インフルエンザウイルス Von Magnus ^{1) 2)}

型不完全粒子の構造に関する研究

〔I〕 その形態学的特性*

水 谷 裕 迪**

HIROMICHI MIZUTANI : STUDIES ON THE STRUCTURE OF VON
MAGNUS TYPE INCOMPLETE FORM OF INFLUENZA VIRUS.(I) THE MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF
INCOMPLETE VIRUS.

〔受稿 12月3日 1957〕

I 緒 言

インフルエンザウイルスの構造に関する研究は、一方では主として、成熟ウイルス又は増殖過程にあるウイルスの電子顕微鏡的研究により形態学的に研究が進められ、他方では主として、成熟ウイルスを物理化学的に分解又は破壊し、その産生物の生物学的性状、化学的組成、形態等を研究する、と云う方向に添ってその歩みが進められてきた。即ち、前者の方向としては、C. Morgan et al,³⁾ J.S. Murphy & F.B. Bang,⁴⁾ C. G. Harford,⁵⁾ R.W. G. Wyckoff,⁶⁾ Werner G.H. & R.W. Schlesinger,⁷⁾ 等の研究があり、後者の方向としては、L. Hoyle,⁸⁾ L. Hoyle et al⁹⁾¹⁰⁾ Frisch-Niggemeyer et al,¹¹⁾ D.A.J. Tyrell,¹²⁾ 等の研究がある。併し、これ等の研究の多くは、分割的研究に止まり、ウイルス構造研究の目的とする、ウイルスの機能と形態構造との結びつき解明には、未だ程遠いものを感じられる。ここで筆者は Undiluted Passage により、ウイルスとしての機能の一部を欠くに到った粒子、即ち、Von Magnus 型不完全ウイルスの構造を、完全ウイルスのそれと多角的に比較研究する事によりウイルスの機能と構造形態との結び付き解明に何等かの足がかりを得られるのではないかと考え、インフルエンザウイルス Von Magnus 型不完全粒子の構造を、完全ウイルスのそれと物理化学的血清学的等の諸角度から比較研究しようと試みた。又、不完全ウイル

スと完全ウイルスの電子顕微鏡像の差異については、既に G.H. Werner & W. Schlesinger⁷⁾ 塩田¹³⁾ 等の報告があるが、これらの像は、いずれも大気中乾燥法によつて撮影されたもので、表面張力などの作用による人工的変形をまぬがれず、従つてこれ等の像による両ウイルスの比較は、両ウイルス本来の大きさ形態を比較したとはいひ難いので、本実験は先ず、両ウイルスの電子顕微鏡像を、なるべく人工的変形の少ない状態で撮影する事から始められた。即ち、本実験第 I 報では、試料作成の際にうける表面張力などの人工的変形作用をさけるため、不完全ウイルスと正常ウイルスの電顕像を凍結乾燥法により撮影しこの像から両ウイルスの形態を比較、又これと従来の大気中乾燥法による像とを比較、以上の像の総合的比較と両ウイルスの溶液中に於ける密度の測定とから、両ウイルスの構造の差を考察した。

II 実験材料及び方法

- 1) 種ウイルス：インフルエンザ A-PR8 株（当研究室保存フエレット継代148代マウス継代596代孵化鶏卵継代60代以上 Standard passage せる感染漿尿液）を種ウイルスとして用いた。
- 2) Standard passage ウイルス：種ウイルスをブイヨンにて 10^{-6} 稀釈、その 0.2cc を、10日 卵の尿膜腔に接種、36°C 2日間培養後 4°C 氷室に一昼夜放置、その感染漿尿液を採取した。

* 本論文の内容の一部は昭和31年7月第3回ウイルス増殖に関するシンポジウムで報告された。

** 国立予防衛生研究所細菌部（指導：福見秀雄部長）

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 1. Air-dried preparation of 0.05% formalin fixed "Standard Passage" virus. Shadowed with platinum palladium. Shadow angle 3/1.

Fig. 2. Frozen-dried preparation of "Standard Passage" virus. Shadowed with platinum palladium. Shadow angle 3/1.

Fig. 3. Sedimentation pattern of "Standard Passage" virus. 9,000 r.p.m. Interval 4 min.

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Fig. 4. Air-dried preparation of 0.05% formalin fixed "3rd Undiluted Passage" virus. Shadowed with platinum palladium. Shadow angle 3/1.

Fig. 5. Frozen-dried preparation of "3rd Undiluted Passage" virus. Shadowed with platinum palladium. Shadow angle 3/1.

Fig. 6. Sedimentation pattern of "3rd Undiluted Passage" virus. 12,000 r.p.m. Interval 4 min

3) Undiluted passage ウイルス: Von Magnus¹²⁾

の法に従い、種ウイルスをそのまま 0.25cc宛、11日卵の尿膜腔に接種、36°C 24時間培養後その感染漿尿液を原液のまま次代に継代、不完全粒子存在比の最も高い第3代目の漿尿液を実験に用いた。

4) 感染価及び赤血球凝集価測定法: 感染価は、被検材料を普通ピジョンで10倍階段希釈し、各階段につき4個の10日卵尿膜腔にその0.2cc宛を接種、36°C 72時間後の漿尿液赤血球凝集の有無から Reed and Muench¹⁴⁾ 法に従い EID_{50} を求めた。

赤血球凝集価は、被検液を倍数希釈、これに等量の0.5%鶏赤血球浮遊液を加え、4°C 2時間後の赤血球凝集像から終末点を読んだ。

5) ウイルスの精製: プールした感染漿尿液を、4,500 r.p.m. 20分、22,500 r.p.m. 60分 (Spinco L, Rotor No. 30,) の分画遠心3サイクルにより精製した。精製ウイルスは、Ph 6.8のリンゲル氏液に浮遊せしめ、又、凍結乾燥法で撮影するための電子顕微鏡試料は、更にこれを2%安息香酸アンモニウム溶液におきかえた。

6) 沈降恒数測定: 東京大学理工学研究所の国産空気駆動式超遠心分析器で測定した。

7) 電子顕微鏡試料の作成: 凍結乾燥法による試料は、R.C. Willimas¹⁶⁾ の方法に従い、-70°Cの凍結状態にあるコロドオン膜に、2%安息香酸アンモニウム溶液に浮遊せしめた精製ウイルスをバポネフリン噴霧吸入器にて低速噴霧、直ちに真空吸引して乾燥後70°Cにて塩類を昇華せしめたものを用いた。又、大気中乾燥法による試料は、型の如くリンゲル氏液に浮遊せしめた精製ウイルスをコロドオン膜にのせた後、蒸溜水にて二回洗滌して塩類を除去、そのまま大気中にて乾燥させたものを用いた。

8) 電子顕微鏡: 日立製作所中央研究所のHU-9型により撮影した。

9) 密度測定用アルブミン溶液及び食塩水溶液: D.G. Sharp et al¹⁷⁾ によつて用いられた牛血清アルブミンは高価につくので、加培地用 Fisher Scientific Co. 製血製アルブミンを適量の蒸溜水にとかし、4,500 r.p.m. 20分にて沈渣及び浮遊物を除き、更にこれを38,000 r.p.m. 90分 (Spinco L, Rotor No. 40) にて遠心その上清を用いた。アルブミン溶液の比重は、比重瓶で測定し、食塩水溶液の比重は、物理恒数表より算出した。

III 実験成績

1) ウイルス材料: 実験に用いた種ウイルス3代 Standard Passage ウイルス、3代 Undiluted Passage ウイルスの原漿尿液及び精製後の HA 価、 EID_{50} /HA比、沈降恒数等を、Table 1 に総括する。 EID_{50} /HA 比が不完全ウイルスと完全ウイルスの量比を表わすものと仮定すれば、3代 Undiluted Passage ウイルスに於ける不完全ウイルスと完全ウイルスの比は約1,000:1となり、又その沈降恒数の値は、Gard S. et al¹⁸⁾¹⁹⁾ によつて報告された Von Magnus型不完全ウイルスの値とほぼ類似する。これらの値からみて、Undiluted Passage ウイルスに於いては、Von Magnus 型不完全ウイルスが圧倒的に多いものと考えられる。

Table 1. HA titer, EID_{50} , EID_{50} /HA, S_{20} of virus suspension

	SP virus	UP virus
HA/ml	$10^{3.7}$	$10^{3.4}$
EID_{50} /ml	$10^{10.1}$	$10^{6.8}$
log EID_{50} /HA	6.4	3.3
S_{20}	700	430

2) Standard Passage ウイルスの電子顕微鏡的形態: Fig. 1 は、精製 SP ウイルスを従来の大気中乾燥法にて撮影した像を示し、Fig. 2 は同試料を凍結乾燥法にて撮影した像、Fig. 3 は同試料の沈降恒数撮影像を示す。

これらの像に示される如く、SP ウイルスはいずれの方法によるも直径80~110m μ のほぼ均一な規則正しい球形を示し、凍結乾燥法による像も大気中乾燥法による像も、その形態の大きさの上に大差はみられない。即ち、SP ウイルスは、表面張力などの人工的変形作用を比較的受けにくいものと思われる。

尚、Fig. 2 に割れた粒子がみられるのは、その規則正しい Shadow の形からみて、恐らく撮影時に於ける電子線などの作用による二次的な変形と思われる。

3) Undiluted Passage ウイルスの電子顕微鏡的形態: Fig. 4 は、精製 3代 UP ウイルスを従来の大気中乾燥法にて撮影した像、Fig. 5 は、同試料を凍結乾燥法にて撮影した像、Fig. 6 は同試料の沈降恒数撮影像を示す。これらの像に示される如く、UP ウイルスの電子顕微鏡像に於いては、凍結乾燥法による像と大

気中乾燥法による像との間に、著しい差が認められる。即ち、大気中乾燥法による像では、ドーナツ様粒子や押しつぶされた袋様の粒子が多数みられ、その大きさも非常に小さい扁平粒子から、SP ウイルスと同等の大きさの粒子、SP ウイルスより遙かに大きい扁平粒子迄、多種多様の粒子が認められる。然るに、凍結乾燥法による像では、最早ドーナツ様粒子や押しつぶされた袋様の粒子は認められず、すべての粒子が比較的立体的な形態をとどめる。併し、粒子の大きさ、形態の不整はこの場合にも認められ、沈降恒数据影像も粒子の不均一性を示し、SP ウイルスの像とは明らかに異つた像を示す。

4) 溶液中に於けるSPウイルスとUPウイルスの粒子密度の比較：前記の電子顕微鏡像による両ウイルスの比較から、SP ウイルスは内容が緻密であるに対し、UP ウイルスは、特にその内部密度が小さい、いわばふわふわの袋様の構造を持つている事が予想されたので、この予想を確かめるべく、SPウイルスとUPウイルスの粒子密度を Pardee A. B.²⁰⁾ の方法に従がい HA 価を指標として比較検討した。即ち、両ウイルスを種々の階段的比重を有する溶液に浮遊せしめ、種々の速度にて遠沈 (Spinco L, Rotor No. 40) 1/5 上清中に残存する HA 価と遠沈前の HA 価の比、及び、ウイルス粒子が沈降しなくなる溶液の比重とから、各ウイルス粒子の密度を求めた。但しこの場合、Pardee²⁰⁾ によつて用いられた蔗糖液による密度の測定は、脱水のため誤差をまぬがれないので、著者の場合は、実験材料及び方法でのべたアルブミン溶液を用いた。又こうして得られた高分子溶液中での密度を、食塩水の如き低分子溶液中での密度と比較する事により、ウイルス粒子中に於ける自由水量の差及び密度測定に及ぼす溶液の影響を見当づける事が出来ると考え、同時に食塩水溶液中に於ける密度が測定された。Fig.7,8, は、各溶液の比重とウイルス粒子沈降の関係を示し、Table 2 は Fig.7,8, の外挿により得られた。SP ウイルスとUP ウイルスのアルブミン溶液中及び食塩水溶液中での密度測定値を示す。

この表に示される如く、UP ウイルスの密度は、アルブミン溶液中に於けるも食塩水溶液中に於けるも、いずれもSPウイルスに比し明らかに小さい。

又、同一ウイルスに於いても、測定に用いる溶液により測定値に大差があり、低分子溶液中では、ウイルス粒子は可成り脱水作用を受ける事が伺われる。

又、今仮りに、両ウイルスの組成物質が全く同一と

Fig. 7 Sedimentation rates of incomplete virus and complete virus in densities varied albumin solution. (Spun at 35,000 r.p.m. for 60 minutes)

Fig. 8 Sedimentation rates of incomplete virus and complete virus in densities varied NaCl solution.

Table 2. Density of incomplete virus and complete virus

Density virus	Density in albumin solution	Density in NaCl solution
Complete virus	1.1	1.23
Incomplete virus	1.07	1.16

仮定し、その乾燥密度を等しく 1.321 とすれば、UP ウイルスと SP ウイルスの水和量は夫々330%, 200%

程度となり、UPウイルスは、SPウイルスに比し、ふわふわした状態にある事が予想される。

Ⅳ 考 察

本実験に用いた Undiluted Passage ウイルスは、 $EID_{50}/ml : 10^{6.8}$, $\log EID_{50}/HA : 3.4$, 沈降恒数 $S_{20} : 430$ 前後で、P. V. Magnus⁽¹²⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾等によつて報告された不完全ウイルスの諸測定値とほぼ類似し、いわゆる Von Magnus型不完全ウイルスを圧倒的に大量含むものと考えられ、従つて、この Undiluted Passage ウイルスの像を、Von Maguus 型不完全ウイルスの像として論じても大過はないものと思われる。

Von Magnus 型不完全ウイルスと完全ウイルスの電顕像による形態の比較については、既に、Werner G.H. & R.W.Schlesinger⁷⁾、塩田¹³⁾等によつて検討され、いずれも不完全ウイルスは、形態大きさが不整、且つドーナツ様粒子や大型乃至小型粒子を大量に含む事を報告しているが、これらの電顕像は、いずれも、大気中乾燥法により撮影されたもので、ウイルス粒子は試料作成の際、何等かの人工的変形を余儀なくされ、従つて、これらの像による大きさ形態の比較は、ウイルス本来の大きさ、形態を比較したとは言い難いものであつた。本実験の目的は、先づこれらの人工的変形による判断の誤りを避けるため、最も人工的変形の少ない方法でウイルス粒子の像をとらえ、これにより、不完全ウイルスと完全ウイルスの大きさ形態を比較しようとするにあつた。即ち、電顕試料作成の際、ウイルス粒子がうける人工的変形作用としては、最も大なるものに試料乾燥時の表面張力作用があり、他にウイルス精製時や脱塩のための洗滌時にうける滲透圧の急変などが考えられているので、本実験では、これらの諸作用を殆んど避けようと考えられている凍結乾燥法により電顕像を撮影、これにより不完全ウイルスと完全ウイルスの形態を比較した。又、これと同時に対照の意味から従来の大気中乾燥法による像も撮影されたが、これらの2方法による電顕像の総合的な比較から、次の諸点が明らかにされた。即ち、

①不完全ウイルスの電顕像に於いて、大気中乾燥法を用いた場合は、ドーナツ様粒子や異常扁平粒子が圧倒的多量見られたが、凍結乾燥法を用いた場合は、すべての粒子が立体的な球形を示した。

②不完全ウイルスの電顕像にみる粒子の形、大きさは、凍結乾燥法によるも、大気中乾燥法によるものと

同様著しく不整で、大量の異常粒子が見られ、平均して完全ウイルスよりむしろ大きい粒子が多かつた。

③完全ウイルスの電顕像に於いては、大気中乾燥法によるも、凍結乾燥法によるも、粒子はほぼ均一な立体的球形を示し、その形態に著しい差はみられなかつた。

以上の諸点を考察すると、先づ①の結果からは、不完全ウイルスも、生の状態に於いては又立体的な形態を保ち、ドーナツ様粒子や扁平粒子の出現は、表面張力などの人工的変形作用の所産である事が予想される。

次に、②の結果に於いて、不完全ウイルスの電顕像にみる粒子の形、大きさが著しい多様性を示した事は、それらの粒子の中には、或いは不完全ウイルス以外の粒子、即ち、ウイルスとは関係のない粒子や不完全ウイルスにもなり切れない粒子が混在しているのではなからうかと云う可能性を考えしめる。併し、小数の完全ウイルス様粒子については、これらの粒子が EID_{50}/HA 比より予想される量以上に存在しているとしても、不完全ウイルスの材料が完全ウイルスの Undiluted Passage によつて作られた事を考えれば或いは漿尿膜に吸着できなかつた完全ウイルスの残存した粒子ではなからうかとも考えられる。いずれにしても、完全ウイルスの像に於いては、大気中乾燥法によるも凍結乾燥法によるも同様に均一な立体的球形を示し、不完全ウイルスの像に於いてのみ、両方法による像に著しい差がみられたと云う事は、不完全ウイルスの構造が、外力によりたやすく押しつぶされ易い事を示しており、この事は、不完全ウイルスの内部密度が著しく粗になつてゐるのか、又は、同ウイルスの内容が乾燥に際し容易に蒸発する自由水の如き物質で占められているのか、等の構造を予想せしめ、不完全ウイルスの大きさが、少なくとも平均的にみて完全ウイルスのそれより小さくないに拘らず、その密度は、後者のそれより明らかに小さい値を示した事も、この構造仮説を裏書きしているものと思われる。

Ⅴ 総 括

1) ウイルスの構造と機能の結びつきを解明する上に何等かの足がかりを得ようとする目的から、ウイルスとしての機能の一部を欠く不完全ウイルスの形態を完全ウイルスのそれと、凍結乾燥法及び大気中乾燥法による電顕像により2面的に比較検討した。

2) 不完全ウイルスの電顕像に於いて、大気中乾燥

法による像にはドーナツ様粒子や扁平粒子が多量見られ、凍結乾燥法による像では、すべての粒子が立体的な形態を示した。

3) 不完全ウイルスの像にみられる粒子は、凍結乾燥法による像に於いても、大気中乾燥法による像に於けると同様、完全ウイルスに比し著しい多様性を示した。併し、この粒子像の不整の度は、大気中乾燥法を用いた場合特に甚だしかった。

4) 不完全ウイルスと完全ウイルスの溶液中に於ける密度が比較され、前者はアルブミン溶液中では約1.07、食塩水溶液中では約1.16、後者は、アルブミン溶液中で約1.1、食塩水溶液中で約1.23なる事が示された。

5) 以上の結果から、不完全ウイルスの形態学的構造が論ぜられた。

終りに臨み、御指導を賜った恩師福見秀雄部長並びに電子顕微鏡撮影に御便宜を頂いた日立中央研究所土倉氏、沈降恒数測定に御指導を頂いた東京大学理工学研究所宇井、中村両氏に厚く感謝の意を捧げる。又、終始御援助と御助言を頂いた当研究所西川文雄技官に厚く感謝の意を捧げる。

REFERENCES

- 1) P.V. Magnus: Propagation of PR8 strains of influenza virus in chick embryos. 11. The formation of incomplete virus following inoculation of large doses of seed virus. *Acta Pathol. Microb. Scand.* **28**, 250-293, 1951
- 2) P.V. Magnus: Propagation of PR8 strains of influenza virus in chick embryos. 111. Properties of the incomplete virus produced in serial passages of undiluted virus. *Acta Pathol. Microb. Scand.* **29**, 157, 1951
- 3) C. Morgan, H.M. Rose & D.H. Moore: Structure and development of viruses observed in the electron microscope. 111. Influenza virus. *J. Exp. Med.* **104**, 171-182, 1956
- 4) J.S. Murphy & F.B. Bang: Observations with the electron microscope on cells of chick chorio-allantoic membrane infected with influenza virus. *J. Exp. Med.* **95**, 259, 1952
- 5) C.G. Harford: Electron microscopy of early cytoplasmic changes due to influenza virus. *J. Exp. Med.* **101**, 577-590, 1955
- 6) R.W.G. Wyckoff: Formation of the particles of influenza virus. *J. Immunol.* **70**, 187, 1953
- 7) Werner G.H. & R.W. Schlesinger: Infectious and non-infectious forms of influenza virus. *J. Exp. Med.* **100**, 203-216, 1954
- 8) L. Hoyle: Structure of the influenza virus. The relation between biological activity and chemical structure of virus fractions. *J. Hyg.* **50**, 229, 1952
- 9) L. Hoyle, B. Jolles & R.G. Mitchell: The incorporation of radioactive phosphorus in the influenza virus and its distribution in serologically active virus fractions. *J. Hyg.* **52**, 119, 1954
- 10) L. Hoyle, R. Reed & W.T. Astbury: Electron microscope studies of the structure of influenza virus. *Nature*, **171**, 256, 1953
- 11) W. Frisch-Niggemeyer & L. Hoyle: The nucleic acid and carbohydrate content of influenza virus A and of virus fractions produced by ether disintegration. *J. Hyg.* **54**, 201-212, 1956
- 12) D.A.J. Tyrell and F. L. Horsfall: Disruption of influenza virus. *J. Exp. Med.* **99**, 321-342, 1954
- 13) Shiota O: Studies on the incomplete form of influenza virus 11. *Virus* **6**, 193, 1956
- 14) Reed and Muench: A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.* **27**, 493-497, 1938
- 15) Stanley, W.M. & Miller G.L.: Quantitative aspects of the red blood cell agglutination test for influenza virus. *J. Exp. Med.* **79**, 185, 1944
- 16) R.C. Williams: A method of freeze-drying for electron microscopy. *Exp. Cell Res.* **4**, 188-201, 1953
- 17) D.G. Sharp, A.R. Taylor, I.W. Mclean, D. Beard & J.W. Beard: Densities and sizes of the influenza viruses A (PR8 strain) and B (Lee) and the swine influenza virus. *J. Biol. Chem.* **159**, 29-44, 1945
- 18) Gard S., P.V. Magnus, Svednry A., & Birch Anderson: A studies on the sedimentation of influenza virus. *Arch. f. Gesam. Virusforsch.* **IV**, **5**, 591, 1952
- 19) Gard S., and P.V. Magnus: Studies on interference in experimental influenza. 11. Purification and centrifugation experiments. *Arkiv. Kemi. Mineral. Och. Geol.* **24**, 8, 1946
- 20) A. B. Pardee & C.A. Schwerdt: A simplified method of determining the size of viruses in impure preparations. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 381-389, 1952
- 21) W.C. Price, R.C. Williams, R.W.G. Wyckoff: Electron micrographs of crystalline plant viruses. *Arch. Biochem.* **9**, 175-185, 1946