



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	OMV感染RTG-2細胞およびサケ 0. keta 肝細胞の超微構造
Author(s)	田中, 真; 吉水, 守; 木村, 喬久
Citation	日本水産学会誌, 53(1), 47-55 https://doi.org/10.2331/suisan.53.47
Issue Date	1987-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/38616
Rights	© 1987 公益社団法人日本水産学会
Type	journal article
File Information	yoshimizu-48.pdf



OMV 感染 RTG-2 細胞およびサケ *O. keta* 肝細胞の超微構造

田中 真, 吉水 守, 木村 喬久

(1986 年 5 月 30 日受理)

Ultrastructures of OMV infected RTG-2 cells and hepatocytes
of chum salmon *Oncorhynchus keta*Makoto Tanaka,*¹ Mamoru Yoshimizu,*² and Takahisa Kimura*²

The ultrastructures of RTG-2 cells and hepatocytes of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) infected with *Oncorhynchus masou* virus (OMV) were observed by thin sectioning and negative staining. RTG-2 cells were fixed 3 and 7 days after OMV infection (m.o.i.=0.01) and the tissue samples from the liver of moribund 80-day-old, 3-month-old and 4-month-old chum salmon infected with OMV by the immersion method (100 TCID₅₀/ml, 60 min) were prepared for electron microscopy. The infected RTG-2 cells and hepatocytes were prefixed with paraformaldehyde-glutalaldehyde and post fixed with 2% osmic acid.

Electron micrographs of both RTG-2 cells and hepatocytes infected with OMV revealed the following activities: nuclei showed the margination and the subsequent aggregation of chromatin; syncytia was found in both RTG-2 cells and hepatocytes; the nuclear membranes became smooth and the virus matured in the nucleus of those cells; the matured virus particles were observed in the vesicle and around the cell membrane; and enveloped virus particles were seen in the focus of the hepatocyte. The size of enveloped virus particles was approximately 200×240 nm and the nucleocapsid was 115 nm in diameter.

前報までに魚類病原ヘルペスウイルス OMV は数種のサケ科魚類稚仔魚に対し、強い病原性を有し、腎臓および肝臓が主要標的臓器であることを明らかにした。^{1,2,3)}

本報では細胞内でのウイルス粒子の動態および感染細胞の微細構造の変化を明らかにすることを目的に培養細胞として RTG-2 細胞を、また人工感染魚の代表としてサケ (*Oncorhynchus keta*) を選び肝臓を対象にそれぞれの OMV 感染細胞について、電子顕微鏡による観察を行った。

材料と方法

供試培養細胞 25 cm² 容プラスチック培養フラスコ (Falcon) を用い、10% FBS (Gibco) 加 MEM (Eagle) にて 3 日間培養した RTG-2 細胞⁴⁾に m.o.i. を 0.01 となるように OMV を接種し、3 日目と 7 日目に感染細胞試料を得、後述の方法により固定を行なった。対象の正常 RTG-2 細胞は培養 6 日目のものを実験に供した。

OMV 感染肝細胞 前報の人工感染試験により OMV

に感染発症したサケのうち 80 日令感染群体長 5.4 cm の 1 尾、3 カ月令感染群体長 7.4 cm と 7.4 cm の 2 尾、4 カ月令感染群の 1 尾計 4 尾の肝臓を本実験に供した。これらの供試魚には前報で明らかにした OMV 感染症の症状である肝臓の白点が観察された。

固定および電顕観察 固定は村田・永田⁵⁾ および海保・佐藤⁶⁾の方法を若干改変して行った。すなわち CPE の出現を待って細胞を Hanks' BSS で洗浄し、一部はトリプシン処理により浮遊させ遠心洗浄後、Karnovsky⁷⁾の固定法によりパラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド混液で 2 時間固定した。10% シュクロース添加 0.1% カコディレート緩衝液で洗浄、2% オスミック酸で 1 時間固定した。肝細胞の固定も同様に行った。次いでアルコールで脱水後エポン樹脂に包埋し、2% 酢酸ウラニルにて 30 分間ブロック染色を行った。常法によりガラスナイフで超薄切片を作製し、日立電子顕微鏡 H-300 にて観察した。なお一部は超薄切片を作製後ウラン単独あるいはウランと鉛で二重染色を行った。

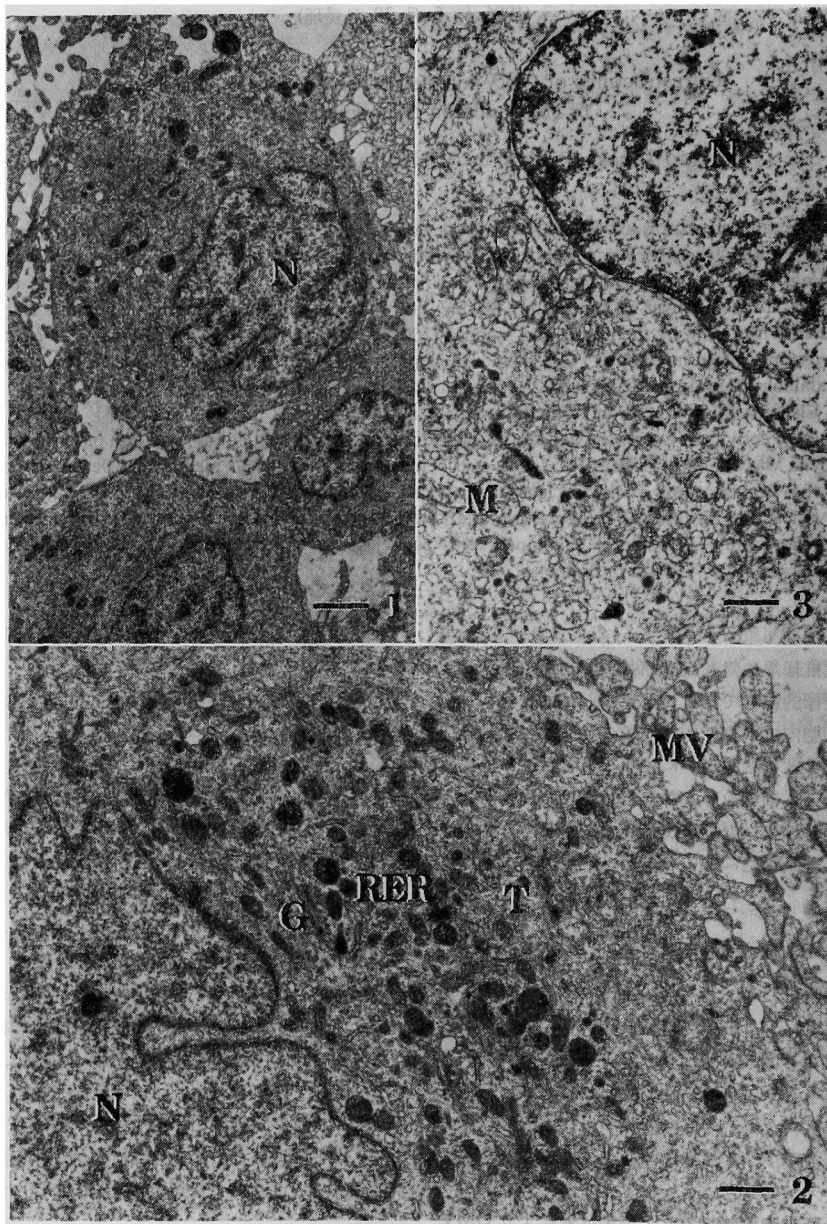
*¹ 静岡県水産試験場浜名湖分場 (Hamanako Branch Shizuoka Fisheries Experimental Station, Bentenjima, Maisaka, Shizuoka 431-02, Japan).

*² 北海道大学水産学部 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041, Japan). (Correspondence: Professor T. Kimura, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041, Japan).

結 果

正常 RTG-2 細胞 正常 RTG-2 細胞の超薄切片像を Fig. 1~Fig. 3 に示した。

培養フラスコの壁面から遊離させた RTG-2 細胞は紡錘形から球状に変化し写真上では円形に観察された。細胞膜面の片側はスムーズであるが、他方は微絨毛が発達していた。スムーズ側は器壁付着面または隣接細胞との



Figs. 1-3. Electron micrograph of RTG-2 cell.

Fig. 1. Normal RTG-2 cell treated with trypsin, —: 2 μ m.

Fig. 2. High magnification of normal RTG-2 cell, —: 1 μ m.

Fig. 3. Normal RTG-2 cell, Low electron dense mitochondria were seen, —: 1 μ m.

N: Nucleus, M: Mitochondria, RER: Rough endoplasmic reticulum, G: Golgi complex, T: Tonofilaments, MV: Microvilli

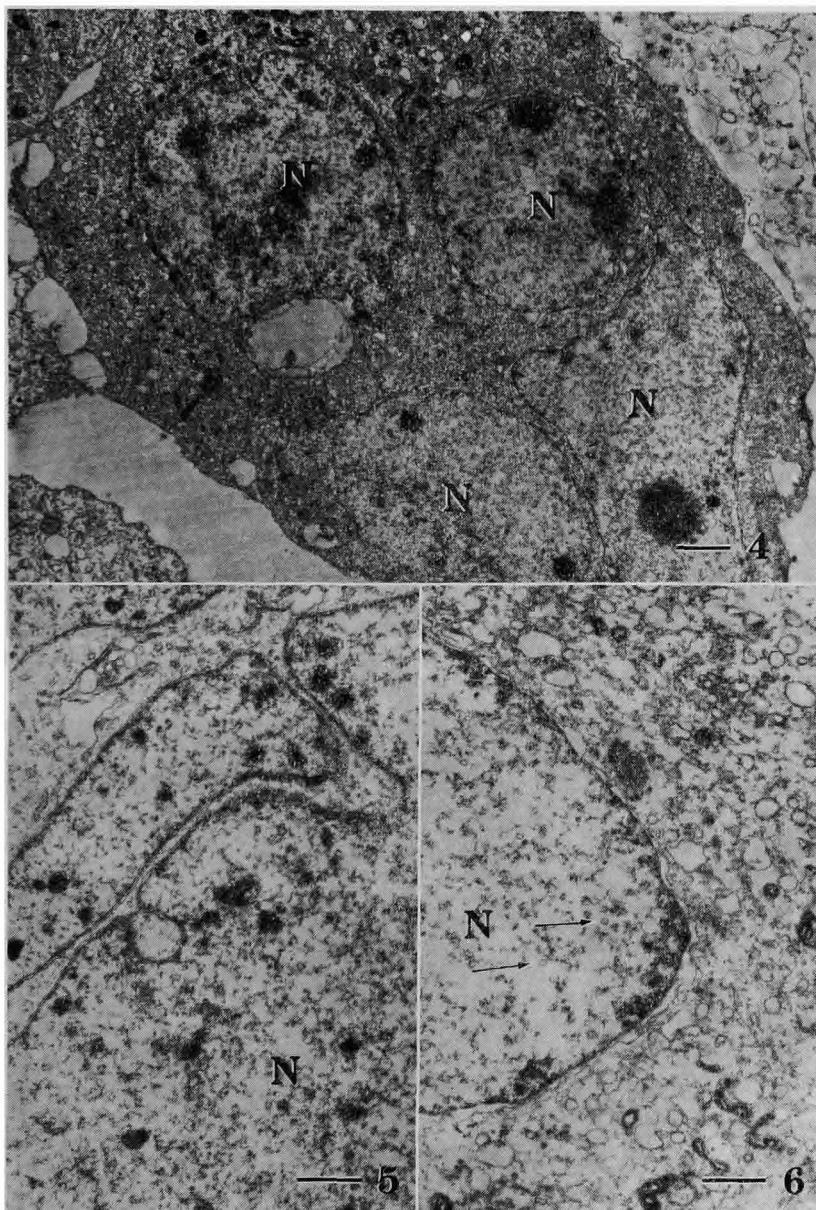
接触面に、微絨毛のみられる側は自由遊離面に一致した。核の細胞内での位置は容器付着面側に片寄っていた (Fig. 1)。

自由遊離面側の細胞質には核以外の大部分の細胞内小器管が偏在し、微絨毛の発達に対応して機能的に配置し

ていた。

核は輪郭がきわめて不整形であり、特に細胞内小器管の発達している側が顕著であった (Fig. 2)。

ミトコンドリアは楕円形で内部に環状電子密度の高い (暗調) クリステを持ち、細胞によっては明調なものも存



Figs. 4-6. Electron micrograph of RTG-2 cell, 3 days after OMV infection.

Fig. 4. Syncytium involving four nuclei, —: 2 μ m.

Fig. 5. Irregular nucleus membrane, —: 1 μ m.

Fig. 6. Smooth nucleus membrane, —: 1 μ m.

N: Nucleus, M: Mitochondria, Arrow: Virus particle.

在したが、同一細胞内では同じであった。電子密度の高いミトコンドリアを持つ細胞では多数の暗調な顆粒の出現が観察された。また繊維芽細胞の特徴である細繊維が多数存在し、所々で束になって観察された (Fig. 3)。

OMV 感染 RTG-2 細胞 OMV 感染 3 日目の RTG-2 細胞を Fig. 4~6 に、7 日目のものを Fig. 7 に示した。

OMV 感染 3 日目ではヘルペスウイルス感染細胞の特徴である多核巨細胞の形成が観察され、細胞は完全に融合していた。核間には細胞膜やデスモゾームは観察されなかった。この時期すでに核内にエンブティーカープシッドが認められたが、数は少なくしかも発達段階の進んだ電子密度の高いヌクレオカプシッドの状態のものは殆んど認められなかった。核は同一の合胞体中ではすべて同

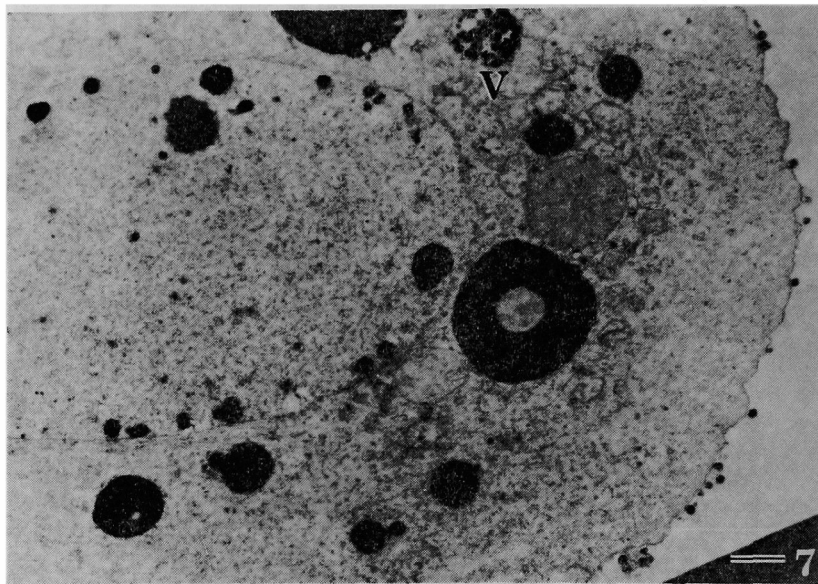


Fig. 7. Electron micrograph of RTG-2 cell on 7 days after OMV infection. Matured virus particles were observed in the vesicle (V) and around the cell membrane, —: 1 μ m.

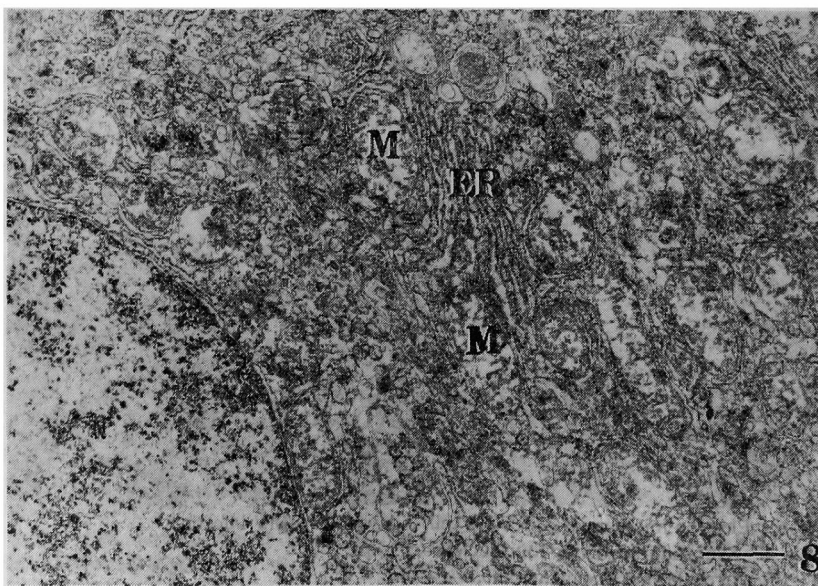
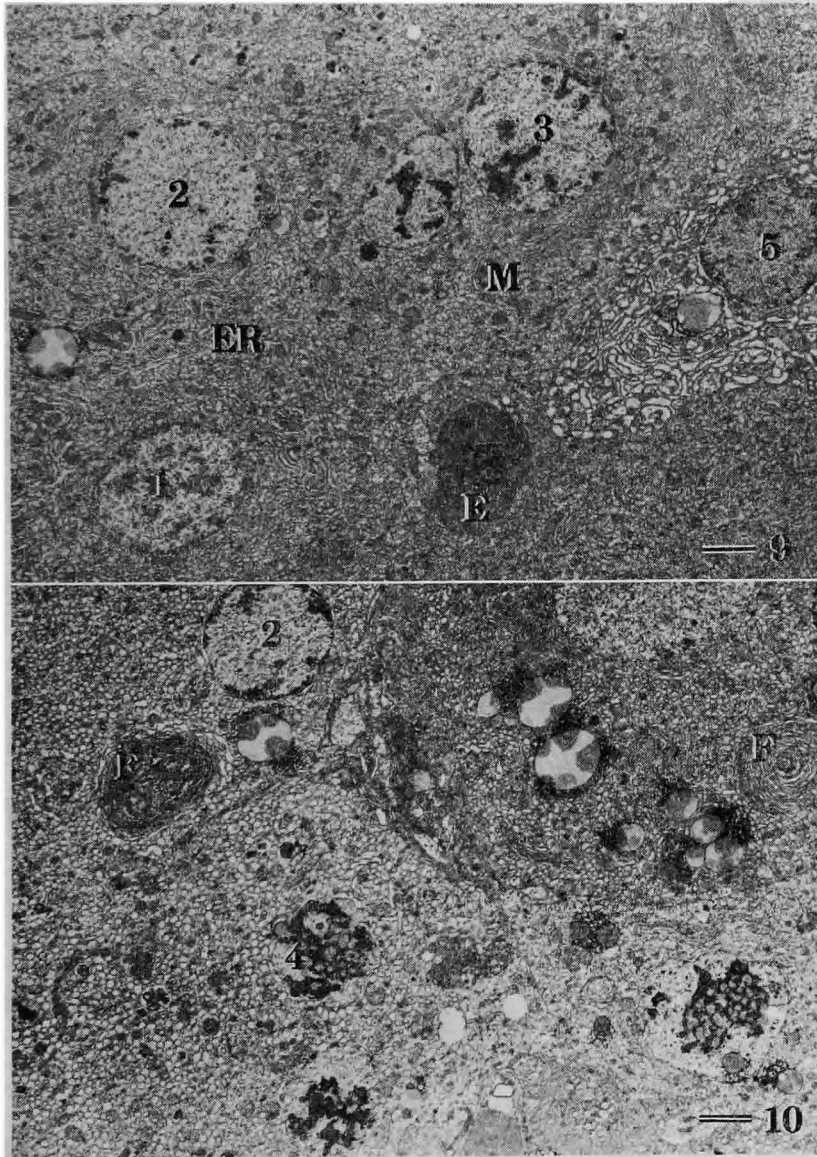


Fig. 8. Electron micrograph of normal hepatocyte of chum salmon, —: 1 μ m.
N: Nuclous, M: Mitochondria, ER: Endoplasmic reticulum

様の形態を示し、多くはクロマチンが核膜側に寄り、いわゆる辺縁趨向性を示していた (Fig. 4)。

核の輪郭は前述の正常細胞に似た不整形 (Fig. 5) を示すものや、スムーズな楕円形 (Fig. 6) を呈するもの

が存在した。輪郭の不整な核では楕円形のものより観察されるウイルス粒子の数が一般に少なく、感染初期のものと考えられた。また小胞体は拡張し円形に観察された。



Figs. 9-10. Electron micrograph of liver lesion of chum salmon infected with OMV. Degenerated hepatocytes, —: 4 μ m.

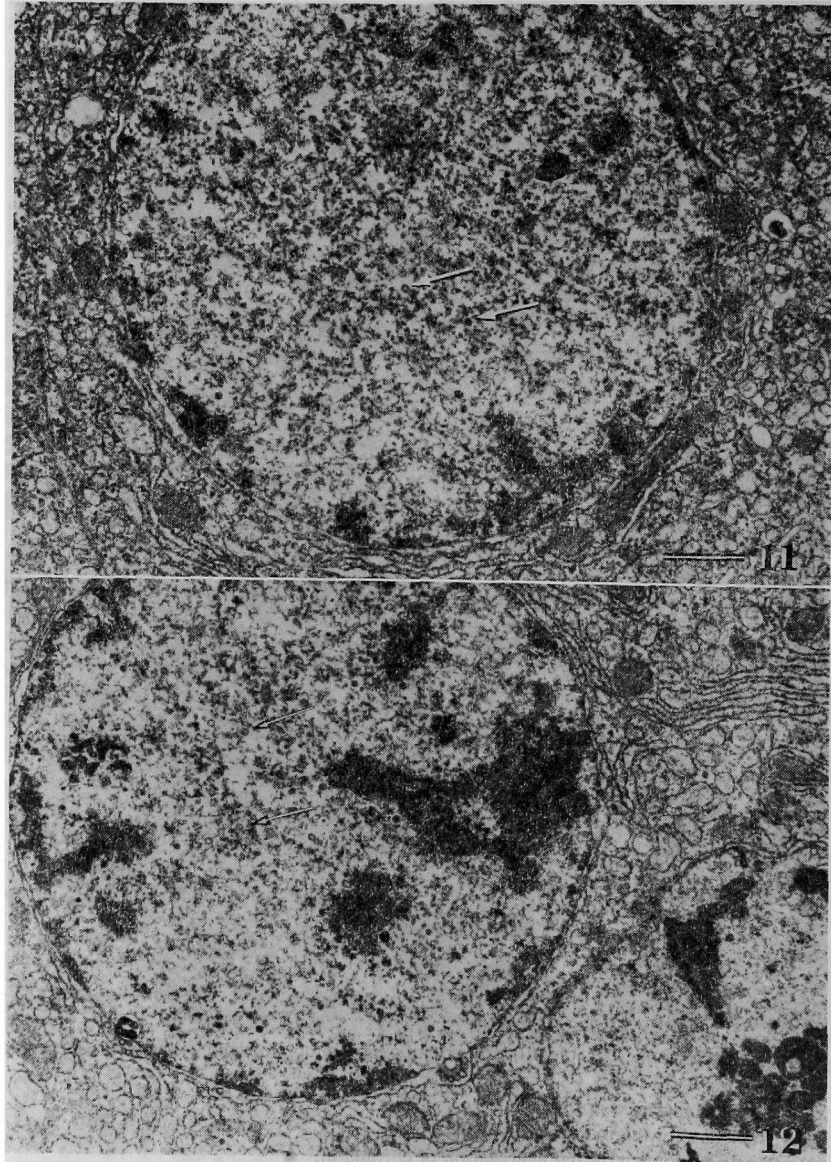
- 1: Nucleus appeared normal.
- 2: Nucleus showing margination of chromatin.
- 3: Nucleus showing partial aggregation of chromatin.
- 4: Nucleus showing pyknosis.
- 5: Cell possessing electron dense nucleus.

M: Mitochondria, E: Erythrocyte, ER: Endoplasmic reticulum, F: Finger print degeneration.

Fig. 7 に OMV 感染 7 日目の RTG-2 細胞を示したが, この時期多数のエンベロープを被った成熟ウイルス粒子が細胞質空胞内に閉じ込められた状態もしくは細胞膜の外側に付着した状態で観察された。核膜, 細胞膜は膜構造が乱れ不鮮明であった。ミトコンドリアには腫大が認められた。また多くの細胞では細胞質に脂肪滴に類似した円形で電子密度の高い均質無構造な構造物が現われ, それらの中には中空でドーナツ状に観察されるもの

も存在した。核内には感染後 3 日目および 7 日目ともに管状あるいは繊維状構造物は観察されなかった。

正常肝実質細胞 サケの正常肝実質細胞の電顕像を Fig. 8 に示した。卵円形の核を持ち, 粗面小胞体は扁平囊状で非常によく発達し数層から十数層にほぼ平行な配列をなし細胞質の大部分を占めていた。滑面小胞体もところどころにみられた。ミトコンドリアは暗調でかなり豊富に細胞質に散在し, 内部に短い管状を呈したクリ



Figs. 11-12. Electron micrograph of hepatocyte of chum salmon infected with OMV.

Fig. 11. High magnification of nucleus showing margination of chromatin, —: 1 μ m.

Fig. 12. High magnification of nucleus showing aggregation of chromatin, —: 1 μ m.

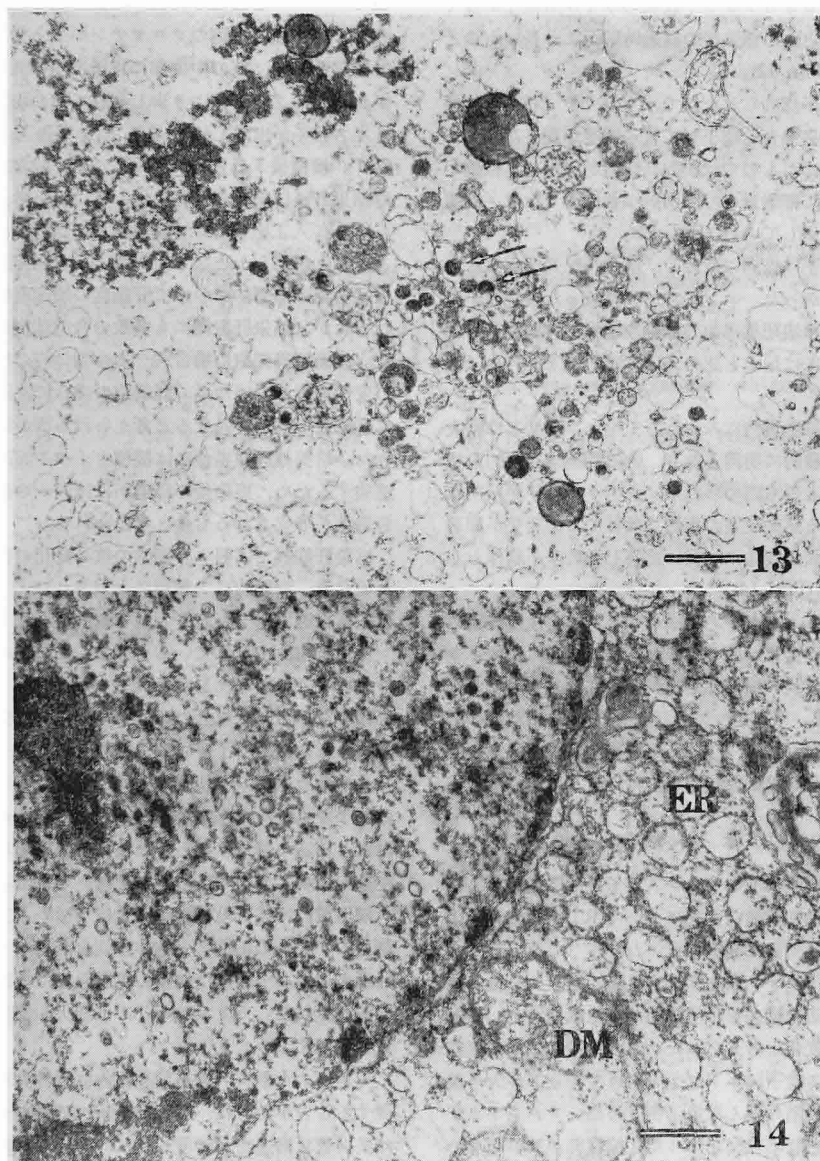
Arrows: Virus particles.

ステをもっていた。グリコーゲン顆粒はウランによるブロック染色のためか認められなかった。

OMV 感染肝細胞 OMV 感染サケの肝臓組織の低倍像を Fig. 9 に示した。明瞭な合胞体を伴う様々な変性段階の細胞が観察され、同一合胞体の中でも感染初期の状態と考えられる核からすでに変性崩壊している核まで

種々の状態のものが観察された。個々の核の形態変化の程度が異なり、これらを大別すると大型で明るい真円形の核 (Fig. 10)、クロマチンが部分的に凝集を示している核 (Fig. 11) および核濃縮が明らかに認められる核 (Fig. 12) の3種類に類別された。

大型で真円形を呈した核ではクロマチンが辺縁趨向を



Figs. 13-14. Electron micrograph of hepatocyte of chum salmon infected with OMV.

Fig. 13. Swelling of mitochondria and endoplasmic reticulum, —: 500 nm.

Fig. 14. Enveloped virus particles were observed in the focus of the hepatocyte nucleus, —: 1 μ m.

DM: Degenerated mitochondria, ER: Endoplasmic reticulum, Arrow: Enveloped virus particle.

示し核質内は明るく観察された。このような核内には一般にウイルス粒子は少なく、しかも電子密度の高いヌクレオカプシッド状態の粒子は殆んど認められず、感染初期の核と考えられる (Fig. 10)。

クロマチンが部分的に凝集している核には大型で明るい真円形の核よりウイルス粒子が多数認められ、電子密度の高いヌクレオカプシッド状態のウイルス粒子が多く認められることから感染後の経過時間がより長いものと考えられる (Fig. 12)。

一方核濃縮が認められた核ではクロマチンの部分的凝集が互いに近接集合し縮小して電子密度が高くなっており、変性の進んだものでは核内に空胞が出現し、核膜が不明瞭になって細胞質との区別がつきにくくなり、崩壊寸前の様相を呈していた (Fig. 12)。

ウイルス粒子は核内に散在し、結晶状配列をとるものは観察されなかった。エンベロープを被った成熟粒子は細胞間隙または壊死巣に他の細胞崩壊物と共に観察されたが細胞質内には殆んど認められなかった (Fig. 13, 14)。

感染細胞の細胞質内にみられるミトコンドリアは腫大し、同時に全般的に明調となり、時に外膜に部分的欠損を生じているものも認められた。ウイルス粒子が核内に多数認められる感染後期の細胞では特にこの変化が顕著であった。粗面小胞体は一般に拡張し多数の小胞体として観察された (Fig. 14)。

小胞体もミトコンドリア同様ウイルス感染後の経過時間の長いもの程変化が激しかった。また小胞体には小空胞化の他に渦紋状の指紋体変性が観察されるものも存在した (Fig. 12)。グリコーゲン野は消失し、脂肪滴の出現が観察された (Fig. 9, 12)。培養細胞同様感染細胞核内には管状あるいは繊維状構造物は出現しなかった。

考 察

OMV 感染細胞内でのウイルス粒子の形成過程および感染細胞の超微細構造の変化について RTG-2 細胞およびサケ肝細胞を対象に観察を行った。

OMV 感染 RTG-2 細胞ではウイルス感染 3 日後、核クロマチンの辺縁趨向を示す細胞が多数観察され、これが感染初期の変化と考えられた。この時期の核内に観察されるウイルス粒子はエンベロープカプシッドが大多数を占め、発達段階の進んだ電子密度の高いヌクレオカプシッドは殆んど認められなかった。核輪郭が不整なものや整ったものが認められ、輪郭の整った核内には不整なものより多数のウイルス粒子が観察され、感染後の経過がより長いものと考えられる。

OMV 感染 7 日後の RTG-2 細胞では成熟ウイルス粒子が多数観察され、それらは細胞膜の外縁に付着してい

るか細胞質空胞内に閉じ込められた状態で観察された。ヘルペスウイルスにおけるエンベロープは内側核膜由来の場合と細胞質内の膜構造を利用する場合の 2 通りが知られているが、⁸⁾ OMV のエンベロープの由来については今回明らかにし得なかった。Nie *et al.*⁹⁾、および新居¹⁰⁾は Herpes simplex virus (HSV) について高感染価のウイルスを接種した後、培養細胞を経時的に電顕観察し、先ず宿主細胞のクロマチンが主として核膜に向けて凝集を始め、核の中央部に電子密度の低い均質な領域が出現し、この変化より少し遅れてこの均質な領域にウイルス粒子が出現し始めることを報告しているが、OMV 接種後 3 日目の RTG-2 細胞はこの HSV の観察結果とほぼ同一の変化を呈していると考えられる。

OMV 人工感染サケでは腎臓および肝臓が標的臓器であることが明らかとなっており、⁹⁾ 今回肉眼的に肝臓に症状を認めた個体について肝細胞の超微細構造の観察を行ったが、感染肝組織にも多数の合胞体形成が観察された。感染培養細胞の場合同一の合胞体内の核はほぼ同様の変性を示していたが、肝細胞の場合には同一合胞体内に感染後の経過が異なると考えられる核が同時に観察された。培養細胞の場合には接種ウイルスが同時に細胞に感染するため、感染後の経過がほぼ同一の細胞によって合胞体が形成されるものと考えられる。

感染肝細胞では個々の細胞の核の変化の程度がそれぞれ異なり、形態的に 3 種類に大別された。先ず第一の群は正常細胞より核が若干大型で真円形を呈し、クロマチンが辺縁趨向を示しているもので、この種の核ではウイルス粒子は少なく、しかもヌクレオカプシッド状態のものは少なかった。第二の群はクロマチンに部分的凝集が認められる核でウイルス粒子の数も多く電子密度の高いヌクレオカプシッド状態のものが多数観察され、前者の細胞よりウイルス感染後の経過時間が長いものと考えられた。第三の群では明らかな核濃縮が認められ、すでに空胞も出現し崩壊寸前のものと考えられた。

細胞質内は感染培養細胞および OMV 人工感染サケ肝細胞のいずれの細胞も小胞体の変化が著しく、感染後の経過とともに小胞体は拡張し電顕像では多数の小胞として観察された。ミトコンドリアは腫大し部分的に欠損を生じていた。

ヘルペスウイルス感染細胞核内には特異な構造物が出現することが知られ、*H. cuniculi* 感染ウサギ腎細胞では長い管状構造物が出現し、¹¹⁾ 2 型単純性疱疹ウイルス感染 FL 細胞ではミクロチューブが、¹²⁾ CCV 感染 BB 細胞および *H. salmonis* 感染細胞ではラメラまたは繊維状構造物が出現する^{13,14)} ことが報告されているが、OMV 感染 RTG-2 細胞およびサケ肝細胞にはそのような構造物は観察されなかった。

以上のように OMV 感染細胞の電顕観察の結果, OMV はヘルペスウイルス群ウイルスの形態的特徴を示し, 感染細胞は合胞体形成を特徴とし, その核は感染経過につれてクロマチンの辺縁趨向, 部分的凝集, そして最終的には核濃縮, 空胞の出現といった変化をたどりその細胞質内ではミトコンドリアの腫大および小胞体の拡張が認められることが明らかとなった。

要 約

OMV 感染 RTG-2 細胞およびサケ肝細胞について電顕観察を行い, 培養細胞, 肝細胞ともに以下のような共通の結果を得た。

1. 感染細胞では核の変化が著しく, 感染経過の進行につれ, 最初クロマチンが辺縁趨向性を示し, 核は真円大型に観察された。続いてクロマチンが部分的凝集を始め, それとともに核濃縮がおこり, 最終的には空胞が出現し核は崩壊していった。
2. 感染細胞の細胞質内ではミトコンドリアが腫大し, 小胞体は拡張し電顕像では円形に観察された。
3. ウイルス粒子は核内ではカップシッドの状態, 核外ではエンベロープを被った状態で観察された。

謝 辞

本研究は昭和 58 年度文部省科学研究費補助金, 課題番号5840001 および日本学術振興会の日米科学協力共同研究, 魚病の検査, 予防・制御によって行われた。ここ

に記して謝意を表する。

文 献

- 1) T. Kimura, M. Yoshimizu, and M. Tanaka: *Fish Pathology*, **15**, 143-147 (1981).
- 2) 木村喬久, 吉水 守, 田中 真: 魚病研究, **17**, 251-258 (1983).
- 3) M. Tanaka, M. Yoshimizu, and T. Kimura: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 431-437 (1984).
- 4) K. Wolf and M. C. Quimby: *Science*, **135**, 1065-1066 (1962).
- 5) 村田長芳, 永田哲士: 組織培養 **2**, 70-84 (1976).
- 6) 海保正義, 佐藤温重: 組織培養, **4**, 400-402 (1978).
- 7) M. J. Karnovsky: *J. Cell Biol.*, **27**, 137-138 (1965).
- 8) 新居志郎: 最新医学, **28**, 1232-1238 (1973).
- 9) S. Nie, C. Morgan, and H. M. Rose: *J. Virol.*, **2**, 517-536 (1968).
- 10) 新居志郎: ウイルス学の進展 (京大ウイルス研), **15**, 149-158 (1975).
- 11) S. Nie and I. Yasuda: *Biken J.*, **8**, 145-148 (1975).
- 12) E. F. Couch and A. J. Nahmias: *J. Virol.*, **3**, 228-232 (1969).
- 13) K. Wolf and R. W. Darlington: *J. Virol.*, **8**, 525-533 (1971).
- 14) K. Wolf, R. W. Darlington, W. G. Taylor, M. C. Quimby, and Y. Nagabayashi: *J. Virol.*, **27**, 657-666 (1978).