



Title	日本脳炎ウィルス感染性リボ核酸の研究
Author(s)	五十嵐, 章
Citation	大阪大学, 1965, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/28744">https://hdl.handle.net/11094/28744</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	五十嵐 章
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 671 号
学位授与の日付	昭和40年3月26日
学位授与の要件	医学科究科病理系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	日本脳炎ウイルス感染性リボ核酸の研究
(主査)	(副査)
論文審査委員	教授 深井孝之助 教授 釜洞醇太郎 教授 天野 恒久

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

日本脳炎ウイルス(JEV)の感染成立のために本質的に重要な役割を演ずるリボ核酸(RNA)の性質を、その生物学的活性を測定する事によって明らかにしようとした。

#### 〔方法及び成績〕

1. ウィルス材料: JEV 材料は中山株感染成熟マウス脳の 10% 乳剤から、8,500×g, 15 分と 90,000×g, 90 分の分別遠心 2 回で得られたもの。比較としてポリオウイルス PV II 型 MEF-1 株を用い、moi=1 で感染させた HeLa 細胞の感染後 6 時間のものを使用した。
2. RNA 抽出: GIERER and SCHRAMM の cold phenol 法に ethanol 沈澱 3 回と 1M NaCl 沈澱を併用した。得られた RNA 分画の吸収スペクトルは  $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ m}\mu$ ,  $\lambda_{\text{min}} = 230 \text{ m}\mu$ ,  $E_{260}/E_{280}$  及び  $E_{\text{max}}/E_{\text{min}}$  は共に 2.0。Orcinol 法で定量された 225  $\mu\text{g}$  の RNA 中に、蛋白及び DNA はそれぞれ LOWRY 法、diphenylamine 法でいずれも検出されない。
3. 感染価(PFU)の測定: JEV 及び JEV-RNA には 10 日目ニワトリ胚の初代培養(CE)細胞を、PV 及び PV-RNA には HeLa 細胞を indicator としてブラック定量法を行なう。但し RNA 分画は 1M MgSO<sub>4</sub> 液で稀釀し、室温で 15~20 分間吸着させた。JEV-RNA-CE 系に於て、高稀釀域では RNA 濃度とブラック数は比例し、JEV-RNA で生じたブラックから抗 JEV 血清で中和される感染性因子が回収され、更に正常マウス脳の RNA ではブラック形成がない事から、この系は JEV-RNA 感染性の特異的定量法といえる。PV-RNA は CF 細胞にブラックを作らず、JEV-RNA は HeLa 細胞にブラックを作らない。
4. JEV-RNA の感染性が生き残り JEV によらないこと: JEV-RNA の PFU は、Ribonuclease に対する感受性、Trypsin に対する抵抗性、硫酸プロタミンによる、失活、有機溶媒に対する抵抗性、

抗 JEV globulin との非反応性、酸及び熱に対する安定性、更に沈降係数の点で、JEV の PFU とは区別される。従って PNA 分画の PFU は抽出操作後に生き残った JEV 粒子の PFU によるものではない。

5. JEV-RNA の PFU の由来：JEV 材料を蔗糖密度勾配遠心法（5～23% 蔗糖勾配、30,000 rpm, 60 分）で分画し、各分画について、CLARKE and CASALS 法による JEV の血球凝集能(HA)、JEV の PFU 及び phenol 法で抽出した RNA の PFU を測定した。Phenol 法で抽出される RNA の PFU は、約 200 S で沈降する JEV の HA 及び PFU のピークと一致する単一ピークで分布した。故に JEV-RNA 分画の感染性は大部分 HA を有する JEV 粒子から抽出されたものといえよう。

6. JEV-RNA の沈降係数：YPHANTIS and WAUGH の方法で PFU を指標として測定した 9 回の連続実験の結果、JEV-RNA の  $s_{20,w}$  として  $46.28 \pm 3.43$  S が得られた。この値は次の実験結果で支持される。

7. JEV-RNA と PV-RNA の同時沈降実験：JEV-RNA と PV-RNA とを各々単独又は混合し、蔗糖密度勾配遠心法（5～20% 蔗糖勾配、37,000 rpm, 150 分）で分析した結果、JEV-RNA の PFU は PV-RNA の PFU 及び細胞 RNA による  $E_{260}$  のピークよりも速く沈降する単一ピークを示した。JEV-RNA の沈降速度は塩濃度に強く依存するが、実験したいずれの塩濃度でも、PV-RNA のそれよりも大である。PV-RNA のピークを 35 S の標準にとると JEV-RNA の沈降係数は 44 S と推定される。

8.  $Cs_2SO_4$  中での buoyant density：JEV-RNA と RV-RNA を混合した試料及び各々単独の試料について、 $Cs_2SO_4$  密度勾配平衡遠心法（初密度 1.64, 33,000 rpm, 24 時間）により buoyant density を測定した。JEV-RNA の PFU は PV-RNA の PFU 及び  $E_{260}$  のピークと同一の分画に単一ピークと分布し、その分画の密度は屈折率測定から 1.666～1.668 g/cc と推定される。

#### 〔総括〕

JEV 感染マウス脳から phenol 法によって感染性を有する RNA 分画が得られ、その感染性を組織培養細胞でのブラック法で検索した結果

1. JEV-RNA 分画の感染性は、HA を有する成熟 JEV 粒子から抽出されるが、生き残り JEV 粒子の感染性ではない。

2. JEV-RNA 分画の感染性因子は PV-RNA と同じ buoyant density (1.67 g/cc) を  $Cs_2SO_4$  中で示す高分子 RNA であり、その  $s_{20,w}$  は  $46.28 \pm 3.43$  S で、PV その他小型ウイルス RNA について報告されている値よりも大である。

3. GIERER 又は SPIRIN の経験的関係式を適用すると JEV-RNA の分子量は  $4.9 \times 10^6$  となる。JEV の物理定数（直径 38 m $\mu$ ,  $s_{20,w} = 200$  S,  $CsCl$  中での密度 1.3）から球型として得られる JEV の粒子量は  $2.25 \times 10^7$  であり、一粒子中に一分子 RNA の存在を仮定すれば JEV の RNA 含量は 22% となる。

## 論文の審査結果の要旨

この論文の研究目的は、日本脳炎ウイルス感染マウス脳から抽出されたリボ核酸（RNA）分画の感染性を、組織培養細胞でのブラック定量法で追跡し、生物学的活性をもった生体高分子としての RNA 分画の感染性因子の基本的性状を明らかにしようとしたものである。

得られた結果は、

- 1) RNA 分画の感染性因子は、大部分が、成熟した日本脳炎ウイルス粒子から抽出され、抽出操作後に生き残ったウイルス粒子ではない。
- 2) そのものは、ポリオウイルス RNA と、 $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  中で同一の buoyant density  $1.67\text{g/cc}$  を示す高分子の日本脳炎ウイルス RNA そのものである。
- 3) 日本脳炎ウイルス RNA の  $s_{20,w}$  は  $46\text{S}$  であり、ポリオウイルス RNA の  $35\text{S}$  よりも大きい。これから推定される日本脳炎ウイルス RNA の分子量は  $4.9 \times 10^6$  である。
- 4) 粒子量  $2.25 \times 10^7$  の日本脳炎ウイルス 1 ケの中に 1 分子の RNA が存在するとすれば日本脳炎ウイルスの RNA 含量は 22 % となる。

RNA 型動物ウイルス及びその感染組織から、いわゆる感染性 RNA が抽出されるという報告はいくつかあるが、その感染性因子の本体に関する知見は数少ない。殊に、日本脳炎ウイルスの属する節足動物媒介ウイルスの場合は殆んどが未知であった。この研究によって得られた結果は、その空白を埋めるだけでなく、これまで一般にウイルス RNA に対して主張してきた分子量  $2 \times 10^6$  という値に対して一つの疑問を投じた。ヌクレオタイド配列まで含めて、ウイルス RNA の構造がそれぞれのウイルスによって異なるのは当然であるが、大まかな物理化学的性質である沈降定数に於いても、日本脳炎ウイルス RNA とポリオウイルス RNA の間に明らかな差のあることが、同一の実験の場に於いて示された。このことは、RNA 型ウイルスの RNA という一般概念をもってすべてのウイルス RNA に関する問題を理解せんとすることが過度の単純化であることを示唆し、ウイルス学及び関連領域に対し、寄与する所が大きいと考える。