

Title	牛痘ウイルス感染細胞の定量的 Autoradiographyによる研究
Author(s)	小川, 真琴
Citation	大阪大学, 1966, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28874
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	小 川 真 琴 お がわ ま こと
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 8 8 0 号
学位授与の日付	昭 和 41 年 3 月 28 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	牛痘ウイルス感染細胞の定量的 Autoradiographyによる 研究
論文審査委員	(主査) 教 授 加藤 四郎
	(副査) 教 授 釜洞醇太郎 教 授 奥野 良臣

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

poxvirus は増殖にあたり、細胞質内に 2 種類の封入体を形成するが、そのうち B 型封入体と名づけられたものは、すべての pox 群ウイルス感染細胞に共通して見出される。蛍光抗体法及び ^3H -thymidine の autoradiography を用いて、この封入体が、ウイルスの NP 抗原の限局部位であると共に、ウイルス DNA 合成の場である事が証明された。本研究は、動物ウイルス学に初めて dipping autoradiography を導入し、銀粒子数計算による定量的研究により、牛痘ウイルスの増殖を、封入体の大きさと感染細胞の DNA 合成との関係において追求しようとするものである。

〔方法並びに成績〕

ウイルスの定量：

牛痘ウイルス (LB red 株) が, Vero 細胞 (猿腎細胞由来) に plaque を形成することを見出し、発育鶏卵漿尿膜上の pock 法と plaque 法とを比較した結果、感度がほぼ等しい事を認めた。以後の定量実験はすべて plaque 法によった。

ウイルスの増殖実験：

FL 細胞を培養管あたり 2×10^5 コの割合に分散し、10% 仔牛血清を含む LE 培地で培養する。2 日後に牛痘ウイルスを 4 種類の MOI (13, 5, 1, 0.1) でそれぞれ感染させ 1 時間吸着後、経時的に材料を採り、plaque 法によるウイルスの定量を行なうと共に、一部は材料採取前 1 時間、 ^3H -thymidine を含む培養液で培養し、採取した材料はメタノール固定後更に 2% perchloric acid 4°C 40 分処理し、dipping autoradiography を行なった。これを Giemsa 染色で観察し、感染細胞の形態と銀粒子の分布並びに数量をしらべ、ウイルス増殖曲線と対比した。

実験結果：

MOI 13では、細胞は一般に高度の cell rounding 等の細胞障害性を示し、形態学的研究は困難である。

MOI の如何を問わず、同じ大きさの封入体の出現のパターンはほぼ等しく、封入体の大きさが、細胞レベルにおける感染の時間的過程と関連のある事が示された。2 μ 以下の封入体を持つ細胞は感染後2時間で発現し、6時間で最も高い百分率を示し、更に12時間後に第2の山が認められた。即ち既に第2段の感染が始まっている事を示す。

B型封入体を大きさにより分類し、それぞれの封入体上の銀粒子数を計算して plot すると、5～10 μ の封入体が最も銀粒子数が多く、同時に同一条件でしらべた正常細胞核又は封入体を持たない細胞の核に認められる銀粒子数とその分布に近い。DNA合成を行なっている核及び封入体につき、単位面積あたり銀粒子数を換算すると、封入体における銀粒子密度が高い。即ち封入体の大きさはDNA合成量に関係があり、最も激しい時は核のDNA量に匹敵し得る。

核の銀粒子数は感染の進行と共に減少するが、細胞を封入体の大きさ別に分類し、それぞれの細胞核に一致する銀粒子数を計算すると、封入体を形成する細胞は、封入体の大きさに関係なく、核の銀粒子数の著しい減少を認めた。即ち細胞核のDNA合成は、ウイルスDNA合成の発現と共に抑制を受ける。

〔総括〕

1) dipping autoradiography は、stripping autoradiography に比較して操作が容易であり、特に染色効果が鮮明で、動物ウイルス感染細胞の autoradiography の銀粒子数計算による比較定量を可能にした。

2) 牛痘ウイルスは Vero 細胞に plaque を形成し、ウイルスの定量に利用できる。その感度は発育鶏卵の漿尿膜の pock forming unit と同程度である。

3) 封入体の大きさは、細胞レベルにおける感染の過程を示し、封入体の発現即ちウイルスのDNA合成の初期は、感染後2時間で認められる。

4) 従来 MOI を1以上にして得られた増殖曲線から、1段増殖と考えられていた状態も、封入体を指標として分析すると感染の phase において非常な heterogeneity のある事が示された。

5) B型封入体の大きさは、ウイルスDNA合成量と関係があり、5～10 μ の封入体が単位時間あたり最も激しいDNA合成を営む事、又その強さは対照の正常細胞核又は封入体形成を示していない細胞核のDNA合成量に匹敵する事を見出した。DNA合成量を単位面積あたりに換算すると、封入体は核に数倍する高密度のDNA合成を示し、特に2 μ 以下の封入体において著明である。

6) 感染細胞の核DNA合成は、ウイルスDNA合成の発現と共に不連続に著しい抑制を受け、細胞レベルにおけるウイルスの増殖と、細胞増殖の共存は認められない。

論文の審査結果の要旨

ポックスウイルスは、増殖にあたり細胞質内にB型封入体を形成する。加藤らは、蛍光抗体法及び ^3H -thymidine のオートラジオグラフィーを用いて、この封入体がウイルスNP抗原の限局部位であると共にウイルスDNA合成の場である事を証明した。著者は、動物ウイルス学に初めて dipping autoradiography を導入し、その安定した後染色性を利用し牛痘ウイルスのB型封入体のDNA合成に関して銀粒子数計算による定量的研究を可能にした。又著者は、牛痘ウイルスが Vero 細胞（猿腎細胞由来）に plaque を形成する事を見出し、このウイルスの定量を安定化した。これらの自ら確立した方法を用いて著者は牛痘ウイルス—FL細胞の相互関係を研究し以下の事実を明らかにした。

1) B型封入体の大きさは、細胞レベルにおけるウイルス感染の時間的過程を示し、初期は2時間で認められる。

2) 感染性ウイルスの上昇は、B型封入体曲線と一致する。

3) B型封入体の大きさは、ウイルスDNA合成量と関係があり、 $5\sim 10\mu$ の封入体が単位時間あたり最も激しいDNA合成を営みその強さは、対照の正常細胞核に匹敵する。DNA合成量を単位面積あたりに換算すると封入体は核に数倍する高密度のDNA合成を示し、特に 2μ 以下の封入体において著明である。

4) 感染細胞の核DNA合成は、ウイルスDNA合成の発現と共に不連続に著しい抑制を受け細胞レベルにおけるウイルスの増殖と、細胞増殖の共存は、認められない。

以上の研究結果は、B型封入体がウイルス増殖部位であるばかりでなく、ウイルス感染の経過とDNA合成の量的な指標である事を示したもので、ウイルス増殖機構の研究上重要な知見である。又ウイルス増殖を示す細胞が決して分裂増殖し得ない事を証明しウイルス炎症論の基本的解析に貢献したものであると考える。