

論 文 内 容 要 旨

ミキソウイルスの生物活性の一つに、多糖体のシアリドラクトース末端から *N*-acetyl-neuraminic acid (NANA) を遊離せしめる酵素であるノイラミニダーゼがある。この酵素がミキソウイルスの構成単位のひとつであつて、粒子表面に存在し、トリプシンで除去し得ることが知られているが、果してウイルス核殻の遺伝指令でつくられた構成単位なのか、又は宿主細胞由来のものであるかという問題はなお解明されておらず、Ada 等がインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ活性と発育鶏卵漿尿膜及びコレラ菌液のノイラミニダーゼ活性とを免疫学的に比較し、この酵素がウイルスに特異的な構成単位であると推論しているにとどまつている。

この報告は卵で増殖した Sendai virus (E-Sendai) と L 細胞で増殖した Sendai virus (L-Sendai) 及び卵で増殖した各種のミキソウイルスを用い、それ等の酵素活性の至適 pH を比較し、又抗体による酵素活性の阻止の特異性を調べることにより、ミキソウイルスのノイラミニダーゼの由来を検討した。

実 験 材 料 と 方 法

1) ウイルス：① E-Sendai: 10 日発育鶏卵漿尿膜腔に 10^8 EID₅₀ (50% 卵感染価) の Sendai virus を接種、36°C、72 時間培養、得られた漿尿液を 2,000 号、15 分と、43,000 号、30 分の分別遠心を 2 度行い、pH 7.2 の M/100 の磷酸緩衝食塩水 (PBS) 中に赤血球凝集素価 (HAU) 32,000/mℓ に調製しておく。② L-Sendai: L 細胞に input multiplicity 100:1 で感染せしめ、1 時間及び 2 時間後に Hanks 液で充分に洗つて未吸着ウイルスを除去し、25 ml の維持液中で 37°C、72 時間培養した。得られた培養液は E-Sendai と同じ分別遠心し、PBS 中に 32,000 HAU/mℓ に濃縮した。③ その他のミキソウイルス; インフルエンザウイルス群として A 型の PR8, FM1, NWS, 及び Japan/305, B 型の LEE, 並びにパラインフルエンザウイルスに近縁な Newcastle disease virus (NDV) 等を用いたが、各々 11 日発育鶏卵漿尿膜腔に 10^8 EID₅₀ の濃度で感染せしめ、37°C、48 時間培養後その漿尿液から、2,000 号、15 分と、53,000 号、30 分の分別遠心を 2 回行い、PBS 中に 32,000 HAU/mℓ の濃縮ウイルスを得た。

2) Sendai virus のノイラミニダーゼ分割の調製: 32,000 HAU/mℓ のウイルス液に 1/2 量の麻醉用エーテルとエマゾール 1130 (Polyoxyethylene sorbitane mono-laurate) を 1 mg/10⁴ HAU の割合に加え氷冷下で処理後、水層を 100,000 号、2 時間遠心し酵素分割を上清に得た。この分割にはなお、1,000~10,000 HAU/mℓ の Small HA を含む。

3) E-Sendai のノイラミニダーゼ分割に対する抗体: E-Sendai のノイラミニダーゼ分割に Freund の incomplete adjuvant を加え、家兎の足蹠に皮下注射して免疫血清を得た。硫酸塩析法によりガンマグロブリンを精製して 50 mg/mℓ に食塩水に調製し、E-

Sendai ノイラミナーゼ分割に対する抗体として用いた。

4) ノイラミナーゼ活性の測定：基質にはヒト血漿から Schmid の方法で分割した oro-somucoid を用いた。0.1 ml の基質と 0.1 ml の酵素材料を混合し、37°C、30 分後、遊離した NANA を Warren の 2-チオバルビツール酸法で定量し、酵素活性を求めた。すべての酵素材料はあらかじめ生理食塩水に透析後、緩衝液で適当な pH に調整して用いた。

実験成績並びに考按

1) Sendai virus の酵素活性の至適 pH：E-Sendai 酵素活性の至適 pH を求めるために醋酸 (pH 4.0 ~ 5.5) 及び磷酸 (pH 5.5 ~ 7.5) 緩衝液で調整したウイルス液 0.1 ml と 0.1 ml の基質を用いた結果至適 pH は 4.0 から 5.5 の間にあり、L-Sendai 酵素活性もほとんど同一で、pH 5.0 ~ 5.5 の範囲で E-Sendai のものに比し活性が低いのが唯一の相違点であつた。この結果は Sendai ウイルス粒子を用いた場合も、その酵素分割を用いた場合と異ならなかつた。

2) 各種ミキソウイルスの酵素活性の至適 pH の比較：次に各種のミキソウイルスの非分解粒子のノイラミナーゼ活性の至適 pH を前記 Sendai virus の場合と同じ方法で測定し、それぞれの比較を行つた。PR8 及び FM1 は pH 5.0 ~ 6.0 の間に至適 pH が認められた。Japan/305 は最も活性の強い pH が 5.5 ~ 6.0 で、他のウイルスでは活性の認め難い pH 3.5 においても高い活性を示した。又 NWS 及び LEE は pH 3.5 から 7.5 の間で全く酵素活性を示さず、基質として Orosomucoid が適しないという結果を得た。一方 Sendai virus に近縁な NDV の至適 pH は Sendai virus とほぼ同一である。

3) Sendai virus の酵素活性の免疫学的特異性：前記のことから、Sendai virus のノイラミナーゼ活性はインフルエンザウイルスのものと異なつておるが、NDV と相違点は認められなかつたので、NDV との相違の有無を免疫学的に検討した。即ち E-Sendai の酵素分割に対する抗体グロブリンは E-Sendai、E-Sendai の酵素分割、L-Sendai 及び L-Sendai の酵素分割の酵素活性を一樣に抑制するけれども、E-Sendai と同じく発育鶏卵で増殖した PR8 や NDV の酵素活性を全く抑制しない。

以上の実験から宿主をかえて培養した E-Sendai と L-Sendai のノイラミナーゼは至適 pH 及び免疫学的特異性から同一酵素と考えられるが、卵で培養し、至適 pH が Sendai virus と同一である NDV の酵素活性は血清学的に Sendai virus のものと全く異なつてゐる。ミキソウイルスのノイラミナーゼは宿主細胞成分がウイルス粒子に組込まれることによつて由来したものではなく、ウイルス遺伝指令に基づいて合成されたものと結論された。

審査結果の要旨

ミクソウイルスに特有な生物活性のひとつにノイラミニダーゼがあり、ウイルス構成成分のひとつになつており乍ら、これがウイルスのゲノムのもつ遺伝情報でつくられるものか、或いは粒子完成の際まきこんで持ち出した宿主成分の一部が不明であつた。本論文は発育鶏卵漿尿膜とL細胞とふたつの宿主を換えて培養した Sendai virus からエーテル・エマゾール法でノイラミニダーゼ分割を抽出し、両者の至適 pH が一致し、しかもその特異的免疫血清によつて両者の作用が同時に抑制されることから、ウイルスノイラミニダーゼはウイルスゲノムによつてつくられる蛋白質で宿主成分ではないことを明らかにした。

パラインフルエンザの Sendai virus 以外にもインフルエンザウイルスを用いて比較的な意味で至適 pH を測定してみるとインフルエンザ A と A 1 の夫は極めて近似するが A 2 (アジア) の夫は全く異なること、またそれ等は Sendai virus と全く異なること、更に Sendai virus と極めて近似する NDV はそのノイラミニダーゼの至適 PH が殆んど Sendai virus の夫と一致するが、Sendai virus に対する抗体では NDV のノイラミニダーゼ活性は全く抑制されないことをも明らかにした。

以上本論文はミクソウイルスを最も特徴づけるノイラミニダーゼの至適 pH と免疫血清による作用の抑制の有無から、ノイラミニダーゼがウイルス遺伝指令に基づいて合成されたウイルス構成成分と結論した点、学位に値するものと認める。