

| | |
|--------------|---|
| Title | 麻疹ウイルス赤血球凝集素の精製とその抗原的性質について |
| Author(s) | 北脇, 達雄 |
| Citation | 大阪大学, 1965, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/28756 |
| 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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

| | |
|---------|---------------------------------|
| 氏名・(本籍) | 北脇達雄 |
| 学位の種類 | 医学博士 |
| 学位記番号 | 第 6 8 3 号 |
| 学位授与の日付 | 昭和 40 年 3 月 26 日 |
| 学位授与の要件 | 医学研究科病理系 学位規則第 5 条第 1 項該当 |
| 学位論文題目 | 麻疹ウイルス赤血球凝集素の精製とその抗原的 性質について |
| | (主査) (副査) |
| 論文審査委員 | 教授 奥野 良臣 教授 天野 恒久 教授 深井孝之助 |

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

麻疹ウイルス(豊島株 KB 細胞継代)は、エーテル Tween 80 処理すると、ばらばらに細分され感染性は消失し赤血球凝集(HA)価が2~数倍上昇する。この処理ウイルスを蔗糖濃度勾配遠心法などで精製しモルモット又はウサギを免疫すると、中和(NT)抗体、赤血球凝集抑制(HI)抗体、補体結合(CF)抗体が産生される。本論文では、麻疹ウイルス赤血球凝集素(HA nin)の抗原性、特に NT 抗原性と HI 抗原性の関係を解明したいと考え、まず HA nin の精製を試み次いで精製 HA nin を用いてその抗原性の解析をおこなった。

〔方法並びに成績〕

I) HA nin の濃縮及び精製

a) 硫酸沈澱法 ウイルス材料に飽和硫酸を滴加し 20% から 60% 飽和迄の分画を段階的にえた。ウイルスの生物学的活性は 35% 分画に高率に回収され、HA nin は 50~80%、感染価は 50~70%、CF 抗原は約 60% の回収であった。Specific activity は 2~6 倍の上昇をみた。

b) DEAE カラムクロマトグラフィー法 ウイルス材料は活性材料及びエーテル Tween 80 処理材料の 2 種類のものを用いた。カラムからの溶出は食塩濃度を stepwise に或いは gradient 法に従って増量して溶出させた。即ち 0.02 M 磷酸緩衝液(PB)で洗滌後、食塩濃度を 0.1M, 0.15 M, 0.2M, 0.5 M と増量していくと、HANin はいずれの材料の場合でも 2 peak を形成して溶出された。即ち、活性材料の場合、HANin peak は 0.15M と 0.2 M 分画に、感染価はこれらの分画と 0.5M 分画に溶出された。細胞成分蛋白は HANin peak と分れて 0.02M PB と 0.1M分画に溶出された。処理材料を用いた場合でも溶出像はほとんど同じでただ HANin は低い食塩濃度で早く溶出される傾向があった。処理材料を gradient 法で溶出すると、HANin は 0.1 M 附近で溶出し始め直ちに鋭い

peak を形成するが尾をひいて溶出し、細胞成分蛋白は 0.02 M PB 及び 低食塩濃度の部分に溶出した。

c) 種々の精製法の併用による場合 以上の2方法と遠心法とを併用して HAnin を精製した。

ウイルス材料
|
35% 飽和硫酸分画
沈渣 (1/4 量の 1/15 M PBS に再浮遊)
|
ストレプトマイシン処理 (最終濃度 1.5% ストレプトマイシンで処理)
上清
|
高速遠心 36,000 g 60 分間遠心
沈渣 (1/10 量の 1/15 M PBS に再浮遊)
|
超音波処置 (10 KC 8 分間)
|
エーテル Tween 80 処理
水層
|
DEAE カラム
HA nin peak プール, 濃縮
|
蔗糖濃度勾配遠心 (10~40% w/w)
17,000 rpm 60 分間 SW 21.5 ローター
|
精製 HAnin

この併用法により高度に精製された HAnin がえられた。ストレプトマイシン処理は核蛋白を沈澱させる為用いた。

II) HA nin の抗原性

a) 種々の精製段階のウイルスでモルモットを免疫 ウイルス 原材料, 遠心濃縮材料, エーテル Tween 処理材料及び DEAE カラム精製 HAnin をモルモットの皮下に1週間々隔で3回注射し, 最終接種後1週間目に全採血した。HI 及び NT 抗体はウイルス材料の純度に関係しほぼ平行上昇した。CF 抗体価は精製度が高くなるにつれ低い価を示した。宿主細胞抗原で CF 抗体を吸収すると CF 抗体価の高いものは著明に低下した。

b) 高度に精製した HAnin の抗原性 精製 HAnin を 1024 HAU/0.4 ml から 4 HAU/0.4 ml¹迄4段階稀釈し, 各稀釈液 1 ml ずつを各々5匹のモルモットの皮下に接種し4週間後全採血した。NT, HI 抗体は抗原の種類或いは抗原量に関係なくほぼ平行上昇した。CF 抗体反応は精製 HAnin に対しては認められなかった。

〔総括〕

麻疹ウイルス赤血球凝集素 (HAnin) の精製法として従来は遠心法のみによっていたが, 本研究では硫酸沈澱法, DEAEカラム分画法などの応用を試みた。その結果硫酸沈澱法では生物学的活性は

35% 分画に高率に回収された。DEAEカラム分画法では HAnin は peak をもって回収され specific activity も数倍から十数倍上昇した。しかし感染価は peak 形成がなく尾をひいてだらだらと溶出された。CF 抗原はカラム通過後は検出できなかった。この精製 2 方法と分別遠心及び蔗糖濃度勾配遠心法とを併用して HAnin を高度に精製することができた。種々の精製度の HAnin でモルモットを免疫すると HI 抗体及び NT 抗体の平行上昇がみられた。CF 抗体はウイルスの精製度に応じて反応し純度が高くなるにつれ抗体価は低くなった。CF 抗体価の高い免疫血清を宿主細胞抗原で吸収すると CF 抗体が著明に吸収された。このことから免疫血清中の CF 抗体産生にはウイルス資料中の混在細胞成分が少なからず関与しているものと思われる。高度に精製された HAnin でモルモットを免疫した場合でも、HI 抗体及び NT 抗体が共に平行上昇したが CF 抗体の産生はみられなかった。以上のことから麻疹ウイルスはエーテル Tween 80 処理によりウイルス粒子がばらばらに破かいされ、subunit となった蛋白外被は NT 抗原性を示すと共に HA 活性に対する決定基 (HI 抗原性) をもっていると思われる。

論文の審査結果の要旨

麻疹ウイルス特にその赤血球凝集素 (HAnin) の精製において遠心法を用いた報告があるが、その抗原性を決めるにはまだ純度が不十分であると思われる。

著者は、麻疹ウイルスの HAnin の抗原性を解明するため、まずその精製を試みた。精製法としては、植物ウイルスではしばしば用いられているが動物ウイルスでは現在ほとんど用いられていない硫酸沈澱法と、近年よく用いられている DEAE カラム法とを応用し、更にそれらと遠心法を併用して精製度の高い HAnin をえようとした。ついでこうして得られた HAnin をモルモットに接種し、麻疹ウイルスのもつ抗原性すなわち HI 抗原、中和抗原、補体結合抗原との関係を明らかにしようとした。

成 績

1) HAnin の精製

- a) 硫酸沈澱法により麻疹ウイルスを濃縮部分精製できることを示した。
- b) DEAE カラム法で HAnin は鋭い peak をもって回収され純度も数倍から十数倍上昇した。
- c) 上記の 2 方法と遠心法を併用することによって高度に精製された HAnin をえた。

2) HAnin の抗原性

精製 HAnin をモルモットに接種し HI 抗体と中和抗体が平行上昇することを認め HAnin 粒子すなわちウイルス粒子の表面蛋白である subunit が HI 抗原性と中和抗原性をもっていることを明らかにした。

以上本論文は麻疹ウイルス精製に硫酸沈澱法及び DEAE カラム法を初めて応用し、かつこれらと遠心法との併用により HAnin を高度に精製しその抗原性を明らかにしたものであって、麻疹ウイルスの抗原分析に新たな知見を加えた有意義な研究であると考えられる。また、血清診断用抗原の作製、精度の高い HA ワクチンの可能性を示す広い応用面をもつ研究である。