

日本脳炎ウイルスの血球凝集反応 に及ぼす Tween 80 の影響

与那城敏夫

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学部門 (主任：福見秀雄教授)

(Received for Publication February 9, 1970)

Effect of Tween 80 on Hemagglutination Activity of Japanese Encephalitis Virus

Toshio YONASHIRO

Department of Virology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University

(Director: Prof. H. FUKUMI)

Abstract

Daiflon 113, a fluorocarbon, was available for extraction of Japanese encephalitis (JE) virus antigen from infected mouse brain. The fluorocarbon extract was not only effective as antigen for hemagglutination and complement fixation, but reservable efficiently at least for three months. HA activity of Nakayama NIH antigen prepared by the fluorocarbon method was promoted by adding Tween 80 with the final concentration of 0.5 percent, while that of JaGAR 01 antigen was markedly depressed. On the other hand, HA of acetone-ether antigens was inhibited by Tween 80 to a great extent in both the strains.

Thirteen out of 17 wild strains which had been isolated from mosquitoes in the epidemic season of JE, showed the depression of HA due to Tween 80 as was observed in JaGAR 01 strain, but the remaining four were little influenced.

Although no significant reduction of CF activity could be observed in both the strains, it was found that the infectivity of the strains to a cultured cell line had been markedly reduced. Using antigens prepared by fluorocarbon or acetone-ether method, cross HI tests were carried out. The antigens of JaGAR 01 strain showed approximately the same HI as to

homologous and heterologous antisera, but in case of Nakayama strain some reduction in titer against heterologous antisera was observed. It is conceivably possible to consider that discrepancies between the findings of the strains lies in different character of their hemagglutinins.

緒 言

Gessler et al. (1956) がウイルス抗原の抽出に Fluorocarbon を用いて以来 Hamparian et al. (1958), Hummler and Ketler (1958), Girardi (1959) はポリオ, エコー, コクサッキーA群とB群, ポリオーマなどのウイルス抗原の抽出や非特異因子の除去の目的にこれを使用し効果をあげた。アルボウイルスの抗原抽出に Fluorocarbon を用いたのは Porterfield (1963) および 西山・山口 (1964) である。Porterfield はブンヤムウエラ, セミリキフオレスト, シンドビス, ウエストナイルの各ウイルス感染マウス脳から Fluorocarbon で血球凝集抗原を抽出し, Clark and Casals (1958) の抗原に劣らないことを強調した。また, 西山・山口は日本脳炎ウイルスの Fluorocarbon 抽出液が補体結合抗原および血球凝集抗原として活用し得ることを述べた。しかし, 本抗原の免疫原性と, Fluorocarbon がウイルスとしての感染性に及ぼす影響については明かでない。一方日本脳炎ウイルスの精製に関する研究は最近特にわが国でかなり行なわれている。竹原 (1962) は DEAE-セルローズカラムクロ

マトグラフィーで Kitaoka and Nishimura (1965), Nishimura et al. (1964, 1968), 西山・山口 (1964) は蔗糖と塩化セシウムを用いた密度勾配遠心法で精製を試み血球凝集素と補体結合抗原は感染性粒子から分離されるが両者の分別は困難であったという。

Tween 80 は表面活性剤としての意義のほか lipid solvent として Ether と同じ作用を期待して使用されている。Norrby (1962) および Dold and Northrop (1969) は麻疹と風疹ウイルスの血球凝集抗原に及ぼす Tween 80 の影響について述べているが日本脳炎ウイルスに関する所見の記載はない。

本報では日本脳炎ウイルスの Fluorocarbon による部分精製, 塩化セシウムを用いた密度勾配遠心法によるウイルス分画の精製ならびに部分精製ウイルスと精製分画に及ぼす Tween 80 の影響について実験し, 日本脳炎ウイルスの標準株として使用されている中山株と JaGAR 株の特異な所見について述べ, 分離野生株の検査成績をも附記する。

実験材料及び実験方法

ウイルス: すべての実験に供したのは国立予防衛生研究所ウイルス・リケッチャ部から分与をうけた中山, 予研株 (Nakayama NIH) に JaGAR 01株で, 両株は1965年以来, 当教室での継代を含めて前者は39代, 後者は16代哺乳動物脳内接種法で継代されたものである。また一部に使用した分離株は 1965年, 1968年および1969年に野外捕集蚊から哺乳動物脳内接種法で分離されたもので, 1965年の分離株が4代継代された以外すべて継代2代目のものであった。

部分精製および精製ウイルス: 出発材料には毎回2ないし4gの感染哺乳動物脳を用いた。これを20%の乳剤になるように Tris 緩衝食塩水 pH8.0 を加え先ず乳鉢中で磨砕し, 次いでホモジナイザーに移し, これに等量の Fluorocarbon (Daiflon 113) を加え氷冷槽中で2ないし3分間高速回転で乳剤とした。乳剤を先ず 1500g 15分間遠心し, 上清を更に 5000g 15分

間遠心した後その上清を採取してこれを部分精製ウイルスとした。

精製のためには Cellulose nitrate tube に塩化セシウムの密度を異にする液層を重ね二重層を作り, その最上層に部分精製ウイルスを重ねて 100000g 2時間遠心した後, tube の側面から注射針で穿刺して, ウイルス層を採取した。これを 4°C, 2時間以上 Tris 緩衝食塩水 pH8.0 に透析し精製ウイルスとした。これらの試料は使用直前まで -70°C に保存した。

濃度勾配遠心法: 塩化セシウムの Density (g/cm^3) 1.410, 1.310 および 1.210 のもの所定量を重ねし, その最上層に部分精製または精製ウイルスを重ねて 129800 g 3時間遠心した後, 遠心管の底部を穿刺し 5滴ずつ採取した。この際 Density 1.320 以後の分画を採取し実験に用いた。各分画はセロファン・チューブで Tris 緩衝液に1夜透析した後, 使用直前まで -70°C

に保存した。

Aceton-Ether 抽出抗原: 中山株, JaGAR 株の Aceton-Ether 抽出抗原は化学及び血清研究所の大夫博士から分与をうけた。

抗血清: 抗中山株家兔免疫血清 R₁, R₂, R₃, 抗 JaGAR 株家兔免疫血清 R₄, R₅, R₈ もまた大夫博士から分与をうけた。これらはいずれも Aceton-Ether 抽出抗原を免疫原として作成したものとされる。抗血清 R₇ から R₁₅ までは著者が Fluorocarbon 抽出抗原で作成した。免疫用家兔は予め日本脳炎ウイルス抗体を有しないことを確認した後精製ウイルスを 2 ml 1 週間間隔で 3 回静注し最終注射後 1 週目に採血した。

ただし、抗血清 R₁₀ は初回免疫後 2 週間目に採血したものである。免疫血清は分離後、使用前まで -70°C に保存した。また血球凝集抑制試験には抗血清を冷アセトンで処置した後使用した。

血球凝集, 血球凝集抑制試験および補体結合反応: 前 2 者のためのウイルス稀釈液は 0.4% 卵アルブミン加硼酸緩衝食塩水 pH9.0 を用いた。血球は 1 日ヒナから採血し Dextrose-Geratin-Veronal 緩衝液中に保存し 5 日以内に使用した。JaGAR 株の血球凝集と同抑制反応は pH6.8 が至適であり中山株のそれは pH6.4

であって、特に中山株はこの至適 pH をはずれると反応はほとんど現われないので以下の実験は両株の至適 pH で行なった。ただし、JaGAR 株のみ特別な場合 pH 6.4 でも行なった。また、分離株の血球凝集は pH6.8 と pH6.4 で実施した。反応は 37°C, 1 時間後に判読し凝集価と凝集阻止価は反応とその阻止の最高稀釈倍数で表わした。補体結合反応は Adenovirus 抗原測定で行なった方法 (Russell et al. 1967) に準じて実施した。

感染価の測定: 孵化 10 日卵のニワトリ胎児を Trypsin 消化し、洗滌した細胞の浮遊液を小型シャーレに分注し、炭酸ガス培養器中で 1 日培養し単層培養細胞を得た。この細胞をよく洗滌した後各階段稀釈ウイルス液の 0.2 ml を接種し 37°C 1 時間吸着した。次いで double Hanks agar を重層し 35°C 5 日間培養して生じた plague 数を算えた。

Tween 80 処置: Tween 80 溶液は Parisius and Macmorine (1969) に従って作成した。各濃度の Tween 80 溶液と抗原溶液 (精製ウイルス及び密度勾配遠心分画) をそれぞれ等量に混じり 4°C に保った後、所定の時間に同一試料からその一部を採取し血球凝集、補体結合および感染価の測定を行った。

実 験 成 績

抗原の保存方法と活性: JaGAR 株の Fluorocarbon と Aceton-Ether 抽出抗原の比較の例を Fig. 1 に示した。-70°C 保存では血球凝集 (HA), 補体結合 (CF) 活性は比較的良好に保たれ特に Fluorocarbon 抽出抗原の活性はほとんど変動を認めなかった。4°C 保存の場合、Aceton-Ether 抽出抗原は数日間で HA, CF とも著しい失活を認めたのに対して Fluorocarbon 抽出抗原は 30 日後でもなおかなりの活性を保ち、Aceton-Ether 抗原より好結果が得られた。

HA 活性に及ぼす Tween 80 の影響: 中山株と JaGAR 株の Fluorocarbon 抽出法で得た部分精製ウイルスおよび精製ウイルスと Tween 80 の各濃度の溶液とを等量混合し 4°C, 2 時間 4 時間および 1 夜 (18 時間) 保った後、混液から一部分を採取してその HA 活性をしらべた。成績は Fig 2 に示されるように中山株は 0.01% から 1.0% に至る濃度の Tween 80 添加でも HA 活性の促進現象を認め、特に 0.05% から 0.5% の濃度で著明であったが、JaGAR 株では Tween 80 のどの濃度の添加でも HA 活性は抑制され特に 0.5% 以上の濃度で著明であった。Fluorocarbon と Tween 80

Fig. 1. Effect of preservation on hemagglutination and complement fixation of partially purified virus of JaGAR strain.

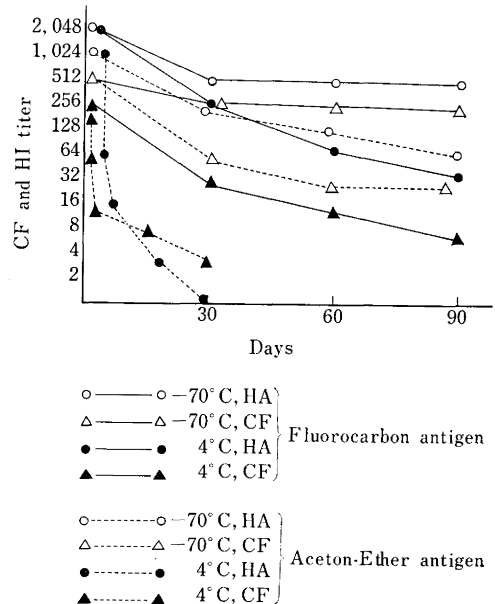


Fig. 2. Effect of Tween 80 on HA activity of JE virus.

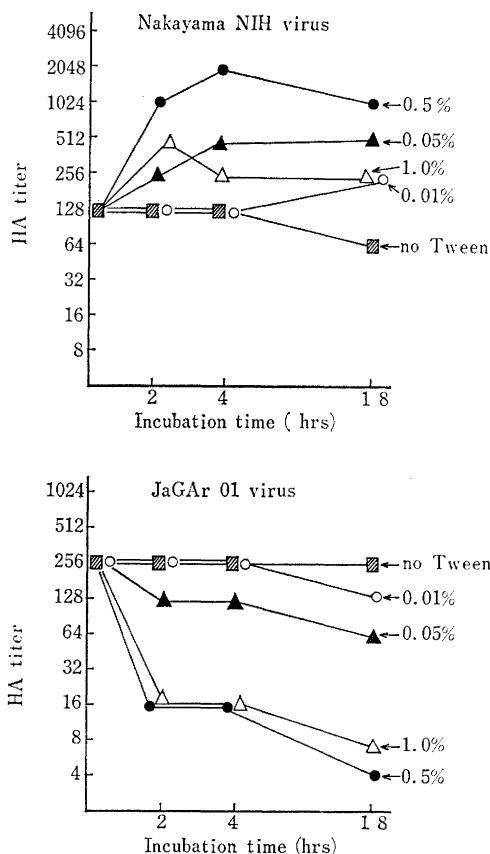


Table 1. Effect of Tween 80 on HA activity of JE virus prepared by acetone-ether treatment

Incubation time	JaGAR 01	Nakayama NIH
no Tween	640	1,280
180 min	160	80
overnight	40	80

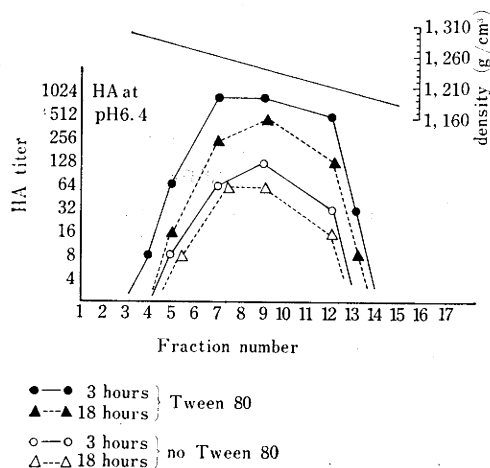
は Ether と同じく lipid solvent でもあるので抗原作成に Aceton-Ether 抽出法が用いられた場合、Fluorocarbon 抽出抗原で認められたような Tween 80 の影響が現われるかどうかを知る必要がある。このような目的で中山株と JaGAR 株の Aceton-Ether 抽出抗原を使用して同様の実験を試みた。成績は Table 1 に示されるように、抗原液に添加される Tween 80 の最終濃度を 0.5% とした場合、4°C 3 時間の保持で中山株、JaGAR 株とも HA 活性の著明な失活を認め、

特に中山株では Fluorocarbon 抽出抗原でみた HA の促進を認めることは出来なかった。従って抗原の作成方法は中山株の Tween 80 に対する反応態度を左右することが明らかである。

塩化セシウム密度勾配遠心分画の性状：前項で Tween 80 添加によって JaGAR 株の HA は抑制、中山株のそれは促進という現象がみられたが、この現象が両株の HA 抗原の本質的特性であるのかどうかを知るためには密度勾配遠心法による精製分画を用いての実験を行なう必要がある。先ず塩化セシウム密度勾配遠心法によるウイルスの精製を試み、各分画の性状を検討するとともに HA および CF 活性のみを示す分画の分離の可能性を検討した。JaGAR 株について反復実施した密度勾配遠心の各分画の HA、CF および plaque 形成能をまとめると、Density (g/cm³) 1.240 を中心として 1.260 及び 1.210 (No11 及び No10, No12) の分画は HA と CF 活性が最も高い。また plaque 形成能も Density 1.240 (No11) 分画を中心として高い値を示した。これに反し、Density 1.280 (No 8) と 1.310 (No 7) の分画、特に後者は CF 活性を示さない HA 活性分画であり、Density 1.180 (No 14) 以下の分画は、CF 活性のみで HA 活性を欠くことは重要な所見である。これらの分画のうち、Density 1.280 ((No 8) と 1.180 (No 14) の両者は頻回の実験で時に CF 活性または HA 活性を低いながら認め、それぞれに Contamination をきたす場合が経験されたが、重層すべき塩化セシウムの密度やその量、遠心速度と時間を一定にすれば所期の目的が達せられる。また、上記の各分画のうち、特に Density 1.310 (No 7) と、1.180 または 1.160 (No 14 または No 15) の分画は plaque 形成能を認めなかった。いずれにしてもこれらの所見は、Fluorocarbon 抽出法による日本脳炎ウイルスの抗原活性と生物活性が密度勾配遠心法によって分別観察される可能性を示している。

密度勾配遠心分画に及ぼす Tween 80 の影響：中山株および JaGAR 株の各分画に Tween 80 を最終濃度が 0.5% になるように加え、4°C 3 時間および 1 夜保持後、HA 活性をしらべた。HA 反応は中山株の場合 pH 6.4 のみ、JaGAR 株の場合 pH 6.8 と pH 6.4 で行なった。中山株、JaGAR 株とも Density 1.240 または 1.250 を中心として 1.310 から 1.190 あるいは時に 1.180 に亘って HA 活性を示した。Fig. 3 にみるように、中山株ではどの分画でも 4°C 3 時間または 1 夜保持後の HA 活性は促進されたが、JaGAR 株では、Fig 4a および Fig 4b のようにどの分画でも常に HA 活性は

Fig. 3. Effect of Tween 80 on HA activity of fractions after gradient centrifugation (Nakayama strain).

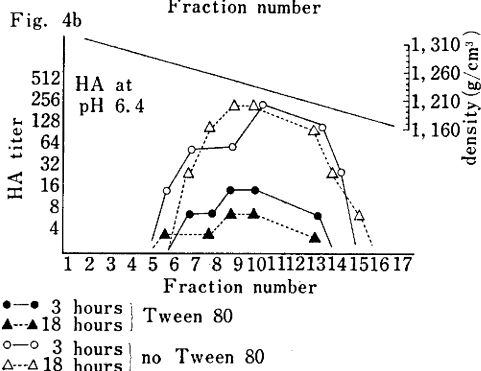
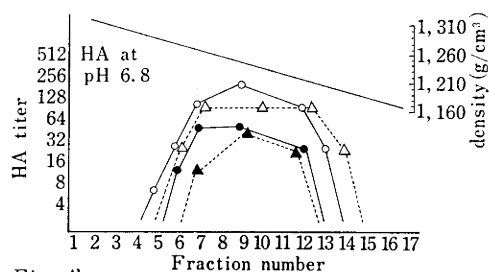


抑制され特に pH6.4 での反応時に著明であった。従って中山株と JaGAR 株の Fluorocarbon 抽出抗原に含まれている血球凝集抗原(素)は Tween 80 によって特異な影響をうけること、換言すればこの成績は中山株と JaGAR 株の血球凝集抗原(素)に何等か質的な差異があることを思わせる。

CF 活性に及ぼす Tween 80 の影響: 中山株及び JaGAR 株の精製ウイルスに Tween 80 を最終濃度が 0.5 及び 0.01% になるように加え、4°C, 2 時間, 4 時間および 1 夜保った後の CF 活性は、Table 2 に示すように、特に減弱することはなかった。

感染能に及ぼす Tween 80 の影響: 中山株と JaGAR 株の部分精製ウイルスに最終濃度が 0.5% になるように Tween 80 を加え、4°C, 3 時間及び 1 夜保った後、plaque 形成能を検査したのが Table 3 である。両株とも Tween 80 の作用下に 3 時間後既に plaque

Fig. 4a Effect of Tween 80 on HA activity of fractions after gradient centrifugation (JaGAR strain).



数の著しい減少を認め 1 夜保持後の試料ではもはや plaque 形成も認めないまでに感染能が不活化された。これに反して同一試料について行なった HA 反応は中山株では促進、JaGAR 株では抑制という所見に変わりなかった。

交叉血球凝集抑制試験: Table 4 に示されるように、反応原として Fluorocarbon 抽出抗原と Aceton-Ether 抽出抗原を用いた場合それぞれの免疫血清の血球凝集抑制価はほぼ等価を示している。JaGAR 株抗原は抗中山株免疫血清、抗 JaGAR 株免疫血清のいずれによっても同じ程度によく抑制されるが、中山株抗原は抗中山株免疫血清によってよく反応を抑制されるの

Table 2. Effect of Tween 80 on CF activity of JE virus

Incubation time(min)	JaGAR 01			Nakayama NIH		
	Final concentration of Tween(%)					
	0.5	0.01	no Tween	0.5	0.01	no Tween
120	8	16	16	16	16	16
240	8	16	16	8	16	16
overnight	4	16	16	16	32	32

Table 3. Effect of Tween 80 on infectivity and HA activity of JE virus

Incubation time	JaGAR 01	Nakayama NIH
	PFU/0.2ml	
no Tween	5.3×10^5	2.0×10^6
180 min	1.3×10^2	8.9×10^2
overnight	0	0
HA titer		
no Tween	128	64
180 min	256	512
overnight	16	1,024

The final concentration of Tween 80 : 0.5%

に比べ、抗 JaGAR 株免疫血清による抑制価は著しく低い。Table 5 は 0.1% に Tween 80 を加え 4°C 3 時間処置した後の抗原を使用した場合であるが、成績は Tween 80 を使用しなかった時の所見と全く同様であった。

分離株の HA に及ぼす Tween 80 の影響：中山株と JaGAR 株の HA 活性に及ぼす Tween 80 の影響に

は特異な点があったので、分離株の中に類似の現象を示すものがあるかどうかを調査した。当教室でコガタアカイエカから分離し日本脳炎ウイルスと同定された 17 株を用いた。分離株の HA 反応の至適 pH は 6.8 であったが、pH 6.4 でも実験を試みた。Tween 80 を最終濃度が 0.5% になるように抗原液に加え、4°C 3 時間および 1 夜保った後 HA 活性を調査した。ウイルス抗原は Fluorocarbon 抽出液である。

HA を pH 6.8 で行なった成績を Table 6 に示した。

Table 5. Cross HI test using JaGAR and Nakayama antigen treated with 0.1% Tween 80 for 3 hours.

Antiserum	Antigen	
	JaGAR	Nakayama
JaGAR R11	2,560	320
R12	1,280	160
R14	1,280	80
Nakayama R4	640	640
R8	1,280	1,280

Table 4. Cross HI tests of antisera and antigens against JaGAR 01 and Nakayama NIH strain

Antiserum	HI titer against antigen of				
	JaGAR 01		Nakayama NIH		
	Fluorocarbon	Aceton-Ether	Fluorocarbon	Aceton-Ether	
Anti-JaGAR	R1	2,560<	5,120<	1,280	640
	R2	1,280	1,280	320	640
	R3	2,560	2,560	640	640
	R10	640	640	160	160
	R11	2,560	2,560	640	640
	R12	2,560	2,560	320	320
	R13	1,280	2,560	320	160
	R14	1,280	1,280	160	160
	R15	2,560	1,280	160	80
	Anti-Nakayama	R4	1,280	640	1,280
R5		640	640	1,280	1,280
R6		2,560	1,280	1,280	2,560
R7		2,560<	5,120<	2,560<	5,120<
R8		2,560	2,560	2,560	1,280
R9		2,560	2,560	2,560<	5,120<

Table 6. Effect of Tween 80 on HA activity of JE virus isolated (1)

Strain	Year of isolation	Number of passage	HA activity			
			No Tween	Tween	No Tween	Tween
			3 hours		18 hours	
at pH 6.8						
2, 279	1965	4	2,560	>2,560	1,280	1,280
3, 591	1968	2	640	320	640	320
3, 618	"	"	1,280	640	1,280	320
2, 667	"	"	1,280	320	1,280	320
3, 686	"	"	1,280	320	1,280	320
3, 698	"	"	1,280	320	640	160
3, 706	"	"	640	160	1,280	160
3, 729	"	"	640	640	640	160
3, 750	"	"	640	320	1,280	80
5, 302	1969	2	1,280	1,280	640	640
5, 337	"	"	1,280	320	2,560	320
5, 358	"	"	2,560	2,560	1,280	1,280
5, 385	"	"	1,280	640	2,560	160
5, 409	"	"	2,560	1,280	1,280	160
5, 460	"	"	2,560	1,280	1,280	640
5, 471	"	"	640	640	640	80
5, 487	"	"	640	160	640	160

Table 7. Effect of Tween 80 on HA activity of JE virus isolated (2)

Strain	Year of isolation	Number of passage	HA activity			
			No Tween	Tween	No Tween	Tween
			3 hours		18 hours	
at pH 6.4						
2, 279	1965	4	1,280	320	1,280	320
3, 591	1968	2	160	20	320	20
3, 618	"	"	320	20	640	40
3, 667	"	"	640	<10	320	<10
3, 686	"	"	320	<10	320	<10
3, 698	"	"	640	20	320	20
3, 706	"	"	320	10	320	<10
3, 729	"	"	320	<10	320	20
3, 750	"	"	320	20	320	40
5, 302	1969	"	640	320	640	160
5, 337	"	"	640	<20	640	<20
5, 358	"	"	640	320	1,280	320
5, 385	"	"	640	<20	640	<20
5, 409	"	"	640	160	640	20
5, 460	"	"	640	320	640	160
5, 471	"	"	320	40	320	20
5, 487	"	"	320	20	320	<10

1965年に分離された2279株 1969年に分離された5302株, 5358株, 5460株の4株は Tween 80 処置1夜後の場合もそのHA 価の低下はほとんど認められなかったが, 中山株のようにHA 活性が賦活されるような例はなかった。また他の13株のHA活性は Tween 80 の影響でかなり低下した。分離株の Tween 80 処置後のHAをpH6.4で行なった成績は Table 7 であるが,

上記の4株の場合, 幾分そのHA 価は低下したとはいえ, なおかなりの活性が保たれていた。これに反して他の13株の場合 HA活性は著しく阻害されそのHA 価が10倍以下にまで低下したものが半数にまで及んだ。以上の成績から, 分離株2279 5302, 5358および5460の4株のHA抗原は Tween 80 に抵抗性であって他の13株のそれは感受性であるといえる。

考 察

ブンヤムウエラ群ウイルスの血球凝集素は Ether 処置で破壊され易いので抗原の抽出には通常Sucrose-Aceton 法が選ばれるが, Porterfield (1960) は感染マウス脳乳剤に Fluorocarbon を加え一夜静置しゼリー様乳剤を遠心しその上清に血球凝集素がよく抽出されているのを認め, 本法はセミリキフォレスト, ウエストナイルの各アルボウイルスの抗原の抽出にも適していると述べた。一方, 西山・山口(1964)も日本脳炎ウイルス抗原の抽出に Fluorocarbon 処置を推奨している。著者は上記両氏の方法を基にし塩化セシウムによる密度勾配遠心法を加味して部分精製ならびに精製ウイルス試料を得た。この試料はHAおよびCF抗原としてすぐれ, -70°C 保存では勿論, Aceton-Ether抽出抗原よりも 4°C 保存に耐え, かつ免疫原としても有用であることを認めた。さらに本法は Aceton-Etherあるいは Sucrose-Aceton法および硫酸プロタミン併用法などより精製過程が簡便であるのも一つの特長といえる。周知のように日本脳炎ウイルスの Aceton-Ether 抽出抗原は 4°C の保存では数日を出ずして失活する。これに対して本法による抗原がたとえ力価として4分の1程度に低下をみるとはいえ同温度で1カ月保存し得ることは, 抗原の輸送や基地研究室を離れての作業を可能ならしめるものであり日本脳炎の疫学的研究を大いに便ならしめるものであろう。

Tween80は麻疹ウイルス (Norrby, 1962; Parisius and Maemorne, 1969), 風疹ウイルス (Dold and Northrop, 1969) などの血球凝集抗原の作成に Ether との組合せで使用され, 特に風疹ウイルスでは血球凝集の促進が認められているが, 一方では麻疹ワクチンの場合 Tween 80は抗原性を減弱せしめるので好ましくないとはいわれている。

日本脳炎ウイルスに及ぼす Tween 80の影響については報告がない。著者の場合, 業室保存の中山株は Tween 80 処置で著明なHA活性の促進を認めたが, JaGAR株のHAは著しく抑制された。もっとも, 反応は 37°C で行ない, 反応液中に含まれる Tween 80は抗原稀釈と共に稀釈されるとはいえ, 一応その存在を考慮しなければならないが, 中山株と JaGAR株の Tween 80に対する態度の差異は日本脳炎ウイルス自体に関する今後の研究に一つの手掛りを与えるものと思う。このような現象は Fluorocarbon 抽出抗原でのみ認められ, Aceton-Ether 抽出抗原では中山株も JaGAR株と同様, そのHAが Tween 80で抑制され易いことを知った。一方, 塩化セシウムを用いた密度勾配遠心による精製分画でも, Tween 80による中山株HAの促進, JaGAR株HAの抑制という前記の所見に変わらなかった。この現象の説明は困難であるが, 両株の血球凝集素に何等か質的な差があることを推定してもよいと思う。

交叉血球凝集抑制反応は, Fluorocarbon 抽出抗原でも Aceton-Ether 抽出抗原でも全く平行した所見が得られ, また, JaGAR株のHA活性をそれほど抑制せず中山株のそれを著明に促進せしめない濃度の Tween 80を作用させた抗原を使用しても同様の成績であった。すなわち, JaGAR株は抗中山株免疫血清でも自原免疫血清とほとんど変りがない阻止価を示したが, 中山株では抗 JaGAR株免疫血清による阻止価が自原抗血清のそれより著しく低いことが注目された。この所見は Okuno et al. (1968) によっても報告され, 氏等はインフルエンザウイルスの場合にみられるP相及びQ相の關係に類するものと考察しているが中山株の抗原の一部の質的な差と考えることも可能であろう。

結 言

1) 日本脳炎ウイルス抗原の抽出, 精製に Fluorocarbon (Daifron 113) 処置と塩化セシウム密度勾配遠心法を併用し好結果を得た. 本法で得られた抗原は HA および CF 抗原としてのみならず免疫原としても有用である.

2) Tween 80 は業室保存の中山株の HA 活性を高めるが JaGAR 株のそれを抑制するという特異な影響を与える. このような現象は Fluorocarbon 抽出抗原のみにみられ, Aceton-Ether 抗原では両株ともその HA 活性は抑制された.

3) この Tween 80 の HA 活性に及ぼす特異な影響は日本脳炎流行期の蚊から分離された野生株でもみられ, 17株中13株までは JaGAR 株と同様な態度を示し, 残りの4株は特に影響を受けなかった.

4) Tween 80 は日本脳炎ウイルスの CF 活性には影響を与えないがウイルスの感染性を失わしめる.

5) 交叉血球凝集抑制実験では Fluorocarbon 抽出抗原, Tween 80 処置抗原とも Aceton-Ether 抽出抗原と平行した成績が得られた. JaGAR株は抗中山株血清に自原血清と同程度の高い阻止価を示すが, 中山株は抗 JaGAR 株血清において著しく低い阻止価が得られた. この所見は密度勾配遠心分画でも認められ, 中山株の血球凝集素とJaGAR株のそれとの間に質的な差があることを推定させる.

稿を終るに当り福見教授の御教示と御指導に感謝し, 本研究に関する直接の御指導, 御校閲を得た林助教授並びに御校閲の労を賜った当大学医学部細菌学教室青木教授に深甚の謝意を表します.

文 献

1) **Clark, D. H. and Cassals, J.** : Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-born viruses. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, **7** : 561-573, 1958.

2) **Dold, H. and Northrop, R.** : The nonspecific inhibitors of rubella virus hemagglutination. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **128** : 577-581, 1968.

3) **Dold, H. J. and Northrop, R. L.** : Analysis of the diluents used for rubella virus hemagglutination and hemagglutination-inhibition test. *Appl. Microbiol.*, **18** : 221-227, 1969.

4) **Gessler, A. E., Blender, C. E. and Parkinson, M. C.** : Animal viruses isolated by fluorocarbon emulsification. *Trans., N. Y. Acad. Sci.* **18** : 707-716, 1956.

5) **Girardi, A. J.** : The use of fluorocarbon for unmasking polyoma virus hemagglutinin. *Virol.*, **9** : 488-489, 1959.

6) **Hamparian, V. V., Muller, F. and Hummular, K.** : Elimination of nonspecific components from viral antigens by fluorocarbon. *J. Immunol.*, **80** : 468-475, 1958.

7) **Hummular, K. and Ketler, A.** : Dissociation of polymelitis virus from neutralizing antibody. *Virol.*, **6** : 297-299, 1958.

8) **Nishimura, C. and Kitaoka, M.** : Purification of Japanese encephalitis virus and its antigenic particles from infected suckling mouse brains. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, **17** : 295-305, 1964.

9) **Nishimura, C., Nomura, M. and Kitaoka, M.** : Comparative studies on the structures and properties of two selected strains of Japanese encephalitis virus. *J. Jap. Med. Sci. Biol.*, **21** : 1-10, 1968.

10) **Kitaoka, M. and Nishimura, C.** : Non-infectious hemagglutinating and complement-fixing components in suckling mouse brains infected with Japanese encephalitis virus. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, **18** : 177-187, 1965.

11) **西山昭典, 山口寿七男** : 日本脳炎ウイルスの血球凝集反応に関する研究 (第1報) 久留米医学会誌, **27** : 115-121, 1964.

12) **Norrby, E.** : Hemagglutination by measles virus. (4) A simple procedure for production of high potency antigen for hemagglutination-inhibition (HI) test. *proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **111** : 814-818, 1962.

13) **Okuno, T., Okada, A., Kondo, M.** : Strains of Japanese encephalitis viruses by antibody absorption, hemagglutination, and complement

fixing tests. Bull. Wld. Helth. Org., **38** : 547-563, **1968**.

14) **Parisuis, W.** and **Macmorine, H. G.** : Effects of tween 80 and freon 113 on measles-virus. Appl. Microbiol., **17** : 379-383, **1969**.

15) **Porterfield, J. S.** : Hemagglutination for arboviruses by Willams, M. C. et al. Erst African Virus Research Institute Report (1959-1960) pp. 50, **1960**

16) **Rott, R.** and **Schafer, W.** : Fine structure

of subunits isolated from new castle disease virus. Virol., **14** : 298-299, **1961**.

17) **Russell, W. C., Hayashi, K., Sanderson, J.,** and **pereira, H. G.** : Adenovirus antigen-A study of their properties and sequential development in infection. J. Gen. Virol., **1** : 396-507, **1967**.

18) **竹原学** : Arbo ウイルスの化学的性状に関する研究 第1報, 日本脳炎ウイルスの部分精製, ウイルス, **12** : 226-231, **1962**.