日本脳炎ウイルスの抗原分析に関する研究

相 沢 主 税 吉 岡 勇 雄
山 岸 郭 郎 笠 原 四 郎

ANTIGENIC ANALYSIS OF JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS BY CROSS NEUTRALIZATION TEST

Chikara AIZAWA, Isao YOSHIOKA, Hiroo YAMAGISHI and Shiro KASAHARA
The Kitasato Institute

〔受付：12月6日，1967年〕

総 括

日本国内および国外（台湾・タイ）で分離された10株の日本脳炎ウイルスの抗原分析を試み，家兎初期免疫血清を用いブラック減少法による交叉中和試験を行ない次の成績を得た。

1) 中山-予研・中山-薬検・Warren・張の四株が比較的近縁の1群を形成して居り，他方 JaGAR 01, Cheingmai の2株が互に近縁関係をもちながら且，相良・林・HV 1 の3株が形作る1群と近接していることを認めた。しかし上記各群は一部において若干ずつ重複して居り，隔絶した群を形成していなかった。

2) 個々のウイルス株の内，中山-予研株は家兎初期免疫血清中に中山-薬検株および Warren 株以外のウイルス株に対する中和抗体を，ごく小量しか産生せしめないきわめて特異なウイルス株であった。

以上，地理的条件による型別は勿論，決定的な型別をするまでに到らなかった。

緒 言

日本脳炎ウイルスは長い間免疫学的には1種類であると考えられていた。しかしながらポリオやインフルエンザのごとく確然としたものではないが，日本脳炎ウイルス株間に抗原構造上可成りの差異のあることが認められてきた。すなわち1953年 Hale がマラヤで分離した6株の日本脳炎ウイルスについての報告に端を発したといつてよいであろう。Hale は上記6株のウイルスおよび中山株ウイルスとで交叉補体結合反応および交叉感染防御試験を行ない，7株のウイルスが3つの型に分けら

れることを示唆した (Hale & Lee, 1954)。その後，感染防御試験・血球凝集抑制試験等を用いて詳細に調べた報告が数々なされたが，型別をするまでに到らなかった (小林, 1959; 緒方, 1959)。奥野ら (1962) は吸収血清を用いての血球凝集抑制試験により JaGAR 01 株ウイルスをもつて代表される1群と，I-58 株ウイルスをもつて代表される他の1群とに型別されることを発表し，日本脳炎ウイルスの型別に新たな資料を提示した (奥野ら, 1962)。

日本脳炎ウイルス株の間にこのような抗原構造の差異のあることが事実であるならば，中山-予研株をもつて日本脳炎ウイルスの代表株として，日本脳炎のすべての研究を推進することは危険なこととなる。又予防衛生上の種々の点においても，いろいろな支障がおこることが当然予測されるところである。

他方，Arbo ウイルスの中で東部アメリカ馬脳炎ウイルス (EEE) (Casals, 1964) および West Nile ウイルス (WN) (Hamman et. al., 1965) は，それらのウイルスが分離された地理的差異によつて抗原構造が異なることが，血球凝集抑制試験の成績から知られている。すなわち北米で分離された EEE ウイルスと南米で分離された EEE ウイルスとでは抗原構造に差異があり，又アフリカおよび中近東地区で分離された WN ウイルスはインド地区で分離された WN ウイルスと稍々異るといった成績が報告されている。同様の試験を日本脳炎ウイルスについて行なつたところ，EEE ウイルスや WN ウイルスで認められたように，地理的条件により抗原構造に差異のある成績は認められなかった (Hamman & Price, 1966)。

われわれは日本脳炎ウイルスの種々の株が果して抗原

表 1 実験に用いた日本脳炎ウイルス株

株 名	分離年度	分離場所	分離材料	分与を受けた時の材料の継代レベル	免疫に用いた材料の分与後の継代数	中和試験に用いた材料の分与後の継代数
JaGAr 01	1959	群馬	コガタアカイエカ	BM-5, AM-2, BM-3	BM-1	BM-2
工藤	1964	大阪	ヒト脳	BM-3	BM-1	BM-1
相良	1964	熊本	ブタ脳	PK-21	BM-2	BM-2
HV1	1958	台湾	ヒト脳	?	BM-1	BM-1
張	1965	台湾	ヒト脳	BM-1	BM-1	BM-1
林	1965	台湾	ヒト脳	BM-1	BM-3	BM-3
Cheingmai	1964	タイ	ヒト脳	BM-7	BM-1	BM-1
中山(葉検)	1935	東京	ヒト脊髄液	G-101	BM-1	BM-1
中山(予研)	1935	"	"	Y-41	BM-2	BM-6
Warren	1935	"	"	CE-3, BM-5	BM-1	BM-1

BM: 哺乳マウス, PK: 初代ブタ腎細胞, CE: 鶏胚センイ芽細胞, AM: 成熟マウス

構造上2群ないしは数群に大別され得るか否か、又その場合に分離された地理的条件などが関与しているかどうかを調べるために、日本国内および国外で分離された10株のウイルスについて、組織培養法による交叉中和試験によって調べることを意図し以下の実験を行なったのでその成績について述べる。

材料と方法

ウイルス株: 実験に使用したウイルス株は「表1」に示された10株のものである。いずれも予研ウイルス4室より分与を受けたもので、継代数を可及的に増加させぬよう留意して実験に用いた。下三段の3株のウイルスはすべて1935年分離された中山株ウイルスが異なる研究機関において継代維持されたものである。

家兎免疫血清: 使用した家兎は体重約2kgのもので、あらかじめ中山-予研株ウイルスに対して中和抗体陰性であることをたしかめたのち用いた。上記各ウイルス株毎に2~5羽の家兎を使用して免疫血清を作製した。免疫方法は前記継代レベルのウイルス感染マウス脳10%乳剤の10,000 rpm 30分間の遠心上清液の更に10倍希釈のウイルス液を脳内に0.5 ml, 腹腔内に5.0 ml, 皮下に1.0 ml, 静脈内に5.0 ml (中山-予研株・中山-葉検株およびJaGAr 01株での免疫は10%感染マウス脳乳剤の遠心上清液で脳内および腹腔内接種のみ)を一時に接種し、接種後1週で一部採血をしこれを初期免疫血清とした。初回接種後2週・3週・4週目に前記ウイルス感染マウス脳10%乳剤の遠心上清液を静脈内に2.0 ml 宛接種し、最終回の接種後2週目に採血を行ない、これを後期免疫血清とした。初期、後期の両免疫血清とも、各ウイルス株毎に2~3羽のものを夫々プールして実験に供した。

鶏胚センイ芽細胞の単層培養: 11日孵化卵の鶏胚を

トリプシンで型のごとく消化し、75 mm 径シャーレに450万個/mlの細胞浮遊液を8 ml 宛入れ、CO₂ フラン器で20~24時間37°C 培養後のものを用いた。細胞浮遊液に用いた培養液は、ラクトアルブミン水解物0.5%, コウシ血清(日本脳炎中和抗体陰性のもの)10%, Earle 液89.5%よりなるものである。

中和試験の術式(吉岡ら, 1965): ウイルスのみ接種の対照シャーレにおけるブラック数の出現を50%抑制せしめるような血清希釈倍数を求めるために、0.55%牛血清アルブミン加 Hanks 液を用いて適当な数段階の希釈血清を作り、これに約150~300 Plaque Forming Unit/0.4 ml のウイルス液を等量加え37°C に60分間おいた後、ウイルス・希釈血清の混合液を培養シャーレ1枚あて0.4 ml 宛接種した。各混合液毎に2枚のシャーレを使用した。ウイルスのみ接種の対照として、希釈血清の代りに0.55%牛血清アルブミン加 Hanks 液と上記ウイルス液との等量比混合液を37°Cに60分間おいた後を10枚のシャーレに接種した。接種されたシャーレはその0.4 ml すべてCO₂ フラン器内に90分置き、ウイルス吸着を行なわした。その後、寒天加培地を8 ml 宛各シャーレの細胞層に重層し、寒天の固まるのを待って寒天層を上にし、CO₂ フラン器内で培養を行なった。第一次寒天加培地の混合前の組成は下記の通りである。

A液 3%寒天液 (Special Agar, Noble, Difco)
90.0 ml

B液 10×Earle (重曹・フェノールレッドを除く)
18.0 ml

5%ラクトアルブミン水解物 18.0

5%イーストレート 1.8

7.5% NaHCO₃ 5.4

抗生剤 (ペニシリン10万単位/ml
ストレプトマイシン100 mg/ml)

再蒸溜水 45.8
 ウイルス接種後2日目に第二次寒天加培地4ml 宛の重層を行なった。この寒天加培地の混合前の組成は下記のごとくである。

A液 3%寒天液 (Special Agar, Noble, Difco)	90.0 ml
B液 10×Earle (重曹・フェノールレッドを除く)	18.0 ml
0.1%中性赤	8.0
抗生剤	1.0
再蒸溜水	63.0

第二次寒天加培地を重層した翌日にブラック数を計算し、ウイルスのみの対照シャーレに出たブラック数の50%の数にまで減少せしめた希釈血清の希釈倍数を、50%前後のブラック数を示した希釈血清の倍数より比例で求め、それを中和抗体価としてあらわした。

成 績

一つのウイルス株を用いて作製された家兎免疫血清(プールされたもの)中に、そのウイルス株および他の9株のウイルスに対する中和抗体がどの位産生されているかを前述の中和試験の術式に従い測定してみた。

交叉中和試験の予備試験を初期および後期家兎免疫血清を用いて実施したところ、後期免疫血清中には各ウイルス株に対する中和抗体価がすべて可成り近似した価を示し、後期免疫血清では各ウイルス株間に著明な差の表われることを期待し難い成績を得た。したがって本実験においては初期免疫血清を用いて行なった交叉中和試験の成績について述べる。

各ウイルス株に対する初期免疫血清中の中和抗体価は、免疫に使用した抗原量が各ウイルス株間に可成りの

相異のあることは確かであり、且免疫に使用した家兎の個体差もあるので、測定された中和抗体価の絶対値をもつて各ウイルス株を比較することは妥当でない。よつて免疫に用いられたウイルス株に対する中和抗体価を相対中和抗体価100として表わし、他の9株に対する相対中和抗体価を絶対値より比例で求めた。その成績が一括して「表2」に示される。横の各段の数値が、夫々のウイルス株で免疫された家兎初期免疫血清中の10株のウイルスに対する相対中和抗体価を示したものである。例えば表の一段目のJaGA 01株ウイルスで免疫された家兎の初期免疫血清中には、工藤株に対する中和抗体はJaGA 01株に対する中和抗体よりも2.38倍高く検出されたので238と示し、HV 1株に対する中和抗体はJaGA 01株に対するものの1/10しか検出されなかつたので20と示してある。

各ウイルス株の相互の関係を見易くするために、この表をグラフに書き直してみると「図」のごとくなる。すなわち免疫に使用したウイルス株に対する中和抗体価をLog₁₀ 0として「0」の所に位置づけ、その左右に各ウイルス株の位置づけを夫々の中和抗体価によって行なうと、図に示されるように各ウイルスのシンボルがおかれる。中山-予研株ウイルスで免疫された家兎の免疫血清(図中下より二段目)を例にとると、中山-予研株のシンボルは「0」の位置におかれ、中山-葉検株に対する相対中和抗体価は表2より102であるので、このウイルス株も又「0」の位置にシンボルがおかれる。同血清中のHV 1株に対する相対中和抗体価は9.9で中山-予研株に対するものの10分の1に当たるため「-0.1」の位置に同株のシンボルがおかれ、相良株に対する相対中和抗体価は中山-予研株のものの100分の1なので「-2.0」の位置にシンボルがおかれている。この図で「-0.6」と「+0.6」の所で各段に通して示された縦線は、

表2 初期家兎免疫血清の相対中和抗体価

ウイルス 抗血清	JaGA 01	工藤	相良	HV 1	張	林	Cheingmai	中山 (葉検)	中山 (予研)	Warren
JaGA 01	100	238	28	20	28	15	25	215	65	70
工藤	18	100	29	12	250	21	76	540	121	7
相良	68	200	100	102	54	117	42	340	190	34
HV 1	45	400	58	100	159	38	100	235	247	65
張	6.4	12	15	5.3	100	8.3	13	29	50	70
林	13	215	88	151	537	100	268	634	202	124
Cheingmai	96	71	32	18	38	35	100	167	91	18
中山(葉検)	8.6	43	4.4	4.8	69	6.9	26	100	41	38
中山(予研)	0.8	8.5	1	9.9	8.3	1.2	1.7	102	100	26
Warren	39	23	88	160	307	71	23	103	160	100

図 1 種々 JE ウイルスに対する各家兎免疫血清中の中和抗体

血清希釈や接種の際などにおこり得る実験誤差を考慮するための線であることを示している。したがって「-0.6」の線より左方にシンボルがおかれたウイルス株は、免疫に使用したウイルス株に対して hetero であると考えられる。

考 察

われわれの実験の目的は、感染発症の防御機構に関連の強そうに思われる中和抗体の状況を調べることににより、抗原構造の差異の有無を究めることにあつた。

われわれの得た成績より判断すると、図に於ける「-0.6」と「+0.6」の両線間からはずれたウイルス株の内、特に「-0.6」の線より左方に位置を占めるものは、免疫に用いたウイルス株に対して hetero であると考えてよいだろう。しかし確実に hetero であると言うためには、比較する2つのウイルス株が夫々相手の抗血清で、共に hetero であることが必要となる。例をひいて言えば、図に於いて抗 JaGAr 01 血清と抗林血清を比べてみると、抗 JaGAr 01 血清で林株ウイルスは hetero であり、抗林血清で JaGAr 01 株ウイルスは hetero であるので、この両者は hetero であると考えよう。このようにして確実に hetero と云えるのは JaGAr 01-林の他に、Warren-工藤、Warren-Cheingmai がある。

逆に「-0.6」と「+0.6」の両線内にあつて homo と考えられるものを探してみると、相良-HV 1、相良-林、HV 1 株等々 20 組にも及ぶ組合せが見出される。

実験に用いた 10 株のウイルスについて、homo, hetero の関係を図示しようとするならば立体図を必要としよう。これを簡単に云い表わすならば、相良・林・HV 1 の 3 株は密接な関係をもつ 1 群をなし、中山-予研、中山-葉検・Warren・張の四株も比較的密接な関係をもつ 1 群を形成し、JaGAr 01 株と Cheingmai 株の 2 株が近縁関係をもち乍ら相良・林・HV 1 株の 1 群に比較的近い関係にある。工藤株は相良・林・HV 1 株の 1 群と中山-予研・中山-葉検株等が作る 1 群との中間に位置している形である。そして上記 3 群も隔離したものでなく、群のある株は他の群のある株と近縁関係をもつことにより各群の一部が若干ずつ重なり合つて居る。

本実験に使用したウイルス株が僅か 10 株であるために、以上のような群別をもつて、日本脳炎ウイルスの型別とすることは危険であろう。

韓・大谷ら(1967)も中和試験による日本脳炎ウイルスの型別を試み、JaGAr 01 型ウイルスと中山-予研型ウイルスおよび中間型ウイルスの存在することを示唆し、尾崎ら(1967)は中和 Kinetics 法による日本脳炎ウイルスの抗原分析を試み、JaGAr 01 および中山-予研株ウイルスが新鮮分離株との間に可なりの開きのあることを認めてはいるが、両氏らも未だ決定的な型別をするまでには到っていない。

型別とは別に個々のウイルス株について考えるならば、中山-予研株が他の 9 株と比べて非常に特異なことが図に一目瞭然となつている。すなわち中山-葉検株および Warren 株ウイルスに対する中和抗体はよく産生しているが、他の 7 株に対してはごく少量の中和抗体しか産生していない。このことは中山-予研株は他のウイルス株に比して、中和抗体産生能の点で非常に特異なウイルス株であると考えよう。同じような傾向が、軽度であるが中山-葉検株および張株ウイルスについても認められる。これに反し、相良・HV 1・Warren の 3 株ウイルスは他のウイルス株に対しても略々同じように中和抗体を産生せしめていることは、別の意味で注目値することである。すなわち広汎な抗体産生能は免疫原として有利な点をもつことになろうし、ウイルス同定の際などに他のウイルス株で作られた免疫血清よりもより有効なものとなる可能性を持つている。

以上これまでに得られた結果は、あくまでも家兎初期免疫血清を用いて得られたものであり、一般論として断定するには尚早であるかも知れない。日本脳炎ウイルスの抗原分析はいわば緒についたばかりであり、更により

多くのウイルス株について調べることの必要があると共に、患者血清の面からも抗原分析の緒口を求めることも効果的な一方法となろう。この方面の研究は現在進行中である。

本研究の一部は文部省科学研究費によった。又本研究の要旨は第41回日本伝染病学会総会(1967年名古屋)において発表した。

Summary

Ten strains of Japanese encephalitis virus isolated in Japan, Taiwan and Thailand, were investigated by plaque reduction neutralization method.

Cross neutralization tests with rabbit early-immune sera demonstrated that all the viruses are divided into three groups. However, those three groups are not independent, but relatively closely related each other.

Nakayama-NIH strain is closely related to Nakayama-Yakken and Warren strains which are sublines of Nakayama-NIH strain, but not related to other viruses.

Geographic variation in the antigenic character of Japanese encephalitis viruses was not observed by our cross neutralization tests.

文 献

- 1) Casals, J. (1964). Antigenic variants of eastern equine encephalitis virus. *J. Exp. Med.* 119, 547-565.
- 2) Hale, J. H. and Lee, L. H. (1954). A serological investigation of six encephalitis viruses isolated in Malaya. *Brit. J. Exp. Path.* 35, 426-433.
- 3) Hammam, H. M., Clarke, D. H. and Price, W. H. (1965). Antigenic variation of West Nile virus in relation to geography. *Am. J. Epid.* 82, 40-55.
- 4) Hamman, H. M. and Price, W. H. (1966). Further observations on geographic variation in the antigenic character of West Nile and Japanese B viruses. *Am. J. Epid.* 83, 113-122.
- 5) Han, H. D., Oya, A. and Sakumoto, H. (1967). Studies on neutralization with Japanese encephalitis virus. III) Strain differences of Japanese encephalitis virus observed in neutralization. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* (To be published.)
- 6) 小林一郎 (1959). 日本脳炎ウイルスの2株の間に存在する免疫学的差異について。ウイルス 9, 475-482.
- 7) 緒方隆幸 (1959). 現行日本脳炎ワクチンの免疫効果に関する実験的研究(第2報)。ウイルス 9, 124-129.
- 8) 奥野剛, 近藤昭, 鈴木誠, 伊東寿子 (1962). 日本脳炎ウイルスの血球凝集抑制反応および血球凝集抑制抗体吸収試験による抗原分析—特に1935~1960年間の分離12株間に見られる免疫学的異同について。第10回日本ウイルス学会総会講演。
- 9) Ozaki, Y. and Tabeyi, K. (1967). Studies on the neutralization of Japanese encephalitis virus. I. Application of kinetic neutralization to the measurement of the neutralizing potency of antiserum. *J. Immunol.* 98, 1218-1223.
- 10) 吉岡勇雄, 相沢主税, 山岸郭郎 (1965). 日本脳炎の中和試験方法について。日本伝染病学会雑誌 39, 201-205.