アジア型ウイルスを抗原として赤血球凝集抑制反応 を行う場合の血清よりの inhibitor の除去法

(インフルエンザウイルスの種々なる inhibitor に関する研究 第5報)

佐々木 広*

HIROSHI SASAKI: THE METHOD HOW TO ELIMINATE INHIBITORS
OF HUMAN SERUM FOR THE HEMAGGLUTINATION INHIBITION
TITRATION WHEN AN ASIAN P VIRUS WAS USED AS ANTIGEN.

(STUDIES ON SEVERAL INHIBITORS AGAINST INFLUENZA
VIRUSES, 5 TH REPORT)

[受稿 5月9日 1959]

緒 言

正常人並びに正常動物の血清、臓器中にはインフルエンザウイルスの赤血球凝集作用を非特異的に抑制する物質が存在する事は多くの研究者により認められ、 α , β inhibitor 等と一括して呼ばれて居るが、このものはインフルエンザウイルス群に対するスペクトル或いは Receptor destroying enzyme (RDE) による破壊のされ方等より見るとむしろ多元的¹⁾²⁾なものであつて如何にしてかかる inhibitor のすべてを破壊するかと云う事になると未だ具体的な³⁾⁴⁾⁵⁾一般解答は得られて居ない。この問題はアジア型インフルエンザの流行に伴い、特にクローズアップされたので、P相ウイルスに対する赤血球凝集抑制抗体価測定を目標に之等 inhibitor の除去方法を再検討して見た。

総論的にインフルエンザの血清診断法を批判する立場にたつと個人を対象に感染の有無を鑑別する診断法としてはS抗原を用いる補体結合反応 (CFT-S) が優れている事は我々の屢々強調したところである⁶⁾⁷⁾。即急性期血清は全く抗体価を示さず恢復期血清は明瞭に64倍前後の抗体価を示すのが常である。次に同様な理由から Strain Specificity を示すV抗体測定も Henle の最近提唱しているところである⁸⁾ が得られた事実はそれほど Strain specific でなく現在患者の血清を診断する上に於てSに比べその利点を特に強調

する理由は見あたらない。一方赤血球凝集抑制反応 (HAI) の利用度は先づその簡単さの故を以て高い⁹⁾。ただし個人の血清を流行株を以てしらべると、旧来の流行株と抗原交叉があつた場合急性期血清も一定の抗体価を示すため恢復期血清で上昇の程度が明瞭に欠く場合がありこの点 CFT-S にもとづく血清診断法に較べ劣る所以である。又恢復期血清中の抗体も anamnestic sin の存在があつて抗体価の特異性を明瞭に示さぬ場合が多々ある。ただしこの特異性という点に議論をしぼると得られたウイルスの抗原構造の決定を行う場合には HAI は缺くべからざる方法で殊に免疫動物にモルモットを選び接種方法を経鼻とすれば初期の抗体は甚だ Strain Specificity が高く之は HAI を利用する事の長所として数えられるべきものであらう¹⁰⁾。

しかしアジア型インフルエンザの流行にあつて我々は従来手慣れた HAI の利用度というものにかなり疑義をいだいた。即鶏の赤血球を用いて人抗体、免疫動物の抗体を測定した場合先づP相ウイルスを用いると抗体価が高く示されるが、Q相ウイルスを用いた場合は抗体価は低く或は全く示されない。即流行株でも用いる抗原の種類により抗体価が甚しく異なるという缺點がある。しかし兎も角P相ウイルスを抗原として HAI をしらべると抗体価上昇を証明するに敏感であるが遺憾乍らこのウイルスは血清中の非特異的な

* 東北大学医学部細菌学教室 (指導: 黒屋政彦教授)

inhibitor によつても非常によく阻止される。我々は之を救う一つの方法として人O型又はモルモット血球を用いQ相ウイルスを抗原として HAI を行えば比較的高い抗体価が示され且つ inhibitor を心配する必要がないという事を述べた¹¹⁾が猶その価はP相ウイルスを抗原として得られる抗体価より低い。するとP相ウイルスを用い且この inhibitor を徹底的に除去する事が必要となるが、従来やつてきた様に RDE²⁾¹²⁾を使用したのではアジアウイルスに対する人や動物中に含まれる inhibitorは破壊し得ない。ただし KIO₄を用いればこれを破壊し得る事に我々はいち早く気づきこの方法を先づ我国に於て提唱した⁷⁾。又KIO₄法はその後アメリカに於ても、アジア型ウイルスの HAI 診断の標準法として選ばれた³⁾。しかし多くの実験をすすめる内に KIO₄は抗体を壊すのではないかと云ふ疑義を生じた。又その事実も実験的には確められた¹⁰⁾。そこで我々は KIO₄と並んで RDE ではなく Cholera filtrate そのものの利用を再検討する事とし、一応この inhibitor を破壊し得る事を知つたが、では如何なる方法でこの濾液を産生すれば何処の研究室においても安心して用い得る濾液が得られるか、その実験再現性を目標として力を注ぎ、一定の結果を得たのでここに報告したい。猶之等血清中に含まれる Asian P ウイルスを非特異的に抑制する耐熱性 inhibitor を α' inhibitor⁷⁾と仮称しコレラ菌濾液中に含まれる本物質を破壊する酵素を α' enzyme とよび従来知られた RDE (α enzyme) との相異を実験的に追及し、一応差異を示し得たと思うが猶化学的な意味からの差異は今後追求さるべき問題と思われる。

実験材料と方法

1) 血清：アジアウイルスに対する陽性血清は、仙台市民及び秋田県尾去沢住民のもので、Aウイルスに対する CFT-S 抗体の上昇を確めたものを用いた。尚 inhibitor を含み抗体を含み陰性血清として Lee に抗体価を示さぬ10才以下の人血清で、アジアウイルス流行以前に得たものを特に選んで使用した。その他動物血清としては家兎、モルモット、鶏、マウス等を適宜実験に供した。

2) ウイルス：インフルエンザウイルスは PR₈, Asian P (萱野株, 305M 株), Cam, FM₁, Lee 等を使用した。各ウイルスは、10~11日 孵化鶏卵に Standard Passage 2代後その漿尿腔液を採取して、試験管に分注し、-25°C に保存してウイルス原液と

し用にのぞんで使用した。

3) コレラ菌：当教室に於て継代保存の 4 Z 株と 558株を用いた。

4) コレラ菌の培養法：継代培養せる普通寒天斜面より、一白金耳を取り 1%ペプトン水 pH 8.0 に接種し、37°C、6~8時間培養を2回繰返した後本培地に1%の割合に接種し、37°C 18時間培養後、これを Seitz EK で濾過し、無菌的な事を確め、氷室に保存使用した。培地の一つは従来あまねく用いられた半凝固寒天¹³⁾で、馬肉汁 1,000ml に対し Neo Pepton 10g, Na₂HPO₄ 12H₂O 3.0g, NaCl 2.0g, 寒天 5.0g, を含み pH 8.0 のものである。第二のものは川村の提唱した Ovomucin を加えた Pepton 水¹⁴⁾の変法培地で RDE 産生はやや低いが Ovomucin の代りに卵白を10%の割合に加えたものを用い pH は 8.0 とした。

5) コレラ菌濾液の活性度の定量方法：以下のべる方法は我々が定めた標準法ですべて他の研究所からコレラ菌濾液を求められた時は之等の価を附して提供する事とした。

A 赤血球による RDE 単位測定法：濾液の 0.25 ml を Ca Borate Buffer (pH 7.1~7.2, CaCl₂ 1.00 g, NaCl 9.00g, H₃BO₃ 1.203g, Na₂B₄O₇·10H₂O 0.052 g, Aq 1,000ml)¹⁵⁾で倍数稀釈し、これに 0.5%鶏赤血球浮游液 0.25ml 宛加え、37°C 60分作用後 PR₈ ウイルス 8HU/0.5ml 宛加え全量を 1.0ml とし 4°C、2時間静置し Salk の Pattern 法に従い判定した。以上の条件で赤血球凝集を抑制する最高稀釈倍数の逆数を RDE unit と呼び Per ml であらわした。

B 溶液状態の α inhibitor を使用する RDE 単位測定法：予め測定して、heated-Lee (56°C 30分加熱) に対し inhibitor の高いことを確めた正常家兎血清を用意しておく。(多くの正常家兎の inhibitor 単位とその deviation については別報する¹⁶⁾。これを適当に稀釈し、 α inhibitor 単位が 512u/ml になる様にする。尚 α inhibitor の単位測定には inhibitor とウイルスを室温に1時間作用後血球を加えた判定値をとる。Ca Borate Buffer で濾液の倍数稀釈液をつくり、上記家兎血清に対し、3倍量加え、37°C 一夜作用後その各々を Citrate Saline で倍数稀釈し、HAI の有無を常法通りしらべる。512u/ml の inhibitor 単位を 32u/ml 以下となし得る濾液の最高稀釈倍数の逆数を以て α enzyme unit と呼ぶ事とし Per ml であらわす。

C α' enzyme unit 測定法：測定方法は全く α の

場合と同じで、ただ α' inhibitor は 1024u/ml の家兎血清を基質として用い Asian P ウイルス (萱野株) を heated Lee の代りに用いた。この外単位の決定の仕方は α enzyme の場合と同じである。

D β enzyme unit 測定法：牛血清の β inhibitor (大体 2000u/ml) に稀釈したコレラ菌濾液を同量加え、37°C 一夜作用後に、卵継代のみでマウスを通過しない Cam 株ウイルスで HAI を測定し、同じく破壊する濾液の最高稀釈倍数の逆数を以て単位とする。

6) 血清及び臓器の処理方法：臓器は10%乳剤とし、3000r.p.m, 15分遠心上清を原液として用いた。先づ血清及び乳剤に1/20量の500倍マーズン液を加え、ついでコレラ菌濾液を被検材料の3倍加え、37°Cで16時間作用せしめた。又 KIO_4 は M/50濃度の水溶液を血清に等量加え、0°C 16時間作用後 10% glucose を KIO_4 量の2倍量に加え、 KIO_4 の作用を止め赤血球凝集抑制試験を行つた。

7) 赤血球凝集抑制抗体価測定法：コレラ菌培養濾液で処理した被検材料 0.25ml を 2.5% Citrate Saline (pH 7.1~7.2) で倍数稀釈し、16u/0.25ml のウイルスを加え室温に30分作用させた後2.5% Citrate Saline で作った0.5%の鶏赤血球浮游液 0.5ml を加え、4°C に90分静置後判定した。

8) 澱粉を支持体とする電気泳動法¹⁷⁾：澱粉を支持体とする電気泳動によつて 558 濾液を分割した。局

方澱粉を pH 7.1, 1/15M 磷酸緩衝液に懸濁して 1.5×7×40cm の Cell につめ 3.8mA/cm² の定電流装置で 250V の電圧をかけ泳動時間19時間とし 0°C で行つた。

実験成績

1) 4 Z 濾液と 558 濾液の相違：先に川村¹⁴⁾は 1%ペプトン水に Ovomucin を加えた培地に 4 Z 株を培養すると、①適応的に RDE 産生が上昇し又 ②この方法で得た濾液は濾過が容易であり ③更に 20% $CaCl_2$ を濾液の 1/40量加え、54~55°C 加熱したものは RDE titer が上昇する事を述べた。この様にして得た濾液は赤血球法で所謂 RDE unit をしらべると明かに単位は高く一般に知られた α inhibitor を破壊するには確かに適しているが、アジア型ウイルスを抗原とした場合、ひと血清や家兎血清中の inhibitor はこの加熱濾液では除去し得ない。従つて我々は先づかかる RDE に対し抵抗の強い Asian P に対する inhibitor を α' inhibitor と仮称しこのものの破壊を目的に実験をすすめる事とした。先づ 4 Z 株でも 558 株でも培養した濾液そのままを用いて血清に大量に加え長時間処理するならばこの α' inhibitor をも破壊する事を知つた。そこで所謂 α' inhibitor destroying enzyme はどうすれば多量に得られるかを確める目的で先づ前記半凝固寒天培地と卵白加ペプトン水培地

Table. 1 Production of α' -enzyme with two Vibrio strains, 4 Z and 558.

dilution of cholera filtrate	RDE (u/ml) contained in each dilution	4 Z filtrate					558 filtrate				
		hemagglutination inhibition titer of treated rabbit serum (u/ml)									
		32	16	8	4	2	32	16	8	4	2
2	128	++*	++	++	++	++	++	++	++	++	++
4	64	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
8	32	—	+	++	++	++	+	++	++	++	++
16	16	—	—	+	++	++	—	+	++	++	++
32	8	—	—	+	++	++	—	—	++	++	++
		hemagglutination inhibition titer of treated human serum (u/ml)									
2	128	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
4	64	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
8	32	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
16	16	—	—	++	++	++	±	+	++	++	++
32	8	—	—	+	++	++	—	+	++	++	++

*++ means positive hemagglutination, indicating the destruction of inhibitor titer of the substrate by adding each dilution of Cholera filtrate.

を用意し、夫々4 Z株及び558株を培養した濾液計4種を用いて何れが α' inhibitor の破壊能が高いかを比較して見た。代表的な成績は Table 1 に示す。赤血球法ではかつた RDE unit は株により差異はなく一般に卵白加ベプトン水培地では512u/ml、半凝固寒天では256u/ml で大差はない。しかしその RDE 単位を一定にし我々のきめた標準法で家兎血清を用いて α' enzyme unit を測定して見ると558の方がやや産生能力がすぐれている。表は半凝固寒天濾液で得られた成績を示し例えば家兎血清を基質とした場合4 Z濾液は64u/ml の RDE 単位を含むところまで稀釈して α' enzyme 単位を示すが、558は32u/ml しか含まれ様にうすめても猶 α' enzyme 活性を示す。この事は人血清の inhibitor を基質としても同様の傾向を示す (Table 1)。この実験から558を一応菌株として選ぶ事に決定し、これを半凝固寒天法でも卵白加ベプトン水法でも培養すると恒常的な data の得られる事を知った。尚最初卵白加ベプトン水では α' enzyme の産生が少ない様な成績を得たため、この実験の大部分は558の半凝固寒天培地で得た濾液を用いたが後半に至つて卵白加ベプトン水も同じく α' enzyme 産生のよい事を知った。

2) 559 濾液と RDE の違い：我々がアジア型インフルエンザウイルスに対する inhibitor が従来知られた α inhibitor とは基質としての態度に於て違う事に気が付いた第1の動機はこのものが当時大量に所有していた高単位精製 RDE によつても破壊されなかつたからである。しかしコレラ菌濾液そのままなら破壊し得るとすれば RDE とコレラ菌濾液とはどこが異なる

であろうか。この差を示す実験を次に述べてみたい。

I) 濾液を加熱すると RDE titer に低下はみられないが、 α' enzyme unit は全く失われる事：アジア型インフルエンザに対し抗体のない人血清を用意し、1. 558濾液、2. 558濾液に20% CaCl_2 1/40量加え、HCl にて pH 6.0 にし 54~55°C 40分加熱しその遠心上清 3. M/50KIO₄ でそれぞれ処理し asian P 及び heated Lee を用い凝集抑制試験を行つた結果を Table 2 に示した。用いた5血清の何れも heated Lee に対する α inhibitor は558濾液、加熱濾液、KIO₄ の3者で完全に破壊されるのに対して、 α' inhibitor は558濾液、KIO₄ でのみ破壊され、加熱濾液では全く破壊されなかつた。即 Ca を添加し加熱するという RDE にとつては activation の方法がいわば α' enzyme を破壊したと考えられる。558濾液の α' enzyme が M/40 CaCl_2 の添加のみで破壊されるかどうか検討してみたが勿論 M/40 CaCl_2 の存在では全然影響を受けなかつた (この点更に後述)。又 pH による α' enzyme の活性は pH 5.8~8.0 までは全く変化は見られなかつた。そこで引続き558濾液 (Ca 全量 2.2mM) も一応透折し、(透折後 Ca は 1.5mM、透折により Na は 1/100 に減少するが Ca は透折されにくい) 之に Ca を前述した量に加え加熱実験を試みてみると Ca の存在、非存在に拘らずこの内に含まれる α' enzyme は破壊されるが RDE では Ca の存在で従来の成績どおり耐熱性が示された。以上の実験から α' enzyme は RDE と耐熱性を異にするものと考えた。

Table. 2 Thermolability of α' -enzyme.

Human serum specimens	hemagglutination inhibition titer				
	against	not treated	when treated with		
			heated cholera filtrate	cholera filtrate	KIO ₄ (M/50)
No. 1	asian-P *	512	512	0 **	0
	heated Lee	2048	0	0	0
No. 2	asian-P	1024	1024	0	0
	heated Lee	1024	0	0	0
No. 3	asian-P	512	512	0	0
	heated Lee	2048	0	0	0
No. 4	asian-P	256	256	0	0
	heated Lee	2048	0	0	0
No. 5	asian-P	1024	1024	0	0
	heated Lee	2048	0	0	0

* Kayano strain was used

** HAI titer of <32 was recorded as 0

II) α' enzyme が働くために Ca^{++} の至適濃度が RDE の場合とは異なる事: Edney¹⁸⁾, 川村¹⁴⁾は RDE の作用は Ca^{++} により促進され脱 Ca 剤により抑制されるが脱 Ca 剤の種類により抑制の程度は異なることを見ている。今 Ca の影響を見るために川村と同様に M/25 から M/400迄の CaCl_2 溶液を作つて、精製 RDE について家兎血清を基質とし型の如く実験を行つて見ると Fig. 1 に示す通りで川村の結果とほぼ同

Fig. 1 Effect of Ca^{++} ion concentration for RDE and α' -enzyme action

様 M/100~M/200 が至適濃度であつたが、透折 558 濾液の α' enzyme 作用は Ca^{++} の存在でもその活性は上昇しなかつた。即図に示す直線がそれである。ただし Citrate を加え脱 Ca を行つた濾液では全く α' enzyme の作用を示さなかつたので α' enzyme にも RDE と同様に微量の Ca はその作用に必要であるが、その至適濃度は低いと考えられる。

III) α' enzyme は基質に加える酵素量がその作用に大きな影響をもつ事又作用に時間を要する事: 先に川村は Ovomucin という α inhibitor を基質として之を破壊するに必要な RDE 力価は両者を等量加え 37°C 60分作用させるという条件下で ml 当り α inhibitor unit の $\frac{1}{4}$ でよい事を述べた。ここで作つた 558 濾液もかかる α inhibitor を破壊するには同様の条件で処理すると全く合致する成績が得られたが、人血清及び動物血清中の α' inhibitor を基質としてこれを破壊するに必要な条件を検討して見ると、かなりこの条件が異なる事に気付いた。即ち α inhibitor と α' in-

hibitor の抑制価を測定条件に合せた人血清及び家兎血清に対して、558 濾液を $\frac{1}{2}$ 量, 等量, 2 倍量, 3 倍量加え, 2 時間, 4 時間, 8 時間, 16 時間と 37°C で作用せしめ, 服用量と作用時間を検討した結果は Fig. 2 に示す如くで人血清でも家兎血清でも Asian P に

Fig. 2 Velocity of enzymatic action of cholera filtrate on both human and rabbit serum.

* Open circle denotes the time when the inhibitor was destroyed to the titer below 32

対する α' inhibitor は $\frac{1}{2}$ 量や等量の濾液を加えたのでは 2~4 時間では全く影響を受けなかつたが、2 倍量を加える事により始めて家兎血清の抑制価は 128 倍より 64 倍まで破壊された。しかも完全破壊のためにはなお時間を要し 8 時間で 32 倍の抑制価をのこし、16 時間で始めて完全に破壊される。しかし heated Lee に対する α inhibitor の力価はかなり容易に破壊され殊に家兎血清を基質とした場合すみやかで $\frac{1}{2}$ 量でも 2 時間で完全に破壊された。人血清は 2~3 倍量で 8 時間で完全に破壊された。兎も角 α inhibitor は破壊され易いが、 α' inhibitor はなかなか破壊されずこれを完全に壊すためには少なくとも 2~3 倍量の 558 濾液を加え、一夜 37°C で作用せしめる必要がある事を知つた。更に 558 濾液を Carbowax¹⁹⁾ で濃縮し高単位の濾液を用いてもなお等量加えるよりも 2~3 倍量加える方が α' enzyme unit を高く示すか否かを検討して見た。今 256u/ml の RDE 力価のものを $\frac{1}{10}$ 量に濃縮し 2048u/ml の RDE 力価を有する濾液を得る (Table 3)。1024u/ml の inhibitor titer を有する家兎血清

Table. 3 Necessity of adding high ratio of cholera filtrate to substrate, in order to destroy α' inhibitors.

amount * of cholera filtrate	dilution of cholera filtrate	Hemagglutination inhibition titer of treated substrate				
		32	16	8	4	2
0.5ml	4	++	++	++	++	++
	8	++	++	++	++	++
	16	+	+	++	++	++
	32	—	+	++	++	++
0.6ml	16	++	++	++	++	++
	32	+	++	++	++	++
	64	—	+	++	++	++
	128	—	±	+	++	++
0.75ml	32	++	++	++	++	++
	64	+	++	++	++	++
	128	±	+	++	++	++
	256	—	+	+	++	++

* Total test system was 1ml, in each. Thus when cholera filtrate was added in the order of 0.5, 0.6 and 0.75ml, the amount of inhibitor solution was 0.5, 0.4 and 0.25ml respectively, giving the filtrate/substrate ratio of 1:1, 1.5:1 and 3:1.

を2倍にうすめ 0.5ml とし、之の 0.5ml に等量の濃縮液を加えると final の inhibitor は 256u/ml となり濾液: inhibitor は 1:1 となる (Total. 1.0ml). 次に inhibitor を 640u/ml になる様にうすめその 0.4ml に濾液 0.6ml を加えると final の inhibitor titer は同じく 256u/ml となり濾液: inhibitor は 1:1.5 となり総量 1.0ml である。同様にして 1:3 のものをつくり、各々 37°C 一夜作用せしめると final 256u/ml の α' inhibitor を完全に破壊するには3倍量加える事がすぐれている事が明かにされた。即反応させる inhibitor: 酵素量が 1:1 では16倍しか力価がないのに 1:1.5 では32倍, 1:3 では 641~28倍の力価を有する事となる。

IV) α' enzyme は RDE に較べ血球に吸着され難い事: 558濾液に 20% CaCl_2 1/40 量加え, 1 規定の HCl にて pH 6.0 に修正し 7,000 r.p.m. 15分遠心しその上清 (RDE 濾液原液) を更に 1 規定の NaOH にて pH 9.0~9.2 に修正 (以下の操作は温度 0°C にて行う) し予め冷した鶏血球を 1/10量加えよく攪拌混和し 7~8 分, 0°C に放置し 3,000r.p.m. 3分遠心後, 上清を得その沈渣 (RDE 吸着血球) は pH 7.1~7.2, Ca Barate Buffer Saline (B.B.S) を加え原量に戻し直ちに 3,000r.p.m. 3分遠心という操作を2回くり返しその洗滌沈渣血球を再び B.B.S を原量の 1/4量加えよく攪拌し 37°C, 60分恒温槽に放置後 3,000r.p.m.

5分遠心その上清液 (血球溶出液) について RDE unit, α enzyme unit, α' enzyme unit をしらべて比をとつて見た。Table 4 の如く RDE/ α' 比をとつてみても α / α' 比をとつてみても、吸着上清の価は低く即 α' enzyme は RDE に比べ赤血球に対する吸着がわるい。但し全く吸着されないわけではないことは溶出液にも α' enzyme activity のある事よりうかがわれる。

V) α enzyme と α' enzyme の zone electrophoresis に於ける違い: 558濾液を10倍に Carbowax で濃縮したものを zone electrophoresis にかけこれを各分層に分けて分層抽出液について α enzyme, α' enzyme の作用を家兎血清を基質として、各抽出液の倍数稀釈液を3倍加え, 37°C 一夜作用し HAI を行う事により測定した。結果は Fig 3 の如くで α' enzyme の作用は原点の部分に強く 12~20 までの分層抽出液では殆んど 2u/ml であつた。 α enzyme は原点11より17までは 32u/ml の α enzyme 作用を示めし18から20までは階段状に作用が減少した。従つて濾液中に含まれる α と α' enzyme は電気泳動的にも些か異なるものと考えた。

3) Guinea Pig の α' inhibitor の特異性: 以上 α' enzyme がコレラ菌培養濾液中に含まれる RDE とかなり態度をことにする事を述べたが, asian P を

Table. 4 Different adsorption rate found between RDE and α' -enzyme to chicken red cells.

tested fractions	RDE-(u/ml)	α E-(u/ml)	α' E-(u/ml)	ratio	
				R/ α'	α / α'
filtrate	2 ⁸	2 ¹²	2 ³	2 ⁵	2 ⁹
Supernate	2 ⁴	2 ⁸	2 ²	2 ²	2 ⁶
Eluate	2 ⁹	2 ¹³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁹

Fig. 3 Electrophoretic separation of α and α' -enzyme

The pattern of zone electrophoresis with cholera filtrate.

The buffer used was phosphate, pH 7.1, ionic strength of 0.16.

The voltage was maintained 250 V, for 19 hours.

非特異的に抑制する各動物血清中の inhibitor は基質としてすべて同等に考えてよいか否かをしらべてみた。即先に清水²⁾はモルモット血清中に含まれる inhibitor は RDE で破壊されず KIO₄ でのみ破壊されるものとして第4群 inhibitor のカテゴリーに入れ又石田⁷⁾¹¹⁾は之を GPS-factor と称し P-Q の鑑別に用いて極めて都合のよい事を示したが先にも述べた様に人血清、家兎血清等に含まれる α' inhibitor は同じカテゴリーに含められるものか否か更にこの 558 濾液を以て検討してみた。今人及びモルモット血清を未処理で asian P 及び heated Lee を用いて抑制価をしらべて見ると Fig. 4 に示す様に人血清では α , α' inhibitor は 256~512 前後であつたがモルモットでは α , α' 両者とも 1024 倍である。之等血清を 558 濾液と KIO₄ で処理し抑制試験を行つてみると KIO₄ では殆んど破壊された。しかし 558 濾液処理では人血清の α 及 α' inhibitor は完全に破壊されたがモルモット血清については α inhibitor は完全に破壊されたのに対して α' inhibitor は全く作用を受けず未処理と同様な価を示した。この事は Carbowax 濃縮 558 濾液

Fig. 4 Comparative study of two treatment procedures in removing inhibitors both in human and guinea pig serum.

でも同様であつた。従つてこの実験から次の様な小括を与え得よう。①モルモットの GPS-factor は asian P, Q を鑑別し RDE では破壊されないという意味で、 α' inhibitor のカテゴリーに含められるが人及び家兎の α' inhibitor に比べると 558 濾液で破壊されず、KIO₄ のみで破壊されるという意味で特に抵抗の強い inhibitor である。②人血清中に含まれるあらゆる inhibitor を破壊するには KIO₄ より 558 濾液が適している。何故なら KIO₄ は α' inhibitor を壊す傾向が強いが、 α inhibitor は残る場合がある。しかしこの事は果して一般傾向か否か確める必要があるので次

に実験に使用される動物血清及び臓器中に、i) モルモット血清の様な KIO_4 でのみしか破壊されぬ inhibitor が存在するかどうか、ii) KIO_4 と558濾液の何れがすべての inhibitor を破壊するのに適しているかの二つを目標に検討してみた。

4) 558濾液は α inhibitor を破壊する一般目的に KIO_4 より適していること：正常家兎及び鶏血清、マウス各臓器乳剤(5匹 pool)を inhibitor としてえらび、PR₈, Asian P, heated Lee を用い抑制価を先づしらべて見た (Table 5). PR₈ に対する inhibitor

Table. 5 Superiority of cholera filtrate in destroying inhibitors from various origins

Inhibitor titer									
virus inhibitor	treated			non treated			treated with KIO_4		
	PR8			heated Kayano Lee			PR8 heated Kayano Lee		
rabbit serum				*					
No. 1	0	4096	4096	0	1024	512	0'	0'	0'
No. 2	0	4096	2048	0	64	128	0'	0'	0'
No. 3	0	1024	1024	0	128	512	0'	0'	0'
No. 4	0	2048	512	0	512	256	0'	0'	0'
No. 5	0	128	128	0	0	0	0'	0'	0'
chicken serum									
No. 1	0	4096	2048	0	64	256	0'	0'	0'
No. 2	0	2048	2048	0	128	256	0'	0'	0'
No. 3	0	4096	2048	0	64	256	0'	0'	0'
No. 4	0	4096	4096	0	128	256	0'	0'	0'
No. 5	0	4096	4096	0	128	128	0'	0'	0'
mouse serum	0	0	0	0	0	0	0'	0'	0'
lung	64	256	256	64	256	128	0'	0'	0'
liver	0	64	256	0	32	128	0'	0'	0'
spleen	0	64	512	0	0	256	0'	0'	0'
kidney	256	128	512	256	256	256	0'	0'	0'

* HAI titer of tested specimens

** $<16=0$, $<32=0'$

はわずかにマウスの肺、腎のみにしか認められない。しかし asian P 及び heated Lee に対する inhibitor はあまねく分布し且高い価を示した。先づ KIO_4 で処理した場合各血清の inhibitor はかなり破壊されたが結局全部を取り除く事は不可能であつた。しかし 558 濾液で処理した場合血清及び臓器中の inhibitor のすべてが完全に破壊された。即以上しらべた血清及び臓器中にはモルモット血清の様な inhibitor は存在しなかつたし又 α inhibitor をこわす一般目的には我々の定めた558濾液処理法の適している事を知つた。

5) Lot を異にする 558 濾液の α' enzyme unit の恒常性：次に約6ヶ月間に亘り前記術式により産生された558濾液の RDE unit, α enzyme unit, α'

enzyme unit, β enzyme unit を各 Lot 毎に測定した成績をまとめてみた。Table 6 に示す様に α' enzyme unit もかなり安定に産生される事を知つた。しかし我々はすべてこの条件を一応検査した人々にコレラ濾液を提供した。

6) 558 濾液処理法と KIO_4 処理法による抗体証明能の比較：以上の実験から我々は定めた条件さえ守れば我々が日常取扱う材料から赤血球凝集反応を阻止する inhibitor をすべてとり除くという意味で KIO_4 より濾液の方が優れている事を認めたのであるが、アジアかぜ流行に際し保存しておいた多くの血清について再び両者により処理しその抗体価分布に及ぼす影響をしらべてみた。尚抗体価自体に及ぼす等処理法の影

Table. 6 Constancy of enzymatic activities found with different lots of culture filtrate.

RDE unit	dilution of cholera filtrate	α' -enzyme				dilution of cholera filt	α -enzyme				dilution of cholera filt	β -enzyme			
		32	16	8	4		32	16	8	4		8	4	2	1
Lot 1 256u/ml	4	++	++	++	++	2048	++	++	++	++	32	++	++	++	++
	8	+	++	++	++	4096	+	++	++	++	64	+	++	++	++
	16	-	+	++	++						128	-	+	++	++
	32	-	-	+	++	8192	-	+	++	++	256	-	-	+	++
Lot 2 256u/ml	4	++	++	++	++	2048	++	++	++	++	32	++	++	++	±
	8	+	++	++	++	4096	+	+	++	++	64	+	++	++	++
	16	-	+	++	++						128	-	+	++	++
	32	-	-	++	++	8192	-	+	++	++	256	-	±	+	++
Lot 3 256u/ml	4	++	++	++	+	2048	++	++	++	++	32	++	++	++	++
	8	+	++	++	+	4096	+	++	++	++	64	+	++	++	++
	16	-	+	++	++						128	-	+	++	++
	32	-	-	++	++	8192	-	+	++	++	256	-	-	+	++
Lot 4 256u/ml	4	++	++	++	++	2048	++	++	++	++	32	++	++	++	++
	8	++	++	++	++	4096	+	++	++	++	64	+	++	++	++
	16	-	+	++	++						128	-	+	++	++
	32	-	±	++	++	8192	-	+	++	++	256	-	-	+	++
Lot 5 256u/ml	4	++	++	++	++	4 48	++	++	++	++	32	++	++	++	++
	8	+	++	++	++	4096	+	++	++	++	64	++	++	++	++
	16	-	+	++	++						128	-	+	++	++
	32	-	-	+	++	8192	-	±	++	++	256	-	-	+	++
Lot 6 256u/ml	4	++	++	++	++	2048	++	++	++	++	32	++	++	++	++
	8	++	++	++	++	4096	+	++	++	++	64	+	++	++	++
	16	-	+	++	++						128	-	+	++	++
	32	-	-	+	++	8192	-	+	++	++	256	-	-	+	++
256u		8u				4096u				64u					

響は別に千葉¹⁰⁾などが報ずる予定である。Table 7は1956~57年に流行したインフルエンザに罹患した患者血清(その多くは CFT-S 抗体の上昇を証明してある)のペアを10人分用意し、558濾液と KIO₄ 処理の両者を施し4種の抗原に対し抑制試験を行つたもので急性患者血清では asian P (萱野株, 305M 株)に対しては全然抗体は証明されず、恢復期患者血清では32倍から128倍の抗体価が証明された。558濾液処理でも KIO₄ 処理でも急性期血清の PR₈, FM₁ の抗体価と恢復期のそれとがほぼ同様であるところから、一応この両者の方法はこの条件では抗体を破壊せずしかも急性期血清で示される様に徹底的に inhibitor を除去し得たものと思われる。

考 察

アジア型インフルエンザの抑制試験を試みた人々はだれでも気付いた様に人血清中の inhibitor を破壊する完全な方法を確立せねばとても抑制試験の結果を信頼できないという現実的な要求からこの仕事は企図された。即人間の血清中の α' inhibitor を完全に破壊し、しかも抗体を傷付けない様にする inhibitor 除去法の発見が目標であつた。結果としてここにコレラ菌濾液がこの目的に適う事、しかも3倍量を加えて37°C一夜放置せねば α' inhibitor は破壊されぬという標準法が示され又その濾液の産生方法と規格化の方法も提示した。そこで我々が始めに提唱した KIO₄ 処理法との比較が問題になるが KIO₄ 法はその後実験動物

Table. 7 Comparative study on the two inhibitor-destroying procedures in serodiagnosis of asian flu

Serum taken		HAI titer when							
		treated with cholera filtrate				treated with KI0 ₄			
		against							
at	from	PR8	FM1	asian-P	305M	PR8	FM1	asian-P	305M
acute phase	1	<32	256	<32	<32	<32	256	<32	<32
	2	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32
	3	64	<32	<32	<32	64	64	<32	<32
	4	128	128	<32	<32	128	128	<32	<32
	5	128	128	<32	<32	128	128	<32	<32
	6	64	<32	<32	<32	64	<32	<32	<32
	7	64	128	<32	<32	64	64	<32	<32
	8	32	128	<32	<32	<32	128	<32	<32
	9	64	128	<32	<32	64	128	<32	<32
	10	<32	128	<32	<32	<32	128	<32	<32
convalescent phase	1	<32	256	128	32	<32	256	128	32
	2	<32	<32	64	64	<32	<32	64	128
	3	64	<32	64	<32	64	64	128	32
	4	128	128	<32	<32	256	128	<32	<32
	5	128	128	64	<32	128	128	64	64
	6	64	<32	64	32	128	32	128	64
	7	64	128	<32	<32	64	64	<32	<32
	8	<32	128	64	32	<32	128	64	<32
	9	64	128	128	32	64	128	128	64
	10	<32	128	64	<32	<32	128	64	32

の抗体を種類によつては破壊する事が示されているので¹⁰⁾、人血清中の抗体を測定する場合一応このコレラ菌濾液処理法と相關する実験成績が得られはしたものの猶追究を要する問題である。しかしコレラ菌濾液はモルモット血清を除いたすべて我々が身近に取扱つてゐる材料中の inhibitor を広範囲に壊すという意味では現在最も推賞するに足るものと思う。しかし化学的な意味からはこの仕事は猶不充分で我々が α' inhibitor と称するものは化学的に普通の α inhibitor と明瞭に異つたものであるのか、或いは α inhibitor と同じものであるが RDE で或る程度破壊された分子がなお asian P Virus を抑制する inhibitor としての構造をもつという解釈に立つべきか猶疑問であるし¹¹⁾、コレラ菌濾液そのものという粗材料を取扱つた酵素的な解析で RDE と α' enzyme は差異を示しても、猶精製されて別の enzyme としてはつきり取出されぬ

限り正式に α' enzyme とはよぶわけにはゆくまい。

結 論

1) 人血清中に含まれる asian P に対する inhibitor (我々のいう α' inhibitor) は KIO₄ のみでなく、コレラ菌濾液を作用させても破壊し得る。

2) 但しコレラ菌濾液を Ca 存在下で加熱すると赤血球法で測定しても液体法で測定しても、RDE 単位は減少しないに拘らず α' inhibitor を破壊する α' enzyme activity は全く破壊される。

3) 従つてコレラ菌濾液には所謂 RDE の他に α' enzyme を含むと推定したが前者と後者とは耐熱性の他に次の諸点でも区別される。①後者は前者ほど明瞭に Co-factor として Ca の Optimum Concentration が示されない。②後者は基質に対し多量の酵素を加え長時間作用させる必要がある。この問題は又現

実的に重要である。③ RDE は赤血球に吸着され易いが α enzyme は比較的吸着されにくい。④ zone-electrophoresis に於ける位置を些か異にする。

4) asian P の赤血球凝集を阻碍し、RDE で破壊されぬ inhibitor は人血清のみならず家兎血清、モルモット血清にも含まれるが、内モルモット血清の inhibitor は KIO_4 でのみ破壊されコレラ菌濾液では破壊されぬ特徴をもつ。

5) α 及 α' inhibitor を含めてすべての inhibitor を破壊するには我々の定めた条件を守れば、 KIO_4 よりコレラ菌濾液の方が広範囲の目的に通している。即モルモット血清の如き特に破壊されにくい inhibitor は我々の通常取扱う材料中にはない。

6) 以上の如き性能を備えたコレラ菌濾液を常時得られるようにするために産生方法を規格化し、之に従って6ヶ月生産し、生産高にぶれない事を認めた。

7) アジアインフルエンザの流行時の血清を我々が前に推奨した KIO_4 とこのコレラ菌濾液法とで処理し、赤血球凝集阻止抗体価をしらべたがとりたていうほどの変動は認められなかつた。即共によく inhibitor を破壊し、抗体価に大きな差は示されなかつた。

稿を終るにのぞみ御指導御校閲を賜つた恩師黒屋教授、石田助教授並びにコレラ菌 558 株を供与され、いろいろの示唆を賜つた群馬衛研松山達夫博士に衷心より感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Schlesinger, R. W. and Karr, H. V. Influenza virus and its mucoprotein substrate in the chorioallantoic membrane of the chick embryo. 1. Characterization and quantitative assay of soluble substrate and studies on its relation to allantoic cell. *J. Exp. Med.* **103**, 309, 1956. 2) 清水喜正：インフルエンザウイルスの種々なる inhibitor に関する研究 (第3報)、凝集阻止物質と増殖抑制物質：ウイルス, **8**, 254, 1958.
- 3) Jensen, K.E., Influenza.; Cited from Diagnostic procedures for virus and Rickettsial Diseases, P. 250, American Public Health Association, New York, 1956. 4) Jensen, K.E., Dunn, F.L. and Robinson, R.Q.: Influenza, 1957, A Variant and the Pandemic: Cited from

- Progress in Medical Virology. **1**, 165, S. Karger, New York 1958. 5) Sampaio, A.A. C., & Isaacs, A.: Action of trypsin on normal serum inhibitors on influenza virus agglutination: *Brit. J. Exp. Path.* **34**, 158, 1953. 6) 日沼頼夫, 池田知行, 沼崎義夫, 白取剛彦, 石田名香雄, 水野秀夫, 長瀬正俊：1956年10月～57年3月に宮城県下に流行したインフルエンザについて, A, B両ウイルスの分離と補体結合反応の有用性：総合医学, **15**, 56, 1958. 7) 石田名香雄, 川村慶二, 本間守男, 長瀬正俊, 日沼頼夫, 池田知行, 沼崎義夫, 工藤肇, 白取剛彦, 遠藤好喜, 松山達夫：アジア型インフルエンザウイルスにみられるP-Q変異と本ウイルスに対する赤血球凝集抑制抗体の測定法について, 総合医学, **15**, 51, 1958. 8) Henle, W., Lief, F. S. and Fabiyi, A.: Strain-Specific Complement-fixation test in antigenic analysis and serodiagnosis of influenza: *Lancet*, April **19**, 818, 1958. 9) Jensen, K.E.: The nature of serological relationships among influenza Viruses, *Advances in Virus Research*, **4**, 279, 1957. 10) 千葉政男：インフルエンザウイルス抗体の産生経過とその特異性について, 未発表. 11) 石田名香雄他, アジア型インフルエンザウイルスにみられるP-Q変異の分析：総合医学掲載予定. 12) 川村慶二：Receptor destroying enzymeを作用させる条件について(インフルエンザウイルスの種々なる inhibitor に関する研究, 第4報)：ウイルス, **8**, 330, 1958. 13) 厚生省衛生検査指針：細菌血清学的検査指針 (VII), p. 45, 1957. 14) 川村慶二：Receptor destroying enzyme (RDE) の産生条件とその精製(インフルエンザウイルスの種々なる inhibitor に関する研究, 第1報)：ウイルス, **8**, 59, 1958. 15) Burnet, F. M. & Stone, J. D.: The Receptor destroying enzyme of *V. cholerae*, *Aust. J. Exp. Biol. and Med. Sci.*, **25**, 227, 1947. 16) 千葉政男他, インフルエンザウイルスの種々なる inhibitor に関する研究 (第6報) 免疫に用いる各種動物血清中に含まれる赤血球凝集抑制物質, 未発表. 17) Kunkel, H. G. and Slater, R.J.: Zone electrophoresis in a Starch Supporting medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **80**, 42, 1952. 18) Edney, M.: The Influence of Calcium ion on the Reactions of the *V. cholerae* enzyme RDE and Influenza virus with Specific mucopolysaccharides; *Aust. J. Exp. Biol. & Med. Sci.*, **27**, 253, 1949. 19) 新井賢治, 坂岸良克, 野見山一生：低蛋白液体の迅速濃縮法としての Cabowax法, 殊に吸水飽和部分の抽出に漏斗を用いる考案, 生物物理化学, **3**, 56, 1956.