狂犬病補体結合反応について

田 口 資 生 加 藤 喜 美 子
武 原 文 三 郎 瓜 生 一 郎

神奈川県衛生研究所 (所長 児玉 威)

[受付: 8月22日・1957年]

従来狂犬病の診断としては容疑動物脳の病理組織学的検査¹⁾, 即ち Negri 小体 (以下N小体と略す) の検索²⁾ と非化膿性脳炎像の有無, および狂犬病ウイルス分離試験, 即ちマウス脳内接種法³⁾ を用いた動物試験の2法が広く実施されていた。しかし容疑動物脳のN小体を発見する方法は相当の手技と時間を要し, 狂犬病動物であっても多くは材料の採取時期が早いため, 又はN小体を作りにくいもの等があるため100%にそれを検出できないのは周知の事実である。そのためN小体陰性所見は狂犬病を否定する診断とはならず, 一方非化膿性脳炎像は他の脳炎にも認められるから参考所見とはなってもその決め手とはならない。従つて狂犬病を診断するには, 早期にN小体を発見出来ない場合はウイルス分離を行い決定する以外に方法がなく, この方法も約14日前後³⁾ の長日数を必要とする欠点がある。

狂犬による咬傷部位が体の上部等の場合は発病迄の日数が短いので予防注射も緊急を要するが, 一方で注射後稀に発する後遺症に対して, これを避けるため真性狂犬病の咬傷以外には注射を控える必要もあり, そのため確実な早期診断が要望され補体結合反応 (以下C. F. T. と略す) が古くから研究^{4), 5)} された。Casals⁶⁾ は凍結融解法による脳炎の抗原調製を報じ, Casals および Palacios⁷⁾ は脳炎および狂犬病の C. F. T. の研究において脳浸出液を抗原とする場合に起る抗補体作用を除去するために2%モルモット血清加食塩水を溶媒として用い目的を達した。又安東等^{8), 9)} は抗原の改良, 非特異性反応の除去, 反応時間の短縮等を行つて, 狂犬病 C. F. T. の実際の診断法を確立した。

流行していた神奈川県下の狂犬病¹⁰⁾ も1950年の126例を最高として漸時減少し最近はその発生を見ない。そこで上記2検査法に加えてC. F. T. を実施したので, 各診断法とC. F. T. との成績の比較およびC. F. T. において得た2, 3の知見について記述する。

試験材料及び検査方法

本試験に用いた容疑動物脳は114例であり, これ等は疑似狂犬病犬 (稀に猫) として当所に送付されたもので臨床的に疑似狂犬病症状を認めたため処分 (薬殺) したもののか, あるいは自然斃死したものである。

病理組織学的検査およびウイルス分離試験は厚生省衛生検査指針¹⁾ に準じて行い, C. F. T. は安東等^{8), 9)} の方法を用いた。

試験成績

C. F. T. 実施の114例の成績は第1表および第2表に示した。第1表の如く3法とも一致した例数は陽性18例, 陰性88例, 計106例であり試験例数の大多数において成績は一致した。

N小体検索成績とウイルス分離試験の成績とは必ずしも一致するものではないが, 従来からの検索法において確定的最終判定とされているウイルス分離試験とC. F. T. とを比較するに, よくその成績は一致し, ウイルス分離試験が

第1表 各検査法成績

ウイルス分離	N小体	C.F.T.	例数	合	計
+	+	+	16 2	18	114
	-	+	2 2	4	
-	-	+	3	3	
	-	-	88 1	89	

TAGUCHI Moto, KATO Kimiko, TAKEHARA Bunzaburo, URIU Ichiro: On the Complement Fixation Test of the Animals Suspected of Rabies. Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory. —Jap. J. of Bact., 12(11) 867—871, 1957.

第 2 表

No.	N 小 体	補 体 結 合 反 応										病 毒 分 離 定	綜 合 判 定		
		診断血清稀釈倍数						使用補体吟味						判 毒 合 分 判 定	
								NaCl水		抗原加					
		2	4	8	16	32	64* K	0.1	0.15	0.2	0.1				0.15
1	+	4	4	4	3	0	0	0					+	+	+
6	+	4	4	4	3	0	0	0					+	+	+
9	+	4	4	4	1	0	0	0	1	±	0		+	+	+
10	+	4	4	4	1	0	0	0	1	0	0		+	+	+
11	+	4	4	4	1	0	0	0	1	±	0		+	+	+
14	+	4	3	2	2	2	0	0	1	0	0		+	+	+
15	+	4	4	4	4	3	1	0	0	0	0		+	+	+
16	+	4	4	4	2	±	0	0	1	0	0		+	+	+
20	+	4	4	2	0	0	0	0	±	0	0		+	+	+
33	+	4	4	2	1	1	0	0	±	0	0	± 0 0	+	+	+
△34	+	4	4	4	2	0	0	0	±	0	0	2 1 0	+	+	+
38	+	4	4	1	±	0	0	0	0	0	0	± 0 0	+	+	+
39	+	3	3	2	0	0	0	0	±	0	0	1 0 0	+	+	+
42	+	1	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0 0	+	+	+
53	+	4	4	4	4	1	0	0	±	0	0	2 0 0	+	+	+
66	+	4	4	2	2	0	0	0	0	0	0	± 0 0	+	+	+
51	+	±	0	0	0	0	0	0	±	0	0	1 0 0	±	+	+
69	+	±	0	0	0	0	0	0	3	±	0	4 3 3	±	+	+
45	-	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0	1 0 0	+	+	+
49	-	2	2	±	0	0	0	0	1	0	0	2 ± 0	+	+	+
63	-	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	± 0 0	±	+	+
104	-	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	± 0 0	±	+	+

No.	N 小 体	補 体 結 合 反 応										病 毒 分 離 定	綜 合 判 定		
		診断血清稀釈倍数						使用補体吟味						判 毒 合 分 判 定	
								NaCl水		抗原加					
		2	4	8	16	32	64* K	0.1	0.15	0.2	0.1				0.15
12	-	±	0	0	0	0	0	0	±	0	0		±	-	-
35	-	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 ± 0	±	-	-
79	-	±	0	0	0	0	0	0	±	0	0	4 4 ±	±	-	-
2	-	0	0	0	0	0	0	0					-	-	-
4	-	0	0	0	0	0	0	0					-	-	-
8	-	0	0	0	0	0	0	0	1	±	0		-	-	-
17	-	0	0	0	0	0	0	0	1	±	0		-	-	-
32	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	± 0 0	-	-	-
△37	-	0	0	0	0	0	0	0	±	0	0	± ± 0	-	-	-
44	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3 2 2	-	-	-
46	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3 3 0	-	-	-
56	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 0 0	-	-	-
64	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 0 0	-	-	-
76	-	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3 2 0	-	-	-
77	-	0	0	0	0	0	0	0	±	0	0	3 ± 0	-	-	-
83	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 0 0	-	-	-
90	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 1 0	-	-	-
96	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 0 0	-	-	-
48	-	±	±	±	±	±	±	±	1	±	0	3 2 ±	-	-	-
85	-	0	0	0	±	±	±	±	1	0	0	3 3 0	-	-	-
41	/	0	0	0					±	0	0		-	-	-
以下陰性例略す															

* K: 抗原対照 Δ: 検体猫

陽性の全例はC. F. T. においてもすべて陽性を示し、
 病毒分離陰性例も3例を除き一致している。

N小体とC. F. T. との成績を見ると、N小体陽性の例はすべて陽性であり、しかしN小体(+)でC. F. T. が弱い陽性(±)を示した例が2例あった。本反応の様に既知の狂犬病毒にのみ特異的に反応する免疫血清を用いての狂犬病抗原の検出には、極めて僅かの溶血阻止も注意して判定し、第1試験管の2倍稀釈免疫血清が溶血阻止(±)程度でも狂犬病と判定し得るとされている。

又N小体、C. F. T. , 病毒分離試験が、それぞれ(-), (+), (+)のものおよび(-), (±), (+)のものが各2例あった。

1例であったが被検動物脳が腐敗し、病理組織学的検

査が不能の例がありC. F. T. を実施した所陰性を示し、後の病毒分離試験も陰性であった。

NO. 10例において、N小体は(+)であったがC. F. T. は完全溶血を示し、陰性と判定出来た。この脳を15日間氷室に保存して軟化腐敗に近づいた時期に新に抗原を作り、本反応を行った所第3表の如く陽性を示した。

この脳材料をマウスに脳内接種して13日目に斃死したマウスの脳を抗原として本反応を行った所、同様に強い溶血阻止を認めた。NO. 51のC. F. T. (±)例も時日を追って本反応を行った所、はっきりとした陽性を示した。

脳組織軟化腐敗時の C. F. T.

脳組織が軟化するに従って不溶血の程度が強く現われ

第3表 No. 10 及び No. 51 の C.F.T.

回	No. 10 の C. F. T.									N 小 体	No. 51 の C. F. T.									N 小 体			
	診 断 血 清 稀 釈						補体吟味				日 数	診 断 血 清 稀 釈						補体吟味			日 数		
	2	4	8	16	32	64	*K	0.1	0.15	0.2		2	4	8	16	32	64	*K	0.1	0.15		0.2	
1.	0	0	0	0	0	0	0	1	±	0	15	±	0	0	0	0	0	0	±	0	0	7	
2.	4	4	1	0	0	0	0	1	0	0		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
**M	4	4	4	4	2	0	0	1	0	0		4	4	4					0	0	0		

* K: 抗原対照 **M: 病毒分離試験マウス脳抗原

第4表 脳組織軟化時の C. F. T.

回	正 常 犬 脳 抗 原							神経性ジステンパー犬脳抗原							狂 犬 病 犬 脳 抗 原						
	診 断 血 清 稀 釈						日 数	診 断 血 清 稀 釈						日 数	診 断 血 清 稀 釈						日 数
	2	4	8	16	32	64*K		2	4	8	16	32	64 K		2	4	8	16	32	64 K	
1.	0	0	0	0	0	0	1 5 17 21	0	0	0	0	0	0	1 5 17	±	0	0	0	0	0	1 5 17 21
2.	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		±	0	0	0	0	0	
3.	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		2	±	0	0	0	0	
4.	0	0	0	0	0	0		2	2	2	2	2	2		2	2	2	±	0	0	
5.	4	4	4	4	4	3		4	4	4	4	4	4		4	4	4	4	4	4	

* K: 抗原対照

た事実を正常犬脳、神経性ジステンパー犬脳および狂犬病犬脳を用いてしらべた。

これらの脳を氷室(4℃)に保存し、1日目、5日目、17日目、21日目に抗原を作り本反応を行つたところ狂犬病犬脳抗原は脳組織の軟化に従い不溶血の程度は強まり、5日目にはかなりはつきりとした溶血阻止を認め更に完全腐敗に至つて抗補体作用のため判定不能となつた。第3表に示したNO. 10抗原は溶血阻止(4)のはつきりした程度を示したが、この試験に用いた狂犬病犬脳抗原は、それ程強い溶血阻止を示さなかつた。

神経性ジステンパー犬脳抗原、正常犬脳抗原は腐敗に至るまで陰性を示した。

補体増量法について

第2表の使用補体の吟味において、補体に食塩水のみを加えたものと、補体に抗原を加えたものとでは補体の吸収が異なつた成績であつた。即ち後者は補体の吸収が多くなる傾向を示した。そこで本反応の補体結合量が抗原によつて異なるか否かを追及し、あわせて本反応(±)を陽性と判定する基準を検討する意味で補体量を増減した。

又補体測定の際に抗原を加えて行つた所、食塩水の場合より1管のずれが認められ、抗原を加えた場合は

補体使用量が幾分か多くなる様な傾向を示した。

補体増量法は原法において陽性、陰性および(±)判定の抗原をもつて補体量を動かして検討した所、陽性と陰性の抗原は明らかにその差が認められたが、(±)抗原においては陽性の判定と疑陽性の判定の2つが出来、原法(±)抗原は補体量の増減にもかゝらず、はつきりした成績を示さず、疑わしいとの判定を下した。

考 察

以上の如く我々は114例の狂犬病C. F. T. を実施し、大多数(106例)が従来から用いられていた2診断法と成績が一致した。

N小体検索が陰性でC. F. T. は陽性、後の病毒分離試験も陽性の例が4例あつた事は注目すべき点と考えられる。狂犬病動物において自然斃死以前に殺処分をした場合はN小体の発見率は非常に低下するといわれ、本例もN小体発現以前に殺処分を受けたものと思われるが、通常この様な場合病毒分離試験を行い長日数をついやして決定をしなければならない。本例は狂犬病動物であるにもかゝらずN小体は陰性を示し、C. F. T. は陽性を示している。この事は本C. F. T. が早期診断法としての充分の価値を認められるものと考えられ

第5表 補体増量法

抗 原	補 體 單 位	補 體 結 合 反 應												抗 原 對 照
		診 斷 血 清 稀 釋 倍 數						使 用 補 體 吟 味						
								NaCl 水			抗 原 加			
		2	4	8	16	32	64	0.10	0.15	0.20	0.10	0.15	0.20	
陽 性 抗 原	1	4	4	4	4	4		4	4	0	4	4	3	2
	2	4	4	4	4	4		4	1	0	4	3	1	0
	4	4	4	4	4	3		±	0	0	1	0	0	0
	6	4	4	4	3	0		0	0	0	0	0	0	0
陰 性 抗 原	1	1	1	1	1	0	0	4	4	0	4	4	4	2
	2	0	0	0	0	0	0	4	1	0	4	4	3	0
	4	0	0	0	0	0	0	±	0	0	4	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(±) 抗 原	1	4	4	4	4	3	3	4	4	0	4	4	4	1 ⁺
	2	3	3	3	2	2	1	4	1	0	4	3	2	1
	4	±	0	0	0	0	0	±	0	0	3	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

る。

しかし陽性および陰性例中に(±)判定のものが少数見出された。これ等は各材料の抗原により補体の吸収程度が異なり、そして抗原が40%という濃い濃度のために抗原の着色をさけることは不可能であるため稀に現われるものと思われるが、(±)不溶血の判定は非常に困難さを感じる。

脳組織の軟化により不溶血が強く現われた事実は本病のC. F. T. について興味ある点である。本C. F. T. の抗原価は脳組織の部分により多少の差が認められるが⁹⁾、この試験に用いた部分は Mesencephalon であり時日を追ってその附近周辺の組織を用いたが第3表および第4表の如く、順次不溶血が強く現われた。これらの事より本C. F. T. 抗体を生ずる抗原は他の病毒における Soluble Antigen¹²⁾ に相当し、又平井¹³⁾、安東等¹⁰⁾の報告の如く本C. F. T. の本態は病毒およびそれによつて変化を受けた随伴蛋白であり、主に後者によるものであると思われる。

補体増量法によれば原法(±)はやはり判然とせず、脳組織中の抗原を検出する本反応では濃度の高い抗原が

必要とされるが、臓器乳剤を抗原につかう場合の濃度の条件はかなり複雑で、しかも普通C. F. T. におよぼす影響のうちでは抗原抗体複合体の補体吸着能力が与える影響が顕著である。そのため本反応の如く抗原濃度が高く、又その抗原自体の補体吸収程度が異なるものにおいては反応にかなりの影響を与える可能性があり、C. F. T. が多くの反応因子をもつて反応を行うことから考えると、やはり原法(±)は疑陽性と判定し後の病毒分離試験成績と総合判定を下すべきものと考えられ、原法陽性の判定は不溶血程度2(50%不溶血)以上が妥当ではないかと思われる。

本法は他の診断法と併用すれば後者の短所を補うに役立つばかりでなく、容疑材料を接種し発症したマウスの病毒同定にも用いる事が出来、又病理組織学的検査が不可能なほど腐敗した脳組織にも応用する事が出来、早期診断と病毒同定とにかなり有効な方法である。

結 論

1. 我々は114例の疑似狂犬病動物の脳を用いてC. F. T. を実施し、その成績は従来から行われていた検

査法によく一致した。

2. 脳組織が軟化し腐敗して行く過程において陰性から陽性への転化が明らかに認められた例があつた。

3. 脳組織の軟化腐敗により順次その不溶血程度が強く現われた事より、本抗原は **Soluble Antigen** に相当し、本反応の本態は病毒およびそれにより変化を受けた随伴蛋白であり、主に後者によるものと思われる。

4. 補体増量法を応用して(±)不溶血を検討し、原法(±)陽性は疑陽性として病毒分離試験と総合判定を下すべきものであると推論した。

この一部は第42回日本獣医学会および第12回日本公衆衛生学会において発表した。

終りに臨み診断血清を分与し下され、御指導御校閲を賜つた安東清博士、又終始御鞭撻をいただいた公衆衛生院松井武夫博士、神奈川県衛生研究所々長児玉威博士、細菌課長宮本泰博士に深く感謝します。

文 献

- 1) 厚生省編纂：衛生検査指針1，細菌血清学検査指針，(1) 309~328, 1952.
- 2) Von Rooyen C. E. and Rhodes: *Virus Diseases of Man*, 835~843, 1948.
- 3) Webster L. T. and Dawson: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 32, 570, 1934.
- 4) 押田：千葉医専雑誌，49, 3, 1909.
- 5) 内藤：中央獣医会雑誌，41, 113, 1928.
- 6) Kraus R. & J. Michalka: *Z. f. Immunitätsforsch.*, 37, 504, 1926.
- 7) Casals J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 70, 339~343, 1949.
- 8) Casals J. and Palacios R.: *Jour. Exp. Med.*, 74, 409, 1941.
- 9) Ando, K., Ishii, K., Oka, Y. and Irisawa J.: *Jap. Jour. Med. Sci. & Biol.*, 6, 221, 1953.
- 10) Ando, K., Ishii, K., Oda Y. and Irisawa J.: *Jap. Jour. Med. Sci. & Biol.*, 6, 659, 1953.
- 12) 武原他：獣医畜産新報，No. 164, 22, 1955.
- 12) 近藤昭，小林芳治，北岡正見：臨床，6, 289, 1953.
- 13) 平井：北海道医学雑誌：12, 549, 1934.