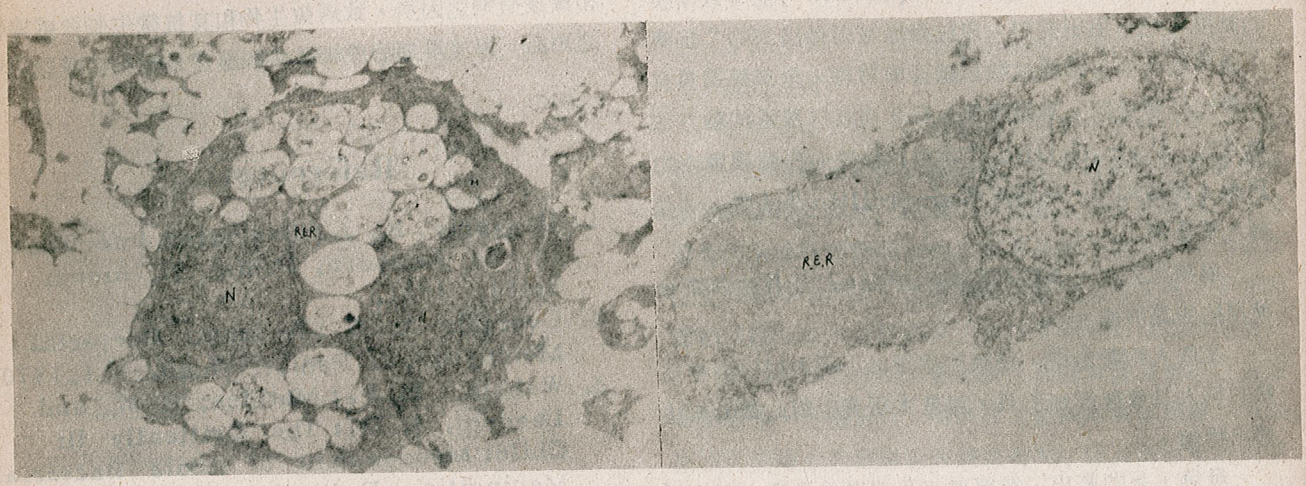


圖 1。　　圖 2.

圖 1 、2：正常 culex cells。(N) 核，R。E。R。粗面小胞體，擴大的 R。E。R。是此細胞的特徵。圖 1 ：10,200 倍。 圖 2 ：18,790 倍。

日本腦炎病毒持續感染之蚊細胞培養的形態學研究

關西醫科大學微生物研究教室

醫二屆：黃秀吉

要　點

感染日本腦炎病毒之蚊細胞，有持續感染現象已可得到證明。我們所採用之蚊細胞爲 Culex pipiens var molestus之卵巢組織的細胞株，以日本腦炎病毒 Jao Ar — 121 （大阪府立公衆衛生研究所贈與）感染之，一年間連續培養10代，病毒的量始終維持於 10^{2-3} PFU/ml 。以電子顯微鏡觀察這種持續感染細胞的結果，可以發現細胞的ER或者原生質中，有極多的病毒粒子。不論何者ER 皆增大發達，且在粗面小胞體內，有不少空胞和病毒粒子存在，這種粗面小胞體常可於被破壞的細胞中觀察到。

實驗材料及方法

(1)病毒：Jao Ar —121 株，1971年夏由 Kog-ataakaieka（蚊名）分離出來，以白老鼠腦培養，第三代之新鮮株。（大阪府立公衆衛生研究所分贈）。

(2)細胞：以Culex pipiens var molestus 羽化第三天的卵巢組織當作材料，於 1967 年 10 月行第一代培養，代培養並株化後，至今已培養至 240 代之細胞做研究。

(3)持續感染細胞：以上述之日本腦病毒感染Culex cell ，初期每 5 日換一次培養液，3 個月後，此吸管反覆吸進壓出 (pipetting)將細胞剝離，使其產生第一次子代；以後每週換一次培養液，每一個月有子代繼續產生，截至目前已有11代，利用這種細胞研究。

(4)病毒量的測定：關於細胞內及培養液中之病毒，使用 LLCMk2細胞，而以 plaque 法測定。

(5)培養液：以下列材料當作維持培養基。

①基礎培養基佔 80 %。

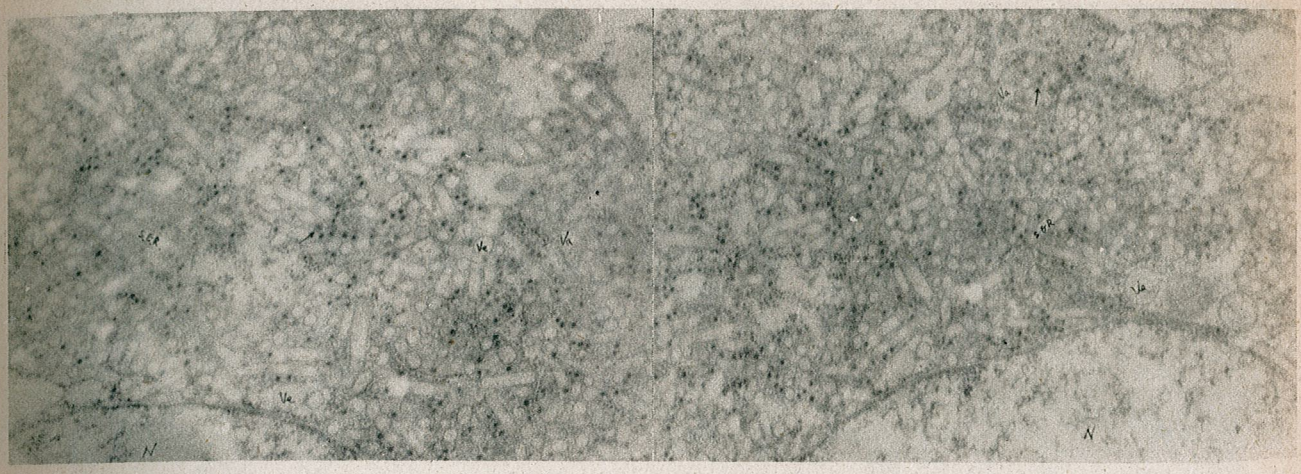


圖 3.　　圖 4.

圖 3 、4 ：細胞質內充滿了 J。E。V。 箭頭所指球狀黑點，其大小約 50$m\mu$ ～ 55$m\mu$ ，core 約 30$m\mu$ ～ 35 $m\mu$ ，充滿了Vesicle (Ve) Vaculoes(Va) S。E。R。 （滑面小胞體）。圖 3 ： 40,000 倍，圖 4 ： 30,000 倍。

NaCl: 650mg, KCl:50mg

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$:10 mg KH_2PO_4:10mg

Glucose : 200mg

Lactalbumin hydrolysate:1000mg

② 合成培養基佔 20 %。

199 培養液

③ 仔牛血清 3 %。

以上混合 2 % KOH, pH 調節爲 7.2 ，在 28°C 下培養。

(6) 電子顯微鏡試料

在 28°C 下，繼代培養的持續感染，細胞之增殖是於角型培養瓶中進行。以此爲試料取出後，先以 2.5 % Glutaradehyde 於 4°C，經 2 小時的前固定；然後以 pH ： 7.3 ， 0.1 M Cacodylate 緩衝液充分洗滌 1 小時以上；之後將細胞剝離，在室溫下，置於 2 % O_8O_4 2 小時後固定；其後用 Alcohol 系列脫水，再以 Epon-812 包中；超薄切片係採用 Porter-Blum MT II-B型切片機，以鈾(Uranium) 、鉛，行二重染色後再用日立 Hu-12 型電顯， 125 KV電壓下觀察。

結　果

Culex cells 經 J。E。V。(日本腦炎病毒) 感染後，兩者之間持續感染成立。此種感染後第一年之細胞與非感染對照細胞，在電子顯微鏡下比較檢討之。

非感染對照細胞：核大略爲圓形、橢圓形；核內的的染色質 (chromatin granules) 爲均勻分布，核小體能在細顆粒狀粒子集合的電子密度高的部分辨認出來。核由二層均勻的核膜包覆著，處處有核孔。且核膜與細胞質內 endoplasmic reticulum 連接之部分也可以看到。細胞質內 ribosome 顆粒附着其上的膜構造稱之 roughsurface endoplasmic reticulum （粗面小胞體 R。E。R ）而擴大的 R。E。R。爲 Culeox cells的特徵。又smooth surfaced endoplasmic reticulum (滑面小胞體 S。E。R。) 有時出現，Vesicle 特別發達之現象較一般細胞爲多。(Fig I)。(Fig 2)

持續感染細胞：在大多數細胞可以看到病毒粒子，但無法看出病毒之細胞，可發現其核膜間隙較廣。R。E。R之發達與 culex cells 大致無何差異，僅在Vesicle 有時能發現擴大與稍有增加之情形，但此種現象並非特異的 Culex cell 感染日腦病毒後，于細胞質內會出現特異性的粒子 (Fig 3)，即可于細胞內發現多量增殖，且 vesicle 也出現很多，這些 vesicle 內和 R。E。R。等之內均可看到直徑 50$m\mu$ 至 55$m\mu$ 的球狀小粒子。這些粒子以極度高倍放大像片觀察時，其中心部分爲電子密度高之 core 由(Fig 5) 所示。其直徑爲 30$m\mu$ 至 35$m\mu$ ，外殼之直徑約 50$m\mu$ 至 55$m\mu$ ，整個爲球狀體，在能認出病毒 (envelope) 之持續感染細胞內，其細胞質幾充滿了 vesicle 和 vaculoe, R。E。R。, S。E。R。。(Fig 4) 可以看出 vesicle

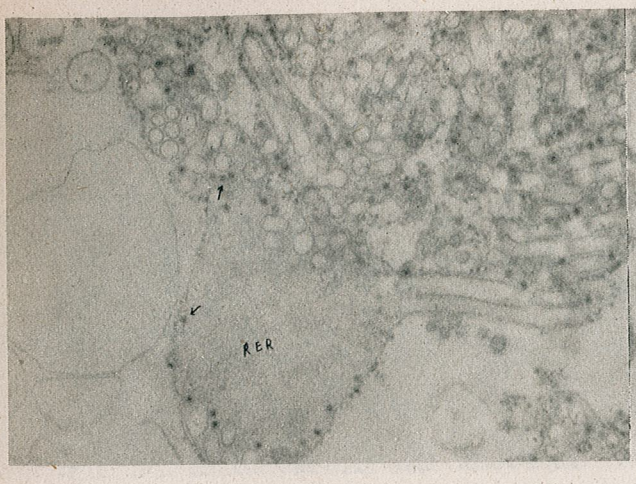


圖 5.

圖 5 ：RER 的周圍許多 J.E.V. 和Vesicle 侵入放大 48,800 倍。

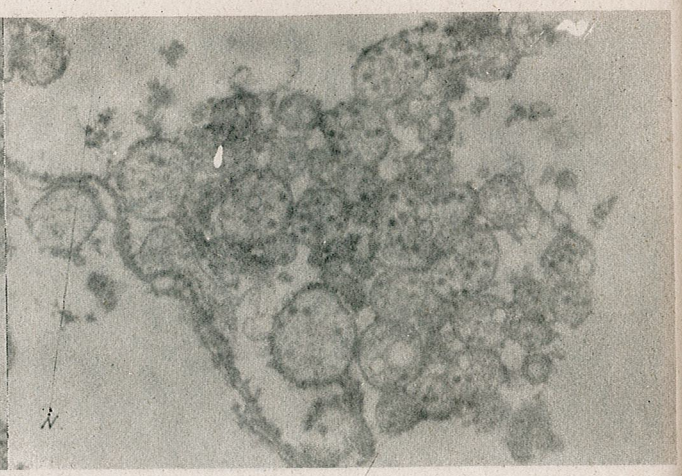


圖 6.

圖 6 ：已經死亡的細胞，Virus 存在於囊中 (R.E.R.) 放大 46800 倍。而此囊再感染於正常的細胞。

爲圓形或長管形，圓形之直徑約 100 $m\mu$ 至 250 $m\mu$ ；長管形的長度約 500 $m\mu$ 至 200 $m\mu$ 。其中之病毒粒子爲成一長列排列着，大部分的病毒粒子集中于 vesicle 周圍之邊緣地帶。被毀壞之細胞，一般均無細胞膜，R.E.R. 脹爲圓狀，直徑自 0.5 μ 至 1 μ 大小不一，其內 vesicle 和病毒粒子爲數不少。(Fig. 3.5.) 筆者暫時將此種 R.E.R. 以囊稱乎之(Fig.6) 。核幾乎都縮小，未看出粒線體 (mitochondria) 之變化，囊常聚集成一群。又如感染到別的細胞時，亦可看到病毒粒子成囊本身被包圍在細胞質內的像。此時，能看出 E.R. 從核膜非常突出的情形，在其中 vesicle 和病毒可被看出，此可能即變化爲我們所稱呼之囊。

結　語

筆者對受日本腦炎感染之細胞，在其感染後96小時與持續感染細胞（感染後一年以上）加以觀察。使用於感染之任何病毒株，在病毒粒子的出現狀態，形態學上爲類似，僅有 Jao Ar-121 病毒在增殖形態上之差異可辨認出來。筆者的觀察，Jao Ar-121 病毒在Culex cells 內的增殖形態，可看出 RER 內vesicle 和病毒粒子同時並存，長管狀 ER 內之病毒粒子成一列排列着。

正常的Culex cells 擴大後，其RER 內之電子密度低，持續感染細胞同樣也可看出脹廣的 RER，但擴大之RER之中心部之電子密度低，在其周圍能觀察出病毒粒子和 vesicle 合成的情形，這種脹廣的RER之大小，約有 2μ 至 3μ ，此爲 Culex cells 的特徵。當感染繼續進行各個脹廣的 R.E.R. ，其周圍之病毒粒子和 vesicle 漸趨合成 (Fig 7) ，96小時後電子密度低的部份已相當地縮小，如此筆者所稱呼的囊即爲 R.E.R. 的變化吧！

謝　辭

本研究對不斷給予指導的太山昭夫教授深致感謝，同時對其他之教員亦予致謝。

參 考 文 獻

1) Kitamura. S. 1966 The in vitro cultivation of tissues from the mosquito KOBE, J. Med Sci 12, 63-70.

2) Peley, J, 1966, Growth a Aedes aegypti embryonic cells and tissues in vitro Expementia 22, 555-557.

3) 堀田進，大山 昭夫（1960）組織培養之基本與實際。

4)Acheson, N, H, and Tamm. I. (1967) Replication of Semilike Forest virus: An electron microscopic study Virology 32, 128-143.



圖七

RER 被 virus 侵入情形，M爲 mitochondria 放大 40,000 倍。

5) B.K. Filshie and J. Rehacek (1968) Studies of the morphology ot Murray Valljey Encephalitis and Japanese, Encephalotis virns Growing in cuetured Mosquit o cells, viuology 34, 435-443.

6) Shinsaku Oyanogi, Fuschiao Ikuta (1969) Electron Microscopic observations in Mice Infected with Japanese Encep halitis, Acta newro path (Berliu) 13 169 -181.

7) J, peleg(1968) Growth of Arboviruses in primary tissue culture of Aedes Aegyptic Embryos, The American, Society of Tropical Medicine and Hyg- iene Vol 17 No 2 219-223.

8) George chin-yun Lee, J, Thomas Grayston and George E. Kenny (1964), Growth of Japanese, Encephalitis virus in cell culture, J, Infect. Dis. Vol 115. No 4 321-329.

9) Brenner S and Horne, R. W. (1959) A negative staining technique for high resolution electron microscopy of viru- ses. Biochim Biophys, Acta 34. 103-110.

10) Cheng, P-Y(1958) Infectivity of ri- bonucleic acid from mouse brains infectel with poliomyelitis viruses J. Expte, Med 99, 167-182.

11) Kerr, J. A. (1952) studies on certain virus isolated in the tropies of Africa and South America, Immunological reactions as determined by cross complement fix- ation tests , J. Immuol 68 461-472.

12) Klug, A. and Caspar, D. L. D. (1960), The structure of small viruses, Adoan, Virus, Res 7 225-325.

13) Luft, J.H. (1961) Improvements in epoxy resin embedding methods, J. Biophys, Biochem, Cytol 9 409-414.

14) Morgun, C. Howe C. and Rose H.M. (1961) strncture and development of Viruses as observed in the electron microscope V. Western equiue encephalomyelitis virus, J. Exptl. Med. 113, 219-234.

15) OTA Z(1965) Electron microscope study of the development of Japanese B encephaliti virus in porcine kidney stable (P.S) cellis, Virology 25, 372-378.

16)Venable, J.H. and Coggeshall, R. (1965) A simplified lead citrate stain for use in electron microscope, J. cell Boiol 25 407-408.

17) Watson M. L. (1958) Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals J. Biophys, Biochem, Cytol 4, 475-478.