タバコモザイク病ウイルスの病原性及び 抗元性に対する X 線の影響

宮本雄一*・河村文夫**

Yuichi Miyamoto and Fumio Kawamura: Effects of X-ray radiation upon the pathogenicity and antigenicity of tobacco mosaic virus.

1. 緒 言

近年ウイルスに対する放射線の作用に関する研究の進歩に伴い、各種放射線のウイルス粒子に対する直接或いは間接作用が明かにされつつある。特にいわゆる ionizing radiation によるウイルスの不活性化は個々のウイルス粒子のイオン化によつて起る。すなわち single ionization によるといわれる^{7,8,9,10,17,18}。なお放射線或いはその他の薬剤処理によつて不活性化されたウイルスが、無処理の活性ウイルスとその血清学的或いは物理学的性質についてはほとんど変りがないこともしばしば報告されている^{2,13,14,15,16,19,21}。

筆者等は純化せるタバコモザイク病ウイルス（以下 TMV と略称する）に X 線を照射し、これが TMV の病原性及び抗元性に与える影響について研究した。実験は 1953 年 4 月より 12 月までの間、北海道大学農学部植物病理学教室で行い、X 線照射は同医学部放射線医学教室で行った。

本実験を行うに当り終始御懇篤なる指導と多大の便宜とを与えられた植物病理学教室福士貞吉教授に対して深厚なる謝意を表する。尙実験に際し有益な助言を戴いた放射線医学教室若林勝教授及び植物病理学教室村山大記助教授に深謝する。

2. 実験材料及び実験方法

供試ウイルスは純化せる TMV である。純化は Bawden¹⁾の方法に従った。すなわち TMV を感染させたタバコ苗 (*Nicotiana tabacum* var. White Burley) の磨碎汁液に対する 250 g/l の硫酸アンモニウム添加、及び稀薄塩酸添加による等電点に於けるウイルスの沈澱と 3000 rpm 30 分間の遠心分離とを交互に反覆して精製した。更に流水及び蒸留水中で 24 時間透析した後蒸留水を加えて最初の磨碎汁液量と同量にし、これを TMV 原液とした。精製過程より推定したこの原液中の TMV 蛋白濃度は凡そ 0.2% であ

り、実験には TMV 原液と 10 倍稀釈液（推定濃度：0.02%）を用いた。これら TMV 溶液の pH は 6.0 ~ 6.2 であつた。

本実験に使用した TMV 抗血清は純化 TMV を注射した家兎から得られた。すなわち上記 TMV 原液を家兎 1 頭につき 2 cc ずつを 3, 4 日間隔で耳周縁静脈内へ注入し、11 回の注射終了後部分採血を行い、免疫の力価を確認して 10 日後に全採血を行い、血清を分離して氷室内に凍結保存した。

X 線の照射に際しては、直径 5 cm のペトリ皿に 2, 3 mm の厚さに TMV 溶液を入れ管球焦点から液面迄の距離を 5 cm にして照射した。使用した X 線の平均波長は 0.4 Å である。照射条件は 60 KVP, 15 mA 及び 60 KVP, 10 mA であり、X 線強度は 15 mA, 10 mA の場合それぞれ 2400 r/min, 1600 r/min であつた。照射は 14°~20°C の室温で行われた。使用した X 線管球は内部へ水道水が導入され、常に強制冷却されつつ照射したので、照射による試料の温度上昇はほとんど認められなかつた。

照射を終えた試料をそれぞれ蒸留水で 4 倍に稀釈した後病原性及び抗元性のテストに使用した。感染力は *Nicotiana glutinosa* に対する半葉法による接種試験で調べた。抗元性のテストには沈降反応の混合法^{3,4,5,6}を用いた。沈降反応には内径 0.8 cm, 長さ 8 cm の試験管を用い、これに予め所要の 2 倍の濃度に稀釈した抗血清を 0.5 cc ずつ入れておき、次いで処理した TMV 溶液を 0.5 cc ずつ注入して混合した。抗血清の稀釈はすべて 0.85% の食塩水で行った。混合した試験管を直ちに 37°C の温湯中に入れ、2 時間浸漬した後沈澱の直無を記録した。更にそのまま低温室内に放置し混合してから 20 時間目に再び結果を調べた。

3. 実験結果

最初に TMV 原液（推定の TMV 濃度：0.2%）の材料を用いて X 線照射を行い、X 線強度に基いて照射時間を決め一定時間で試料を取り上げた。所要線量の照射を終えた試料はそれぞれ蒸留水で 4 倍に稀釈して

* 北海道大学農学部植物病理学教室

** 北海道大学医学部放射線医学教室

接種試験と沈降反応を行つた。TMV 原液に対するX 線照射の結果を要約表示すれば第1表の通りである。この際のX線照射は焦点被照射体間距離5cm, 電圧60 KVP, 電流15 mA, X線強度2400 r/min の条件

Table 1. Effects of X-ray radiation upon the pathogenicity and antigenicity of TMV (ca. 0.2 %).

Doses ($\times 10^4$ r)	Dilution of antiserum Time (hr.)*	Antigenicity**						Pathogenicity***	
		1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	Antigen control	Number of necrotic spots	% of survival
4	2	+++	++	+	+	+	—	279/384	72.6
	20	+++	+++	+++	++	+	—		
8	2	+++	+++	++	++	+	—	259/500	51.8
	20	+++	+++	++	++	+	—		
12	2	+++	+++	++	++	+	—	372/376	98.9
	20	+++	+++	+++	++	++	—		
16	2	+++	+++	+++	+++	++	—	146/288	50.6
	20	+++	+++	+++	+++	++	—		
20	2	+++	+++	+++	++	++	—	234/320	73.1
	20	+++	+++	+++	+++	++	—		
24	2	+++	+++	+++	++	++	—	220/381	57.7
	20	+++	+++	+++	+++	++	—		
28	2	+++	+++	+++	+++	++	—	109/292	37.3
	20	+++	+++	+++	+++	++	—		
32	2	+++	+++	+++	+++	++	—	84/355	23.6
	20	+++	+++	+++	+++	++	—		
36	2	+++	+++	+++	+++	++	—	55/260	21.1
	20	+++	+++	+++	+++	++	—		
40	2	+++	+++	+++	+++	++	—	36/306	11.7
	20	+++	+++	+++	+++	++	—		
Control	2	+++	+++	++	±	+	—		
	20	+++	+++	+++	++	+	—		

Virus preparations were irradiated at 5 cm distance from the anticathode of X-ray tube run at 60 KVP, 15 mA and at the rate of 2400 r/min.

*, ** Results of precipitin reaction were read after 2 hr. in a water bath at 37°C and after 20 hr. under the room temperature. + sign indicates the degree of precipitation. — sign indicates that there is no precipitation. Dilution of antiserum represents the final concentration.

*** Number of necrotic spots indicates the total number of spots on 5 leaves, whereas the denominator shows the number of spots on control half-leaves.

下で行つた。沈降反応の結果は 37°C に於ける 2 時間後、及び室温に於ける 20 時間後に読み取つたものである。+ 及び — は沈降反応による羊毛状の沈澱の有無を示している。抗血清の稀釈倍数はすべて TMV 溶液と混和後の最終濃度である。壊死斑点の数は 5 枚の葉の合計であり、それぞれの分母はこれらの葉の無処理区半葉の斑点数の合計である。

TMV 原液を 10 倍に稀釈した溶液 (推定濃度: 0.02 %) に X 線を照射した結果は第 2 表の通りである。この場合の照射条件は焦点被照射体間距離 5 cm, 電圧 60 KVP, 電流 10 mA, X線強度 1600 r/min であつた。血清反応及び接種試験に関する事項は前記第

1 表の場合と同様である。

第 1, 第 2 表に示した活性 TMV の残存率の対数を一方にとり、他方に X 線照射線量をとつて半対数グラフを作つた。これによつて照射線量に対する TMV の障害の程度を示す曲線が得られた。第 1 表, 第 2 表に示された結果に基いた曲線がそれぞれ第 1 図及び第 2 図に示されている。これら曲線は大体単純な直線となり、これから所要の TMV 障害量を得るに要する照射線量を読み取ることができた。

全実験を通じて、X 線照射による試料の温度上昇及び沈澱物の現出は全く認められなかつた。

Table 2. Effects of X-ray radiation upon the pathogenicity and antigenicity of TMV (ca. 0.02 %).

Doses ($\times 10^4$ r)	Dilution of antiserum Time (hr.)*	Antigenicity**						Pathogenicity***	
		1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Antigen control	Number of necrotic spots	% of survival
4	2	++	+	+	±	—	—	29/208	13.9
	20	++	++	++	+	—	—		
8	2	++	++	++	++	±	—	1/ 49	2.0
	20	++	++	++	++	+	—		
12	2	++	++	+	±	+	—	0/ 67	0
	20	++	++	++	+	+	—		
16	2	++	++	++	+	±	—	0/ 66	0
	20	++	++	++	++	++	—		
20	2	++	++	++	++	+	—	0/ 24	0
	20	++	++	++	++	++	—		
24	2	++	++	++	++	++	—	0/ 21	0
	20	++	++	++	++	++	—		
28	2	++	++	++	++	++	—	0/ 72	0
	20	++	++	++	++	++	—		
32	2	++	++	++	++	+	—	0/ 62	0
	20	++	++	++	++	++	—		
36	2	++	++	++	++	++	—	0/109	0
	20	++	++	++	++	++	—		
40	2	++	++	++	++	++	—	0/109	0
	20	++	++	++	++	++	—		
Control	2	++	+	+	±	—	—		
	20	++	++	++	+	—	—		

Virus preparations were irradiated at 5 cm distance from the anticathode of X-ray tube run at 60 KVP, 10 mA and at the rate of 1600 r/min.

*, **, *** For the explanations of the table, see the foot-notes of Table 1.

Fig. 1. The inactivation of TMV (ca. 0.2 %) by X-ray radiation.

The experimental errors shown in Fig. 1 are mostly attributed to the high concentration of TMV, the activity of which was tested by half-leaf method.

Fig. 2. The inactivation of TMV (ca. 0.02 %) by X-ray radiation.

うのである。更に様々の物理化学的処理の結果、バイラスの抗原性と結晶性との

4. 考察及び結論

バイラスが多くの物理化学的処理によつて不活性化されることは古くから報告されている。しかしバイラスの不活性化を引き起す過程については未だ明瞭な解釈がない。X線照射或いはその他のいわゆる ionizing radiation によるバイラスの不活性化は加水分解と酸化作用によることが知られている。しかもこの多くの場合には、バイラス粒子の総体的な構造にはほとんど明かな影響を与えることなく、その感染力のみを奪うのである。更に様々の物理化学的処理の結果、バイラスの抗原性と結晶性との

関係はその各々と病原性とのつながりよりも一層密接であり、全く病原性を失ったバイラスが、無処理のバイラスのそれと全く同様な血清反応或いは結晶となる能力を示す場合の多いことが明かにされた。特に TMV についてこれらのことが多く研究された^{3,13,14,15,16,19,21)}。故にこれらの性質をも破壊する為にはバイラス粒子の破碎或いは、少くとも病原性の破壊より以上の本質的な変化を粒子に与えることが必要である。バイラスの抗元性を破壊せずに感染力だけを剥奪するものとしてはフォルムアルデハイド、過酸化水素、亜硝酸、硝酸ウラニウム、超音波、紫外線、X線等が知られている。

なお近年ある研究者達^{7,8,9,10,17,18)}は、放射線照射によるバイラスの障害曲線は指数函数曲線となり、従つてこの不活性化は個々のバイラス粒子が single ionization, 或いは single cluster of ionization を受けることによって起り得るという見解を示している。更に TMV については、X線或いはその他の ionizing radiation の既知の一定線量照射による TMV の不活性化量を測定し、その値からバイラス粒子の大きさ、或いは target volume の推定が試みられている^{9,10,12)}。

本実験は X 線照射後に於ける TMV の病原性と抗元性との関係を知る為に行つた。実験結果が示す通り X 線照射によつて不活性化された TMV は、抗血清との反応能力を単に維持しているだけでなく、反つて活性バイラスが未だ多少残っている試料、或いは無処理のものよりも強い沈降反応を示した (第 2 表)。これらの実験結果 (第 1, 第 2 表) によつて、実験した照射線量の範囲内では、線量の増加に従つて抗元性は感染力の減少とは反対に反つて強くなることが認められた。

次に照射した試料の活性 TMV の残存率の対数値と照射線量との半対数グラフを作つたが、活性 TMV の残存曲線は実験誤差の範囲内で大体単純な直線となり (第 1, 第 2 図)、従つてこの二者の間には指数函数的な関係が成立つことがわかつた。実験誤差は或る場合には相当大きくあらわれた。特に第 1 図の $4 \sim 16 \times 10^4 r$ 照射に於て最も大きかつた。この場合は、使用した TMV の濃度が高く、更に実験が盛夏の高温期に行われたので植物の感受性も強く、従つて接種した葉に生ずる壊死斑点が稠密となつた。この為には多少の TMV 障害量は数字の上に現われ得なかつたものと想像される。しかし障害作用が斑点数の上に顕著に現われ始めた後は明かな直線状となつた。なお、これらの場合

TMV 濃度の低い材料による残存曲線の傾斜はより急になつた。

不活性化線量即ち 37% 線量 (mean lethal dose) はこれらの曲線から夫々 TMV 濃度 0.2% の材料の場合は $28 \times 10^4 r$, 0.02% の時には $2 \times 10^4 r$ と得られた。この 2 つの曲線を比較すると濃度が 2×10^{-3} と 2×10^{-4} の場合に於ける X 線の作用の相違が明瞭に現われている。これは蛋白質に X 線を照射する場合被照射蛋白質濃度が稀薄となるに従つて同じ変化を起すに要する線量は小となるという所謂“稀薄効果”が働いているものと思われる。この稀薄溶液に於ける X 線による蛋白質の変化には直接作用の外に間接作用もその一端を負つていると考えられ、多くの論議の対象とされている^{8,11)}が、ここではこれにふれない。

結局筆者等はこれらの事実により次の様な結論に達した。X 線を照射した TMV の抗元性は、実験を行つた照射線量に関する限り、線量の増加に従い感染力の漸減とは反対に反つて強くなつた。特に病原性が完全に認められない試料に於て顕著に現われた。この現象は X 線照射の直接或いは間接的作用によつて、バイラス粒子が影響を受けて短小粒子が増加し、従つて表面積も増加する為と考えられる。X 線照射線量に対する活性 TMV の残存率を半対数グラフにすると、障害曲線は単純な直線となつた。これは ionizing radiation によるバイラスの不活性化は個々のバイラスに対する single ionization によるという見解と一致する。

5. 摘 要

純化せる TMV に X 線を照射し、それがこのバイラスの病原性及び抗元性に与える影響について研究した。バイラスの感染力は *Nicotiana glutinosa* への半葉法による接種試験で調べ、抗元性のテストには沈降反応 (混合法) を用いた。

X 線照射によつて病原性を失つたバイラスは依然強い抗元性を有し、照射線量の増加に伴つて抗元性が強くなる傾向が認められた。

X 線照射による TMV の障害量と照射線量との間には指数函数的関係が成立する。従つて一方に活性バイラス残存率の対数ととり、他方へ照射線量をとつて半対数グラフを作ると、TMV の X 線による障害曲線は大体単純な直線となつた。従つてこれらの結果は ionizing radiation によるバイラスの不活性化は single ionization によるという説と一致する様に思われる。X 線照射による TMV 障害曲線は照射時の TMV 濃

度が低いと、その傾斜はより急になった。これらの曲線より得られた TMV の大凡の不活性化線量 (37% 線量) は照射時の TMV 濃度 0.2% の場合は $28 \times 10^4 \text{r}$ であり 0.02% の時は $2 \times 10^4 \text{r}$ であった。

(1954 年 7 月 10 日受理)

引用文献

- 1) Bawden, F. C.: Plant viruses and virus diseases. 3rd ed. p., 172. (1950).
- 2) Bawden, F. C. & N. W. Pirie: Proc. Roy. Soc. London, 123: 274~320. (1937).
- 3) Chester, K. S.: Phytopath., 25: 10. (1935).
- 4) —: Ibid., 25: 686~701. (1935).
- 5) —: Ibid., 25: 702~714. (1935).
- 6) —: Ibid., 27: 903~912. (1937).
- 7) Lea, D. E.: Nature, 146: 137. (1940).
- 8) —: Actions of radiations on living cells. London & New York. pp. 100~125. (1947).
- 9) Lea, D. E. & K. M. Smith: Parasitol., 32: 405. (1940).
- 10) — & —: Ibid., 34: 227~237. (1942).
- 11) Lea, D. E., K. M. Smith, B. Holmes & R. Markham: Ibid., 36: 110. (1944).
- 12) Marshak, A. & W. N. Takahashi: Proc. Nat. Acad. Sci., 28: 211~216. (1942).
- 13) Matsumoto, T. & K. Somazawa: Jour. Soc. Trop. Agric., 2: 223~234. (1930).
- 14) — & —: Ibid. 3: 24~32. (1931).
- 15) Miyamoto, Y.: 枋内, 福士両先生還暦記念論文集. 札幌. (印刷中).
- 16) 宮本雄一: Virus, 4: 256~263. (1954).
- 17) 大島信行, 若林 勝: 日植病報, 15: 87. (1951).
- 18) Pollard, E. C.: The physics of viruses. New York. pp. 69~102. (1953).
- 19) Stanley, W. M.: Science, 83: 626~627. (1936).
- 20) Wyckoff, R. W. G., J. Biscoe & W. M. Stanley: Jour. Biol. Chem., 117: 57~71. (1937).

Résumé

The present work was undertaken in order to investigate the effects of X-ray radiation upon the pathogenicity and antigenicity of tobacco mosaic virus (TMV).

The virus preparation used in this work was the aqueous suspension of TMV purified by Bawden's procedure. The antiserum was prepared by injecting rabbits with the purified TMV. The infectivity of the irradiated virus was tested by the half-leaf method using *Nicotiana glutinosa* as assay plants. In serological tests of TMV, the precipitin reaction was used. The virus preparation 2 or 3 mm thick in a Petri dish of 5 cm in diameter was irradiated at 5 cm distance from an anticathode of an X-ray tube run at 60 KVP and or 10 mA. The mean wave-length of X-ray used in this work was $0.4 \text{ \AA}$, and dosages measured were 2400 r/min. in the case of 15 mA and 1600 r/min. in that of 10 mA. The pH of the virus preparations were 6.0~6.2 and their temperatures were 14° ~ 20°C during the irradiations, and as the X-ray tube employed was water-cooled no rising of temperature of the preparations due to the irradiations was recognized.

The results of experiments are summarized as

follows:

(1) The non-infective preparations of TMV which had been inactivated by X-ray radiation always showed to be serologically active, and it was moreover found that the serological activities of irradiated preparations increased within the limits of dosage used in the experiments, on the contrary of decreasing of the infectivity (Tables 1 and 2).

(2) The logarithm of the surviving fraction has been plotted against the dosage of irradiation according to the results of the virus activity assay (half-leaf method), and the survival curve was shown by a straight line (Fig. 1 and 2). Consequently, these results seem to agree with the view that the inactivation of virus by ionizing radiation is caused by a single ionization or a single cluster of ionization, as the inactivation follows a simple exponential curve.

(3) The inactivation doses (the 37% doses) were estimated from the above-mentioned curves, to be approximately $28 \times 10^4 \text{r}$ in the case of preparations of 0.2% and $2 \times 10^4 \text{r}$ in the occasion of 0.02%.