日本脳炎ワクチンの研究に関連して調べられた マウス脳と鶏胎児との比較

伊東平八, 小林富久男, 戸田光敬, 高下逸郎, 北川三朗 *

HEIHACHI ITOH, FUKUO KOBAYASHI, MITSUYOSHI TODA, ITSURO TAKASHITA
AND SABURO KITAGAWA: STUDIES ON MOUSE BRAIN AND CHICK
EMBRYO TISSUE IN CONNECTION WITH PREPARATION OF
JAPANESE ENCEPHALITIS VACCINE.

[受稿: 10月1日, 1954]

過去約3年の間に私共が行つた日本脳炎ワクチンの研究に関連して, マウス脳及び鶏胎児に就いていくつかの事が明らかになった。マウス脳と鶏胎児との全般に亘る比較ではなくて, 実地に関連性の多い立場からの一断面であるけれども, 一先ず簡単に記述して御参考に供し度いと思う。

実験材料並に方法

詳細は各項目下に述べる事として, ここでは一般的のものを挙げる。使用病毒株は日本脳炎中山株で予研より分与された。多数代マウス脳を通過している。マウスは市販の雑系白色マウスで埼玉の動物商から購入された。鶏胎児の試験は主として孵化12日のそれに就いて行われた。感染鶏胎児は卵初代の材料に限られている。すべて生きている胎児を用いた。感染価測定其他病毒材料希釈には磷酸緩衝食塩水 (後述) に2%の濃度に卵黄¹⁾を加えたものである (以後YBSと略記)。製法は安東等に拠つた。磷酸緩衝食塩水 (BSと略記) としてはM/75でpH7.5前後のものを用いた。

成 績

1. マウス脳及び鶏胎児の総窒素量

感染させてないマウス脳 (MBと略記) 及び12日卵鶏胎児 (CEと略記) に就いて試験した。材料をワクチン調製法に従つて, ホモナイザーを用いて夫々10%及び20%のBS浮游液とし80 mesh 金網を通過した材料にホルマリンを0.2%になる様に加えて用いた。CEでは少量の寒天様組織片が金網上に残り除去された。MBは8~10gのマウスから集められた12個で4g強で

あつた。CEは5個の12日卵から集められ1個平均重量は5.08gであつた。総窒素量の測定はMikrokjedahl²⁾法に拠つた。尚この材料にホルマリンを加える前, 一部を取つて水平遠心器で2,500r.p.m. 15分間遠心し (感染価測定は此の遠心速度及び時間で行われた), 上清を分離し又沈渣にBSを加え原量に戻した浮游液とを得, 上同様にホルマリンを加えてNを測定した。

以上の成績をTable 1に示す。但し表には得た数値をMBでは10倍, CEでは5倍して夫々の組織1gから由来したN量として示した。

Table 1. Total Nitrogen of MB and CE tissue

Tissue	Before centrifugation	Supernate	Sediment
MB	18.3	8.6	10.8
CE	8.1	7.2	0.7

MB and CE indicates mouse brain and 12-day-old chick embryo tissue respectively.

Figures indicate mg of Nitrogen from one gram of wet tissue.

Centrifugation at 2500r.p.m. for 15 minutes by horizontal centrifuge.

表に示される様に MB の Total N 量は12日卵 CE の2倍以上である。又遠心分離によつて沈渣に移行するNはMBの方が遙に多い, CEでは思つたより少かつた。MBでは上清に残るNよりも沈渣のNの方が大であつた。尚此の試験の他に感染材料を以つて造られたワクチンに就いても同様な数値が繰返し得られている。

2. 乾燥重量

* 北里研究所実験病理部 (部長 岡本良三博士)

感染させてない MB 及び 12 日卵 CE に就いての成績は次の様である。MB は体重 10~11g のマウス 5 匹から集められた、CE は 1 個宛を 1 個の秤量瓶に入れた。材料はピンセットを用いて瓶内で砕いた後に、電熱式減圧乾燥器内に入れて P_2O_5 を乾燥剤として最高 $110^\circ C$ 3~5mmHg 迄引いて恒量になる迄乾燥した。

Table 2. Total solids per cent of MB and CE tissue.

Material		WW _g	DW _g	DW/WW%
MB		1.580	0.325	20.56
C E	1	3.686	0.300	8.14
	2	3.692	0.306	8.29
	3	3.211	0.248	7.72
	4	3.882	0.311	8.01
	5	3.767	0.271	7.19
	6	4.126	0.319	7.73
	Avg	3.727	0.293	7.87

WW = wet weight. DW = dry weight. Avg. = average.

MB represents a pool of five brains.

CE indicates 12-day-old chick embryo.

成績は Table 2 に示されている。別の時に感染材料を以つて行われた成績も大体同程度であつて、12 日卵 CE では固形分は 8% 前後にあり、MB では 20% 前後にあつた。即ち MB は CE に比べ約 2 倍半の固形分を持つている事が分つた。ちなみに表に示した試験時の孵卵温度は約 $100^\circ F$ 、湿度は約 55% であつた。

尚乾燥重量と Total N との関係は、(乾燥重量 1g 当りの N (mg)) Table 1 及び 2 から

$$MB : \frac{18.3}{0.2056} = 89.0mg/g \text{ D.W.}$$

$$CE : \frac{8.1}{0.0787} = 102.9mg/g \text{ D.W.} \quad \left(\begin{array}{l} \text{D.W.} = \\ \text{乾燥重量} \end{array} \right)$$

となり、MB に於いては固形分の約 1/11、CE では 1/10 が N であると推定された。

3. 感染 MB 及び CE に於ける感染価

MB, CE 共に病毒増殖が最高であると思われる材料について試験が行われた。此の様な材料は後に述べるワクチンの出発材料等になるものである。感染組織の MB に於いては 10%, CE に於いては 20% の浮游液を造り 2,500r.p.m. 15 分遠心した上清から YBS を用いて 10 倍通減稀釈し、その適当な数稀釈 0.025ml を 8~10g のマウス脳内に接種し 14 日間観察後 Reed and

Muench の方法で LD_{50} を算出した。1 稀釈についてマウスを 4 匹宛用いた。

12 日卵 CE の titer は昭和 27 年 3 月から 11 月迄に行われた 14 回に亘る test に於いて卵総数 108 個が 4~12 個の pool で調べられ、その LD_{50} の Negative log は次の様であつた。>7.77, >7.50, 7.25, 7.00, >6.79, 6.67, 6.67, >6.50, 6.50, 6.50, 6.45, 6.23, 6.00, 5.75。大凡 6.2 から 7.2 の間に入る事が多いと考えた。一方 MB の titer は、上の CE の titration によく匹敵する条件を具えたものを選ぶと、昭和 27 年 4 月から 28 年 6 月に亘る間に行われた 12 回の test に於いて、MB 総数 170 個を 2~27 個の pool に分けて調べられた其の成績は、>9.00, 8.50, 8.38, 8.33, >8.25, >8.23, >8.23, >8.00, 8.00, 8.00, 7.75, 7.50 であつて大凡 8.00~8.50 の範囲に入るものが多いと考えられる。即ち上述の範囲を夫々に就いて仮にとれば、MB の LD_{50} は CE のその最小 6.3, 最大 200 倍となる。

4. 遠心上清の総素量と感染価との関係

Table 1. 上清の欄に示された 8.6mg 及び 7.2mg は夫々 MB 及び CE の湿重量 1g に就いて遠心操作で上清に移行する N 量である。一方感染価は組織湿重量約 0.025g に就いての数値である (0.025cc を脳内に接種した)。従つて LD_{50}/mgN (上清) を MB 及び CE 夫々に就いて求めれば、

$$MB : 10^{8.00-8.50} \times \frac{1,000}{25} \times \frac{1}{8.6} = 10^{8.67-9.17}$$

$$CE : 10^{6.20-7.20} \times \frac{1,000}{25} \times \frac{1}{7.2} = 10^{6.94-7.94}$$

となり、MB が CE の最小約 5.4, 最大約 170 倍と計算された。上清中に含まれる N で感染性と関係のないものが CE に於いて多いのではないかと考えられる。

参考迄に之に関連した 1, 2 の予備試験成績を挙げると、MB に於いて遠心上清の titer, 及び沈渣を原量に戻したものゝ titer は、夫々 >8.25 及び 8.33 であり略同量の感染性が遠心によつて两部分に分けられる事が分つた。

尚 CE では、同様な test は今迄行われていないが、遠心しない材料そのまゝと、遠心上清との titer は夫々 6.53, 6.67 で小差であるが矛盾している。或は、沈渣には感染性の多くは移行しないと考えられるかも知れない。

5. MB 病毒と CE 病毒についての交叉補体結合試験

(感染マウス脳内のウイルスをMBウイルス、感染鶏胎児組織内のウイルスをCEウイルスと略称する。)

〔実験方法〕

免疫血清：MBウイルス免疫血清はモル (モルモット) 脳内に中山株 MB10⁻² 希釈 (希釈液BS) 0.15ml を10日間隔で2回接種し、第2回注射後7日、8日、9日と連続3日に亘つて心臓穿刺によつて得た血清を約-20°Cに凍結して保存した。CEウイルス免疫血清は接種された材料が異なる以外はすべて同じ処置が施された。接種された材料は卵初代のCEウイルスで9日卵に接種し3日後に採取した胎児をBSで20%浮游液としその遠心上清を用いた。

抗原：CASALS の凍結融解⁴⁾ 抗原及び ESPANA AND HAMMON のベンゾール抽出^{5,6)} 抗原の調製法に準じて造られた。(凍結融解抗原は12日卵で造られ、ベンゾール抽出抗原は11日卵で造られた。凍結融解抗原は抗補体作用がとれ難く、凍結融解の回数を増加しても目的を果さなかつたので、本試験に於いては同時に test に用いられたMB抗原にとつては補体量が多くなつてい

る。成績の判定は本試験と平行して行われた補体の測定に於いてCE抗原列の補体1充単位含有の管が完全溶血を起した時に行われた。

補結試験術式：CASALS の方法に大凡準拠している。低温長時間 incubation の方法である。

〔成績〕

Table 3 a に示されてあるのは凍結融解抗原を以つて行つた成績である。用いられた抗原が弱く、又血清の titer も低い。然し表に示される様な box titration に於いて、homologous の関係にある抗原と抗血清とが反応している事が見られた。此の成績の一部は文献に報告されている。尙此の時の試験ではCE血清はMB抗原と全く陰性であつたが、以前の試験では或程度陽性を示すのであり、此の表の成績と併せて homologous の関係のものがより強く反応すると考え度い。又 MB血清は NMB 抗原と、CE 血清は NCE 抗原と弱度に反応し、而も hetero の関係にある中山抗原と反応していない。して見れば此処に見られた homologous の関係の陽性成績の一部は非特異的のものであると云

Table 3 a. Cross complement fixation test with MB and CE antigens against the corresponding immune guinea pig sera.

Guinea pig serum	Nakayama MB antigen					NMB antigen 1:1	Nakayama CE antigen					NCE antigen		Serum control
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16		1:1	1:2	1:4	1:4	1:16	1:1	1:2	
MB75	1:4	4	4	3	±	0	3	0	0	0	0	0	0	0
	1:8	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1:16	4	±	0	0	0	0	0						
	1:32	±	0	0	0	0	0							
	1:64	0	0	0	0	0								
MB72	1:4	4	3	2	±	0	±	0	0	0	0	0	0	0
	1:8	4	±	±	0	0	0	0	0	0	0			
	1:16	4	0	0	0	0								
	1:32	2	0	0	0	0								
	1:64	0	0											
MB74	1:4	4	4	3	±	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	1:8	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0			
	1:16	4	±	0	0	0								
	1:32	2	0	0	0	0								
	1:64	±	0											
MB76	1:4	4	4	2	0	0	±	0	0	0	0	0	0	0
	1:8	3	±	0	0	0	0	0	0	0	0			
	1:16	±	0	0	0	0								
	1:32	0	0	0	0	0								

CE78	1:4	±	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	0
	1:8	±	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	2	0	0
	1:16	0					0	4	3	3	±	0	0	0	
	1:32	0						3	0	0	0	0	0	0	
	1:64							±	0	0	0	0			
CE77	1:4	±	0	0	0	0	0	4	4	4	±	0	4	4	0
	1:8	0	0	0	0	0		4	±	0	0	0	0	0	
	1:16	0						±	0	0	0	0	0	0	
	1:32	0						0	0	0	0	0			
CE79	1:4	±	0	0	0	0	0	4	4	4	4	3	4	4	0
	1:8	0	0	0	0	0		4	3	±	0	0	±	0	
	1:16	0						4	±	0	0	0	0	0	
	1:32	0						0	0	0	0	0			
CE80	1:4	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	2	4	4	0
	1:8	0	0	0	0	0		4	4	3	±	0	±	0	
	1:16	0						4	2	0	0	0	0	0	
	1:32	0						±	0	0	0	0			
CE81	1:4	0	0	0	0	0	0	4	4	4	3	±	4	4	0
	1:8	0	0	0	0	0		4	2	0	0	0	0	0	
	1:16	0						4	0	0	0	0	0	0	
	1:32	0						0	0	0	0	0			
Antigen control		0	0				0	0	0				0	0	

NMB=normal mouse brain. NCE=normal chick embryo.

Antigens prepared by the Casals' method of freezing and thawing.

MB and CE sera were taken from guinea pigs immunized with infected mouse brain and chick embryo tissue respectively.

4=complete fixation. 3, 2, 1, ±=partial fixation. 0=no fixation.

わねばならぬであろう。

そこで今度はベンゾール抽出抗原を造つて見た。結果は満足すべきものでなかつた。NCE 抗原とCE血清との非特異反応が取れなかつたし、又中山 CE 抗原が弱かつた。(Table 3 b)

然し中山 CE 抗原に対して CE 血清が MB 血清に比して、より強く反応した事は、その一部が非特異的な CE 組織によるものであると考えられはするが、凍結融解抗原を以つてした成績との関連に於いて見逃さるべきではないと思う。尙此処で用いられた血清は Table 3 a の血清を pool したものである。

要之、此の様にして行われた交叉補結試験に於いて、非特異性の問題は一先ず措いて homologous の関係にある反応がより強かつた事を認めた。

6. 交叉中和試験の成績

〔実験方法〕

用いられた血清は交叉補結試験に於いて用いられたモル免疫血清混合であつて、血清分離後及び混合後約 -20°C に凍結保存されていたものである。交叉補結試験から約 2 年後に中和試験が行われた。防腐剤は加えず、又勵性のまま用いられた。術式はマウス脳内中和試験であつて稀釈されない血清に等量の病毒各稀釈が混合され、37°C 30 分温浴槽中に放置後氷水中に漬けてマウス脳内に 0.025ml 宛接種された。病毒はマウス脳系の MB 浮游液及び CE 初代の 12 日卵 CE (新鮮材料) 浮游液を用い、浮游液及びその稀釈には YBS を用いた。Negative Control には YBS が用いられた。マウスは埼玉の雑系であるが生後日数は凡そ 4 週である。接種後 14 日間型の如くに観察し、REED and MUENCH の方法に従つて各群の LD₅₀ を算定し Negative Control

Table 3 b. Cross complement fixation test with MB and CE antigens against the corresponding immune sera.

Guinea pig serum	Nakayama MB antigen #2					NMB antigen #2	Nakayama MB antigen #2					Nakayama CE antigen #3					Nakayama CE antigen #3					NCE antigen #2								
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:1	1:2	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:1	1:2	1:4					
MB p. s. 1	1 : 4	4	4	4	4	4	0	0											4	±	0	0	0	0	0			0	0	0
	1 : 8	4	4	4	4	4	0	0											3	0	0	0	0	0	0			0	0	0
	1 : 16	4	4	4	4	4	0	0											±	0	0	0	0	0	0			0	0	0
	1 : 32	4	4	4	4	3											0	0	0	0	0	0								
	1 : 64	4	4	4	4	2											0	0	0	0	0	0								
	1 : 128	4	4	4	4	0											0	0	0	0	0	0								
CE p. s. 1	1 : 4	4	4	4	4	0	0	0	4	4	4	4	0	4	4	3	3	3	4	4	4	3	2	4			1	0		
	1 : 8	4	4	4	4	0	0	0	4	4	4	4	0	4	4	±	±	0	4	±	0	0	0	4			0	0		
	1 : 16	4	4	4	4	0	0	0	4	4	4	3	0	4	3	0	0	0	3	0	0	0	0	3			0	0		
	1 : 32	4	4	4	3	0											0	0	0	0	0	0								
	1 : 64	4	4	4	0	0											0	0	0	0	0	0								
	1 : 128	0	0	0	0	0											0	0	0	0	0	0								
Antigen control	0					0		0					0					0					0							
Date of test	12/26 51										1/23 52										1/20 52									

Antigens prepared by the method of Benzene extraction.

MBp.s.1=MB sera in Table 3a were pooled and used.

CEp.s.1=CE sera in Table 3a were pooled and used.

Table 4. Cross neutralization test between sera and viruses from homologous and heterologous origin.

Guinea pig serum	MB virus dilutions tested					LD ₅₀ log	N.I. log	CE virus dilutions tested					LD ₅₀ log	N.I. log
	10 ⁻⁵	-6	-7	-8	-9			10 ⁻³	-4	-5	-6	-7		
MB.p.s. 1	3/4	9/4	1/3			-5.47	2.20	4/4	2/3	1/4			-4.45>	2.55
CE.p.s. 1	3/4	9/3	9/4			-5.00<	2.67<	4/4	4/4	9/4			-4.50	2.50<
Control		4/4	4/4	1/4	9/4	-7.67			4/4	4/4	4/4	2/4	-7.00>	

Date of test: 3/8/54.

MB virus=infected mouse brain suspension.

CE virus suspension of infected 12-day-old chick embryo tissue.

N.I.log indicates logarithm of Neutralization Index.

The same pooled guinea pig sera were used as in Table 3b.

の LD₅₀ と比較して中和指数を求めた。Table 4 には N.I. log として示してある。

〔成績〕

表に見られる所から、中和試験に於いては同じ血清が前述の補結試験に於いて示した様な関係は認められなかつた。勿論此の Test の結果からして、MB 免疫血清と CE 免疫血清とが一般的に交叉中和試験で違った態度をとらないとは言えない。然し此処では、補結試験で異つた態度をとつた同一血清が中和試験では殆んど差を認めなかつたという事柄を述べる。

7. ワクチンを以て行つた交叉免疫試験の成績

(此の成績及び8.に述べる成績は第26回日本細菌学会で口演された。又北里実験医学に印刷予定である)

〔実験方法〕

免疫にはMB及びCEワクチンを用いた。即ちマウ×腹腔内 (i.p.) にワクチン 0.25ml 宛を第1週に隔日3回、翌週同じく隔日3回計6回繰返す(例えば火、木、土、火、木、土と6回行ふ)、次いで初回免疫より14日後にMB病毒、CE病毒の数稀釈を以つて0.025

ml 宛脳内に攻撃した。攻撃後14日間型の如く観察し、免疫群及び無処置対照群について LD_{50} を求め、之等の対数の差を防禦指数対数として防禦力を比較して見た。マウスは埼玉の雑系で免疫開始時の体重が11~13 g の雌を用いた。日令は詳かでない。

用いられた MB ワクチンは感染マウス脳10%浮游液を BS で造り 2,500 r.p.m. 15分の上清を採つてホルマリンを最終濃度 0.2 % になる様に加えたものである。

CE ワクチンは10日卵の卵黄嚢内に MB 病毒を接種し 2 日後に胎児を採つて BS を以つて 20% 浮游液とし 2,500 r.p.m. 15分の上清にホルマリンを 0.2 % になる様に加えた。不活化は両ワクチン共に 2~8°C で行つた。

Table 5 a に CE #13, 15 とあるのは #13, #15 の両ワクチンを等量混合して使用したのである。CE ワクチンは稀釈せずに用い、MB ワクチンは免疫の都度 BS で 1:20 に稀釈して用いた。

攻撃病毒は、MB は感染 MB を -20°C ~ -25°C に約 2 日凍結保存したものが用いられた。YBS を以て、

10% 浮游液の 2,500 r.p.m. 15分の上清を造り之を 10^{-1} 稀釈と考えた。CE 病毒は12日卵の感染 CE の 20% 浮游液遠心上清を MB と同様に造り、之を凍結乾燥して低温に保存して置き 1~2 ヶ月後に用いられた。再浮游は滅菌蒸留水を用い、原組織の 10% 浮游液になる濃度で低速遠心した上清を 10^{-1} と考えた。ついで YBS を以つて 10 倍通減稀釈を行い攻撃に使用した。

〔成 績〕

Table 5 a 及び 5 b 中に示される MB 及び CE ワクチンは Table 6 に示す様な計算を行つた場合 夫々の使用濃度で夫等の不活化前感染価は大凡四敵している。しかも MB 病毒攻撃に於いても、CE 病毒攻撃に於いても MB ワクチンの防禦力が優れている。即ち homologous の組織由来の病毒で攻撃したとき、防禦力がより強く表われると云う関係は見られなかつた。

尙 2 回の test を通じて CE 病毒攻撃の場合 MB 病毒攻撃に比べて防禦が劣っている点が注目される。又 CE 病毒攻撃の場合は此処に示した以外の試験成績を

Table 5. Cross immunization test in mice vaccinated with either MB or CE vaccine, challenged intracerebrally with the corresponding both viruses.

a) Date of test : 9/18/52

Challenge Virus	Vaccine	Virus dilutions inoculated								LD_{50} log	Protective Index
		10^{-2}	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9		
MB	MB #7 1:20		$\frac{1}{6}$	%	$\frac{1}{6}$	$\frac{1}{6}$				-2.8 ?	1000.000 < ? 32 <
	CE #13,15 1:1			%	%	$\frac{1}{6}$	%			-6.3	
	Control					$\frac{5}{6}$	$\frac{1}{6}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{6}$	-7.8 >	
CE	MB #7 1:20	$\frac{3}{6}$	$\frac{1}{6}$	%	%					-2.3 <	500 < 25
	CE #13,15 1:1	%	$\frac{5}{6}$	$\frac{3}{6}$	%					-3.6	
	Control		$\frac{5}{6}$	$\frac{4}{6}$	$\frac{4}{6}$	$\frac{1}{4}$				-5.0	

b) Date of test : 10/9/52

Challenge virus	Vaccine	Virus dilutions inoculated								LD_{50} log	Protective Index
		10^{-2}	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9		
MB	MB #7 1:20		$\frac{5}{6}$	$\frac{3}{6}$	$\frac{3}{4}$	$\frac{1}{6}$				-5.2 >	250 ? 63 <
	CE #17 1:1			$\frac{5}{6}$	$\frac{1}{6}$	$\frac{2}{6}$	%			-5.8	
	Control					$\frac{5}{6}$	$\frac{1}{6}$	$\frac{1}{6}$	$\frac{1}{4}$	-7.6 >	
CE	MB #7 1:20		$\frac{4}{6}$	$\frac{1}{4}$	%	%				-3.7	80 10
	CE #17 1:1		%	$\frac{4}{6}$	$\frac{2}{6}$	%				-4.6	
	Control			$\frac{5}{6}$	$\frac{5}{6}$	$\frac{1}{6}$	%			-5.6	

MB vaccine 1:20 = 1:20 dilution of formalized 10% MB vaccine, centrifuged.

CE vaccine 1:1 = Undiluted formalized 20% vaccine prepared from infected 12-day-old CE, centrifuged.

Mice given 6 intraperitoneal doses of 0.25ml of vaccine in 2 weeks, challenged 2 weeks after the first dose of vaccine.

Table 6. Comparison of protective power of MB and CE vaccines on the basis of their infective titers before inactivation.

a)

Vaccine	Protection test		Infectivity before inactivation LD ₅₀ log	
	No. of tests	P.I. Log	Original material	Diluted vaccine tested
MB 1 : 20	25	>5.6~2.2	-8.0 ~ -8.5	-5.7 ~ -6.2
CE 1 : 1	3	ca. 1.5	- 6.2	- 5.5
		ca. 1.8	- 7.3	- 6.6
		ca. 1.9 *	- 6.7 *	- 6.0 *

b)

Vaccine	Protection test		Infectivity before inactivation LD ₅₀ log	
	LD ₅₀ log	P.I. log	Original material	Diluted vaccine tested
MB #8 1 : 20	-3.3<	4.1<	-8.5	-6.2
do. 1 : 40	-5.0 ?	2.4 ?	d.o.	-5.9
CE #22 1 : 1 *	-5.5<	1.9<	-6.7	-6.0
Control	-7.4			

P. I. log indicates logarithm of Protective Index.

Protection test were made by the method outlined in the note of Table 5.

* This vaccine was prepared from uncentrifuged suspension.

も含めて、より強い病毒接種の所で免疫マウスが反つて多数生残すると云う様な矛盾現象は見られていない。

此の項目で示した成績に関連して次の文献等があるが、此の試験に於いては試験動物がマウスである事、免疫が i.p., 攻撃が脳内でルートが異なる事、又免疫回数が多い事等を注意しなければならないであろう。

8. MB 及び CE ワクチンの防禦力と不活化前感染価との関係

Table 6 a に示される様に前項目で述べた術式によるマウス防禦試験の成績は MB ワクチン 0.5% に於いてはワクチン 7 lots 検査総数 25 回、20% CE ワクチンでは 3 lots 合計 3 回の試験に於いて、MB ワクチンの P. I. log はすべて 2.0 以上を示し、内 70% は 3.0 以上であつたが、CE ワクチンでは大体 2.0 以下に止つた。而も感染価の項目で述べた如く MB ワクチンの出発材料の感染価は 10^{-8.0}~^{-8.5} と推定され、之を 0.5% 浮游液にする時は 10^{-5.7}~^{-6.2} と考えられるから、20% CE 浮游液の感染価と略々同等のものである。

Table 6 b では MB ワクチン 0.25% の成績も示した。此の成績からすれば、MB と CE ワクチンとの防禦力は夫々の不活化前感染価に平行せず、MB の方が不

釣合に良い様に思われる。

尙此際用いられたワクチンの総窒素量は CE (20%) が MB (0.5%) の 33~38 倍に当っている事を附加える (計算は Table 1. の数字による)。

9. MB 病毒及び CE 病毒の加温材料を添加した場合の両種病毒感染価への影響

前項目に述べた様に、此の防禦試験術式によつて知られた防禦力は、ワクチンの不活化前感染価を基礎として考える時 MB が CE に比して不釣合に良い。之は何に因るのであろうか、種々の事が考えられるが、感染 MB (遠心上清) には感染性に関係なく免疫力に関係するものがあるのではないかと、又 MB には此の様な性質のもの又は何か他のもので感染性を干渉するものがありはしないか、即ち MB の titer は見掛上低く出ているのではないだろうか等と考えられる。

又 CASALS AND OLITSKY¹¹⁾ の報告にある様な脳から取られた抑制物質、或は所謂脳内抗体の早期に現われたもの等が考えられる。CE¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾ では抗体産生がないと云う事²¹⁾²²⁾は一般に認められている。

別な面から考えて試験術式に含まれる、例えば免疫動物としてマウスを用いて同種及び異種のワクチンを比較していること、又免疫回数が多いと云う様な条件

が考えられる。実際現在迄に私共が得た成績（未発表）で之等を暗示する様なものもある。

ここでは凡そ此の様な関連に於いて実験を行つたが他の観点からの考察も若干含ませる。

〔実験材料並に方法〕

感染したMB及びCE組織浮游液の60°C30分加温した材料を夫々 MB Extract, CE Extract と呼ぶ事にする。MBは病毒を脳内に接種して4日後に症状の顕著なもの5~21個を1つの pool としてワクチン調製の時と同方法で採取し、YBSを以つて10%浮游液として2,500 r.p.m. 15分の上清を取り、之を60°C30分1~4回加温したものが用いられた。対照として同時に入手された無処置マウス同数から同方法でExtractを造り NMB Extract として用いた。又1つの Extract は20%の濃度で造られた。

CE Extract は9日卵の卵黄嚢内に MB病毒を接種し3日後に胎児組織を採り MB Extract 同様に処置した。但し濃度は20%である。又1つの Extract は40%の濃度で造られた。無処置材料から同方法で造られたものを NCE Extract と呼ぶ。

之等の Extract 中の病毒は感染力がないものと思われる。

試験に用いた病毒はMBでは1回の test を除いてはすべてその日に採脳された新鮮材料であつた。残りの1回は15日間凍結保存されたものが用いられた。CE病毒はExtractを加温してないものと全く同じで3~15個が pool された新鮮材料を用いた。両病毒はYBSで10%又は20%の濃度に造られ2,500 r.p.m. 10~15分の上清を 10^{-1} 又は 5^{-1} 稀釈と考えた。

Fig. 1 の註*に示した試験では 10^{-1} の病毒をMBは20%及び5%の Extract, CEは40%及び10%の Extract で10倍通減稀釈した。其の他の試験では 5^{-1} から始まる病毒の10倍通減稀釈を同量の10% MB Extract 又は20% CE Extract と混合した。(Extract 中の組織の最終濃度は夫々5%, 10%となる)

之等を37°C30分温浴槽内に置き(氷水に30分放置したのみで接種した場合もあるが一応同等に扱つて表に収めた) 適当な数稀釈の0.025ml 宛をマウス脳内に接種して型の如く観察後 LD₅₀ を算定し比較した。

マウスは埼玉の雑系で雌雄を問わず、4週のマウスを用いた時と13~15g (約5~6週と云う) のを用いた時とがある。一稀釈について4~5匹宛を用いた。

同時 test に於ける比較すべき一対毎に図に示したの

が Fig. 1 である。

〔成 績〕

Fig. 1. A. に於いては感染した MB Extract と CE Extract とを比較している。小差ではあるけれども CE Extract を用いた時の方が感染価は高くでている。MB病毒を用いても CE 病毒を用いても同様であつた。

B. 感染した MB Extract を用いると NMB Extract に比して LD₅₀ が低く出る傾向が見られる。

C. 感染していない組織の Extract を比較すると CE Extract を用いた方が LD₅₀ が高く出る傾向があつた。

D. CE Extract に於いては Extract が感染した材料から又はしていない材料から造られてもその間に甲乙を認める事が出来なかつた。

E. 感染した CE Extract と感染していない MB の Extract とを比べた場合 MB 病毒に対しては両者間に甲乙をつけられなかつたが CE 病毒に対しては NMB Extract の方が感染価が低く出た。

以上を私共は一応次の様に表現してみる。

1. 中山 MB Extract は中山 CE Extract に比べて病毒の感染力に対する阻止作用がある。

2. 中山 MB Extract は NMB Extract に比べて阻止作用が強い。

3. NMB Extract は NCE Extract に比し阻止作用を示す。

4. 中山 MB Extract の阻止作用は NMB Extract が示す非特異的な阻止作用を除いても尚若干の阻止作用を有つと考えられる。

5. 中山 CE Extract と NCE Extract との間に阻止作用の甲乙は附け難い。

6. NMB Extract と 中山 CE Extract とを比較すると MB 病毒に対する作用は甲乙を附け難いが CE 病毒に対しては前者が阻止的に働いている。之の説明は出来ない。

7. 中山 MB Extract 中に含まれると考えられる加温不活化毒を CE 病毒に加えても感染力を増強しなかつた。又 MB 病毒に加えても同様であつた。(B)

8. 中山 CE Extract 内の不活化毒を MB 病毒に加えても又 CE 病毒に加えても感染力増強については不明であつた。(D)

私共は此処に掲げた乏しい実験から多くを推論することを慎むのである。然し若し中山 MB Extract

Fig. 1. The effect of heated extracts from infected MB and CE tissue in virus titration.

MB extracts were used in the form of 5% suspension of tissue in 2% yolk buffered saline in final concentration, in another case (※) 20% was used.

CE extracts were two-fold high, i.e. 10% and ※ 40%.

Mice were inoculated intracerebrally with virus-extract mixture.

に見られた阻止作用の説明について抗体様のものの存在によるか、又は干渉現象によるかと云う2つを挙げて二者択一を迫られたならば、目下の所前者に軍配を挙げねばならないだろう。中山 CE Extract に阻止作用が明かでないことと云うことが干渉様の機序によつて説明しようとする場合に、更に解明されなければならない何段階かの階程を予想させる。

尤も此の様な実験に加温した材料のみを用いた事は適当でない、之はあく迄予備的な試験であるに過ぎないのであつて、私共は茲では私共の所謂 MB 病毒と CE 病毒と（感染組織浮游液）の差異に就いて述べれば足りるのである。

尙中山 MB Extract の阻止作用と云つても弱度のものであつて実験の繰返しによつてのみその存在を推定している。通常の術式で MB 病毒の感染価を測定する場合、測定材料そのものに含まれると思われる此の阻止作用は殆んど影響なく、CE 病毒の時に比べて、実際にあるよりその値を著しく低く見せ掛けて居ると云う事はないと考えられる。

此の様に考えて来ると感染価とワクチン力価との関係で述べた所から感染 MB 組織浮游液中には抗体様の物質もある他感染性を持たず免疫原性をもつものがある又は CE に比べて多量にもつと云う事になるのかも知れない。

結 語

ワクチンの製造に関連して MB 組織と CE 組織、及び夫等の感染した結果得られた諸性状に就いて多少とも知つて置きたいと云う願が私共にあつたが為ら便ある毎に試験を重ねて行つたのが此処に記述した所である。従つてやゝ取りとめのない成績の羅列であつた事をお断りしたい。

簡単に云えば、ここに調べられた MB 組織及び CE（主として12日卵）組織の間には種々の点で差異が認められる。即ち総窒素量、遠心分離による分れ方、凝固形分比率、単位窒素量当りの感染性、之等に於ける差異は明かであつた。補体結合試験に於いて、中和試験で差が認められなかつた血清に差を認めた事は今後の問題となる。マウス防禦試験によるワクチンの防禦賦与性と不活化前感染価との関係に於いて、MB と C

E との間に差が認められた。又加温した感染組織浮游液の病毒阻止能力について、両者間に差が認められた。

之等から若干の考察が行われたが尙多くを今後の実験に俟たねばならない。

終に北里所長、滝田副所長に敬意を表し、終始御援助を賜つた岡本部長に深謝する。

文 献

- 1) 安東他：日本脳炎，1948-49，38，日本脳炎調査研究協議会，1950.
- 2) 弘中：北里実験医学，23，(4) 139-149，1951.
- 3) 落合，津田：有機微量小量定量分析法，科学書院，1942.
- 4) Casals, J. & Palacios, R. : J. Exp. Med., 74, (5) 409-426, 1941
- 5) Espana, C. & Hammon, W. M. : J. Immunol., 59, (1) 31-45, 1948.
- 6) 伊東，戸田，林：日本脳炎，1950-51，53，日本脳炎調査研究協議会，1952.
- 7) 福住，伊東，戸田：日本脳炎，1949-1950，89，日本脳炎調査研究協議会，1951.
- 8) 伊東，岡本：第26回日本細菌学会にて口演，1953.
- 9) 伊東，高下山田，岡本：北里実験医学に発表予定.
- 10) Laidlaw, P. P. & Dunkin, G. W. : J. Comp. Path., 41, (1) 209, 1928. (cited in Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, 3rd Edition, 1946.)
- 11) Traub, E. : J. Exp. Med., 68, (1) 95, 1938.
- 12) Koprowski, H. & Cox, H. R. : J. Immunol. 54, 356-370, 1946.
- 13) 安東，石井，岡，藤崎，入江：細菌時報，18，10-16，1952.
- 14) Casals, J. & Olitsky, P. K. : Science, 108, 690, 1949.
- 15) Morgan, I. M., Schlesinger, R. W. & Olitsky, P. K. : J. Exp. Med., 76, 357-368, 1942.
- 16) Schlesinger, R. W. : J. Exp. Med., 89, 507, 1949.
- 17) Fox, J. P. : J. Exp. Med., 77, 487, 1943.
- 18) 林，中村，杉本，左奈田：Virus, 3, (4) 263-268, 1953.
- 19) 黒崎：日本細菌学雑誌，8, (4) 397-402, 1953.
- 20) 堀江，村上：Virus, 4, (2) 97-100, 1954.
- 21) Beveridge, W. I. B. & Burnet, F. M. : Spec. Rep. Series Med. Res. Council. London, No. 256, 1946.
- 22) Cox, H. R. : Ann. New York Acad. Sci., 55, 236-247, 1952.