ARBOR 群ウイルスの化学的症狀に関する研究

第2報 デング熱ウイルスおよびその他2, 3の ARBOR ウイルスの部分的精製*

竹 原 学**

STUDIES ON SOME CHEMICAL PROPERTIES OF ARBOR VIRUSES

II. PARTIAL PURIFICATION OF DENGUE FEVER AND SOME OTHER ARBOR VIRUSES

MANABU TAKEHARA

[受稿: 11月13日, 1962]

Arbor ウイルス中, 本邦において最も関係の深い日本脳炎 (以下 JBE と略記する) ウイルス (G 1 株) をトリブシン処理されたハムスター腎細胞培養に増殖せしめ, ウイルス粒子を ECTEOLA-Cellulose カラムもしくは Fluorocarbon 処理によつて精製可能なること, およびこの操作過程は従来の方法に比して比較的簡便なることを前報¹⁰⁾において報告した.

デング熱および黄熱ウイルスは前記の JBE ウイルスと共にそれ等の血清学的態度より Arbor B 群ウイルスに分類され^{1, 2)}, 種々のウイルス学的性状も互に類似している点が認められる. 前二者は共にハムスター腎細胞培養によく増殖し, それ等の増殖曲線もまた互に類似している^{4, 9, 10, 22)}.

デング熱ウイルス粒子の部分的精製および性状に関しては是迄も若干の実験報告^{7, 15, 21)}がなされてきたが詳細は不明である. 一方, 黄熱ウイルスに関しても詳細な検討はなされていないようである.

両種ウイルスの近縁関係を理化学的に粒子性状の面より検討することは今後重要な, かつ興味ある課題と思われる故, まず第一段階として本報告においては既報²⁰⁾にしたがつてトリブシン処理ハムスター腎細胞に増殖させた各ウイルス感染培養液を出発材料として ECTEOLA-Cellulose カラムあるいは Fluorocarbon 処理を用いてウイルス粒子の部分的精製を行なつた. この種の Ar-

bor B 群ウイルスは何れも一般に不安定でしかも組織培養系での収量は必ずしも高いことはいえないのであるが, これと比較実験の目的から, 従来より比較的性状の多くが判明しているアメリカ西部型ウマ脳炎 (WEE) およびポリオウイルスを同様な手技にしたがつて精製し, 以下のごとき検討を試みた.

実験材料ならびに実験方法

1. 供試ウイルス株:

a) デング熱ウイルス 1 型 (望月株)

本教室においてマウス脳に 160 代以上継代せるもの, あるいはトリブシン処理ハムスター腎細胞培養に 25 代以上継代せるウイルスを使用した.

b) 黄熱ウイルス (17 D 株)

同様に本教室においてマウス脳に 5 代以上継代せるウイルスを使用した.

c) アメリカ西部型ウマ脳炎ウイルス (WEE, Rockefeller 研究所保存株)

予防衛生研究所より分与を受けて, その後本教室においてマウス脳に 3 代以上継代せるウイルスを使用した.

d) ポリオウイルス II 型 (MEF-1 株)

兵庫県衛生研究所より分与を受け, その後本教室において HeLa 細胞に 10 代以上継代せるウイルスを使用した.

2. ECTEOLA-Cellulose:

前報と同じく Peteyson & Sober (1956)¹⁷⁾の方法に準

* 本報の要旨は第8回日本ウイルス学会総会 (1960年10月, 京都) で発表した.

** 神戸医科大学微生物学教室 (主任: 堀田進教授)

じて作製したものを使用した*。

3. Fluorocarbon :

前報と同じく Difron S2 (大阪金属製) と n-Heptane (東京化成製) とを 3 : 1 の割合に混合した溶媒を使用した。

4. 供試ウイルスの組織培養ならびに精製方法 :

a) デング熱ウイルスの場合

ECTEOA-Cellulose カラム法

培養角瓶 (150 ml 容) に良好なる細胞層を形成せるトリプシン処理ハムスター腎細胞培養にマウス LD₅₀ (per 0.02 ml, 以下同様) がおおむね 10^{5.0} を示すデング熱ウイルス 1 型 (望月株) の感染マウス脳乳剤を Hanks 液で 13⁻³ ~ 10⁻⁴ に稀釈し, その 1 ml 宛を接種後培養液 9 ml を添加して 35°C, 7~10 日間静置培養を行なった。細胞変性の明確に出現した培養液相の 3,000 rpm/min. 10 分の遠沈上清 10 ml を出発材料とした。この培養期間において液相中に放出されるウイルス量はほぼ最高に達することが知られている^{9,22}。

次に原液 (Crude virus suspension) を前報と同様に調整せる ECTEOA-Cellulose カラムに通し, ウイルスを吸着後 0.07 M Phosphate buffer (pH 7.2) 10 ml で溶離し, 原液および流出液 (Purified virus suspension) のウイルス力価は Reed & Muench (1938) 法¹⁸⁾ によりマウス LD₅₀ を計算し検定され, 同時に各分画の窒素量を Micro-Kjeldahl 法^{1,16)} により定量した。

Fluorocarbon 処理法

前報と同様の処理方法により精製し, 各分画のウイルス力価はトリプシン処理ハムスター腎細胞培養の試験管により TCID₅₀ (per 0.2 ml 以下同様) を計算し検定された。同時に窒素量を Micro-Kjeldahl 法により定量した。

b) 黄熱ウイルスの場合

前項同様良好なる細胞層を形成せるハムスター腎細胞培養の角瓶にマウス LD₅₀ がおおむね 10^{4.75} を示す黄熱ウイルス (17D 株) の感染マウス脳乳剤を Hanks 液で 10⁻³ に稀釈し, その 1 ml 宛を接種し, 35°C に培養後, 液相中のウイルス力価が最高となる 5~6 日目の培養液相を材料とし^{4,19)}, ECTEOA-Cellulose カラム法および Fluorocarbon 処理法によりウイルスの部分的精製を行なった。ウイルス力価は前者においてはマウス LD₅₀ により, 後者においては TCID₅₀ により測定した。

c) WEE ウイルスの場合

ハムスター腎細胞培養にマウス LD₅₀ がおおむね 10^{7.0}

を示す WEE ウイルス (Rockefeller 研究所保存株) の感染マウス脳乳剤を Hanks 液で 10⁻⁵ ~ 10⁻⁶ に稀釈し, その 1 ml を接種後, 細胞変性の顕著に出現した 2~3 日目の培養液相を材料として使用し, 同様に ECTEOA-Cellulose カラム法および Fluorocarbon 法により精製を行なった。ウイルス力価は何れもマウス脳内接種により LD₅₀ を測定した。

d) ポリオウイルスの場合

本教室において継代中の HeLa 細胞の培養液としては YLA 液に 20 % の割合にウシ血清を含み, 抗生物質としてペニシリン 100 u/l, ストレプトマイシン 100 γ/l 宛含むものを使用した¹⁵⁾。ポリオウイルス接種後はウシ血清を 5~10 % に減少させたものを使用した。37°C, 4~5 日間培養し, 良好なる細胞層を形成せる角瓶培養におおむね TCID₅₀ が 10⁻⁷ ~ 10⁻⁸ を示すポリオウイルスの感染培養液を約 1 ml 宛接種し, 35°C, 12~24 時間培養後, 細胞変性の顕著に出現した組織培養液の 3,000 rpm/min. 10 分の遠沈上清液約 10 ml を前項と同様に ECTEOA-Cellulose カラム法もしくは Fluorocarbon 処理法によりウイルスの部分的精製を行なった。精製操作により得られた原液 (Crude virus suspension) および精製液 (Purified virus suspension) についてウイルス力価は試験管培養の HeLa 細胞を用い TCID₅₀ により測定し, 同時に平行して各分画中の窒素量を定量した。

実験成績

1. デング熱ウイルスの精製 :

ECTEOA-Cellulose カラム法によつて得られた 2 つの分画液をそれぞれ型のごとく Hanks 液で 10 倍段階稀釈し, 各稀釈濃度について 5.5~6.0 g の幼若マウス 3 匹宛を使用し, 0.02 ml 宛脳内接種を行なった。接種後のマウスの観察期間を 3 週間とし, その死亡数よりマウス LD₅₀ を計算した結果, Table 1 および Fig. 1 に示されるごとく原液 (Crude virus suspension) のウイルス感染価は 10^{4.25} より精製液 (Purified virus suspension) の感染価 10^{3.50} にやや減弱するが, 含有窒素量は原液の約 93 % 程度除去されていることが分つた。一方 Fluorocarbon 処理法によつて得られた各分画液のウイルス力価測定にはハムスター腎細胞の試験管を使用し, TCID₅₀ によつて測定した。この場合の観察期間は約 2 週間であつた。その結果, Table 2 および Fig. 2 に示されるごとく, 前法と大体同様の回収率および精製度が得られ, 2 つの実験結果を総合して JBE ウイルスの部分精製の場合と大差はなかつた。

* 現在は市販品 (例えば Brown 社製, Serva 社製) が容易に入手出来る。

Table 1 Infectivity and nitrogen content of dengue and yellow fever virus fluids fractionated on ECTEOLA-Cellulose column

Materials	Dengue			Yellow fever		
	Infectivity LD ₅₀ (-log)	Nitrogen (mg/ml) (%)		Infectivity LD ₅₀ (-log)	Nitrogen (mg/ml) (%)	
Crude virus suspension (Original virus fluid, Supernatant centrifuged 3,000 r.p.m. 10 min.)	4.25	1.596		3.25	1.603	
Purified virus suspension (0.07 M PB elute, 10 ml)	3.50	0.112	7	3.25	0.198	12

Fig. 1 Purification and recovery of dengue and yellow fever virus by ECTEOLA-Cellulose column **Fig. 2** Purification and recovery of dengue and yellow fever virus by fluorocarbon **Table 2** Infectivity and nitrogen content of dengue and yellow fever virus fluids fractionated by fluorocarbon deproteinization.

Materials	Dengue			Yellow fever		
	Infectivity TCID ₅₀ (-log)	Nitrogen (mg/ml) (%)		Infectivity TCID ₅₀ (-log)	Nitrogen (mg/ml) (%)	
Crude virus suspension (Original virus fluid, Supernatant centrifuged 3,000 r.p.m. 10 min.)	5.25	1.764		4.50	1.650	
Purified virus suspension (Fluorocarbon treatment)	4.75	0.183	10	4.50	0.153	9

2. 黄熱ウイルスの精製:

前項と同様に2種の方法を用いてウイルスの部分的精製を実施した結果, Table 1, 2 および Fig. 1, 2 に示さ

れるがごとき成績を得た. この場合, ECTEOLA-Cellulose カラムおよび Fluorocarbon 処理法共にウイルス回収率は100%でありしたがって比較的良好な精製度を示

Table 3 Infectivity and nitrogen content of WEE and poliovirus fluids fractionated on ECTEOLA-Cellulose column

Materials	WEE			Polio		
	Infectivity LD ₅₀ (-log)	Nitrogen (mg/ml) (%)		Infectivity TCID ₅₀ (-log)	Nitrogen (mg/ml) (%)	
Crude virus suspension (Original virus fluid, Supernatant centrifuged 3,000 r.p.m 10 min.)	5.75	1.778		7.25	1.931	
Purified virus suspension (0.07 M PB elute, 10 ml)	5.75	0.130	7	6.75	0.156	8

Fig. 3 Purification and recovery of WEE and poliovirus by ECTEOLA-Cellulose column

Fig. 4 Purification and recovery of WEE and poliovirus by fluorocarbon treatment

Table 4 Infectivity and nitrogen content of WEE and poliovirus fluids fractionated by fluorocarbon deproteinization.

Materials	WEE			Polio		
	Infectivity DL ₅₀ (-log)	Nitrogen (mg/ml) (%)		Infectivity TCID ₅₀ (-log)	Nitrogen (mg/ml) (%)	
Crude virus suspension (Original virus fluids, Supernatant centrifuged 3,000 r.p.m 10 min.)	7.00	1.582		6.50	2.114	
Purified virus suspension (Fluorocarbon treatment)	5.50	0.189	11	6.25	0.154	7

した。

3. WEE ウイルスの精製：

同様に2種の 方法を用いて WEE ウイルスの 部分的 精製を行ない、Table 3, 4 および Fig. 3, 4 に示される がごとき 成績を得た。すなわち この場合にも ECTEO-

LA-Cellulose カラム法によつてはウイルス回収率は100 %であり、含有窒素量の約93%が除去され、良好な精製度が得られたが、一方 Fluorocarbon 処理法による精製の場合にはウイルス回収率が悪く、この原因について 現在のところ明らかでない。追て検討を要する問題であ

と思われる。

4. ポリオウイルスの精製：

ECTEOLA-Cellulose カラム および Fluorocarbon 処理法共に分画液中のウイルス力価は試験管内培養の He La 細胞により TCID₅₀を測定した。その結果 Table 3, 4 および Fig. 3, 4 に示されるがごとき成績を得た。一方ポリオウイルスは動物ウイルスの中でも物理、化学的性質の安定な比較的取扱い易いウイルスの1つに数えられているが、この種の実験の限りでは他のウイルスよりも精製度が一段と良好であるというような結果は得られなかった。

考 察

前報における JBE ウイルスの部分的精製より得られた知見をさらに拡張するために、以上のごとき精製実験を行なった結果、デング熱および黄熱ウイルスについても ECTEOLA-Cellulose カラム もしくは Fluorocarbon 処理によつてウイルス粒子の部分的精製を比較的簡便に行なうことが可能であつた。特に後者の術式にしたがえば無菌的操作が行ない易いから、厳密な無菌操作を要求する組織培養系を用いるような実験の場合には便利であると思われる。精製過程でこの種の溶媒はウイルス材料中に微量混入するが培養細胞に対する影響は全く認められなかった。ただし Fluorocarbon は蛋白および脂質に対する変性もしくは溶解作用を示すことが知られているから、ウイルスの種によつては不活性化を惹起す可能性は十分考慮しなければならない^{5,6,12)}。当然ウイルス粒子自体の形態的变化も十分起りうる可能性があると思われる。

これ等の供試した Arbor B 群ウイルスと比較実験の意味から、Arbor A 群の WEE ウイルス (Rockefeller 研究所保存株) ならびにポリオウイルス II 型 (MEF-1 株) について同様の精製実験を行なった。

両種ウイルスは比較的安定で、かつ感染細胞よりの収率も比較的高いから、従来より粒子の精製ならびに性状に関する研究が動物ウイルスの中でも非常に進んでおり^{11,13,14)}、なかんずくポリオウイルスに関しては数少ない結晶化が成功している程である¹⁹⁾。この種の動物ウイルスに用いられた複雑な精製方法をそのまま著者の供試したような Arbor B 群ウイルスの濃縮、精製に適用することが果して可能であるかどうかは、今後さらに十分検討されるべき課題であるが、この種の Arbor B 群ウイルスは不安定であるところから是迄の実験成績からは比較的短時間の中に、単一化された方法を選ぶのがよいように考えられた。

以上4種の動物ウイルスについて比較検討した成績に

よると、最も精製度の良好であつたのは黄熱ウイルスの場合であり、このような操作過程ではウイルス活性の減弱が殆んどおこらず、したがつて回収率が高かつた。検討したその他のウイルスに関して ECTEOLA-Cellulose カラムによる精製では互に大きな差違は生じなかつた。ただし WEE ウイルスを Fluorocarbon で処理した場合にはマス LD₅₀で約 $10^{1.5}$ 位の力価の減少が認められたが、この種のウイルスは粒子の構成成分として脂質が非常に多く含有されている点特徴のあるウイルスである事実を考えると、用いられた溶媒の影響を十分検討する必要があると思われる。

総 括

1. この実験に供試したデング熱1型(望月株)ならびに黄熱ウイルス(17D株)は何れもトリプシン処理ハムスター腎細胞培養に良く増殖し、それ等の感染培養液相中のウイルス力価は何れもマウス LD₅₀ (per 0.02 ml) が $10^{-4} \sim 10^{-6}$ であつて、精製材料として十分好適なものであつた。

2. これ等のウイルス粒子を部分的に精製する方法として、それぞれの感染培養液を ECTEOLA-Cellulose カラムあるいは Fluorocarbon 処理法により精製した。比較実験のために WEE ならびにポリオウイルスについて同様の方法により精製処理を行なった。

3. 4種のウイルス回収率および精製度に関しては互に若干の差違が認められたが、何れも部分的精製が可能であり、特に ECTEOLA-Cellulose カラムを使用した場合には1回の処理によつて含有窒素量の約90~95%が除かれ、かつウイルス力価は高々10%以内の減弱に留まつた。4種のウイルス中で黄熱および WEE ウイルスの場合には100%のウイルス回収率が示された。

4. Arbor B 群に属するデング熱ならびに黄熱ウイルスの粒子性状あるいは近縁関係を理化学的な面から検討するに先立ち、以上のごとき試みられた精製方法は従来の方法に比して比較的簡便なるものとして有意義であると考えられた。

稿を終るに臨み御指導と御校閲を賜つた堀田進教授並びに種々の御助力を賜つた大山昭夫助教授、研究室の諸兄に厚く感謝致すと共に、貴重なウイルス株を分与せられた国立予防衛生研究所大谷明博士並びに兵庫県衛生研究所大城俊彦博士に厚く感謝の意を表します。

尚この研究の費用の一部は文部省科学研究費によつたことを附記致します。

Summary

In the first paper of this serial works, the author reported that crude Japanese B encephalitis virus preparations were successfully purified by techniques of column chromatography with ECTEOLA-Cellulose ion-exchanger or by fluorocarbon deproteinization.

In attempt to develop these findings on Japanese B encephalitis, the present paper describes that some other arbor viruses and poliovirus were also partially purified by cellulose chromatography or fluorocarbon deproteinization.

Results obtained are as follows:

1) The viruses used were dengue fever type 1, Mochizuki strain; yellow fever, strain 17D; and Western equine encephalitis, Rockefeller Institute stock strain. The viruses were also grown in trypsinized hamster-kidney cell cultures. The concentration of each crude virus in infected fluid was about $10^{5.0}$ (mouse intracerebral LD₅₀ per 0.02 ml) in the case of dengue fever, $10^{4.0}$ in yellow fever, and $10^{7.0}$ in Western equine encephalitis respectively.

Poliovirus, strain MEF-1, was used for comparison and grown in HeLa cell culture too. HeLa cells were grown in culture bottles with medium consisting of 2% yeast extract, 0.5% lactalbumin hydrolysate in Earle's balanced salt solution (YLA medium), and 20% bovine serum.

2) Culture fluid harvested from the infected cultures, showing characteristic cellular degeneration, was centrifuged at 3,000 r.p.m./min. for 10 minutes to remove crude debris masses. The supernatant fluid was loaded onto a column containing ECTEOLA-Cellulose and eluted with 0.07 M phosphate buffer solution (pH 7.2). Some supernatant fluid was treated with fluorocarbon. In the case of yellow fever and Western equine encephalitis viruses, 100% of the original viruses was practically recovered and 90-93% of the nitrogen contained in the original virus materials was removed. Nitrogen contents of purified virus suspensions, as measured by the micro-Kjeldahl method, ranged mainly from 0.1 to 0.2 mg/ml.

参考文献

- 1) Casals, J. and Brown, L. V. (1954): Hemagglutination with arthropod-borne viruses. *J. Exp. Med.*, 99: 429-449. —2) Casals, J. (1957): The arthropod-borne group of animal viruses. *Trans. N. Y. Acad. Sci. Ser. II*, 19: 219-235. —3) 江上不二夫 (1953): 標準生化学実験. 文光堂, 東京. —4) 藤田宣哉, 大山昭夫, 堀田進 (1960): 黄熱ウイルス (17

- D株)の組織培養に関する研究. 日本ウイルス学会西日本支部第6回総会記録. ウイルス, 10: 352-354. —5) Gessler, A. E., Bender, C. E. and Parkinson, M. C. (1956 a): A new and rapid method for isolating viruses by selective fluorocarbon deproteinization. *Trans. N. Y. Acad. Sci., Ser. II*, 18: 701-703. —6) Gessler, A. E., Bender, C. E. and Parkinson, M. C. (1956 b): Animal viruses isolated by fluorocarbon emulsification. *Trans. N. Y. Acad. Sci., Ser. II*, 18: 707-716. —7) Hotta, S. (1953): Treatment of mouse-passaged dengue virus (Mochizuki-strain) with protamine sulfate. *Science*, 118: 225. —8) 堀田進, 大山昭夫 (1960): 組織培養の基本と実際. 日本臨床, 18: 2271-2276. —9) Hotta, S., Ohyama, A., Yamada, T. and Awai, T. (1961): Cultivation of mouse-passaged dengue viruses in human and animal tissue cultures. *Japn. J. Microbiol.*, 5: 77-88. —10) 堀田進, 大山昭夫, 藤田宣哉, 山田隆己 (1962): 黄熱ウイルスの組織培養に関する研究. 各種動物腎細胞のトリプシン処理単層培養. 神戸医科大学紀要, 印刷中. —11) Hoyer, B. H., Bolton, E. T., Ritter, D. B. and Ribic, E. (1959): Simple method for preparation of purified radioactive poliovirus particles: Electron micrograph. *Virology*, 7: 462-464. —12) 北野忠彦, 春名一郎 (1962): イオン交換セルロースと分配法によるウイルスの精製について, 蛋白質核酸酵素, 7: 1-8. —13) Luria, S. E. (1953): *General Virology*. John Wiley & Sons Inc., N. Y. —14) Manson, L. A., Rothstein, E. L. and Rake, G. W. (1957): Purification of poliovirus with fluorocarbon. *Science*, 125: 546-547. —15) 中川洋 (1953): デング熱病原体に関する研究. デング熱ウイルスの精製 (X-1). ウイルス, 3: 6-11. —16) 日本化学会 (1957): 実験化学講座, 23, 生物化学, I. 丸善, 東京. —17) Peterson, E. A. and Sober, H. A. (1956): Chromatography of proteins. I. Cellulose ion-exchange adsorbents. *J. Amer. Chem. Soc.*, 78: 751-755. —18) Reed, L. J. and Muench, H. (1938): A simple method of estimating fifty percent endpoint. *Amer. J. Hyg.*, 27: 493-497. —19) Schaffer, F. L. and Schwerdt, C. E. (1955): Crystallization of purified MEF-1 poliomyelitis virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 41: 1020-1023. —20) 竹原学 (1962): ARBOR 群ウイルスの化学的性状に関する研究. 第1報日本脳炎ウイルスの部分的精製. ウイルス, 投稿中. —21) Warren, J., Weil, M. L., Russ, S. B. and Jeffries, H. (1949): Purification of certain viruses by use of protamine sulfate. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 72: 662-664. —22) 山田隆己 (1962): デング熱ウイルス (1型) の組織培養に関する研究. 神戸医科大学紀要, 投稿中.