- 22) Huang, C. H. : Further studies on the titration and neutralization of the western strain of equine encephalitis virus in tissue culture. *J. Exper. Med.*, 78, 111-126, 1943.
- 23) Bang, F. B., & Gey, G. O. : Comparative susceptibility of cultured cell strains to the virus of eastern equine encephalitis. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 91, 427-461, 1952.
- 24) Bubin, H., Baluda, M., & Hotchin, J. E. : The maturation of western equine encephalitis virus and its release from chick embryo cells in suspension. *J. Exper. Med.*, 101, 205-212, 1955.
- 25) Lennette, E. H., & Koprowski, H. : Interference between viruses in tissue culture. *J. Exper. Med.*, 83, 195-219, 1945.
- 26) Koprowski, H. & Lennette, E. H. : Effect of in vitro cultivation on the pathogenicity of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J. Exper. Med.*, 84, 205-210, 1946.
- 27) Gadusek, D. C., Anslow, R. O., & Hubbell, E. J. : Tissue culture studies of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. 1. Propagation in human uterine tissue. *J. Imm.*, 72, 224-228, 1954.
- 28) Enders, J. F. : Cytopathology of virus infections. (Particular reference to tissue culture studies). *Ann. Rev. Microbiol.*, 8, 473-502, 1954.
- 29) Youngner, J. S., Ward, E. N., & Salk, J. E. : Studies on poliomyelitis viruses in cultures of monkey testicular tissue. (Hanks' personal communication) *Am. J. Hyg.*, 55, 291-300, 1952.
- 30) Earle, W. R. : Production of malignancy in vitro. Iv. Mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Nat. Canc. Inst.*, 4, 165- 1943.
- 31) Jacobson, W., & Webb, M. : The two types of nucleoproteins during mitosis. *Exper. Cell. Res.*, 3, 163-183, 1952.
- 32) Reed, L. J., & Muench, H. : A single method of estimating fifty per cent end-points. *Am. J. Hyg.*, 27, 493-497, 1938.
- 33) Tyrrell, D. A. J., & Horsfall, F. L., Jr. : Neutralization of viruses by homologous immune serum. 1. Quantitative studies of factors which affect the neutralization reaction with Newcastle disease, influenza A, and bacterial virus T3. *J. Exper. Med.*, 97, 845-861, 1953.
- 34) Melnick, J. L. and Riordan, J. T. : Poliomyelitis viruses in tissue culture. IV. Protein free nutrient media in stationary and roller tube cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 81, 208-213, 1952.

ウイルス性疾患の治療に関する実験的研究

第1報 マウス脳脊髄炎の血清療法と一つの試み

中 川 洋* 神 田 幸 重*

YOH NAKAGAWA AND YUKISHIGE KANDA : EXPERIMENTAL STUDIES ON THE THERAPIES OF VIRAL DISEASES (I)

[受稿 6月22日 1955]

近年長足の進歩を遂げた化学療法は、一般病原細菌或はリケッチャや更に大型のウイルスによる疾患の治療を容易にし、人類の福祉に貢献するところ甚だ大であるが、小型に属するウイルスによる疾患に対して有効な化学療法剤或は治療法の発見はなお渋滞の現状である。従つて、これに関する探究は今日最も急を要する

課題の一つと言ねばならない。

便宜上、ウイルス性疾患治療剤の作用には、同程度の重要性をもつて2つの方向を考へることが出来る。云うまでもなく、その一つは直接ウイルスに働く方向であり、他の一つは感受性細胞に働いて感染の成立を阻害する方向である。そして、前者の効果を規定

* 久留米大学医学部細菌学教室 (主任 中川 洋 教授)

する重要な因子の一つは、その作用が細胞内にまで及び得るか否かと云う問題であり、後者にとつて重要なことは、細胞毒であつてはならないと云うことである。

しかして、吾人が最も容易に且つ手早く試みることの出来たウイルス性疾患の血清療法について、Rivers, Andrewes 等は、細胞内にまで及んで作用し得ない中和抗体に治療の効果を期待し得ないと主張したけれども、川喜田及び田崎或は Magill 及び Francis 等は中和抗体が細胞内にまで喰い込み得ることを明らかにした。更に本邦に於いては矢追が強力な免疫血清を用い、又川喜田は直接局所への投与と云う試みを通してウイルス性疾患に対する血清療法の価値を喚起した。

吾々はこれらの点について積極的な見解を明らかにする論拠は持たないけれども、治療の困難なウイルス性疾患に対して、血清療法が少くとも可能性ある一つの有力な手段である以上、より充分な量の抗体をより直接ウイルスに働かせるために更に一つの試みがなされるべきかと考えている。即ちそれは adjuvant の使用であり、本報に於いて吾々は免疫血清 γ -globulin を直接脳内に投与し、adjuvant として hyaluronidase を用いた血清療法の一つの試みが、マウス脳脊髄炎の実験的治療に有効であることを認めたので、これについて報告したいと思う。

実験材料並に方法

マウス：マウスは生後3～4週（体重約10g）の健康なものを使用した。

ウイルス：本実験に使用したマウス脳脊髄炎ウイルス GDVII 株はシカゴ大学の Rustigian 博士より分与をうけたものである。

免疫方法：マウス脳脊髄炎ウイルスに感染したマウス脳の10%乳剤を10,000r. p. m. 20分間冷却遠心沈澱を行い、その上清による生ウイルスをもつて家兎を免疫した。即ち、先ず静脈内に0.3ccより始めて2～3日間隔で0.5cc 2回、1cc 2回、2cc 2回、3cc 2回と順時増量して最後は4cc 宛免疫を繰り返した。そして最終回の免疫より20日後に採血して集めた血清は、血球凝集阻止価64,936倍であり、後に行つた中和試験の結果は中和対数2.1であつた。

免疫血清 γ -globulin の分割方法：方法は第1表に示した如く無水硫酸ソーダ（メルク）による塩析によつて分割した。即ち、先ず37°Cに温めた免疫血清に

終濃度16%になるまで無水硫酸ソーダを少量宛加える。これを37°Cに12時間保つた後、3000r. p. m. 15分間遠心沈澱を行つて上清を捨て、得られた沈澱を16%硫酸ソーダ溶液にて2回洗滌する。そして最後に得られた沈澱より更に塩液部分を濾紙でとり（透析の際に稀釈されるのを防ぐために）、次いで氷室中で48時間透析する。この間操作は出来る限り無菌的に行つたけれども、最後に streptomycin (SM. と略す) を0.1mg/cc 並に penicillin (P. と略す) を100u./cc の割に添加して、滅菌時計皿に移し37°Cで若干濃縮した後供試した。かくして得られた γ -globulin 溶液の中和対数は2.6であつた。

Table 1 Fractioning method of gamma globulin

hyaluronidase：本実験に使用した hyaluronidase は持田製薬の SPRASE である。

判定方法：感染マウス脳乳剤の 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 及び 10^{-7} 或は更に 10^{-8} 各稀釈液を各々5匹宛のマウスに脳内接種を行い、その後に各処置を行つた。かくして、それらの LD₅₀ を求める形式によつて治療効果を比較観察すると共に、潜伏期調和平均を求めて参考とし、マウスの観察は3乃至4週間注意深く行つた。其の他の方法は各項で夫々述べた。

A. 免疫血清並に免疫血清 γ -globulinの治療効果

〔実験方法〕 免疫血清 γ -globulin. 免疫血清更に对照としてブイオンをウイルス脳内接種後24時間目並に27時間目の2回、各0.03cc宛脳内に同一部位から注射した3つの群について観察した。しかし、 γ -globulin 溶液には streptomycin 並に penicillin が添加されているので、その他のいずれの材料にも同様に加えて供試した。(以後の実験に於いても同様である)

〔実験成績〕 成績は第2表に示した如く、免疫血清 γ -globulin を注射した群の LD_{50} と对照群の LD_{50} との対数差は -0.7 であり、平均潜伏期の延長と併せてその効果を窺うことが出来るが、原免疫血清だけの群では对照群との LD_{50} の対数差は殆んどみられず、平均潜伏期の延長のみがウイルス稀釈度の高い部分で認められた。

Table 2 Therapeutic effect of the immune serum and immune serum gamma globulin.

No. of exp.	* Treatment	Virus dilution	Result	Incub. period	LD_{50}	Log diff.
1	i.s. γ -globulin + SM. P.	10 ⁻⁴ -5 -6 -7	5/5 4/5 2/5 0/4	4.5 7.2 9.5	10 ^{-5.7}	-0.7
2	immune serum + SM. P.	10 ⁻⁴ -5 -6 -7	5/5 5/5 3/5 0/5	4.2 6.2 9.0	10 ^{-6.2}	-0.2
cont.	broth + SM. P.	10 ⁻⁵ -6 -7 -8	5/5 4/5 0/5 0/5	5.1 6.1	10 ^{-6.4}	

* intracerebral injection, at 24 and 27 hours after inocul.

**harmonic mean of incubation period

i. s. - immune serum

B. 免疫血清 γ -globulin と hyaluronidase の併用効果 (1)

〔実験方法〕 免疫血清 γ -globulin 並にこれに hyaluronidase を100u/cc の割りに添加して注射した2つの群と、生塩水に hyaluronidase のみ同じ様に添加して注射した群、更に对照として生塩水のみ群、即ち計4群のマウスについて観察した。なお、注射方法はA項に同じくウイルス脳内接種後24時間目及び27時間目の2回、各々0.03cc宛直接脳内に行つた。

〔実験成績〕 成績は第3表に示した如く、 γ -globulin

溶液並にそれに hyaluronidase を併用した実験3及び4の LD_{50} と对照との対数差は夫々 -0.7 及び -0.8 であり、平均潜伏期の延長と併せてみればA項の実験と同じ程度の有効性が窺われるけれども、実験3及び4の間には殆んど差がなく、hyaluronidase が免疫血清 γ -globulin の治療効果を助長する様な結果は得られなかつた。又、実験5の成績から hyaluronidase はかゝる投与条件では感染の進展に明らかな影響を示さない。

Table 3 Combined effect of the immune serum gamma globulin with hyaluronidase (1)

No. of exp.	* Treatment	Virus dilution	Result	Incub. period	LD_{50}	Log diff.
3	i.s. γ -globulin + SM. P.	10 ⁻⁴ -5 -6 -7	5/5 5/5 2/5 0/5	4.2 6.6 9.0	10 ^{-6.8}	-0.7
4	i.s. γ -globulin + hyaluronidase 100 u/cc + SM. P.	10 ⁻⁴ -5 -6 -7	5/5 4/5 2/5 0/5	4.2 7.0 9.4	10 ^{-5.7}	-0.8
5	saline solut. + hyaluronidase 100 u/cc + SM. P.	10 ⁻⁴ -5 -6 -7	5/5 5/5 4/5 0/5	4.0 5.3 6.1	10 ^{-6.4}	-0.1
cont.	saline solut. + SM. P.	10 ⁻⁵ -6 -7 -8	5/5 4/5 1/4 0/5	5.1 6.1 7.0	10 ^{-6.5}	

* intracerebral injection, at 24 and 27 hours after inocul.

** harmonic mean of incubation period

C. 免疫血清 γ -globulin と hyaluronidase の併用効果 (2)

〔実験方法〕 B項の実験結果から hyaluronidase の使用量を 1500u/cc に増して更にB項と全く同じ実験を行つた。

〔実験成績〕 成績は第4表に示す如く、免疫血清 γ -globulin のみ注射した群の LD_{50} と对照との対数差は -0.8 であり、平均潜伏期の延長と併せてその治療効果を窺うるに過ぎないが、更にこれに hyaluronidase を併用した実験7の LD_{50} は 10^{-4.8} であり、对照群の LD_{50} 10^{-6.2} とは対数差 -1.4 を示し可なり明らかな治療効果を認めることが出来た。しかし、本項に於いてもかゝる使用条件の hyaluronidase は感染の進展に少くとも阻止的影響を及ぼすことはないと思われ、従

つて hyaluronidase は免疫血清 γ -globulin の作用を助長したと考えられる。なお、今回 hyaluronidase を併用したマウスでは脳内注射後の脳圧亢進症状が速かに消滅することが観察された。

Table 4 Combined effect of the immune serum gamma globulin with hyaluronidase (2)

No. of exp.	* Treatment	Virus dilution	Result	** Incub. period	LD ₅₀	Log diff.
6	i.s. γ -globulin + SM. P.	10 ⁻⁴ -5 -6 -7	5/5 5/5 1/5 0/5	4.0 6.8 9.0	10 ^{-5.6}	-0.8
7	i.s. γ -globulin + hyaluronidase 1500u/cc + SM. P.	10 ⁻⁴ -5 -6 -7	5/5 2/5 0/5 0/5	4.1 7.0	10 ^{-4.8}	-1.4
8	saline solut. + hyaluronidase 1500u/cc + SM. P.	10 ⁻⁴ -5 -6 -7	5/5 5/5 4/5 0/5	4.0 5.1 5.8	10 ^{-6.4}	0.2
cont.	saline solut. + SM. P.	10 ⁻⁵ -6 -7 -8	5/5 3/5 0/5 0/5	4.9 6.0	10 ^{-6.2}	

* intracerebral injection, at 24 and 27 hours after inocul.

** harmonic mean of incubation period

D. 免疫血清 γ -globulin と hyaluronidase の併用効果 (3)

〔実験方法〕 C項の実験に準じて免疫血清 γ -globulin を注射した群と、それに hyaluronidase を 1500u/cc の割合に併用した2つの実験群並に生塩水を注射した対照群を設け、ウイルス脳内接種後48時間目並に51時間目の2回、0.03 cc 宛直接脳内に同一部位より注射した。

〔実験成績〕 成績は第5表で示した如く、ウイルス接種後48時間以上経過した処置では著しく効果が減じ、免疫血清 γ -globulinのみ注射した実験9ではLD₅₀並に潜伏期に関しても何んら効果が認められない。しかして、hyaluronidase を併用した実験10の場合には、LD₅₀は対照と殆んど差がみられなかつたけれども平均潜伏期の延長を招来することが出来た。

E. 免疫血清 γ -globulin と hyaluronidase の併用効果 (4)

〔実験方法〕 C項の実験に準じて、免疫血清 γ -glo-

Table 5 Combined effect of the immune serum gamma globulin with hyaluronidase (3)

No. of exp.	* Treatment	Virus dilution	Result	** Incub. period	LD ₅₀	Log diff.
9	i.s. γ -globulin + SM. P.	10 ⁻⁴ -5 -6 -7	5/5 5/5 4/5 0/5	4.0 4.9 6.6	10 ^{-6.4}	0.1
10	i.s. γ -globulin + hyaluronidase 1500u/cc + SM. P.	10 ⁻⁴ -5 -6 -7	5/5 5/5 3/5 0/5	4.5 4.9 9.4	10 ^{-6.2}	-0.1
cont.	saline solut. + SM. P.	10 ⁻⁵ -6 -7 -8	5/5 3/5 1/5 0/5	5.1 6.2 7.0	10 ^{-6.3}	

* intracerebral injection, at 48 and 51 hours after inocul.

** harmonic mean of incubation period

bulin 並にこれに hyaluronidase を併用した2つの実験群と生塩水による対照を用意したが、本項に於いてはウイルス脳内接種後24時間目並に27時間目の2回、各々0.2cc宛皮下より注射した。

〔実験成績〕 これまで行つて来た脳内えの直接投与と異り、皮下からの処置では γ -globulin 並に hyaluronidase の併用に拘らず何んら治療的效果を招来させることは出来なかつた。その他成績は第6表に示した。

Table 6 Combined effect of the immune serum gamma globulin with hyaluronidase (4)

No. of exp.	* Treatment	Virus dilution	Result	** Incub. period	LD ₅₀	Log diff.
11	i.s. γ -globulin + SM. P.	10 ⁻⁵ -6 -7 -8	5/5 4/5 0/5 0/5	5.0 6.2	10 ^{-6.4}	0.1
12	i.s. γ -globulin + hyaluronidase 1500u/cc + SM. P.	10 ⁻⁵ -6 -7 -8 -9	5/5 3/5 1/5 0/5	5.1 6.4 7.0	10 ^{-6.3}	0
cont.	saline solut. + SM. P.	10 ⁻⁵ -6 -7 -8	5/5 3/5 1/5 0/5	5.1 6.0 6.0	10 ^{-6.3}	

* subcutaneous injection, at 24 and 27 hours after inocul.

** harmonic mean of incubation period

総括並に考按

マウス脳脊髄炎ウイルスにより家兎を免疫して得られた抗血清を、ウイルスの脳内接種後24時間目に直接脳内に接種したけれども、本実験に用意することの出来た力価(中和対数2.1)の抗血清では殆んど治療的效果を認めることが出来なかつた。しかし、より多くの抗体を使用する目的で精製濃縮した免疫血清 γ -globulin を、同じく直接脳内に投与した場合には、LD₅₀の面から得られた結果と潜伏期の延長とを併せてその治療的效果を窺い知ることが出来る。このことは、充分な量の抗体が与えられた場合について少なからぬ期待を抱かせるものであり、吾々の意図は更にこれに続く実験に存する。即ち、より充分な量の抗体をより直接ウイルスに働かせるために試みた adjuvant としての hyaluronidase は、その適当量を使用することによって、中和抗体によるマウス脳脊髄炎の実験的治療効果を助長することを明らかに出来た。

しかし、その効果は中和抗体と hyaluronidase を直接脳内に投与した場合であつて、これらを皮下から投与しても同じ様な効果を再現することは出来なかつた。皮下に与えられた中和抗体の量について若干の疑問が残されるにしても、より充分な量の抗体をより直接ウイルスに働かせるべく blood brain barrier を考慮して、川喜田が試みた直接脳内への投与と云う手段は、こゝでも重要な役割を果していることが理解される。

なお、吾々が試みた adjuvant については次の様なものを考えることが出来よう。その第1は投与された抗体をウイルス感染細胞により良く接触させるだけの段階のものであり(擔体としての adjuvant に期待している)、第2は更に細胞膜の透過性等を変えることにより抗体が細胞内に喰い込むことを助ける adjuvant である。これらを導入的 (introductory) adjuvant と呼んでおこう。そして更に第3のものとして、抗体とウイルスとの結合そのものを助ける触媒的 (catalytic) adjuvant が考えられるが、これは実現性に乏しく思われる。

しかして、本実験に於ける hyaluronidase の効果は、拡散因子としての本来の作用から当然導入的 adjuvant として働いたと考えられるが、単にそれが抗体の細胞への接触を助けたものであるか、更に抗体が細胞内に

喰い込むことを容易にしたのであるかまだこゝでは結論出来ない。そして、本実験に用いた方法は臨床的応用と云う面から多くの距りがあるけれども、各種ウイルス性疾患の特色を考慮して適当な adjuvant の探究とそれによる血清療法血清療法の改良は、ウイルス性疾患の治療的手段として有効にして案外手近かな道であるかも知れない。吾々のこのさゝやかな試みが渋滞しているウイルス性疾患の血清療法に何んらかの示唆を与えることが出来れば幸甚である。

又、一方 hyaluronidase がウイルスの感染を促進することが知られ、これについては後藤、大久保等によつて詳細な研究が進められている。只、その投与条件によつてはこの様な利用もあるわけである。

結 論

マウス脳脊髄炎に対して免疫血清 γ -globulin を hyaluronidase と共に直接脳内に投与すると云う血清療法の一つの試みに於いて、hyaluronidase は免疫血清 γ -globulin の導入的 adjuvant としてその実験的治療効果を助長することを明らかにした。

主なる文献

- 1) Rivers, T.M.: Prevention and treatment of virus diseases by immune sera. (Lane Medical Lecture, Viruses and Virus Diseases, Stanford Univ. Press, 107-1128, 1939. 2) Andrewes, C.H.: Virus III in tissue cultures. II. Further observation on the formation of inclusion bodies. III. Experiments bearing on immunity., Brit. J. Exper. Path., Vol. 10, 273-280, 1929. 3) 川喜田愛郎, 田崎忠勝: 培養組織内のウイルスに対する抗ウイルス血清の作用について—流行性脳炎ウイルスを以つてせる実験—, 実験医学雑誌, Vol. 26, 295-307, 1947. 4) Magill, T. P. & Francis, T.: The action of immune serum on human influenza virus in vitro., J. Exp. Med., Vol. 65, 861-872, 1937. 5) 矢追秀武: 天然痘血清療法に関する実験的研究., 日新医学, Vol. 24, 1113-1132, 1935. 6) 川喜田愛郎: 流行性脳炎の血清療法に関する研究(第1報), 実験医学, Vol. 26, 389-406, 1942. 7) 後藤正勝, 大久保新也他: Hyaluronidase の実験的日本脳炎ウイルス感染に及ぼす影響(2), 日本細菌学雑誌, Vol. 7, 648, 1952., 日本B型脳炎ウイルス感染マウスに及ぼす感染抑制物質(肺炎球菌荚膜多糖質その他)感染促進物質(ヒアルロニダーゼ)の影響及び両物質の拮抗作用について., 東京医学雑誌, Vol. 62, 199-213, 1954.