原 著

マウス脳脊髄炎ウイルス GD VII 株の 精製実験に関する研究 (1)*

エーテル抽出・血球吸着誘出及びメタノール・アセトン沈澱法による実験

中 川 洋** 中 村 昌 弘**

YOH NAKAGAWA AND MASAHIRO NAKAMURA: PURIFICATION AND CONCENTRATION OF GDVII STRAIN OF MOUSE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS, I. PURIFICATION AND CONCENTRATION OF GDVII VIRUS BY MEANS OF ETHER EXTRACTON, ADSORPTION AND ELUTION WITH ERYTHROCYTES, AND METHANOL, ACETONE PRECIPITATION

〔受稿 6月13日 1955〕

インフルエンザウイルスが鶏赤血球を凝集することを Hirst が発見して以来、他の多くのウイルスにも同様の性質が存在することが知られ、向神経性ウイルス⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾の血球凝集性についても。すでに若干の報告がある。

また、この性質を利用して、ウイルスを先ず血球に吸着せしめ、血球と共に沈下したあと上層の非ウイルス材料を除去し、次に血球よりウイルスを誘出せしめることによつて、ウイルスの精製或は濃縮を試みようとする企てもあり、インフルエンザ・ウイルスをはじめ、その他のウイルスについて可成の成果を挙げている。マウス脳脊髄炎ウイルス GDVII 株も 4C⁽⁴⁾において人 O 型血球を凝集する性質を有しているので この性質を利用することによる GDVII ウイルスの精製もすでに報告されているところである。ところがこの実験を追試してみると、血球よりウイルスを濃縮誘出する場合その濃縮度の高いほど、血球の溶血を惹起し、ウイルスは予想通りの濃縮が行われているに拘らず、得られた終末産物の総窒素量の溶血による増加が認められ結果として総窒素量の除去が行われないことになり、精製濃縮が思わしくない成績として表われることになった。ここに述べようという報告はその点の検討と、こ

れに種々の方法を加えて、より良きウイルスの精製方法について吟味を行つたものである。

実験材料並びに方法

ウイルス：本実験に供試した GDVII ウイルスは、1951年12月シカゴ大学細菌学寄生虫学教室より著者の一人中川が直接分与をうけ、当教室において成熟マウス脳内接種により保存中のものである。ウイルス浮游液としては感染兆候が出現し、瀕死の状態となつた感染マウスを屠殺し、その感染脳を無菌的に剔出、滅菌ガラス管に封入、-20℃に保存。実験直前に乳鉢にて充分に細性、生塩水 (pH 7.0) を以つて 10% 乳剤を作製。3,000r.p.m. 5 分間の遠心沈澱後の上清を出発材料として常に使用した。

血球吸着・誘出法：出発材料に等量の 3 回生塩水洗浄人 O 型血球生塩水浮游液を加え、この混和液を氷水中で 5 分毎に軽く振盪しつゝよく混和し、この操作を約 1 時間行つた後、そのまま、4℃に保つて一定時間後、低速遠心沈澱を施すか、或は遠心沈澱を行わずに血球を分離し、その血球を冷生塩水を以つて 4℃の条件下で 1 回洗滌、その洗滌血球にウイルス誘出のための

*本研究は文部省科学研究費によつて行われた **久留米大学医学部細菌学教室

溶液を所定量加え、37℃中にて1.5乃至2時間血球吸着ウイルスの誘出を行う。その間、時折軽く振盪した。誘出が完了したと思われる時間が経過したならば、これを3,000r.p.m, 15分間遠心沈澱し、血球を除去して、ウイルス液を得る。

^{7,9)}
エーテル抽出: エーテル・エーテルと出発材料を3:5の割合に混和し、充分に攪拌、一定時間後、4℃中にて3,000r.p.m, 15分により2層に分ち、エーテル層をピペットにて除去。下層に含まれるエーテルを吸引ポンプによる排気によつて除くこと約1時間。これをエーテル抽出液とした。

^{8,9,10,11,14)}
メタノール沈澱法: 血球吸着・誘出を行つて、ある程度の不要蛋白を除去したウイルス液をN/10塩酸にてpH5.6に補性したのち、-20℃に冷却された精製メタノールを毛細管ピペットで一滴宛加え、その度毎によく混和し、所要の濃度に達せしめる。このメタノール混和ウイルス液を所要時間、4℃に保ち、9,000r.p.m, 15分遠心沈澱によつて上清のメタノールを除去、沈渣にウイルス誘出のための溶液を所要量加え、充分に沈渣の再浮游を行つたのち、再び9,000r.p.m, 15分遠心沈澱によつて水不溶性部分を除去したものを終末産物とした。これらの遠心操作はすべて0℃以下にて行つた。

⁷⁾
アセトン沈澱法: 如上のメタノール沈澱法に準ずるが、この場合はpHの補性は行わず、pH 7.0にて行つ

窒素量測定: 供試材料中に含有される総窒素はmicro-Kjeldahl 法によつて測定され、ウイルス精製度の判定は1mgN中に含有されるHATによつて行われた。

実 験 成 績

I. エーテル抽出による不要窒素の除去

出発材料にエーテルを混和して、その抽出による総窒素量の減少率とHATとの関係を検討した。この際、エーテルを加えてからの作用時間を10, 30, 及び60分について観察すると、第1表の如くで、HATを減少することなく、窒素量を減少したところの作用時間は30分であつた。これによつて40%の窒素を減らし得た。60分作用ではHATに傷害を及ぼしたと思われる。従つて以降の実験には出発材料を先ずエーテルで抽出して窒素を減少させたのち、種々の処置を施して実験を進めた。

II. エーテル抽出、血球吸着・誘出によるウイルスの精製濃縮実験

出発材料をエーテルで処置したあと、これに等量の人O型血球浮游液を加えて、4℃で1晩ウイルスの吸着を行い、上清を捨て、血球に生塩水を加えて、37℃で2時間処置、ウイルスの誘出を行つて、ウイルスの精製濃縮を試みたのが本実験である。この実験を行うに当つては、予めウイルスを完全に吸着する血球の至適濃度と至適時間の決定を行う必要があり、それにつ

Table I. Removal of nonviral nitrogen by extraction of ethyl ether in the partial purification of GD VII virus

Time of extraction of ether (minute)	Hemaggl. titer		r N per ml		
	Crude	Ether extraction	Crude	Ether extraction	% removal N
10	5120	5120	896.0	596.4	33.5
30		5120		536.2	40.2
60		1280		568.4	36.2

た。

血球凝集反応: ウイルスの血球凝集価(HAT)の測定はインフルエンザの場合に準ずるが簡単に記載すればLahelle and Horsfallによる次の方法である。即ち生塩水による2倍稀釈ウイルス液と0.3%人O型血球生塩水浮游液とをよく混和し、4℃下(氷水中)にて約2時間反応を行い、管底における血球凝集の起つたウイルス最高稀釈濃度を以つて、供試ウイルス材料のHATとした。

いては1.5 及び 10%血球浮游液を用い、そのウイルス吸着時間については2,4 及び 18時間について各々検討を加えた。その結果は1%血球浮游液では18時間の作用にもウイルスを完全に吸着しえなかつたため、それは血球量の不足であり、5%血球浮游液では4時間作用では尚、上清にウイルスの存在をみとめるが、18時間では上清のHATは零を示し、完全に吸着されたことを意味した。10%血球浮游液では4時間以上の作用において、何れも完全なるウイルスの吸着が行われた。

しかし、実験操作の都合上、以下、5%血球浮游液を用い、1夜(約18時間)氷水中にてウイルスの吸着を行うこととした。さてこのような操作によつてウイルスを吸着した血球から、ウイルスを誘出して精製濃縮を試みた成績は第2表の如くである。この成績によれば先ずエーテル抽出によつて、HATの損耗を見ることなく、窒素を約40%除去し得、次に血球吸着・誘出によつて原量に誘出した場合には更に窒素量の減少を99.8%まで来することが出来、1mgN当りのHATが1,000倍

依然として生塩水を用いて誘出を行つた。

Ⅲ. メタノール沈澱法におけるメタノール添加量の検討

血球吸着・誘出を行つてウイルスを先ず原量の1/5に濃縮したものについて、冷却(-20°C)精製メタノールを1滴宛混和しつつ添加して、その終末濃度が25, 30, 35, 40及び50%になるようにして、至適メタノール添加量を決定した実験が本項である。なお、この実験ではメタノール沈澱物よりのウイルス浮游液として

Table II. Purification and concentration of GD VII virus by ether extraction, adsorption and elution procedure

Material	% Red cells	Adsorption time (hour)	Expected conc.	Hemaggl. titer			Observed conc.	r N per ml			% removal N	Hemagglutination units/mg N		
				Crude	Ether extr.	Purified		Crude	Ether extr.	Purified		Crude	Ether extr.	Purified
Virus	5	18	5	1280	1280	5120	4	784.4	410.4	31.6	96.0	1x10 ^{3.5}	1x10 ^{3.7}	1x10 ^{5.5}
Virus	5	18	10	1280	1280	20480	16	〃	〃	86.2	89.0	1x10 ^{3.5}	1x10 ^{3.7}	1x10 ^{5.7}
Virus	5	18	1	1280	1280	1280	1	〃	〃	1.5	99.8	1x10 ^{3.5}	1x10 ^{3.7}	1x10 ^{6.2}
Normal brain	5	18	5	0	0	0	0	918.4	414.4	28.0	97.0			

近く得る上昇され、しかし、表に現われているようにこの方法による濃縮実験においては、原量誘出の場合に比して終末産物の窒素減少が良好でない。この原因は濃縮度を増せば増すほど、誘出液による溶血を来すからである。従つて、誘出液として用いた生塩水が不適当な為かと考え、生塩水の外に M/15, 2M/10 及び 3M/10 Sørensen buffer を用いて誘出濃縮を試みたが、何れも予期の成績をえなかつたので結局、以下、

生塩水と磷酸緩衝生塩水を試みに使用した。成績は第3表の如く、先ず、血球吸着・誘出法による1/5濃縮によつて、理論値5倍を超過して8倍の濃縮が認められたが、窒素量の減少は90%程度で良好とは考えられない。そこで、この中に含有される窒素を除去すべくメタノール処置を4°Cにて4時間行くと、メタノール添加量30%の場合に窒素量の減少並に或る実験群ではそれに加うるに HAT の上昇を認め、1mg N当りの

Table III. Determination of final concentration of methanol for methanol precipitation in concentration of GD VII virus after adsorption and elution procedure with erythrocytes*

Final conc. of methanol	Eluant from methanol precip	Expected conc.	Hemaggl. titer			Observed conc.	r N per ml			% removal N	Hemagglutination units/mg N		
			Crude	Eluted from blood	Purified		Crude	Eluted from blood	Purified		Crude	Eluted from blood	Purified
25%	Saline	5	2560	20480	10240	4	842.8	106.4	72.8	91.4	1x10 ^{3.8}	1x10 ^{5.6}	1x10 ^{6.4}
30%	〃	5	〃	〃	40960	16	〃	〃	11.2	98.7	〃	〃	1x10 ^{6.9}
30%	Phosph buff. saline	5	5120	40960	40960	8	940.8	28.0	2.8	99.7	1x10 ^{4.0}	1x10 ^{6.5}	1x10 ^{7.5}
35%	〃	5	2560	20480	20480	8	842.8	106.4	14.0	98.4	1x10 ^{3.8}	1x10 ^{5.6}	1x10 ^{6.5}
40%	〃	5	〃	〃	10240	4	〃	〃	11.2	98.7	〃	〃	1x10 ^{6.3}
50%	〃	10	640	5180	2560	4	907.2	120.4	2.8	99.7	1x10 ^{3.1}	1x10 ^{4.9}	1x10 ^{6.3}

* The crude were adsorbed with 5% human Group O blood cell suspension for 18 hours in the cold, and then were eluted in 1/5 of original volume. Chilled methanol was added to the material eluted from blood cell, and this mixed solution was kept for 4 hours in the cold.

HATが1,000倍以上に高められた成績をえた。一部に認められたHATの上昇はメタノール沈澱法によつて、HAT 阻止物質が除去されたとも考えられよう。

本実験においては予めメタノールを添加する際の沈澱効果と被添加ウイルス材料のpHとの関係について、pH6, 7及び8にウイルス材料を補性して実験を行つたが、pH6に於て最もよく沈澱され、pH8においてはその効果不良の事を確めたので、メタノール沈澱を行う場合には被添加ウイルス材料をpH6に補性した後、メタノールを30%になるように添加した。

IV. メタノール沈澱法におけるメタノール作用時間の検討

血球吸着・誘出法によつて、ウイルスを1/5に濃縮したものに冷メタノールを30%の割になるように加

え、蛋白沈澱を行つたのち、その沈澱物を1/2量即ち原量の1/10量に生塩水に浮遊させて、ウイルスの濃縮精製を計つた本実験に於ては、メタノールを作用させる時間、換言すればウイルスを完全に沈澱させるに要する時間の検討を3,5及び7時間について行つた。成績は第4表に示す。これによれば3時間のメタノール作用ではウイルスの完全な沈下と理論値の3倍の濃縮が出来た場合もあつたが、沈下の不充分のこともあり、いずれの場合も窒素の減少率とHATとを総合的に考慮に入れれば、3時間作用よりも、5及び7時間作用においてより良き成績がえられる。即ちHATが32倍に濃縮され、窒素は99%に減少し、1mg N当りのHATが1,000倍以上に高められた。

Table IV. Determination of contact time of methanol with virus material for methanol precipitation in concentration of GD VII virus after hemagglutination

Contact time of methanol (hour)	Final conc. of meth.	Eluent from meth. precp	Expected conc.	Hemaggl. titer			Observed conc.	r N per ml			% removal N	Hemagglutination units/mg N		
				Crude	Eluted from blood	Purified		Crude	Eluted from blood	Purified		Crude	Eluted from blood	Purified
3	30%	Saline	10	2560	20480	5120	2	840.0	152.6	14.0	98.4	1x10 ^{3.8}	1x10 ^{4.5}	1x10 ^{5.9}
5	"	"	"	"	"	10240	4	"	"	12.6	98.6	"	"	1x10 ^{6.2}
7	"	"	"	"	"	81920	32	"	"	8.4	99.0	"	"	1x10 ^{7.3}
3	"	"	"	"	10240	81920	32	1064.0	133.0	16.4	98.4	1x10 ^{3.7}	1x10 ^{5.2}	1x10 ^{7.0}
5	"	"	"	"	"	81920	32	"	"	8.4	99.2	"	"	1x10 ^{7.3}
7	"	"	"	"	"	20480	8	"	"	22.4	97.9	"	"	1x10 ^{6.3}

Table V. Effect of eluant for virus from methanol precipitate* in concentration of GD VII virus after hemagglutination

Eluant	Expected conc.	Hemaggl. titer			Observed conc.	r N per ml			% removal N	Hemagglutination units/mg N		
		Crude	Eluted from blood	Purified		Crude	Eluted from blood	Purified		Crude	Eluted from blood	Purified
Aq. dest	20	1280	20480	163840	128	933.2	154.0	25.2	97.4	1x10 ^{3.4}	1x10 ^{5.4}	1x10 ^{7.1}
Saline	20	"	"	40960	32	"	"	25.2	97.4	"	"	1x10 ^{6.5}
M/15 buffer	10	2560	81920	81920	32	1204.0	224.0	22.4	98.2	1x10 ^{3.6}	1x10 ^{5.9}	1x10 ^{6.9}
M/10 buffer	10	"	"	5120	2	"	"	33.6	97.2	"	"	1x10 ^{5.5}
2M/10 buffer	10	"	"	640	1/4	"	"	47.6	96.1	"	"	1x10 ^{4.4}
Normal brain	10	0	0	0	0	904.4	114.8	8.4	99.1			
Aq. "	10	0	0	0	0	"	"	67.2	92.6			
Saline												

* Conditions of methanol precipitation : Final conc. of methanol : 30%, exposed time : 6 hours.

V. メタノール沈澱法におけるメタノール沈澱物よりのウイルス誘出条件の検討

血球吸着・誘出法により 1/5 量に濃縮されたウイルス液を pH 5.6 に補性したのち、メタノールを 30% の割になるように加え、6 時間、4 °C に保つてメタノールによる沈澱を行つて、その沈澱よりのウイルスの誘出を試みる場合の誘出液について、Aq dest, 生塩水、M/15, M/10 及び 2 M/10 Sørensen buffer を用いて検討した。得られた結果は第 5 表として示すが、これによれば、1/20 量濃縮を行つた場合、Aq dest によつて、128 倍の濃縮を認めた。生塩水を用いた時でも 32 倍の濃縮を認め、出発材料と精製材料との 1mg N 当り HAT の差が $1 \times 10^{3.7}$ であつた。緩衝液については M/15 のものが生塩水と大差なく、Mol 濃度が高まるにつれて、HAT の減少を来した。この所見はインフルエンザ・ウイルスの場合と趣を異にした。

物からの誘出に際しての誘出剤の検討を試みたが、メタノール沈澱法の場合と同様、Aq dest による誘出がもつとも良好な効果をおさめ得た。

総括並びに考按

ウイルスの血球吸着及びその血球よりの誘出という生物学的特性を利用して、ウイルスの精製並に濃縮を試みる手段は簡単にして、しかも極めて効果的な方法である。GDVII ウイルスは 4 °C において人 O 型血球に吸着し、37 °C においてその血球より遊離して来る性質があり、その本態についての研究も若干みられるが、この性質を利用する本ウイルスの精製に関する報告もすでに先人⁵⁾によつて発表せられている。

しかしながら、この実験を行つてみると、以上述べ

Table VI. Purification and concentration of GD VII virus by means of acetone precipitation after hemagglutination

Final conc. of Acetone	Contact time to Acetone (hour)	Eluant from Acetone precip.	Expected conc.	Hemaggl. titer			Observed conc.	r N per ml			% removal N	Hemagglutination units/mg N		
				Crude	Eluted from blood	Purified		Crude	Eluted from blood	Purified		Crude	Eluted from blood	Purified
25	2.5	Saline	10	2560	81920	640	1/4	1204.0	224.0	5.6	99.6	$1 \times 10^{3.6}$	$1 \times 10^{5.9}$	$1 \times 10^{6.4}$
30	"	"	10	"	"	1280	1/2	"	"	8.4	99.3	"	"	$1 \times 10^{5.5}$
35	"	"	10	"	"	2560	1	"	"	11.2	99.2	"	"	$1 \times 10^{5.7}$
40	"	"	10	"	"	20480	8	"	"	16.8	98.2	"	"	$1 \times 10^{6.4}$
50	0.5	Aq	10	1280	20480	81920	64	1036.0	229.6	28.0	97.3	$1 \times 10^{3.4}$	$1 \times 10^{5.3}$	$1 \times 10^{6.8}$
50	"	"	20	"	"	81920	64	935.2	154.0	58.8	93.8	"	$1 \times 10^{5.4}$	$1 \times 10^{6.4}$
50	"	Saline	10	"	"	20480	16	10360	229.6	36.4	96.5	"	$1 \times 10^{5.3}$	$1 \times 10^{6.1}$
50	"	M/10 buffer	10	"	"	5120	2	"	"	37.8	96.4	"	"	$1 \times 10^{5.4}$
Normal 50	"	Aq	10	0	0	0	0	904.4	114.8	2.8	99.8			

VI. アセトン沈澱法によるウイルス精製の試み

前実験同様、血球吸着・誘出法によつて 1/5 量濃縮ウイルス液を得て、これの pH を補性することなく、アセトンを適当量加えよく混和し、一定時間後遠心沈澱して、アセトン沈澱により生じた蛋白から、ウイルスの誘出を試みた。先ず、アセトンの添加量を検討するに、第 6 表の如く、アセトン量の少量のほど蛋白沈澱が少く、50% の割に添加された場合が最もよい効果を示した。作用時間は 30 分でも 2 時間 30 分でも大差ないようだから、ウイルスを保護する意味からも 30 分が適当であろう。

次に 50% の割に添加して、30 分作用させた後の沈澱

たように原量に精製した際には期待された精製成績がえられるが、これを 1/5 量以上に濃縮する場合には、必ず溶血現象が現われ、終末産物の室素量が濃縮度に比例して、増加する傾向にあり、濃縮成績は極度に低下することになつた。この点に関する報告は先人によつて何ら触れられていない。本研究においては主としてこの点より出発し、精製材料の室素量の減少率にその主眼をおいた。

従つて、ウイルスを完全に吸着する血球側の条件を先ず 5 % 血球浮游液、18 時間作用ということに決定したのち、それよりの可及的溶血を防止するウイルス誘出液を検討したが、特にすぐれたものが得られなかつ

たため、一応、血球誘出液中の窒素量は考慮外にして、HATを保つ溶液として生塩水で原量の1/5量に濃縮した。その1/5量濃縮液中の窒素量を減少させる目的で、メタノール並にアセトン蛋白沈澱法を導入した訳である。

メタノール並にアセトン沈澱法についてはその添加量、添加する場合のウイルス液のpH作用時間及びそれら沈澱物よりの最終誘出液の検討を行つた。メタノール沈澱法では30%の割合に添加され、6時間作用後、沈澱物よりの誘出液として蒸溜水又は生塩水を用いた場合、最良の結果を招来し、最高濃縮度128倍窒素減少率99.2%、精製材料と出発材料との1mgN当りHATの差が最高 $1 \times 10^{3.7}$ という成績をえた。期待濃縮20倍の際、128倍、期待濃縮10倍の際、64倍という成績をえたのは数計的には矛盾があるが、それは本ウイルスのHATを惹起する多くの因子、例えば出発材料中に含有されているHA阻止物質がメタノール作用によつて除去されたと思うべきであろう。アセトン沈澱法についての成績も概ねメタノール沈澱法の成績と軌を一にした。

たゞ、両方共、沈澱物よりの最終ウイルス誘出液の検討をMol濃度について2・3試みたが、インフルエンザ¹⁵⁾・ウイルスの場合と全く逆にMol濃度の高いほどその効果は不良になつた。このことは両ウイルス間の生物学的差違によるものであろう。

最初に検討した血球吸着誘出法のみによるウイルス濃縮実験については、たゞ、少量の溶液中に血球を再浮遊させる場合の滲透圧を考慮して溶血を防止すれば良いことであるので、今後の検討によつて成績の向上は計られうると考えられる。また、メタノール及びアセトン沈澱物よりの最終ウイルス誘出の際に蒸溜水を用うると極めて効果的であることは上述したが、たゞこの場合も窒素量の減少率が生塩水を用いた場合ほど良好でない。このことはごく少量の血球を含有している血液誘出ウイルス液にメタノール又はアセトンを添加して蛋白を沈澱させた中にこれらの血球が含まれていて、この沈澱物の再浮遊を蒸溜水で行うために、溶血を来して窒素量の減少を来さないと考えられるので、この点も更に検討の余地を残している。

最後にこの実験はGDVIIウイルスの血球凝集がウイルス粒子そのものに起因することを前提として行われたのであるが、今後、感染師の測定を行つて精製実験を進めるつもりである。

結 論

GDVIIウイルスの精製濃縮実験を先ず出発材料をエーテルで抽出し非ウイルス性窒素を除去後、人O型血球に吸着させ更に血球よりウイルスを誘出させる方法について行つた。この結果は濃縮度を高めることによつて、平行的に血球の溶血を惹起し、精製効果を不良ならしめた。従つて、これら血球誘出ウイルス液にメタノール及びアセトン沈澱法を併用したところ、溶血によつて増加した窒素を除去し得、可成りの精製濃縮成績をうる事が出来た。

文 献

- 1) Lahelle, O. and Horsfall, F. L. : Hemagglutination with the GD VII strain of mouse encephalomyelitis virus. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., Vol. 71, 713, 1949.
- 2) Hallauer, C. 4th International Congress Microbiol., July 20-26, Copenhagen, Denmark, p. 257. 1949.
- 3) Olitsky, P. K. and Yager, R. H. : Hemagglutination by Columbia SK, Columbia MM, Mengo Encephalomyelitis and Encephalomyocarditis viruses : experiments with other viruses. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., Vol. 71, 719, 1949.
- 4) Taylor, A. R., Sharp, D. K., Beard, T. W., and Dingle, J. H. : Isolation and characterization of Influenza A virus. J. Imm. Vol. 47, 261, 1943.
- 5) Lahelle, O. and Ward, T. G. : Purification and concentration of mouse encephalomyelitis virus by hemagglutination, J. Imm., Vol. 67, 75, 1951.
- 6) Theiler, M. and Gard, S. : Encephalomyelitis virus, J. Exp. Med., Vol. 72, 49, 1940.
- 7) Herrarte, E. and Francis, T. : Efforts toward selective extraction of poliomyelitis virus. J. Inf. Dis., Vol. 73, 206, 1943.
- 8) Gollan, F. : Purification of the MM poliomyelitis virus. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., Vol. 67, 364, 1948.
- 9) Brumfield, H. Stulberg, C. S. and Halvorson, H. O. : Purification of mouse poliomyelitis virus by methanol precipitation at low temperature, Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., Vol. 68, 410, 1948.
- 10) 赤司 : インフルエンザウイルスの精製に関する研究 (1) ウイルス, 4巻, 122, 1954.
- 11) Nakagawa, Y. and Akashi, A. : Studies of purification of Influenza virus. The Kurume Med. J., Vol. 1, 61, 1954.
- 12) Fastier, B. L. : The inhibition of GD VII virus hemagglutination by normal tissue extract. J. Imm., Vol. 66, 87-97, 1951.
- 13) 重藤 : マウス脳脊髄ウイルスGDVII株の赤血球凝集反応に関する研究, 久留米医学会雑誌, 17巻, 342, 1954.
- 14) Cox, H. R., Scheer, J., Aiston, S., and Bohnel, E. : The purification and concentration of influenza virus by means of alcohol

precipitation. J. Imm., Vol. 56, 149 1947. 15)
Moyer, A.W., Sharpless, G.R., Davies, M. C., Win-
nfield, K., and Cox, H.R. : Methanol precipitation
of influenza virus, Science, Vol. 112, 459, 1950.

16) Tomizawa J. and Fukumi, H. : Some aspects
of methanol precipitation of Influenza virus. Jap.
M. J., Vol. 5, 59, 1952.

マウスのウイルス感受性に及ぼす影響に関する研究

第3報 マウスのウイルス感受性に及ぼす cortisone の影響 (3) *

神 田 幸 重 **

YUKISHIGE KANDA : STUDIES ON THE INFLUENCE UPON
THE SUSCEPTIBILITY OF MICE TO VIRUS (III)

[受稿 6月16日 1955]

前処置として比較的大量の cortisone 投与がマウス
脳脊髄炎ウイルス (GDVII 株) に対するマウスの感
受性を高めることを確かめ、この時みられる脾臓の萎
縮を始めとする網内系の機能低下は、cortisone の作
用機序の解明にあたつて先ず追究さるべき意味ありげ
な変化であり、ウイルス感受性とその意義には新たに
解明さるべき大きな疑問が残されることは既に指摘し
た如くである。⁽¹⁾

マウスに対する cortisone のウイルス感受性上昇効
果は cortisone による直接作用であるか否か、脾臓の
萎縮を始めとする網内系の機能低下は cortisone の作
用効果として如何程の意義をもつものであるか、又そ
の2次的影響は広範な cortisone 効果から如何に区別
されているのか、今回はこれ等の疑問に対して進めた
検討の結果について、即ち、cortisone のウイルス感
受性上昇効果は網内系ホルモンとして理解さるべきも
の、欠乏による2次的影響であること、そして更に網
内系ホルモンは生体内の酵素作用にも密なる影響を及
ぼし、ウイルス感受性を規定する上に重要な役割を果
していることを報告すると共に、併せて新たに追加さ
るべき生体の内分泌性防衛機転即ち、副腎皮質と網内
系との間のホルモン連鎖の存在についても意見を述べ
たいと思う。

第1章 Cortisone の感受性上昇効果に 及ぼす正常マウス脾乳剤の影響

実験材料並に方法

マウス：マウスは生後3～4週（体重約10g）の健
康なものを使用し、同一条件のマウスを供試するため
に極力注意を払つた。

ウイルス：本実験に使用したマウス脳脊髄炎ウイル
ス GDVII 株は、シカゴ大学の Rustigian 博士より分
与をうけたものである。今後の実験に於けるマウス並
にウイルスは、全て上記のものを使用したものでこれに
ついての記載を略す。

cortisone 並に投与方法：cortisone はメルク製コル
トンアセテート生理的食塩水懸濁液にして、ウイルス
接種前処置として筋肉内に1.0mg 宛2日間投与した。
これに関する其の他の事項に就ては前報に記した。

脾乳剤並に投与方法：脾乳剤の作製は Cole 等の方
法にならつた。⁽²⁾ 即ち、生後3週の正常マウスの脾臓を
集め、低温に保ちつゝ pH7.2 の M/15 Phosphate
buffer 1cc につき脾臓2個の割で乳剤を作り、直に
0.2cc 宛マウスの腹腔内に注射した。注射回数は co-
rtisone の投与に平行して2回並に更に続いて2回計
4回行つたが、脾乳剤は注射の都度作製して新鮮なも

* 本論文の要旨は昭和29年10月第2回日本ウイルス学会総会の席上発表したものに一部加筆したものである。

** 久留米大学医学部細菌学教室（主任 中川 洋 教授）