リフトバレー熱ウイルス・中和抗体の 試験管内での結合について

鈴木 孜*

TSUTOMU SUZUKI: LA FIXATION IN VITRO DU VIRUS DE
LA FIÈVRE DE LA VALLÉE DU RIFT ET D'ANTICORPS
NEUTRALISANTS

〔受稿 6月22日 1959〕

緒 言

リフトバレー熱ウイルスに対する抗血清は、これを該ウイルスと混合して感受性動物に注射した場合にも、また、ウイルスを単独に注射し、その前後に抗血清を注射した場合にも、著明な感染阻止効果を発揮することはよく知られている。抗体がこのような作用をあらわすからには、抗体は抗原たるウイルスに結合するに違いない。事実、動物体内では抗体が消費されることが示されているが（長野・佐伯，1947）¹⁾、抗体によるウイルスの中和はどのような経過をとつて営まれるのであろうか。中和は試験管内で完了し得るのであろうか。もしそうであるならば、混合物の注射を受ける動物は単に中和を免れたウイルスの量を測るだけの役に立つていることになる。それとも、中和は試験管内では完了せず、生体内である要因が参加して、はじめて、感染阻止に必要な状態が実現されるのであろうか。これ等の事情を探る手がかりを得ようとして、私はとりあえず試験管内において、本ウイルスと抗体とは果して結合するか、もし結合するならば、どのような条件のもとでどの程度の結合をするか等の点を追求した。

実験の材料と手技

ウイルス：

1938年バリのパスツール研究所より分与され、爾来、マウス継代をつづけた株。感染マウスの瀕死期に心臓穿刺により採血、血清を分離し、1cc 宛アンプルに封入し、凍結保存。使用時に溶かし、ブイオンで稀釈して用う。0.25cc をマウス皮下に接種してしらべ

ると、LD₅₀ は通常 10^{-7.5}～10^{-8.5} である。

免疫血清：

感染斃死したマウスの肝臓をとり、ブイオンで10% 乳剤とし、軽く遠心した上清 10cc を 1 週間隔で 2 回、家兎皮下に注射し最後注射より 3 週後に採血、血清を分離、非働化してアンプルに封じて冷蔵庫に保存する。

中和試験：

被検血清の濃度を一定とし、これにウイルスの種々なる濃度のものを等量混合し、0.25cc をマウス皮下或いは 0.025cc をマウス脳内に接種し、2 週間観察する。

実験 1 ウイルスによる中和抗体の試験管内吸収

かつて当研究室において、試験管内で抗血清に過大量のウイルスを加え 37° に 96 時間おいた後、65° に 1 時間加熱し、その中和力価を測つたところ、低下はみられなかつたという（長野・佐伯，1947）¹⁾。私も試験管内でウイルスを以て中和抗体を吸収することができるか否かを検したのであるが、ウイルスと抗血清との混合物からウイルス粒子および、もし存在するならばウイルスと抗体との結合物を除く手段として高速遠心沈澱を行うこととした。

実験方法：

免疫血清 10 倍稀釈にウイルス材料 10² 倍稀釈を等量混合し、直ちに 10cc 宛沈澱管に分注し 60,000g（スピコン L 型遠心機、ローター第 40 号分速 30,000 回）1 時間遠心沈澱する。対照として免疫血清 10 倍稀釈に正常マウス血清 10² 倍稀釈を等量混合したものを同様に分注して同時に遠心沈澱する。遠心後、各沈澱管から最上層 1cc をとり、各群ごとに合併して上清中に残存す

* 伝染病研究所第 4 細菌研究部（指導 長野泰一教授）

る中和抗体の量をマウス皮下注射による中和試験によつてしらべる。

実験成績：

対照群の遠心上清に種々なる量のウイルスを加えて

マウスに接種すれば、その LD₅₀ は2.75であるのに対し、実験群の遠心上清のそれは3.25であつた（第一表）同様の実験を反復し、その結果を一括すると第2表のようになる。実験群と対照群との差を推計学的に検定

Tableau 1. Absorption *in vitro* des anticorps neutralisants par virus... I

	Concentration du virus ajouté aux immun-sérums à examiner	Jours entre l'inoculation et la mort des animaux				Pouvoir infectant des mélanges virus-sérums (en log DL ₅₀)
Immun-sérum traité	10 ⁻¹	2	2	2	2	3,25
	10 ⁻²	3	3	3	6	
	10 ⁻³	4	6	.	.	
	10 ⁻⁴	5	.	.	.	
	10 ⁻⁵	.	.	.	.	
	10 ⁻⁶	.	.	.	.	
Immun-sérum non traité	10 ⁻¹	2	2	2	2	2,75
	10 ⁻²	2	3	4	7	
	10 ⁻³	6	.	.	.	
	10 ⁻⁴	.	.	.	.	

• Souris ayant survécu

Note: Les mélanges virus-sérums ont été injectés immédiatement après leur préparation.

Tableau 2. Résumé des résultats des essais sur l'absorption *in vitro* des anticorps neutralisants par virus.

Numéro d'essai	Pouvoir infectant du mélange virus-sérum traité	Pouvoir infectant du mélange virus-sérum non traité	Différence du pouvoir infectant entre les deux mélanges
1	3,25	2,75	0,50
2	2,75	2,75	0,00
3	3,50	3,25	0,25
4	2,50	2,25	0,25
5	3,00	2,50	0,50
6	2,25	2,00	0,25

すれば5%の危険率で有意である。

更に、上述の免疫血清、ウイルス混合を 5℃ 前後に24時間保存してから、同様に保存した対照群と共に

遠心沈澱し、その上清につき中和力価をしらべたところ、第3表に総括したように一そう明確な結果が得られた。

Tableau 3. Absorption *in vitro* des anticorps neutralisants par virus... II
(Résumé des essais)

Numéro d'essai	Pouvoir infectant du mélange virus-sérum traité	Pouvoir infectant du mélange virus-sérum non traité	Différence du Pouvoir infectant entre les deux mélanges
1	4,75	3,25	1,50
2	3,75	2,00	1,75
3	4,00	3,00	1,00
4	4,00	2,75	1,25

Note: Les mélanges virus-sérums ont été injectés après une incubation de 24 heures.

小括:

抗血清にウイルスを混合すると、直ちに、僅かながら中和抗体は吸収された。混合液を氷室に24時間おいた後では、より明らかに抗体の吸収が証明された。すなわち、上述の実験条件のもとでは、中和抗体は試験管内でウイルスと結合したと考えられる。

実験 2 稀 釈 現 象

上述の吸収試験によつて、中和抗体は試験管内でウイルスに結合しうることが明らかにされたが、その結合の程度はどうであろうか。本ウイルスにおいては、いわゆる稀釈現象が容易におこり、しかも、抗血清・ウイルス混合物を長時間放置した後も著明におこることなどからみて、結合は必ずしも強固なものではないように感じられる。ところで、感染力を示さない混合物を順次稀釈して、ある一定の稀釈度に達すると感染力が復活することに着目すると、いま述べたとおり、ウイルスと中和抗体との結合が緩やかであることが感じられるが、稀釈を更にすすめて、どの稀釈度まで感染力を示すかということに着目すると、別の知見が得られる。すなわち中和混合を稀釈した際にウイル

ス活性の復活する終末稀釈度は、ウイルス単独を稀釈した場合のそれには及ばない。つまり、稀釈のウイルス復活効果は完全なものではない。(長野・佐伯, 1947)¹⁾。これはウイルスの一部分が試験管内で中和抗体と結合することの結果ではあるまいか。私はこの点をやや詳細に検し特にウイルスと抗体との接触時間の影響を観察した。

実験方法:

免疫血清10倍稀釈とウイルス 10^2 倍稀釈とを等量混合し、5℃前後に24時間放置したのち10倍階段の稀釈を行い、各稀釈0.25cc 宛マウス皮下に注射する。同時に上述の免疫血清とウイルスとを混合せずにおのの5℃に24時間放置してから等量混合し、直ちに10倍階段稀釈したものをマウス皮下に注射する。対照として健康ウサギ血清10倍稀釈とウイルス 10^2 倍稀釈とを、混合せずに5℃に24時間放置してのち等量混合し、直ちに10倍階段稀釈してマウス皮下に注射する。

実験成績:

第4表に示すように、ウイルスと正常血清とを混合したものを稀釈した場合には $10^{7.75}$ 倍稀釈までマウス

Tableau 4. Phénomène dit de dilution (Injection sous-cutanée)

	Dilution des mélanges	Concentration du virus dans les dilutions	Jours entre l'inoculation et la mort des animaux				Pouvoir infectant des mélanges (en log DL_{50})
Dilué après incubation de 24 heures	1 ×	10^{-2}	6	6	•	•	5,00
	10 ×	10^{-3}	3	5	5	•	
	10^2 ×	10^{-4}	3	3	4	5	
	10^3 ×	10^{-5}	7	9	•	•	
	10^4 ×	10^{-6}	•	•	•	•	
	10^5 ×	10^{-7}	•	•	•	•	
	10^6 ×	10^{-8}	•	•	•	•	
Dilué immédiatement après préparation du mélange	1 ×	10^{-2}	4	•	•	•	6,50
	10 ×	10^{-3}	3	4	5	•	
	10^2 ×	10^{-4}	2	3	3	5	
	10^3 ×	10^{-5}	3	4	9	•	
	10^4 ×	10^{-6}	3	3	4	•	
	10^5 ×	10^{-7}	4	5	•	•	
	10^6 ×	10^{-8}	•	•	•	•	
Mélange témoin (sérum normal + virus)	10^3 ×	10^{-5}	2	2	2	3	7,75
	10^4 ×	10^{-6}	2	2	3	4	
	10^5 ×	10^{-7}	3	3	5	•	
	10^6 ×	10^{-8}	3	4	•	•	
	10^7 ×	10^{-9}	•	•	•	•	

• Souris ayant survécu.

を倒したのに対して、ウイルスと免疫血清とを混合し、直ちに稀釈した場合には、 $10^{6.5}$ 倍稀釈までしかマウスを倒さなかつた。すなわちウイルスと免疫血清とがごく短い時間、接触した結果として、ウイルスの90%以上は、稀釈することによつては復活させ得ない不活性状態となつていた。ウイルス免疫血清混合物を氷

室に24時間おいてから稀釈した場合には LD_{50} は5.0であつた。すなわちウイルスの99%以上が不可逆的に不活化されていた。

同上の実験を更に2回くり返したが、成績は大同であつた。(第5表)

小括：ウイルスを試験管で免疫血清と接触させると

Tableau 5. Résumé des résultats des essais sur le phénomène dit de dilution.
(Injection sous-cutanée)

Numéro d'essai	Mélanges virus-immunsérums dilués		Mélanges témoins
	après incubation de 24 heures	immédiatement après préparation	
1	5,00	6,50	7,75
2	5,50	6,50	7,50
3	5,50	6,50	7,50

ウイルスの大多数は直ちに不活化され、稀釈することによつては復活しない状態となる。このような状態のウイルスの量は接触時間の延長によつて増加する。このように復活不能となつたウイルスは試験管内で中和抗体と結合したものと考えられる。

実験 3 脳内注射による中和試験

以上の諸実験によつて、とにかくウイルスと中和抗体とは試験管内で結合しうることを知つたが、試験管内での結合はどの程度に強固なものであろうか、この点に関して、例えば次のような事実がある。すなわち、ウイルス・抗血清混合物をマウスの静脈内、腹腔内、皮下等に注射すれば感染力を示さないのに、同じ混合物をマウスの脳内に注射すると感染がおこる。このことは本ウイルスの向神経株について(遠藤, 1950)²⁾だけでなく、向汎株についても知られている(竹森等, 1955)³⁾。この事を解釈するために種々なる想定が可能であらうが、例えば、試験管内で結合したウイルスと中和抗体とはマウスの静脈内に送入された場合には解離することはないのに反して、脳内に送入された場合には、大部分が解離するのであろうか。あるいはまた、抗体がウイルスを中和するためには試験管内で結合するだけでは不充分で、生体内で或る要因が参加して、はじめて中和作業が完了するものであつて、その生体内の要因が、静脈内注射の場合には参加するのに反して、脳内注射の場合には参加しえないということなのであろうか。いずれにしても、脳は中和試験の注射路としてはきわめて不適当な部位であるが、その脳内に混液を注射しても、なおかつ中和が成立するようなウイルス・抗体結合物は試験管内で作られないの

であらうか。混液を脳以外の部位に注射する中和試験においては、ウイルスと抗血清とを混合して直ちに注射しても長時間放置したのちに注射しても、中和成績には殆ど全く差異を生じなかつたが(沢・渋谷・竹内 1950)⁴⁾。これは中等度の濃度の抗血清の場合であつた。高濃度の抗血清の場合には差が生じるかも知れない。脳内に注射してさへ差が生じるかも知れない。この点を確かめるために次のような実験を行つた。

実験方法：

免疫血清5倍稀釈液に、ウイルスの 10^8 倍から 10^7 倍までの各稀釈を等量混合して 5°C 前後に24時間放置し、各混合液を、0.025cc 宛マウス脳内に注射する。一方、上述の免疫血清とウイルスとの稀釈液を混合せずに別々に 5°C 24時間放置してから等量混合して、各混合液 0.025cc をマウス脳内に注射する。対照としてウサギ正常血清5倍稀釈とウイルスの各稀釈液とを別々に 5°C 24時間放置したのち、等量混合して同様にマウスに注射する。

実験成績：

免疫血清とウイルスを予め接触させることなく、混合後ただちにマウス脳内に注射した場合には LD_{50} は6.5で、対照の7.0に比して殆んど差がみとめられなかつたが、免疫血清とウイルスとを予め24時間接触させてから動物に注射した場合には、 LD_{50} は5.25で対照との間に有意の差が認められた(第6表)。同様の実験をくりかえし行い、その成績を総括したのが第7表である。

小括：

ウイルスと抗血清とを混合し、直ちに脳以外の部位

Tableau 6. Réaction de neutralisation (Injection intracérébrale)

	Concentration du virus dans le mélange	Jours entre l'inoculation et la mort des animaux				Pouvoir infectant des mélanges (en log DL ₅₀)	Indice de neutralisation
Injecté après incubation de 24 heures	10 ⁻³	3	3	4	4	5,25	1,75
	10 ⁻⁴	4	4	4	4		
	10 ⁻⁵	4	4	5	•		
	10 ⁻⁶	•	•	•	•		
	10 ⁻⁷	•	•	•	•		
Injecté immédiatement après préparation	10 ⁻³	2	3	3	4	6,50	0,5
	10 ⁻⁴	3	4	4	4		
	10 ⁻⁵	3	3	3	4		
	10 ⁻⁶	4	6	6	9		
	10 ⁻⁷	•	•	•	•		
Mélange témoin (sérum normal + virus)	10 ⁻⁵	2	2	2	2	7,00	
	10 ⁻⁶	2	2	2	2		
	10 ⁻⁷	4	4	•	•		
	10 ⁻⁸	•	•	•	•		

• Souris ayant survécu

Tableau 7. Résumé des résultats des essais sur la réaction de neutralisation (Injection intracérébrale)

Numéro d'essai	Pouvoir infectant des mélanges virus-immunsérums injectés		Pouvoir infectant des mélanges témoins
	après incubation de 24 heures	immédiatement après préparation	
1	5,25	6,50	7,00
2	5,50	7,00	7,00
3	5,00	6,25	6,50

に注射すると中和がみられる場合にも、その混合物を脳内に注射すると、中和は明瞭にはみられなかつた。しかし混合物を氷室に24時間おいてから後に脳内に注射した場合には、確かに中和がみられた。このようにウイルスと抗血清との接触時間の長短が中和成績に反映するのは、試験管内でウイルスと抗体との間に交渉があつたからだと考えられる。

実験 4 脳内注射による稀釈現象

前述の皮下注射による稀釈現象の実験において、ウイルスと中和抗体との不可逆的結合は混合直後から始まり、その後、時間とともに進行する事が示された。ところで、中和試験の際にウイルス・抗血清混液を脳内に注射すると中和が起りにくいという事実があるが、稀釈現象の実験において、各稀釈を皮下に注射する代りに脳内に注射しても、やはり不可逆的結合の存

在が示されるであろうか。

実験方法：

免疫血清20倍稀釈とウイルス 10³ 倍稀釈とを等量混合し、5℃に放置する。この組み合わせはマウス脳内に注射すればマウスを倒す組み合わせである。すなわち、稀釈現象の実験の出発材料としては変則である。24時間および48時間後にとり出して、10倍階段稀釈し、各稀釈 0.025cc をマウス脳内に注射する。一方上記の免疫血清およびウイルス稀釈液を混合しないで別々に 5℃ に48時間保存してからのに混合し、直ちに10倍階段稀釈してマウス脳内に注射する。更に、正常ウサギ血清20倍稀釈とウイルス 10³ 倍稀釈とを混合せずに 5℃ 48時間保存後混合し、ただちに10倍階段稀釈してマウスに接種する。

実験成績：

Tableau 8. Phénomène dit de dilution (Injection intracérébrale)

	Dilution des mélanges	Concentration du virus dans les dilutions	Jours entre l'inoculation et la mort des animaux				Pouvoir infectant des mélanges (en log DL ₅₀)
Dilué après incubation de 48 heures	10 ² ×	10 ⁻⁵	3	3	3	3	6,00
	10 ³ ×	10 ⁻⁶	5	8	.	.	
	10 ⁴ ×	10 ⁻⁷	.	.	.	.	
	10 ⁵ ×	10 ⁻⁸	.	.	.	.	
Dilué après incubation de 24 heures	10 ² ×	10 ⁻⁵	2	2	2	3	6,00
	10 ³ ×	10 ⁻⁶	5	5	.	.	
	10 ⁴ ×	10 ⁻⁷	.	.	.	.	
	10 ⁵ ×	10 ⁻⁸	.	.	.	.	
Dilué immédiatement après préparation du mélange	10 ² ×	10 ⁻⁵	2	2	2	3	6,75
	10 ³ ×	10 ⁻⁶	2	3	3	3	
	10 ⁴ ×	10 ⁻⁷	4	.	.	.	
	10 ⁵ ×	10 ⁻⁸	.	.	.	.	
Mélange témoin (sérumnormal + virus)	10 ³ ×	10 ⁻⁶	2	2	2	2	8,00
	10 ⁴ ×	10 ⁻⁷	2	2	3	4	
	10 ⁵ ×	10 ⁻⁸	4	5	.	.	
	10 ⁶ ×	10 ⁻⁹	.	.	.	.	

• Souris ayant survécu.

第8表にみられるように、ウィルスの90%以上は抗血清と接触するや否や不活化され、混液を稀釈して脳内に注射しても復活しなかつた。ウィルスと抗血清とを24時間接触させると、ウィルスの99%は不可逆的に

不活化された。48時間後には結合の進行はもはやみられなかつた。

同じ趣旨の実験を更に2回行つたが、成績はほぼ一致した(第9表)。

Tableau 9. Résumé des résultats des essais sur le phénomène dit de dilution (Injection intracérébrale)

Numéro d'essai	Mélanges virus-immunsérums dilués			Mélange témoin
	après incubation de 48 heures	après incubation de 24 heures	immédiatement après préparation	
1	6,00	6,00	6,75	8,00
2	6,50	6,75	7,00	8,00
3	6,75	6,75	7,25	8,00

小括:

稀釈現象の実験において、各稀釈を脳内に注射してみたところ、前述の皮下注射の場合と類同な成績となつた。

考 察

まえがきで述べたとおり、これまでリフトバレー熱ウィルスは試験管内においては中和抗体と結合しないのではないかと思わせるような事実が幾つか示されて

いた。少くとも、試験管内で結合することの確証はなかつた。しかし、本報告でのべた遠心沈澱を利用したの抗体の吸収試験の成績は確かに陽性であるから、リフトバレー熱ウィルスといえども他の多くのウィルスと同じように、試験管内で中和抗体と結合し得るものと考えなければならない。

またそれ自身は活性を示さないウィルス・抗血清混液を稀釈することによってウィルス活性を復活させることができるが、それには限度があつて、完全には復

活させられない。その復活不能のウイルスは試験管内で中和抗体と結合したものと考えられるが、その結合は、私の実験条件のもとでは、ウイルスと抗体とが接触すると直ちに始まり、時間とともに進行することを知った。

しかし、ここに疑問が残る。稀釈現象において復活したウイルスや脳内中和試験で中和を免れたウイルスは、試験管内で一旦中和抗体と結合し、その後に解離したのであるか、はじめから結合してはいなかったのかは不明のままである。

また、不可逆的結合といい、復活不能というものの、その事を検するには動物に注射し、ある程度の日時を経てから動物の生死をみて判定するのであるから、ウイルスと抗体とが生体内にはいつてから、両者間の交渉がどのように進むのか、また第三の要因が参与するのか否か等の点については、上述の諸実験からは知見が得られなかつた。そもそも、中和抗体は本ウイルス感染の諸過程のうち、いずれの段階を抑制することによつて中和効果を発揮するのかという問題は全く今後の研究に委ねられている。

要 約

1) リフトバレー熱ウイルスをウサギ抗血清に加え、約 60,000g, 60分間遠心して得られた上清の中和力価はもとの血清のそれよりも低かつた。すなわち、試験管内でウイルスを以て中和抗体を吸収することができた。

2) ウイルスと、それを中和するのに充分な量の抗血清とを混合し直ちに稀釈するとウイルスの一部分は活性を示すが、ウイルスの90%以上は不活性となつていた。混合液を5℃に24時間おいた後に稀釈するとウイルスの99%が不活性となつていた。

3) ウイルスと抗血清とを混合し、直ちにマウス脳内に注射すると明瞭には中和が起こらないものを5℃に24時間おいてから注射すると中和が起こつた。

4) 以上の諸成績から、リフトバレー熱ウイルスと中和抗体とは試験管内で結合すると考えられる。

(稿を終るに臨み御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた長野泰一教授に深甚なる謝意を捧げると共に直接御指導御助言を戴いた同室の諸先生方に感謝致します)

文 献

- 1) 長野泰一・佐伯潔：リフトバレー熱感染防禦抗体の作用について。日本細菌学雑誌, 2, 7~8, 1947.
- 2) 遠藤元繁：ガラス器内培養法によつて出来るリフトバレー熱ウイルスの向神経性変異に就て。Virus, 1 (1), 42~50, 1950.
- 3) Nobuyuki Takemori, Minoru Nakano, Mitsuo Hemmi and Masami Kitaoka: Propagation of Rift Valley fever virus in ascites hepatoma cells of the rat: Production of new variant of the virus. Virology, 1 (1), 58~82, 1955.
- 4) 沢生子・渋谷実・竹内祥：ウイルスと抗体との試験管内結合について。日本細菌学雑誌, 6 (4), 321~324, 1951.