

螢光抗体法によるマウス白血病ウイルスの研究

第 1 編

C58 マウス白血病ウイルス抗原の精製

—特に Fluorocarbon 処理法の検討—

岡山大学医学部平木内科

高 橋 喜 亮

〔昭和41年6月15日受稿〕

目 次

<p>I 緒 言</p> <p>II 実験材料及び実験方法 実験材料 実験方法</p> <p>A ウイルス抗原の精製 1) 濾過管通過法 2) 超遠沈分画法 3) Fluorocarbon 処理法</p> <p>B 螢光抗体法 1) 抗血清の作製 2) 抗体グロブリンの螢光標識 3) 非特異反応因子の吸着 4) 直接法の実施 5) 螢光顕微鏡装置 6) 特異螢光の判定 7) 組織細胞学的観察</p> <p>III 実験成績 A 螢光抗体法直接法による特異螢光 1) 螢光抗体及び標本の種類</p>	<p>2) 非特異的螢光</p> <p>3) 特異螢光 a. 濾過管通過ウイルス抗原に対する螢光抗体 b. 分画遠沈ウイルス抗原に対する螢光抗体 c. Fluorocarbon 処理ウイルス抗原に対する螢光抗体</p> <p>4) 小 括</p> <p>B Fluorocarbon 処理液の物理化学的組成に関する検討及びウイルス活性の吟味 1) 電子顕微鏡による検討 2) 紫外線吸光度よりみた Fluorocarbon 処理液の化学的組成 3) ウイルス活性の吟味 4) 小 括</p> <p>C 螢光抗体法染色手技の改良とその結果</p> <p>IV 総括及び考案</p> <p>V 結 語</p>
--	---

I. 緒 言

ウイルス学の発展にはウイルス精製分離の改良進歩が大なる役割を果して来た。動物ウイルスの精製分離はメチルアルコール法¹⁾、プロタミン沈澱法²⁾、濾過管通過法及び分画遠沈法³⁾等により、或る種のウイルスでは精製可能なる事が報じられ、就中インフルエンザウイルスや牛痘ウイルスでは比較的精製され易い特性を有するも動物ウイルス全体としては植物ウイルスに比し甚だ精製分離が困難の様である。その精製度の標準も定め難かつたが、Palade⁴⁾に

より超遠沈 Pellet の Ultrathin sectioning technic が物理的裏付けとなつたため、その後の動物ウイルス分離には一般に分画遠沈法が用いられて来た。腫瘍ウイルスでは Moloney⁵⁾ はプロタミン沈澱法及び分画超遠沈法を用い、Crawford⁶⁾ はニワトリ胎児より得た線維芽細胞の組織培養に Rous Sarcoma Virus を感染させ、その培養液中に放出した Rous 肉腫ウイルスを Rubidium chloride 連続密度勾配遠沈法で精製した。又 Epstein ら¹¹⁾ により Fluorocarbon 処理法が報告されている。抗ウイルス血清を作るために腫瘍ウイルスの精製分離を行なつたも

のでは Shope 乳嘴腫については Kidd²²⁾ が濾過管通過法で, Mellors³⁰⁾ が超遠沈法で, 又 Polyoma ウイルスについては Malmgren²⁶⁾ が凍結融解により, Levinthal²⁴⁾ が濾過管通過法により, Rous 肉腫ウイルスについては Vogt⁴¹⁾ が分画超遠沈法, Mellors²⁹⁾ がホモジネイトにより抗血清を得ている. 私は C₅₈ マウス白血病ウイルスの組織培養又は他種動物への感染が不能であつたため, その精製分離に特に力を注いだ. 即ち従来よく用いられた濾過管通過法及び分画遠沈法の外に, Gessler¹⁴⁾ らにより始められ, Epstein¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾ により電頭的に, 又 Hamparian¹⁷⁾, Hummler¹⁹⁾²⁰⁾, Stanley³⁷⁾ らにより免疫学的にウイルスの精製分離効果が証明されている Fluorocarbon 処理法をも用いて抗原を作製し, それぞれの抗原につき免疫学的方法即ち螢光抗体法, 電頭的観察, 物理化学的方法, 生物活性及び文献的考察を行ない, 何れが抗血清を得るため, 最も優れた方法であるかを比較検討した.

II. 実験材料及び実験方法

実験材料 Texas 大学由来の C₅₈ 系自然発生リンパ性白血病マウス並びに教室で継代移植中の白血病株 OHS-LL, No. 1 (リンパ性), OHS-ML, No. 1 及び No. 2 (骨髄性) のマウス及び対照として C₅₈ 系成熟正常マウス (生後 3 ヶ月以内) を使用し, 脾, リンパ節, 肝を摘出して各々を抗原の作製に供した.

実験方法

A ウイルス抗原の精製

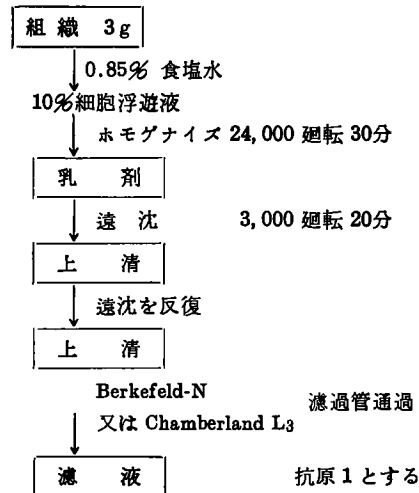
1) 濾過管通過法 (第 1 図) 上記材料各 3g に 0.85% 食塩水 30 ml を加えホモジナイザーにて 24000rpm 30 分間ホモジナイズし, その乳剤につき 3000rpm 20 分間の遠沈を 2 回反復し, その上清を Berkefeld N 又は Chamberland L₃ を用いて濾過し, その濾液を抗原液とした. なお上記の操作は 0°~4°C に於いて行なつた.

2) 超遠沈分画法 (第 2 図) 上記濾過管通過法にて作製せると同様の乳剤を 3000rpm 20 分間遠沈し, その上清を 10000rpm 20 分間遠沈し, 上清を取り, 40000rpm 20 分間超遠沈し, 沈渣を 0.85% 食塩水に浮遊させそれを抗原液とした.

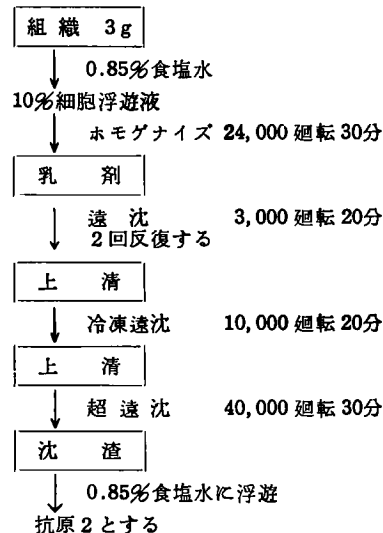
3) Fluorocarbon 処理法 (第 3 図)

上記同材料 3g 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 15 ml と Fluorocarbon 7.5 ml (CF₂-C Cl₂ F, 大阪金属製 Diflon Solvent S₃) をホモジナイザーにて 24000 rpm

第 1 図 濾過管通過法

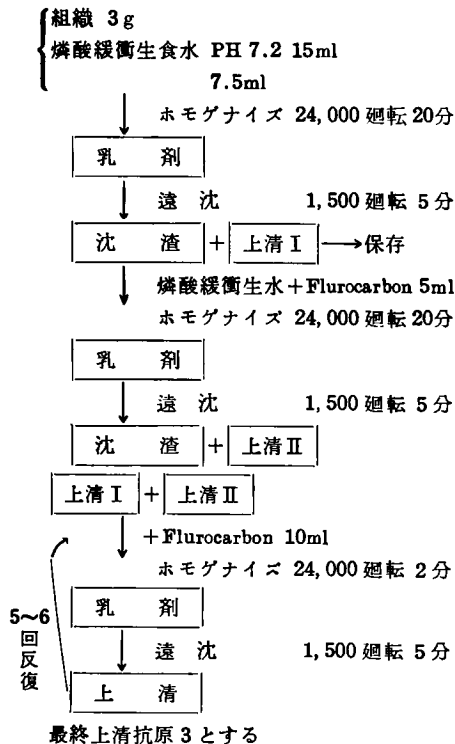


第 2 図 超遠沈分画法



20分間ホモジナイズし, その乳剤を 1500 rpm 5 分間遠沈し, その上清を保存して置き, 沈渣を取り, それに磷酸緩衝液 10 ml と Fluorocarbon 5 ml を加え, 再び 24000rpm 20 分間ホモジナイズ及び 1500 rpm 5 分間遠沈を行ない上清を得た. 次に 2 回の遠沈の上清を合わせ, それに Fluorocarbon 10ml を加えて 24000 rpm 2 分間ホモジナイズすると白い泡沫様乳剤となつた. これを 1500rpm 5 分間遠沈するとやや褐色を帯びた上清液と同色の膠状の Fluorocarbon 層とに分れた. この上清をとつて同じ操作を反復すると得られた上清は次第に脱色して 5 回の操作の後には全く清澄あるいは帯白色液となり, これを

第3図 Fluorocarbon 処理法



ウイルス抗原液とした。

B. 螢光抗体法

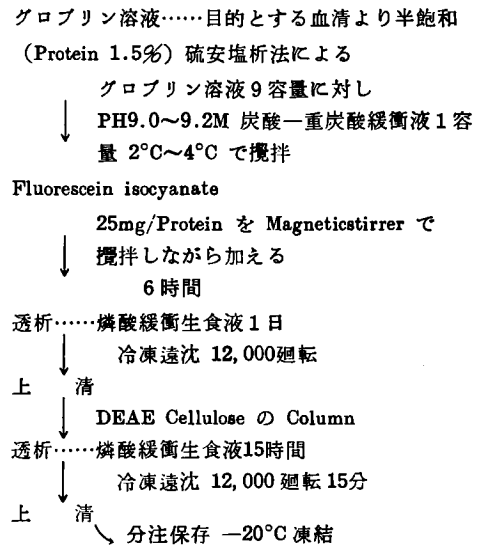
1) 抗血清の作製

各抗原液の Nitrogen 量を Microkjeldahl 法にて定量し、約 3 mg N 量を 6 ml となる様に稀釈し、Arlacel A (Atlas power Co, Wilmington, Delaware) 1 ml と流動パラフィン 5 ml の中へ数滴宛、滴下して根気よく攪拌し incomplete adjuvant を作製した。Fluorocarbon 処理液は Nitrogen 含量が 0.2mg N/ml 以下であり、Microkjeldahl 法では測定不能であつたが、やはり 6 ml を用いて Adjuvant を作製した。上記 Adjuvant を家兎背筋内に 1 週間隔で 3 回注射し、4 週後補体結合反応 (Kalmer 変法による) titer が 80 倍以上の際は全採血を行なつた。抗体価が不足する場合は抗原液 1 ml の静注を 3~5 日間継続し、1 週後に再測定した。

2) 抗体 globulin の螢光標識 (第4図)

半飽和硫酸沈降法で globulin 分画を塩析し、セロファン膜に入れて硫酸を透析した。0.85% NaCl にて 48 時間透析すると (食塩水を 3 回交換) 透析液中に SO_4^{--} は証明できなくなつた。得られた globulin 溶液の蛋白量を Biuret 反応で定量し 1.5% に

第4図 抗血清の螢光標識



稀釈した。これに 0.5M 炭酸重炭酸緩衝液を 1/9 容加え pH を 9.0~9.2 に補正した後 Fluorescein isothiocyanate (BBL 製) を蛋白 40 mg 当り 1 mg 加え Magnetic Stirrer で 6 時間攪拌した。次いで再びセロファン膜に入れて 1/10 M 磷酸緩衝食塩水 pH 7.2 により透析した。透析液を 2 回交換して 24 時間透析後 12,000 rpm にて 20 分間遠沈し、上清を DEAE Cellulose を 1.5cm つめた径 10mm の Column に通した。得られた螢光抗体液の一部を再び Biuret 法で蛋白量を測定し、又 490m μ に於ける吸光度の Optical density により Fluorescein 濃度を測定し、両者より色素対蛋白濃度比 (F/P ratio) を求めた。各螢光抗体の F/P ratio は 1.4 より 3.9 の範囲であつた。

3) 非特異反応因子の吸着

螢光抗体の蛋白量を 1.2% に補正した後 Coons の従つて作製したマウス肝粉をグロブリン溶液 1 ml 当り 100 mg 加え、室温にて 1 時間攪拌しながら吸着し、12,000 rpm 20 分遠沈後上清をとり、再びマウス肝粉を加えて反復し、計 3 度の吸着を行なつた。

4) 直接法の実施

イ) 標本作製

組織を採取後直ちに -70°C の dry ice-Aceton で凍結し、Cryostat 内にて -18°C 前後の温度で厚さ 4 μ の切片を作製し、室温乾燥後冷却 Aceton で 15 分間固定した。スタンプ標本は乾燥後直ちに固定した。

ロ) 染色

Coons 及び Kaplan⁹⁾ の原法通り標本を pH 7.0 の磷酸緩衝液に10分間浸漬し、乾燥した後、蛍光抗体を滴下し、室温湿潤室内にて30分間染色した。洗滌は緩衝液を交換しながら10分間以上行ない、緩衝グリセリンで封入 0°C~4°C に保存した。

5) 蛍光顕微鏡装置

励起光源は OSRAM HBO200 高圧水銀燈又は千代田高輝度水銀燈 HL 250 を用いた。フィルター構成は BV 励起法では光源フィルターに BG 12 又は千代田 BV フィルターを、接眼フィルターには OG5 又は千代田 Y フィルターを使用した。又 UV 励起法ではそれぞれ UV 励起系のフィルターを使用した。尚油浸レンズ使用に際しては流動パラフィン (Merk 製) を使用し、写真撮影には Super Anscochrome ASA 200 を用い、100 倍拡大で約 20 秒、1000 倍では約 10~15 分間の露出を行なった。

6) 特異蛍光の判定

原則として blocking test によつた。即ち非蛍光標識血清を滴下して30分間反応させた後、蛍光抗体で染色するもので理論的に特異反応が起らない筈である。又マウス肝粉で吸着できない非特異染色を知るため、対照抗原として正常マウス各組織を染色し、更に抗体の成分による非ウイルス性蛋白の反応を知るため、正常家兎蛍光標識グロブリン及び抗正常組織蛍光抗体を用いて染色した。

7) 組織細胞学的観察

前述の凍結切片標本に対して予め連続切片を保存しておき、Hematoxylin-Eosin 染色、May-Giemsa 染色により、組織学的細胞学的検索を行なった。又連続切片標本で判定不可能の場合は蛍光抗体法の標本を緩衝液で充分洗い、然る後メタノール固定を行ない上記組織学的染色を施し観察した。

III. 実験成績

A 蛍光抗体法直接法による特異蛍光

1) 蛍光抗体及び標本の種類

C₅₈ 自然発生白血病の各ウイルス材料に対する蛍光抗体を抗原精製法により分け、濾過管通過法 (L-1 と略す) 分画遠沈法 (L-2) Fluorocarbon 処理法 (L-3) の3種とし、骨髄性白血病の変異株ウイルス材料に対するものを同様に濾過管通過法 (M-1) 分画遠沈法 (M-2) Fluorocarbon 処理法 (M-3) の3種とした。対照抗体としては正常 C₅₈ マウスからの材料に対する抗体を同様に N-1, N-2, N-3 の

3種として、他に正常家兎グロブリン (N-0) も用いた。染色標本は上記抗原採取材料と同様の各マウス及び正常 C₅₈ マウスのリンパ節、脾、肝、骨髄、腎、肺及び脳の凍結切片又はスタンプ標本である。

2) 非特異蛍光

N-0 により染色した際の蛍光及び各蛍光抗体の blocking test による標本の蛍光を免疫反応によらない非特異的な染色と考えた。それは次の如きものであつた。

a) 細胞間隙には非常に淡いび漫性黄緑色蛍光を認め、細胞質は全く無蛍光であつた。

b) 結合織は細胞間隙よりも更に弱いび漫性蛍光を示した。

c) 血管内皮細胞の胞体は強黄緑色を呈した。

d) 顆粒球の一部のものは胞体に淡いび漫性の蛍光を認め、又他の一部のものには球形粗大の等大の強黄緑色顆粒が充満するのがみられた。細胞学的には前者は好中球、後者は好酸球であつた。

3) 特異蛍光

両株白血病マウス及び正常マウス組織における直接法の特異蛍光を表1に示した。

a) 濾過管通過ウイルス抗原に対する蛍光抗体

リンパ性白血病株マウスの各組織を L-1 で染色すると白血病細胞胞体及び細胞間隙にび漫性の強い特異蛍光が認められ、核内には蛍光を認めなかつた。先ずリンパ節に於ける蛍光が最も強く、脾、骨髄の蛍光がこれに次いだ。脾では結合織細胞、細網細胞に強い蛍光を認め、骨髄では顆粒球系細胞胞体にも中等度の蛍光がみられた。一方肝では肝細胞胞体及び結合織には弱いび漫性蛍光がみられ、腎に於いても糸球体、尿管上皮に弱い特異蛍光がみられ、肺、脳ではかかる蛍光は殆んど認められておらず、何れの臓器に於いても白血病細胞胞体の蛍光が特異的であつた。(写真1)

変異株骨髄性白血病マウスの各臓器を M-1 で染色すると白血病細胞胞体及び細胞間隙に強いび漫性蛍光がみられ、核内には蛍光はみられなかつた。脾における蛍光が最も強く、骨髄、リンパ節がこれに次ぎ骨髄の成熟顆粒球に中等度の、リンパ節のリンパ球には弱いび漫性蛍光を胞体内に認めた。他臓器における蛍光はリンパ性白血病マウスに対する L-1 の染色結果と同様であつた。

正常 C₅₈ マウスの各臓器を L-1, M-1 又は N-1 で染色した結果は何れも殆んど差異がなく、骨髄では顆粒球に、脾ではリンパ球、結合織に、又肝細胞、

第 1 表 螢光抗体法直接法による特異螢光

抗原	螢光抗体	抗 L 血清			抗 M 血清			抗 N 血清			対照血清
		L-1	L-2	L-3	M-1	M-2	M-3	N-1	N-2	N-3	N-0
L 抗 原	骨 髓	++	++	+	+	+	±	+	+	±	-
	脾	++	++	+	++	+	±	++	+	±	-
	リンパ節	++	++	+	+	+	±	+	+	±	-
	肝	++	++	+	++	++	+	++	++	+	-
	腎	++	+	±	+	+	±	+	±	±	-
	肺 脳	+	+	±	+	+	±	+	±	±	-
		±	±	-	±	-	-	±	±	-	-
M 抗 原	骨 髓	++	+	±	++	++	±	+	+	±	-
	脾	+	+	±	+++	++	+	++	+	±	-
	リンパ節	+	+	±	++	+	+	+	±	±	-
	肝	++	++	±	++	+	+	++	+	+	-
	腎	++	+	±	+	±	±	+	+	±	-
	肺 脳	+	±	±	±	±	-	±	±	±	-
		±	-	-	±	-	-	-	-	-	-
N 抗 原	骨 髓	+	+	±	+	+	±	+	±	±	-
	脾	++	+	±	++	++	±	++	++	±	-
	肝	++	+	±	+	+	±	++	+	±	-
	腎	++	+	±	++	+	±	+	+	-	-
	肺	+	±	-	±	-	-	±	±	-	-
	脳	±	-	-	±	-	-	±	-	-	-

註. 組織の特異螢光を++++++++-の7段階とする

Lは C₅₈ リンパ性白血病マウス, Mは変異株骨髄性白血病マウス, Nは C₅₈ 正常マウス

L-1, M-1, N-1……濾過管通過ウイルス抗原に対する螢光抗体

L-2, M-2, N-2……分画遠沈ウイルス抗原に対する螢光抗体

L-3, M-3, N-3……Fluorocarbon 処理ウイルス抗原に対する螢光抗体

N-0……正常家兎血清に螢光標識せるもの

腎上皮細胞, 肺胞上皮細胞等の胞体内にび漫性の弱い特異螢光が認められた。

対照血清 N-0 で染色した際は何れの臓器においても非特異螢光がみられた。(写真2)

リンパ性白血病株マウスの組織を M-1 で染色すると白血病細胞胞体及び細胞間隙に中等度のび漫性螢光がみられ, N-1 で染色した場合にはかかる螢光はみられず, 白血病細胞以外の細胞の螢光は共に正常マウスにおける M-1, N-1 の染色結果と等しかった。

変異株骨髄性白血病マウスの組織を L-1 で染色すると白血病細胞及び細胞間隙の螢光は骨髄で最も強く殆んど M-1 による染色結果に匹敵し他臓器では N-1 による染色結果と同様に顆粒球系細胞に微弱なび漫性螢光を認めたにすぎなかつた。

b) 分画遠沈ウイルス抗原に対する螢光抗体

リンパ性白血病株マウス組織を L-2, M-2 で, 又変異株骨髄性白血病マウス組織を M-2, L-2 で染色した結果それぞれの白血病細胞及び細胞間隙に強いび漫性螢光が出現したが何れも L-1, M-1 を用いた際の螢光に比し弱かつた。白血病細胞以外の細胞及び N-2 で染色した標本に於いてはそれぞれを L-1, M-1, N-1 で染色せる際の特異螢光と類似せるもやや弱い特異螢光が認められた。

e) Fluorocarbon 処理ウイルス抗原に対する螢光抗体

リンパ性白血病株マウス組織を L-3 で染色すると L-1, L-2 による染色でみられた如きび漫性螢光は非常に弱くなり, 白血病細胞胞体と細胞間隙に弱いび漫性螢光を混えた粒子状の強い特異螢光が認め

られた。(写真3) この特異蛍光はリンパ節において最も多く脾、骨髄、肝がこれに次ぎ、他の臓器ではみられなかつた。同一マウス組織を M-3 で染色すると白血病細胞体の特異蛍光は微弱であり、細胞間隙には処々粒子状蛍光を混えた弱いび漫性蛍光がみられた。変異株骨髄性白血病マウス組織を M-3 で染色すると上記リンパ性白血病細胞に於けると同様に白血病細胞体の蛍光は M-1, M-2 によるものに比して著しく減弱し、弱いび漫性蛍光と一部の細胞では粒子状蛍光が混在し、細胞間隙には弱いび漫性蛍光の中に稀に粒子状形態が認められた。(写真4) 同一マウス組織を L-3 で染色すると細胞間隙に稀に弱い粒子状蛍光が判別できたが、び漫性蛍光は弱く N-3 による染色標本と異らなかつた。

正常マウス各組織を L-3, M-3, N-3 で染色すると何れの標本に於いても細胞間隙に微弱なび漫性蛍光がみられたが、細胞内には特異蛍光は認められなかつた。

4) 小 括

C₅₈ マウスのリンパ性及び骨髄性白血病組織を各々の白血病組織の濾過管通過抗原及び分画遠沈抗原に対する蛍光抗体で染色した結果、白血病細胞体及び細胞間隙に強いび漫性特異蛍光がみられた。これに対し Fluorocarbon 処理抗原に対する蛍光抗体で染色すると上記び漫性蛍光は非常に弱くなり、細胞間隙及び一部の白血病細胞体に粒子状特異蛍光がみられた。この粒子状特異蛍光は各白血病組織とそれに対応する蛍光抗体の間で強く出現し、リンパ性白血病組織と抗骨髄性白血病抗体又は骨髄性白血病組織と抗リンパ性白血病抗体の間では特異蛍光は減弱した。

B. Fluorocarbon 処理液の物理化学的組成に関する検討及びウイルス活性の吟味

1) 電子顕微鏡による検討

C₅₈ マウス自然発生リンパ性白血病の臓器の Fluorocarbon 処理液の一部を採り、Shadowing 法により電顕の観察を行った。その結果直径 70~90m μ の球形又は楕円形の等大のウイルス粒子が多数認められた。(写真5)

2) 紫外線吸光度よりみた Fluorocarbon 処理液の化学的組成

両株白血病マウスのリンパ節、脾、肝又は正常マウスの脾、肝の各々 3g より Fluorocarbon 処理液を作製し、紫外線吸光度測定、Orcin Hcl 反応(Bial 試験)及び Diphenylamin 反応を行った。

Beckman 光電比色計にて両株白血病マウス及び正常マウスの Fluorocarbon 処理液の紫外線吸光度をみると 260m μ 附近で極大、230m μ 附近で極小の吸収曲線を示し核酸様物質の含有されている事が判明した。

Orcin Hcl 反応 (Bial 試験) においては三者共緑色を呈し、RNA の含有される事が判明したが、両株白血病マウスの方が正常マウスより、より多量の RNA が含有せる結果を示した。尚両株白血病マウス間にはその発色において差を認め得なかつた。

Diphenylamin 反応において三者共発色せず、三者とも DNA はほとんど含有していない事が判明した。

3) ウイルス活性の吟味

C₅₈ マウス自然発生リンパ性白血病のリンパ節、肝、脾の Fluorocarbon 処理液を C₅₈ 新生児マウス(生後24時間以内のもの)の腹腔内に接種後4ヶ月間の観察にて6匹中3匹リンパ性白血病の発生を認め、対照の無処置マウスでは発症はみられなかつた。

4) 小 括

C₅₈ マウス白血病組織の Fluorocarbon 処理液の組成に関する検討において、先づ電顕による粒子の形態は直径 70~90 m μ であつた。紫外線吸光度の測定では核酸物質特有の吸収曲線を描き、且つ RNA 反応が著明であつた。更に Fluorocarbon 処理液による発症実験において6匹中3匹に白血病を発症せしめた。

c. 蛍光抗体法染色手技の改良とその結果

教室小塚による直接法改良法を行った。即ち蛍光抗体を1.0%蛋白量に調整し、この1ml当り300mgの生のマウス肝、脾、腎の蛋白(ホモジネートのアセトン沈降蛋白を洗滌せるもの)を加え、0°~4°Cにて12時間吸着を行い然る後、更にマウス肝粉100mgを加えて12時間の吸着を反復し、12,000 rpm 20分の遠沈上清を用いた。切片標本の固定は Aceton-fluorocarbon 等量混合液を0°Cとして15分間固定し、染色は湿潤室内0°~4°Cにて6~12時間行つた。後洗滌は緩衝液を交換しながら20分以上行い緩衝グリセリンで封入した。

特異蛍光の判定は blocking test によつた。即ち蛍光抗体1.5%蛋白量のもの1mlに等量の Fluorocarbon 処理液を加え、0°~4°Cにて12時間反応せしめ、12,000rpm 20分遠沈の後上清を milliporefilter HA で濾過した。濾液について前述のマウス肝蛋白

による吸着を行い染色した。

1) 直接改良法の染色結果

自然発生リンパ性白血病マウスのリンパ節切片を染色すると細胞間隙に微細な粒子状螢光が無数に散在するのが認められた。白血病細胞の一部のものは胞体内に弱いび漫性螢光を有し、更に核周及び細胞膜附近に強い粒子状螢光が並ぶのが認められた。核内には特異螢光は全く認められなかった。blocking test により上記螢光は全て認められなくなつた。

(写真6)

IV. 総括及び考按

C₅₆ マウス白血病ウイルスではウイルスの組織培養による増殖が困難であり、又私は C₅₆ 白血病マウス組織そのものを抗原材料としたため、濾過管通過法及び超遠沈法による抗血清での螢光抗体法直接法の染色結果は宿主細胞蛋白の反応が強くウイルス精製分離効果は不充分なる結果を得た。市川ら²¹⁾は白血病ウイルス培養細胞より得た抗血清中に抗細胞蛋白抗体が含まれていることを指摘して居り、このことは私の所見と一致するところである。次に Fluorocarbon 処理法につき、文献的考案を行うと、1956年 Gessler¹⁴⁾ により Fluorocarbon 処理法により宿主細胞成分よりウイルスを精製分離できる事が発表された。彼によれば数回の Fluorocarbon 処理を行うと、可溶性非蛋白物質と核蛋白体を含む最上層、細胞質蛋白と Fluorocarbon の emulsion である中間層及び遊離脂質を溶解した残余の Fluorocarbon より成る最下層とに別れた。3層に分離せしめる為には Fluorocarbon 対組織浮遊液の比が 1:1 以上でなくてはならず、2:1 を越える必要はないと言う¹⁵⁾。Gessler の言う核蛋白体とは形態上はリボゾム又はウイルスの性格を有していた。この方法は組織のみでなく細胞浮遊液¹⁵⁾¹⁸⁾²⁷⁾ や細胞培養液からも分離できるし、ウイルスと中和抗体の Complex¹⁶⁾²⁰⁾ からも精製できると言う。ウイルスの感染価を各 extraction の後で調べると3回目までは上昇し、4回目以後は漸減少したが¹⁷⁾²⁷⁾ 補体結合性ウイルス抗原は減少しなかつた¹⁷⁾ と言う。Hamparian¹⁹⁾ はポリオ、コクサッキー、ムンプス、インフルエンザの各ウイルス材料を同方法で処理し、ムンプス、インフルエンザウイルスは2~3回ですでに沈澱することを認め、この差異はウイルスの Lipoid の含有量の差によるものであろうと推論している。又本法でウイルスを含まない細胞群を処理すると精製リボゾ-

ムが得られた⁷⁾⁸⁾⁴⁰⁾ と言う。このリボゾム分画を更に Fluorocarbon と共に極度の high speed でホモジナイズするとリボゾムの分解物が得られ、各々の段階で上清を分析すると蛋白が漸次減少し、RNA の濃度が増加して来た⁸⁾ と言う。Stanley³⁷⁾ は1960年 C₃H 乳癌、PL 白血病及びその Extract 接種による胸腺腫の三つの Fluorocarbon extract について電気泳動法及び沈降係数測定により正常組織にはない蛋白を見出し、これがウイルス蛋白であろうと述べている。Taylor⁴⁰⁾、De Carvalho ら⁸⁾ Mc. Kenna ら²⁸⁾ はニワトリ腫瘍 Novikoff のヘパトーム及びヒト腫瘍細胞の Fluorocarbon extract に腫瘍特異抗原を観察している。Schwarz ら³⁶⁾ はヒト白血病組織の Fluorocarbon-extract が半膜細胞に対して増殖性 Focus を形成せしめたと言う。

さて上述した如く Fluorocarbon 処理法の特徴を利用して腫瘍ウイルスの精製分離に用いたものは前述の Rous 肉腫²¹⁾ RIII マウス乳癌ウイルス及び教室の巻帽³²⁾ による C₃H 乳癌ウイルス位で甚だ稀であつた。

私は Fluorocarbon 処理法による抗血清で螢光抗体法直接法を行い、その結果前記した如く、宿主細胞蛋白による抗原抗体反応と思われるものは消失し、正常細胞内には弱い非特異的び漫性螢光が認められるのみで、一方白血病細胞内には一部は粒子状、一部はび漫性的特異螢光が判然と認められ、従つてウイルス抗原の精製分離に理想的と思われる結果を得た。又教室の高木³⁹⁾ も同材料にて免疫電気泳動法により Fluorocarbon 処理法による抗原は濾過管通過法によるものより明瞭でかつ安定した沈降線を認めており、Fluorocarbon 処理法が免疫抗原精製法として優れている事を強調している。

Fluorocarbon 処理液の蛋白量は Microkjeldahl 法では測定できず (0.06mg/dl の測定値を得たが同方法では測定蛋白量の限界は 0.2mg/dl 以上であるので信頼度が低い)、電顕的観察にて直径 70~90 μ の球形又は楕円形の等大の粒子を多数認め、Fluorocarbon 処理法の分離精製がすぐれている結果を得たが、Epstein も既に牛痘ウイルス¹⁰⁾ 及び Rous 肉腫ウイルス¹¹⁾¹²⁾ で同様な事を証明している。

私はその上清において核酸特有の紫外線吸収曲線を認め、Bial 反応及び Diphenylamin 反応で多量の RNA が含まれている事を証明したが、1960年 De Carvalho⁸⁾ は Fluorocarbon 処理液につき同様方法で RNA を定量して居り、教室の岡田³³⁾ も A

KR 白血病組織にて同様の方法で同様の結果を得ている。

私は少数例であるが Fluorocarbon 処理液の生物学的活性を認めたが、教室の岡田³⁸⁾によれば AKR 白血病マウスの Fluorocarbon 処理液による白血病発生率は生後 4 ヶ月で 50%、無細胞濾液による接種第 5 代に於ては白血病発生率は生後 4 ヶ月で 20% であり、Fluorocarbon 処理液の方が白血病発生率が高い事が強調されている。Epstein も牛痘ウイルス¹⁰⁾ Rous 肉腫ウイルス^{11) 12)} で Hummeler^{19) 20)} はポリオ、コクサッキーウイルスで Stone³⁹⁾ は R III マウス乳癌にて同方法による処理液に生物学的活性の存在する事を認めている。

V. 結 語

C₅₇ マウス白血病ウイルスの精製に関し蛍光抗体法、電顕的観察、物理化学検査及び生物学的活性により精製効果を吟味し、次の結果を得た。

1. Berkefeld-N 及び Chamberland L₃ 濾過管による濾液は宿主組織に由来する蛋白を多量に含むため、蛍光抗体法によつてウイルス抗原の所在を明らかにすることが出来なかつた。
2. 白血病臓器 homogenate の 10,000rpm 遠沈上清 40,000 rpm 遠沈沈渣に含まれる抗原は前項の濾

液と同じく宿主組織に由来する蛋白を多量に含み、従つてウイルス抗原を目的とした免疫学的実験に不適當であつた。

3. 白血病臓器の Fluorocarbon 処理により抗血清を作製し、蛍光抗体法直接法を行うと白血病臓器において一部粒子状、一部び漫性的の特異蛍光が白血病細胞内及び細胞間隙に認められた。

4. Fluorocarbon 処理によるウイルス精製効果を吟味するに電顕的には多数のウイルス様粒子が認められ、Bioassay においては 50% が発症した。

5. Fluorocarbon 処理の紫外線吸光度は 260m μ 附近で極大 230 m μ 附近で極小を示すことより多量の核酸が含有されることを示し、白血病臓器の Extract では Bial 試験により多量の RNA が存在することが明らかとなつた。

6. 項目 4.5. の結果より Fluorocarbon 処理液には多量の RNA ウイルスが含有されており、従つて蛍光抗体法における特異蛍光はウイルス抗原の所在を示すものと考えられた。

稿を終るに臨み御指導御校閲戴いた恩師平木潔教授、大藤真助教授並びに直接御指導いただいた小塚堯前講師に深く感謝致します。

文 献

- 1) Ada, G. L. and Perry, B. T., : Studies on soluble complement fixing antigens of influenza virus: nature of antigens. *Aus. J. Exp. Biol. med., Sci.* 32: 453, 1954.
- 2) Bryan, W. R. & moloney, J. B.: Rous sarcoma virus. The purification problem. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 68; 441, 1957.
- 3) Coons, A. H. & Kaplan, M. H. ; Localization of antigen in tissue cells. II Improvement in a method for detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. med.*, 91; 1, 1950.
- 4) Coons, A. H., et al.: Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of strain antibody and its application to a study of hyperimmune rabbits. *J. Exp. med.*, 102; 49, 1955.
- 5) Crawford, L. V.: A study of the Rous sarcoma virus by density gradient centrifugation. *Virology*, 12; 143, 1960.
- 6) De Carvalho, S.: Biological properties of a nucleic acid rich fraction from human leukemic and Tumor clls. *Proc. Int. Congress. Intern. Soc. Hematol.* 7th. Rome, 1958, Pp 523.
- 7) De Carvalho, S.: Cytopathogenicity of RNA rich Particles from human leukemic and tumor cells for primary culture of human amniotic cells. In "Canadian cancer conference," 3: 329, 1959. Academic Press, New york.
- 8) De Carvalho, S. et al.: Biologic properties of human leukemic and tumoral RNA. III the effect of different media on the cytopathogenicity in tissue culture. *J. Lab. & Clin. med.*, 55; 694, 1960.
- 9) De Carvalho, S. & Rard, H. J.: Comparative effects of liver and tumor RNA on the normal

- liver and the Novikoff Hepatoma cells of the rat. *Nature*, 189 ; 815, 1962.
- 10) Epstein, M. A. : An investigation into the purifying effect of a fluorocarbon on Vaccinia Virus. *J. Exp. path.*, 39 ; 426, 1956.
 - 11) Epstein, M. A. : Observation of the Rous virus ; Purification and identification of the particles from solid tumor. *Brit. J. Cancer*. 12 ; 248, 1958.
 - 12) Epstein, M. A. : Integrated electron microscopical and cytochemical studies of fluorocarbon purified preparations. *Brit. J. Cancer*, 12 ; 363, 1958.
 - 13) Fisher, R. G. : methylalcohol purification of the rabbit papilloma virus. *Proc. Soc. Exp. Biol & med.*, 72 ; 323, 1949.
 - 14) Gessler, A. E. et al. : A new and rapid method for isolating viruses by selective fluorocarbon deproteinization. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 18 ; 701, 1956.
 - 15) Gessler, A. E. et al. : Animal viruses isolated by fluorocarbon emulsification. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 17 ; 707, 1956.
 - 16) Girardi, A. J. : The use of fluorocarbon for unmasking Polyoma virus hemagglutination. *Virology*. 9 ; 488, 1959.
 - 17) Hamparian, V. et al. : Elimination of nonspecific components from viral antigens by fluorocarbon. *J. Immunol.*, 80 ; 468, 1958.
 - 18) Halonen, P. & Huebner, R. J. : ECHS and Polio-myelitis virus antisera prepared in guinea pigs with fluorocarbon treated all culture antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol & med.*, 105 ; 46, 1960.
 - 19) Hummeler, K. & Hamparian, V. : Removal of anticomplementary activity and host antigens from viral preparations by fluorocarbon. *Science*, 125 ; 547, 1957.
 - 20) Hummeler, K & Ketiler, A. : Dissociation of polio myelitisvirus from neutralizing antidody. *Virology*. 6 ; 297, 1958.
 - 21) 市川康夫, 他 : 螢光抗体法によるマウス白血病ウイルスの研究, 癌の臨床, 8 ; 655, 1962.
 - 22) Kidd, J. G. ; The detection of a "masked" virus (The Shope papilloma virus) by means of immunization. *J. Exp. med.*, 74 ; 326. 1954.
 - 23) 小塚堯他 : 日本癌学会記事. 未刊.
 - 24) Levinthal, J. D. et al. : Polyoma disease and tumors in mice. : The distribution of viral antigen detected by immunofluorescence. *Virology*. 16 ; 314, 1962.
 - 25) Malmgren, R. A. et al. : Demonstration of the intracellular location of Rous sarcoma virus antigen by fluorescein labeled antisera. *J. Nat. Cancer, Inst.*, 24 ; 994, 1960.
 - 26) Malmgren, R. A. et al. : Intracellular localization of Polyoma virus antigen demonstrated with fluorescein labeled antiserum. *J. Nat. Cancer, Inst.* 24 ; 581, 1960.
 - 27) Manson, L. A. et al. : Purification of Poliovirus with fluorocarbon. *Science*, 125 ; 546, 1957.
 - 28) McKenna, J. H. et al. : Extraction of distinctive antigens from neoplastic tissue. *Science*, 135 ; 370, 1962.
 - 29) Mellors, R. C. & Munrae, S. : Cellular localization of Rous sarcoma viruses studied with fluorescent antibody. *J. Exp. med.*, 112 ; 963, 1960.
 - 30) Mellors, R. C. : Tumor cell localization of the antigens of the Shope papilloma virus and Rous Sarcoma virus. *Cancer. Res.*, 20 ; 744, 1960.
 - 31) Moloney, J. B. : Biological studies the Rous Sarcoma virus. V. Preparation of improved Standard Lots of the virus for use in quantitative investigations. *J. Nat. Cancer, Inst.*, 16 ; 877, 1955.
 - 32) 巻幡 徹 : 岡山医学会雑誌, 未刊
 - 33) 岡田耕一 : Fluorocarbon によるハツカネズミ白血病ウイルス分離に関する研究, 医学と生物, 64 ; 32. 1962.
 - 34) Palade, G. E. : A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. med.*, 95 ; 285, 1952.
 - 35) Quigley, J. : Ultrafiltration and ultracentrifugation of Coxsackie virus. *Proc. Soc. Exp. Biol & med.*, 72, 434, 1949.
 - 36) Schwary, O. et al. : Immunologically specific antigens in leukemic tissues. *Blood*. 21 : 717, 1963.
 - 37) Stanley, R. G & Ramsey, D. S. : Some properties of fluorocarbon treated animal tissue. *Proc. Soc. Exp. Biol & med.*, 103 ; 20, 1960.
 - 38) Stone, R. S. et al. : Purification of the mouse mammary carcinoma agent by means of a fluo-

- locarbon. *Nature*, 183; 1275, 1959.
- 39) 高木健作: ウイルス白血病の免疫学的研究, 岡山医学会雑誌: 76, 333, 1964.
- 40) Taylor, A.: Fractionation studies of tumor tissues from germ-free chickens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 78; 354, 1959.
- 41) Vogt, R. K. et al.: Localization of infectious virus and viral antigen in chicken fibroblasts during successive stages of infection with Rous Sarcoma virus. *Virology*. 13; 528, 1961.
- 42) Warren, J. et al.: Purification of certain virus by use of Protamin sulfate. *Proc. Soc. Exp. Biol & med.*, 72; 662, 1949.
- 43) Whitaker, J.A. et al.: Focal cellular alteration in stable amnion cells produced by inoculation with human leukemia brain extracts. *Cancer, Res.*, 23; 519, 1963.

写 真 説 明

1. C₅₈ マウス自然発生リンパ性白血病の脾, 蛍光性抗ウイルス血清 (濾過管通過法), 直接法 1,000倍
2. 同 上 蛍光性正常マウス血清直接法 1,000倍
3. 同 上 蛍光性抗ウイルス血清 (Fluorocarbon 処理法) 直接法, 1,000倍.
4. C₅₈ マウス変異株 (骨髓性) 白血病の脾, 蛍光性抗骨髓性ウイルス血清 (Fluorocarbon 処理法) 直接法 1,000倍
5. C₅₈ マウス自然発生リンパ性白血病の肝, 脾, リンパ節, Fluorocarbon 処理液の超遠沈沈渣を Shadowing せるもの.
6. C₅₈ マウス自然発生リンパ性白血病のリンパ節, 蛍光性抗ウイルス血清 (Fluorocarbon 処理法直接法改良法, 1,000倍

Immunofluorescent Studies of Viral Antigens in Mouse Leukemias

I Purification of Viral Antigens in C₅₈ Mouse Leukemias by Fluorocarbon Extraction

By

Yoshiaki TAKAHASHI

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

Purification of viruses of C₅₈ mouse leukemias was carried out by the following procedures; filtration, differential ultracentrifugation and Gessler's fluorocarbon extraction. The degree of virus purification was examined by fluorescent antibody method, electron microscopy, nucleic acid analysis and bioassay.

The following results were obtained.

1. Large amount of host cell antigens was noted in virus suspension separated by Berkefeld-N and Chamberland L₃ filtration and by differential ultracentrifugation. Therefore it was improper to perform immunofluorescent study because this procedure was concerned with examination of viral antigens.
2. Immunofluorescent procedure by Coons' direct method using anti-viral serum against fluorocarbon extracts showed partially granular or partially diffuse specific fluorescence in leukemic cells and intercellular spaces of the leukemic organs.

3. Electron microscopic observation revealed many virus-like particles in the fluorocarbon extracts. And 50% of animals inoculated with developed leukemias in these extracts.

4. Ultraviolet spectrophotometry of the fluorocarbon extracts demonstrated a maximal absorption at $260\text{ m}\mu$ and a minimal absorption at $230\text{ m}\mu$ with a Bechman spectrophotometer. It was clear from these data that large amount of nucleic acid was contained in these extracts. And also it was indicated by Bial's test that the fluorocarbon extracts of the leukemia organs contained large amount of RNA.

5. From above findings, fluorocarbon extraction appeared a superior procedure for fluorescent antibody technic in comparison with the other procedurs used. It was thought that the specific fluorescence in the immunofluorescent study represented viral antigen itself.

高橋論文附圖

