資 料

ポリオ 3 型の標準中和抗血清の作成について

宮 村 達 男 ・ 北 原 典 寛 ・ 多 ヶ 谷 勇

PREPARATION OF NATIONAL STANDARD ANTI-POLIOVIRUS TYPE 3 SERUM

Tatsuo MIYAMURA, Tsunehiro KITAHARA and Isamu TAGAYA

Department of Enteroviruses, National Institute of Health,
Musashi Murayama, Tokyo 190-12

[受付: 8月16日, 1972年]

序 文

一般にポリオウイルス中和抗体価の測定は組織培養法によつて行なわれるが、組織培養法による中和試験は試験に用いる細胞、培養液、中和の時間、温度、判定の時期などの実施の方法がさまざまであり、術者によつてまた研究室によつて異なることがあり、また同一術者が同一研究室で行なう場合といえども、常に全く同一の条件のもとで行なわれるとは限らない。したがつて、得られた血清の中和抗体価は、同一の血清についても、必ずしも一致せず、その測定値はむしろかなり広い範囲に分布する。そこで、時、所、術者をかえて行なわれた中和試験の結果を相互に比較することはあまり意味がないと言えよう。しかし、時、所、術者を異にする各試験の実施の際、被験血清と同時に、一定の標準血清の中和抗体価の測定を行ない、この特定の血清の抗体価に対する各被験血清の抗体価の比が、時、所、術者を問わず、一定であるならば共通の国際標準血清を相互に使用して、それぞれの中和試験の際、同時にその中和抗体価を測定し、この標準血清の抗体価に対する各被験血清の抗体価の比を算定することによつて、時、所、術者を異にした中和試験の成績を相互に比較することが可能である¹⁾。このような目的に供する標準血清としては、ウイルス性疾患の場合は、Anti-swine-fever serum (1963年)、Anti-small pox serum (1965年)、Anti-canine-distemper serum (1967年)、Anti-canine-hepatitis serum (1967年) が WHO の Expert Committees on Biological Stan-

dardization の主唱によつて準備されている²⁾。ポリオウイルスの標準血清については、先に Perkins などによつて作成されていた英国標準血清³⁾を、国際標準血清として採用することが、WHO の Expert Committees on Biological Standardization によつて検討され、4ヶ所の研究所*で、多くの同一血清について中和抗体価の測定を行ない、その成績を総合して検討したところ、それぞれの血清の測定値は、研究室によつて異なるが、それぞれの血清の中和抗体価の、英国標準血清の中和抗体価に対する比はよく一致したので、ポリオ中和試験を行なう場合の標準血清の使用の意義が確認され、この英国標準血清を国際標準血清として採用することが、決定されている²⁾。WHO は、この国際標準血清の使用を推奨しているが、この血清には量的に制限があるので各国において、国際標準血清に準じて国内標準血清を準備し、両標準血清の中和抗体価の比を定めた上、一般には国内標準血清を使用して相互のポリオ中和抗体価についての比較、検討することが望ましいとしている。われわれは、国際標準血清の作成された方法に準じてまずポリオ 3 型の抗血清を作成し、抗体価などの検討を行なつたが、その結果、標準血清として十分使用に耐えると思われる成績を得たので、この血清を国内標準ポリオ 3 型中和血清とすることを提唱するものである。

* (Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark; National Institute of Health, Bethesda, Md., U.S.A; National Public Health Laboratory, Faculty of Medicine, Lyons, France; Moscow Institute for Poliomyelitis Prophylactics U.S.S.R.)

材料と方法

1) ウイルス：抗血清の作成に用いたウイルスは、Sabin type 3 株の Connaught 社製ワクチンで予研において、標準ウイルスとして使用中のもの (Lot No. 308-1) をアフリカミドリザル腎細胞で一代通過したもので、その感染価は $10^{7.9}$ TCID₅₀/ml であった。

2) 供試サル：抗血清の作成に用いたサルは、アフリカミドリザル2頭 (No. 9118および No. 9131) で当研究所獣疫部で、購入、管理されていたもので、いずれも免疫前のポリオ3型抗体価は4倍以下であった。

3) 免疫方法と血清の採取：上記ウイルスを10ml ずつ、おのおののサルの大腿部皮下に、2か月間にわたり、計4回接種した。最終の接種後、1週間を経て全採血を行ない、血清を得た。

4) 血清の凍結乾燥：アフリカミドリザルNo. 9118から得られた免疫血清80ml に6%デキストラン液 (Dextran T-500, Pharmacia, Uppsala, Sweden) 1,000ml を加え、中和抗体価が、約1,000倍になるよう希釈した後、1ml ずつアンプルに分注して凍結乾燥した。凍結乾燥は北里研究所柏支所において米国 Virtis 社製 RE-PP Model No. 101で行なわれた。

5) 組織培養：中和試験には初代培養カニクイザル腎細胞を用いた。増殖用培地として重曹0.11%, ストレプトマイシン 100 μ g/ml, ペニシリン 100u/ml を含む、Lactalbumin-Earl 液にウシ血清2%を加えたものを用いた。約1週間、静置培養したものを中和試験に用いた。

6) 中和試験：中和試験は二つの方法を用いた。一つは、当研究室において日常的に行なわれている方法であ

り、(方法1)、いま一つは、前述の英国標準血清の作成の際に、Perkins らが行なった方法である(方法2)。二つの方法の要点を、表1に示した。

7) 国際標準血清：作成したポリオ3型免疫血清の抗体価を、国際標準血清のそれと比較したが、国際標準血清は National Institute for Medical Research の Medical Research Council から分与されたものであつて WHO で、国際標準血清と定めたものである²⁾。この血清は凍結乾燥されており、その取り扱いにあつては Perkins らの方法にしたがつた。すなわち

① アンプルは4°C 以下の低温に保存する。

② 開封にあつては、0.01%の重曹を含んだ Hank's 液を10ml 試験管にとり、そのうちの適量を、アンプル内に乾燥血清が完全にひたるまで入れ、37°C の孵卵器に入れて血清を完全に溶解せしめる。(約10分で血清は溶ける)。溶けた血清はカピラーを用いて10ml のメスシリンダーに移し、そのカピラーを用いて、残りの Hank's 液にてアンプルを洗いその液をメスシリンダーに移して、最終的に正確に10ml とする。

③ 溶解血清は4°C に保存する。直ちに使用しない分は、1ml ずつ、小試験管に分注し-30°C 以下に凍結し保存する。

④ 凍結血清を溶解して、使用する場合は1回かぎりとし、何回も凍結融解をくりかえしてはならない。

⑤ この国際標準血清はアンプル当たり10単位の中和抗体を含むものと定められている。

われわれが作成した標準血清のアンプルを開く場合も、忠実に上記の方法にしたがつた。ただし、溶解血清

表1 中和試験の二つの方法

	方 法 1	方 法 2
I) 培養液	前日に、重曹0.15%、ストレプトマイシン100 μ g/ml、ペニシリン100u/mlを含んだ Eagle 維持液に液替しておく	Hanks 液で洗浄後、重曹0.2%、ストレプトマイシン100 μ g/ml、ペニシリン100u/ml を含んだ Parker 199 液を維持液として用いる。
II) 血清希釈	希釈液は Eagle 液を用い、4倍階段希釈	希釈液は、Hanks 液を用いて2倍階段希釈
III) 試験管数	各希釈 4本	各希釈 4本
IV) 攻撃ウイルス	Sabin 株または Saukett 株 100TCID ₅₀ /0.1ml	Saukett 株 100TCID ₅₀ /0.25ml
V) 中 和	1時間 37°C 水浴	3.5時間 37°C 孵卵器内
VI) ウイルス接種	維持液を捨て、血清-ウイルス混合液を0.2ml ずつ接種。37°C、孵卵器内で1時間吸着せしめ、その後前述の Eagle 維持液1ml を加える	血清-ウイルス混合液を0.5ml ずつ、吸着時間をおくことなく、前述の維持液中に加える。
VII) 培 養	37°C 孵卵器内で静置培養する	37°C 孵卵器内で回転培養する。 (10回転/hr)

は -20°C で凍結保存した。

成 績

1) 血清抗体価：アフリカミドリザル2頭を免疫して得られた、それぞれの3型ポリオウイルスに対する抗体価は、表2のとおりであり、1型、2型との交差反応は認められなかった。9118号猿の血清の中和抗体価がより高かったので、これを国内標準血清用の候補血清として用いた。デキストラン液による希釈、凍結乾燥の過程を経て、約600本のアンプルが作成された。

表 2 ポリオ 3 型抗血清中和試験成績*

アフリカミドリザル番号	血 清	攻撃ウイルス	中和抗体価**
9118	免疫前	Sabin 株	<4(32)
		Saukett 株	<4(32)
	免疫後	Sabin 株	8192(32)
		"	16384(32)
		"	8192(100)
		Saukett 株	6300(100)
9131	免疫前	Sabin 株	<4(32)
		Saukett 株	<4(32)
	免疫後	Sabin 株	8192(32)
		"	6300(320)
		"	6300(100)
		Saukett 株	8192(32)
		"	1580(100)

* 表1の方法1によって得た。

** () 内は攻撃ウイルス量, TCID₅₀/0.1ml

2) 蛋白含量および含湿度：無作為に抽出した10本のアンプル内の乾燥血清を水にとかして、10ml とし、その4ml をとり、トリクロル酢酸沈殿についてマイクロケルダール法により、窒素量を測定し、その値に6.25を乗じて蛋白質量とした(表3)。下段にその平均値と95%信頼限界を示した。

表 3 ポリオ 3 型抗血清蛋白質量含量

No.	蛋白質 mg/アンプル
1	4.0
2	4.1
3	4.0
4	4.0
5	4.0
6	4.1
7	4.2
8	4.1
9	4.2
10	4.1
m	4.1±0.1

また5本のアンプルの検体の質量をはかり、 60°C にて3時間乾燥(圧5mm以下)した後、再び質量をはかり、その差からアンプル内の含湿度を求めた(表4)。

蛋白量および含湿度の測定は、予研化学部において行なわれた。

3) 準備された分注血清(候補血清)の中和抗体価およびその国際標準血清の抗体価との比の決定：方法1による中和試験で得た候補血清と国際標準血清の抗体価ならびに両者の比を表5に示した。攻撃ウイルスとしてはSabin 株と Saukett 株を用いた。

表5における中和試験の成績は無作為に抽出された11本(A~K)のアンプルについての成績であるが、すべてほぼ同一の値を示し、アンプル間に抗体価の差は認められなかった。また表5におけるB.C.D.E.F.(試験番号3~7)の5アンプルについては同時に、同一の条件で行なったもので得られた抗体価はよく一致した。Sabin 株と Saukett 株で得られた抗体価にも差は認められなかった。(P<0.01)

候補血清の抗体価の平均は、125倍、国際標準血清のそれは、28倍、候補血清の抗体価の国際標準血清の抗体価に対する比の平均(相加)は4.4であつた。

つぎに、方法2によつて得られた候補血清と国際標準

表 4 含湿度試験成績

No.	A) 試料重量 mg	B) 乾燥後重量 mg	C) H ₂ O 重量 A-B	D) H ₂ O % C/A
1	46.020	45.475	0.545	1.2
2	53.970	53.320	0.650	1.2
3	52.965	52.190	0.775	1.4
4	43.640	43.130	0.510	1.2
5	50.210	49.690	0.520	1.0
m	—	—	—	1.2±0.2

表 5 方法 1 による抗ポリオ 3 型中和試験成績

試験番号	アンプル	血 清		候補血清と国際標準血清の抗体価の比 (A/B)	攻撃ウイルス	攻撃ウイルス量 (TCID ₅₀ /0.1ml)
		A) 候補血清	B) 国際標準血清			
1	A	128	32	4.0	Sabin 株	40
2	A	144	32	4.5	"	32
3	B	128	—	—	"	200
4	C	128	—	—	"	"
5	D	128	—	—	"	"
6	E	122	—	—	"	"
7	F	128	—	—	"	"
8	F	135	40	3.4	"	56
9	D	128	16	8.0	"	68
10	D	100	16	6.3	"	46
11	E	128	—	—	"	32
12	C	128	—	—	"	46
13	B	159	—	—	"	100
14	G	128	—	—	"	178
15	G	128	—	—	Saukett 株	68
16	H	128	—	—	"	200
17	I	96	—	—	"	200
18	J	128	—	—	"	216
19	J	128	—	—	"	100
20	I	128	32	4.0	"	68
21	H	128	32	4.0	"	100
22	I	100	32	3.1	"	32
23	K	128	27	4.7	"	46
24	K	128	32	4.0	"	216
25	K	128	32	4.0	"	100
平均		125	28	4.4	—	—

表 6 方法 2 による抗ポリオ 3 型中和試験成績

試験番号	アンプル	(A) 候補血清抗体価	(B) 国際標準血清抗体価	A/B 比	攻撃ウイルス量 (TCID ₅₀ /0.1ml)
1	H	128	—	—	32
2	I	155	—	—	32
3	J	200	—	—	46
4	J	138	—	—	46
5	I	100	32	3.1	46
6	I	148	37	4.0	46
7	K	100	40	2.5	32
8	K	128	64	2.0	100
平均		136	41	2.9	—

血清の抗体価および両者の比を表 6 に示す。攻撃ウイルスとして Saukett 株を用いた。候補血清の平均抗体価は、136倍、国際標準血清のそれは、41倍で、候補血清の抗体価の国際標準血清の抗体価に対する比の平均は、

2.9であつた。

さらに、方法 1 で得た平均値と方法 2 で得た平均値の差について F 検定を行なつた。両標本の分散が著しく異なつていたので、Cochran-Cox の近似法により、検定したところ、5%以下の危険率で、両標本の平均値には有意の差はなかった。ただし、この際、抗体価の常用対数は正規分布すると仮定するものである。以上の結果から候補血清の抗体価は128倍、国際標準血清の抗体価は31倍とし(表 7)、候補血清は国際標準血清の 4 倍の力価と定めた。

考 按

血清中の中和抗体価を指標としてポリオ流行の予測、ワクチン投与効果の判定が行なわれるが、その中和抗体価の測定にあつては得られた成績をほかの成績と総合して判断し、あるいは他の成績と比較するために、共通の標準血清の使用が望ましい。WHO の Expert Com-

表7 国際標準血清と作成された3型候補血清の中和抗体価の検討

方 法	血 清	攻 撃 ウイルス	試験数	平 均 (Log ₄)	分 散 (Log ₄)	標準偏差 (Log ₄)	平均値の95% 信 頼 限 界
方 法 1	候 補 血 清	Sabin	14	3.518	0.0054	0.074	106~129~152
		Saukett	11	3.469	0.0051	0.071	100~120~146
			25	3.496	0.0055	0.074	102~125~153
	国際標準血清	{Sabin Saukett}	11	2.421	0.0425	0.206	21~ 28~ 38
方 法 2	候 補 血 清	Saukett	8	3.559	0.0453	0.151	91~136~205
	国際標準血清	Saukett	4	2.695	0.0922	0.215	23~ 41~ 74
平 均 (方法1と方法2と) を合わせたもの	候 補 血 清		33	3.512	0.0098	0.099	98~128~167
	国際標準血清		15	2.489	0.0596	0.244	16~ 31~ 60

mittees on Biological Standardization は種々の抗血清について国際標準血清を定めているが、ポリオウイルスの中和血清についてもすでにその標準抗血清が国際的に準備されている。しかしこの国際標準抗血清はその供給に制限があるので、主として国内で使用される標準血清を準備する必要がある、まずポリオ3型の標準抗血清を作成した。その作成にあたっては国際標準血清の作成された方法にしたがったが、得られた抗血清は、アンプルごとの分注量、含湿度に差はなく、各アンプルの内容を溶解して10mlにした場合その抗体価は常に128倍に、おおむね一定し、国際標準血清の中和抗体価との比は1:4であつて、国内標準血清として適当なものであつた。

Bentzon らによつて示されるごとく、二つの同一血清の中和抗体価の比は、中和試験の異同にかかわらず一定であるから、国際標準血清と作成された3型標準血清の中和抗体価の比を定める場合、いずれの方法によつても一定の比が得られるのであるが、この比の決定は重要であるので慎重を期するために、当研究室で行なつてゐる方法(方法1)と、Perkins らが英国標準血清を定めた際に用いた方法(方法2)の両法を用いた。表5、表6および表7に示されるごとく、両法によつていずれも同一の比が得られ、またそれぞれの方法で得られた抗体価は国際標準血清、3型候補血清のいずれの場合もほぼ同一の値が得られた。このことは、ポリオ標準中和血清の使用の意義を認めた Perkins らの報告²⁾を支持するものであり、いつばう得られた抗体価についての成績が確実であることを示すものである。

また、当研究室で行なつてゐる方法で測定した国際標準血清、3型候補血清のいずれも攻撃に使用したウイルスが Sabin 株、Saukett 株いずれの場合も同一の抗体価が得られ、攻撃株による抗体価の差異は認められず、いずれの株を中和試験に用いても得られる結果に、差異

はないものと考えられる。

1, 2型のポリオ国内標準血清も3型の場合と同様の方法により作成中である。

総 括

ポリオウイルスの中和抗体価の測定にあつて抗体価の標準とする血清として国際標準血清が準備されている。しかしこの国際標準血清はその供給がかぎられているので、国際標準血清に準じて標準血清を別途に作成し、抗体価などの検討を行ない、国内での実用に供すべく準備した。

アフリカミドリザルを免疫して得られたポリオ3型免疫血清を凍結乾燥したものについてアンプルごとの血清量、抗体価を測定し、さらに平均の抗体価を国際標準血清のそれと比較したが、アンプル分注量、アンプルごとの抗体価は一定しており、1アンプル当たり、40国際単位を含んでいる。この血清はポリオ3型の中和試験を行なう際の標準血清として、ひろく実用に供しうるものと考えられる。

謝 辞

凍結乾燥のお世話をいただいた北里研究所森田千春博士、室素量などの測定を行なつていただいた予研岡本季彦、原幸子両技官に感謝致します。

Summary

In order to standardize the titer of polio-neutralizing antibody determined by different neutralization tests, the International Standard Poliomyelitis Antisera have been prepared. Since the supply of the sera is limited, an attempt was made to prepare a national standard serum for the use in Japan. As a result, anti-poliovirus serum type 3 was produced from immunized African green monkeys diluted and distributed into ampo-

ules in 1 ml amounts, and freezedried. The reconstituted serum was examined for the protein content. The titer of neutralizing antibody was compared between this serum and the International Standard Serum. From the results of these tests, it was concluded that the prepared serum was suitable for the use as the national standard anti-poliovirus type 3 serum, since it contained 40 International units per ampoule.

文 献

- 1) Bentzon, M. W., Evans, D. G., Maaløe, O., Perkins, F. T. and Spaun, J. (1962) : An international collaborative study of the assay of the potency of poliomyelitis sera. Bull. Wld. Hlth. Org., **26**, 341-355.
- 2) Lyng, J. and Bentzon, M. W. (1963) : International standards for anti-poliovirus sera types 1, 2 and 3. Bull. Wld. Hlth. Org., **29**, 711-720.
- 3) Perkins, F. T. and Evans, D. G. (1959) : British standard poliomyelitis antisera types 1, 2 and 3. Brit. Med. J., **i**, 1549-1553.
- 4) WHO Expert Committee on Biological Standardization (1971) : 23rd Report. Wld. Hlth. Org. tech. Rep. Ser., **463**, 47-79.