

5 牛痘ウイルスによる赤血球凝集反応の基礎的研究 (第2報)

北海道立衛生研究所 (所長 中 村 豊)

北海道立衛生研究所嘱託
北海道大學醫學部教授 山 田 守 英

北海道立衛生研究所技師 寒 河 江 和 子

先きに著者等は“牛痘ウイルスによる赤血球凝集現象について”なる題で牛痘毒がインフルエンザ、ウイルスと同じく鶏赤血球を凝集すること、及びこの現象は痘毒免疫血清によつて特異的に抑制されることを発表した。この報告に於て著者等は更に痘毒による赤血球凝集現象に及ぼす
1) メジウムの影響 2) 赤血球の種類について 3) 作用温度の影響等について検索した成績を
発表した。

この痘毒による赤血球凝集現象はわが國に於てこの研究に手を染めたのは著者等を以て嚆矢とする。同じ問題に關してオーストラリヤに於て Nager (1942年), North (1944年) 及び Burnet, Bonke (1946年) の研究發表がある。前二者の文献は入手が不可能で從つて讀む機會を得ないが全く基礎的な研究にとどまるらしく、Burnet は ectromelia virus を中心として vaccinia virus との關係を探究しようとしたものである。

著者等はこの問題の検索の着手に當つて直ちに 1) 再種痘善感、不善感の正確なる判定、
2) 痘瘍患者の診斷 (別報の如き) 等應用方面に重要なことを豫想し、從つて精細なる基礎的實驗を行つてその知見を實際的検索に於て實施し、この反應を正確に行うべきことを考えた。

今回の報告は同じく牛痘毒による鶏赤血球凝集現象について、引續き行つた基礎的研究の結果を
發表するものである。

實驗材料及び方法

赤血球凝集因子： 牛痘毒家兎睪丸苗又は孵化鶏卵漿尿膜苗を用いた。家兎睪丸苗は牛痘毒を多數世代家兎の睪丸通過したもので、これを正常家兎の睪丸内に接種し、4～5日後病變が最高に達した時期に剔出、生理食鹽水で5倍乳剤を作り、凍結融解を4～5回繰返し、その上清を使う。漿尿膜苗は上記家兎睪丸苗又は痘苗を10～11日目の孵化鶏卵漿尿膜に數代繼代接種したものであつて著明な病變を起した漿尿膜をとり5倍生理食鹽水乳剤とし、凍結融解反復後上清を用いた。

牛痘毒免疫血清： 牛痘ウイルスを家兎皮内に接種し一程度免疫性になつてゐるものに更に家兎睪丸苗を數回耳靜脈内注射して強度に免疫し、全採血して血清を得る。血清はすべて56°C30分間非壊化後に使う。

0.1%鶏血漿食鹽水： 減菌した3.8%クエン酸ソーダ溶液を0.4cc注射器にとり、鶏の翼靜脈から1.6cc採血する。このクエン酸ソーダ加血液に4倍の生理食鹽水を加えて遠心沈澱し上清を得る。この上清は大體10%血漿食鹽水である。反應を行う際これを生理食鹽水に0.1%になるように加え

て使用する。沈澱した赤血球は生理食鹽水で3回洗滌し、0.25%の赤血球浮游液とする。以上方法の詳細は第1報に述べた通りである。

反応メジウムは今回は第1報で使用した0.1%家兎血清食鹽水の代りに専ら上記0.1%鶏血漿食鹽水を用いた。

實驗成績

1. 反應のメジウムについて

さきに著者等は、ウイールスによる赤血球凝集反応に際してはガラス器具やメジウムを吟味し條件に叫つたものを用いなければ非特異的な自然凝集を招き易く、これを避けるためには0.1%家兎血清加食鹽水を用いればよいことを報告した。その後實驗を續けているうちに、家兎血清の代りに0.1%の鶏血漿を加えた食鹽水を用いても規則正しい反應を起させることが出来る事を知つた。殊に鶏血漿は家兎血清に比し鶏から採血する度毎に新しいものが得られ、非勵化を要せず容易に利用出来ると云う長所がある。即ち第1表に示すようにメジウムとして0.1%鶏血漿生理食鹽水を用いても凝集價の低下或は非特異的凝集は全く認められない。なお、この他にクエン酸ソーダ加鶏血液を洗滌せずそのまま約150倍に稀釋して血球浮游液として用いても目的を達することが出来る。

第 1 表

血球液	ウイールス稀釋メジウム	稀釋倍數 5×2^n			血球 對照
		n=7	8	9	
食鹽水(不良)	食鹽水(不良)	+	×	×	×
〃(良)	〃(良)	+	+	-	-
0.1%正常家兎 血清食鹽水	食鹽水(不良)	+	士	-	-
	0.1%正常家兎血清食鹽水	+	+	-	-
	0.1%鶏血漿食鹽水	+	+	-	-
0.1%鶏血漿 食鹽水	食鹽水(不良)	+	士	-	-
	0.1%正常家兎血清食鹽水	+	+	-	-
	0.1%鶏血漿食鹽水	+	+	-	-
鶏血液 食鹽水 (150倍)	食鹽水(不良)	+	+	-	-
	0.1%正常家兎血清食鹽水	+	+	-	-
	0.1%鶏血漿食鹽水	+	+	-	-

次にこれらのメジウムを用い、免疫血清による血球凝集抑制反應を試みたが血清の抑制價には何らの影響をも示さなかつた。(第2表)

これ等の實驗から爾後著者等はウイールスの赤血球凝集反應及び免疫血清による凝集抑制反應のメジウムとして0.1%鶏血漿生理食鹽水を用いることにした。

2. PHの影響

ウイールス材料にN/10鹽酸或は10%炭酸ソーダ溶液を加えて、PH3, 4, 5, 6, 7, 8, 9とし、1時間放置後中和して凝集反應を行い牛痘ウイールス材料による赤血球凝集反應に及ぼすPHの影

第 2 表

血 球 液	ウイールス稀釋メジウム	免疫血清稀釋倍数 2^n			
		n=7	8	9	10
食鹽水(不良)	食鹽水(不良)	-	-	+	+
〃(良)	〃(良)	-	-	-	+
0.1%正常家兎 血清食鹽水	食鹽水(不良) 0.1%正常家兎血清食鹽水 0.1%鶏血漿食鹽水	-	-	-	+
0.1%鶏血漿 食鹽水	食鹽水(不良) 0.1%正常家兎血清食鹽水 0.1%鶏血漿食鹽水	-	-	-	+
鶏血液 食鹽水 (150倍)	食鹽水(不良) 0.1%正常家兎血清食鹽水 0.1%鶏血漿食鹽水	-	-	-	+

響を調べた。即ち第3表に示すようにその凝集價は対照が160倍であるのに對し、PH3, 4では10倍より小さく、PH5では40倍 PH6, 8及び9では80倍、PH7に於て最も高く160倍であつた。從つて凝集因子は酸性側で不安定で、アルカリ側で稍々安定であると云える。

第 3 表 PH の 影 韻

PH	ウイールス稀釋倍数 5×2^n						凝集價
	n=1	2	3	4	5	6	
3	-	-	-	-	-	-	>10
4	-	-	-	-	-	-	>10
5	+	+	+	-	+	-	40
6	+	+	+	+	+	-	80
7	+	+	+	+	+	-	160
8	+	+	+	+	+	-	80
9	+	+	+	+	+	-	80
無處置(6.8)	+	+	+	+	+	-	160

3. 濾過の影響

ウイールス材料を Seitz E.K. 濾過板で濾過し濾液について凝集反応を行つた。ウイールスはこの濾過板を通過しない。

この場合濾過板は直徑3 cm のものを用い豫め正常牛血清の3倍稀釋液又はブイヨンを5 cc 宛濾過して前處置した後に使用した。

その成績は第4表の通りであるが未濾過対照の凝集價が、睾丸苗80倍、漿尿膜320倍であるのに對し、濾液の凝集價は睾丸苗では10倍、漿尿膜苗では20倍に低下していた。而も濾過するウイール

ス材料の量が少なければ濾液は凝集力がない。即ちこれは凝集因子が濾過板に吸着するためと考えられ、濾過には一定量以上のウイルス材料を用いなければならないことを示すものである。

この実験から濾過により凝集價は著しく低下したが、これは濾過板の吸着によるものであつて、凝集因子は Seitz E.K. を通過するものとみられる。

第4表 濾過の影響

材 料	濾過板の前處置	濾過量	凝集價
睾丸苗	ブイヨン	10cc	—
	正常牛血清(3×)	始めの10cc 後の 5cc	— 10
	未濾過		80
漿尿膜苗	ブイヨン	15cc	20
	未濾過		320

この所見から既に Burnet や Nagler が報告しているように、Seitz 濾液の赤血球凝集因子はウイルス以外の可溶性特異的物質 Soluble specific substance に基くものと考える。

4. 加熱の影響

次に凝集因子の熱に対する抵抗性を知ろうとし、ウイルス材料を種々の温度及び時間加熱し、遠心沈澱を行つてその上清について凝集價を調べた。

その結果第5表に示す如く凝集價320倍の睾丸苗は50°C 1時間の加熱で20倍でも凝集しなくなる。併し漿尿膜苗は50°C 1時間加熱後の凝集價は、無處置対照と同じく40倍であつた。そして60°C 1時間加熱によつて凝集價は10倍に低下し、100°C 15分間加熱でも60°C 1時間と同じ値を保つてゐた。従つて睾丸苗によれば凝集因子は易熱性であり、漿尿膜苗では稍々耐熱性であるよう見えるが、これはウイルス材料中の熱凝固性蛋白によるものと思われる。即ち睾丸苗は50°C以上の温度で加熱すると著しい凝固沈澱を生ずるが、漿尿膜苗ではこのような加熱凝固蛋白はあまり多くない。従つて睾丸苗の場合加熱後遠心沈澱を行つた上清は稀薄になつてゐるので凝集力がないものと思われる。

第5表 加熱の影響（睾丸苗）

温 度・時 間	稀 釋 5×2^n						
	n=2	3	4	5	6	7	8
TL. 50°C 1hr.	—	—	—	—	—	—	—
60°C 1hr.	—	—	—	—	—	—	—
70°C 30min.	—	—	—	—	—	—	—
80°C 15min.	—	—	—	—	—	—	—
100°C 15min.	—	—	—	—	—	—	—
無 處 置	+	+	+	+	+	—	—

5. 痘苗の血球凝集力と補體結合性抗原力、發痘力の関係

ウイルス材料に於ける血球凝集價、補體結合性抗原價、發痘力を比較検討することにより、各反応の銳敏度を知ることが出来る。且つ又血球凝集價と補體結合性抗原價或は發痘力との間に一定の關係が成立するとすれば、痘毒の研究の上に赤血球凝集反応を廣く用いることが出来て種々の便宜をもたらすものと考えられる。

そこで多數の漿尿膜苗について、發痘試験、補體結合反応、血球凝集反応を行い、各々の力値に

第 5 表 繼加熱の影響(漿尿膜苗)

温度・時間	稀 釋 5×2^n				
	1	2	3	4	5
CV. 50°C 1hr.	+	+	+	-	-
60°C 1hr.	+	-	-	-	-
70°C 30min.	+	-	-	-	-
80°C 15min.	+	-	-	-	-
100°C 15min.	+	-	-	-	-
無 處 置	+	+	+	±	-

について比較検討した。

その結果は第6表に示す通りであつて、それぞれの値の常用対数を求めてこれを指數とし、血球凝集力を1としてその比を求めた。

これによると発痘力が最も高く、血球凝集価は最も低かつた。従つて或る材料からウイルス或はこれに關聯ある物質を證明しようとする場合には、発痘試験が最も銳敏で血球凝集反応は最も鈍感である。而して発痘力、補體結合性抗原力、血球凝集力の間に一定の關係を求めるることは出来なかつた。

第 6 表 漿尿膜菌の発痘力、補體結合性抗原力血球凝集力

漿尿膜苗	発 痘 力		補 結 合 性 抗 原 力		凝 集 力		発 痘 力 : 補 結 合 性 抗 原 力 : 凝 集 力			
	指 數	2^n	指 數	2^n	指 數	2^n	指 數	:	:	
11C	a	10^4	4	$n=7$	2.1	$n=5$	1.5	2.7 :	1.4 :	1
	b	$<10^4$	<4	8	2.4	7	2.1	<1.9 :	1.1 :	1
	c	$<10^4$	<4	9	2.7	5	1.5	<2.7 :	1.8 :	1
11D	a	10^5	5	8	2.4	7	2.1	2.4 :	1.1 :	1
	b	10^4	4	<7	<2.1	5	1.5	2.7 :	<1.4 :	1
	c	10^5	5	9	2.7	6	1.8	2.7 :	1.5 :	1
	d	$<10^4$	<4	10	3	7	2.1	<1.9 :	1.4 :	1
11E	a	$<10^4$	<4	7	2.1	7	2.1	<1.9 :	1.0 :	1
	c	5×10^5	5.7	8	2.4	7	2.1	2.7 :	1.1 :	1
	d	5×10^5	5.7	9	2.7	7	2.1	2.7 :	1.1 :	1
	e	10^4	4	7	2.1	8	2.4	1.7 :	0.9 :	1
	f	5×10^5	5.7	9	2.7	8	2.4	2.4 :	1.1 :	1
11F	a	10^4	4	7	2.1	8	2.4	1.7 :	0.9 :	1
	b	10^5	5	9	2.7	8	2.4	2.1 :	1.1 :	1
	c	10^5	5	8	2.4	8	2.4	2.1 :	1.0 :	1
	d	10^5	5	9	2.7	8	2.4	2.1 :	1.1 :	1
	e	10^5	5	8	2.4	8	2.4	2.1 :	1.0 :	1
	f	5×10^5	5.7	9	2.7	8	2.4	2.4 :	1.1 :	1

結 論

- 牛痘ウイルスの赤血球凝集反応は、0.1%鶏血漿食鹽水をメジウムとして用いると非特異的凝集を避けることが出来る。
- 凝集因子はアルカリ側で安定であり、易熱性因子と耐熱性因子があるように思われる。又ウイ

ールス材料をウイールスを通過させない Seitz E.K. 濾過板で濾過すると凝集價は著しく低下するが凝集因子は濾過性である。故に濾液の血球凝集因子はウイールス以外の特異的可溶性物質に基くことを知る。

3. 牛痘ウイールス材料からウイールス或はこれに關聯ある物質を證明する場合には、發痘試験が最も銳敏で補體結合反應がこれに次ぎ、血球凝集反應が最も鈍感である。

なお本研究の一部は厚生科學研究費による。