B. S. B. Bornholm disease in children. Brit. M. J. 1 : 1351, 1953. 20) Swain, R. H. A., and Mitchell, R. G. The isolation of a Cocksackie virus from two cases of Bornholm disease. Brit. M. J. 1 : 1354, 1953. 21) Warin, J. F., Davies, J. B. M., Sanders, F. K. and Vizoso, A. D. Oxford epidemic of Bornholm disease, 1951. Brit. M. J. 1 : 1345, 1953. 22) Lépine, P., Desse, G. et Sautter, V. Biopsies musculaires avec examen histologique et isolement du virus coxsackie chez l'homme atteint de myalgie épidémique (Maladie de Bornholm). Bull. Acad. nat. Méd., Paris. 136 : 66, 1952. 23) 福見秀雄, Cocksackie ウィールスについて. 医学のあゆみ 14 : 270, 昭. 27. 24) Pappenheimer, A. M., Kunz, L. J., and Richardson S. Passage of Cocksackie virus (Connecticut-5 strain) in adult mice with production of pancreatic disease. J. Exper. Med., 94 : 45, 1951. 25) Pappenheimer, A. M., Daniels, J. B., Cheever, F. S., and Weller, T. H. Lesions caused in suckling mice by certain viruses isolated from cases of so

called non-paralytic poliomyelitis and of pleurodynia. J. Exper. Med. 92 : 169, 1950. 26) Gifford, R. and Dalldorf, G. The morbid anatomy of experimental Cocksackie virus infection. Am. J. Path. 27 : 1047, 1951. 27) Godman, G. C., Bunting, H. and Melnick, J. L. The histopathology of Cocksackie virus infection in mice. I. Morphologic observations with four different viral types. Am. J. Path. 28 : 223, 1952. 28) Gödeke, R. Kidney lesions in suckling mice following group A Cocksackie virus infection. Arch. Path. 54 : 276, 1952. 29) 小田塚三, Cocksackie virus 接種哺乳マウスの病理組織学的変化(岡山医学会第63回総会発表要旨) 岡山医学会雑誌 65巻 2号別巻掲載 30) Beeman, E. A., Huebner, R. J., and Cole, R. M. Studies of Cocksackie viruses. Laboratory aspects of group A viruses. Am. J. Hyg. 55 : 83, 1952. 31) Melnick, J. L. and Ledinco, N. Immunological reactions of the Cocksackie virus. I. The neutralisation test : Technic and application. J. Exper. Med. 92 : 463, 1950.

超遠心機による牛痘ウィルスの分析

沢井芳男* 田中光* 中村正好**

YOSIO SAWAI, HIKARU TANAKA, MASAYOSI NAKAMURA: ULTRA-CENTRIFUGAL ANALYSIS OF THE VACCINIA VIRUS.

(受稿 5月30日 1955)

牛痘ウィルスは Paschen(1906)により基本小体として指摘されたが、その後 MacCallum等(1922)はこの基本小体がウィルスそのものであることを証明するために感染組織の不要の成分を分割遠心により除去しようと試みた。次に Ledingham(1931)はウサギの皮膚に感染したウィルスを材料として遠心機によるウィルスの分離精製を試みた。この分離遠心法は Craigie(1932)及び Parker等(1935)により完成され、高度に純化された試料がえられるようになった。ついでこれらの試料は、いろいろな方法でその純度が検討されてきたが、その中で Amies(1938), Pickels等(19

38), Smadel等(1938, 1939), Beard等(1938)及び McFarlane等(1939)は超遠心機による分析を行った。測定された沈降常数 s は研究者により $s_{20} = 4910S$ と決定された。

このようにして分割遠心によるウィルスの精製の研究により、さらに牛痘ウィルスの免疫学的活性、物理化学的性質、電子顕微鏡による観察あるいは化学構造に関する多くの研究が促進された。

さきに沢井等(1953)は、分割遠心法による牛痘ウィルスを精製し、その凝集反応を電子顕微鏡によつて追及したが、その後試料の精製度を知るために沈

* 東京大学伝染病研究所

** 東京大学理工学研究所

降常数 s の測定を行つたところ、ウイルス粒子よりはるかに小さい粒子が混入してくることがわかつたので、もつと純度の高い試料をうるために以下の実験を行つたので、ここにその大要を報告する。

実験材料及び方法

1. 牛痘ウィールスのウサギの臍丸苗(1947年、伝研長野博士より分与)をウサギの皮膚に継代したものを材料とし、本実験には皮膚継代60ないし70代の材料を用いた。そのほかウナギの皮膚苗をウシに接種し、第5日目の皮膚材料すなわち粗痘苗をも用いた。

2. 皮膚株をうるには、Parker等(1935)の方法に従つて、ウサギの背中中の皮膚の毛を刈り、硫化バリウムで脱毛し、金属ブラシで軽く傷をつけ、その上に臍丸苗の生理食塩水10%乳剤を滅菌した脱脂綿にしたし、ピンセットにはさみ、軽く皮膚面をこする。感染した皮膚は次第に発赤と発痘をみるが、72時間後に耳静脈に5.0mlの空気を注射して殺し、登痘した皮膚をきりとり、台の上に張り、釘で固定した後、エーテル10mlを滴下し、脱脂綿でかるくふきとる。次に0.004モル(pH7.0)のクエン酸、磷酸ソーダ緩衝液15mlを滴下して、ナイフのへりで発痘をつぶすようにしてかきあつめながら駒込ピペットで吸いあげて遠心管にあ

つめたのち、もう一度15 mlの磷酸緩衝液で同じことを繰り返かし、3,000rpm 5分遠心し、その上清を他の遠心管にうつし、沈澱は10 mlに再浮遊し前と同じ遠心を行い、その上清を前のものとあわせて5°C 24時間または48時間抽出し、もう一度3,000 rpm 5分遠心し、その上清を分割遠心の試料とした。また継代の材料にはこのほかに、さらに分割遠心により精製したものをを用いた。

3. 分割遠心には超遠心分離機(Spinco, Model L・ローターNo. 40)を用いて分割遠心をくりかえし、試料の精製と濃縮を行つた。遠心操作はすべて低温で行い沈澱の再浮遊には前にのべた磷酸緩衝液を用いた。

4. 沈降常数 s の測定は空気駆動の分析用の遠心機^{*}を用い、3,000 rpm で回転し、粒子の沈降状況を知るために7分ごとに撮影しその結果から沈降常数を算出した。(本測定には文献13を参考にした。)

実験成績

1. ウィールスは継代60代のウサギの皮膚株を用い、分割遠心の試料として2匹のウサギから約40mlをえた。分割遠心の高速は初めは13,000rpm 20分、その沈澱を10mlに再浮遊し、次回は12,000 rpm 20分、その沈澱を10mlに再浮遊し、低速3,000 rpm 20分、その

Fig. 1, a

b

c

d

e

* 超遠心機の製作と、それによる蛋白質及びウィールスの研究特別委員会で試作され、現在東京大学理工学研究所に設備されている。

上清を第3回高速12,000rpm 25分、その沈澱を1mlに再浮遊し低速3,000rpm 40分の上清(試料1)を沈降常数 s の測定に用いた。

s の測定値は $s_{20}=5,500 S$ の比較的界面のはつきりした牛痘ウイルス分割と思われるもののほかに $s_{20}=1,300 S$ の成分がかなり大きい比率で含まれていることが見出された(図1, a) 傾斜した遠心管内おかれた浮遊液中の粒子が遠心力によつて沈降するばあい、実際には種々複雑な現象が起つて厳密には簡単な取扱いはできないのであるが、粒子が水平方向に理想的に沈降していくものとすれば、粒子の移動距離 Δx と沈降常数 s 、遠心力場の強さ G 、及び遠心時間 t の間に近似的に次の様な関係がある。

$$\Delta x = sGt$$

上に行つた実験で、不純物と思われる1,300 S のものは5,500 S の粒子が丁度沈降し終つた時に遠心が終るようにすれば比較的能率よく除去されるわけである。この様な条件を上の関係から次の様に求めた。すなわち牛痘ウィールス ($s=5,000S$) が2,400gの遠心力(No. 40のローターで6,000 rpmに相当する)で傾斜した遠心管の円筒部の両端の水平距離約2cmを移動す

るに要する時間を求めると、約30分であることがわかつた。

2. 上の条件にもとづいて次の実験を行つた。ウイルスは継代66代のウサギ皮膚試料の40 ml を用い、分割遠心の方法は図2に示した通りである。この方法ははじめに4,000 rpm 7分の低速遠心を行いその上清を6,000 rpm 30分、3回の高速遠心を行い、次に低速遠心を1回はさんで最後に高速遠心と低速遠心を行つた上清(試料2)を沈降常数の測定に用いた結果、 $s_{20}=5,400 S$ をえた(図1, b)。次にこの様な高速遠心の間に低速遠心をはさむことは、試料の純度は増すが、ウイルスの収量がわるくなるので、図2に示した通り初めと中途にはさんだ低速遠心の沈澱からウイルスを回収するために、さらにこれらをプールして分割遠心を行つた試料3について測定した結果、 $s_{20}=5,500 S$ の単一な界面を示す図型をえた(図1, c)。

3. 継代70代のウサギ皮膚の材料60mlを用い、2回の高速遠心後の沈澱を20 mlに浮遊し、第3回の高速遠心後の沈澱をさらに1mlに濃縮した(試料-4) その沈降常数の測定値は、 $s_{20}=5,100 S$ であつた(図1, d)

Fig. 2 Method of differential centrifugation

4. 次はウイルスの材料として痘苗に用いるウシの粗苗190gをpH 7.0の磷酸緩衝液でホモゲナイザーを用いて10%乳剤とし、2,000rpmないし3,000rpm 5分の遠心により、1500 mlをえた。この試料は量が多かつたことと、かなりの濁りを示したのでまずシャープ

レス遠心機を用いて部分的精製を行つた。まず32,000 rpm, 10ml/pmの流出速度でえた沈澱を1300 mlに浮遊し、これを10,000 rpm, 50ml/pmで遠心した上清をさらにもう一度分割遠心し、その上清の150mlをSpincoの超遠心機、ローター No.30を用いて4,000rpm 5分

の上清を6,000rpm 30分高速遠心し、その沈殿を15 ml に再浮遊し、次に低速遠心を行つてその上清について沈降常数を測定した。(試料5) 沈降常数は $s_{20}=1,300$ S で、そのほかに不正確ながら $s_{20}=4,200$ S の成分も認められた(図1, e) 従つてこの試料はウイルス以外の不純物を多く含んでいるためにウイルスの沈降常数の測定には不適當であつた。

考 察

ウサギの皮膚を用いて粗苗をつくるばあいには、われわれは24時間ないし48時間5°Cで抽出を行つた。これは Craigie 等の原法には記載されていないが、分劃遠心を行う際に高速遠心の沈殿から比較的容易に均等な浮遊液がえられたるためであつた。

分劃遠心の方法は Craigie の原法では、Angle centrifuge を用いて 3,500rpm, 50~60分、2回の高速遠心を行つているが、Parker 等は4,500rpm, 60分、3回を行つている。又 Hoagland 等(1940)は3,000rpm, 60分、3回を行つている。

沈降常数の測定を行つた Beard 等(1938)は4,200rpm, 45分、3回を用いて精製した試料で $s_{20}=5400$ S の単一界面の鋭い沈降図型をえている。又 Pickels 等(1938)は Craigie の方法で精製を行い25回の測定の平均値として4,900 S (最高5170S, 最低4,530 S) をだしている。McFarlane 等(1939)は Craigie に準じて実験を行い5,000 S を記録した。

われわれは Green 等(1942)が用いた様に Angle centrifuge のかわりに超遠心機を用いて分劃遠心に要する時間を短かくして能率をあげるために Spinco の超遠心機を用い、はじめに12,000rpm, 20分、3回の高速遠心を行つたが、この方法でえた精製試料は実験1にみられる様にウイルスより遙かに小さい粒子が不純物として含まれていることがわかつたので、この粒子をとり除くために6,000rpm (2400g) 30分の高速遠心に変えた結果、実験2, 3に示すような $s_{20}=5500, 5400, 5,100$ の値を示す単一の境界の比較的鋭い沈降図型をえた。この値はこれまで認められている牛痘ウイルスの沈降常数に一致しているものである。

このように精製度の高いウイルス液をうるためには適切な遠心速度が必要であることは明かであるが、もうひとつは適当なウイルスの感染組織を与えることである。すなわちそのひとつは個々に遊離したウイルス粒子の最も多い時期をえらぶことと もうひとつは感染

によつて、正常成分(normal component)あるいはウイルス粒子以外の成分が混入しないような時期を選ぶべきである。すなわちウサギの皮膚をかるくきずつけて、ウイルスを接種し、比較的早期の72時間にその発痘をかきとるのがそれである。ウシの粗苗を用いて失敗に終つたのは、粗苗がウシの皮膚のかかなり深いきずに接種され、また発痘は接種後5日目のものをかきあつめたものであるからで、感染後もつと早期に行えば、精製しよい材料がえられたのではないかと考えられる。

総 括

ウサギの皮膚の感染材料を用いて超遠心機(Spinco, L型)により分劃遠心し、精製された牛痘ウイルスの超遠心分析を行い、試料を調製するために適当な高速遠心の速度を決めた。次に精製試料につき沈降常数 s を測した結果、 5400×10^{-13} cm/sec/dine/g の値を示す比較的界面のはつきりした沈降図型をえた。

終りに臨み超遠心分析をするに当り、種々御助力をえた理工研川出由己氏に深謝する。

なお本研究は一部文部省科学研究費によつたことを附記して謝意を表する。

文 献

- 1) Amies C. R.: The production of homogeneous suspensions of vaccinia elementary bodies and the histology of the associated skin lesions. J. Path. & Bact., 47, 205, 1938.
- 2) Beard J. W., Finkelstein H. & Wyckoff R. W.: The pH stability of the elementary bodies of vaccinia. J. Immunol., 35, 415, 1938.
- 3) Craigie J.: The nature of the vaccinia flocculation reaction and observations on the elementary bodies of vaccinia, Brit. J. Exp. Path., 13, 259, 1932.
- 4) Craigie J. & Wishart F. O.: The agglutinations of a strain of vaccinia elementary bodies. Brit. J. Exp. Path., 15, 390, 1934.
- 5) Green R. H., Anderson T. F. & Smadel J. E.: Morphological structure of the virus of vaccinia. J. Exp. Med., 75, 651, 1942.
- 6) Hoagland C. L., Smadel J. E. & Rivers T. M.: Constituents of elementary body of vaccinia. I. Certain basic analysis and observations on lipid components of the virus. J. Exp. Med., 71, 737, 1940.
- 7) Hoagland C. L., Lavin G. I., Smadel J. E. & Rivers T. M.: Constituents of elementary bodies of vaccinia. II. Properties of nucleic acid obtained from vaccinia virus. J. Exp. Med., 72, 139, 1940.
- 8) Ledingham J. C. G.: The

aetiological importance of the elementary bodies in vaccinia and fowl-pox. Lancet, 221, 525, 1931. 9) McFarlane A. S., McFarlane M. G., Arnies C. R. & Eagles G. H.: A physical and chemical exmianation of vaccinia virus. Brit. J. Exp. Path., 20, 485, 1939. 10) Parker R. F. & Rivers T. M.: Immunological and chemical investigations of vaccinia virus. I. Preparations of elementary bodies of vaccinia. J. Exp. Med. 62, 243, 1935. 11) Parker R. F. & Rivers T. M.: Immunological and chemical investigations of vaccinia virus. IV. Statistical studies of elementary bodies in relation to infection and agglutination. J. Exp. Med. 64, 439, 1936. 12) Pickels E. G. & Smadel J. E.: Ultracentrifugation studies on the elementary bodies of vaccine virus. I. General methods

and determination of particle size. J. Exp. Med. 68, 583, 1938. 13) 佐々木重雄編: 超遠心機とそれによる蛋白質およびウイルスの研究, 日本学術振興会刊 (1954) 14) Sawai, Y. & Noda, S.: Studies on the agglutination of the vaccinia virus by the electron microscope. Japan. J. Exp. Med., 23, 357, 1953. 15) Smadel J. E., Pickels E. G., & shedlovsky T.: ultracentrifugation studies on the elementary bodies of vaccine virus. II. The influence of sucrose, glycerol, and urea solution on the physcal nature of vaccine virus. J. Exp. Med., 68, 607, 1938. 16) Smadel J. E., Rivers T. M. & Pickels E. G.: Estimation of the purity of preparations of elementary bodies of vaccinia. J. Exp. Med., 70, 379, 1939.

新生児肺炎ウイルス(HVJ仙台型)の研究

第5報 抗体分布

菊 地 浩*

HIROSHI KIKUCHI: NEWBORN VIRUS PNEUMONITIS (HVJ, TYPE SENDAI) 5TH REPORT

(受稿 6月3日 1955)

昭和27年3月, 当教室に於て, 新生児肺炎患児より病原体と思われる一新ウイルスを分離したが、その後教室に於ては、本ウイルスにより生ずる患児病変の組織学的所見³⁾及びその後⁴⁾に得られた散発例よりのウイルスの再分離、等主としてこのウイルスの人体殊に新生児に於ける感染、発病性について種々研究を継続中である。他方当教室白取は、福見博士の指導により本ウイルス分離当時既にマウスより本ウイルスと血清学的に同一と考えられる赤血球凝集性ウイルスを分離して⁵⁾居り、その後⁶⁾深井はマウスより、笹原、渡辺はマウス及び豚より同様のウイルスを分離して居り、笹原は豚に於ても殆ど全国的にこの新ウイルスの浸潤を認めている。斯くの如く本ウイルスは動物間にも広く分布する新病原体である事が漸次明らかになりつつあるが、吾々は更に本ウイルスによる人間の顕性又は不顕性の

感染の有無を知る目的で、人血清中の赤血球凝集抑制抗体を全国的に調査する計画を立て、本ウイルス分離当初に行つた仙台塩釜地区及び宮城県の一部の調査に引続き、昭和29年5月より30年3月に至る約10ヶ月間に、仙台市及び宮城県山間一地区の年令別抗体分布を調査すると共に、少数例宛ではあるが、殆ど全国各地より送附を受けた人血清についても本ウイルスに対する抗体価を調査する事が出来たので、その結果を報告し、御批判を仰ぎたい。

尙本ウイルスは第3回日本ウイルス学会総会に於てHVJ (Hemagglutinating Virus of Japan) と命名する事に決定したので、以下吾々の分離したウイルスをHVJ (仙台型) と略称する事にする。

1) 実験方法

* 東北大学医学部細菌学教室 (主任 黒屋政彦教授)