

血清肝炎患者血清中のオーストラリア抗原の 電子顕微鏡学的研究

阿 多 実 茂

Electron Microscopical Observations on the Australia Antigen in Serum of Patients with Serum Hepatitis

by

Saneshige ATA

は し が き

ウイルス性肝炎の概念が確立されて久しいが、その病原体については1945年エンダースの組織培養法の発見以来、ウイルス学の立場から多大の努力が費やされたにもかかわらずいまだその曙光すら得ていない。

人類遺伝学と免疫学の興味から独自の研究をすすめていた Blumberg¹⁾ は頻回輸血をうけた血友病患者血清とオーストラリア原住民の血清とをウクタロニー法 (Ouchterlony法) による寒天ゲル内沈降反応にて反応させた結果、従来証明されたことのない新しい抗原をみつけ、オーストラリア抗原 (Au 抗原) として発表した。本抗原と白血病、肝炎等の諸疾患との関連性が免疫学的に検討されているうちに特に血清肝炎と密接な関係にあることが認められるようになった。^{1) 3) 9)}

Au 抗原をもつ血液の輸血により血清肝炎がおこるが、この場合先づ最初に Au 抗原が出現し、次に GPT 値上昇がありつづいて黄疸が認められ、その後抗体産生が証された。¹⁾ これは明らかにウイルス感染症の経過である。Au 抗原粒子即肝炎ウイルス粒子という考え方は必然的におこってくる。私共はこの Au 抗原を電子顕微鏡学的に検討し、いわゆる Au 抗原はウイルスらしくない小型球形粒子、管状形粒子などのほかに、ウイルスらしい直径400Å~440Å、六角形、被膜粒子等からなる多形態性の粒子群であることを明らかにし、更に感染性粒子を中心に統一的にこの複雑性を解明しようとしているので御報告し御批判を仰ぎたい。

実験材料及び方法

ウクタロニー法、電気泳動法 (Electrosyneresis) 及び一元免疫拡散法 (Single radial immunodiffusion) で検出した Au 抗原陽性の血清肝炎患者血清を使用した。テストには補体結合反応 (C.F. 法) もつかった。この Au 抗原血清を塩化セシウム (CsCl) 密度こう配遠心法で精製し、燐タングステン酸 (phosphotungstic acid) ネガティブ染色法により電子顕微鏡学的検討を行った。詳細については別報^{1) 2) 3)} を参照されたい。

成 績

CsCl を使用した平衡密度こう配遠心のパターンで Au 抗原の浮游密度は1.23の値を得たが、

このところはかなりヘテロジナースな分布で、Au 抗原の存在が補体結合反応で証明される。これを電顕でのぞくと大部分は直径 $200\text{\AA}\sim 240\text{\AA}$ の球形粒子であるが、(図1) そのほかと同じ径でありながらソーセージ様に伸びた管状粒子、連鎖粒子、双粒子等も散見される。(図2)

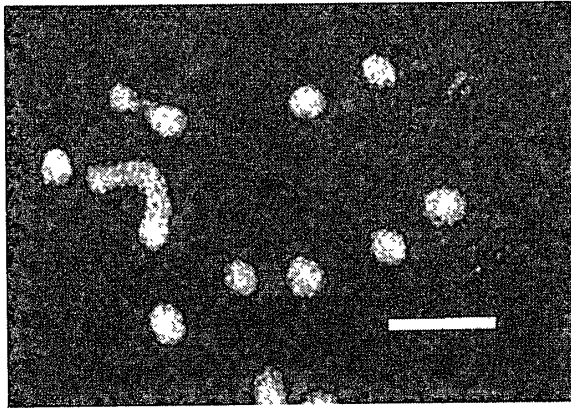


図1 小球形粒子
 $200\text{\AA}\sim 240\text{\AA}$

白線 500\AA

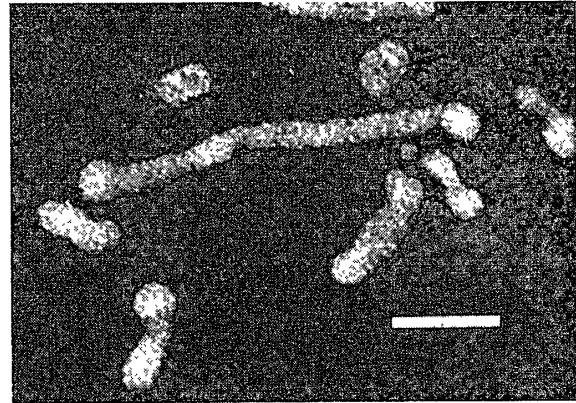


図2 管状粒子, 連鎖粒子
双粒子

白線 500\AA

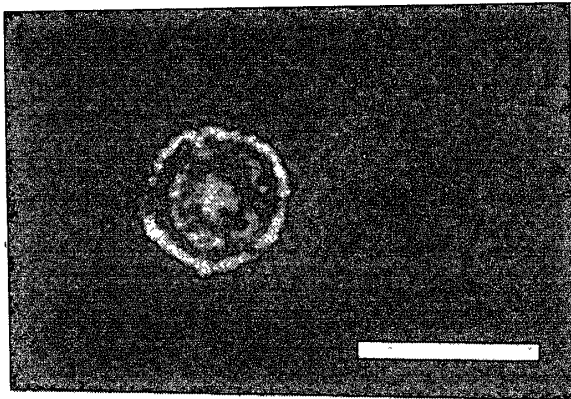


図3 ウイルス様粒子
芯, 六角形カプシッド
とりまくエンベロップ
表面にスパイク

白線 500\AA



図4 大型粒子
芯, カプシッド, それに突出
伸長したエンベロップ

白線 500\AA

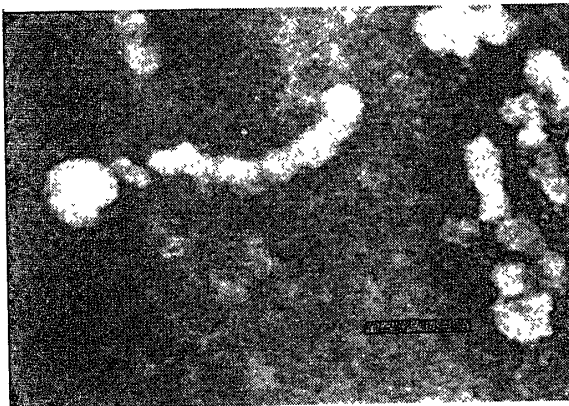


図5 大型粒子
エンベロップの連鎖粒
子状に伸長したもの

黒線 500\AA

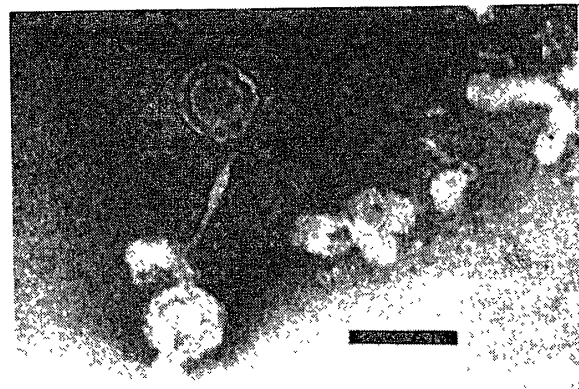


図6 芯をもつウイルス様粒子
エンベロップがはがれ
ヌクレオ. カプシッドが露出

黒線 500\AA

これらに混在して $400\text{\AA}\sim 440\text{\AA}$ 大型六角形二重壁粒子，カプシッド (Capsid) 構造物 (正二十面体) の中心部に電子密度の高い芯 (Core) の存在する粒子が観察される。(図3) 中心部に 120\AA の芯，これをおさめている直径 280\AA ，六角形のカプシッド構造物，更にこれをエンベロップ (Envelope) がおおっている。その表面には多数のスパイク (Spike) が認められる。動物ウイルスには被膜ウイルスとエンベロップのないヌクレオ・カプシッドだけのウイルスとがある。この大型粒子は芯，カプシッド及びエンベロップの3主要構造を有する被膜ウイルス例えばヘルペス・ウイルスと全く同じ形態でこれこそ感染性ウイルス粒子といえよう。芯をおさめたカプシッド構造物を取りまくエンベロップには奇形を示すものもある。2, 3個所膨大化したもの， 200\AA 巾で伸長したもの，(図4) しかも $200\text{\AA}\sim 240\text{\AA}$ 球状にくびれゆく様を示すもの，(図5) 既にこれからはなれたかと思われる小粒子のかたまりなどが特徴的に観察される。又エンベロップがはがれ，カプシッド構造物が遊離，露出した像も認められる。(図6) 尚各粒子には何れも 30\AA の Subunit の球形粒子が表在性にみられる。

このような多様な粒子は感染によりできるが，それぞれに自己増殖能をもつわけではない。核酸をもつ芯のある大型粒子の複製過程中に全てつくられるのであろう。

電顕下に抗 Au 抗原抗体 (Anti-Au) を働かせると各粒子はほぼ同様に凝集する。小型球状粒子，管状粒子及び連鎖粒子等の表面の抗原性は大型粒子のエンベロップのそれと同一である。とするとエンベロップの生成時に全粒子がつくられるように思われる。大型粒子エンベロップの奇形から小型粒子形成を想像させる電顕像からもこのような推論は可能である。

感染性大型粒子は肝細胞に吸着，エンベロップをぬいで細胞内に侵入，エクリップス期を経て，おそらく核内で核酸とカプシッドが別々に複製される。ついで核酸をおさめたカプシッドは核膜を通るがそのときエンベロップをつくり被膜して細胞質を通り細胞外にでると思われる。このような過程で，ヌクレオ・カプシッドが内側核膜とふれあいをもちエンベロップをつくるとき他の被膜ウイルスでみられるようにその異常増生を招来し，多くの核酸のない粒子を産生させたものと考えられる。尚現在 Au 抗原とよんでいるのは，上記の複雑な粒子群をさしている。

考 察

Au 抗原陽性血清中に私共や，^{6) 7)} Daneら⁵⁾ が完全ウイルス様大型六角形粒子をみつける迄は Au 抗原性の担い手は 200\AA の球状粒子であるとし，その伸長形の存在と共に多数の報告がなされた。核酸のない小球状粒子であることから，感染性を担うウイルス様粒子も未だみつかっておらず更に発症した動物の血清中に感染性に影響を及ぼすような因子もみつかっていない slow virus (s. v.) と同じカテゴリーでこれを理解しようとするころみもおこなわれた。従来のウイルスの概念からはみだすこの考え方にはにわかに賛成しがたいものがあった。

大型六角形ウイルス様粒子には核酸の存在を示唆する芯のないものがあるが，図3に示すようにネガティブ染色法で中心に芯をもつものを確認した。これでウイルスの従来の概念で血清肝炎をみる立場が明確になった。Jokelainen ら⁶⁾ は酢酸ウラニル染色法で直接に芯の核酸を証明し，Jozwiak ら⁷⁾ は Au 抗原中に5%のRNAを含むという興味ある報告をおこなった。芯をもつ大型粒子は感染粒子，ウイルスたりうるが，それ以外の諸粒子は非感染性粒子として一括していいであろう。形態学的には被膜ウイルスの姿である。エンベロップをまとい，これにはスパイクがみられる。

肝細胞に吸着するのにスパイクが役立ち、エンベロップに存在する酵素賦活作用及び肝細胞膜の酵素的な特異性により吸着後、エンベロップがとれ、裸のヌクレオ・カプシッドは細胞内に侵入、エクリップス期を経る。細胞核内で核酸とカプシッドは別々に複製される。核酸がカプシッドにおさまる。ついで核膜にふれる。核酸の情報により内側核膜からつくったプロテインと細胞由来のリピッドからなるエンベロップをかぶり成熟粒子となる。成熟粒子を包む外側核膜は空胞として細胞質中に遊離していったり、小胞体と通じており最後には、これら空胞や小胞体が細胞膜と接続して成熟粒子を細胞外に放出するものと考えられる。この過程で特徴的なのは、核内で複製されたヌクレオ・カプシッドと内側核膜との直接的 interaction でエンベロップ成分が異常に、色々な形で増生される現象であろう。この結果が大型粒子エンベロップの奇形であり、管状、連鎖状粒子及び 200\AA の小粒子の出現であろう。ヘルペスウイルスの発芽過程にみられるものと同一現象として理解しうる。

肝細胞内で Au 抗原はどこに存在するかと蛍光抗体法で検索した志方ら¹⁰⁾ は血清肝炎患者及びキャリアーの肝 Au 抗原は、肝細胞の細胞質内に存在し、核膜に接した部分にも認められるという。上述のエンベロップ形成の考え方をうらづけする成績のように思われる。

Au 抗原に関しては現在、特定疾患との関連性、因果関係、起因疾患の制圧などの面から強力に研究が進められている。そして得られた成果は一段とウイルス学的研究を期待し、推進する。形態、構造、核酸の問題、組織及び器官培養、実験的な感染系の確立など現在多方面の研究がおこなわれているが、困難な段階にあしぶみしている感が深い。これを解く鍵は核酸をもつ大型粒子を如何に純粋に大量あつめうるかということであろう。これが解決できれば肝炎ウイルスの分離も、細胞内感染機構、ウイルス学的性格等も明らかになるであろうし、ワクチンの作製、血清肝炎予防も可能となるろう。

ま と め

- 1) Au 抗原をもつ血液を輸血しておこる血清肝炎の発症はウイルス感染症の経過を示す。
- 2) 血清肝炎患者血清中の Au 抗原は、電顕形態学的には径 200\AA の球形粒子、同径の双球形、連鎖あるいは管状形粒子、 $400\text{\AA}\sim 440\text{\AA}$ 六角形粒子及びエンベロップ奇形を示す大型粒子等が認められる。
- 3) 核酸の存在を示す芯をもつ大型六角形粒子は肝炎ウイルスと考えられる。
- 4) 他の粒子はヌクレオ・カプシッドと肝細胞の核膜とのインターアクションでできるエンベロップの極めて異常な増生結果と思われる。
- 5) 今後の研究進展の重大な鍵は大型六角形粒子を精製、純化することであろう。

参 考 文 献

- 1) 阿多実茂ほか, 1971. オーストラリア抗原の本態に関する研究, 診断と治療 59: 135
- 2) 阿多実茂ほか, 1971. オーストラリア抗原の本態について, 日本医事新報 2460: 43
- 3) 阿多実茂ほか, 1972. オーストラリア抗原のウイルス様粒子, 医学のあゆみ 82: 758
- 4) Blumberg, B.S. et al, 1965. A "new" antigen in leukemia sera, J. A. M. A. 191:541
- 5) Dane, D.S. et al, 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen associated hepatitis, Lancet 1:695
- 6) Jokelainen, P.T. et al, 1970. Electron microscopic observations on virus-like particles

associated with SH antigen, J. Virol. 6:685

- 7) Jozwiak, W. et al, 1971. RNA in Australia-antigen, Nature New Biol. 229:92
- 8) Okochi, K. & Murakami, S., 1968. Observations on Australia antigen in Japanese, Vox Sang. 15:374
- 9) Prince, A.M., 1968. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis, Proc. Natl. Acad. Sci. 60:814
- 10) 志方俊夫ほか, 1971. オーストラリア抗原の組織内分布とその形態(1) 蛍光抗体法による検索, 医学のあゆみ 79:19