伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV) の濃縮と精製について

福田穎穂*¹・周 信佑*¹・伴 文彦*²
西村定一*³・佐野徳夫*¹

(*¹東京水産大学, *²相互生物医学研究所,
*³東海区水産研究所陸水部)

IHNV の精製については LEONG ら¹⁾の報告, また, VHSV の濃縮と精製については de KINKELIN²⁾, OLBERDING and FROST³⁾ の報告がある。いずれも精製にショ糖濃度勾配遠心法あるいは塩化セシウムによる密度平衡遠心法を用いているが, 濃縮の段階では de KINKELIN および OLBERDING and FROST はポリエチレングリコール (PEG)-6,000 による沈澱法を, LEONG らはグリセリンのクッションを用いた超遠心法を採用している。また, ALBERTSON⁴⁾ は水性二相分配法を用いてウイルスの濃縮をした後, 水溶性ポリマーを取り除くために, 15,000 rpm の高速遠心を用いウイルスを沈澱させている。著者らは IHNV を PEG-6,000 および 18,500 g (15,000 rpm) の高速遠心で濃縮した後, LEONG らの方法で精製することによって良好な結果を得た。以下にその概要を報告する。

供試ウイルス種は IHNV・HV 7601 株とし, FHM 細胞に M.O.I. 10^{-3} TCID₅₀/cell で接種し, 15°C で培養し

表 1 ポリエチレングリコール (PEG)-6,000 による IHNV 濃縮時の再懸濁用緩衝液検討結果*¹

緩衝液の種類	再懸濁後のウイルス 感染価 ($\times 10^8$ TCID ₅₀ /ml)	回収率
PBS (—)	7.1	82%
NTE	2.4	28%
NTE+1% PEG-6,000	8.5	98%
NTE+0.2% DS* ²	7.4	85%
NTE+0.4% BSA* ³	7.6	87%
10 mM Tris・HCl pH 7.76	8.3	95%
Hank's BSS	6.9	79%
MEM-10	6.7	77%
MEM-2	7.6	88%

*¹ 感染価 8.7×10^7 TCID₅₀/ml の IHNV 培養液を PEG 処理し, 生じた沈澱をそれぞれの溶液 (原液の 1/10 量) で再懸濁して感染価を測定した。PEG 処理の方法については図 1 を参照。

*² デキストラン硫酸

*³ 牛血清アルブミン

ウイルス培養液

↓ 4,000 g, 10 分間遠心

上清

↓

6.5% PEG-6,000, および 2.3% NaCl を加え溶解, 2 時間~1 夜攪拌後 3,000 g, 30 分間遠心

沈澱

↓

1/10~1/30 量*の 0.01 M Tris・HCl に再懸濁 4,000 g, 10 分間遠心

上清

↓

18,500 g, 150 分間遠心

沈澱

↓

1/100~1/300 量の Tris・HCl に再懸濁 4,000 g, 10 分間遠心

上清

↓

ショ糖不連続密度勾配遠心, 80,000 g, 90 分間

ウイルスバンド

↓

脱ショ糖・濃縮 (160,000 g, 30~60 分間)

沈澱

↓

1/300~1/900 量の Tris・HCl に再懸濁 4,000 g, 10 分間遠心

上清

↓

ショ糖連続密度勾配遠心, 61,000 g, 30~45 分間

ウイルスバンド

↓

脱ショ糖・濃縮 (160,000 g, 30~60 分間)

沈澱 (最終サンプル)

図 1 IHNV の濃縮と精製法

* Tris・HCl の液量はいずれも培養液量からの換算値で表した。

た後, 濃縮・精製に供した。各ウイルス培養液の感染価は, 概ね $10^{8.3} \sim 10^{9.3}$ TCID₅₀/ml であった。濃縮・精製の手順を図 1 に示す。

ウイルスベレット再懸濁用溶液の検討結果を表 1 に示す。多くのウイルスに用いられ, OLBERDING and FROST も VHS ウイルスの精製で用いた NTE (0.1 M NaCl, 10 mM Tris・HCl pH 7.4, 1 mM EDTA) 緩衝液ではウイルスの収量が極めて低かった。しかしながら, NTE 緩衝液に PEG, デキストラン硫酸 (DS) あるいは牛血清アルブミン (BSA) を加えることによって収量が増すことが判明し, これらの物質が IHNV の安定化作用を有しているものと考えられた。ウイルス精製の目的からすれば, 懸濁用溶液はできるだけ単純なものが良いと考えられることから, 以後の操作では 0.01 M Tris・HCl, pH 7.76 を採用した。PEG 処理後は 10~30 倍に, 18,500 g の遠心の後には 100~300 倍に濃縮したが, この段階までの IHNV の収量はほぼ 100% ときわめて高かった。また, LEONG らは STE (0.15 M NaCl, 0.05 M Tris・HCl, 10 mM EDTA, pH 7.0) を再懸濁用ならびにショ糖溶解用の緩衝液として用いるが, 我々の結果ではこの

図2 精製した IHNHV および HRV の SDS-PAGE 像。1: IHNHV, 2: HRV, 右側のアルファベットは各構成タンパクの名称を示す。泳動条件: ミニゲル装置を用い, ゲル濃度 11%, 25 mA の定電流で約 3 時間泳動後, 銀染色を施した。G タンパクは染色後酢酸溶液に浸漬すると, 急速に退色する。

緩衝液を用いた場合, 精製段階でのウイルスバンドの形成が Tris・HCl を用いた場合に比べ微弱であり, 収量が低いものと判断された。

シヨ糖連続濃度勾配遠心後の超遠心によるペレットを精製の最終サンプルとし, LAEMMLI⁵⁾ の溶解液 (0.0625 M Tris・HCl: pH 6.8, 2% SDS, 10% グリセリン, 5% 2-mercaptoethanol, 0.001% BPB) に溶解して SDS-PAGE に供した。図2に精製 IHNHV の SDS-PAGE 像を示す。図に示されるように構成タンパク以外の夾雑物はほとんど認められない。超遠心と低速遠心とを交互に組み合わせた分画遠心は, 従来ウイルスや細胞小器官

の精製に用いられてきた方法である。我々は各精製段階の再懸濁液に 4,000 g の低速遠心を行い, 精製度の向上を計った。ここではデータは示さないが, この低速遠心を省略するとウイルスの回収率は向上するものの, ウイルス構成タンパク以外のタンパクがかなり混入して来る。また, 本精製法は他の魚類ラブドウイルス EVA(Eel Virus America)⁶⁾, EVEX (Eel Virus Europe X)⁷⁾ ならびに HRV (Hirama Rhabdovirus)⁸⁾ にも使用が可能であった。図2には精製 HRV の SDS-PAGE 像も示した。

本法で精製した IHNHV を免疫原として家兎に接種して得た抗血清は, FHM 細胞で一回吸収することによって蛍光抗体法にも充分使用でき, Western blot 法においても細胞溶解物との反応は認められなかった。Western blot 法ならびに蛍光抗体法の結果については他の機会に報告する。

引用文献

- 1) LEONG, J. C., Y. L. HSU, H. M. ENGELKING, and D. MULCAHY (1981): *Dev. Biol. Standard*, **49**, 43-55.
- 2) de KINKELIN (1972): *Ann. Rech. Veter.* **3**, 199-208.
- 3) OLBERDING, K. P. and J. W. FROST (1975): *J. Gen. Virol.* **27**, 305-312.
- 4) ALBERTSON, P.-A. (1967): in "Method in virology", Vol. 2, pp. 303-321.
- 5) LAEMMLI, U. K. (1970): *Nature*, **227**, 680-685.
- 6) SANO, T. (1968): *Fish Pathol.*, **10**, 221-226.
- 7) SANO, T., T. NISHIMURA, N. OKAMOTO, and H. FUKUDA (1977): *Bull. Jap. Soc. Fish.*, **43**, 491-495.
- 8) KIMURA, T., M. YOSHIMIZU, and S. GORI (1986): *Dis. Aquat. Org.*, **1**, 209-217.

(昭和 63 年 12 月 7 日受付)