

## 6 成牛、仔牛、成馬の正常血清のインフルエンザウイルスに対する非特異的赤血球凝集抑制因子について (第1報)

北海道立衛生研究所 野 呂 新 一

### 緒 言

種々の動物には、人も含めて血清中にインフルエンザウイルスに対する非特異的赤血球凝集抑制因子があると言われている<sup>1) 2) 3) 4) 5) 6) 10) 12) 13)</sup>。

当実験室では猿腎細胞初代培養の単層細胞を用いて昭和40年春のインフルエンザ流行の際に、患者より採取した咽頭ぬぐい液または咽頭うがい液を接種してインフルエンザウイルスの分離を試みたことがあった。その際、初代接種では、細胞にはつきりした変性が見られ、またその培養液上清の赤血球凝集テストが陽性に出たにもかかわらず次代接種にはその変性 (CPE=Cytopathic Effect) も赤血球凝集 (以下 HA=Hemagglutination) も見られなくなつたことが多かつた。

そこでこれは細胞培養に使用している牛馬血清中に非特異的赤血球凝集抑制因子があつて、HA を抑制しており、もしくは中和能力さえもつており<sup>12) 13)</sup>、この抑制因子 (以下 Inhibitor) のために、CPE も抑えられているのではないかと考え、まず前段階として未処理の牛、馬血清を屠場より得て種々の処理法により、その Inhibitor を除去し、あわせて特異抗体をも調べようと試みた。何故なら当実験室使用の牛馬血清は使用に際して、すでに加熱処理 (56°C 30分) を行つてあるものばかりであるからである。

### 実験材料及び方法

#### 1 血清

成馬血清 1件。12月22日 (1965) に屠場において正常馬より得た血液より血清を分離したものである。以下の成牛、仔牛は共に同月同日採取したものであり、この馬は胆振産の9歳馬である。

成牛血清 2件。2件共上川産で2歳である。

仔牛血清 2件。2件共石狩産で、生後1ヶ月と3ヶ月のものである。

#### 2 ウイルス

使用したインフルエンザウイルスは次の3株である。

B/Lee/40, A2/足立/2/57, B/昭島/2/64。

3株共、加熱ウイルスと生ウイルスを使用した。

それぞれの HA titre は次のようである。

Lee(2,048×), Lee(加熱)(1,024×), Adachi(512×), Adachi(加熱)(256×), Akishima(2,048×), Akishima(加熱)(2,048×)。

#### 3 血球浮遊液

トリ血球を0.5%にリン酸緩衝食塩水(phosphate buffered saline 以下 PBS) に浮遊させたもの。

#### 4 稀釈液

pH 7.0 の上記 PBS を使用した。

#### 5 血清の処理法

##### a 加熱処理

56°C で30分間の加熱を行う。

##### b 血球による吸収

トリ血球 (2,500rpm 10分 で遠沈した血球を使用する) を血清 1ml あたり 0.1ml 分注し、氷浴中で15分間時々振りながら<sup>9)</sup> 非特異的赤血球凝集素を吸収させた後に 3,000rpm 7分 で血球を除く。この処理は他の処理血清についても行う。

##### c RDE 処理法

力価 128× の当実験室にて作製した RDE (Receptor Destroying Enzyme) を血清と等量加えて、1夜 (16~18時間)、37°Cにおき、翌日56°C 30分でその作用を止める。

##### d KIO<sub>4</sub> による処理

M/90 の KIO<sub>4</sub> を等量加え、37°C に1時間又は4°C に1夜の後 10% グルコースを等量加えてその作用を止める。後にトリ血球によつてその非特異的な赤血球凝集素を除く。

##### e Trypsin 処理

約50%のMgSO<sub>4</sub>の入つた結晶トリプシン(Worthington) を 3.2g/l で PBS に溶解し、等量血清に加えて 37°C 1時間作用させ、後に 56°C 30分でその作用を止める。更にトリ血球で非特異的な赤血球凝集素を吸収する。その方法は b) に記した通りである。

### 6 実験方法

#### a 血清稀釈法

6列各8本計48本の試験管を血清1件について使用し、16×~2,048× まで2段階稀釈を行う。非処理の血清と加熱処理のみの血清の場合は、第1列第1管に 2.25ml の Saline を入れ、第1列第2~8管までは 1.5ml の Saline を分注する。血清 0.75ml を第1列第1管に入れピペットでよく混合し、その0.25ml 宛を各列の第1管に分注し 1.5ml を第1列第2管に入れてよく混合しその0.25ml 宛を各列の第2管に分注する。1.5ml を第1列第3管に入れて混合し以下同様にして血清稀釈を行う。RDE と Trypsin 処理血清の場合は第1列第1管には 1.5ml、第2~8管も同

様に 1.5ml 宛 Saline を分注する。第 1 列第 1 管に 1.5ml の処理血清を入れて混合し上記同様の稀釈を行う。KIO<sub>4</sub> 処理血清の場合は第 1 列第 2～8 管迄 Saline を 1.5ml 宛分注し第 1 管には入れない。処理血清を第 1 管全てに 0.25 ml 宛分注し第 1 列第 1 管には 1.5ml 入れて以下上記と同様に稀釈する。このようにすべて血清稀釈では 4×から始まり、抗原、血球浮遊液分注後では 16×となる。

#### b 抗原作製

使用抗原は前にも述べたように、Lee 株、足立株、昭島株の 3 株であり、それぞれ加熱処理したものも作製した。この抗原（4 単位）を 0.25ml 宛各列に分注する。第 1 列～第 6 列の抗原分注順位は上記のウイルスの生ウイルス、加熱ウイルスの順である。

#### c 血清コントロール

血清 1 件につき Saline 0.25ml と処理血清 0.25ml を入れて血清コントロールとする。

#### d ウイルスコントロール

4 単位抗原を Saline で 4×, 8×, 16×, 32×, 64×, 128×（血球浮遊液を入れた場合の増数）になるように稀釈を行いウイルスコントロールとした。

#### e 食塩水コントロール

2 本の試験管に食塩水（PBS）を各 0.5ml 宛分注し食塩水コントロールとする。

#### f トリ血球

0.5% のトリ血球浮遊液を作り、その 0.5ml 宛を全管（血清コントロール、ウイルスコントロール、食塩水コントロールを含む）に分注した。

#### g 判定

血球浮遊液分注後 4℃ にて 1 時間後に行つた。判定規準は衛生検査指針<sup>1)</sup>のインフルエンザの項による。

### 7 非特異的血球凝集抑制因子について

次の 3 つが知られている。

#### a-inhibitor

a-inhibitor は Francis の inhibitor とも言われ、RDE, Trypsin, KIO<sub>4</sub> により破壊されると言われる。成牛血清にもあり、卵白は a-inhibitor である。70℃ に耐えるので、血清の非働化（56℃ 30 分）のみでは破壊されない。その化学的性質は糖蛋白質でありウイルス血球凝集反応を起す血球の receptor である neuraminic acid に近いものである。Indicator vivus の阻止作用が強い。他には兎、フェレット、人に多い。

#### β-inhibitor

β-inhibitor はまた Chu-inhibitor と言われ、主として、A-type のウイルスの血球凝集を阻止するものである。易熱性であり 56℃ 30 分で破壊される。Trypsin でも破壊されるが、RDE, KIO<sub>4</sub> のみでは作用を受けない。成牛に多く、マウスにも多量ある。

#### γ-inhibitor

γ-inhibitor はまた下条, Cohen の inhibitor とも言われ、Cohen はアジア風邪の研究中に normal な馬の血清中に発見したものである。56℃ 30 分に耐え RDE, Trypsin では破壊されず KIO<sub>4</sub> によつて破壊されると言われる。馬の他ウサギ、モルモットに多いことが知られている。

## 実験結果

### 1 全く処理を行わない血清による HI test (Hemagglutination Inhibition test)

ただし、どの血清（処理、非処理を問わない）の場合もトリ血球による非特異的凝集素の吸収は行つてある。

第 1 表を見ると処理をしていない血清による HI test では全般的に A 型よりも B 型に対する inhibitor があるように思われ、生ウイルスよりも加熱ウイルスの方がより抑制されていることは Horse, Calf, Bovine のすべてに a-inhibitor が想定されるものである。B/Akishima/2/64 の加熱ウイルスが一番強く（256×～1,024×）抑制されている。未処理の血清の生ウイルスに対する inhibitor は Calf が一番少いように思われる。

### 2 加熱処理のみの血清による HI test

加熱処理の欄の下の 2 段は加熱処理によつて破壊される β-inhibitor を多量に持つ Mouse 血清について対照の意味でテストした。非処理とは加熱していないものである。表に見られるように、処理のものは加熱 Akishima を除いて全部 <16 となつており、加熱が β-inhibitor の破壊に対して有効であることを示している。Horse, Calf について見ると Adachi 株を除いて抑制力価は ≤16 となつているが、加熱ウイルスに対してはすべてがその力価に上昇が見られ、Akishima 株の加熱ウイルスに対しては ≤2,048× である。したがつて Horse, Calf には β-inhibitor のあることが考えられる。

### 3 RDE 処理血清による HI test

Egg White は a-inhibitor と同質のものであるが、表を見ても明らかのように加熱により inhibitor titre はすべて <16 となつている。Horse, Calf, Bovine の血清は Akishima 株に対してはある程度の力価があるが他ではすべて <16 である。Horse, Calf は共に a-inhibitor をもつてることが示されている。またこの Horse 血清は RDE によりほとんど inhibitor が破壊されており、γ-inhibitor はないようである。それ故馬血清はすべてが γ-inhibitor をもつていてはならないらしい。なお Calf 血清には加熱、RDE によつても破壊されない inhibitor がある。これは後の test で Trypsin では破壊されないが KIO<sub>4</sub> では破壊されているので γ-inhibitor と考えられる。

### 4 KIO<sub>4</sub> 処理血清による HI test

表によると γ-inhibitor を多量に含むモルモット血清を処理したものはその titre が 1/4 以下になつており完全ではないがかなり γ-inhibitor を破壊していることがわかる。

第1表 処理別による Inhibitor titre

		B-Lee	B-Lee (加熱)	A2-Adachi	A2-Adachi (加熱)	B-Akushima	B-Akushima (加熱)
1 非処理	H※	64	64	32	64	32	256
	C※-a※	32	64	16	64	64	256
	C-b※	32	64	16	64	64	256
	B※-a	32	64	32	32	64	512
	B-b	32	32	32	32	128	1,024
2 加熱処理	H	16	256	16	64	32	≧2,048
	C-a	16	128	<16	256	64	≧2,048
	C-b	<16	128	<16	128	32	≧2,048
	B-a	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	B-b	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	非処理※ Mouse	64	128	64	128	256	1,024
	処理※ Mouse	<16	<16	<16	<16	<16	1,024
3 RDE 処理	H	<16	<16	<16	<16	<16	32
	C-a	<16	<16	<16	<16	64	128
	C-b	<16	<16	<16	<16	64	256
	B-a	<16	<16	<16	<16	<16	256
	B-b	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	非処理 Eggwhite	128	1,024	<16	256	<16	512
	処理 Eggwhite	<16	<16	<16	<16	<16	<16
4 KIO <sub>4</sub> 処理	H	<16	16	16	<16	<16	32
	C-a	<16	16	<16	32	<16	128
	C-b	<16	<16	<16	<16	<16	128
	B-a	<16	<16	<16	<16	128	128
	B-b	<32	<32	<32	<32	256	256
	非処理 G. P※	64	512	64	1,024	128	≧2,048
	処理 G. P	16	128	16	256	32	1,024
5 Trypsin 処理	H	16	16	<16	32	16	128
	C-a	16	256	<16	64	64	1,024
	C-b	<16	64	<16	64	16	512
	B-a	NT	NT	NT	NT	<16	<16
	B-b	NT	NT	NT	NT	<16	16

注 ※H=Horse, C=Calf, B=Bovine, a と b は2頭の区分, G. P=Guinea Pig  
 非処理=加熱, RDE, KIO<sub>4</sub>, Trypsin の処理のないもの  
 処理=加熱, RDE, KIO<sub>4</sub>, Trypsin の処理したもの

さきの Calf 血清は, Akishima 株に対しても <16 となっており,  $\gamma$ -inhibitor を持っていることがはつきりしている。Bovine は Akishima 株に対して加熱, 非加熱共に inhibitor を持っている。これらは RDE で破壊されるものであるから  $\alpha$ -inhibitor である。

5 Trypsin 処理血清による HI test

表によると Calf-a のように Akishima 株と Lee 株の加熱ウイルスに対しては非処理のものよりも inhibitor の

力価が上つているのに気づく。これは加熱処理のみによる血清が Indicator virus に対しての力価が非処理の血清に比較して上昇していた場合と同じで, Trypsin 処理後は 56°C 30 分で加熱してあるため  $\beta$ -inhibitor が破壊され, 残っていた  $\alpha$ -inhibitor の作用によるものであろう。注目してよいことは RDE, KIO<sub>4</sub> で破壊されなかつた B-a と b の Akishima 株に対する力価が共に <16 となつて破壊されていることである。

考 察

猿腎細胞を使用してインフルエンザウイルスを分離する際、初代において陽性であったものが継代によって陰性になる現象がしばしばみられたので、その機序を追及する第1段階として細胞の維持血清中の既知の Inhibitor について検討した。

第1表にみられるように各動物の血清中にすでに知られている  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -inhibitor が2~3種類含まれていることが明らかになった。

これらの Inhibitor がインフルエンザウイルスの猿腎細胞感染に如何なる影響を及ぼすかについては今後の実験で解明する予定である。

竹森らは猿腎細胞においてインフルエンザのプラークを作る際に寒天中の Inhibitor がウイルスの吸着を阻止したことを認めており、この Inhibitor を除去することに成功している<sup>14)</sup>。

今迄の実験により各種動物血清に含まれる Inhibitor の種類が明らかになったので HA Inhibitor の感染に及ぼす影響を検討したい。

要 約

Horse 血清には、 $\alpha$ ,  $\beta$ -inhibitor が認められたが多量あると言われる  $\gamma$ -inhibitor はこの Horse 血清には認められなかつた。Bovine 血清には  $\alpha$ ,  $\beta$ -inhibitor が認められた。Calf 血清には  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -inhibitor が認められた。B/Akushima/2/64に対しては生ウイルスに対する inhibitor はすべて $<16$ であつたのに対して加熱ウイルスに対しては $\geq 128$ のものが多く認められた。また血清の加熱処理により加熱ウイルスに対する inhibitor titre の上昇が見られた。

本実験に際して、色々と御指導いただいた桜田博士、佐藤七七郎研究員、奥原広治研究員、血液採取にお世話になつた畜産公社の工藤、持田の諸氏に深く感謝致します。

文 献

- 1) 黒沢亮助, 中村良一: 臨床獣医宝典, 改 著 版, 336~339 (1962).
- 2) 東昇, 石田名香雄: ウイルス, 737~744 (1964).
- 3) 福見秀雄, 牛馬大蔵, 三橋進, 山本正: 病原微生物学, 366, 417 (1961).
- 4) Kaplan, M. M & Payne, A. M. M: Bull. W. H. O. 20, 465 (1959).
- 5) A. Cohen, and G. Belyavin: Virology, 7, 59~74 (1959).
- 6) G. Belyavin, A. Cohen: Virology, 18, 144~145

(1962).

- 7) 国立予防衛生研究所学会: ウイルス実験学, 164~165 (1964).
- 8) 堀田進, 太田昭夫: 組織培養の基本と実際, 169~198 (1963).
- 9) 国立予研ウイルス第4室: 日本脳炎ウイルスのHAとHIの新方法 (1962).
- 10) 桜田教夫: 道立衛生研究所報, 12, 245~259 (1961).
- 11) 厚生省: 衛生検査指針, 7, 43~52 (1957).
- 12) 杉浦昭: ウイルス, 9, 2, 138~146 (1959).
- 13) 後藤仁: 札幌医学雑誌, 24, 3, 205~210 (1963).
- 14) K. K. Takemoto and P. Fablich, Prco. Soc. Exper. Biol & Med, 114, 3, 811~814 (1963).

6 On the Study of Nonspecific Hemagglutination Inhibitors against Influenza Viruses found in Normal Bovine, Calf and Horse Sera (Part I)

Shinichi Noro

(Hokkaido Institute of public health)

Nonspecific hemagglutination inhibitors in normal bovine, calf and horse sera against influenza viruses were investigated.

There were  $\alpha$  and  $\beta$  inhibitors in horse and bovine sera and  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  inhibitors in calf serum.

Increase of inhibitor titre against influenza indicator viruses was seen after heating all sera.