72, 1820-1828, 1957. 12) Stapleton, G. E.: Variations in the sensitivity of *Escherichia coli* to ionizing radiations during the growth cycle. *J. Bacteriol.*, **70**, 357-362, 1955. 13) 高橋常郎: 放射線によるファージ誘発現象に関する研究. (I) X線によるファージ誘発の動力学. ウイルス投稿中. 14) 田波洋: 溶原性 (Lysogenesis)

に関する研究. I. 溶原化の成立と人為的溶原菌の生物学的諸特性の比較. *日本細菌学雑誌*, **11**, 391-398, 1956. 15) Tobias, C. A.: The dependence of some biological effects of radiation on the rate of energy loss. Symposium on Radiobiology The basic aspects of radiation effects on living systems. 1950.

光動力学的不活化ウイルスの性質に関する研究

岩 恭 三*

Kyozo IWA: THE NATURE OF ECTROMELIA VIRUS INACTIVATED BY THE PHOTODYNAMIC ACTION OF METHYLEN BLUE

〔受稿 12月12日 1958〕

一般にウイルスは紫外線, X線等の短波長の放射線の直接照射により不活化され, その宿主に対する感染力を失うが, 可視線にはその作用が殆んどない. ところが1933年, Perdau and Todd により数種のウイルスはメチレン青液の中で可視光線の Photodynamic action を受けて不活化されるという報告がなされた. その後, 数人の人々によりその不活化の作用機序に関してかなり詳しい説明がなされた. 特に1954年, Welsh and Adams は Phage 間の光動力学的作用に対する感受性の相異は血清学的分類と関連があるという1933年の Burnet の所見を確認した. 又, 1956年山本は多数の色素を試みて, この作用の強い色素は heterotricyclic の構造を有する塩基性色素であり, その作用機序はウイルス核酸に対する酸化作用であろうと推定した. 而るに, 動物ウイルスに関しては, この種の研究に乏しく, 特に不活化ウイルスそのものの性質に関する報告は殆んどなされていないので, 本論文は特に Ectromelia Virus を用いて, このウイルスが粒子として free の状態で在るとき, 及び細胞内に侵入して増殖過程に入っている時に, Photodynamic action を受ける態度, 更にこの不活化ウイルスが, 感染能, 免疫原性を保有しているか否かに関して試べてみたのである.

材料及び実験方法

ウイルス・宿主系として釜洞, 加藤により発見された Ectromelia Virus-Ehrlich 癌細胞系を用い, ウイルス不活化の判定には癌細胞内にウイルス感染によって特異的に出現する封入体を指標とした. 萩原, 古沢によれば感染20時間以内に出てくる封入体は first cycle のもの, 即ち接種した親ウイルスにより生じたもので, 子ウイルスによる 2nd cycle の封入体は未だ混入していない. 又豊島によれば感染後20時間の封入体数は接種ウイルスの感染価に比例して増減する. そこで不活化の程度をいちいち感染価測定をしなくても, 癌細胞と混合してマウスに注入しておけば, 20時間後に出てくる封入体数でかなり鋭敏な, %の level に於て計り得るのである.

1) Virus: 研究室保存の Ectromelia Virus ハムステッド株及微研株でマウス継代のもの. 使用に際しては斃死直前のマウス肝の20%乳剤, 3000 r. p. m. 10分後の遠心上清を原液とする.

2) Ehrlich 癌細胞: 研究室保存の Hyperdiploid 型, マウス腹腔内接種後7~10日頃のものを使用する.

3) Methyleneblue 水溶液: 1/15モルの磷酸 Buffer, pH 8.0 に溶かし, 0.001, 0.01, 0.1, 1%のものを作る.

4) 光源及照射方法: 照射材料 1~3ml を9cm直径の蓋付きシャーレに入れ, ガラス板上に置き, 手で軽

* 大阪大学微生物病研究所感染病理学部 (主任 釜洞醇太郎教授)

く水平方向に振りながら、上下各々 15cm の距りに固定してあるマッド20W 螢光燈 2 本で照射する。操作は暗室で行う。

実験成績

〔I〕不活化試験

Perdrau and Todd の実験からはこの Ectromelia Virus が Photodynamic action を受けるか否か疑問であつたので、先づ感受性の有無を調べてみた。色素の最終濃度を 0.1% とし、光線も 20 分間照射してみた。

1) Virus 原液 0.9ml に 1% メチレン青液 (M・B) 0.1 ml を混じ、20 分間照射する。

2) M・B の代りに pH 8.0, 磷酸 Buffer を混ず。(色素対照)

3) 光線対照として 1) を暗室に放置する。

次に 1), 2), 3) に各々 Ehrlich 癌細胞 (E 癌) 0.5ml づつ混じ、直ちに 2 匹づつのマウスに注入する。20 時間後、E 癌の塗沫ギームザ染色標本を作り、出現せる封入体数を計算する。結果を表 I に示す。

Table 1. Photodynamic inactivation of the ectromelia virus

virus mixed with	radiation	inclusions %
*M. B. solution	light	0
phosphate buffer	light	30
M. B. solution	dark	30

* 0.9 ml of virus mixed with 0.1 ml of 1 % methylen blue was irradiated by the visible light, and the virus was mixed with Ehrlich ascites cells, and they were injected into the mice. The fraction of inclusions in the cells were counted 20 hours after injection.

即ち、色素と光線を加えるとウイルスは不活化されるが、何れか一方の欠けた対照では活性を保ち、よく E 癌に感染して封入体を形成する。故にこのウイルスは明らかに Photodynamic inactivation を受けることが分る。

〔II〕メチレン青の濃度

Welsh and Adams は Bacteriophage 不活化に M・B 濃度を 0.001% にしている。そこで比較のために 0.1% → 0.0001% に段階稀釈してみた。表 II にその結果を示す。照射時間は 20 分である。

即ち最終濃度 0.001% までは利くが 0.0001% に下げると全くウイルスを不活化できない。このことは Phage

Table 2. Concentration of methylen blue for the photodynamic inactivation

concentration of methylen blue	radiation	inclusions %	
		at 20 hrs.	at 48 hrs.
0.1 %	light	0	0
0.1	dark	32	75
0.01 %	light	0	0
0.01	dark	30	72
0.001 %	light	0	0
0.001	dark	31	80
0.0001 %	light	28	80
0.0001	dark	31	78
buffer	light	30	79

の場合とよく一致している。以後の実験では 0.01% で使用した。

〔III〕光線の量

照射距離一定のため光線量は照射時間に比例する。そこで 10 秒から 20 分まで色々な時間で不活化の程度を試してみた。ウイルス 0.9ml に 0.1% M.B. 0.1ml を混じ、一定時間照射した後 E 癌 0.5 ml と混合してマウスに注入し 20 時間後の封入体数を計算する。結果を図 1 に示す。

Fig. 1 Doses of the light for the photodynamic inactivation

The fraction of inclusions in control is 42.2%.

対照として光線対照をとり、その封入体数は 42.2% である。縦軸は実験値の対照に対する比率で示す。大多数のウイルスは 5 分照射すれば不活化されることが分る。封入体は全細胞数の 0.1% 以下になると検出困難となる。即ち感染細胞数が約 10^5 以下、ウイルス側から云えば約 $10^5 ID_{50}$ 以下になると first cycle の封入体は検出困難となる。それ故 5 分間照射で、約 $10^8 \rightarrow 10^5 ID_{50}$ 以下、即ち 99.9% 以上のウイルスが不活化され

たと推定される。しかし5分照射では0.1%以下の残存活性ウイルスは増殖を続けるため、数日以内に封入体が出現してくる。20分照射では完全に不活化されるためか10日以上経ても封入体は検出できず、又20分不活ウイルスをそのままマウスに接種しても発症してこない。

〔IV〕細胞内ウイルスに対する光動力学的作用

一般にウイルスは細胞内に侵入して増殖過程に入つてしまえば、free ウィルス粒子を不活化するような処置、例えば抗体、紫外線等の作用を受け難くなると云はれている。そこで Photodynamic Action に対しても耐性があるか否か試してみた。ウィルス原液とE癌を当量混合してマウス腹腔内に注入し感染後一定時間毎に細胞をひき出して3回洗滌し free のウィルスを除いた後、2等分し、一方は光線対照にとり、一方は実験として0.01%最終濃度にM・B液を混じ光線10分照射後マウスに注入す。結果を表Ⅲに示す。

Table 3. Resistance of the intracellular virus to the photodynamic action

*time after infection	inclusions of experiments	inclusions of dark controls	ratio to controls
0 hrs.	0 %		
0.5	1.3	22.4%	0.06
1	3.0	30.2	0.10
2	14.5	35.4	0.41
3	19.0	43.3	0.44
4	28.7	42.2	0.68
5	32.4	41.5	0.78
6	42.8	45.5	0.94
8	43.4	44.7	0.97

* The infected cells were drawn out from the mouse at the definite time, and after irradiation they were transferred into the other mice. The inclusions were counted 20 hours after infection.

感染後2時間より光線に対する耐性が明らかになり、4時間になると約70%、6時間になると90%以上のウイルスが不感受性になつている。この実験では細胞自体にも Photodynamic action が加わるため、細胞の活性が低下し、そのため二次的にウイルス合成能が落ち、封入体数の減少をきたしていることも考えられるので、次に細胞障害の吟味をした。

〔V〕細胞障害の吟味

癌細胞0.25mlに0.1% M・B 0.1ml, Buffer 0.65ml

を混じ20分照射した後、ウイルス原液0.5mlを混じ、マウス内に注入し20時間後の封入体数を計算した。対照は光線対照と色素対照をとつた。結果は実験値が33%、光線対照が32%、色素対照が30%の封入体出現率を示し、細胞に対しては障害作用がないことを確認した。

〔VI〕不活化ウイルスの干渉能の有無

Henle and Henle によれば Influenza Virusに紫外線の量を増加すると次の順序で各性質が侵される。即ち先づ感染力が消失し、次に毒性、干渉能力、免疫原性、赤血球凝集性、最後に補体結合抗原が侵される。Ectomria Virus に紫外線を照射すれば感染力、干渉能力、免疫原性の順であり、適度の照射で干渉能力のある不活化ウイルスを得る。そこで、この Photodynamic action を受けたウイルスが、紫外線不活化ウイルス同様に干渉能力を保有しているか否かを試してみた。対照として紫外線不活化ウイルスを併用した。紫外線不活化及干渉方法は豊島の方法に従い、1分照射ウイルスを用いた。

1) 紫外線不活化ウイルス2mlと活性ウイルス0.5mlとE癌0.5mlを同時に混合しマウス2匹に注入する。

2) 活性ウイルス2mlと0.1ml M・B 0.2mlを混じ光線10分照射して不活化ウイルスを作り、之に活性ウイルス0.5mlとE癌0.5mlを混合して、マウス2匹に注入する。

3) 対照として正常マウス肝乳剤の遠心上清2mlを1), 2)の不活化ウイルスの代りに用いる。

4) 対照として不活化ウイルスの代りに Buffer 2mlを用う。20時間後に出現した封入体数を計算した結果を表Ⅳに示す。

Table 4. Failure of interfering property of the inactivated virus

interfering virus	inclusions at 20 hrs.	
	Exp. 1	Exp. 2
virus inactivated with ultraviolet light	5.6%	4.7%
virus inactivated with light and M. B.	23.2	26.6
normal liver emulsion	28.4	25.2
phosphate buffer	24.5	27.3

即ち、光動力学的不活化ウイルスには干渉能力が無いことが分る。

〔VII〕免疫原性の有無

ウイルスを完全に不活化するために光線を20分照射した不活化ウイルスを用い、10匹のマウスに0.2 mlづつ腹腔接種で、1週間毎に3回注入した。3回終了後12日目より実験に供した。この間マウスは1匹も死ななかつた。

1) 先づ, free の Virus を中和するか否かをみるために、活性ウイルス0.2mlとE癌0.2mlを混合直ちに上記免疫処置マウスと正常マウスに注入した。結果は表Vに示す如く、対照の方は封入体が出現してきたに拘わらず、処置マウスの方は封入体が出ずに終つた。

Table 5. Immunogenicity of the inactivated virus

virus and cells were mixed, and injected into the	inclusions %	
	at 24 hrs.	at 48 hrs.
normal mouse	10	65
immunized mouse	0	0

2) 次にウイルスがE癌に感染し、既に細胞内に入ってしまった後にでもよく封入体形成を抑え得るか否かを試してみた。活性ウイルス0.5mlとE癌0.5mlを混じ、正常マウスに注入後4時間を経てから感染細胞をひき出し3回洗滌後2等分して、正常マウスと免疫処置マウスに注入する。感染19時間後及48時間後に出現せる封入体数を計算した結果が表VIである。

Table 6. Effect of the immunity against the intracellular virus

At 4 hrs. after infection the cells were transferred into the	inclusions %	
	at 19 hrs.	at 48 hrs.
normal mouse	24	93
immunized mouse	0	0

即ち免疫処置マウスの方は全く封入体が出現してこない。萩原、古沢によれば感染4時間後には大多数のウイルスは細胞内に侵入し終つて Eclipse の段階にあり、又感染20時間までに出現している封入体は大多数、接種ウイルスに由来する first cycle の封入体がある。故にこの実験で19時間後に封入体が全く出現していないことは、明らかに免疫処置マウス内で、細胞内のウイルス増殖過程が抑えられたものと思はれる。

3) 次に、既に封入体を形成している細胞をこの免疫処置マウスに移入した場合、既存封入体の細胞内での発展過程が抑制され得るか否かを試してみた。Ectromelia Virusは同一の細胞内で2つの形態学的に異

Table 7. The effect of the immunity on the infected cells which have already contained the inclusion bodies

time	mouse	inclusions %	rate of inclusion forms	
			A-type	B-type
*19 hrs.	normal	26	7	93
23	normal	49	8	92
23	immunized	28	9	91
48	normal	85	62	38
48	immunized	27	8	92

* 19 hours after infection the cells were transferred into the normal and immunized mouse.

つた封入体を形成しながら増殖する。先づB型封入体が現われ、次にA型封入体がB型の周辺又は内部の細胞質内に劃然と出現してくる。そこで主としてB型の時期に細胞をひき出し免疫処置マウスに移入したところ、A型えの発展が明らかに抑制され、A型封入体が出現してこないのである。即ちB型のままで Stop してしまつたのである。結果は表VIIで示す通り感染19時間後の細胞を移入し23時間及48時間後に計算したところ、正常マウスえ移入した場合はA型封入体が発生し、増加し且つ、大きさも増大してくるのにも拘わらず、免疫マウスえ移入した場合はA型の発生が完全に Stop してしまい、B型の時期のままにとどまつている。以上、この M・B 不活化ウイルスは明らかに強力な免疫原性を保有していることが分る。

考 察

Perdrau and Todd は Ectromelia の Photo-dynamic inactivation は不規則な結果であつたと報告しているが、本実験によりこのウイルスは Bacteriophage におとらぬほど感受性があり、容易に不活化されることを知つた。更にかような不活化ウイルスそのものの性質に関する報告が細菌及動物ウイルスを通じて殆んど無いので、特にその干渉能力及免疫原性の有無を試みた。Henle and Henle によれば Influenza Virus に紫外線を照射すれば、大多数のものは30秒で感染力を失ひ、3分では干渉能を保有しているが5分では著明に干渉能の低下をきたす。又、豊島によれば Ectromelia Virus の紫外線照射で同じく30秒で感染力を失ひ、干渉能は3分まで保有し、5分で著明に低下している。即ち、感染力を失う最小時間(30秒)の6倍(3分)の量を照射しても猶、両ウイルスは干渉

能を保有している。そこで M.B. 不活化の場合も最小照射時間（5分）の2倍量（10分）照射で実験したのであるが干渉能は全く認められなかった。故に光線照射時間が長かつたために干渉能が消失したのではなく、本質的に、この Photodynamic action は感染性と殆んど同時に干渉能をも破壊するものと思はれる。之に反して、免疫原性は可なり安定で光線20分照射でも充分に保存されている。この不活化ウイルスで免疫すれば、紫外線不活化ウイルスで免疫したと同じく強力な免疫をマウスに与えることができ、この免疫マウスで、古沢の実験を追試してみたところ全く同一結果を得た。即ち、この免疫マウス腹腔内では明らかに癌細胞内で増殖しつつあつたウイルスが不活化されてしまうのである。猶、細胞内ウイルスは Photodynamic inactivation を受け難くなることも知つた。

結 論

Ehrlich 癌細胞 Ectromelia Virus 系の封入体形成を指標として Photodynamic inactivation を受けたウイルスの性質を試べた。

- 1) Ectromelia Virus は光動力学的不活化を受ける。
- 2) 既に細胞内に入り増殖過程に入つたウイルスはこの不活化作用を受け難い。
- 3) この不活化ウイルスは干渉能を持たない。
- 4) この不活化ウイルス免疫原性を保有す。
- 5) この不活化ウイルスにより免疫されたマウス腹腔内に、既に感染を受けた癌細胞を移入すれば、封入体の形成並びに既存封入体の発展過程は阻止される。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導を賜つた笠洞醇太郎教授並びに古沢英一助手に衷心より感謝の意

を表します。

参 考 文 献

- 1) Perdrau, J. R., and Todd, C. The photodynamic action of methylen blue on bacteriophage. Proc. Roy. Soc. (London) **B. 112**, 277-287, 1933.
- 2) Welsh, J. N., and Adams, M. H. Photodynamic inactivation of Bacteriophage. J. Bact., **68**, 122-127, 1954.
- 3) Burnet, F. M. The Classification of dysenterycoli bacteriophages. III. A correlation of the serological Classification with Certain biochemical tests. J. pathol. Bacteriol., **37**, 179-184, 1933.
- 4) Yamamoto, N. Photodynamic action on Bacteriophage I. the relation between chemical structure and the photodynamic activity of various dyes. Virus, **6**, 510-521, 1956.
- 5) Kato, S., Hagiwara, K., and Kamahora, J. The mechanism of the growth of ectromelia virus propagated in the ascites tumor cells. I. Study on the inclusion bodies of ectromelia virus. Med. J. Osaka Univ., **6**, 39-46, 1955.
- 6) Hagiwara, K., Kato, S., Furusawa, E., Baba, B., and Kamahora, J. II. Studies on the growth curves in vivo and in vitro. Med. J. Osaka Univ., **7**, 561-569, 1956.
- 7) Furusawa, E., The Effect of antibody on intracellular virus multiplication (III). Med. J. Osaka Univ., **8**, 711-723, 1958.
- 8) Toyoshima, K., Furusawa, E., and Kamahora, J. Interference between active and Ultraviolet-inactivated viruses of ectromelia in Ehrlich ascites tumor cells. Med. J. Osaka Univ., **8**, 299-313, 1958.
- 9) Henle, W., and Henle, G. The effect of ultraviolet irradiation on various properties of influenza virus. J. Exp. Med. **85**, 347-364, 1947.
- 10) Furusawa, E., Hagiwara, K., and Kamahora J. The effect of antibody on intracellular virus multiplication. I. Med. J. Osaka Univ. **7**, 551-560, 1956.