

Title	日本脳炎ウイルス粒子の特性に関する研究 : その超遠心的性状について
Author(s)	北野, 秀武
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/28873">http://hdl.handle.net/11094/28873</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名・(本籍)	北野秀武 きたのひでたけ
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 885 号
学位授与の日付	昭和 41 年 3 月 28 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	日本脳炎ウイルス粒子の特性に関する研究； その超遠心的性状について
論文審査委員	(主査) 教授 深井孝之助 (副査) 教授 釜洞醇太郎 教授 奥野 良臣

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

アルボ・ウイルス B 群に属する日本脳炎ウイルス (J E V) について、生物学的活性を指標として超遠心法による分析を行ない、従来ほとんど未知であったこのウイルスの粒子の性質を明らかにすることを目的とした。

#### 〔方 法〕

1 ウイルス材料：J E V 中山株感染成熟マウス脳の 0.02M Tris-HCl・0.14M NaCl 0.1mg/ml cystine 添加緩衝液 (T S C), pH 7.6~8.0 10% 乳剤を出発材料として、その 8500g, 15分遠心上清を硫酸プロタミン処理した遠心上清 (S<sub>2</sub>) の分別遠心 (90,000g, 90分; 8,500g, 15分) 2回で得られた部分精製材料を主として用いた。

2 赤血球凝集反応および赤血球凝集抑制反応：CLARKE & CASALS 法によったが、沈降係数測定の場合には HORSFALL & TAMM の Fractional dilution 法により稀釈を行なった。

3 プラック形成能 (P F U) の測定：10日目ニワトリ胚の初代単層培養細胞上で、PORTER-FIELD の変法により行なった。

4 蔗糖濃度勾配沈降速度遠心法 (SDGC) : 5~23%の蔗糖濃度勾配中で Spinco L, SW 39 ローター, 30,000rpm (Rmin=4.4cm, Rmax=9.8cm, 平均g=70,000), 60分間遠心し管底からドロップ法で分画した。

5 CsCl 密度勾配平衡遠心法 (CsCl-DGC) および effective buoyant density ( $\rho$ ) の測定：CsCl-DGC は MESELSON 等の方法に従い、Spinco E, SW 39 ローター, 35,600rpm, 40時間遠心した。 $\rho$  は日立 Abbe 型屈折率計で屈折率を測定し、I F F T等の式から求めた。

6 Sephadex gel filtration : Sephadex G-200 (又はG-100) の  $2\text{cm}\phi\times 20\text{cm}$  カラムに試料 2ml を負荷し, T S Cを用いて 4ml ずつに分画した。

7 沈降係数の測定 : YPHANTIS & WAUGH 型 movable partition cell を用いて遠心し (Spinco E, AN-A ローター, 最高 14,290rpm, 10分), YPHANTIS & WAUGH の式により沈降係数を求め, 標準状態への補正は Ostwald 粘度計で測定した粘度を用いて行なった。

#### 〔結 果〕

1 SDGC による JEV の赤血球凝集能 (HA) 分布における不均一性 : SDGC で JEV 試料は HA 分布から少なくとも二つの成分, Hr (rapid-sedimenting hemagglutinin) および Hs (slow-sedimenting hemagglutinin) に分れた。Hr, Hs の各分画を分画前の試料と平行して SDGC で再遠心すると, ほぼ元の試料の HA 分布の各ピークに相当して, それぞれ単一のピークとして分布した。また PFU については, Hr 分画にピークをもつ分布を示した。

2 Hr, Hs 分画のHAの pH 依存性 : Hr, Hs 分画の赤血球凝集反応の至適 pH は, それぞれ6.2, 6.4であった。

3 Hr, Hs 分画の熱および pH 安定性 : Hr, Hs 分画共, 0.05M Tris-HCl, 0.14M NaCl, pH 7.6 緩衝液中で,  $50^{\circ}\text{C}$  以上では極めて不安定であり,  $37^{\circ}\text{C}$  での不活化実験では結果がかなりばらついていたが, 有意差は認められなかった。

また pH 安定性については 0.1M 磷酸緩衝液中では ( $20^{\circ}\text{C}$ , 30分間), HA でみると Hr, Hs 分画共, pH 8 でかなり安定であるが, pH6~7 では不安定であった。

4 赤血球凝集抑制反応 : Hr, Hs 分画共, 米軍第406総合医学研究所分与の抗 JEV 中山株モルモット血清により, HA は分画前の試料と同程度に抑制された。

5 CsCl-DGC による Hr, Hs 分画の  $\rho$  の測定 :  $S_2$  を CsCl-DGC 後, 分画を行なうと HA 分布は 2 ピークを示した。SDGC により得た Hr, Hs 各分画を,  $S_2$  と平行して CsCl-DGC にかけて, HA 分布で Hr, Hs 分画の各ピークは単一であり, それぞれ  $S_2$  の密度の高い方および低い方のピークに一致した。CsCl 溶液の初密度を 1.24, 1.25, 1.26g/cc とした時, Hr, Hs 分画の  $\rho$  の平均値はそれぞれ 1.320, 1.244g/cc ( $4^{\circ}\text{C}$ ) であった。

6 JEV 粒子の沈降係数の測定 : 部分精製 JEV 試料について, Sephadex 処理を行なうと, HA および PFU は, 共に単一のピークとして一致した分布を示した。このピーク分画を SDGC にかけて HA, PFU 共 Hr に相当する位置に一峯性の分布を示した。そこで Sephadex 処理で HA, PFU 共にピークの存在する分画について求めた  $s_{20,w}$  は HA, PFU でそれぞれ  $207.9\pm 7.3\text{S}$ ,  $211.9\pm 17.5\text{S}$  で, 実験誤差内で一致した。この値を用いると, Hs の沈降係数は SDGC の HA 分布から約 150S と与えられた。

#### 〔総 括〕

1 JEV 感染マウス脳からの JEV 部分精製試料は, 蔗糖濃度勾配遠心法で HA 分布でみると不均一性を示すが, PFU では一峯性を示した。

2 Hr には HA, PFU 共に存在し, Hs には HA が存在すると思われる。

3 Hr, Hs, の表面的な性質には大差は認められなかった。

- 4 CsCl 平衡遠心法での Hr, Hs の  $\rho$  はそれぞれ1.320, 1.244g/cc (4°C) である。
- 5 生物学的活性を指標とした Hr, Hs 分画の  $s_{20,w}$  はそれぞれ約210, 150Sである。
- 6 JEV 粒子が近似的に球形と仮定すると, Hr, Hs, 共その直径は約 35m $\mu$  と推定され, これは電子顕微鏡で得られた値 38m $\mu$  によく一致する。

### 論文の審査結果の要旨

著者はその性状が全く不明であった日本脳炎ウイルス (以下JEVと略称) の性状を明らかにすることを目的として, JEV中山株感染マウス脳を出発材料とし, 超遠心的に3つの赤血球凝集 (HA) 活性分画を見出し, Hr, Hs, Ht と名づけた。以下そのそれぞれの分画を, PFU を指標とする感染価測定の結果と対比し, JEV virion は Hr 分画に相当し, Hs, Ht は, 感染性をもたないことを明らかにした。

Hr 分画を更にセファデックスゲル濾過法および超遠心法によって精製した試料に関する Yphantis-Waugh 法による沈降定数の決定において, HA 活性に関しては208S (S.D.7.3S), PFU に関しては212S (S.D.17.5S) の値がえられ, この値は実験誤差の範囲でよく一致し, この分画が完全な virion からなることを示す。この分画の CsCl 中における平衡遠心法による buoyant density は, 1,304 (4°Cに補正) であり, Svedberg-Pedersen の式によればその粒子直径は 35~40m $\mu$  と推定される。

他の2つの分画, Hs, Ht は, それぞれ150S, 60Sの沈降定数を有し, その buoyant density は 1.230, 1.248であり, 同様にして推定された粒子直径はそれぞれ34~37m $\mu$ ,  $\approx$ 22m $\mu$  であった。

これらの3分画の性質を比較すると, HA 活性の pH 依存性, pH 変化に対する安定性, 熱不活化, 赤血球凝集抑制反応による抗原性にはかわりはない。ただ, 紫外線照射によって Hr, Hs の HA 活性は multiple hit curve を示すのに反して, Ht のそれは, single hit curve に従って不活化される。

上記の知見に加うるに, 出発材料における3つの分画の存在比, 以後の処理における存在比の変化, HA 活性の紫外線による不活化の態度, 感染性等から, Hs, Ht は, 不完全粒子, およびその崩壊産物であると考えられ, 上記 Hr 分画中の活性粒子こそ, 日本脳炎ウイルスそれ自体であることが結論された。この粒子の特性は, 平行して行なわれた電子顕微鏡による所見とよく一致する。

以上著者は, 日本脳炎ウイルス粒子の沈降定数および buoyant density の最も正確な値を決定し, その粒子直径の推定値をも示すことができたのみならず, 感染組織あるいはその抽出液中に存在するウイルス粒子以外の HA 活性粒子の特性をも明らかにして, その由来を考察した。これらの知見は従来未知であった日本脳炎ウイルスの本態を著しく明らかにすると同時に, arbovirus B群に關しての研究の促進にも寄与するところ甚だ大であると考えられる。