

6. 實驗的狂犬病の血清による發病阻止 に関する研究

北海道立衛生研究所 (所 長 中 村 豊)
佐 伯 潔

ウイルス病に對する血清療法は治療的には餘り著明でなく、豫防的にはかなり効果があることは一般に承認されている。しかしウイルス病の大衆豫防に免疫血清を用いることは感染機會の認知が困難なことなどにより適用されないことが多い。

狂犬病の場合は他のウイルス病の場合と異つて感染の機會がはつきり認知されるから發病前に血清を豫防的に與えることができるはずである。それならば狂犬病において血清を豫防的に與えた場合發病を阻止し得るかどうか、これに關して後記のように先人の業績について考察するに未だ諸學者の意見の一致がない。ただ比較的新しい文献の示すところでは狂犬病抗血清の局所注射に引續いてワクチン接種が有効であるようである。それにしても正常家兎にウイルスを注射して4日後に血清を注射しても感染を阻止するというような顯著な効果を説く報告もあつて、この成績が正しいとすれば、實際的に狂犬に噛まれた人について、その發病阻止に利用され得る可能性も起つてくる。

著者もこの問題について實驗的に研究を行い、マウスを使用して狂犬病免疫血清のウイルス感染阻止如何を知らんとした。以下これについて報告する。

狂犬病免疫血清の感染防禦作用についての文献的考察

Bates & Lepp (1)により狂犬病毒に對する中和抗體の産生が初めて記載された。これに次いで Kraus & Kreissl (2)は防禦物質を狂犬病豫防接種者の血清中に證明した。更に Marie (3)はこの中和抗體の問題を精細に研究し抗血清の調製とその人體への發病阻止についての應用を報告した。Kraus & Holobut (4)は狂犬病抗血清の中和作用は角膜眼球間には認められるが、ウイルスの神経内あるいは皮下接種による感染試験では効果を示さないという。即ち彼等は動物に豫め血清を皮下あるいは靜脈内に注射しておいてからウイルスを坐骨神経内、硬腦膜下皮下に注射すると、抗血清の中和作用は認められず、同様の事は血清とウイルスを同時に注射した場合でもそうである。ただ血清の効果が認められるのはこれを眼球内に注射した場合であつて、これは血清と同時にあるいはその注射後でもウイルスの角膜接種感染試験に堪えるという。これに對して又 Fermi (5)は血清の効果が極めて良好な成績を發表している。即ち石炭酸ワクチンで免疫した馬血清を1日2回注射することによつて狂犬病ウイルス注射後84時間後であれば100%感染を防禦し、ウイルス注射96時間後でも61%は生存したと報告している。又同じく抗血清の好成績を示す研究として Pfeiler (6)は羊の眼球内に病毒接種後5日に脊椎内に血清を注射し、感染を防禦したと報告している。又近藤(7)も家兎靜脈内に固定毒を連日注射して作つた血清を使用し、海猿の腹腔内、靜脈内、腦内に血清注射後、ウイルス100倍致死量を筋肉内に接種し豫防的に感染を防禦したといつている。

Speransky (8)は極めて強力なる免疫血清でもウイルス接種後に注射したのでは効力がないことを認めているが、それは血液中に入つた中和抗體は中樞神経組織にあるウイルスと充分に接觸する事が不可能なためであつて、これを防ぐにはできるだけ大量の骨髓液を除去してから免疫血清の注射を行う必要があると

いつている。その後 Ponomareff et Tchekhoff (9) は Speransky の實驗を追試承認した。又彼等 (10) は流動パラフィンで振盪處置したウィールスで免疫した馬血清を家兔靜脈内に注射して豫防効果のある事を認めている。その他狂犬病抗血清の發症阻止作用を肯定する報告として Löffler & Schweinberg (11) は Speransky の方法を使用し、腦内にウィールス接種後 1 時間に血清を注射し感染を防禦し得たといひ、Hoyt 等 (12, 13, 14) は抗血清の豫防効果は腦内にウィールス接種後 4 日のような遅れた時期に血清を注射しても感染を防禦したと發表している。又矢追等 (5) も血清注射により死期の延長を見ているといふ。最近 Habel (16) の詳細な研究のうちウィールス注射後 3 日に接種部位の筋肉内に抗血清を注射しても効果がある事を報じ、松井 (17) は家兔坐骨神經内に街上毒を接種後免疫血清を筋肉内に連續 3 日間合計 10cc を注射しその死期を延長あるいは生存することを報告している。又 Koprowski 等 (18) はウィールス接種後 24 時間後抗血清 1 回注射でハムスター、海狸共感染を防禦し、ワクチンとの併用療法を報告している。その他参考とすべき研究として、同じく向神經性ウィールスである日本腦炎について川喜田 (19) は實驗的に血清の處置方法即ち腦内に注射することにより發症を阻止し得ることを報告している。

以上によつて知られるように狂犬病に對する免疫血清の豫防乃至治療効果については無條件にこれを信することはできない。効果ありとする學者のうちでもその度合に格段の差があるようであるし、さらに全く無効であると結論する業績もある。

その故でもあろうか、Lepin (20) は次のようにいつている。即ちこの免疫血清がいまだに人體應用が顧みられないのは、その製造上の困難に加えて、統計上少しも優秀性が現われなかつたこと (Remlinger et Bailly による) に基づくといい、結局狂犬病抗血清の中和能は多くの研究にもかかわらず今日學理的興味しかなくなつたといつている。

實驗方法

次の方法で狂犬病ウィールス抗血清を得て、マウス腦内に、確實に致死せしめるウィールスの一定量を接種し 1 乃至 4 回 0.025cc 宛抗血清を注射し、抗血清の中和抗體によるウィールス感染發症阻止能をば、マウスの生死 (1 カ月觀察) によつて判定した。

免疫血清の製法

次の 3 種の免疫原を以て家兔を免疫して抗血清を得た。家兔は體重 2 kg 以上の白色のものを選んだ。

1. 石炭酸ワクチン：1%石炭酸加10%感染マウス腦乳劑を室温に一夜放置した後、氷室に保存したものの。
2. 生ウィールス：感染マウス腦10%乳劑を氷室に保存したものの。
3. 乾燥ウィールス：感染マウス腦を健康馬血清にて10%乳劑を作りこれを 1cc ずつ凍結乾燥し氷室に保存したものの。

免疫方法及び免疫血清の中和抗體の強さ

a) 石炭酸ワクチン 5 回免疫後生ウィールス 3 回免疫したもの

石炭酸ワクチン 20cc づつ 1 週間の間隔で 5 回皮下免疫したが中和抗體の上昇が見られなかつたので、更に生ウィールス 5cc 宛同じ間隔で 3 回皮下免疫した處、血清 100 倍稀釋が 10 致死量のウィールスを中和するものを 2 頭得た、1 頭は中和抗體の上昇を認めなかつた (表 I)

b) 石炭酸ワクチン (20cc) 皮下 1 回免疫後生ウィールス及び乾燥ウィールス (共に靜脈内 1cc づつ) を以て免疫せるもの——これは注射間隔を違えた 3 群とす (各 2 頭宛)

- i. 第 1 群の 10 日間隔で免疫したものは 2 頭共 100 倍稀釋が 10 致死量を中和した。
- ii. 第 2 群の 10 日連日注射した群は最終注射後 20 日で 1000 倍稀釋が 10 致死量を中和した。
- iii. 第 3 群の 1 カ月間隔で免疫した群は 3 回免疫後 20 日目で 100 倍稀釋、4 回免疫後 20 日で 1000 倍稀釋が 10 致死量を中和した。(表 II)

C) 石炭酸ワクチンを以て基礎免疫することなしに、いきなり生ウイルスあるいは乾燥ウイルスで免疫（静脈内1cc宛注射）を行つた。その免疫回数及び間隔はbと同じである。

- i 第1群のものは1000倍稀釋が10致死量を中和した。
 - ii 第2群のものは100倍稀釋が10致死量を中和した。
 - iii 第3群のものは1000倍稀釋が10致死量を中和した。
- 即ちbの實驗と力價が一致するものを得たわけである（表Ⅲ）

狂犬病免疫血清の強力なるものを得る法についての著者の經驗

免疫血清製法の項で述べた結果から次のことがいえると思う。即ち石炭酸ワクチンは皮下注射で家兎を免疫することができるがこれだけでは強い力價の免疫血清を得るには恐らく長期間を要し且つ相當困難である。結局石炭酸ワクチンは基礎免疫として有用であり、その後引き続き生ウイルスで免疫することによつてより高い力價の血清が得られることが判る。又皮下に注射するよりも静脈内に注射した方が早期に強い血清が得られることを知つた。さらに石炭酸ワクチンを使用しないで生ウイルスを静脈内に注射する事により同様に強い血清が得られた。

表Ⅰ 石炭酸ワクチンによる免疫

	1 回	2 回	3 回	4 回	5 回	6 回	7 回	8 回
家 兎 92	0	0	0	10x	10x	10x	10x	10x
93	0	0	0	10x	10x	10x	10x	100x
115	0	0	0	10x	10x	10x	10x	100x

數は10致死量を中和する血清の稀釋倍數

表Ⅱ 石炭酸ワクチン基礎免疫後生病毒素は乾燥病毒静脈内注射免疫

	1 回	2 回	3 回	4 回	5 回	6 回
10 日間隔	0	100x	100x	100x	100x	100x
10 日連日	—	—	10x	1000x	—	100~ 1000
1 ヵ月間隔	—	10x	100x	1000x	100x	100x

表Ⅲ 基礎免疫を行わずに生病毒或は乾燥病毒静脈内注射免疫

	1 回	2 回	3 回	4 回	5 回
10 日間隔	0	10x	100x	100x	100x
10 日連日	0	10x	100x	10~ 100	10~ 100
1 ヵ月間隔	0	0	0	100x	1000x

これ等の方法で作られた血清のウイルス中和能は0.000125 cc がマウス脳内確實感染量を中和する程度である。

攻撃に使用せる狂犬病ウイルス

固定毒（傳研株）をマウス脳繼代したものでこれを凍結乾燥したものをを使用した。その攻撃量はマウスの過半数又は全部を感染發症致死せしめる量を以てした。

實 験 I

ウイルス接種後、當日、1日後、2日後、3日後、4日後に1回ずつの群及び當日から4日まで毎日1回あて4回、抗血清を注射した群の成績を表Ⅳで示した。これを要約すると抗血清を當日1回注射したものは6頭中3頭、當日から4回注射したものは10頭中5頭生存し、無處置對照は6頭中1頭だけ生存した。

表 Ⅳ

注射後 病 毒	〇一 日回	一一 日回	二一 日回	三一 日回	四一 日回	〇り 日四 よ回	無對 處 置照
マウス 生死	〇〇 〇〇 ●●	●● ●● ●●	●● ●● ●	〇● ●● ●● ●●	〇〇 〇〇 ●	〇〇 〇〇 〇● 〇● ●●	●● ●●
生存數 使用數	3 6	0 6	0 5	1 8	3 7	5 10	1 6

註 〇=生存マウス
●=發症斃死マウス

1日後に抗血清を注射したものが効き方が悪いことである。なお追究を要すると思われる。

表 Ⅴ

注射後 病 毒	前一 日回	〇一 日回	一一 日回	二一 日回	三一 日回	三三 日 後回	四二 日 後回	〇四 日 後回	無對 處 置照
マウス 生死	〇〇 ●● ●● ●●	〇〇 〇〇 〇〇 〇〇	〇〇 ●● ●● ●●	〇〇 〇〇 〇〇 〇〇	〇● ●● ●● ●●	〇● ●● ●● ●●	〇〇 〇〇 〇〇 〇〇	〇〇 〇〇 〇〇 〇〇	〇〇 ●● ●● ●●
生存數 使用數	3 15	8 18	2 17	9 19	1 8	1 9	4 14	12 20	2 16

實 験 II

ウイルスを強くし、抗血清をウイルス接種後短時間内に行つた實驗である。その成績は表Ⅵで明かなように、無處置對照は全部感染斃死したのに比して早い時間に血清を注射したものは相當の効力が認められる。

實 験 IV

今回は多數のマウスを使用して實驗を行つた。抗血清注射も1回注射、4回注射のものと試みた結果は表Ⅶに示すようにある程度の効力を示した。

實 験 V

以上の實驗 I 乃至 IV においては對照實驗に特別の考慮を拂わず單に發症阻止試驗の結果を知るウイルス量を別のマウスに接種するに止まつた。しかしウイルスの一般性狀殊にそれが傷つけられたところでよく増殖することを考えると、かかる對照試驗は辛過ぎると思われる。即ち他のウイルスと同じく狂犬病毒を腦内、又は腦以外の場所に注射し、そのままでは感染

實 験 II

前實驗を繰返したものである。その結果は表Ⅴに示される。即ち抗血清を當日1回、2日後1回、當日から4日間毎日1回注射したものは、無處置對照に比較すると相當程度の効果を示すような成績である。この實驗において注意すべきは抗血清を當日及び2日後に注射したものが効いて、前日及び1

表 Ⅵ

注射後 病 毒	前一 日回	一後 時一 日間回	五後 時一 日間回	一後 日一 日間回	無對 處 置照
マウス 生死	〇〇 ●● ●● ●●	〇〇 〇〇 〇〇 〇〇	〇〇 〇〇 〇〇 〇〇	●● ●● ●● ●●	●● ●● ●● ●●
生存數 使用數	4 10	6 14	6 14	0 12	0 16

に免疫血清は感染を阻止している。

總括及び結論

狂犬病ウイルス免疫血清の感染發症阻止作用について、未だ賛否兩論があるので、この實驗的追及は狂犬病の發症阻止についての利用と關係が深いことを考えて、その結果如何を知らんとした。

1. できるだけ強い免疫血清を得んとして、石炭酸ワクチンの注射による免疫操作は基礎免疫には適するが、より以上の強力な血清は生きたウイルスによる免疫によらなければならないことを知つた。ただ著者の場合は強力な血清の獲得が主目的ではなかつたから、この免疫に全力を傾注したわけではない。

2. 狂犬病抗血清の發症阻止作用を検するため實驗Ⅰ乃至Ⅴを行つた。

その方法は大體同じであつて確實にマウスを致死せしめるウイルスの一定量を脳内に接種しておいて、種々なる間隔で1乃至數回抗血清を脳内に注射し、その生死を觀察（對照試験と比較）して判定した。又血清を先きに注射しておいてから攻撃試験としてウイルスを接種した實驗も行つている。

これ等の實驗の結果を總合していえば狂犬病免疫血清は相當にウイルス感染に對し發症阻止作用の効果があることが認められた。しかし一層顯著な効力を發揮させるためにはなお一層強力な抗血清を作つて使用すべきであることが感ぜられた。

3. 著者は全實驗を通じて免疫血清の脳内注射を行つているが、これは他の注射方法をもつて抗血清の効力を検するよりは優れており、従つて著者の成績は血清の皮下或いは靜脈内注射を行つての先人の成績よりも信するに足るものであると思う。

すべて向神經性ウイルスの抗血清の効力を檢せんとするならば、それを確實に中樞神經に到達させなければならないことは敢て言を俟つまでもない。これについて川喜田は日本腦炎血清について脳内注射を行つてその効果を檢している。著者も曩に破傷風抗毒素血清の發症阻止作用について行つた實驗を報告(2)したが、この場合にも血清の脳内注射は他の注射ルートよりも優れた成績を示した。破傷風患者の血清療法も血清の腰椎内注射が賞用されているが、これ等のことを考え合せるとかかる注射方法によつて中樞神經に結合したウイルスも血清によつて中和されるのではないかとも考えられる。

以上を總合すると狂犬病血清の實際的應用は強力なる血清を要するものと信ぜられるが有望なるものと思う。

稿を終るに臨み御指導下された傳染病研究所長野泰一教授に深く感謝致します。

尙本研究は昭和18年第17回連合微生物學會に於て發表した。

文 献

- (1) Babes et Lepp ; A. I. P. 3, 384, 1889
- (2) Kraus & Kreissl ; Zbl. Bakt. Orig. 32, 1902
- (3) Marie ; A. I. P. 19, 1, 1, 1905. A. I. P. 22, 271, 1908.
- (4) Kraus & Holobut ; Zschr. Imm. forsch. 3, 130, 1909.
- (5) Fermi ; Zlb. Bakt. Orig. 52, 576, 1906.
- (6) Pfeiler ; Berl. Tierärztl. Wochsch. 29, 269, 1913.
- (7) 近藤 ; 日本獸醫學雜誌 1, 279, 1922.
- (8) Speransky ; A. I. P. 41, 166, 1927.
- (9) Ponomareff et Tchechkoff ; C. R. S. B. 97, 376, 1927
- (10) Ponomareff et Solovieff ; A. I. P. 42, 1661, 1928
- (11) Löffler & Schweinberg ; Wien. Klin. Wschr. 26, 813, 1932.
- (12) Hoyt, Fisk & Moore ; Proc. Soc. Exp. Biol. Med 32, 1560, 1935.
- (13) Hoyt, Fisk, Moore & Tracy ; J. inf. Dis. 59, 152, 1936.
- (14) Hoyt, & Gurley ; Proc. Soc. Exp. Biol & Med. 38, 40, 1938.
- (15) 矢追, 金澤 ; 實驗醫學雜誌 22, 142, 1938.
- (16) Habel ; Pub. Heal. Rep. 60, 545, 1945.
- (17) 松井 ; 新潟醫學雜誌 64, 522, 1950.
- (18) Koprowski Scheer & Black; Am. J. of Med. 8, 412, 1950.
- (19) 川喜田 ; 實驗醫學雜誌 26, 389, 1942.
- (20) Lepin ; Levaditi et al Les ultravirus des maladies humains p 457, 1958.
- (21) Remlinger et Bailly ; Bull. Ac. vet. de France. p 239, 1931.
- (22) 佐伯 ; 實驗醫學雜誌 27, 697, 1943.