アデノウイルスの研究

(補体結合性抗原の検討を中心として)

武 田 宏*

STUDIES ON ADENOVIRUS WITH SPECIAL REGARD TO COMPLEMENT FIXING ANTIGEN

Hiroshi TAKEDA*

[受稿 7月3日, 1961]

アデノウイルスは現在人間および猿から 24 以上の血清学的に異なる型が分離されており、臨床的には咽頭結膜熱、流行性角結膜炎、異型肺炎その他感冒様疾患の原因として知られている。一方本ウイルスに関する基礎的研究も数多くなされている (Pereira, 1959 a)。

アデノウイルス群は主として中和試験によつて各型に分けられるが、その補体結合抗原 (以下 CF 抗原) は各型に共通でアデノウイルス群に特異的であつて、しかもウイルス粒子とは異なるいわゆる可溶性 (soluble) 抗原 (以下 S 抗原) であるとされている、ウイルス粒子自体の CF 反応における抗原性は Werner (1956) および Hilleman ら (1955) によつてわずかに暗示されてはいるもののその詳細については現在全く不明といわざるをえない。

この論文においてはウイルス粒子の CF 抗原 (いわゆる V 抗原) の存在を明らかにし、V 抗原と S 抗原の性質を比較すると同時に、V 抗原および S 抗原の異同を解明するために試みられた二三の実験が報告される。また予備実験として行われた感染価測定法の条件の検討と、えられた新条件による増殖曲線と CF 抗原および細胞変性効果 (Cytopathogenic effect, C.P.E.) 出現との時間的關係についても報告され、先人の業績と比較検討される。

材 料 と 方 法

1. 実験材料

ウイルス: アデノウイルスの標準株 3 型 (G-B 株), I 型 (adenoid 71) を使用した。これらのウイルス (伝

研より分与を受けた) はわれわれの研究室で HeLa 細胞を用いて継代しているもので、感染細胞を培養液と共に凍結融解 6 回後、4,000 rpm 30 分の遠心沈澱上清をウイルス液として使用した。

細胞および組織培養液: HeLa 細胞を用いた。増殖用培養液としては lactalbumin hydrolysate 0.5% 加 Hanks 液に馬血清を 20%, ニワトリ胎児浸出液 (1:1) を 2% に含ませ、更に streptomycin 100 mcg/ml, penicillin 100 単位/ml を加えた液を用いた。維持用培養液としては lactalbumin hydrolysate 0.5% 加 Hanks 液に馬血清 5%, yeast extract 0.1%, streptomycin 100 mcg/ml, penicillin 100 単位/ml を加えたものを用いた。また組織培養に使用したガラス器具はすべて良質のもので、その清浄法は Enders 研究室の方法にしたがつた (甲野, 1954)。

2. 実験方法

a) 感染価の測定: 角嚢中に一層に発育した HeLa 細胞に 200 H.U.M./ml の trypsin 溶液 (持田製薬の trypsin を使用) を加えて細胞をガラス面より剝し、Hanks 液にて洗い、中型試験管に約 200,000 細胞/ml の濃度の液を 0.5 ml 入れて 37°C に静置培養した。2~3 日目に増殖用培養液を捨て、維持用培養液 0.9 ml, ウイルス液の 3.2 倍又は 10 倍階段希釈したもの 0.1 ml を加えて 37°C に静置培養し、7 日目毎に試験管内の液を新しい維持用培養液と交換した。主として 28 日目の C.P.E. をもつて終末点を判定し、Behrens-Kärber の方法 (伝研・実習提要, 1958) によつて TCD 50/ml を求めた。

b) 補体結合抗原価の測定: 術式は Kolmer 変法 (伝研・実習提要, 1958) を用いた。すなわち 3 単位の溶血

* 慶応義塾大学院医学研究科 (指導: 三方一沢教授)
(指導: 牛場大蔵教授)

Doctor's Course, Dep. of Int. Med., School of
Med., Keio University.

Director: Prof. I. Mikata, Prof. D. Ushiba

素, 2 正単位の補体, 2 単位の抗体を使用し, 抗原稀釈法により抗原価を測定した. 抗体としてはアデノウイルスに比較的高い CF 抗体価を有する成人男子の血清を用いた. また抗原および抗体はすべて 56°C 30 分にて非働化して使用した. 以後 CF 価と記載されるものは CF 抗原価を示す.

c) 超遠心による分割の実験: Spinco Model L, Roter No. 40 を用いた.

d) CF 抗原の熱抵抗性: 試料を 1% HCl, 1% NaOH にて pH 6.1 に補正し, その一定量を小試験管に分注して 68°C~75°C の間で 1 分~40 分の間温水中に入れた後, それぞれの試料の CF 価を測定した.

e) ゲル内沈降反応: Ouchterlony の方法 (伝研・実習提要, 1958, 鈴木, 1960) により Difco 寒天 1% にマーズニンを 0.01% の割に加え pH を 7.8 に補正したものを 6 ml シヤールに入れ, 固まった後に薬剤耐性検査用のカップを寒天の上におき, さらに 15 ml の同寒天を注いで固まった後にこれを取り去り, できた穴の中に抗原および抗体を注いでゲル内沈降反応の様相を検討した. 早い時には 24 時間後に沈降帯が現われたが, 判定は寒天の乾燥を防ぐ目的でビニール製の袋に入れて 3~4 日間 37°C に置いた後に行なつた.

f) エーテル処置の実験: 試料に 1/2 容のエーテル (特級) を加え, 室温にて 1 時間攪拌しエーテル層をピペットで捨て, さらに 12 時間 37°C にて保存し, 残りのエーテルを除いて CF 価の測定を行つた.

g) 音波の実験: 東陽理工製作所製, 強力音波振盪器, 50-5 型 (出力 10 キロサイクル) を用い, 音波にて 1 時間処理した試料の CF 価および感染価の測定を行なつた.

成 績

1. 感染価測定法の検討. 予備実験としてアデノウイルス 3 型感染価測定における判定日数の検討を行つた. すなわち観察期間の延長による見かけ上感染価の推移を知るために 10 倍階段希釈したウイルス液を各希釈 2 本以上の細胞シート試験管に接種し, 日を追つて, C.P.E. を観察して各判定日における見かけ上の感染価を測定した. 表 1 に示すごとく 7 日目には $10^{1.5} \sim 10^{2.5}$ TCD₅₀/ml のものが 14 日, 21 日と日を追つて感染価が上昇し, 7 日目と 28 日目で $10^{3.0} \sim 10^{3.75}$ の差を認める. しかし 28 日以上 HeLa 細胞を維持することはなかなか困難であるのでわれわれは一応 28 日目で観察を打ち切つたが, 28 日目で C.P.E. (一) を示した最低希釈の試験管の細胞を凍結融解して, 新しい細胞に接種する実験を試みた結果, 行なつた範囲内では継代後 28 日目においても C.P.E. を認めなかつた. したがつて 28 日目の価はほぼ真実の感

染価を示していると思われる. ゆえに以後の実験における感染価の測定には主として 28 日目に判定を行うこととした.

Table 1. Comparison of Infectivity Titers Read after Various Periods of Incubation of Culture Tubes for Infectivity Titration of Type 3 Adenovirus.

Experiments	Virus preparation	Infectivity titers (TCD ₅₀ /ml) determined after incubation for			
		7	14	21	28 (days)
1	A	$10^{2.5}$	$10^{4.0}$	$10^{4.5}$	$10^{5.5}$
2	A	$10^{2.5}$	$10^{3.5}$	$10^{5.5}$	$10^{6.0}$
3	A	$10^{2.5}$	$10^{3.5}$	$10^{4.0}$	$10^{6.0}$
4	A	$10^{2.5}$	$10^{3.5}$	$10^{6.0}$	$10^{8.0}$
5	B	$10^{2.5}$	$10^{4.0}$	$10^{5.5}$	$10^{5.5}$
6	C	$10^{1.5}$	$10^{4.0}$	$10^{5.0}$	$10^{5.25}$

2. アデノウイルス 3 型における感染性ウイルス粒子と CF 抗原出現の時間的關係

ほぼ 2×10^6 /角塊 (200 ml の角塊) の細胞を含む細胞シート (角塊) 多数に 10^7 TCD₅₀/角塊のアデノウイルス 3 型ウイルス液を接種し, 3 時間 37°C にて吸着させた後, Hanks 液にて 3 回洗い, 以後時間を追つて (接種時を 0 時間とした) 角塊を取りだして C.P.E. を観察した

Fig. 1 The growth characteristics of type 3 adenovirus.

後、直ちに凍結保存し、まとめて同時に感染価および CF 価の測定を行なった。感染価に関しては細胞では 21 時間より上昇し始めたが培地の中では 46 時間においても増加が認められなかった。接種したウイルス液の CF 価は 32 であったが、細胞に感染後 27 時間までは CF 抗原を検出できず、細胞では 30 時間で 2 となり、36 時間で 8 となった。しかし培地の中では 46 時間においても CF 抗原を検出できなかった。C.P.E. は細胞の比較的少い所を見ると 18 時間より認められるようになり 24 時間で 4 となった。感染価および CF 価の時間的關係を見るとウイルス粒子の感染価よりややおくれで CF 抗原が検出されるようになる。

3. ウィルス粒子の CF 反応

a) アデノウィルス 3 型ウイルス液を 40,000 rpm 60 分間、超遠心分離を行い、原液、上清および沈渣の感染価と CF 価を測定すると表 2 のごとくで 40,000 rpm 60 分でウイルス粒子の示す感染価は沈渣に集ることが分つたが、この場合の沈渣の CF 価は 3.2 となる。一方その時の上清の価は 4 で原液に比してわずかに低いに過ぎないので、沈渣は 40,000 rpm 60 分でいわゆる可溶性 S 抗原の一部が落ちることを示すのではないかと云うことが疑われた。そこでさらに次の実験を行なった。

Table 2. Complement Fixing Antigen and Infectivity Titers of Fractions Obtained by Ultracentrifugation from Type 3 Adenovirus Preparation.

Fractions tested	CF antigen titers	Infectivity titers* (TCD ₅₀ /ml)
Original (non-treated)	8	10 ^{3.5}
Supernatant from 40,000 rpm, 30 min.	4	10 ^{1.5}
Sediment from 40,000 rpm, 30 min.	3.2**	10 ^{2.5}

* In this Experiment, the titer was determined after 1 week incubation.

** Calculated from CF antigen titer of 10 fold concentrated sample.

b) 40 ml のアデノウィルス 3 型および 1 型ウイルス液を 8 ml づつ 5 本の遠沈管に分け 15,000 rpm 30 分で沈殿する粒子 (“15,000 沈渣”) を先ず落とし、その上清 (“15,000 上清”) 27 ml を 9 ml づつ 3 本の遠沈管に分け更に 30,000 rpm 30 分超遠心を行なった (それぞれ “30,000 上清, 沈渣”)。更に “30,000 上清” の 20 ml を 40,000 rpm 60 分超遠心を行なって沈殿する粒子を落した (それぞれ “40,000 上清, 沈渣”)。上記のごとくにしてえられた “15,000, 30,000, 40,000, 沈渣”

をそれぞれ 8 ml の Hanks 液に浮遊させて 40,000 rpm 60 分超遠心に洗滌し、沈渣をそれぞれ出発の $\frac{1}{10}$ 量の Hanks 液に浮遊させて 10 倍濃縮の沈渣浮遊液を作製した。このようにしてえられた上清、沈渣の CF 価を測定した。結果は表 3 のごとくで 1 型、3 型共に同様の態度

Table 3. Complement Fixing Antigen Titers of Several Fractions Obtained by Ultracentrifugation from Type 3 and 1 Adenovirus Preparations.

Fractions tested	CF antigen titers	
	Type 3	Type 1
Original (non-treated)	16	32
Supernatant (15,000 rpm, 30 min.) (A)	16	16
Sediment (15,000 rpm, 30 min.)*	0.8**	1.6**
Supernatant (30,000 rpm, 30 min.) from (A) (B)	16	16
Sediment (30,000 rpm, 30 min.) from (A)*	0.1**	0.4**
Supernatant (40,000 rpm, 60 min.) from (B)	8	16
Sediment (40,000 rpm, 60 min.) from (B)	0.2**	0.8**

* Each sediment was washed once more with Hank's balanced solution of 40,000 rpm for 60 minutes.

** Calculated from CF antigen titer of 10 fold concentrated sample.

をとり、“15,000, 30,000, 40,000 沈渣”のいずれにもわずかではあるが CF 反応を起すものがあることおよびその半分以上は 15,000 rpm において落ちることを示している。この場合沈渣へのはじめの S 抗原の汚染は、上清を捨てた後に遠沈管 1 本に残る上清量は 0.3 ml を越えることはない (秤量により測定された) ことから計算すると、“15,000 沈渣”は 5 本の遠沈管の沈渣を集めて Hanks 液 8 ml に浮遊し、さらに 40,000 rpm 60 分超遠心して沈渣を 4 ml に浮遊させたのであるから $\frac{8}{0.3 \times 5} \times \frac{4}{0.3} \approx 70$ となり、また “30,000 沈渣” “40,000 沈渣” もそれぞれ約 90 となるので、沈渣にあらわれた CF 抗原は沈渣そのものが示す CF 反応とも考えられるとはいうものの、なおはじめの上清中に含まれる S 抗原の汚染によつても同様の結果がえられる可能性もあるので、汚染による反応を全く除外する目的で、沈渣をくりかえして洗滌する実験を次に行なった。

c) 18 ml のウイルス液を 2 本の遠心管に分け、40,000 rpm 60 分超遠心を行なって上清の一部を静かに取つて “上清” とし、沈渣を 18 ml の Hanks 液に浮遊させ

Table 4. Washing Experiments of Sediments of Type 3 Adenovirus Preparation by Centrifugation at 40,000 rpm for 60 Minutes.

Fractions tested	Infectivity titers (TCD ₅₀ /ml)	CF antigen titers	Supposed dilution of S antigen contaminated from Original fraction
Original (non-treated)	10 ^{6.75}	64	1 : 1
Supernatant from 1 st. centrifugation	>10 ^{3.75}	32	1 : 1
Sediment from 1st. centrifugation	10 ^{6.75}	4	1 : 30
Fluids from 1 st. washing of sediment	>10 ^{3.25}	1	1 : 30
Sediment washed once	10 ^{6.0}	2	1 : 700
Fluids from 2 nd. washing of sediment	>10 ^{3.25}	<1	1 : 700
Sediment washed twice	10 ^{5.5}	1	1 : 20,000

Table 5. Washing Experiments of Sediments of Type 3 Adenovirus Preparation by Centrifugation at 15,000 rpm for 30 Minutes..

Fractions tested	Infectivity titers (TCD ₅₀ /ml)	CF antigen titers	Supposed dilution of S antigen contaminated from Original fraction
Original (non-treated)	10 ^{6.5}	64	1 : 1
Supernatant from 1 st. centrifugation	10 ^{4.5}	64	1 : 1
Sediment from 1 st. centrifugation	10 ^{6.25}	4	1 : 30
Fluids from 1 st. washing of sediment	10 ^{4.5}	2	1 : 30
Sediment washed once	10 ^{5.75}	2	1 : 700
Fluids from 2 nd. washing of sediment	10 ^{4.75}	<1	1 : 700
Sediment washed twice	10 ^{5.75}	1	1 : 20,000

Table 6. Thermal Differentiation of Complement Fixing Antigen Titers between Supernatant and Sediment of Type 3 Adenovirus Preparation by Centrifugation at 15,000 rpm for 30 min. (pH 6.1)

Fractions tested	Non-heated	Relative CF antigen titers*										
		68 °C			70 °C			73 °C			75 °C	
		20	30	40	5	10	15	2	4	6	1	2 min.
Supernatant	1	1	1/2	1/2	1	1/2	1/2	1/2	1/4	1/8	1	1/4
Sediment**	1	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/4	1/4	1/2	1/4

* These values indicate relative CF titer when CF titer of nonheated sample is expressed to be 1.

** Sediment washed twice.

て“沈渣”とした。この場合上清の汚染は遠沈管1本に0.3ml 残ると仮定すると約 $\frac{1}{30}$ となる。次に14mlの“沈渣”の浮游液を40,000 rpm 60分遠沈を行い、再び沈渣を14mlのHanks液に浮游させて“1回洗滌沈渣”とし、その一部をとつてさらにもう一度洗滌を繰り返して“2回洗滌沈渣”をえた。はじめの“上清”の汚染は1回および2回の洗滌でそれぞれ約 $\frac{1}{700}$ 、 $\frac{1}{20,000}$ となる。以上のごとくにして得られた試料についてそれぞれの感染価およびCF価を測定した。結果は表4に示すごとくで、感染価(ウイルス粒子)の大部分が1回の遠沈で沈渣に集つた。この時CF価は原液64、上

清32、沈渣4であつた、この沈渣に対する“上清”の汚染は約 $\frac{1}{30}$ と考えられるので、沈渣のCF価4は上清(S抗原)の汚染によるCF反応を否定することはできない。しかし1回洗滌により沈渣のCF価4であつたものが2となり、約半分に低下したが、この時の感染価の減少は $10^{6.75}$ が $10^{6.0}$ となつて感染価も同時に減少しているので遠沈操作による損失と考えられ、しかも“上清”のうすまり方は約 $\frac{1}{700}$ である。したがつてこのCF価は上清の汚染では説明がつかず、洗滌沈渣にもCF抗原性があることを明らかに示している。さらに繰り返した洗滌においてほぼ同様の結果である。すなわちCF抗原が

沈渣に現れて、遠沈の繰り返しによるその減り方は感染価の減り方とほぼ平行しているという結果がえられた。

d) そこで同様の方法で 15,000 rpm 30 分でウイルス粒子を洗うと、成績は表 5 のごとくになり、40,000rpm の場合とほとんど同じ結果がえられた。

4. 沈渣の 補体結合性物質 (以下一応これを “V 抗原” とよぶ) といわゆる S 抗原との比較。

a) 熱抵抗性: S 抗原と “V 抗原” との熱抵抗性を比較すると成績は表 6 のごとくで、CF 価の熱による減少率は S 抗原と “V 抗原” との間で差が認められなかった。

b) エーテル処理: “15,000 rpm 30 分 2 回洗滌沈渣” をエーテル処理を行なつたが処理前後の CF 価はいずれも 2 で “V 抗原” はエーテル処理を行なつても CF 価に変動はなかつた。

c) 音波による実験: “15,000 rpm 30 分 2 回洗滌沈渣” を 1 時間音波にかけその感染価、CF 価を測定した。結果は表 7 に示すごとくで、 TCD_{50}/ml に関しては $10^{8.0}$ のものが $10^{5.5}$ となり感染価を有するウイルス粒子は約 $1/300$ に減じた。一方 CF 価は音波処理後のものは音波処理前に較べて 2 倍上昇していた。CF 反応は 2 回

Table 7. Influences of Sonic Oscillation on Complement Fixing Antigen and Infectivity Titers of Twice Washed Sediments of Type 3 Adenovirus.

Sample	CF antigen titers	Infectivity titers (TCD_{50}/ml)
Non-treated	4	$10^{8.0}$
Sonicated for 1 hour	8	$10^{5.5}$

行なつたがいずれも同じ結果をえた。

d) ゲル内沈降反応: Ouchterlony の方法によりゲル内沈降反応を行つた。すなわち図 2 a に示すごとく抗血清 (S) とウイルス原液 (A), 15,000 rpm 30 分上清 (B), および 2 回洗滌沈渣 (C) との間にそれぞれやや太い 1 本の沈降帯を認め、これらはその端において合致し連絡している。また S と C の間に現れた沈降帯は S-A, S-B 間に現れた沈降帯に較べて抗原側に接近していた。

次に音波処理の試料を用いてゲル内沈降反応を行なつた。成績は図 2 b のごとく、抗血清 (S) とウイルス原液 (A) および超遠心上清 (B) との間にはそれぞれ 3 本の細かい沈降帯が現れた (一応 α, β, γ とする)。この場合使用

Fig. 2 Comparison of Supernatant and sediment fractions obtained by ultracentrifugation from type 3 adenovirus preparation by the aid of gel-diffusion technic.

した試料は図2 aの場合に用いた試料と全く同一であり条件もまた全く同一としたにもかかわらず実験により3本にでることもあり、図2 cのごとく2本、図2 aのごとく1本にでることもあったが、これは微妙な条件の差によるものであろう。それはともかく、図2 bにおける音波処理後の(C)には幅の広い沈降帯があらわれ、その中にはあまり明瞭ではない4~5本の細い沈降帯が観察され、全体として端においてS-B間の β , γ と連絡している像がえられた。

対照として“上清”(S抗原)に音波を1時間かけゲル内沈降反応を行つたが音波処理前後で全く差を認めなかった。(図2 c)

考 察

アデノウイルスの増殖に関する研究はすでにいくつかの研究が報告されている(Fukumi ら, 1957, Ginsberg, 1958; Lieberman ら, 1959, Pereira ら, 1959 b, 甲野 ら, 1960)。またウイルス増殖とCF抗原出現の時間的關係もこれらの研究者によつてとりあげられているが、ウイルス粒子とCF抗原生成上の関係を知る上で興味がある。私の実験では感染価の上昇の始まる時間は21時間であつたが、Lieberman ら(1959)の1, 4, 5, 6型についての実験では16~22時間であり、甲野 ら(1960)の3型の実験では低濃度のウイルスを接種した時が36時間、高濃度の場合は12時間であつた。またCF価に関しては私の実験によると、細胞では30時間よりCF価が上昇し始めたが、液層では46時間でもその上昇を認めなかった。この種の実験ではLieberman ら(1959)も指摘しているように細胞の状態とかウイルスの吸着の割合などに多分の影響を受けるので、多少の時間の差はやむをえないものであろう。いづれにせよCF価の上昇が感染価の上昇より遅れている点では共通しており、私の実験でもそうであつた。この点よりCF抗原はウイルス粒子の前駆物質(Precursor)でなく副産物(by-product)であるとするLiebermanの説は一見正しいようにも思われるが、補体結合反応は微量の抗原の検出には適当でないのでCF価の時間的推移のみでCF抗原がウイルス粒子の前駆物質でないとするのは無理であろう。C.P.E.は18時間より始まっているが、これはRowe ら(1958)、およびPereira(1958)の云う毒素作用によるものと思われる。

アデノウイルスのウイルス粒子とCF抗原を超遠心で分けることはRowe ら(1955)およびHilleman ら(1955)により明らかである。すなわちRoweは10,000 rpm 3時間2回、HillemanはSW 39 roterで24,630 rpm 30~45分でウイルス粒子とCF抗原を分けている。

私もこれを追試したがその途上ウイルス粒子の洗滌を繰り返してもわずかではあるがウイルス粒子の分割にCF反応性が残ることを認めた。Werner(1956)は3型ウイルス液を超遠心分離を行い、その沈渣(ウイルス抗原)でモルモットを免疫したところ、その血清はCF反応で型特異的でなく、3型、7型いずれの可溶性抗原ともCF反応を起すことを観察しウイルス粒子は群特異的の抗原を含んでいて、この群特異的の抗原はウイルス粒子の表面にあるのであろうと述べている。Hilleman ら(1955)も超遠心で分けたウイルス粒子が僅かながらCF反応を起す所からCF抗原の一部は顆粒状になっているか、あるいはウイルス粒子の表面に附着しているのかも知れないと云うことを述べている。これらの報告と上述の実験成績はよく一致しているので、さらにこの“V抗原”について研究を進めた。

超遠心沈渣に補体結合性が表れる場合の可能性について考えてみると

- (1) 可溶性抗原とは異つた抗原性物質がウイルス粒子にあつて、それがS抗体とは別のいわばV抗体と反応する場合。
- (2) 可溶性抗原と同じものが反応に関与している場合としては
 - a) ウイルス粒子自体の構成成分としてS抗原が存在する場合
 - b) ウイルス粒子の表面に吸着された形でS抗原が存在する場合
 - c) S抗原の一部は15,000 rpmでも沈澱する大きさの粒子として、ウイルス粒子とは別に存在する場合

などがある。前述の可能性を証明するには可溶性抗原、および“V抗原”に対するそれぞれの抗血清がえられなければならないが未だ成功していない。しかしこれとは全く別の方法で私が行つたゲル内沈降反応の結果を見ると、図2 aにおいてS-A, S-B, S-C間に現れた沈降帯はそれぞれ連絡している所から“洗滌沈渣”に含まれる抗原性物質はウイルス原液およびS抗原に含まれる抗原性物質とその特異性において同一であることを意味している。したがつて(1)の可能性は除外出来、(2)の可能性のa, b, cいずれかであろうと考えられる。また図2 aのS-C間の沈降帯が、S-A, S-B間に現れた沈降帯に較べて抗原側に接近していることは“洗滌沈渣”中に含まれる抗原性物質の量がA, Bに含まれる抗原性物質より少いこと、あるいは抗原性物質の寒天内拡散速度のおそいことを意味している。また図2 bのS-A, S-B間の抗原側の α はPereiraのearly cyto-

pathic factor に、他の2本 (β , γ) は CF 抗原 (S 抗原) に相当すると思われる。前述の可能性 (2) について考えてみると、超遠心の成績において沈渣の CF 価の減り方と感染価の減り方がほぼ平行していた事実は沈渣における CF 反応性がウイルス粒子そのものと何等かの関係を有していることを暗示するものであろう。したがって可能性 (2) a または (2) b が最も考え易いが、一方 (2) c の可能性を完全に否定することはできないであろう。

Friedman ら (1959) はアデノウイルスの 1, 2, 5, 6 型と 3, 4, 7, 8 型で CF 抗原の熱抵抗性に差があることを述べているが、S 抗原と“V 抗原”との比較をするために熱抵抗性試験を試みたところ、熱に対する抵抗性には差が認められなかった。また“V 抗原”のエーテル処理を試みたが CF 価の上昇を認めなかった。エーテル処理に関してはインフルエンザウイルス、リフトバレー熱ウイルスについてそれぞれ Lief and Henle (1956)、野島ら (1957) の報告があり、これらのウイルスにおいてはエーテルによりウイルス構成成分の V 抗原が遊離してきて、CF 価の上昇をきたしたと考えられているが、アデノウイルスはエーテル耐性のためか差を認めなかった。

“V 抗原”に音波を1時間かけると TCD_{50}/ml は $10^{8.0}$ が $10^{5.5}$ に減少しその差は約 $1/300$ である。一方 CF 価は2倍上昇している。このことはウイルス粒子が破壊されたため構成成分が遊離して CF 価が上昇したことを意味していると考えるのが最も妥当であろう (可能性 (2) a)。しかし S 抗原の一部がウイルス粒子の表面に強固に附着している場合 (可能性 (2) b) を私の実験より否定することはできない。さらに興味あることは“洗滌沈渣”に音波を1時間かけた試料はゲル内沈降反応においてその沈降帯の幅が広くでることで、これはウイルス粒子の内部または表面にある抗原がウイルス粒子よりは小さい種々の大きさの粒子となりゲル内を遠くまで拡散するようになったと考えると一応理解できる。

アデノウイルスの感染価の測定に際し私は予備実験の結果から28日間という長期判定を採用した。文献的には6~7日の短期間の判定を行なっている報告が多いが、一方 Pereira ら (1959) は5型を用いて長期間の観察を行っており、3日以内では毒素の問題を考えに入れる必要があり、9日以上観察を行わなければ真のウイルスの感染価を測定できないと云っている。その他内田 (1960)、Grayston ら (1958) なども長期観察の必要性を述べている。アデノウイルスは感染価の低い割に CF 価が高いと云われているが (Hilleman ら, 1955)、7日目と28日目では感染価に $10^3 \sim 10^{3.75}$ の差があり、7日判定の場合と比較して CF 価と感染価の比率は大部異ってくるので

感染価に比して CF 価が高いということをアデノウイルスの特徴の一つとするのは妥当でない。むしろ感染価測定法が不適当であつたと考えるべきであろう。

総 括

1. アデノウイルス3型の増殖に関しては細胞において21時間で感染価の上昇が始まり、CF 価の上昇は30時間より始まった。すなわち感染価の上昇はCF 価の上昇よりやや早かつた。液層では46時間においても感染価、CF 価ともに上昇を認めなかった。

2. アデノウイルス3型ウイルス液を超遠心でウイルス粒子とS抗原に分ち、さらに洗滌を繰り返した後のウイルス粒子は弱いながら明らかにCF 反応性を示す (いわゆる“V 抗原”) ことが明らかとなつた。

3. “V 抗原”とS抗原を比較する実験を行なつた。その結果、熱抵抗性において差を認めず、エーテル耐性の点でも差を認めず、ゲル内沈降反応において両者の特異性が同一であることが明らかとなつた。

4. ウイルス粒子中におけるS抗原の存在様式について、音波処理によるウイルス粒子の破壊後にCF 価が上昇したこと、およびゲル内沈降反応において音波処理ウイルス粒子がより幅の広い沈降帯を形成したことはウイルスの構成成分の一部としてS抗原が存在している可能性を示していると考えられた。

しかしS抗原がウイルス粒子表面に強固に吸着されている可能性あるいはS抗原がウイルス粒子とは別個に15,000 rpm で沈殿する大きさの粒子として存在しているかもしれないという可能性を除外することはできなかった。

5. アデノウイルスの感染価の測定には28日の長期観察を行うと従来云われていたような感染価に比してCF 価が高いと云うことはない。

謝 辞

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導及び御校閲をいただきました内科学教室三方一沢教授、細菌学教室牛場大蔵教授、佐々木正五助教授、内科学教室勝正孝講師に衷心より感謝し、また終始多大なる御援助をいただきました細菌学教室橋本一男講師その他教室員各位に謝意を表します。

Summary

It was the purpose of this paper to identify the complement fixing (CF) antigen from adenovirus type 3 particles, namely V antigen, and to compare the characteristics between V antigen and soluble antigen (S antigen). Some efforts have been made to describe the similarity and difference of these

two antigens. Results were as follows:

1) In growth experiment of adenovirus type 3, infectivity titer in HeLa cells began to rise in 21 hours and the increase of CF titer was noted in 30 hours, indicating that the infectivity titer preceded the CF titer. In extracellular media, however, both titers did not rise even after 48 hours.

2) Virus particle and S antigen were separated through ultracentrifugation from adenovirus type 3 preparation. Virus particle repeatedly washed several times evidently showed reactivity to CF antibody. ("V antigen".)

3) Experiments to compare "V antigen" and S antigen clarified that there was no difference in resistance to either heat or ether. Specificity of these two antigens was determined to be same by gel-diffusion method.

4) Destruction of virus particle by sonic oscillation resulted in the rise of CF titer. Virus particle treated by sonic oscillation formed a broader band in gel-diffusion method. These facts might indicate that S antigen was a part of virus particle constitution. But doubts still remained unsettled that S antigen was possibly adsorbed in the surface of virus particle or exist as another particle sedimentable by ultracentrifugation apart from virus particle itself.

5) Observation as long as 28 days was necessary for the determination of infectivity titer of adenovirus. Using this method for infectivity titration, it was not demonstrated that CF titer was high in comparison with infectivity titer in adenovirus.

文 献

1) 伝染病研究所学友会編 (1958): 細菌学実習提要丸善株式会社, 東京. — 2) Friedman, M. and De Berry, P. (1959): Thermal differentiation of the adenovirus complement fixing antigens. *J. Immunol.*, 82, 535-541. — 3) Fukumi, H., Nishikawa, F. and Ejima, S. (1957): The relationship between cytopathic changes and virus multiplication in HeLa cells infected with adenovirus. *Jap. J. Med. Sci. & Biol.* 10, 321-328. — 4) Ginsberg, H. S. (1958): Characteristics of the adenovirus. III, reproductive cycle of type 1 to 4. *J. Exp. Med.*, 107, 133-152. — 5) Grayston, J. T., Loosli, C. G., Smith, M., McCarthy, M. A. and Johnston, P. B. (1958): Adeno-

virus. I, the effect of total incubation time in HeLa cell cultures on the isolation rate. *J. Inf. Dis.*, 103, 75-85. — 6) Hilleman, M. R., Tousimis, A. J. and Werner, J. H. (1955): Biophysical characterization of the RI (RI-67) viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 89, 587-593. — 7) 甲野礼作 (1954): ウイルス研究の新技术, 組織培養法の応用について. *臨床病理*, 2, 356-362. — 8) 甲野礼作, 浜田忠彌, 矢追秀昭, 平山宗弘 (1960) アデノウイルスに関する研究. I, HeLa細胞における増殖に関する研究. *ウイルス*, 10, 267-274. — 9) Lieberman, M. and Friedman, M.: (1959): Growth characteristics of adenovirus, I, production and release of complement fixing antigen and infectious virus. *J. Immunol.*, 82, 1-8. — 10) Lief, F. S. and Henle, W. (1956): Studies on the soluble antigen of influenza virus. I, the release of S-antigen from elementary bodies by treatment with ether. *Virology*, 2, 753-771. — 11) 野島徳吉, 岩佐三郎 (1957): リフトバレー熱ウイルス感染過程に出現する抗原について. *ウイルス*, 7, 348-350. — 12) Pereira, H. G. and Kelly, B. (1957): Dose-response curves of toxic and infective actions of adenovirus in HeLa cell cultures. *J. Gen. Microbiol.*, 17, 517-524. — 13) Pereira, H. G. (1958): A protein factor responsible for the early cytopathic effect of adenovirus. *Virology*, 6, 601-611. — 14) Pereira, H. G. (1959 a). Adenovirus. *Brit. Med. Bull.*, 15, 225-230. — 15) Pereira, H. G., Allison, A. C. and Balfour, B. (1959 b). Multiplication of adenovirus type 5 studies by infectivity titrations and by the fluorescent antibody technique. *Virology*, 7, 300-314. — 16) Rowe, W. P., Huebner, R. J., Hartley, J. W., Ward, T. G. and Parrot, R. H. (1955): Studies of the adenoidal-pharyngeal-conjunctival (APC) group of viruses. *Am. J. Hyg.*, 61, 197-218. — 17) Rowe, W. P., Hartley, J. W., Roizman, B. and Levy, H. B. (1958): Characterization of a factor found in the course of adenovirus infection of tissue cultures causing detachment of cells from glass. *J. Exp. Med.*, 108, 713-729. — 18) 鈴木鑑 (1960). ゲル内拡散法 (2). 二次元拡散法 (主として Ouchterlony 法). *医学のあゆみ*, 35, 87-92. — 19) 内田清二郎等 (1960): アデノウイルスに関するシンポジウム. *総合医学*, 17, 181-251. — 20) Werner, G. H. (1956): Complement fixing antibody in guinea pigs immunized with type 3 adenopharyngo-conjunctival virus. *J. Bact.*, 72, 568-569.