

狂犬病ウイルス免疫脾細胞の抗ウイルス作用

牧 野 芳 大

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学部門

In vitro Antiviral Activity of Spleen Cells from Mice Immunized with Rabies Virus.

Yoshihiro MAKINO (Department of Virology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University)

Abstract: The effect of mouse spleen cells immunized with either live or beta-propiolactone (BPL)-inactivated rabies virus on the spread of rabies virus was studied *in vitro*. Spleen cells from C3H/He mice immunized with approximately 5×10^7 focus forming unit of either live or BPL-inactivated rabies virus (Flury-HEP strain) first showed a low level of specific cell-mediated cytotoxicity on day 4 after immunization. The cytotoxicity reached a peak on day 7 and then declined to a low level on day 14. In conjunction with the development of this cytotoxic activity, immune spleen cells significantly suppressed the virus spread in the virus-infected mouse neuroblastoma cells (strain N-18) as revealed by the inhibition of virus specific fluorescent focus size during a 30hr of incubation period. This activity was apparently due to the T lymphocyte populations of immune spleen cells since the activity was not diminished by the depletion of plastic plate adherent cells from spleen cells nor by passage of non-adherent spleen cells through nylon wool column. However, it was abrogated by prior incubation of non-adherent spleen cells with anti-Thy-1 serum and complement. In addition, neither antiviral neutralizing antibody, interferon nor lymphotoxin was detected in the infected murine neuroblastoma cell culture fluid co-cultivated with immune spleen cells. This activity was observed only when immune spleen cells and virus infected cells shared at least one H-2 haplotype. This focus size reduction activity was also observed in the spleen cells of mice immunized with BPL-inactivated virus to the same degree as with live virus.

Tropical Medicine, 22(4), 209-221, December, 1980

緒 言

狂犬病は、感染から発症までの期間が比較的長い
ため、感染後にワクチンを治療的に投与 (Postex-
posure vaccination) して、発症を阻止できると言
われている。しかし、その発症防禦機構については
不明な点が多い。

種々の実験動物での、いわゆる予防的ワクチン投
与 (Pre-exposure vaccination) においては、産生

される中和抗体が感染防禦に重要な役割を果たして
いることは Sikes *et al.* (1971) によって明らかに
されている。しかし、Baer *et al.* (1972) による
マウスの実験系では、ウイルス感染後に抗体を移入
した場合、そのマウスの生存期間を多少とも延長す
ることはできても、死亡率を減少することはできな
いことを報告し、Postexposure vaccination による
発症防禦機構での中和抗体の意義に疑問を投じてい

る。

一方, Wiktor *et al.* (1972), Baer *et al.* (1977) は, 感染後に投与するワクチンのインターフェロン (IF) 産生能の有無, 強弱が狂犬病発症防止に重要であり, IF 産生能のないワクチンは発症防禦効果が少ないことを報告している。また Weinmann *et al.* (1979) は, 狂犬病感染サルを, ヒト IF の投与のみによって顕著な治療成績を得たことを報告している。

一方, Kaplan *et al.* (1975) は, 正常マウスでは不顕性感染に終始する弱毒狂犬病ウイルスが, 免疫抑制マウス, スードマウスあるいは抗胸腺細胞血清処理マウス等で, 致死感染をひきおこすことを報告し, 狂犬病ウイルス感染からの回復には細胞性免疫の関与があることを指摘している。また, Mifune *et al.* (1980), 三舟 (1980 a) は Postexposure vaccination による発症防禦において, ワクチンにより産生される抗体, あるいは IF のみでは説明できない, 細胞性免疫あるいは他の免疫機序の関与の可能性を示唆した。

狂犬病ウイルスで免疫された動物に, 細胞性免疫応答が誘起されることは, これまで, Tignor *et al.* (1976), Wiktor *et al.* (1977), 三舟ら (1980 a) による免疫脾細胞の標的細胞障害 (Cell-mediated cytotoxicity) 試験, Lagrange *et al.* (1978), Tsiang and Lagrange (1980) による遅延型過敏症の発現, Wiktor *et al.* (1974) によるリンパ球幼若化現象等が報告されているが, この細胞性免疫応答が, 実際に, 狂犬病ウイルスの増殖あるいは伝播に, そして発症防禦にどのように関与しているかについては, 未だ不明である。

Ennis (1973) は, ヘルペスウイルス免疫脾細胞には, *in vivo* でヘルペスウイルスの周辺細胞への伝播を抑制する効果があること, 従って, ウイルスによるブラックのサイズを抑制する効果があること, そしてこの反応が, 遅延型過敏症の出現, マクロファージ遊走阻止試験の成績と良く一致していることを示した。

この研究では, 狂犬病ウイルスで免疫されたマウスの脾細胞に, 上記のような細胞性免疫応答の, より直接的な表現である抗ウイルス作用が認められるか否か, そしてそれは誘発される標的細胞障害活性とどのような関係にあるか, また, ワクチンとして

使用される不活化ウイルスでも, 同様の活性を誘発することが可能か否かについて検討し, 狂犬病発症防禦の機転の一端を明らかにしようとした。

材料と方法

細胞およびマウス : A系マウス由来の神経芽 (MNB)細胞のN-18株を軟寒天中でクローニング (Macpherson and Luc Montagnier, 1964) したものをダルベコー変法イーグル培地に5%牛胎児血清 (FCS), 5%仔牛血清 (CS) および3g/lのNaHCO₃を加えた培地 (DM 5+5) 中で増殖させたものを使用した。CER細胞 (Smith *et al.* 1977) はイーグルMEM培地に5%FCS, 5%CS, 1.3g/lのNaHCO₃を加えた培地 (MEM 5+5) で培養した。L₉₂₉細胞はMEM-5%CSで培養した。初代ニワトリ胎児 (CE) 細胞は7日目受精卵から常法 (山内一也, 1973) に従って作成した。Vero細胞はMEM-10%CSで培養した。

マウスはMNB細胞とH-2K部位が共通な純系C3H/Heの5週令~8週令のものを使用した。

ウイルス : 狂犬病ウイルス固定株のFlury-HEP株およびCVS株を用いた。Flury-HEP株はストックウイルスをMifune *et al.* (1980) の方法に従ってCE細胞で増殖させたものを使用した。狂犬病ウイルスの感染価は, Smith *et al.* (1977) の方法に従って迅速蛍光フォーカスカウント法で行ない 8×10^6 Focus forming unit (FFU)/mlであった。CVS株は, Vero細胞でクローン化したものをMNB細胞で増殖させ使用した。感染価は 6×10^8 FFU/mlであった。Vesicular stomatitis virus (VSV) はIndiana株を使用し, L₉₂₉細胞で増殖, 継代されたものを用いた。感染価は $10^{6.5}$ TCID₅₀/0.2mlであった。シンドビスウイルス (MP684株) のストックは, Vero細胞で増殖させたものを使用し, その感染価は 1.7×10^8 PFU/mlであった。

免疫原 : 三舟ら (1980 a) の方法に従ってFlury-HEP株をCE細胞で増殖させ, その培養液を低速遠心し, 上清を更にベックマン社製Type 19ローターを用いて18,000rpmで2時間遠心し, その沈渣を最初のウイルス液量の1/100のリン酸緩衝液 (PBS, pH7.4) に浮遊させた。この100倍濃縮ウイルス液の感染価は 2.5×10^8 FFU/mlであった。生ウイルスを0.04%のβ-プロピオラクトン (BPL) で37°C,

1時間不活性化した Flury-HE P株も、同様に濃縮して使用した。これら濃縮ウイルス液を0.2mlずつマウスの腹腔内 (i. p.) に投与し免疫した。

シンドビスウイルスによる免疫は、ストックウイルスの0.2mlを i. p. で接種した。

脾細胞の分画: 矢田、藤原 (1980) の方法に準じて行なった。エーテルで麻酔死させたマウスの脾臓を取り出し、細切後、RPMI 1640 培地と共に脾細胞をステンレスティールメッシュ #200に通し、単個細胞浮游液とした。この浮游液を、RPMI 1640 培地に5% FCSを加えた培地 (RPMI-5% FCS) で2回洗った後、DM-5% FCSに浮游させ、これを脾細胞浮游液 (Spleen cells) とした。

一方、この脾細胞を MEM-10% FCS に浮游し、細胞数を 10^7 /mlに調整し、その7mlずつを100mmプラスチックシャーレに移し、37°C CO₂インキュベーター中で1時間培養した。シャーレを揺り動かし、シャーレ面に非付着性の細胞を集め、RPMI-5% FCSで1回洗った後、DM-5% FCSに浮游させ、これをプラスチック面非付着性脾細胞 (Non-adherent spleen cells) とした。

この非付着性脾細胞の一部は、再び RPMI-10% FCS で 10^8 /mlに濃縮し、Julius *et al.* (1973) の方法に準じてナイロンウール非付着性の細胞を集めた。RPMI-5% FCS で細胞を1回洗った後、DM-5% FCS に浮游させ、これをナイロンウール通過性脾細胞 (Nylon wool effluent spleen cells) とした。この細胞をロゼット法 (矢田・藤原, 1980) で検査したところ、93%がT細胞であった。

腹腔細胞の分画: エーテル麻酔死させたマウスの腹腔内に、10mlの冷 RPMI 1640 培地を注入し、腹腔内を洗い、腹腔 (P E)細胞を採取した。時に、Freund's complete adjuvant を0.2ml マウス腹腔内に注入し、6日後に冷 RPMI 1640 培地で腹腔内を洗い PE細胞を採取した。PE細胞は RPMI-5% FCS で3回洗った後、脾細胞と同様にしてガラス面付着性細胞 (P E-Ad) とナイロンウール通過細胞 (P E-T) を分画した。

抗 Thy-1 血清と補体による処理条件の検討:

胸腺細胞の調整は矢田・藤原 (1980) の方法に準じて行なった。胸腺細胞または非付着性脾細胞 (1.5×10^8 /ml) の0.1mlに、800倍希釈した抗 Thy-1 血清 (OLAC 社製, Clone F7D5) を混和し、

37°C 水槽中で30分間反応させた。対照として培養液を同様にして反応させた。次に8倍希釈したモルモット補体0.1mlを加えた後、更に37°C で30分間反応させた。反応後、細胞を RPMI-5% FCS で洗った後、DM-5% FCS に浮游させ、抗 Thy-1 血清・補体処理細胞とした。この処理で、胸腺細胞は対照で、5%以下の細胞がトリパンブルー液 (0.1%) で染色され、95%以上の細胞が障害をうけなかったのに対し、処理細胞では94%が障害をうけた。

標的細胞障害試験: Mifune *et al.* (1979) の方法に従って行なった。MNB細胞に CVS株を、multiplicity of infection (m. o. i.) を3にして感染させ、37°C で12時間培養後、50 μ Ci の ⁵¹Cr で1時間標識し、DM で3回細胞を洗った後、 4×10^5 /穴の割合で MNB細胞をマイクロプレート (ファルコン社製 3040) に植えた。Effector cell と Target cell (E/T) の比を50:1~100:1としてマウス腹腔細胞または脾細胞を重層し、37°C で更に18時間培養した後、培養上清中の放射活性を測定し、Specific cytotoxic index (CI) を計算した。また、同時に培養液および感染細胞内のウイルス感染価も測定した。

ウイルス特異蛍光フォーカスサイズの測定:

MNB細胞を4チェンバースライド (Lab Tek 社製 4084) 上で増殖させ単層培養細胞とした。次に狂犬病ウイルスの CVS株を、100 FFU/チェンバーで感染させ、4時間培養後、正常脾細胞あるいは免疫脾細胞を静かに重層し、更に26時間、37°C で培養した。培養後、培養液は低速遠心し上清を中和抗体・インターフェロンおよびリンホトキシン活性を測定するために-75°C にストックした。

一方、MNB細胞は PBS (pH 7.4) で洗った後、冷アセトンで固定し、FITC 標識狂犬病ウイルスグロブリン (BBL 社製 40604) を用い、蛍光抗体直接法で染色した。対比染色としてエバンスブルーを用いた。蛍光顕微鏡 (オリンパス社製 Vanox) 下で、各々のウイルス特異蛍光フォーカスを形成している細胞数を数えた。40~60個のフォーカスについて計測し、平均値を求めた。対照群との比較を行ない、その有意性の検定には分散分析を行ない $P < 0.01$ で有意とした。

ウイルス中和抗体 (NT)・インターフェロン (IF) およびリンホトキシン (LT) の測定: NTは Smith

et al. (1973) の方法に準じ、CER 細胞を用いて迅速蛍光フォーカス抑制試験で行なった。また IF はマイクロカルチュアプレート (ファルコン社製 #3040) に用意した L₉₂₉ 細胞を用い、100TCID₅₀ の VSV の攻撃に対する細胞変性 (CPE) の抑制法で定量した (Mifune *et al.*, 1980)。LT は Simizu *et al.* (1977) の方法に準じて L₉₂₉ 細胞、MNB 細胞を使用して測定した。

成 績

免疫脾細胞による標的細胞障害活性の経時的变化: 生および BPL 不活化 Flury-HEP 株で免疫されたマウスの脾細胞による細胞障害活性の経時的变化を、⁵¹Cr-release 法で測定した。図 1 に示す如く、免疫後 4 日目から細胞障害活性が認められ、7 日目にピークに達し、その後次第に低下して、14 日目には殆んど消失した。BPL 不活化ウイルスで免疫されたマウスの脾細胞も、生ウイルスとほぼ同様の活性のパターンが見られた。この免疫脾細胞の標的細胞障害活性の経時的变化は、Wiktor *et al.* (1977) の報告とも一致し、また免疫腹腔細胞を用いても同様の結果が得られることは既に報告 (三舟ら, 1980a) したが、今回、更にこれを確認した。

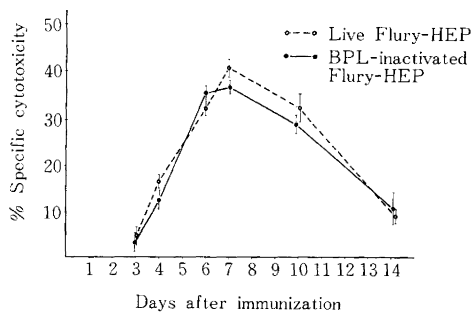


Fig. 1 Development of cell-mediated cytotoxic activity of spleen cells of mice immunized with rabies virus.

免疫細胞の抗ウイルス活性: 免疫脾細胞が MNB 細胞内でのウイルス産生にどのように作用するかを見るために、以下のような予備実験を行なった。MNB 細胞に CVS 株を m.o.i. 3 で感染させ、4 時間後に免疫 7 日目の脾細胞を E/T 比 100 で重層し、37°C で 20 時間培養した。培養後、培養瓶を 3 回凍

結・融解し、低速遠心後その上清中のウイルス感染価を測定した。この脾細胞の標的細胞障害活性も同時に測定した。表 1 に示したごとく、正常脾細胞とウイルス感染 MNB 細胞との同時培養でも、脾細胞を加えない対照と比較し、約 90% のウイルス量の低下が認められたが、免疫脾細胞との同時培養では、それを上回る著明なウイルス量の減少が認められた。また、この免疫脾細胞は高い細胞障害活性を示した。次に、この抗ウイルス活性が脾細胞のどの細胞分画に存在するかを知るため、腹腔細胞からナイロンウールカラム法による Tリンパ球 (PE-T) と、ガラス付着細胞 (PE-Ad) とを分画し、脾細胞と同様の方法で培養し、抗ウイルス作用を見た。免疫 PE-T の抗ウイルス作用は免疫脾細胞に比べるとそれほど著明ではなかったが、正常 PE-T のそれに比して、有意のウイルス産生抑制が見られたのに対し、PE-Ad では免疫群及び非免疫共にウイルス量を 90% 以上減少させ、免疫特異性が認められなかった。以上の結果から、免疫 7 日目の脾細胞には、標的細胞障害活性と同時に抗ウイルス作用が認められること、そしてそれは、免疫特異的な標的細胞障害活性を有する Tリンパ球によること、PE-Ad 細胞には免疫非特異的な抗ウイルス作用があることが示唆された。

しかしながら、以上の予備実験では、免疫脾細胞が如何にしてウイルス産生を抑制しているのか、即ち免疫脾細胞が直接的にウイルス感染細胞に何らかの作用を及ぼし、ウイルスの増殖に影響を及ぼしているのか、あるいは、脾細胞が産生する NT 抗体、さらには、免疫された抗原との接触により産生される IF あるいは LT が介在しているのか等が不明である。そこで、これらの点をより明確にするため、Ennis (1973) が、ヘルペスウイルス免疫脾細胞を用いて行なったブラックサイズ抑制法を利用して、狂犬病ウイルス免疫脾細胞が、ウイルスの周辺細胞への伝播に対して、どのような影響を及ぼすかを検討した。そして同時に、脾細胞とウイルス感染細胞の培養液の NT 抗体・IF および LT 活性をも調べた。

接種ウイルス量と蛍光フォーカス数との関係: 狂犬病ウイルスのブラックを形成する組織培養細胞株は非常に少なく、稀にあって、それは特殊なウイルス株—細胞系でのみ可能であり、従ってこの実験

Table. 1 Antiviral activity of rabies virus immune cells of mice in virus-infected murine neuroblastoma cells*

Effector cells	E/T ratio**	Specific cytotoxic index(%)	Virus yield (Log ₁₀ FFU/ml)	Reduction of virus titer
Immune spleen cells	100	24.6±4.6	5.0	2.4
Normal spleen cells	100	0.3±3.3	6.4	1.0
Immune PE-T cells ⁺	50	31.7±6.4	6.2	1.2
Normal PE-T cells ⁺	50	— 3.5±1.8	6.9	0.5
Immune PE-Ad cells ⁺⁺	75	4.6±3.3	6.0	1.4
Normal PE-Ad cells ⁺⁺	75	— 1.8±2.2	6.1	1.3
Medium only	—	—	7.4	

* The monolayers of murine neuroblastoma cells were infected with plaque-purified CVS strain of rabies virus at a moi of 3FFU/cell. Four hr later, the effector cells, harvested on day 7 after immunization, were carefully overlaid on the monolayers with varying E/T ratio and incubated at 37C. After 20 hr, the cultures were frozen and thawed 3 times and the supernatant fluids after low speed centrifuzation were assayed for the virus infectivity.

** Effector to target cell ratio.

⁺ T cell enriched population from peritoneal exudate cells.

⁺⁺ Glass adherent cell population from peritoneal exudate cells.

では、ブラック形成法の代わりに、蛍光フォーカス形成法を使用することにした。適当な濃度のウイルス液を5倍階段希釈し、4チェンバースライド上のMNB細胞に接種し、37°Cで30時間培養した後、冷アセトンで固定し、蛍光抗体直接法で染色し、蛍光フォーカス数とウイルス接種量との関係を見た。図2のごとく、両者の間には直線的なDose responseが見られ、この培養時間内では、MNB細胞内で増殖したウイルスが培地を介して他に広がり、新しいフォーカスを作ることは無いものと考えて以下の実験を行なった。

重層する脾細胞数と感染 MNB 単層培養で観察されるフォーカスサイズとの関係：非附着性脾細胞の数とMNB細胞数との割合を100:1, 50:1, 25:1, 10:1として脾細胞をウイルス感染MNB細胞上に重層し、26時間培養した後の蛍光フォーカスの大きさを、免疫脾細胞を重層した場合と、正常脾細胞を重層した場合とで比較した。表2に示したごとく、100:1で脾細胞を重層すると、免疫群及び非免疫群共に非特異的な抑制が見られたが、50:1および25:1とすると、免疫群が非免疫群に比べフォーカスサイズを有意に抑制した。10:1では免疫群・非免疫群共に、脾細胞を含まない培地だけで培養した時のフォーカスサイズとはほぼ同じになり、

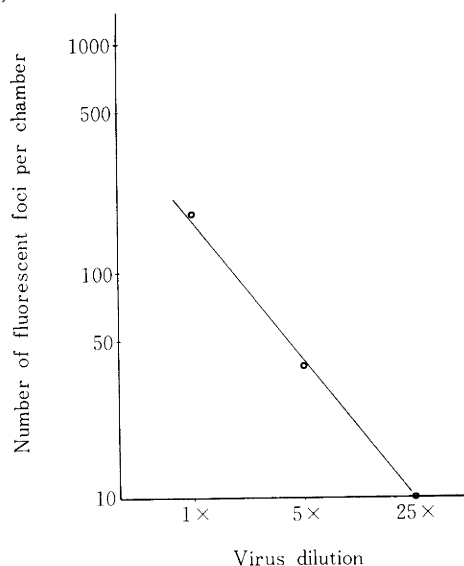


Fig. 2 Relation between virus inoculum and number of fluorescent foci of rabies virus in murine neuroblastoma cells after 30hr of incubation period.

脾細胞の影響が余り認められなくなった。この実験結果から、以下の実験では脾細胞数とMNB細胞数との割合を50:1とした。

Table. 2 Effect of the number of spleen cells on rabies virus focus size in murine neuroblastoma cells

Ratio of spleen cells to monolayer cells	Focus size*		Reduction rate(%)	Analysis of variance
	Non-immune**	Rabies immune***		
100 : 1	3.8	3.4	10.5	NSS ⁺
50 : 1	9.3	4.9	47.3	P<0.01
25 : 1	10.8	5.2	51.9	P<0.01
10 : 1	19.7	18.1	8.1	NSS
No spleen cells	23.2			

* Average number of cells an immunofluorescent focus consisted.

** Nonadherent spleen cells from non-immune mice.

*** Nonadherent spleen cells from mice 6 days after immunization with Flury-HEP strain of rabies virus.

+ Not statistically significant.

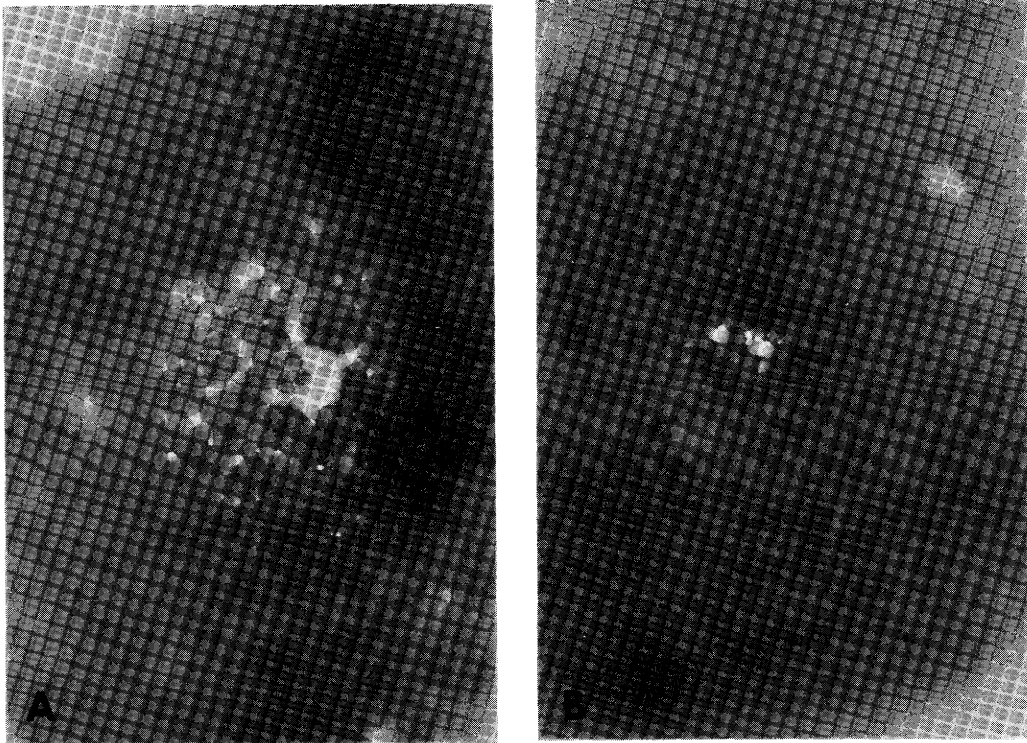


Fig. 3 Immunofluorescent focus of rabies virus infected murine neuroblastoma cells. The cells in the 4-chamber slide were infected with 100 FFU per chamber of plaque purified rabies virus. Four hr after infection, the cells were overlaid with either (A) non-immune spleen cells or (B) rabies immune spleen cells and further incubated at 37C for 26hr. After the incubation period, infected cells were harvested and fixed with cold acetone and stained with FITC-conjugate anti-rabies glubulin.

免疫脾細胞による蛍光フォーカスサイズ抑制効果: 感染MN B細胞上に正常脾細胞, 免疫脾細胞を重層し, 感染後30時間目のフォーカスサイズを比較した. 図3 Aは正常脾細胞を重層した時の蛍光フォーカスであり, 実験により, 5~20個の細胞より成る蛍光フォーカスを形成した. 図3 Bは免疫脾細胞を重層した時の蛍光フォーカスであり, 通常1~5個の細胞より成っており, 有意のフォーカスサイズの抑制が認められた. また, 感染MN B細胞の免疫脾細胞との培養では, 1個の細胞当たりのウイルス蛍光抗原量が, 正常脾細胞との培養の時に比べて減少していることが肉眼的に認められた.

フォーカスサイズを, 正常脾細胞と共に培養した場合と, 免疫脾細胞と培養した場合について比較した結果を表3に示した. 正常脾細胞をウイルス感染MN B細胞に重層し培養した際のフォーカスサイズ

は平均6.2であるのに対し, 免疫脾細胞を重層した場合は3.2となり, 48.4%のフォーカスサイズの抑制が認められ, これは統計的に有意 ($P < 0.01$) の差であった. 次に, この脾細胞からプラスチック面付着細胞を除いた脾細胞 (非付着性脾細胞) について同様の実験を行なった (Exp. II). 正常細胞でのフォーカスは9.3であるのに対し, 免疫細胞では4.9となり, 47.3%の抑制が認められた ($P < 0.01$). この非付着性脾細胞を, 更にナイロンウールカラムに通し, 通過した細胞について同様の実験を行なった. ここでも, 免疫細胞由来の細胞で, 正常細胞由来の細胞に比べ, 47.3%と, 有意 ($P < 0.01$) のフォーカスサイズの抑制が認められた (Exp. II).

以上の脾細胞と感染MN B細胞との同時培養した時のそれぞれの培養液からは, Ab, IF, LT は検出されなかった. このことは, 免疫脾細胞によるフ

Table. 3 Characterization of focus size reduction activity of immune spleen cells in rabies virus-infected murine neuroblastoma cells

Expt.	Effector cells	Immune status to rabies virus	Treatment	Focus size*	Reduction rate(%)	Analysis of variance	Ab, IF and LT assay**
Expt. I.	Spleen cells	Non-immune	None	6.2			Ab(-) IF(-) LT(-)
		Immune	None	3.2	48.4	$P < 0.01$	
Expt. II.	Spleen cells	Non-immune	Adherent cells depleted	9.3			Ab(-) IF(-) LT(-)
		Immune	Adherent cells depleted	4.9	47.3	$P < 0.01$	
	Nylon wool column effluent cells	Non-immune	None	11.0			Ab(-) IF(-) LT(-)
		Immune	None	5.8	47.3	$P < 0.01$	
Expt. III.	Nonadherent spleen cells	Immune	Culture medium and complement	2.1			Ab(-) IF(-) LT(-)
		Immune	Anti-Thy-1 serum and complement	6.6	68.2	$P < 0.01$	
Expt. IV.	Nonadherent spleen cells	Non-immune	None				
		Non-immune but immune to Sindbis virus	None	7.9			NT+
			None	5.6	29.1	NSS***	

* Average number of cells an immunofluorescent focus consisted.

** Ab(neutralizing antibody), IF(interferon) and LT(lymphotoxin) in infected culture media were assayed as described in the text.

*** Not statistically significant.

+ Not tested.

フォーカスサイズの抑制が、同時培養により、免疫脾細胞あるいは感染MNB細胞から放出されたNT抗体、IFあるいはLTによる抑制ではなく、感作T細胞自身による作用であることを示唆するものと考えられた。

次に、この感作T細胞を抗Thy-1血清と補体で破壊した時のフォーカスサイズに及ぼす影響をみた(Exp. III)。対照とした、免疫脾細胞を培地と補体で処理した時のフォーカスサイズが2.1であるのに対し、抗Thy-1血清と補体で処理するとフォーカスサイズは6.6となり、抑制が解除された。また、この抑制効果が狂犬病ウイルス免疫脾細胞に特異的であるか否かを見るために、シンドビスウイルス免疫脾細胞を狂犬病ウイルス感染MNB細胞に重層し、そのフォーカスサイズを正常脾細胞を重層した場合と比較した(Exp. IV)。シンドビスウイルス免疫リンパ球には、シンドビスウイルス感染細胞に対し標的細胞障害活性があることが報告されている(McFarland, 1974)。しかしながら、シンドビスウイルス免疫脾細胞には、狂犬病ウイルス感染

MNB細胞でのフォーカスサイズ抑制効果は低く、有意性を示さなかった。

フォーカスサイズ抑制効果を示す標的細胞の特異性の検討：免疫脾細胞によるフォーカスサイズの抑制効果が、標的細胞の種類によって如何に発現するか、即ち、標的細胞障害活性が発現するための条件として、Effector cellとTarget cellのH-2 haplotypeが共通、あるいはH-2KまたはH-2Dのいずれかが共通であることが必要であることが報告されている(Doherty and Zinkernagel, 1975; Shearer and Schmitt-Verhulst, 1977)が、同様のことがフォーカスサイズ抑制効果発現の際にも必要であるか否かを検討した。C3H/Heマウス(H-2^{kk})とH-2Kが共通なMNB細胞(H-2^{kd})と、狂犬病ウイルスに対し感受性の高いハムスター由来と考えられるCER細胞(Smith *et al.*; 1977)とを用いて同様の実験を行なった。MNB細胞でのフォーカスサイズは免疫脾細胞によって有意に抑制されるが、CER細胞でのフォーカスサイズの抑制は少なく、有意性を示さなかった(表4)。

Table. 4 Effect of the difference of virus-infected target cells on the focus size reduction activity of rabies virus immune nonadherent spleen cells

Target cells	Focus size*		Reduction rate(%)	Analysis of variance
	Non-immune	Rabies immune		
MNB**	16.3	6.0	63.2	P<0.01
CER	36.8	24.6	33.0	NSS***

* Average number of cells an immunofluorescent focus consisted.

** Murine neuroblastoma cells.

*** Not statistically significant.

なお、成績には示さなかったが、使用した感染CER細胞の細胞表面には、ウイルス抗原が発現されることが、抗狂犬病ウイルス血清と補体による抗体依存性細胞溶解反応により確かめられている。

免疫脾細胞によるフォーカスサイズ抑制効果の経時的変化：マウスを生ウイルスあるいはBPL不活化ウイルスで免疫し、それぞれ6日目、14日目、あるいは初回免疫後10日目に初回の1/2量の同一免疫原をi. p. で追加免疫した4日後に、脾細胞を採取し、それらのフォーカスサイズ抑制活性を測定し

た。表5に示すごとく、免疫後6日目のナイロンウール通過性脾細胞、非付着性脾細胞で高いフォーカスサイズ抑制効果が認められたが、免疫後14日目の脾細胞ではこの活性は低下していた。また、10日目に追加免疫を行なうと、初回免疫後14日目でも高い活性が保持されているのが認められた。また、BPL不活化ウイルスで免疫した場合も、生ウイルスで免疫した場合とほぼ同様の活性およびその活性の経時的変化が認められた。

Table. 5 Development of focus size reduction activity of spleen cells after immunization with live or inactivated virus

Effector cells	Stimulant	Day spleen cells harvested after immunization	Focus size*		Reduction rate(%)	Analysis of variance	Ab, IF and LT assay**
			Non-immune	Rabies immune			
Nylon wool effluent spleen cells	Live virus	6	14.1	6.0	57.4	P<0.01	Ab(-) IF(-) LT(-)
Nylon wool effluent spleen cells	Live virus	14	14.1	10.	28.4	NSS*	Ab(-) IF(-) LT(-)
Nylon wool effluent spleen cells	Live virus	14 ⁺⁺	14.1	6.1	56.7	P<0.01	Ab(-) IF(-) LT(-)
Nonadherent spleen cells	BPL-inactivated virus ⁺⁺⁺	6	19.8	7.6	61.6	P<0.01	Ab(-) IF(-)
Nonadherent spleen cells	BPL-inactivated virus	14	19.8	12.3	37.8	P<0.01	Ab(-) IF(-)
Nonadherent spleen cells	BPL-inactivated virus	14 ⁺⁺	17.1	1.0	94.4	P<0.01	Ab(-) IF(-)

* Average number of cells an immunofluorescent focus consisted.

** Ab(neutralizing antibody), IF(interferon) and LT(lymphotoxin) in infected culture media were assayed as described in the text.

+ Not statistically significant.

++ Mice were received second i. p. injection 10 days after primary injection with the same antigen.

+++ β -propiolactone inactivated virus.

考 察

狂犬病ウイルスで免疫されたマウス脾細胞には、MNB細胞で、狂犬病ウイルスの周辺細胞への伝播を抑制する抗ウイルス活性があることが明らかになった。使用した蛍光フォーカスサイズ抑制試験は、ヘルペスウイルス、ワクチニアウイルス感染に引続く、細胞性免疫応答の1つのパラメーターと考えられるブラック径抑制試験(Ennis, 1973; Simmon *et al.*, 1974; Simizu *et al.*, 1977; Morinishi and Hayashi, 1978)の応用であるが、狂犬病ウイルスのように、感染細胞に細胞変性効果を示しにくく、従ってブラック形成が困難なウイルスの場合には、この方法が有用であると思われる。また、この方法では、ウイルスの伝播を、細胞内のウイルス抗原で直接に観察するため、フォーカスのサイズの計測と共に抗原量の変化も見ることができた。

この蛍光フォーカスサイズ抑制活性は、免疫後、脾細胞に出現するウイルス感染標的細胞障害活性と時期を同じくして認められ、免疫後6日目に高く、

14日目には低下していた。しかし、免疫後10日目に追加免疫をしたマウスの群の脾細胞には、初回免疫後14日目でも、まだかなり高いフォーカスサイズ抑制活性を保持していた。

この活性は、免疫脾細胞のナイロンウールカラム通過細胞に活性が認められること、抗Thy-1血清と補体で処理すると、この活性が消失すること、ウイルス感染MNB細胞と脾細胞の混合培養液中に、ウイルスNT抗体、IF、あるいはLTが証明されなかったことから、脾細胞のTリンパ球が所持しているものと思われる。

また、このフォーカスサイズ抑制活性の発現には、免疫脾細胞と標的細胞の組織適合性抗原が少なくとも一部共通している必要があるように推測された。この研究では、組織適合性抗原の異なった種々の細胞を使用することができなかったが、マウスの組織適合性抗原(H-2)とK領域を共有するMNB細胞では、顕著なフォーカスサイズの抑制が認められたのに対し、MNB細胞と同様に、狂犬病ウイル

スに対し高い感受性があり、細胞表面にウイルス抗原の発現をしているハムスター由来 (Smith *et al.*, 1977) といわれる CER 細胞を使用した場合、33% の抑制が認められたものの、有意の抑制は認められなかった。Wiktor *et al.* (1977) は、狂犬病免疫脾細胞の標的細胞障害活性の発現に関し、H-2 遺伝子座の異なるマウスを使用した実験を行ない、狂犬病ウイルスの場合、他のウイルスとは異なり、H-2 遺伝子座に共通のものが無い場合でも、多少の活性が認められることを報告している。CER細胞で見られた若干のフォーカスサイズの抑制が、このような細胞障害活性の反映なのかは不明であるが、今後、組織適合性抗原の異なる数多くの細胞で調べる必要があると思われる。

この研究では、感作Tリンパ球がどのような機序で、ウイルスの、周囲細胞への伝播を抑制しているかについては明確にすることはできなかった。しかしながら、このフォーカスサイズ抑制活性が、細胞障害活性と時期を同じくして出現すること、組織適合性抗原のK領域が共通する細胞で顕著に出現する傾向が認められたことから、感作リンパ球による細胞障害活性と密接な関係があることが推測された。

三舟ら (1980, b) は、Tリンパ球の欠如するヌードマウスにおいて、Postexposure vaccination が無効であること、その機序として、ヌードマウスにおける中和抗体の産生能の欠除では説明が困難であること、対照マウスからの免疫脾細胞の移入により、ウイルス攻撃に耐えるヌードマウスが増加すること等から、Postexposure vaccination による狂犬病発症防禦機構に、細胞性免疫が重要な役割をしている可能性を報告しているが、本研究で明らかにされた、*in vitro* での免疫脾細胞の抗ウイルス作用は、三舟ら (1980, b) の *in vivo* の成績を支持するものと考えられる。

この研究からは、免疫マクロファージの抗ウイルス効果についても、明確にすることができなかった。腹腔細胞のプラスチック面付着細胞を、ウイルス感染細胞と混合培養すると、非免疫マウスからのプラスチック面付着細胞も、免疫マウスからのそれと同程度のウイルス産生抑制効果がみられ、免疫の特異性は認められなかった。しかしながら、Turner *et al.* (1976) は、免疫されていない正常の成熟マウスのマクロファージは、*in vitro* で狂犬病ウイル

スを貪食し、ウイルスはその中では増殖しないこと、成熟マウスのマクロファージを、ウイルスに感受性の高い同種の乳のみマウスの腹腔内に移入後、狂犬病ウイルスを腹腔内感染させると、1~2日間の延命効果があったことを報告している。また、狂犬病ワクチン投与によって大量のIFが産生され、このIF産生が、狂犬病発症防禦に非常に重要であることが報告されている (Wiktor *et al.*, 1972; Baer *et al.*, 1977; Weinman *et al.*, 1979; Mifune *et al.*, 1980) が、最近、IFが単に抗ウイルス作用のみでなく、マクロファージあるいはNatural killer細胞を活性化することが報告されている (Hamburg *et al.*, 1978; Trinchieri *et al.*, 1978) ことを考えると、マクロファージも狂犬病発症防禦に重要な役割をしていることが予測される。

BPL不活化ワクチンで免疫されたマウスの脾細胞にも、生ウイルスによる免疫と同様に、ウイルス感染標的細胞障害活性とウイルス伝播抑制活性が認められた。細胞障害活性が、不活化狂犬病ウイルス免疫により脾細胞に出現することは、既に Wiktor *et al.* (1977) も報告しているが、この他、ワクチニアウイルス (Hapel *et al.*, 1978)、センダイウイルス (Palmer *et al.*, 1977; Sugamura *et al.*, 1977; Gething *et al.*, 1978) においても、不活化ウイルス免疫で細胞障害活性が発現することが報告されている。この機序として、エンベロープウイルスで膜融合をおこして細胞に侵入するウイルスでは、Stimulator cellの膜に不活化ウイルス膜が融合され、結果的に、細胞障害活性を発現させるために必要なH-2抗原との相互反応が起きるためであると説明されている (Lawman *et al.*, 1980)。狂犬病ウイルスでは、まだこの種の知見は得られていないが、このことは、不活化ワクチンによるPostexposure prophylaxisの機構を考える上で非常に重要であろう。

現在、狂犬病のPostexposure vaccinationに確立された方法はない。不適当なワクチン投与による、いわゆる早期死亡が報告されている (Sikes *et al.*, 1971)。また、中和抗体やIF産生能の良いワクチンの検討もなされている (Nicholson *et al.*, 1979; Rosanoff *et al.*, 1979; Anderson *et al.*, 1980)、これに加えて、細胞性免疫が効果的に賦活するようなワクチン投与方法が発症防禦に重要である

と考えられる。

結 論

狂犬病ウイルスで免疫されたマウスの脾細胞に、*in vitro* で狂犬病ウイルスの周辺細胞への伝播を抑制する活性が認められた。この活性は、同時に脾細胞に発現する標的細胞障害活性と時期を同じくして発現し、免疫後6日ないし7日目に高く、14日目には低下していた。この抗ウイルス活性は、脾細胞のナイロンウールカラム非付着性分画に認められること、脾細胞の抗Thy-1血清と補体による処理で、活性が消失すること、ウイルス感染細胞と免疫脾細

胞との混合培養液中に、ウイルス中和抗体、インターフェロンあるいはリンホトキシンは検出されなかったことから、Tリンパ球に存在することが推測された。また、この活性の発現には、ウイルス感染細胞とTリンパ球が、同一組織適合性抗原を共有する必要がある傾向が認められた。 β -propiolactone で不活化したワクチンで免疫した場合も、生ウイルスによるのとはほぼ同様に、この活性が認められた。これらの所見は、狂犬病の postexposure vaccination による発症防禦機構における細胞性免疫の役割を研究する上で重要な知見であると思われる。

謝 辞

懇切な御指導と御校閲を賜った、大分医科大学 三舟求真人教授に心から感謝の意を表しますと共に、御指導御鞭達を頂いた林薫教授、五十嵐章助教授、ならびに教室員一同に心から感謝します。

文 献

- 1) Aderson, L. J., Sikes, R. K., Langkop, C. W., Mann, J. M., Smith, J. S., Winkler, W. G. & Deitch, M. W. (1980): Postexposure trial of a human diploid cell strain rabies vaccine. *J. Inf. Dis.*, 133-138.
- 2) Baer, G. M. & Cleary, W. F. (1972): A model in mice for the pathogenesis and treatment of rabies. *J. Infect. Dis.*, 125, 520-527.
- 3) Baer, G. M. & Yager, P. A. (1977): A mouse model for post-exposure rabies prophylaxis: The comparative efficacy of two vaccines and of antiserum administration. *J. gen. Virol.*, 36, 51-58.
- 4) Doherty, P. C. & Zinkernagel, R. M. (1975): H-2 compatibility is required for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Exp. Med.*, 141, 502-507.
- 5) Ennis, F. A. (1973): Host defence mechanisms against herpes simplex virus. 1. Control of infection *in vitro* by sensitized spleen cells and antibody. *Infect. Immun.*, 7, 898-904.
- 6) Gething, M. J., Koszinowski, U. & Waterfield, M. (1978): Fusion of Sendai virus with the target cell membrane is required for T cell cytotoxicity. *Nature*, 274, 289-291.
- 7) Hamburg, S. I., Manejias, R. E. & Rabinovitch, M. (1978): Macrophage activation: Increased ingestion of IgG-coated erythrocytes after administration of interferon inducer to mice. *J. Exp. Med.*, 147, 593-598.
- 8) Hapel, A. J., Bablanian, R. & Cole, G. A. (1978): Inductive requirements for the generation of virus specific T lymphocytes. 1. The nature of the host cell virus interaction that triggers secondary poxvirus specific cytotoxic T lymphocyte induction. *J. Immunol.*, 121, 736-743.

- 9) Julius, M. H., Simpson, E. & Herzenberg, L. A. (1973): A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 3, 645-649.
- 10) Kaplan, M. M., Wiktor, T. J. & Koprowski, H. (1975): Pathogenesis of rabies in immunodeficient mice. *J. Immunol.*, 114, 1761-1765.
- 11) Lagrange, P. H., Tsiang, H., Hurtrel, B. & Ravisse, P. (1978): Delayed-type hypersensitivity to rabies virus in mice: Assay of active or passive sensitization by the footpad test. *Infect. Immun.*, 21, 931-939.
- 12) Lawman, M. J. P., Rouse, B. T., Courtney, R. J. & Walker, R. D. (1980): Cell-mediated immunity against herpes simplex induction of cytotoxic T lymphocytes. *Infect. Immun.*, 27, 133-139.
- 13) Macpherson, I. & Luc Montagnier. (1964): Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology*, 23, 291-294.
- 14) Mc Farland, H. F. (1974): In vitro studies of cell-mediated immunity in an acute viral infection. *J. Immunol.*, 113, 173-180.
- 15) Mifune, K., Nakamura, M & Mannen, K. (1979): Persistent infection of avirulent strain of rabies virus in immunosuppressed mice. *Trop. Med.*, 21, 131-138.
- 16-a) 三舟求真人, 七条明久, 牧野芳大, 武内恵理子, 山田昭, 坂本国昭 (1980): 狂犬病の発症機転と生体防御. 感染初期における生体防御 (第3回阿蘇シンポジウム記録), 136-147, 小池聖淳・林薫編, 南山堂, 東京.
- 16-b) 三舟求真人, 七条明久, 武内恵理子, 牧野芳大, 坂本国昭, 山田昭 (1980): 感染後ワクチン投与によるマウス狂犬病の発症防御. (2)ヌードマウスでのワクチンの無効性. 第28回日本ウイルス学会総会演説抄録, 2092.
- 17) Mifune, K., Shichijo, A., Makino, Y., Takeuchi, E., Yamada, A. & Sakamoto, K. (1980): A mouse model for the pathogenesis and post-exposure prophylaxis of rabies. *Microbiol. Immunol.*, 24, 835-845.
- 18) Morinishi, T. & Hayashi, K. (1978): Meningeal exudate cells in vaccinia meningitis of mice: Role of local T cells. *Infect. Immun.*, 20, 752-759.
- 19) Nicholson, K. G., Kuwerner, L. & Harrison, P. (1979): Interferon response to human diploid cell strain rabies vaccines in man. *Arch. Virol.*, 61, 35-39.
- 20) Palmer, J. C., Lewandowski, L. J. & Waters, D. (1977): Non-infectious virus induces cytotoxic T lymphocytes and bind to target cells to permit their lysis. *Nature*, 269, 595-597.
- 21) Rosanoff, E. & Tint, H. (1979): Responses to human diploid cell rabies vaccine: Neutralizing antibody responses of vaccinees receiving booster doses of human diploid cell rabies vaccine. *Amer. J. Epidem.*, 110, 322-327.
- 22) Shearer, G. M. & Schmitt-Verhulst, A-M. (1977): Major histocompatibility complex restricted cell-mediated immunity. *Advances in Immunology*, 25, 55-92.
- 23) Shimizu, F., Hanaumi, K., Shimizu, Y. & Kumagai, K. (1977): Antibody-dependent cellular protection against herpes simplex virus dissemination as revealed by viral plaque and infectivity assays. *Infect. Immun.*, 16, 531-536.
- 24) Sikes, R. K., Cleary, W. F., Koprowski, H., Wiktor, T. J. & Kaplan, M. M. (1971): Effective protection of monkeys against death from street virus by postexposure administration of tissue culture rabies vaccine. *Bull. W. H. O.*, 45, 1-11.
- 25) Simmons, R. L. Centifanto, Y. & Kaufman, H. E. (1974): Plaque size reduction as a measure

- of viral cell-mediated immunity. *Infect. Immun.*, 10, 1034-1039.
- 26) Smith, A. L., Tignor, G. H., Mifune, K. & Motohashi, T. (1977): Isolation and assay of rabies serogroup viruses in CER cells. *Intervirology*, 8, 92-99.
 - 27) Smith, J. S., Yager, P. A. & Baer, G. M. (1973): A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull. W. H. O.*, 48, 535-541.
 - 28) Sugamura, K., Shimizu, K., Zarling, D. A. & Bach, F. G. (1977): Role of Sendai virus fusion-glycoprotein in target cell susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature*, 270, 251-253.
 - 29) Tignor, G. H., Mifune, K. & Smith, A. L. (1976): The immunopathology of rabies, p. 13-14. *In* Symposium on advances in rabies research. Atlanta, U. S. Department of Health, Education and Welfare.
 - 30) Trichieri, G., Santoli, D., Dee, R. R. & Knowles, B. B. (1978): Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation. *J. Exp. Med.*, 147, 1299-1313.
 - 31) Tsiang, H. & Lagrange, P.H. (1980): In vivo detection of specific cell-mediated immunity in street rabies virus infection in mice. *J. gen. Virol.*, 47, 183-191.
 - 32) Turner, G. S. & Ballard, R. (1976): Interaction of mouse peritoneal macrophage with fixed rabies virus *in vivo* and *in vitro*. *J. gen. Virol.*, 30, 223-231.
 - 33) 山口一也 (1973) : 単層培養法, ウイルス実験学総論. 改訂二版, 144-150, 丸善, 東京.
 - 34) 矢田純一, 藤原道夫 (1980) : リンパ球機能検索法, 181-190, 中外医学社, 東京.
 - 35) Weinman, E., Majer, M. & Hilfenhaus, J. (1979): Intramuscular and/or intralumbar postexposure treatment of rabies virus-infected cynomolgus monkeys with human interferon. *Infect. Immun.*, 24, 24-31.
 - 36) Wiktor, T. J., Postic, B., Ho, M. & Koprowski, H. (1972): Role of interferon induction in the protective activity of rabies vaccines. *J. Infect. Dis.*, 126, 408-418.
 - 37) Wiktor, T. J., Kamo, I. & Koprowski, H. (1974): In vitro stimulation of rabbit lymphocytes after immunization with live and inactivated rabies vaccines. *J. Immunol.*, 112, 2013-2019.
 - 38) Wiktor, T. J., Doherty, P. C. & Koprowski, H. (1977): In vitro evidence of cell-mediated immunity after exposure of mice to both live and inactivated rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 334-338.