

単純ヘルペスウイルス感染による細胞模構築の変化について

— 凍結割断法による観察 —

佐々木 公 男

札幌医科大学小児科学講座 (主任 中尾 亨 教授)

国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部 (主任 岩崎祐三 部長)

Membrane Changes in Cells Infected with Herpes Simplex Virus

— A Freeze-Fracture Study —

Kimio SASAKI

Department of Pediatrics, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. T. Nakao)

Department of Ultrastructural Research, National Center for Nervous, Mental and Muscular Disorders

(Chief : Y. Iwasaki)

With the freeze-fracture technique, virus-induced modulation of the nuclear and plasma membrane was studied in cultured murine neuroblastoma cells, C-1300 and clone NA, infected with herpes simplex virus type 1, strain HF. The results were correlated with findings obtained from thin-sectioning and scanning electron microscopy of sister cultures.

1) During the penetration of the virus, fusion of the viral envelope with the host cell membrane was clearly demonstrated at the host cell surface. At the site of fusion, intramembrane particles (IMP) were absent in the protoplasmic face (P face) of plasma membrane, although the distribution of IMP appeared unaltered in surrounding areas.

2) With the envelopment of virions at the nuclear membrane, focal elevation of the inner leaflet of the nuclear membrane was accompanied by substantial reduction or absence of IMP in the P face of elevated areas. IMP free spots and small aggregates of IMP were also seen in the P face of unelevated areas of the nuclear membrane.

3) Aggregates of IMP similar to ones seen in nuclear membranes were also observed in cell surface membranes during the process of virus release from host cells.

4) Treatment of virus-infected but not uninfected cells with antiviral antibody resulted in focal aggregation of IMP in cell surface membranes. This phenomenon appears to be parallel to the capping of viral antigens as demonstrated by immunofluorescence staining and scanning electron microscopy.

5) No specific structural profiles of the "virus receptor" on the cell surface were verified in the present study.

(Received June 28, 1982 and accepted July 20, 1982)

1 緒 言

単純ヘルペスウイルス, Herpes simplex virus (以下 HSV と略す)は潜伏感染をおこすウイルスとして知られているが, 神経節の神経細胞に長期間潜伏している可能性が強く示唆されている^{1,2)}。しかしながら, HSV の潜伏感染が成立する過程や, 一度細胞内に潜伏した

ウイルスが再び賦活化され増殖を始める機序については, 未だ不明な点が多い。

HSV の感染に伴う細胞病変の病理学的および電顕的報告は数多く見い出され, 培養細胞を用いた *in vitro* の実験も少なくない³⁻⁹⁾。しかし, HSV 1 型 (HSV-1) の細胞内への侵入過程^{4,7)}, および細胞外への放出過程^{3,6)}, に関しては一致した見解に達していない。

そこで、著者は、細胞膜の超微形態を詳細に観察できる方法として凍結割断法 (freeze-fracture technique, 以下 FF と略す) に注目した。この方法は超低温に冷却された生体膜に衝撃を加えた場合、生体膜を構成する二層の脂質層の間で分割され、そこに埋め込まれているところの生体膜構成蛋白と考えられている膜内粒子 (IMP) の形態と局在を明らかにするユニークな方法であり、割断された生体膜は脂質二重層の外葉の内面 (E面) と内葉の外葉 (P面) の二つの部分が観察される。

本研究では、神経細胞における HSV-1 感染の本態を解明する手段の一つとして *in vitro* の実験で広く使われている培養神経芽細胞を用い、HSV-1 感染に伴う神経細胞膜構築の変化を FF により解析することを試みた。

2 実験方法

2.1 細胞 マウス神経芽細胞 (line C-1300, clone NA) はフィラデルフィア市ウィスター研究所の Dr. McMorris から恵与を受けたもの、Vero 細胞は大日本製薬から購入し、神経センター微細構造研究部で継代中のものを用いた。培養ヒト星状膠細胞 (FB cell) は岩崎がヒト胎児より分離したものである。

2.2 ウイルス 本研究に用いた HF 株は、東京大学医科学研究所吉野亀三郎教授によりヒトから分離された 1 型ウイルスで、本実験ではこのウイルスを Vero 細胞で増殖、 -80°C で凍結保存されていたものを使用した。使用時のウイルス力価は $4.6 \times 10^7 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ であった。

2.3 組織培養 神経芽細胞、星状膠細胞、Vero 細胞は 10% 牛胎児血清 (GIBCO 社, Grand Island) を添加した Eagle's minimal essential medium (MEM) 中で、5% 炭酸ガスの存在下に、ガラスまたはプラスチック製カバースリップ (Lux 社, Thousand Oaks) 上、または 35 mm プラスチックペトリ皿 (Falcon 社, Oxnard) 内で 37°C の条件下で静置培養した。

2.4 感染 ウイルス原液は、ウイルスの宿主細胞への侵入過程の観察のためには m. o. i. (multiplicity of infection) が 50 に、またウイルスの増殖過程の観察には m. o. i. が 5 になるように MEM で稀釈して用いた。ウイルスの侵入過程の観察にはカバースリップ上に単層培養した細胞を 4°C に冷却後、これにウイルス浮遊液を重層し、 4°C で 1 時間宿主細胞へウイルスを吸着させた後、細胞を 37°C の炭酸ガス培養器 (Forma 社, Marietta) に移し加温後、5, 10, 15 および 30 分

後に検索を行なった。ウイルスの増殖過程の観察には、プラスチックボトルで単層培養した細胞をトリプシン処理して得られた細胞浮遊液にウイルス浮遊液を加え、組織培養試験管内で 37°C 1 時間培養後、カバースリップとペトリ皿に移して培養を継続した。ウイルス感染細胞は 10% 牛胎児血清を添加した MEM 中で、炭酸ガス濃度を 5% に調整した 37°C 炭酸ガス培養器で 10, 20 および 30 時間培養した後検索した。

2.5 電子顕微鏡

2.5.1 凍結割断法 (FF) 単層培養細胞の割断を Pauli *et al.*¹⁰⁾ の方法に準じて行なった。プラスチック製カバースリップ上に培養した細胞を 0.1 M カコジル酸緩衝液加 2.5% グルタルアルデヒド (pH 7.4) で 40 分間、 4°C で固定した後、20 および 25% グリセリンでそれぞれ 20 分間処理、次いでポリビニルアルコール溶液¹⁰⁾ を滴下した銅製試料台に細胞面を下にしてカバースリップを載せ、これを液体窒素中で急速に凍結した。凍結した試料は、エイコー社製凍結試料処理装置 (FD-2 型) を用いて、ステージ温度 -105°C 、真空度 $1 \sim 2 \times 10^{-7} \text{Torr}$ で割断し、直ちに白金パラジウムの電子線蒸着を行ない割断面のレプリカを作製した。残存する細胞を室温で融解し、漂白剤を用いて消化した後、得られたレプリカを蒸留水で洗浄、これを銅製 300 メッシュに載せて日立 H-700 および H-300 型透過電子顕微鏡 (加速電圧 150 および 75 kV) で観察した。

2.5.2 超薄切片法 (thin sections, 以下 TS と略す) ペトリ皿で単層培養した細胞をグルタルアルデヒドで固定後ラバーポリスマンを用いて集め、低速遠心を行なってペレットを作製した。ペレットにした細胞は 1% オスミウム酸で後固定、次いでアルコール系列で脱水後エポキシ樹脂に包埋し、ウルトラミクローム (Porter-Blum MT-2) で超薄切片を作製した後、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色を行ない透過電子顕微鏡 (TEM) で観察した。

2.5.3 走査電子顕微鏡 (SEM) による観察 プラスチック製カバースリップ上に培養した細胞をグルタルアルデヒドで固定後、1% オスミウム酸で後固定し、アルコール系列で脱水した。アルコールを液化炭酸ガスで置換し、日立臨界点乾燥器 (HCP-2) を用いて試料の臨界点乾燥を行なった。乾燥した試料は、エイコー社製イオンコーター (IB-3) を用いて白金パラジウムのコーティング (膜厚約 100 Å) を行なった後、日立 S-700 型走査電子顕微鏡 (加速電圧 15 kV) で観察し写真撮影を行なった。

2.6 蛍光抗体法 感染細胞におけるウイルス抗原の存

在は蛍光抗体直接法を用いて検索した。本研究に使用した抗体は、HSV-HF 株で感作したウサギ血清の IgG 分画と fluorescein isothiocyanate (FITC) を結合した FITC 標識抗 HSV 抗体で東芝化学製のものを用いた。予備実験により抗血清の 100 倍稀釈液が至適条件であることを確認し、標識抗ウイルス抗体をリン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline, 以下 PBS と略す) で 100 倍に稀釈して用いた。細胞内ウイルス抗原の検出には、ガラスカバースリップに培養した細胞を PBS で 3 回洗浄した後、アセトンで 10 分間固定し、FITC 標識抗 HSV 抗体を重層、10 分間 37°C で反応させた。細胞表面のウイルス抗原の検出と抗ウイルス抗体によるウイルス抗原の capping 現象の観察には未固定の細胞に上記抗体を重層、37°C で 10~15 分間反応させた。また、抗ウイルス抗体による capping の阻止には上記抗体に 0.2% 窒化ナトリウムを加えた。さらに未固定細胞に上記抗体を反応させたうえで前述のごとくグルタルアルデヒドで固定し、FF および SEM の試料を作製した。

3 成 績

3.1 ウイルスの吸着と侵入

37°C に加温後 5~15 分でエンベロープと細胞膜が細胞表面で融合することが示された (Fig. 1 a~d)。この侵入部分は P 面において直径約 100~180 nm の半球状ないし丘状の隆起として認められ、ウイルス粒子の細胞内への侵入が進むにつれて、この隆起は半球状から丘状に高さを減じ、それとともに直径も小さくなった。侵入しつつあるウイルス粒子のエンベロープの P 面および E 面はともに IMP を欠き、IMP と明らかに区別される多数の小顆粒の粗い表面構造を呈していた (Fig. 1 c)。しかし、侵入部位の細胞膜の IMP には変化がみられなかった (Fig. 1 c,d)。加温後 30 分でも宿主細胞へ侵入しつつあるウイルス粒子を観察することができた。Fig. 1 d に示すようにウイルス粒子が数个集まって侵入する像も観察された。TS による観察と同様に FF でも pinocytosis によるウイルス粒子の取り込みは観察されなかった。Fig. 2 は Vero 細胞におけるウイルス侵入過程の凍結切断像であるが、E 面においても P 面と同様にウイルス粒子と細胞膜の融合した部位において IMP は消失していた。しかし、吸着直前にあると思われるウイルスのエンベロープの P 面には IMP が散在性に少数存在した (Fig. 2 b)。また、細胞の種類によるウイルス粒子の侵入過程の差は NA, FB, Vero 細胞の間では特に認められなかった (Fig. 3,4)。

3.2 成熟ウイルス粒子の形成と放出

新たに産生されたウイルス粒子は感染後 10 時間で核内に認められた。これらのウイルス粒子は核内に散在して認められ、TS では電子密度の低いコアをもつ粒子が多く認められ、電子密度の高いコアをもつ粒子は少数しか認められなかった (Fig. 5 a)。これに対応して FF では円環状でかつ顆粒状構造を示すカプシドが観察され、その直径は約 110 nm で TS による観察とほぼ同じ大きさであった (Fig. 5 b,c)。しかし、電子密度の違いによるコアの区別は困難であった。感染後 30 時間においても核内にウイルス粒子は散在性に、ときには集合して観察され、TS ではウイルス粒子の結晶様配列が観察された。

感染に伴う核膜の変化として、核膜の細胞質側へ向かう膨隆 (直径 200~250 nm) が認められ、その部分の IMP は減少ないし消失していた (Fig. 6 a)。TS ではエンベロープを被ったウイルス粒子が核膜腔において観察された (Fig. 6 b)。核膜の一部にしかも膨隆部位に隣接して直径 220~300 nm の全く IMP を欠く平坦な部分を認めた (Fig. 7,8)。さらに一部の外側核膜の P 面において IMP の凝集が認められた (Fig. 9)。感染に伴う核膜小孔の変化は観察されなかった。

TS による観察ではエンベロープを被ったウイルス粒子は感染後 10 時間で既に細胞質内に観察され、これらのウイルス粒子は常に細胞質内の空胞や小胞体、ときに核膜腔内に存在した。エンベロープを被らないカプシドは細胞内において感染後 30 時間で観察された。しかし、FF では細胞質内のウイルス粒子は phagosome などと区別することが、ときに困難であった。さらに、TS で感染細胞の細胞質内および核内に同心円状の膜様層構造 (annulate lamellae) が観察され、これらの一部は核膜と接していた (Fig. 10 a)。FF では玉ねぎ状構造を呈していた (Fig. 10 b)。

ウイルス粒子の細胞外への放出は感染後 10 時間で既に認められた。SEM ではウイルス粒子が細胞表面に接して存在するところを示されたが (Fig. 11 a)、TS および FF では細胞表面においてウイルス粒子がエンベロープを被って出芽する像は観察されなかった。TS によると細胞表面近くに達した多くのウイルス粒子は、空胞内に存在し (Fig. 11 b)、外界に放出されたものは細胞表面に接して存在するものから外部の空間に浮遊するものまで観察され (Fig. 5 a)、細胞表面の陥凹部に存在するものも認められた。FF では陥凹した細胞表面に外界へ放出された直後と思われるウイルス粒子が観察された (Fig. 11 c)、外界に放出されたウイルス粒子のエ

ンペロープのIMPは極めて少数であった。さらに、一部の細胞膜のP面においてIMPの分布が非感染細胞に比べ全体に不均一であった (Fig. 12)。

3.3 蛍光抗体法

未固定標本による細胞表面のウイルス抗原の検出は、感染後10時間で約50%の細胞が陽性であり、30時間目には陽性率は100%となった。感染初期では細胞表面に散在する小さな蛍光顆粒として認められたが、時間の経過とともに蛍光陽性の細胞が増加し、顆粒の蛍光が増強した。アセトン固定細胞における細胞質内のウイルス抗原も感染初期より認められ、核周辺部において小顆粒状を呈していた。

0.2%窒化ナトリウムの存在下で感染細胞と抗体を反応させた場合には、細胞膜全体が蛍光陽性となるが、窒化ナトリウムを除いた場合は、抗体と反応後5~10分で細胞表面の一部に蛍光をもつスポットの出現がみられた。このようにウイルス抗原のcappingを行なった状態の細胞をSEMで観察したものがFig. 13であり、細胞表面のmicrovilliが一か所に集まりその他の部分は比較的平坦になっている細胞がみられた。このcapの部分にはウイルス粒子と考えられる小粒子(直径180nm)も認められた。

FFによるとウイルス抗原のcappingを行なった状態で切断した感染細胞の細胞膜(非cap部分と思われる)において、直径150~250nmのIMPの集合するスポットが観察され、この部分のIMPは高い密度で集合していた (Fig. 14)。しかし、個々の粒子の形状はスポットを形成していない粒子のそれと区別できなかった。このような変化は非感染細胞および窒化ナトリウムの存在下、すなわちcappingを阻止した状態で感染細胞と抗体を反応させた場合には認められなかった。

4 考 察

現在までにHSV-1感染に伴う培養細胞の形態的変化をFFで観察した報告はHasegawa and Hata^{11,12)}, Haines and Baerwald¹³⁾, Rodriguez and Dubois-Dalq¹⁴⁾の他にみあたらない。他のウイルスについてはエンペロープを被ったRNAウイルス(インフルエンザウイルス¹⁵⁾, シンドヴィスウイルス¹⁶⁾, マウス乳癌ウイルス¹⁷⁾, ラウス肉腫ウイルス¹⁸⁾, ヴィスナーウイルス¹⁹⁾, 水疱性口内炎ウイルス²⁰⁾)に関する報告がみられる。

ウイルスの感染は宿主細胞へのビリオンの吸着に始まり、不可逆的な吸着をおこなうためにはウイルスと細胞表面のレセプターが強固に結合する必要があると考えられているが、HSVのレセプターの性状そのものに

関してはまだ明らかにされていない。HSVの侵入過程については2つの仮説がある。1つはMorgan *et al.*⁴⁾の説でエンペロープが細胞膜と融合してカプシドが細胞質内に侵入するというものであり、他の1つはpinocytosisに似た機構で細胞内に取り込まれる⁷⁾という考え方である。今回の実験結果からは前者の説を積極的に支持している。すなわち、最初にエンペロープが宿主細胞の表面に吸着し、次にエンペロープと細胞膜の融合がおこり、エンペロープが消失するものと考えられる。この侵入過程は比較的速やかで、大部分のウイルス粒子は10分以内に細胞内に取り込まれるものと思われる。また、ウイルスの細胞内侵入は温度依存性であることから酵素が関与していると考えられている⁴⁾。

侵入部位における融合したエンペロープに由来する細胞膜のP面はIMPを欠いていたが、その周囲の細胞膜にはIMPの分布を含めて変化がみられなかった。

ウイルス粒子の侵入において細胞膜とエンペロープが融合するときその部分のIMPが消失する理由は今のところ説明されていない。センダイウイルスによる赤血球の融合の際に細胞膜のIMPの分布が変わる(凝集すること²¹⁾)が知られており、エンペロープと細胞膜の融合の際にもIMPの移動が起こり得ることが予想される。しかし、HSVの侵入に際しては周囲の細胞膜におけるIMPの分布に変化がみられなかったので、赤血球の場合と同様の機序によるとは考えにくい。

ウイルス粒子が細胞内に侵入するどの段階でエンペロープのIMPが消失するか分からないが、エンペロープと細胞膜が融合する前にすでにエンペロープのIMPが消失しているのかも知れない。Ben-Porat and Kaplan²²⁾は、核内に存在するエンペロープをもたないウイルスのカプシドの糖蛋白とウイルスのエンペロープに存在する糖蛋白が同じものであることを示しており、また、Rodriguez and Dubois-Dalq¹⁴⁾は、buddingの際にウイルスのある種の蛋白質がエンペロープに移行することを推測している。侵入に際しても、全く逆の過程でエンペロープに存在するIMPがカプシド内、あるいは宿主の細胞質内に取り込まれることも考えられる。また、ウイルスのレセプターの存在を想定するならば、センダイウイルスの赤血球吸着のときにみられるようなIMPの凝集が起こらない理由は、次のような可能性によって説明される。第1に、ウイルス側のレセプター認識の低さによる非特異的結合がおこっている可能性、第2にFFによって観察されない細胞表面に存在する蛋白質がレセプターとなっていてP面に存在するIMPがレセプターとして関与していない可能

性などが考えられる。

細胞膜と融合したウイルス粒子のエンベロープの内側面にみられた小顆粒状の凹凸が、エンベロープの projection (スパイク) に相当する構造に一致するかどうかは明らかでない。

細胞内で増殖したウイルスの細胞外への放出過程において核内に出現するウイルスは、新たに産生された progeny virus と考えられる。今回の観察では、感染後 10 時間で核内において、DNA より合成されたビリオンすなわちカプシドを認めたが、Nii *et al.*⁹⁾ は感染後 5 時間で核内にウイルス粒子が出現すると言う。

核内で形成されたウイルス粒子のエンベロープ獲得は、獲得部位によって内側核膜を被る場合と核内空胞膜を被る場合、さらに細胞質の膜構造を利用する場合の 3 つに大別される。今回の実験結果より、ウイルス粒子は最初核のほぼ中央の電子密度の低い均質な部分に現われ、それが核周辺部へ移動した後、内側核膜をエンベロープとして被って核膜腔へ出芽するのが主要経路と考えられる。この出芽に際して生じる最初の変化は、核膜の細胞質側へ向かっての膨隆であり、核膜の P 面ではウイルス粒子の直径よりやや大きい半球状の膨隆がいくつか認められた。そのときの膨隆部の IMP は減少ないし消失していたが、これはウイルス抗原が核膜表面に現われることによって、核膜に存在する蛋白質がウイルス抗原の結合部位から外におしやられる結果生じたものと思われる¹³⁾。あるいは、膨隆部の IMP がカプシド内に一部取り込まれるのかも知れない。エンベロープを持つ RNA ウイルス (インフルエンザ¹⁵⁾、シンドヴィス¹⁶⁾、ヴィスナー¹⁹⁾、水疱性口内炎ウイルス²⁰⁾ において、ウイルス出芽部位の細胞膜の IMP は消失していたが、これらの現象は HSV の出芽に際して生ずる核膜の変化とよく類似する。

核膜の平坦な面における円形ないし楕円形の限局性の IMP の消失した部分は、膨隆部とほぼ同じあるいはそれよりやや大きいので、出芽後の変化と推定される。これは、核膜をエンベロープとして獲得したウイルス粒子の出芽によって生じた核膜の欠損を補うような形で、IMP を欠く新しい核膜が合成ないし延長されてできたものと思われる¹³⁾。

核膜の P 面に認められた IMP の凝集は感染に伴って生じた変化であり、ウイルス抗原の存在に伴う IMP の凝集と考えられ、細胞膜において観察された IMP の凝集と同様の機序によるものと思われる。

核膜小孔の大きさ、形および分布に関しては変化がみられず、ウイルス粒子の出芽には構造的に関与して

いないものと思われた。

核膜腔に出てエンベロープを被ったウイルス粒子は、外側核膜ないし細胞質内の空胞や細胞小器官などの膜構造を利用して細胞質内を移動し、外界に放出されるものと考えられる。また、細胞質内、ときに核内に出現する膜様層構造 (annulate lamellae) は、核膜と接して認められることもあり⁵⁾、核膜由来のものと考えられる。しかし、胎児期の細胞や腫瘍細胞のような分裂増殖の盛んな細胞においてしばしば認められるので、これが HSV 感染に特異的な所見であるとは思われない。

更に、Rodriguez and Dubois-Dalcq¹⁴⁾ は核膜腔に出芽した直後のビリオンの IMP 数は内側核膜の粒子数と同じであるが、時間の経過とともに IMP が増加し、細胞外のビリオンに至ってはおよそ 3 倍に増加していることを指摘している。

細胞膜においても、核膜と同様に IMP の減少ないし消失した丘状の膨隆が認められたが、このような変化は、ウイルス粒子が細胞外に放出される直前の状態を示しているのかも知れない。しかし、細胞表面よりのウイルスの放出は、細胞膜そのものをエンベロープとして利用するのではなく、細胞内の空胞が細胞膜と融合して外界と通じて、すでにエンベロープを被っているウイルス粒子が、空胞内から外界へ放出されるものと考えられる。すなわち、reverse phagocytosis and pinocytosis³⁾ と呼ばれる仕組みによるものと考えられる。

ウイルスの成熟および放出過程における感染細胞膜の変化としては、IMP の凝集が高頻度で観察されたが、このような結果は Rodriguez and Dubois-Dalcq¹⁴⁾ の報告と一致する。また、Heine *et al.*²³⁾、Heine and Roizman²⁴⁾ は HSV 感染細胞膜の蛋白質を分析した結果、感染細胞の細胞膜にはウイルス由来の蛋白質が入り込んでいることを示している。すなわち、感染細胞膜におけるウイルス特異蛋白質の存在が考えられている。IMP の凝集は、ウイルス抗原と細胞膜に存在する IMP の蛋白質との相互作用によるものと考えられ、ウイルス抗原が細胞表面に出現することによって細胞膜に結合した cytoskeletal elements (microfilaments, microtubules など) に影響を及ぼした結果と思われる。Cytoskeletal elements に影響を及ぼす機序については明らかでないが、ウイルス抗原が細胞膜に出現することによって、細胞膜に存在するウイルスレセプターが集合するために、二次的に IMP の凝集が生じる可能性が考えられる。

感染細胞に抗ウイルス抗体を反応させることにより、

IMPの集合した大きなスポットの形成が高頻度で観察されたが、このスポットの得られた断面は、cap自体の断面を得ることは技術的に困難であることから、cappingをおこした細胞の非cap部分の断面であろうと思われる。しかし、このスポットの出現はcappingに対応するIMPの分布の変化と考えられる。CappingとIMPの分布の間における関連性については明らかでないが、細胞表面に存在するウイルス抗原が抗体と結合することによって、このウイルス・抗体複合物としての蛋白質がIMPと結合し、これらが細胞膜表面で集合することによってこのようなスポットが出現することが推測される。

Nicolson²⁵⁾の仮説によれば、ほとんどの細胞膜はfluid mosaic structureをもち脂質二重層の中に蛋白質が遊離して存在し、この脂質二重層の中を自由に動き得るものと考えられている。細胞表面におけるpatchingやcappingの現象も蛋白質の分布の変化の著明な例と考えられる。ウイルス抗原の他に免疫グロブリンに対する多価の抗体がリンパ球の表面にある免疫グロブリンのcappingを誘導したり、Con Aがトランスフォームした細胞やリンパ球におけるCon A結合部位の凝集をひき起こしたりする²⁶⁻²⁸⁾ことが知られている。

Cappingを電顕レベルで追求したLampert *et al.*²⁹⁾は麻疹ウイルス抗原で被われたmicrovilliが細胞の一方の極に移動することを示し、最終的にはウイルス・抗体複合物が細胞表面から脱落することを推測している。Cappingは温度依存性であることから酵素が関与し、エネルギーを必要とする現象³⁰⁾と思われる。また、窒化ナトリウム、vinblastine sulfate, cytochalasin Bやcolchicineなどでcappingが抑制される³⁰⁾ことから膜内蛋白質の流動性に影響を与えているmicrofilamentsやmicrotubulesがcytoskeletal elementsとして関与しているものと考えられる。このような現象は、抗体の存在下における慢性感染症とくに潜伏性ウイルス感染症における感染細胞の細胞膜構築の変化をさぐる上で重要な役割を演ずるものと思われる。

5 結 論

単純ヘルペスウイルスI型を培養マウス神経芽細胞に感染させ、それに伴う細胞膜および核膜の形態的变化について凍結切断法により観察するとともに超薄切片法および走査電顕による所見との対比を行なった。

1) ウイルスの宿主細胞への侵入に際して、エンペロープと細胞膜の融合がおきることを示した。融合部位において細胞膜のP面の膜内粒子(IMP)は消失し

ていたが、その周囲のIMPには変化がみられなかった。

2) 成熟ウイルス粒子の核膜腔への出芽に伴って、内側核膜の限局性膨隆が見られ、その部分におけるP面のIMPは減少ないし消失していた。その周囲の平坦な核膜のP面において限局性のIMPの欠損が認められ、一部の核膜のP面においてIMPの凝集が認められた。

3) ウイルスの宿主細胞からの放出過程において、細胞膜のP面においても核膜でみられたものと同様のIMPの凝集が観察された。

4) 抗ウイルス抗体を感染細胞に加えることにより、細胞膜において局所的なIMPの凝集したスポットが形成された。この現象は蛍光抗体法や走査電顕によって示されたウイルス抗原のcappingに対応するものと思われた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただいた札幌医科大学小児科学教室中尾亨教授、国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部岩崎祐三部長ならびに御指導、御協力いただいた多田愛子先生に感謝します。また、本研究の機会を与えて下さった国立療養所八雲病院篠田実院長に感謝します。

なお、本研究は厚生省「遅発性ウイルス感染」に関する研究班の研究費の補助により行なわれた。

文 献

1. Stevens, J. G. and Cook M. L.: Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. *Science* **173**, 843-845 (1971).
2. Cook, M. L. and Stence, J. G.: Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: Evidence for intraaxonal transport of infection. *Infect. Immun.* **7**, 272-288 (1973).
3. Morgan, C., Rose, H. M., Holden, M. and Jones, E. P.: Electron microscopic observations on the development of herpes simplex virus. *J. Exp. Med.* **110**, 643-693 (1959).
4. Morgan, C., Rose, H. M. and Mednis B.: Electron microscopy of herpes simplex virus I. Entry. *J. Virol.* **2**, 507-516 (1968).
5. Nii, S., Morgan, C. and Rose, H. M.: Electron microscopy of herpes simplex virus. II. Sequence of development. *J. Virol.* **2**, 517-536 (1968).
6. Schwartz, J. and Roizman, B.: Concerning the egress of herpes simplex virus from infected cells: Electron and light microscope observations. *Virology* **38**, 42-49 (1969).
7. Dales, S. and Silverberg H.: Viroplexis of herpes simplex virus by HeLa cells. *Virology*

- 37, 475-480 (1969).
8. Nii, S.: Electron microscopic observation of FL cells infected with herpes simplex virus. I. Viral forms. *Biken J.* **14**, 177-190 (1971).
 9. Smith, J. D. and Harven, E.: Herpes simplex virus and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. I. Sequence of viral replication. *J. Virol.* **12**, 919-930 (1973).
 10. Pauli, B. U., Weinstein, R. S., Soble, L. W. and Alroy J.: Freeze-fracture of monolayer cultures. *J. Cell Biol.* **72**, 763-769 (1977).
 11. Hasegawa, T. and Hata, S.: Freeze-etching observations of herpes simplex virus in the nucleus of FL cell. *J. Electron Microsc.* **24**, 43-44 (1975).
 12. Hasegawa, T. and Hata, S.: Freeze-etching observations of herpes simplex virus. *Arch. Derm. Res.* **255**, 139-148 (1976).
 13. Haines, H. and Baerwald, R. J.: Nuclear membrane changes in herpes simplex virus-infected BHK-21 cells as seen by freeze-fracture. *J. Virol.* **17**, 1038-1042 (1976).
 14. Rodriguez, M. and Dubois-Dalcq, M.: Intramembrane changes occurring during maturation of herpes simplex virus type 1: Freeze-fracture study. *J. Virol.* **26**, 435-447 (1978).
 15. Bächli, T., Gerhard, W., Lindenmann, J. and Mühlethaler K.: Morphogenesis of influenza A virus in Ehrlich ascites tumor cells as revealed by thin-sectioning and freeze-etching. *J. Virol.* **4**, 769-776 (1969).
 16. Brown, D. T., Waite, M. R. F. and Pfefferkorn, E. R.: Morphology and morphogenesis of Sindbis virus as seen with freeze-etching techniques. *J. Virol.* **10**, 524-536 (1972).
 17. Sheffield, J. B.: Envelope of mouse mammary tumor virus studied by freeze-etching and freeze-fracture techniques. *J. Virol.* **12**, 616-624 (1973).
 18. Torpier, G., Montagnier, L., Biquard, J. and Vigier, P.: A structural change of the plasma membrane induced by oncogenic viruses: Quantitative studies with the freeze-fracture technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1695-1698 (1975).
 19. Dubois-Dalq, M., Reese, T. S. and Narayan, O.: Membrane changes associated with assembly of visna virus. *Virology* **74**, 520-530 (1976).
 20. Brown, D. T. and Riedel, B.: Morphogenesis of vesicular stomatitis virus: Electron microscope observations with freeze-fracture techniques. *J. Virol.* **21**, 601-609 (1977).
 21. Bächli, T., Aguet, M. and Howe, C.: Fusion of erythrocytes by Sendai virus studied by immuno-freeze-etching. *J. Virol.* **11**, 1004-1012 (1973).
 22. Ben-Porat, T. and Kaplan, A. S.: Synthesis of proteins in cells infected with herpesvirus. V. Viral glycoproteins. *Virology* **41**, 265-273 (1970).
 23. Heine, J. W., Spear, P. G. and Roizman, B.: Proteins specified by herpes simplex virus. VI. Viral proteins in the plasma membrane. *J. Virol.* **9**, 431-439 (1972).
 24. Heine, J. W. and Roizman, B.: Proteins specified by herpes simplex virus. IX. Contiguity of host and viral proteins in the plasma membrane of infected cells. *J. Virol.* **11**, 810-813 (1973).
 25. Nicolson, G. L.: Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. I. Cytoplasmic influence over cell surface components. *Biochim. Biophys. Acta* **457**, 57-108 (1976).
 26. Inber, M. and Sacks, L.: Morbidity of carbohydrate containing sites on the surface membrane in relation to the control of cell growth. *FEBS Lett.* **32**, 124-128 (1973).
 27. Loor, F., Forni, L. and Pernis, B.: The dynamic state of the lymphocyte membrane. Factors affecting the distribution and turnover of surface immunoglobulins. *Eur. J. Immunol.* **2**, 203-212 (1972).
 28. Rosenblith, J. Z., Ukena, T. E., Yin, H. H., Berlin, R. D. and Karnovsky, M. J.: A comparative evaluation of the distribution of concanavalin A-binding sites on the surface of normal, virally-transformed, and protease-treated fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 1625-1629 (1973).
 29. Lampert, P. W., Joseph, B. S. and Oldstone, M. B. A.: Antibody-induced capping of measles virus antigens on plasma membrane studied by electron microscopy. *J. Virol.* **15**, 1248-1255 (1975).
 30. Joseph, B. S. and Oldstone, M. B. A.: Antibody-induced redistribution of measles virus antigens on the cell surface. *J. Immunol.* **113**, 1205-1209 (1974).

別刷請求先:

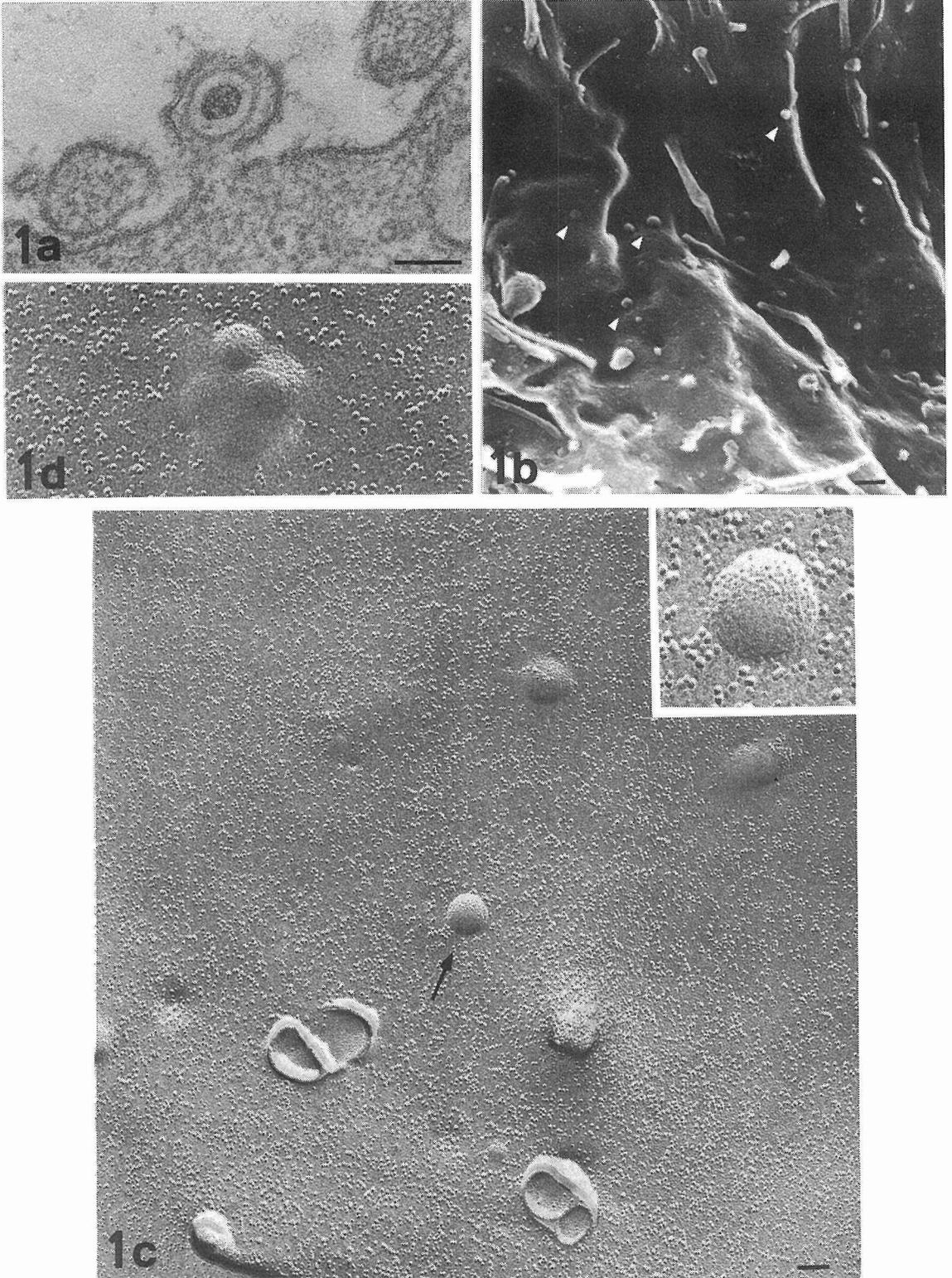
(〒049-31) 山越郡八雲町宮園町 128

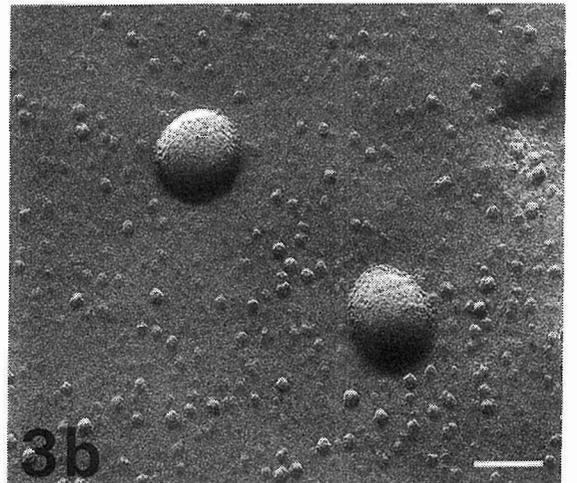
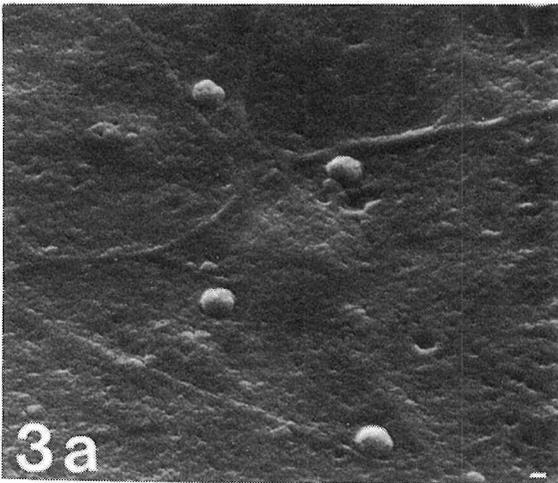
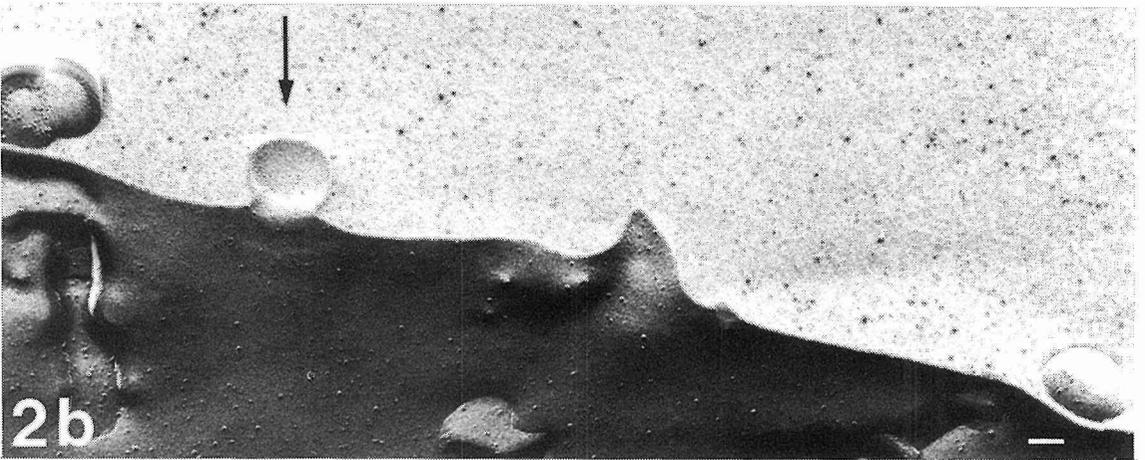
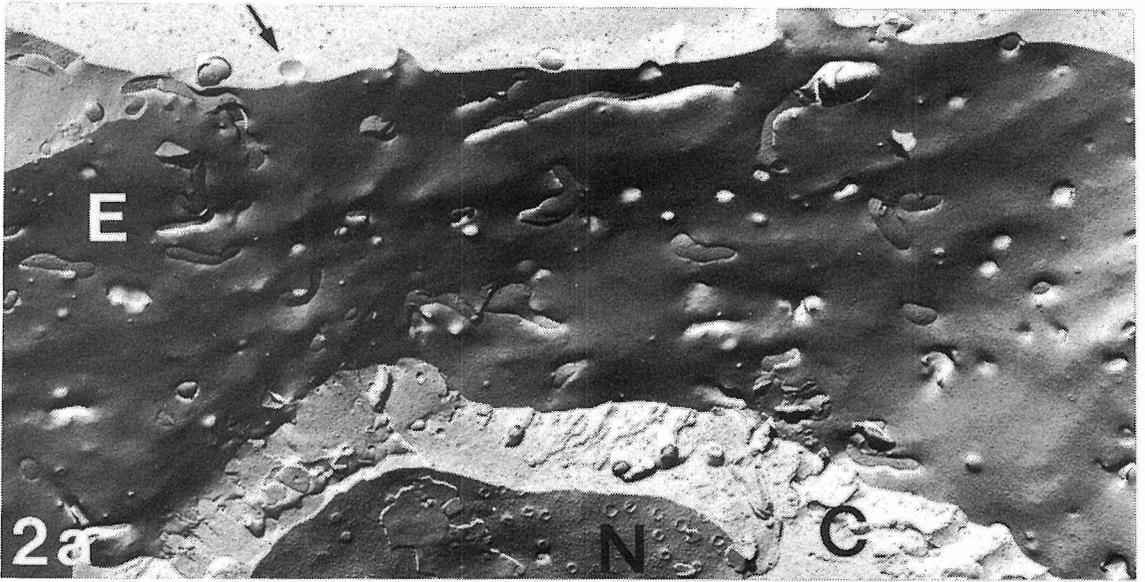
国立療養所八雲病院 佐々木公男

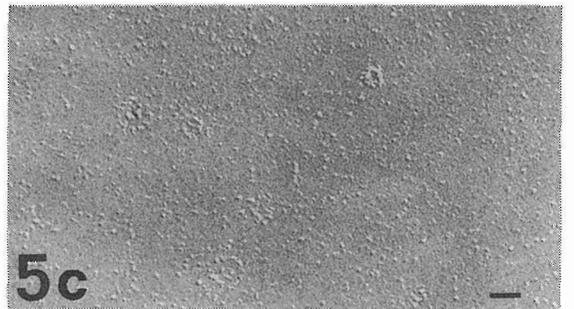
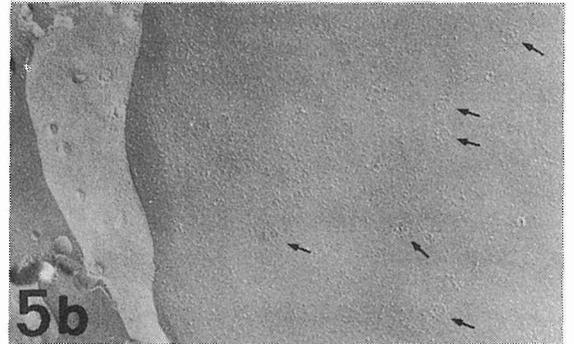
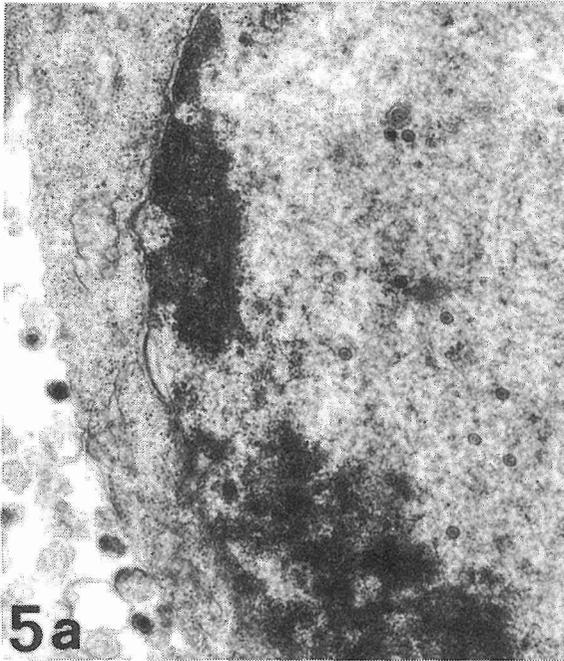
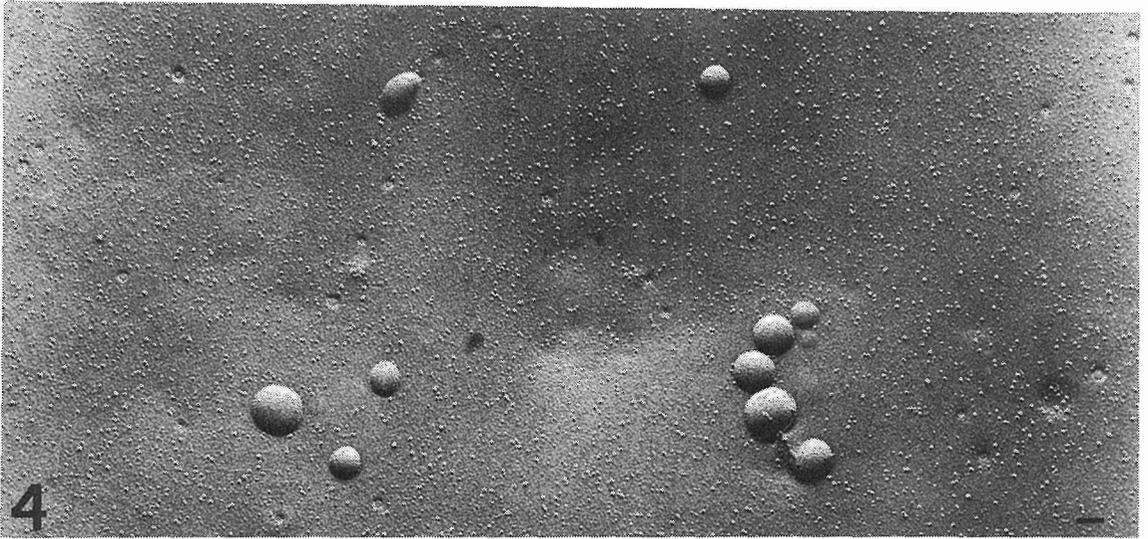
Explanation of figures

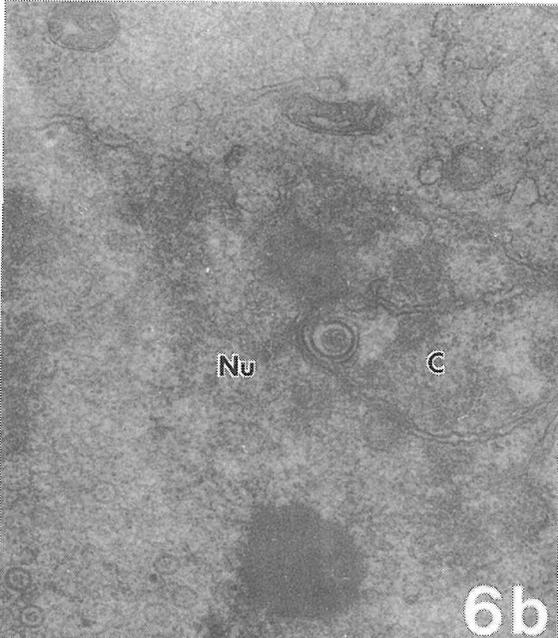
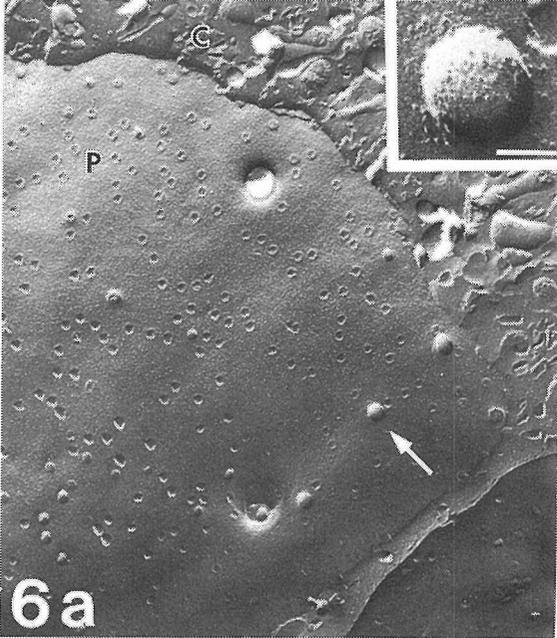
- Fig. 1a** A thin section of a NA cell 15 min. after the infection. Note the fusion of viral envelope with cell surface membrane. $\times 106,500$ bar : $0.1 \mu\text{m}$
- Fig. 1b** A scanning electron micrograph of a NA cell 15 min. after the infection. Virions on the cell surface were indicated by arrowheads. $\times 9,600$ bar : $0.5 \mu\text{m}$
- Fig. 1c** A FF replica of a NA cell 15 min. after the infection. The fusion of viral envelope with plasma membrane is indicated by an arrow. Note the absence of IMP in fused viral envelope (inset). $\times 52,500$, inset $\times 136,000$ bar : $0.1 \mu\text{m}$
- Fig. 1d** A FF replica of a NA cell 5 min. after the infection. Penetration of a group of virions (two or more) is shown in the center of this figure. Note the unaltered distribution of IMP in the surrounding area. $\times 70,000$
- Fig. 2** A FF replica of a Vero cell 10 min. after the infection.
- 2a** A few virions locate in the vicinity of cell surface and one virion is fused with the cell membrane (arrow). E : E face of the plasma membrane C : cytoplasm N : nuclear membrane $\times 14,500$
- 2b** A higher magnification of the virion fused with the cell membrane in Fig. 2a. Note the absence of IMP in fused envelope on the E face of the plasma membrane (arrow). $\times 48,000$ bar : $0.1 \mu\text{m}$
- Fig. 3** A FB cell 15 min. after the infection.
- 3a** A scanning electron micrograph showing four virions on the cell surface. $\times 20,000$ bar : $0.1 \mu\text{m}$
- 3b** A FF replica of P face of the plasma membrane showing two virions being fused with the plasma membrane. $\times 90,000$ bar : $0.1 \mu\text{m}$
- Fig. 4** A FF replica of P face of the plasma membrane of a Vero cell 10 min. after the infection. Virions being fused with cell surface membrane. Note the morphological similarity to the virions seen in Figs. 1c, 1d, and 3b. $\times 36,000$ bar : $0.1 \mu\text{m}$
- Fig. 5a** A thin section of a NA cell 30 hrs. after the infection. Note the presence of capsids in the nucleus and enveloped virions in extracellular space. $\times 20,000$
- Fig. 5b** A portion of a NA cell 30 hrs. after the infection. Note FF profiles of capsids within the nucleoplasm (arrows). $\times 20,000$
- Fig. 5c** A higher magnification of intranuclear virions shown in Fig. 5b. Viral capsids and cores appear as granules arranged in a circle. $\times 40,000$ bar : $0.1 \mu\text{m}$
- Fig. 6a** A FF profile of the nuclear membrane of a NA cell 20 hrs. after the infection. One of the virions on the P face of the inner leaflet of nuclear membrane (arrow) is shown at a higher magnification in the inset. Note the paucity of IMP in the viral envelope. P : P face of the nuclear membrane C : cytoplasm $\times 12,800$, inset $\times 80,000$ bar : $0.1 \mu\text{m}$
- Fig. 6b** A thin section of a NA cell 30 hrs. after the infection. Note an enveloped virion in the perinuclear cistern and several capsids within the nucleoplasm. Nu : nucleus C : cytoplasm $\times 34,000$
- Fig. 7** A FF replica of a NA cell 10 hrs. after the infection. The envelopment of virions (arrows) and a IMP free spot (asterisk) in the P face of the nuclear membrane. Two capsids can be seen within the nucleus (arrowheads). $\times 29,000$

(Explanations of Fig. 8 – Fig. 14 are under their figures.)









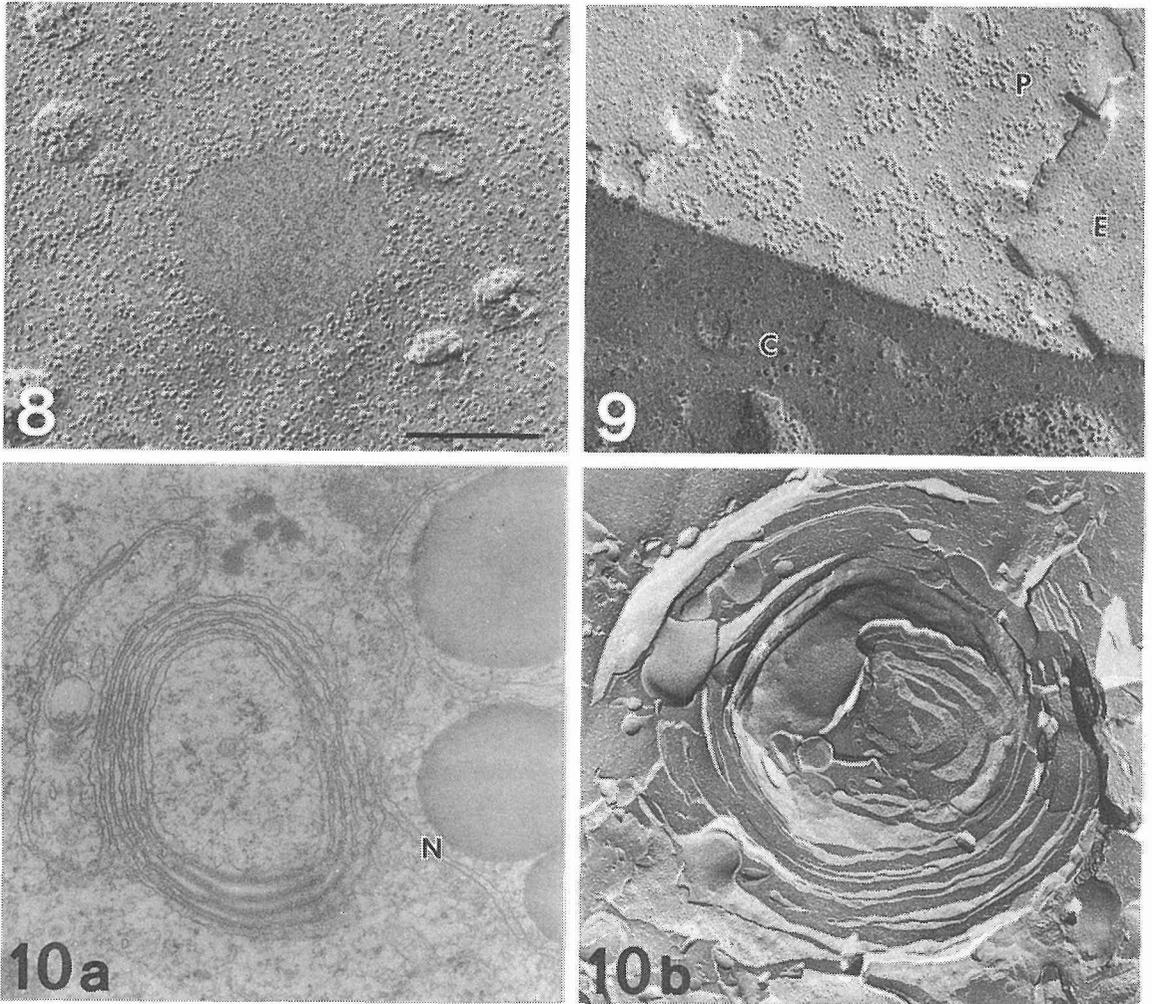


Fig. 8 A higher magnification of IMP free spot in the P face of the nuclear membrane. $\times 88,000$ bar : $0.2\mu\text{m}$

Fig. 9 A FF replica of a NA cell 20 hrs. after the infection. Aggregates of IMP in the P face of the outer leaflet of nuclear membrane. P : P face of the nuclear membrane E : E face of the nuclear membrane C : cytoplasm $\times 68,000$

Fig. 10 Aspect of concentrically arranged membrane of a NA cell 30 hrs. after the infection.

10a The most external membrane appears to contact with the nuclear membrane. Two capsids are seen within the circle of lamellated membrane. Lipid droplets are seen in the cytoplasm. N : nuclear membrane $\times 30,000$

10b A comparative FF profile of onion-bulb-like structure shown by thin-sectioning in Fig. 10a. $\times 18,600$

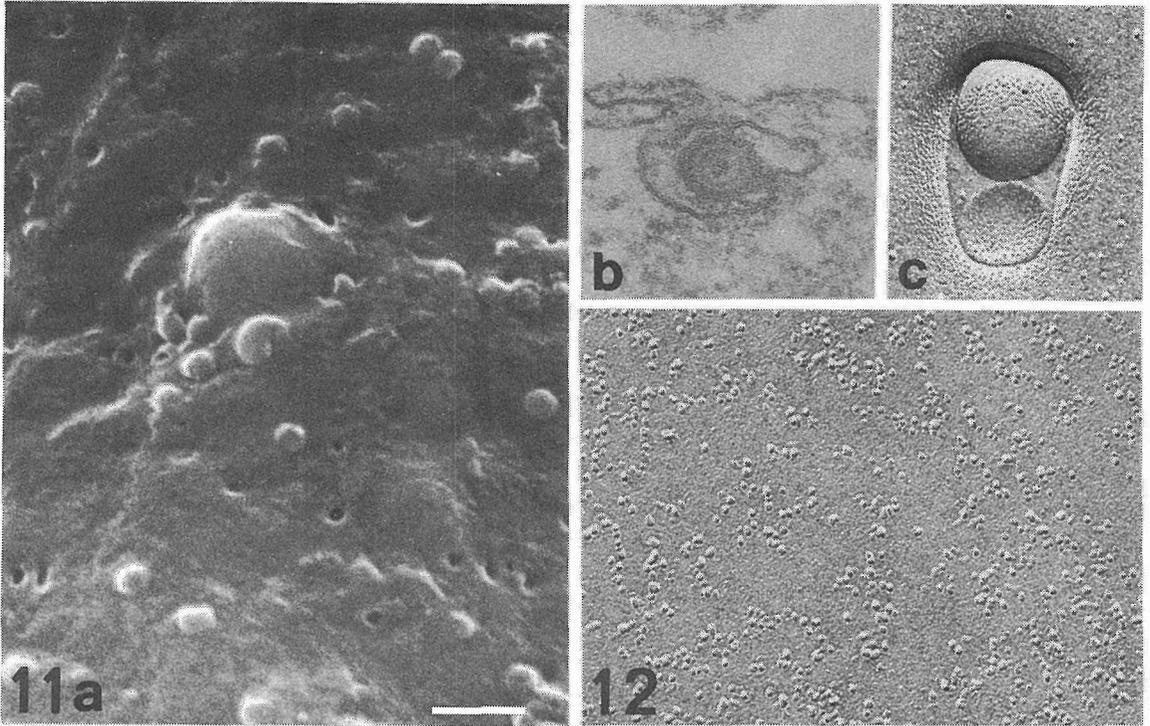


Fig. 11a A scanning electron micrograph showing virions on the surface of a NA cell 30 hrs. after the infection. $\times 25,000$ bar : $0.5\mu\text{m}$

Fig. 11b A thin section of a NA cell 30 hrs. after the infection. A virion appears to locate in a vacuole. $\times 115,000$

Fig. 11c Paucity of IMP in the envelope of virions being released from a NA cell 30 hrs. after the infection. $\times 90,000$

Fig. 12 Uneven distribution of IMP in the P face of the plasma membrane of a NA cell 30 hrs. after the infection. $\times 92,000$

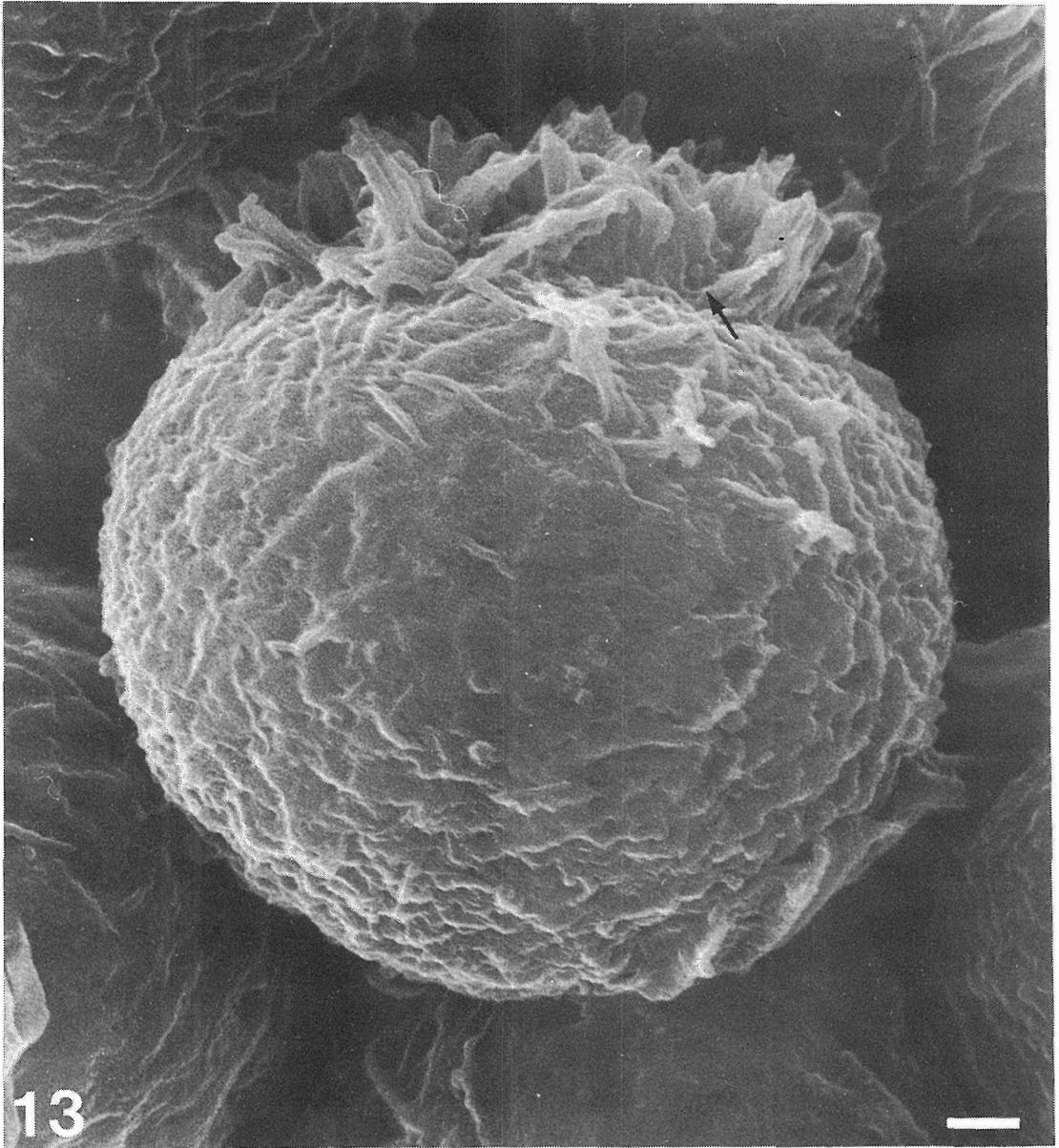


Fig. 13 A scanning electron micrograph showing a cluster of microvilli at one pole of a NA cell. The cell was infected 30 hrs. previously to the treatment with antiviral antibody for 10 min. at 37°C. A virion is indicated by an arrow. $\times 10,000$ bar : $1\mu\text{m}$

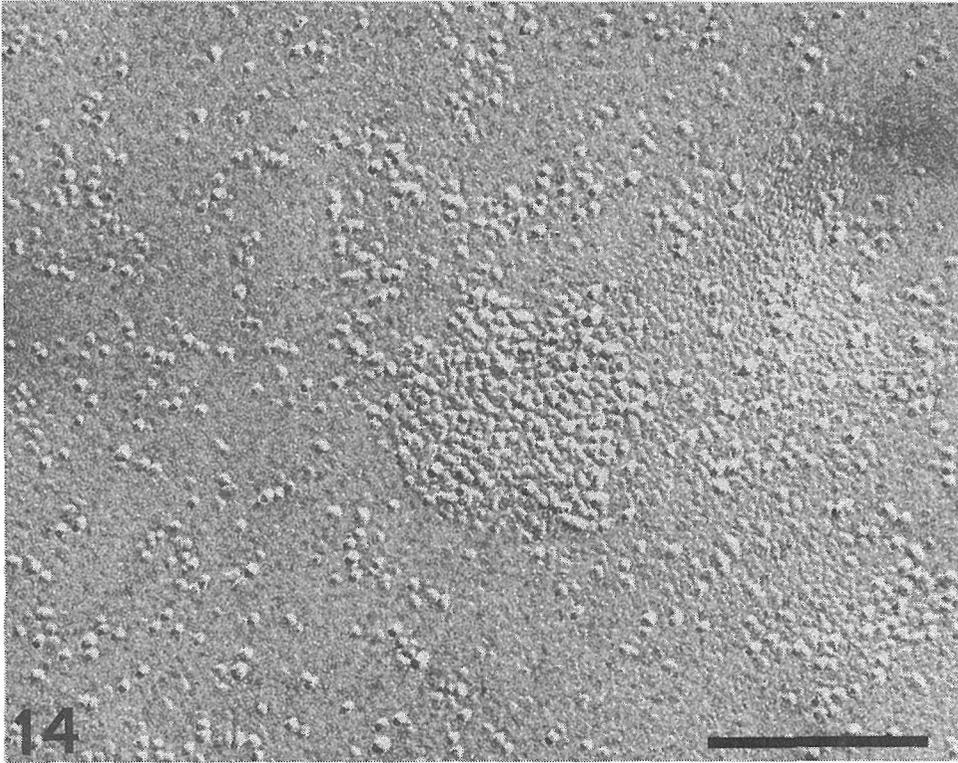


Fig. 14 A large patch of IMP in the P face of cell surface membrane. The cell was infected 30 hrs. previously to the treatment with antiviral antibody for 10 min. at 37°C. $\times 146,000$ bar : $0.2\mu\text{m}$