

岡山医学会雑誌

第 78 卷 6 号 (第 859 号)

昭和 41 年 6 月 30 日 発行

576. 858 : 616—006 : 621. 385. 833

腫瘍ウイルスの電顕的研究

第 2 編

C₃H 系マウスに自然発生した乳癌のウイルス

粒子に関する電子顕微鏡的研究

岡山大学医学部平木内科 (指導: 平木潔教授)

池 田 一 彦

〔昭和 41 年 6 月 2 日受稿〕

緒 言

C₃H 系マウスに自然発生する乳癌がウイルスに起因する可能性は 1936 年 Bittner¹⁾ の行つた乳癌嫌発系マウスによる A 系マウスの foster-nursing の実験によつて初めて示され、爾来ウイルス学的に各方面より研究され、乳汁中に含まれる milk factor すなわち Bittner agent によつて乳癌が惹起されることが確認された。

一方この粒子の形態を電顕的にとらえようとする試みも同じ頃より行われ、1948 年 Porter²⁾ は C₃H 乳癌に由来する組織培養細胞を電顕的に観察してウイルス粒子であると思われる直径 130 mμ の小体を認めた。

次いで Bernhard ら³⁾、Dmochowski ら⁴⁾、Moore ら⁵⁾、本邦では鈴木⁶⁾、松井⁷⁾、今井⁸⁾、らにより超薄切片法による電顕観察により詳細な研究が行われウイルス粒子の形態、形成様式等がほぼ明瞭にされるに至つた。

しかしながら今日なおウイルス粒子の形態、形成様式等の詳細に関しては意見の一致を見ない点があり、これらを明かにする目的で C₃H 乳癌の電顕的観

察を試みた。

実験材料ならびに実験方法

本実験に使用した C₃H 系マウスは Baylor 大学, Texas, より分与されたものを本学マウスコロニーで兄妹交配より得た子孫である。

生後約 12 ヶ月の C₃H 系マウス (♀) に自然発生した乳癌を組織学的に確認した後材料として用いた。

電顕的観察にはマウスを屠殺後出来るだけ速かに乳癌組織を切り出し、約 1 mm³ 角に細切して 1% オスミウム酸ペロナール緩衝液に 4°C で 1 時間固定後、50%, 80%, 90%, 95%, 100% アルコール溶液で漸次脱水し、butyl methacrylate, methyl methacrylate 4 : 1 の混合液に移し、37°C で 24 時間重合を行つた。包埋を完成した材料はライツ製ウルトラミクロトームで超薄切片とし、uranyl acetate 飽和溶液⁹⁾で約 1 時間電子染色した後日立 HU11 型電子顕微鏡で観察した。negative staining によるウイルス粒子の観察は Parsons の方法¹⁰⁾ に従つて腫瘍組織を針で突き、尖端に附着した少量の組織液を 2% 燐タングステン酸溶液にひたし、液の表面に浮いた微細な組織片をメッシュに載せて電顕的に観察した。

実 験 成 績

1) 乳癌組織

写真1に示す様に乳癌組織は乳癌細胞と処々に見られる乳腺腺腔とより成り、支持組織は稀である。乳癌細胞は円形又は楕円形の細胞で、胞体に比べて核が大きく明瞭な核小体を認めることが出来る。核小体には時に写真2に示すように直径約 $100\text{m}\mu$ 程度の電子密度の比較的高い異常の小顆粒を認めることがある。核はほぼ均一の微細顆粒より成るが、散在性に不定形の核質の小集塊を認めることが出来る。胞体も比較的単調で少数の糸粒体、空胞、粗面及び滑面小胞を認める。RNA 顆粒はあまり豊富ではない。細胞間には時に desmosome を認めることが出来る(写真3)。腺腔に面する癌細胞の表面には多数の microvilli が観察される(写真3)。

2) 乳癌ウイルス

a. 成熟ウイルス粒子

乳癌組織内に認められるウイルス粒子には2種あり、一つは細胞外に見られる成熟ウイルス粒子であり、今一つは細胞内に観察される未熟ウイルス粒子と考えられる粒子である(写真3)。成熟ウイルス粒子は主に腺腔内に存在し、時に細胞間隙、細胞質内の空胞内に認められることがあるが、細胞質基質内、核内等には観察されることはない。成熟ウイルス粒子は腺腔内に多いが、これも場所により数が異なり、最も多数観察される場所では腺腔は殆んど無数のウイルス粒子によつて満たされている(写真1, 4)。又腺腔には微細顆粒状又は線維状の物質が少量に存在するものもある。成熟ウイルス粒子が少数存在する例は写真3に示す。

成熟ウイルス粒子は超薄切片上円形又は楕円形で直径 $100\sim 120\text{m}\mu$ 、中心部に直径 $40\text{m}\mu$ 電子密度の高い円形、無構造の核様体が存在し、その周囲には3重の膜構造を認めることが出来る(写真5, 6)。通常外より数えて第1, 第2の膜構造は等間隙で相接しており、第3膜は核様体を一定の間隙で取巻き、第2膜と第3膜の間は比較的空間に富み、殆んど無構造に見える。第1膜は詳細に観察すると写真6の矢印の部の様に微細な棘状突起の配列とより成る様に見える。この様なウイルス粒子は Bernhard¹¹⁾ 及び平木¹²⁾の腫瘍ウイルスの分類によるB型粒子に属する。ウイルス粒子の中心には通常1ヶの核様体が存在するのみであるが、時に2~3ヶを観察することがあり(写真5)、これは異常形成された巨大ウ

イルス粒子である。この場合前述の第1, 第2膜はウイルス粒子の共通の外膜を形成しているが、第3膜はそれぞれの核様体を取り巻いて、核様体の数と同数存在する。ウイルス形成において第3膜と核様体が極めて密接な関係を有することを示すものである。

成熟ウイルス粒子は negative staining 像でも円形の粒子として観察され(写真7)直径 $100\sim 150\text{m}\mu$ 周囲には多数の長さ約 $100\text{\AA}$ の棘状突起が観察され、ウイルス粒子の表面はこの棘状突起の長軸方向より見た無数の点状の粒子によつて覆われている。粒子の中心部には超薄切片で見られた核様体に一致する空虚な円形構造を認めることがあり、又辺縁に膜構造に一致する構造を見ることも出来る。ウイルス粒子内部の nucleo-protein complex 又は polyoma ウイルス粒子等で認められる capsid に相当する構造は認めない。

b. 未熟ウイルス粒子

腺腔に面した細胞の胞体内にはしばしば封入体を認めることが出来る(写真3)。この封入体を詳細に観察すると多数の粒子の集団より形成されている(写真8)。個々の粒子は円形又は楕円形で直径約 $70\text{m}\mu$ 内外2重の膜構造および、微細顆粒を満した中心部より成り、内膜は外膜に比べてやや厚く、電子密度も大である(写真8)。この様な粒子は Bernhard¹¹⁾ 及び平木¹²⁾の腫瘍ウイルスの分類によるA型粒子に相当する。膜構造は閉鎖性に見えることが多いが時に一方が開いてC字型に見えることもある。この粒子は主に細胞質内に封入体として認められるが、少数は細胞内に散在性に存在し、又しばしば空胞の周囲を環状にとり巻く。核内および細胞外に見られることはない。

c. 成熟ウイルス粒子の形成過程

成熟ウイルス粒子は細胞膜の budding により形成される(写真4, 6)。すなわち細胞膜又は microvilli の一部が肥厚して、電子密度が大となり漸次細胞外に突出し粒子の形となると同時に内部に前述の未熟ウイルス粒子に相当する構造が現れる。この時中心部の電子密度は比較的低く、未だ核様体は現れない。粒子はその後更に細胞外に突出し、粒子の基部はくびれて細管構造を呈する様になるが後切断され、粒子は細胞外部に遊離される。粒子が細胞より離れると内部に核様体が急速に形成される様である。

総括ならびに考按

乳癌組織に見られる細胞は正常の細胞に比べて核優勢であり、核小体が極めて明瞭で腫瘍細胞としての特徴を具えている。細胞質内に封入体を認める以外には細胞学的にはむしろ単調な細胞であるが、核小体に顆粒状の異常構造が見られるのは興味ある所見である。ウイルス腫瘍として知られている Shope 乳頭腫¹⁴⁾においても同様の所見が観察されており、ウイルス感染と関係のある構造かもしれない。教室太田¹³⁾らはヒト緑色白血病細胞内に類似の構造物を観察し報告している。

超薄切片上著者の観察した成熟ウイルス粒子の形態は Bernhard³⁾、松井⁷⁾、今井⁸⁾らによつて報告された結果とほぼ同様であるが、最外層が棘状突起の配列であることを言及した報告はほとんどなく、多くの場合膜構造として記載されている。negative staining によると粒子の表面に極めて明瞭な棘状突起が見られることは Moore¹⁵⁾、Dmochowski¹⁶⁾ も示摘しており、又本実験に於ても示した通りである。従つて従来超薄切片法と negative staining 像との間にあつた形態上の不一致はほぼ解決されたことになる。粒子の大きさは超薄切片法に比べて、negative staining でやや大きい。これは後者では乾燥時粒子がやや扁平化するためであろう。

ウイルス粒子の表面には多数の棘状突起が認められ、Polyomaウイルス粒子等に認められる capsid¹⁷⁾ 構造とは異なる。この表面構造は、一般に表面膜(envelope)と呼ばれ、定型的な例を influenza ウィルス粒子¹⁸⁾に認められることが出来る。この構造は myxovirus 群に特徴的な構造のため乳癌ウイルスもこのウイルス群に分類されるのが妥当と思われる。

成熟乳癌ウイルス粒子の大きさについては研究者により若干の差異はあるがほぼ $100\mu\sim 120\mu$ の範囲内にあり、著者の成績に一致する。マウスに見出される白血病ウイルスはやや小さく直径 $80\sim 100\mu$ である^{19, 20)}。Bernhard¹¹⁾ 及び平木¹²⁾ の分類に従うと前者は B 型粒子に、後者は C 型粒子に属する。B 型ウイルス粒子の概念を明確にするため、先に発表した C_{3H} 自然発生白血病にみられた C 型ウイルス²⁰⁾と比較すると C 型ウイルス粒子は 2 重の膜構造が外膜として認められるのに反して B 型ウイルス粒子の外膜は 3 層の膜構造より成り、最外層は正確には棘状突起より成る。核様体は C 型粒子では電子密度が中等度で粒子の中心に存在するのに対し、

B 型粒子では電子密度は高く、扁平性である。粒子の大きさに関しては前述の通りである。negative staining によれば C 型粒子は一般に棘状突起が不明瞭であるが¹²⁾、B 型粒子では本実験成績の様に明瞭に観察することが出来る。A 型粒子の意義については研究者の間に異論がある。

成熟ウイルス粒子である B 型粒子が細胞膜又は microvilli よりの budding により形成されることは今日殆んど一致した見解であるが、ウイルス粒子の budding に際してその中心部に、著者も述べた様に A 型粒子に一致した構造が見られる。Bernhard³⁾¹¹⁾ 今井⁸⁾、松井⁷⁾らはこの構造は細胞内に封入体を形成している A 型粒子が細胞膜又は microvilli 直下に移動したものと考えているが、Lasfargues²¹⁾、Moore²²⁾、天野²³⁾らはこれに対して A 型粒子とは関係がないと主張する。

著者は平木¹²⁾が述べる様に一般に A 型粒子は腫瘍ウイルスに関係がある組織に限つて認められ、ウイルスの一般的構造に一致する構造を示すこと等より、A 型粒子は B 型粒子と密接な関係があり、A 型粒子は B 型粒子の未熟型であろうと考える。又細胞内に封入体として認められる A 型粒子は必ずしもすべて B 型ウイルス粒子に取り込まれるとは考えられず、おそらく細胞内に過剰に生産されたウイルス性蛋白が A 型粒子として封入体を形成しているものと推定する。この様にウイルス形成が起つている細胞内にウイルス性蛋白が過剰形成される現象は influenza ウィルス²⁴⁾において定型的な例がみられる。

結 語

C_{3H} 系マウスに自然発生した乳癌の電子顕微鏡による観察を行い、癌細胞の細胞学的特徴ならびにウイルス粒子の形態学的特徴について 2, 3 の新知見を得た。

乳癌細胞は核優性にして、核小体明瞭細胞質内には少数の糸粒体、空胞、粗面及び滑面小胞体を観察した。細胞によつては無数の A 型粒子より成る封入体を認めた。

成熟ウイルス粒子は腺腔内、細胞間隙、細胞質空胞内に存在し、円形で直径 $100\sim 120\mu$ 、中心部に電子密度が大である核様体が存在し、その外部には 3 層の膜構造が認められた。最外層の膜構造は詳細に観察すると多数の棘状突起より成り、negative staining による像に一致する所見を示し、従来超薄切片上と negative staining によつて得られていた

所見の間の形態上の差異を解決するのに成功した。

成熟ウィルスの形成上におけるA型粒子の意義に関しては2つの異った見解が存在していたが、著者は得られた所見を基礎にして新しい見解を提出した。

撰筆するに当たり御指導と御校閲を賜った平木

文

- 1) Bittner, J. J.: Some possible effects of nursing on mammary gland tumor incidence in mice, *Science* **84**, 162, 1936.
- 2) Porter, K. R. and Tompson, H. P.: A particulate body associated with epithelial cells cultured from mammary carcinomas of mice of a milk-factor strain. *J. Exp. Med.* **88**, 15, 1948.
- 3) Bernhard, W. and Guirin, M.: Presence de particules d'aspect viral, dans les tissus tumoraux de souris atteintes des Leucémie spontanée. *Compt. rend. acad. sci.* **247**, 1802, 1958.
- 4) Dmochowski, L.: Viruses and tumors in the light of electron microscope studies: a review. *Cancer Res.* **20**, 977, 1960.
- 5) Lasfargues, E. Y., Moore, D. H. and Murray, M. R.: Maintenance of the milk factor in cultures of mouse mammary epithelium. *Cancer Res* **18**, 1281, 1959.
- 6) Suzuki, T.: Electron microscopic cyto-histopathology. (III) Electron microscopic studies on spontaneous mammary carcinoma of mice. *Gann* **48**, 39, 1957.
- 7) 松井敬介, 森脇昭介: マウス乳癌ウイルスの電子顕微鏡的研究—特にウイルスの形態発生, 増殖及び成熟について—米子医学雑誌. **13**, 25—51, 1962.
- 8) 今井 環: ウィルス腫瘍の宿主ウィルス関係, 癌の臨床, **8**, 231, 1962.
- 9) Watson, M. L.: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 475, 1958.
- 10) Parsons, D. F.: Structure of the Gross leukemia virus. *J. Nat. Cancer Inst.* **30**, 569, 1963.
- 11) Bernhard, W.: The detection and study of

癌教授, 大藤真助教授および太田善介講師に深甚の講意を表します。また電子顕微鏡撮影の技術的援助を与えられました本学林信男氏に感謝致します。

本研究は日本臨床病理学会中国四国第9回地方会において発表した。

献

- tumor viruses with the electron microscope. *Cancer Research* **20**, 712, 1960.
- 12) 平木 深他13名: 腫瘍ウイルスの形態と分類. 岡山医学会雑誌印刷中.
- 13) Ota, Z. Suzuki, S. and Higashi, S.: Virus-like particles in human chloroleukemia cells. *Gann* **54**, 481—486. 1963.
- 14) Stone, R. S., Shope, R. Z. and Moor, D. H.: Electron microscope study of development of the papilloma virus in the skin of the rabbit. *J. Exp. Med.* **110**: 543, 1959.
- 15) Moor, D. H.: On the identification and characterization of the milk agent. Ciba Foundation Symposium of murine origin. Little, Brown and Co, Boston. pp107, 1962.
- 16) Dmochowski, L., Grey, C. E., Padgett, F. and Sykes, J. A.: Studies on the structure of the mammary tumor-inducing virus (Bittner) and of leukemia virus (Gross). *Virus, Nucleic Acids and Cancer*. Wilkins Co. Baltimore pp85. 1963.
- 17) Wildy, P., Stoker, M. G. P., Macpherson, I. A. and Horne, R. W.: The fine structure of polyoma virus. *Virology* **11**, 444, 1960.
- 18) Horne, W. E., Waterson, A. P., Wildy, P. and Farnham, A. E.: The structure and composition of the Myxoviruses. I. electron microscope studies of the structure of Myxovirus particles by negative staining techniques. *Virology*. **11**: 79, 1960.
- 19) Dalton, A. J., Law, L. W., Moloney, J. B. and Manaker, R. A.: An electron microscopic study of a series of murine lymphoid neoplasms. *J. Nat. Cancer Inst* **27**, 747, 1961.
- 20) 池田一彦: 腫瘍ウイルスの電顕的研究 I. C68系マウスに自然発生した淋巴性白血病のウイルス粒子に関する電子顕微鏡的研究. 日血会誌, **28**,

- 185, 1965.
- 21) Laefargues, E. Y., Moor, D. H., Murray, M. R., Haagenzen, C. D. and Pollard, E. C.: Production of milk agent in cultures of mouse mammary carcinoma. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5, 93, 1959.
- 22) Moor, D. H.: The milk agent in tumor induced by Viruses: Ultrastructural studies. Academic Press. New York & London, pp 113, 1962.
- 23) Amano, S.: Ultracytological host-virus relationships in leukemia and tumors of viral origin. *日血会誌*. 23, 651, 1960.
- 24) Ada, G. L. and Perry, B. T.: Infectivity and nucleic acid content of influenza virus. *Nature* 175, 209, 1955.

写 真 説 明

1. 乳癌組織，癌細胞は核小体明瞭で，核優性である．腺腔内に無数のウイルス粒子(B)および細胞内に封入体(A)を認める．
2. 癌細胞の一部を示す．核小体内に異常の顆粒状構造（矢印）を見る．倍率×44,000
3. 乳癌細胞内には多数のA型粒子より成る封入体(A)を認め，腺腔内にはB型ウイルス粒子(B)をみる．Microvilli(M)の先端には budding 中のウイルス粒子が多数みられる．D: desmosome 倍率×12,500
4. 腺腔内にみられる多数のB型ウイルス粒子(B)矢印はウイルス粒子の budding を示す．左の細胞内に封入体を認める．倍率×44,000
5. 成熟ウイルス粒子（B型粒子）3層の膜構造及び中心部の核様体が明瞭である．中心には核様体を3ヶ有するウイルス粒子が認められる．倍率×150,000
6. B型ウイルス粒子及びその budding ウイルス粒子の表面には棘状突起が見られ（矢印），budding 中のウイルス粒子の内部にはA型粒子に一致した構造が見られる(A)．倍率×200,000
7. B型ウイルス粒子の negative staining 像．表面は無数の棘状突起によりおおわれる．左の粒子では中心部に核様体に一致する構造が認められる．倍率×150,000
8. 封入体を形成するA型粒子，内外2重の膜構造より成り，内膜はやや厚い．中心部は微細顆粒が充滿する．倍率×150,000

Electron Microscopic Studies on Oncogenic Virus

II. An electron microscopic Study on the virus particles of spontaneous mammary carcinoma in the strain C3H mice.

By

Kazuhiko IKEDA

Department of Internal Medicine, (Director, Prof. K. HIRAKI)
Okayama University Medical School, Okayama

Spontaneous mammary carcinoma of C3H mice was studied by electron microscopy.

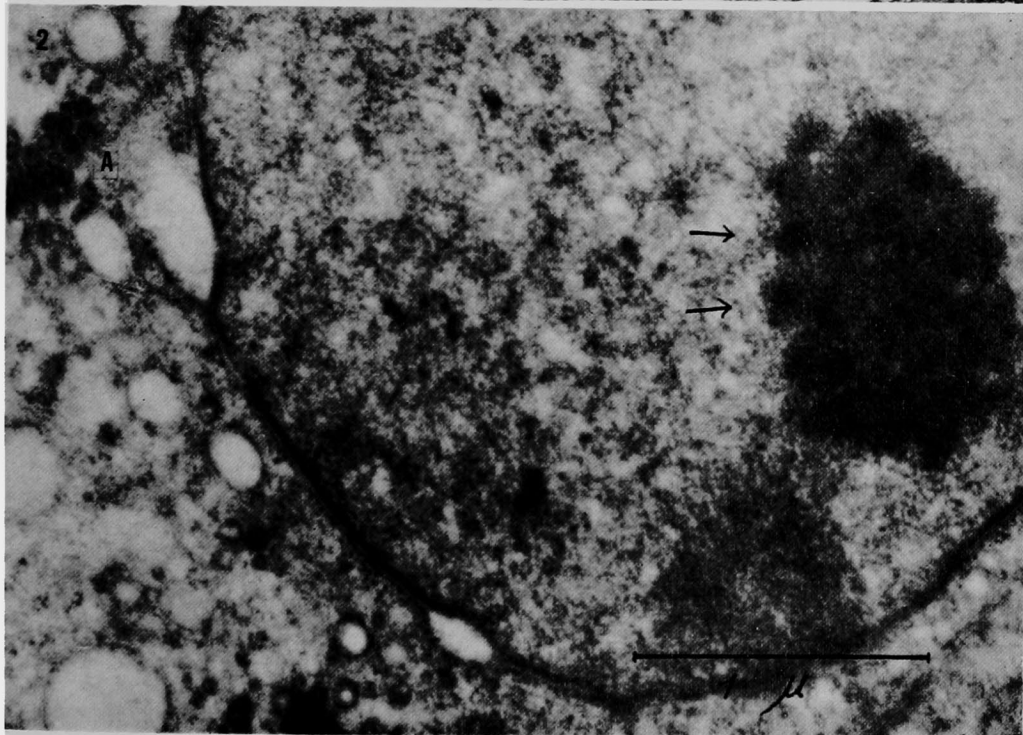
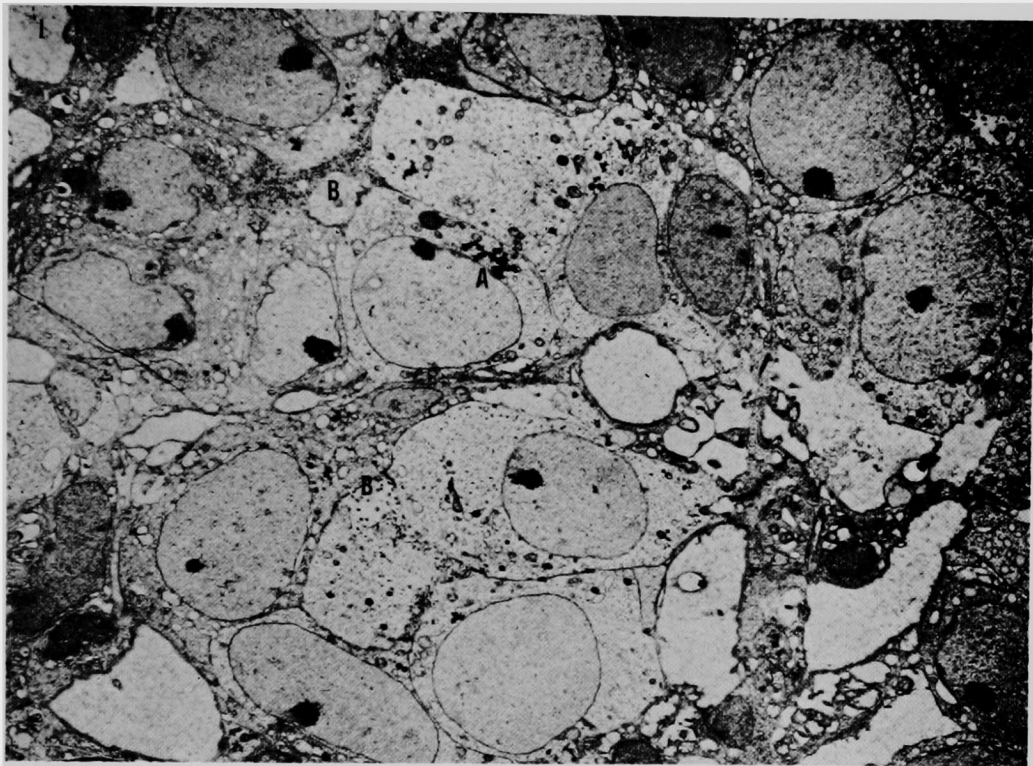
Cancer cells showed prominent nucleoli and increased nucleocytoplasmic ratio, containing a few mitochondria, vacuoles, and endoplasmic reticulum in the cytoplasm. There were inclusion bodies in some of cancer cells.

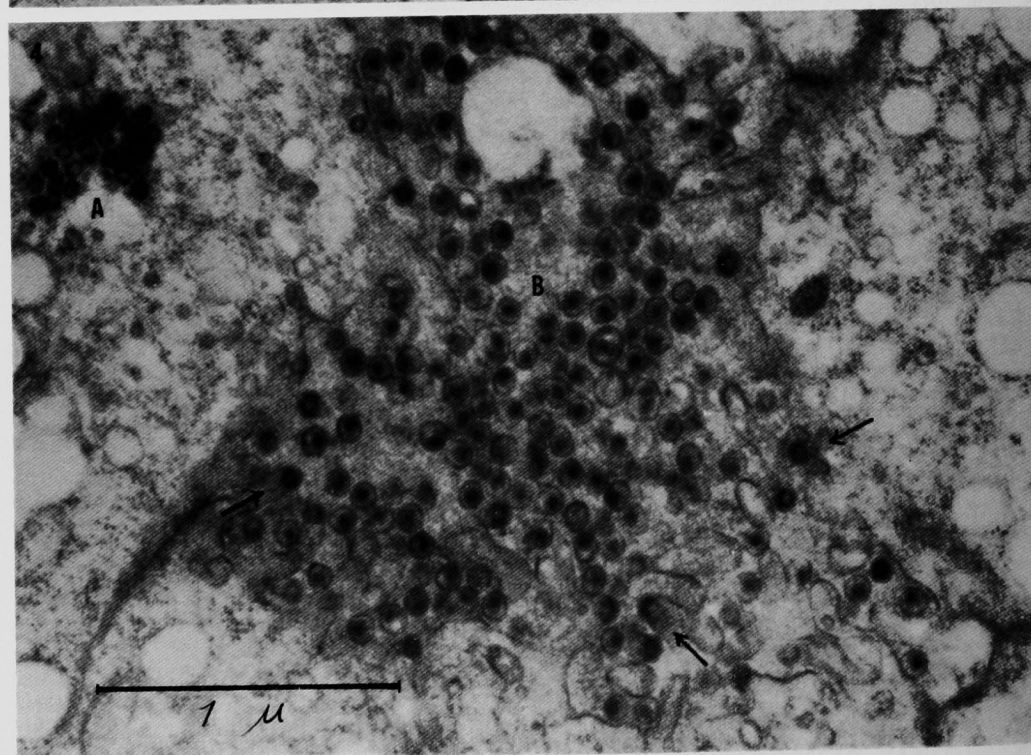
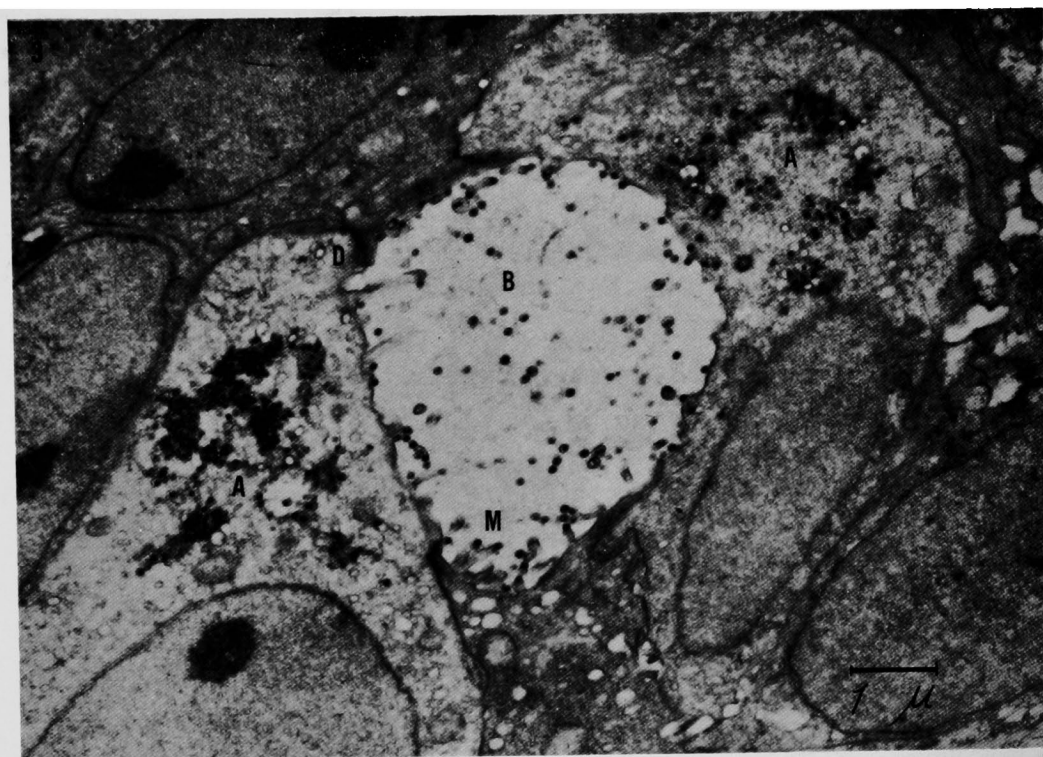
Mature virus particles were seen in the lumina of the milk ducts, intercellular space and

intracytoplasmic vacuoles. They were round in shape and composed of an eccentrically-located, electron-dense nucleoid contained in a triple-layered shell ranging 100 to 120 m μ in diameter. It was demonstrated that the outermost layer of the shell consists of numerous 100 Å spines. This finding is closely consistent with the negative contrast figure of the mature virus particles.

A new interpretation of type A particles was also presented.

池田論文附図





池田論文附図

