

# ウイルス感染症における細胞性免疫 に関する研究 (第1報)

— インフルエンザとムンプス —

森田 盛大\*・原田誠三郎\*  
須藤 恒久\*\*・石田名香雄\*\*\*

## I ま え が き

細胞性免疫の In vitro における指標が Lymphotoxin 又は Lymphokines として Granger et al (1968)<sup>1)</sup> や Dumonde et al (1969)<sup>2)</sup> によって開発されてから、細胞性免疫に関する研究は急速に進展してきた (森田, 1972)<sup>5)</sup>。しかし、ウイルス感染症における細胞性免疫に関しては、2, 3のウイルスを除いてそれほど研究がすすんでいない。

従って、ウイルス感染症一般において細胞性免疫が何程の重要性をもって宿主防衛に関与しているのかつまびらかでないのが現状である。

我々は、このようなウイルス感染症における細胞性免疫を明らかにすることを研究目的として、Influenza 及び Mumps についてマウス又はモルモット-Macrophage Migration Inhibition (MMI) Test 系で実験をはじめた。本報ではこの実験系から得られた成績を報告する。尚、詳細な実験解析結果は今後行なわれる実験成績を含めた上で別途報告したい。

## II 実験方法

### A 実験動物

東北大学実験動物センター由来の D D 系マウス及び Hartley 系モルモット。

### B ウイルス抗原

Influenza A2/Japan/305/57 (H2N2) ウイルス (A 2/57) 及び Mumps ウイルスの Enders 株、並びに受精卵正常尿膜腔液 (NAF)。

### C MMI 実験法

1. A2/57 抗原—マウス実験系では A2/57 又は NAF 抗原 0.5 ml をマウス腹腔内 (I P) に 3 日間隔で 2 回接種。7~10 日後に Freund's incomplete adjuvant 1 ml/I P に注入し、3 日後に腹腔内滲出細胞 (PEC) を採取し MMI 実験に供した。

2. Mumps—モルモット実験系では先ず Mumps 抗原を 0.2 ml 経鼻接種し、更に 1 週後に 1 ml を皮内注射して感作。2—3 週後に同 adjuvant 10 ml/I P を注入し、3 日後に PEC を採取して MMI 実験に供した。

3. MMI 実験は次の如く行なった。すなわち、PEC を Ca<sup>++</sup> と Mg<sup>++</sup> を除いた phosphate buffer saline pH 7.2 (PBS) で 3 回低速遠心洗浄後、10 倍量の 20% 牛胎児血清 (FCS) 加 RPM 1 培養液に浮遊し、これを毛細管につめ、1,000 rpm 3 分間遠心。packed cells 部を切取ってシリコングリースでカバースリップ上に固定し、20% FCS 加 RPM 1 培養液 3 ml を入れたシャーレ (直径 2.5 cm) に静置。これに抗原 0.1 ml を添加して 5% 炭酸ガス培養器で 24 時間培養 (37°C) した。マクロファージの遊走面積は倍率 20 倍で撮影し、毛細管の口径を基準に引伸して測定した。遊走率は (抗原添加時の遊走面積 / 抗原非添加時の遊走面積) × 100 として算出した。

### D 皮内及び足蹠反応実験法

皮内及び足蹠反応実験は Mumps—モルモット系でのみ行なったが、上述実験法 C—2 の如く 2 回免疫した後、12 日及び 16 日に左側前肢足蹠及び後肢大腿部皮内に Mumps 抗原を 0.1 ml ずつ接種し、又、右側足蹠及び大腿部皮内に PBS を対照として同様に接種した。24 時間後 erythema の縦軸 × 横軸を測定した。

## III 実験成績

### A インフルエンザ—マウス系における MMI 実験成績

この実験系における MMI 成績を第 1 表に示す。

- 1) A2/57 抗原による非特異的な遊走阻止が (1:10) 稀釈抗原添加時に有意差で認められたが、(1:50) では 15% 程度に減少し非有意差であることから、この実験系における各抗原はすべて (1:50) に稀釈したものを用いた。(第 1 段)
- 2) 第 2 段の NAF 感作群では、ホモの NAF 抗原によ

\* 秋田県衛生科学研究所細菌病理科 \*\* 秋田大学医学部微生物学教室 \*\*\* 東北大学医学部細菌学教室

表1 インフルエンザ—マウス系におけるMMI  
実験成績

感作別	実験 マウス 数	添加抗原	マクロフ ージ遊走率 %	MMI 率 %	
非感作 (対照) 群	9	非添加 (対照)	100±15	—	
		NAF (1:50)	NT	NT	
		A2/57	1:10	58±12	42
			1:25	85±12	15
			1:50	85±14	15
1:100	88±12	12			
NAF感作群	11	非添加 (対照)	100±26	—	
		NAF (1:50)	93±14	7	
		A2/57 (1:50)	81±17	19	
A2/57感作群	15	非添加 (対照)	100±20	—	
		NAF (1:50)	88±26	12	
		A2/57 (1:50)	69±16	31	

NT: Not Tested

って7%の遊走阻止が起きたが、対照に対して有意差ではない。又、A2/57抗原によって約19%の遊走阻止が認められたが、対照に対して有意差ではない。

3) 第3段のA2/57感作群では、ホモのA2/57抗原によって対照に対して有意差(P=0.05)の遊走阻止が認められたが、NAF抗原による遊走阻止率に対しては有意差ではない。

#### B Mumps—モルモット系におけるMMI実験成績

この実験系におけるMMI実験成績を第2表に示す。

表2 Mumps—モルモット系におけるMMI  
実績成績

感作別	実 モルモット 数	添加抗原	マクロフ ージ遊走率 %	MMI 率 %
対照 (非感作)	11	非添加 (対照)	100±26	—
		Mumps	88±16	12
Mumps 感作	10	非添加 (対照)	100±12	—
		Mumps	64±13	36

第1段の非感作(対照)モルモットPECのMumps

抗原による非特異的な遊走阻止が12%認められたが、有意差ではない。第2段のMumps抗原感作モルモットPECでは、Mumps抗原によって36%の遊走阻止が起り、有意差(P=0.05)であった。

#### C Mumps—モルモット系における皮内反応及び足蹠反応実験成績

第3表に示したのはMumps抗原による皮内反応及び足蹠反応実験成績である。

表3 Mumps—モルモット系における皮内反  
応及び足蹠反応

反応別 接種抗 原別 実験 群別	接種 抗原 別 実験 数	皮内反応		足蹠反応	
		PBS	Mumps	PBS	Mumps
対照群	2	2.5	18	2	38
Mumps 感作 12日目群	2	2.5	138	2	120
Mumps 感作 16日目群	2	3.0	72	3	150

※ Erythema の縦×横(mm<sup>2</sup>)

感作12日目のMumps抗原による皮内反応面積(Erythema)は対照群の約8倍であったが、感作16日目では12日目群の1/2に減少した。

これに対して、足蹠反応はMumps抗原によって対照群に比し約3倍のErythemaを呈したが、感作16日目群は12日目群より顕著で対照群に対して約4倍のErythemaであった。

#### IV 考 察

インフルエンザやMumpsなどに関する細胞性免疫については、Feinstone et al (1969)<sup>3)</sup>やWaldman et al (1972)<sup>4)</sup>によって、Lymphokinesの内MMIの成立することがすでに報告されている。我々の実験でも、インフルエンザ及びMumpsにおいてMMIが成立するようなデータが得られた。しかし、インフルエンザについては、表1及び2に示されるように、今回の実験では標準誤差が大きかったこと、又、対照に比して有意差であったとはいえ、NAF抗原添加時のMMI率(第3段)に対して有意差でなかったが故に、インフルエンザにおいてMMIが成立したとは確断できなかった。今後の第2報の実験で明らかにしたい。

Mumpsについては、MMI、皮内反応及び足蹠反応が成立し、これらのインデケーターに関する限り、Mumpsにおいて細胞性免疫が関与していることが証明さ

れたと考えられる。我々は、次の実験として、人末梢血を用いたMMI実験系でも成立するの否かを現在検討中であるので、この結果を第2報で報告したい。

実験方法論について付言すれば、標準誤差の小さい精度の高いMMI実験が望ましい故に、今回の我々の実験方法を再検討する必要があると考えている。又、インフルエンザ抗原自体も、尿膜腔成分を可能な限り除去した精製抗原を用いる必要があろう(第3段に示したように、このような粗抗原で免疫すると、NAF抗原によってもかなり遊走阻止が認められるからである)。免疫方法もマウスにadaptした生ウイルスの経鼻接種法に切替えるべきではないか、と考えている。更に、皮内反応や足蹠反応の如き *in vivo* の実験は反応面積の測定自体に難があり、従って、細胞免疫に関する定量的実験法としての意味からは欠点がある。

これら実験方法論上の問題も含めて、ウイルス感染症における細胞性免疫を今後検討していく考えである。

## V 結 語

ウイルス感染症における細胞性免疫を明らかにすることを目的として、先ずインフルエンザ及び Mumps についてマクロファージ遊走阻止実験系をもって実験した成績について述べた。

## 文 献

- 1). Granger, G.A., & Kolb, W.P.. Lymphocyte *in vitro* cytotoxicity: Mechanisms of immune and non-immune small lymphocyte mediated target L cell destruction. *J. Immunol.*, 101, 111-120 (1968)。
- 2). Dumonde, D.C., Wolstencroft, R. A., Panayi, G.S., Matthew, M., Morley, J., Howson, W, T., Lymphokines: Non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. *Nature*, 224, 38-42 (1968)。
- 3). Feinstone, S.M., Beachey, E.H., Rytel, M.W.. Induction of delayed hypersensitivity to influenza and mumps viruses in mice. *J. Immunol.*, 103, 844-849 (1969)。
- 4). Waldman, R.H., Spencer, C.S., Johnson, J.E.. Respiratory and systemic cellular and humoral immune responses to influenza virus vaccine administered parenterally or nose drops. *Cellular Immunol.*, 3, 294-300 (1972)。
- 5). 森田盛大. インフルエンザ感染と免疫応答, 特に分泌性 Ig A と細胞性免疫, 東北のコロニー, 19, 1<sup>0</sup>-18 (1972)。