



Title	蛍光抗体法によるRabbit Myxoma Virus増殖に関する研究
Author(s)	高橋, 理明
Citation	大阪大学, 1959, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/28221">https://hdl.handle.net/11094/28221</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【 25 】

氏 名・(本籍)	高 橋 理 明 たか はし みち あき
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 5 8 号
学位授与の日付	昭 和 34 年 7 月 21 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 病 理 系 学位規則第5条第1項該当
学 位 論 文 題 目	蛍光抗体法による Rabbit Myxoma Virus 増殖に関する研究
	(主 査) (副 査)
論 文 審 査 委 員	教 授 釜 洞 醇 太 郎 教 授 天 野 恒 久 教 授 奥 野 良 臣

論 文 内 容 の 要 旨

目 的

myxoma virus は家兎に対する腫瘍性ウイルスとして pox group virus 中で特異な存在を占めている。先に研究室の加藤等によりこのウイルスが羊膜細胞に由来する FL 細胞に感染して Giemsa 染色により赤染する封入体を形成することが見出されたが、このものは Feulgen 反応陽性であり従来の pox group viruses (ectromelia, fowlpox, vaccinia) に於て見出されたB型封入体と染色態度その他に於て全く一致して居り、これ等 pox group virus に見られるA型封入体は出現しない。従ってこのB型封入体が myxoma virus の増殖と密接な関係にあることが想像され、この封入体の本質を究めることは緊要な問題である。そこで Coons 等の創めた蛍光抗体法を用い、この封入体とウイルス抗原との関係及びウイルス増殖のあり方を追求した。

方 法

1. 蛍光抗体の作り方

myxoma tumor 組織の20% suspension を作り之を紫外線照射により不活化して家兎に数回注射した。最後に活性のウイルスを challenge し生き残ったものの血清を抗体材料として用いた。この Globulin 分割に Fluorescein-isothio-cyanate を結合し透析後マウス肝粉で吸収したものを蛍光抗体として用いた。こものの myxoma 抗原に対する補体結合価は約80倍、又中和指数は2強であった。

2. 実験方法

test tube に cultivate した FL 細胞に virus を inoculate し、一定時間で medium を捨て細胞を洗って ree の virus を除き新しい medium とおきかえる。その後経時的に medium と細胞との各々に含まれる virus 量を家兎感染単位によって調べた。之と平行して Slide ell culture を行い、全く同様の操作を加え、同じく経時的に slide を取り出し、半分を Giemsa 染色して封入体の出現を調べ、他方に螢

光抗体を用いて細胞に於ける螢光のあり方を観察した。螢光の見られた細胞は顕微鏡下に mark しておいて後で Giemsa 液で染色し封入体と対比した。

#### 結 果

1. 先づ皮内にウイルスを接種し、皮下に tumor を作って死亡した家兎の各組織に含まれる virus 量を調べた。その結果 blood $10^2$ , lung $10^4$ , liver $10^4$ , tumor $10^{7-8}$  (各 per gm) で tumor に最も多くのウイルス量が含まれていることが分った。従って virus source として tumor が最も適していることが明らかとなり、之を実験に使用した。
2. 感染細胞を螢光抗体で染めた後、同一標本に Giemsa 染色を施し対比してみると B 型封入体の存在個所と一致した場所に螢光がみられた。この螢光は感染初期には compact な小円形であるが、漸次種々な形を経て diffuse となり細胞質内に拡がっていく様であり、これは B 型封入体の発展過程と一致していると思われる。核にははっきりした螢光は見られなかった。
3. 細胞に於けるウイルス感染価の上昇と、封入体及び螢光のみられる細胞の出現及びその増加率はよく平行している。即ちウイルス接種後24時間目に於てウイルス感染価の上昇がみられるが、この頃に至って始めて封入体及び螢光のみられる細胞があらわれてくる。時間的に追跡してみると螢光を示す細胞は漸次周囲にその数を増すが、感染価も同時に上昇している。96時間頃になると感染価は略 maximum に達するが、細胞内に於ける螢光もかなり diffuse となり、細胞自体も形が円くなり、かなり変性してきていることを思わせる。
4. 更に長期間観察すると、感染10日目に至っても尚螢光のみられない正常と思われる細胞が多数残っている。これ等の細胞を更に新しく植えかえるとやはり増殖し、その中に螢光を示す細胞も存在していることが分った。

#### 総 括

myxoma virus を FL 細胞に感染させ螢光抗体を用いて virus 増殖のあり方に関して研究した。この virus は細胞質内に於て Feulgen 反応陽性の pox group virus に共通する B 型封入体を形成するが、螢光抗体を用いることによりこの B 型封入体に virus 抗原が圧倒的に多量存在していることが判明した。更に時間的にこの B 型封入体、螢光を示す細胞の出現が、細胞に於けるウイルス感染価の上昇と一致して居り、これ等の事実から B 型封入体こそ細胞内におけるウイルス産生の母地と考えてよいと思われる。尚核にははっきりした螢光が見られなかったことよりウイルス合成は専ら細胞質で行われ、核は抗元的には無関係であることが分り、この点 RNA 型ウイルスであるインフルエンザ等とは余程趣を異にしていると思われる。

#### 論文の審査結果の要旨

釜洞研究室においては、先に pox group virus の ectromelia, fowlpox, vaccinia が A, B 2 種類の封入体を形成しその中 B 型封入体は形態学的組織化学的に共通の性質をもち、Giemsa 塗抹染色により赤染し且つ Feulgen 反応陽性であるが、A 型はウイルスの種類及び host の差によりその出現の頻度、染

色性に相違のみられたことを発見してきた。pox group には、この他に家兎に対する腫瘍性ウイルスとして特異的な存在である myxoma virus があるが、このものの封入体に関しては今迄かなりの記載があるが、その染色性存在部位に関して必ずしも一致していない。のみならず、その封入体のウイルス増殖の立場からの研究は現在まで全くなされていなかった。同研究室においては、この myxoma においても感染家兎の腫瘍細胞、腹腔細胞にやはり Giemsa 染色法により赤染する B 型封入体が存在し、且つこのウイルスが容易に established cell strain である FL 細胞に感染し B 型封入体を形成することを見出した。従って全 pox group virus が共通の性質を有する B 型封入体を形成して増殖することが明らかとなったわけであり、この B 型封入体の本質を究明することは pox group virus の増殖機構を解明する上に緊要な問題となってきている。そこで著者は近年 Coons 等により創始された蛍光抗体法を用い、この Myxoma virus について B 型封入体のもつ抗元的性質及びそのウイルス増殖との関連性について研究した。

実際の研究方法としては、試験管内に培養した FL 細胞にウイルスを感染させて、一方ではその増殖曲線を描き乍ら、他方で同時に感染細胞のギムザ染色による形態観察、及び蛍光抗体法による研究を並行して行った。又、蛍光のみられた細胞はマークしておいてギムザ染色を施してその染色所見と対比している。

その結果先ず細胞内において明瞭に蛍光のみられる部位は完全に B 型封入体と一致することが判明した。即ち、B 型封入体には圧倒的に多量の virus 抗原が存在することが明らかとなったわけである。又、増殖曲線と対比した結果 B 型封入体及び蛍光を示す細胞はウイルス感染価の上昇のやや以前から出現していることも明らかとなった。従って之等の成績と先に証明せられていた B 型封入体が Feulgen 反応陽性である事実と併せ考えると、この B 型封入体こそウイルス産生のものであると考えてよいと思われる。即ちウイルス感染によりその DNA 合成と蛋白合成とほぼ同時に B 型封入体で行われ漸次成熟ウイルス粒子が出来てくるものと思われるがこれは抗原分析を行うことにより更に明らかとなることが期待される。

又、感染の過程を通じて核には明らかな蛍光のみられなかったことよりウイルス合成は専ら細胞質内で行われ、核は直接には関係のないことが証明されたわけであり、この点 RNA 型ウイルスのインフルエンザ等とは趣きを異にしていることも明らかとなった。

従来細胞質内封入体の有する意義については、之が細胞内における異常代謝産物であるとなす説と、ウイルスと何らかの関連性のあるものであるとなす説があり、かなり議論のあったところであるが、ここに pox group においてはその B 型封入体の有する意義が極めて明確に解明せられたわけであり、ウイルス増殖機構の研究上、価値を有するものと思われる。