

40 Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) に関する研究 1

Receptor 順位における HVJ と MNI 群 Virus との関係

40 Studies on Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) 1.

Relation of Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) to Mumps-NDV-Influenza viruses Receptor gradient

北海道立衛生研究所 (所長 中村 豊)
技師 桜田 教夫

緒 論

Burnet¹⁾ は MNI 群の種々なウイルスと赤血球の Receptor との相関関係を追及した結果、Mumps virus (Mu. と略)、Newcastle disease virus (NDV と略)、および Influenza virus が Receptor 破壊という点で一定の系列におかれることを見出し、これを Receptor 順位と名付けた。

一方 MNI 群のウイルスが赤血球に低温で吸着し、37°C で遊出するところからこれらのウイルスは赤血球の Receptor に対して酵素ように作用することが注目され同様な活性を有する酵素について検討が加えられた。

その結果 Lecithinase あるいは Cholinesterase に類似の作用のあることが明瞭になった。すなわち Friederich²⁾ は 2 種類の細菌、Diphtheroid 菌と *Cholera vibrio* を含めた *Vibrio* の培養液が Influenza virus 群に似た活性のある酵素を含むことを見出した。さらに Burnet & Stone³⁾ はこの酵素の作用には Ca⁺ を要し、citrate によつて阻止されることなどを見出した。そしてこの活性因子を **Receptor destroying enzyme (RDE)** と名付けた。

Hirst⁴⁾ は Receptor 順位を決める最も簡単な方法として基質に鶏の赤血球をもちい、RDE を種々な時間作用させて赤血球の Receptor を種々な程度に破壊し、かかる処理赤血球の各種ウイルスに対する血球凝集性の有無から順位を判定する方法を案出した。彼はこの方法を応用して Taylor⁵⁾ によつて分離された 1,233 株 (Influenza C virus) の同定もおこなっている。⁶⁾

最近わが国において赤血球凝集性の新しいウイルスが人および動物界に広く分布していることが発見された。すなわちこのウイルスは最初発見⁷⁾ が実験マウスの肺から分離したが人体では黒屋等⁸⁾ が新生児肺炎から、山田等⁹⁾ は小児の急性漿液性髄膜炎から、あるいは奥野、深井等¹⁰⁾ はインフルエンザあるいは麻疹患者の材料をマウス、猿等を通して途中に赤血球凝集性のウイルスを分離した。また渡辺、笹原等¹¹⁾ は豚のインフルエンザのような疾患から同様のウイルスを証明している。これらのウイルスはその後の研究によつて生物学的性状の上からそれぞれ免疫学的に均一な一新ウイルスであることが証明され、1957 年委員

会が設けられこのウイルスを **Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ)** と呼ぶことに決定した。

著者はすでに山田等が小樽市および青森市における 2 系統の漿液性髄膜炎から分離した HVJ と、ほかの国内の研究者が分離したウイルス株の分与をうけ、これらについて Receptor 順位を検討した。

すなわち、まず HVJ の MNI 群各ウイルスとの間における Receptor 順位を決定せんとし、さらに HVJ 株相互間の順位についても検索した。

実験材料

ウイルス株

HVJ: 括弧内は分離された宿主を示す。

M-N 株 (マウス) 213-1 株 (一過性発熱の豚) 青森、田無株 (神経症状を呈した豚) 石井、関配株 (泉熱研究中のマウス) 伏見株 (新生児ウイルス性肺炎患者) 沼畑, 41, 165, 176 株 (青森県に発生した漿液性髄膜炎患者、数字は患者番号である) 安井株 (小樽市に発生した髄膜炎よう疾患患者)

Influenza virus

A 型: PR 8, FM 1, 糞谷 1-52 株 B 型: Lee, 東京 1-52 株

Mumps virus: Enders 株

NDV: 宮寺株

各ウイルスの感染漿尿液を使用し、赤血球凝集 (以下 HA) 価は Enders 株の 256~512 倍を除いてはすべて 1,024 倍以上であった。

RDE

RDE は国立予防衛生研究所細菌部から分与されたコレラ菌異型 558 株のブイヨン培養からえた。RDE をうる方法は衛生検査指針¹²⁾ にしたがった。RDE の力価測定は Ca saline を稀釈液として RDE の 3 倍階段稀釈 (0.25cc 宛) をおこなつた後、1% 鶏赤血球浮游液を各管に 0.25cc 宛加えた。これらを 37°C の恒温槽に 2 時間保つた後に 4 凝集単位になるように稀釈された Influenza virus B Lee 株を 0.5cc 宛加え、よく振盪混和してから 4~10°C に 2 時間放置して判定した。その結果 RDE 力価は 64 倍であった。

Ca Saline : Burnet-Stone の処方にしたがつて作った。
すなわち CaCl_2 1g, NaCl 9g, H_3BO_3 1,203g, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.25g を 1l の蒸溜水にとかし、pH を 7.0 に修正した。

鶏赤血球 : 心穿刺によって直接採血し、数回食塩水で洗滌してから使用した。なお Receptor 順位決定の際の基質としてもちいた鶏赤血球は終始同一個体から採血したものをもちいた。

実験方法

RDE を Ca Saline で稀釈し、これに鶏赤血球を最終濃度が 0.5 % になるように浮遊させる。これを 37°C の恒温槽に保ち、種々な時間に所要量のサンプルを取り出す。つぎにこのサンプルに最終濃度が 2 % になるようにクエン酸ソーダを加え、RDE の活性を止める。処理された血球は食塩水で十分に洗滌してから正常食塩水に最終濃度が 1 % になるように再浮遊する。

あらかじめ 1 列の試験管に 2 倍階段稀釈ウイルス液を 0.25cc 宛作つておき、1 % 血球浮遊液を 0.25cc 宛各列に加え Pattern test によつて判定した。グラフの横軸には時間を示し、RDE 処理血球によつてえた力価は logarithmic vertical scale の上に正常血球との百分力価として示した。

実験成績

I Panagglutination 阻止実験

RDE 稀釈液中に赤血球を 37°C に保つと、赤血球は Panagglutinable になり、後の操作の pattern test においてウイルスの有無にかかわらずすべての赤血球が凝集し、HA 価が全く測定できなくなる。

これを阻止するために稀釈メジウムに対して種々検討を加えた。すでに山田等¹³⁾はウイルスの赤血球凝集反応においてメジウム中に 0.1 % に鶏血漿を添加すれば、常に失敗することなく結果を読むことができることを見出し、このメジウムを広く応用しているが、著者もメジウム中に鶏血漿を加えると上記の Panagglutination を阻止できることを見出した。

第 1 表 鶏血漿加メジウムと Panagglutination との関係

鶏血漿% メジウム	0.1	0.5	1.0
CaS + S	+	+	+
CaS + PS	+	±	-
PCaS + PS	-	-	-
PCaS + S	+	-	-

註 S は Saline, CaS は Ca Saline, P は Plasma, +, -, は Panagglutination の有無を示す

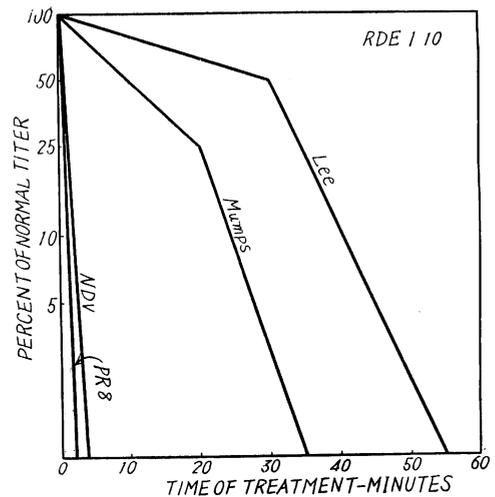
すなわち第 1 表に示す通り、最初 Ca Saline 中に種々の濃度の鶏血漿を加え、鶏赤血球を浮遊させてから 37°C の温水に 3 時間保ち、つぎに血球を洗滌してから失張り種々の濃度の鶏血漿食塩水に再浮遊せしめた。

対照として Ca Saline に血球を浮遊させた後に Saline に再浮遊させた場合には Panagglutination がみられるが、両方に鶏血漿を加えた場合には 0.1 % の低濃度でも阻止される。しかしいづれか一方に鶏血漿を加えた場合には 0.1 % のみでは不十分であつて、0.5 あるいは 1.0 % 加えなければ阻止できない。最も良いのは同表にみられる如く、Saline と Ca Saline の両方に鶏血漿を加えた場合である。

II MNI ウイルスの Receptor 順位について

HVJ の Receptor 順位における位置を決める前に、実験に使用する MNI 群ウイルスの Receptor 順位について検討した。使用した株は Mu., NDV それぞれ 1 株および Influenza virus としては PR 8 と Lee の 2 株である。RDE の稀釈濃度は 1 : 10 であつて、この濃度では赤血球表面のこれらの株に対する Receptor は 1 時間以内に速かに破壊された。

第 1 図 MNI 群ウイルスの Receptor 順位



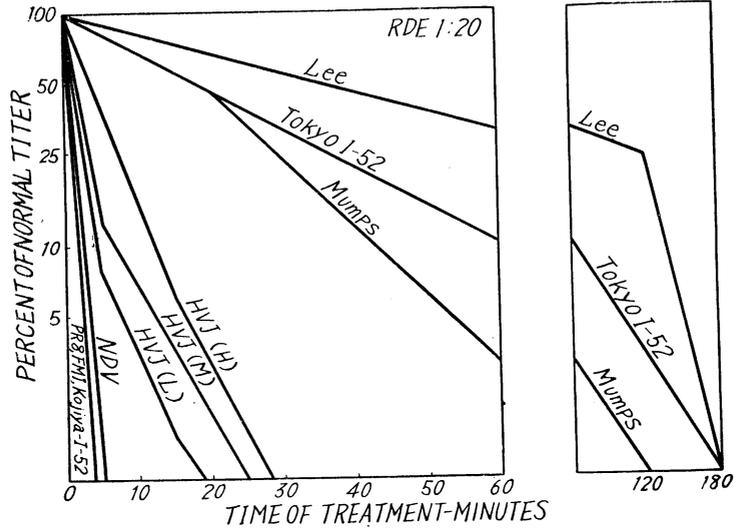
第 1 図に示す如く、PR 8 と NDV の Receptor は速かに破壊されるが、Lee, Mu. の Receptor は抵抗があり破壊されるのは 30 分以後である。すなわち PR 8, NDV, Mu., Lee の順序になつていのがみとめられた。なおこの結果は前述の Hirst 等¹⁴⁾の実験結果と一致している。

III Influenza virus 群の Receptor 順位における位置について

使用株は PR 8, FMI, 糞谷 1-52, Lee, 東京 1-52 であつて、そのほかに Mu., NDV をもちいた。RDE の稀釈濃度は 1 : 20 である。

第 2 図に示す如く、最も低位にあるのは Influenza A virus 群であつて 1 : 20 の低濃度の RDE をもちいても 10 分以内に赤血球表面の A 群ウイルスに対する Receptor は

第2図 インフルエンザウイルス群の Receptor 順位



破壊される。いわゆる古典株に属する PR 8 株と、かつて A prime と呼ばれていた FMI, 糀谷 I-52 株とは血清学的にいちぢるしい差がみとめられるのであるが Receptor 順位においては同一の位置におかれるのがみとめられた。

B 群のウイルスでは東京 I-52 株は Lee 株よりも幾分低位にあるが、MNI 群のウイルスの中では Influenza B virus 群は最高位におかれる。

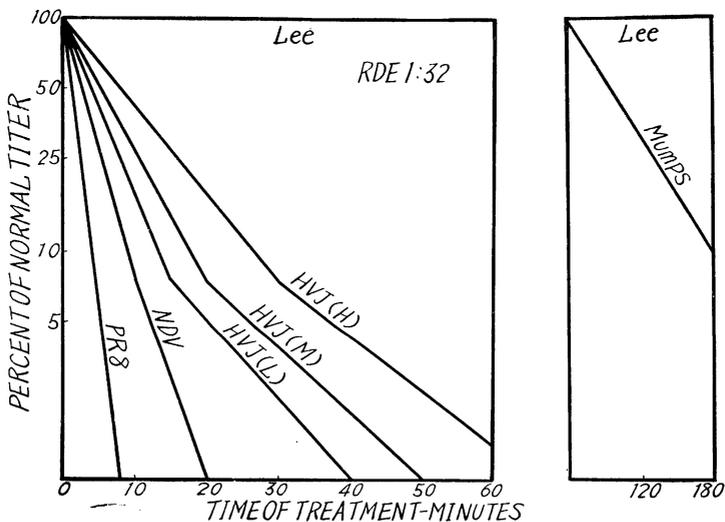
IV HVJ の Receptor 順位における位置について

最初の 1:20 稀釈濃度の RDE をもちい HVJ 12 株についてほかの MNI 群のウイルスと共に同時に実験した。

第2図に示した通り、HVJ の Receptor 順位における位置は Lee, Mu. よりも低位にあるが PR 8, NDV よりは高位にあり Receptor 順位は PR 8, NDV, HVJ, Mu., Lee になっている。またその位置は Lee, Mu. よりはむしろ NDV, PR 8 に近い。

RDE 1:20 の稀釈濃度では赤血球の HVJ の Receptor は 30 分以内に完全に破壊される。しかし Receptor の破壊は RDE の濃度を低稀釈でおこなえば時間的に遅くなり、かつ更に精密な観察がなされるので 1:32 の稀釈濃度をもちいた。

第3図 HVJ の Receptor 順位



第3図にみられる如く、HVJ の MNI 群ウイルス中におかれる位置は第2図と同じである。また HVJ に対する Receptor の中には 1 時間後にも破壊されない抵抗性の部分が残っていることがみとめられた。

第2図、第3図にみられる如く、12 株の HVJ に対する赤血球表面の Receptor の抵抗性は一致せず、したがって 12 株の HVJ 間においても差がみとめられ 3 群に分けられた。すなわち RDE に対して最も抵抗のある高位に存在する群

(high-H と略す), RDE によつて直ちにその Receptor が破壊される低位にある群 (low-L と略す), およびその中間の群 (medium-M と略す) の3群である。それぞれの群に属する HVJ はつぎの通りである。

H : 安井, 青森, 伏見, 関配, 176, 165

M : 沼畑, 213-1, M-N, 石井

L : 田無, 41

考 察

過去数年間に亘つて日本各地において分離された 12 株の HVJ について, MNI 群ウイルスの Receptor 順位との相関関係について検索をおこなつた。

すなわち MNI 群ウイルスの酵素作用と同一な活性を有すると考えられる RDE をあらかじめ赤血球に作用させてから, Receptor の破壊に伴う MNI 群ウイルスと HVJ に対する赤血球凝集性の有無を指標にして順位を決めた。この際 Receptor 順位の高位にあるウイルスとは, このウイルスに対する Receptor が RDE に対して抵抗のある状態, すなわち該ウイルスに対する血球凝集性が長時間保たれて場合を指し, 低位のウイルスとは速かに該ウイルスに対する Receptor が破壊, すなわち赤血球凝集性が失われる場合を指す。

この場合高稀釈濃度 (1 : 10) の RDE を赤血球に作用させると, 高位にある抵抗性のある Receptor は 1 時間以内に破壊されるが, 一方低位にあるウイルス群との相関関係が不明になる。また Hirst 等¹⁾がおこなつた如く低稀釈濃度 (1 : 32) の RDE を使用すると高位にあるウイルス群に対する Receptor の破壊は 3 時間以内に起らず, したがつて実験には中間の稀釈の RDE (1 : 20) を使用した。

実験結果にみられる如く, 最も高位にあるのは Lee 株 (Influenza B) であり, つぎに東京 1-52 株 (Influenza B) と Mumps が続く, HVJ の諸株はこれらの株のつぎに位置し, HVJ よりも低位には NDV と Influenza A に属する PR 8, FMI, 桃谷 1-52 株が位置している。この順位は東京 1-52 株, FMI, 桃谷 1-52 株を除くと Hirst 等の実験結果と一致する。全体として HVJ は Lee, Mumps の如き高位における株よりもむしろ PR 8, NDV 等の低位に属する株に近いようである。

12 株の HVJ の間においても Receptor 順位に差があり, 高位 (6 株), 中間位 (4 株), 低位 (2 株) の 3 群に分けることができた。これらの諸株は交叉的赤血球凝集抑制反応, 交叉的補体結合反応によつても区別することができない。¹⁴⁾ すなわち血清学的には同一の抗原構造を有するようにみえるが鶏赤血球を基質にし, RDE を exhausting agent とし, てもちいた本実験の結果にみられる如く, 3 群に分けられたことは各々のウイルス粒子の酵素作用の活性度が同一でないためと考えられる。

結 論

鶏赤血球を基質とし, RDE を Receptor exhausting agent として MNI 群ウイルスの Receptor 順位における HVJ の位置を求めた。

1 MNI 群ウイルスの中で最も高位にあるのは Influenza B 群ウイルスであり, Mumps, NDV, Influenza A 群ウイルスの順序でこれに続いている。

2 HVJ は Influenza B 群ウイルスおよび Mumps よりも低位にあるが, NDV および Influenza A 群ウイルスよりは高位にある。

3 12 株の HVJ について検討すると HVJ の諸株の間にも Receptor 順位に差があり, 高位 (6 株), 中間位 (4 株) および低位 (2 株) の 3 群に分けられた。

文 献

第 2 報参照