Rickettsia mooseri 免疫血清の急死毒中和 抗体力價測定法について

鈴木 潔

東京大学傳染病研究所第5細菌研究部 (部長 安東洪次)

[受付: 10 月 15 日, 1952 年]

Gildemeister and Haagen (1940) は發育雞卵々黄囊に培養した *Rickettsia mooseri* の濃厚浮游液をマウスの腹腔内に注射すると、マウスが急激な毒性死を起すこと、又その毒性が免疫血清、恢復血清によつて特異的に中和されることを発見し、次いで Otto and Bickhard (1941), Bengtson, Topping and Henderson (1945) は *Rickettsia prowazeki* で同様の現象を発表した。免疫血清或いは恢復血清による急死毒中和試験はリケッチアの免疫学的研究に或いは患者の血清学的診断に又はワクチンの効力試験に利用されて來たが、各研究者 (Gildemeister and Haagen, 1940: Hamilton, 1945: Bengtson, Topping and Henderson, 1945) の用いた術式がまちまちであるから、その成績は比較することが困難である。依つて急死毒中和試験術式を比較検討する要を認め、些か所見を得たので茲に報告する。

実験材料及び実験方法

1. リケッチア

当研究部で發育雞卵々黄囊内に継代培養している *Rickettsia mooseri* (*Rickettsia typhi*) の Wilmington 株を用いた。

2. 急死毒の調製

39°C で孵卵した7日卵雞卵々黄囊内に1%感染卵黄囊食塩水乳剤を0.2ml 接種し、爾後34°C で培養した。胎児が生きていて、リケッチアの増殖が最高に達し、更に培養を続ければ程なく胎児が死亡すると思われる時期の雞卵から卵黄囊を摘出して塗抹標本を作り、鏡檢上でリケッチアが無数に認められたものを急死毒の材料とした。摘出した卵黄囊に pH 7.2 の脱脂乳を加えてホモゲナイザーで10重量%の乳剤を作り、2,000 r.p.m. 5分遠心して中層をアンブレに分注し、ドライアイス・アルコール寒剤で急速に凍結してドライアイス箱に保存した。

3. 急死毒の力價測定法

凍結乳剤を10°C 以内の水浴中で溶解して pH 7.2 の磷酸緩衝 (M/75) 食塩水 (0.15 M) で2倍階段稀釈し、各稀釈液の0.5ml を1群5匹の体重11~13g のマウスの尾靜脈内に注射して24時間後にその生死数より50%死亡終末点 (LD_{50}) を算定した (Read and Muench, 1938)。マウスに注射中は急死毒液を氷で冷却し、注射完了までに1時間以上経過しない様に努めた。

4. 中和血清

感染卵黄囊10重量%のリケッチア浮游液0.5ml を10匹の海狸の腹腔内に注射し、海狸の下熱後3週間目に採血して血清を分離し、混合してアンブレに2ml 宛分注してドライアイス箱に凍結保存した。凍結保存 No. 1, No. 2, No. 3, の3種類の血清について実験を行つた。

5. 試験管内中和法

凍結保存恢復海狸血清を pH 7.2 磷酸緩衝食塩水 (上記) で2倍階段稀釈し、各濃度の2ml と上記方法で決定した0.5ml 中に4 LD_{50} , 8 LD_{50} の急死毒が含まれている2ml とを混合して (0.5ml 中の急死毒は2 LD_{50} , 4 LD_{50} となる)、一定温度の溫浴中に一定時間放置し、混合液を11~13g の1群5匹のマウスの尾靜脈内に0.5ml 注射した。注射したマウスが全部生残つた血清稀釈度を完全中和價、一部生残つたものを部分中和價、すべてのマウスが死亡したものを中和陰性價とした。

実験成績

1. 接触時間の影響

4 LD_{50} , 8 LD_{50} 各急死毒に中和血清の各濃度を等量加えて混合直後、20°C 30分、1時間及び2時間放置後マウスに注射して中和能に及ぼす接触時間の影響を検討

SUZUKI, Kiyoshi: Contribution to the assaying method for neutralizing antibody in anti-Rickettsia mooseri sera. The Institute for Infectious Disease, The University of Tokyo. — Jap. J. of Bact., 8 (1): 71-74, 1953.

した。

その成績によれば、接触時間の経過と共に中和能は増大するが、急死毒が非常に温度に対して鋭敏である爲に毒力の低下を恐れて3時間以上の接触実験を行わなかつた。混合後30分はその中間値を示し、1時間値と2時間値との間に差異が僅少であるところから中和過程は1時間で相当進行しているものと推定された。中和抗体急死毒の結合は *in vivo* に於ても起り得るが、中和能は低く、完全中和價は *invitro* の場合の $\frac{1}{4}$ であつた。No. 1 血清の成績を第1表に示した。

第1表 接触時間の影響

No. 1 血清

毒 力	接触時間	中 和 能		
		完全中和	部分中和	中和陰性
2LD ₅₀	直 後	1 : 32	1 : 64	1 : 128
	30 分	1 : 64	1 : 128	1 : 256
	1 時間	1 : 128		1 : 256
	2 時間	1 : 128	1 : 256	1 : 512
4LD ₅₀	直 後	1 : 16	1 : 32	1 : 64
	30 分	1 : 32	1 : 64	1 : 128
	1 時間	1 : 64	1 : 128	1 : 256
	2 時間	1 : 64	1 : 128	1 : 256

接触温度： 20°C

2. 接触温度の影響

4LD₅₀、8LD₅₀ の急死毒に中和血清の各濃度を等量加えて2°Cの氷水中、20°C 及び 34°C の温浴中に1時間放置して接触温度の中和能に及ぼす影響を検討した。

実験の範囲内で接触温度の上昇と共に中和能は高くなつたが、接触温度の影響は2LD₅₀ に対しては僅少であ

第2表 接触温度の影響

No. 1 血清

毒 力	接触温度	中 和 能		
		完全中和	部分中和	中和陰性
2LD ₅₀	2°C	1 : 128		1 : 256
	20°C	1 : 128	1 : 256	1 : 512
	34°C	1 : 256		1 : 512
4LD ₅₀	2°C	1 : 32	1 : 64	1 : 128
	20°C	1 : 64	1 : 128	1 : 256
	34°C	1 : 128		1 : 256

接触時間： 1 時間

り、4LD₅₀ に対しては稍々出現した。No. 1. 血清の成績を第2表に示した。

3. 中和血清と急死毒との結合状態

中和血清 No. 1, No. 2, No. 3 の2倍階段稀釈法による各濃度の各 LD₅₀ に対する 20°C 1 時間接触による中和能を検討した。

第1図に示す如く、No. 1, No. 3 血清の各 LD₅₀ に対する完全中和曲線は血清の濃度に逆比例的に45度の直線関係にあつた。例えば No. 1 血清の 32 LD₅₀ を完全に中和する稀釈度は 1:8 であり、16 LD₅₀ に対しては 1:16、8 LD₅₀ に対しては、1:32、4 LD₅₀ に対しては 1:64、2 LD₅₀ に対しては、1:128 であつた。然し No. 2 血清の 2 LD₅₀ に対する完全中和價、又 No. 1 血清の 2 LD₅₀ と 4 LD₅₀ との間に相当する毒力に対する完全中和價は直線関係が成り立たなかつた。

第1図 中和血清と急死毒との結合状態

接触温度： 20°C

接触時間： 1 時間

試験管内中和試験法として中和血清及び急死毒を夫々稀釈して混合し接触させる方法（稀釈後混合法）と両者の或る濃度を混合し接触させた後に稀釈する方法（混合後稀釈法）とがある。急死毒 32 LD₅₀ にこれを充分中和し得る No. 1 血清 1:8 稀釈液を等量加え、20°C 1 時間放置してから混合液を磷酸緩衝液で2倍階段稀釈してマウスに注射したが、マウスは死亡しなかつた。同時に行つた急死毒各稀釈液に中和血清各稀釈液を加えて20°C 1 時間放置した実験でもマウスは全部生存した。接触条件を 20°C 30 分で行つた実験成績も全く同一であつた。急死毒を中和するには稍々不十分な濃度の血清を用い、上記実験と同じく (1) 混合後稀釈した場合、(2) 稀

釈後混合した場合の中和能に及ぼす影響を比較検討したが、両條件間に差異は認められず、すべてのマウスは死亡した。

4. 中和抗体の吸収試験

濃厚に感染した卵黄囊 10 重量%乳剤を 10,000 r.p.m. 1 時間遠心して沈渣を集め、3 回洗滌してから、原量の $\frac{1}{10}$ 量の磷酸緩衝食塩水に浮遊し、血清の原液にその 3 倍量を加えて、よく混合し、37°C 2 時間、更に 4°C 1 晩放置して、10,000 r.p.m. 1 時間遠心して上清を吸収血清として実験に用いた。

20°C 1 時間接触による 4 LD₅₀ に対する中和能を比較したところ、非吸収血清は完全中和価 1:64。部分中和価 1:128、中和陰性価 1:256 であつたが、吸収血清は完全中和価 1:16 (75%減少) 中和陰性価 1:32 (87.5%減少) で中和抗体がリケッチアの菌体で吸収されることが証明された。

5. 中和抗体の加温による影響

No. 1 血清原液を夫々 56°C, 60°C, 64°C 68°C, 72°C (72°C 加温の場合は血清を 1:1.5 に稀釈した) で 30 分加温し、20°C 1 時間接触による 4 LD₅₀ に対する中和能を測定し、中和抗体の加温による影響を検討した。

非加温血清は完全中和価 1:64、部分中和価 1:128、中和陰性価 1:256 であつたが、56°C 加温血清の中和能は若干低下して完全中和価 1:64、中和陰性価 1:128 で、60°C 加温血清は完全中和価 1:32、部分中和価 1:64、中和陰性価 1:128 であつた。64°C, 68°C 加温血清は共に完全中和価 1:32、中和陰性価 1:64 で両加温血清間に中和能の差異は認められなかつたが、両加温血清原液の 4 LD₅₀~32 LD₅₀ に対する中和能を同一條件で測定したところ、64°C 加温血清は 16 LD₅₀ を完全に中和したが、68°C 加温血清は 8 LD₅₀ を完全に中和して、16 LD₅₀ を中和しなかつた。72°C 加温血清は完全中和価 1:3、中和陰性価 1:6 で中和能は著しく減少した。No. 1, No. 2, No. 3 血清すべて加温血清の高濃度に於ても中和阻害地帯は認められなかつた。

中和能に補体が影響するかを検討する爲に、56°C 30 分加温した中和血清に新鮮海狸血清を原液~8 倍各稀釈液を加えて 20°C 1 時間接触させ、4 LD₅₀ に対する中和能を検討したが、56°C 30 分加温の海狸血清を加えた対照群と比較し殆んど差異を認めなかつた。

中和抗体は凍結—融解 20 回に及ぶまで中和能に影響を受けなかつた。

考 察

リケッチアの急死毒は非常に鋭敏である爲に毒性の自

然減弱がかなり大きいから接触時間の短縮が望ましい。中和抗体は *in vivo* で急死毒を中和すが、その能力は著しく低い。Gildemeister 等 (1940) は急死毒と中和抗体とを混合して室温に 4~5 時間放置し、更に 2°C に 1 夜放置後マウスに注射した。Hamilton (1945) は 35°C に 30 分接触させ、Bengtson 等 (1945) は室温に 2 時間接触させて中和抗体の力価を測定した。私の実験範囲内では接触時間の延長及び接触温度の上昇は中和能をたかめたが、中和能の接触 1 時間値と 2 時間値との間に大差がなく、接触 20°C 値と 34°C 値との間にも差異が僅少であつたので、20°C 1 時間接触で中和過程は相当量進行しており、中和抗体の接触条件とした。Gildemeister の方法は接触時間あまりにも長いので急死毒の著しい自然減弱を招く恐れがあつて、中和抗体力価測定法としては不適當である。Hamilton の方法は接触温度が高いので毒力の低下を来し、又接触時間が短いので中和抗体の充分な能力発揮に欠けるものがある。Bengtson の方法は接触時間が 2 時間であるが、1 時間値と 2 時間値との間に差異が僅少であるから、接触時間の短縮を望む測定法として 1 時間が適當である。

20°C 1 時間接触による免疫血清の完全中和曲線はその濃度に比例した直線関係にあつたが、血清により 2 LD₅₀ に対しては直線関係が成り立たなかつたし、又極めて不安定である急死毒の性質上前日測定した 2 LD₅₀ がやゝもすれば実験当日に測定値以下の成績を示し、注射したマウスを生存させる危険性があるので免疫血清の眞價を発揮させる爲に毒力 4 LD₅₀ 以上を用いるべきである。稀釈後混合法、混合後稀釈法いずれによるも中和価にvarietyがなく、中和抗体—急死毒の結合はウィールスで見られる稀釈による解離現象 (Burnet, Keogh and Lush, 1937) が認められなかつた。

中和抗体はリケッチア生菌体によつて吸収され、加温 (56°C~72°C) によつて中和能は徐々に減少したが、加温血清の高濃度に於て Agglutinoid (Eisenberg and Volk, 1902) の如き反應阻害地帯は認められなかつた。

総 括

Rickettsia mooseri 免疫血清の力価測定に際して異なる条件下で測定された成績を比較することは困難であるから、その条件を一定にする必要がある。

(1) 接触時間は直後—30 分—1 時間—2 時間の順に、又接触温度は 2°C—20°C—34°C の順に中和能をたかめたが、接触 1 時間値と 2 時間値と、又接触 20°C 値と 34°C 値と夫々差異が僅少であつたので中和混合液を 20°C 1 時間放置してマウスの尾静脈に注射することにし

た。

(2) No. 1, No. 2, No. 3 免疫血清の 20°C 1 時間接触による完全中和曲線は血清の濃度に比例した直線関係にあつたが, No. 2 血清は 2 LD₅₀ に対して, 又 No. 1 血清は 4 LD₅₀ ~ 2 LD₅₀ 間の毒力に対して直線関係が成り立たなかつたので, 爾後中和抗体力價測定に毒力は 4 LD₅₀ を用いた。稀釈後混合法, 混合後稀釈法いづれによるも中和能に变りがなく, 中和抗体急死毒の結合は稀釈によつて解離しなかつた。

(3) 中和抗体はリケッチア生菌体によつて 37°C 2 時間, 更に 4°C 1 晩接触で吸収された。

(4) 中和抗体の中和能は加温 (58°C ~ 72°C, 30 分) によつて徐々に減少した。中和能は補体 (海狼) によつて影響されなかつた。中和抗体は凍結—融解 20 回に及ぶも影響を受けなかつた。

文 献

- Bengtson, I. A., Topping, N. H. and Henderson, R. G. National Institute of Health Bulletin No. 183, 25-30, 1945.
Burnet, F. M., Keogh, E. V. and Lush, D.: Anstr. J. Exp. Biol. and Med. Sci., 15, 231-368, 1937.
Eisenberg, P. and Volk, R. Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr., 40, 155- , 1902.
Gildemeister, E. and Haagen, E.: Deut. Med. Wchnschr., 66, 878-880, 1940.
Hamilton, H. L.: Am. J. Trop. Med., 25, 391-395, 1945.
Otto, R. and Biekhardt, R. Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr., 123, 447-462, 1941.
Read, L. T. and Muench, E.: Am. J. Hyg., 27, 493-497, 1938.