The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | PS細胞における日本脳災ウイルスの増殖部位 |
| Author(s) | 李, 鍾訓 |
| Citation | 大阪大学, 1966, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/29313 |
| 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

【58】

| | |
|---|---|
| 氏名・(本籍) | 李(り) 鍾訓(しょうくん) |
| 学位の種類 | 医学博士 |
| 学位記番号 | 第 1050 号 |
| 学位授与の日付 | 昭和41年11月21日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当 |
| 学位論文題目 | **PS 細胞における日本脳災ウイルスの増殖部位** |
| 論文審査委員 | (主査)<br>教授 深井孝之助<br>(副査)<br>教授 藤野恒三郎 教授 釜洞醇太郎 |

## 論文内容の要旨

〔目　　的〕

日本脳炎ウイルス (JEV) の感染防禦研究上，細胞内増殖部位は重要な問題点の一つである。故に，培養細胞を宿主細胞としてJEV感染を成立させた後，螢光抗体法による細胞内でのJEV-抗原(蛋白)の合成部位と，Acridine orange (AO) 染色及び $^3$H-uridine の取込み分析によるJEV-RNA (リボ核酸) の合成部位を追求し，JEV の細胞内増殖部位を明らかにしようとした。

〔実験方法〕

1．細胞：PSY15′ 細胞を5％仔牛血清加199培地内で培養した単層細胞を使用した。

2．ウイルス：JEV 中山株を細胞に順応させた後，大型プラックから Cloning し，PS 細胞内で増殖させたものを用いた。

3．JEV 感染価の測定：Porterfield 変法に従って PS 単層細胞に於けるプラック形成能 (PFU) から求めた。

4．螢光抗体法：JEV 感染細胞に精製螢光抗体を直接作用させた後観察した（螢光顕微鏡下で)。

5．Acridine orange (AO) 染色：感染細胞を酢酸-Alcohol で固定後 0.1% AO 染色液で染色して螢光顕微鏡下で観察した。

6．Autoradiography：2乃至10$\mu$ c/ml $^3$H-uridine を JEV 感染細胞に5乃至60分間取込ませ（対照非感染細胞も同様)，氷冷酢酸-Alcohol 固定，70% Ethanol洗滌，2％過塩素酸処理後，感光乳剤(NTB$_2$ 或いはサクラ NR-M1) を被覆し7乃至20日間露出してから現像 (D-19 或いは Konidol X) した。

薄片上のオートラジオグラフィーは H-uridine の取込みが済んだ後，5％中性 Formalin 固定，過塩素酸処理，流水洗滌（2時間)，Palade's OsO$_4$ 液再固定，脱水 (Alcohol 脱水過程) 後細胞を瓶壁から剝離蒐集し，Luft の方法で Epon 包埋して LKB ultrotome で 0.2 乃至 1 $\mu$ の厚さに薄切し，オ

ートラジオグラフィーを行なった。

7．抗生物質：細胞 RNA 合成の抑止目的で actinomycin D (AMD) 或いは actinomycin $S_{2+3}$ (AMS) を利用した。

〔実験成績〕

PS 細胞に於ける JEV の増殖曲線の検討からウイルス増殖の明らかとなる感染後 8～12時間を中心とした細胞における分析の結果は以下の通りである。

1．適当濃度の actinomycin は JEV の増殖に影響を与えずに細胞 RNA 合成のみを抑制し分析に有利である。

2．螢光抗体法に於いてはウイルス抗原は感染後 6～8 時間に核周囲の細胞質中に出現し，感染の進展と共に全細胞質中でびまん性に発展するが，この際核周囲に環状に螢光を示してから直ちに他に及ぶものと，細胞質中に Compact mass を形成した後に他に及ぶものとの 2 つの型が認められる。螢光を示す細胞中には，小球状の螢光粒子が多数認められる。

3．AO 染色に於いては前記螢光抗体法による実験に於いて螢光の認められた部位に相当して，RNA 陽性顆粒が認められ，螢光の発展と略一致した発展形式を示す。

4．オートラジオグラフィーに於いては，actinomycin 処理細胞のウイルス感染後 $^3$H-uridine の取込みが認められるのは細胞質であり，而もKinetic analysis によってその取込み活性の増加は細胞質に於いてのみ認められる。螢光抗体法及び AO 染色実験の結果と対比すると，この取込みの局在部は AO (RNA) 陽性及び螢光抗原出現場所と略一致する場所であるのが認められた。

薄片上のオートラジオグラフィーによる $^3$H-uridine の取込みの観察からは，核，核小体内への $^3$H-uridine の取込みのないことが確認され，且つ細胞中に出現する空胞周囲に於いても取込みが行なわれることを示した。この部分も AO (RNA) 陽性顆粒の出現場所と略等しい場所である。

〔総　　括〕

1．上記の実験結果から JEV の感染によって

i）抗原は先ず核周辺細胞質に出現し，順次他に及ぶ（螢光抗体法）

ii）AO 染色に於いて RNA 陽性を示す物質 (RNA 或いは RNA 蛋白) は螢光抗体法に於いて観察される抗原出現部位に略等しい局所に形成される (actinomycin 存在下の実験)

iii）Actionomycin によって細胞 RNA の抑止されている細胞に於いて $^3$H-uridine の取込み及びその活性の増加は細胞質に限られる。

2．したがって，JEV 感染に於いてウイルス抗原，ウイルス核酸の双方共に感染細胞の細胞質内で形成され，核或いは核小体はこれに関与しないと結論される。

## 論文の審査結果の要旨

ウイルス感染の機序を明らかにする上で，まずそのウイルスの核酸及び抗原の宿主細胞内における増殖部位を明らかにすることは基本的な問題である。日本脳炎ウイルスの細胞内での増殖部位についてはこれまで殆んど知られていなかった。

本論文は日本脳炎ウイルス RNA 及び抗原の宿主細胞内での増殖部位について，$^{3}$H-uridine の取込み分析，アクリジンオレンジ染色法及び螢光抗体法を用いて詳細に追求したものである。その結果，1．螢光抗体法によって認められる抗原はまず核周辺の細胞質に出現し順次細胞質全域に及ぶ。2．アクリジンオレンジ染色において RNA 陽性を示す物質は螢光抗体法により観察された抗原の出現部位にほぼ対応して認められる。3．宿主細胞の RNA 合成をアクチノマイシン処理によって抑止した条件下では，$^{3}$H-uridine の取込みは細胞質のみに認められその活性の増加も細胞質に限られる。

以上の明らかにされた事実から，日本脳炎ウイルスの感染においてウイルス抗原及びウイルス RNA の合成はいずれも細胞質内で行なわれ，核又は核小体はこれに関与しないと結論され，日本脳炎ウイルスの増殖機序の基本的な一部が明らかにされた。

これらの知見及び結論は，日本脳炎ウイルスを代表とするB群アルボウイルスに関しては極めて重要なものである。これらが明らかにされたことによってウイルス学に寄与することはもとより，将来アルボウイルス群による疾患の診断，予防あるいは治療研究の礎石として貢献する所大なるものがあると期待される。