日本脳炎ウィールス中和抗体の吸収試験

田 崎 忠 勝

東京大学傳染病研究所第八研究部 (主任: 川喜田愛郎助教授)

〔受付: 4 月 23 日, 1950 年〕

日本脳炎ウィールス中和抗体の吸収試験が, 日本脳炎カリニナ株ウィールス, ウマ進時号血清の組合せで実験した場合, 明らかに成立した。即ちこの場合日本脳炎ウィールスとその中和抗体との結合がガラス器内で成立することは, 川喜田, 田崎によりつて, 一應証明された。しかし, その後の実験によつて, ウィールスによるウィールス中和抗体のいわゆる吸収試験は, 細菌の場合と異なる多くの技術的の困難に遭遇したので, それらの問題についての記述と考察を試みてみたい。

實驗方法

中和抗体吸収後過剰のウィールスを加熱によつて殺す川喜田博士の方法¹⁾を使用した。

實驗成績

1) 免疫ウマ血清 (進時号) についての實驗

A) 日本脳炎松永株ウィールスを使用した場合。

既に日本脳炎ウィールスカリニナ株を用いての實驗を報告したので, 今度は松永株について實驗した。免疫ウマ血清 (進時V号) を 100 倍とし, 日本脳炎松永株ウィールス 10^{-1} 稀釈液で処置し, このウィールスで中和試験を行つた。正常マウス脳と同様に処置した血清, 並びに加温などの操作を同様に施した血清は全くマウスの発症を阻止したにもかかわらず, 吸収血清の場合は, これらの対照と比較して明らかに中和抗体の吸収が認められる (第1表)。

又この吸収血清について, 日本脳炎カリニナ株ウィ

ールスで中和試験を行つた場合も完全に吸収が行われた (第2表)。

第 2 表

血清 ウィールス	ブイヨン	健腦處置 血清	吸収血清
10^{-6}	7 8 9	○ ○ ○	7 8 8
10^{-7}	8 9 9	○ ○ ○	9 9 9
10^{-8}	※ 9 ○	※ ○ ○	9 9 ○

B) 日本脳炎諏訪株ウィールスを使用した場合。

免疫ウマ血清 (進時V号) と日本脳炎諏訪株ウィールスを用いた場合も全く同様であつた。

以上で進時号ウマ血清と日本脳炎カリニナ株, 松永株, 諏訪株等のウィールスとの組み合わせにおいて常に中和抗体の吸収が成立することが証明された。

しかるに免疫ウマ血清 (進時号) と免疫学的に無関係なアメリカ馬脳炎西部型ウィールス, 又はセントルイス脳炎ウィールスとの間, 及びアメリカ馬脳炎西部型ウィールスで免疫して得たモルモット血清と日本脳炎カリニナ株ウィールス, 並びにこれらの血清と健康マウス脳との間では, 同様な實驗の結果この反應は起らないことが証明された。これらのことからこの反應は日本脳炎ウィールスに特異的であると断定できると考える。(ウサギ腎臓, 睪丸, ウサギ, ヒツジ, ヒトの血球など正常組織による非特異的な吸収が二三の研究者によつて報告されている²⁾³⁾⁴⁾。Andrewes²⁾も述べているごとく加熱法ではこの点特に注意を要するのであるが, この場合このようなことは一度もなかつた。)

2) 正常ウマ血清の場合。

これまでの實驗に使用した免疫ウマ血清 (進時号) は再三報告されたように, 反復免疫して一部採血を繰返えたものである。この反應はこのような重ね免疫ウマ血清という特殊な場合にのみ起るものであろうか。これを調べるために, 日本脳炎ウィールスに対する正常抗体を

第 1 表

血清 ウィールス	ブイヨン	血清対照	健腦處置 血清	吸収血清
10^{-5}	6 6 6	○ ○ ○	※ ○ ○	7 7 9
10^{-6}	7 7 8	※ ○ ○	○ ○ ○	8 10 ○
10^{-7}	7 7 8	※ ○ ○	○ ○ ○	8 10 ○
10^{-8}	※ 7 8	○ ○ ○	※ ※ ○	○ ○ ○

備考 6, 定型的腦炎死 (接種後 6 日)

※, 他の原因にかり死せるもの

○, 14 日間觀察して生存せるもの

これらの記載法は本報告の全般に通ずるものである

TAZAKI, Tadakatsu, : Absorption test of neutralizing antibodies against Japanese encephalitis virus. Japan. J. Bact.; 5 (5) : 275-278, 1950.

第 3 表

血 清 ウィ ールス	ブイオン	血清対照	健腦處置 血 清	吸収血清
10 ⁻⁵	7 8 10	8 9 9	※ 7 ○	8 8 8
10 ⁻⁶	8 8 8	○ ○ ○	11 ○ ○	8 10 11
10 ⁻⁷	8 8 10	○ ○ ○	○ ○ ○	7 9 10
10 ⁻⁸	9 11 ○	○ ○ ○	○ ○ ○	※ 10 ○

有する正常ウマ血清で同様の実験を行つた。正常ウマ血清(第483号)を33倍として日本脳炎カリニナ株ウィールス10⁻¹稀釈液で処置し、このウィールスで中和試験を行つた。この結果はブイオン対照と全く同様になり完全に吸収が行われた。即ち重ね免疫ウマ血清の場合のみならず、いわゆる正常ウマ血清の中に含まれる中和抗体をも吸収できることがわかつた(第3表)。

3) 作用条件

このような試験管内の吸収試験が作用条件にいかん左右されるかを調べるために、次の実験を行つた。

A) 吸収に使用するウィールスの量を色々に変えた場合。

免疫ウマ血清(進時V'号)を100倍とし、日本脳炎カリニナ株ウィールス10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴稀釈液で夫々処置を行い、このウィールスで中和試験を行つた。(この場合このウィールスのマウス脳に対する感染価は大體10⁻⁸であつた)。10⁻²稀釈液で吸収の場合は、吸収血清の中和試験に於て、ブイオン対照は10⁻⁸までマウスは全部死んだが、吸収血清の場合は10⁻⁶で3匹中²匹、10⁻⁷は3匹中1匹、10⁻⁸は3匹中2匹死亡という状態で、多少吸収が行われているが、10⁻³、10⁻⁴稀釈液で吸収した場合は、この実験で認め得る範囲内の中和抗体の減弱は証明されなかつた(第4表)。

即ちこの場合10⁻¹稀釈液というような極めて濃いウィールス浮遊液を用いなければ完全な吸収は行われなことが分つた。こゝに使用した血清は100倍稀釈では10⁻⁵稀釈ウィールスの発症を完全に阻止するのであるから、極く大體の計算でゆくと、この場合この免疫血清

のこの濃度の最大発症阻止量の約10,000倍量のウィールスを使用したわけである。Salaman⁹⁾も牛痘ウィールスに関する吸収試験で同様にその1,500~100,000倍量の基本小体浮液を使用している。これらの場合両ウィールスの大きさという点を考え合せると真に興味深いものがある。

B) 作用温度及び作用時間との関係

a) 作用温度を0.5°Cとした場合。

50倍稀釈免疫ウマ血清(進時V'号)と日本脳炎カリニナ株ウィールス10⁻¹稀釈液との混合を0.5°Cの氷水中に30分間保ち、そし間時々振盪し、その後直ちに56°Cの温浴で2時間加熱してウィールスを殺しこのウィールスで中和試験を行つた。この結果は従来の方法で行つた場合と全く同様に吸収が行われた。

b) 即時反應の場合。

同様な混合物を短時間充分振盪し、直ちに56°Cの温浴で2時間加熱し、このウィールスで中和試験を行つたところ、この場合も全く同様に吸収が行われた。

以上でこの反應が成立するためには中和抗体とウィールスとの間に量的關係が成立しなければならないことがわかつた。しかし上述のような実験方法の範囲内では一應温度的、時間的には無關係のようにみえる。しかしこの場合0.5°C、あるいは室温に置いたウィールス、血清混合物を56°Cに上げてそのまま2時間放置したのであるから正確にいつて反應がどこで起つたかは、更に詳細に調べてからでないとはつきりした結論を下すことはできない。しかし單なるカリオン吸着法、濾過法、遠心沈澱法、電気泳動法、などを用いた吸収試験の多くが余りはつきりとした成績を示していない点より考えて^{2) 3) 4) 5) 9) 10)}、—これには無論他に色々な理由もあるが、一少くとも最後の強固な結合には或る程度の温度とそれに対する時間とが必要なのではいかと想像されるのである。

4) 加熱ウィールスによる吸収

1,000倍の免疫ウマ血清(進時V'号)を用い日本脳炎カリニナ株ウィールス10⁻¹稀釈液を56°C 30分間加

第 4 表

血 清 ウィ ールス	ブイオン	健腦處置 血 清	カリニナ10 ⁻¹ 吸収	カリニナ10 ⁻² 吸収	カリニナ10 ⁻³ 吸収	カリニナ10 ⁻⁴ 吸収
10 ⁻⁵	7 7 7	○ ○ ○	8 8 8	8 8 9	○ ○ ○	○ ○ ○
10 ⁻⁶	7 8 9	※ ○ ○	※ 6 8	9 8 ○	○ ○ ○	※ ○ ○
10 ⁻⁷	7 8 8	※ ※ ○	8 8 8	9 ○ ○	※ ○ ○	○ ○ ○
10 ⁻⁸	7 9 9	※ ○ ○	8 9 9	9 10 ○	○ ○ ○	※ ○ ○

熱したもので処置を行つた場合は中和抗体の吸収が行われた。この場合加熱ウィールスに生ウィールスが全然残存しなかつたことは無論である。

同じく1,000倍の免疫ウマ血清(進時V号)を用い、日本脳炎カリニナ株ウィールス 10^{-1} 稀釈液を 56°C 30分間加熱したもので吸収を行つた場合も同様に吸収が行われた。しかしこの場合は加熱時間が短かつたためか、一括移植法によつて生ウィールスの混在していたことが判明した。 56°C 30分間加熱されたこのウィールスは、ブイヨン 10^{-1} 浮遊液(未濾過)では残存生ウィールス量は非常に少量であると云うことは明らかなことである。故に従来の成績からすれば吸収は起らないはずである。

一方100倍の免疫ウマ血清(進時V号)を用い、日本脳炎カリニナ株ウィールス 10^{-1} 稀釈液を 56°C 2時間加熱したもので処置した場合は吸収は全く起らなかつた。この場合加熱に使用した恒温槽の構造上必ずしもその温度は正確とはいひ得ないので、以上の3例並びに川喜田による日本脳炎培養ウィールスの熱に対する抵抗試験¹¹⁾、Bedsonのヘルペス・ウィールス¹²⁾、及びおうむ病ウィールス¹³⁾に対するフォルマリン加熱ワクチンと單なる加熱ワクチンとの差の問題などと合せ考え、例之死ウィールスでも抗原性にあまり変化のないような状態にあるものならば、抗血清中の中和抗体を充分吸収し得るとするのが妥当であろう。

むすび

日本脳炎ウィールスはそれで免疫されたウマの、並びに正常抗体を有する正常ウマの中和抗体を特異的に吸収する。温度的、時間的關係はともかくとしても、この反應が成立するためには抗原、抗体間に一定の量的關係が成立しなければならない。これら点から、この反應が試験管内反應であると結論できると考える。以上はウィールス中和抗体の吸収試験に関するこれまでの報告にかつて記載されたことのない確然たる成績を示したものと云うべきで、ウィールスとその中和抗体とが試験管内で結合する否かと云うウィールス免疫学の領域で永く論ぜられていた問題に関し、少くとも日本脳炎ウィールスとウマ血清とに関する限りもはや異論の余地のない解答を提供したものと考える。

Sabin⁹⁾, ¹⁰⁾を初めとしてウィールスとそれに対する中和抗体との試験管内反應に対し直接間接に反対意見を表明している学者は少ない。わたくしは日本脳炎ウィールスとウマ血清との場合にはつきりと認められた事実を記載しそれに基づいて結論を下したのであつて、他の

ウィールスの場合を今こゝで云々する考はない。

ただこの場合罹患マウス脳乳剤を使用しているため大量の生細胞と一緒に使用していることは事実である。しかしベルケフェルドV濃液を使用してもこの反應の成立することを考えれば¹⁴⁾、このことは余り問題とするには当らない。

罹患脳細胞性産生物(例えば Smith¹⁵⁾らの Necrotic cell products) による反應を全然否定することはできない。

又 Salaman¹⁶⁾の牛痘ウィールスを用い、Friedewald & Kidd¹⁷⁾の Shope の乳嘴腫を用いての実験では夫々の S. S. S. は中和抗体吸収とは無關係であると述べてはいるが、この場合ウィールス性産生物によるこれらの反應も全然除外してしまうことはできない。これらの点に関しては更に深い研究が必要である。

加熱ウィールスを用いた場合もウィールスの抗原性を余り損しないような状態にあるときは中和抗体の吸収は可能である。このことは加熱ウィールスの抗原性に関して一つの指示を與えるものとする。

終始御指導と御鞭撻とを賜つた恩師川喜田博士に対し心から御礼申し上げる次第である。

本研究は文部省科学研究費(川喜田愛郎に配分された分)の補助をえて行われたものである。

主な文獻

- 1) 川喜田愛郎, 田崎忠勝: 日本流行性脳炎ウィールス中和抗体の吸収試験について. 日本細菌, 2, 58-59, 1947.
- 2) Andrewes, C. H.: The action of immune serum on vaccinia and virus III in vitro. J. Path. Bact. 31, 671-698, 1928.
- 3) Andrewes, C. H.: Antivaccinial serum. 3. Evidence for slow union with virus in vitro. J. Path. Bact. 33, 265-272, 1930.
- 4) Jungeblut, C. W.: The immunological characteristics of the poliocidal substance in human serum. Concentration, thermostability, absorption and specificity. J. Imm. 27, 17-41, 1934.
- 5) Salaman, M. H.: The combining properties of vaccinia virus with the antibodies demonstrable in anti-vaccinial serum. Brit. J. exp. Path. 18, 245-258, 1937.
- 6) Andrewes, C. H.: Some properties of immune sera active against fowl-tumour virus. J. Path. Bact. 35, 243-249, 1932.
- 7) Gay, F. P. & Holden, M.: The herpes encephalitis problem III. J. inf. Dis. 53, 287-303, 1933.

- 8) Sabin, A. B.: The mechanism of immunity of filterable viruses. I. Does the virus combine with the protective substance in immune serum in the absence of tissue? *Brit. J. exp. Path.* 16, 70-84, 1935.
- 9) Friedewald, W. F. & Kidd J. G.: Specific absorption of antibody with extracts containing the rabbit papilloma virus (Shope). *Proc. Soc. exp. Biol. & Med.* 41, 218-220, 1939.
- 10) Friedewald, W. F. & Kidd, J. G.: Union in vitro of the papilloma virus and its antibody. *J. exp. Med.* 72, 331-558, 1940.
- 11) 川喜田愛郎: 流行性脳炎ウィールスのガラス器内培養 (第二回報告後半). 主としてガラス器内に於けるウィールスの消長に就いて. *實驗醫學*, 24, 79-105, 昭15.
- 12) Bedson, S. P.: Immunization with killed herpes virus. *Brit. J. exp. Path.* 12, 254-260, 1931.
- 13) Bedson, S. P.: Immunological studies with the virus of psittacosis. *Brit. J. exp. Path.* 14, 162-170, 1933.
- 14) 川喜田愛郎, 田崎忠勝: ウィールス中和反應の機序に関する一考察. 第17回聯合微生物學會記録, 昭18(未發行).
- 15) Smith, W.: Specific antibody absorption by the virus of vaccinia and herpes. *J. Path. Bact.* 33, 373-282, 1930.
- 16) Sabin, A. B.: The mechanism of immunity to filterable virus. II. Fate of the virus in a system consisting of susceptible tissue, immune serum and virus, and role of the tissue in the mechanism of immunity. *Brit. J. exp. Path.* 16, 84-101, 1935.