(附)「ファージをもたぬ」子孫細胞の割合の計

算法

例をあげて説明する。nucleoid 4 コの細胞に 4 コのファージが感染した場合を考えて見よう。nucleoid 4 コの代りに 4 コの部屋、ファージ 4 コの代りに玉 4 コとおきかえてみる。4 部屋の 4 コの玉を入れる時、考えられる組合せは、第 2 図に示す様に、1) 玉の入らぬ部屋が 0 の場合、2) 玉の入らぬ部屋が 1 の場合、3) 玉の入らぬ部屋が 2 の場合、4) 玉の入らぬ部屋が 3 の場合が考えられる。

部屋に I, II, III, IV と番号をつけ、又玉に a, b, c, d と番号をつけて区別すると、あらゆる組合せは $4^4 = 256$ となる。

第 2 図に示す様に、玉の入らぬ部屋が 1) 0 の場合の確率は $\frac{24}{256}$ 2) 1 の場合の確率は $\frac{144}{256}$ 3) 2 の場合の確率は $\frac{84}{256}$ 4) 3 の場合の確率は $\frac{4}{256}$ となる。

従つて、玉の入らない部屋の生ずる確率は

$$\left(\frac{144}{256} \times \frac{1}{4}\right) + \left(\frac{84}{256} \times \frac{2}{4}\right) + \left(\frac{4}{256} \times \frac{3}{4}\right) = \frac{81}{256} = \left(\frac{3}{4}\right)^4$$

となる。これを一般化すると

$$\left(\frac{n-1}{n}\right)^r \quad n = \text{室数} \quad r = \text{玉数}$$

となる。

ここで $n = \text{核数}$ $r = \text{吸着したファージ粒子数}$ とすれば、 $\left(\frac{n-1}{n}\right)^r$ はファージをもたない子孫細胞の割合を示す式となる。

文 献

- 1) Bertani, G. : Lysogeny. In Adv. Virus Research **5**, 151, (1958)
- 2) Bisset, K. A. : Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biology **16**, 373 (1951)
- 3) Cortelyou, J. R., Amundson, L. M. and McWhinnie, M. A. : J. Bact. **71**, 462, (1956)
- 4) Lulbecco, R. : Genetics. **34**, 122, (1949)
- 5) 萩原 : ウィルス **9**, (5) 掲載予定 (1959a)
- 6) 萩原 : ウィルス **9**, (6) 掲載予定 (1959b)
- 7) Knaysi, G. : The nucleus. Elements of Bacterial Cytology **78**, (1951) Comstock Publ. Co., Ithaca, N. Y.
- 8) Knayti, G. : Cytology of Bacteria. Ann. Rev. of Microbiology. **10**, 253, (1956)
- 9) Lark, K. G. and Maaløe, O. : Biochimica et Biophysica Acta. **15**, 345, (1954)
- 10) Lark, K. G., Maaløe, O. and Rostock, O. : J. gen. Microbiology. **13**, 318, (1955)
- 11) Luria, S. E. and Human, M. L. : J. Bact. **59**, 551, (1950)
- 12) Mudd, S. and Smith, A. G. : J. Bact. **59**, 561, (1950)
- 13) Smith, A. G. : J. Bact. **59**, 575, (1950)
- 14) Uetake, H., Luria, S. E. and Burrous, J. W. : Virology. **5**, 68, (1958)
- 15) Winkler, A. : Die Bakterienzelle. **33**, (1956) Gustav Fischer, Stuttgart.

紫外線照射狂犬病不活化ワクチンの改良の研究

——接種後麻痺症惹起因子の除去について——

藤 原 京 子*

KYOKO FUJIWARA : ESSAI D'ÉLIMINER LES FACTEURS PROVOQUANT LA PARALYSIE DE VACCIN ANTIRABIQUE IRRADIÉ

[受稿 9月14日 1959]

緒 言

狂犬病は古来死亡率が 100% の病気として人々に恐れられていたが、Pasteur が狂犬病ワクチンを作つてこの対策に偉大な貢献をなした。しかしワクチン接種とともに起つた重要な問題は、狂犬病予防接種後麻

痺症である。これは、神経組織を注射することによつて起る脳脊髄炎の一種であるといわれている。1933年 Rivers¹⁾らは、動物の脳組織を猿に注射すると急性散在性脳脊髄炎が起ると報告し、その後 Adjuvant 法の発達とともに、実験的に各種の動物に比較的たやすく発症させることができるようになった。

* 東京大学伝染病研究所第四細菌研究部 (部長 長野泰一教授)

一方各種の完全不活化ワクチンの免疫原性は大同小異であり、また製法によつて力価が動揺するので、Hodes²⁾らは免疫原性を破壊しないで不活化された、紫外線不活化ワクチンを作つた。Nagano³⁾らは、多数の人体について紫外線ワクチンとPasteurワクチンとの効果を比べて前者がすぐれていることを述べ、さらに紫外線ワクチンは、日本における後麻痺症の発生を激減させたことを報告した。しかしなお紫外線ワクチンを用いても僅かながら後麻痺症発生の危険があるためこれの改良は必要なことであり、実用面としてはワクチン中の脳炎惹起因子を除くことと、これの測定が重要である。前者は種々の化学的操作によつて抽出できるが⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾、しかしワクチンとして用いる時は免疫原性の大小のこともあり（ベンゼン抽出では力価が下る）、また人体に注射するという点からいつて、なるべくならば機械的操作で除去することが望ましい。木村⁸⁾らは、脳乳剤を物理的に高速遠心し各分劃について、Adjuvant法でモルモットのアレルギー性脱髄性脳脊髄炎の発症能力を検討し、毎分1000回転5分3回遠心の上清は、遠心しない対照群と同様の発症能力を認めた。しかしNaganoらは、1000回転10分の遠心上清ワクチンではPasteurワクチンと比較して高度の減少を報告している。一方Waksman⁹⁾らは、白質を-15度Cに15ヶ月冷凍保存するだけで、発症能力が低下すると報告した。しかしKabat⁹⁾らは、冷凍脳と凍結乾燥脳とを比較してこれらの発症能力は大差ないと述べている。

私は、後麻痺症惹起因子の測定法として Freund の Adjuvant¹⁰⁾法を用い、遠心沈澱および冷凍保存その他の操作を行つたワクチンについて、後麻痺症の発症能力を調べ、遠心操作にたいするワクチン力価への影響を調べたのでここに報告する。

実験材料 実験方法

実験材料

ウイルス：ワクチン製造用狂犬病固定毒は、伝研1号株をマウスの脳で継代し、この感染マウス脳を10%正常ウマ血清加生理食塩水で10%乳剤にして、毎分3000回転15分遠心し、上清を0.5mlずつアンブレに分注、ドライアイスボックスに保存したものを使用した。攻撃用病毒は、製造用病毒と同じものおよび、国立予防衛生研究所ウイルス・リケッチャ部より分与されたマウス脳継代のCVS株を使用した。CVS株は、この感染マウス脳を10%正常ウマ血清加生理食塩水で10

%乳剤とし、毎分3000回転15分遠心の上清を0.5mlずつアンブレに分注、ドライアイスボックスに保存した。攻撃用病毒としては、実験に際し一旦マウスの脳を通し、発症マウスの新鮮脳を採取して使用した。

希釈液：ウイルスの希釈液は10%正常ウマ血清加生理食塩水を使用し、感染脳のワクチン製造、およびワクチンの力価試験の希釈液は、PH 7.6の磷酸緩衝食塩水を使用した。

Adjuvant： Freund の Adjuvant¹⁰⁾を使用した。これは流動パラフィン (Bayol F) と Arlacel A を 85 : 15 の割合に加え、これに結核死菌 (青山 B, 加熱死菌) を 10mg/ml 加えてよくまぜ高圧滅菌した。

モルモット： ワクチン製造および後麻痺実験のモルモットは、体重300~400gの岐阜産のモルモットを使用し、一実験の性別は一定にした。

マウス： ワクチンの力価試験用のマウスは、生後3週の市販雌マウス、およびddD系の雌マウスを使用した。

実験方法

I 新鮮脳の遠心沈澱法による惹起因子除去の実験

ワクチン製造には、伝研1号株を 10^{-3} に希釈してモルモットの脳内に0.1ml注射した。発症後死亡直前に採脳して、10%乳剤として3等分し (A, B, Cとする)、Aはそのまま、Bは毎分1000回転10分遠心、Cは毎分3000回転10分遠心して上清を分離した。A, B, Cそれぞれを、2.0mlずつシャーレに分注して紫外線照射 (三共電気株式会社製15WA型紫外線殺菌灯使用、照射距離10cm、照射時間30秒) を行い、1万倍希釈のマーズエンを加えて氷室に保存した。

これら A, B, C の各ワクチンに Adjuvant を等量加えてよくまぜ、これをモルモットの背部皮内に0.1mlずつ3ヵ所、項筋内に0.2ml1ヵ所注射し、臨床症状を40日間観察して発症モルモットの数を調べた。実験は4回行い、1群のモルモット数は5~10匹を使用した。

発症すれば体重は注射後7日前後より次第に減少し、特に腰部が細く力がなくなつて歩行に際し Ataxie がある。また排尿、排便の失禁があり、後肢の麻痺が起つてついに倒れて立てなくなり死亡する。しかし麻痺が起つてもやがて回復するものもある。症状の程度はモルモットによつて差があるが、私は、連続的の体重減少を示して腰が細くなり Ataxie の現れたものは、後肢麻痺、失禁等の症状がそろわなくても発症とみなした。また観察の途中で、体重減少、呼吸速迫、毛ば

立ち等の症状で死亡し、麻痺の認められなかつたものは、発症例より除外した。

ワクチンの力価試験は、生物学的製剤基準(1957年)の狂犬病ワクチン(不活化)基準¹¹⁾に従つた。感染価はBehrens-Kärberの法によつてLD₅₀を求め、対照群とのlogLD₅₀の差を求めてワクチンの力価とした。

II 冷凍保存その他の操作による惹起因子除去の実験

ワクチン製造は、感染モルモット脳を2ヶ採取し、各脳を2等分してそれぞれの半分と合わせて1ヶとし、1ヶはそのままだライアイスボックスで、他の1ヶは100%のグリセリンに入れて氷室で各々169日間保存した。実験に際し、これら保存脳を20%乳剤としてワクチンを作り、これと、別に新鮮感染脳を20%乳剤紫外線不活化ワクチンとして凍結乾燥したもの、および対照として、感染脳乳剤を毎分10000回転30分遠心し上清を凍結乾燥して保存したものを使用した。これらを実験IのようにAdjuvantを加えてモルモットに注射し、後麻痺発症の状態を観察した。

実験前にワクチンの脳乳剤0.4gの乾燥重量を調べたところ、冷凍保存脳は0.1g、グリセリン保存脳は0.15g、新鮮凍結乾燥脳は0.1gであつた。

実験成績

I 新鮮脳の遠心沈澱法による後麻痺症惹起因子の除去

緒言で述べたように、脳乳剤を遠心することによつて発症惹起因子を除去できる可能性が現れたので、どのくらい遠心すればこれが除かれるのか、また遠心操作がワクチン力価にどのような影響を与えるものかを調べた。

脳の10%乳剤、1000回転10分の遠心上清、および3000回転10分の遠心上清の3群について4回実験を行つた。第1表はこれを示す。第1表より明かなように、脳乳剤を遠心することによつて、10%乳剤そのままのワクチンよりは発症能力が減少した。3000回転10分の遠心ではほとんど発症しないとみさせるが、1000回転10分遠心では、遠心しない場合よりは少いがしかしなおいくらか発症した。

これらワクチンの力価は遠心によつてどのように影響されるであろうか。実験II、III、IV、について力価試験を行つた。第2表はこれを示す。実験IIに使用したマウスは市販マウスであつて成績が動揺したため、III、IV、においては均一のddD系マウスを使用した。また生物学的製剤基準の狂犬病ワクチン(不活化)基準¹¹⁾で、ワクチンの力価試験の場合のマウスの免疫は、ワクチンを脳の0.5%乳剤となるように希釈することが規定(5%乳剤をさらに10倍に希釈する)してある

Tableau 1 Paralysie Provoquée chez le Cobaye par le Vaccin Centrifugé

Exp.	Vaccin	Nombre de Cobayes Vaccinés	Nombre de Cobayes Paralysiques (Période Latente en Jours)	Nombre de Cobayes Morts (Durée jusqu'à la Mort en Jours)	Nombre de Cobayes (Guéris)	Nombre de Mort Intercurrente (Durée jusqu'à la Mort en Jours)	Nombre de Cobayes Paralysés
I	A*						
	B	10	1(9)	1(11)	0	1(8)	8
	C	9	1(24)	1(29)	0	1(5)	7
II	A	10	7(14,14,15,16,16,18,18)	4(19,24,28,42)	3	2(4,10)	1
	B	10	5(17,17,17,17,17)	5(25,31,32,36,36)	0	3(7,16,16)	2
	C	9	0	0		1(16)	8
III	A	5	3(15,16,18)	2(21,21)	1	0	2
	B	5	0	0		0	5
	C	3	0	0		0	3
IV	A	5	3(8,9,14)	0	3	0	2
	B	5	1(16)	0	1	0	4
	C	4	0	0		1(29)	3

* A : Emulsion Irradiée à 10% du Cerveau du Cobaye Inoculé.

B : Surnageant Obtenu par Centrifugation de 10 Minutes à 1,000 t/m.

C : Surnageant Obtenu par Centrifugation de 10 Minutes à 3,000 t/m.

Tableau 2. Pouvoir Vaccinant la Souris du Vaccin Centrifugé

Vaccin	Exp. II		Exp. III		Exp. IV	
	Dose d'Épreuve en -log LD ₅₀	Indice de Protection	Dose d'Épreuve en -log LD ₅₀	Indice de Protection	Dose d'Épreuve en -log LD ₅₀	Indice de Protection
A*	< 4.04	> 2.56	< 2.75	> 4.17	< 3.40	> 3.20
B	< 4.03	> 2.57	< 3.27	> 3.65	< 3.49	> 3.11
C	< 4.01	> 2.59	< 4.38	> 2.54	< 3.60	> 3.00
nonn Vacciné	6.60		> 6.92		6.60	

* Voir le Commentaire du Tableau 1.

Tableau 3. Paralysie par le Vaccin Préparé avec le Cerveau Conservé

Vaccin	Nombre de Cobayes Vaccinés	Nombre de Cobayes Paralysés (Période Latente en Jours)	Nombre de Mort (Durée jusqu' à la Mort en Jours)	Nombre de Cobayes Guéris	Nombre de Mort Intercul- rente (Durée jusqu'à la Mort en Jours)	Nombre de Cobayes non Paralysés
Congelé	10	6(7,7,7,13,15)	6(17,21,21,33,37,37)		1(6)	3
Glycériné	10	6(7,7,17,18,21,23)	3(20,26,37)	3	1(14)	3
Lyophilisé	9	8(7,8,9,10,15,17,18,24)	4(17,20,21,21)	4	0	1
Frais (Témoin)	5	0			0	5

ため、実験Ⅱではワクチンを20倍に希釈して行つた。しかしこれでは、遠心上清ワクチンの脳組織濃度は0.5%以下になる。このため、実験Ⅲ、Ⅳ、では規定どおりワクチンの10倍希釈で行つた。また実験Ⅱ、Ⅲの攻撃ウイルスは、ワクチン製造の時と同じ伝研1号株を使用した。Buster Effect が強い。ため、実験Ⅳは予研より分与されたCVS株で行つた。しかしどの実験においても、Buster Effect がウイルスの10⁻²希釈まででありこれは計算から除外した。ワクチンの検定基準では、製剤の力価は、攻撃用ウイルスの1000LD₅₀以上の攻撃量にたいして、試験マウスを防禦する免疫能力を持たなければならないと規定されているが、第2表では1000回転10分遠心のワクチンはこの規定に合格するが、3000回転のワクチンでは、時により免疫原性が低いこともあつた。

II 冷凍保存その他の操作による後麻痺惹起因子の除去

Waksmanらは白質を長期間冷凍保存すると発症能力が低下すると報告した。私は、感染脳を169日間ドライアイスボックスに保存したものと、100%グリセリンに入れて同じ期間氷室に保存したものから製造したワクチンと、新鮮脳ワクチンを凍結乾燥したものおよび、対照群として10000回転30分の遠心上清を凍結乾燥して保存したものの4種について、発症の状態

を調べた。

第3表に示すとおり、保存脳は新鮮凍結乾燥脳に比べて発症が減少したが、冷凍およびグリセリン保存の間には差はなかつた。またこの減少の程度は、遠心上清ワクチンに比べて大きいとは思われない。

考 察

狂犬病ワクチン予防接種後麻痺症は、ワクチン中の脳物質によつて起る脱髄性脳脊髄炎の一種だといわれている。この脳炎惹起因子については、多くの研究者によつて種々研究が行われ、現在 Proteolipid であるという説⁴⁾⁵⁾¹²⁾、水溶性蛋白であるという説⁶⁾⁷⁾、などがあるが、まだ明快な結論は出ていない。しかしいずれにしても、狂犬病ワクチンからこの惹起因子を除くことは重要な問題である。

神経組織を動物に注射することによつて、脱髄性脳脊髄炎を発症させ得るが¹⁾、FreundのAdjuvantを併用して比較的たやすく動物に再現することができる。私は、このAdjuvantを用いて、脳乳剤の遠心上清による狂犬病ウイルス紫外線不活化ワクチンの予防接種後麻痺症の発生能力を、遠心しないワクチンと比べたところ、かなりの低下がみられ遠心回転数が多くなるにつれて発症は減少した。Nagano³⁾らの先の報告でも、Pasteur ワクチンによる後麻痺症の発生が、

接種者6367名中36名(0.57%)であつたのに比べ、毎分1000回転10分遠心上清の紫外線不活化ワクチンでは、接種者838名中発症は2名(0.24%)であつた。これは遠心上清使用のためと思われる。麻痺発生の原因となる物質は、遠心操作によつてかなり除去されるのであり、私の実験では3000回転10分の遠心でほとんど除かれた。しかし1000回転10分では、遠心しないワクチンよりは発症が少くなっているが、なおいくらかの発症はあり、実験のたびに成績にかなりの動揺があつた。これは実験動物の感受性の違いや、Adjuvant そのものの能力の動揺が影響するものと思われる。

遠心ワクチンの力価を遠心前ワクチンと比べると、ddD系マウスを使用した場合に、力価は遠心することによつて低下した。ワクチンは攻撃用ウイルスの1000LD₅₀の攻撃量にたいして、試験マウスを防禦する力価を持たなければならないが、1000回転10分の遠心でこの条件がころうじて満たされた。しかし3000回転10分遠心では、免疫原性が低下することがあつた。

すなわち、ワクチンの遠心操作のみで後麻痺発症惹起因子を除去するという点から考えると、免疫原性は保たれ、発症能力は低下した1000回転10分遠心上清がその限度であろう。

一方Waksman⁵⁾らの報告した冷凍保存脳の発症能力低下は、私の実験でも、冷凍およびグリセリン長期間保存脳は、新鮮凍結乾燥脳に比して発症能力が低下した。しかしこの低下の程度は、遠心上清の場合に比較して大きいとは考えられない。

以上の結果からワクチン使用上の実際的な問題としては、Adjuvant 法を検定基準にくり入れて、遠心沈澱法によつてワクチンを改良して行くのがよいと思われる。

要 約

1) 狂犬病固定毒接種モルモット脳の10%乳剤を材料として作つた紫外線不活化ワクチンの、モルモット

における麻痺惹起作用は、1000回転10分間の遠心によつてかなり減弱し、3000回転10分間の遠心によつてほとんど消失した。

2) しかし、マウスにおける免疫原性は、3000回転10分間の遠心によつて、やや減弱することもあつた。

3) 脳材料を、冷凍、グリセリン浸漬などによつて長期保存することにより、麻痺惹起作用は幾らか減弱したが、遠心による場合には及ばなかつた。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師長野泰一教授、伝研附属病院大谷杉士助教授、並びにCVS株を分与くださいました予研吉野亀三郎先生、近藤昭先生に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Rivers, T. M., Sprunt, D. M., and Berry, G. P. : J. Exp. Med. **58**, 39-53, 1933.
- 2) Hodes, H. L., Webster, L. T., and Lavin, G. I. : J. Exp. Med. **72**, 437-444, 1940.
- 3) Nagano, Y., Shibuki, M., Kitamoto, O., and Otani, S. : Rev. Immunol. **18**, 339-343, 1954 ; Bull. Acad. Nat. Méd. **139**, 368-369, 1955.
- 4) Goldstein, N. P., Kolb, L. C., Mason, H. L., Sayre, G. P., and Karison, A. G. : Neurology, **3**, 608-614, 1953.
- 5) Waksman, B. H., Porter, H., Lees, H. D., Adams, R., and Folch, J. : Exp. Med. **100**, 451-471, 1954.
- 6) Kies, M. W., Roboz, E., and Alvord, E. C. : Feder. Proc. **15**, 288, 1956. (abstract); Feder. Proc. **16**, 204, 1957. (abstract)
- 7) Lipton, M. M., and Stergman, A. J. : J. Immunol. **82**, 409-414, 1959.
- 8) 木村潔, 浅尾博一, 古谷隆 : 精神神経学雑誌. **60**, 277, 1958.
- 9) Kabat, E. A. : VI^e Congrès International de Neurology-Reports et Discussion 31-47, 1957, Bruxelles, Acta Medica Belgica Ed.
- 10) Freund, J., and McDermott, K. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **49**, 548, 1942.
- 11) 狂犬病ワクチン(不活化)基準, 厚生省告示第90号改正. 生物学的製剤基準, 厚生省, 1957.
- 12) Olitsky, P. K., and Tal. C. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **79**, 52-53, 1952.