

IPN ウィルスの微細構造に関する超微細胞化学的観察

工藤 重治・黒沢 団・国峯 一声・信沢 邦宏・小林 茂

(1974 年 8 月 13 日受領)

Ultracytochemical Observations on the Ultrastructure of Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) Virus

Shigeharu Kudo, Dan Kurosawa, Issei Kunimine,
Kunihiro Nobusawa, and Shigeru Kobayashi

Ultrastructure of IPN virus, a pathogen of the fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson), was examined by the ultracytochemical techniques.

Mature virions are unenveloped and hexagonal or round in profile, having an average diameter of approximately $66\text{ m}\mu$ (size range of $65\text{--}68\text{ m}\mu$) after phosphotungstic acid (PTA) or ethanol-phosphotungstic acid (E-PTA) staining technique. These techniques revealed that five capsomeres were sharply present on a capsid edge of the hexagonal virions on the ultrathin sections, suggesting that the IPN virus capsid is made up of 162 capsomeres. Probably, IPN virus may be unenveloped icosahedra and a member of the reovirus group. The capsomeres are often penta- or hexagonal on the ultrathin sections, and at each apex small units with an average diameter of approximately 21 \AA are located.

PTA, E-PTA, ruthenium red, and lanthanum staining techniques revealed a positive reaction on the capsomeres of IPN virus, suggesting the presence of polysaccharides. The ruthenium red staining technique was applied to penetrate into small pancreatic tissue by means of mechanical damage. Further, PTA and E-PTA staining techniques revealed fine particles with the positive reaction on the outer surface and in the interior of tubular structures (or rod-like bodies) often located near the virions of various numbers.

Among IPN virions within cytolysosomes small particles with an average diameter of approximately 210 \AA appeared often singly or in beads-like chains. They consisted of a group of a few capsomeres and appeared penta- or hexagonal in profile. It is not clear what is the meaning of small particles.

(S. Kudo; Department of Anatomy, Gunma University School of Medicine, Maebashi, 371, Japan, D. Kurosawa, I. Kunimine, K. Nobusawa, and S. Kobayashi; Gunma Prefectural Fisheries Experimental Station, Maebashi, 371, Japan).

マス類の IPN 症はウィルスによる病変であることは Wolf et al. (1960) がウィルスを分離して以来確定されている。しかし IPN ウィルスの分類には混乱があり、ピコルナウィルス (picornavirus) 群 (Malsberger and Cerini, 1963; Wolf, 1964; Cerini and Malsberger, 1965) あるいはレオウィルス (reovirus) 群 (Amend and Chambers, 1969; Moss and Gravell, 1969) に属すると言われている。IPN 症のニジマス稚魚においても IPN ウィルスは Moss and Gravell (1969) の所見と対比してその形 (六角形また

は円形) や大きさ (平均 $54.3\text{ m}\mu$) からレオウィルス群に属すると考えた (工藤ら, 1973)。しかし、レオウィルス粒子のカプソメア (capsomere) の数が 162 個と言われているのに対して、Moss and Gravell (1969) は燐タングステン酸でネガティブ染色した IPN ウィルス粒子のカプソメア数は 92 個であるという。一方、種々な種類の細胞表面には多糖類 (Luft, 1966; Pease, 1966) や糖蛋白 (Dimmock, 1970) の薄層が存在することが知られている。そこで、これらの証明方法を用いて、超微細胞化学的に IPN ウィルス粒子

の微細構造およびカプソメアの数をはっきりすることを試みた。

材料および方法

IPN ウィルス (Infectious pancreatic necrosis virus) の正常な微細構造を観察するために、工藤ら (1973) と同様に IPN 症ニジマス稚魚の膵臓を固定し、エポン包埋した。また、超微細胞化学的観察のために、燐タングステン酸 (PTA)、エタノール・燐タングステン酸 (E-PTA)、ルテニウム赤およびランタンが用いられた。

PTA 染色は IPN 症のニジマス膵臓の小組織片を 4% グルタルアルデヒド燐酸緩衝液 pH 7.4 で 3 時間固定し、その後 2% PTA に 3 時間浸してから脱水した。その一部は 2% PTA を含む 100% エタノールに 1 晩浸した (E-PTA)。

ルテニウム赤染色は上述と同様の小組織片を 500 ppm ルテニウム赤を含む 4% グルタルアルデヒド (カコジレート緩衝液 pH 7.4) の中で機械的に破壊し、ルテニウム赤の細胞内浸潤を助けながら、2~4 時間固定し、同濃度のルテニウム赤を含む同緩衝液で洗って後、さらに同濃度のルテニウム赤を含む 1% 4 酸化オスミウムで 3 時間固定した。

ランタン染色は細胞内構造を染色する Bannister (1972) の方法に従い、2% ランタンを含む 4% グルタルアルデヒド (カコジレート緩衝液 pH 7.4) で上述と同様の小組織片を 4 時間固定した後、2% ランタンを含む同緩衝液で 1 晩洗い、さらに 2% ランタンを含む 1% 4 酸化オスミウムで 3 時間固定した。

いずれの小組織片も脱水後、エポン包埋した。超薄切片は酢酸ウランと酢酸鉛の二重染色または無染色で電子顕微鏡で観察した。

観察結果

IPN ウィルスは膵臓外分泌細胞の細胞質の中に見出され、しかも通常チトリゾーム (cytolysome) の中に封ざられた状態で存在し、正常な細胞質から隔離されている。一般の電子顕微鏡的方法では IPN ウィルス粒子 (virion) は六角形あるいは円形輪郭で被膜を有さず、直径約 50~60 m μ 、平均約 54.3 m μ である (Fig. 1)。しばしばウィルス粒子の中心部が電子密度が高く、いわゆる芯を有するものやその中心部が明調なものもみられるが、大部分のものは均質な微細顆粒状を呈する。高倍率の電子顕微鏡写真では六角形の 1 稜にしばしば 5 個のカプソメアを数えることができるが、PTA や E-PTA 染色の場合ほど電子密度は高く

ない。また、ウィルス粒子の間に介在して、単独にあるいはビーズ状配列した小粒子が多数存在することがある (Fig. 1)。これらの小粒子は直径約 190~240 Å、平均約 210 Å で多くは中空な五角形あるいは六角形である。これは数個のカプソメアの集団で、1 個のカプソメアの周囲に 6 個のカプソメアがみられることもある (Fig. 2)。このようなカプソメアの配列は正常な IPN ウィルス粒子の表面でも観察され、1 個のカプソメアの周囲に 5 個あるいは 6 個のカプソメアがある (Fig. 3)。また、1 個のカプソメア自身が五角形ないし六角形を呈し、その中央部がやや明調で、しかも各頂点に平均約 21 Å の微粒子 (あるいは小単位) が存在することがある (Fig. 4)。

PTA と E-PTA 染色は IPN ウィルス粒子に対してはほぼ同様の電子密度を示し、全体として電子密度は高くなるが (Fig. 5)、これは特にカプソメアの電子密度が高くなるためである (Fig. 6)。それゆえに外見的に六角形を呈するウィルス粒子の 1 稜に 5 個のカプソメアを明瞭に識別できることが少くない (Figs. 6, 7)。また、カプソメアは超薄切片上で円柱ないし角柱にみえることがある (Fig. 7)。PTA または E-PTA 染色した IPN ウィルス粒子は大きさが約 65~68 m μ 、平均約 66 m μ で、1 稜の長さは平均約 410 Å、カプソメアの大きさは平均約 63 Å、カプソメアとカプソメアの間隔は平均約 24 Å である。これらの所見は IPN ウィルス粒子は正二十面体 (icosahedron) で総数 162 個のカプソメアを有するレオウィルス群に属することを示唆する。また、ウィルス粒子の付近にしばしば存在する棒状体の表面や内部にも PTA 染色で陽性を呈する微粒子がみられる (Fig. 10)。

ルテニウム赤で陽性の反応を呈する物質はウィルス粒子の表面に点在し、しかもカプソメア自身が陽性である (Fig. 8)。

ランタン染色の場合も IPN ウィルス粒子は全体的に電子密度が高くなり、特にそのカプソメアが陽性に染色される (Fig. 9)。

考 察

IPN ウィルス粒子の大きさについての初期の報告は 50 m μ 以下で (Cerini and Malsberger, 1963; Wolf, 1964; Malsberger and Cerini, 1965; Parisot et al., 1965)、IPN ウィルスはピコルナウィルス (picornavirus) 群に属すると考えられて来たが、最近、ウィルス粒子の大きさや形からレオウィルス (reovirus) 群に属すると報告された (Amend and Chambers, 1969;

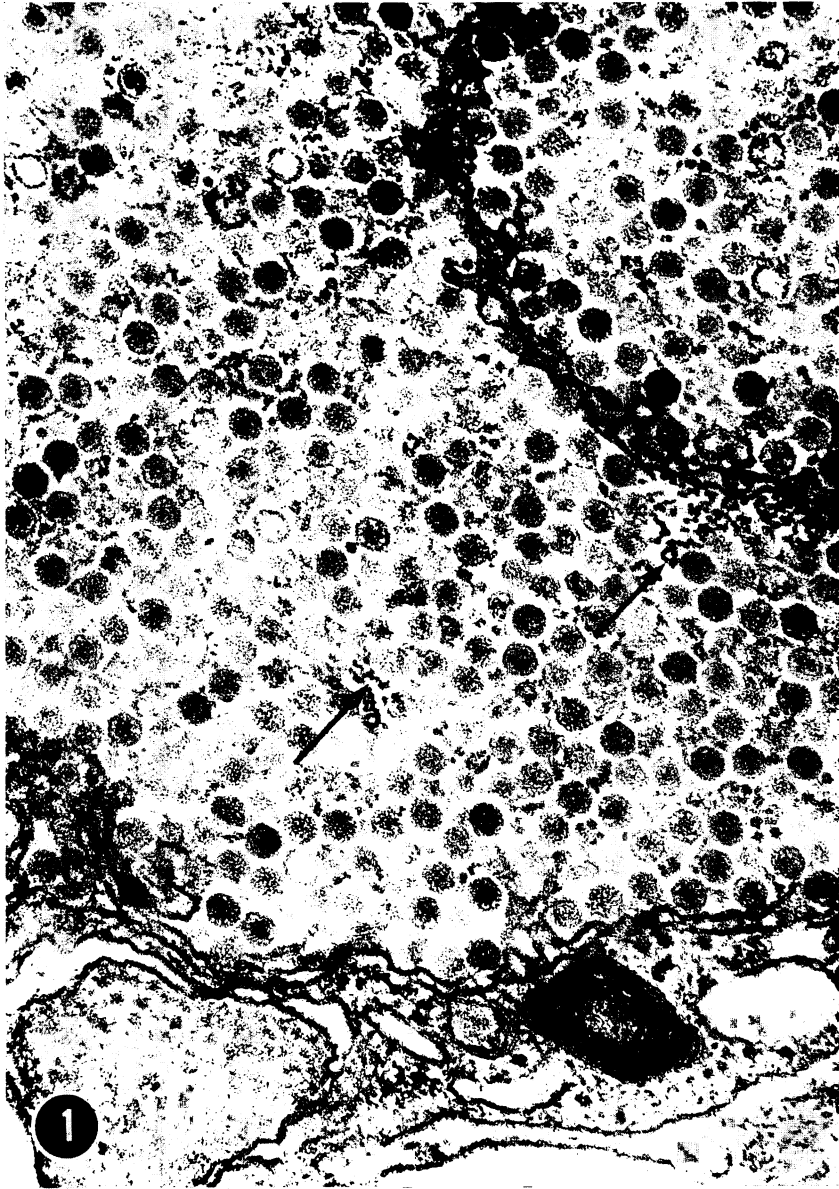


Fig. 1. IPN virus enclosed within a cytolysome. Unenveloped virions appear hexagonal or round in profile, and several of them are empty and some others contain a core. Among virions small particles with an average diameter of approximately 210\AA interpose singly or in beads-like chains (arrows). Routine electron microscopy. $\times 101,200$.

Moss and Gravell, 1969; 工藤ら, 1973). そこで、レオウィルスの形態学的特徴を参照しながら本観察のIPN ウィルスを分類する必要がある。

レオウィルス粒子は $60\sim 70\text{ m}\mu$ の大きさで、正二十面体、外見的に六角形を呈し、1 稜のカプソメアの

数が5個、ウィルス粒子1個のカプソメア総数は162個である。カプソメアは長い中空の五角または六角柱で、五角柱は正二十面体の各頂点に、六角柱は稜か面に位置する。しかもレオウィルスは細胞質内でのみ増殖する(東・石田, 1964 参照)。IPN ウィルス粒子は

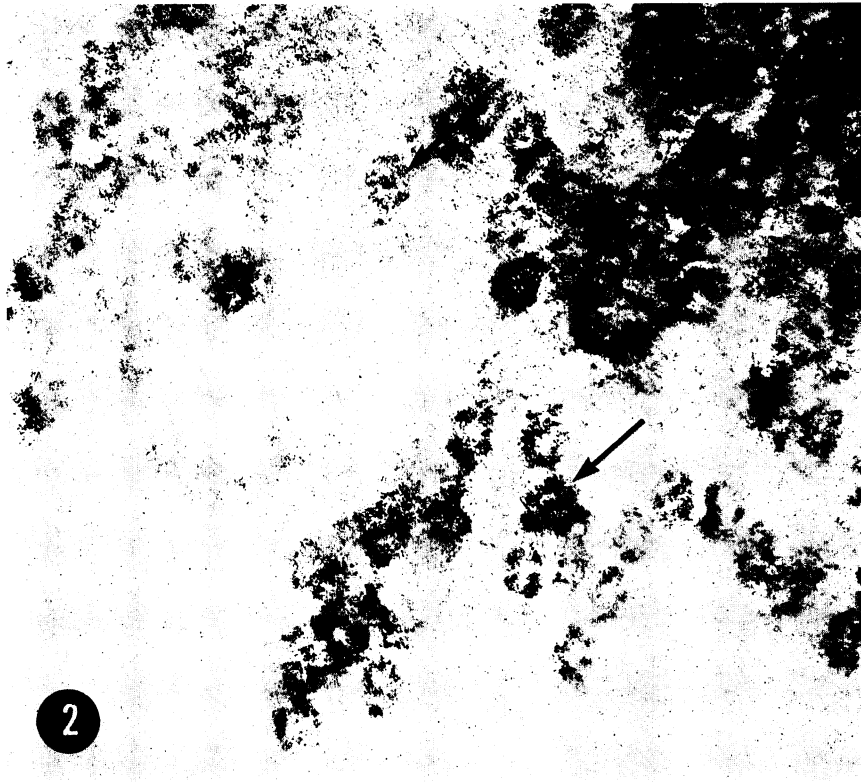


Fig. 2. Small particles lying singly or in beads-like chains. The small particles are penta- or hexagonal in profile, consisting of a few capsomeres. The majority of them are empty but some contain a capsomere located in the central portion (arrows). Routine electron microscopy. $\times 368,000$.

核内には決してみられず、細胞質内のみ存在し(工藤ら, 1973), 核酸は RNA であることが推察される。しかも、本観察における IPN ウィルスの微細構造は上述のレオウィルスの微細構造とほとんど一致し、そのカプソメアの微細構造においても共通点を有し、超薄切片上でしばしば円柱ないし角柱、あるいは五角ないし六角形でその各頂点に直径約 21 \AA の小単位が存在する。IPN ウィルス粒子の大きさについて Moss and Gravell (1969) は一般の電子顕微鏡的方法では平均直径が $55 \text{ m}\mu$ で、PTA でネガティブ染色した標本では約 $65 \text{ m}\mu$ であるという。確かに一般の方法では小さく、直径約 $50 \sim 60 \text{ m}\mu$ で平均 $54.3 \text{ m}\mu$ であるが(工藤ら, 1973), 本観察における PTA あるいは E-PTA 染色では約 $65 \sim 68 \text{ m}\mu$, 平均約 $66 \text{ m}\mu$ であり、ウィルス粒子の大きさについてはほぼ両者間で一致するが、ウィルス粒子 1 個のカプソメアの総数については前者の報告では 92 個、後者では 162 個である。保

坂 (1966) によると、カプソメアの総数について差異が生ずるのは正二十面体カプシド (capsid) の二つの頂点をはっきり同定されていない場合で、1 つの頂点は同定されても、もう 1 つの頂点の同定があいまいであるためという。いずれにしても現在はレオウィルス粒子のカプソメア総数は 162 個が正しいとされている。

PTA または E-PTA 染色した場合に IPN ウィルス粒子がグルタルアルデヒド・4 酸化オスミウムの二重固定の場合よりも大きいのは恐らくカプソメアの表面に多糖類を含む物質層があり、それが PTA と反応して陽性を呈した結果その物質層も含めて測定することができたためと理解される。なぜなら、PTA 染色で陽性を呈する物質は多糖類であることが知られているからである (Pease, 1966)。さらに、種々の種類の細胞表面にはルテニウム赤と反応する物質層が存在することが知られ、それは酸性粘性多糖類 (Luft, 1966; Behnke, 1968; Martinez-Palomo et al., 1969) や酸

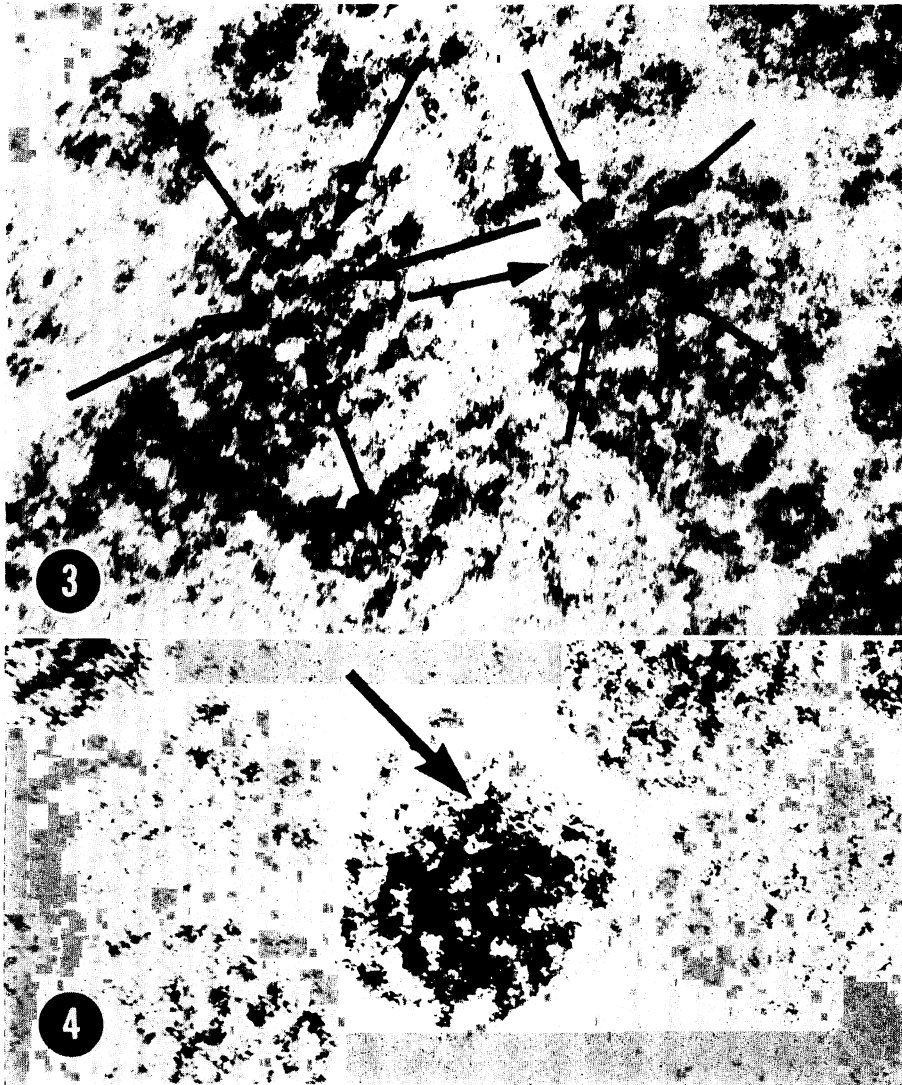


Fig. 3. Arrangement of capsomeres. Five or six capsomeres surround one capsomere (arrows). Routine electron microscopy. $\times 690,000$.

Fig. 4. A cross-sectioned capsomere. The capsomere is pentagonal in profile, and at each apex small units with an average diameter of approximately 21\AA are located (arrow). Routine electron microscopy. $\times 607,200$.

性糖蛋白 (Dimmock, 1970) よりなるといわれ、また最近、ある種のウィルス粒子の被膜が酸性粘性多糖類の存在を示すルテニウム赤反応が陽性であるという報告もある (Shigematsu and Dmochowski, 1973)。IPN ウィルス粒子、特にそのカプソミアが PTA とルテニウム赤の両者によって陽性反応を呈することは少なくともそのカプソミアには多糖類が含まれているこ

とが考えられる。

ランタンは細胞間腔のトレーサー (tracer) として使用されているが (Revel and Karnovsky, 1967; Brightman and Reese, 1969; Hall and Williams, 1971; Henrikson and Stacy, 1971)、細胞内の構造も染色することが知られている (Bannister, 1972)。しかし、ランタンによって染色される細胞質内の物質は非

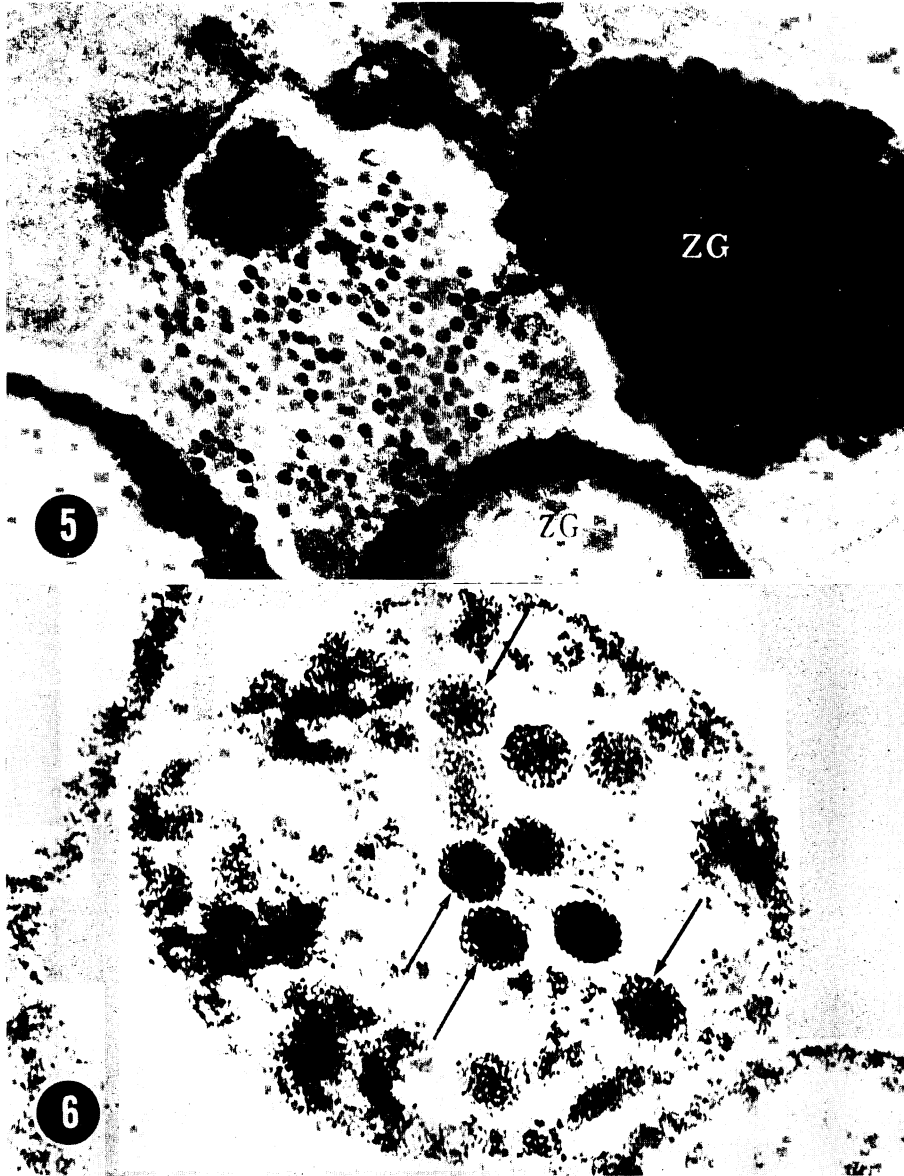


Fig. 5. IPN virus after E-PTA staining technique. E-PTA staining technique reveals virions and zymogen granules (ZG) with the positive reaction. Unstained. $\times 38,000$.

Fig. 6. IPN virus after PTA staining technique. Capsomeres of virions sharply show a positive reaction. Five capsomeres are present on a capsid edge of a few virions (arrows). Stained by uranium and lead. $\times 144,400$.

特異性であるかも知れないという。一方、ランタンは糖蛋白 (Khan and Overton, 1970) あるいは酸性粘性多糖類 (Lane and Treherne, 1970) の存在を証明するという報告もあり、ランタン染色によって陽性を

呈する物質は必ずしも特異性は高いとはいえないかも知れないが、Bannister (1972) のランタン染色法では IPN ウィルス粒子のカプソメアの電子密度が高くなることから、PTA 染色やルテニウム赤反応による陽性結



Fig. 7. A virion after PTA staining technique. Each arrow shows one of five capsomeres present on a capsid edge of a hexagonal virion. Stained by uranium and lead. $\times 698,300$.

果と合せ考え、少なくとも IPN ウィルス粒子ではランタンによって染色される物質は多糖類と無縁ではないように思われる。

チトリゾーム内に存在するウイルス粒子間に数個のカプソメアの集団からなる小粒子(直径約 $190\sim 240\text{ \AA}$)が存在したが、この意義については不明である。ウイルス粒子がチトリゾームの中で消化される過程があることを報告したが(工藤ら, 1973)、その場合にはウイルス粒子の輪郭が全体として不明瞭になり、チトリゾーム内にミエリン像の増加を伴うが、上述の小粒子が存在するチトリゾーム内では決してウイルス粒子の輪郭が不明瞭になったり、ミエリン像を伴ったりすることはなくチトリゾーム内の消化過程におけるウイルス粒子の崩壊を意味する形態とは異なっているように思われる。しかし、カプソメアが集まってカプソド(capsid)を作る過程なのか、それともウイルス粒子の消化や崩壊の第1歩を意味している過程なのかは明らかでない。

IPN ウィルス粒子の付近にしばしば棒状体が現われるが(Moss and Gravel, 1969; 工藤ら, 1973)、本観察ではその棒状体の表面や内部に PTA 染色で陽性の

微粒子が存在するが、この微粒子が IPN ウィルス粒子のカプソメアと超微構造的に一致するかどうか明らかにすることはできなかった。

要 約

IPN ウィルスの微細構造が超微細胞化学的に検索された。IPN ウィルス粒子は被膜を有さず、外見的に六角形あるいは円形輪郭で PTA や E-PTA 染色した標本では直径約 $65\sim 68\text{ m}\mu$ 、平均約 $66\text{ m}\mu$ である。六角形輪郭のものではしばしば1稜に5個のカプソメアがある。1稜の長さは平均約 410 \AA 、カプソメアの大きさは平均約 63 \AA 、カプソメアとカプソメアの間隔は平均約 24 \AA である。カプソメアは超薄切片上ではしばしば円柱または角柱、あるいは五角形または六角形でその各頂点に平均約 21 \AA の小単位が位置する。

PTA、E-PTA、ルテニウム赤およびランタン染色では IPN ウィルス粒子のカプソメアが陽性を呈し、それは多糖類を含むことが示唆される。IPN ウィルス粒子は恐らく正二十面体で総数 162 個のカプソメアを有するレオウィルス群に属するものと考えられる。

チトリゾーム内の IPN ウィルス粒子間に数個のカ

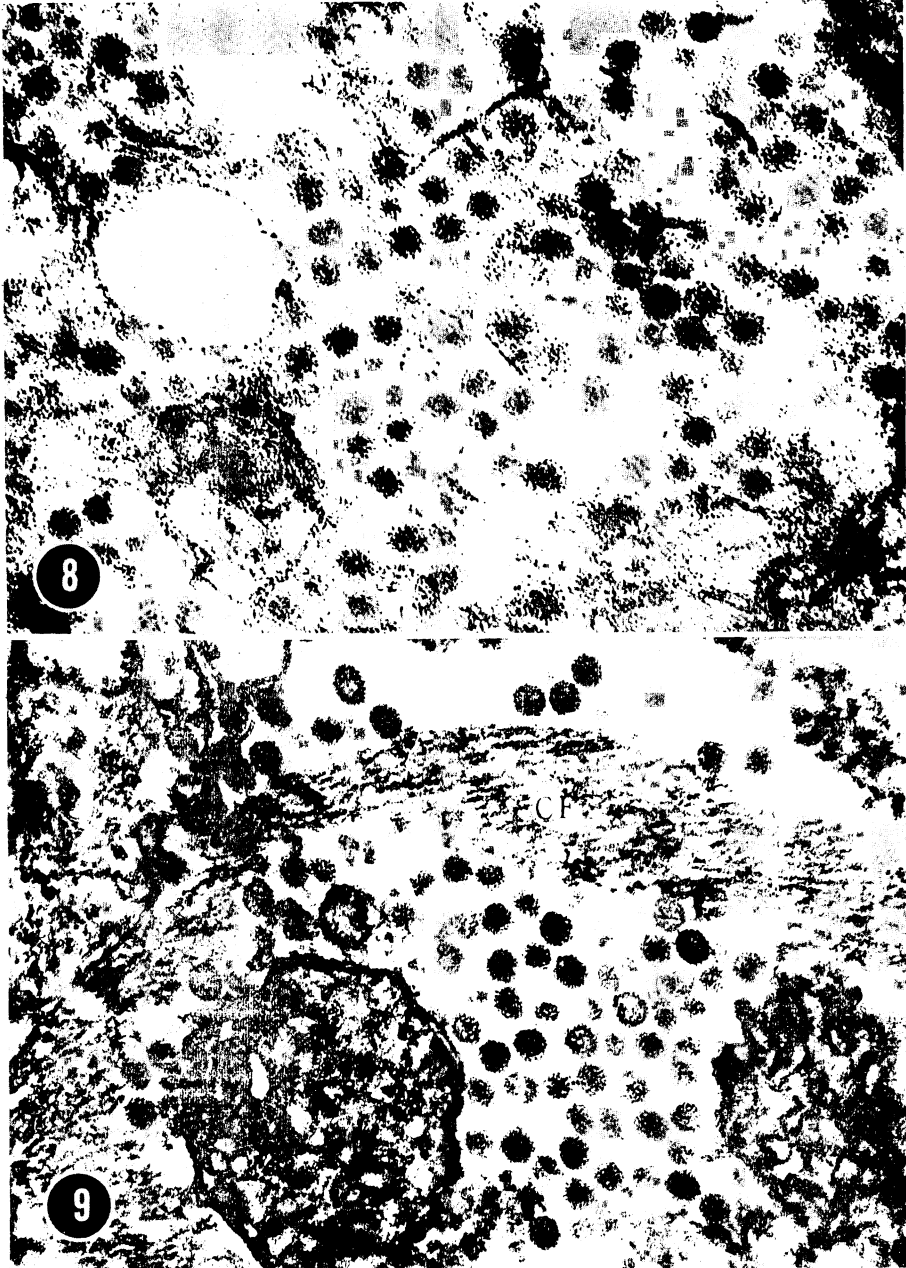


Fig. 8. IPN virus after ruthenium red staining technique. Ruthenium red-stained material is seen as electron dense spots on the virions, particularly on the capsomeres. Stained by uranium and lead. $\times 87,300$.

Fig. 9. IPN virus after lanthanum staining technique by Bannister (1972). The lanthanum staining technique reveals a positive substance on the capsomeres of virions and collagen fibres (CF). Stained by uranium and lead. $\times 75,800$.

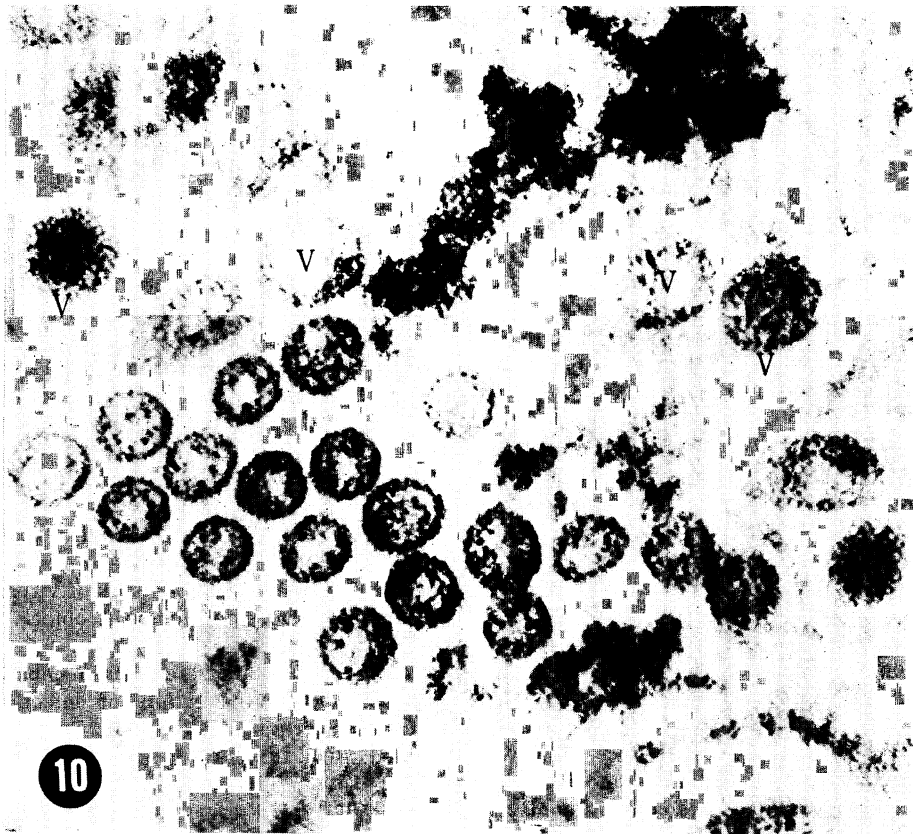


Fig. 10. Cross-sectioned rod-like bodies after PTA staining technique. PTA-positive material is seen as electron dense spots on the outer surface and in the interior of the rod-like bodies, and the capsomeres of virions (V) also are stained by PTA. Unstained by uranium and lead. $\times 210,900$.

プソメアの集団よりなり、しかも多くは中空な五角形または六角形の微小粒子（平均約 210 \AA ）がしばしば単独にあるいはビーズ状配列をして存在する。

IPN ウィルス粒子の付近にしばしば存在する棒状体の表面や内部に PTA 染色で陽性を呈する微粒子がある。

引用文献

- Amend, D. F. and V. C. Chambers. 1969. An electron microscope study of certain viruses of salmonid fishes. (工藤ら, 1973 より引用). 東昇・石田名香雄. 1964. ウィルス学 827 pp. 朝倉書店, pp. 4~17 東京
- Bannister, L. H. 1972. Lanthanum as an intracellular stain. *J. Microscopy*, 95 : 413~419, figs. 1~9.
- Behnke, O. 1968. Electron microscopical observations on the surface coating of human blood platelets. *J. Ultrastruct. Res.*, 24 : 51~69, figs. 1~26.
- Brightman, M. W. and T. S. Reese. 1969. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.*, 40 : 648~677, figs. 1~41.
- Cerini, C. P. and R. G. Malsberger. 1965. Morphology of infectious pancreatic necrosis virus. *Ann. New York Acad. Sci.*, 126 (Art. 1) : 315~319, figs. 1~4.
- Dimmock, E. 1970. The surface structure of cultured rabbit kidney cells as revealed by electron microscopy. *J. Cell Sci.*, 7 : 719~737, figs. 1~12.
- Hall, S. M. and P. L. Williams. 1971. The distribution of electron dense tracers in peripheral nerve fibres. *J. Cell Sci.*, 8 : 541~555, figs. 1~12.
- Henrikson, R. C. and B. D. Stacy. 1971. The barrier to diffusion across ruminal epithelium: A study by electron microscopy using horse-

- radish peroxidase, lanthanum, and ferritin. *J. Ultrastruct. Res.*, 34 : 72~82, figs. 1~12.
- 保坂康弘, 1966. ウイルス粒子の構造. ウイルス, 川喜田愛郎ら編 pp. 1~23, 共立出版, 東京
- Khan, T. A. and J. Overton. 1970. Lanthanum staining of developing chick cartilage and reaggregating cartilage cells. *J. Cell Biol.*, 44 : 433~438, figs. 1~8.
- 工藤重治・黒沢団・国峯一声・信沢邦宏・小林茂 1973. IPN 症のニジマスにおける膵臓および肝臓の電子顕微鏡による観察. 魚類学雑誌, 20 : 163~177, figs. 1~8.
- Lane, N. J. and J. E. Treherne. 1970. Lanthanum staining of neurotubules in axons from cockroach ganglia. *J. Cell Sci.*, 7 : 217~231, figs. 1~6.
- Luft, J. H. 1966. Fine structure of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed. Proc.*, 25 : 1773~1783, figs. 1~15.
- Malsberger, R. G. and C. P. Cerini. 1963. Characteristics of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Bacteriol.*, 86 : 1283~1287, figs. 1~2.
- Malsberger, R. G. and C. P. Cerini. 1965. Multiplication of infectious pancreatic necrosis virus. *Ann. New York Acad. Sci.*, 126 (Art. 1) : 320~327, figs. 1~3.
- Martinez-Palomo, A., C. Braislovsky, and W. Bernhard. 1969. Ultrastructural modification of the cell surface and intercellular contacts of some transformed cell strains. *Cancer Res.*, 29 : 925~937, figs. 1~18. Pl. 1.
- Moss III, L. H. and M. Gravel. 1969. Ultrastructure and sequential development of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.*, 3 : 52~58, figs. 1~8.
- Parisot, T. J., W. T. Yasutake, and G. W. Klontz. 1965. Virus diseases of the salmonidae in western United States. I. Etiology and epizootiology. *Ann. New York Acad. Sci.*, 126 (Art. 1) : 502~519, figs. 1~7.
- Pease, D. C. 1966. Polysaccharides associated with exterior surface of epithelial cells: kidney, intestine, brain. *J. Ultrastruct. Res.*, 15 : 555~588, figs. 1~23.
- Revel, J. P. and M. J. Karnovsky. 1967. Hexagonal array of subunits in intracellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.*, 33 : C7~C12, figs. 1~6.
- Shigematsu, T. and L. Dmochowski. 1973. Studies on the acid mucopolysaccharide coat of viruses and transformed cells. *Cancer*, 31 : 165~174, figs. 1~9.
- Wolf, K. 1964. Characteristics of viruses found in fishes. *Develop. Ind. Microbiol.*, 5 : 140~148.
- Wolf, K., S. F. Snieszko, C. E. Dunbar, and E. Pyle. 1960. Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 104 : 105~108, figs. 1~2.
- (工藤: 371 前橋市昭和町群馬大学医学部第1解剖学教室. 黒沢・国峯・信沢・小林: 371 前橋市敷島町群馬県水産試験場)