秋田県衛生科学研究所報　№24. 101～103 (1980)

水性二層分配法（ポリエチレングリコールとデキストランサルフェートナトリウム）を用いたエコー9ウイルスの分配組成系の比較検討について

原田誠三郎*　佐藤宏康*　高山和子*
高橋久美子*　森田盛大*

I　はじめに

現在，ウイルスの精製法として用いられているものには，沈澱法，溶媒間の分配を用いる方法，吸着材を用いる方法及び超遠心分離による方法[1]などがある。しかし，これらの各方法は目的とするウイルスの物理化学的因子及び生物学的特性などによって，おのずから制約されるのが常である。特に，今回我々がＰＨＡ用抗原として精製するエコー９ウイルス（Ｅ－９）のような小型ウイルス粒子の場合は，大量のウイルス培養液を出発材料とすることから，精製法がある程度限定せざるを得ない。このようなことから，ウイルス活性の保持及び操作の簡便性などを備え，しかも大量のウイルス液を短時間に効果的に濃縮することが可能である溶媒間の分配を利用した水性二層分配法[2][3]（ポリエチレングリコールとデキストランサルフェートナトリウム：PEG－Ds）を濃縮精製過程の一手法として用い，効率よくウイルスを回収することができたので，その成績について報告する。

II　実験材料及び実験方法

A．実験材料

1.　ウイルス液の調製

濃縮精製出発材料のウイルス培養液は，500 mℓルー氏瓶にfull sheetしたJINET細胞にＥ－9を接種して調製した。即ち，－ＰＢＳで２回洗浄後，種ウイルスのＥ－９液３mℓ（感染価10ＴＣD_{50}／mℓ）を接種し，37℃で１時間吸着後，－ＰＢＳで１回洗浄次いで，血清未添加ＭＥＭ液40mℓを加えて，37℃で静置培養した。翌日ＣＰＥが最高に達した時に回収し－20℃に凍結保存した。さらに，このようにストックしたものを更にドライアイスとアルコールで１回凍結融解を行い，次いで，7000rpm 20分間の遠心した上清を出発材料として用いた。

2.　試薬の調製

30％（w/w）ポリエチレングリコール（30％ＰＥＧ）と20％（w/w）デキストランサルフェートナトリウム（20％Ds）の試薬の調製は，PHILIPSONらの方法[4]に準じて行った。なお，ＰＥＧ及びDsは半井製薬株式会社製のものを使用した。

B．実験方法

最初の分配組成系の比較検討実験には，塩化ナトリウムで0.3 Mに調製したＥ－９液50mℓを分液ロート（200 mℓ）に入れた後，30％ＰＥＧと20％Dsの両水溶性ポリマー溶液を表１の各組成系を形成するように加えた。共栓をした後，同分液ロートを約50回反転撹拌してから４℃に一夜静置した。分配形成がみられた各系については，上下層液をそれぞれ採取し，ウイルスの感染価をMicro法[5]で測定し，感染価と分配量から回収率を算出した。

なお，デキストランサルフェートナトリウムの除去には，３MKCIを用いて行った。

III　実験成績

表１及び表２に示した25組のＰＥＧ－Ds系の分配形成の有無をみると，上下層間に液量の差はみられるが全ての系に分配形成がみられた。ＰＥＧ系の５％から5.2％とDs系の３％の組成系の範囲では，ウイルスが100％回収されていた。さらに，詳細に比較検討するために50 mℓのスケールで，５％から5.6％のＰＥＧ系と2.6％から３％のDs系の組成系を作成して分配処理を行った結果，表３の成績が得られた。即ち，全ての系で分配形成がみられたが，下層液のウイルス感染価は上層液よりもすべて高い値を示し，ＰＥＧ５％－Ds３％の系の90％のウイルス回収率が最も高かった。以上の２回の結果を総合すると，ＰＥＧ５％－Ds３％の系の平均回収率が95％と最も高率であった。さらに，出発材料を700 mℓにスケールアップして，同じ組成系で３回の分配実験を行った結果，表４に示す如くであった。分配形成された感染価測定は，下層液が上層液よりも高い値を示し，また，回収率は平均90％（71.4～100％）で，ほぼ再現性のある成績が得られた。

* 秋田県衛生科学研究所

表1. エコー9ウイルス液の各分配組成系の比較

PEG(%)−Ds(%) 分配系	分配形成	ウイルス力価 (TCID50/0.025ml)	使用エコー9ウイルス回収率(%)
4.4 − 3	+	1.3 × 10^{6}	8.1
4.6 − 3	+	1.2 × $10^{6.5}$	24
4.8 − 3	+	1.3 × 10^{6}	8.1
5 − 3	+	1.6 × 10^{7}	100
5.2 − 3	+	1.6 × $10^{7.5}$	100
4.4 − 3.2	+	1.6 × 10^{6}	10
4.6 − 3.2	+	5.4 × $10^{6.5}$ *	100
4.8 − 3.2	+	5.5 × 10^{6} *	34.4
5 − 3.2	+	5.6 × $10^{6.5}$ *	100
5.2 − 3.2	+	1.6 × $10^{6.5}$	32
4.4 − 3.4	+	1.4 × $10^{6.5}$	28
4.6 − 3.4	+	1.3 × $10^{6.5}$	26
4.8 − 3.4	+	1.3 × $10^{6.5}$	26
5 − 3.4	+	1.3 × 10^{7}	81.3
5.2 − 3.4	+	1.2 × 10^{7}	75
4.4 − 3.6	+	1.5 × 10^{6}	9.4
4.6 − 3.6	+	1.5 × $10^{6.5}$	30
4.8 − 3.6	+	1.5 × 10^{6}	9.4
5 − 3.6	+	5.4 × $10^{6.5}$ *	100
5.2 − 3.6	+	5.6 × 10^{6} *	35
4.4 − 3.8	+	5.3 × $10^{6.5}$ *	100
4.6 − 3.8	+	5.2 × $10^{5.5}$ *	10.4
4.8 − 3.8	+	5.4 × 10^{6} *	33.8
5 − 3.8	+	5.5 × $10^{6.5}$ *	100
5.2 − 3.8	+	1.4 × 10^{7}	87.5

* ウイルス力価が下層液より上層液の方が高いもの

Ⅳ 考 察

水性二層分配法（PEG−Ds系）を用いたウイルス分配実験としては，すでに，エコーウイルス7型，19型及びアデノウイルス2型などについて行なった成績がPHILIPSONらによって報告[6]されている。しかし，同じエンテロウイルスの濃縮でも，ウイルスの種類や用いる組成系によって分配効率に差があることが示唆されたので，著者らはE−9粒子を濃縮するにあたり，まず，ウイルス回収率を指標として，最も高い回収率を示す組成系を求め各PEG−Ds組成系の分配効率を比較検討したのである。その結果，PEG 5%−Ds 3%とPEG5.2%−Ds 3%の両系のウイルス回収率が100%と最も高いことがわかった。そこで，この前後の組成系を更に小きざみに検討したところ，PEG 5%−Ds 3%の系が最も高

表2. エコー9ウイルス液の各分配組成系のE−9ウイルス回収率の比較

PEG(%) \ Ds(%)	3	3.2	3.4	3.6	3.8
4.4	8.1 *	10	28	9.4	
4.6	24	**	26	30	
4.8	8.1		26	9.4	
5	100		81.3		
5.2	100	32	75		87.5

* 回収率 **分配時のウイルス力価が下層液より上層液の方が高かったもの

表3. エコー9ウイルス液の各分配組成系の比較

PEG(%)−Ds(%) 分配系	分配形成	ウイルス力価 (TCID50/0.025ml)	使用エコー9ウイルス回収率(%)
5 − 2.6	+	1.2 × $10^{7.5}$	24
5.2 − 2.6	+	1.2 × 10^{7}	7.5
5.4 − 2.6	+	1.1 × $10^{7.5}$	22
5.6 − 2.6	+	1 × $10^{7.5}$	20
5 − 2.8	+	1.2 × $10^{7.5}$	25
5.2 − 2.8	+	9.5 × 10^{6}	6.2
5.4 − 2.8	+	1.1 × $10^{7.5}$	22
5.6 − 2.8	+	1.1 × $10^{7.5}$	22
5 − 3	+	1.4 × 10^{8}	90
5.2 − 3	+	1.4 × $10^{7.5}$	28
5.4 − 3	+	1.4 × 10^{7}	8.8
5.6 − 3	+	1.3 × $10^{7.5}$	26

表4. エコー9ウイルス液の分配成績

PEG(%)−Ds(%) 分配系	分配形成	ウイルス力価 (TCID50/0.025ml)	使用エコー9ウイルス回収率(%)
5 − 3	+	5 × $10^{7.5}$	71.4
5 − 3	+	6 × 10^{8}	100
5 − 3	+	6 × 10^{8}	100

率であった。このことから，出発材料を50mlから700mlにスケールアップして実験を反復した結果，同様の成績が再現され，同組成系がE－9の精製法として最も適していることが確認されたのである。我々はこの方法によりE－9を濃縮精製し，次のPHA試験を検討していく考えである。

V まとめ

E－9液の濃縮精製過程の一手法として，水性二層分配法（ポリエチレングリコールとデキストランサルフェートナトリウム：PEG－Ds）を用いた結果，次の成績を得た。

1）E－9液50mlのスケールで分配を行った結果，PEG5％－Ds3％の組成系がウイルス平均回収率95％を示し最も高率であった。

2）さらに，出発材料を700mlにスケールアップして，同じ組成系で行った結果，回収率が平均90％でほぼ再現性のある成績が得られ，同組成系がE－9の精製法に最も適していることが確認された。

文　献

1）東昇，石田名香雄：ウイルス学，朝倉書店，505－517（1964）

2）L. PHILIPSON, P. Å. ALBERTSSON, AND G, FRICK：The Purification and Concentration of viruses by Aqueous Polymer phase Systems, VIROLOGY, 11, 553－571（1960）

3）P. Å. アルバートソン著／加藤好雄訳：水性二相分配法，東京大学出版会，（1972）

4）L. PHILIPSON, P. Å. ALBERTSSON, AND G, FRICK：The Purification and Concentration of viruses by Aqueous Polymer phase Systems, VIROLOGY, 11, 554（1960）

5）佐藤宏康たち：各種マイクロトレイ法の比較とその応用，臨床とウイルス，vol. 5 no. 4（1977－11）

6）L. PHILIPSON, P. Å. ALBERTSSON, AND G, FRICK：The Purification and Concentration of viruses by Aqueous Polymer phase Systems, VIROLOGY, 11, 553－571（1960）