エクトロメリア・ウイルスの免疫血清学的研究

第2報 エクトロメリア・ウイルス接種ウサギにおける中和抗体の産生 並びにその性状について

藤崎 優次郎・堀江 喜一*

IMMUNOLOGICAL AND SEROLOGICAL STUDIES ON THE ECTROMELIA VIRUS

SECOND REPORT: DEVELOPMENT OF NEUTRALIZING ANTIBODY IN RABBITS INOCULATED WITH THE ECTROMELIA VIRUS AND ITS CHARACTERISTICS

YUJIRO FUJISAKI and KIICHI HORIE

[受稿 4月20日, 1961]

第1報において、私共はエクトロメリア・ウイルス（以下 E-ウと略）を接種したウサギの血清中には、E-ウに対する各種抗体の産生が認め難いことを述べた。また、E-ウを頻回腹腔内に注射してえられた抗Eウサギ血清には、E-ウに対する中和能が認め難いのに対して、ワクシニア・ウイルス（以下 V-ウと略）に対してはかなり高い中和能が認められることも報告した。

今回は更に、多数のウサギを用いて E-ウによる免疫をおこない、方法論の上からも検討を試みつつ、E-ウ接種ウサギにおける中和抗体産生の問題、並びに抗Eウサギ血清の中和反応上における 1, 2 の性状について V-ウと対比しながら検討したのでその成績を報告する。また、本研究中に遭遇した 2, 3 の問題点、すなわち E-ウ免疫ウサギの V-ウに対する感染防御能、あるいは免疫方法がそこに産生される中和抗体の性状におよぼす影響などについても若干検討したので、あわせてここに報告する。

実験に用いた材料および実験方法は第1報におけるとほぼ同様であるが、それらの詳細については実験成績の項でその都度述べる。

実験成績

実験 I 抗Eウサギ血清の中和能について

実験 I-1 新たに E-ウでウサギを強度に免疫し、これらの血清の E-ウおよび V-ウ両ウイルスに対する中和能を同時に測定した。免疫方法は、E-ウ感染マウス肝10%乳剤（マウス腹腔内 0.2 ml 接種で $LD_{50} : 10^{-7.0}$ ）5 ml を1週間隔で5回腹腔内に注射し、最終注射後2週目に採血した（これをE免疫群と仮称する）。使用ウサギの免疫期間中における V-ウ汚染をみるために無処置対照群並びに N 免疫群（正常マウス肝乳剤を用いて E 免疫群と同様な方法でウサギを免疫したもの）をおいた。

成績は表1に示すように、E免疫群の中には No. 2 のごとく E-ウに対する中和能 ($\log NI : 0.1-0.3$) が全く認められないものもあつたが、No. 4 のごとく E-ウに対する中和能 ($\log NI : 2.8$) が認められるウサギもあつた。しかしながら、誤差範囲内とも考えられるような中和能の値を示すウサギが多いように思われた。また、これらのウサギの血清は、V-ウに対して概ねかなり高い中和能を示したが、No. 4 のごとく V-ウに対する中和能は他のものより却つて低いものもあり、E-ウに対する中和能と V-ウに対する中和能との間には平行関係はみられなかつた。なお、E-ウ免疫ウサギの V-ウに対する感染防御能をみるため、免疫終了後の各ウサギの背部皮内

* 国立予防衛生研究所

Department of General Biologics Control, National Institute of Health, Tokyo

Table 1. Neutralizing capacity of anti-ectromelial rabbit serum against ectromelia and vaccinia viruses (No. 1)

Serum	Virus	Ectromelia		Vaccinia	Result of protection test***
E group*	No. 1	1.1	1.6	4.0	10^{-4}
	No. 2	0.1	0.3	4.0	10^{-4}
	No. 3	1.9	2.1	5.0	10^{-4}
	No. 4	2.8		2.0	10^{-4}
	No. 5	1.8			10^{-3}
N group**	No. 6	0.3		1.0	10^{-4}
	No. 7				10^{-4}
Normal	No. 8			1.0	10^{-4}
	No. 9				10^{-4}

Notes *: Injected with 5 ml of 10% emulsion of the ectromelia mouse liver ($LD_{50} : 10^{-7}$) five times intraperitoneally at weekly intervals, and bled 2 weeks after the last injection.

** : Instead of the ectromelia mouse liver, the normal mouse liver emulsions were injected in the manner as in E group.

*** : Result of titration test with vaccinia virus, that is, each rabbit was inoculated with 0.1 ml of each of the gradually diluted virus suspensions intracutaneously immediately after the bleeding for the determination of neutralizing capacity.

Expression of the neutralizing capacity: Log. difference in titer between control and undiluted test serum

Table 2. Neutralizing capacity of anti-ectromelial rabbit serum against ectromelia and vaccinia viruses (No. 2)

Serum	Virus	Ectromelia	Vaccinia	Result of protection test*
E group** (I)	A	2.3	3.5	10^{-3}
	B	1.8	1.5	10^{-3}
	C	1.7	3.5	10^{-4}
E group*** (II)	D	0.7	0	10^{-3}
	E		0	10^{-4}
	F	0.5	2.0	10^{-4}
N group****	G	-0.6	0	10^{-4}
	H		0	10^{-3}
	I			10^{-4}

Notes *: See notes in Table 1.

** : Injected with 1 ml of 10% emulsion of the ectromelia mouse liver five times intraperitoneally at weekly intervals, and bled 10 days after the last injection.

*** : Injected with 5 ml of 10% emulsion of the ectromelia mouse liver, and bled 10 days later.

**** : See notes in Table 1.

に、10倍階段希釈されたV-ウを接種してその発症力価をしらべたところ、表にみられるごとく対照群との間に差はみられなかった。

実験I—2 前記の成績を検討するため、免疫量を変えて略々同様な実験を繰返しおこなったところ、表2に示すような成績が得られた。即ちE-ウ10%乳剤を

1mlずつ5回腹腔内に注射したE免疫群(I)においては、3頭の中1頭(A)はE-ウに対する中和能が認められたが、2頭(B, C)は僅かながら中和能を有しているのではないと思われる程度であつた。V-ウに対する中和能は、3頭の中2頭に認められたが、前実験に比べると同様に両中和能の間には平行関係はみられなかつ

た。

また、E-ウ 10%乳剤 5 ml を 1 回腹腔内に注射した E 免疫群 (II) においては、F ウサギ血清が V-ウ に対して僅かな中和能 ($\log NI: 2.0$) を示したほかは、E-ウ、V-ウ両ウイルスに対する中和能は、共に認められなかった。

以上のような実験成績から、E-ウでウサギを強度に免疫した場合にも、E-ウに対する中和能が明らかに認められる血清が得難いことは事実であるが、ウサギにおいても、あるいは E-ウに対する中和抗体を産生しているのかもしれないと考えられた。

なお、免疫期間中同一場所に飼育した N 免疫群および無処置対照群ウサギの血清が示した E-ウおよび V-ウに対する中和能の値から、実験 1, 2 を通じて免疫期間中 V-ウの汚染はなかつたであろうと考えられる。

さて、今回の実験においては、E-ウ免疫ウサギがいずれも V-ウに対する発症阻止能を示さないという成績がえられているが、この点については若干検討をおこなったので、その結果は別項で述べる。

実験 II 抗 E ウサギ血清と E-ウおよび V-ウとの中和曲線について

次に、E-ウに対して、あるいは誤差範囲内ではないかとも考えられる低い中和能を示す抗 E ウサギ血清中に果して E-ウに対する中和抗体が存在しているのか否か、また抗 E ウサギ血清の E-ウに対する中和能と V-ウに対する中和能とが平行しない点を解明するため、血清稀釈とウイルス稀釈とを組合わせて、E-ウおよび V-ウ両ウイルスを用いた Box 中和試験をおこない、それぞれのいわゆる中和曲線を求めた。

材料と方法

1. E-ウに対する中和曲線の求め方

抗血清を先ず原液から 100 倍あるいは 1000 倍まで 10 倍階段稀釈し、各稀釈血清とあらかじめ 10 倍階段稀釈した E-ウ液とを等量混合して、 37°C 2 時間反応させた後、1 稀釈段階につき 10 匹のマウスの脳内に接種した。14 日間の観察の後、血清の各濃度における LD_{50} をプロビット法によつて算出した。血清の代りにメジウムを使用した対照列の LD_{50} を同時に求め、対照列の LD_{50} に対する血清列の LD_{50} の比の対数を取り、それを中和能 ($\log NI$) とした。横軸を血清濃度、縦軸を中和能として、血清の各濃度に対する中和能の値をプロットし、各点を通る回帰直線を求め、それを中和曲線とした。なお、ウイルス量を一定とした血清稀釈法を用い、各使用ウイルス量に対するいわゆる血清の ED_{50} を算出し、両

者の関係から中和曲線を求めてみたが、上記方法に拠つた場合と同様な結果がえられている。

2. V-ウに対する中和曲線の求め方

抗血清を先ず原液から 100 倍あるいは 1000 倍まで 10 倍階段稀釈し、各稀釈血清とあらかじめ 10 倍階段稀釈された V-ウ液とを等量混合して、 37°C 2 時間反応させた後、各混合液を 3 頭のウサギの背部皮内に 0.1 ml ずつ合計 3 箇所接種した。3 日から 7 日の間毎日接種箇所の硬結および発赤の程度を観察し、現われる反応の最高点において成績の読みとりをおこなつた。なお、触知できる硬結をともなつた径 8 mm 以上の丘疹の発生したものを発症陽性とし、血清の各濃度における ID_{50} を Reed & Muench の方法によつて算出した。血清の代りにメジウムを使用した対照列の ID_{50} を同時に求め、対照列の ID_{50} に対する血清列の ID_{50} の比の対数を取り、それを中和能とした。E-ウの場合とほぼ同様にしてその中和曲線を求めた。

図 1 はその成績を示したものである。図にみられるように V-ウに対する中和曲線は、傾斜が極めて急であるのに対して、E-ウに対する中和曲線は概してその傾斜がゆるやかで、両曲線は平行しないものと思われる。また、E-ウに対する中和曲線と V-ウに対する中和曲線との間には、中和能からみた位置の上で一定の相対的關係がみられなかつた。このことは実験 I において抗 E ウサギ血清の E-ウに対する中和能と V-ウに対する中和能との間に平行關係がみられなかつたことと符合するものである。更に、両ウイルスに対する二つの中和曲線の傾斜が異なることから、二つの中和反応は異つた機作によつておこなわれている可能性が考えられるので、抗 E ウサギ血清について E-ウに対する中和能と V-ウに対する中和能の高低を比べることは論理上不合理であることがわかつた。

また、血清原液で誤差範囲内と考えられる程度の低い中和能を示した血清でも、稀釈血清で測つた中和能を結ぶ線は、原液でもつと高く明らかな中和能を示す血清の場合と、一般にその傾斜は同じとみられることから、中和能は低いが抗体は産生しているとみるべきではなからうか。なお、実験 I で述べた No. 2 ($\log NI: 0.1, 0.3$) のウサギ血清を用いて Box 中和試験をおこなつたところ、図にみられるように一定の中和曲線がえられなかつた。このことは No. 2 ウサギ血清中における中和抗体の存在は考え難いことを示すものであろう。

実験 III 抗 V ウサギ血清と E-ウおよび V-ウとの中和曲線

実験 II において述べたように、抗 E ウサギ血清対 E-ウおよび V-ウの二つの中和曲線が平行しないことから、

Fig. 1 Neutralization line of anti-ectromelial rabbit serum against ectromelia and vaccinia viruses

- Notes 1) Horizontal axis: Serum concentration
Vertical axis: Neutralizing capacity
2) -----: Neutralization line against vaccinia virus
———: Neutralization line against ectromelia virus
3) Immunization

No. 1, No. 2, No. 3: See notes in Table 1.

E 1: Injected with 5 ml of 10% emulsion of the ectromelia mouse liver five times intraperitoneally at weekly intervals, and bled 9 days after the last injection.

E 3, E 5: Injected in the same manner as in E 1, and bled 15 days after the last injection.

ERP: Injected with 5 ml of 10% emulsion of the ectromelia mouse liver four times intraperitoneally at intervals of five days. Bleeding was made 10 days after the last injection and pooled serum was used.

両中和反応にあずかる諸因子の中に、異質のものが含まれているのではなかろうかと考えられたので、その点について検討した。

上述の二つの中和曲線の傾斜の差異が現われる原因として先ず考えられることは、中和反応の場が E-ウと V-ウとで異つているという点である。そこで、試みに抗 V ウサギ血清を用いて E-ウおよび V-ウに対する中和曲線の関係をしらべたところ、図 2 のような成績がえられた。

抗 V ウサギ血清の作り方: $10^{-1} \sim 10^{-7}$ の各生ウイルス稀釈液 0.1 ml を 4 個所ずつ背部皮内に接種し、2 週後にウイルス原液 (ウサギ皮内 0.1 ml 接種で 10^{-6} の発痘力価を有する) 1 ml を耳静脈内に接種した後 1 週目に採血した。

図にみられるように、抗 V ウサギ血清においては、抗 E ウサギ血清の場合とは異り、対 E-ウ中和曲線の傾斜は急で、対 V-ウ中和曲線の傾斜と殆んど差がみられな

かつた。

すなわち、抗Eウサギ血清対 V-ウおよび抗Vウサギ血清対 V-ウの中和曲線の傾斜は急で常に同じような値を示すのに、抗Eウサギ血清対 E-ウの中和曲線の傾斜はゆるやかである場合が多く、しかも時には抗Vウサギ血清の場合のように、これが急になつて対 V-ウの場合と差のない程度になることがある。そこで、このような現象の原因を検討するため、以下述べるような実験をおこなつた。

Fig 2 Neutralization line of anti-vaccinial rabbit serum against ectromelia and vaccinia viruses

Notes

- 1) Horizontal axis: Serum concentration
Vertical axis: Neutralizing capacity
- 2) ---: Neutralization line against vaccinia virus
—: Neutralization line against ectromelia virus
- 3) Immunization
Two weeks after the intracutaneous injection of vaccinia virus, injected intravenously with 1 ml of vaccinia seed virus suspension, and bled one week after the second injection.
(VC): Serum of an immunized rabbit
(VRP): Pooled serum of ten immunized rabbits

実験 IV 抗Eマウス血清と E-ウおよび V-ウとの中和曲線

抗Eウサギ血清対 E-ウの中和曲線の傾斜は、一般にゆるやかなことを実験Ⅱで述べた。そしてこのような現象は必ずしも E-ウの中和反応の場によるものではないであろうということが、実験Ⅲの成績から考察された。

そこで、このような現象の原因として免疫に使用する動物の種の問題をとり上げて検討を試みるため、抗Eマウス血清を用いて、E-ウおよび V-ウ両ウイルスに対する中和曲線を求めてみたところ、図3のような成績がえられた。

抗Eマウス血清の作り方：10% 不活化 E-ウ液（作り方は第1報を参照）0.25 ml を1週間隔で3回腹腔内に注射し、1週後 10^{-2} 生 E-ウ液 0.25 ml を腹腔内に注射した。最終注射後10日目に生残マウスから採血し血清を集めた。

図にみられるように、抗Eマウス血清においては、V-ウに対する中和曲線の傾斜は急であるのに対し、E-ウに対する中和曲線の傾斜はゆるやかであり、抗Eウサギ血清の場合と同様な成績がえられた。

抗ウサギ血清と抗Eマウス血清との間で、E-ウ、V-ウの両中和曲線に関して同様な現象がみられることから、

Fig. 3 Neutralization line of anti-ectromelial mouse serum against ectromelia and vaccinia viruses

Notes

- 1) Horizontal axis: Serum concentration
Vertical axis: Neutralizing capacity
- 2) ---: Neutralization line against vaccinia virus
—: Neutralization line against ectromelia virus
- 3) Immunization
Injected with 0.25 ml of 10% UV inactivated ectromelia virus suspension three times intraperitoneally at weekly intervals, and injected with 0.25 ml of 1% living virus suspension intraperitoneally one week after the third injection. Bleeding was made 10 days after the last injection and pooled serum was used.

抗Eウサギ血清対 E-ウの中和曲線の傾斜がゆるやかなことの原因として、ウサギ対 E-ウという特殊な関係を考えることは無理のように思われる。

なお、抗Eマウス血清中には、抗Eウサギ血清の場合に考えられる正常マウス肝組織に対する抗体は考え難いので、もし抗Eウサギ血清対 E-ウの中和曲線の傾斜がゆるやかであるという現象を惹き起すのに、正常マウス肝組織に対する抗体が何等かの役割を果しているのならば、抗Eマウス血清においては上述のごとき結果がえられないのではなかろうかと考えられる。すなわち、抗Eウサギ血清対 E-ウの中和曲線の傾斜が特にゆるやかな

のは、その血清中に含まれる正常マウス肝組織に対する抗体のためではなからうと思われる。

実験 V 抗Vマウス血清と E-ウおよび V-ウとの中和曲線

前述の諸実験の成績から、抗Eウサギ血清対 E-ウの中和曲線の傾斜が特にゆるやかである原因の一つとして、免疫原としての E-ウの特殊性が考えられた。そこで、免疫原として E-ウを用いることが、このような現象を惹き起す原因であるかどうかを検討するため、抗Vマウス血清を用いて E-ウ、V-ウ両ウイルスに対する中和曲線を求め、両曲線の関係をしらべたところ、図4のような成績がえられた。

抗Vマウス血清の作り方：生 V-ウ液（ウサギ皮内 0.1 ml 接種で 10^{-6} の発痘力価を有するもの）を用いて次のように腹腔内に注射した。 10^{-1} 稀釈液 0.5 ml 注射後約 1 週間隔で 3 回ウイルス原液を注射し、最終注射後 1 週目に採血し血清を集めた。

Fig. 4 Neutralization line of anti-vaccinia mouse serum against ectromelia and vaccinia viruses

Notes

- 1) Horizontal axis: Serum concentration
Vertical axis: Neutralizing capacity
- 2) ---: Neutralization line against vaccinia virus
—: Neutralization line against ectromelia virus
- 3) Immunization

Twenty mice were injected with 0.5 ml of 10% diluted vaccinia virus suspension intraperitoneally, thereafter injected with 0.25 ml of vaccinia seed virus suspension three times intraperitoneally at intervals of 7 days. Bleeding was made 7 days after the last injection and pooled serum was used.

図にみられるように、抗Vマウス血清においては、対V-ウ中和曲線の傾斜は急であるのに対し、対E-ウ中和曲線の傾斜はゆるやかであり、抗Eウサギ血清および抗Eマウス血清における同様な成績がえられた。

すなわち、E-ウに対する中和曲線の傾斜が特にゆるやかであるという現象は、V-ウを免疫原とした場合にもみられたわけで、このような現象のみられる原因を、免疫原としての E-ウそのものに帰することはできないと考えられる。

さて、以上述べてきたように、V-ウに対する中和曲線の傾斜が急であるのに対して、E-ウに対する中和曲線の傾斜がゆるやかなことは、抗Eウサギ血清の場合のみではなくて、抗Vウサギ血清以外の抗血清の場合にはいずれもみられる現象であつて、E-ウに対する中和曲線の傾斜が特にゆるやかであるという現象の原因として考えられた中和反応の場の問題、あるいは E-ウとの関連において考えた免疫動物の種特異性、あるいは抗原構造上から考えた免疫原としての E-ウの特異性などは、すべて否定されたわけである。したがって、その原因は中和試験をおこなう時々の抗体側にあるのではなからうかと考えるようになった。

実験 VI 中和曲線の傾斜におよぼす免疫方法の影響

免疫の時期や免疫の方法によつて質的に異つた抗体が見出されることが指摘されている。これらの報告によれば、この質的差異が中和曲線の傾斜の差として現われる可能性が考えられる。私共は、免疫過程における抗血清の性状の変化をみるために、中和曲線の傾斜におよぼす免疫方法の影響について 2, 3 実験を試みた。

これまで述べた抗Eウサギ血清は、生 V-ウを皮内接種または乱切接種した後、静脈内に追加免疫をおこなつたもので、E-ウとの中和曲線は図5で点線の示すようなものであることは既に述べた。そこで、試みに V-ウによる乱切接種のみをおこなつた後、2 週目の血清について、E-ウに対する中和曲線を求めたところ、実線で示すようなゆるやかな傾斜をもつた中和曲線がえられた。すなわち、同一抗原材料を用いてもその免疫方法や時期によつて、中和曲線の傾斜を異にする血清がえられることがわかつた。

次に、抗Eウサギ血清について、免疫初期と後期の血清を用意し、その中和曲線の傾斜を比べてみた。今 E-ウ感染マウス肝10%乳剤を 1 週間隔で 2 回注射後 1 週目の血清を初期血清、1 週間隔で 5 回注射後 1 週目の血清を後期血清と仮りに名付ける。

先ず E-ウを用いて中和試験をおこなつたところ、図6に示すように、後期血清の中和曲線としては実線で示

Fig. 5 Influence of method of immunization on slope of neutralization line. (No. 1)
Neutralization line of anti-vaccinia rabbit serum (2 weeks after the scarification) against ectromelia virus

Notes

- 1) Horizontal axis: Serum concentration
Vertical axis: Neutralizing capacity
- 2) —: Bled 2 weeks after the scarification.
---: This case was boosted intravenously with 1 ml of vaccinia seed virus suspension 2 weeks after the scarification.

Fig. 6 Influence of method of immunization on slope of neutralization line. (No. 2)
Comparison of neutralization lines of anti-ectromelial sera of rabbits immunized 2 and 5 times against ectromelial virus infection in mice

Notes

- 1) Horizontal axis: Serum concentration
Vertical axis: Neutralizing capacity
- 2) ---: Earlier stage of immunization
—: Later stage of immunization

Fig. 7 Influence of method of immunization on slope of neutralization line. (No. 3)
Comparison of neutralization lines of anti-ectromelial sera of rabbits immunized 2 and 5 times against vaccinia virus infection in rabbits

Notes

- 1) Horizontal axis: Serum concentration
Vertical axis: Neutralizing capacity
- 2) ---: Earlier stage of immunization
—: Later stage of immunization

すようなこれまで述べてきたと同様な傾斜を有する曲線がえられたが、初期血清には中和能は認められなかったため両血清の中和曲線の比較はできなかった。

さて、E-ウに対して中和能が認められない抗Eウサギ血清でもV-ウに対しては中和能が認められることを、かつて経験しているので、E-ウの代りにV-ウを用いて上記両血清の中和曲線を求めてみたところ、図7のような成績がえられた。点線は初期血清、実線は後期血清を用いた場合の中和曲線である。図に示したように、注射回数の増加と共に中和能の上昇がみられるが、それと同時に中和曲線の傾斜の変化がみられている。

以上の成績から、同一材料を用いても免疫の方法あるいは免疫の時期によつて中和曲線の傾斜を異にする抗血清がえられることがわかった。

実験 VII E-ウ免疫ウサギのV-ウ発痘阻止能について

E-ウ免疫ウサギのV-ウ発痘阻止能に関して、第1報とやや異つた成績が今回えられたことを実験Iの項で述べた。この点について若干検討を試みたので、その結果について次に述べる。

実験 VII-1 E-ウ免疫ウサギ, V-ウ免疫ウサギおよび健康ウサギの V-ウ接種後における発痘経過
先ず次のような3群のウサギを用意した。

E免疫群: E-ウ感染マウス肝 10% 乳剤を 5 ml ずつ 1 週間隔で 5 回腹腔内に注射し, 最終注射後 16 日目に V-ウの攻撃をおこなった。V-ウ攻撃接種直前の血清中和能は, 図 1 中 (E3), (E5) に示してある。

V免疫群: 抗Vウサギ血清 (100 倍稀釈液で約 2.5 の中和能を有する) を V-ウ攻撃接種 4 時間前に 10 ml/kg 静脈内に注射したもので, 攻撃接種直前における血清は原液で 6.0 以上の中和能を示した。

対照群: 健康無処置ウサギで V-ウ攻撃接種前の血清中和能は 0 であった。

以上のような各群 2 頭のウサギに対して, 同時にその背部皮内に V-ウを接種して力価試験をおこなった。ウイルスの各稀釈液について 4 個所ずつ接種し, 毎日その発痘の程度を観察し, Reed & Muench の方法により ID₅₀ を算出した。その結果, 図 8 のような成績がえられた。

Fig. 8 Inhibition of vaccinia dermal infection in rabbits immunized with ectromelia virus

Notes ---: Normal rabbits
 +++: Passively immunized rabbits with anti-vaccinial serum
 —: Actively immunized rabbits with ectromelia virus

すなわち, 健康ウサギにおいては, 従来の報告および私共の経験しているように, その発痘の程度はウイルス接種後日を経ると共に増大し, 発痘力価は 5 日目頃最高値を示し, 以後そのまま持続する。それに対して E-ウ免疫ウサギにおいては, ウイルス接種後 3 日目頃最高値

を示し, その後は次第に減退する傾向がみられた。つまり, 発痘の経過が両者の場合で異なることを見出した。このことは, 同じく発痘といっても両者の間におこなわれている機作には異なる点があるのかもしれないと思わせるものであつて, それらの発痘を比較して発痘阻止の問題を論ずる場合には留意されなければならないことであると思われる。V-ウ被働性免疫ウサギでは, 健康ウサギに比べ発痘力価がかなり下まわっているが, その経過は健康ウサギと同じような傾向であつた。

実験 VII-2 E-ウ免疫ウサギにおける V-ウ増殖曲線
E-ウ免疫ウサギの V-ウに対する増殖阻止能を直接検討するため, 次に E-ウ免疫ウサギの皮内に V-ウを接種し, 接種後日を追つて局所のウイルス量をしらべてみた。

すなわち, E-ウ免疫ウサギおよび健康無処置ウサギ各 3 頭ずつを用意し, 1000 ID₅₀, 100 ID₅₀, 10 ID₅₀ の V-ウ稀釈液を 1 稀釈につき数個所ずつ各ウサギの背部皮内に接種した。接種後日を追つて局所皮膚を径約 2 cm の大きさに 2 個ずつ切り取り, 乳剤として凍結融解を 3 回おこない, 3000 rpm 15 分間遠心沈澱した上清について, 新しいウサギの背部皮内接種で感染価をしらべた。

その結果は図 9 にみられるように, E-ウ免疫ウサギにおいては, ウイルス力価が健康ウサギに比べて終始下まわっていた。更に興味ある点は, E-ウ免疫ウサギと健康ウサギとではウイルス増殖曲線の型の上でも異つており, 前者では 4 日目頃から急にウイルス量の減少がみられたことである。

また, 両ウサギにおける発痘の経過について, 発赤の大きさを目やすとして比べてみると, 前の実験結果と同様に両者の間で発痘経過に差異がみられた。すなわち, 接種後 4 日目までは, E-ウ免疫ウサギにおける発痘の程度は健康ウサギにおけるよりも大であるが, 以後はその関係が逆になる。E-ウ免疫ウサギではウイルス増殖の点では健康ウサギより終始下まわっているにも拘らず, このような現象がみられるのは, 接種後 4 日目までの E-ウ免疫ウサギにみられる発赤硬結は, ウイルスの増殖によるほかに, 更に他の因子が加わつてみられるものと考えられる。

考 察

1. 抗Eウサギ血清の E-ウに対する中和能について
第 1 報でも述べたように, 従来 E-ウでウサギを免疫した場合における E-ウに対する中和抗体の産生に関しては, 一致した結論はえられていないようであるが, 私共は, ウサギでは E-ウに対する中和抗体は極めて産生し難いと考えてきた。今回の実験においても, 第 1 報で

Fig. 9 Multiplication of vaccinia virus in rabbits immunized with ectromelia virus

述べたと同様、高い中和能（血清濃度を一定としたウイルス希釈法により算出したもの）をもつ抗Eウサギ血清をうることはすくなくつた。

ここに注意さるべきことは、抗Eウサギ血清の示すE-ウに対する中和曲線の傾斜が極めてゆるやかで、一般にその値は約0.5前後を示したことである。私共の今回の実験範囲内では、E-ウに対して高い中和能を有する抗Eマウス血清をうることは、必ずしも容易でなかつたことをあわせ考えると、中和能が低く、あるいは誤差範囲内と思われるような値を示す抗Eウサギ血清でも、血清濃度と中和能との間の相関を示す一定の中和曲線がえられる場合には、中和抗体は産生されているのであらうと判断するのが妥当と考える。すなわち、中和曲線からみると、抗Eウサギ血清はE-ウに対する中和抗体がないのではなく、相当濃厚にもつていながら中和能が低いために認識し難いのであらうと考えられる。仮りに、少量のウイルスを用いて、ウイルス量を一定とした血清希釈法により中和試験をおこなえば、抗Eウサギ血清のごとく中和曲線の傾斜がゆるやかな抗血清については、かなり高い中和抗体価（いわゆる ED_{50} ）が求められるわけである。Tyrrell ら¹⁵⁾ もいうように、中和曲線の傾斜がわからないときには、ウイルス量を一定とした血清希釈法の採用を考慮する必要がある。結局、中和抗体の量（濃度）をはかるためには、血清希釈法が妥当であつて、中和能はむしろ抗体の質をあらわすものではなからうか

と考える。

ところで、E-ウ免疫ウサギにおける中和抗体産生の問題をとりあつかう場合に、先ず注意せねばならないのは、V-ウによる使用ウサギの汚染の問題であるのはいうまでもない。この点は、本実験を通じて私共が終始留意したところで、実験ごとに厳重な消毒と動物の飼育管理をおこない、使用ウサギは実験前にすべて血清反応によりV-ウに対する血中抗体の存否をたしかめ、またV-ウ汚染を検出するための対照群を常に同じ環境において観察した。なお、E-ウに対する中和能がみられる抗Eウサギ血清がえられたことは、このV-ウ汚染に最も留意すべき点であるが、このE-ウ免疫ウサギが、V-ウの汚染をうけていた上にE-ウの booster effect があらわれたためではなからうかという心配も、抗Eウサギ血清がE-ウに対して示す中和曲線の傾斜によつて、ある程度否定できるのではなからうか。また、V-ウ汚染ウサギが免疫に使用されたとしたら、図6の実験における初期血清において既に中和能がみられてもよい筈であらう。このことからE-ウ注射による booster effect によつて抗Eウサギ血清がE-ウに対して中和能を示したとは考え難い。更に、図6および図7に示した成績は、E-ウの免疫注射の回数が増すにしたがつて中和能の上昇があつたことを示唆しており、免疫期間中にV-ウの感染があつたとは考え難い。以上のことから、実験中におけるV-ウの汚染は一応除外することができると考えられる。

2. 中和曲線の傾斜について

実験の初期において、抗Eウサギ血清とE-ウとの中和曲線の傾斜は極めてゆるやかであるのに対し、V-ウとの中和曲線の傾斜は急であつて両中和曲線が平行しないことを見出した。そしてこのことは抗Eウサギ血清の一特性ではなからうかと考えた。しかし実験の進展にしたがつて、抗Vウサギ血清以外の抗血清、すなわち抗Eマウス血清および抗Vマウス血清においても抗Eウサギ血清と同様な現象がみられることがわかり、更に、免疫の方法によつては、E-ウに対する中和曲線の傾斜の上で抗Eウサギ血清と同じような態度を示す抗Vウサギ血清がえられることもわかつた。そして、E-ウに対する中和曲線の傾斜が一般にゆるやかであるという現象の原因ではないかと考えられたE-ウの中和反応の場合、あるいはウサギ対E-ウという特異な関係、あるいはE-ウの抗原構造上の特異性などは一応否定された。

更に実験VIの成績によつて、同一材料を用いて免疫した場合にも免疫方法あるいは免疫時期によつて中和曲線の傾斜を異にする抗血清がえられることが明らかとなつた。そして私共の中和試験に用いた系においては、免疫の程度が高くなるにしたがつて中和曲線の傾斜が大きくなるのではないと思われた。

さて、中和曲線を求める実験全体を通じて、V-ウに対する中和曲線の傾斜が急である抗血清をうることは比較的容易で、私共の用いた抗血清は殆んどすべて1.0~2.0の傾斜を示したが、E-ウに対する中和曲線は、極めて強度に免疫した抗Vウサギ血清以外はすべてその傾斜がゆるやかで約0.5前後の値を示した。しかし、ここに用いた抗Eウサギ血清は大量頻回注射して得られた血清であり、Ginsberg^{31,41}が考察しているウイルス側の因子をも考慮して、この傾斜と免疫方法の関係については今後解明されるべき点が残されていると考える。

一方、Raffel & Terry¹³、Kekwick & Record¹¹、Burnet & Fenner¹¹、Jerne⁹、Jerne & Avegno¹⁰、Ward et al.¹⁶、Humphrey & Porter⁹、Sabin¹⁴、Brunner & Ward²らは免疫の時期あるいは免疫方法によつて質的に異つた抗体が見出されることを指摘しており、また、Horsfall & Lennette⁶、Ward et al.¹⁶、Jerne & Avegno¹⁰、Sabin¹⁴、Brunner & Ward²らにより、主としてウイルスと抗体の結合解離の面から質的に異つた中和抗体の存在が論ぜられているのは興味あることと考える。さて、本報告で述べたような中和曲線の傾斜の差というのは、生物学的にはどのような意味をもっているのだろうか。ウイルスと抗体結合物の安定性（稀釈現象）^{15, 16}、結合速度^{57, 18}、avidity^{37, 41, 16}あるいはウイルスと抗体の結合の際の両者の比率の差¹⁹などについて

考察している人々があるが、私共の用いた系における中和反応にこれらの事柄がどのようにあてはまるかは、今後の実験の進展に俟たいと思う。

3. E-ウ免疫ウサギのV-発痘阻止能について

E-ウ免疫ウサギにおいては、共通抗原を有するV-ウ皮内接種に際して局所アレルギー反応が起ることが考えられる。しかもそれが、ツベルクリン型のものであるならば、E-ウ免疫ウサギにV-ウを接種した後比較的短時日である3~4日後においては、V-ウ増殖による発赤、腫脹、硬結とアレルギー反応によるそれとが重なりあつて、V-ウによる発痘の有無の判定をあやまらしめる恐れが多分にあるわけである。さて、E-ウ免疫ウサギのV-ウ発痘阻止能に関して、第1報とやや異つた成績がえられたが、これは前回においては免疫後のアレルギー反応が比較的弱く、今回はそれが比較的強かつたのではないかと考えられる。いずれにしても、E-ウ免疫という前処置ウサギを用いた場合と、健常ウサギを用いた場合と同一判定基準によつてV-ウの力価試験をおこなつたところに、そのような成績がえられた原因があつたのではなからうかと考えられる。

次に、E-ウ免疫ウサギにV-ウを皮内接種した場合に、健常ウサギとは異つて、接種後4~5日頃から局所のウイルス量の低下がみられることであるが、これは健常ウサギとは異つてE-ウ免疫ウサギの場合には、V-ウ接種後比較的短時日の間に局所の中和抗体が産生されるのではないかと考えられる点があるが、小島¹²らのいう発痘抑制因子の性状もあわせて考慮すべきであらう。

総 括

第1報に引き続き、ウサギを用いてE-ウの免疫血清学的研究をおこなつた。

まず、E-ウ免疫ウサギにおける中和抗体（E-ウおよびV-ウに対する）産生の問題をとり上げ、実験例数を増すと共に、中和曲線によるその解明を試みた。更に、E-ウおよびV-ウに対する抗Eウサギ血清の中和曲線に関してやや特異な性状が認められたので、抗Vウサギ血清、抗Eマウス血清および抗Vマウス血清についてあわせて検討すると共に、中和曲線の傾斜におよぼす免疫方法の影響についても若干検討した。その結果、中和曲線の傾斜に関して2, 3の知見がえられた。

また、E-ウ免疫ウサギのV-ウ発痘阻止能について検討するため、V-ウ免疫ウサギおよび健常ウサギと対比しながら、V-ウ接種後における発痘経過並びにV-ウの増殖過程を観察した結果、やや興味ある知見がえられた。

以下実験成績について述べる。

1. E-ウでウサギを強度に免疫した場合にも、E-ウに

対する中和能を明らかに認める血清は得難いことは事実であるが、抗Eウサギ血清とE-ウとの中和曲線の特性から考えて、ウサギにおいてもE-ウに対する中和抗体を産生しているのではなからうかと考えられた。

2. 抗Eウサギ血清のV-ウに対する中和曲線の傾斜は急であるのに対して、E-ウに対する中和曲線の傾斜は概してゆるやかで、両曲線は平行しないものと思われた。このことは抗E-ウサギ血清とE-ウおよびV-ウとの中和能が平行しないという成績と符合するものであり、更に両ウイルスに対する中和能の高低を比較論ずることの不合理性を示唆するものと思われた。

3. 抗Eウサギ血清のE-ウに対する中和曲線の傾斜が特にゆるやかなことは、E-ウの中和反応の場合、あるいはウサギ対E-ウという特殊な関係、あるいは免疫原としてのE-ウの特異性などが要因となつてあらわれるものというよりは、恐らくその時々の抗血清側にその要因が含まれているのではなからうかと考察された。

4. 同一材料を用いても免疫の方法あるいは免疫の時期によつて中和曲線の傾斜を異にする抗血清がえられることがわかつた。

5. E-ウ免疫ウサギにV-ウを皮内接種した場合には、健常ウサギの場合とはその発痘の経過およびV-ウの増殖曲線に差異がみられ、このことは、発痘の機作が両者で異なることを意味するのではないかと思われる。つまり、E-ウ免疫ウサギのV-ウ発痘阻止能をみる場合、この点に充分留意しなければならないと考える。

終りに臨み、御指導御校閲を賜つた予研黒川正身博士並びに種々御助言を賜つた伝研長野泰一博士、日生研中村稔治博士、伝研田嶋嘉雄博士、精神医学研林博博士、故安東清博士に謝意を表します。また本研究遂行にあたり、御協力を得た研究室の諸氏に感謝します。

Summary

Successively from the first report, the immunological and serological investigations on the ectromelia virus was carried out using rabbits.

In the first place, the problem of development of neutralizing antibody (VN antibody) against ectromelia and vaccinia viruses in rabbits immunized with the ectromelia virus, was taken up. Its elucidation was attempted by the increase in number of experiments and by using the neutralization line of immune serum. Concerning the neutralization line of anti-ectromelial rabbit serum against ectromelia and vaccinia viruses, the singular property was recognized.

And so the investigations was done about each neutralization line of the anti-vaccinial rabbit serum,

the anti-ectromelial mouse serum and the anti-vaccinial mouse serum, like in the anti-ectromelial rabbit serum.

The influence of method of immunization on the slope of neutralization line was investigated.

In order to see the inhibition of vaccinia dermal infection in rabbits immunized with ectromelia virus, the courses of pox-pustulation and virus multiplication after the inoculation of vaccinia virus were observed in rabbits of normal and immunized with vaccinia and ectromelia virus.

The results are summarized as follows.

1. Even in rabbits immunized repeatedly with the ectromelia virus in large quantities, the serum which the neutralizing capacity against ectromelia virus can be recognized clearly, was not easily obtainable. However, considering the property of neutralization line, the VN antibody could be produced in rabbits.

2. The slope of neutralization line of anti-ectromelial rabbit serum against vaccinia virus was steep, on the other hand, that against ectromelia virus was flat on the whole, thus two neutralization line were not parallel. This phenomenon is consistent with the fact that the neutralizing capacities of anti-ectromelial rabbit serum against ectromelia and vaccinia viruses were not parallel. The mechanism of the mode of neutralization reaction against both viruses might not be analogous.

3. The phenomenon that the slope of neutralization line of anti-ectromelial rabbit serum against ectromelia virus was flat, might be caused by the property of the anti-serum itself, rather than by the system of neutralization test, or the particular relation of rabbit to ectromelia virus or the singularity of ectromelia virus as immunogen.

4. The different slopes of neutralization line were obtained due to varying methods of immunization or varying periods of immunization, even though using the identical material.

5. When the rabbit immunized with ectromelia virus was intracutaneously inoculated with the vaccinia virus, the course of pustulation and the growth curve of vaccinia virus was different from that in the normal rabbit. It was suggested by this fact that the mechanism of vaccinia dermal infection was different in these animals. The attention should be directed on this a point, when the inhibition test of vaccinia dermal infection in rabbits immunized with ectromelia virus was attempted.

文 献

- 1) Burnet, F. M. and Fenner, F. (1949). The production of antibodies, 2nd. Ed., Mcmillan & Co. Ltd., London — 2) Brunner, K. T. and Ward, R. (1959). J. Imm., 83, 405-410. — 3) Ginsberg, H.

S. (1956). J. Imm., 77, 271-278. — 4) Ginsberg, H. S. (1957). Ann. New York Acad. Sci., 67, 383-391. — 5) Horsfall, F. L. (1939). J. Exp. Med., 70, 209-222. — 6) Horsfall, F. L. and Lennette, E. H. (1941). J. Exp. Med., 73, 327-333. — 7) 堀江喜一, 村上忠正 (1954). ウイルス, 4, 115-122. — 8) Humphrey, I. H. and Porter, R. R. (1956). Biochem. J., 62, 93-98. — 9) Jerne, N. K. (1951). Acta. path. microbiol. Scandinav., Suppl., 87, 3-183. — 10) Jerne, N. K. and Avegno, P. (1956). J. Imm.,

76, 200-208. — 11) Kekwick, R. A. and Record, B. R. (1941). Brit. J. Exp. Path., 22, 29-43. — 12) 小島保彦 (1959). ウイルス, 9, 347-351. — 13) Raffel, S. and Terry, M. C. (1940). J. Imm., 39, 349-360. — 14) Sabin, A. B. (1956). J. A. M. A., 162, 1589-1596. — 15) Tyrrell, D. A. J. and Horsfall, F. L. (1953) J. Exp. Med., 97, 845-861. — 16) Ward, R., Chang, C. and Rader, D. (1955). Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 90, 162-165.

第2回バクテリオファージ講習会に ついてのお知らせ

バクテリオファージをテーマとした昨年の講習会は各方面からその意義を認められましたので今年も引続いて金沢大学で開催することになりました。

この講習会は活発に進歩しつつある科学研究の領域の中で視野の広い研究者を養成し、生命現象に関する基礎的な研究分野の発展を目的とするものです。内容はファージの基礎知識と技術の習得を主とし実習及び講義を行います。

日 時 昭和 37 年 8 月 20 日～30 日 (予定)

場 所 金沢大学医学部医化学教室

講 師 富沢純一 (予研) 他

募集人員 約 15 名

参加申込締切日 7 月 10 日

希望者は下記にお問い合わせ下されば詳細御連絡いたします。尚応募多数の場合は当方で選択することがありますから予めご承知おき下さい。

連絡先 金沢市土取場永町 15

金沢大学医学部医化学教室内

第2回ファージ講習会準備係