昭和32年度の近畿地方における日本脳炎 患者の血清学的考察

永井 勝次 服部 毅 島川 玄明

京都府立医科大学微生物学教室 (主任 鈴木成美教授)

[受付: 12月2日・1957年]

緒言

日本脳炎 (以下 J. B. E. と略記する) 流行の究明は従来顕性感染患者を対照として行われて来たのであるが従来考えられていた様に本病原体の抗原構造も決して Homogeneous ではなく例えば 予研安東氏が分離した根岸, K₁₃ の如きは中山株とはその免疫学的性状を異にすることが知られている。一般に J. B. E. Virus の変異株が原株と一部或いは大部分の免疫学的性状を異にするのは当然である。併し本事実の重要性については Influenza Virus を引合に出す迄もなく Virus 病診断及び Virus ワクチン製造等の日常実際的な分野においても使用する Virus 株の選択には充分な考慮が払われなければならぬのは勿論である。又本事実各 J. B. E. 流行における患者血清の補体結合反応 (以下 C. F. と略記する) の陽性率にも大なる関連を有する。

近年 Virus 感染症に対する血清学的診断法が確立せられ J. B. E. においても血中中和抗体価による顕性患者の診断成績がある。1941年, Casals and Palacios が神経親和性 Virus における C. F. 試験の新しい方法を発表し我国でも 1945 年の流行以来 J. B. E. 患者を類似患者から鑑別する目的で本反応が実施されるに至り続いて不顕性感染の検索にも応用せられるに至った。

又 Hirst が報告した所謂 Hirst 試験 (Hirst test or CCA inhibition test) は先ず Influenza の感染並に免疫に関する研究のみならずその診断及び防疫学上にも大きな寄与をもたらしたが今日同様の赤血球凝集現象は Influenza Virus の他数種の Virus により諸種動物の赤血球が凝集せられることが証明されている。Sabin and Buescher は J. B. E. Virus も鶏離赤血球凝集能を有し赤血球凝集反応が J. B. E. 患者血清又は免疫血清により特異的に抑制されることが確認された。

昭和32年度の近畿地方における J. B. E. 流行は予想以上に過少で吾々も材料の採取時期や材料数の僅少等のため

Virus の分離は不成功に終つたが患者血清39材料について C. F. 並びに血球凝集抑制試験 (以下 H. A. I. と略記する) を比較検討したので以下成績の概要を報告する。

実験材料

1) 血清

被検血清として1957年大阪 (桃山病院) 京都 (京都病院) 名古屋 (東市民病院) に発生し臨床的に J. B. E. 患者と診断された24例39材料であり対照としては京都及び奈良在住の健康者25例を用いた。

2) 抗原

H. A. I. における抗原は中山株を用いこれを緩衝液の入らない食塩水で 10 % 乳剤を作り 4000 rpm 40分間遠心しその上清を抗原として用いた。

C. F. の抗原は Casals & Palacios の方法によつて中山株接種マウス及び正常マウス脳より作製した、又免疫血清は家兎の静脈内に中山株罹患マウス脳乳剤の高速遠心上清を数回接種し免疫したものを用いた。

3) 血球

H. A. I. に用いた血球は孵化後3日目の鶏離から採血し食塩水で3回洗滌した後 0.25 % 浮游液として使用した。C. F. の場合には綿羊血球を用いた。

4) 稀釈液

H. A. I. の場合予備試験における抗原及び抑制試験の場合の血清稀釈には 磷酸緩衝食塩水 (PH 6.5) を使用しその他は緩衝液の入らない食塩水を使用した。

実験方法

1) C. F. 及び中和試験の場合は衛生検査指針に準拠

NAGAI Katsuzi, HATTORI Takeshi and SHIMAKAWA Gemmei: Serologic studies on Japanese B encephalitis patients in Kinki district in 1957. Department of Microbiology, Kyoto Pref. Med. University. —Jap. J. of Bact. 225-227, 1958.

した。

2) H. A. I. の場合

a) 血清の処理方法

血清は56°C30分非働化した後正常抑制物質を除去する為クロロホルム或いはアミールアルコール、四塩化炭素処理方法があるが本実験にはクロロホルム処理のみを行った。この方法は血清に4倍量のクロロホルムを添加し15分間位よく振盪した後2500 rpm 60分遠心してその上清1量に対してN/100 HCl2量, M/100 磷酸緩衝食塩水7量の割合に混じてpHを凡そ6.5に修正(血清は10倍に稀釈される)した。

b) 予備実験

10%の抗原をpH 6.5の磷酸緩衝食塩水で2倍稀釈液を作る。次で各管に0.25%の血球浮遊液を0.5 ml ずつ加えよく振盪し1時間室温に放置してその成績を判定する。明らかに凝集の認められる最終の試験管内の抗原量を1凝集単位として本試験には0.5 ml 中に8単位を含む濃度の抗原の0.25 ml 即4単位の抗原を使用する。

c) 抑制実験

クロロホルムで処理した血清でpHを凡そ6.5に修正し10倍に稀釈されたものを2倍稀釈法で稀釈する。次で各試験管に抗原0.25 ml (4単位)を加えよく振盪し更に0.25%, 血球浮遊液0.5 ml 宛加えて再びよく振盪し室温に1時間放置してから結果を判読する。

d) 判定

管底像にて完全に血球凝集を抑制した最終試験管中の終末稀釈濃度を以て表わした。

実験成績

J. B. E.患者のH. A. I.は第1表に示す如く健康者25例については何れも40倍以下の抑制価を示すのに反しJ. B. E.患者血清39例中1280倍を示したものは2例, 640倍は6例, 320倍7例 160倍は14例, 80倍は8例, 40倍のものが2例あった。健康人血清と比較し差は認められるが著差はみられなかった。

又H. A. I.とC. F.との関係については第1図に示す如くC. F.が2倍でH. A. I. titer が160倍以上を示したものが25例あった。

第1表 J.B.E 患者及び健康人血清の H.A.I. 価

H.A.I.価 (血清稀釈)	40	80	160	320	640	1280	2560	計
血清								
J.B.E患者血清	2	8	14	7	6	2	0	39
健康人血清	25	0	0	0	0	0	0	25

第1図 C.F. 価と H.A.I. 価

第2表 J.B.E. 患者血清の C.F. 及 H.A.I. 価

患者名	採血月日	C.F.	H.A.I.
大 橋	2/8	4	160
	25/8	8	640
砂 川	28/8	4	80
	5/9	8	160
石 井	1/8	2	40
	13/8	2	40
中 沢	5/8	2	40
	12/8	2	80

第3表 J.B.E. 患者血清による中和試験

ウイルス 稀釈	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	LD ₅₀	中和 指数
可検血清									
石 原		0/3	2/3	3/3				10 ^{-3.8}	631
渡 辺		0/3	3/3					10 ^{-3.5}	251
対 照				0/3	1/3	3/3		10 ^{-6.2}	

註：分子は生存マウス数，分母は使用マウス数を示す

第2表に示す如く患者血清を一定期間後採血してC. F.並にH. A. I.反応を試みたところ大橋, 砂川の場合はC. F.が上昇と共にH. A. I. titer が上昇している。併し石井, 中沢の場合はC. F.が2倍であるがH. A. I. titer も40倍以下であった。

第3表は名古屋において発生した患者2例即石原の52

病日, 及び渡辺の48病日の血清について中和試験を行った処非常に高い中和指数を示した又この2例のC. F.の結果は今年度における最高の titer を示した。

考按並びに総括

Sabin and Buescher によつて報告されたJ. B. E. Virus の鶏離血球凝集反応並に同抑制反応はJ. B. E. 流行地にいる多くの研究者により追試研究せられた。H. A. I. についてもいろいろの研究者により追究されているが実際に現在J. B. E. の病因学的診断には主としてC. F. が用いられているがC. F. においては溶血素, 補体, 血球, 抗原, 被検血清等の変量を扱うから技術的にはその実施は複雑である。一方H. A. I. は変量としては血球凝集素, 血球被検血清の3つを含むに過ぎないから技術上容易である。これらの実験方法を用いて昭和32年度のJ. B. E. 患者について検討を行った。

1950年北岡氏が同様患者のH. A. I. を行つた際H. A. I. はJ. B. E. 感染者に特異的に高く現われ而もC. F. 陰性者でも陽性に現われ160倍以上の成績を示したことを報告している。又教室の藤田が行つた成績についても160倍以上を呈したものが殆んどを示しその内C. F. 陰性のもの1例がH. A. I. が20倍のものとC. F. 陽性のもの1例にH. A. I. が40倍のものがあつた事を報告している。又永井は昭和31年度の流行患者血清のC. F. とH. A. I. を比較した結果C. F. より, H. A. I. の方が特異的に反応し良い成績を得た。又陰性血清においてもH. A. I. が陽性を示した。而し昭和32年度の流行は少なかつたが患者血清についてC. F. とH. A. I. 両反応を行つたところこれまでの成績に比較し著しく titer が低く40倍のものが2例, 80倍のものが7例あつた。又C. F. についても患者は症状が特異的であるのにC. F. が陰性な

ものがあり低い成績であつた。今回行つた実験についてC. F. の titer とH. A. I. titer とは必ずしも一致しない, 病日を追つてC. F. とH. A. I. を検討したがC. F. titer の上昇と共にH. A. I. titer の上昇を認めた。又, C. F. 陰性血清についてもH. A. I. titer の僅かな上昇を認めた例もあつた。H. A. I. はC. F. 陰性の血清材料でも陽性率はC. F. より高く簡単で且つ鋭敏な反応と思うがこれらの血清学的診断には今後用いる抗原(種類, 性状並に純度等)に左右されるのではなからうかと思われるので現今の如く中山株のみによつて診断を行うのはInfluenza の血清診断における同様顧慮が必要と思われるが今後の流行について更に検討を加えてみたい。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた恩師鈴木教授に満腔の謝意を捧げ併せて御援助を戴いた大阪桃山病院山上院長, 塚口医長, 京都府立衛生研究所城下技師, 名古屋市立東市民病院落合院長, 戸谷部長に厚く謝意を表す。

参考文献

- 1) 永井勝次他: 京府医大誌, 61, 1, 123, 1957
- 2) 藤田信男: Virus 2, 202, 昭和27年
- 3) 北岡正見他: Virus 2, 183, 昭和27年
- 4) 山田守英他: Virus 2, 160, 昭和27年
- 5) 柏木胖他: 日伝染会誌, 31, 452, 昭和32年
- 6) 徳田正夫: 大阪医科大学雑誌, 12, 452, 1951
- 7) 横田万之助: 日伝染会誌, 27: 7-8号, 1953
- 8) Hodes H. Thomas Proc. Soc. Exp. Biol. & Med 60, 220-225, 1945
- 9) 波多野基一: Virus 2, 187, 194, 昭和27年
- 10) 高山三男: 京府医大誌, 61, 1, 118, 1957
- 11) 永井勝次他: 関西医学, 6, 昭和31年
- 12) Sabin, A. B & E. L. Buescher, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., N. Y. 74, 222, 1950