日本脳炎ウイルスの抗原性に及ぼす

Tween 80 の影響

丸 山 典 彦 丸 山 成 和 山 下 武 彦
伊 藤 浩 三 奥 田 惟 精 松 井 清 治

EFFECT OF TWEEN 80 ON ANTIGENICITY OF JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS

Fumihiko MARUYAMA, Seika MARUYAMA, Takehiko YAMASHITA
Kozo ITO, Koremasa OKUDA, Seiji MATSUI
Serum Institute of Chiba Prefecture, Ichikawa.

〔受付：10月20日，1973年〕

総 括

日本脳炎ウイルス，中山 NIH 株に対し非イオン系界面活性剤である Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate (以下 Tween 80 と略す) の影響およびその作用機序について以下の成績を得た。

1) Tween 80, 0.01v/v % 添加により日脳ウイルスは著しく免疫原性を失活した。しかしホルマリンで1カ月以上不活化保存した後の状態では Tween 80 処理によって免疫原性は失活せず力価は安定であった。

2) Tween 80, 0.2v/v % によって日脳ウイルスの感染価は 30°C, 4 時間後には約 5 Log₁₀ の感染価の減少を示し，10 時間後にはほぼ完全に失なわれた。

3) 未処理ウイルスは $\rho=1.24\sim1.26$ の分画に感染性，CF および HA 活性が認められ，また $\rho=1.19$ 付近に非感染性の HA, CF 活性が存在した。一方 Tween 80 処理ウイルスでは $\rho=1.17\sim1.19$ に非感染性の HA, CF 活性が存在した。

4) ゲル内沈降反応で，未処理ウイルスは2本の沈降線を認めたが，Tween 80 処理ウイルスでは少なくとも3本の沈降線を得た。そのうち2本は未処理ウイルスと共通なものであったが，抗原側に位置して感染性をもつと思われる反応線は減弱していた。

すなわち Tween 80 によって日脳ウイルスは分解され，感染性および免疫原性は著しく失活されたが，HA

および CF 活性は残存した。また Tween 80 の作用はホルマリン添加後十分な期間をおいた場合抑制された。

序 文

現在日脳不活化ワクチンの安定剤として Tween 80 が使用されている。Influenza virus では Tween 80-ether 処理によって HA 活性は促進されるが免疫原性は減少することが明らかにされ (Larin et al. 1971)，また Measles virus では Tween 80 処理により免疫原性はホルマリン不活化ワクチンより一時的に増強されるが，保存中に著しく抗原性を低下すると報告されている (Marmorine et al. 1969)。Rubella virus においても Tween 80-ether 処理によって HA 活性の促進が報告されている (Dold et al. 1968)。また日脳ウイルス中山 NIH 株においては HA 活性は促進されるが感染性は著しく失活すると報告されている (与那城 1970)。しかしながら日脳ウイルスの免疫原性に及ぼす Tween 80 の影響についてはまだ詳細な報告はない。われわれは感染マウス脳乳剤を用いて Tween 80 の抗原性への影響およびその作用機序の一端について検討した。

材料と方法

ウイルス：中山 NIH 株で国立予防衛生研究所より分与され，当所でさらに数代マウス脳継代したものである。

ウイルスの精製：20%感染マウス脳乳剤を低速遠心

* 千葉県血清研究所：市川市国府台 2-6-1

後、エタノールで処理し、ついで硫酸プロタミンで不純蛋白を除去した。また別に一部を硼酸緩衝食塩液(BBS) pH 9.0にて乳剤を調製し、硫酸プロタミン3 mg/ml で処理した後超遠心機にて70,000×g, 4時間遠心後の沈渣を再浮遊して濃縮部分精製したものを使用した。

感染価の測定：鶏胎児線維芽細胞による plaque 測定を行ない、大谷ら(1967)の方法によった。

赤血球凝集反応(HA)および抑制反応(HI)：Clarkeら(1958)の方法に準じて行つた。血球はガチヨウ赤血球を用いた。HI試験には中山 NIH 株のアセトン・エーテル抽出抗原を用い、免疫血清の作成は精製ウイルス液をホルマリン1:2800と Tween 80または Span 80処理した後、1カ月以上4°C保存後、4週令マウス(ddY系)に1週間隔2回腹腔に0.5 ml 宛注射してその後1週間後に採血して行い、得られた血清はカオリン処理とガチヨウ赤血球吸収によりインヒビターを除去して使用した。

感染防御試験による力価の測定：厚生省告示の生物学的製剤基準(1970)に準拠して実施し、攻撃用ウイルスは中山 NIH 株を使用し、10~50LD₅₀/0.03mlの毒力をマウス脳内に接種した。また判定はEID₅₀(50%有効免疫量)をReed and Muench(1938)法により算出した。

蛋白性窒素量の測定：トリクロール酢酸不溶性窒素(P-N)量をマイクロケルダール法によつて測定した。

補体結合反応：予研法(1960)による抗原希釈法にて実施した。

密度勾配遠心法による分画試験：5~45w/v%の蔗糖直線勾配を作製し、試料0.5mlを重層してSpinco L-3型, SW 39ローターで30,000rpm, 120分遠心して底部より4~5滴ずつ分画採取した。またCsCl平衡勾配法は $\rho=1.30\text{g/cm}^3$ のsingle layerで37,000rpm, 24時間遠心した。buoyant densityはIfft et al. (1961)の計算式により算出した。

寒天ゲル内沈降反応：Munsi, W (1958)の方法に準じてスライドガラス5×5cmに直径4mm, 中心より中心まで8mm, 深さ2mmの反応穴を使用した。ゲルメジウムは0.01M 硼酸緩衝液(pH 7.0)中にSpecial noble agar (Difco) 0.85 w/v%, NaCl 1.0M, Glysin 0.3Mをそれぞれ加え、120°C 30分高圧滅菌し、後にチメロサルを0.01w/v%に加えた。抗血清はRoyle, A. H. et al. (1966)の方法に準じてアルコール・プロタミン処理生ウイルスを40日令雄鶏に10日間隔3mlを筋肉内に5回免疫し最終免疫の1週後に採血した。

界面活性剤の調製および定量法：Tween 80 (Atlas chemi co) および Sorbitan mono oleate (Span 80) (和光純薬)は10%水溶液を調製して、保存した。後に

ウイルス液に対しそれぞれ種々の濃度に加え十分混合し、4°Cに保存した。添加後の Tween 80の定量はCukovich (1971)によるAmylose-iodene complex 発色法に準拠し、コールマンの比色計700m μ にて測定した。

実験成績

1) Tween 80処理の力価への影響

感染マウス脳よりアルコール・プロタミン法にて精製したウイルス液にホルマリン1:2800に加えて0日目, 5日目, 10日目, 30日目, 60日目に Tween 80をそれぞれ0.01%, 0.05%, 0.2%の濃度に加えその後4°Cに1~3カ月保存し、免疫原性および遠心上清の蛋白窒素量を測定した。Table 1に示すごとく4°Cに保存した場合、ホルマリン添加後30日までに Tween 80を0.05~0.2%に加えたものはいずれもED₅₀ならびに HI 価が著しく減少したが、30日後に0.01%および60日後に0.05%, 0.2%の Tween 80を加えたものは、それらの低下はみられなかった。

2) ホルマリンおよび Tween 80による不活化

①ホルマリン1:2800添加, ② Tween 80, 0.2%添加, ③ホルマリン1:2800, Tween 80, 0.2%重添加, に対し4°Cおよび30°Cにおけるウイルス不活化を検討した。Fig 1に示すごとく Tween 80またはホルマリン添加による30°Cではそれぞれ10時間および20時間でほぼ完全に不活化した。また Tween 80, ホルマリン重添加によって30°C 2時間後には7 Log₁₀以上の感染価の減少を示した。

3) Tween 80および Span 80処理の比較

アルコール・プロタミン精製ウイルス液に対し Tween 80, Span 80をそれぞれ0.2%添加して4°C, 24時間後の感染価および HA 価を測定した。さらにその後ホルマリンを1:2800に加えて1カ月4°C保存後の免疫原性を比較検討した。その結果 Table 2に示すごとく, Tween 80添加のものは感染価において24時間後に約5 Log₁₀の減少がみられ、免疫原性についても完全に失活していた。いつぼう Span 80添加については、感染性および免疫原性も未添加ウイルス液にくらべほとんど差異は認められなかった。

4) 密度勾配遠心法による検討

感染マウス脳を硫酸プロタミンおよび超遠心機を用いて精製した濃縮ウイルス液に対し、Tween 80を1%, 24時間作用させ、CsCl平衡勾配法および蔗糖勾配法にて分画した。Fig 2より Tween 80未処理ウイルスは $\rho=1.26$ 付近に感染性, HAの強い活性が認められ、 $\rho=1.19$ 付近にもまた別の HA 活性が存在した (Fig 2-A)

Table 1 Effect of Tween 80 on formalin inactivated JE virus at 4C

Additional time of Tween 80 to virus fluids	Days after Tween 80 addition (days)	Concn of Tween 80 (v/v%)	Exp No	Supernate P-N ^b (μg)	HI (Units/0.2ml)	ED ₅₀ ^c (log ⁴)
same time with formalin inactivation	90	0.2	1	51	10>	0.5 >
			2	57	10>	0.5 >
		0.05	3	ND	10>	0.5 >
			4	51	10>	0.5 >
		0.01	5	ND	10>	0.5 >
5 days after formalin inactivation	85	0.2	1	53	20	0.66 ≥
			2	56	10	0.612 ≥
		0.05	3	ND	ND	ND
			4	49	10	0.66 ≥
		0.01	5	ND	20	1.0
10days after "	80	0.2	1	53	10	0.62 ≥
			2	58	20	0.697 ≥
		0.05	3	ND	40	1.180
			4	50	20	1.0
		0.01	5	ND	20	1.390
30 days after "	60	0.2	1	49	40	1.0
			2	53	20	1.10
		0.05	3	55	40	1.18
			4	46	40	1.50
		0.01	5	ND	80	1.862
60 days after "	30	0.2	1	45	80	2.0
			2	51	40	1.18
		0.05	3	55	80	1.550
			4	45	80	1.840
		0.01	5	ND	160	2.168
No addition of Tween 80	90	—	1	32	160	1.910
			2	47	80	1.10
			3	49	80	1.860
			4	46	80	1.860
			5	32	160	1.910

a. All virus fluids were inactivated with 1:2800 formalin.

b. P-N was determined after precipitate was removed.

c. HI and ED₅₀ were measured 90 days after formalin inactivation.

ND. Not done.

いつぼう Tween 80 処理ウイルスでは $\rho=1.17\sim1.19$ に HA 活性が認められ、高密度の $\rho=1.27$ 付近にわずかに HA 活性が存在したに過ぎなかった。また Tween 80 自体は $\rho=1.16$ 以下の低密度に分布し HA 活性の分画より軽い部分に認められた (Fig 2-B) CF 活性については Fig 3 にみられるごとく、HA 活生の分布と同様の傾向を示し、Tween 80 処理によってその活性の大部分は低密度の分画に移行した。 (Fig 3-B)。

5) 寒天ゲル内沈降反応

密度勾配法に使用したウイルスに対する寒天ゲル内沈降反応は Fig 4 に示すごとく、未処理ウイルスは抗原側に強い沈降線とその他に弱い線が認められた。また Tween 80 1% 処理ウイルスでは少なくとも 3 本の沈降線がみられたが、そのうち 2 本は未処理ウイルスと共通のものであり、そして未処理ウイルスで強く認められた抗原側の沈降線は減弱していた。

Fig. 1 Inactivation curve of JE virus (Nakayama NIH) by addition of formalin and Tween 80

○—○ Untreated virus at 30C ●—● Tween 80 0.2 v/v % at 30C
▲-----▲ Formalin 1:2800 at 30C. △—△ Tween 80 0.2 v/v % and formalin 1:2800 at 30C
■-----■ Formalin 1:2800 at 4C

Table 2 Comparison of two kinds of detergents on JE virus

Detergent	Concn (v/v%)	HA ^a (Units/0.4ml)	Infectivity ^a (PFU/ml)	HI ^b (Units/0.2ml)	ED ₅₀ ^b (log ₄)
Tween 80	0.2	3200	3.3×10^3	10>	0.5>
Span 80	0.2	3200	8.0×10^7	80	1.93
No detergent	—	3200	1.8×10^8	80	1.86

a. HA and Infectivity were determined 24 hours after detergents addition.
b. HI and ED₅₀ were measured days 30 after detergents addition.

Fig. 2 Distribution of activities of JE virus (Nakayama NIH) after centrifugation in CsCl density gradient.

(A) Untreated JE virus (B) Tween 80 1 v/v % treated JE virus.

Fig. 3 Distribution of activities JE virus (Nakayama NIH) after centrifugation in sucrose density gradient.

(A) Untreated JE virus (B) Tween 80 1 v/v % treated JE virus

Fig. 4 Ouchterlony agar diffusion analysis.

N: Supernatant of normal mouse brain, T(-): Untreated virus, T(+): Tween 80 1 % treated virus, S: Immunized chicken serum.

考 察

Arbovirus における Tween 80 を用いての血球凝集素の抗原解析(与那城1970), あるいは Ether 併用による形態学的研究(M. Horzinech 1969)はすでに行なわれている。今回われわれは Tween 80 が日脳ウイルス中山 NIH 株の抗原性に与える影響について検討を加えた。本実験によって日脳ウイルスは Tween 80 処理により著しく免疫原性を損なわれるが、あらかじめホル

マリンによる不活化が完全に終了した時点ではその影響をほとんど受けないことを確かめた。また保存期間中 Tween 80 が存在した場合、液中に目立つ沈殿の析出が認められなかった。これは Tween 80 のもつ界面活性的な作用による分散効果によるものと思われる。また Tween 80 による感染性の失活については、ホルマリンによる不活化よりも早くに失活したが、赤血球凝集性は pH 7.5 以上で作用させた場合低下しなかった。Tween 80 による感染性の失活はウイルス粒子の分解によるもの

と思われる。CsCl 分画の場合未処理ウイルスは $\rho=1.26$ 付近に全ての活性を認め、 $\rho=1.19$ 付近に非感染性の HA, CF 活性を認めたが、Tween 80 処理ウイルスは大部分が $\rho=1.19$ 付近に非感染性の HA, CF 活性のみを認めるに過ぎなかつた。これは未処理ウイルスの light fraction に存在する非感染性のものと類似していたが、蔗糖勾配法でみるように Tween 80 処理ウイルスは完全には非感染性のパターンを示さず、ウイルス粒子の分解過程の様相を想定できる。

(ゲル内沈降反応でも Tween 80 処理ウイルスは抗原側の強い沈降線が減弱し、さらに新たな沈降線が出現していた。)

いつぼう Arbo A 群の Chikungunya virus (Igarashi et al. 1970) および Sindbis virus (Muscgay et al. 1960) においては、Tween 80-ether で処理することによりむしろ heavy fraction ($\rho=1.27-1.28$) に HA 活性が認められると報告されこれはウイルスの種類および処理条件の差異によるものと思われ興味あるところである。Tween 80, 1% 処理ウイルスの $\rho=1.19$ 付近の高い HA 活性(約 2500 HA/ml)の有する非感染性の分画を用いて感染防御能および HI 抗体産生をマウスを用いて試みたが抗体産生能は認められなかつた。すなわち Tween 80 によつて日脳ウイルスは影響を受け、その結果として感染性、感染防御能および HI 抗体産生能を減弱するのではないと思われる。また Span 80 によつて日脳ウイルスはほとんどその影響を受けないことから Tween 80 に含まれる Polyethylene Oxide がウイルスの抗原性を損なう主な原因であろうかと思われる。またその形態学的検討およびウイルス核酸への影響については今後さらに検討を要する問題であろう。

Summary

The effect and mechanism of the non-ionic detergent, polyethylene sorbitan mono-oleate (Tween 80), on Japanese encephalitis virus (JEV) was examined and following results were obtained.

1. Owing to the action of Tween 80 (0.01 v/v %), JEV reduced remarkably in immunogenicity. When Tween 80 was added to the virus fluid not less than 30 days after formalin inactivation, the virus did not lose its immunogenicity and the potency of vaccine was maintained stably.
2. The infectivity of the virus was reduced about 5 logs in four hours and almost completely lost in ten hours after Tween 80 (0.2 v/v %) treatment at 30 C.
3. Treated virus showed infectivity, hemag-

glutination (HA) and complement fixation (CF) activities in the fraction with a buoyant density of 1.24-1.26 g/ml, while non-infectious HA and CF activities were detected with a buoyant density of 1.19 g/ml.

On the other hand, Tween 80 treated virus had only non-infectious HA and CF activities in the fraction with a buoyant density of 1.17-1.19 g/ml.

4. In gel diffusion test, the untreated virus showed two precipitation bands, while the Tween 80 treated virus presented at least three precipitation bands. Of the three precipitation bands, two were common to those of the untreated virus and one of the two which was situated near the antigen well and considered to be related with infectivity became fainter.

From these results, it is clarified that JEV was disrupted by few molecules of polyethylene oxide which is a component of Tween 80 and viral infectivity and immunogenicity was reduced remarkably, while its HA and CF activities were maintained.

The action of formalin seemed to play a first role and that of Tween 80 is supposed to be suppressed in proportion to the degree of formalin fixation.

文 献

- 1) Clark, D. H. and Cassals, J. (1958) : Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-born viruses. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 7, 561-573.
- 2) Cucakovich, N. B. (1971) : Determination of tween 80 in tissue culture media, vaccine and related products. Analy Biochem. 40, 183-186.
- 3) Dold, H. J. and Northrop, R. L. (1968) : The nonspecific inhibitors of rubella virus hemagglutination. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 128, 577-581.
- 4) Horzinech, M. (1969) : Structural constituents of venezuelan equine encephalitis virus. Arch. Virusforsch. 27, 94-108.
- 5) Ifft, J. B., Voet, D. H. and Vinograd, J. (1961) : The determination of density distributions and density gradients in binary solution at equilibrium in ultracentrifuge. J. phys chem 65, 1138-1145.
- 6) Igarashi, A., Fukuoka, T., Nithiuthal, P., Hshu, L. C. and Fukai, K. (1970) : Structural components of chikungunya virus. Biken. J. 13, 93-110.
- 7) 厚生省 (1970) : 生物学的製剤基準.
- 8) 国立予防衛生研究所, リケッチア・ウイルス部 ウイルス第4室編 (1960) : 日本脳炎補体結合反

応の新しい術式(少量法)について.

- 9) Larin, N. M. and Galtimore, P. H. (1971) : Antigenic properties of the envelope of influenza virus rendered soluble by surfactant-solvent systems. *J. Hyg. Camb.* **69**, 35-46.
- 10) Macmorine, H. G. and W. Parisius (1969) : Effects of tween 80 and freon 113 on measles virus. *Appli Microbiol.* **17**, 379-383.
- 11) Mussgay, M. and Rott, R. (1964) : Studies on the structure of a hemagglutinating component of a group A arbo virus (Simdbis). *Virology* **23**, 573-581.
- 12) Mansi, W., (1958) : Slide gel diffusion precipitin test. *Nature.* **181**, 1289.
- 13) 大谷明, 奥野剛(1967) : 国立予防衛生研究所学友会編, ウイルス実験学, 各論(丸善), 147-154.
- 14) Reed, L. J., Muench, H., (1938) : A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, **27**, 493.
- 15) Royle, A. Hawkes and lan, D. Marshall., (1966) : Studies of arbo viruses by agar gel diffusion. *Am. J. Epidemiol.* **86**, 28-44.
- 16) 与那城敏夫(1970) : 日本脳炎ウイルスの血球凝集反応に及ぼす Tween 80 の影響, 熱帯医学, **12**, 22-31.