



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Tobacco Mosaic Virus の凍結又は凍結乾燥による粒子の長さと感染力の変化について
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 四方, 英四郎 他
Citation	低温科学. 生物篇, 18, 77-81
Issue Date	1960-11-04
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17642
Type	departmental bulletin paper
File Information	18_p77-81.pdf



凍結又は凍結乾燥による Tobacco Mosaic Virus の粒子の長さ及び感染力の変化について*

根井 外喜男
(低温科学研究所 医学部門)

四方 英四郎
(農学部 植物病理学教室)

(昭和 35 年 6 月受理)

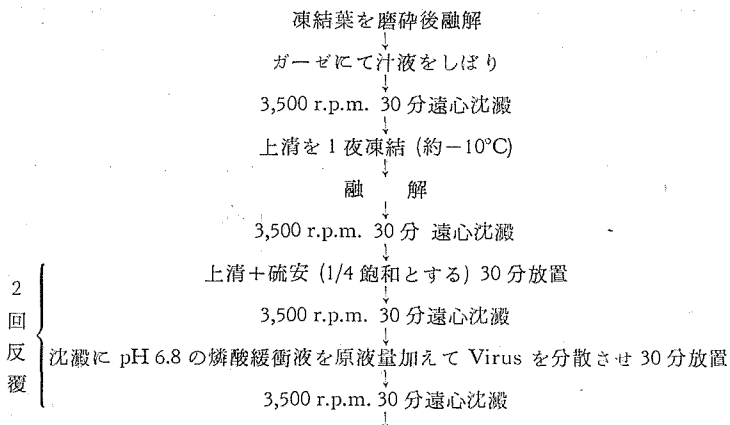
I. 緒 言

さきに著者等は, Tobacco Mosaic Virus (以下 TMV と略称) が, 凍結乾燥によつて幾つかの粒子に断裂することを確認し, そのような変化がおこる機構について種々検討を試みた¹⁾。

今回は更に, TMV の煙草葉への接種試験を実施し, 凍結又は凍結乾燥によつてそれぞれ感染力の低下することを認めたので, それが形態的な変化とどのような関連を示すかを明らかにしたいと考えて, 本実験を行なつた。

II. 実験方法

使用材料: TMV を *Nicotiana sylvestris* に接種して罹病させた葉を刈りとつて凍結保存しておく。これに pH 7.0 の磷酸緩衝液を加えて磨砕し, 10,000 r.p.m. 30 分遠心沈澱した上



* 北海道大学低温科学研究所業績 第 556 号

清を粗製液とし、更に前頁記載のような硫酸塩析及び等電点沈降をくりかえしたものを精製液として使用した。

凍結融解： 試料 0.5 cc (又は 1.0 cc) を径 2 cm の試験管にとり、 -30°C の低温室に放置して緩慢に凍結させたのち室温で融解させたもの、及び液体窒素中に浸して急速に凍結させたのち 20°C の温浴槽で急速に融解し、これを 5 回反覆したものである。

凍結乾燥： 試料 5cc をシャーレにとり、 -30°C の低温室に放置して凍結させたのち凍結乾燥の装置にとりつけて真空中で乾燥した。室温で凡そ 4 時間ほどを要し、乾燥終了後は蒸留水を元の量まで加えて再生した。

電子顕微鏡の観察： 前記のように処理した試料を 1 滴型の如くコロジウム膜を張つたメッシュにとり、室温で乾燥しパラジウムでシャドウをつけた。電子顕微鏡は JEM 4 型及び 4C 型を使用し、加速電圧 50 KV, 直接倍率凡そ 1 万倍で写真撮影した。

接種試験： 予め頂葉を切断して数葉を残した生育のほぼ同等な *Nicotiana glutinosa* に、半葉法によつて接種した。即ち葉表の半分は無処理液を、他の半分には処理液を接種し、生じた壞疽斑点を数えた。

なお本実験は 1956 年 7 月から 11 月にかけて行つたものである。

III. 実験成績

前記の条件で同一の実験をそれぞれ 5 回ずつくりかえして行つたが、中には技術的な失敗もあつて、3 例しか結果の得られない場合もあつた。ここでは大体の傾向を論ずることにして、平均値を以てあらわした。

1) 粗製液

第 1 表並びに Figure 1 に示すように、凍結又は乾燥の処理によつて、長い粒子 ($360\text{ m}\mu$ 以上のもの) は減少し、短かな粒子 ($240\text{ m}\mu$ 以下のもの) が増加している。これは凍結又は乾燥の結果、粒子が断裂したものと思われるが、粗製液では試料中のウィルス粒子の凝集する傾向が強かつたので、短粒子の%は実際よりやや少な目に現われているようである。その為か凍結融解の回数を重ねても余り大きな差はできなかつた。

第 1 表 各処理と粗製液中のウィルス粒子の長さ

処 理	粒子の長さ			
	0~120 $\text{m}\mu$ (%)	120~240 $\text{m}\mu$ (%)	240~360 $\text{m}\mu$ (%)	360 $\text{m}\mu$ 以上 (%)
無処理対照	11.8	11.4	41.3	35.5
凍結融解 1 回	17.3	12.4	56.8	14.4
凍結融解 5 回	17.1	17.4	46.6	19.1
凍結乾燥	18.3	18.4	47.9	15.8

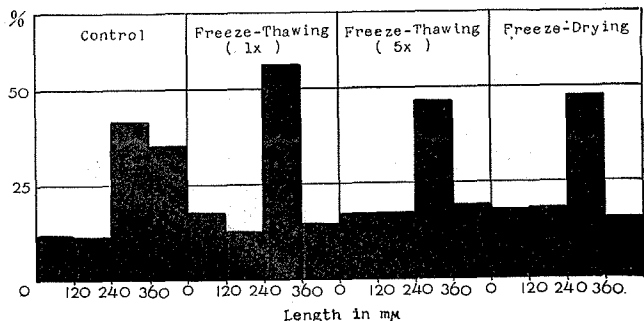


Figure 1. Size distribution of virus particles in the crude material freeze-thawed or freeze-dried.

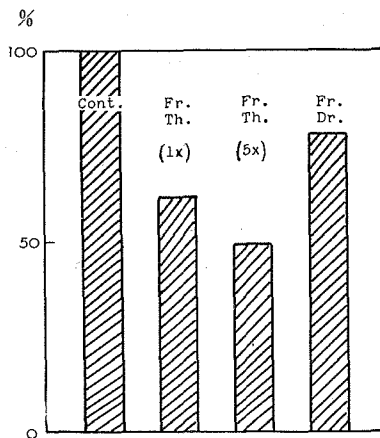


Figure 2. Infectivity of the crude material freeze-thawed or freeze-dried.

処理後の感染試験では、凍結乾燥、凍結融解1回、凍結融解5回の順に感染力の低下を示した (Figure 2)。

2) 精製液

第2表 各処理と精製液中のウィルス粒子の長さ

処理	粒子の長さ			
	0~120 m μ (%)	120~240 m μ (%)	240~360 m μ (%)	360 m μ 以上 (%)
無処理対照	6.8	11.9	67.9	13.6
凍結融解5回	43.3	27.3	27.7	2.0
凍結乾燥	41.3	21.8	36.6	0.5

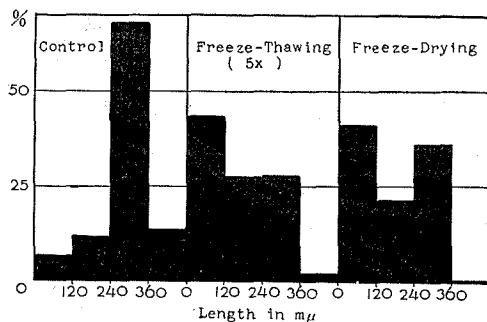


Figure 3. Size distribution of virus particles in the purified material freeze-thawed or freeze-dried.

まず粒子の大きさからみて、粗製液では 360 m μ 以上のものが 35% もあるのに、精製液でははるかに少なく、その代り 240~360 m μ もが多く全体の 2/3 を占めている。この試料を凍結融解或いは凍結乾燥すると、やはり長い粒子が少なくなつて、240 m μ 以下のもの、とりわ

け $120 \text{ m}\mu$ 以下の短粒子が非常に増してくる。粗製液に比較して短粒子の増加度の大きい点が特に目立っている。

但し感染力については、Figure 4 に示すように、粗製液の場合とほぼ大差のない傾向を示している。

以上の結果をもう一度要約してみると、凍結融解又は凍結乾燥の処理によつて、感染力は粗製液、精製液ともに同じ程度に低下するが、粒子の大きさでは精製液に短粒子が多く見られた。

IV. 考 察

TMV がいろいろの物理的或いは化学的因子によつて障害される時、一般に形態的变化に伴つて感染力にも影響をうけることが多い。本実験の結果でも大体に於いてその傾向を示しているが、両者の変化の程度は必ずしも平行していないようである。

いまウイルス粒子の大きさと感染力との関係について考えてみると、感染をおこす基本単位はほぼ $300 \text{ m}\mu$ 前後の粒子であつて、それより短かなものでは感染力はないが、一方それよりはるかに長いものであつても感染力は有するとみなされている

従つてここで扱つた粒子のうち $240 \sim 360 \text{ m}\mu$ と $360 \text{ m}\mu$ 以上とを合わせたものについてだけ感染力との関係が考えられるわけで、今粗製液についてみると、この2つを合わせたものの割合は、対照の 77% に対し、各処理によつて減つても精々 64% くらいでその変化は比較的僅かである。ところがこの粒子が示すと思われる感染力は、対照を 100% として凍融5回のもので 50% くらいになつており、大きさと感染力との関係は平行していない。また同じような立場で精製液についてしらべてみると、粗製液にくらべれば、両者はかなり近い値を示しているが、それでも凍結乾燥の例などでは、短粒子の増加した割合に比較して、感染力のほうがむしろ大きすぎるくらいで、粗製液とはかえつて逆の関係になつている。

まだ実験例数が少ないし、しかも個々の実験例での数値にかなりの変動があるので、定量的にはつきりしたことは云えないが、以上のような傾向から考えると、凍結や乾燥の処理をうけた試料では、ウイルス粒子が $240 \text{ m}\mu$ 以上あつても感染力をもたないもの(粗製液での例)或いは $240 \text{ m}\mu$ 以下の粒子をもつ試料でも感染性を示すもの(精製液での例)があるようにみえる。いずれにしてもこのような処理をうけて、ウイルス粒子に何らかの障害をきたした場合その形態的所見と感染性とは必ずしも一致するとは限らないのではなからうか。

なお精製液の成績で、凍結融解或いは凍結乾燥によつて、長い粒子が切れて短粒子に移行する割合は、前報¹⁾の結果とほぼ一致している。粗製液では、精製液よりも粒子の断裂は少ないが、これはウイルス自身の性質に差があるためか、メジウムの性状が異なるためかはわから

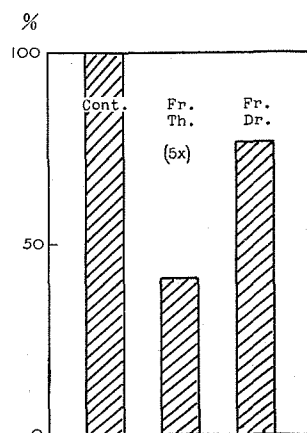


Figure 4. Infectivity of the purified material freeze-thawed or freeze-dried.

ない。

TMV は罹病葉のままならば乾燥に対して抵抗力は強いが、溶液にすると弱くなつて不活化されやすいという。また一般に植物ウィルスは凍結や乾燥によつて或いは不活化されるといふ或いは変化をうけないといふ、その成績は一定していないようである²⁾³⁾。しかし本実験の結果からは TMV は明らかに凍結融解又は凍結乾燥によつて形態的にも感染性にも変化をうけたものとみとめられる。

V. 結 論

TMV の粗製液と精製液とを凍結融解又は凍結乾燥した結果、次のような成績を得た。

- 1) これらの処理によつて、ウィルス粒子は短くなり、感染力は低下した。その程度は処理の種類によつて異なる。
- 2) 感染力の低下は粗製液と精製液とでほぼ等しいが、粒子の断裂は精製液に於いて著しい。
- 3) 長粒子が短粒子へ変わる割合と、感染力の変化の割合とが一致しないことから、これらの処理によつて TMV のうける形態的变化と感染力の変化とは必ずしも平行するものではないと考えられた。

文 献

- 1) 根井外喜男, 佐々木芳郎, 四方英四郎 1956 Tobacco Mosaic Virus の凍結乾燥による断裂について 低温科学, 生物篇, **14**, 75-85.
- 2) 福士貞吉 1952 植物バイラス. 初版 朝倉書店, 東京.
- 3) Bartels, W. 1955 Der gegenwärtige Stand der Forschung auf dem Gebiet der Inaktivierung pflanzenpathogener Viren, insbesondere des Tabakmosaikvirus. Phytopath. Z., **24**, 9-178.

Résumé

Crude or purified tobacco mosaic virus (TMV) solution used as experimental material was morphologically and in its infectivity affected by freeze-thawing or freeze-drying: the length of the virus was shortened, owing to the breaking of the virus into smaller particles by such low temperature treatment, and infectivity measured by inoculation to plant leaves was reduced to some extent.

The shortening in the virus length was manifested more markedly in the purified material than in the crude one, but percentage in inactivation was almost the same in both materials.

As a result of this study, it is concluded that there is no parallelism between virus length and infectivity in crude or purified TMV treated by freeze-thawing or freeze-drying.