山羊脳内に於ける狂犬病固定毒の増殖について

大 島 康 夫 竹 原 孝 一

日本生物科学研究所 (所長 中村 稔治)

〔受付: 6月17日 1954年〕

緒 言

ウイルス性ワクチンの製造には、好適動物の選択と適期の採材とが重要である。狂犬病不活化ワクチン材料としての好適動物について、安東及石井等¹⁾は兎脳よりもモルモット及マウス脳が優るとし、高松及大島等²⁾も山羊由来のものが、安定してよい免疫元性を有すると報告している。又山羊が材料として適していることは、既に諸外国に於て早くから之を応用していることから明かである。

固定毒注射動物に於ける採材の適期は、脳内ウイルスの最盛期にあることは勿論である。神沢³⁾、杉田及上野⁴⁾等は馬に於て、脳内注射後6日及3日に、又近藤及大橋⁵⁾はモルモットに於て注射後4日に、それぞれ脳内ウイルスが急激に増殖すると報告している。然し乍ら採脳の時期については明白にされていない。

特に狂犬病固定毒を脳内注射した山羊について、その症状と脳内ウイルスの増殖との関係を経過を追つて検討し、採材の適期を明確にした報告は寡聞にして知らない。私共は之等を解明すると共に、Viremiaの有無及斃死後に於ける脳内ウイルスの消長を併せ追求したので、得た成績について報告する。

本文の要旨は、昭和27年3月第33回日本獣医学会で発表した。

実験材料及実験方法

1. 供試ウイルス²⁾

(1) 脳内注射ウイルス: 西ヶ原株感染兎脳毒 (LD₅₀ 5.5~6.5) を100倍に希釈し、山羊脳内に0.2cc注射した。

(2) 力価試験攻撃用ウイルス: CVS-54株感染マウス脳毒 (LD₅₀ 6.3~6.5) を使用した。

2. 供試山羊

山梨及長野県等で集めた体重11~15kgの日本ザーネン種の健康な山羊を使用した。

3. 脳内ウイルスの検出方法

(1) 生体連続検査: 1951年幡谷及臼井⁶⁾の報告した

アンモン角穿刺法に依つて、固定毒を脳内注射した山羊につき、24時間後から斃死するまで、生体のまま連続的にウイルスの注射対側大脳白質の一片を採り、緩衝食塩水 (pH 7.6) で10%乳剤を調製した。同時に頸静脈より採血し、硝子玉入り瓶で脱繊した。

(2) 症状群別検査: 兎脳毒を注射した1群の山羊について、各症状別(頭部下垂、横臥直後、横臥5時間後、横臥10時間後、横臥15時間後)に材料を採り、脳及脊髓毎に混合し、緩衝食塩水で50%乳剤 (Waring Blendor) を作り、其の一部はマウスでのLD₅₀算出に用い、他は石炭酸不活化ワクチンとして防禦価を測定した。

(3) LD₅₀の算出⁷⁾: 10%脱脂牛乳加緩衝食塩水で脳及脊髓乳剤は10進希釈を、脱繊血は10倍希釈液を作り、各々7~9g体重の市販雑マウスの脳内にそれぞれ0.03cc宛注射し、14日間観察後そのLD₅₀を算出した。

4. 石炭酸不活化ワクチン

市販ワクチンと同一製法²⁾¹⁰⁾で石炭酸不活化ワクチンを作り(最終濃度: 0.4%石炭酸, 0.01%マーズン, 20%脳浮游液) 18~20g体重の市販雑マウス10匹の脳内注射で死毒化を確認した後、Habel法¹¹⁾でその免疫元性を検査し、防禦価 MLD Protective Value (以下MLD P-V と略す) を算出した。

実験成績

1. 生体連続検査による脳内ウイルスの推移

6例の注射山羊について症状及脳内ウイルスの増殖を検査し、第1図及第1表の様な結果を得た。

症状は殆どが第1図に例示したNo. 5に近似し、体温は注射後48時間頃から上昇、80時間頃には最高に達し以後は次第に下降する傾向があり、食欲不振、頭部下垂、四肢開張等は略々95時間頃から相前後して現れた。麻

OHSHIMA Yasuo and TAKEHARA Kohichi:
Multiplication of rabies fixed virus in the goats
brain. Nippon Institute for Biological Science.
— Jap. J. of Bact., 9(11), 959-962, 1954.

第 1 表 固定毒脳内注射山羊の経過と脳内ウイルス（生体連続検査）

山 羊		注射 毒 西ケ 原株 LD ₅₀	注 射 後 の 経 過 時 間 と 脳 内 ウ イ ル ス LD ₅₀															症 (発時 候時 間)	状 (横臥 機臥 時間)	全 経 過 時 間						
番 号	年 齢 (月) 性		体 重 kg	生					前							死					後					
				24	48	72	80	95	100	110	120	125	130	147	10	20	35				40	45	頭部 下垂	機臥		
1	3	♂	11.2	5.8	N	N	N	1.3	4.3	5.8	5.4	6.4	6.2	<5.5	•	5.8	•	•	•	•	100	120	130			
2	3	♂	13.5	5.5	N	N	3.4	<3.5	7.5	7.2	5.5	5.4	6.8	•	•	6.8	•	•	•	•	100	120	125			
3	5	♀	14.0	6.3	N	N	1.3	3.4	<6.6	6.5	6.7	•	•	•	•	•	6.0	•	•	•	75	96	105			
4	5	♂	15.0	6.5	2.5	<N	2.0	4.5	<4.8	•	5.0	•	•	•	•	•	6.4	5.2	5.5	80	99	107				
5	5	♂	14.2	6.5	N	N	3.2	<4.5	6.4	6.7	6.8	6.7	•	5.8	6.5	•	•	6.2	6.2	5.6	96	123	150			
6	3	♂	13.0	6.2	N	N	N	N	5.2	<4.7	4.5	5.2	5.0	•	•	•	•	•	•	•	100	103	125			

（註） 脳内注射ウイルス量：100 倍—0.2 cc, N：脳 10 倍乳剤注射マウスが無症状生存したものを示す

第 1 図 脳内注射山羊 5 号の経過に伴う症状と
脳内ウイルス

痺症状は経過と共に更に著明となり、偏針転倒、膝折がみられ、次で一隅に蹲居して沈鬱の状を呈し、眼反射機能減退、嗜眠するに至る。120時間前後からは一層麻痺は進み横臥全身麻痺を起し、105～150時間で斃死したが、3例に流涎を認めた。

脳内ウイルスは第1表の様に24～48時間後には殆ど証明されなかつたが、72時間後に至つて6例中4例はLD₅₀ 1.3～3.4となり、80時間後には1例を除いた外は72時間後よりも稍々増加し（1.3～4.5）、95時間後に及んで何れも急激に増加（4.3～7.5）した。このウイルスの急激な増加期は食欲不振、頭部下垂、四肢開張等の症状発現期と一致していた。次でウイルスは多少の増減を伴いつゝ斃死するまで高値を持続した。

斃死後の脳内ウイルスの消長を5例の山羊（斃死後5～24℃に放置）で検査したが、最も長期間に亘つたNo. 4と5の例では、35時間のLD₅₀ 6.2～6.4であつたが、40～45時間後には5.2～5.6と低下していた。

注射後24時間より全例について Viremia の有無を検

査したが、悉く陰性であつた。然し Konrádi,¹²⁾ Hermann,¹³⁾ Wong & Freund¹⁴⁾ 等は兎、モルモット、マウス等で陽性成績を報告しているが、特に Wong & Freund はウイルス注射後3時間以内のマウス血中にのみウイルスを証明していることからみて、私共の陰性結果は尙お検討すべき余地があると考えられる。

以上の成績から脳内注射山羊に於ける脳内ウイルスは注射後95時間即ち、頭部下垂期から急激に増殖し、其のままの状態で斃死するまで持続することを知つた。然し乍ら、この脳内ウイルスの増殖期は長時間持続するので、ワクチン材料としての採材時期を決定するため、多数例により石炭酸不活化ワクチンを作出し、MLD P-V を測定すると共に、脳及脊髄内のウイルス量を検討した。

2. 各症状別による脳及脊髄内ウイルス量

経過時間と症状とが一致した注射山羊のみを各2～3頭宛選び、各症状群毎に混合した脳及脊髄内のウイルス量を測定し、第2表の様な結果を得た。

脳内ウイルスのLD₅₀ は3回の実験を通じ、頭部下垂群6.5～7.8、横臥直後群6.5～7.4、横臥後5時間群6.0～7.0、横臥後10時間群6.3～7.8、横臥後15時間群6.8～7.8を示した。

脊髄内ウイルスのLD₅₀ は、末期に至るに従つて稍々増加する傾向がみられたが、多数の研究者達⁹⁾¹⁵⁾¹⁶⁾によつて指摘された如く、脳内ウイルス量（6.0～7.8）に比して低値（4.6～6.7）であつた。

本実験と生体連続検査との結果は、略々一致する傾向がみられ、頭部下垂は96～97時間で、横臥は110時間で出現し、脳内ウイルスも頭部下垂期より常に高値を示していた。

3. 各症状別山羊脳による石炭酸不活化ワクチン

第2表 各症状群別山羊の脳、脊髄内ウイルス量
及石炭酸不活化ワクチンとしての免疫元性

症状群	試験番号	山羊頭数	経過時間	注射毒 (西ケ) 原株 LD ₅₀	LD ₅₀		MLD P.V.
					脳	脊髄	
頭部 下垂	1	3	96	6.5	6.5	5.0	154,100
	2	3	97	6.2	7.8	5.8	1,062
	3	2	97	6.2	6.6	4.6	100,700
横臥 直後	1	3	110	6.5	6.8	5.4	•
	2	3	110	6.2	7.4	5.7	•
	3	3	110	6.2	6.5	4.7	•
横臥後 5時間	1	3	115	6.5	6.0	5.8	1,820
	2	3	115	6.2	7.0	5.9	49,200
	3	3	115	6.2	6.2	5.6	19,360
横臥後 10時間	1	3	120	6.5	7.1	5.4	50,940
	2	2	120	6.2	7.8	6.7	•
	3	2	120	6.2	6.3	5.4	•
横臥後 15時間	2	3	125	6.2	7.8	6.3	194,100
	3	2	125	6.2	6.8	5.4	33,190

実験2に用いた脳で調製し、何れも24~26°C 30日保存で死毒化した。その免疫元性は第2表の様である。

即ち、MLD P-Vを測定したワクチンは計9例であるが、中2例(頭部下垂群の試験2と横臥後5時間群の試験1)を除き何れも高いP-Vを示し、症状群別による優劣を見出すことは出来なかつた。

第2図 症状群感染山羊の脳内ウイルス量と
ワクチン力価との関係

脳内ウイルス量とワクチンのMLD P-Vとの関係は、第2図にみられる様に、試験2の外は両者の増減が略々一致していた。

結 論

私共は狂犬病固定毒(西ケ原株兎脳毒)を脳内注射した山羊について、経過を追つて、症状、脳、脊髄、血液中のウイルス量、脳の不活化ワクチンとしての免疫元性を追求し、次の結論を得た。

1. 経過、症状と脳内ウイルス量：脳内注射後の山羊は次の様な経過によつて、症状と脳内ウイルスの増殖に關聯がみられた。

48時間—発熱、ウイルス陰性。

72時間—発熱、ウイルス微量発現。

80時間—体温41°C内外、ウイルス低値。

95時間—発熱稍々下降、食慾不振、頭部下垂、四肢開張、ウイルス量急激に上昇。

100時間以後—発熱持続、偏針転倒、膝折、蹲居、横臥(時に流涎)、ウイルス量高値持続。

105~150時間—体温急下降、ウイルス量高値持続。

斃死後—40~45時間でウイルス量低下。

2. 脊髄内ウイルス量：経過の末期に至るに従つて、稍々増加する傾向を示したが、脳内ウイルス量に比し遙に低値であつた。

3. 血中ウイルス：注射後24時間から検査した6例の山羊では、其後の経過中全例が血中ウイルス陰性であつた。

4. 石炭酸不活化ワクチンとしての免疫元性：頭部下垂期から横臥後15時間に至る、各時期の脳から作出したワクチンの免疫元性は、総て有効なMLD P-Vを示した。

擧筆に當つて、御指導と御校閲を賜つた中村所長及び高松部長に深謝し、室員各位の御助力を感謝する。

文 献

- 1) 安東清, 石井慶藏等: 細菌時報, 18, 1~9, 1952.
- 2) 高松泰人, 大島康夫等: 日本獣医師会雑誌, 5, 216~219, 1952.
- 3) 神沢謙三: 陸獣医報, 398, 1~12, 1942.
- 4) 杉田文雄, 上野安雄: 陸獣医報, 413, 1233~1249, 1943.
- 5) 近藤正一, 大橋正之助: 獣疫調査所研究報告, 4, 23~28, (1921)
- 6) Fermi, C.: Zbl. Bakt. I. Orig., 50, 438~441, 1909.
- 7) Sabin, A. B. & Ruchman, I.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 44, 572~577, 1940.
- 8) 幡谷正明, 臼井和哉: 日本獣医学雑誌, 13, 299~300, 1951.
- 9) Reed, L. T. & Muench, H.: Amer. J. Hyg., 27, 493~497, 1938.
- 10) Michigan Department of Health: Method

for production of rabies vaccine.

- 11) Habel, K.: Pnb, Health Rep., 55, 1473~1487 1940.
- 12) Daniel Konrádi: Centrabl. f. Bakt., I. Orig., 47, 203~212, 1908.
- 13) Otto Hermann: Centrabl. f. Bakt., I. Orig., 94, 201~204, 1925.
- 14) Wong, D. H. & Freund, J.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 76, 717~720, 1951.
- 15) 伊藤定隆: 北里実験医報, 24, 67~83, 1951.
- 16) 岩村一治, 佐沢弘士等: 家畜衛試研究報告, 25, 71~82, 1952.