

動物臓器乳剤に依るインフルエンザ・ウイルスの 血球凝集阻止反応に関する研究

第 三 編

核酸及び臓器乳剤に依る血球凝集阻止反応に就いて

岡山大学医学部微生物学教室 (主任・村上 栄教授)

福 島 里 志

〔昭和 33 年 10 月 1 日受稿〕

緒 言

著者は各種動物の臓器乳剤に依るインフルエンザ・ウイルスの血球凝集阻止反応に就いて第一編及び第二編で報告したが、その阻止物質の本態については全く不明である。然し乍ら、此等の研究に関連して、夫々 Receptor Substance 及び receptor destroying factor に就いて種々の研究が発表されている。即ち De, Burgh¹⁾ (1948), Wooley²⁾ (1947), Hirst³⁾ (1949), 福見⁴⁾ (1949) 等に依つてその精製が試みられ、彼等は炭水化物であろうと想像している。

又、Burnet⁵⁾ (1946) はリポイドであろうとも云つている。更に Wooley⁶⁾ (1949) は各種多糖類特に Apple pectin が、又後藤・木村⁷⁾ (1951) は Cremaster mannan なる植物性多糖類及び胆汁中の Mucoprotein 様物質が血球凝集阻止反応を呈すると報告している。又宮本、赤間、森田⁸⁾ (1953) は核酸が血球凝集阻止反応を呈し、上記物質とは逆にウイルスに作用するのではなからうかと仮定している。

著者も血球凝集阻止反応に関係する物質を探求する目的で、臓器乳剤及び核酸製品を用いて種々比較実験を行つてみた。

I 実験材料及び方法

実験材料：

1. 供試ウイルス

インフルエンザ・ウイルス PR₈

2. 核酸製品

丸若化学製品の酵母核酸及びミノファゲン製薬より提供を受けた R. N. A. 及び D. N. A. である。

3. 血球浮游液

第一編に述べた実験材料血球浮游液作製に同じ。

実験方法：

各実験成績の部で述べる。

II 実験成績

1. 核酸で感作した血球並びにウイルスの血球凝集阻止反応に就いて

実験方法は各 10 本宛の A. B. C. D. 4 列の試験管列を作り、A 列は核酸、ウイルス、血球を同時に反応させた非感作対照、B 列は核酸感作ウイルスに血球を加えたもの、C 列は核酸感作血球にウイルスを加えたもの、D 列はウイルス対照として比較実験を行つた。即ち A 列及び B 列には、生理的食塩水で 500 倍稀釈した核酸稀釈液で段階的に倍数稀釈したウイルス液 0.5 cc を夫々分注し、A 列には直ちに 0.25% 血球浮游液 0.5 cc を注加し、よく混和後、2 時間 10°C 以下に静置した後に結果を判定し、B 列はこの核酸によるウイルス稀釈液を 18 時間室温に放置して両者をよく感作せしめた後、0.25% 血球浮游液 0.5 cc を加へ、C 列には 0.5% 血球浮游液 0.25 cc に 250 倍核酸稀釈液 0.25 cc を加へ、18 時間感作後、各々に倍数稀釈したウイルス液 0.5 cc を注加し、2 時間後 10°C 以下に静置後判定した。D 列はウイルス対照とした。

第 1 表に示す如く、D 列の対照が 1280 倍迄凝集を示したのに反し、核酸は血球凝集阻止作用を示し、18 時間感作血球の場合 (C 列) は非感作の場合 (A 列) と同程度にウイルス稀釈 320 倍迄凝集し阻止反応を呈し、対照の 4 倍程度の阻止作用がみられ、18 時間感作ウイルスの場合 (B 列) は感作血球の場合より阻止作用が強く、対照の 16 倍以上の阻止作用が

第1表 核酸感作血球並びに感作ウイルスの血球凝集阻止反応

実験種類	感作時間	感作材料	ウイルス稀釈								食塩水照
			20	40	80	160	320	640	1280	2560	
A	0	—	+	+	+	+	+	+	+	+	(—)
C	18	血球	+	+	+	+	+	+	+	+	
B	18	ウイルス	+	+	+	+	+	+	+	+	
D		ウイルス対照	+	+	+	+	+	+	+	+	

見られた。この結果核酸によつても、インフルエンザ・ウイルスの血球凝集は阻止される事が知られ、しかも臓器乳剤の場合と同様にウイルスに作用して阻止反応を呈するものと思われる。

2. 核酸感作ウイルスの感作時間別血球凝集阻止反応に就いて

実験方法は500倍、1000倍、及び2000倍核酸稀釈液でウイルスを3時間、5時間、及び18時間の各時間別に感作し、これを用いて感作時間の差異に依る凝集阻止反応の結果を比較検討した。其の結果第2表に示す如く、長時間感作したもの程阻止反応が強

第2表 核酸感作ウイルスの感作時間別血球凝集阻止反応

核酸稀釈	感作時間	ウイルス稀釈								メチウム対照
		40	80	160	320	640	1280	2560	5120	
500×	3	+	+	+	+	+	+	+	+	(—)
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	
	18	+	+	+	+	+	+	+	+	
1000×	3	+	+	+	+	+	+	+	+	
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	
	18	+	+	+	+	+	+	+	+	
2000×	3	+	+	+	+	+	+	+	+	
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	
	18	+	+	+	+	+	+	+	+	
ウイルス対照		+	+	+	+	+	+	+	+	

く表れた。

即ち500倍核酸稀釈液の場合は、18時間感作したものでは160倍迄、5時間感作したものでは320倍、3時間感作したものでは640倍ウイルス稀釈迄凝集反応を呈し、感作時間が長くなる程凝集阻止反応は強く現れた。この傾向は1000倍、2000倍、核酸稀釈液についても同様であつたが、感作に用いた核酸稀釈の高度なもの程、阻止作用は減弱している。

3. R. N. A. 並びに D. N. A. 感作ウイルスの感作時間別血球凝集阻止反応の実験成績

ミノファーゲン製薬より提供をうけた R. N. A. 及び D. N. A. を使用して凝集阻止反応を試みた。

実験方法はウイルスの倍数稀釈液各 0.5 cc に各種稀釈 R. N. A. 及び D. N. A. を 0.1 cc 注加し所定時間 10°C 以下で感作せしめた後、0.25%血球浮游液 0.5 cc を注加して凝集阻止反応を行った。

尚本実験に際し R. N. A. 及び D. N. A. の稀釈に当り 0.05 M チトラート加 1 M 食塩水で最初100倍迄稀釈し以後は生理的食塩水で稀釈した。

実験成績は第3表に示す如く500倍稀釈 D. N. A.

第3表 D. N. A 感作ウイルスの感作時間別凝集阻止反応

D. N. A. 稀釈	感作時間	ウイルス稀釈								メチウム対照
		20	40	80	160	320	640	1280	2560	
500×	0	+	+	+	+	+	+	+	+	(—)
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	
	18	+	+	+	+	+	+	+	+	
ウイルス対照		+	+	+	+	+	+	+	+	

R. N. A 感作ウイルスの感作時間別凝集阻止反応

R. N. A. 稀釈	感作時間	ウイルス稀釈								メチウム対照
		20	40	80	160	320	640	1280	2560	
500×	0	+	+	+	+	+	+	+	+	(—)
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	
	18	+	+	+	+	+	+	+	+	
1000×	0	+	+	+	+	+	+	+	+	
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	
	18	+	+	+	+	+	+	+	+	
2000×	0	+	+	+	+	+	+	+	+	
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	
	18	+	+	+	+	+	+	+	+	
4000×	0	+	+	+	+	+	+	+	+	
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	
	18	+	+	+	+	+	+	+	+	
ウイルス対照		+	+	+	+	+	+	+	+	

感作ウイルスを用いた成績では感作時間の長短にかかわらずいずれもウイルス対照と同様の凝集価を示し、阻止作用は全く認められなかつた。

R. N. A. 感作ウイルスの感作時間別実験の結果

は各稀釈別とも、長時間感作せしめる程強く阻止反応を呈し、核酸及び臓器乳剤と同様に階段的に阻止反応を呈している。

4. メヂウムの pH が R. N. A. 凝集阻止反応に及ぼす影響

実験方法はメヂウムの pH 別による R. N. A. の凝集反応を磷酸緩衝液を用いて 3) の実験方法に順じて各 pH 別の緩衝液で所定濃度に稀釈したウイルス液 0.5 cc に各 pH 別緩衝液で稀釈した 500 倍 R. N. A. 0.1 cc を注加し、同時に 0.25% 血球浮遊液 0.5 cc も注加し、よく振盪混和し 10°C 以下に 2 時間静置した後成績を判定した。

実験の結果は第 4 表に示す如く pH 8.3 では阻止

第 4 表 R. N. A. の pH 別血球凝集阻止反応

磷酸緩衝液 pH	ウイルス稀釈						メヂウム 対照
	40	80	160	320	640	1280	
8.3	+	+	+	+	+	-	(一)
7.4	+	+	+	+	-	-	
5.6	+	+	-	-	-	-	
5.3	+	+	-	-	-	-	
ウイルス対照	+	+	+	+	+	-	

反応は認められず、pH 5.6~5.3 で最高の阻止作用を示した。

5. 孵化鶏卵内ウイルス増殖に及ぼす核酸及び臓器乳剤の影響

丸若化学製酵母核酸 (N. A.) 前記の R. N. A. 及び D. N. A. 又臓器乳剤を使用して孵化鶏卵の漿尿腔液に於けるウイルス増殖に及ぼす影響について検討した。

実験方法は滅菌生理的食塩水で N. A. は 500 倍、R. N. A. 及び D. N. A. は各々 500 倍、1000 倍、2000 倍、4000 倍に、鶏肝臓乳剤は 20 倍、40 倍、80 倍に稀釈した夫々の 0.1 cc 及び 10⁻³ に稀釈したウイルス液 0.1 cc を 10 日目の孵化鶏卵 6 個づつに漿尿腔内接種を行い、37°C、48 時間培養後 1 夜氷室に静置し、漿尿腔液を採取しその凝集価を測定した。対照卵には生理的食塩水 0.1 cc と 10⁻³ 稀釈ウイルス 0.1 cc とを同様接種した。

実験成績： 500 倍 N. A. 及び 500 倍、1000 倍、2000 倍、R. N. A. を接種した場合の腔液は全く凝集価を示さず、即ちウイルスの増殖が阻止された。4000 倍 R. N. A. 時は対照と同様であり 1280 倍~2560 倍の凝集価を示した。D. N. A. 及び鶏肝臓乳

剤の場合は阻止作用はいずれの場合も対照卵と同様の凝集価を示した。

6. R. N. A. に吸着されたウイルスの遊離実験

著者は R. N. A. に吸着されたウイルスの再遊出の有無について検討した。尚本実験は臓器乳剤中の赤血球凝集阻止物質の性状と比較検討することも意図されている。

実験方法は R. N. A. 500 倍稀釈液を用いて、80~2560 倍稀釈したウイルス液 0.5 cc 宛、A. B. 2 列を作り、18 時間氷室でウイルスと R. N. A. を作用させた後、A 列 (遊出試験対照) には直ちに 0.25% 血球液 0.5 cc 宛分注よく混和後、37°C の孵卵器中に 2 時間放置して遊離を試みた後、0.25% 血球浮遊液を 0.5 cc 宛分注し、前記 A 列と同様にして反応せしめた。又ウイルスの凝集価を測定してウイルス対照とした。

実験成績は第 5 表に示した如く、A 列は 320 倍ま

第 5 表 ウイルス遊離に関する実験成績

遊出時間	ウイルス稀釈						食対 塩水 対照
	80	160	320	640	1280	2560	
A 列 0	+	+	-	-	-	-	(一)
B 列 2 時間	+	+	+	+	-	-	
ウイルス対照	+	+	+	+	+	-	

で阻止反応を示したが、B 列では 1280 倍まで阻止したにすぎない。即ち 37°C に 2 時間静置することにより R. N. A. に吸着されたウイルスが遊離する事が認められた。

考 按 及 び 結 論

中川⁹⁾ (1955)、深沢¹⁰⁾ (1951) 等は種々な角度から動物臓器乳剤の阻止物質の本態について追求しているが、中川はマウスの脳について検討を加へ、かなり高分子の構造を有する蛋白性物質であろうと云い、深沢はマウス肺臓中の阻止物質は或種の蛋白質であると報告している。宮本、赤間、森田 (1953) 等は核酸製品を使用して阻止反応を試みこれ等は阻止作用を示すと報告し、これ等の物質はウイルスと作用して阻止反応を呈するのではなからうかと説明している。著者は核酸製品を用いて種々阻止反応を試み、動物臓器乳剤による阻止反応とを合せ鑑み、臓器乳剤中阻止物質の本態に関する或種の暗示を得た。即ち両者間の類似点は他の阻止物質は赤血球に作用して阻止反応を示すのに反し、臓器乳剤及び

核酸製品はいずれもウイルスと作用して阻止反応を呈すことである。その反面、鶏卵内ウイルス増殖に及ぼす核酸の影響は R. N. A. の高濃度のもものではウイルスの増殖を阻止する事が認められたが、臓器乳剤はウイルスの増殖を阻止する事が認められたが、臓器乳剤はウイルスの増殖阻止はみられなかつた。しかし乍ら臓器乳剤中阻止物質は核酸特に R. N. A. とは非常によく類似したものではなかろうかと推察

される。

稿を終るに臨み終始御懇切なる御指導並びに御校閲を賜つた村上栄教授に謝意を表します。本論文の要旨は第10回中国四国細菌学会に於いて発表したものである。

文 献

- 1) De Burgh, P. M., Yu. P. C., Howe & Bovarrick, A. : Preparation from human red cells of substance inhibiting Virus hemagglutination. *J. Exp. Med.* **87**, 1~9, 1948.
- 2) Wooley, D. W. & Green. R. H. . Inhibition by certain polysaccharides of hemagglutination and of multiplication of influenza Virus *J. Exp. Med.* **86**, 54~64, 1947.
- 3) Hirst, G. K. The nature of the Virus receptors of red cells. IV. Effect of sodium Perjodate on the elution of influenza Virus from red cells. *J. Exp. Med.*, **89**, 233~243.
- 4) 福見, 山本 : インフルエンザ・ウイルスについて 臨床, **2**, 9~15, 1949.
- 5) Burnet, F. M., Mc, Crea, J. F., & Stom, J. D. : modification of human red cells by Virus Action. 1. The receptor gradient for Virus action in human red cells. *Brit. J. Exp. path.*, **27**, 228~236, 1946.
- 6) Wooley, D. W. : Purification of an influenza Virus substrate and demonstration of its competitive antagonism to apple pectin. *J. Exp. med.*, **89**, 11~22, 1949.
- 7) 後藤, 木村 インフルエンザ・ウイルスによる Hirst 現象の機作について *Virus* 1 巻 1 号, 1952.
- 8) Miyamoto, Akama, Morita . The influence of Nuclein Acid on hemagglutination by influenza Virus and its mechanism. *The guma journal of medical Sciences Vol 2, No 1*, 1953.
- 9) 中川, 吉田 : マウス脳内に存在するウイルス血球凝集阻止物質に関する研究 *Virus* 5 巻, 1955.
- 10) 深沢 : 臓器性物質並荷電コロイドの Hirst 現象阻止作用 熊本医学雑誌, 1951.

Studies on the Inhibitory Action of Animal Organ Emulsions to Hemagglutination by Influenza Virus

III. : Hemagglutination Inhibition by Nucleic acids

By

Satoshi Fukushima

Department of Microbiology, Okayama University Medical School
(Director : Prof. Dr. Sakae Murakami)

The author studied the inhibitory action of nucleic acid to hemagglutination by influenza virus. Just like animal organ emulsions, nucleic acids (commercially obtained) inhibited the hemagglutination by influenza virus, and the viruses adsorbed on ribonucleic acid re-floated out by still standing at 37°C for 2 hours.

These results suggest that the hemagglutination-inhibiting substance in organ emulsions is ribonucleic acid or its relating compounds.