2種類のメンブランフィルターにおける各種 ウイルスの有効なろ過について

新 海 健 吉 西 村 卓 三*

EFFICIENT FILTRATION OF VARIOUS VIRUSES THROUGH TWO TYPES OF MEMBRANE FILTERS

Kenkichi SHINKAI and Takuzo NISHIMURA

Central Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd., Tokyo

〔受付：1月8日，1976年〕

総 括

素材の化学的性質の異なるセルローズアセテートメンブラン (CAM) とセルローズナイトレートメンブラン (CNM) による各種ウイルスのろ過効率と、それによらずウイルス希釈液の影響およびメンブランフィルター前処理の効果などを比較検討し、つぎのような成績をえた。

1. 単純性疱疹ウイルス (HSV), vesicular stomatitis virus (VSV) およびインフルエンザウイルスをリン酸緩衝食塩水 (PBS) に希釈し、CNM でろ過した場合、ほとんど100%のウイルスがメンブランフィルターに吸着され、ろ過液中にウイルスはまったく観察されなかった。いつぼう、HSV, VSV およびインフルエンザウイルスをポアサイズが 0.45μ のCAMでろ過した場合は、メンブランへの吸着はあまりおこらず、それぞれ48, 76および72%のウイルスがメンブランフィルターを通過した。

2. HSV, VSV およびインフルエンザウイルスを0.1%卵黄含有PBSあるいは2%仔牛血清含有Eagle's minimum essential medium (MEM) で希釈し、無処理のCAMあるいはCNMでろ過すると、ウイルスをPBSあるいはMEMで希釈したときにくらべ、ろ過効率の上昇が見られた。

3. ポアサイズが 0.45μ のCNMを5%仔牛血清あるいは1% polyvinylpyrrolidone (PVP) で前処理して、HSV, VSV およびインフルエンザウイルスをろ過すると、0%の無処理CNMろ過率が、それぞれ

61~91, 71~82 および74~94%に上昇し、 0.45μ のCAMも同様の前処理で49, 67および68%からそれぞれ52~93, 92~100および88~96%に上昇した。特記すべきはHSVの場合で、CAMは仔牛血清前処理で、またCNMはPVP前処理でろ過効率の顕著な上昇が認められた。

以上の成績から、CNMよりCAMを使用したほうが、ウイルスのろ過率は概して高く、メンブラン前処理によりろ過率を高めるためには、ウイルスの種類により、メンブランの材質およびコーティング剤を慎重に選択すべきことが示唆された。

序 文

メンブランフィルターによるウイルスろ過は、ウイルスと細菌を分別するのみならず、ウイルスの大きさの測定^{1,2)}、ウイルスの濃縮^{10,12)}、中和試験用ウイルス液の調製¹¹⁾およびウイルス中和機構の解明¹⁴⁾などに広く応用されている。しかしある種のメンブランフィルターにはウイルスが非常に吸着されやすいため、ウイルスをろ過する前に、仔牛血清⁹⁾、牛血清アルブミン⁹⁾あるいはpolyvinylpyrrolidone (PVP)¹³⁾でメンブランフィルターを前処理する必要性が報告された。

いつぼう、ウイルスのメンブランへの吸着性はメンブラン素材の化学的性質によつて異なることが示唆され⁴⁾、われわれも先に、インターフェロンのメンブランフィルターへの吸着程度がセルローズアセテートメンブラン (CAM) とセルローズナイトレートメンブラン (CNM) によつて、顕著に異なることを見いだしたが³⁾、ウイルスについてCAMとCNMの違いを詳細に調

* 三共株式会社中央研究所

べた報告は見あたらない。

今回は, vesicular stomatitis virus (VSV), 単純性疱疹ウイルス (HSV) およびインフルエンザウイルスのろ過における, 1) CAM と CNM のろ過効率の比較, 2) ウイルス希釈液のろ過効率におよぼす影響, 3) 仔牛血清, PVP などのコーティング剤による前処理の効果および, 4) メンブランフィルターに吸着したウイルスの再溶出などについて検討したので報告する。

材料と方法

1. ウイルス

VSV (New Jersey 株) は農林省家畜衛生試験場の徳田悟一博士より分与されたもので, これをニワトリ 11 日卵漿尿膜腔で増殖させたものを用いた。HSV (II 型・NO 株) は東京大学医科学研究所の吉野亀三郎教授より分与されたもので, Vero 細胞で増殖させて用いた。このものの分離場所, 継代歴などはすでに報告してある⁹⁾。インフルエンザウイルスの A/AA/2/60 (H₂N₂) 株は 10 日卵漿尿膜腔で増殖させたものを用いたが, これの継代歴などはすでに報告したとおりである⁹⁾。

2. 細胞

初代ニワトリ胎児 (CE) 細胞は 8 日めふ化鶏卵より, すでに報告したような方法で調製した⁹⁾。継代細胞であるマウス由来 L 929 細胞とサル由来 Vero 細胞は, ともに東京大学医科学研究所の吉野亀三郎教授より供与されたものである。

3. ウイルスのブラック定量法

VSV の L 929 細胞上でのブラック定量法⁹⁾, HSV の Vero 細胞上でのブラック定量法⁹⁾, およびインフルエンザウイルスの CE 細胞上でのブラック定量法⁹⁾はすべて, すでに報告したような方法を用いた。

4. メンブランフィルター

FM-22, FM-30, FM-45 および FM-65 は富士写真フイルム株式会社より, SM-11305, SM-11306, SM-11307 および SM-11106 は Sartorius-Membranfilter GmbH より, EH および HA は日本ミリポア・リミテッドより, また TM-2 は東洋濾紙株式会社よりそれぞれ購入した。このうち, 素材がセルローズアセテートのものは, FM-22, FM-30, FM-45, FM-65, SM-11106 および EH であり, セルローズナイトレートのもの, SM-11307, SM-11306, SM-11305, HA および TM-2 である。

5. ウイルスのろ過方法

すべてのメンブランフィルターは直径が 25 mm のものを用い, Syringe-type のホルダーに設置し, 0.05 ml あたり約 30 ブラック形成単位となるようにしたウイルス

希釈液 5 ml が約 15 秒間にフィルターを通過するように加圧してろ過を行なった。ろ過液にはただちに最終濃度 5 % となるように仔牛血清を加え, ブラック定量法によりウイルス量を測定した。ろ過効率は, ろ過しない対照試料に対するブラック数の割合 (%) であらわした。

6. ウイルス希釈液

ウイルスの希釈液としては, 1) pH 7.2 のリン酸緩衝食塩水 (PBS), 2) PBS に 0.1 % となるように卵黄を加えたもの (Y-PBS), 3) Eagle's minimum essential medium (MEM) および, 4) MEM に仔牛血清を 2 % 加えたもの (CS-MEM) を用いた。

7. メンブランフィルターのコーティング物質

仔牛血清はメンブランフィルター前処理使用のまえに, あらかじめ FM-22 でろ過して用いた。PVP は分子量 7×10^5 の Badische Anilin-und Soda-Fabrik 製品を用いた。これらの溶解液および希釈液には PBS を用いた。

成 績

1. メンブランフィルターの素材およびポアーサイズと各種ウイルスのろ過効率の関係

まず予備実験として, 素材の異なるいろいろなメンブランフィルターで, PBS に希釈した VSV, HSV およびインフルエンザウイルスのろ過効率を比較してみた。表 1 に示すように, 素材がセルローズアセテートである FM-22, FM-30, FM-45, FM-65, SM-11106, および EH は 3 種のウイルスを吸着する率が少なく, ポアーサイズによる透過率の差がみられた。すなわち, VSV は 0.3μ 以上のもので約 75%, HSV は 0.45μ 以上で約 50%, またインフルエンザウイルスでは 0.3μ 以上で約 70% がそれぞれメンブランフィルターを通過した。

いつぼう, 素材がセルローズナイトレートである SM-11307, SM-11306, SM-11305, HA および TM-2 などろ過した場合はいずれもみなウイルスをほぼ 100% 吸着し, ポアーサイズを大きくしてもウイルスはメンブランフィルターを通過せず, ろ過液中にはほとんどウイルスを観察することができなかつた。以上の成績より, ウイルスをたん白質を含有しないような液で希釈した場合には, そのろ過効率が, メンブランフィルターの化学的性質によつて顕著に左右されることがわかつた。

2. ウイルス希釈液によるろ過効率の影響

上述の成績は, ウイルスを PBS に希釈した場合であるが, つぎにウイルス希釈液として, 一般に用いられている MEM, CS-MEM および Y-PBS によつて 3 種のウイルスを希釈し, CAM と CNM でろ過して, その成績を比較してみた。この際, メンブランフィルターの

表 1 Filtration of various viruses diluted in PBS through CAM or CNM of different porosities.

Membrane filter	Material of membrane	Porosity of membrane (μ)	Percentage of viruses recovered in the filtrate		
			VSV	HSV	Influenza virus
FM-22	Cellulose acetate	0.22	57	14	55
FM-30	"	0.3	79	33	68
FM-45	"	0.45	76	48	72
FM-65	"	0.65	77	52	70
SM-11106	"	0.45	72	45	67
EH	"	0.5	75	42	72
SM-11307	Cellulose nitrate	0.2	0	0	0
SM-11306	"	0.45	0	0	0
SM-11305	"	0.6	6	0	2
HA	"	0.45	0	0	0
TM-2	"	0.45	0	0	0

表 2 Filtration of various viruses diluted in different diluents through two types of 0.45 μ membrane filters

Virus	Membrane filter	viruses diluted in			
		MEM	CS-MEM**	PBS	Y-PBS***
VSV	FM-45	75*	94	76	78
	SM-11306	0	82	0	67
HSV	FM-45	44	62	48	76
	SM-11306	0	13	0	17
Influenza virus	FM-45	75	89	72	87
	SM-11306	0	63	0	60

* Numerals denote per cent of virus recovered in the filtrates.

** Eagle's minimum essential medium supplemented with 2% calf serum.

*** Phosphate-buffered saline supplemented with 0.1% egg-yolk.

ポアサイズは表1の成績をもとに、すべて0.45 μ をえらんだ。成績をまとめて表2に示す。

VSVをFM-45でろ過した場合、MEM、Y-PBSの成績はPBSとほぼ同じであつたが、CS-MEMではかなりのろ過効率の上昇をみとめた。SM-11306使用の場合は、MEMの成績はPBSと同様、ろ過効率は0%であつたが、CS-MEMとY-PBSでは顕著なるろ過効率の上昇がみられ、とくに前者の場合は80%以上を示した。

HSVをFM-45でろ過した場合は、MEMではPBSと変わらなかつたが、CS-MEMとY-PBSでは60%以上のろ過効率を示した。SM-11306の場合はいずれの希釈液とも、低いろ過効率であつた。

インフルエンザウイルスをMEM、CS-MEMおよびY-PBSに希釈して、FM-45でろ過した場合は、それぞれ75%、89%および87%のウイルスが通過した。SM-

11305の場合は、CS-MEMとY-PBSで希釈したときのみ、約60%のウイルスが通過した。以上の成績より、PBSとMEMの成績およびY-PBSとCS-MEMの成績はほぼ一致していることから、ウイルス希釈液中にたん白質が含まれると、ろ過効率の改善がみられるが、MEMのようにアミノ酸を含有する液では効果のないことが判明した。

3. メンブラン前処理の効果

つぎに、コーティング剤によるメンブランフィルター前処理の効果をしらべた。すなわち、1.3~5%の仔牛血清あるいは0.25~1%のPVP 5mlをあらかじめろ過することによって、メンブランフィルターを前処理し、さらにPBS 10mlで残存するコーティング物質を洗浄したのち、PBSで希釈した各種ウイルス5mlをろ過した。その成績をまとめて表3に示す。

VSVをFM-45でろ過した場合、1.3~5%仔牛血清

表 3 Filtration of various viruses through two types of 0.45 μ membrane filters pretreated with calf serum and PVP

Virus	Membrane filter	Pretreatment with						
		Calf serum			PVP			PBS
		5%	2.5%	1.3%	1%	0.5%	0.25%	—
VSV	FM-45	100*	93	90	92	79	76	67
	SM-11306	82	76	59	71	77	56	0
HSV	FM-45	93	84	70	52	64	52	49
	SM-11306	61	40	35	91	80	67	0
Influenza virus	FM-45	96	92	94	88	78	77	68
	SM-11306	94	72	47	74	94	82	0

* Numerals denote per cent of virus recovered in the filtrates.

あるいは1% PVP を含む PBS で前処理すると、90%以上のウイルスがろ過液中に回収された。SM-11306の場合は、2.5~5% 仔牛血清あるいは0.5~1% PVP で、ほぼ70~80%の回収率を示した。

HSV の場合は、FM-45を2.5~5% 仔牛血清、SM-11306を0.5~1% PVP で前処理すると、80%以上のろ過率が示されたが、ほかの場合、すなわち、FM-45を PVP、SM-11306を仔牛血清でそれぞれ処理した場合は、いずれも50%前後のろ過効率で、効果が少なかった。

インフルエンザウイルスの場合は、FM-45を1.3~5% 仔牛血清で前処理すると90%以上のウイルスがろ過液中に観察され、また1% PVP 前処理においても約90%のろ過率がみられた。いつぼう、SM-11306の場合は2.5~5% 仔牛血清あるいは0.25~1% PVP 前処理によつて、70%以上のウイルスがメンブランを通過した。

4. メンブランフィルターに吸着したウイルスの溶出
PBS で希釈した VSV、HSV およびインフルエンザウイルスを CNM でろ過するとすでに示したように(表1)、ほぼ100%のウイルスが吸着されてしまうが、これを25% 仔牛血清含有 MEM で溶出を試みたところ、前2者の場合はまったくメンブランからのウイルス遊離はみられず、インフルエンザウイルスの場合は約5%だけ遊離がみられた。

考 察

素材の異なる CAM と CNM による各種ウイルスのろ過効率を比較したところ、ウイルス希釈液として PBS を用いた場合、著明な差があらわれた(表1)。ウイルス希釈液にたん白質を含有する CS-MEM あるいは Y-PBS を用いても、CAM のほうが CNM にくらべて高いろ過効率を示し(表2)、また仔牛血清と PVP 前

処理実験においても、両メンブランの差は少なくなつたものの、CAM のほうが概して高いろ過効率を示した(表3)。

ポアーサイズの異なる FM-22、FM-30、FM-45および FM-65などの CAM によるろ過効率の比較実験から、VSV とインフルエンザウイルスは0.3 μ で、また HSV は0.45 μ でプラトーに達した。この値は、それぞれのウイルスサイズの2~3倍に相当し、ほかの報告^{9,10)}とよく一致した。

いつぼう、HSV は VSV やインフルエンザウイルスに比較して、メンブランフィルターに吸着されやすいことがいくつかの実験成績で示された。すなわち、無処理 CAM におけるろ過実験で、HSV はほかの2種のウイルスのろ過効率より低く(表1)、希釈液に加えたたん白質の効果も、ほかのウイルスほど著明にあらわれず(表2)、さらにメンブランの前処理効果も低かつた(表3)。これらの成績は、メンブランフィルターへの吸着性がウイルスの種類によつてかなり異なることを示唆する。

HSV でさらに注目すべきは、メンブランフィルター前処理実験で示されたように、CAM を仔牛血清で、また CNM を PVP で前処理するとそれぞれきわめて高いろ過率が示され、これと逆の組み合わせでは、たいしたろ過効率の改善が見られなかつた点である。この事実は、ウイルスのろ過に際し、前処理を行なう場合に、各ウイルスによつて、メンブランフィルターの種類とコーティング剤の種類を慎重に選択する必要性のあることを示した。

さきに、Wallis ら (1967 a)¹⁰⁾はエンテロウイルスを CNM に吸着させ、牛血清や Sodium lauryl sulfate を含む液で溶出を試み、ウイルスの濃縮に成功したと報

告しているが、われわれも同じ手段により、仔牛血清によるメンブラン吸着ウイルスの溶出を試みたが、不成功に終わった。このことはすでに指摘したように、ウイルスの種類によりメンブランへの吸着様式が異なり、エンテロウイルスの吸着が可逆的であるのに対し、今回の実験に用いた3種のウイルスは再遊離ができないような様式で吸着しているのであろう。なお、この結果は、われわれが先に行なつたインターフェロンがメンブラン、とくに CNM に強く結合し、25%仔牛血清含有 MEM で再溶出できなかった成績⁹⁾とよく一致している。

Summary

The efficiency of filtration of various viruses was compared between cellulose acetate membrane (CAM) and cellulose nitrate membrane (CNM). In addition, studies were made on the effects of virus diluents and pretreatment of these membrane filters on the filtration of various viruses. The results obtained are summarized as follows.

(1) Herpes simplex virus (HSV), vesicular stomatitis virus (VSV), and influenza virus diluted in phosphate-buffered saline (PBS) or Eagle's minimum essential medium (MEM) were adsorbed completely to untreated CNM. Therefore, no infectivity was detected in the filtrate of any virus. When HSV, VSV and influenza virus diluted in the above-mentioned diluents were filtered through untreated 0.45μ CAM, the viral infectivity recovered in the resulting filtrate was about 45, 75, and 75%, respectively.

(2) When HSV, VSV and influenza virus were diluted in PBS containing 0.1% egg-yolk or in MEM supplemented with 2% calf serum and filtered through untreated CAM or CNM, there was an increase in the amount of recovery of these viruses.

(3) When CAM and CNM were pretreated with 1.3 to 5% calf serum or 0.25 to 1% polyvinylpyrrolidone (PVP), they were prevented from adsorbing HSV, VSV and influenza virus, and the recovery of viral infectivity was increased in the filtrate through each membrane.

文 献

- 1) Givan, K. F., Rozee, K. R. and Rhodes, A. J. (1965) : Incidence of rubella antibodies in female subjects. *Can. Med. Assoc. J.*, **92**, 126-128.
- 2) Hsiung, G. D. (1965) : Use of ultra filtration for animal virus grouping. *Bacteriol. Rev.*, **29**, 477-487.
- 3) Kawana, T., Shinkai, K. and Yoshino, K. (1974) : Typing of herpes simplex virus strains of genital and nongenital origins. *Jap. J. Microbiol.*, **18**, 235-241.
- 4) 中野 稔, 松倉俊彦 (1973) : ろ過法. ウイルス実験学総論, 国立予防衛生研究所学友会編. p.35. 丸善株式会社, 東京.
- 5) 新海健吉, 西村卓三 (1974) : 定量的血球吸着反応法による Virazole の抗インフルエンザウイルス活性について. *ウイルス*, **24**, 175-180.
- 6) Shinkai, K. (1975 a) : Virucidal effect of sodium *p*-chloromercuribenzoate on influenza viruses attributable to inhibition of virus particle-associated RNA-dependent RNA polymerase. *Jap. J. Microbiol.*, **19**, 19-24.
- 7) Shinkai, K. (1975 b) : Plaque morphology of herpes simplex virus in various cells under liquid overlay as a marker for its type differentiation. *Jap. J. Microbiol.*, **19**, 459-462.
- 8) Shinkai, K. and Nishimura, T. (1976) : Efficient filtration of interferon through membrane filters. *Jap. J. Microbiol.*, (in press).
- 9) Ver, B. A., Melnick, J. L. and Wallis, C. (1968) : Efficient filtration and sizing of viruses with membrane filters. *J. Virol.*, **2**, 21-25.
- 10) Wallis, C. and Melnick, J. L. (1967 a) : Concentration of enteroviruses on membrane filters. *J. Virol.*, **1**, 472-477.
- 11) Wallis, C. and Melnick, J. L. (1967 b) : Virus aggregation as the cause of the non-neutralizable persistent fraction. *J. Virol.*, **1**, 478-488.
- 12) Wallis, C., Henderson, M. and Melnick, J. L. (1972) : Enterovirus concentration on cellulose membranes. *Appl. Microbiol.*, **23**, 476-480.
- 13) Yoshino, K. and Morishima, T. (1971) : Filtration of viruses through Millipore membranes coated with polyvinylpyrrolidone. *Arch. ges. Virusforsch.*, **35**, 399-401.
- 14) Yoshino, K. and Kishie, T. (1973) : Studies on the neutralization of herpes simplex virus. VI. The mode of action of complement upon antibody-sensitized virus. *Jap. J. Microbiol.*, **17**, 63-70.