

実験的感染における細網内被系の機能について

第5報 牛痘ウイルスの赤血球凝集反応について

金沢大学医学部微生物学教室(主任 谷友次教授)

伏 木 唯 和

Tadakazu Fushiki

(昭和30年1月22日受附)

第1章 緒 言

1941年 Hirst¹⁾がインフルエンザ・ウイルスにおける鶏赤血球凝集反応並びにインフルエンザの免疫血清による赤血球凝集抑制反応について報告したがその後の研究により他のウイルス或いは細菌濾液によつても同様の反応が起ることが知られた。

牛痘ウイルスについては1942年 Nagler²⁾により最初に記載せられ、次いで Clark & Nagler³⁾, Nagler⁴⁾, Burnet & Stone⁵⁾, North⁶⁾, Gillen⁷⁾, Briody⁸⁾等により同ウイルスで凝集されるのは約半数の鶏の赤血球であり、ウイルス力価と凝集価とは必ずしも一致せず、ウイルスと凝

集素とは別のもので凝集素は、Lecithin 様物質であろうと推論せられ、又凝集素は耐熱性と易熱性の二部分に分けられ、又17000回/分3時間の遠心によつても明らかに二部分に分れることが報告された。しかしその本態についてはなお疑問の点が少なくない現況である。よつて著者は牛痘ウイルスの赤血球凝集抑制反応によつて実験を行うに先立ち孵化鶏卵を用いて凝集素とウイルスとの関係を究明し、一方では使用赤血球にも検討を加え、更に Roller tissue culture によつても凝集素の産生を確かめたのでここに報告する。

第2章 実験材料並びに実験方法

使用牛痘ウイルスは東芝生物化学研究所製の組菌50mgを1ccの生理食塩水に混和しこれにストレプトマイシン5mg、ペニシリンG結晶1000単位を加え、室温に1時間放置し、2000回10分遠心して得た上清を用いた。上記抗生物質の添加により雑菌は完全に抑制せられ、且つウイルスの力価に何ら影響を及ぼさないことを予め確めた。

前記材料を Burnet の変法により12日卵脈絡尿膜上に接種し37°C、72時間後の脈絡尿膜を乳鉢でよく磨碎し生理食塩水を加えて10倍乳剤とし、これを2000回10分遠心し、その上清0.2ccを同様の方法で接種し24代継株に成功した。

使用鶏赤血球は鶏により被凝集性に著しい固体差が

認められたので、同一抗原に対し、同じ凝集価を示した2羽の鶏の赤血球を交互に採血し3回洗滌後0.25%生理食塩水浮遊液として用いた。

凝集反応の術式は被検材料を0.5cc宛2倍階段希釈し、それに前記鶏赤血球浮遊液0.5ccを加え、37°C孵卵器に静置1.5時間後に判定した。判定は厚生省編纂の衛生検査指針⁹⁾のインフルエンザ診断指針に準じて行つた。

ウイルスの力価は家兎の皮内に抗原の10倍階段希釈液0.25cc宛を注射し5日後に直径7mm以上の硬結を示したものを陽性としその最高希釈倍数を以て表した。なおその他個々の実験方法については実験成績の項に記載した。

第3章 実験成績

第1節 凝集素の産生と使用卵の孵化

日数並びに培養日数との関係

接種卵の孵化日数については従来より8~15日卵が使用されており、特に10日卵以後のものが使用されているが、著者も爾後の実験に先立ち孵化日数が凝集素の産生に大きな影響を有すると考え、 10^{-6} の発痘力を有する脈絡尿膜乳剤の0.2ccを8~15日卵3個宛についてその脈絡尿膜上に接種し、 37°C 、72時間培養後の脈絡尿膜を取り出し発痘力、鶏赤血球凝集価を測定

した。その結果は第1表に示す如くで、8日卵、9日卵、10日卵では発痘力 10^{-5} ~ 10^{-6} を示し相当高いウイルス力価を認めるにも拘わらず、凝集価は80倍以下であった。一方14日卵、15日卵はウイルス力価、凝集価共に相当高い値を示していたが卵の死亡率が高く不適當である。11日卵、12日卵、13日卵は発痘力、凝集価共に高く、よい成績を示しているが、就中12日卵が最も凝集素の産生が著明である¹⁰⁾。

次に脈絡尿膜上接種を行つた12日卵について

第1表 使用卵の孵化日数とウイルス力価、凝集価の関係

使用卵 力 価	8 日 卵			9 日 卵			1 0 日 卵			1 1 日 卵		
	発 痘 力	10^{-5}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}
凝 集 価	20	40	40	80	40	80	80	80	80	80	640	640

使用卵 力 価	1 2 日 卵			1 3 日 卵			1 4 日 卵			1 5 日 卵		
	発 痘 力	10^{-6}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-4}
凝 集 価	640	640	640	640	320	320	320	160	320	640	80	320

培養日数を1日、3日、5日と分けて夫々比較せる所その成績は第2表の如くで発痘力は培養日数を長くすれば増加するが、凝集価は3日間培養と5日間培養との間に差は認められなかつた。又本実験において3日間培養にては全卵生存したが、5日間培養では4日目、5日目に死亡せる卵があり、従つて3日間が最も適當と考えられた。

第2表 培養日数とウイルス力価、凝集価の関係

培養日数 力 価	1 日	3 日	5 日
	発 痘 力	10^{-3}	10^{-7}
凝 集 価	80	640	640

第2節 凝集素の産生と接種部位との関係

孵化鶏卵による牛痘ウイルスの培養を行う場合脈絡尿膜を最もよく利用しており、その接種部位は尿膜腔内接種と脈絡尿膜上接種の二法が現在屢々用いられているが^{10) 11)}、著者は両者を比較検討するため発痘力 10^{-6} を有する脈絡尿膜乳剤0.2ccを12日卵の脈絡尿膜上と尿膜腔内に夫々接種し、 37°C 、3日間培養後脈絡尿膜、胎兒、尿液、卵黄囊の各部について発痘力、凝集価を検した。その結果は第3表に示す如くでウイルス力価は脈絡尿膜上接種では脈絡尿膜が最も高く、次いで卵黄囊、胎兒、尿液の順で、尿膜腔内接種では尿液が最も低く他は差がなかつた。凝集素の産生は脈絡尿膜上、尿膜腔内両接種共脈絡尿膜が最もよく、他の部分は何れも低い値を示し、継株材料としても又抗原としても脈絡尿膜が最もよい材料であり、接種部位は脈絡尿膜上接種の方が優れていると考えられ

る。

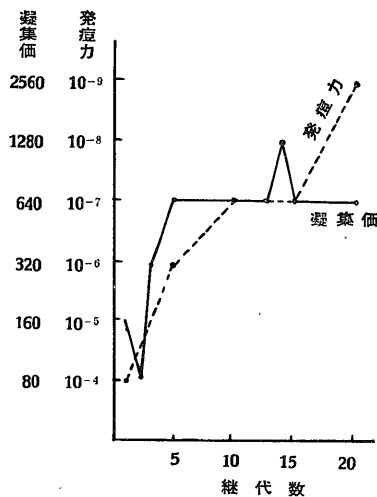
第3表 接種部位と各種臓器におけるウイルス、凝集素の分布

接種部位	各種臓器 力 価	脈絡尿膜	胎児	尿液	卵黄嚢
		脈絡上尿	発痘力 凝集価	10^{-7} 640	10^{-4} 0
尿内腔	発痘力 凝集価	10^{-6} 320	10^{-6} 0	10^{-4} 20	10^{-6} 40

第3節 継代数と凝集素の産生との関係

前述の如く粗苗にストレプトマイシン、ペニシリンを加えて孵化鶏卵脈絡尿膜上接種を行い、37°C、3日間培養して継代したが、各代について脈絡尿膜を材料としてその凝集価の変動を調べ、併せて5代毎に発痘力を調べてウイルス力価を測定したが、その成績は第1図に示す如くウイルス力価は初めは低く、代を重ねると共に上昇を認めた。それと共に接種卵の生存日数も次第に伸び、5代以後は3日以内に死亡する卵は全く見られなかつた。斯様にウイルス力価の上昇にも拘わらず卵の死亡率が低下せるは概ウイルスが孵化鶏卵に次第に適応せるためと考えられる。一方凝集素の産生は必ずしも発痘力と平行せず、初めから高い値を示したが、初めの数代は不安定であるが5代目以降は略々安定せる値を示していた。

第 1 図



第4節 使用食塩に対する吟味

赤血球凝集反応においては試験管の清潔、稀釈メジウムの良否が屢々自然凝集の原因となることは既によく知られる所である¹³⁾。而して稀釈メジウムには生理食塩水が最も用いられるので関東化学(分析用)、武田薬品(注射用)、和光純薬(日本薬局方)、富田製薬(注射用)、家庭用食卓塩、粗製塩、について比較検討を行つたがその結果、食卓塩、粗製塩を除いては何れも用いられることを確めた。第4表はその成績であるが食卓塩にては自然凝集は見られないが凝集価が低く、粗製塩では自然凝集が見られ何れも不適當と考えられる。

第4表 各種食塩の赤血球凝集反応に及ぼす影響

凝集価 使用食塩	40	80	160	320	640	1280	2560	対 照
関東化学製	+	+	+	+	+	-	-	-
武田薬品製	+	+	+	+	+	-	-	-
和光純薬製	+	+	+	+	+	-	-	-
富田製薬製	+	+	+	+	+	-	-	-
食卓塩	+	+	+	-	-	-	-	-
粗製塩	+	+	+	+	+	+	+	+

第5節 各種動物赤血球の被凝集性について

Rivers¹³⁾によれば牛痘ウイルスにおいて凝集される動物の赤血球は鶏の外に猫、豚、白鼯、

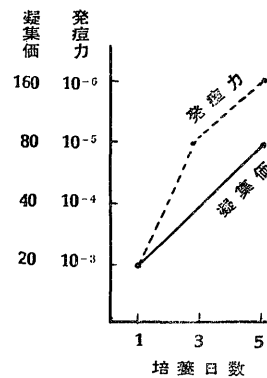
モルモット、鴨、蛇等が挙げられているが、山田等¹²⁾によれば鶏以外は何れの動物赤血球も凝集せずと報告している。著者も人(A型、B型、AB型、O型)山羊、綿羊、モルモット、家兎、ラッテ、マウス、魚(鯉、鮒)、雀、犬等について行つた所、7羽の鶏中640倍の凝集価を示したものの2羽、160倍1羽、80倍1羽、他は何れも陰性なる結果を得た。又他の動物赤血球はモルモットにおいて10頭中1頭に弱く凝集したのみで他は何れも陰性であつた。

第6節 Roller tissue culture による凝集素の産生について

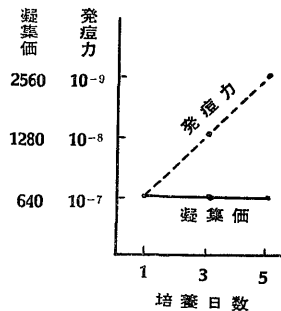
1949年 Bernkopf¹³⁾は脈絡尿管膜以外の孵化鶏卵の内容を除き Tyrode 液を入れたものでインフルエンザ・ウイルスの培養に成功し、岩崎¹⁴⁾はこれを牛痘ウイルスに応用した結果を報告している。著者も同法による牛痘ウイルスの培養を試み更に凝集素の産生の有無を検した。

接種方法は14日卵を用い無菌的に気室部の卵殻を取り除き、卵殻膜を脈絡尿管膜より剝離して脈絡尿管膜に切開を加えて静かに転倒して内容を除き、脈絡尿管膜と胎児、卵黄嚢との結合を切断する。これに1cc中にストレプトマイシン1mg、ペニシリンG 20単位を含む Tyrode 液 30cc を入れ、発痘力 10^{-6} の脈絡尿管膜乳剤 0.2cc を滴下し、開窓部を滅菌せる大型デッキグラスにて覆いパラフィンで封鎖し 37°C 孵卵器中に立て1日数回廻転して脈絡尿管膜全体を液が浸すようにして、1日、3日、5日後に開卵し各々の脈絡尿管膜について発痘力、凝集価を調べた所第2図の如くでウイルスの増殖は脈絡尿管膜上接種に劣らぬ成績を示したが、凝集素の産生は脈絡尿管

第 2 図



第 3 図



膜上接種に比し低い値を示した。

一方岩崎にならない12日卵の脈絡尿管膜上接種3日後の卵を同様処置し観察せる結果は第3図に示す如くで、凝集素の産生は脈絡尿管膜上接種後3日の値と変化はないが、ウイルス力価は更に上昇し本法によつても牛痘ウイルスが増殖せることを確め、凝集素も産生せられるが脈絡尿管膜上接種に比し劣ることを確めた。

第4章 総括並びに考按

以上の実験を総括するに

1) ペニシリン、ストレプトマイシン処置により、粗苗より孵化鶏卵に接種し更にそれより継代が行い得ることを確め得た。

2) 孵化鶏卵の孵化日数は牛痘ウイルスにお

いては8日卵、9日卵、10日卵等日数の浅いものは凝集素の産生が悪く、又発痘力より判断するにウイルスの増殖も活潑ではないが、11日卵以後のものは何れも凝集素の産生、ウイルスの發育共に良好である。しかし14日卵、15日卵の

如く胎児の成長の進んだものでは、早期に死亡する卵が相当見られ従つて接種材料獲得には必ずしも良いとはいえない。又脈絡尿膜の發育は11~13日卵が最もよく、以上の点より11~13日卵が最も適当と考えられるが、著者の実験では12日卵が最も成績が良かったので、爾後の実験には特別の場合を除き12日卵を使用した。孵化日数については長い程發痘力は強くウイルス力価は高い材料が得られるが、凝集素の產生は3日間培養と5日間培養との間に差は見られず、卵の死亡することを考慮に入れると、3日間培養にて充分と考えられる。

3) 接種部位と各臓器のウイルス力価、凝集素の產生状態を觀察するに、脈絡尿膜上接種と尿膜腔内の2つについて比較すると、凝集素の產生は両者何れの場合にも脈絡尿膜において最も良好で、他の臓器では何れも極めて低い値を示していた。ウイルスの發育は脈絡尿膜が両者とも良いことは凝集素の產生と同様であるが他の臓器においては多少の差が見られた。しかし何れにせよウイルスの増殖、凝集素の產生共に脈絡尿膜が最もよくウイルス材料としても、凝集反応の抗原としても脈絡尿膜が最も適していることがわかつた。又脈絡尿膜のみについて見ると脈絡尿膜上接種の方が尿膜腔内接種より優れていると考えられる。

又この実験によつて、ウイルスの力価と凝集素の產生度は平行せず、特に胎児の場合の如きは相当高い發痘力を示すにも拘わらず、凝集素の產生は全く行われなことが知られた。

4) 前記の如く粗苗より孵化鶏卵接種に成功し更にこれを24代継株したがその継代数とウイルス力価、凝集素產生状況との関係を見るにウイルス力価は代を重ねる毎に上昇し、而も接種卵の生存日数も長くなつたが、これは概ウイル

スが孵化鶏卵に適應して来たためと考えられる。然るに凝集素の產生はウイルス力価に平行せず、初め数代は不定であるが、3~5代頃より安定し、その後は特に凝集価の上昇は見られない。これは前述の接種部位と各臓器のウイルス力価、凝集素產生の場合にもいい得ることであるが、ウイルスと凝集素とは全く別のものと判定する根拠の一つとなり得ると信ずる。又この実験によつて、凝集反応の材料として孵化鶏卵を用いる場合、粗苗より接種直後のものよりも数代経過したものを実験に供する方が安全と考えられる。

5) 赤血球凝集反応の場合、メジウムの良否が非常に影響を有することは既によく知られる所であるが、市販の諸種食塩について比較検討したが、粗製塩などの低級品を除き、日本薬局方、化学用、注射用等の何れの製品にても大差がないことが知られた。

6) 各種動物赤血球の被凝集性については既に多くの研究があるが、その成績は必ずしも一致しない。本実験においても、鶏においてすら大きな差が見られ、他の動物赤血球においては極く一部を除いて全く陰性なる結果を得、今までの報告に必ずしも一致しない点が少なくなつた。これは特に牛痘ウイルスにおいては同種動物間の個体差が強いためと考えられる。

7) Bernkopf がインフルエンザ・ウイルスにて行つたと同様に、Roller tissue culture により牛痘ウイルスの培養を行つて見たが、本法によつて充分牛痘ウイルスの培養が行い得ることを確めた。又本法によつても、脈絡尿膜上接種に比して凝集価は低いとはいえ、凝集素の產生が認められ赤血球凝集反応の材料として充分用い得ることを確めた。

第5章 結 論

牛痘ウイルスについて鶏赤血球凝集に関する実験を行つた結果次の如き結論を得た。

1) 抗生物質の使用により粗苗を孵化鶏卵に接種し、牛痘ウイルスの孵化鶏卵適應株を得る

ことに成功した。

2) 使用卵は孵化11~13日卵が凝集素産生最もよく、接種後の培養日数は3日間が適当と考えられる。

3) 接種部位は脈絡尿膜上接種が、凝集素の産生最も良好である。

4) 脈絡尿膜上接種の際のウイルス力価と凝集価の関係、孵化鶏卵の各臓器の分布は必ずしも両者平行せず、ウイルスと凝集素とは別のものと考えられる。

5) 鶏の約半数に赤血球凝集反応を認めた外、他の動物赤血球では殆んど同反応が行われず同種動物間にも強い個体差があると考えられる。

6) 継代によりウイルスの力価は上昇するが凝集価は略々安定で変動が少ない。

7) Bernkopfによりインフルエンザ・ウイルスで試みられた Roller tissue culture によつても凝集素が産生されることを確めた。

(欄筆するに当り 恩師谷教授の御懇篤なる御指導と御校閲に深謝致します)

文

- 1) Hirst : *Scienc*, **94**, 22, (1941). 2) Nagler : *Med. J. Austral.*, **1**, 281, (1942).
(Nagler⁴⁾より引用) 3) Clark : *Austral. J. Exp. Biol. & Med. Sci.*, **21**, 103, (1943).
4) Nagler : *Austral. J. Exp. Biol. & Med. Sci.*, **22**, 29, (1944). 5) Burnet : *Austral. J. Exp. Biol. & Med. Sci.*, **24**, 1, (1946).
6) North : *Austral. J. Exp. Biol. & Med. Sci.*, **22**, 105, (1944). 7) Gillen : *J. Immunol.*, **65**, 701, (1950).

献

- 8) Briody : *J. Immunol.*, **67**, 403, (1951).
9) 厚生省編纂 : 衛生検査指針, **I**, (3), 31, (1953). 協同医書出版社. 10) 多ヶ谷 : *日本細菌学雑誌*, **8**, 303, (1953). 11) 岩崎 : *Virus*, **1**, 57, (1951). 12) 山田 : *Virus*, **2**, 160, (1952). 13) Rirers : *Viral and Rickettsial Infection of Man*, **78**, (1948). 14) Bernkopf : *Proc. Soc. Biol. & Med.*, **72**, 680, (1949).