

Newcastle disease virus の免疫に関する研究

第3編 Newcastle disease virus の毒素の研究

岡山大学医学部細菌学教室 (主任: 村上教授)

中 川 文 雄

[昭和29年月7日10受稿]

緒 言

Virus の毒素に就ては psitacosis-lympho-granuloma venereum group¹⁾ (Rake²⁾ 1944) 及び influenza group (Henle1946³⁾ a. 1946⁴⁾ b) の virus で認められている。Henle に依ると influenza virus を感染せしめた孵化鶏卵の漿尿腔液 (C. A. F.) をマウスに非経口的に投与すると 24 ~ 72 時間以内に強直性、或いは間代性痙攣を起して死亡し、此の際マウスは肺に consolidation を生ぜず、influenza の感染と異なつた像を呈している。毒力は血球凝集価及び感染価が高い程強力であり、此の毒性物質は virus から分離出来ないと述べている。即ち此の毒性物質の virus 自体からの分離は超遠心法、Protamine-sulfate によるも総て不可能である。

是等の実験成績から見ると本病毒は virus 自体に存在するものと考えられる。若しそうであるとするならば本病毒は virus 自体の構成物質であるか、即ち virus の活性に必要な物質か、それとも体内に保存されている代謝産物か、と種々の疑問が生ずるのであるが、今日之に対して未だ解答が与えられていない。尚本毒素は免疫血清との間に中和が成立することから見て virus の免疫に関与するであろうと考えられる。著者は是迄 N. D. V. を用いて行つた実験中に感染 C. A. F. を筋肉内に注射した場合24時間以内によく死亡する事を体験し、本病毒も毒素を有するものではないかと推測した。

翻つて N. D. V. の toxin に就ては Upton (1953⁵⁾) により推測されているに過ぎず、其

の性状に就ては不明である。そこで著者は N. D. V. の毒素の研究を意図し、本病毒の毒素を有する事を明かにし、多少其の性状を追求したので、其の成績を報告する次第である。

第1章 実験材料及び実験方法

第1節 実験材料

- 1) 使用病毒株: 第1編で報告した実験に用いたものと同じ N. D. V. 宮寺株である。
- 2) 実験動物: 使用動物は生後3~7日雛、生後30日の幼弱マウス、及び孵化11日鶏卵である。

第2節 実験方法

孵化11日鶏卵の漿尿膜に N. D. V. を接種して、感染せしめ斃死直前及び直後の漿尿腔液 (C. A. F.) 及び10倍胎児乳剤に就て、幼弱マウス、及び幼弱雛を用いて血管内及び腹腔内接種を行つて、致死毒の有無を追及し、又漿尿膜接種法に依つて異なる病毒量を注射した場合及び接種24時間、48時間後の C. A. F. の致死毒の強さを測定した。更に感染 C. A. F. を用いカオリン吸着、解離法によつて virus と致死毒との分離を試みた。又抵抗性の相異から感染力と致死毒を分離する事が可能でなからうかと考え、感染 C. A. F. を 6°C の冷室に保存したもの、更に virus 不活性剤を作成せしめた後、その感染力及び致死毒を比較検討した。更に又免疫血清との中和及び vaccine で能動免疫する事により致死毒の生体内中和如何を実験した。

第2章 実験成績

第1節 感染 C. A. F. 及び胎児の致死毒に関する実験.

感染 C. A. F. 及び 10%胎児乳剤に就て 7 日雛及び幼弱マウスを用いて血管内及び腹腔内接種を行つて致死毒の有無を実験した. 感染 C. A. F. 及び胎児 10%乳剤を 2000 r. p. m. 10分遠沈した上清を各 0.3cc 宛雛の心臓内及

びマウスの尾静脈内接種を行つて観察した.

1) 感染 C. A. F. の致死毒.

先づ感染 C. A. F. を吟味する為雛を用いて感染価 (L. D₅₀) を測定し, 又血球凝集反応を行つた. 其の成績は Fig. 1 に示す如く L. D₅₀ は 10^{-13.2}, 血球凝集反応は 1280 倍陽性を示し, N. D. V. の感染増殖が充分起つてゐる事が考えられる.

致死毒の観察には感染 C. A. F. を稀釈した

Fig. 1. C. A. F. 感染実験

10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²	10 ⁻¹³	10 ⁻¹⁴	10 ⁻¹⁶	LD ₅₀
2334	2334	3344	3334	3334	334	344	34	34	3	10 ^{-13.2}
観察 4 日. 一群 4 羽. 注射量 0.05cc. 対照 4 羽/60羽. ● 死亡 ○ 生存										

C. A. F. 血球凝集反応

抗原倍数	20	40	80	160	320	640	1280	2560	対照
	+	+	+	+	+	+	+	-	-

いもの, 2 倍, 4 倍, 8 倍稀釈したものを血管内に 0.3cc 腹腔内に 0.4cc 接種した. 其の成績は Fig. 2 及び Fig. 3 に示した. 而して著者の観察では雛の感染死は一般に 3 日以後に見られるので一応 48 時間以内に斃死したものを致死毒による死と見做した. マウスでは一般に感染死は見られないが, 4 日以内の死亡を毒素によるものと見做し D 記号で示した. 4 日以上生存したものを S 又雛の場合には 3~4 日の中に死亡したものを d で示した. 而して記号の数字は死亡迄の時間を示している.

C. A. F. の 8 倍稀釈を接種した一羽を除き, その他は総べて致死毒によると考えられる 48 時間以内に斃死した. 対照とした正常 C. A. F. 接種雛では総べて 4 日以上生存した. マウスでは 4 倍及び 8 倍稀釈は何れも 4 日以上生存したが原 C. A. F. 及び 2 倍稀釈のものは総べて 96 時間以内に斃死し, 対照は総べて 4 日以内に死亡するものは見なかつた.

先づ血管内接種の成績 (Fig. 2) は雛では

次に腹腔内接種の成績 (Fig. 3) は雛では 8 倍稀釈のものは 4 日以上生存したが, 4 倍では一羽を除き, 其他は 48 時間以内に斃死し, より高濃度接種のものは総べて 48 時間以内に死亡した. 対照は総べて 4 日以上生存

Fig. 2. 鶏及びマウス対 N. D. V. 感染 C. A. F. の毒性実験

	抗原別	抗原稀釈			C. A. F.	× 2	× 4	× 8
		N. D. V.	C. A. F.	正常				
雛	心臓内 0.3c.c.	N. D. V.	C. A. F.	正常	D ₂₄ D ₂₄ D ₃₆	D ₂₄ D ₂₄ D ₃₆	D ₂₄ D ₃₆ D ₄₈	D ₂₄ D ₃₆ d ₇₂
		正 常	C. A. F.	正 常	S S S	S S S	S S S	S S S
マウス	尾静脈 0.3c.c.	N. D. V.	C. A. F.	正常	Dc ₂₄ Dc ₇₂ Dc ₉₆	D ₃₆ D ₄₈ D ₄₈	S S S	S S S
		正 常	C. A. F.	正 常	S S S	S S S	S S S	S S S

D : 毒素に依る死亡 S : 96時間以上生存 d : 発病死亡
Dc : 痙攣を起して死亡 一群 3 匹

Fig. 3. C. A. F. 毒性実験〔腹腔内〕

	C. A. F. 別	C. A. F. 原液	2 ×	4 ×	8 ×
雛	N. D. V.	D ₂₄ D ₂₄ D ₃₆	D ₂₄ D ₃₆ D ₃₆	D ₃₆ D ₃₆ S	S S S
	正 常	S S S	S S S	S S S	S S S
マウス	N. D. V.	D ₄₈ D ₄₈ D ₇₂	D ₄₈ S S	D ₇₂ S S	S S S
	正 常	S S S	S S S	S S S	S S S

D : 毒性死 S : 96時間以上生存 注射量 0.4c.c. 観察5日

した。

マウスでは2倍, 4倍接種のものが各一匹4日以内に死亡し, 其他は生存したが, 稀釈していないものは総べて4日以内に死亡し, 対照は総べて生存した。

・2) 感染胎児の致死毒。

10%胎児乳剤の病毒の吟味を行つた成績は

Fig. 4¹⁾に示す如く L.D₅₀は10^{-13.2}で充分染していると考えられる。

その致死毒実験成績は Fig. 4(2)に示す如く10倍乳剤上清及び20倍稀釈液では, 雛を毒素で斃死させているが, マウスでは死亡したものはなかつた。腹腔内に接種した雛では40倍稀釈より高濃度の毒素で死亡した。

Fig. 4(1) 10倍胎児乳剤感染実験

10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²	10 ⁻¹³	10 ⁻¹⁴	10 ⁻¹⁵	I.D. ₅₀
3334	3334	3334	334°	334°	32°	44°	4°	10 ^{-13.2}

観察4日. 一群4羽. 注射量0.05c.c. 正常対照死亡4羽/60羽. ●死亡 ○生存

Fig. 4(2) 10%胎児乳剤毒性実験

	接種部位	10%乳剤	2 ×	4 ×	8 ×
N. D. V. 感染胎児	鶏心臓内	D ₂₄ D ₂₄ D ₃₆	D ₂₄ D ₂₄ d ₇₂	d ₉₆ S S	D ₄₈ d ₇₂ S
	鶏腹腔内	D ₂₄ D ₂₄ D ₃₆	D ₂₄ D ₂₄ D ₄₈	D ₂₄ D ₄₈ S	D ₂₄ d ₉₆ S
	マウス尾静脈	S S S	S S S	S S S	S S S
正常胎児	鶏心臓内	S S S	S S S	S S S	S S S
	鶏腹腔内	S S S	S S S	S S S	S S S

一群3匹. 注射量, 雛0.3c.c. マウス0.2c.c. D 毒素死
d. 発病死 S. 96時間以上生存 観察5日

第2節 接種病毒量と感染C. A. F. の毒性実験.

感染に用うる N. D. V. 量の異なる場合に感染 C. A. F. の病毒量に差異を求すか否かを実験し, 更に感染 C. A. F. の 10⁻¹³ 稀釈液, 即ち微量の病毒を接種して感染せしめた C. A. F. の致死毒を検べ, 上述の実験に於ける可成大量の病毒接種による成績と比較した。

感染 C. A. F. を bouillon で 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸, 10⁻¹³ に稀釈して, 11日孵化卵の漿尿膜上に接種し, 死亡直後の C. A. F. に就て血球凝集反応を行つた。成績は Fig. 5 に示す如く, C. A. F. の病毒量は接種病毒量に殆んど影響されない。

又感染 C. A. F. 10⁻¹³ 稀釈の微量病毒を接種して感染せしめた C. A. F. を4日雛に心内接種を行つて致死毒を検べ, 更に雛に対する

Fig. 5. 血球凝集反応

接 種 C. A. F. 稀 釈 度	採 集 C. A. F. 稀 釈								
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	対 照
10 ⁻⁵	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10 ⁻⁶	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10 ⁻⁸	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10 ⁻⁸	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10 ⁻¹³	+	+	+	+	+	+	-	-	-
原C.A.F.	+	+	+	+	+	+	-	-	-

感染価を測定して、致死毒の吟味にそなえた。

その成績は Fig. 6 に示す如く C. A. F. そのまゝのもの及び2倍稀釈では48時間以内に殆んど死亡した。此の感染 C. A. F. の LD₅₀ は 10^{-13.7} を示した。以上の成績から感染 C. A. F. の病毒らなびに致死毒は接種病毒量にあまり影響されないと考えられる。

第3節 感染後の経過日数と C. A. F. の毒性

11日孵化卵を用い病毒接種24時間と48時間後の C. A. F. に就て致死毒、感染価及び血球

Fig. 6. 10⁻¹³virus 接種 C. A. F. 毒性及び感染実験

1 × C. A. F. (原液)	D ₂₄	D ₃₆				
2 × C. A. F.	D ₂₄	D ₂₄	D ₂₄	D ₃₆	D ₃₆	D ₄₈
4 × C. A. F.	D ₃₆	D ₄₈	D ₄₈	d ₇₂	d ₇₂	

D 毒素死 使用雛, 生後4日雛
d : 発病死亡 48後間以上のもの。
注射量 0.3c.c.

C. A. F. 感 染 価

10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²	10 ⁻¹³	10 ⁻¹⁴	10 ⁻¹⁵	LD ₅₀
3333	3444	3333	3334	33	334	334	44	4	10 ^{-13.7}

観察日数4日。注射量0.05c.c. ●死亡 ○生存
一群4羽。対照死亡4羽/60羽中。

凝集価を検べた。又7日雛及び幼弱マウスを用い心内及び尾静脈内に夫々0.3cc及び0.2ccを接種した。実験成績は Fig. 7 に示す如く致死毒力は雛及びマウス共に感染48時間の C. A. F. が24時間のそれに比較して明かに大きい。而して感染価及び血球凝集価には両者

Fig. 7. (1) 感 染 実 験

C. A. F. 別	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²	10 ⁻¹³	10 ⁻¹⁴	10 ⁻¹⁵	10 ⁻¹⁶	LD ₅₀
24時間採集	2333	2333	3334	3334	334	334	344	34	4	4	10 ^{-13.7}
48時間採集	2334	3324	3333	3244	334	324	44	3	44	4	10 ^{-13.2}

一群4羽。観察4日。接種量0.05c.c. 正対常照5羽死亡/60羽 ●死亡 ○生存

(2) . 血 球 凝 集 反 応

C. A. F. 別	20	40	80	160	320	640	1280	2560	対 照
24時間採集	+	+	+	+	+	+	-	-	-
48時間採集	+	+	+	+	+	+	±	-	-

(3) 毒 性 実 験

C. A. F. 別	接種動物及び部位別	1 × C. A. F.	2 × C. A. F.
24時間採集	雛心臓内接種	D ₂₄ D ₂₄ D ₃₆ d ₇₂	D ₄₈ D ₄₈ d ₉₆ d ₇₂
	マウス尾静脈内接種	D ₇₂ S S	S S S
48時間採集	雛心臓内接種	D ₂₄ D ₂₄ D ₂₄ D ₃₆	D ₂₄ D ₂₄ D ₃₆ D ₄₈
	マウス尾静脈内接種	Dc ₂₄ Dc ₃₆ Dc ₂₄	D ₃₆ S S

D : 毒素に依る死亡 d : 発病死 Dc : 痙攣を起して死亡。 S : 生存5日以上。

殆んど差異を見ない。

第4節 カオリン^{6,7,8)}精製による病
毒と致死毒と分離

カオリン吸着に依つて致死毒と病毒とを分離する事が可能か否かを追求した。病毒材料は感染 C. A. F. を用いカオリン精製法は第2編に述べたと大体同じ方法で行つた。即ち感染 C. A. F. 20cc に pH 4.0 の磷酸緩衝液を 3cc 加えて pH 4.0 とし、是に 5% の割に精製カリオンを加え、20 分間振盪した後、3000 r. p. m. 20 分遠沈して、その上清に更に同量のカオリンを加え、同様の操作を行いカオリン沈渣を一本の沈澱管に集め、pH 8.0 の磷酸緩衝液を C. A. F. の原量迄加え、氷室に 24 時間おいた後 3000 r. p. m. 20 分間遠沈して解離上清を得た。

而して此の解離上清と中性に修正したカオリン吸着上清の致死毒力、感染価、及び血球凝集価を測定して、病毒と致死毒の分離の関係を見た。即ち 7 日雛及び幼弱マウスを用い

心臓内及び尾静脈内に夫々 0.3cc, 0.2cc, を接種して致死毒力を調べた。実験成績は Fig. 8, 9, 10, に示す如くである。先づ致死毒実験成績を見ると Fig. 10. に示す如く、対照 C. A. F. を接種したものは雛、マウス共に総べての動物が毒素によると考えられる時間内に死亡した。カオリン解離上清を接種したものは雛では半数、マウスでは一匹が有意な時間内に死亡し、カオリン吸着上清を接種したものは鶏、マウス共に有意な時間内に死亡したものは見なかつた。而して是等感染 C. A. F. カオリン吸着上清、カオリン解離上清の血球凝集反応成績 (Fig. 8) を見るとカオリン解離上清の血球凝集価は対照の夫れと大差はないが、カオリン吸着上清は著しく低下している。又感染実験成績を見ると (Fig. 9) カオリン解離上清の LD₅₀ は 10⁻¹² で、対照に比してあまり差はないが、吸着上清ではかなり低い価を示している。

Fig. 8. 血 球 凝 集 反 応

	20	40	80	160	320	640	1280	2560	対照
C. A. F.	+	+	+	+	+	+	-	-	-
カオリン吸着上清	+	+	-	-	-	-	-	-	-
カオリン解離上清	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Fig. 9. 感 染 実 験 成 績

C. A. F.	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²	10 ⁻¹³	10 ⁻¹⁴	10 ⁻¹⁵	LD ₅₀
	2233	3344	2333	3334	334	344	344	44	4	10 ^{-13.7}
カオリン吸着上清	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹			10 ^{-8.5}
	3344	3344	3	344	44	4	3			
カオリン解離上清	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²	10 ⁻¹³	10 ⁻¹⁴
	2233	3334	3344	3344	3334	334	233	34	4	4

一群 4 羽 注射量 0.05c.c. 実験動物 3 日雛 正常対照 5 羽/60 羽 ● 死亡 ○ 生存

Fig. 10. 毒 性 実 験

カ吸 オ着 リ上 清	雛	d ₇₂ d ₁₂₀ d ₉₆ d ₁₂₀				カ解 オ離 リ上 清	雛	D ₄₈ D ₄₈ d ₇₂ d ₉₆				原腔 漿 尿 液	雛	D ₂₄ D ₂₄ D ₂₄ D ₃₆			
		マウス	S	S	S			マウス	D ₇₂	S	S			S	マウス	D ₂₄	D ₂₄
		S	S	S	S			D ₇₂	S	S	S			D ₂₄	D ₂₄	D ₂₄	D ₃₆

D : 毒素による死亡 d : 発病死 S : 生存 5 日以上 Dc : 痙攣を起して死亡

第5節 保存が感染 C. A. F. の致死毒及び感染力に及ぼす影響。

実験成績は Fig. 11 及び 12 に示す如く、感染価は 1 日保存のものと 10 日保存のものとの差が見られないが、致死毒では再者に大なる差を示し、10 日保存のものでは雛、マウス共

に総べて 5 日以上生存したが、1 日保存したものでは大部分の動物が、又雛では 2 倍稀釈のものも有意な期間内に死亡した。即ち致死毒は保存に依つて失われるものと考えられる。

Fig. 11. 感 染 実 験

	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²	10 ⁻¹³	10 ⁻¹⁴	LD ₅₀
24 時間保存 C. A. F.	●●●● 3333	●●●● 3334	●●●● 3334	●●●○ 234	●●○○ 44	●○○○ 34	●○○○ 4	10 ^{-12.5}
10 日保存 C. A. F.	●●●● 2344	●●●● 3334	●●●○ 333	●●○○ 44	●○○○ 33	●○○○ 34	●○○○ 4	10 ⁻¹²

一群 4 羽. 観察 4 日. 注射量 0.05c.c. 正常対照 4 羽/60 羽死亡 ● 死亡 ○ 生存

Fig. 12. 毒 性 実 験

		24 時間保存 C. A. F.				10 日保存 C. A. F.			
雛	1 × C. A. F.	D ₂₁	D ₂₁	D ₄₈	d ₇₂	S	S	S	S
	2 × C. A. F.	D ₂₄	D ₂₄	D ₄₈	S	S	S	S	S
マウス	1 × C. A. F.	D ₇₂	D ₄₈	S		S	S	S	

D : 毒素による死亡 d : 発病死 S : 5 日以上生存

第6節 熱の致死毒及び感染力に及ぼす影響。

感染 C. A. F. を 56°C 15 分及び 30 分間加熱した後 7 日雛及びマウスに夫々心臓内に 0.3cc, 尾静脈内に 0.2cc 接種して致死毒に対する、又 3 日雛を用いて感染力に対する影

響を調べた。

実験成績は Fig. 13, 14 に示した。即ちマウスに対する毒性は 56°C 15 分, 56°C 30 分共に見られない。雛に対する毒性は 15 分加熱と 30 分加熱とで殆んど差を見ないが、後者の毒性が少々減弱している。感染力は 15 分では

Fig. 13. 加熱 N. D. V. 感染 C. A. F. 感染実験

C. A. F. 別	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	LD ₅₀
56°C 15 分	●●●● 3444	●●○○ 44	●●○○ 34	●●○○ 44	●○○○ 4	●○○○ 4	●○○○ 4		10 ^{-3.7}
56°C 30 分	●○○○ 4	●○○○ 44	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	●○○○ 4		/

一群 4 羽. 注射量 0.05c.c. 対照 4 羽死亡/40 羽中 ● 死亡 ○ 生存

Fig. 14. 加熱 virus 毒性実験

		56°C 15 分加熱 C. A. F.				56°C 30 分加熱 C. A. F.				
雛	1 × C. A. F.	D ₂₄	D ₂₄	D ₂₄	D ₄₈	1 × C. A. F.	D ₂₄	D ₂₄	D ₄₈	d ₇₂
	2 × C. A. F.	D ₄₈	d ₇₂	d ₉₆	S	2 × C. A. F.	S	S	S	S
マウス	1 × C. A. F.	S	S	S	S	1 × C. A. F.	S	S	S	S
	2 × C. A. F.	S	S	S	S	2 × C. A. F.	S	S	S	S

D : 毒素による死亡 観察 5 日 d : 発病死 S : 生存 5 日以上

L. D₅₀ = 10^{-4.7} を示し、30分では殆んど認められない程減弱し、対照に較べて著しく低下している。

第7節 ホルマリンの致死毒及び感染力に及ぼす影響。

11日孵化卵に感染せしめて得た C. A. F. に 0.2% の割にホルマリンを加えて5日間6°C、に保存した後、7日雛、幼弱マウスに夫々心臓内に 0.3cc、尾静脈に 0.2cc、を接種して、毒性を検すると共に3日雛を用いて感染実験を行つた。その成績は Fig. 15, 16 の如くである。

Fig. 15. 2000倍ホルマリン液とし5日保存した C. A. F. の感染実験

10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
●●●● 444	●●●● 4	●●●● 4	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●

一群4羽。観察日数4日。○生存 ●死亡
注射量 0.05c.c. 正常対照死亡2羽/40羽

Fig. 16. 2000倍ホルマリン液とし5日保存した C. A. F. 毒性実験

鶏	1 × C. A. F.	d ₉₆	d ₉₆	d ₉₆	S	S
	2 × C. A. F.	d ₉₆	d ₁₂₀	d ₁₂₀	S	S
マウス	1 × C. A. F.	S	S	S	S	S

Fig. 17. 中和実験

	雛				マウス			
C. A. F. + 5倍稀釈免疫血清	S	S	S	d ₉₆	S	S	S	S
C. A. F. + 50倍稀釈免疫血清	d ₉₆	d ₉₆	d ₉₆	S	D ₉₆			D ₉₆
C. A. F. + 5倍稀釈正常免疫血清	D ₂₄	D ₂₄	D ₂₄	D ₃₆	D ₄₈	D ₄₈	D ₇₂	S S

S : 生存96時間以上 d : 鶏では48時間以後死亡。 D : 毒素死。

ゾニンを加え氷室に10日間保存して不活性化した抗原を7日雛及びマウスに 0.3cc 宛2日間隔で3回筋肉内注射して免疫し、最後の注射の6日後に感染 C. A. F. の稀釈しないもの、2倍及び4倍稀釈を雛には、0.3cc を心内に、マウスでは尾静脈に 0.3cc を接種して中和されるか何うかを見た。

鶏及びマウスに対する致死毒は全く失われ、又感染性も著しく低下し、殆んど消失している。以上の結果より毒性はホルマリンに対して感染性より稍々早く失われる様である。

第8節 致死毒の試験管内及び生体内中和試験。

致死毒の試験管内中和試験に用いた免疫血清は感染 C. A. F. を成鶏に接種して発症せしめ、15日後に採血したもので中和対数 4.0 の免疫血清である。中和試験は免疫血清を 56°C 30分間被動化した後生理的食塩水で5倍及び50倍に稀釈し、各々に感染 C. A. F. を等量加えて 37°C に2時間置いた後、7日雛の心臓内に 0.5cc マウスの尾静脈に 0.3cc を接種した。対照として正常血清を用いて同様の実験を行つた。実験成績は Fig. 17 示した如く雛では対照はすべて死亡しているが10倍及び100倍稀釈免疫血清共に総べて致死毒による死を免れ、マウスでは10倍稀釈では死亡するものは認められないが100倍稀釈では対照の夫れと差異を認めなかつた。

次に生体内中和実験は感染死亡胎児10倍乳剤を2重ガーゼで濾過し、0.1%の割にマ-

其の実験成績は Fig. 18 に示す如く雛では対照は殆んど総べて有意な期間内に死亡しているが、免疫したものは大多数が致死毒に依る死亡を免れている。マウスの場合は対照に較べて免疫したものと大差を見ないが、多少中和されている様である。

Fig. 18. 生体内中和実験

		ワクチン免疫雛				正 常 雛			
1	× C. A. F.	D ₁₈	D ₁₈	d ₉₆	S	D ₂₄	D ₂₄	D ₃₆	D ₄₈
2	× C. A. F.	D ₁₈	S	S	S	D ₂₄	D ₃₆	D ₄₈	D ₄₈
4	× C. A. F.	D ₄₈	S	S	S	D ₄₈	D ₄₈	D ₄₈	d ₉₆

		ワクチン免疫マウス				正 常 マ ウ ス			
1	× C. A. F.	D ₁₈	D ₇₂	D ₉₆	S	Dc ₂₄	Dc ₄₈	Dc ₉₆	D ₄₈
2	× C. A. F.	D ₃₆	D ₄₈	S	S	D ₃₆	D ₄₈	D ₉₆	S

D : 毒素に依る死亡 S : 5日以上生存 d : 発病死
Dc : 痙攣を起して死亡 観察 5日

総括及び考按

以上 N. D. V. の毒素に就て実験した成績を総括考按して見ると次の如くである。

1) 雛及びマウスの血管内に N. D. V. 感染 C. A. F. を注射すると、雛では8時間から48時間以内に、マウスでは12時間から94時間の間で死亡する。その際雛は大多数は全身衰弱の様相を呈して死亡し、稀には痙攣を起すものもあるが、マウスでは痙攣を起して死亡するものが多く、稀釈すると4倍迄は死亡するが痙攣を起さない。N. C. D. の潜伏期は雛では大体3~4日であるから8時間乃至48時間の如く短時間内に死亡するのは毒素によるものと考えられる。マウスでの実験は松本(1952⁹⁾)はハムスター馴化のN. D. V. 宮寺株のC. A. F. を脳内に接種して死亡を認めず、又徳田¹⁰⁾(1952)はN. D. V. 宮寺株をマウスの脳内接種によつて継代し、馴化発症さすのに十数代を要した事を報告している。著者もマウスの筋肉内及び脳内にN. D. V. 対染C. A. F. を接種したが死亡するものを認めなかつた。然るにUpton(1953⁵⁾)は25株のN. D. V. を用いてマウスに脳内接種を行つて、8株は激しい症状を起して死亡したが、他の17株は殆んど症状を認めず、激しい症状を起した8株を鶏に静脈内接種すると電撃的に死亡せしめる事を報告している。斯の如く病毒株によつて毒性の差があること

が考えられるが著者の実験に供した宮寺株は筋肉内及び脳内接種では、毒性が認められないに拘らず静脈内接種では短時間で痙攣を起して死亡するに至る等の点よりN. D. V. には毒素が存在すると考えられる。又哺乳動物にN. D. V. を馴化せしめた場合猿¹¹⁾、蝙蝠¹²⁾、ハムスター¹³⁾、マウス等では症状は麻痺であつて、いずれの場合も痙攣を認めないことも毒素の存在を支持するものであろう。

2) 次に此の毒素の性状に就ては毒性物質がvirus自体であるか、virusの代謝産物であるか、或いは動物体内産生物であるかと云う様な疑問が起る。Henleはinfluenza virusに於て毒素の中和がvirusのtype specificというよりむしろstrain specificにより成立する事から実験動物が罹患した事に依り生ずるという考えを否定している。本実験に用いた宮寺株ではマウスに脳内或いは筋肉内接種を行つても死亡するものなく、松本によると8代継代しても少くとも毒性を示さなかつたという事からN. D. V. の感染により毒素を生ずるとは考え難い。そこでN. D. V. の毒性がvirus自体にあるか、或いはvirusの代謝産物であるかを検べる為にカオリンに依る吸着及び解離実験を行つた成績によると、雛及びマウスに対する毒性は感染価及び血球凝集価の高い吸着解離液に多く認められる。即ち毒性はvirus濃度の高い液に認められてvirusを含まない毒性物質を分離する事は不

可能であつて、結局毒性物質は virus 自体であると考えられる。

3) 次に virus の増殖と毒性の発生との関係を多少とも窺う事が出来るのではなからうかと考えて、孵化鶏卵に N. D. V. を接種して24時間と48時間後に C. A. F. を採集して毒性と感染性を検べた結果、両 C. A. F. の感染価及び血球凝集価は殆んど差異を認めないが24時間後の C. A. F. の毒性は48時間後の夫れに比べて弱い事を知つた。即ち感染価及び血球凝集価の上から見た virus の増殖と毒性とは心ずしも一致するものではないと考えられる。

4) 更に保存が毒性と感染性に及ぼす影響を検べた結果は 6°C に保存した C. A. F. の24時間後のものと10日後のものとを比較して見ると、感染価は両者殆んど差異を認めないに拘らず後者の毒性は完全に失われた事は興味ある事実である。

5) 毒性と感染性に及ぼす熱の影響を見た成績では 56°C, 15分と 56°C, 30分熱を加えた C. A. F. に就て見ると、前者の感染価は著しく低下しているが猶多少認められる。後者即ち30分加熱の感染力は完全に失われ、毒性の面では前者はマウスに対しては認められないが、雛に対しては尚相等に強い毒性を認める事が出来た。後者、即ち30分加熱のものでも雛に対して或る程度の毒性を認めた。毒性は感染性に較べると稍々耐熱性が大きい。猶 56°C 30分で感染力を失うことは Cunha¹⁴⁾ (1947) の報告と一致している。

6) ホルマリンに対する抵抗性は著者の実験範囲では毒性と感染性に差異を認めなかつた。即ちホルマリンを0.2%に加えて6日間6°Cに保存した後、検べた所では両者共に完全に失われていた。

7) 次に免疫血清に依る毒素の中和及びワクチンで免疫した雛を用いて生体内で毒性の中和実験を行つた結果、免疫血清による中和は10倍稀釈では雛、マウス共に中和され、100稀釈では雛は中和されているが、マウスは中和されなかつた。又免疫雛及びマウスの

実験では共に対照に較べて毒素の中和が認められた。

猶感染 C. A. F. を雛及びマウスの腹腔内に接種すると、両動物は共に毒素の為の死亡を来すが、マウスでは痙攣等の強い反応は見られず、又胎児乳剤を雛に接種すると心臓内、腹腔内共に毒素の為に死亡するが、マウスは死亡しない。influenza virus 感染孵化鶏卵で Henle は、胎児は感染性が最も高く、C. A. F. は毒性が最も高い。と述べているが、N. D. V. でも胎児の方が毒性が弱い為マウスは死亡しなかつたと考えられる。

Delbrücke (1945¹⁵⁾) は Rickettsia の毒素に就て、感染に三つの段階を想像している。即ち 1) 感受性のある細胞に吸着される。2) 寄生する細胞の中に入つて細胞の状態を変えて、他の病原体の入るのを妨げる。3) 細胞の中で増殖した Rickettsia の毒素で細胞が破壊されて Rickettsia は血中に入り、病氣そのものとは別な症状を呈する。之は毒素の問題に対して参考になる仮説であろう。

結 論

1) N. D. V. 感染 C. A. F. を雛及びマウスの血管内或いは腹腔内に注射すると、致死毒により該動物を死亡させる。

2) 毒性はカオリン吸着及び解離により virus と分離する事は出来ない。尚 virus 濃度と毒性とは平衡関係を有し、毒性物質は virus 自体と思われる。

3) 孵化卵内で増殖した N. D. V. の毒性は同一感染価の病毒量に就て見ると、24時間のものより48時間のものが強い。

4) 毒性は 6°C に保存される事により感染性より早く失なわれる。

5) 加熱に対して毒性は感染性より稍々安定でホルマリンに対しては平行して失われる。

6) N. D. V. の致死毒は抗血清により中和され、又免疫動物体内でも中和される。

稿を終るに臨み終始御懇切なる御指導並びに御校閲を賜つた恩師村上教授に謝意を表します。

文 献

- 1) K. F. Meyer., . Psitacosis-lymphogranuloma group, viral and rickettsial disease of man edited by Thomas. M. Rivers., 440~450.
- 2) Rake. G., and Johnes H. P., . Studies on lymphogranuloma venereum. II. Association of specific toxins with agents of the lymphogranuloma-psitacosis group., J. Exp. Med., 463~486, 1944.
- 3) Henle. G., and Henle. W.,: Studies on the toxicity of influenza virus. I. The effect of intracerebral injection of influenza group., J. Exp. Med., 463~486, 1946a.
- 4) Henle. W., and Henle. G., . Studies on the toxicity of influenza viruses. II. The effect of intraabdominal and intravenous injection of influenza viruses., J. Exp. Med., 84, 639~660, 1946 b.
- 5) Upton. E., Hanson. R. P., Dow. D., and Brandly. C. A., . Studies on intracerebral inoculation of N. D. V. into mice., J. infect. diseases, 92, 175, 1953.
- 6) Praktikum der physikalischen Chemie. Lenor Michaelis und Peter Rona., 147. 1930.
- 7) Sato. and Kodana., . Adsorption of fixed rabies virus and vaccinia virus by adsorption on Kaolin. The Kitasato Archives of Exp. Med., 117, 1931.
- 8) 中原, 中島: 家鶏肉腫原因体の吸着及び解離実験, 癌, 27 卷.
- 9) 松本, ニューカッスル病ウイルスのハムスターに対する病原性に就て, 日本細菌学雑誌, 8 卷, 267, 1952.
- 10) 徳田, 野竹: Newcastle 病 virus の研究, 日本細菌学雑誌, 7 卷特別号, 1952.
- 11) Reagan. R. L., Werner. H. O., and Brueckner. A. L.,: Transmission of the hamster adapted Newcastle virus to the macacus rhesus monkey., J. infect. diseases., 87, 210, 1950.
- 12) Reagan. R. L., Smith E. J., and Brueckner A. L., . Studies of Newcastle disease virus propagated in the cave bat., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 75, 1950.
- 13) Reagan, R. L., Lillie, M. G., Poelma, L. J., und Brückener, A. L., . Die Übertragung des Virus der Newcastle Krankheit auf den syrischen Hamster., Am. J. Vet. Res., 8, 136~138, 1947.
- 14) Cunha, R., Well, M. L., Beard, D., Tylor, A., Sharp, D.G., . Purification and characters of the Newacstle disease virus. (California strain), J, immun., 55, 69~89, 1947.
- 15) Delbrück, M., . J. bact., 50, 151, 1945.

Department of Bacteriology, Okayama University Medical School.
(Director : Prof. Dr. S. Murakami)

Studies on the immunity of Newcastle disease virus.

Part III : The toxin of Newcastle disease virus.

By

Fumio Nakagawa

There have been made few reports on the virus toxins except those of psitacosis-lymphogranuloma and influenza groups, and, as to the Newcastle disease virus, the existence of its toxin is only presumed by Upton. Considering the fact that this toxin is neutralized by the immune serum of Newcastle disease virus, this toxin seems to have some relationship with the immunity of the virus. Therefore, the author makes reports on

the fact that the Newcastle disease virus has its toxin, and about the various results gained by studying its properties.

1) The intravenous and intraabdominal injection of the chorioallantoic fluid inoculated with this virus, could kill the injected hosts such as chickens and mice. In the case of chickens, it took less than 24 hours to kill, and in the case of mice, the animals died with convulsion.

2) This toxic substance seems to be the virus itself, because the virulence of this toxin and the concentration of virus went parallel to each other and this toxin was not able to be separated from the virus by means of kaolin-adsorption and-dissociation.

3) This virus proliferated for 48 hours in embryonated eggs showed greater virulence than that proliferated for 24 hours. In this test, however, the quantities of virus were adjusted that their infectious titer might be the same one.

4) If this virus is kept at 6°C, it lost its virulence earlier than the infectious titer. Against heating, however, this virulence was a little more stable than the infectious titer, and, in the presence of formalin, these two were lost parallel to each other.

5) The lethal toxin of Newcastle disease virus was neutralized by antiserum and was also neutralized in the bodies of immunized hosts.
