



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	煙草モザイク病ウイルスに対する高周波、低周波及び直流の作用について
Author(s)	宮本, 雄一; MIYAMOYO, Yuichi; 福岡, 醇一 他
Citation	北海道大學農學部邦文紀要, 2(3), 77-85
Issue Date	1955-10-31
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/11595">https://hdl.handle.net/2115/11595</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	2(3)_p77-85.pdf



# 煙草モザイク病ウイルスに対する高周波、低周波 及び直流の作用について

宮本 雄一\*・福岡 醇一\*\*

Effect of high frequency, low frequency and direct  
current upon tobacco mosaic virus.

By

Yuichi MIYAMOTO and Junichi FUKUOKA

## I. 緒 言

ウイルスはさまざまな化学的処理によつて不活性化されると同様に、多くの物理的処理によつてもその病原性を奪われる。近年、ウイルスに対する種々の電磁波の作用に関する研究の進歩に伴い、ウイルス不活性化の過程の究明が試みられ更にこれがウイルス本体解明への足がかりとされている。中でも紫外線の影響あるいは X 線等の所謂 ionizing radiation の作用についての研究が多い。これらはウイルスの抗元性あるいは結晶性には影響を与えることなしに病原性のみを剝奪し得ることが知られている。他方において、ウイルスに対する高周波あるいはその他の電氣的処理の作用についての研究は殆ど見当らない。ただ、宮本等<sup>25)</sup>による馬鈴薯ウイルスに対する高周波処理の研究があるのみである。

筆者等は純化せる煙草モザイク病ウイルス(以下 TMV と略称する)に超短波、交流及び直流電流を作用せしめ、これらが TMV の病原性及び抗元性に与える影響について研究した。実験は 1953 年 4 月より 1954 年 3 月迄の間北海道大学農学部植物病理学教室及び同応用電気研究所において行つた。

本実験を行うに当り終始懇篤なる御指導と多大の便宜とを与えられた植物病理学教室富士貞吉教授に対し深厚なる謝意を表す。なお、電氣的処理を担当された応用電気研究所進藤善雄氏、有益な助言を戴いた植物病理学教室村山大記助教授に深謝する。

## II. 実験材料及び実験方法

供試ウイルスは純化せる TMV の水溶液である。純化は BAWDEN の記載した方法<sup>2)</sup>によつた。即ち TMV を感染させた煙草苗 (*Nicotiana tabacum* var. White Burley) の磨碎汁液に 250 g/l の硫酸アンモニウム添加による沈澱及び稀薄塩酸添加による等電点における沈澱と 3000 r.p.m. 30 分間の遠沈とを交互に反覆した。更に流水中及び蒸溜水中で夫々 24 時間透析した後蒸溜水を加えて最初の磨碎汁液量と同量にしこれを TMV 原液とした。この TMV 原液のウイルス蛋白濃度は精製過程により 0.2% と推定された。実験には TMV 原液と更に 10 倍に稀釈した溶液(推定濃度 0.02%) との両方を用いた。これら TMV 溶液の pH は 6.0~6.2 であつた。

本実験に使用した TMV 抗血清は純化 TMV を注射した家兎から得られた。即ち、前記 TMV 原液を家兎 1 頭につき 2 cc 兎耳周縁静脈内へ注入し 3~4 日間隔で 11 回の注射後、部分採血により免疫の力価を確認しその 10 日後に全採血を行い血清を分離して氷室内に凍結保存した。

使用した高周波は波長 5.0 m (周波数: 60 メガサイクル) の超短波であり、その発振器は強制空冷管 TR-594 A によるプッシュプル平行線型(出力 5 kW) である。処理に際し、極板の間に内径 1.9 cm、壁の厚さ 0.2 cm の正立方体のガラス容器をはさみその中に TMV 溶液を入れて照射した。照射中は常に極板の端子電圧を測定し、これに基づきガラスの誘電率を 5、TMV 溶液の誘電率を 80 として照射中の電界強度 (electric field intensity) を算出した。なお、常にガラス容器内に長さ 9 cm、直径 0.3 cm のアルコール寒暖計を挿入して上昇温度を測定した。処理を終えた試料は直ちに流水中に浸漬して冷却した。実験に用い

\* 北海道大学農学部植物病理学教室

\*\* 北海道大学応用電気研究所

た低周波電流は 50 サイクルの商用交流であり、研磨せる鉄板を上記のガラス容器の相対する内壁に密着せしめこれに電圧を加えて処理を行った。直流の処理も交流の場合と全く同様の方法で行われた。交流、直流何れの処理の場合も高周波処理におけると同様に端子電圧を測定して電界強度を算出し、又処理中の TMV 溶液の温度上昇を測定した。更にこれら電氣的処理の実験と平行して単なる高温処理の実験をも行つたが、この場合には TMV 溶液を両端にゴム栓をしたガラス細管に入れ所定の温度に保持された温湯中に入れて処理した後流水中で冷却した。

各種の処理を終えた試料を蒸留水で 4 倍に稀釈して病原性と抗元性のテストに使用した。感染力は *Nicotiana glutinosa* に対する半葉法による接種試験で調べた。抗元性のテストには沈降反応 (混合法)<sup>9)10)11)12)</sup>を用いた。即ち、内径 0.8 cm 長さ 8 cm の試験管を用い、これに予め所要の 2 倍の濃度に稀釈した抗血清を 0.5 cc 宛入れて置き次いで処理した TMV 溶液を 0.5 cc 宛注入し混和せしめた。抗血清の稀釈はすべて 0.85% の食塩水で行つた。混合した試験管を 37°C の温湯中に 2 時間浸漬した後沈澱の有無を記録した。更にそのまま低温室内に放置し翌日混合後 20 時間目に再び結果を調べた。

### III. 実験結果

実験は高周波、交流及び直流処理の影響を調べると同時に、これらと比較するために熱処理実験も行つた。

#### 1) 高周波処理

TMV 原液 (濃度 0.2%) に対して波長 5.0 m の超短波を電界強度 50~110 V/cm の範囲内で照射してその病原性及び抗元性に与える影響を調べた。照射はすべて試料の上昇温度及びその維持時間を基準として行い、すべての試料を 3 分以内に所要温度に迄高めるように電圧を調節した。従つて温度上昇期間には表に示されている電界強度より多少高い数字が時々現われた。照射前の材料の温度は 13°~15°C, pH は 6.0 であつた。照射により温度が 70°C 以上になると試料は幾分白濁した。処理を終えた試料を蒸留水で 4 倍に稀釈して接種試験と沈降反応を行つた。この結果を要約して表示すれば第 1 表及び第 2 表の通りである。沈降反応の結果は 37°C における 2 時間及び室温における 20 時間後に読み取つたものである。+ 及び - の印は沈降反応による羊毛状沈澱の有無及び程度を示し

た。抗血清の稀釈倍数はすべてウイルス溶液と混和後の最終濃度である。壊死斑点数は夫々 5 枚の葉の合計であり、分母は夫々の半葉の無処理のもの合計である。

80°C 乃至 90°C 以上に温度が上昇した試料による沈降反応においては、生ずる沈澱の性質が他の場合のそれと異り粉末状であつた。

#### 2) 低周波処理

TMV 10 倍稀釈液 (濃度 0.02%) に電界強度 100~150 V/cm の範囲内で周波数 50 サイクルの交流を通じ、この処理によつて TMV が如何なる影響を受けるかを調べた。処理の基準をすべて上昇温度及びその持続時間に置き、所要温度を一定時間保持する間の電圧、電流の動きを読み電圧から電界強度を算出した。試料に電流を通じてから 3 分以内に所要温度に達するように調節したのでその間、表示した電界強度以上の数字が時々示された。処理前の材料の温度は 20°C であり pH は 6.2 であつた。処理によつて温度が 70°C 以上になると試料はわずかに白濁した。処理を終えた試料を夫々蒸留水で 4 倍に稀釈して病原性及び抗元性のテストを行つた。これらの結果を第 3 表に要約表示した。この表に関する説明事項は第 1 表の場合と同様である。

処理の際の温度が 80°C 以上になると沈降反応における沈澱の性質が他のものと異り粉末状であつた。処理中に赤褐色の沈澱が多少現われたが蒸留水又は水道水のみを用いても同様の沈澱を生じたので、これは電気分解によつて極板の鉄から出た単なる水酸化第二鉄と思われる。

#### 3) 直流処理

TMV 10 倍稀釈液 (濃度 0.02%) に電界強度 120~180 V/cm の範囲内で直流を作用せしめ、この処理が TMV の病原性及び抗元性に与える影響を調べた。処理の基準は高周波あるいは低周波処理の場合と同様にすべて上昇温度とその持続時間に置いた。試料に電流を通じ 3 分以内に所要温度に達するように調節したのでその間には表に示されている電界強度以上の数字が時々現われた。処理開始前の材料の温度は 20°C であり pH は 6.2 であつた。処理によつて温度が 70°C 以上になつても高周波あるいは低周波処理の時のような白濁は殆ど見られなかつた。処理を終えた試料を夫々蒸留水で 4 倍に稀釈し病原性及び抗元性のテストに供した。これらの結果を第 4 表に要約表示した。この表に関する説明事項は第 1 表の場合と同様である。

**Table 1.** Effect of ultra-short waves (wave-length: 5.0 m) upon the pathogenicity and antigenicity of TMV (ca. 0.2%).

Temp. and duration of treatment	Electric field intensity (V/cm)	Grade of irradiated preparation	Time (hr.)*	Dilution of antiserum	Antigenicity**						Pathogenicity***	
					1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	Antigen control	Number of necrotic spots	Percentage of survival
60°C	10 min.	56~91	-	2/20	+++ +++	+++ +++	+++ +++	++ ++	± ±	- -	319/354	90.1
70°C	10 min.	91~110	+	2/20	+++ +++	+++ +++	+++ +++	++ ++	± ±	- -	388/392	98.9
80°C	10 min.	64~100	++	2/20	++ ++	++ ++	+ +	+ +	- ±	- -	16/317	5.0
90°C	10 min.	91~100	++	2/20	+ ++ <sup>Δ</sup>	+ ++ <sup>Δ</sup>	- + <sup>Δ</sup>	- ±	- -	- -	0/261	0
95°C	10 min.	91~100	++	2/20	+ ++ <sup>Δ</sup>	+ ++ <sup>Δ</sup>	+ + <sup>Δ</sup>	- + <sup>Δ</sup>	- ±	- -	0/455	0
Control	Not irradiated	-	2/20	+++ +++	+++ +++	+++ +++	++ ++	+ +	- -	- -		

\* Results of precipitin reaction were read after 2 hrs. in a water-bath at 37°C and after 20 hrs. at the room temperature.

\*\* + signs indicate the grade of precipitation. - signs indicate no precipitation. Dilution of antiserum shows the final concentration.

\*\*\* Number of necrotic spots: the numerator represents for the total number of spots produced on 5 leaves and the denominator those produced on control half-leaves.

Δ These precipitates were fine and not flocculent as in the other cases.

**Table 2.** Effect of ultra-short waves (wave-length: 5.0 m) upon the pathogenicity and antigenicity of TMV (ca. 0.2%).

Temp. and duration of treatment	Electric field intensity (V/cm)	Grade of irradiated preparation	Time (hr.)*	Dilution of antiserum	Antigenicity**						Pathogenicity***	
					1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	Antigen control	Number of necrotic spots	Percentage of survival
70°C	10 min.	91~100	+	2/20	+++ +++	+++ +++	++ ++	++ ++	± ±	- -	308/409	75.3
	20 min.	73~91	+	2/20	+++ +++	+++ +++	++ ++	++ ++	- ±	- -	662/689	96.0
	40 min.	56~91	++	2/20	+++ +++	+++ +++	++ ++	++ ++	- +	- -	472/666	70.8
	60 min.	56~91	++	2/20	+++ +++	+++ +++	++ ++	++ +	- +	- -	49/933	5.2
80°C	10 min.	58~91	++	2/20	++ ++ <sup>Δ</sup>	+ ++ <sup>Δ</sup>	+ + <sup>Δ</sup>	± + <sup>Δ</sup>	+ + <sup>Δ</sup>	- -	0/1091	0
	20 min.	58~91	++	2/20	++ ++ <sup>Δ</sup>	+ + <sup>Δ</sup>	- + <sup>Δ</sup>	- + <sup>Δ</sup>	- -	- -	2/1498	0.1
	40 min.	73~100	++	2/20	++ ++ <sup>Δ</sup>	+ + <sup>Δ</sup>	+ + <sup>Δ</sup>	± + <sup>Δ</sup>	- + <sup>Δ</sup>	- -	0/1105	0
	60 min.	61~100	++	2/20	++ ++ <sup>Δ</sup>	+ + <sup>Δ</sup>	+ + <sup>Δ</sup>	± + <sup>Δ</sup>	- + <sup>Δ</sup>	- -	0/667	0
Control	Not irradiated	-	2/20	+++ +++	+++ +++	+++ +++	++ ++	+ +	- -	- -		

\*, \*\*, \*\*\* For the explanation of the table, see the footnotes of Table 1.

Δ These precipitates were fine and not flocculent as in the other cases.

**Table 3.** Effect of alternating current (frequency: 50 c/s) upon the pathogenicity and antigenicity of TMV (ca. 0.02 %).

Temp. and duration of treatment	Electric field intensity (V/cm)	Grade of turbidity of treated preparation	Time (hr.)*	Dilution of antiserum	Antigenicity**						Pathogenicity***	
					1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	Antigen control	Number of necrotic spots	Percentage of survival
60°C	10 min.	105~110	-	2/20	++	++	+	±	-	-	196/414	47.3
	20 min.	105~110	-	2/20	++	++	+	+	±	-	110/343	32.0
70°C	10 min.	100~110	-	2/20	++	++	+	-	-	-	2/146	1.3
	20 min.	100~110	±	2/20	++	++	+	-	±	-	2/231	0.8
80°C	10 min.	121~131	±	2/20	±++ <sup>△</sup>	±+ <sup>△</sup>	+ <sup>△</sup>	-	-	-	0/129	0
	20 min.	121~131	+	2/20	±++ <sup>△</sup>	-+ <sup>△</sup>	+ <sup>△</sup>	±	±	-	0/132	0
90°C	10 min.	131~157	+	2/20	±++ <sup>△</sup>	-+ <sup>△</sup>	+ <sup>△</sup>	+ <sup>△</sup>	-	-	0/174	0
	20 min.	131~157	+	2/20	±++ <sup>△</sup>	±+ <sup>△</sup>	+ <sup>△</sup>	±	-	-	0/129	0
Control	Not treated	-	2/20	++	+	+	±	-	-			

\*, \*\*, \*\*\* For the explanation of the table, see the footnotes of Table 1.

△ These precipitates were fine and not flocculent as in the other cases.

**Table 4.** Effect of direct current upon the pathogenicity and antigenicity of TMV (ca. 0.02 %).

Temp. and duration of treatment	Electric field intensity (V/cm)	Grade of turbidity of treated preparation	Time (hr.)*	Dilution of antiserum	Antigenicity**						Pathogenicity***	
					1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	Antigen control	Number of necrotic spots	Percentage of survival
60°C	10 min.	157~184	-	2/20	-	-	-	-	-	-	0/159	0
	20 min.	157~184	-	2/20	-	-	-	-	-	-	0/154	0
70°C	10 min.	152~173	-	2/20	-	-	-	-	-	-	0/ 89	0
	20 min.	152~173	-	2/20	-	-	-	-	-	-	0/190	0
80°C	10 min.	136~157	±	2/20	-	-	-	-	-	-	0/ 41	0
	20 min.	136~157	±	2/20	-	-	-	-	-	-	0/ 75	0
90°C	10 min.	126~157	±	2/20	-	-	-	-	-	-	0/189	0
	20 min.	126~157	±	2/20	-	-	-	-	-	-	0/ 31	0
Control	Not treated	-	2/20	++	+	+	±	-	-			

\*, \*\*, \*\*\* For the explanation of the table, see the footnotes of Table 1.

処理中に赤褐色の沈澱が多少現われその量は交流処理の時よりも多かつた。蒸溜水又は水道水のみを用いて実験しても同様な沈澱を生じたのでこれは電気分解によつて極板の鉄から析出された単なる水酸化第二鉄と思われる。

#### 4) 高温処理

高周波、低周波及び直流の処理の結果と比較するために単なる熱処理を行い、処理後の TMV の病原性と抗原性を調べた。この場合に用いた材料は TMV 原液 (濃度 0.2%) でありガラス細管に封じて所要温度に 10 分間暴露した後流水中で冷却した。処理の際の試

料の pH は 6.0 であつた。処理温度は 80°, 85°, 90° 及び 95°C であるが処理により試料が白濁するので 10000 r.p.m. 30 分間の遠沈による沈澱物除去後のテストをも併せ試みた。処理を終えた試料を蒸溜水で 4 倍に稀釈し感染力及び抗原性のテストに供した。処理後遠沈を行わない場合の結果を第 5 表に示し、遠沈を行つた後に調べた結果を第 6 表に示した。なお、これらの表に示された異常沈澱を生ずる抗原性が抗血清に対して特異的なものであるや否やを確めるために正常な兎の血清を同様に稀釈して 95°C 処理及び遠沈を行つた試料との沈降反応を行つた。この結果は第 7

Table 5. Effect of high temperatures upon the pathogenicity and antigenicity of TMV (ca. 0.2%).

Temp. and duration of treatment	Grade of turbidity of treated preparation	Time (hr.)*	Dilution of antiserum	Antigenicity**					Pathogenicity***			
				1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	Antigen control	Number of necrotic spots	Percentage of survival	
80°C	10 min.	+	2 20	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+	-	11/306	3.5
85°C	10 min.	++	2 20	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+	-	0/295	0
90°C	10 min.	++	2 20	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+	-	0/186	0
95°C	10 min.	++	2 20	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+	-	0/203	0
Control	-	-	2 20	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+	-	-	-

\*, \*\*, \*\*\* For the explanation of the table, see the footnotes of Table 1.

△ These precipitates were fine and not flocculent as in the other cases.

Table 6. The pathogenicity and antigenicity of TMV (ca. 0.2%) exposed to high temperatures.

Temp. and duration of treatment	Grade of turbidity of treated preparation	Time (hr.)*	Dilution of antiserum	Antigenicity**					Pathogenicity***			
				1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	Antigen control	Number of necrotic spots	Percentage of survival	
80°C	10 min.	+	2 20	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+	-	25/ 53	47.1
85°C	10 min.	++	2 20	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+	-	0/101	0
90°C	10 min.	++	2 20	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+	-	0/ 98	0
95°C	10 min.	++	2 20	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+	-	0/120	0
Control	-	-	2 20	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+	-	-	-

All heated preparations were centrifuged at 10000 r.p.m. for 30 min. and the supernatant fluids were used for tests.

\*, \*\*, \*\*\* For the explanation of the table, see the footnotes of table 1.

△ These precipitates were fine and not flocculent as in the other cases.

Table 7. Precipitation test of heated TMV (ca. 0.2%) with normal serum.

Virus preparation	Dilution of normal serum		1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	Antigen control
	Time (hr.)*							
Heated at 95°C for 10 min. and centrifuged at 10000 r.p.m. for 30 min.	2	20	-	- <sup>△</sup>	-	-	-	-
	20	20	+△	+△	±	-	-	-
Control	2	20	-	-	-	-	-	-
	20	20	-	-	-	-	-	-

\* Readings were made after 2 hrs. and 20 hrs.

△ These precipitates were fine and not flocculent.

表の通りである。85°C以上の温度で処理した試料はどれも血清反応における沈澱の状態が他のものあるいは無処理の羊毛状沈澱と異り粉末状であった。80°C処理の場合にはこの両方の沈澱が認められることがあった。これらの表に関する説明事項は第1表のそれと同様である。

#### IV. 考察及び結論

ウイルスが多くの物理化学的処理によつて不活性化されることは古くから報告されているが、不活性化を引き起す過程については未だ明瞭な解釈がない。ウイルスが蛋白質より成ることが判明して以来これら病原蛋白質の分析化学的研究と同時に、精製せるウイルス蛋白質の物理化学的処理によつてウイルスの病原性、抗原性あるいは結晶性の変化が研究された。ある種の物理化学的処理を行うとウイルスの感染力は失われるが、血清反応あるいは結晶性は変化をうけない。これらの事実はウイルスの抗原性と結晶性との関係はその各々と病原性とのつながりよりも一層密接であることを示している。故にこれらの性質をも破壊するためにはウイルス粒子の破壊あるいは、少くとも病原性の破壊より以上の本質的な変化を粒子に与えることが必要である。TMVに対しては、X線、紫外線、超音波、フォルムアルデヒド、過酸化水素、亜硝酸、硝酸ウラニウム等の処理がこのウイルスの抗原性あるいは結晶性を破壊せずに感染力のみを奪い得ることが知られている<sup>21) 22) 23) 24) 25) 26) 27) 28) 29) 30) 31) 32) 33) 34) 35) 36) 37) 38) 39) 40) 41) 42) 43) 44) 45) 46) 47) 48) 49) 50) 51) 52) 53) 54) 55) 56) 57) 58) 59) 60) 61) 62) 63) 64) 65) 66) 67) 68) 69) 70) 71) 72) 73) 74) 75) 76) 77) 78) 79) 80) 81) 82) 83) 84) 85) 86) 87) 88) 89) 90) 91) 92) 93) 94) 95) 96) 97) 98) 99) 100)</sup>。

筆者等は TMV に高周波、低周波電流及び直流を作用せしめ、これらの処理がウイルスの病原性と抗原性に如何なる影響を与えるかを知るために実験を行った。特にこれらの影響が熱作用のみであるか否かを確かめるために単なる熱処理の実験をも併せ行つてこれらの関係に特に注意した。筆者等の知れる所では、バ

イラスに対するこれら超短波、交流あるいは直流等の処理の研究は全然見当たらない。ただ、宮本等<sup>23)</sup>による馬鈴薯ウイルスの高周波処理の研究があるのみである。この研究によれば葉捲病あるいは連葉モザイク病に冒されている馬鈴薯塊茎に対する短波(波長: 30.0 m)及び超短波(波長: 8.9 m, 36.0 cm, 9.8 cm)の10~80分処理は内部のウイルスに何等の影響を与えず、更に煙草汁液中の馬鈴薯Yウイルスに対する超短波(波長: 8.9 m, 36.0 cm, 9.8 cm)の10~80分処理も温度上昇がYウイルスの死滅温度以下の場合には全く影響を与えなかつた。結局、これらの高周波処理はこれらウイルスに対して単なる熱作用以外の何等の影響をも与えていないのである。筆者等はこの超短波をも含めた性質を異にする3つの電氣的処理を50~180 V/cmの電界強度で純化TMVに対して行つた。電界強度は2点間に働く電圧を距離で割つたもので V/cm で表わされ、何れの電氣的処理においても上昇温度と共に処理の手がかりにされた。これは従来のように電源又は真空管等の電圧あるいは電流を測定することよりも一層処理の基準として意義のあることがわかつたためである。

実験結果に示されているように、超短波を照射した試料及び単なる熱処理のみを行つたものは病原性、抗原性何れのテストにおいても全く同様の結果を示した。即ち、超短波処理を行つたものは温度上昇が80°C以内においてのみ *Nicotiana glutinosa* に対して感染力を有し(第1, 第2表)、熱処理を行つたものは85°C以上の温度ではこの植物に対して壊死斑点を1個も生じなかつた(第5, 第6表)。ここで問題になるのはこの場合の抗原性についてである。血清反応の結果は超短波処理(第1, 第2表)も熱処理(第5, 第6表)も大体同様であつたが、何れの場合においても病原性喪失後の試料による沈降反応の沈澱物が明かに

他の試料あるいは無処理のものの生ずるそれと違うのである。即ち、沈降反応において示される沈澱物は通常 flocculent precipitate と呼ばれ綿状の沈澱であるがこの場合のものは完全な粉末状でありあたかも白濁した溶液の自然沈澱のように見えるのである。何れの表にも示されているように温度が 70°C 以上になると処理液は多少白濁する。かかる処理液は自然には殆ど沈澱しないが 10000 r.p.m. で 30 分間遠沈するとわずかに白色沈澱を生ずるので、その上澄液を用いて同様に沈降反応を行うと生ずる沈澱量は多少減ずる傾向を示すけれども殆ど前と同様に抗血清の濃度に比例して反応する(第6表)。更にこの遠沈後の上澄液と正常な兔の血清とで沈降反応を行うとわずかに反応を認めるが問題とする程の結果は示さない(第7表)。即ち、これら異常な沈澱物も TMV 抗血清に対して特異的に結合する能力を有することがわかった。従来の研究<sup>7)8)4)13)25)</sup>によれば熱処理による病原性と抗元性の離反はトマト萎縮病や煙草葉捲縮等のウイルスに認められているが TMV や馬鈴薯 X バイラスには認められず単に病原性よりも多少遅れて抗元性が失われるだけである。他方、日高等<sup>14)</sup>は TMV の熱処理の結果として病原性の減少とは反対に抗元性が増加すると報告している。この問題について筆者等の実験の結果わかったことは次の通りである。処理液は感染力が失われる頃から白濁し始め 10000 r.p.m. 30 分間の遠沈によつて多少の白色沈澱を分離出来るが不完全である。この上澄液は抗血清と特異的に反応するが生ずる沈澱は粉末状で通常の沈澱と大いに異り、沈降反応における沈澱の量に比例してその試験管内の透明度が増すのである。この場合血清反応を行う前に遠沈による沈澱の分離を更に完全にすれば沈降反応における沈澱量が少くなる傾向も認められた。従つて処理の温度に比例して抗元性が増加するという現象は本実験においては全く認められなかつた。従来、X線、紫外線及び超音波等で処理するとウイルスの短小粒子が増加し、これと同時に抗元性も増進することが報告されている<sup>19)14)26)24)</sup>。しかし熱処理による短小粒子の増加は、本実験及び従来の熱処理に関する報告<sup>7)8)4)13)25)</sup>を考え合わせると、上記の諸処理の場合と同様には考えられぬように思われる。

交流で処理した試料は超短波あるいは熱処理の場合と同様の結果を示したが病原性は処理による温度上昇が 70°C でわずかに認められるのみで 80°C では全く認められなかつた(第3表)。直流で処理した試料

を用いたテストではその温度上昇が 60°C において既に病原性、抗元性共に完全に失われていた(第4表)。交流処理においてウイルスの不活性化温度が超短波処理あるいは熱処理の場合よりも低いことから、この低周波電流による影響の中には熱作用の外に電気分解の作用も含まれているように思われる。直流は上昇温度には全く無関係に電気分解作用のみによつて TMV の病原性、抗元性を破壊したものと想像される。商用交流にも多少の電気分解作用があり、直流は最もその傾向が大である事実を併せ考えると、これらの解釈は妥当と思われる。但しここに付加えねばならぬことは、処理に使用した極板は白金板ではなくて鉄板であることである。高周波の場合は極板はガラス容器の外であるから問題はないが、低周波及び直流処理の時には直接鉄イオンが試料中に出ることは否定できない。鉄を選んだのはそのイオンの影響が他の金属のそれに比べて少いと思われたからであるが、処理に際し特に直流処理の場合には鉄の電気分解産物と思われる水酸化第二鉄の沈澱を多少認めた。

現在、高周波の影響は主としてその特殊な熱作用にあると言われている。特に最近では frequency selective heating あるいは Punktwärme といわれる現象、即ち不均質系中のある媒質を特に著しく加熱し得る周波数が存在する事実が明かにされた。併し筆者等の実験及び宮本等<sup>20)</sup>の研究を併せ考えて、現在使用されている cm 波以上の波長の超短波ではウイルスを選択的に加熱不活性化することは極めて困難であり普通の高温処理の域を出ないことがわかつた。極超短波の研究が進歩している現在、mm 波以下のむしろ赤外波に近い波長の高周波使用が可能となれば紫外線照射の影響<sup>22)1)15)21)17)23)25)29)</sup>あるいは X 線等の ionizing radiation<sup>18)16)20)27)28)</sup>がウイルスの病原性、結晶性及び抗元性に与える結果と類似の影響を期待し得るように思われる。一般に、電気的作用は高周波から低周波更に直流になると同時にその主な作用が熱作用から電気分解作用へと移行することが知られている。本実験の結果ウイルスに対しても全く同様にこの事実を適用し得ることがわかつた。即ち、TMV に対する高周波処理は全くの熱影響のみを与え、低周波処理では熱作用と多少の電気分解の影響が認められ、更に直流処理においてはその電気分解の作用のみによつて容易にその病原性及び抗元性が破壊されるのである。

## V. 摘 要

純化した TMV を波長 5 m (周波数: 60 メガサイクル) の超短波, 交流 (周波数: 50 サイクル) 及び直流で処理しこのバイラスの病原性及び抗原性に与える影響について研究した。バイラスの感染力は *Nicotiana glutinosa* への半葉法による接種試験で調べ, 抗原性のテストには沈降反応 (混合法) を用いた。

超短波処理は単なる熱処理と全く同様な結果を示した。即ちこれら処理を受けた TMV は 80°C 10 分迄は感染力を有したがそれ以上では何れの場合も感染力を失つて居り, 抗原性は 90°C 以上でも依然認められた。但しこの場合の沈降反応における沈澱は, 80°C 以上の温度に曝されたものは他の羊毛状沈澱と異り粉末状沈澱であつた。

交流による処理の結果は超短波あるいは熱処理の場合と殆ど同様であつたが, 病原性を喪失する温度がそれらの場合より 10°C 低く電気分解の影響が多少認められた。

直流で TMV 溶液を処理すると, 処理による温度上昇には殆ど無関係に, 容易にその病原性及び抗原性を失つた。これは直流の強い電気分解作用によるものと思われる。

## 引用文献

- 1) ARTHUR, J.M. & J.M. MEWELL: The killing of plant tissue and the inactivation of tobacco mosaic virus by ultra-violet radiation. *Amer. Jour. Bot.*, 16: 338-353, 1929.
- 2) BAWDEN, F. C.: *Plant viruses and virus diseases*. 3rd ed. Waltham, p. 172, 1950.
- 3) ———: *Ibid.*, p. 248.
- 4) ———: *Ibid.*, p. 253.
- 5) BAWDEN, F. C. & A. KLECZKOWSKI: The behaviour of some plant viruses after exposure to ultraviolet radiation. *Jour. Gen. Microbiol.*, 8: 145-156, 1953.
- 6) BAWDEN, F.C. & N.W. PIRIE: The isolation and some properties of liquid crystalline substances from solanaceous plants infected with three strains of tobacco mosaic virus. *Proc. Roy. Soc. London*, 123: 274-320, 1937.
- 7) ——— & ———: Liquid crystalline preparations of potato virus 'X'. *Brit. Jour. Exp. Path.*, 19: 66-82, 1938.
- 8) ——— & ———: Crystalline preparations of tomato bushy stunt virus. *Brit. Jour. Exp. Path.*, 19: 251-263, 1938.
- 9) CHESTER, K. S.: Serological evidence in the study of the relationships of certain plant viruses. (*Abst.*) *Phytop.*, 25: 10, 1935.
- 10) ———: Serological evidence in plant-virus classification. *Phytop.*, 25: 686-701, 1935.
- 11) ———: The antigenicity of the plant viruses. *Phytop.*, 25: 702-714, 1935.
- 12) ———: Serological studies of plant viruses. *Phytop.*, 27: 903-912, 1937.
- 13) 福士貞吉: 植物バイラス. 東京, 185-187 頁, 1952.
- 14) 日高醇・桐山清: タバコモザイク病バイラスの不活性化. 温度, 超音波, ホルマリン, ヨウシユヤマゴボウの葉よりの抽出物及びブクリンによる処理(I). *Virus*, 3: 39-50, 1953.
- 15) HOLLAENDER, A. & B.M. DUGGAR: Irradiation of plant viruses and of micro-organisms with monochromatic light. III. Resistance of the virus of typical tobacco mosaic and *Escherichia coli* to radiation from  $\lambda$  3000 to  $\lambda$  2250 Å. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 22: 19-24, 1936.
- 16) LEA, D. E.: *Actions of radiations on living cells*. London & New York, pp. 100-124, 1947.
- 17) ———: *Ibid.*, p. 124.
- 18) LEA, D.E. & K.M. SMITH: The inactivation of plant viruses by radiations. II. The relation between inactivation dose and size of virus. *Parasitol.*, 34: 227-237, 1942.
- 19) MALKIEL, S.: Immunochemical studies on tobacco mosaic virus. IV. The serological behavior of sonic treated tobacco mosaic virus. *Jour. Immunol.*, 57: 55-65, 1947.
- 20) 松井千秋: 紫外線による SP<sub>1</sub> バイラス (*Bact. solanacearum* phage  $\alpha$ ) の不活性化について. 九大・農・学芸雑誌, 12: 321-325, 1952.
- 21) MATSUMOTO, T. & K. SOMAZAWA: Immunological studies of mosaic diseases. I. Effect of formolization, trypsinization and heat

- inactivation on the antigenic properties of tobacco mosaic juice. *Jour. Soc. Trop. Agric.*, 2: 223-234, 1930.
- 22) MCKINLEY, E.B., R. FISHER & M. HOLDEN: Action of ultra-violet light upon bacteriophage and filterable viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 23: 408-412, 1926.
- 23) MIYAMOTO, Y.: Effect of uranium compounds upon tobacco mosaic virus. 柄内・福士両教授還暦記念論文集. 札幌, 323-331頁, 1955.
- 24) 宮本雄一: 煙草モザイク病ウイルスの病原性及び抗原性に対する紫外線の作用. *Virus*, 4: 256-263, 1954.
- 25) 宮本雄一・因藤寿: 馬鈴薯ウイルスに対する高周波の影響に就いて. *日植病報*, 15: 127-130, 1951.
- 26) 宮本雄一・河村文夫: タバコモザイク病ウイルスの病原性及び抗原性に対する X 線の影響. *日植病報*, 19: 53-57, 1954.
- 27) POLLARD, E. C.: The physics of viruses. New York, pp. 69-102, 1953.
- 28) ———: *Ibid.*, pp. 140-142.
- 29) ———: *Ibid.*, pp. 146-168.
- 30) POLLARD, E. & A.E. DIMOND: Properties of tobacco mosaic virus determined by its inactivation deuterons. (Abst.) *Phytop.*, 41: 659, 1951.
- 31) PRICE, W.C. & J.W. GOWEN: Quantitative studies of tobacco-mosaic virus inactivation by ultra-violet light. *Phytop.*, 27: 267-282, 1937.
- 32) STANLEY, W.M.: The inactivation of crystalline tobacco-mosaic virus protein. *Science*, 83: 626-627, 1936.
- 33) WYCKOFF, R. W. G., J. BISCOE & W. M. STANLEY: An ultracentrifugal analysis of the crystalline virus proteins isolated from plant diseased with different strains of tobacco-mosaic virus. *Jour. Biol. Chem.*, 117: 57-71, 1937.

### Résumé

The present work was performed in order to investigate the effect of ultra-short waves, alternating current and direct current upon

the pathogenicity and antigenicity of tobacco mosaic virus (TMV).

The virus preparation used in this work was the aqueous suspension of TMV which had been purified by Bawden's procedure. The pH of the virus preparations were 6.0~6.2 and the concentrations of TMV in the preparations 0.2 and 0.02%. The antiserum used was prepared by injecting rabbits with the purified TMV. The infectivity of the treated TMV was tested by the so-called half-leaf method on leaves of *Nicotiana glutinosa* plants. In serological tests of TMV, the precipitin reaction was used.

The frequencies of the ultra-short waves (wave-length: 5.0 m) and alternating current employed in this work were 60 megacycles per second and 50 cycles per second, respectively. In every test, the electric field intensity and the rise of temperature of the virus preparation were measured. On the other hand the effect of heat upon TMV was investigated.

The experimental results are summarized as follows:

- (1) The results of exposure of TMV to ultra-short waves resembled those of heat treatment of the virus (Tables 1, 2, 5, 6 and 7), the infectivity of TMV being retained when heated at 80°C for 10~20 min. in either case. The serological reaction of the virus was demonstrated even when heated at 90°C or 95°C for 10 min. in either experiment. In precipitin tests, however, the precipitates produced in the preparations exposed to temperatures above 80°C, being fine and not flocculent are apparently different from those induced by lower temperatures.
- (2) The results of treatment of the virus with the alternating current were similar to those of exposure of the virus to ultra-short waves or high temperatures (Table 3). The infectivity of TMV, however, was lost at temperatures higher than 70°C, and it seemed that the virus might have been subject to some electrolytic effect.
- (3) When the virus preparations were treated with direct current, the infectivity and serological activity of TMV were completely destroyed even at temperature of 60°C for 10 min. (Table 4). This finding may indicate that the effect of direct current upon TMV is probably attributed to the action of electrolysis regardless of the rising temperature.