The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	日本脳炎ウイルスの光化学的不活化
Author(s)	福永, 利彦
Citation	大阪大学, 1967, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29146
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【34】

氏名・(本籍)	福永利彦（ふくながとしひこ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 1169 号
学位授与の日付	昭和42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	**日本脳炎ウイルスの光化学的不活化**
論文審査委員	(主査) 教授 天野 恒久 (副査) 教授 奥野 良臣 教授 松代 愛三

論文内容の要旨

〔目　　的〕

日本脳炎ウイルス（JEV）の光化学的不活化反応を追求し，その反応に関与する構成因子と反応の機構に関する知見を得ようとした。

〔方　　法〕

1．ウイルス材料：JEV 材料は中山株感染成熟マウス脳10%乳剤の 8,500×g，15 分遠心上清（S_1）及び S_1 を 90,000×g，90分と 2,000×g，15分の分別遠心 2 回で得られたもの（U_2）を用いた。

2．RNA の抽出：GIERER and SCHRAMM の cold phenol 法に ethanol 沈澱と 1 M Nacl 沈澱を併用した。

3．感染価（PFU）の測定：JEV 及び JEV-RNA の PFU 測定には10日目ニワトリ胚の初代培養細胞を用いた。

4．可視光線照射：Proflavine（PF）を含む，あるいは含まない JEV あるいは JEV-RNA の浮遊液 2 ml の入った試験管を 4°C で 20 ワットの昼光色螢光燈で照射した。各試験管は光源より等距離に配置され，照射時以外は黄色の安全ランプ下で操作された。

5．吸収スペクトル：PF 及び PF と Yeast RNA 混合液の吸収スペクトルを島津自動記録型分光光度計で求めた。

6．Action spectrum：PF による JEV の光不活化の Action spectrum を，Hilger monochromator による単色光を用いて求め，これと上記吸収スペクトルを対比した。

7．Sephadex gel 沪過：Sephadex G-100 column に PF と JEV の混合液 2 ml を負荷し 5°C dark で沪過分画した。

8．血球凝集能（HA）の測定：JEV の HA 活性は Clarke and Casals の方法によって測定した。

〔成　　績〕

1．JEV の plaque 形成能は 1–10 μg/ml の PF 存在下で可視光線照射によって single hit curve で不活化され，各照射段階の JEV から phenol 法で抽出される感染性 RNA もそれと平行して不活化されている。遊離の感染性 RNA も PF 存在下に single hit で光不活化される。この不活化反応は PF と光が直接同時に JEV に作用することを要し，不活化速度には 0°C–37°C で有意差なく，気相を N_2 に置換すると不活化は著しく抑制される。

2．PF は可視部の波長 445 mμ に吸収ピークを持ち，この光の励起で 510 mμ に螢光を発するが Yeast RNA の添加によって吸収ピークは 458 mμ に移動し螢光は消失する。牛血清アルブミンの添加ではこの変化はおこらない。JEV-PFU の PF による光不活化の Action spectrum は 400–550 mμ の間で PF-Yeast RNA 混合液の吸収スペクトルに一致し，458 mμ での 37% 生残量：$D_{0.37}=39.4\times10^5$ erg/cm^2, Inactivation Cross Section: $\sigma=1.10\times10^{-17}$ cm^2/Photon である。

3．JEV-PF 混合液の光感受性の程度は，照射前の PF と JEV の preincubation time に関係せず，またこの未照射の混合液は Sephadex gel 濾過によって光抵抗性となる。光感受性の JEV-PF 混合液から Phenol 法で得た感染性 RNA も光抵抗性である。これらの光抵抗性となった試料も新たに PF を加えることによって，もとの試料と同じく可逆的に光感受性となる。

4．JEV の HA 活性は PF と可視光線の作用に影響されない。光不活化 JEV の庶糖濃度勾配中での沈降の pattern は非不活化 JEV のそれと差がない。

〔総　　括〕

JEV は Poliovirus と異なって，細胞外の状態で色素存在下に容易に光感受性となる。その光不活化に関しては，

1．JEV 及び遊離 JEV-RNA のいずれも single hit で不活化される。即ち感染能を失活させるには 1 個の photon で充分である。

2．酸素に依存し，温度には影響されない。

3．感染能に関して損傷を受ける部位は内部の RNA であり，Action spectrum と in vitro のモデル実験の対比から PF と JEV-RNA との直接の結合が示唆される。

4．PF と JEV との結合は非常に速く，また可逆性である。

5．ウイルス粒子の表面に存在すると考えられる HA 活性は，PF による光不活化を受けない。

6．光不活化された JEV 粒子も正常粒子とほぼ同じ大きさを保っている。

以上の結果から，PF はウイルスの表面構造を通過して内部の RNA と直接可逆的に結合し，その状態で可視光線を吸収し，そのエネルギーによって RNA が何らかの損傷を受けるため活性が失われるという光不活化の機構が考えられる。

論文の審査結果の要旨

ある種の色素存在下におけるウイルスの光化学的不活化反応については，約30年以前に報告されて

いるが，この反応における可視光線の効果に注意を払われたのは1960年頃からである。一般に，細胞外でもアクリジン系色素存在下に容易に光感受性となるウイルスと，増殖の場に色素が存在しない場合は光感受性とならないウイルスとがあり，日本脳炎ウイルスは前者の type に属するが，従来この光不活化反応の機構の研究は殆んどなされていない。本論文は，日本脳炎ウイルス(JEV)の性状を明らかにする一方法として，その光不活化反応を追求し，その反応に関与するウイルス粒子の構成因子と反応の機構の一部を明らかにしたものである。得られた結果は，1. JEV 及び遊離の JEV-RNA のいずれも single hit で不活化される。即ち感染能を失活させるには一個の photon で充分である。2．この光不活化反応は酸素に依存し，温度 (4°C–37°C) には影響されない。3．感染能に関して損傷を受けるウイルス粒子の部位は内部の RNA であり，action spectrum と in vitro のモデル実験の対比から色素と JEV-RNA との直接の結合が示唆される。4．色素と JEV との結合は速く，また可逆性である。5．ウイルス粒子の表面に存在すると考えられる血球凝集能はこの光不活化を受けない。6．光不活化された JEV 粒子も正常粒子とほぼ同じ大きさを保っている。

以上の結果から，色素はウイルス粒子の表面構造を通過して，内部の RNA と直接，可逆的に結合しその状態で可視光線を吸収して，そのエネルギーにより RNA が何らかの損傷を受けるためウイルスの感染能が失われる，という光不活化反応に対する説明が可能となった。

ウイルスの不活化方法として，ウイルス粒子の表面活性及び内部の核酸の両者に損傷を与えるものとしてフォルマリン不活化，紫外線不活化などがあり，表面活性だけを失活させるものとしては適度の熱不活化，デオキシコール酸ソーダなどの界面活性剤による不活化等が知られているが，ウイルス粒子の内部の核酸だけに損傷を与える不活化方法として光化学的不活化をあげることができるようになった。この不活化方法は，不活化ワクチンの不活化方法として利用される可能性があり，また光不活化ウイルスを用いてのウイルスと細胞との相互作用の研究，あるいはウイルス相互間の干渉現象の研究等により，ウイルス学に寄与することが期待される。