

氏 名 (本籍)	原 元 宣 (島根)
学 位 の 種 類	獣医学博士
学 位 記 番 号	乙 第 177 号
学 位 記 の 日 付	昭和56年2月4日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学 位 論 文 題 名	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
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 田 淵 清 (副査) 教授 斎 藤 保 二 教授 越 智 勇 一

論 文 内 容 の 要 旨

ネコカリキウイルスは1957年 Fastier によってネコの上部呼吸器病の病原体として分離されて以来、ネコヘルペスウイルスと共に重要なウイルスとして臨床家に認識されるようになった。本ウイルスの分布、感染様式等についてはすでに詳細に報告され、我国においても広く浸潤し、多くの健康ネコがウイルスを保有し、感染源となっている。

中和試験による抗原分析の結果は非常に多くの抗原型を呈し、本ウイルスの血清学的分類はいささか混乱していたが、広域的な共通抗原を所有するウイルス株が発見され、多様な抗原性状は同一ウイルスの Variant とみなされ、この方面の研究は一応の区切りがつけられ、有効なワクチンも市販されるにいたった。

ネコ以外のカリキウイルスについては米国で豚の VEV (Vesicular Exanthema of Swine Virus) が知られていたが、1956年に消滅している。その後、1973年にはアシカから分離されて SMSV (San Miguel Sea Lion Virus) と呼ばれている。近年、幼児の下痢症からも検出され、注目されるにいたり、今後、獣医学及び人医学上の感染症の分野においてさらに重視される可能性を秘めている。

カリキウイルスは数年前までピコルナウイルスに分類されており、ネコや豚以外の宿主では本ウイルスによる独立したウイルス性疾患としての概念がなかった訳であるが、当時すでにカリキウイルス粒子は形態学的に Hollow capsomere を有し、サイズがやや大きい等の理由から分類上さらに詳細な検討が必要とされていた。一面、ピコルナウイルスについては口蹄疫ウイルスの発見からポリオウイルスの総合的研究まで古い歴史があり、本ウイルスの増殖様式は分子レベルの詳細な検討が加えられて来た。その反面、ウイルス粒子が非常に小型であるために電子顕微鏡による形態学的側面からの総括的検索は以外と少なく、多くは断片的な知見であった。特にウイルス成分の合成から粒子の構成へ移行する過程での前駆構造の証明が形態学的に不十分な状況のままに残されている。このような疑問点に関してはむしろ電子顕微鏡技術の限界を示すものではないかとも思われ、どの程度までが電顕によって観察しうる限界となるのか定かでない。一方、カリキウイルスの形態学的観察においても、この領域の問題はいまだ未解決のままで検討されていない。本研究においては特に前駆構造を形態学的に把握することを目的に、カリキウイルスの増殖機構をピコルナウイルスと比較検討しながら解明しようと試みた。本研究成績の概要は以下のとおりである。

1. ウイルス産生と抗原の出現

使用ウイルスは秋元氏から分与を受けた FIV-1 株をネコ腎初代培養に継代したものである。

感染性ウイルスの宿主細胞内及び細胞外への出現は感染 2 時間後から認められ、感染 8 時間後プラトーに達する一段増殖曲線で示された。蛍光抗体法によって検出されるウイルス抗原は感染後 4 時間目から出現した。抗原の出現する時期は感染性ウイルスがすでに形成されており、ウイルス蛋白が十分に合成構築された時期にあたると考えられる。蛍光は核内には認められず、細胞質内に限局していた。空胞の周囲に現われる傾向をみせたが、その内側には存在しなかった。この蛍光は時間経過と共に強くなり、5 時間後には顆粒状線維状を呈し、ウイルス粒子の配列像と関連するように観察された。

ウイルス蛋白の合成時期についてさらに検討するため、蛋白合成阻害剤であるピュエロマイシンの添加・除去による阻害実験を行った。顕著にウイルス産生が阻害される期間は感染早期の 2 時間から 3 時間の間であった。この期間が旺盛な蛋白合成時期に相当しており、暗黒期終了時からウイルス抗原の出現するまでの中間に位置していることが判明した。

この他、カリキウイルスの形成は 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 の影響を受けず、細胞側の DNA から RNA が合成される段階、もしくは、ウイルス自体の複製過程においても DNA が関連していないこと、さらに、エンテロウイルスの RNA 合成に阻害効果を示す HBB (2- α (hydroxybenzyl)-benzimidazole) はカリキウイルスに作用しない事実から、その RNA 複製、転写レベルはエンテロウイルスと相違していることが、Coxsackie-4B を対照に使用して追認された。

2. 感染細胞核の超微形態学的変化

核膜外膜の形態は感染後 3 時間から不規則な変化を生じ、内膜との遊離は 5 時間後に明らかに認められた。このような変化は、ウイルス増殖に積極的な役割を持つ構造的なものではなく、細胞質内の膜の増量にとまって誘発される現象であり、その後、核クロマチンの外側辺縁部への集積と凹凸化、さらに激しい核の分葉化が起こる。クロマチン集積像を呈する細胞の割合は 3 時間後に $4.4 \pm 2.7\%$ (平均値 \pm 標準偏差) であるが、5 時間後には $36.4 \pm 8.5\%$ に達し、その後減少した。クロマチン集積細胞数は感染の経過にともない増加する傾向にあるが、クロマチンの集積がなくてもウイルス粒子の形成があることから、これはむしろウイルス増殖によって受けた退行性変化であろうと思われる。核の外側の形態は凹凸が激しくなり、内側に巨大な核仁の変性像がしばしば認められた。

3. 感染初期の細胞質の構造

細胞質には感染後 2 時間まで形態学的変化を生じなかったが、3 時間後、細胞質内に膜と密接に結合した著しく電子密度の高い顆粒状構造が確認された。本構造は一様ではないが感染細胞に特有であって、この構造を有する細胞は時間後の 48.1% から、5 時間後に 76.5% に達し、ウイルス粒子を認め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始した。したがって本構造は前駆構造として最も疑いの持たれるものであった。

膜とウイルス形成の関連をさらに検討するために、膜のグリコリジスを抑制するヨード酢酸と、膜に機械的な小孔を開けるアンホテリシン B のウイルス産生への影響を調べた。ヨード酢酸による影響は極めて顕著であり、感染後 30 分頃から始まり 4 時間まで持続し、5 時間後にその作用を脱することから、膜は脱殻後のウイルス合成の全過程において関与していることを示唆しており、形態学的な結果をさらに裏付けするのであった。これに対しアンホテリシン B は軽い抑制効果を示したに過ぎない。

4. 感染後期の細胞質の構造

著しく電子密度の高いリボソーム様粒子が広く拡大する膜に付着する CMB (Complex membranous body) 構造については、今までその役割が不明であった。本実験において、感染5時間目の細胞にはその構造を認めなかったが、8時間後にはよく発達し、変性したリボソームが膜表面に集積していくと思われる像が観察された。したがって CMB 構造は後期に出現する構造と考えられ、粗面小胞体の変性像と思われる。正常よりも電子密度が高くなる理由はわからないが、いわゆるウイルス合成の場としては意味がないようである。

ウイルス様粒子が感染5時間後から確認された。結晶格子状配列をする粒子は $27.1 \pm 3.9\text{nm}$ のサイズを持ち、直線状に細線維と結合しているものは $28.9 \pm 1.5\text{nm}$ 、高頻度に出現する Pre-crystalline 構造を呈する粒子は $32.6 \pm 3.7\text{nm}$ であり、ネガティブ染色による $37.2 \pm 3.3\text{nm}$ に最も近い値をとる。

以上のような形態学的特徴を有する細胞を6型に分類し、経時的に百分率で表現した結果、感染後3時間から5時間にかけて増加した膜結合性の顆粒状構造が著しく発達し、急速にウイルス構成へ移行して行へ過程が明瞭に示された。この成績から顆粒状構造と膜の複合物がカリキウイルスの前駆構造であると結論づけられた。

5. ウイルス感染と細胞小器官

ミトコンドリアの変化は軽度であり、 NaN_3 による呼吸の抑制はウイルス増殖に全く影響を与えなかった。8時間後には変性したポリソーム様の集塊が観察され、巨大変性ポリソームと呼んだ。ウイルスの放出については特別な機構はないようである。この件については単なる細胞崩壊によるものとする。

6. ウイルス感染細胞の三次元構造

感染後10時間目の感染細胞を崩壊し、ネガティブ染色によって観察した。Capsomere subunit に類似する構造物が紐状、あるいは袋状を呈してウイルス粒子と部分的に結合していた。紐状構造はクサリ状の小単位がからみあい束状に連鎖していた。又、ウイルスの subunit と思われる構造は膜上に被い、ウイルス粒子も膜上に局在しており、超薄切片の成績とよく一致している。このような成績は、膜上においてウイルスが構成されることをさらに裏付けるものであった。

ウイルス粒子の構造は重ね燃き等の成績から、3回、5回対称性を有し、Core を2層の蛋白が包んでいる。形態学的には複雑に見えるが、一種類の蛋白から構成されていることが報告されているので、内層も外層も同一成分からできており、同一単体成分のくり返しによって形成されているものと推察される。

三次元構造においてはウイルス接種量は少なくし10時間後に50~70%程度の CPE が現われるように調節した感染材料を用いたため経時的な連続性のある像としてとらえることができなかった。

ポリオウイルス、エコーウイルス等のピコルナウイルスの増殖過程については、分子レベルにおいて膜の関与が明らかにされ、膜結合性前駆構造の指摘がなされているが、カリキウイルスで示された程著明な形態像は証明されていない。ピコルナウイルスについて観察されている前駆構造は膜に囲まれた Viroplasma、又は Viral bleb と呼称されるものであって、これが一応ウイルス合成の場とされている。両者を比較すると相当に異った構造であり、このことはカリキウイルスとピコルナウイルスの感染前期における増殖様式に違いがあるものと解釈された。したがってカリキウイルスにおいて観察された前駆構造は、このウイルスに特有なものであると考えられる。この見解は、最近カリキウイルスの感染細胞内に二種類の一本鎖 RNA が検

出され、ピコルナウイルスよりもむしろトガウイルスに似ていることが示された報告によってさらに支持されるものである。

以上のように本論文はネコカリキウイルスの増殖様式を明らかにすることを目的とし、主として形態学的な立場より、特にウイルス形成の行われる前駆構造を明確にした。一方、ピコルナウイルスとカリキウイルスの分類学的側面に対しても意義のある見解を与えた。

論文審査の結果の要旨

ネコカリキウイルス *Feline calicivirus* は1957年・Fastier によって最初に分離され、次いでネコの上部気道感染症における重要な病原ウイルスの一種として確認されるに至り、ネコの臨床上、ネコヘルペスウイルスと共に特に注目されることとなった。本ウイルスは我が国におけるネコの間にも比較的広く浸潤していることから、現在までにネコの本感染症については、その病理発生や臨床学的・疫学的諸様相がほぼ明らかにされ、そして、そのウイルス学的・血清学的診断法及び予防法についても一応確立されるに至った。他方、ネコ以外の宿主域を持つ *Calicivirus* としては、1956年に消滅した豚の *Vesicular Exanthema of Swine Virus* が知られていたが、これと抗原的に類似する病原ウイルスが1973年アシカから分離されている。さらに、近年、我が国でも幼児下痢症からカリキウイルス様粒子が検出され、本属のウイルスは人獣両医学上から一段と関心を集めるに至っている。

Calicivirus は一本鎖（十鎖）RNA 型の小型ウイルスであって、そのウイルス粒子は正20面体対称性のカプシドを形成して32ケのカプソメアを保有するが、エンベロープを欠く裸の粒子であることから、従来、*Enterovirus* 等と共に *Picornavirus* 群（科）に分類されていた。しかしながら、*Calicivirus* は、粒子の直径が35～40nm で *Enterovirus* よりやや大きく、粒子表面にカップ状陥凹物（Hollow capsomere）を形成する等、形態学的に特徴づけられ、分類学上再検討すべきことが指摘されていた。他方、*Picornavirus* の増殖様式については分子レベルの詳細な研究があるが、感染宿主細胞内でのウイルス構成成分の合成から粒子の組み立てに移行する過程の形態学的側面、特にその前駆構造の把握は断片的で不完全なままに残されている。一方、*Calicivirus* の増殖機構、特にその形態学的特性についてはほとんど研究されていない。

著者は本研究において、*Calicivirus* の増殖機構を解明する目的でネコカリキウイルスの増殖過程における感染宿主細胞を主として超微形態学的に観察し、*Picornavirus* の増殖過程と対比・検討しながら前駆構造の動態とその本質的役割を明確にすると共に、*Calicivirus* と *Picornavirus* との分類学的独立性を支持する積極的な根拠を初めて提出することに成功した。本研究成績の概要は次のとおりである。

1. ウイルス産生と抗原の出現

本研究には主としてネコカリミウイルス FIV-1 株とネコ腎初代培養細胞との感染系が使用された。

ウイルスの感染後、経時的に感染性ウイルス粒子の産生と蛍光抗体法によるウイルス抗原の出現様相を調べた結果、前者は感染3時間目に出現しはじめ、8～10時間後にプラトーに達したが、特異蛍光は感染4時間目に明らかに認められるようになり、漸次蛍光を増強した。特異蛍光の出現時期は、すでに感染性ウイルスが形成されており、ウイルス蛋白の充分な合成・構築後に相当するものと考えられる。この特異蛍光は細胞質内、特に空胞周囲に限局して認められ、感染5時間後には顆粒状又は線維状を呈し、ウイルス粒子の配列像と関連するように観察された。

ウイルス蛋白の合成時期を検討するため、ピューロマイシンによる感染性ウイルスの産生阻害効果を調べた結果、その作用は感染早期の2～3時間の時期に一致した。一方、*Enterovirus* の RNA 合成阻害剤：HBB(Hydroxy-benzyl-benzimidazole) はネコカリキウイルスに阻害効果を示さないことから、両者のRNA複製又は転写機構の異なることが追認された。

2. 感染細胞核の超微形態学的変化

感染細胞核は感染3時間後から変性しはじめ、その外膜は5時間後に明瞭に内膜からの遊離を示し、核クロマチンの核膜外側部への著明な集積と核の分葉化を生じた。クロマチン集積像を示す細胞の比率は、3時間後に4.4%であったものが、5時間後には36.4%に達した。ウイルス粒子の形成はクロマチン集積像を示さない細胞でも認められることから、この変化は、ウイルス増殖に必要な本質的なものではなく、細胞質内の膜質の増量にもよって誘発される現象であると考えられる。

3. 感染初期の細胞質の構造

細胞質の形態学的な変化は、感染後2時間以内には全く認められなかったが、3時間後には細胞質内の膜構造に密着して出現する電子密度の著しく高い顆粒状構造を確認した。その出現率は感染3時間後の48.1%から、5時間後に76.5%へと上昇した。この顆粒状構造は感染細胞に特有であって、膜の発達と関連しており、いわゆる前駆構造として理解された。

膜とウイルス形成との関連性を検討するために、膜のグリコーゼ抑制剤：ヨード酢酸及び膜小孔形成剤：アンホテリシンBの添加によるウイルス形成の阻害効果を調べた結果、前者による影響は極めて強く、その作用は感染後30分頃から効果を示しはじめて4時間後まで持続し、5時間後にはその影響を認めなかった。したがって、膜の関与はアンコーティング後のウイルス複製の全過程に必要であるものと考えられる。これに対して、アンホテリシンBは軽度の抑制効果を示したに過ぎない。

4. 感染後期の細胞質の構造

広く拡大する膜構造に著しく電子密度の高いリボソーム様粒子の付着した Complex membranous body (CMB) 構造は、感染5時間目の細胞には認められなかったが、8時間後にはよく発達し、変性リボソームが小胞体膜表面に集積したと思われる像として観察された。したがって、CMB 構造は粗面小胞体の一変性像であって、いわゆるウイルス合成の場としては無関係であると考えられた。

ウイルス様粒子は感染5時間後から確認され、結晶格子状配列粒子のサイズは $27.1 \pm 3.9\text{nm}$ 、直線状の細線維結合粒子は $28.9 \pm 1.5\text{nm}$ であり、高頻度に出現する pre-crystalline 構造を構成する粒子は $32.6 \pm 3.7\text{nm}$ でネガティブ染色による粒子サイズ $37.2 \pm 3.3\text{nm}$ に最も近似していた。

細胞質の形態学的特徴を、その質的・量的程度に応じて6型に分類し、その細胞比率を経時的に検討した結果、感染後3～5時間にかけて膜結合性の顆粒状構造が著しく発展・増加し、急速にウイルス粒子の構成へ移行する過程が明確に示され、顆粒状構造と膜の複合物が *Calicivirus* の前駆構造であると判断した。これは、*Picornavirus* における前駆構造とされている膜に囲まれた viroplasma 又は viral bleb とは異った形態学的構造物であった。

5. ウイルス感染と細胞小器官

ウイルス感染にともなうミトコンドリアの変化は軽度であり、 NaN_3 による呼吸抑制作用はウイルス増殖に全く影響を及ぼさなかった。

感染8時間後には、巨大変性ポリソームの出現が観察された。

ウイルスの放出は単なる細胞崩壊によるものであって、特別な機構はないように考えられる。

6. ウイルス感染細胞の三次元構造

ウイルス感染後、10時間目の細胞を破壊し、ネガティブ染色によって観察した。

ウイルスのサブユニットと思われる構造及び完全ウイルス粒子は膜上に局在し、超薄切片の成績とよく一致した。又、カプソメアのサブユニットと思われる構造物は紐状あるいは袋状を呈し、ウイルス粒子と部分的に結合して存在した。この紐状構造は鎖状の小単位が絡み合い束状に連鎖していた。これらの成績は膜上にてウイルスが構成されることを裏付けるものであった。

ウイルス粒子の構造は、重ね燃き等の成績から3・5分軸対称性を示した。カプシド蛋白は、化学的には単一成分からなるとされているが、形態学的には二層性を示しており、同一成分の繰り返し構築によって形成されるものと考えている。

前述の研究結果から、著者は、ネコカリキウイルスの増殖過程における前駆構造は膜上に密着して出現し、これがそのままウイルス構築の場となることを明らかにして、*Picornavirus* の場合の前駆構造とは異った形態学的構造物であることを初めて提示し、*Calicivirus* 群（科）と *Picornavirus* 群（科）との分類学的独立性についても意義ある見解を与えた。このように、本研究は獣医ウイルス学上貢献するところ大であり、獣医学博士の学位を授与するにふさわしい業績として評価する。