスターラでよく攪拌する。白濁した混合液へ、1 N、NaOHを1~3滴、透明になるまで攪拌し徐々に滴下する。冷却し、5 mlの50%グルタールアルデヒドを加え、0.2 Mのカコジレート緩衝液によって全量を50 mlにする。最終PHは7.2 に作り、25mgのCa. Cl₂を加える。後固定には、OsO₄をcacodylate緩衝液に1%溶液として使用した。

I. 固定操作法

(1) 寒天によ、てブロッツにした細胞を Karnovsky 固定液に入れ、軽く洗って堅くた、たらすばやく安全カミソリの刃で 2mm^3 角にし、室温で 3ml の同固定液に 2 時間固定する。一度途中で新しい固定液に移しかえる。

(2) cacodylate 緩衝液で数回洗う。

(3) 1% OsO_4 で $1-2$ 時間室温で固定、途中で新しい液と交換する。

(4) 固定液を除き、cacodylate 緩衝液で数回洗い、酢酸ウラン ($0.5 \sim 2\%$) の水溶液中に 2 時間置く。

II 脱水

(1) 50 、 70 、 80 、 90 、 95% エチルアルコールに 15 分 4°C の条件で各々脱水する。 95% 以降の操作は室温で行う。

III 包埋

(1) II (1) に続いて 15 分 95% エタノールとアセトン ($1:1$)

(2) 95% アセトン 15 分

(3) 99% アセトン 10 分 (2 回)

- (4) 無水アセトン 20分 (3回)
- (5) アセトンとエホン混合 (3 : 1) 60分
- (6) アセトンとエホン混合 (2 : 1) 60分
- (7) アセトンとエホン混合 (1 : 1) 1夜
- (8) アセトンとエホン混合 (1 : 2) 60分
- (9) アセトンとエホン混合 (1 : 3) 60分
- (10) 新鮮なエホン混合に 60分
- (11) セラチンカプセル内へエホン混合中に包埋
- (12) 37°C に 1 日、45°C に 1 日、最終的に 60°C 半日から 1 日かけて重合する。

IV アラルダイト樹脂成分 [72]。

Araldite M	10ml
Araldite 964C	25ml
DPB	0.7 ~ 8 ml
Araldite 964B	10ml

(応研商事 K.K. 製)

加速剤 (Araldite 964B) を最後に入れ 40°C 近くで使用すると粘度が低く使いやすく
 なる。

V 染色

(1) 2% 酢酸ウラン水溶液によって 20 分室温で染色。

(2) 水洗

(3) Reynolds 法原法による硝酸鉛染色 20 分。

(4) 水洗

VI 染色液の作成法

(1) 酢酸ウラン液：蒸留水に酢酸ウランを 2% に溶解し、ろ過して使用する。

(2) Reynolds 法鉛染色液

I 液：硝酸鉛 $Pb(NO_3)_2$ 1.33 g

クエン酸ソーダ $Na_3(C_6H_5O_7) \cdot 2H_2O$

1.76 g

蒸留水

30 ml

II 液：1N NaOH

I 液に II 液 8.0 ml を加えた後、蒸留水を加え全量を 50 ml にする。ほとんど無色透明な液となるが、液が濁っている際には 2,500 ~ 3,000 rpm、15 ~ 20 分遠心して上清を用いる。

Ⅷ ネガティブ染色法

0.01%牛血清アルブミンに5%酢酸アンモニウムを感染細胞ペレットに4~6滴加える。5分後、2%のリンタンブステン酸液4滴を加える。混合液のドロップをグリッド上に乗せる。

Ⅲ 成 績

1. ウィルス産生と抗原の出現

1) 感染細胞内ウィルスの産生と細胞外ウィルスの出現

以後の全般にわたる実験において、完全な感染性ウィルスが細胞内にいつ産生され、終了するのかを知っておき、実験に用いたウィルスと細胞の系が一段増殖をし十分に増殖の実験目的にかなうものであることを検討する必要がある。

実験成績： 30×10^5 PFU/ml のウィルスカ価を持つウィルス液を 5 ml のシャーレに培養したネコ腎初代培養細胞に 0.2 ml ずつ接種し、各々 2 枚ずつ上清と細胞を分け凍結融解 3 回処理後、経時的にカ価を測定した。

感染後 4 時間では CPE は陰性であつたが、細胞内ウィルスはすでに $10^{5.25}$ TCID₅₀/ml に上昇し、以後 16 時間で頂点に達し漸次下降

した。これに対し、上清中には細胞内ウイルスとほぼ平行しながらゆくり放出された(図2)。

小括：細胞内ウイルスは、吸着後4時間目に $10^{5.25}$ TCID₅₀/ml に達しており、16時間後には減少がみられた。この時間的経過とウイルス産生状況から、一段増殖を示す成績が得られた。

初代培養細胞を使用したため、多少のばらつきが予想され、又細胞の出来具合によっても成績が左右されると考えられるが、良好なシート形成がなされた細胞を使用すればかなりそろって一段増殖曲線を描くことが可能であり、満足のいく実験結果が得られた。吸着後2時間以前においては感染性ウイルスは出現せず、したがって暗黒期は吸着後2時間までとみなされる。

2) ウイルス抗原の出現部位と経時的変化

ネコカリキウイルスの蛍光抗体法による抗原の検索は1971年 GILLESPIE [62] によつてなされ、特異蛍光は細胞質内に局在し、核内に認められなかった。本ウイルスは血清型が多いが、標識抗体では共通抗原として認められた一方、ヘルペスウイルス、レオウイルスⅢ型、パンロイコペニアウイルスとは反応しなかった。しかし、経時的に抗原の推移をとらえていなかった。本法によつてネコカリキウイルスの増殖様式を検討するため、蛍光抗体をウサギとネコを免疫して作成し、直接法によつて試験した。ウサギによつて免疫した場合、アルミフリードを添加した結果の方が良好であったので、添加した方法による成績を示した。ウサギとネコの免疫血清から調整した標識抗体は、双方ネコ肝アセトンパウダーによつて非特異蛍光を吸収除去した。

3) ウサギ高度免疫血清から調節した標識抗体を用いた成績

ウイルス感染後の経時的観察：タニガク上の培養細胞にウイルス液の4段階 (M_{OI} : 3, 0.3, 0.03, 0.003 PFU/cell) をそれぞれ接種し、 4°C 3時間の吸着後、維持培地を加え 37°C に培養した。観察は維持培地交換後 (0時間) から24時間培養までのものについて行った。CPEは無染色のまま判定し、細胞感染率はギムザ染色後400倍に拡大し観察した。細胞数を100とし、蛍光細胞数との比から算出した。蛍光の強さはその程度により4段階 (一、十、廿、卅) に区分した。

4°C 、3時間の吸着後、 37°C の培地による加温後、0時間めには全く蛍光が観察されなかった。2時間後に微弱な蛍光が現れた。しかしTFから、蛍光細胞数も非常に少なく、核、細胞質の区別をつけがたく、明らかに蛍光特有の緑色を認めた。感染4時間後、核を除いて細胞質全体が、一部核周囲において局在を明確に示す蛍光が認められた。なかには顆粒状を呈する場合もあった。CPEはこの時点

においてまだ観察されてはいない。M.O.I. 3 における細胞感染率は 14% であった。8 時間後、細胞質の螢光は強くなり、M.O.I. 3、及び 0.3 において C.P.E がみられた。細胞感染率は M.O.I. 3 で 36%、M.O.I. 0.3 で 20%、それ以下に於いて 10% 前後であった。18 時間以後、円形化剥離が激しく、M.O.I. 3 の細胞感染率は、18%、24 時間後に各々 48%、64% に達した。M.O.I. 0.3 では 58% から 74% になって M.O.I. 3 よりも高い感染率を示すが、変化した細胞がガラス壁から液中へ遊離するため、実際には 80% 以上の感染率になると考えられる(図 3、4)。

小括：C.P.E の形成、ウイルスの産生、M.O.I. の増加とともに螢光、細胞感染率の増加が認められた。予備実験であるが、フラック法による感染中心によつて感染率を求めた結果では、M.O.I. 0.15 において 5% の細胞感染率であった。この方法で正確に感染率を求める試みを計画した。初代培養細胞の使用のためであらうと考えられるが、剥離された細胞

が株細胞のように、シート上ですみやかに生
残せば、低値が出るものと解釈し、その後感
染中心による実験は行わなかった。

ネコカリシウイルスは形態学的にポコルナ
ウイルスとは相違するので〔5, 199〕螢光像に
特色がみられるのではなにかと思われたが、
特異螢光は細胞質に限局していた。尾崎〔194〕
らのポリオウイルスの報告にある核内封入体
様の核内螢光は温度条件等を考慮に入れてい
ないが、本実験では認められなかった。経時
的傾向は、BUCKLEY(1955)のポリオウイルス
の結果と一致している〔23〕。

b) ネコをアルミクリーム加抗原で免疫作成
した標識抗体による成績

ウサギで作成した標識抗体による長時間後
に出現した微弱な螢光をさらに検討するため、
非特異螢光が出ないよう細胞と同種の関係に
あるネコを感染細胞を洗滌した後免疫して同
様に実験を行った。作成した染色液はFA価
8単位のものをも1単位にして使用した。すこ

にネッ肝アセトンパウダーで吸収をほどこしたもので非特異螢光は全く認められなかつた (図5, 6-8)。

CPEは4時間後わおかに出現し、5時間からは急速に円形化細胞の形成に移行していった。螢光は3時間まで全く出現せず、4時間めに核以外の細胞質に弱いが鮮明な螢光が見え出された。以後5時間からは様々の螢光像がみられたが、空胞の周囲に存在する螢光は内側にはみられなかつた。橙黄色の自家螢光が散見され、これはLipofuscinの例にみられるものと思われ[91]明らかに緑色螢光と区別された。使用ウイルスに対する抗血清によつて細胞を被つた後、螢光抗体で染色した結果、螢光は認められなかつた。

小括：この結果、ウイルス抗原は4時間目に認め、同時期は感染性ウイルスが産生されており、ウイルス構成蛋白が充分合成され蓄積された結果によるものと解釈される。ウイ

ルス抗原は核に存在せず、細胞質にのみ局在し、空胞の周囲において蛍光は認められるが内部には存在しない。4時間以後も蛍光が増強するので、さらに引続き蛋白合成が持続し抗原蓄積が行われているものと考えられる。5時間以後に蛍光像は様々の形態像を示し、後に顆粒状、線維状も呈する。

3) ウイルス蛋白の合成時期

感染性ウイルスの産生が2時間以後に生じる事、ウイルス抗原が4時間後に検出される事から、いわゆる暗黒期は、吸着後から2時間の間であり、それ以後の2から4時間の期間にウイルス構成成分の合成がほぼ完了し、ウイルス粒子の成熟が行われるものと推察される。そこで、いつごろから正確に蛋白合成が始まり、終了するのかを知るため、間接的に蛋白合成阻害剤を使用した。ウイルス m-RNA が蛋白合成をする段階に抑制剤が影響を与えるのであるから、感染後どれくらいの期間蛋白合成阻害剤を作用させたらウイルスの産生を抑制する効果が現れるのかを検討すれば、合成部位の形成時期を推定できると思われる。一方、蛋白合成の場が生じ、各々の時間毎に産生される蛋白がウイルス粒子へ構成されていく誤であるから、それぞれの段階において阻害剤を作用させて蛋白合成を止めてやれば、それまでに産生された蛋白によつて

ウィルスを形成することになり、ある一定濃度の蛋白量が合成されれば、それ以後の合成の必要はなく、すなわち、蛋白合成が完了した時点においては、阻害剤の影響は全く受けなくなると思われる。

この蛋白合成の開始と終了時期を確認するために、阻害剤としてよく知られているピュエロマイシンを使用した。ピュエロマイシンはポリオウィルスにも応用されており、明らかに作用点を有する薬剤として多用されている。ピュエロマイシン (Puromycin) は化学式から3'末端のアミノアシル化されたセ-RNA群の構造類似体であり、蛋白合成阻害は翻訳の過程において順番にあたるアミノアシル-セRNAを競合的に置き換える。ピュエロマイシンが翻訳を行っているリボゾームに付着する結果ピュエロマイシンと伸びつつあるペプチドとの間に結合が起こり、ペプチジル-ピュエロマイシンとなり、リボゾームから遊離する[95, 188]。ピュエロマイシンの

作用機序がきわめて明確なこと。動物細胞に効果があることから蛋白合成の研究にはよく用いられ、ウイルス学方面でもとり入れられている。

実験成績

ロユーロマイシンの細胞毒性の検討：ロユーロマイシンの適当な濃度を選択するために細胞シートに各濃度に調節した維持培地を加え、24時間作用させた。CPEの現れる程度から薬剤の毒性を検討した。 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ において中程度のCPEが生じ、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度ではCPEがみられなかった。この結果から、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度についてウイルス産生を調べたが、この濃度においてはウイルス増殖に影響を与えなかった(表2、3)。 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ では全くウイルス産生が認められなかった。以上の成績から多少の障害を細胞に与えることを考慮し、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度を用いた以下の実験に供した。

ロユーロマイシンの作用が始まる時期：37

℃にあらかじめ保温しておいた $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度の維持液を 4°C 3 時間の吸着後に捨て、3 回 Earle 液で洗滌し、30 ml ずつ分注した。この時を 0 時間とし、それぞれ 30 分、及び、1、2、3 時間感作させた後、新しい維持液を交換し各時間毎にウイルス量を測定した。1 時間の作用では影響を受けなかったが、2 時間、3 時間の感作により、ウイルス産生が遅れた (図 9)。

実際のウイルス感染状況を次のような条件で感染細胞の電顕観察を行なった。i) ヒューロマイシン、ウイルス双方を加えない対照、(図、10)。散在するポリゾームと微絨毛が明瞭であり障害を受けていない。ii) ヒューロマイシンを添加してはいない感染細胞 (図 11)。激しい変性を受けウイルス粒子が散見される。iii) $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で作用させる時間後除去したもの (図 12、13)。ウイルス結晶の形成と直線状に配列する様子を示す。iv) $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加えそのまま除去しないので 16

時間後観察(図14、15)。これもピューロマイシンの影響は認められず、直線状に配列するウイルスと Complex membranous body を現わし、この濃度では、ウイルス増殖を阻止しない。V) $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のピューロマイシンと作用させ、除去しない(図16-18)。ウイルス粒子は全く検出されない。膜を消失し、空隙を残し細胞全体が変性を呈し、リボゾームが散在する(図、16)。ほかにはある程度粗面小胞体を残すもの(図17)、ミトコンドリアの障害が軽いもの(図18)などがある。このように電顕所見から、ピューロマイシンは $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ において膜系の消失、変性を招くが、短時間の作用であれば、除去後に細胞は代謝阻害から免れウイルス形成に導かれるようである。

ピューロマイシン作用が終了する時期：ウイルス接種を行った細胞へ、0、1、2、3、4、5、6時間毎に $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のピューロマイシンを添加し、24時間後感染価を測定した(

図19)。3時間まで著明な抑制を受け、4時間以後徐々にロューロマイシン作用を脱していった。それ故に、蛋白合成は4時間で急に停止するのではなく、ゆるやかに持続する傾向を示唆すると思われる。

小括：ロューロマイシンの成績から、吸着後のロューロマイシン阻害作用は2時間から始まり、その後3時間または4時間まで阻害が著明に認められる。螢光抗体の成績では、4時間めに螢光が確認され、4時間までにウイルス抗原が蓄積され検出可能となる。ロューロマイシンの阻害作用が認められる期間から蛋白合成阻害作用を脱する時期、すなわち、蛋白合成が終了しつつある時期にウイルス産生と、ウイルス抗原の集積があり、矛盾なく一連の過程が成立する。すなわち2時間の暗黒期、引続いてる時間までの蛋白合成蓄積、4時間後の螢光抗原の出現に致る。ロューロマイシンによる抑制からの脱出は比較的ゆる

く行なわれるので、蛋白合成は3時間ですぐ終了せず、6時間ぐらいまで持続するようである。これらの結果から感染早期に盛んな蛋白合成が行なわれるようである。

4) DNA依存 RNA ポリメラーゼ阻害剤であるアクチノマイシンDの影響

本剤はDNAを有するワクシニアウイルスの形成を阻害し、RNAを有するメングウイルスは阻害しない等、多くのRNAウイルスの産生を阻止しないが、DNAウイルスの産生を阻止するという特異的な阻害効果を持つているため多用されている薬剤である。しかしながら、本薬剤は一般的にRNAウイルスの形成を阻止しないが、同一ウイルスでも異なる細胞を使用したりすると抑制を受けたりする。例えば、ポリオウイルスの複製はHeLa細胞では影響を受けないが、Hep-2、人の羊膜細胞では抑制されたという報告もあり、あまり簡略化しては考えられない[65, 140, 158]。そこで、カリキウイルスが本剤に影響を受けるかどうか検討した。

アクチノマイシンの細胞毒性の検査：ロイロマイシンと同様に、それぞれの濃度のアクチノマイシンを加え、24時間後に細胞の変

性状態を観察した。 $50\mu\text{g/ml}$ から $5\mu\text{g/ml}$ ま
で強い変性を生じ、 $0.5\mu\text{g/ml}$ では中程度、 $0.05\mu\text{g/ml}$ においては全く影響が認められな
かった(表4)。

アフチノマイシンのウイルス産生に及ぼす
影響：ウイルス接種前3時間において $0.5\mu\text{g/ml}$
と $0.05\mu\text{g/ml}$ の濃度を添加し、あらかじめ
培養しておいた。経時的に増殖曲線を比較
した結果、無添加群と一致する増殖態度を示
しアフチノマイシンの影響はみられなかつた
(図20)。

小括：この成績をもつて、直ちにアフチノ
マイシンはカリキウイルス合成に何らの影
響も与えないと結論づけるのは早急かもしれ
ないが、中程度の細胞毒性を示す $0.5\mu\text{g/ml}$ に
おいても無添加群とかわることなく増殖する
ことから、作用点が全くウイルス合成と相違
した場所であるのばらば、細胞への障害その
ものの影響は、これ程までにはウイルス増殖に

影響を及ぼす因子とみなす必要はないように考えられる。これは種々な阻害剤を検査する上で、常に考慮されねばならない事柄であり、え来の薬理作用の障害の結果からさらに惹起される障害作用によつてウイルス抑制が現れる可能性が含まれており、アフラノマイシンの実験から、本実験において検討された薬剤の作用点以外への障害作用に対する疑問を幾分緩和するものと思われる。

5) ヒコルナウイルス RNA 合成レベルに作用する HBB [2-(2-hydroxybenzyl)-benzimidazole] の効果

グアニジンと HBB は双方 RNA 合成レベルに働きヒコルナウイルスの増殖を阻止する。HBB は主にエンテロウイルスを阻止し、アクチノマイシン D とかピューロマイシンのように作用点が明確にされていないが、最近 RNA レベルで作用することが知られている [127]。カリキウイルスがグアニジン、HBB によって阻止されないことは以前報告されたが [24]、作用点が明確にされてきた数少ない有効な薬剤であり、エンテロウイルスと明らかに RNA 合成の段階に相違がある証拠としてさらに追試を行った。

成績：HBB は水に少量しか溶解せず文献から $219 \mu\text{M}/\text{ml}$ 濃度で有効な結果が示されていたので、本濃度を実験に用いた。この濃度では細胞毒性が全く無く、この点に関しては他の薬剤に比べ特殊なものであった。 $10^{5.25}$ T

C I D 50/ml のウイルス液を 250 ml 角びんに
 接種し、経時的に H B B 効果を判定した(図
 21)。ネコカリキウイルスは H B B 無添加群
 と全く一致する増殖態度を示した。これに対
 し、エンテロウイルスに効果があるかを調べ
 るため青藤[57]によつて開発された IB-RS
 -2 豚腎細胞と Coxsackie-4B の系を使用し H
 B B の効果を検査した(図 22)。H B B 添加
 群では 5 時間以後ウイルス産生が認められず
 漸次下降していった。無添加では $10^{5.5}$ T C I
 D 50/0.1ml まで上昇し、H B B はこの濃度で
 明らかに Coxsackie-4B の増殖を阻止した。

小括：前記にカリキウイルスと他のエンテ
 ロウイルスの H B B に対する態度には明らか
 な差があることが報告されており、その詳細
 はメカニズムはわからないが、コフルサウイ
 ルスよりもむしろトガウイルスに似ているこ
 とが指摘され、全く異なる RNA の複製転写
 機構を有すると解釈すれば、この成績は素直

に理解される。それ故に、HBBの効果はネコカリキウイルスに対し作用しない理由として、RNAポリメラーゼ構造の違いとか、RNA複製時の問題という次元にあるのではなく、ヒコルナウイルスとは全く異なるRNA複製、転写機構を有し、トカウイルスに相当するメカニズムを持つのではないかと考えられる。

エ. 感染細胞の核の超微形態学的変化

感染細胞の微細構造を検討するために予備実験を行なった。感染後、0時間から出発し1時間毎に0、1、2、3、4、5、6、及び8、13、16、24時間とそれぞれの時期にすばやく維持液を抜き残存するシートをPTEで剥離し観察した。ウイルス粒子の結晶配列、直線状配列を後期に確認する一方、初期の0、1、2時間目の感染細胞においては形態学的変化を認め得なかった。3時間以後の経時的観察像においては、色々な形態像が現れ、中間期の連続性ある秩序だった形態像をつかむことができなかった。これはCPEの出現にともない感染細胞がガラス壁から剥離していくため、維持液と一緒に抜いてしまい、肝心の感染細胞を紛失させ、全く連続性を失ってしまう結果である。しかし、予備的には一応2時間までは形態学的に変化のない時期と認めら

れ、細胞内ウイルスの認められない暗黒期の成績と一致していた。予備実験を踏まえ本実験には、0、3、5、8時間後の感染細胞を観察することにした。又、予備実験でしばしば出現した電子密度の高い膜構造と関連を持つ初期構造らしい像も最重要なものとして注意深く観察した。この構造は3時間以後少数ばかり散発的に認められたが、経時的に増減する傾向をつかめないうちにウイルス粒子の出現に移行してしまつた。それ故に、本実験においては上清中へ剥離した細胞をすべて遠心によつて集め、トリフミンで剥離した細胞と加え、すぐに固定し過度に固定しないよう一連の術式に従ひ包埋した。

出現する形態像を量的に客観的に把握するため、比率(百分率)で表現する方法を採用した。これは一般的ではないが、多くの感染細胞を観察した結果、個々の細胞は細い部分を除くとかなり単純な形態像を呈することをつかめたので、分類してそれぞれの形態像を

持つ細胞をすばやく算出し、なるべく30個以上の細胞を観察し、繰り返しを行ない各時間毎の増減の割合を示し、経時的に形態像がどのように動いているのかを表現することができた。これによつて逆に、感染経過がかなり正確に同調していることも確認された。ただし後期の像では、細胞そのものが崩壊していたり、移行状態、重複像を呈するものがあり、なるべくはっきり識別しうる細胞を選ぶという人意的配慮が加えられ、特に8時間の形態像で問題とほりうるものであつた。にが、實際上よく形態の動きをつかめ得た。

1) 核膜外膜の形態学的変化

成績：ウイルス感染は細胞質に形状変化を与えるのみならず、核の形態にも多大な影響を与えた。核膜の二重膜は3時間後には、部分的に複雑に小刻みに入り組む不規則な形態を示し、おおかに離れるが完全に離れることはなか、T₁ (図23、24、25)。5時間から8時間後には明瞭に拡大した外膜が徐々に内膜から離れ、さらに外膜は細胞質に移行していき凹凸が激しさを増し島状に内膜と外膜の間隙に入り込む (図、26、27)。図、26 においては核膜外膜が直接拡大しているようであるが、図27は造成した外膜と細胞質内の滑面及び粗面小胞体が融合して生じたと考えられる面があり、本質的には、核膜外膜と小胞体膜と連絡しており、双方の増量の結果が核膜の分離に導くと思われる。このような核では核物質の極端な変性を受けていない場合が多く、外膜の著明な変化が後述される電子密

度の高い顆粒状構造を伴う所見も認められた。

小括：3時間後、外膜の不規則な変化を生じ、5時間後に外膜のはっきりした遊離が認められた。一方変化の著しい外膜に比べ核内容はその程度変化していない。核物質の辺縁部への集積がみられた核の複雑な外膜の様子と内膜との部分的遊離像は、核の収縮によるものと考えられる。遊離した外膜が積極的にウイルス増殖と関連しはから発展するような形態像を提供することはなく、反面、細胞質の膜系が高い電子密度を有する顆粒構造と密接に結合し発展を示すのに対し、それ程の役割がないように思われた。すなわち、核膜外膜は細胞質の膜系と区別がつかないが、ウイルス増殖の場の形成としての意味は薄く、外部遺伝子侵入の結果生ずる細胞質内の急激な蛋白質合成、膜系の造成に関連し誘発されたものではいかと解釈される。

2) 核クロマチンの外側辺縁部への集積と凹凸、及び分葉化

成績：核膜の形態変化が生じるとともに、核内容、核形態も著しい変化を呈する。このよりの核変化はウイルス感染の経過と関連し増減する。しかしまれには、吸着時の細胞においても核辺縁部へのクロマチンの集積が観察された。この細胞は核形態が分葉化せず滑らかな外形を示し、集積するクロマチンの層も薄い（図 61-3）。細胞質もリボゾームが乏しく、すでに死んでいるが、それに近い細胞であろうと思われ、感染によるものではないと推察される。

一方感染と関係していると考えられるクロマチンの集積する細胞の割合は、0時間には0%で始まり、3時間後に $4.4 \pm 2.7\%$ （平均値 \pm 標準偏差）、5時間後にピークを示し $36.4 \pm 8.5\%$ に達し、その後 $2.7 \pm 5.4\%$ にまで減少する。核変化と同時に高い電子密度を

持つ顆粒構造と膜の造成を伴って観察され、明らかにウイルス感染の経過につれ増加するが、核変化のみられない細胞においてもウイルス形成が行われているので、ウイルス増殖による退行変性の結果によるのではないかと思われる。核変態は凹凸が激しくなり分葉化してくる(図25、28)。フロマチン集積像と核の内側に巨大なフロマチンから独立する集塊が認められた(図、28、29)。この構造は核仁の変性像と考えられる。8時間の核変化を示す図30はフロマチンがやや外側へ集積しつつある像で、核膜の外膜と部分的に剥離している。この像は外膜が細胞質側へ移行するのではなく、核が収縮していくことにより、間隙が生じると思われる。このような激しい変化はポリオウイルス等にも同様に観察される像であるが、人工産物の疑いもありうるので操作上すべて対照として正常な細胞と同時に材料を作成しているのも、この範囲において一応人工的な影響はないとみはしている。

小括：核の形態像として問題にされた核内ウイルス蛋白結晶の出現という尾崎[134]の報告を考慮に入れ観察を実施したが、カリキウイルスの観察からは示されなかった。ウイルス感染とともに経時的にフロマチンの辺縁部への集積が生ずるからウイルス増殖と直接関係すべき事柄であるが、辺縁部への集積自体はウイルス産生への関与としてはあまり意味がないようである。むしろ単純に逆行変性を受けたとするのが妥当のようである。しかしながら、あまりに例数が少なすぎて十分検討ができなかったが、核周辺から細胞質側へ放射する細線維様構造が何らかのかかわり合いを有することもあり得るので今後検討したい(図23)。

3. 感染初期の細胞質の構造

1) 初期前駆構造の出現と特徴

成績：感染 2 時間まで細胞の形態学変化は現れないが、3 時間後、細胞質内に膜と密接に結合した電子密度の著しく高い顆粒構造が認められた（図 32 - 36）。顆粒状構造は不規則な形態を示し、サイズ（図 32 の矢印）は 43.4 nm 程度あり、表 5 に掲げた他の粒子サイズよりも大きい特徴を有する。粗面小胞体にみられる膜結合リボゾーム 20 nm、遊離リボゾーム 18.4 nm、ウイルス結晶中の粒子 27.1 nm、Precrystalline 中のウイルス粒子 32.6 nm をそれぞれ示し、いおれよりも顆粒構造が大きい。

図. 31 に、0 時間の膜、及び結合するリボゾームを示す。リボゾームは個々の粒子形態がそろっており鮮明である。時には電子密度の高い顆粒はミトコンドリアの膜とも結合する（図 33）。小胞の外側（図 34）、内側（図

35) 両側の膜面に結合している。個々の顆粒中には中心部に電子密度の高い芯様構造を持ち、周囲に低い電子密度で囲まれる前ウイルス様構造を呈するものがみられたり、小顆粒が数個凝集していたり、顆粒状態より均質な構造を示す場合もあり一様ではない(図34-35、36)。本構造は明らかに感染細胞においてのみ特有に産生される。他にこの時期に関連があるとみられる形態学的特徴のある構造は認められない。それ故に、この顆粒構造を有する細胞の割合を求めることができた。3時間後は48.1%、5時間後76.5%に達した。ウイルス粒子の認められるまでの形態変化はもっぱら電子密度の高い顆粒構造と膜の発達に終止する。図37はVesicle周囲に結合集積したさらに発達した像である。図38はこの拡大である。中心の粒子はかならずウイルス粒子様の形態をとっている。同様に図39もウイルス様粒子の小集塊を形成し、感染後5時間の顆粒構造の中にウイルス様粒子が散見され

るようになる。8時間以後にはウイルス粒子が形成される反面、顆粒構造を有する細胞の割合が減少する。興味ある知見として8時間の細胞においてニューキャスルウイルス〔180〕ポリオウイルス〔176〕で観察されたNucleo-plasma (NCL) 様構造が確認された(図40

)。田島らの認めたニューキャスルウイルスの線維状構造はNucleocapsidの前駆体のように解釈してもいいように思われるが、ポリオウイルスのNCL構造については報告も少なく、解釈は難しいが、カリキウイルスにおいても8時間後の感染細胞においてのみ低頻度で確認された。8時間後に認められる顆粒構造の一部は、かなりウイルス粒子に似た形態をとるものが見られる(図41, 42)。又、線維と強く結合するものもある(図43)。膜の豊富な領域とリボソームに富む領域からなる部分では、膜に富む部分において顆粒構造が発達するような傾向がうかがわれた(図44)。

小括：初期に出現し、感染経過と共に増量
発展しながら、ウイルス粒子の形成とともに
減少していく顆粒構造は、膜と強く結合し、
きわめて電子密度の高い構造である。又初期
にはこれ以外の構造は認められず、5時間目
にはウイルス様粒子と混在する点などの移行
状態もみられるので、膜と顆粒からなる特異
な構造を前駆構造 (Viral Precursor C-
omplex) とした。

2) 初期前駆構造の発展と膜の関連

前駆構造は複雑であるが、3時間から5時間にかけて発展し、顆粒構造が膜と結合し増量することは明らかである。この膜の必要性をさらに検討するためヨード酢酸を用い、阻害効果を調べた。ヨード酢酸は細胞膜の Glycolysis を抑制する作用を持っている。

アンホテリシンBは赤血球膜に小さな穴をあけ溶血を呈し、機械的に膜に障害を与えるので、ウィルス産生になんらかの影響を及ぼすのではないかと検討した。

i) ヨード酢酸の効果：ウィルス産生を抑制する濃度を決めるため、適当な濃度に調整した培地で24時間培養しウィルス価を測定した。0.01 mg/ml では全くウィルスが産生されない。この濃度は細胞をかなり障害した(表6)。0.001 mg/ml は中程度に $10^{2.25}$ TCID₅₀/ml まで抑制し、細胞障害がなかった。この濃度以下では $10^{4.75}$ TCID₅₀/ml を産生し抑制

も細胞障害もなかった。この結果から、本実験ではウイルス産生を完全に抑制する 0.01 mg/ml を使用した。

ヨード酢酸が効果を示す時間をロコモイシンと同様の方法を用い、ヨード酢酸を加えた後、0、30分、1、2、3時間作用させ抜きとって無添加培地を新しく加え、ウイルス量を測定した。図45に示されるように30分作用させただけで5時間後のウイルス産生は無く、その後遅れて24時間後には $10^{4.5} \text{ TCID}_{50}/0.1 \text{ ml}$ にまで回復した。作用時間が長くなるにつれて強く抑制され、3時間の作用では完全に抑制された。この結果、ヨード酢酸によって非常に早期に、すなわち、感染後30分で抑制が始まると解釈された。

ヨード酢酸の効果が終了する時間：各時間毎にヨード酢酸を加え24時間後ウイルスカ価を測定した。4時間までは完全にウイルス産生はなかったが5時間後 $10^{2.0} \text{ TCID}_{50}/0.1 \text{ ml}$ の値を呈した（図46）。

上述の結果を加味するとコード酢酸は30分後作用を示し、4時間まで持続し5時間以後影響を及ぼさなくなる。

小括：膜の Glycolysis はカリキウイルスの産生に必要な要素として重要なことが理解された。一般のヒコルナウイルスを参考に解説すると、Uncoating後ウイルスRNAは膜に結合し、膜を場として増殖過程をとる。したがって膜の場に対して直接的に影響を与えるコード酢酸はピューロマイシンより早期に効果を示し、蛋白合成後もウイルスの構成の場として働く場の提供者である膜は蛋白合成阻害剤が効果を脱する時期以後もさらに作用し続す、より長く作用を及ぼすと考えることが出来る。以上の結果は電子顕微鏡による観察で示された3時間から5時間の形態像が膜と関連している事実をさらに裏付けるものである。

ii) アンホテリシン B (ファンギーゾン) の
影響：アンホテリシン B はポリエーテル系抗生
物質であり、ステロールと特異的に相互作用
を営むことにより、膜に小穴を開け、現象的
に赤血球を溶血させる [130]。膜に微細孔を
形成する事が知られているが、必ずしも特異
性を持つ阻害剤という意味にはとれない。レ
しかし、膜に微細孔を形成するという機械的作
用に注目し、ウイルス産生に影響を与えるの
ではないかと仮定し、実験を試みた。この薬
剤が、ウイルス増殖の場としての膜に直接影
響を与えるためには細胞膜を通過しなければ
ならないが、これらの知見に関する十分なデ
ータが少なく、かなりあいまいな結論とな
らざるを得ないと予想される。それ故、微細
孔を生ずる機械的影響という観点に限定し、
ウイルス産生への影響をみることにした。

溶血作用を生ずる濃度：アンホテリシン B
は市販のファンギーゾン (三共社製) を用い
ネコ赤血球に対し溶血を生じる濃度を求める

ため、0.5%赤血球を0.1Mのトリス(50mM NaCl, pH. 7.0)で作成し、0.1、1、10、100- $\mu\text{g}/\text{ml}$ の各濃度のファンギーゾンを0.1Mトリス緩衝液に溶解し、 37°C 30分間赤血球と作用させた。これを直接OD 550の比色計で測定し吸光度を求めた。

成績：0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までゆるやかな溶血が生じ、0.01から0.1 mg/ml にかけてやや強く生じ、1 mg/ml では急激に完全に溶血した(図47)。そこで細胞障害の程度が低い0.1、0.01、0.001 mg/ml においてウイルスを接種し、CPEの出現状態を観察した(表7)。0.1 mg でかなりCPEを抑制したが、0.01、0.001 mg 濃度では抑制しなかったため、0.1 mg/ml の濃度を用いて経時的にウイルス産生を測定した。5時間、8時間後において産生が抑制されたが、16時間以後それ程抑制されずにウイルスが産生された(図48)。

小括：軽度の溶血を示す0.1 mg/ml 濃度にお

けるウイルス産生は、今までの阻害剤に比べ完全に抑制する傾向を示さず、後に回復するか、又は遅れて産生される。もう一つの考え方としては、少量ずつ産生され比較のおだやかには抑制を受けているとも解釈される。本薬剤の作用がステロイドとの相互関係を持ち微細孔を生ずるといふ知見といかようにウイルス産生が関連しているかを論ずることは難しい。ウイルス粒子自体への本薬剤の影響は、裸のウイルスという性質からあまり考えられなく、一応膜の機械的障害によってある程度カリキウイルスの増殖が抑制されたと解釈するにとどめたい。

4. 感染後期の細胞質の構造

1) Complex membranous bodyの出現

PETERSON (1970) [137] のネコカリキウイルスの報告にある Complex membranous body (CMB) は拡大した粗面小胞体の槽の形成と陥入によって生じ、しばしばみうけられる構造であり、ポリオウイルス等にも観察されている [48]。この構造がネコカリキウイルスの増殖においていかなる機能をもっているのかを検討するため観察を行った。

成績：24時間後の観察を行うと非常に著明なCMBを認める。それ故、よく同調されていない感染細胞では、この構造は単なる粗面小胞体とは考えられず何らかの機能を有するのではないかという疑問が生ずる。よく同調した今回の実験系では、CMBは5時間まで出現しない。そして、8時間後にいたってのみ確認された。このよく発達した典型的な形態は非常に大きく拡大した槽を形成し、表面

にリボゾームを一層に、又は部分的に集積している(図49)。場合によつては電子密度が膜、リボゾームともに増強する(図50)。従つてCMBが前駆構造の出現する初期に形成されていれば、ウイルス構成蛋白の合成部位として単純に考えることができるのである。同調していはい系でこの形態を観察すると混同する原因となる。

このCMBがどのようにして形成されるのが疑問であつたが、図49は拡大しつゝある膜に周囲のリボゾームが付着していく像である。多くのCMBは図50にみられるようにきつた独立した構造を有し、どのようにして形成されるのか推察できない。図49から拡大する膜に既存する遊離リボゾームが受動的に付着すると解釈したが、なぜこのような状態になるのかは明確に答えることはできない。

小括：CMBはPETERSONが用いた名称であるが、機能的には不確定な存在であつた。

これは同調していない材料、あるいは感染後期のみを観察した場合、著明に発達した構造としてみうけられるので、一見ウイルス構成材料の合成の場としてか、この構造としてとらえにくくなるが、多くの材料を観察してもこれからさらに発達し、ウイルス蛋白合成に働きウイルス粒子の構成に関与する場としての構造変化はみうけられない。時間的に感染前期よりむしろ後期に出現することによって直接的にウイルス構成蛋白の合成部位としての可能性を否定しえた。結論的にはウイルス産生の結果、粗面小胞体膜が変性し浸透圧の変化によって槽が拡大する退行性変化と思われる。

2) ウイルス粒子の出現

感染後5時間において低頻度であるが、ウイルス様粒子を認め、8時間には明らかにならウイルス粒子が観察された。

成績：結晶状配列をするウイルス粒子のサイズは最小であり、著明に凝集されたいわゆる格子様配列を呈する(図51)。結晶内ウイルス11個を測定し $27.1 \pm 3.9 \text{ nm}$ を得た(図51、表5)。膜に結合するウイルスがあるが、結晶状に配列するものと似ている。膜に沿って一列、二列に重なり配列する(図52-55)。直線状に長く配列するウイルスは細胞繊維と結合している(図56)。この粒子34個を測定し $28.9 \pm 1.5 \text{ nm}$ を得た。Pre-crystallineの粒は34個を測定し、 $32.6 \pm 3.7 \text{ nm}$ の大きさを有する(図57-59、表5)。この大きさは陰性染色による粒子サイズの $37.2 \pm 3.3 \text{ nm}$ に最も近い値をとる。Pre-crystallineの形状をとるものが一般に高頻度に観察され、弱拡大の観察では下ドウの房状にうつるのよう

に走行する膜と結合して存在している(図57. 58)。芯のなかに中空粒子の存在はまれであつた。

細線維は増加し直線的な配列を有するウイルス粒子形成となんらかの関連があるとも考えられるが、決定的ではない。正常細胞でみられる線維と形態学的に区別ができない線維の造成もあり、支持体もしくは輸送などの役目をもっているかもしれない(図60)。

3) 形態像の経時的変化

ネコカリキウイルスの感染細胞を経時的に電顕的観察した結果、出現する形態像を6型の細胞に分けることができた(図61、62)。

1型は細胞が充実し膜構造がそれほど見られない。核はクロマチンの辺縁部への集積がみられない特徴を持っている。ウイルスに対する感受性が低いようであり、かなり後にいたっても残存する。2型と3型は細胞質に膜が発達している末感染細胞であり、3型は核クロマチンの辺縁部集積が認められる。4型と5型は、2型と3型の細胞に電子密度の高い顆粒状、あるいは不規則な構造が膜に結合するいわゆる前駆構造というものを有する。6型はウイルス粒子が認められ、これ以外に粗面小胞体の拡大、著明なCMBの発達、巨大変性ホリゾーム様物の出現を呈する細胞である。これら6型の細胞の割合を経時的に比較し、増減する110ターンにより形態の時間的動態を検討した。

成績：結果的に各時間毎にみられる形態像はよく同調していた（表 8）。

0時間：1 から 3 型の細胞からなり、膜の発達した 2 型の細胞が大部分の $85.3 \pm 5.4\%$ を占めていた。

3時間：2 型は 31.8% に減少し、4 型が $43.7 \pm 2.1\%$ に増加し、膜に結合した電子密度の高い顆粒構造が新しく現れた。

5時間：4 型とともに 5 型が $36.4 \pm 8.5\%$ に増え、両者を合計すると 76.5% にまで達した。

8時間：4 型が 40.1 から $15.7 \pm 8.4\%$ に減少、5 型が 36.4 から $2.7 \pm 5.4\%$ に減少した。これに対応して 6 型が $55.7 \pm 11.7\%$ に変換しウイルス形成に移行する結果になる。この時期ではすでにかなりの破壊細胞が存在し、6 型の細胞は実際にはかなりの割合を占めるものと思われる。

この成績を図 63 に示す 3 時間から 5 時間に増加した膜結合体の電子密度の高い顆粒構

造が発達し、急速にウイルス構成へ移行する経過が納得される。

小括：経時的に出現する形態像の關係が、非常にあきりした形で整理され、ウイルス形成の成立する前段階には、膜に結合する電子密度の高い顆粒構造が存在することが証明された。ポリオウイルス、エコーウイルスの前期において出現する遊離ポリゾームの形成についてはカリキウイルスで認められず、尚さらに検討を要するが、現時点では、カリキウイルスの前駆構造に示される顆粒構造の一部はポリゾームではないかと推察している。したがって、カリキウイルスの場合にはポリゾームが膜に結合した状態か、あるいは膜に囲まれて蛋白合成、及びRNA複製、転写さらにウイルス構成も前駆構造で行われるのではないかと考えられる。形態学的に確認されたカリキウイルスの前駆構造は本ウイルスに固有のものであると結論づけられる。

5. ウイルス感染と細胞小器官

1) ミトコンドリアの変化と呼吸の影響

ミトコンドリアの形態変化は全般を通じて全面的に激しい変化を呈するのではなく、比較的部分的に生じるものである。

成績：3時間後に顆粒構造と部分的に結合する前記の図57の例とか、膜の拡大に伴ってミトコンドリア膜も一層に変化する例（図27）もみられたが、一般には多少膨化するとか、クリステが消失する程度のものが多い（図64-68）。図66は5時間後のミトコンドリアで軽度の変形を呈する。図67、68は15時間後の観察像でかなりきれいな形態を有するミトコンドリアの中に部分的に消失するものがある。これらは粗面小胞体の発達、細胞形態の崩壊とともにミトコンドリア固有の形状を失うものがあるが、ウイルス産生における機能的役割については形態学的によくわかっていない。そこで NaN_3 は Cytochrome Ox-

ydase の作用を阻害することがよく知られて
いるので、本薬剤を用いウイルスの増殖に及
ぼす影響を検討した。

表 9 のように 1 mg/ml の高濃度下では細胞
障害がみられるが、ウイルス産生は抑制されな
い。 10 mg/ml 濃度でようやくウイルス産生を
抑制した。ヨード酢酸が 0.01 mg/ml 、ヒュー
ロマイシンが 0.01 mg/ml 、アンホテリシン B は
 0.1 mg/ml で一応の効果がある。これらの結果
をみると NaN_3 は抑制するのに 1000 倍の濃度を
必要とする。それ故、 NaN_3 はウイルス産生に
ほとんど影響を与えないとみて、呼吸作用と
はまた関連してないといわれる。

2) 巨大変性ポリゾーム様物

成績: CMBとともに8時間、16時間以後のほとんどウイルス増殖が終了した時期に観察される(図69)。CMB同様これも感染細胞においてきわだつた存在であるため、ポリオウイルス例においても注目されたことがあるが今日では多分変性ポリゾームの集塊であろうと推察されている[47]。なぜこのように集塊を形成するのかは不明である。

3) ウイルスの放出

成績：全過程を通じて特に產生されたウイルス粒子が何らかの機構によって細胞外へ輸送されるという像を注意深く検索したが、このような像は認められなかった(図70)。本実験においては遠心沈殿により、集められた比較的大きな細胞成分を観察した訳であり、結晶配列、Pre-crystalline状態をよく保持しており、それが散在してしまふことはない。細胞崩壊後もやはりもとの状態を残しており、細胞崩壊前においてウイルスを特別な放出機構で細胞外へ放出していた証拠はないようである。

6. ウィルス感染細胞の三次元構造

ウィルス粒子及びウィルス成熟の場を立体的に観察するため、ウィルス感染後10-12時間の細胞遠心沈渣に酢酸アンモニウムを添加し、2%リンタンクステン酸ナトリウムを加え生乾きのまま観察した。

成績：ウィルス粒子は単独に散らばっている所見が多いが（図71-73）ほかには図74のように数個の粒子が結晶状に集まって粒子同志が互いに結合している。図71と72の粒子（矢印）は、微小な粒子からなる短いキャプソミア構造と結合している。ウィルス粒子が壊れたものか、成熟以前の形態か、定かではないが、ウィルス粒子として形成される前段階のものと考えられ、又形成された粒子は互いに親和性が強く、バラバラにほりにくいようである。この前段階の粒子を構成するキャプソミア構造に非常によく類似す

るのは紐状構造(図 75・76)の束に結合した粒子が袋状構造と結合して観察されるもので、同様の前粒子構造を有していると思われる。又この紐状構造はフサリ状の小単位が集合し、からみあつて束状に連鎖しており、ウイルスのキャプソメアサブユニットと類似した構造で、あるものは中心部が陥凹し、抜けた状態を示す Hollow capsomere を有するカリキウイルスのキャプソメアに一致する構造が連鎖し、塊状、紐状になっているのではいかと考えられる。さらにこのキャプソメアサブユニット様物の観察は図 78 の膜上に著明に認められる。膜面を微小な粒子が被い、粒子は中心部が陥凹し電子密度が高い。直線状、円形状に配列するものがあり比較的、規則的に並ぶのかもしれない。

フサリ状の小単位が連鎖する紐状構造はカリキウイルスに特有であると考えられ、対照としてヘルペスウイルスを同様の操作で観察した(図 80-83)。このネコヘルペスウイ

ルスにも紐状構造がみられるが、鎖状ではない。カリキウイルスの場合と似て紐状構造と親和性があるようで粒子がいくつか結合している。ヘルペスウイルスのこの紐状構造はこれだけの観察データからは結論づけられないが、ヘルペスウイルスのキャプソメアサブユニットの結合しあった一形態ではないかと解釈した。

膜構造に結合しているウイルス粒子も多く観察された(図 77, 79)。膜の大きさはまちまちであり、膜面は上述のようにサブユニットが結合している。図 77 の矢印は中空粒子を示す。この膜の上部には局所的に不完全粒子が数個重なり合っている。膜の限局部で多数のウイルス粒子が集積しているのがよく観察される(図 78, 79)。このような場所では、個々のキャプソメアサブユニットが結合しウイルス完全粒子へ移行する過程を示している。

散在している個々のウイルス粒子の観察像

から、ウイルス粒子構成の過程を図 84 に示した。

図 76 は、紐状構造中に細線維が存在する。超薄切片像でもこのようは線維構造の増加が起こるが、ネガティブ像においてもウイルス合成との関連は不明であった。

粒子構造の検討：ウイルス粒子構造の立方対称性を検討するのによく用いられるローテーションテクニックにより、よく染色された粒子を選び、3回(120°)、5回(72°)、6(60°)、8(45°)、10(36°)、12(30°)回とそれぞれ重ね焼きをし、明瞭に現れた形態から粒子の回転対称性を決めた。一般の正20面体のウイルスは2回、3回、5回の対称性を有する。

図 86(85B)と87は10回重ね焼きした場合に明瞭な10本の突起が認められる。

図 88(85A)は12回で12本の突起が認められた。この結果、本ウイルス粒子が5回と3回対称性を持つことを証明する。一方超薄切

片像も同様に証明された。図 89 は10回、図 90 は12回重ね焼きした時にそれぞれ明瞭な像を呈した。超薄切片像の場合、比較的內部構造がうかがえた。ウイルス粒子はいずれも Hollow capsomere を有し、粒子外側はネグティブでも超薄切片でも低い電子密度を示している。

3回対称性と5回対称性のウイルス粒子モデルを図91(図89、90)に示し、内部構造のサイズを表11のように並べると、芯のサイズはそれぞれ7.3と10.5nmでほぼ等しい大きさである。内側 Capsid は13.8~24.3と11.3~22.9nm、外側 Capsid は28.7~36.3と28.7~34.1nmであり、両者はほぼ等しい値をとる。芯は中空粒子の大きさからみて、内側 Capsid と強く結合し、外側 Capsid に包まれている。図90の6mは60°ずつ焼きつけた超薄切片像であるが、芯を包む蛋白層[a]の周囲にもう一層の蛋白が包んでいる[b]。

小括：超薄切片で認められた前駆構造と、
紐状構造、膜面の微小粒子構造は一致するも
のと考えられ、前駆構造の電子密度の高い顆
粒状構造の一部はネガティブ染色で観察され
たキャプソムアサブユニット構造と一致する
ものと解釈される。さらに膜と結合した前駆
構造は、ウイルス構成材料の集合部位である
とともに、合成部位であろうと推察される。

IV 考 察

1) カリキウイルスの細胞内増殖における基礎的
条件的検討

ウイルスの吸着、侵入、脱外被、ウイルス材料の合成、ウイルス粒子の構成、放出という一連の増殖過程を経時的に把握するためには各時間毎に取り出された標本、すなわち感染細胞が忠実にその時点での像を反映しているものでなければならぬ。このために最も要求される条件を満たすためには、使用された実験系において、ウイルスが細胞内で一段増殖を繰り返していたかどうかが挙げられる。

本実験において、どの程度ウイルスの動きが一律化しているかは、ネコカリキウイルスと初代培養細胞の系において最も重要なことである。使用ウイルスの初代培養細胞の成績は比較的安定した一段増殖曲線を描き、形態学的検索を行う上で困難はないようである。

に。又、吸着後のウイルス産生量の成績から
 暗黒期が2時間であることを示された。これ
 はMANDEL(1962)、HOWES(1957)らのポリオ
 ウイルスの成績とほぼ一致している[113, 80]。
 本ウイルスも裸の小型RNAウイルスに共通
 する性状と思われる非常に早い合成速度を有
 し、裸であるが、中型で2重鎖RNAを持つ
 レオウイルスの7時間もの暗黒期と対比され
 る[64]。同様に螢光抗体法によるウイルス抗原の
 出現も増殖曲線に平行して確認され、4時間
 後に明瞭な抗原の蓄積が確認できた。ポリオ
 ウイルスの螢光抗体法による初期の報告であ
 るBUCKLEY(1955)の成績では感染後5時間の
 に螢光が現れるが、かなりの非特異螢光も観
 察され、技術的な問題を含むようである[23]。
 蛋白合成については直接的な検討を行って
 いないので推論の域を出ないが、さらに間接的
 な方法として用いられている蛋白合成阻害剤
 であるコユーロマイシンの使用による成績は、
 吸着後、2時間から4時間の間に著明な阻害

効果が生じる事を示した。暗黒期からウイルス抗原の出現するまでの期間と一致する興味のある結果が得られた。ヒューロマイシンのポリオウイルスへの応用として、LEVINTOW (1962) は暗黒期の初期にヒューロマイシンを添加するとポリオウイルスRNAの合成とウイルス成熟の双方を阻止し、後期に添加すると少量のRNAが合成され、RNAの複製には蛋白合成が必要であることを示した[103]。SCHARFF (1963) も同様に感染細胞におけるポリオウイルスRNA形成は、特異蛋白の持続的合成に依存し、さらに蛋白はアクチノマイシン存在下において作られるので、蛋白合成はウイルスゲノムから直接合成されるとした[161]。カリキウイルスの場合も、アクチノマイシンはウイルス産生に何ら影響せず、宿主DNAより合成される蛋白には依存してはいないと考えられる。一方、POLATNICK (1967) は口蹄疫ウイルスの産生自体にはアクチノマイシン効果の影響はないが、ウイルスによっ

て產生されるRNAポリメラーゼをかなりの程度に抑制すると報告している[140]。このようにカリキウイルスの產生量とは別に、ポリメラーゼのレベルにおいても検討する必要もあるが、アフチノマイシンDがカリキウイルス產生を抑制しない点に限って、ヒコルナウイルスの系における態度と一致するものであった。一方において、HBBの抑制効果が多くのヒコルナウイルスにみられるのに反し、カリキウイルスにみられない点においてRNAの複製レベルに何らかの相違を示唆しているようである。

以上のように、ヒコルナウイルスとHBBの作用効果を除けば区別のつかない性状を有し、初代培養細胞の使用によって経時的な検討を行うのに条件を満たしていると思われる。

2) ポコルナウイルス及びカリキウイルスの増殖における膜の関与

カリキウイルスは以前ポコルナウイルスに属し、粒子形態、及びウイルスRNAの産生状況において区別されるようになった。しかしながらカリキウイルスはポコルナウイルスとともに裸の小型RNAウイルスであるという共通する性状がある。ウイルスRNAは二本鎖RNAを持つオルボウイルスとレオウイルスを含む *Reoviridae* 科のウイルス群を例外として、一般に一本鎖RNAである。ラブドウイルスにおいては一鎖RNAを持ち、ウイルス増殖のためには十鎖RNAを転写する酵素がないと増殖できないのでウイルス粒子内に転写酵素を含んでいる。これに対し、十鎖RNAを有するポコルナウイルスは感染性RNAとして単独でウイルスRNAが感染増殖することができ、ウイルス粒子内に転写酵素を有する必要はない。カリキウイルスはこの点についてポコルナウイルスの範疇に属し

感染性RNAが証明されている[1, 105]。このような類似する性状がある反面、カリキウイルスの増殖に関し直接的な膜の関与がいかなる状態にあるのか形態学的観察以外に報告がなく、いまだ解決されてはいない。EHRSMANN(1977)はカリキウイルスRNAがポリコルナウイルスのように末端にPoly(A)を含んでいることを報告した[53]。この事実が多分にカリキウイルスRNAも脱外被後、膜に結合し、増殖の場が始まるであろうと推察される。

一方、ポリオウイルスにおいては、以下のようによくの知見が得られている。ポリオウイルス感染細胞においてウイルス誘発細胞質膜が密接にウイルス生合成と関係することやCALIGUIRI(1973)は生化学的にウイルスRNAポリメラーゼが滑面小胞体と関連することを示した[33]。感染細胞を可溶化し、二種のRNA複製複合物が単離され、膜を含んでいる複合物のRNAポリメラーゼ活性は含んでいない分画に比べ著しく高い。この結果はウ

ウイルスRNAポリメラーゼが膜酵素であること、あるいは膜の存在とともに作動する機構がウイルスRNA複製混合物に対して必要であることを示す。さらにCALIGUIRI(1970, 1971)は生化学的手法と電顕的手法を加味し、細胞質膜の役割を明らかにした[30-32]。ウイルスRNAの翻訳の主なものは粗面小胞体である一方、ウイルスRNAの複製は滑面小胞体に関与して生じる。ウイルスRNAの合成ポリメラーゼを障害するブアニジン添加成績もやはり、ウイルスRNA合成が滑面小胞体の関係する複合物において開始されることを示唆した。彼らの報告からポリオウイルスの形成過程には滑面小胞体と粗面小胞体の膜系が必要とされること、すなわち、これらの膜系が前駆構造を形成している可能性を示唆するものである。カリキウイルスの場合にこのポリオウイルスの成績をそのままあてはめる訳にはいかないが、酢酸ヨードによる強いウイルス産生の抑制から膜の関与を度外視す

る事はできない。それ故に膜にRNA、蛋白の合成部位が存在する可能性を示唆している。

ポリオウィルスの生化学的知見が膜の関与を強調している反面、超薄切片像から形態学的に膜と関係する特定は前駆構造と考えられる領域を証明していない。これに対し、Horne (1959) のネガティブ染色法による三次元的な電子顕微鏡観察像で示された Large body はよくウイルス形成の場を示す膜構造であり著者がネガティブ染色像で示した膜構造と類似するものと考えられる。しかしながら、Large body は超薄切片によらずこれに一致する構造物が見い出されていない [79]。著者の考えでは、MAYOR (1962) らの Viral bleb (VB) が最も類似したのではないかと推察するが、後述のようにVBは少数のウイルス粒子を膜が囲んだ構造をとっており、この構造中でウイルスRNAの複製、あるいは蛋白合成が行われているとはなかなか断言できない [115]。その他、結晶ウイルスに移行す

る前段階と思われる DALES (1962) の示した Dense materials も細胞質内を非常に広く占有しているので膜の関係を問うのはむづかしい [47]。同じく DALES (1965) の示した Viroplasma も出現頻度が低いので問題がある [48]。このようにポリオウィルスを表とした知見は、生化学的に RNA 複製と蛋白合成のどちらにも膜が関与していることを明らかにしているがその他に、ウィルス材料の合成部位から Virion 形成までの Assembly の過程においてウィルス RNA とウィルスキャプシド蛋白との相互作用を容易にする場を提供している可能性等も考えられるかもしれない。

カリキウィルスとコルナウィルスの粒子構造と構成成分を比較してみると、両者間には異った膜の関与の仕方もありうる可能性が示唆されるので、この点に触れておく必要がある。ZWILLENBERG (1966) はウシエンテロウィルスと粒子形態を比較し著しい相違がありカリキウィルスが内層と外層を有する点で、

レオウイルスに似ていると報告した〔199〕。
 WAWRZKIEWICZ(1968) は VEV の形態と RNA
 A について〔193〕。MCFERRAN(1971) の動物
 エンテロウイルスとの比較〔117〕。PETERSON
 (1970) らはキャプソメアのサブユニットの
 構成に関する詳細なモデルを提出した〔137〕。
 これらはいずれもコルナウイルスとは大き
 さと構造において全く別のウイルスであると
 結論づけられた。当初、カリキウイルスは粒
 子が突起を有すると言われたが、その後正確
 なモデルが提出され、実際には最外層の粒子
 表面には凹凸したキャプソメアがあり、5回、
 10回の重ね焼きをすると10本の突起を有する
 形態となるためであった。いわゆる Hollow
 capsomere を呈する非常にめずらしい粒子で
 あるといえる。このような点については本研
 究において再確認したが、コルナウイルス
 より大きく複雑にみえる構造のようであるが、
 カリキウイルスの主ペプテドが一種類しかた
 いという知見からすると、実は内側キャプシ

ドも外側キャプシドも同一の単位成分を持つキャプソメアサブユニットから構成されていると考えられる。これに反して、カリキウイルスよりもさらに小型の単純な立方対称性ウイルスであるポリオウイルスのキャプソメアは少くとも9種か4種のペプチドからなっており〔15〕、したがってカリキウイルスは大きさとス層のキャプシドからなる複雑性があるが、実際には単一ペプチドからなる内層のキャプシドを単にもう一層の同一成分から構成されているキャプシドが包んでいるだけの最も単純な構成によるウイルスと考えられる。

ウイルスの再構成についてよく知られているタバコモザイク病ウイルスも単一ペプチドからなっており、構成しているサブユニットが互いに結合しあい自らウイルス形成 (Self assembly) を行うが、粒子の大きさは核酸を加えると得られ、核酸に依存している〔12〕。

タバコモザイク病ウイルスの試験管内での再構成のように、カリキウイルスが単一蛋白の

みで形成されているとすれば、複製された核
酸の近くに合成された蛋白の一定量以上の濃
度の集積があれば簡単にウイルス粒子へ構成
される可能性が強い。それ故に、ウイルス粒
子の最終的な構成に必要な条件としては蛋白
が拡散せず、高濃度に合成された蛋白を封じ
込めておく場を作れば良い。ポリオウイルス
のようにフリーベージ (Cleavage) のための
酵素による巨大蛋白の切断機構を考える必要
がないものと思われる[94, 119, 128]。膜をウ
イルス合成の場としてすべての過程に利用し
ているのではなにかと考えられる根拠に以上
のように単純なウイルス構成の様式を持っ
ている可能性が挙げられるのではなにかと思う。

3) ポコルナウイルスの前駆構造とカリシウイルスの前駆構造の形態学的比較

ネコカリキウイルスの形態学的観察の結果、細胞質内に発達する膜と密接に結合する電子密度の著しく高い顆粒構造を認め、本構造を前駆構造とした。本構造は感染3時間から出現し、5時間末で急激に増量し、減少とともにウイルス粒子が形成された。ウイルス粒子が現れるまで膜と顆粒が増加しながら存続し、他に前駆構造らしいもの、あるいはこれより発展したと思われる構造はなかった。又、本構造を前駆構造と考える根拠として、酢酸ヨードの膜ブリーチング活性の抑制によって強くウイルス産生が抑えられることから、前駆構造には膜のかかわり合いが必須であると考えられよくこの条件を満たしている。蛍光抗体法によるウイルス抗原の出現は4時間後であるから、この前後に特徴的な構造変化が生ずる可能性がある。この前駆構造が蛋白合成と関連するものであれば、ポエーロマイシン

によって最も強く抑制を受けることから時間の時期にポリゾームと関係があると考えられる。著者が示した前駆構造の膜に結合した電子密度の高い顆粒が何であるかは断定できないが、ポリゾームと関連のある構造と解釈してもよいかもしれない。初期の形態学的変化はもっぱらこの膜とポリゾーム様の顆粒構造から成り、したがってRNA合成、蛋白合成、ウイルス構成のすべてが膜上、あるいは前駆構造において行われるのではないかと推察される。又、示された前駆構造は前述のポリオウイルスの生化学的知見において論ぜられた条件をよく満たしている。

著者が示した前駆構造は、今までにピコルナウイルス及びカリキウイルスの電子顕微鏡観察から得られた研究報告にはないきわめて特徴的なものであることを以下述べてい。

ポリオウイルス感染細胞の初期の電子顕微鏡による形態学的研究においては、しばしばウイルス粒子を観察できなかった。KALLMA-

N(1958)の報告は感染後期に U bodies という電子密度の高い領域を示し、Vacuoleの形成というポリオウイルス感染によって生じる特徴を指摘したが、全くウイルス粒子らしいものが確認されなかった[87]。そして、しばしば U bodies の意義及び膜の関与が問われるにリしたが、ウイルス形成の場として論ずるには技術的な電顕像の不鮮明さ、出現時期などから意味のないものであった。MAYOR(1962)は37°Cの培養ではウイルス粒子を確認できなかったが、30°Cでは可能であった。30°Cではウイルス粒子の放出が阻止されたが18時間後にウイルス粒子が認められた[115]。そして、同時期にみられる Viral bleb (VB) という構造は、小さく集合したウイルス粒子群を膜で包み込む状態を呈し、このVBはその後のMATTERN(1965)が観察した小胞中のウイルス粒子像と同様の所見を指すものと思われる[114]。彼の観察では、この小胞の融合によって大きな結晶構造が形成されるとした。

その他の報告では、DALES (1965) の5時間から7時間に現れる Small bodies (SB) と一致している [48]。VB 及び SB は、初期に認められるが、ウイルス粒子が膜に囲まれた比較的簡単な構造であるため、この場においてウイルス RNA の合成、あるいは、蛋白合成、ウイルス粒子の構成等が行われているとすることは多少うなずけたい点があり、これ以外の構造に前駆構造を求めようとする試みがあるが、いまだ VB、SB 以外に特異的前駆構造といえるものは見い出されてはいない。同時期には細胞質に遊離ポリゾームも認められるので、著者は VB、SB はウイルス粒子の構成の場ではないかと考えている。カリキウイルスの形態学的観察からは、VB、SB に類似する構造は認められていない。著者はこの点を特に留意しながら、多くの観察を行なったが、ネコカリキウイルスの検索においても確認されなかった。DALES の報告した Viroplasma (VP) は電子密度が高い集塊を形成

し前駆構造ではないかと示唆された。しかし示された形態像は経時的に発展し、ViroplasmaがVB、SBへ、あるいは、ウイルス粒子の構成へ移行するなど、又、膜との関連について明らかにできなかった。天児はたまたViroplasmaが膜と結合しているのも膜と関連があるのではないかと推察した〔6〕。さらに興味のある知見として、LEVINTHAL(1969)はフェリチン抗体法による免疫学的手法を応用しウイルス粒子の付着していない膜にもフェリチン粒子が結合することを示した。そして注目すべきことに、DALESらのViroplasmaにはフェリチンが結合せず、ウイルス粒子、線維に結合した〔102〕。それ故に、彼はViroplasmaは細胞反応産物であり、ウイルス産生において活発に形成される構造というよりもむしろ退行変性したリボソーム集塊といったものであろうと結論づけた。ただしこの報告では、残念ながらVBの所見に対する検討がなされていないかった。本法による結果は説

得があるが、充分にその背景を把握しておく必要がある。ネコカリキウイルスにおいても本法による前駆構造の検討が今後必要であろう。U bodies とか Viroplasma はむしろ巨大変性ポリゾームの小型のものであつて、積極的に増殖に結びつく構造ではないように思われる。

この他、サルの感染実験を行なつた超薄切片像から KANAMITU(1967) は結晶像を報告するにとどまつたが[90]、SIMON(1969) は粗面小胞体の細管が融合した嚢胞中にウイルス結晶が存在するのを発見し、ウイルス複製のための鋳型の存在部位を指すのではないかと述べ、ポリオウイルス感染細胞系[48, 61, 87, 102, 114, 115, 150, 175]でとらえられなかつた注目すべき小胞体との関係を示すものであつた。本構造はいまだ in vitro の系では証明されておらず、一般化できるかどうか疑問があるが現在、形態学的側面からいえる最も前駆構造らしいもので、いまだ前駆構造をVBの

みに帰結しえない可能性を示唆するものである[166]。一方、尾崎(1968)はウイルスRNAが m -RNA として細胞質リボゾームと結合し、ウイルス特異ホリゾームを形成しRNAの複製に必要な酵素蛋白の産生とウイルス蛋白の合成を促す一般的知見に反し、中空の不完全粒子からなる核内のウイルス結晶構造を認める核に細胞質と幾分異ったウイルス蛋白の合成機構が存在する考えを述べた。以上のようにポリオウイルスの系では、初期の遊離ホリゾームの形成からVBの出現、ウイルス結晶への発展が連続的に観察されるが、ホリゾームからVBへの移行についての詳細な報告がなく、形態学的に確認されていない構造が残されているのではないかと疑問がある。

エコーウイルスに関してはSKINNER(1968)が膜に結合する小胞を詳細に報告したが[167]ポリオウイルスの報告の域を脱してはいなかった[151, 152, 153]。メングウイルス及びEncephalomyocarditis virus もポリオウイルス

と同様、 α 、 β 、 γ 、 δ のポリオン構成蛋白からなるエンテロウイルスに所属するメンバーである。古くから研究されており DALES(1962)によって詳細な形態学的研究がなされた。要約すると、感染細胞の中心体領域に小空胞の形成を伴う核物質の再配列と変形が感染後4から6時間で始まる。メングウイルスでは電子密度の高い、非常に広い領域を占める Dense Materials (DM) という特異な構造が8時間後に細胞質中に現れ、12時間後にウイルス粒子からなる構造に置換される[47]。この報告はよくウイルスの形成段階を断片的ではあるがとらえており参照されるが、やはり感染早期の模様をとらえておらず、急速に細胞質の大部分を占める電子密度の高い集塊が出現し、前期の特異構造よりもむしろ8時間後に後期の形態像が急に現れたように思われる。ポリオウイルスでは、巨大な結晶が占める例もあるがこれ程の均質な電子密度の高い広範な領域を占める構造物はない。従って

Dense Materials はポリオウイルス群のなかで一般的に前期構造とみなさないで、メソウイルスの後期に観察される特有なものとして便宜上区別して解釈しておこうと著者は考えた。もちろんウイルスと細胞系による違いのなかは結論できない。

コフサッキーウイルスの報告[61, 124, 176]もポリオウイルスとほぼ同様の所見を呈したが、STUART(1961)はポリオウイルスとコフサッキーウイルスの比較を行い、このなかでポリオウイルス感染細胞の細胞質と核内に線維状、顆粒状の核様物質の出現をみた[176]。これはニューキャッスル病ウイルスにみられるNucleoplasma(NC₁)とよく似た形態をとる[180]。著者のネコカリキウイルス感染細胞の8時間後に認めた形態像とよく一致していた。低頻度で出現する構造であるため断定できないが経時的にみまう少なくとも初期構造とはいえず、ウイルス構成成分の集塊がウイルス粒子へ構成されていく中間構造ではな

いかと推察している。この他、人のライノウ
ウイルス〔17、92〕、口蹄疫ウイルス〔18、19〕の
電顕観察があるが、上記の成績と一致するも
のであり、ネコカリキウイルスの感染後期
に示された粗面小胞体の拡大により、生ずる
Complex membranous body、巨大変性ポリゾ
ームの出現、ウイルス粒子像、細胞崩壊によ
るウイルスの細胞外放出等の一連の感染像は
ヒコルナウイルス群と区別できないものであ
り、著者の示したネコカリキウイルスの前駆
構造はポリオウイルスの前駆構造と考えられ
ている遊離ポリゾームと *Viral bleb* の差に
よってはっきり両者を区別できると結論づけ
られる。著者のカリキウイルスの成績とヒコ
ルナウイルスの各メンバーの報告を比較し、
裸の小型RNAウイルスの増殖様式を模式的
に示した(図92)。

核変化は著しく、主な変化は核膜の剥離と
核物質の核周辺への集積であり、一般にウ
イルス感染は宿主細胞の代謝を抑制する〔36、

78]。そのために外膜の剥離が生じたのか、あるいは剥離することによって宿主の代謝抑制を有効に導き、ウイルス増殖を助けることもありうるかもしれないが、いずれも外膜の変化自体はウイルス増殖の初期の段階では積極的役割を持つ構造ではないと考えられる。

ポリオウイルス感染においても核変化は著明であり、HINZ(1962)によって詳細に検討された[73]。メングウイルスと Encephalomyocarditis virus については DALES(1962)の報告がある[47]。これらの核変化はカリキウイルスの観察結果と全く類似した所見を呈するもので、感染後非常に早期に不規則な核形態を示し、あるものは押し出し(Extrusions)と深い陥凹(deep invagination)を示す。核周囲の空隙は大てい膨化し、核は多葉化と同時に大部分が分離した核節になり続いて核容積は著しく縮む。このように全くヒコルナウイルスと区別しえないが、問題にされた核内ウイルス蛋白結晶の出現という尾崎[194]

の報告はカリキウイルスの観察からは見えて
されなかった。

核変化はウイルス合成に積極的役割を持つた
ぬ退行性変化であろうという結論に終始した
が、最近正常細胞において核内で合成された
RNAの輸送には膜が関連しているという示
唆があり〔164〕、これは形態学的にはDNA
から転写されたmRNAは顆粒状、線維状構
造からなる複合体(RNP-network)として
存在し、膜流動により、転写の場から翻訳の
場へ運ばれるという考えである。ウイルスR
NAの複製、転写あるいは輸送は細胞質に限
定されているので、膜とRNAの関連を同一
視することはできないが、技術的に電子顕微
鏡は固定してとらえるので、物質の動きとい
う点に観察しにくい部分があるとも考えられ
る。

4) カリシウイルスの前駆構造の検索

豚の V E V (Vesicular Exanthema Virus of Swine) の電子顕微鏡による観察は最初 ZEE によりなされた [198]。さらに ZEE は 1968 年に詳細な検討を行なった [197]。感染後 4 時間においてウイルス粒子が見出され 7 時間後に Cytoplasmic cisternae に結合してみられた。ウイルス結晶は 8 時間後に観察された。同時期に結晶格子を含む dense aggregates の集積を認め、これを Viroplasmic foci と呼び、DALES の Viroplasma と類似するものであると解釈した [196]。ZEE は DALES の Viroplasma を一応前駆構造と解釈しているようである。彼は Viroplasmic foci が 8 時間後に出現しウイルス結晶と共に感染後期に現れてくるのに対し、感染性ウイルスはそれ以前に形成されているので、ウイルス構成成分が Viroplasmic foci の中で形成されることはないだろうと考え、前駆構造としての役割を否定した。彼は多少矛盾

した見解をとっているが、Viroplasmic foci
 をViroplasmaに相当すると解釈するのが誤
 りであり、Viroplasmic fociの一部にはウ
 イルス粒子が存在しており、両者は全く別の
 ものとするのが妥当と思われる。この構造に
 ついてはメンドウウイルスで示されたDense
 Materialsか、著者のネコカリキウイルスで
 確認したNucleoplasma様構造に関連するも
 のではいかと解釈される。乙EEは結局、豚
 のVEVの系において的確な前駆構造を示し
 得ず、ヒコルナウイルスとの形態学的な相違
 点も見い出すことができなかった。

ネコカリキウイルスの最初の電顕観察によ
 る系統的な研究は1970年にPETERSONが行
 った[137]。Cytoplasmic fibrilsに沿って直
 線状に配列するウイルス粒子、Paracrysta-
 lline aggregateを形成するウイルス粒子像
 Complex membranous bodyという粗面小胞体
 のinvaginationによって生ずる特徴を示した。
 この報告もヒコルナウイルスで認められた形

態所見と一致しており、一方においてウイルスの増殖過程を同調できなかつたため形態像の特徴を述べるにとどまり、連続的な増殖過程を把握しえなかつた。そして、著者が認めた前駆構造については全く触れることができなかった。その他の報告では断片的なものが多く、PETERSONの報告を越えるものはなかつた[108, 121, 178]。その中で、LOVEは核変化に次いで細胞質中の膜に結合した小胞の形成を確認した[108]。特に、Smooth membraneに沿って配列する、又は、集積するウイルス粒子を明確にとらえ、膜の関連を主張した。既知のカリキウイルスの報告の中で、確実な前駆構造とそれに続くassemblyの場をつかみ得なかつたのに対し、著者が明確な前駆構造を示し得たのは、感染像をうまく同調できた点と、出現した形態像が比較的単純であつたため、各時間毎に出現した細胞が示す像も百分率によつて表現しえた結果、前駆構造がウイルス粒子形成へ移行する状況を説明

しえた点によるものである。このカリキウイルスがヒコルナウイルスと形態学的に相違する成績は、ヒコルナウイルスよりもむしろトガウイルスに近い性状を持つことを裏付ける結果であらうと思われる。

本研究は前駆構造に対して主眼が置かれたが、その他、ウイルス放出機構については特別な機構はないという成績を得た。DUNNEB-
ACKER(1969)はポリオウイルスの侵入と放出について従来の Pinocytosis による侵入に対し直接ウイルスが細胞内へ侵入するのを証明するとともに、放出については Vesicle 内のウイルス粒子形成があり、この Vesicle が細胞外に開放し、ウイルスを外部へ放出する新しい放出機構を示した[52]。著者はこの点を考慮したが、そのような放出機構を認めることができなかった。又、吸着・侵入過程についても P T E で感染細胞を剥離する方法を使用しているので本実験において検討できなかった。吸着又カニズムに関するポリオウイルス

の特定は Capsomere subunit と細胞リセプター - の役割 [45, 46, 66, 74, 75, 104, 118, 120] DUNNEBACKE の実験からも、要求される条件として高濃度の均一な精製ウイルスと一定した性質を持つ細胞が必要とされ、今後株細胞による適切な実験系を用いなければならぬ。
 CPE の発現については不明の点が多が、だが、二重鎖 RNA の関与が CORDELL - STEWART (1971) によって示唆された [41]。二重鎖 RNA は細胞のポリペプチドの合成を阻止するようである。これまで代謝を目的とした RNA の研究は多いが [4, 10, 11, 12, 24, 50, 81, 126, 127] CPE の直接の担手として別の意味を持つようになった。今後はさらに代謝等の要因を考慮した形態学的意味づけがなされなければならない。吸着からウイルスの放出までの総括的な増殖過程を表10に一括した。E.E. の結果と多少のズレが認められるが全般的によく同調した動きがうかがえられた [197]。

5) カリキウイルスの蛋白合成様式

カリキウイルスは脱殻後、ウイルスRNAが膜と結合し、遊離ホリゾー4の形式をとらず、膜と結合したままでRNA複製、転写、蛋白合成が行われるのではないかと推論したが、全く想像の域にとどまるところであり、この裏付けは今後の研究に待たねばならない。著者は単に形態学的所見より推定し、批判はあろうが、今日にいたって細胞の蛋白合成に関しても従来の固定した考えと異り、特に粗面小胞体の蛋白合成は膜流動輸送の知見とあいまって多くの新事実による積極的な仮説が述べられている[189]。これらを考慮に入れ関連づけて考察したい。

ホリオウイルス、カリキウイルスのRNA末端のPoly(A)については述べたが、3'末端のPoly(A)部分はウイルスRNAに特有なものではなく、真核細胞のm-RNAにおいてもみられ、このPoly(A)部分は小胞体膜に固定されていると考えられている。

れ故に、ウイルス RNA の 3' 末端の存在はむしろ一般的であり、細胞の m-RNA が膜に結合して固定された状態で翻訳されるモデルが示すようにウイルス RNA の Poly(A) も同様の機能をもち翻訳されると考えても矛盾はないと思われる。一般に粗面小胞体で合成される蛋白は分泌蛋白であって小胞体腔へ移送されると考えられていたが、小胞体腔へ移動しない小胞体膜に蛋白を組み込んで膜動輸送によって移送する可能性が提案された。又、小胞体に結合し細胞質内に移送されてから分泌されるような多様化した蛋白輸送モデルが考えられた。

膜とリボゾームの結合

の仕方についても単紙ではなく、リボゾームと膜が強く結合するものと、ゆるく結合する loose ribosomes 等のモデルが示され

た。後者の loose ribosomes はカリキウイルス前駆構造出現の前段階に、遊離ホリゾームを確認しえたほか、その理由を説明するのに非常に都合のよいモデルではないかと思われる。

すなわち、このようなモデルはカリキウイルスの m-RNA が loose ribosomes の形態をとって膜と結合したままで蛋白を合成するという可能性を強く支持するものであり今後の検討が必要と思われる。一方、カリキウイルスの前駆構造で見られる電子密度の高い顆粒をこの loose ribosomes に結びつけて考えても形態学的所見からは矛盾するものではないようである。

今後の課題は、前駆構造に的を絞って形態学的、生化学的に検討すればさらに興味ある知見が得られるものと考えられる。

V. 総括及び結論

ネフカリキウイルスの増殖に関し、主として形態学研究を行い、次のような結果を得た。

1) 蛍光抗体法によつて感染4時間目から明確な蛍光が認められ、漸次蛍光が増強していった。ウイルス抗原が証明される4時間目には細胞内に感染性ウイルスが生じる時期であり、ポエーロマイシンの蛋白合成阻害作用から脱する時期であった。合成される蛋白種、量についてはいまだ検討されず不明であるが、感染早期2〜3時間の間に重要な蛋白合成過程があると考えられる。

2) ウイルス感染細胞を経時的に電顕観察した。

(1) 出現する細胞の形態像によつて、大まかに6型の細胞に區別された。1型の細胞は細胞質が充実した感があり、ウイルスに感受性がよく残存する。2型3型は膜の発達した末

感染細胞にみられる細胞形態である。4、5
両型は2と3型の細胞にそれぞれ電子密度の
高い主に顆粒状を示す構造物が膜に結合する
特徴を有する。6型はウイルス粒子が認めら
れ結晶配列をする等、前述以外の細胞である。
このようにそれぞれの細胞形態は比較的単純
に區別しうる構造を呈し、一部混合する像が
あるが一つの細胞型に区分することができた。

(2) それぞれの型に分けられた細胞の出現す
る割合の経時的検索の結果、2と3型の膜の
発達した正常な細胞が、4型5型の電子密度
の高い顆粒構造を膜に結合した領域を持つ細
胞へ移行した。この領域はウイルス形成の以
前に現れ、ウイルス粒子の出現とともに減少
する。又この領域以外に著明な形態学的変化
はないので、本構造は特異的な前駆構造と考
えられる。

(3) ポリオウイルス、エコーウイルス等の他
のピコルナウイルスの報告にみられる初期遊
離ポリマーの明確な所見が得られなかった。

それ故、前駆構造として膜と結合したままの状態で、あるいは囲まれてウィルス構成成分を産生し前駆構造がそのままウィルス成熟の場に移行するものと解釈した。

3) 膜の関与は感染後30分の早期に始まり、5時間の長期にわたり持続するので、脱殻後からウィルス粒子の成熟にいたるまでの全過程において膜が関与していると考えられる。

4) 呼吸は直接ウィルス産生に関与しない。

5) 三次元構造から膜上に、又は小鎖状にウィルス subunit 様構造が配列し、それぞれの局所に成熟ウィルスが結合し、集簇を形成する。超薄切片像、ネガティブ染色像の所見から膜がウィルス形成の場として重要であった。

6) ウィルス粒子はCoreの周囲を一層の蛋白質層が包み、もう一層同様の蛋白質層がこれを囲む。中空粒子はこの最外層が残ったもので弱く内層と結合しているようである。

7) カリキウィルスは現在分類学上、一応、ピコルナウィルス科に所属しているが、ウィ

ルス粒子の形態。前駆構造は非常に特徴的な構造を呈しており、多くのポコルナウイルスの形態学的研究の報告にはみられない。それ故、本構造はカリキウイルスに特異的でありカリキウイルス科として独立させる根拠の一つとしての可能性を与える。一方、前駆構造以外の形態学的変化は、ポコルナウイルスとほぼ同様であった。

Ⅶ 謝 辞

稿を終るにあたり、研究の場と機会を与え終始御指導御校閲を賜りました麻布大学 今井信実名誉教授、並びに家畜微生物学教室 田梨 清教授、励ましと御助言を賜りました麻布大学環境微生物学教室 上村知雄教授 本論文作成及び電子顕微鏡操作に際し御指導を賜りました麻布大学家畜病理学教室 斉藤保二教授、野村靖夫助教授、細胞の供与をいただきました麻布大学家畜伝染病学教室 斉藤隆信講師、ウイルス分与をいただきました秋元輝二先生に深謝いたします。さらに麻布大学家畜微生物学教室室員各位に感謝いたします。

VII. 参考文献

- 1) ADLDINGER, H.K., LEE, K.M., and GILLESPIE, J.H., [1969], Extraction of infectious ribonucleic acid from a feline picornavirus. Arch. ges. Virusforsch., 28, 245-247.
- 2) AKERS, T.G., SMITH, A.W., LATHAM, A.B., and WATKINS, H.M., [1973], Calicivirus antibodies in california gray whales (*Eschrichtius robustus*) and steller sea lions (*Eumetopias jupatus*). Arch. ges. Virusforsch., 46, 175-177.
- 3) AKIMOTO, T., TADA, N., HASE, M., HARA, M., TABUCHI, K., and IMAI N., [1973], Studies on feline picornavirus infection. Jour. Vet. Med., 598, 930-937 (in Japanese).
- 4) ALEXANDER, H., KOCH, G., MOUNTAIN, I.M., and DAMME, V.O., [1958], Infectivity of ribonucleic acid from poliovirus in human cell monolayers. J. Exptl. Med., 108, 493-506.
- 5) ALMEDIA, J.D., WATERSON, A.P., PRYDIE, J., and FLETCHER, E.W. L., [1968], The structure of feline picornavirus and its relevance to cubic viruses in general. Arch. ges. Virusforsch., 25, 105-114.
- 6) 天兒和暢、〔1968〕、動物ウイルス感染にともなう宿主細胞の変化——電子顕微鏡による形態学を中心として——、蛋白質・核酸・酵素、13、1126-1135。
- 7) ANDREWS, C.H., [1962], Classification of viruses of vertebrates. Adv. in Virus Reserch, 9, 271-296.
- 8) ARMSTRONG, J.A., EDMONDS, M., NAKAZATO, H., PHILLIPS, B.A., and VAUGHAN, M.H., [1972], Polyadenylic acid sequences in the virion RNA of poliovirus and eastern equine encephalitis virus. Science, 176, 526-528.
- 9) BACHRACH, H.L., and HESS, W.R., [1973], Animal picornaviruses with a single major species of capsid protein. Biophys. Res. Commun., 55, 141-149.
- 10) BALTIMORE, D., and FRANKLIN, R.M., [1962], The effect of mengovirus infection on the activity of the DNA-dependent RNA polymerase of L-cells. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 48, 1383-1390.

- 11) BASES,R., and TARIKAS,H.,[1969] , Encephalomyocarditis virus ribonucleic acid polymerase associated with 150S cytoplasmic particles. J.Virol.,3,623-626.
- 12) BISHOP,J.M., and KOCH,G.,[1969] , Infectious replication intermediate of poliovirus : Purification and characterization. Virology,37,521-534.
- 13) BITTLE,J.L.,YORK,C.H.,NEWBERNE,,J.W., and MARTIN,M., [1960] , Serologic relationship of new feline cytopathogenic viruses..Am.J.Vet.Res.,21,547-546.
- 14) BITTLE,J.L.,EMERY,J.B.,YORK,C.J., and MCMILLEN,J.K., [1961] , Comparative study of feline cytopathogenic viruses and feline panleukopenia virus. Am.J.Vet.Res., 22, 374-378.
- 15) BITTLE,J.L., and RUBIC,W.J.,[1975] , A feline calicivirus vaccine combined with feline viral rhinotracheitis and feline panleukopenia vaccine. Feline Practice, 5, 13-15..
- 16) BITTLE,J.L., and RUBIC,W.J.,[1976] , Immunization against feline calicivirus infection.Am.J.Vet,Res.,37, 275-278.
- 17) BLOUGH,H.A.,TIFFANY,J.M.,GORDON,G., and FIALA,M.,[1969] The effect of magnesium on the intracellular crystallization of rhinovirus.Virology,38,694-712.
- 18) BREESE,S.S., and GRAVES,J.H.,[1966] , Electron microscopic observation of crystalline arrays of foot-and-mouth disease virus. J.Bacteriology,92,1835-1837.
- 19) BREESE,S.S.,[1969], Reactions of intracellular crystals of foot-and-mouth disease virus with ferritin-tagged antibody. J.gen.Virol.,4,343-346.
- 20) BREESE,S.S., and DARDIRI,A.H.,[1977] , Electron microscope observations on a virus transmissible from pinnipeds to swine.J.Gen.Virol.,36,221-225.
- 21) BROWN,F.,NEWMAN,J.,STOTT,J.,,PORTER,A.,FRISBY,D.,NEWTON,C.,CAREY,N., and FELINER,P.,[1974], Poly(C) in animal viral RNAs. Nature,251,342-344.
- 22) BRUNER,D.W., and GILLESPIE,J.H.,[1973] , Hagan's infectious disease of domestic animals.6th ed., Cornell university press,Ithaca and London,1256-1261.

- 23) BUCKLEY, S.M., [1955] , Visualization of poliomyelitis virus by fluorescent antibody. Arch.ges.Virusforsch., 6,388-400.
- 24) BÜRKI, F., and PICHLER, L., [1971] , Further biochemical testing of feline picornaviruses. Arch.ges Virusforsch., 33,126-133.
- 25) BÜRKI, F., [1971] , Virologic and immunologic aspects of feline picornaviruses. J.A.V.M.A., 158,916-919.
- 26) BÜRKI, F., STARUSTKA, B., and RUTTNER, O., [1976] , Attempts to serologically classify feline caliciviruses on a national and an international basis. Infect.& Immun., 14,876-881,
- 27) BURROUGHS, J.N., and BROWN, F., [1974] , Physico-chemical evidence for the re-classification of the caliciviruses. J.Gen.Virol., 22,281-286.
- 28) BURROUGHS, N., DOEL, T., and BROWN, F., [1978] , Relationship of san miguel sea lion virus to other members of the calicivirus group. Intervirology, 10,51-59.
- 29) BUTTERWORTH, B.E., and KORANT, B.D., [1974] , Characterization of the large picornaviral polypeptides produced in the presence of zinc ion. J.Virol., 14,282-291.
- 30) CALIGUIRI, L.A., and TAMM, I., [1970] , The role of cytoplasmic membranes in poliovirus biosynthesis. Virology, 42,100-111.
- 31) CALIGUIRI, L.A., and TAMM, I., [1970] , Characterization of poliovirus-specific structures associated with cytoplasmic membranes. Virology, 42,112-122.
- 32) CALIGUIRI, L.A., and MOSSER, A.G., [1971] , Proteins associated with the poliovirus RNA replication complex. Virology, 46,375-386.
- 33) CALIGUIRI, L.A., TAMM, I., and MOSSER, A.G., [1973], Cytoplasmic membranes in poliovirus RNA replication. Advances in the Biosciences, 11,65-81.
- 34) CALIGUIRI, L.A., [1974] Analysis of RNA associated with the poliovirus RNA replication complexes. Virology, 58,526-535.

- 35) CHAPPUIS, G., and STELLMANN, C., [1974] , Biomathematical system of relationship and dominance for the classification of feline picornavirus. J.Biol.Standard., 2, 319-328.
- 36) CHATTERJEE, N.K., KOCH, G., and WEISSBACH, H., [1973] , Inhibition of protein synthesis in vivo in poliovirus-induced hela cells. Archives of Biochemistry and Biophysics, 154, 431-437.
- 37) COLBY, D.S., FINNERTY, V., and LENARD, J.L., [1974] , Fate of mRNA of L-cells infected with mengovirus. J.Virol., 13, 858-869.
- 38) CONANT, R.M., and HAMPARIAN, V.V., [1968] , Rhinoviruses : Basis for a numbering system I. Hela cells for propagation and serologic procedures. J.Immunol., 100, 107-113.
- 39) CONANT, R.M., and HAMPARIAN, V.V., [1968] , Rhinoviruses : Basis for a numbering system II. Serologic characterization of prototype strains. J.Immunol., 100, 114-119.
- 40) COOPER, P.D., [1961] , A chemical basis for the classification of animal viruses. Nature, 190, 302-305.
- 41) CORDELL-STEWART, B., and TAYLOR, M.W., [1971] , Effect of double-stranded viral RNA on mammalian cells in culture. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A., 68, 1326-1330.
- 42) CRANDELL, R.A., USAF, V.C., and MADIN, S.H., [1960] , Experimental studies on a new feline virus. 21, Am.J.Vet. Res., 551-556.
- 43) CRANDELL, R.A., NIEMANN, W.H., GANAWAY, J.R., and MAURER, F.D., [1960] , Isolation of cytopathic agents from the nasopharyngeal region of the domestic cat. Virology, 10, 283-285.
- 44) CRANDELL, R.A., and GANAWAY, J.R., [1960] , A study of the antigenic relationship between feline and human viruses. Virology, 11, 650-651.
- 45) CROWELL, R.L., [1966] , Specific cell-surface alteration by enteroviruses as reflected by viral-attachment interference. J.Bacteriology, 91, 198-204.
- 46) CROWELL, R.L., and PHILIPSON, L., [1971] , Specific alterations of coxsackievirus B3 eluted from hela cells. J.Virol., 8, 509-515.

- 47) DALES, S., and FRANKLIN, R.M., [1962] , A comparison of the changes in fine structure of L cells during single cycles of viral multiplication, following their infection with the viruses of mengo and encephalomyocarditis. J.Cell Biol., 14, 281-302.
- 48) DALES, S., EGGERS, H.J., TAMM, I., and PALADE, G., [1965], Electron microscopic study of the formation of poliovirus. Virology, 26, 379-389.
- 49) DALTON, A.J., and HAGUENAU, F., [1973] , Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages. Academic press, New York, 133-153.
- 50) DARNELL, J.E., LEVINTOW, L., THORÉN, M.M., and HOOPER, J.L., [1961] , The time course of synthesis of poliovirus RNA. Virology, 13, 271-279.
- 51) DORSH-HÄSLER, K., TOGO, Y., and WIMMER, E., [1975] , Replication of picornaviruses I. Evidence from in vitro RNA synthesis that poly(A) of the poliovirus genome is genetically coded. J.Virol., 16, 1512-1527.
- 52) DUNNEBACKE, T.H., LEVINTHAL, J.D., and WILLIAMS, R.C., [1969] , Entry and release of poliovirus as observed by electron microscopy of cultured cells. J.Virol, 4, 505-513.
- 53) EHRESMANN, D.W., and SCHAFFER, F.L., [1977] , RNA synthesized in calicivirus-infected cells is atypical of picornaviruses. J.Virol., 22, 672-676.
- 54) FABRICANT, C.G., KING, J.M., GASKIN, J.M., GILLESPIE, J.H., [1971] , Isolation of a virus from a female cat with urolithiasis. J.A.V.M.A., 158, 200-201.
- 55) FASTIER, L.B., [1957] , A new feline virus isolated in tissue culture. Amer.J.Vet.Res., 18, 382-389.
- 56) FENNER, F., PEREIRA, H.G., PORTERFIELD, J.S., JOKLIK, W.K., and DOWNIE, A.W., [1974] , Family and generic names for viruses approved by the international committee on taxonomy of viruses. Intervirology, 3, 193.
- 57) FENNER, F., [1976] , The classification and nomenclature of viruses. Arch.Virol., 51, 141-149.
- 58) FENNER, F., [1976] , The classification and nomenclature of viruses. J.Gen.Virol., 31, 463-470.

- 59) FENNER, F., [1976] , The classification and nomenclature of viruses. *Virology*, 71, 371-378.
- 60) FLEWETT, T.H., and DAVIES, H., [1976] , Calicivirus in man. *Lancet*, No. 7954, 311.
- 61) FOGH, J., and STUART, D.C., [1959] , Intracytoplasmic crystalline patterns of coxsackie virus in FL cells. *Virology*, 9, 705-708.
- 62) GILLESPIE, J.H., and JUDKINS, A.B., and KAHN, D.E., [1971] , Feline viruses. XIII. The use of the immunofluorescent test for the detection of feline picornaviruses. *Cornell Vet.*, 61, 172-199.
- 63) GIRARD, M., [1975] , Donneés secentes sur le developpement du polliovirus. *Bull. Institut .Pasteur.*, 73, 17-24.
- 64) GOMATOS, P.J., DALES, I.S., and FRANKLIN, R.M., [1962] Reovirus type III : Physical characteristics and interaction with L cells. *Virology*, 17, 441-454.
- 65) GUSKEY, L.E., and WOLFF, D.A., [1974] , Effects of actinomycin D on the cytopathology induced by poliovirus in HEP-2 cells. *J. Virol.*, 14, 1229-1234.
- 66) GUTTMAN, N., and BALTIMORE, D., [1977] , A plasma membrane component able to bind and alter virions of poliovirus type 1 : Studies on cell-free alterlation using a simplified assay. *Virology*, 82, 25-36.
- 67) HAMPARIAN, V.V., HILLEMANN, M.R., and KETLER, A., [1963] , Contributions to characterization and classification of animal viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112, 1040-1050.
- 68) HARA, M., TAGUCHI, K., WATANABE, M., AKIMOTO, T., and IMAI, N., [1974] , Fundamental studies on the multiplication of feline calicivirus 1. Plaque formation for feline calicivirus direct by agar overlay method. *Bull. Azabu Vet. Coll.*, No. 28, 107-113.
- 69) HARA, M., MATSUMOTO, M., NAITO, T., KOBAYASHI, H., and WATANABE, K., [1976] , Feline calicivirus isolated from the primary tissue culture of feline kidneys. *Bull. Azabu Vet. Coll.*, 1, 99-103.

- 70) HARA,M.,WATANABE,,K.,KOBAYASHI,H.,SATO,Y., and YANAI,Y.,[1977] , A case of recurrent infection of feline viral rhinotracheitis induced by pregnancy. Bull.Azabu Vet.Coll.,2,185-196.
- 71) HERSEY,D.F., and MAURER,F.D.,[1961] , Immunological relationship of feline viruses by complement fixation P.S.E.B.M.,107, 645-646.
- 72) 東 昇、〔1969〕、医学生物学用電子顕微鏡学、文光堂（東京）、99-157.
- 73) HINZ,R.W.,BARSKI,G., and BERNHARD,W.,[1962] , A electron microscopic study of the development of the encephalomyocarditis (EMC) virus propergated in vitro. Experimental cell Research,26,571-586.
- 74) HOLLAND,J.J., and MCLAREN,L.C.,[1959] , The mammalian cell virus relationship II. Adsorption, reception and eclipse of poliovirus by hela cells. J.Exp.Med., 109,487-504.
- 75) HOLLAND,J.J., and MCLAREN,L.C.,[1961] , The location and nature of enterovirus receptor in susceptible cells. J.Exp.Med.,114,161-171.
- 76) HOLM,L.K., and KORANT,B.O.,[1972] , Early interaction of rhinoviruses with host cells. J.Virol.,9,29-40.
- 77) HOLZINGER,E.A., and KAHN,D.E.,[1970] , Pathologic features of picornavirus infections in cats. Am.J.Vet. Res.,31,1623-1630.
- 78) HO,P.P.K., and WASHINGTON,A.L.,[1971] , Evidence for a cellular ribonucleic acid synthesis inhibitor from poliovirus infected hela cells. Biochemistry,10,3646-3650.
- 79) HORNE,R.W.,[1959] , Electron microscope studies of the development and structure of poliomyelitis virus. J. Mol.Biol.,1,333-338.
- 80) HOWES,D.W., and MELNIC,J.,[1957] , The growth of polio-virus in monkey kidney cells 1. Maturation and release of virus in monolayer cultures. Virology,4,97-108.
- 81) HUANG,A.S., and BALTIMORE,D.,[1970], Inhibition of polyribosome formation on poliovirus-infected Hela cells. J.Mol.Biol.,47,275-291.

- 82) JACOBSON, M.F., [1968] , Morphogenesis of poliovirus.
I. Association of the viral RNA with coat protein.
J.Mol.Biol., 33, 369-378.
- 83) JENSEN, M.M., BUELL, D.J., and MCKIM, R.M., [1977] ,
Isolation rates of feline respiratory viruses in local
cat populations. J.Small.Anim.Pract., 18, 659-661.
- 84) KAHN, D.E., and GILLESPIE, J.H., [1971] , Feline viruses:
Pathogenesis of picornavirus infection in the cat. Am.
J.Vet.Res., 32, 521-531.
- 85) KAHN, D.E., HOOVER, E.A., and BITTLE, J.L., [1975] ,
Induction of immunity to feline calicivirus disease.
Infect. & Immun., 11, 1003-1009.
- 86) KAHN, D.E., and HOOVER, E.A., [1976] , Feline caliciviral
disease: Experimental immunoprophylaxis. Am.J.Vet.Res.,
37, 279-283.
- 87) KALLMAN, F., WILLIAMS, R.C., DULBECCO, R., and VOGT, M.,
[1958] , The structure of changes produced in cultured
cells sampled at specified intervals during a single
growth cycle of poliovirus. J.Biophysic. and Biochem.
Cytol., 4, 301-308.
- 88) KALUNDA, M., LEE, K.M., HOLMES, D.F., and GILLESPIE, J.H.,
[1975] , Serologic classification of feline calici-
viruses by plaque-reduction neutralization and immuno-
diffusion. Am.J.Vet.Res., 36, 353-356.
- 89) KAMIZONO, M., KONISHI, S., OGATA, M., and KOBORI, S., [1968],
Studies on cytopathogenic viruses isolated from cats
with respiratory infections 1. Jap.J.Vet.Sci., 30, 197
-206.
- 90) KANAMITSU, M., KASAMAKI, A., OGAWA, M., KASAHARA, S., and
IMAMURA, M., [1967] , Immunofluorescent study on the
pathogenesis of oral infection of poliovirus on monkey.
Japan. J.Med.Sci.Biol., 20, 175-194.
- 91) KAWAMURA, A., [1969] , Fluorescent antibody techniques
and their applications. University of Tokyo press,
Tokyo, 135-137.

- 92) KAWANA, R., and MATSUMOTO, I., [1971] , Electron microscopic study of rhinovirus replication in human fetal lung cells. Japan.J.Microbiol., 15, 207-217.
- 93) 川村 明義、〔1966〕、蛍光抗体法、蛋白質・核酸・酵素、11、1621-1634.
- 94) KIEHN, E.D., and HOLLAND, J.J., [1970] , Synthesis and cleavage of enterovirus polypeptides in mammalian cells. J.Virol., 5, 358-367.
- 95) 木村 孝一、石本 真、〔1970〕、リボソーム、広川書店、東京.
- 96) KLUTH, G.A., [1977] , Safe use of vaccines. Vet.Rec., 100, 249.
- 97) KOSCHEL, K., [1974] , Poliovirus infection and poly(A) sequences of cytoplasmic cellular RNA. J.Virol., 13, 1061-1066.
- 98) KOWALL, N.L., [1975] , The common cold in cats. Modern Vet.Prac., 56, 173-176.
- 99) LEAVELL, H.R., [1957] , The enteroviruses. Am.J.P.H., 47, 1556-1569.
- 100) LEE, K.M., and GILLESPIE, J.H., [1973] , Thermal and pH stability of feline calicivirus. Infect. & Immun., 7, 678-679.
- 101) LEE, K.M., KNIAZEFF, A.J., FABRICANT, C.G., and GILLESPIE, J.H., [1969] , Utilization of various cell culture systems for propagation of certain feline viruses and canine herpesvirus. Cornell Vet., 59, 540-547.
- 102) LEVINTHAL, J.D., DUNNEBACKE, T.H., and WILLIAMS, R.C., [1969] , Study of poliovirus infection of human and monkey cells by indirect immunoferritin technique. Virology, 39, 221-223.
- 103) LEVINTOW, L., THORÉN, M.M., DARNELL, J.E., and HOOPER, J.L., [1962] , Effect of p-fluorophenylalanine and puromycin on the replication of poliovirus. Virology, 16, 220-229.
- 104) LEVITT, N.H., and CROWELL, R.L., [1967] , Comparative studies of the regeneration of hela cell receptors for poliovirus T1 and coxsackievirus B3. J.Virol., 1, 693-700.

- 105) LOVE,D.N.,[1973] , The effect of DEAE-Dextran on the infectivity of a feline calicivirus and its RNA. Arch.ges.Virusforsch.,41,52-58.
- 106) LOVE,D.N.,[1973] , The utilization of zwitterionic buffer system in the plaque assay of a feline calicivirus. AJEBAK,51,263-266.
- 107) LOVE,D.N., and JONES,R.F.,[1974] , Studies on the bouyant density of a feline calicivirus. Arch.ges.Virusforsch.,44,142-143.
- 108) LOVE,D.N., and SABINE,M.,[1975] , Electron microscopic observation of feline kidney cells infected with a feline calicivirus. Arch.Virol.,48,213-228.
- 109) LOVE,D.N.,[1975] , Pathogenicity of a strain of feline calicivirus for domestic kittens. Austral.Vet.J.,51,541-546.
- 110) MACNAUGHTON,M.R., and DIMMOCK,N.J.,[1975] , Polyadenylic acid sequences in rhinovirus RNA species from infected human diploid cells. J.Virol.,16,745-748.
- 111) MADELEY,C.R., and COSGROVE,B.P.,[1976] , Caliciviruses in man. Lancet, No.7952,199-200.
- 112) MAIZEL,J.V., and SUMMERS,D.F.,[1968], Evidence for differences in size and composition of the poliovirus specific polypeptides in infected hela cells. Virology 36,48-54.
- 113) MANDEL,B.,[1962] , The use of sodium dodecyl sulfate in studies on the interaction of poliovirus and hela cells. Virology,17,284-288.
- 114) MATTERN,C.F.T., and DANIEL,W.A.,[1965] , Replication of poliovirus in hela cells : Electron microscopic observation. Virology,26,646-663.
- 115) MAYOR,H.D., and JORDAN,L.E.,[1962] , Formation of poliovirus in monkey kidney tissue culture cells. Virology,16,325-333.
- 116) McCLAIN,M.E.,MADIN,S.H., and ANDRIESE,P.C.,[1954], In vitro cultivation and cytopathogenicity of vesicular exanthema virus. Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,86,771-774.

- 117) McFERRAN, J.B., CLARKE, J.K., and CONNOR, T.J., [1971] ,
The size of some mammalian picornaviruses. J.gen.
Virol., 10, 279-284.
- 118) MCLAREN, L.C., HOLLAND, J.J., and SYVERTON, J.T., [1959] ,
The mammalian cell-virus relationship 1. Attachment
of poliovirus to cultivated cells of primate and
non-primate origin. J.Exp.Med., 109, 475-485.
- 119) MEDAPPA, K.C., McLEAN, C., and RUECKERT, R.R., [1971],
On the structure of rhinovirus 1A. Virology, 44, 259-
270.
- 120) MEDRANO, L., and GREEN, H., [1973] , Picornavirus rece-
ptors and picornavirus multiplication in human-mouse
hybrid cell lines. Virology, 54, 515-524.
- 121) METIANU, T., and VIRAT, J., [1974] , Formations crista-
llines intracytoplasmiques induites par certains virus
isoles chez le chat. Ann.Microbiol., 125A, 477-484.
- 122) 三木 隆、〔1969〕 ウイルスの化学、朝倉書店、東京、141-146.
- 123) MITTELSTAEDT, R., OPPERMANN, H., and KOCH, G., [1975] ,
Poliovirus-induced infectious double-stranded RNA :
Effect of RNA-degrading enzymes. Arch.Virol., 47, 381-
392.
- 124) MORGAN, C., HOWE, C., and RPSE, H.M., [1959] , Intracellular
crystals of coxsackie virus viewed in the electron
microscope. Virology, 9, 145-149.
- 125) NAGAI, Y., [1973] , Metabolic requirements for the
development of hemadsorption activity and virus
formation in BHK-21 cells with newcastle disease virus.
J.Virol., 11, 479-486.
- 126) NAIR, C.N., and OWENS, M.J., [1974] , Preliminary observa-
tions pertaining to polyadenylation of rhinovirus RNA.
J.Virol., 13, 535-537.
- 127) NAYAK, D.P., [1977] , The molecular biology of animal
viruses, .Vol.1, Marcel Dekker, , New York and Basel,
U.S.A., 63-110.
- 128) 日本電子顕微鏡学会関東支部、〔1970〕、電子顕微鏡試料技術集、誠文堂新光社
(東京)、302-391、

- 129) NOBLE, J., KASS, S.J., and LEVINTOW, L., [1969] , Analysis of poliovirus-specific RNA in infected HELA cells by polyacrylamide gel electrophoresis. *Virology*, 37, 537-544.
- 130) 野沢 義則、〔1977〕、ポリエン抗生物質と膜——膜ステロールの意義に関連して——、蛋白質・核酸・酵素、22、115-130.
- 131) NÚÑEZ-MONTIEL, O., and WEIBEL, J., [1960] , Electron microscope study of ECHO 19 virus infection in monkey kidney cells. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 8, 291-292.
- 132) OGLESBY, A.S., SCHAFFER, F.L., and MADIN, S.H., [1971] , Biochemical and biophysical properties of vesicular exanthema of swine virus. *Virology*, 44, 329-341.
- 133) OLSEN, R.G., KAHN, D.E., HOOVER, E.A., SAXE, N.J., and YOHN, D.S., [1974] , Differences in acute and convalescent-phase antibodies of cats infected with feline picornaviruses. *Infect. Immunity.*, 10, 375-380.
- 134) 尾崎良克、安西 隆、〔1968〕、ポリオウイルス感染にともなう細胞内結晶形成について、ウイルス学の進展、92-107.
- 135) PCNV., [1965] , Proposals and recommendations of the provisional committee for nomenclature of viruses. *Ann. Inst. Pasteur.*, 109, 625-637.
- 136) PENMAN, S., BECKER, Y., and DARNELL, J.E., [1964] , A cytoplasmic structure involved in the synthesis and assembly of poliovirus components. *J. Mol. Biol.*, 8, 541-555.
- 137) PETERSON, J.E., and STUDDERT, M.J., [1970] , Feline picornavirus : Structure of the virus and electron microscopic observations on infected cell cultures. *Arch. ges. Virusforsch.*, 32, 249-260.
- 138) PHILLIPS, B.A., [1971] , In vitro assembly of poliovirus II. Evidence for the self-assembly of 14S particles into empty capsids. *Virology*, 44, 307-316.
- 139) PIERCY, S.E., and PRYDIE, J., [1963] , Feline influenza, *Vet. Rec.*, 75, 86-89.
- 140) POLANTNICK, J., and ARLINGHAUS, R.B., [1967] , Effect of actinomycin D on virus-induced ribonucleic acid polymerase formation in foot-and-mouth disease virus infected baby hamster kidney cells. *J. Virol.*, 1, 1130-1134.

- 141) PORTER, A., CAREY, N., and FELINER, P., [1974] , Presence of a large poly(rC) fract within the RNA of encephalomyocarditis virus. *Nature*, 248, 675-678.
- 142) POVEY, R.C., WARDLEY, R.C., and JESSEN, H., [1973] , Feline picornavirus infection : The in vivo carrier state. *Vet.Rec.*, 92, 224-229.
- 143) POVEY, R.C., and HALE, C.J., [1974] , Experimental infections with feline caliciviruses (Picornaviruses) in specific-pathogen-free kittens. *J.Comp.Path.*, 84, 245-256.
- 144) POVEY, R.C., [1974] , Serological relationships among feline caliciviruses. *Infection and Immunity*, 10, 1307-1314.
- 145) POVEY, C., [1976] , Viral diseases of cats: current concepts. *Vet.Rec.*, 98, 293-299.
- 146) POVEY, R.C., and WILSON, M.R., [1978] , A comparison of inactivated feline viral rhinotracheitis and feline caliciviral disease vaccines with live-modified viral vaccines. *Feline Practice*, 8, 35-42.
- 147) PRATO, C.M., AKERS, T.G., and SMITH, A.W., [1974] , Serological evidence of calicivirus transmission between marine and terrestrial mammals. *Nature*, 249, 255-256.
- 148) PRATO, C.M., AKERS, T.G., and SMITH, A.W., [1977] , Calicivirus antibodies in wild fox populations. *J.Wildl Dis.*, 13, 448-450.
- 149) PRYDIE, J., [1966] , Viral diseases of cats. *Vet.Rec.*, 79, 729-734.
- 150) REISSIG, M., HOWES, D.W., and MELNICK, J.L., [1956] , Sequence of morphological changes in epithelial cell cultures infected with poliovirus. *J.Exp.Med.*, 104, 289-304.
- 151) REKOSH, D., [1972] , Gene order of the poliovirus capsid proteins. *J.Virol.*, 9, 479-487.
- 152) RIFKIND, R.A., GODMAN, G.C., HOWE, C., MORGAN, C., and ROSE, H.M., [1960] , ECHO 9 virus in tissue culture observed by light and electron microscopy. *Virology*, 12, 335-347.

- 153) RIFKIND, R.A., GODMAN, G.C., HOWE, C., MORGAN, C., and ROSE, H.M., [1961], Structure and development of viruses as observed in the electron microscope VI. ECHO virus, type 9. J.Exp.Med., 114, 1-12.
- 154) RÖDER, A., and KOSCHEL, K., [1974], Reversible inhibition of poliovirus RNA synthesis in vivo and in vitro by viral products. J.Virol., 14, 846-852.
- 155) ROY, P., and BISHOP, D.H.L., [1970], Isolation and properties of poliovirus minus strand ribonucleic acid, J.Virol., 6, 604-609.
- 156) SABINE, M., [1970], Isolation of a feline picornavirus from cheetahs with conjunctivitis and glossitis. Vet.Rec., 87, 794-796.
- 157) 斎藤隆信、管野康則、〔1977〕、豚腎由来株化細胞 IBRS2のコクサッキー B群ウイルスに対する感受性、第25回日本ウイルス学会総会演説抄録、大阪、159.
- 158) SATKIN, A.J., [1962], Actinomycin inhibition of ribonucleic acid synthesis and poliovirus infection of hela cells. Biochim.Biophys.Acta., 61, 310-313.
- 159) SAWYER, J.C., [1976], Vesicular exanthema of swine and san miguel sea lion virus. J.A.V.M.A., 169, 707-709.
- 160) SCHAFFER, F.L., and SOERGEL, M.E., [1973], Biochemical and biophysical characterization of calicivirus isolates from pinnipeds. Intervirology, 1, 210-219.
- 161) SCHARFF, M.D., THOREN, M.M., McELVAIN, N.F., and LEVINTOW, L., [1963], Interruption of poliovirus RNA synthesis by p-fluorophenylalanine and puromycin. Biochemical and Biophysical Research Communications, 10, 127-132.
- 162) SCOTT, C.E., [1977], Vaccination program. Feline Practice, 7, 34.
- 163) SCOTT, F.W., [1977], Evaluation of a feline viral rhinotracheitis-feline calicivirus disease vaccine. Am.J.Vet. Res., 38, 229-234.
- 164) 塩川光一郎、〔1976〕、真核細胞のm-RNA輸送機構における膜系の役割、蛋白質・核酸・酵素、21、511-524。
- 165) SHOEMAKER, A.C., SCHAFFER, F.L., and MADIN, S.H., [1963], Purification and properties of vesicular exanthema of swine virus. Bacteriol.Proc., 16, 130.

- 166) SIMON, K.B., and BOULGER, D.M., [1969] , Poliovirus crystals within the endoplasmic reticulum of endothelial and mononuclear cells in the monkey spinal cord.. Science, 163, 1336-1337.
- 167) SKINNER, M.S., HALPEREN, S., and HARKIN, J.C., [1968] , Cytoplasmic membrane-bound vesicles in echovirus 12 infected cells. Virology, 36, 241-253.
- 168) SMITH, A.W., AKERS, T.G., MADIN, S.H., and VEDROS, N.A., [1973] , San miguel sea lion virus isolation, preliminary characterization and relationship to vesicular exanthema of swine virus. Nature, 244, 108-109.
- 169) SMITH, A.W., and AKERS, G., [1976] , Vesicular exanthema of swine. J.A.V.M.A., 169, 700-703.
- 170) SMITH, A.W., PRATO, C., and SKILLING, D.E., [1978] , Caliciviruses infecting monkeys and possibly man. Am.J.Vet.Res., 39, 287-289.
- 171) SMITH, A.W., and LATHAM, A.B., [1978] , Prevalence of vesicular exanthema of swine antibodies among feral mammals associated with the southern california coastal zones. Am.J.Vet.Res., 39, 291-296.
- 172) SPECTOR, D.H., and BALTIMORE, D., [1975] , Poly(A) on mengovirus RNA. J.Virol., 16, 1081-1084.
- 173) SPECTOR, D.H., VILLA-KOMAROFF, L., and BALTIMORE, D., [1975] , Studies on the infection of polyadenilic acid on poliovirus RNA. Cell, 6, 41-44.
- 174) SPRADBROW, P.B., BAGUST, T.J., BURGESS, G., and PORTAS, B., [1970] , The isolation of picornaviruses from cats with respiratory disease. Austral.Vet.J., 46, 105-108.
- 175) STUART, D.C., and FOGH, J., [1959] , Electron microscopic demonstration of intracellular poliovirus crystals. Exptl.Cell Res., 18, 378-381.
- 176) STUART, D.C., and FOGH, J., [1961] , Micromorphology of FL cells infected with polio and coxsackie viruses. Virology, 13, 177-190.
- 177) STUDDERT, M.J., MARTIN, M.C., and PETERSON, J.E., [1970] , Viral diseases of the respiratory tract of cats : Isolation and properties of viruses tentatively classified as picornaviruses. Am.J.Vet.Res., 31, 1723-1732.

- 178) STUDDERT, M.J., and O'SHEA, J.D., [1975], Ultrastructural studies of the development of feline calicivirus in a feline embryo cell line. Arch.Virol., 48, 317-325.
- 179) SUMMERS, D.F., SHAW, E.N., STEWART, M.L., and MAIZEL, J.V., [1972] , Inhibition of cleavage of large poliovirus-specific precursor proteins in infected hela cells by inhibitors of proteolytic enzymes. J.Virol., 10, 880-884.
- 180) 田島 正典、工藤 雄一、工藤 悟、〔1977〕、ニューカスル病ウイルス感染培養細胞における核内ヌクレオカプシッドの証明、日獣誌、39、521-530.
- 181) TAKAHASHI, E., KONISHI, S., and OGATA, M., [1971] , Studies on cytopathogenic viruses from cats with respiratory infections. II. Characterization of feline picornaviruses. Jap.J.Vet.Sci., 33, 81-87.
- 182) 高橋 満、〔1971〕、蛍光抗体法、北里メデイカルニュース、18、1-33.
- 183) TAMM, I., and EGGERS, H.J., [1962] , Differences in the selective virus inhibitory action of 2-(α -hydroxybenzyl)-benzimidazole and guanidine HCl. Virology, 18, 439-447.
- 184) TANAKA, Y., SUGIMURA, M., HARA, M., INABA, Y., KUROGI, H., OMORI, T., [1975] , Simple method for titration and neutralization test of bovine viral diarrhea virus with microplate Bull.Natl.Inst.Anim.Hlth., 70, 7-13.
- 185) TAN, R.J.S., and MILES, J.A.R., [1971] , Further studies on feline respiratory virus diseases 1. vaccination experiments 2. immunodiffusion tests. New Zealand Veterinary Journal, 19, 12-18.
- 186) TAN, R.J.S., [1970] , Serological comparisons of feline respiratory viruses. Japn.J.Med.Sci.Biol., 23, 419-424.
- 187) THACH, S.S., DOBBERTIN, D., LAWRENCE, C., GOLINI, F., and THACH, R.E., [1974] , The mechanism of viral replication Structure of replication complexes of encephalomyocarditis virus. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A., 71, 2549-2553.
- 188) TRAUT, R.R., and MONRO, R.E., [1964] , The puromycin reaction and its relation to protein synthesis. J.Mol.Biol., 10, 63-72.

- 189) 田代 裕、〔1977〕、粗面小胞体におけるたん白合成——最近の話題を中心にして——、細胞、9、11-30。|
- 190) WARDLEY, R.C., and POVEY, R.C., [1976] , The clinical disease and patterns of excretion associated with three different strains of feline caliciviruses. Res. Vet.Sci., 23, 7-14.
- 191) WARDLEY, R.C., [1976] , Feline calicivirus carrier state A study of the host/virus relationship. Arch.Virol., 52, 243-249.
- 192) WARDLEY, R.C., and POVEY, R.C., [1977] , The pathology and sites of persistence associated with three different strains of feline calicivirus. Res.Vet.Sci., 23, 15-19.
- 193) WAWRZKIEWICZ, J., SMALE, C.J., and BROWN, F., [1968] , Biochemical and biophysical characteristics of vesicular exanthema virus and the viral ribonucleic acid. Arch.ges Virusforsch., 25, 337-351.
- 194) WILDY, P., [1971] , Classification and nomenclature of viruses. First report of the international committee on nomenclature of viruses. Monogr.Virol., 5, Karger:Basel, NY.
- 195) YOGO, Y., and WIMMER, E., [1972] , Poliadenylic acid at the 3'-terminus of poliovirus RNA. Proc.Nat.Acad.Sci.USA., 69, 1877-1882.
- 196) ZEE, Y.C., HACKETT, A.J., and MADIN, S.H., [1968] ; Electron microscopic studies on vesicular exanthema of swine virus : Intracytoplasmic viral formation in cultured pig kidney cells. Am.J.Vet.Res., 29, 1025-1032.
- 197) ZEE, Y.C., HACKETT, A.J., and TALENS, L.T., [1968] , Electron microscopic studies on the vesicular exanthema of swine virus. Virology, 34, 596-607.
- 198) ZEE, Y.C., TALENC, L., and HACKETT, A.J., [1967] , Localization of a small ribonucleic acid virus within cytoplasmic cisternae. J.Virol., 1, 1271-1273.
- 199) ZWILLENBERG, L.O., and BÜRKI, F., [1966] , On the capsid structure of some small feline and bovine RNA viruses. Arch.ges.Virusforsch., 19, 373-384.

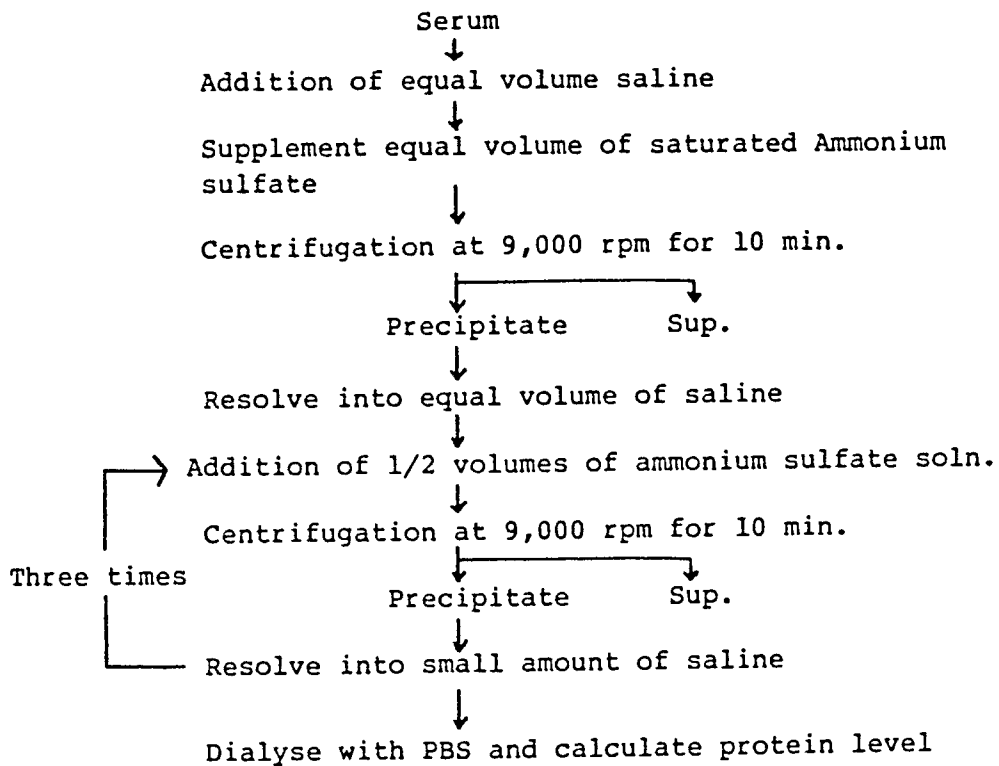


Fig.1.Purification of Y-Globulin.

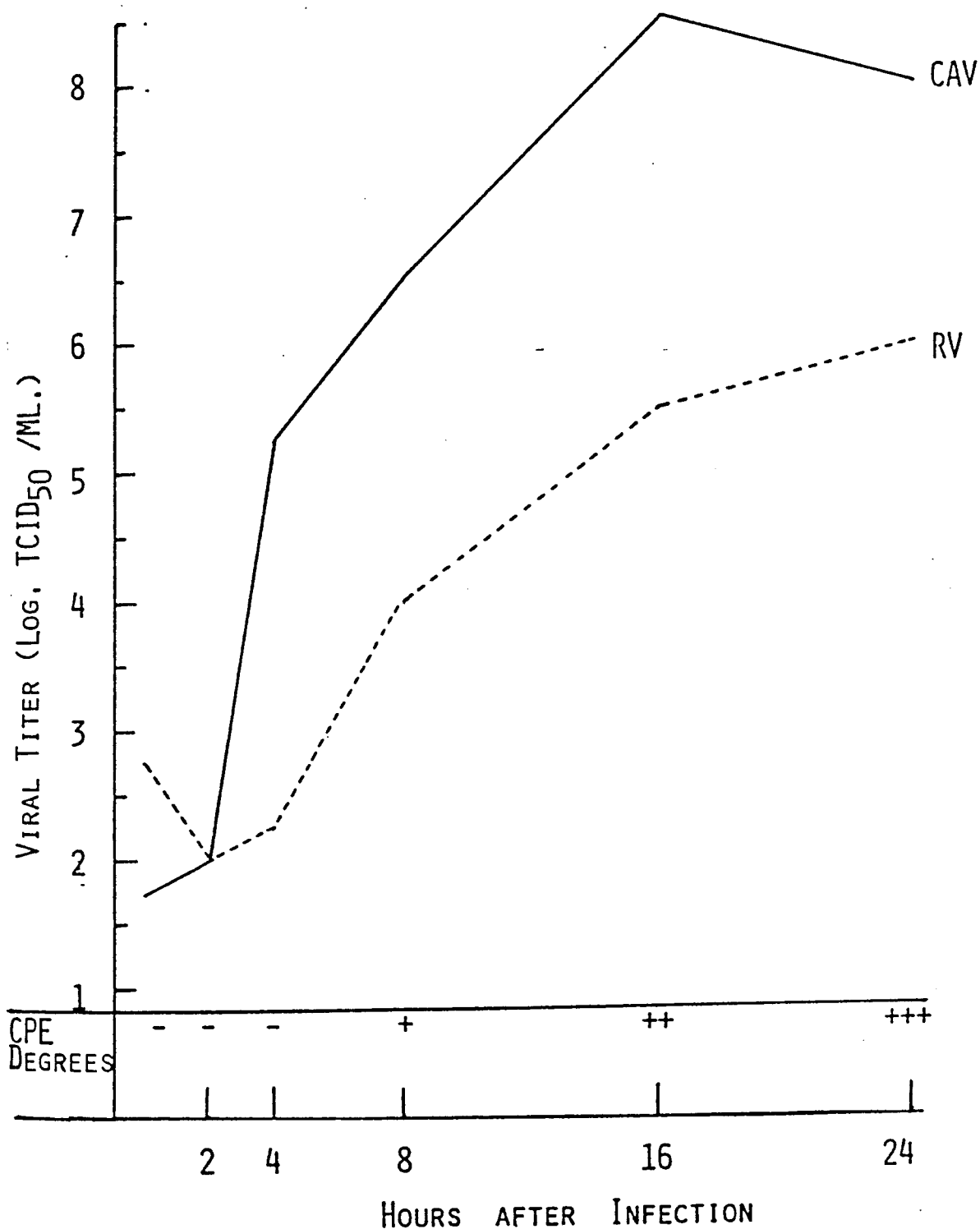
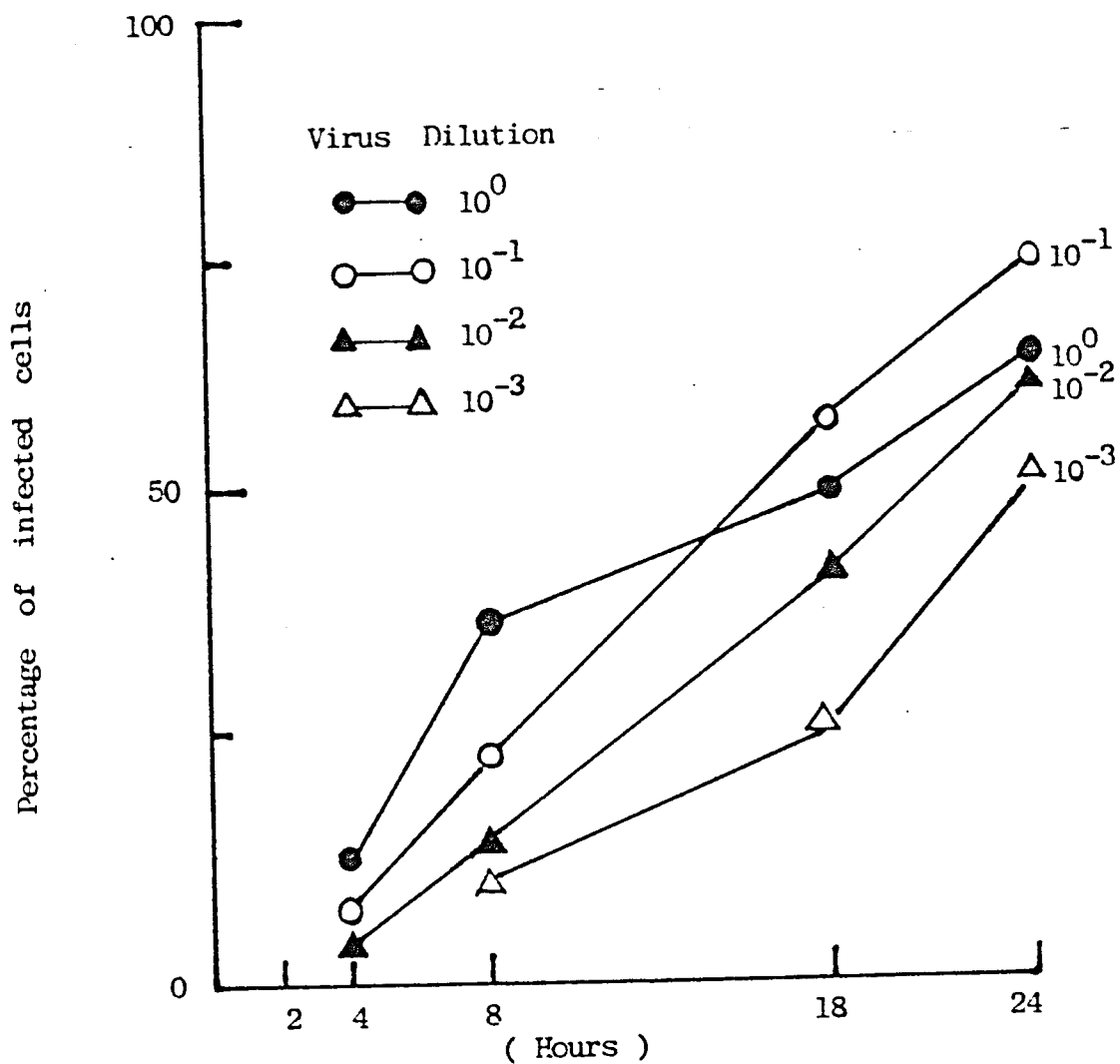


Fig.2. Growth Curve of Feline Calicivirus.

RV: released viral dose in 0.1 ml of maintenance medium.
 CAV: Cell associated virus was detected after three times freezing and thawing in addition of 3 ml PBS . CAV have been found at 4 hours after the inoculation and reached to the peak at 16 hours.



Examinations	Relative dose of virus	Time (hours) after the inoculation					
		0	2	4	8	18	24
C P E	10^0	-	-	-	+	++	+++
	10^{-1}	-	-	-	+	+	++
	10^{-2}	-	-	-	-	+	+
	10^{-3}	-	-	-	-	+	+
	10^{-4}	-	-	-	-	-	-
Specific fluorescence	10^0	-	+	+	++	++	+++
	10^{-1}	-	+	+	+	++	++
	10^{-2}	-	+	+	+	++	++
	10^{-3}	-	+	+	+	+	+
	10^{-4}	-	-	-	-	-	-

$10^0 = 30 \times 10^5$ PFU/ml.

Fig. 3 Periodic rate of the cells infected with Feline Calicivirus and comparison of CPE and specific viral fluorescent degrees.

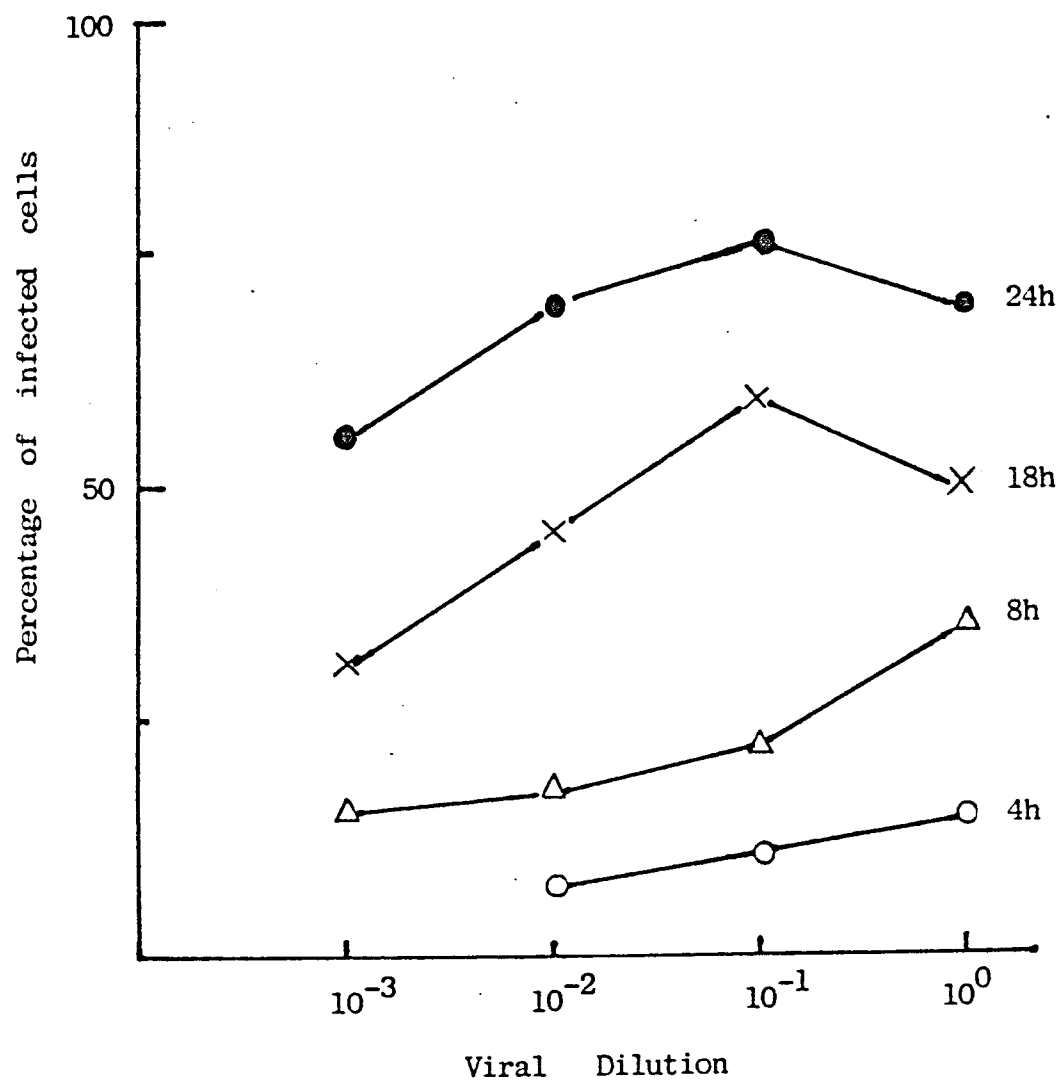


Fig. 4 Relationship between viral inoculum sizes ($10^0 = 30 \times 10^5$ PFU/ml.) and their infected cells.











Hours after viral inoculation	CPE degrees	Developmental patterns of specific fluorescence
0	-	
1	-	
2	-	
3	-	
4	+	
5	++	
6	++	
8	+++	
10	+++	
12	+++	

Fig. 5 . Relationship between the appearance of CPE and viral antigen detected by fluorescent antibody technique.

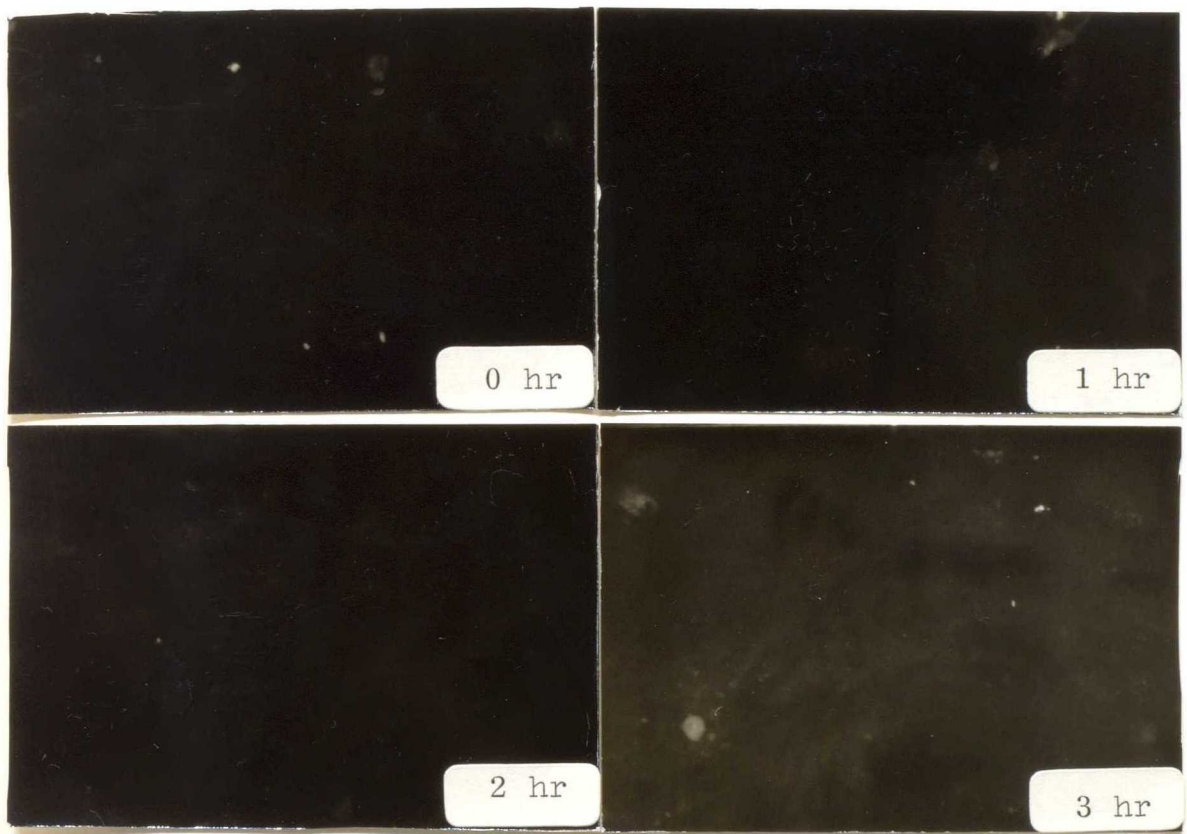


Fig. 6 . Observations at 0,1,2 and 3 hours after Feline calicivirus infection(Mag.400). All stained cells did not show any specific fluorescence.

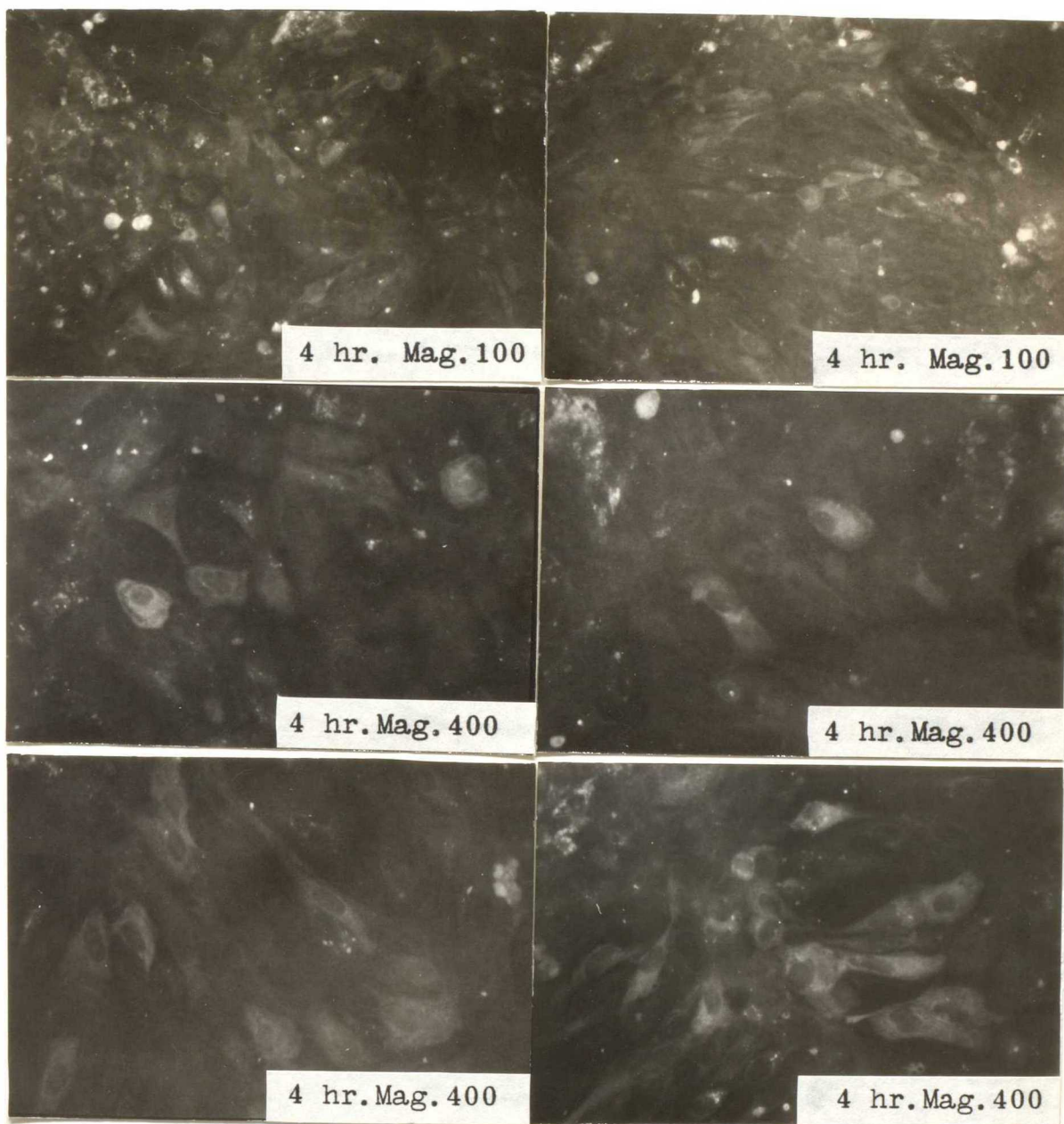


Fig. 7 . First specific fluorescence was found at 4 hours after infection , the weak blight was limited in the cytoplasm of Feline calicivirus infected cells.

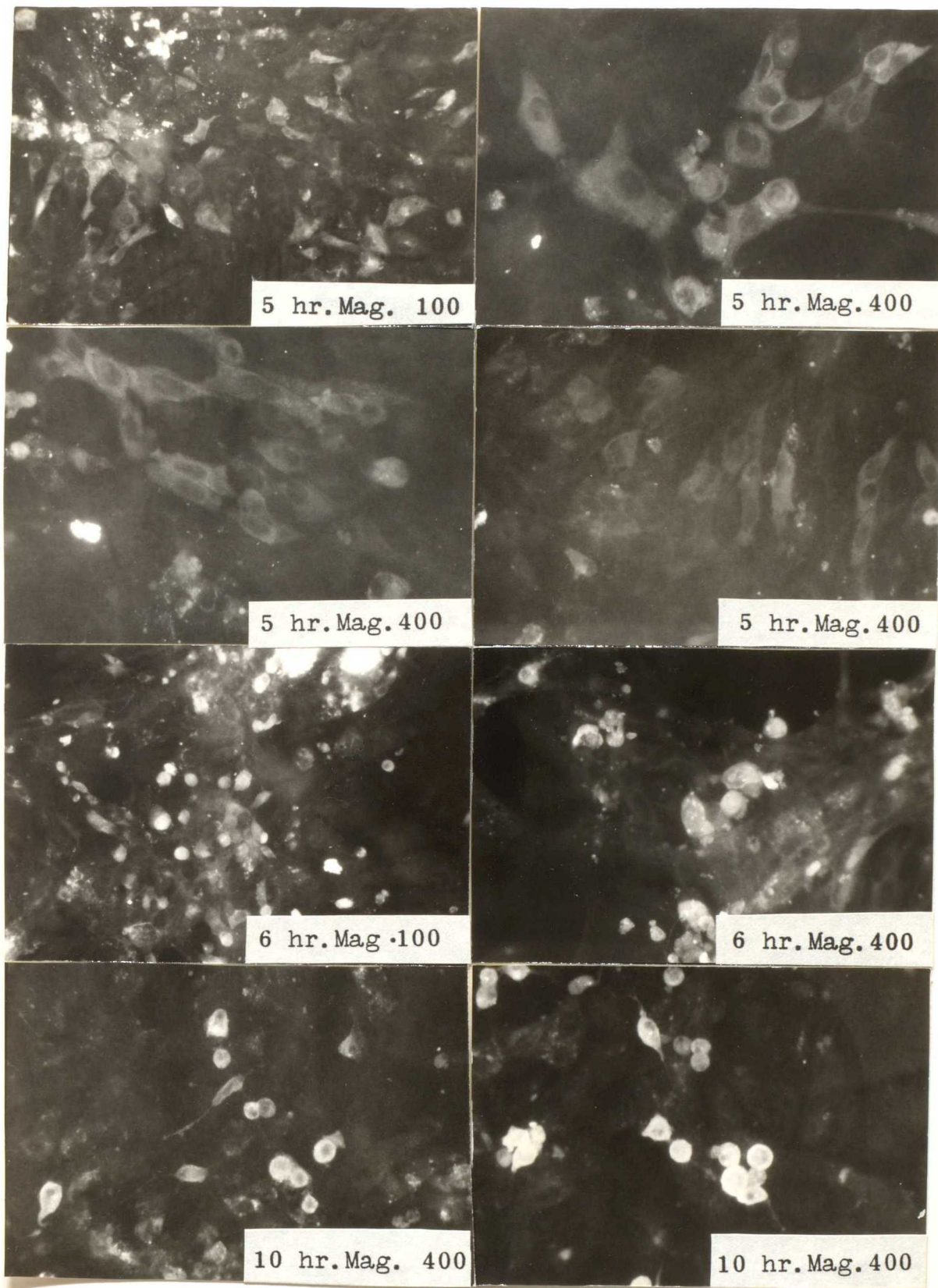


Fig. 8 . The present fluorecence increased the blightness with times and varied the shapes such as small granular, fibrinous, and rounding pictures.

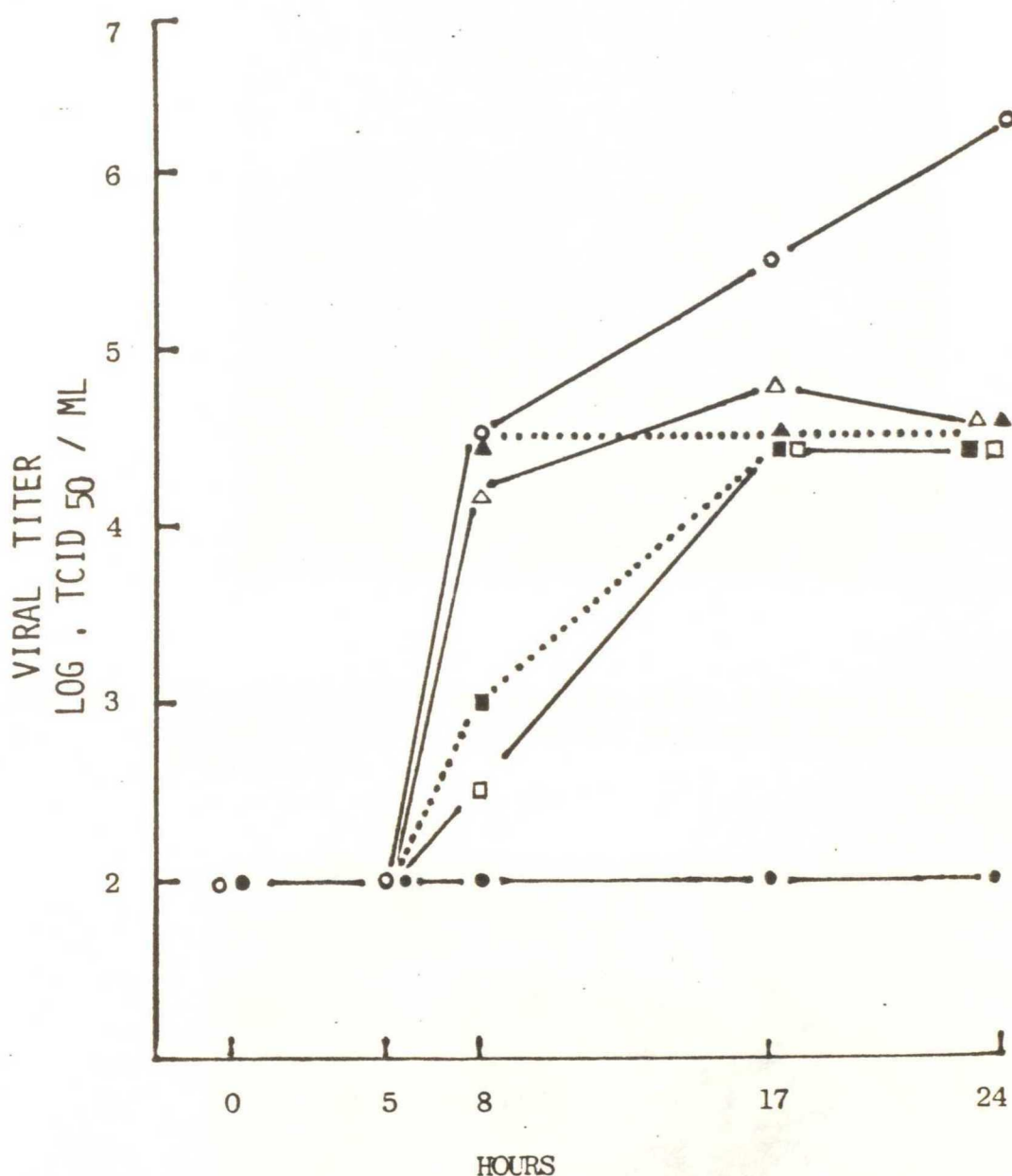


Fig. 9 . Determination of the effect of Puromycin on the growth of FCV, the tested media which were supplemented by 10 μ g puromycin per ml were adsorbed at 4 C for three hours and after there removed at 0, 0.5, 1, 2, and 3 hours. 0 (○), 0.5 (△), 1 (▲), 2 (□), 3 (■), and no removed (●).

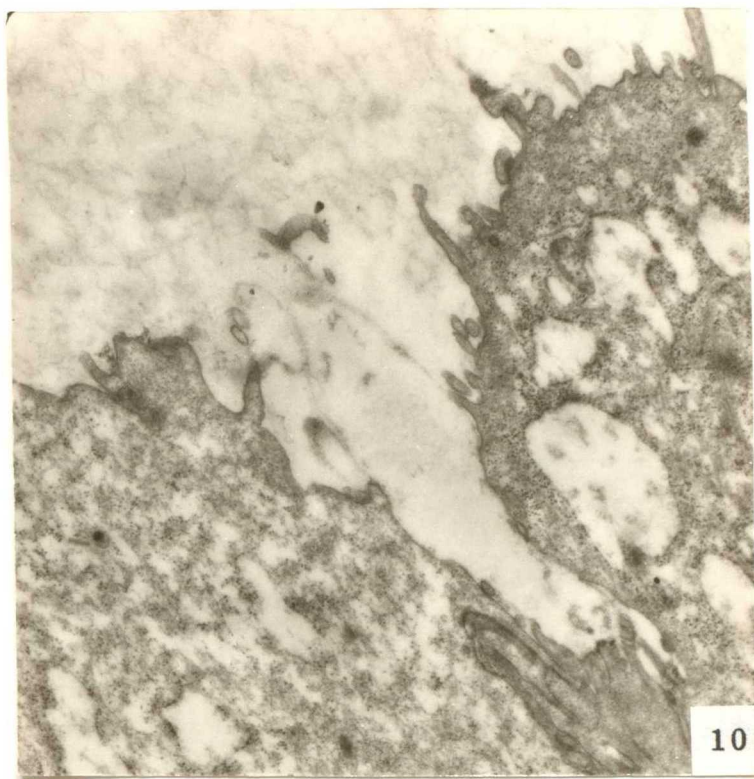


Fig.10. Characteristic structure with microvilli found on the surface of normal feline kidney cells. Mag.15,000.

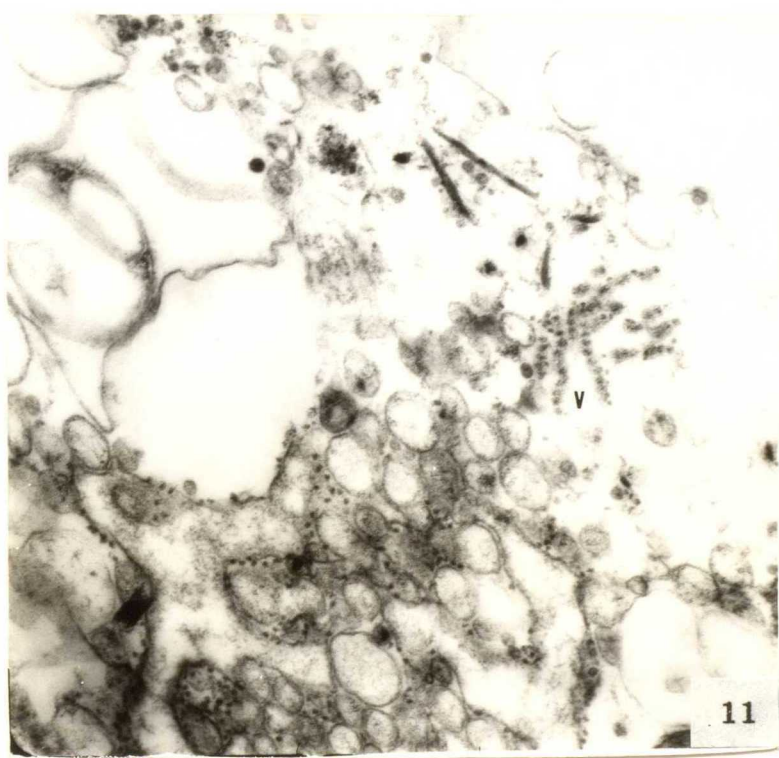
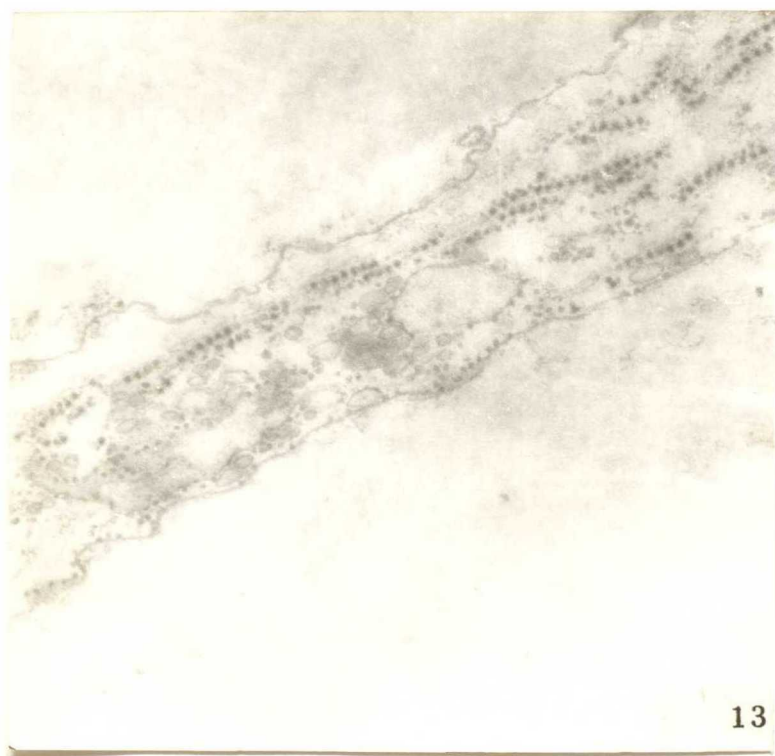
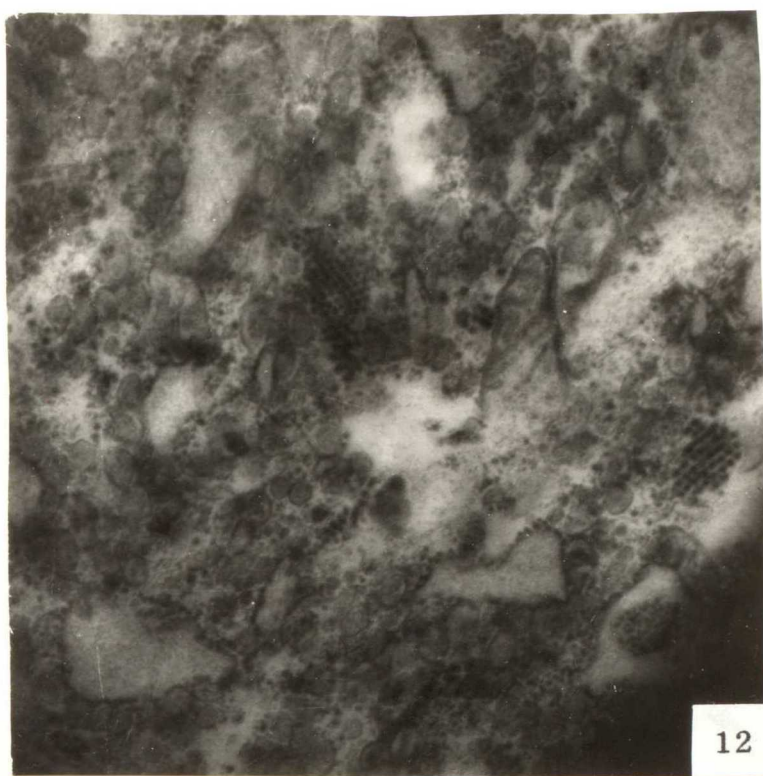
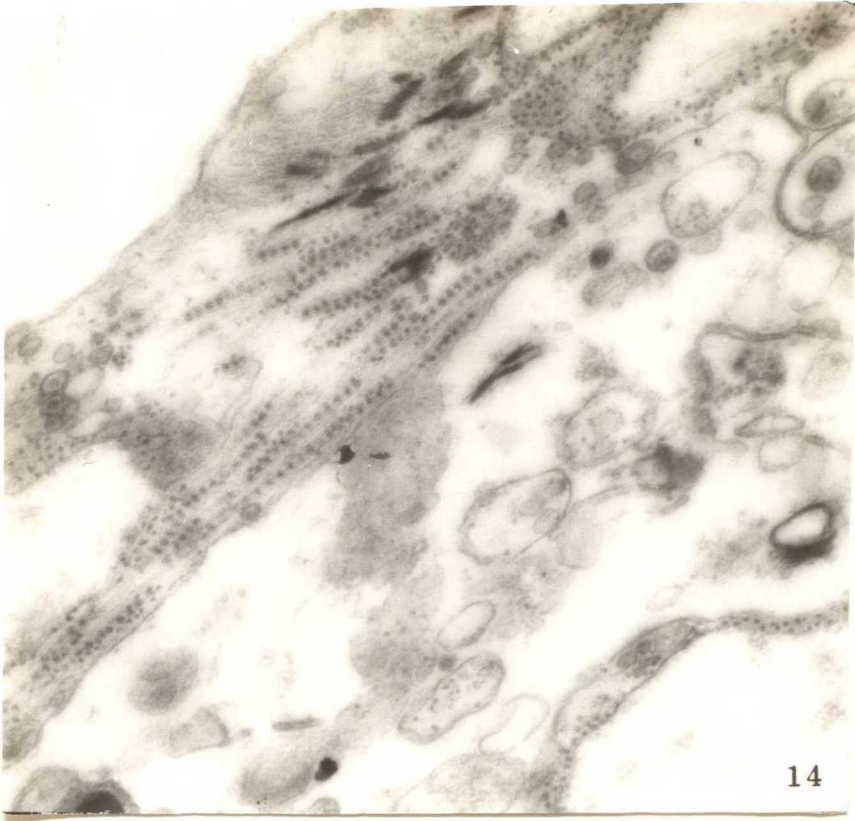


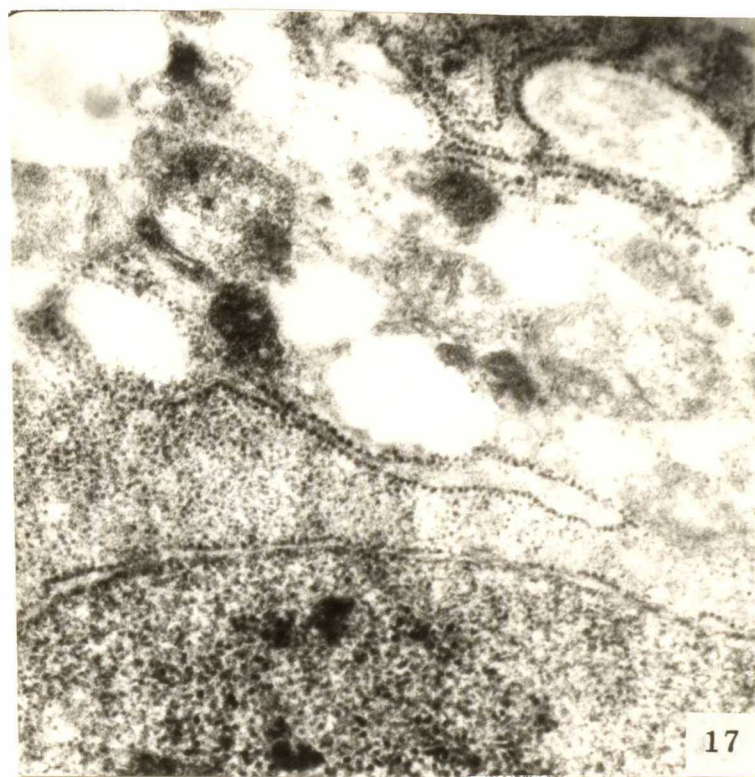
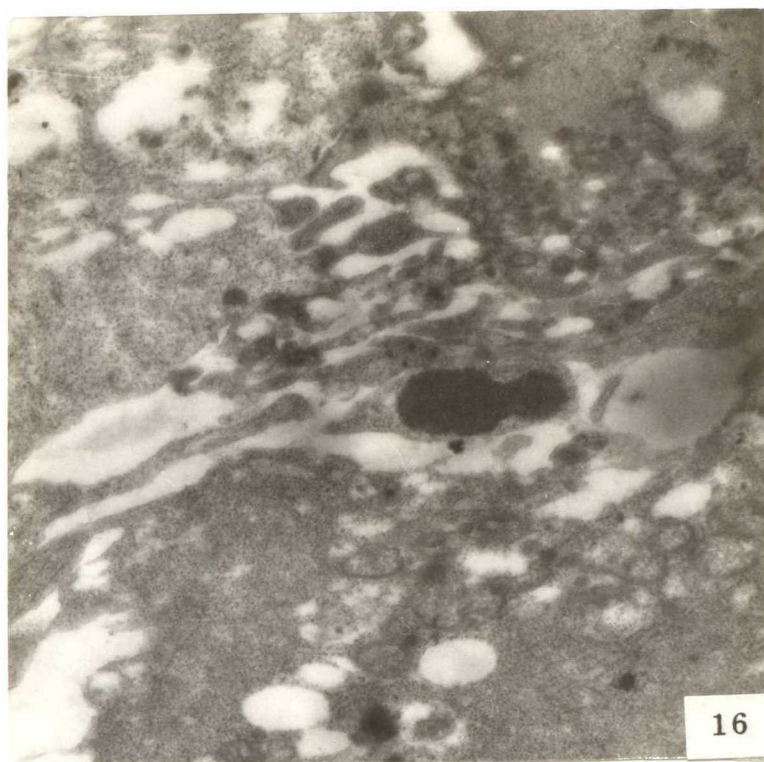
Fig.11. No pretreatment with Puromycin. In the control cells infected with Feline calicivirus, viral particles formed to arrange linealy. Mag.33,000.



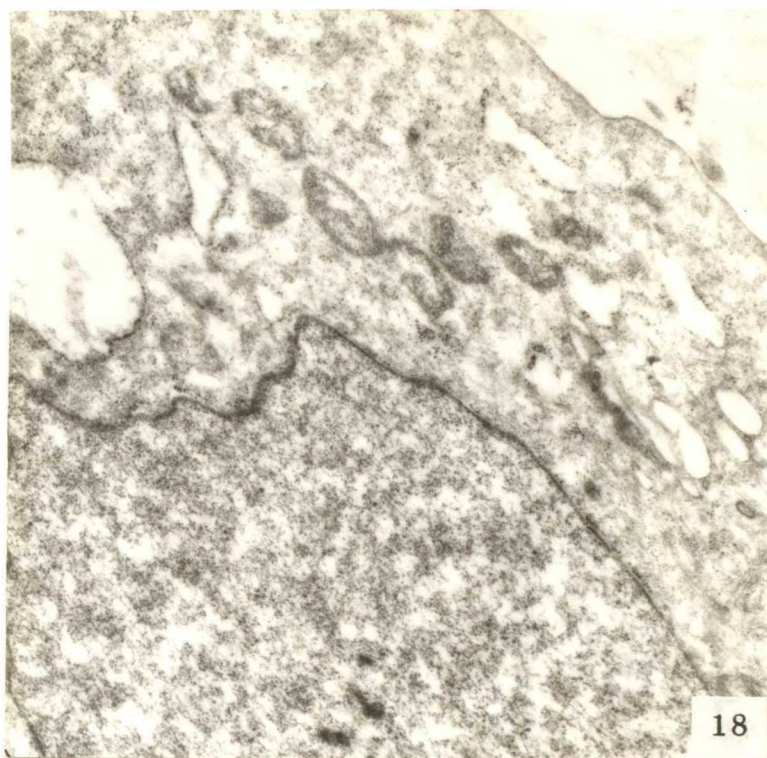
Figs.12,13. Infection of Feline calicivirus in the cells treated with Puromycin (10 $\mu\text{g/ml}$) for 3 hours. Viral crystalline(Fig.12) and linearly arranged viruses(Fig.13) were observed. Mag.33,000.



Figs.14,15. Infection of Feline calicivirus in the cells treated with Puromycin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Linearly arranged viruses (Fig.14) and complex membraneous bodies (Fig.15) were observed. Mag.33,000.



Figs.16,17,18. Infection of Feline calicivirus in the cells treated with Puromycin ($10\mu\text{g}/\text{ml}$). Most Cytoplasmic membranes were disappeared (Fig.16) partial remnant of rough endoplasmic reticulum (Fig.17) and rarely complete cells were remained with the mitochondria (Fig.18).Mag.15,000.



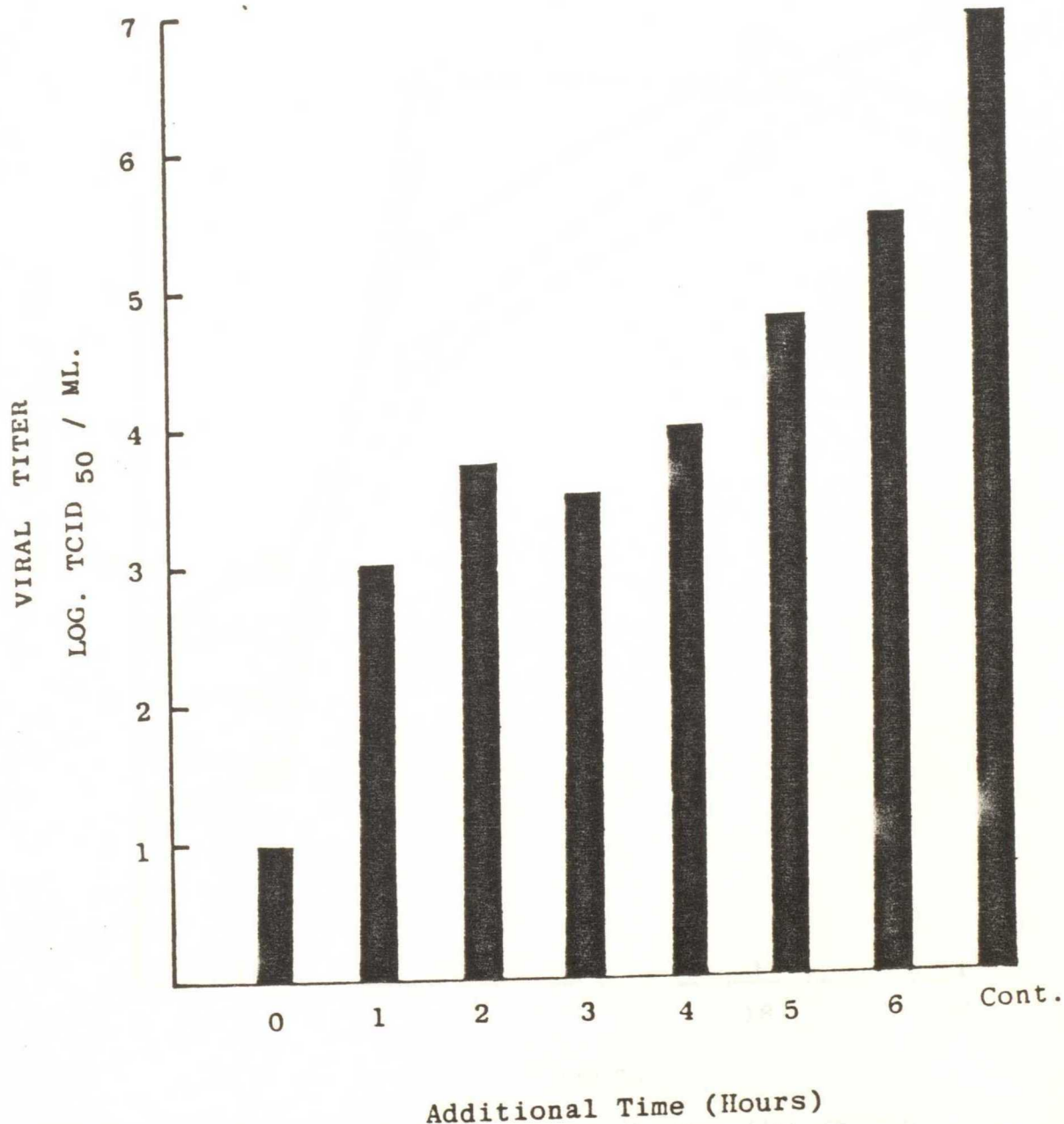


Fig.19. Influence of addition time of Puromycin to cultured cells upon the viral yield of Feline calicivirus after 24 hours incubation.

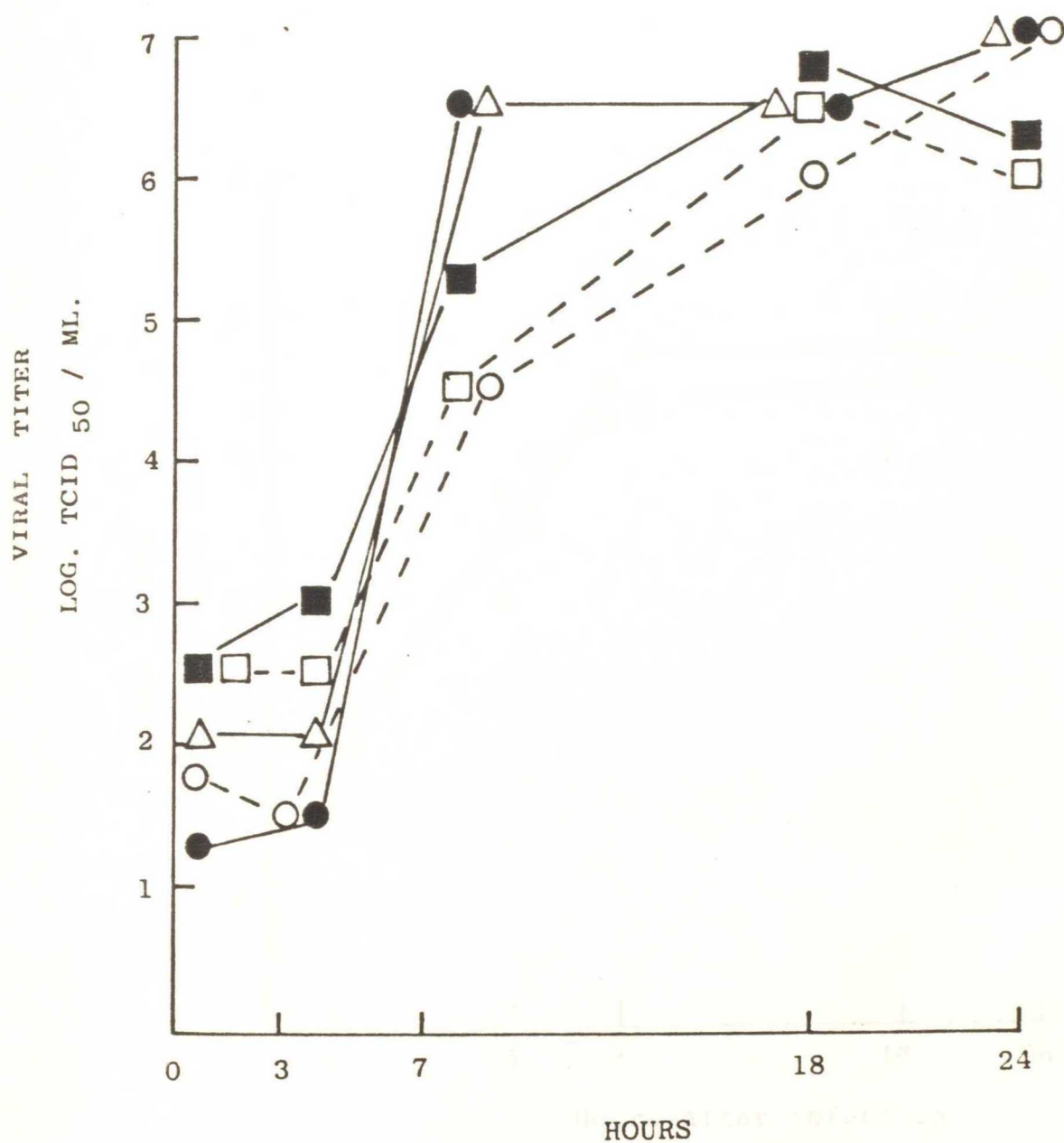


Fig.20. Influence of Actinomycin D upon the growth curve of Feline calicivirus. Concentration: of Actinomycin D : 0.05 $\mu\text{g/ml}$ (Δ), 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (\square & \blacksquare), Control (\circ & \bullet).

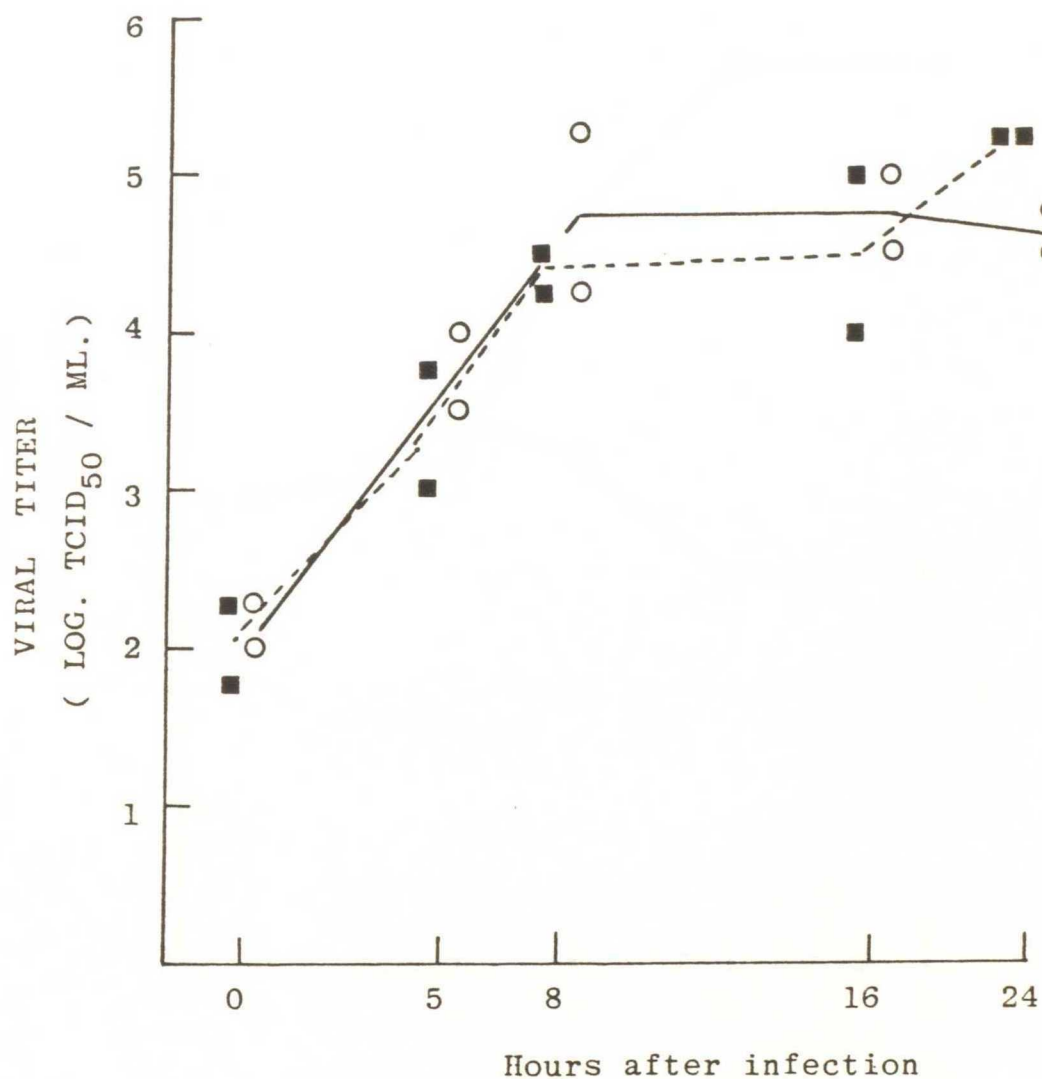


Fig.21. Influence of HBB upon the growth curve of Feline calicivirus, 219 μ M of HBB (■-■), Control (○-○).

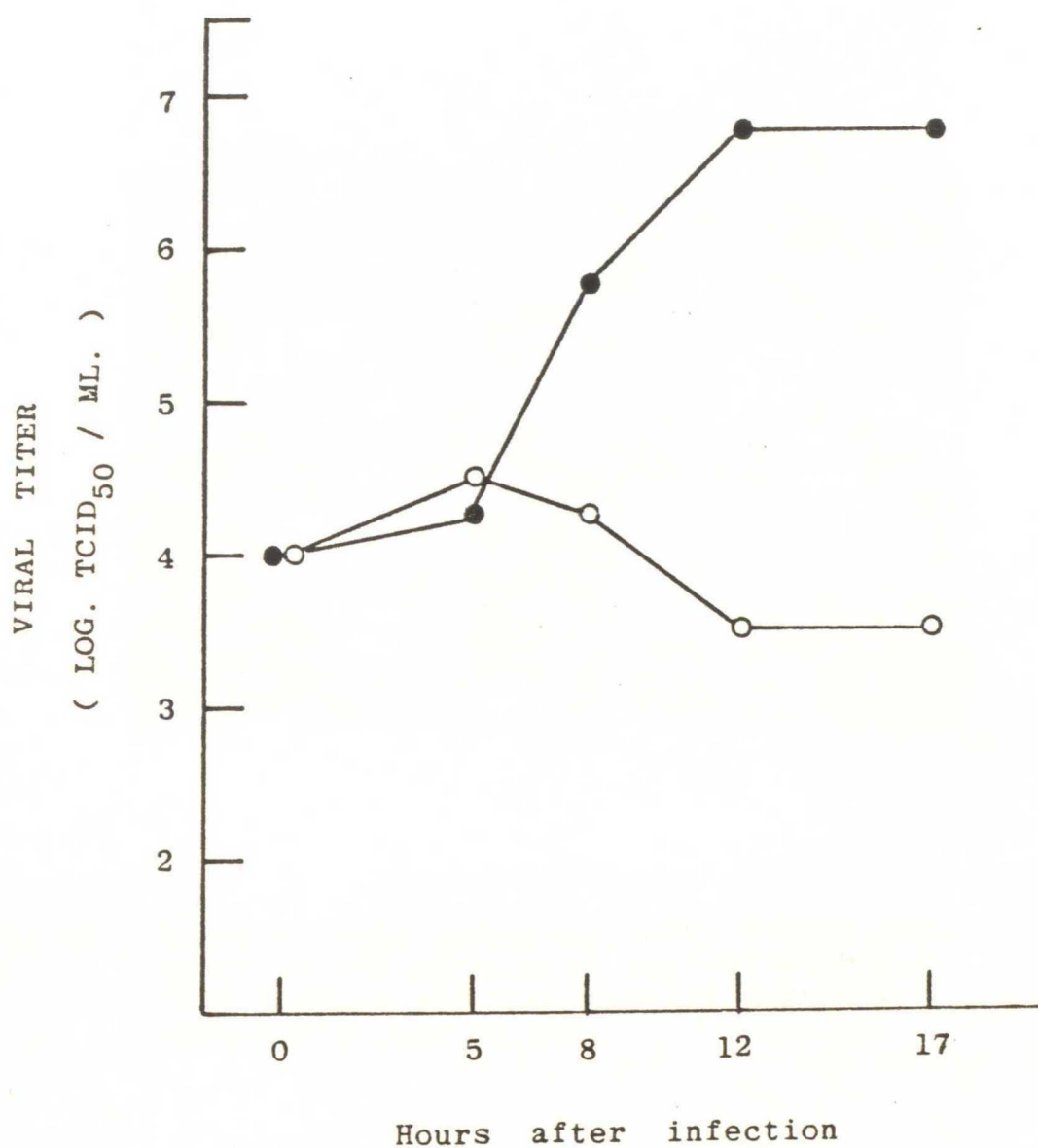


Fig.22. Influence of HBB upon the growth curve of Cocksackie-4B infected to IB-RS-2 cells, 219 μ M (○—○), Control (●—●).

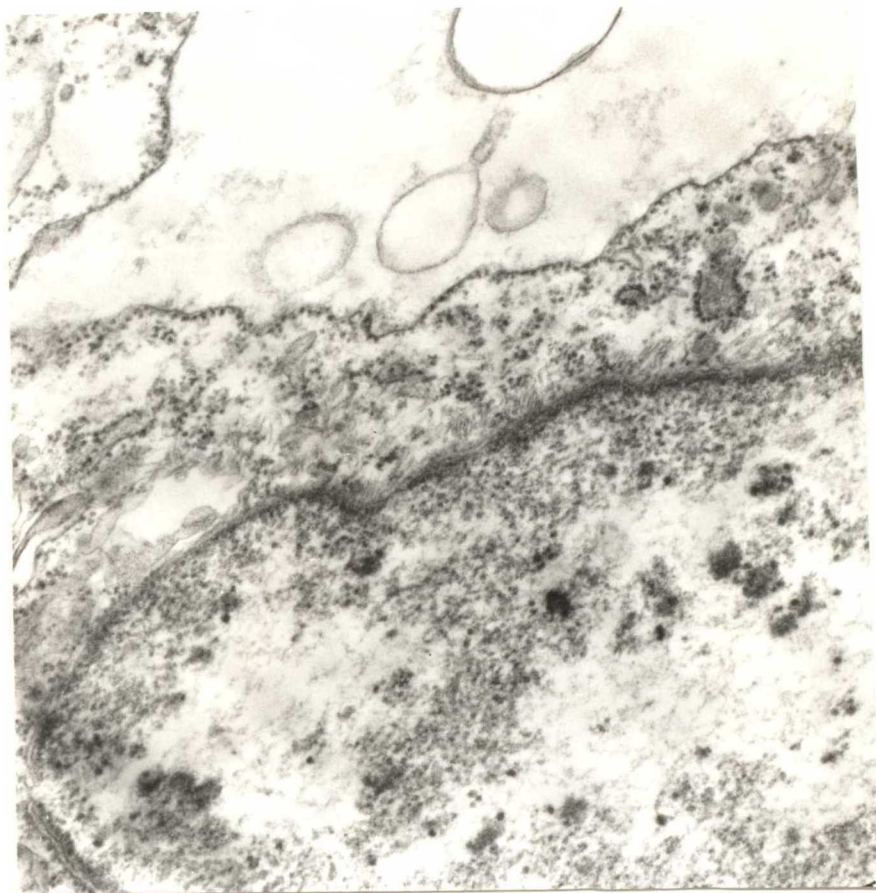
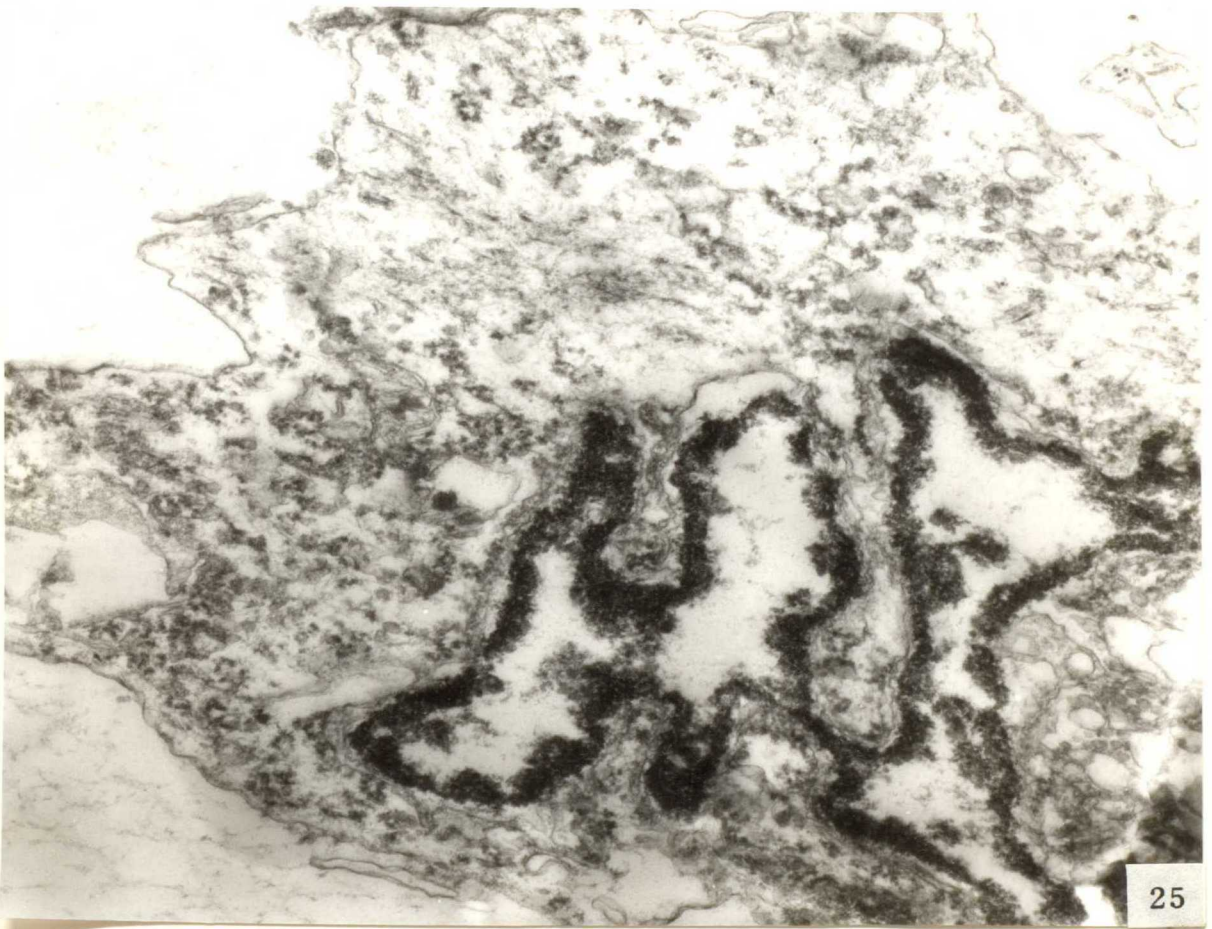
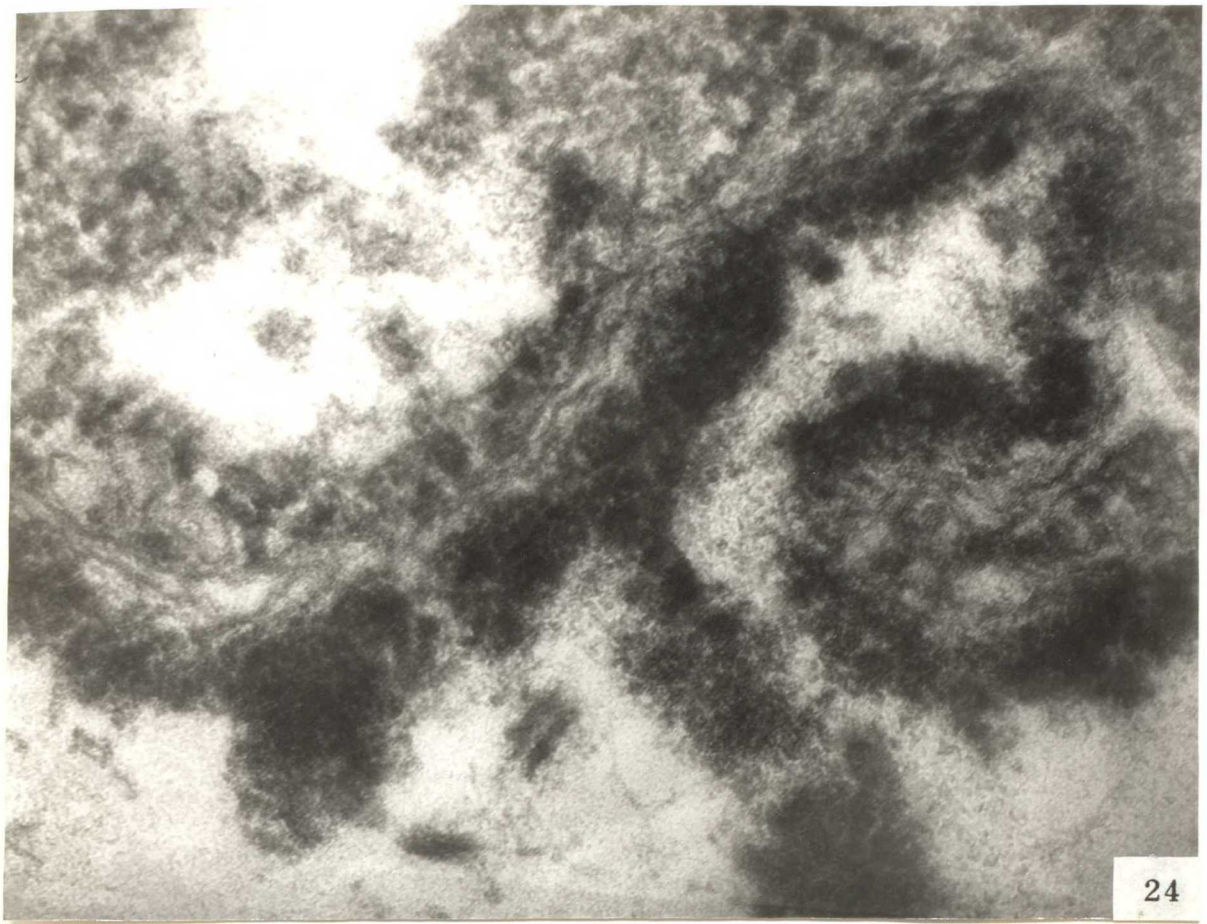
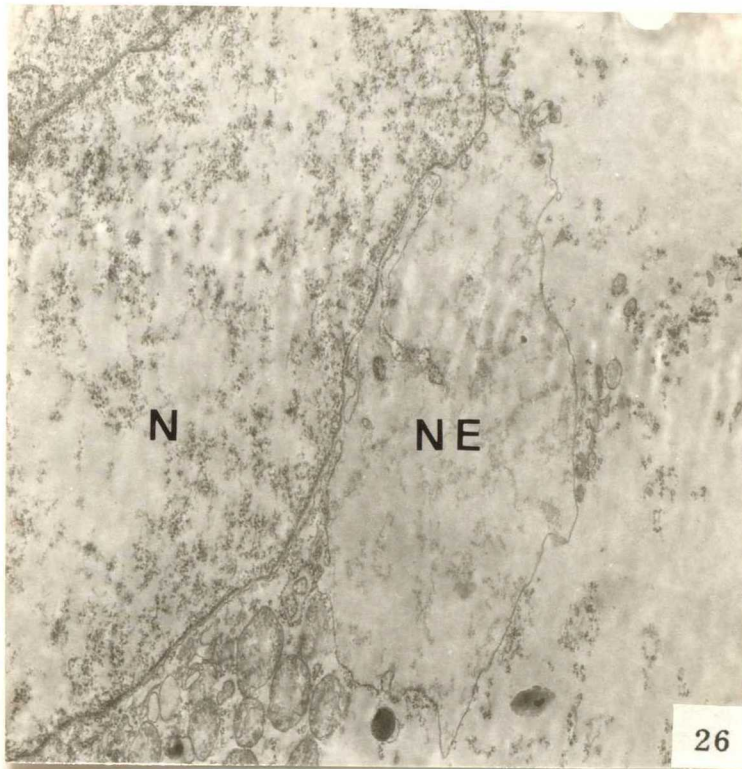


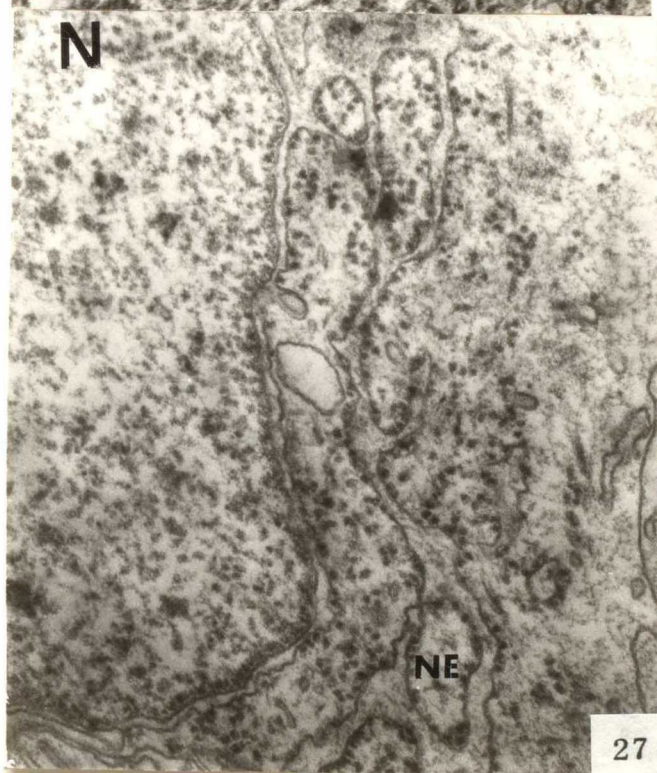
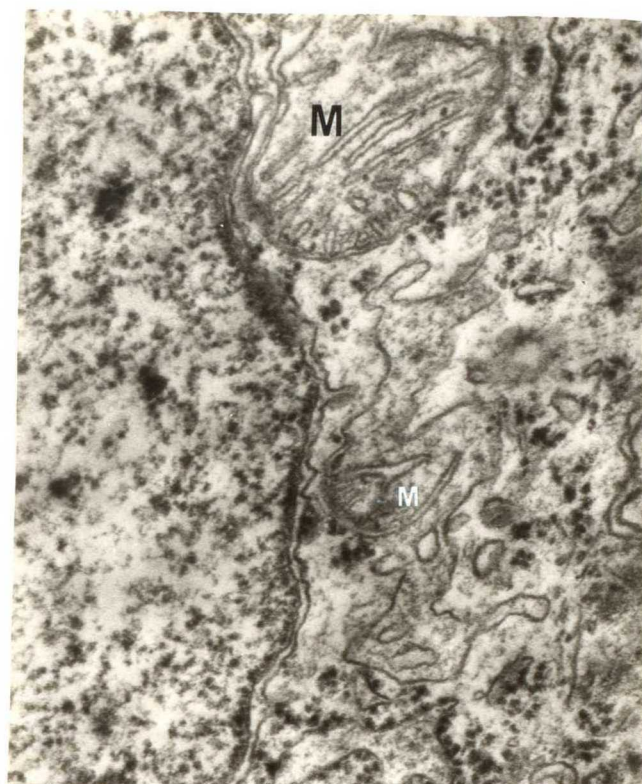
Fig.23. 3 hours after infection, many fibers were found on the surface of nuclear membrane. This picture was demonstrated very low frequently. Mag.10,800.

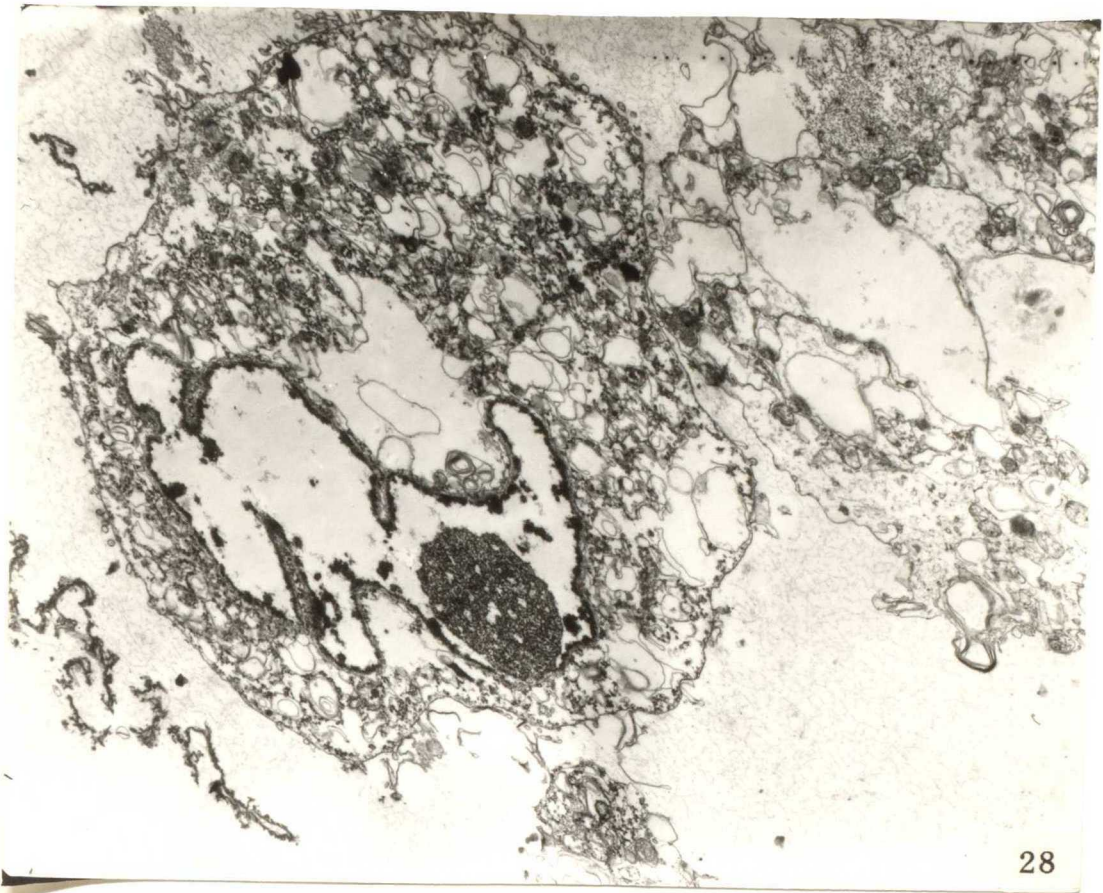


Figs.24-25. Nuclear membrane did not show clear extrusion at 3 hours after infection, irregular nuclear membrane (Mag.47,000 in Fig.24), polylobulated nucleus and detached karyomeres (nuclear fragmentation). All chromatin is accumulated adjacent to the nuclear membrane (Mag.18,000 in Fig.25).

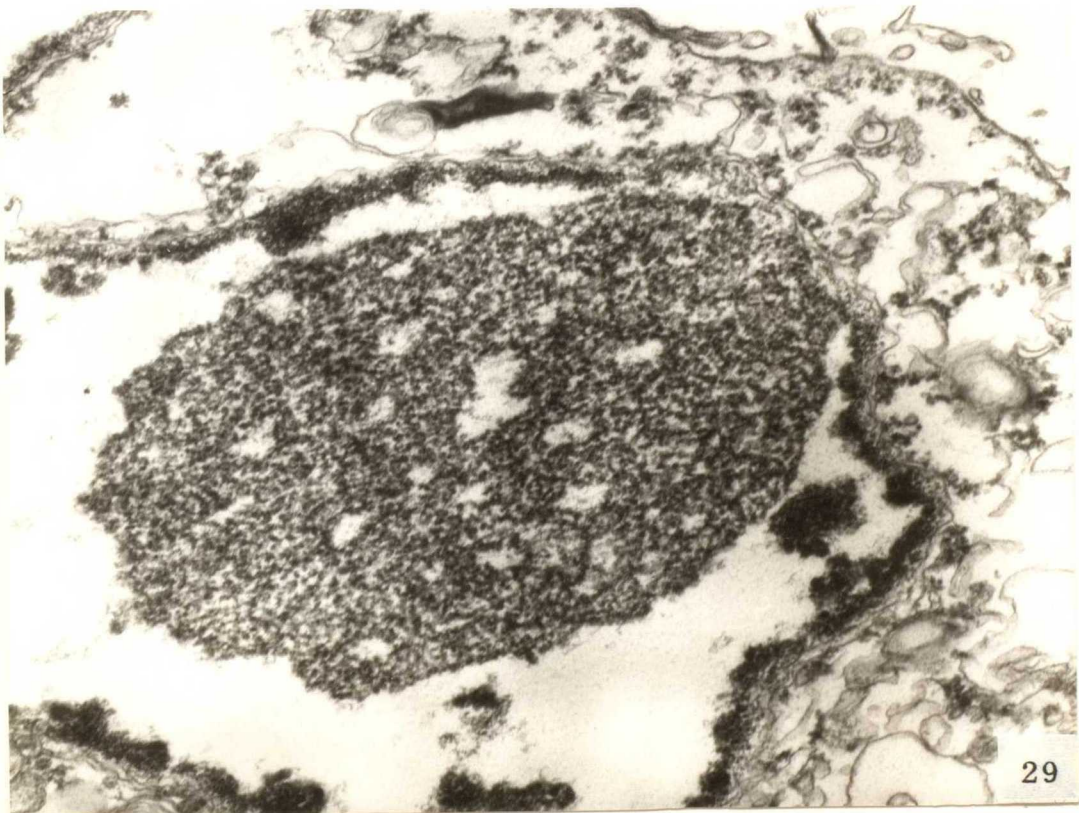


Figs.26-27. Clearly enlarged external nuclear membrane formed the nuclear extrusion (NE). Also the membrane of mitochondria (M) correlated with NE structure in Fig.27(Mag.20,100 in Fig.26 and 40,000 in Fig.27).





28



29

Figs.28-29. Accumulation of chromatin to nuclear membrane and dense granular materials regarded as the nucleolus was separated from the chromatin in affected nucleus at 3 hours after infection (Mag.10,400 in Fig.28), higher magnification of Fig.28 (Mag.65,000).

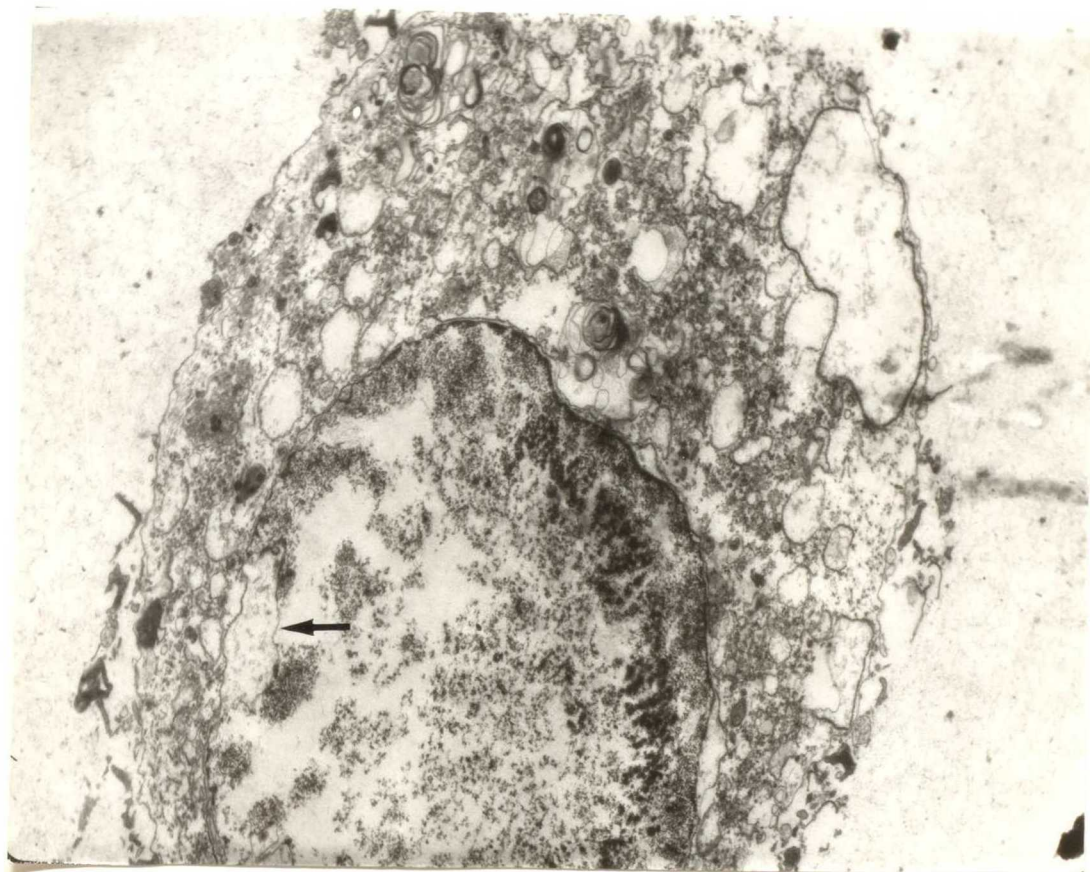


Fig.30. The picture was considered that the early nuclear lesion would imply the first incident in despite of later stage at 8 hours after infection (Mag. 7,400), a few dense clumps of chromatin, and nuclear volume shrunk considerably (arrow).

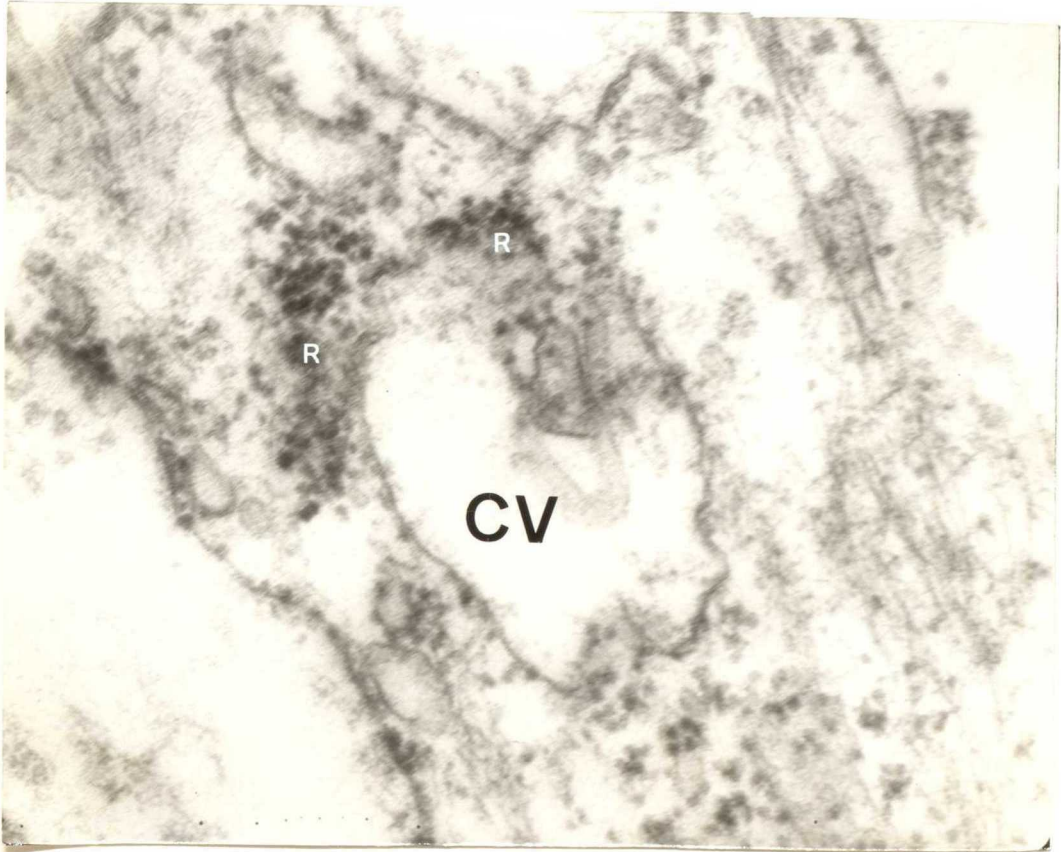
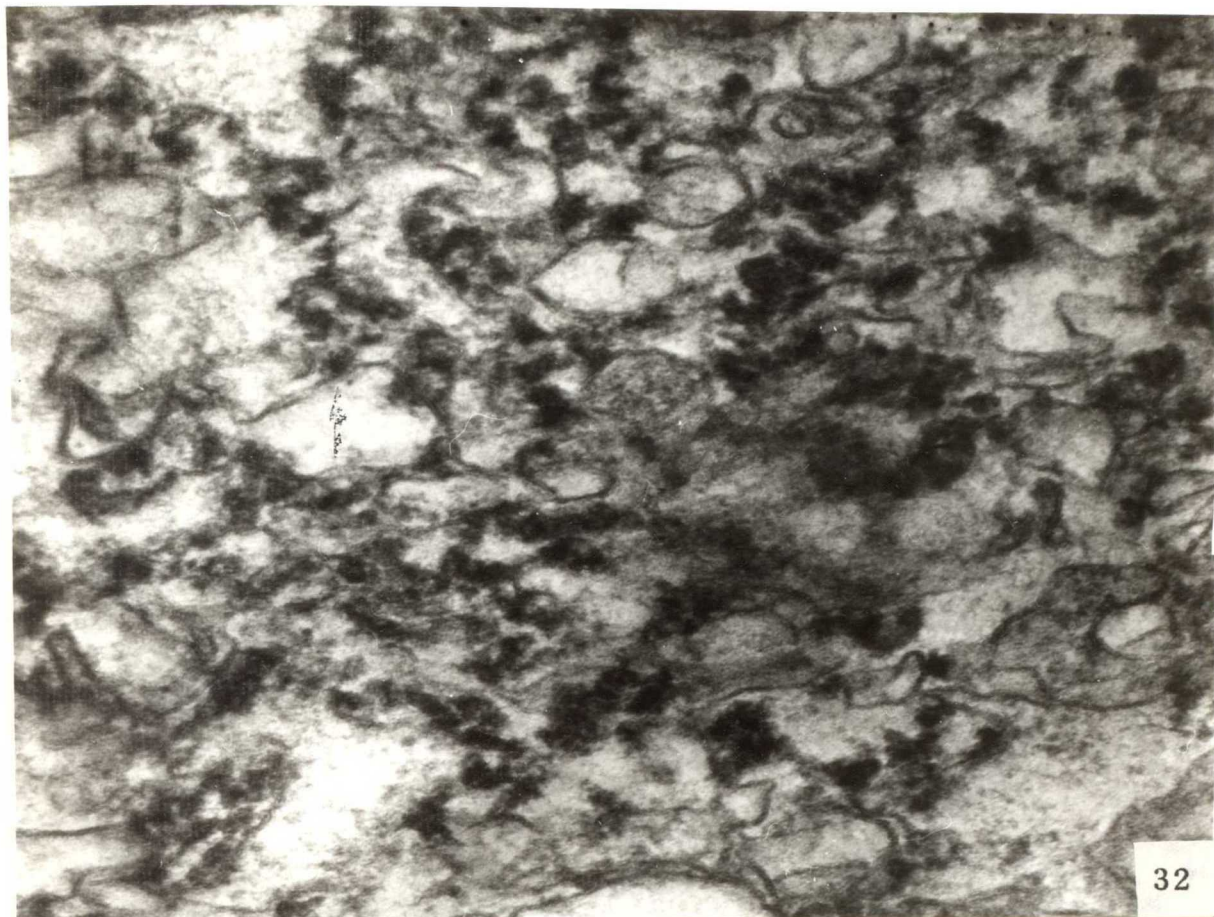
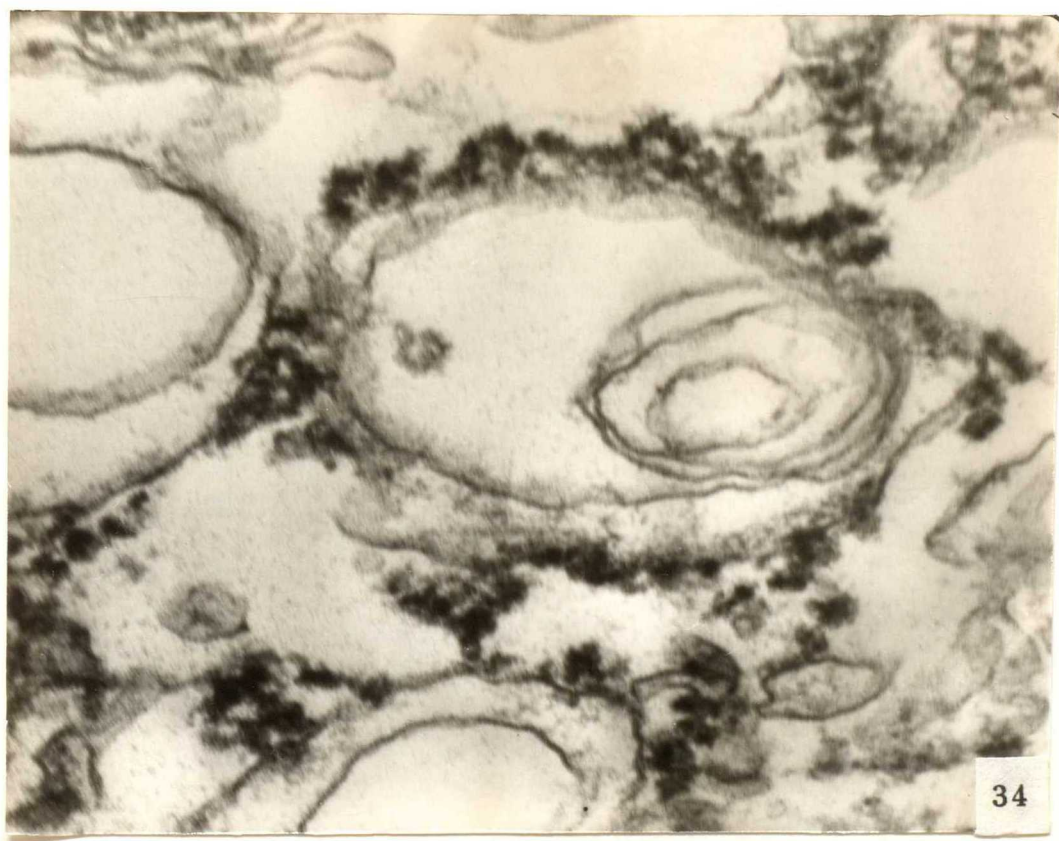
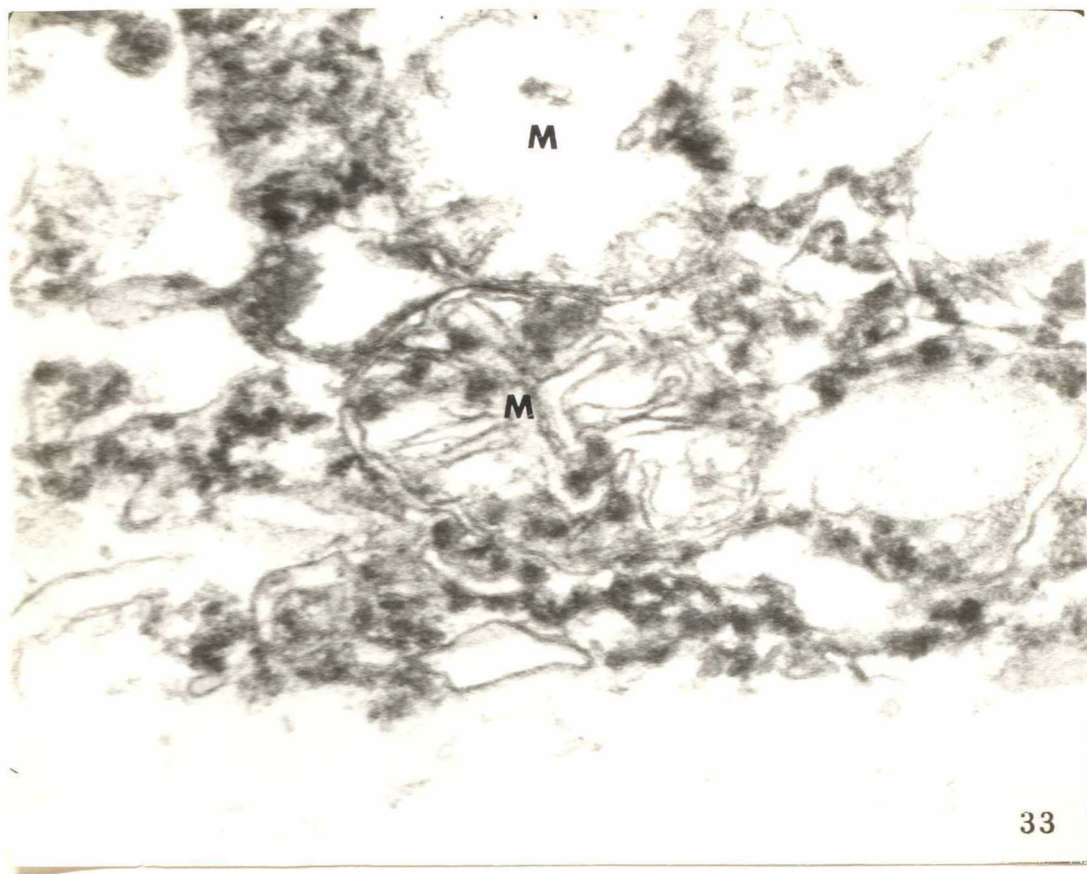


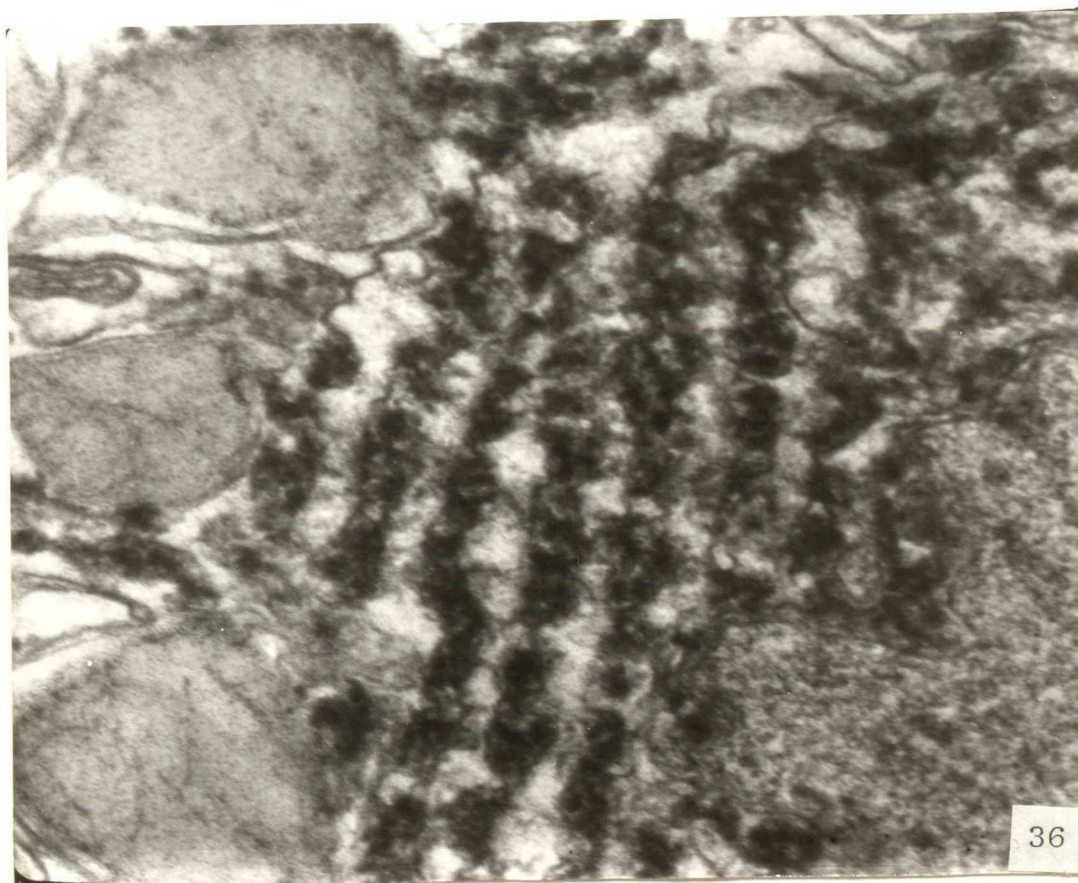
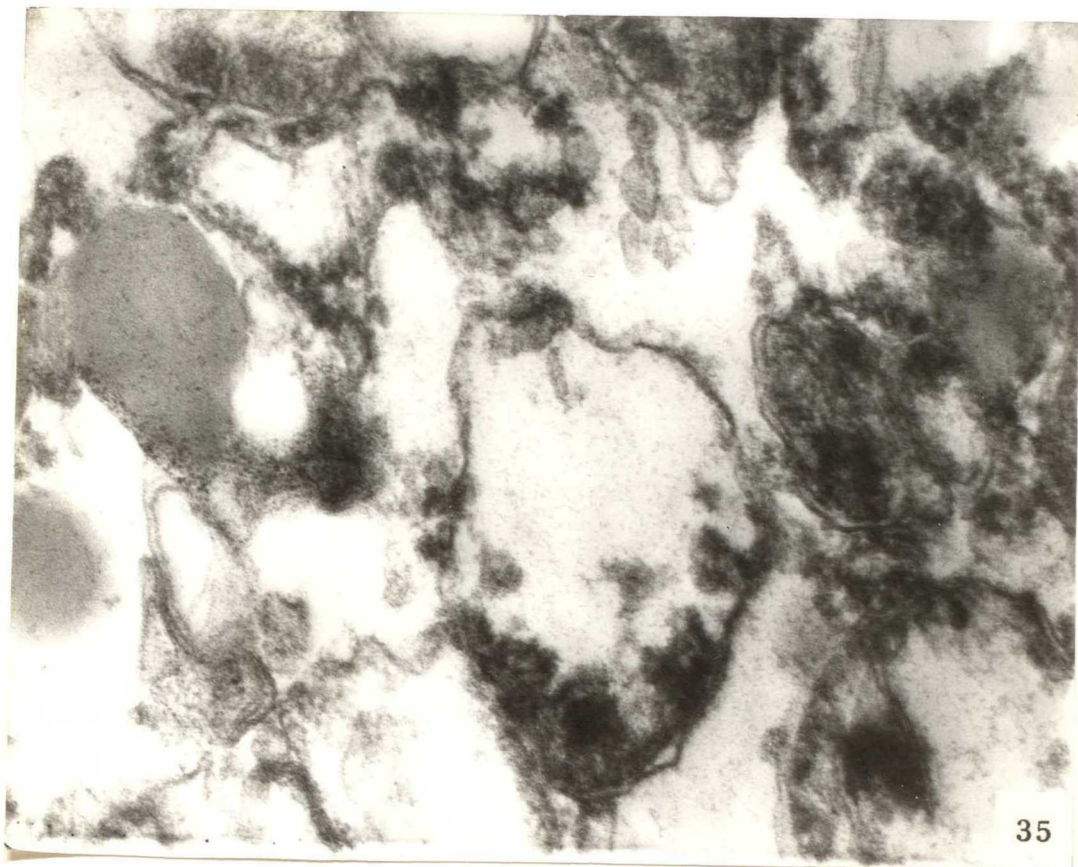
Fig.31. Section at 0 hour after infection showed mainly cytoplasmic vesicles with various shapes (CV), free ribosomes (R) or polysomes (Mag.100,000).

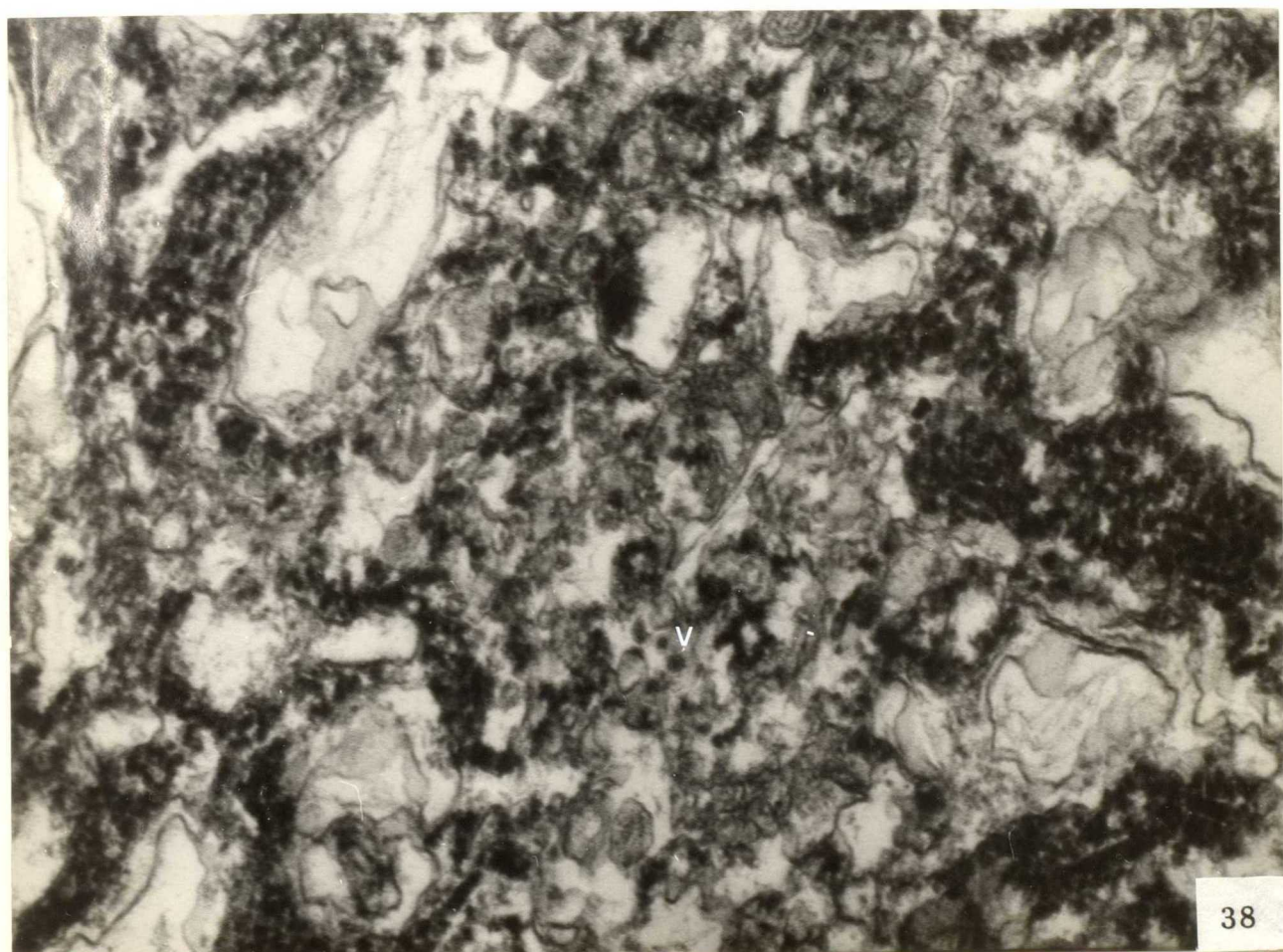
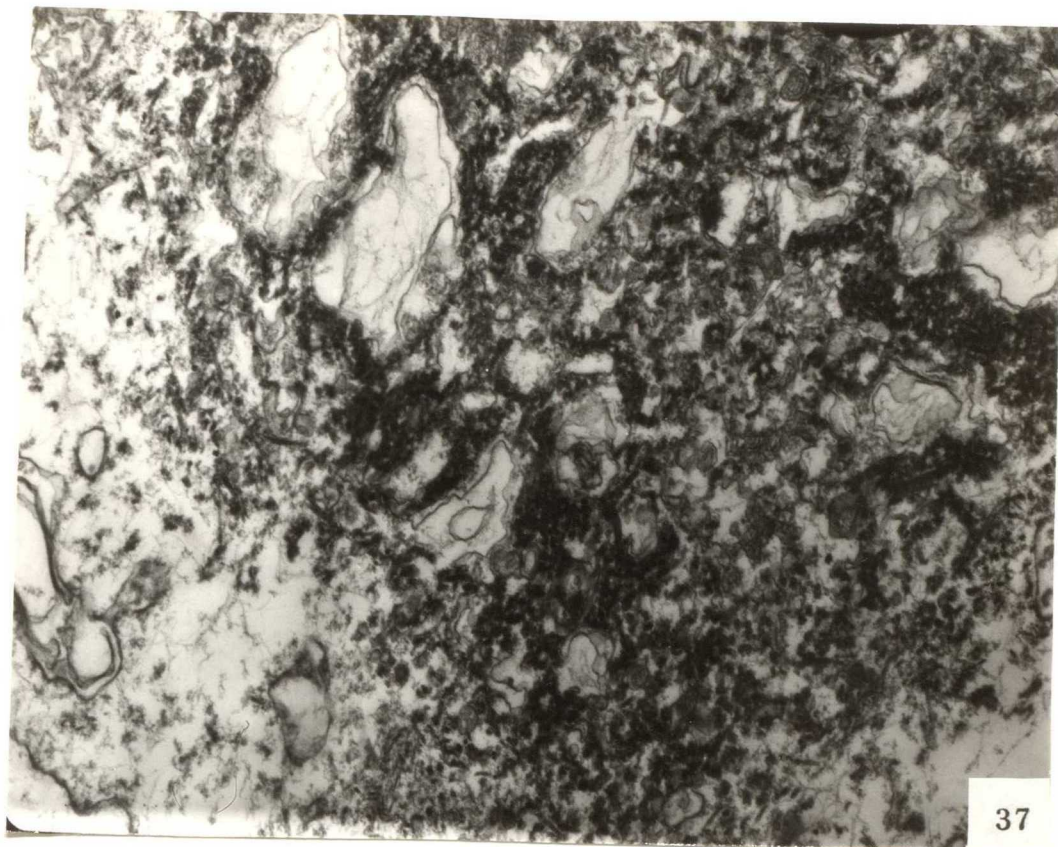


32

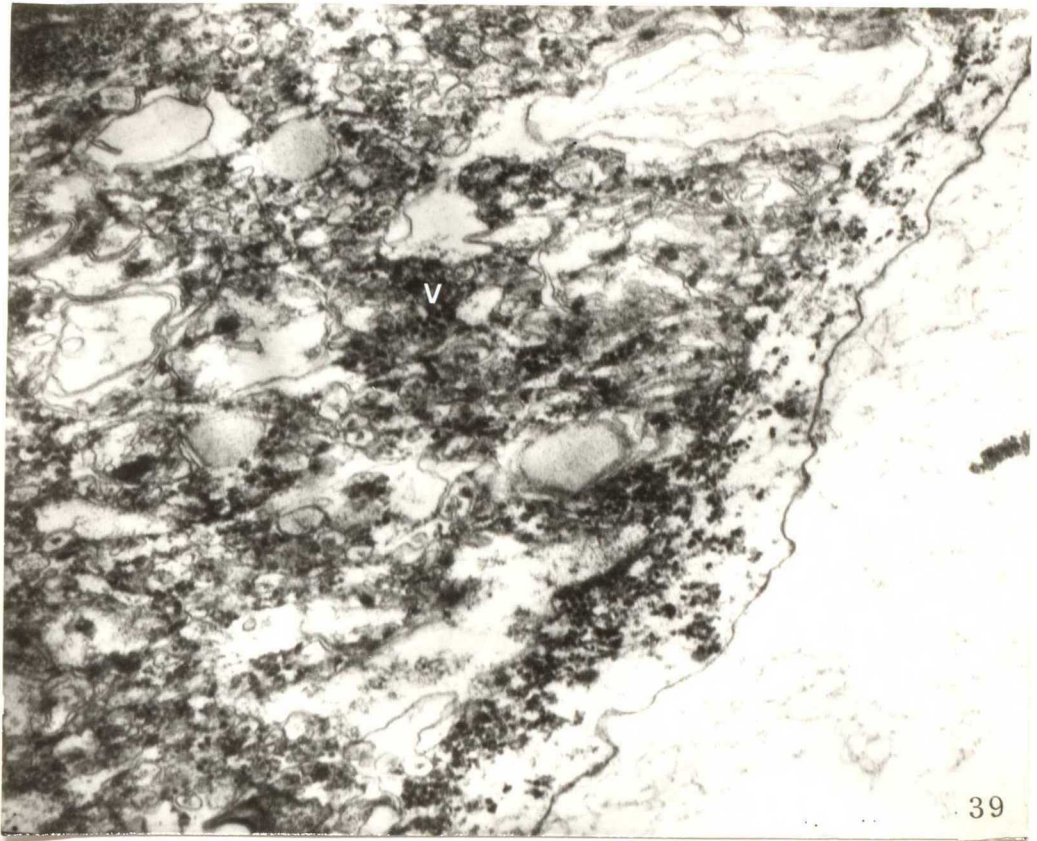
Figs.32-36. All sections show the viral precursor complexes (VPC) bound with membrane indicating the various shapes in cytoplasm. The high dense and granular materials appeared at 3 hours after infection (Mag.60,000 in Fig.32). The picture of Fig.33 showed the viral precursor complex in mitochondria (Mag.92,000). It was not so clear whether the present dense granular complexes attached to the inner or outer surface of cytoplasmic vacuoles and also how to bind. The picture of Fig.34 was observed on the outer membrane and Fig.35 (Mag. 92,000) appeared on the inner membrane. While Fig.36 (Mag.30,000) showed regularly arranged precursors in small gutters formed by cytoplasmic membranes.

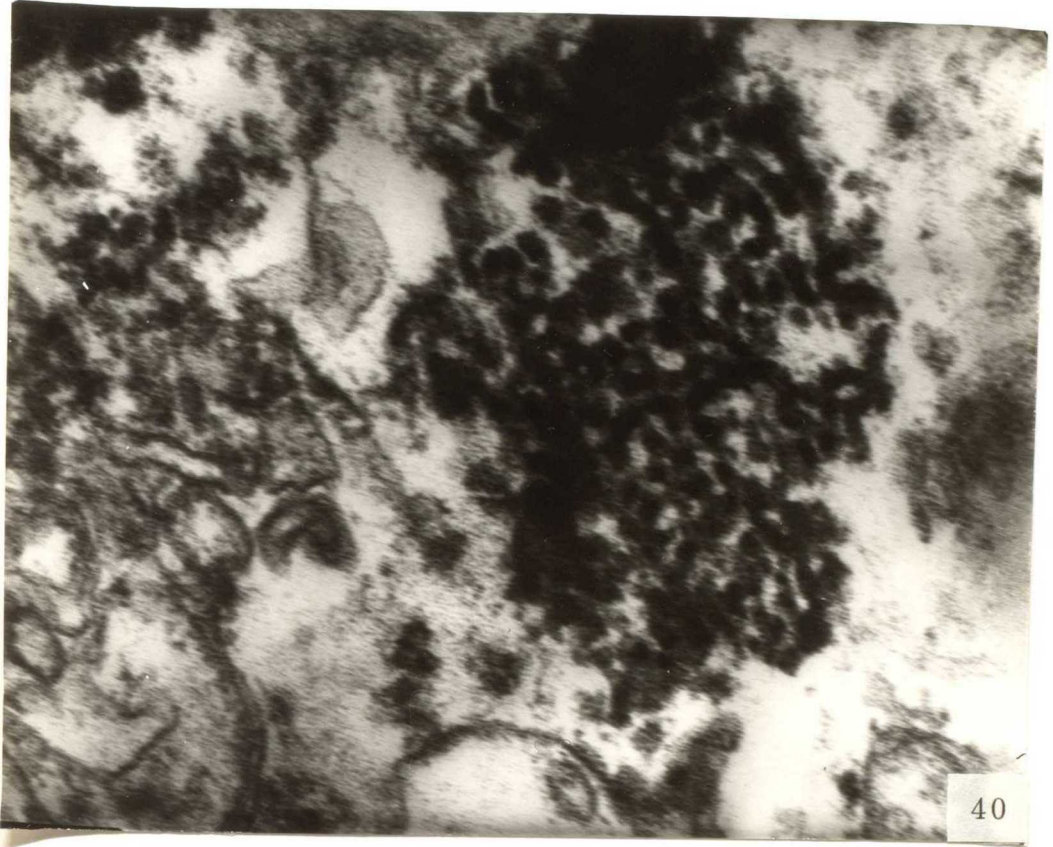




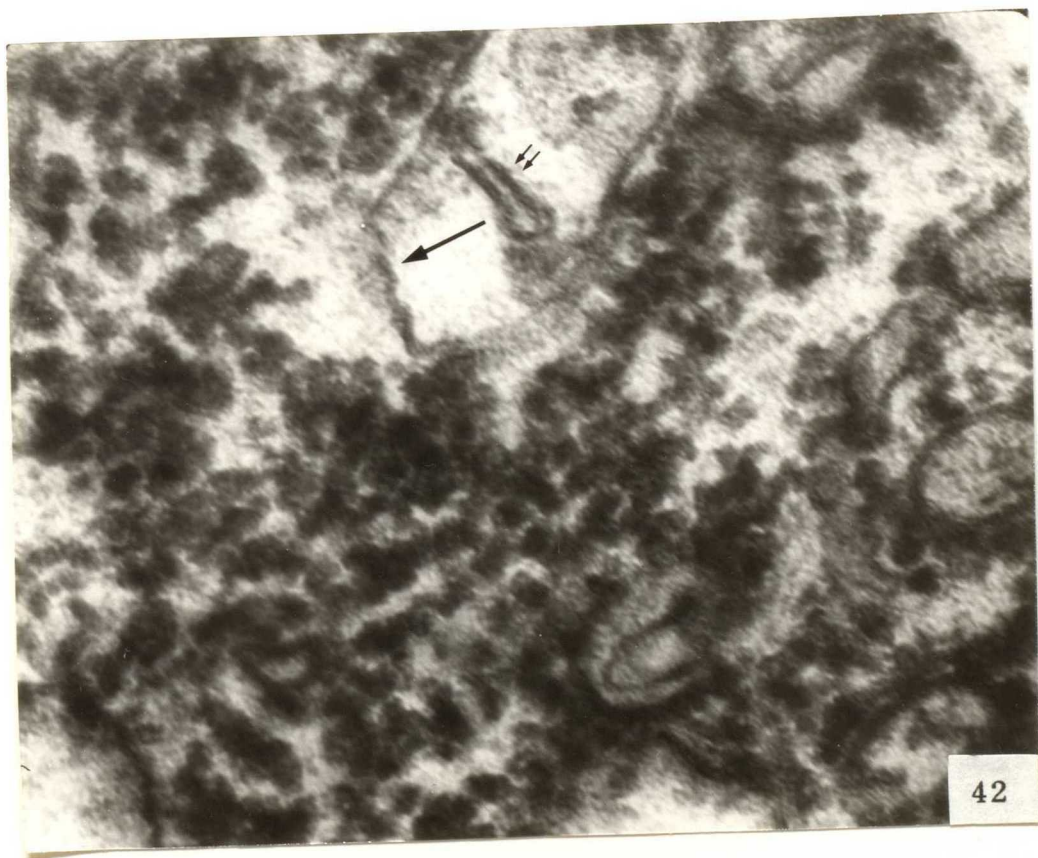


Figs.37-39. Sections at 5 hours after infection.
Further development of viral precursor complexes
(VPC) and viral like particles (V and arrow).
Mag.38,000 in Figs.37 and 39, 76,000 in Fig.38.





Figs.40-43. The high dense precursors at 8 hours after infection attached to membrane and each of virus like particles was closely aggregated. The picture of Fig.40 (Mag.92,000) was considered as Nucleoplasma reported in NDV or Ncl structure in poliovirus. Sometimes, the precursor showed many virus like particles and the subunit like structures attached on the surface of membranes bounded with particles (arrow). Also the membrane itself might be linked together with small beads as hollow capsomeres (two arrows). Mag.180,000 in Figs.41 and 42 , Fig.43 showed dense granular aggregates with fibers(Mag.92,000).



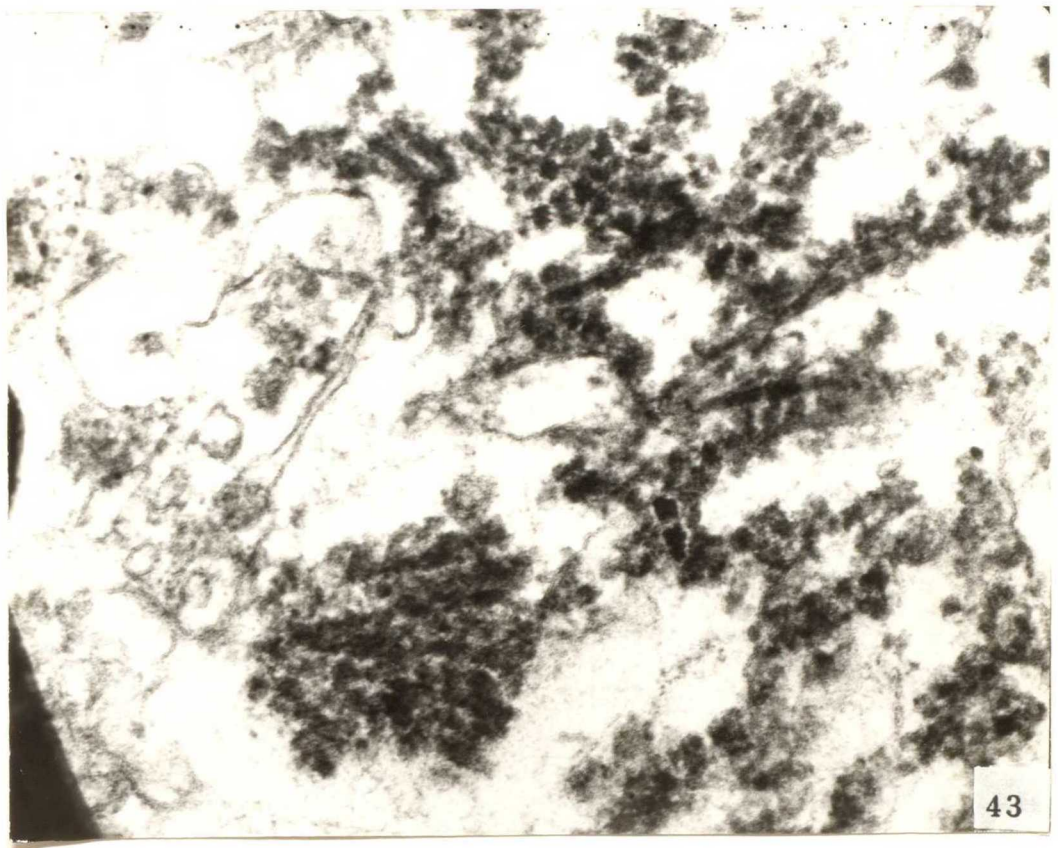


Fig.44. Precursors at 8 hours after infection showed to invade into ribosome rich area. The remained crump of divided ribosomes may be followed to become degraded giant ribosomes (Mag.92,000).

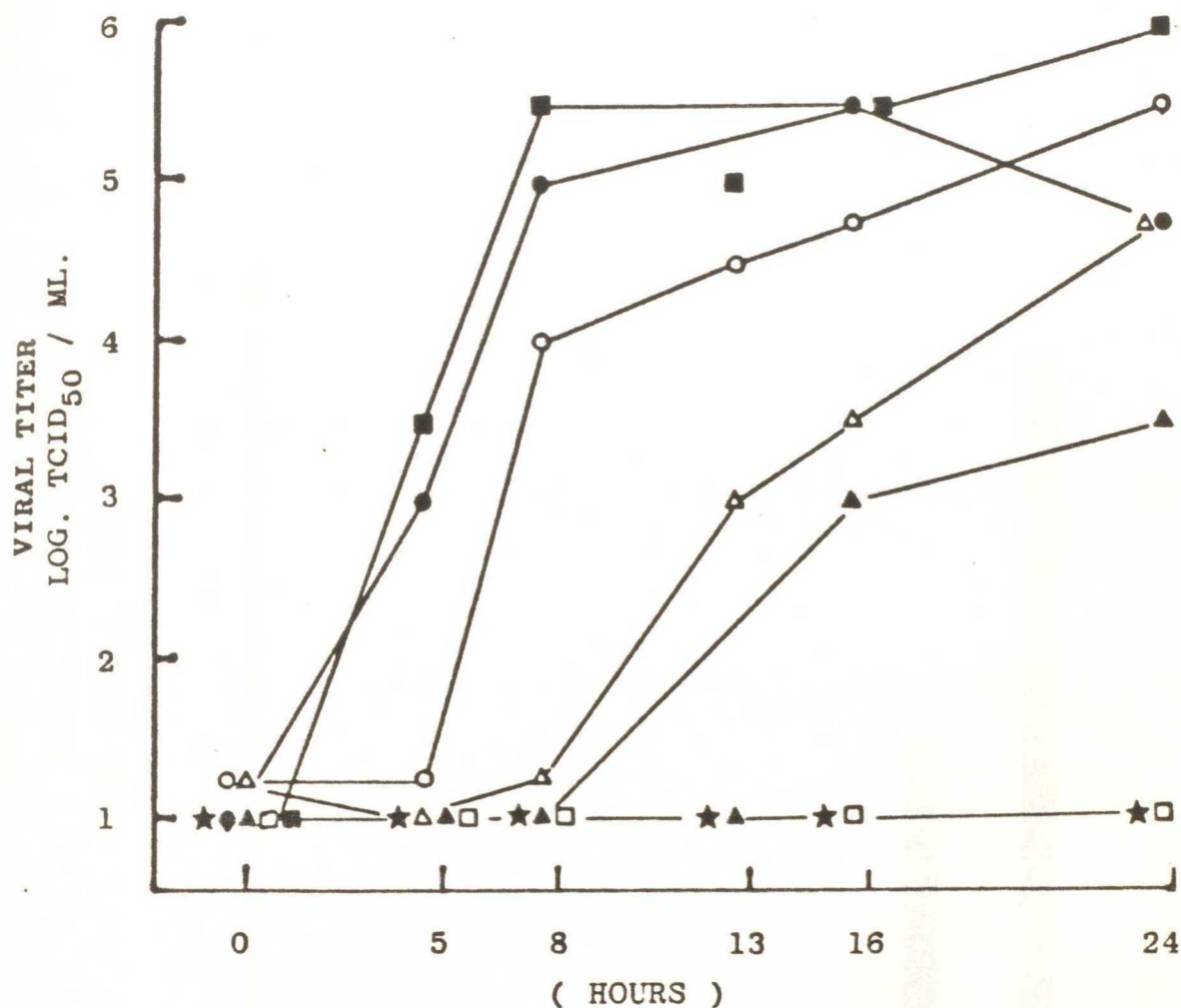


Fig.45. Determination of the effect of Iodoacetic acid on the growth of FCV, the tested media which were supplemented by 10 μ g Iodoacetic acid per ml were adsorbed at 4 C for three hours and afterthere removed at 0, 0.5, 1, 2, and 3 hours. 0 (●), 0.5 (○), 1 (△), 2 (▲), 3 (□) , and no removed (★), Control (■).

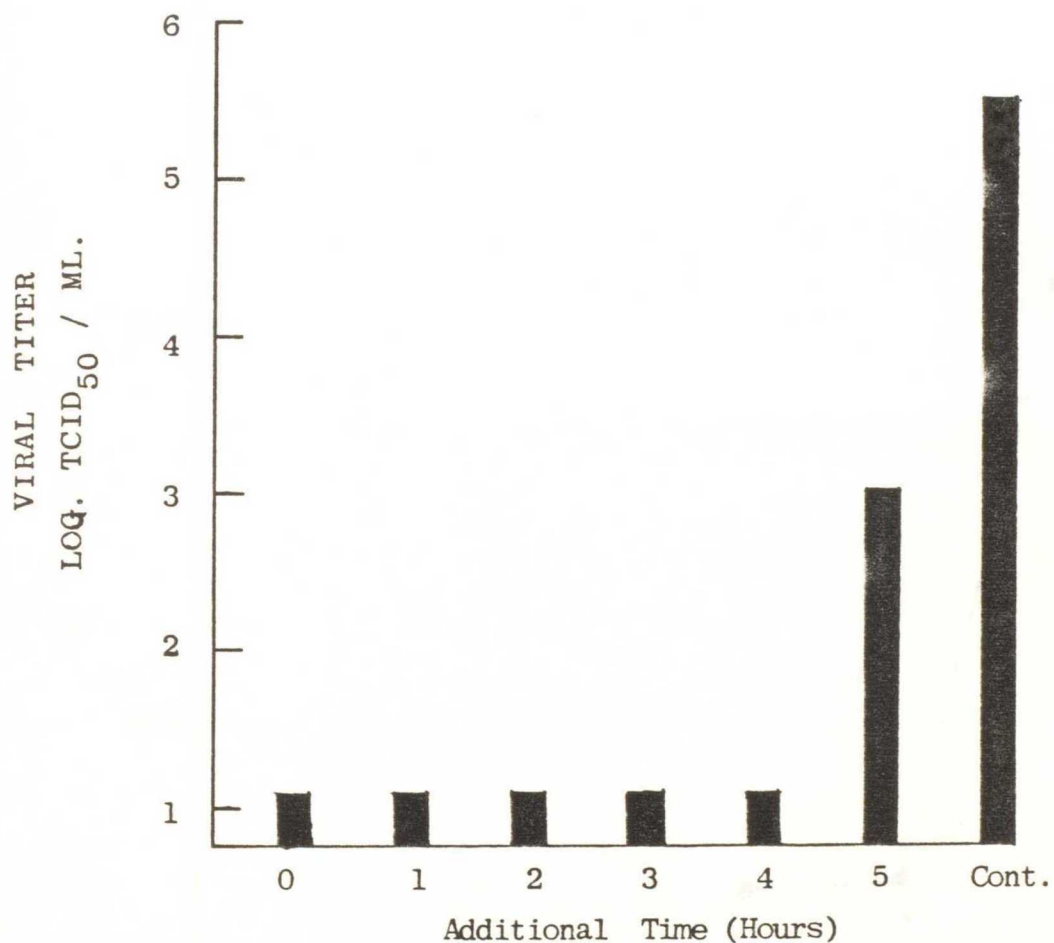


Fig.46. Influence of addition time of Iodoacetic acid to cultured cells upon the viral yield of Feline calicivirus after 24 hours incubation.

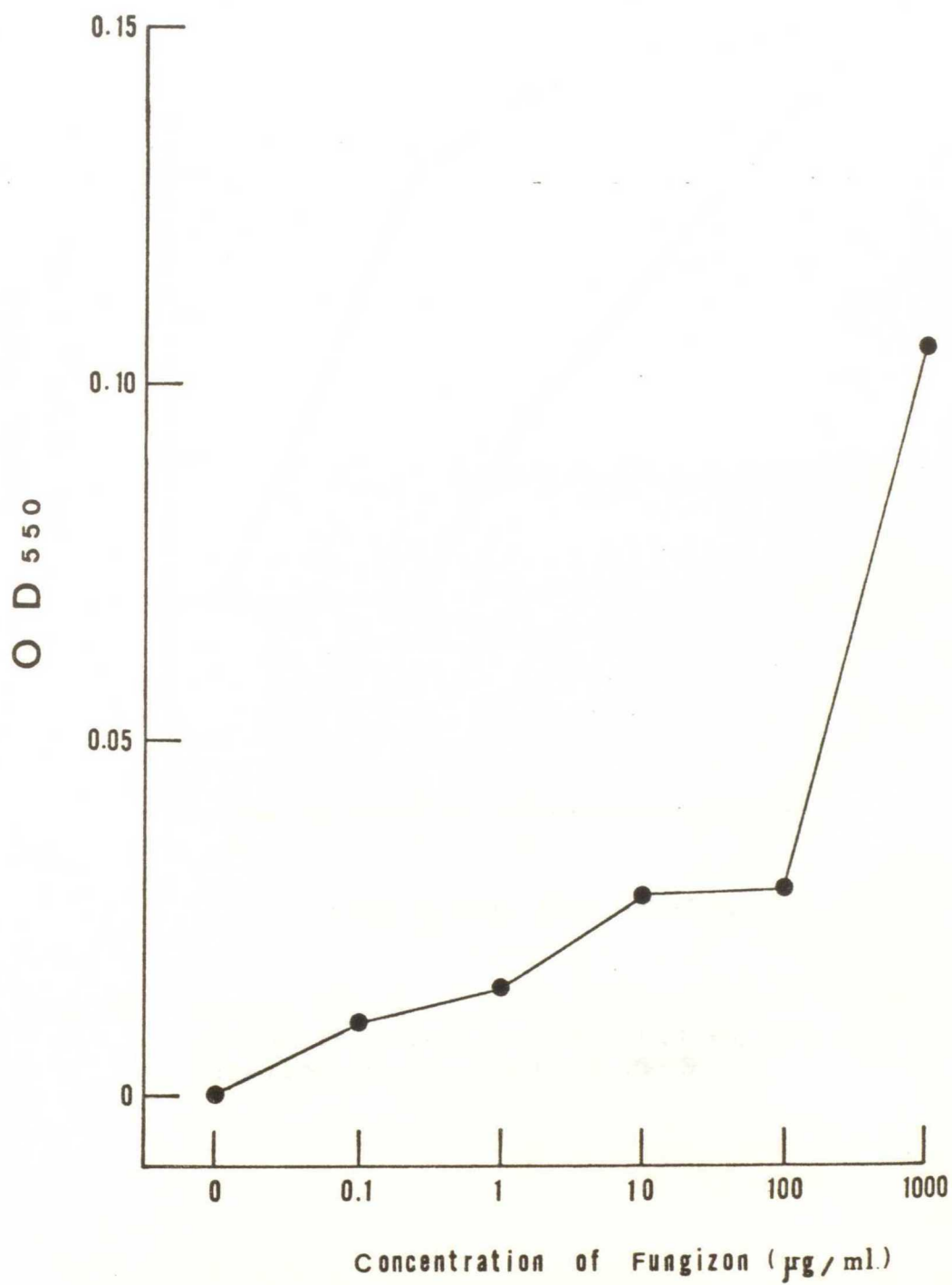


Fig.47. Hemolysis of red blood cells of cat by Fungizon.

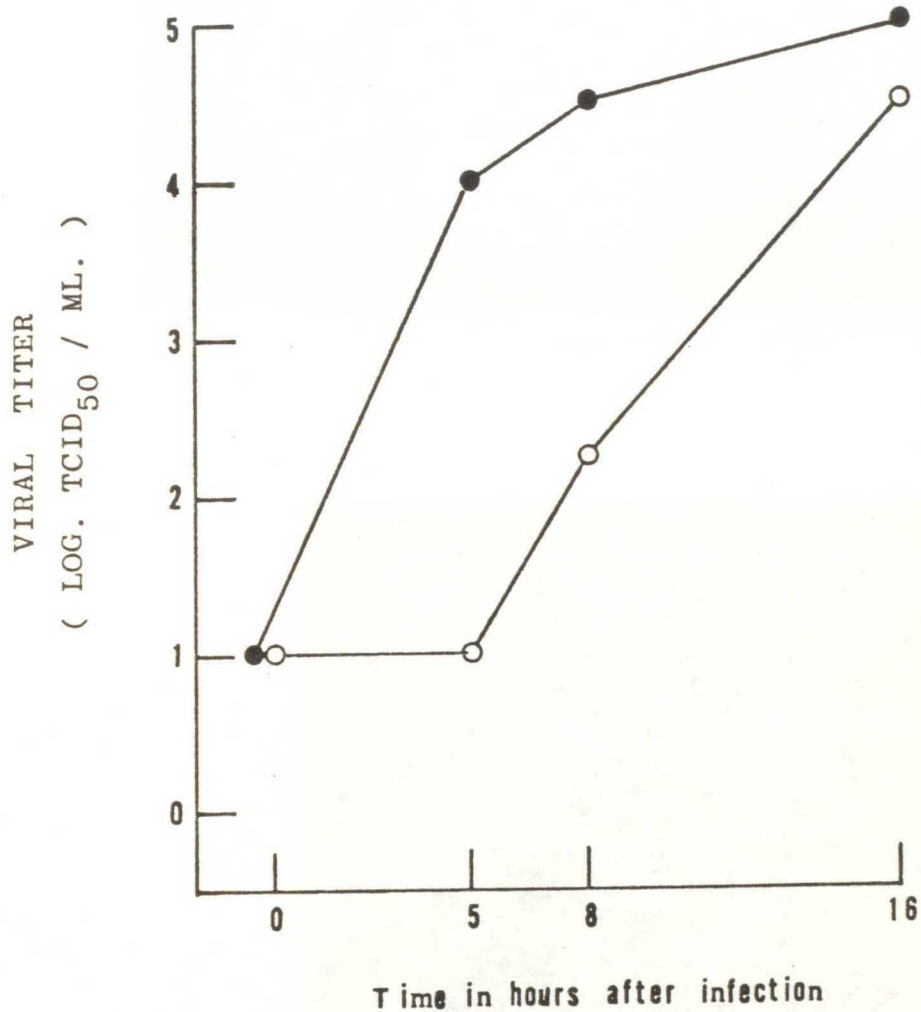
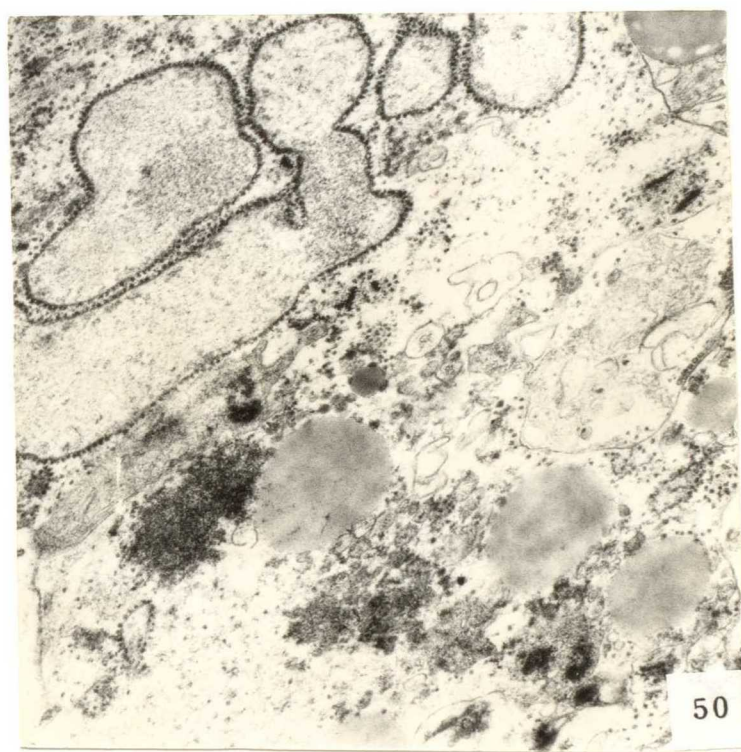
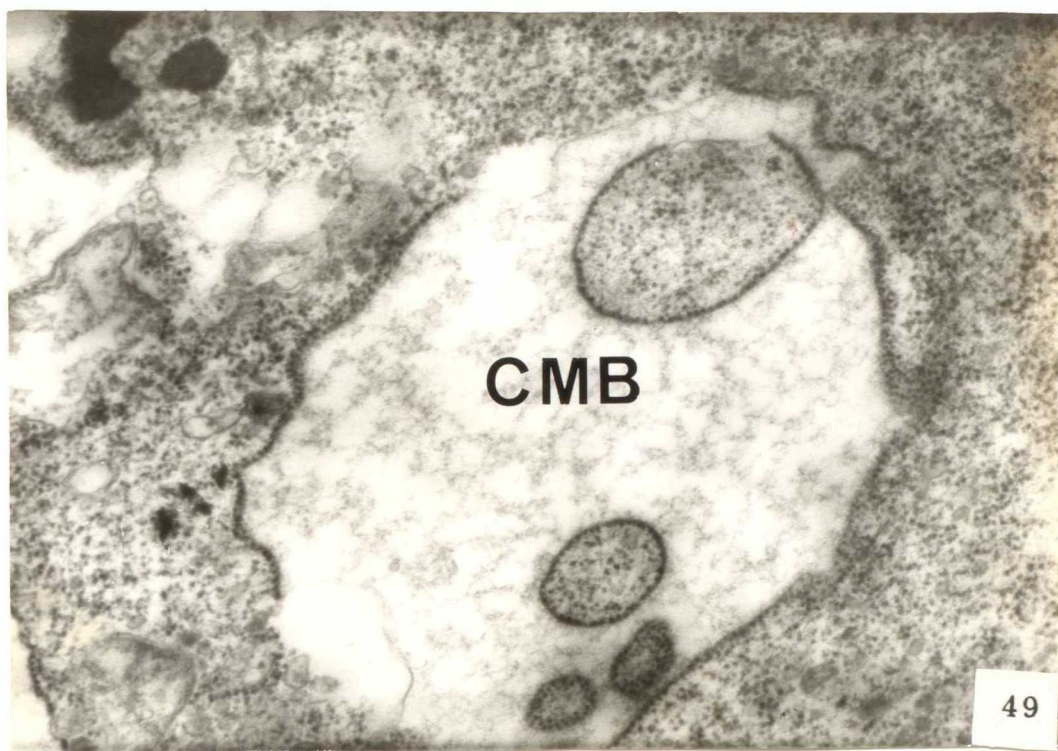


Fig.48. Growth curve of Feline calicivirus in the medium including Fungizon 0.1 mg per ml. Fungizon (○—○), Control (●—●).



Figs.49-50. The structure designated as CMB (Complex Membranous Body), especially Fig.50 developed at late stage (Mag.38,000 in Fig.49,Mag.25,000 in Fig.50).

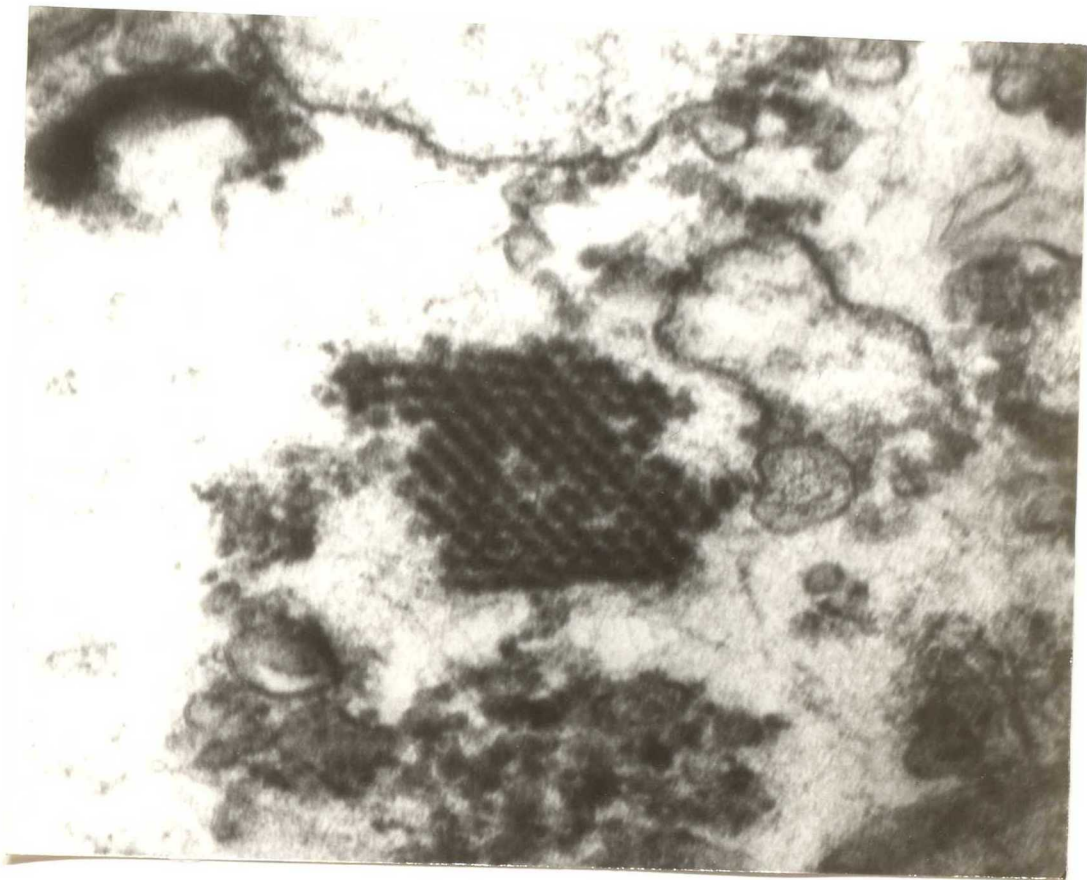
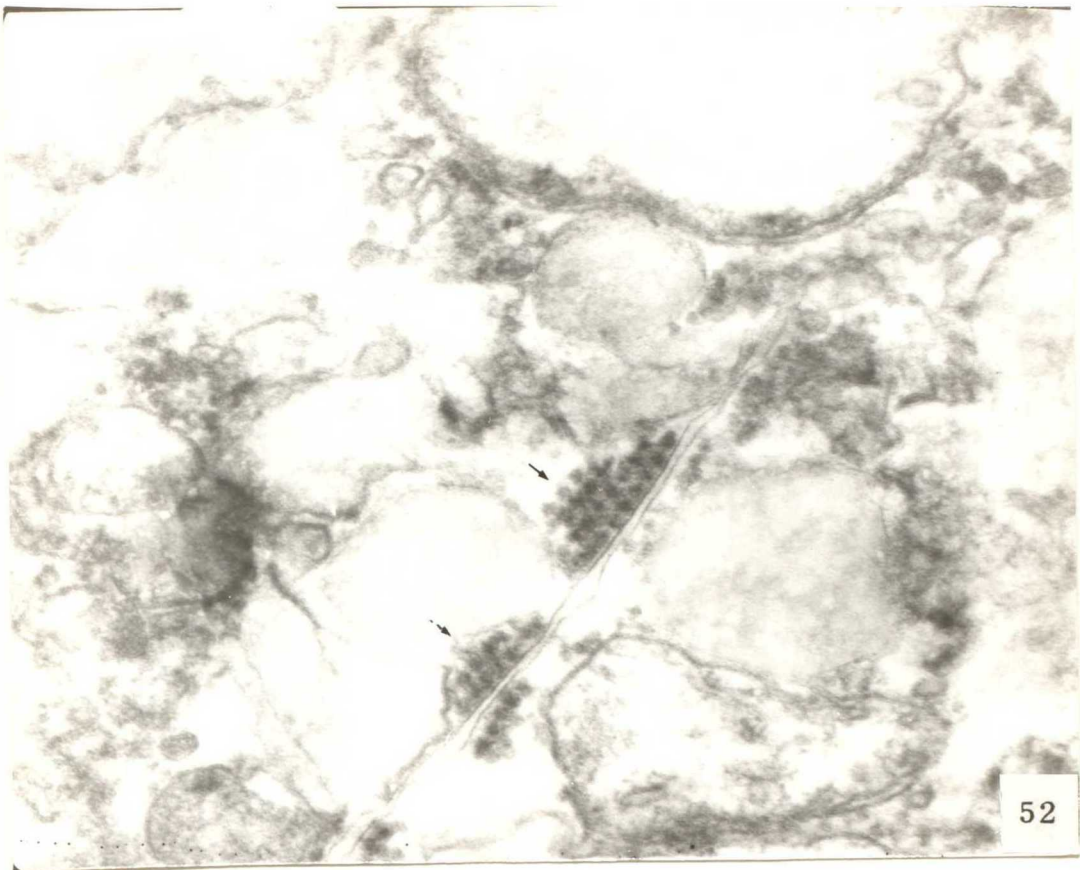


Fig. 51. Crystalline array of viral particles (Mag. 92,000).



Figs.52-55. Clearly attached viral particles along with membrane (Mag.92,000 in Figs.52 & 53, and Mag.76,000 in Figs.54 & 55).

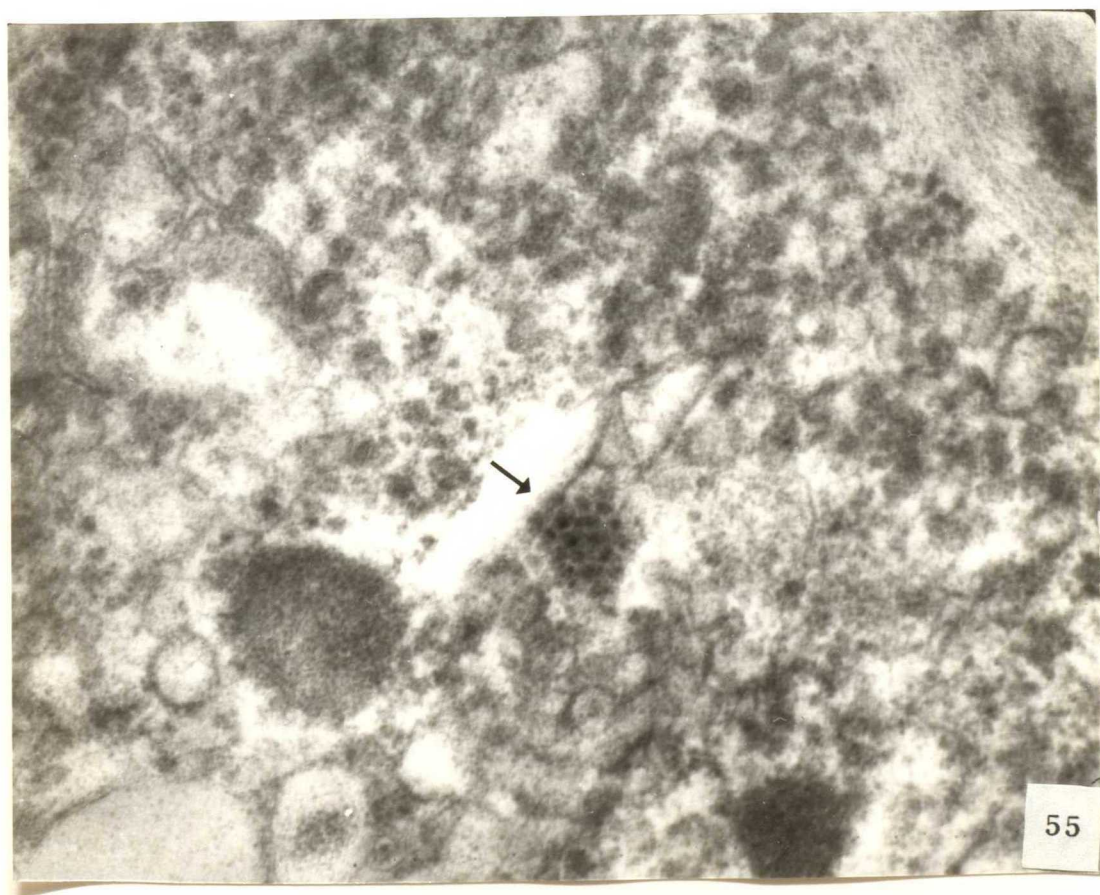
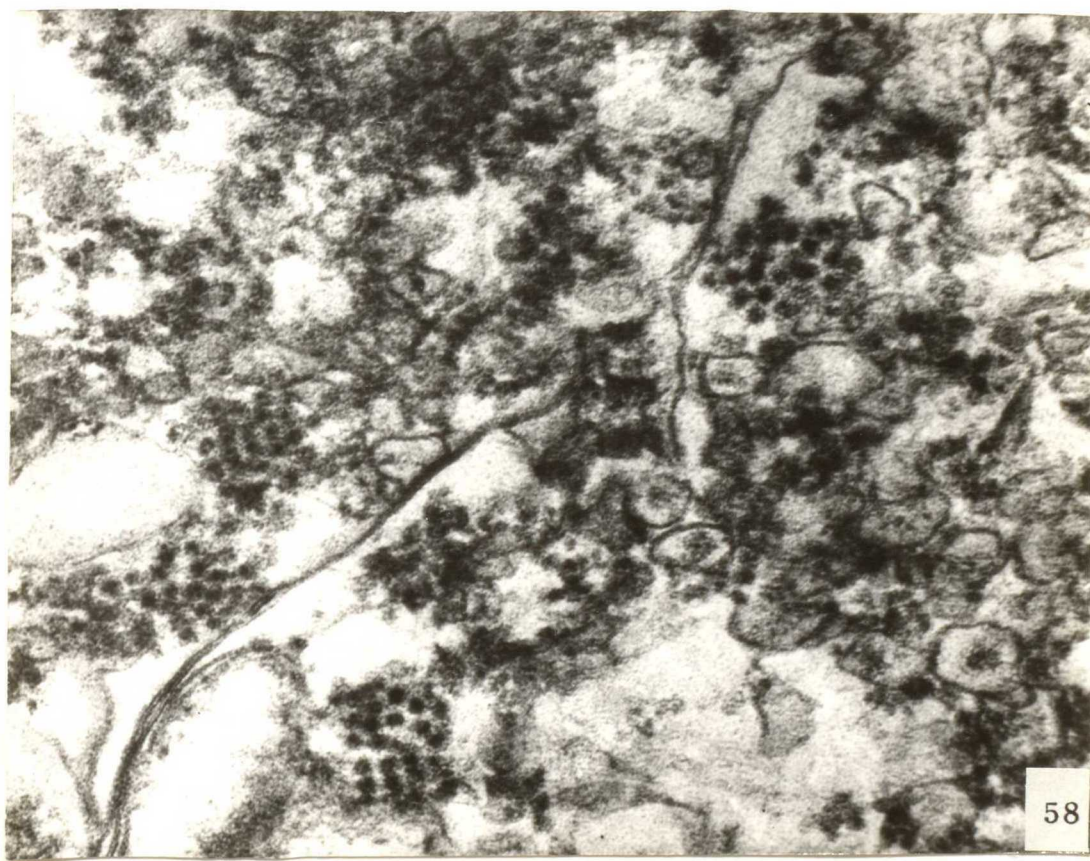
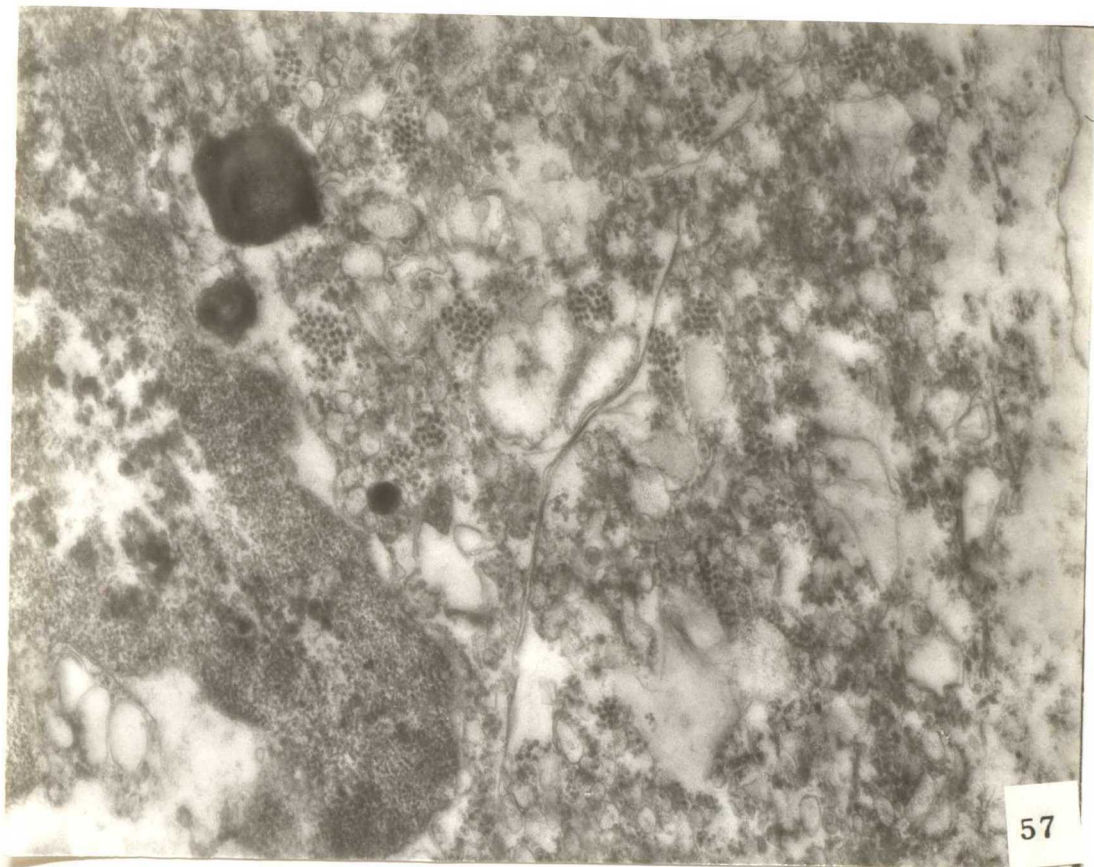




Fig.56. Linearly arranged viral particles with fine fibers,
(Mag.50,000).



Figs.57-59. Pre-crystalline viral particles similar to a bunch of grapes (Mag.30,100 in Fig.57, and Mag.92,000 in Figs.58 & 59).

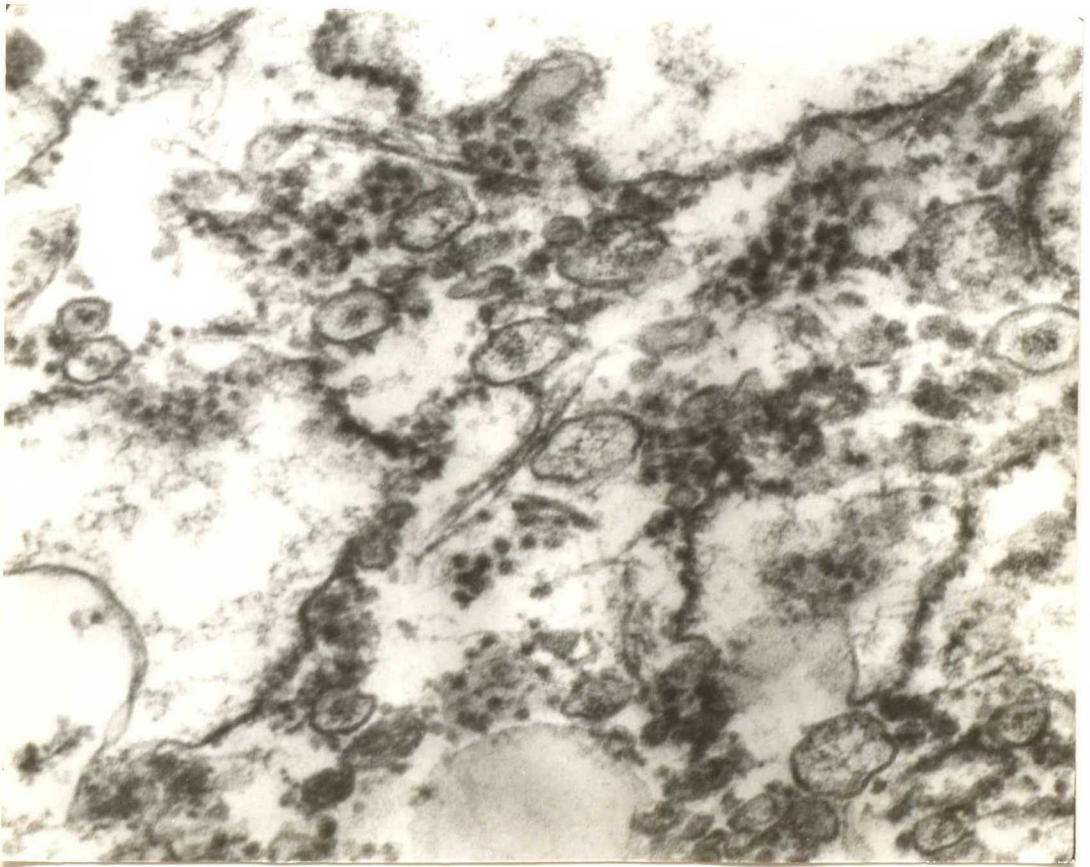
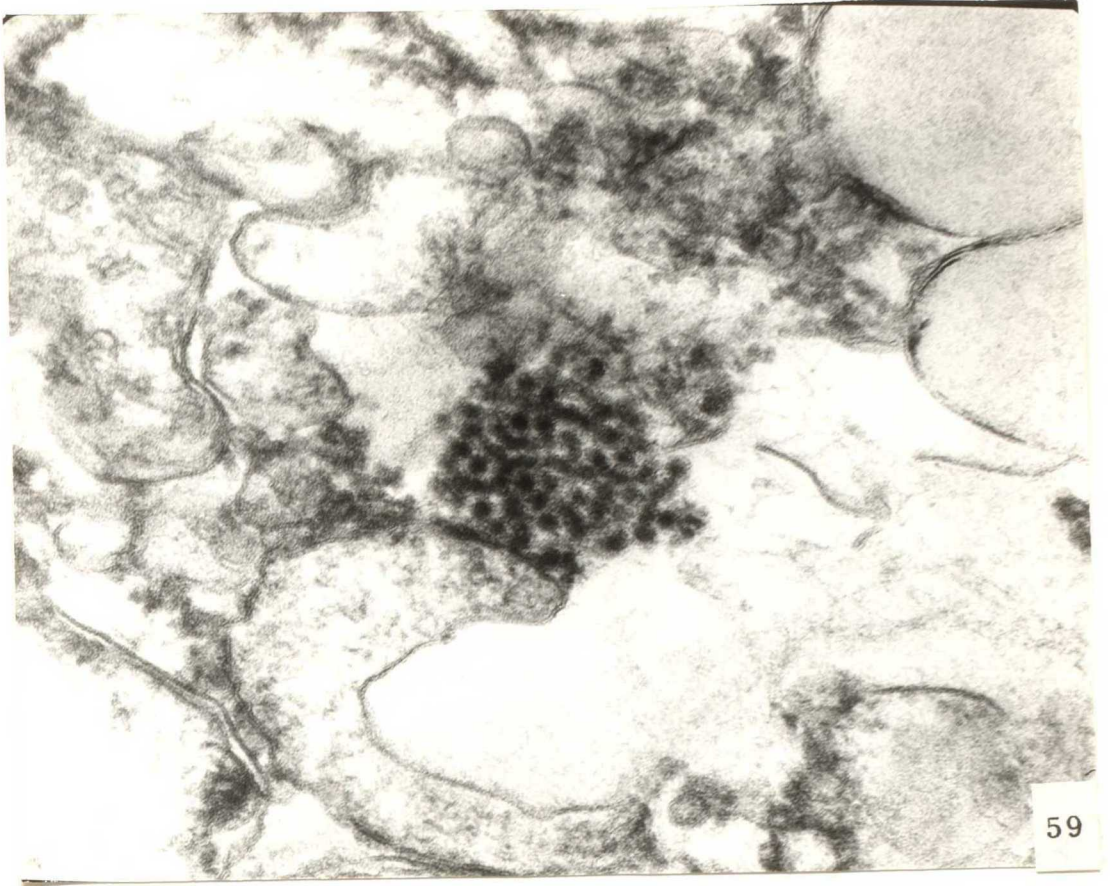


Fig.60. Many fine fibers were observed with viral particles (Mag.92,000).

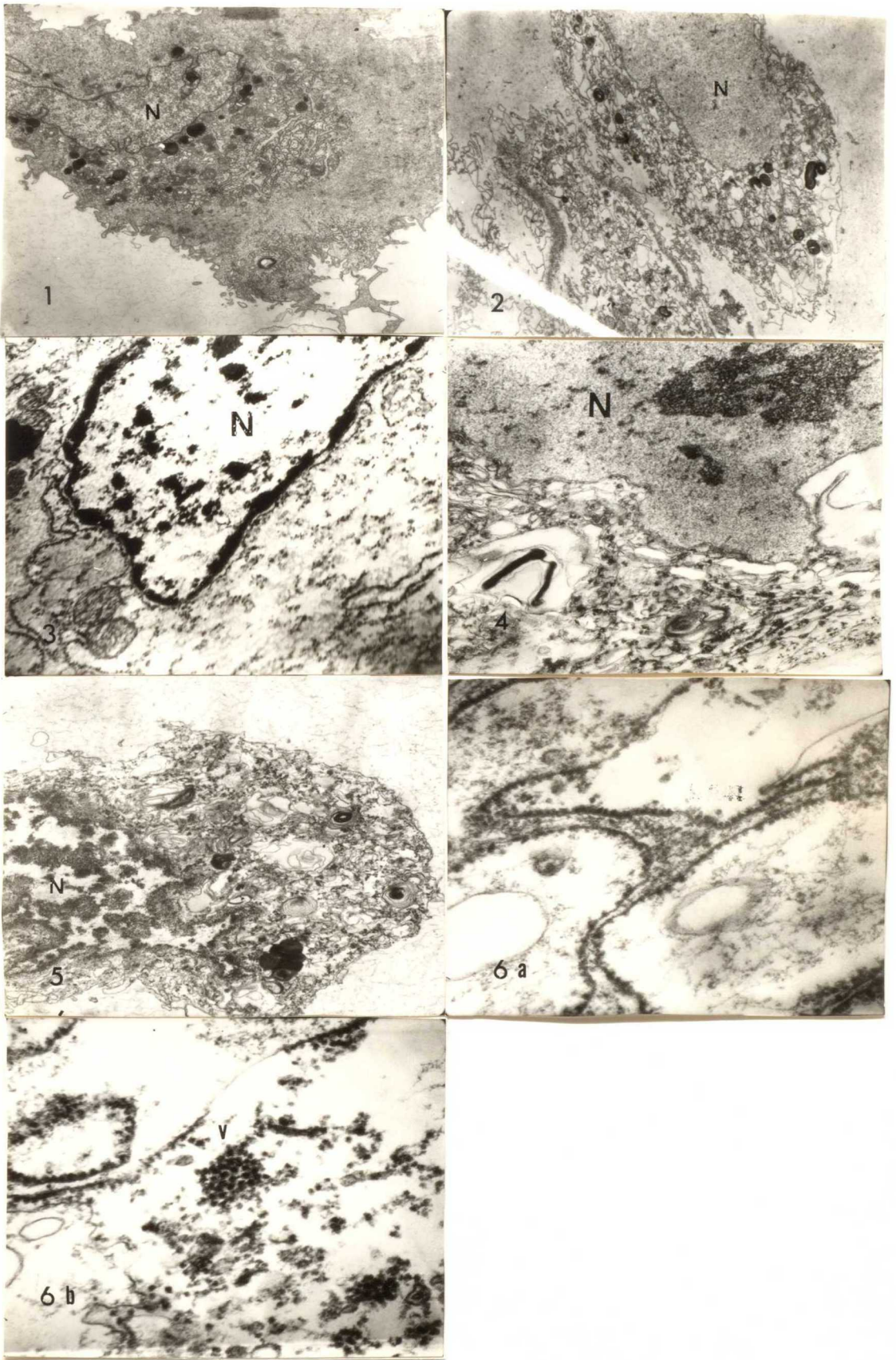
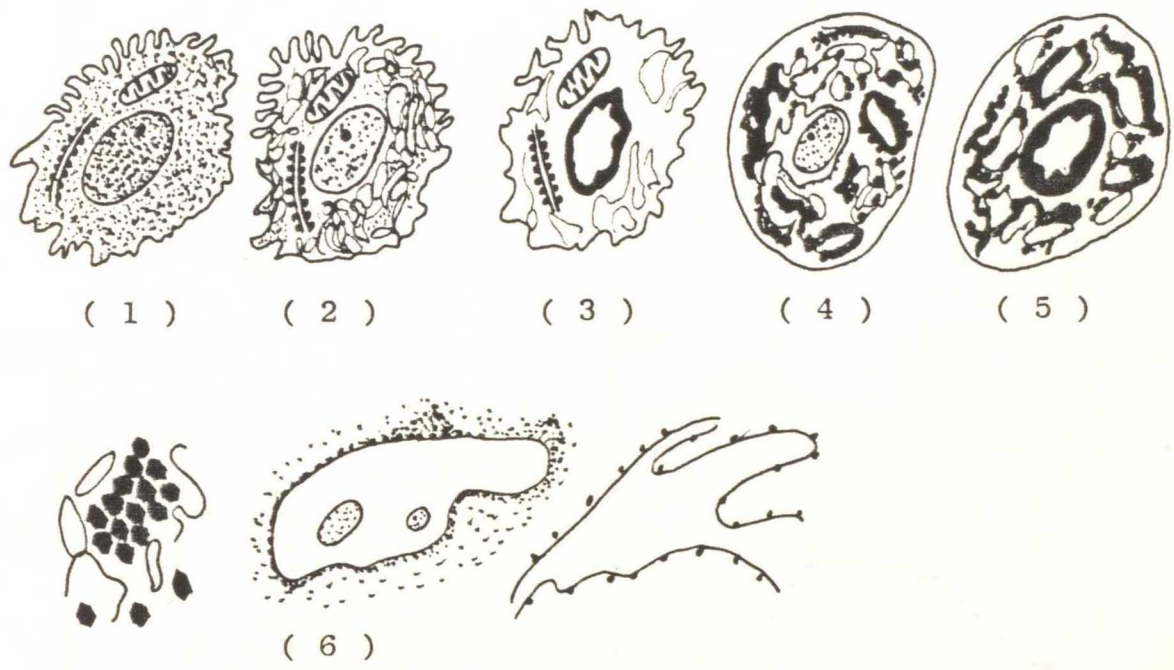


Fig.61. The infected cells were divided into six morphological characteristic types with two features due to nucleus and cytoplasm.

Morphological characteristics of six cell types



	Cell types					
Cell alteration	1	2	3	4	5	6
Chromatin accumulation of nucleus	-	-	+	-	+	
Cytoplasmic alteration						
M : Membrane						
VPC : Viral precursor complex	poor	rich	rich	rich	rich	rich
CMB : Cytoplasmic membranous body	M	M	M	VPC	VPC	VP
VP : Viral particle						CMB

Fig.62. Morphological classification of the infected cells with the appearance of viral particles as determined by electron microscope.

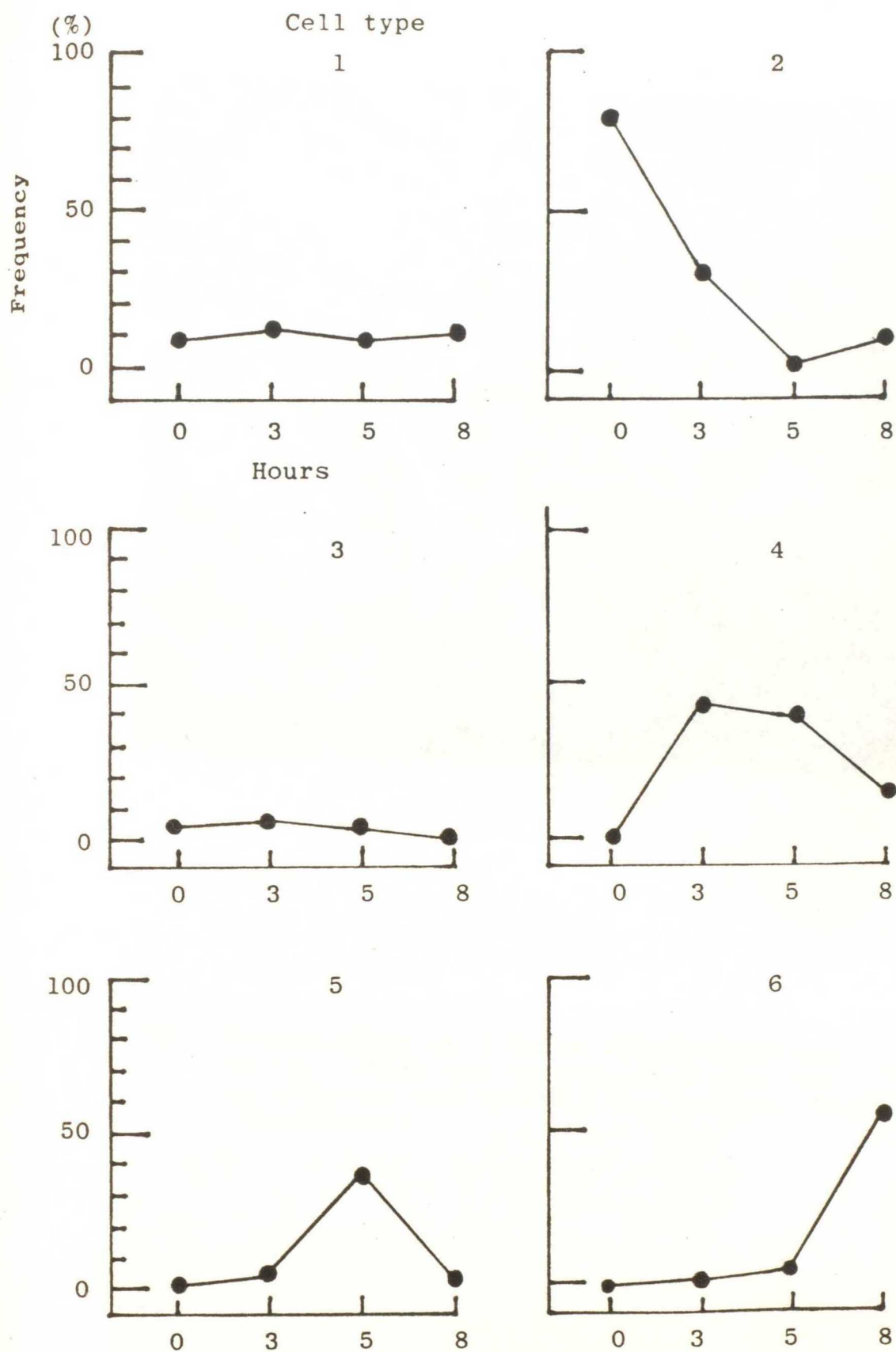


Fig.63. Schematic diagram to illustrate the successive changes after inoculation with feline calicivirus.

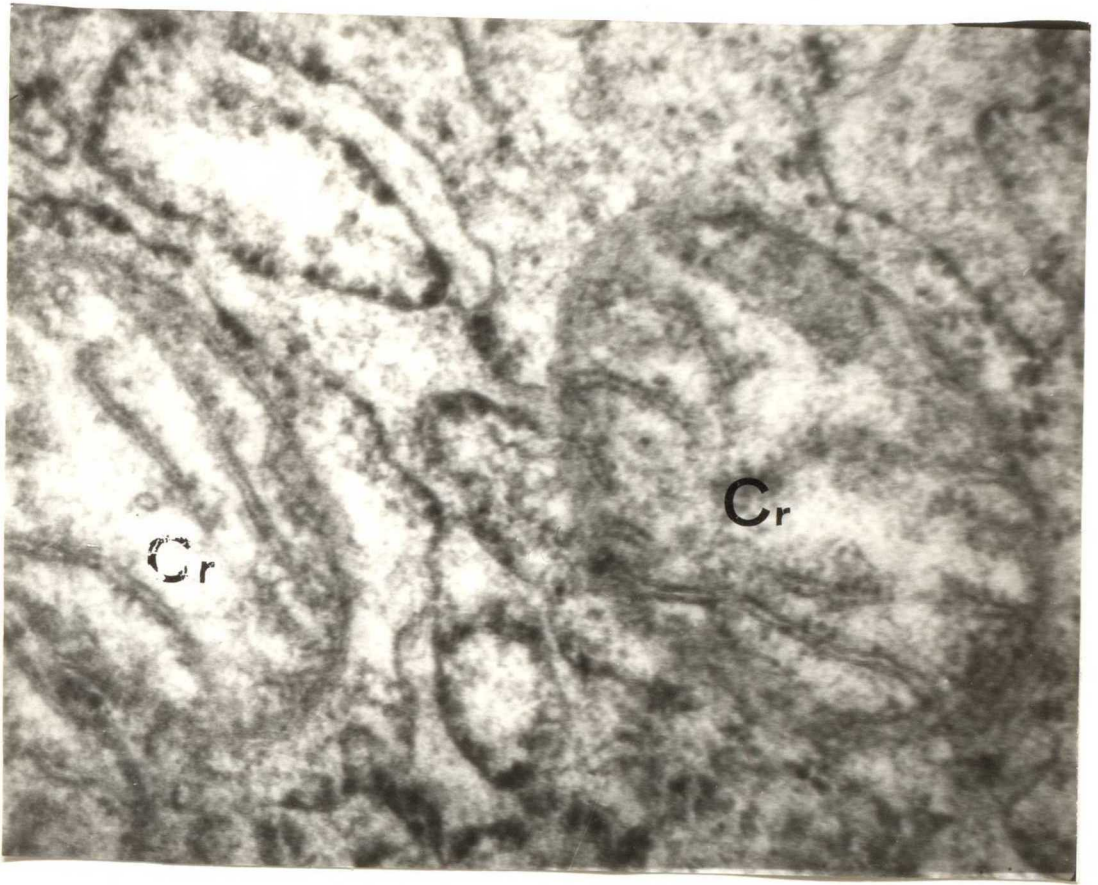
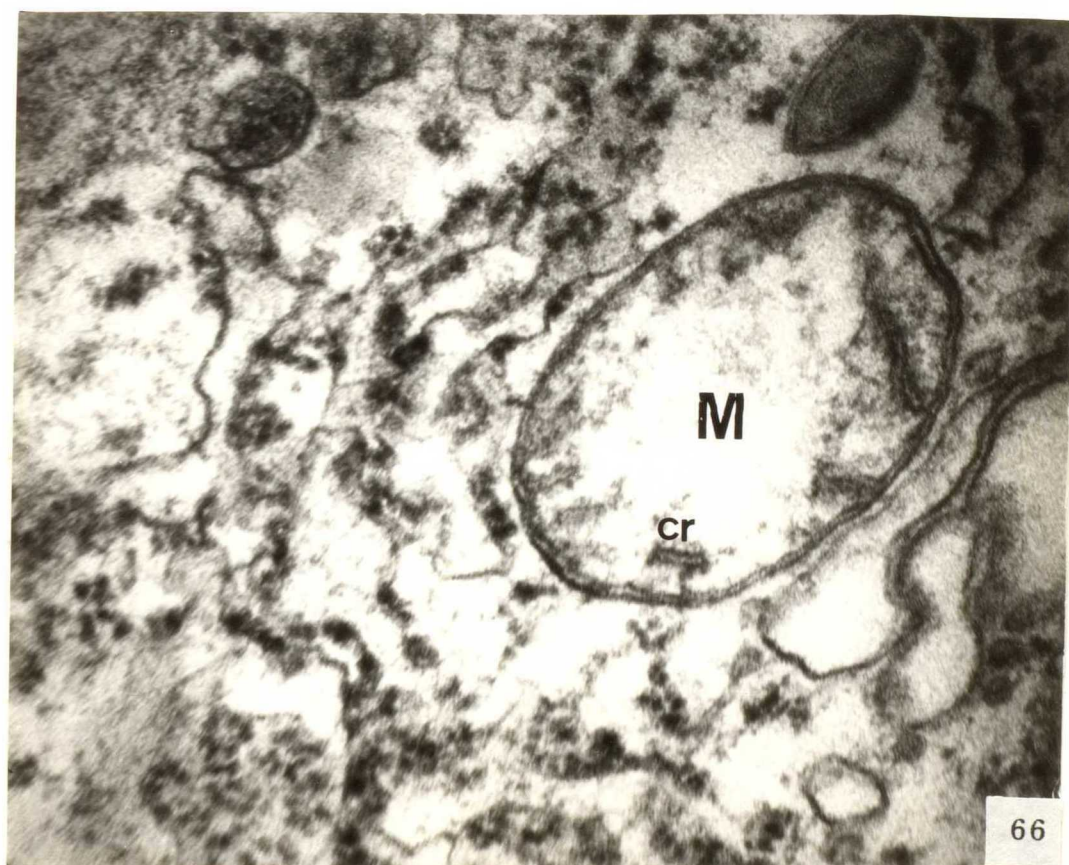
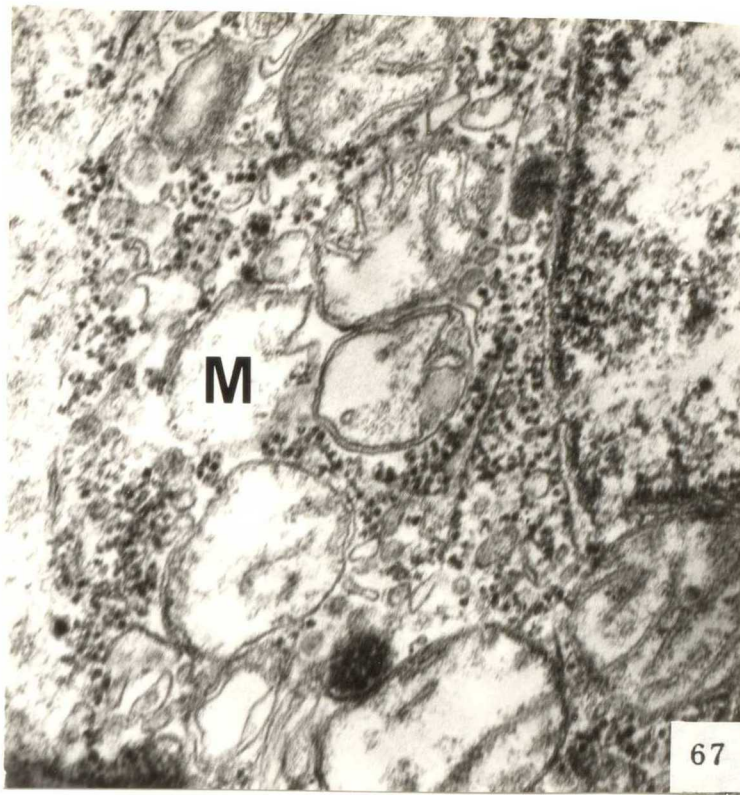


Fig.64. Mitochondria at 3 hours after infection.
At this stage the mitochondria were not
so affected and showed clear cristae (Cr)
(Mag.92,000).



Figs.65-66. Mitochondria of section at 5 hours after infection .Remnant of cristae in Fig.65 (Mag.92,000) and lost of cristae in mitochondria in Fig.66 (Mag.92,000).



Figs.67-68. Mitochondrion showed some morphological degenerations at 15 hours (Mag.50,000 in Fig.67 and Mag.84,000 in Fig.68).

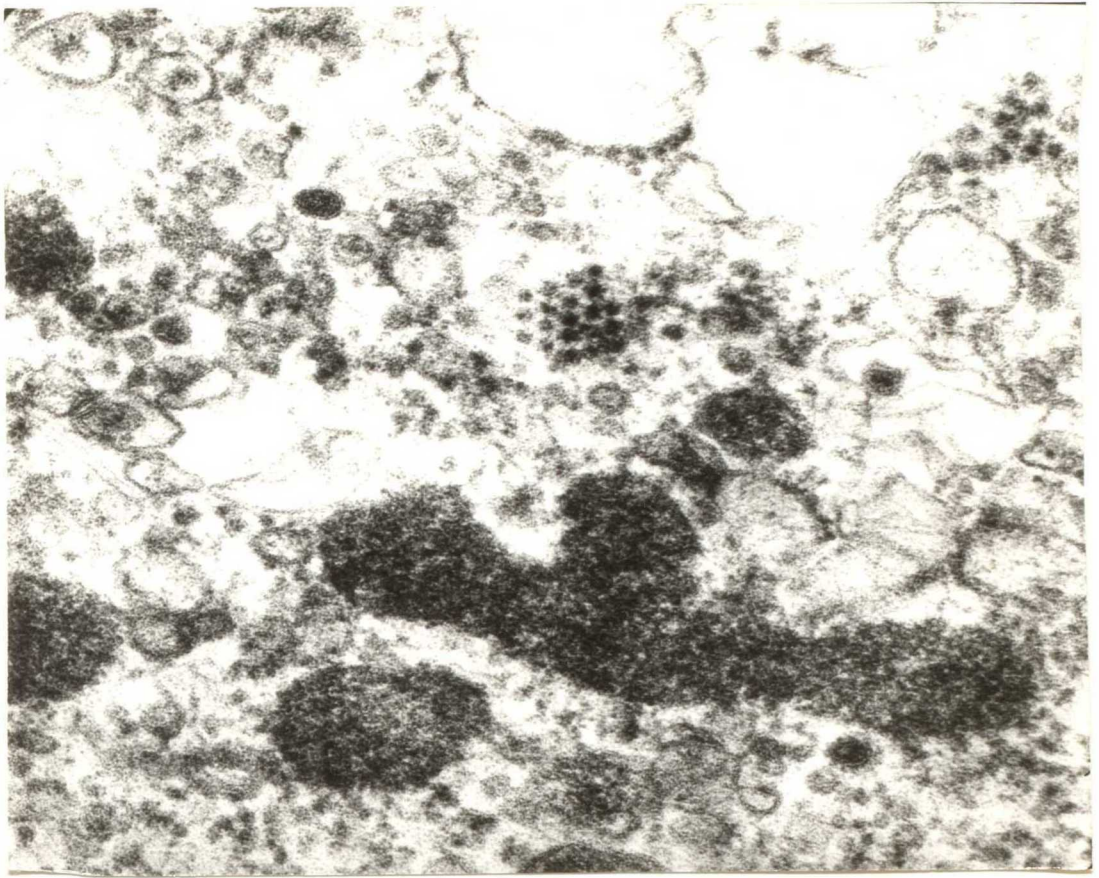


Fig.69. Degraded giant ribosomes at 8 hours after infection (Mag.92,000).

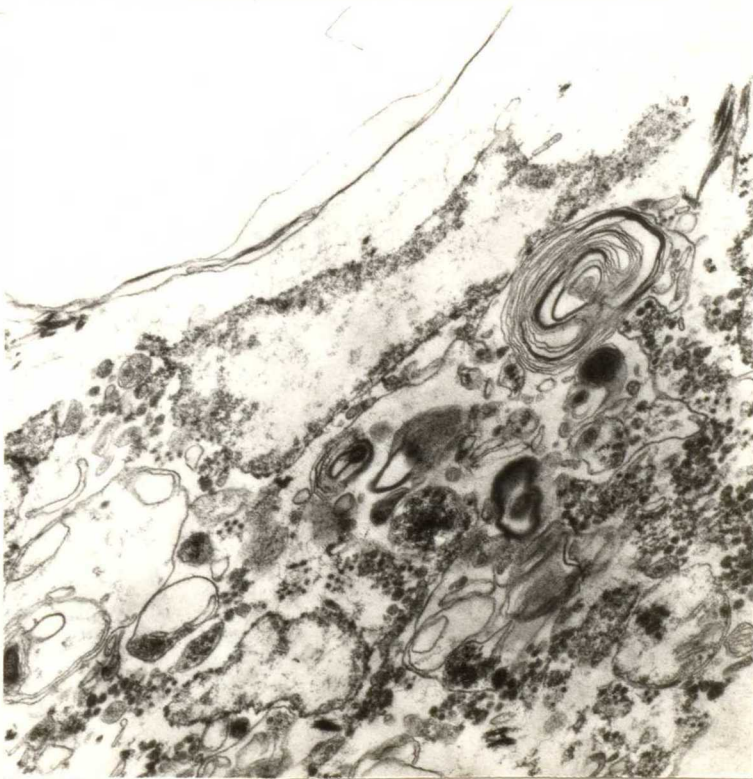
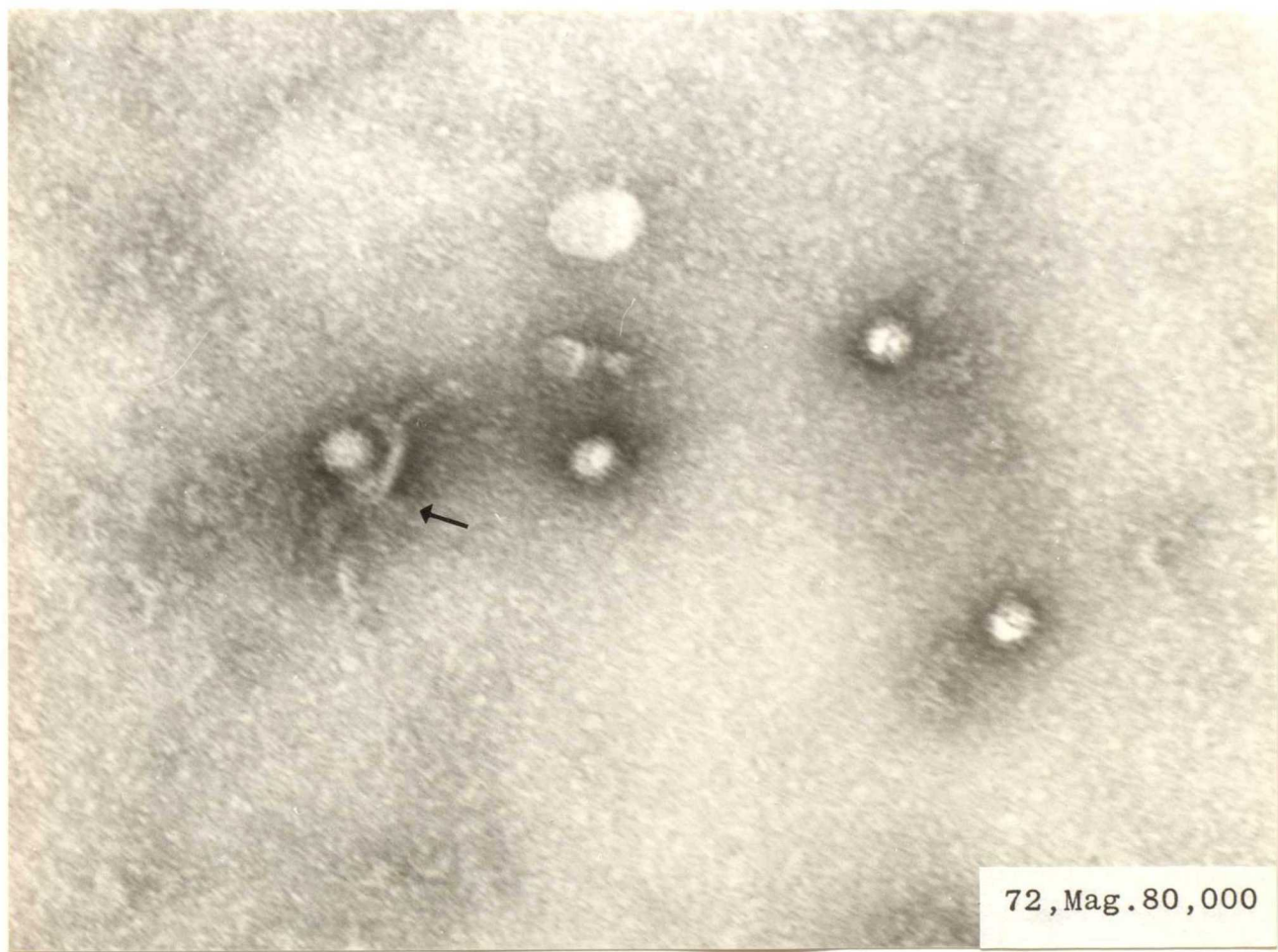
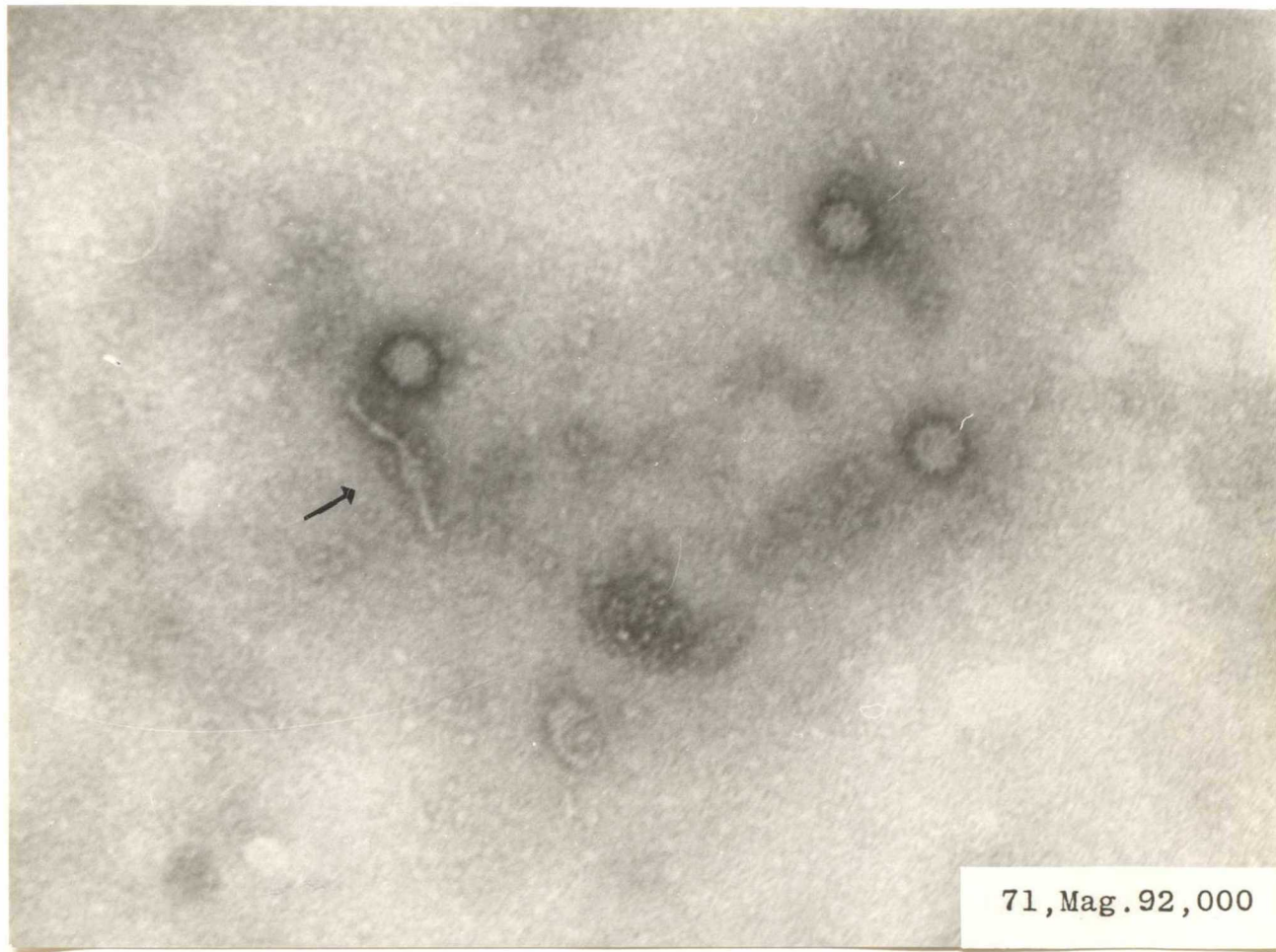
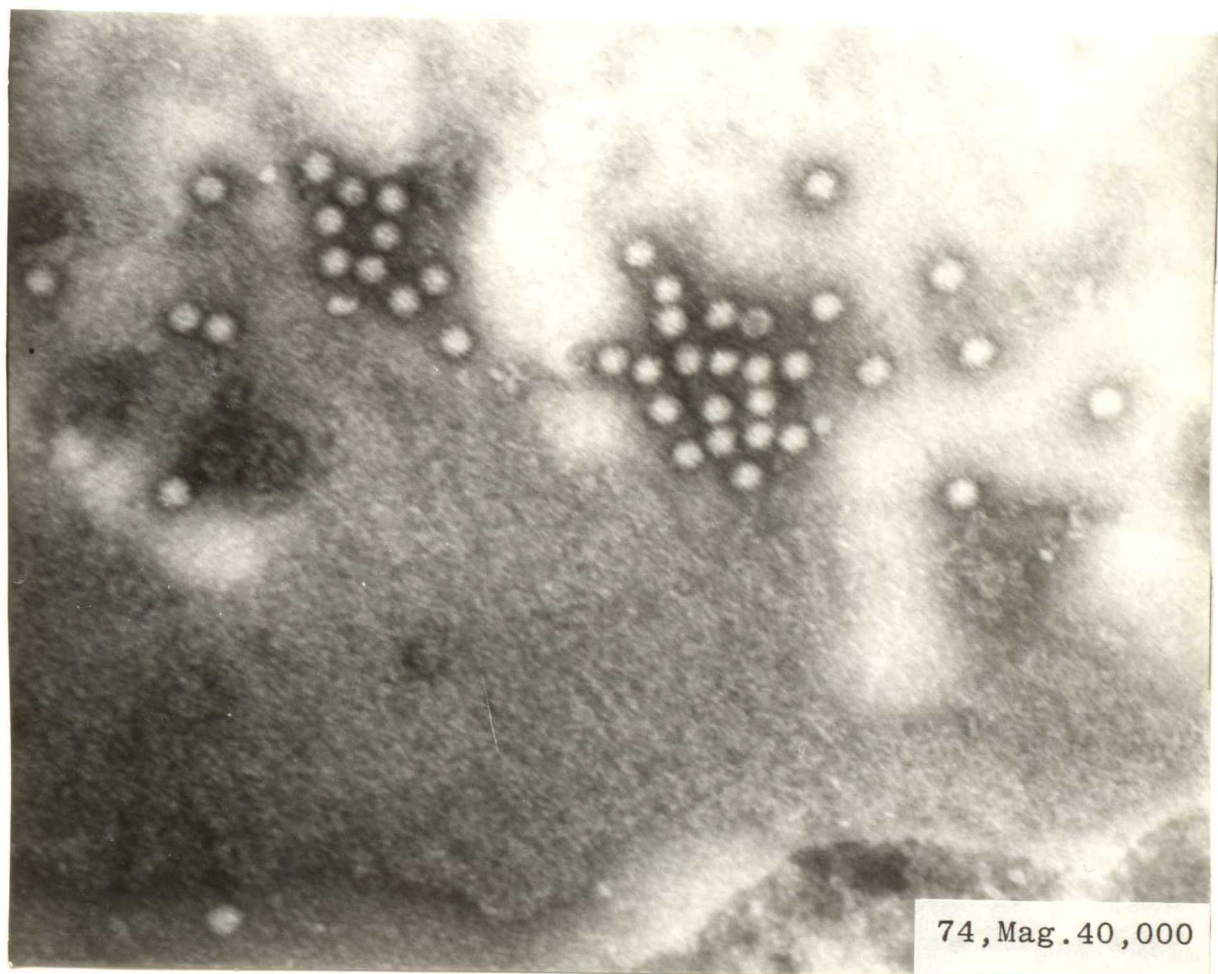
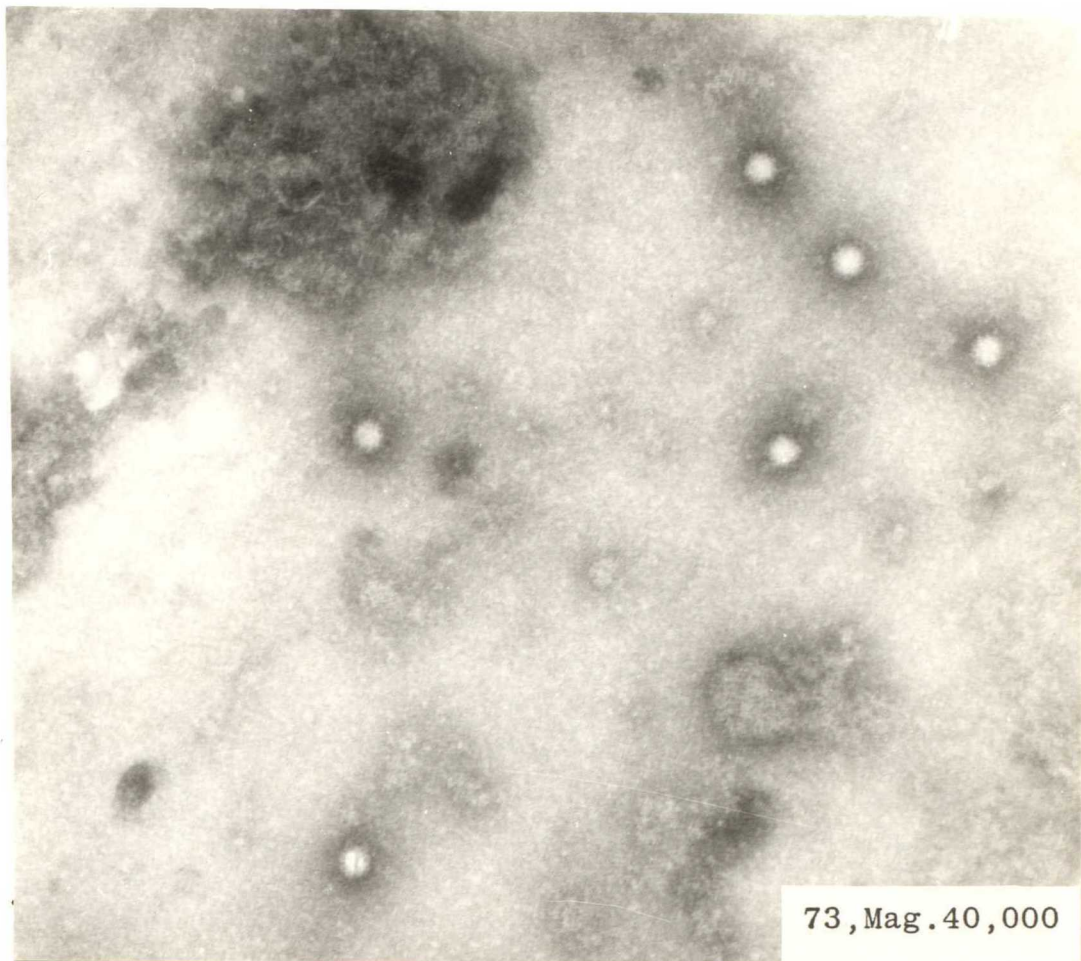
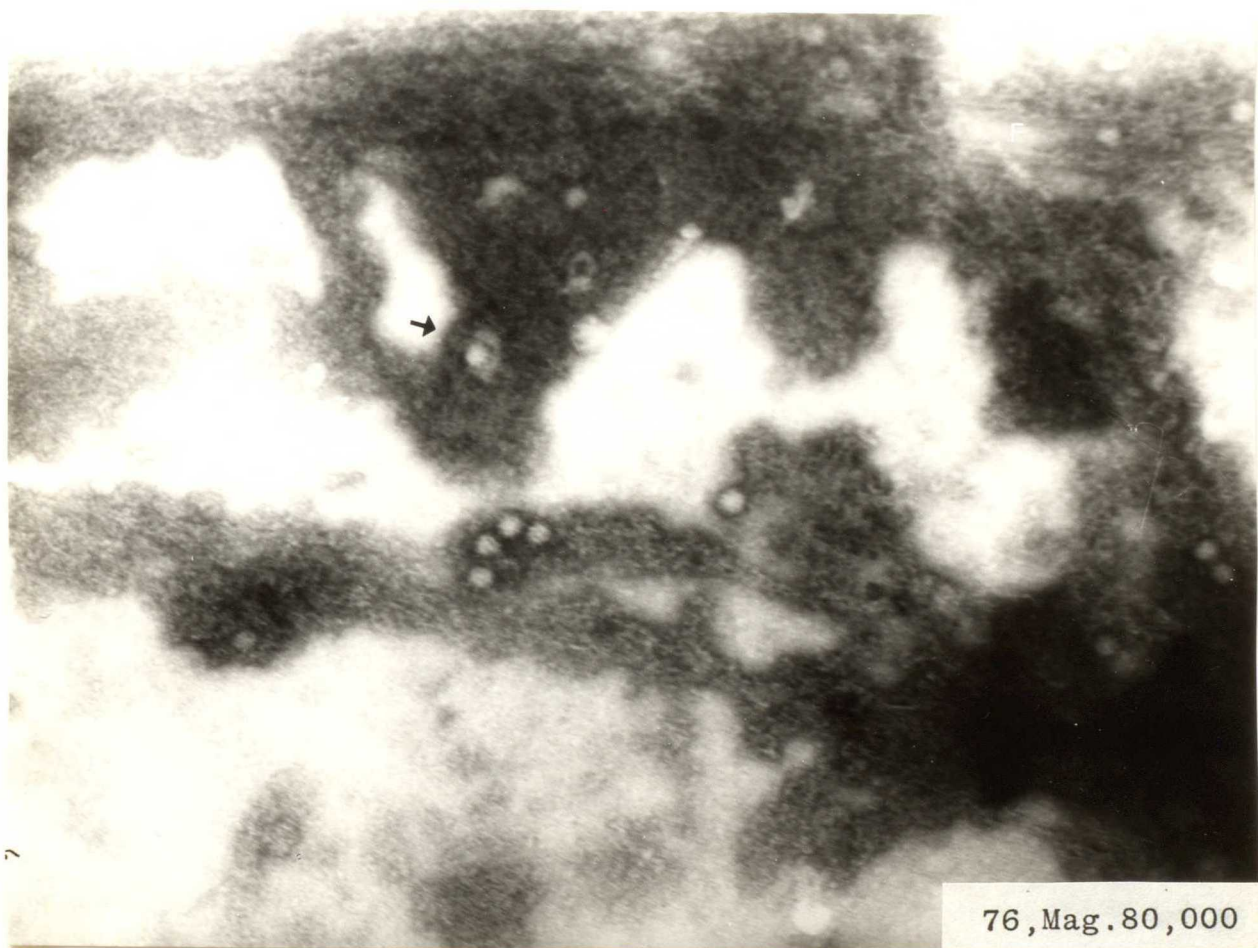


Fig.70. Section at 15 hours after infection. All infected cells were disrupted, but the viruses and vesicles were observed in broken pieces to be possessed of rather natural morphological shape as existed in those cells (Mag.33,000).

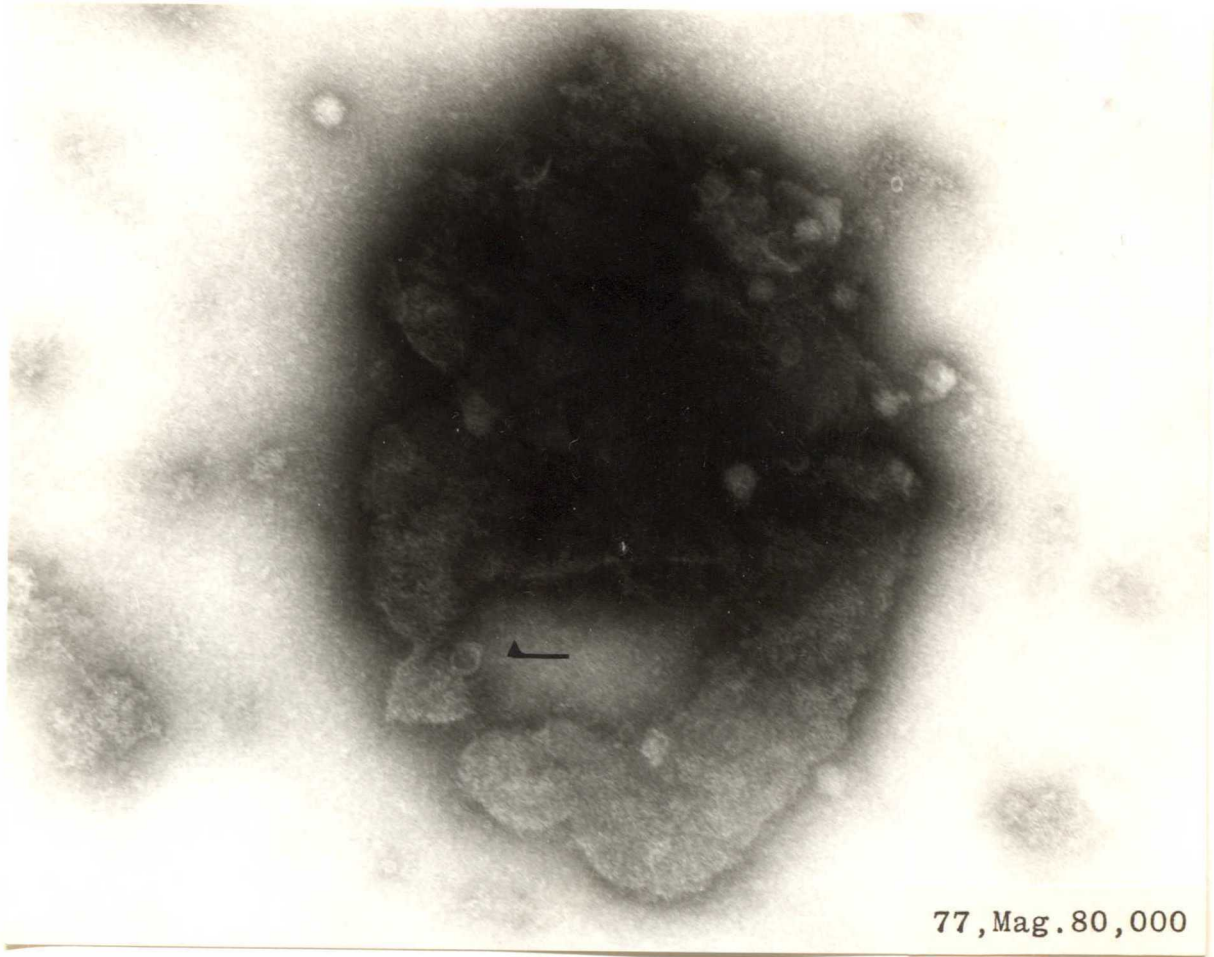


Figs.71-74. Negative stained viral particles.

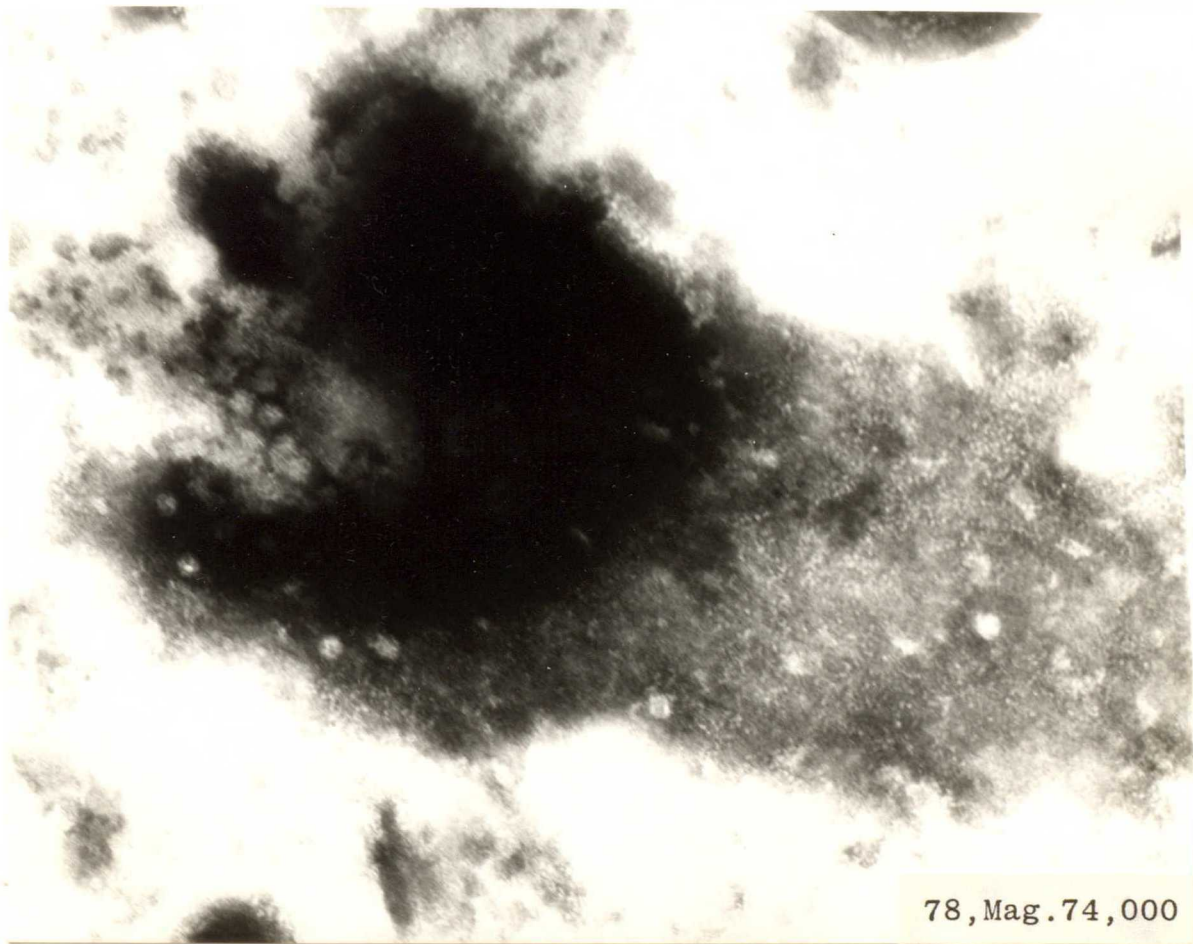




Figs.75-76. String formed by chain like subunits.

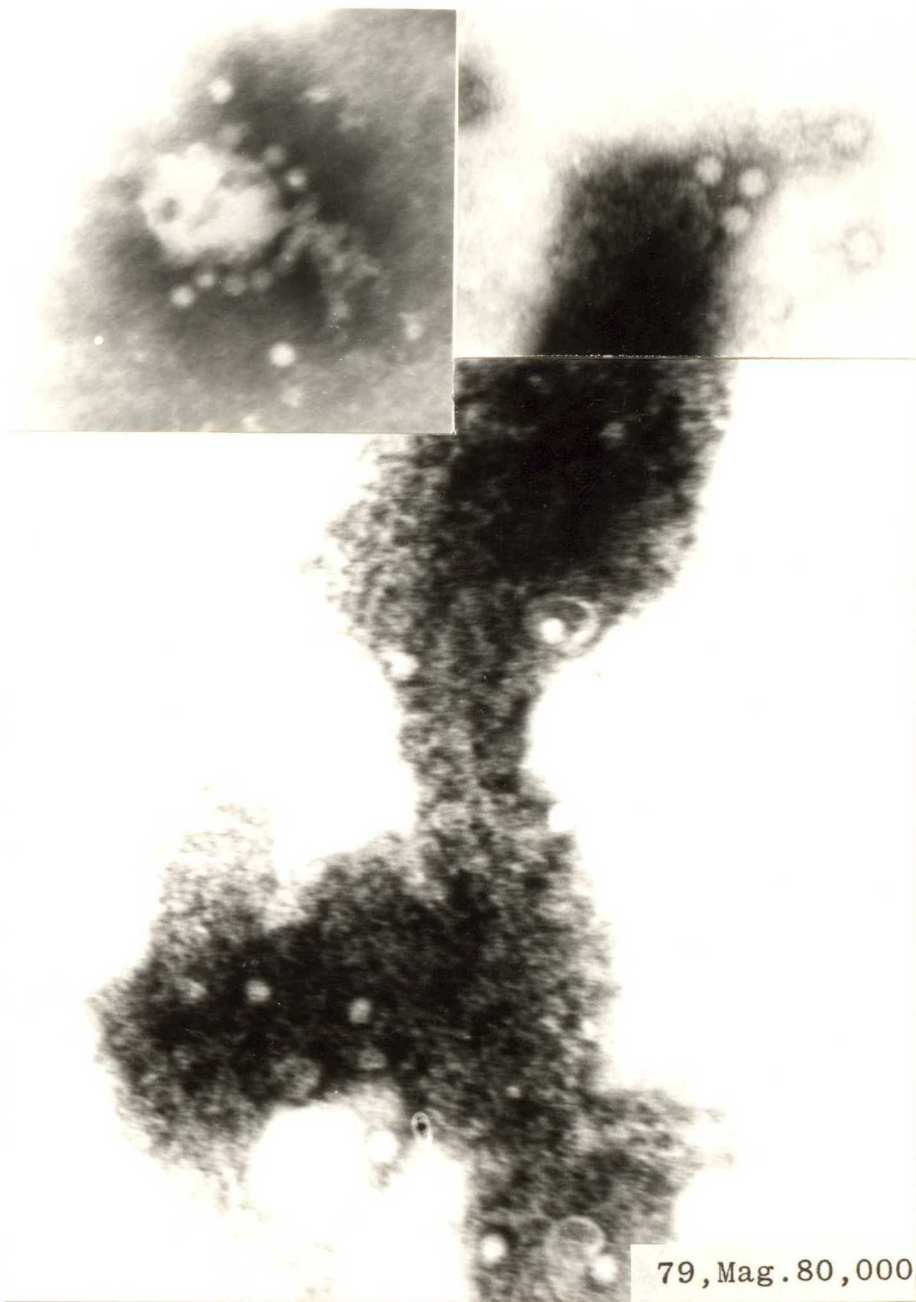


77, Mag. 80,000

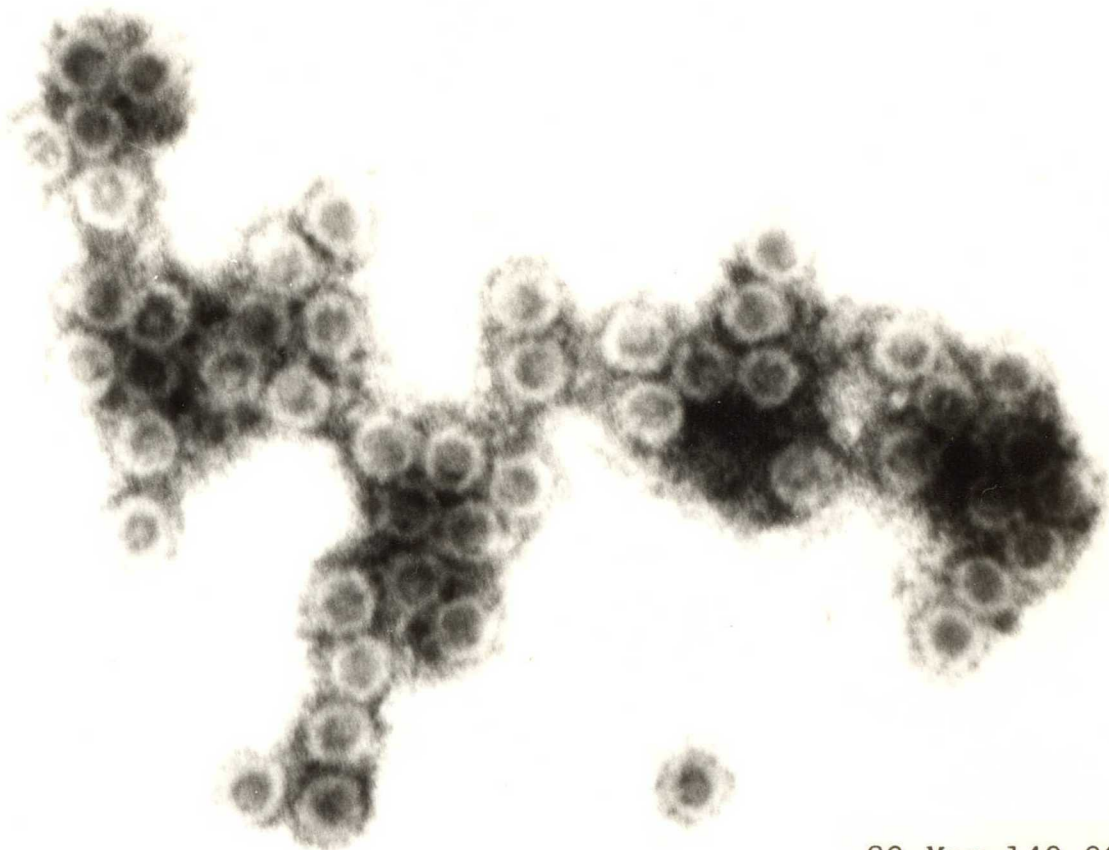


78, Mag. 74,000

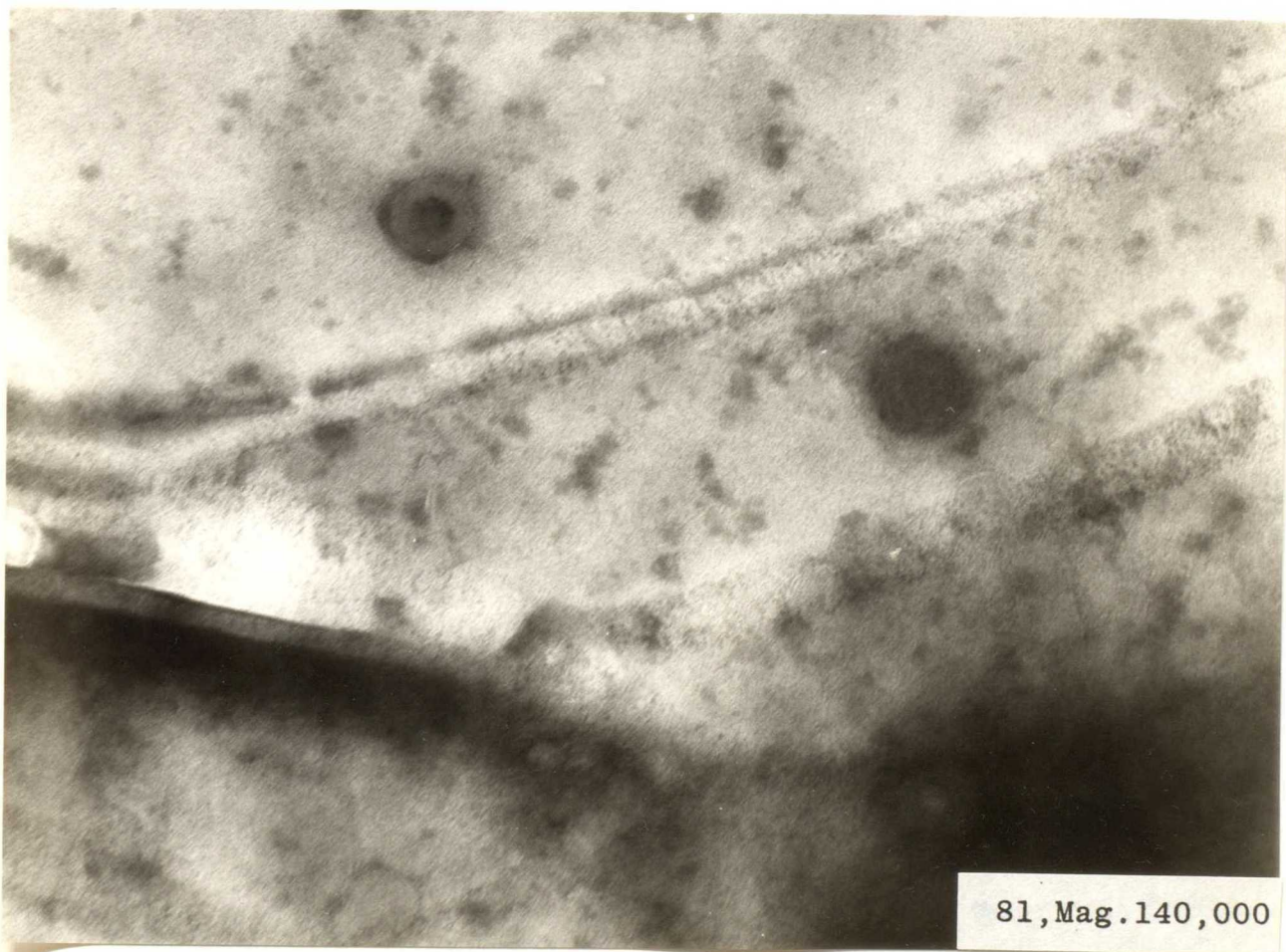
Figs. 77-79. Crump of viral particles and viral subunits on membrane



79, Mag. 80,000

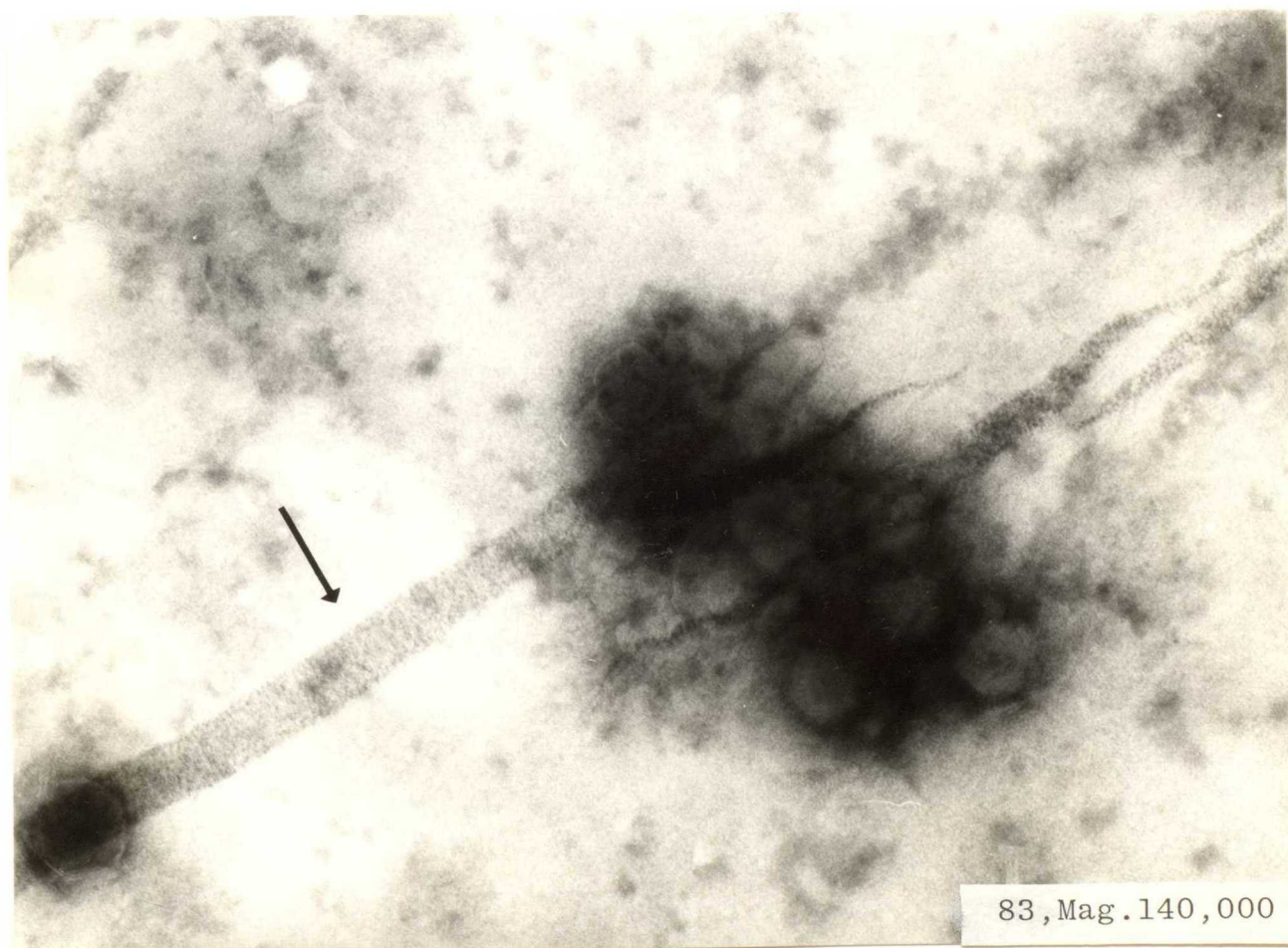
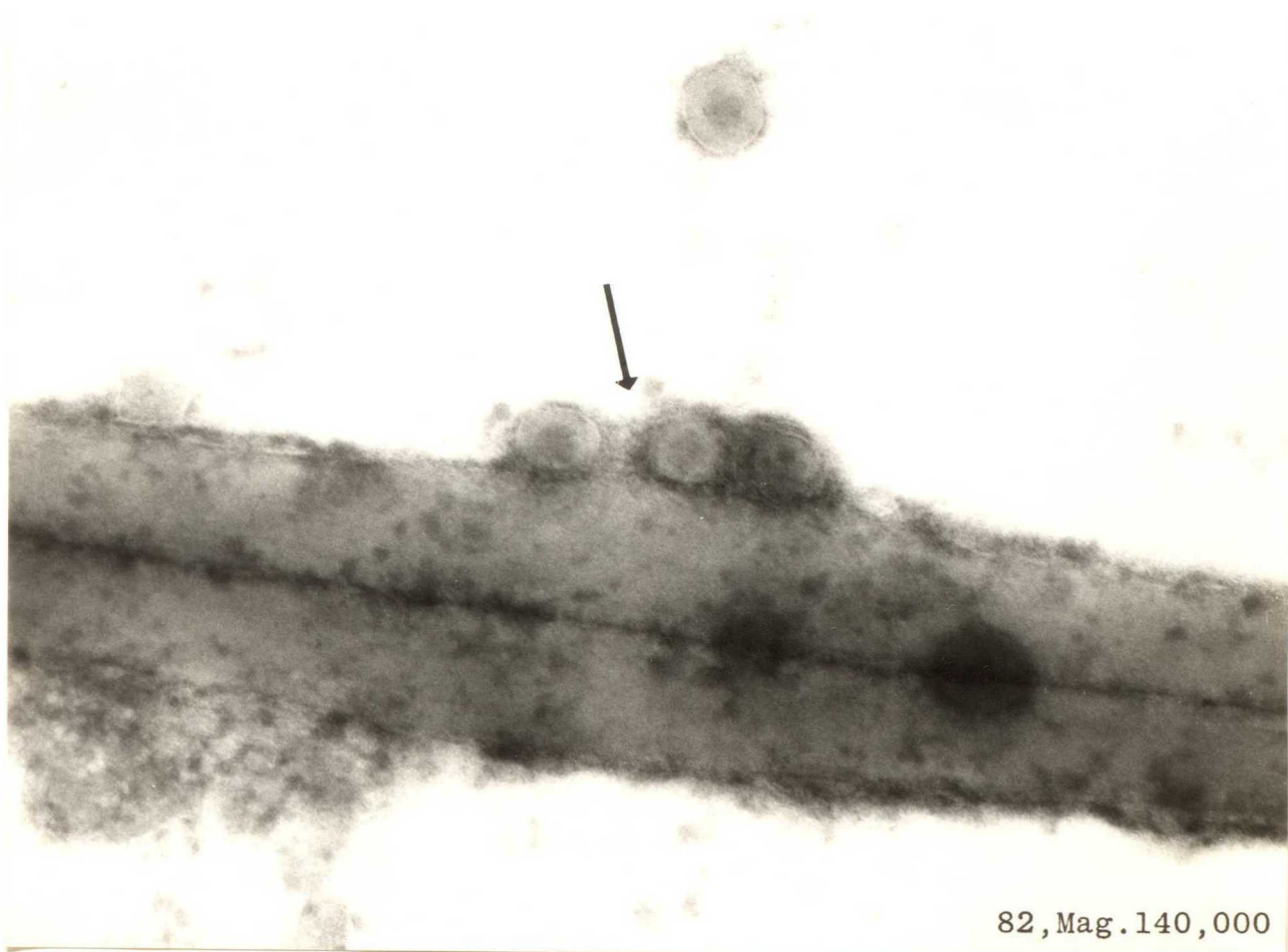


80, Mag. 140,000



81, Mag. 140,000

Figs. 80-83. Feline herpesvirus and attachment with fiber.



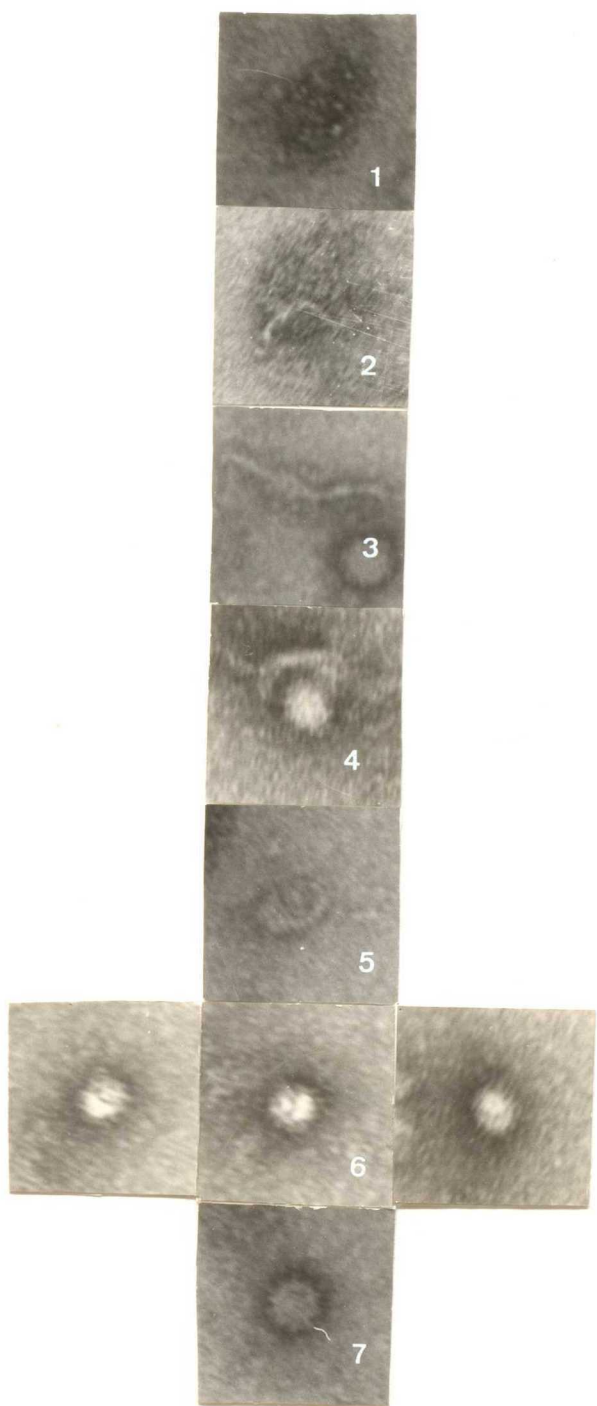
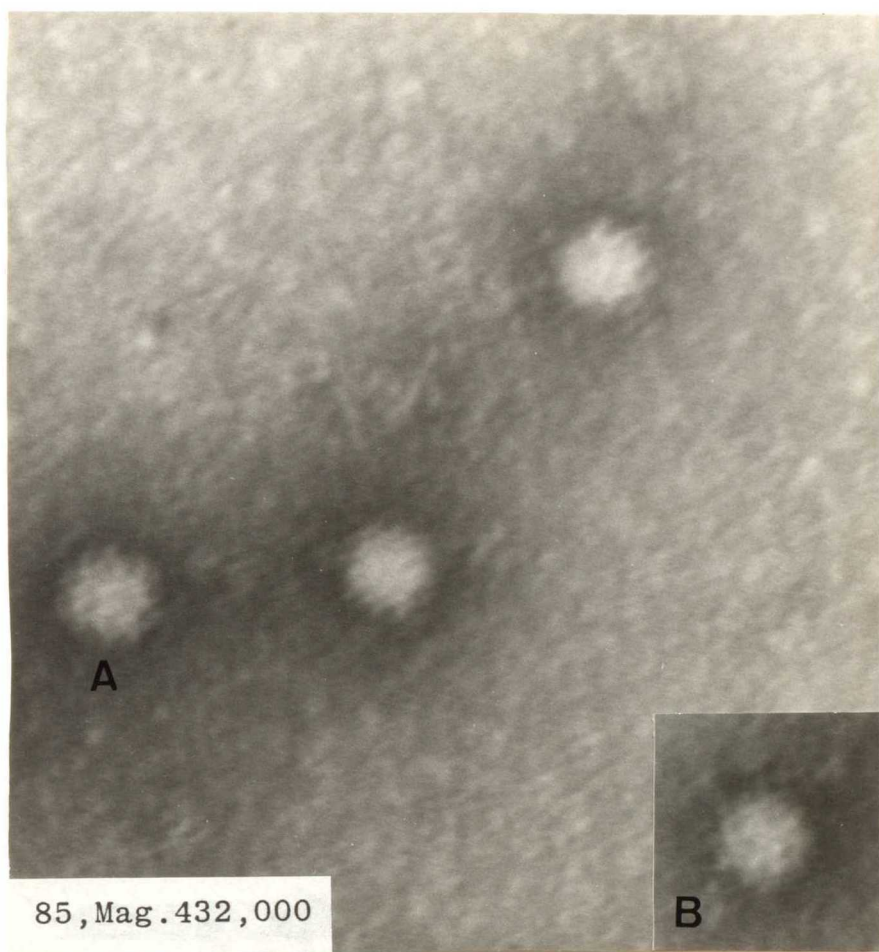
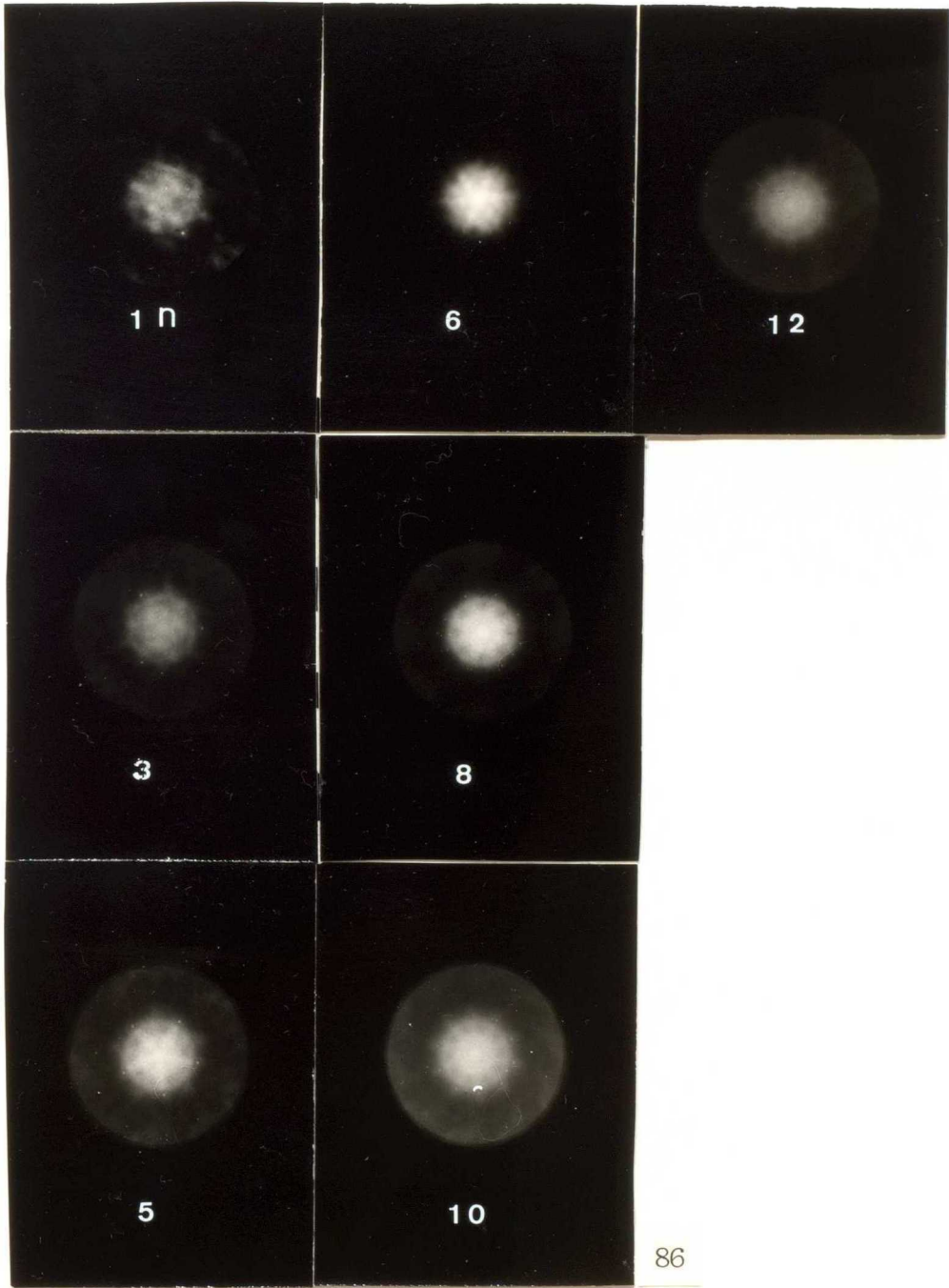
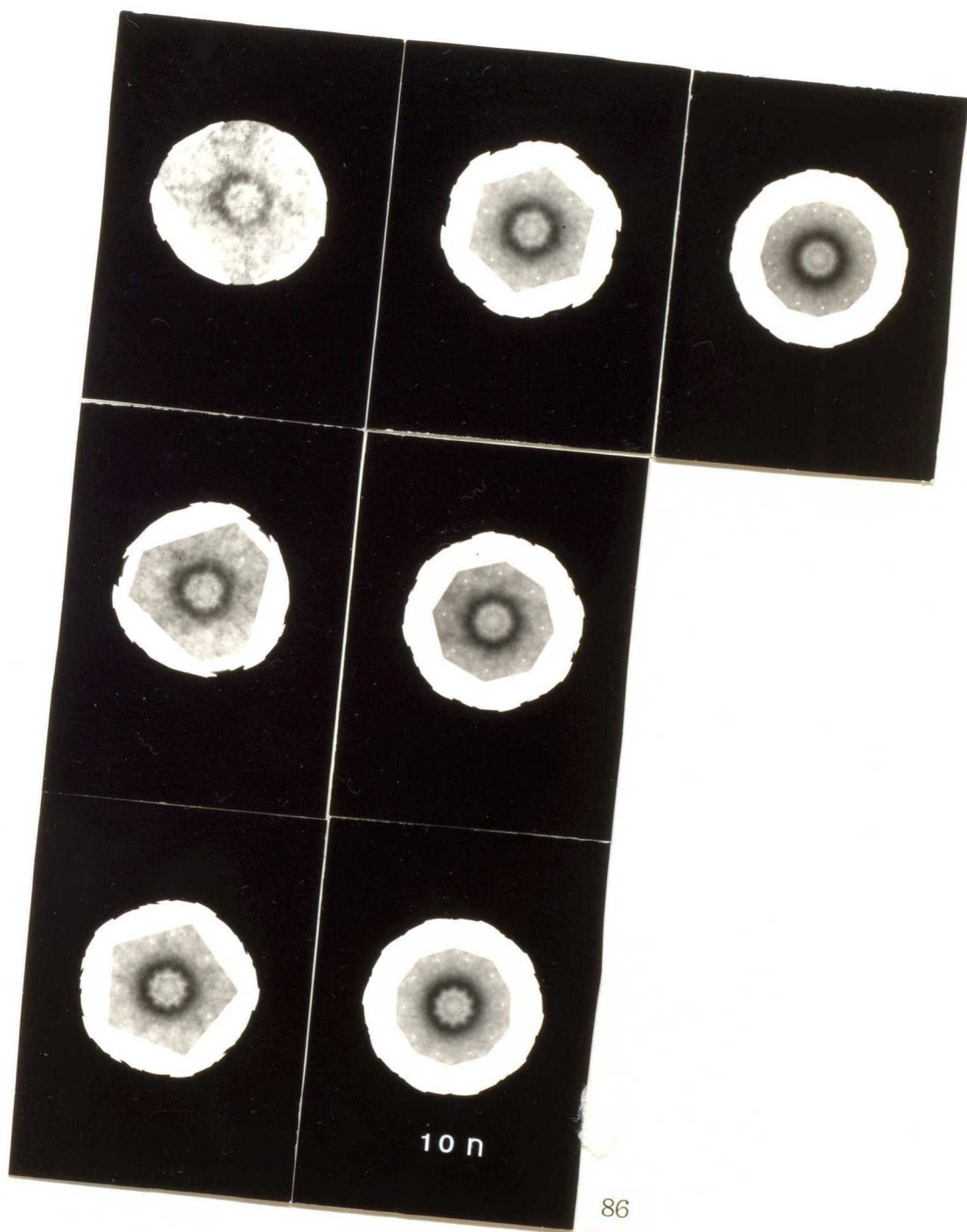


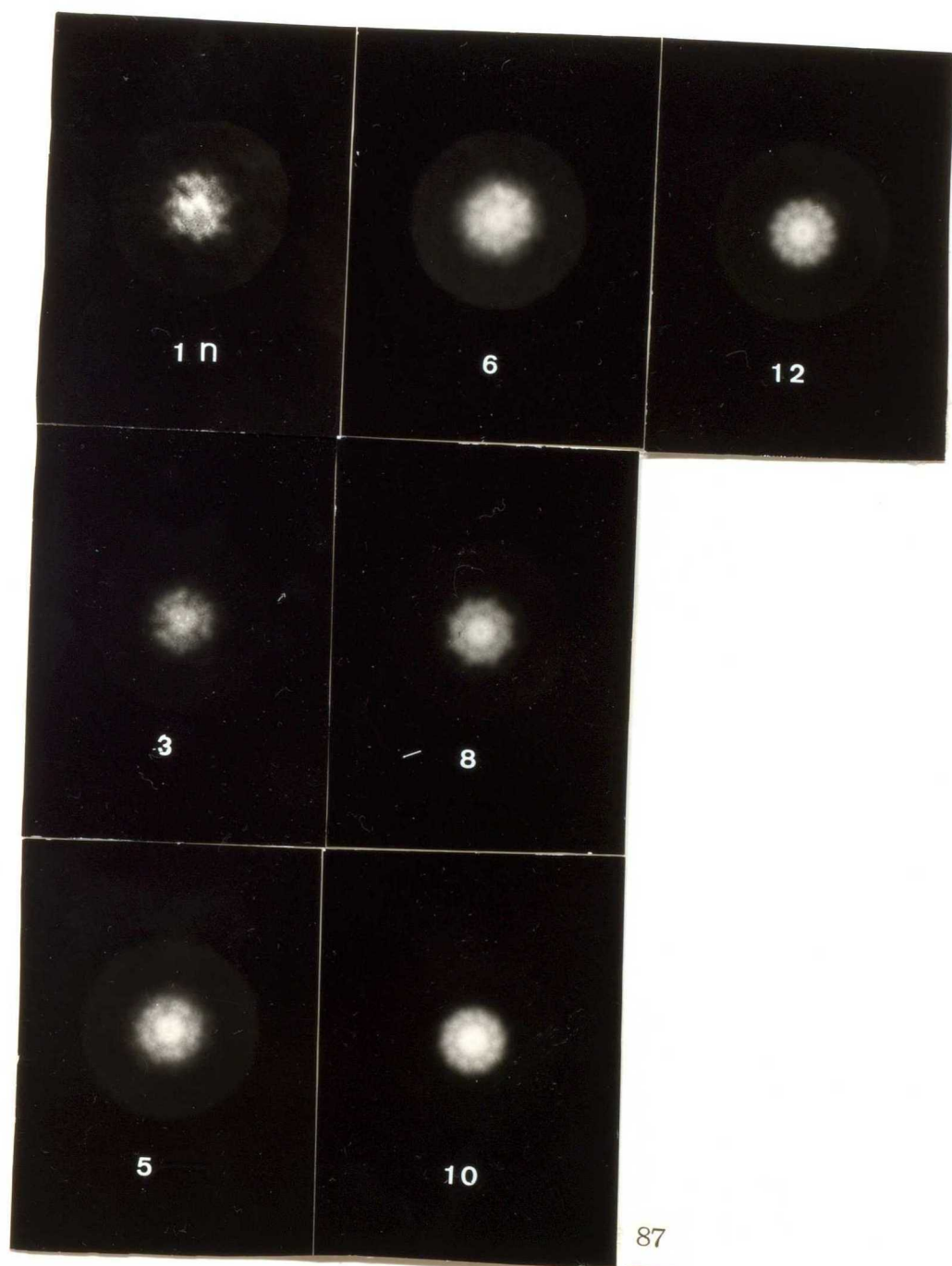
Fig.84. Sequence of viral particle formation.

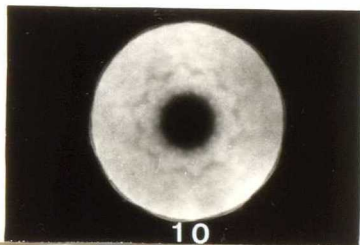
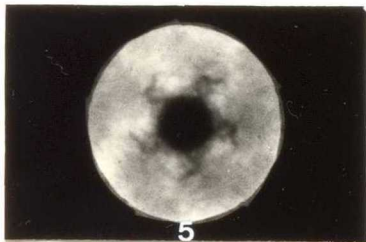
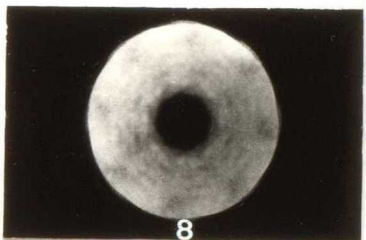
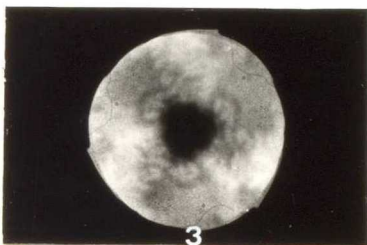
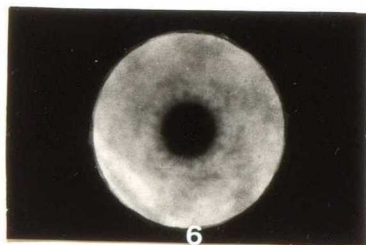
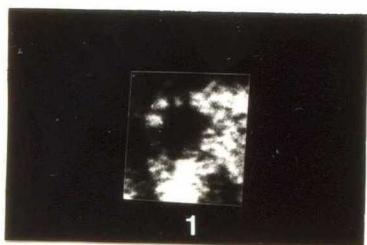


Figs.85-88. Rotation pattern of negative stained virus.

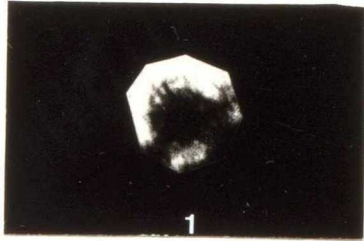




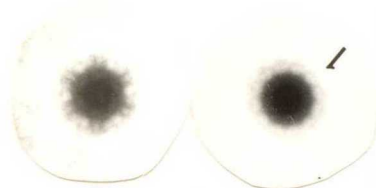




Figs.89-90. Rotation pattern of thin section.



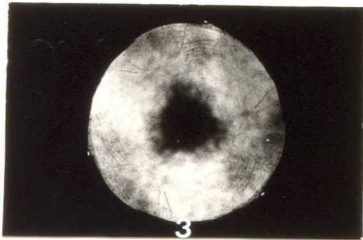
1



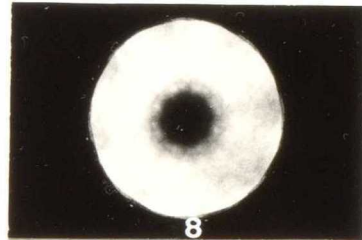
[a]

[b]

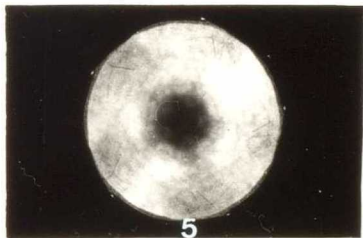
6 n



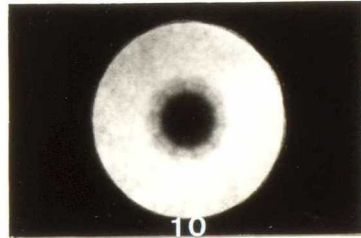
3



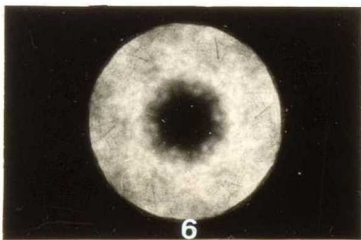
8



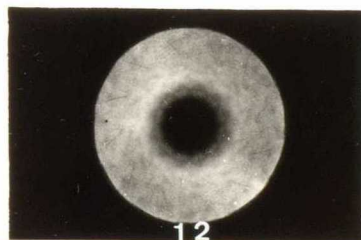
5



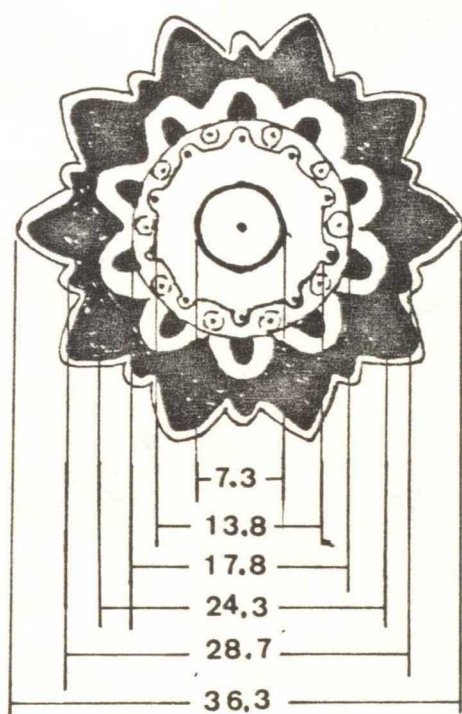
10



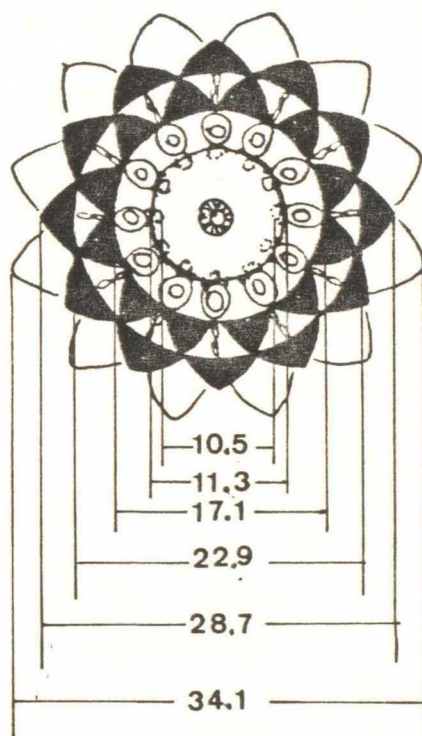
6



12



10



12

Fig.91. Viral particle was composed with core, inner and outer layers.

VIRUS

POLIO

MENGO

CALICI



Fig. 92 . ADVANCE OF MORPHOGENESIS

PR: Polyribosome
SB: Small body
VB: Viral bleb

VP: Viral particle
DM: Dense materials
VPC: Viral Precursor Complex

Table.1. Comparision of physicochemical properties
between Feline Calicivirus and Herpesvirus.

	Calicivirus	Herpesvirus
BUDR inhibition	4.5	2.75
Control	5.0	5.75
20 % Ether	5.5	0
5 % Chloroform	NT	0
Control	5.7	5.0
Acid stability (PH.3.0)	3.5	1.5
Control	6.25	4.0
Filtration		
Origin	5.2	6.0
220 nm	NT	2.5
100 nm	NT	0
50 nm	5.5	0
DOC sensitivity	NT	0
Control	NT	5.0
Heat stability		
Saline		
50° C, 60 min.	≤ 3.5	0
Room Tem.	5.5	4.75
1 M MgCl ₂		
50° C, 60 min.	≤ 3.5	0
Room Tem.	5.5	5.0

Table.2. Toxicity of Puromycin to Feline Lung Cells
(FLC).

Concentration of Puromycin(μ g/ml)	1000	100	10	1	0.1	0.01
C P E	+	+	+	-	-	-

Table.3.Effect of Puromycin with 1 μ g per ml. on
the Growth of Feline Calicivirus.

Hours after Infection	0	12	24
Differences compared with Control Cultures *	0	0.5	1

* Viral titer(Log TCID₅₀/ml.) of Control -
Viral titer produced under Puromycin

Table.4. Toxicity of Actinomycin D to Feline Lung Cells (FLC).

Concentration of Actinomycin D(μ g/ml)	50	5	0.5	0.05	0.005
C P E	++	++	+	-	-

Table.5. Comparision with the Size of Particles between Viruses and Complex Membranous Body

Item of particles	\bar{X}	\pm	Size (nm)	
			SD	Min.~Max.
Crystalline arraied ^{a)} viral particles	27.1	\pm	3.9	21.7 ~ 32.6
Linear arraied ^{a)} viral particles	28.9	\pm	1.5	27.1 ~ 32.6
Ribosomes from rough ^{a)} endoplasmic reticulum	20.0	\pm	3.5	13.0 ~ 26.0
Ribosomes from complex ^{a)} membranous body	20.6	\pm	6.0	20.2 ~ 27.6
Pre-crystalline arraied ^{b)} viral particles	32.6	\pm	3.7	26.3 ~ 39.4
Free ribosomes ^{b)}	18.4	\pm	4.2	13.1 ~ 26.3
Negative stained virus ^{b)}	37.2	\pm	3.3	31.5 ~ 42.1

a) Magnification of 46,000 folds, b) Magnification of 38,000 folds.

Table.6. Toxicity to Cells and Inhibition of Viral Growth by Iodoacetic acid.

	Concentration of Iodoacetic acid (mg/ml)						Cont.
	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001	
C P E	++	++	++	++	-	-	-
Viral Titer *	0	0	0	0	3.25	5.75	5.75

* Log TCID₅₀ / ml. All samples were cultured for 24 hours under Iodoacetic acid , afterthere the viral yield was calculated

Table.7. Effect of Amphoterisin B(Fungizon) on Appearance of C P E of FCV infected Cells.

Amphoterisin B(mg/ml)	C P E in hours after infection					
	0	3	5	8	16	24
0.1	-	±	±	+	+	+
0.01	-	-	±	++	+++	+++
0.001	-	-	+	++	+++	+++

FCV: Feline Calicivirus

Table.8. Sequence of Morphological Changes observed after Inoculation with Feline Calicivirus.

Cell Type	Hours after Infection			
	0	3	5	8
1	9.4 ± 7.7	12.3 ± 3.4	9.2 ± 3.7	11.7 ± 5.9
2	85.3 ± 5.4	31.8 ± 4.2	3.4 ± 1.7	11.6 ± 6.6
3	5.3 ± 2.8	7.4 ± 2.6	5.7 ± 4.0	2.6 ± 2.2
4	0	43.7 ± 2.1	40.1 ± 7.8	15.7 ± 8.4
5	0	4.4 ± 2.7	36.4 ± 8.5	2.7 ± 5.4
6	0	0.3 ± 0.6	51.0 ± 3.6	55.7 ± 11.7

$\bar{X} \pm SD (\%$)

Table.9. Effect of NaN_3 on Toxicity to Cells and Yield of Feline Calicivirus.

	Concentration of NaN_3 (mg/ml)						Cont.
	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001	
C P E	++	+	-	-	-	-	-
Viral Titer *	0	4.5	5	5	4.5	4.5	5.5

* Log TCID_{50} / ml. All samples were cultured for 24 hours under NaN_3 , afterthere the viral yield was calculated.

Table.10. Developmental patterns of Feline calicivirus.

	Hours after infection						
	0	2	3	5	8	13	24
Infectios virus	—	—	+	++	++	++	++
Protein synthesis	—	++	++	—	—	—	—
Fluorescent antigen	—	—	—+~	++	++	++	++
Concern with membrane	—~+	+	+	+	—	—	—
Morphological change							
Viral particles	—	—	—	+	++	++	++
Extrusion of nuclear membrane	—	—	—	+	+		
Development of plasma membrane	—	—	+	+++	+++		
Viral precursor complex	—	—	+	+++	++		
Mitochondria	—	—	+	+	+		

Table.11. Structural Size (nm) of Feline Calicivirus.

Rotational Symmetry	Structure of Outer Capsid			Inner Capsid			Core
	**						
5 fold ax.	36.3	30.9	28.7	24.3	17.8	13.8	7.3
3 fold ax.	34.1	-*	28.7	22.9	17.1	11.3	10.5

* No appearence

** The each size of present structures is reffered to Fig.91 .