

P<sup>32</sup> による実験的流行性肝炎の研究

## 第 2 編

## 岡山県下に発生せる所謂流行性肝炎ウイルス接種マウス肝内に於ける燐代謝の Schmidt-Thanhauser 法による研究

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上栄教授)

田 辺 憲 也

〔昭和34年1月7日受稿〕

## 目 次

I 緒 言	3. 森本株10 <sup>-4</sup> 稀釈ウイルス接種マウスに於ける P <sup>32</sup> incorporation 特に DNA 及び RNA-PP 分割に於ける SA に就いて
II 実験材料及び実験方法	
III 実験成績	IV 総括及び考按
1. 小川株10 <sup>-2</sup> 稀釈ウイルス接種に於ける成績	V 結 論
2. 森本株の各稀釈ウイルス接種における成績.	

## I 緒 言

放射性同位元素を生物学的実験法に利用する事は近年急速な進歩を来し、生化学的な動的観察を非常に簡易に且つ正確ならしめるに至つた。放射性同位元素 P<sup>32</sup> を最初に生物学研究に利用したのは Stanley (1942年)<sup>1)</sup> で、タバコモザイク・ウイルスの増殖の研究に応用し、新開地を開いた。かくしてウイルスの構成、ウイルスの宿主細胞内に於ける運命及びウイルスと核酸の関係等多数の実験的研究がなされた。

そもそも Friedlich Miescher の研究を嚆矢として核酸はすべての型の細胞物質中に見出され、種々の重要な生物学的意義を有している事は周知の事実であり、一方ウイルスはその構成成分の大部分が核酸よりなる事に鑑み、更に寄生性が他の病原微生物に比して遙かに高度と考えられる点より、感染を蒙るならば宿主の核酸に変動の起る事は推測し得る。かかる見地より著者は当教室で分離した流行性肝炎ウイルスを腹腔内に接種し発症せしめたマウスの肝臓に就いて、Schneider 法により酸溶性燐、脂質燐、核酸燐、蛋白質燐分割に分け各分割に於ける燐代謝の動的観察を行い報告した<sup>2)</sup>。しかし核酸燐に就いては、6, 12病日に於てはウイルス病特有の代謝昂進を来し、組織内の核酸に関連した物質に激しい変動の起る事が観察され、22病日では逆に代謝が抑制される結果を得た。著者は更に総核酸としてではなく Desoxyribonucleic acid (以下 DNA と略す) 及び Ribonucleic acid (以下 RNA と略す)、Phosphoprotein (以下 PP と

略す) 分割に分け、各分割に於ては如何なる影響を蒙るものであるかを詳細に追究する目的をもつて Schmidt-Thanhauser 法によつて実験を行い些かの知見を得たのでここにその大要を報告する。

## II 実験材料及び方法

## 1) 実験材料

実験動物: 体重10g~13gの幼若健康白色マウスを用いた。

供試ウイルス: 実験に使用したウイルスは、村上等により昭和27年以来肝炎と診断された患者より分離された小川株及び森本株で、孵化鶏卵累代により分離され、その後マウスに累代されたものである。

小川株は急性肝炎患者肝より分離し、孵化鶏卵74代後マウスに40代継代せるものであり、森本株は発症後2週間目の肝炎患者血清より分離し、孵化鶏卵62代後マウス50代継代中のものより使用した。

放射性燐 (P<sup>32</sup>): 使用した P<sup>32</sup> は英国原子力会社よりの物を使用した。尚これは正燐酸の形のものであり、使用に際しては生理的食塩水で適当に稀釈し、NaOH 液で pH 7.3 に修正し、加熱滅菌後用いた。

## 2) 実験方法

累代マウスの肝を無菌的採取し、Homogeneizer で磨砕乳剤となし、生理的食塩水にて10倍稀釈の後、3000rpm 10分遠心せるものを10<sup>-1</sup> となし、その上清を生理的食塩水にて10<sup>-2</sup> 又は10<sup>-6</sup> に稀釈せしめ、0.3 ml 宛を接種ウイルス材料として用いた。

接種方法は第 I 編の<sup>2)</sup> 既述と同様マウス腹腔内接種を行つた。これら病毒接種後 6 日, 12 日, 22 日の 3 期を撰んで接種マウス群より無選択的に取り出し,  $P^{32}$  液を 0.3ml 腹腔内に注射す。この際  $P^{32}$  量は第 1 回注射時に  $10\mu\text{c}/0.3\text{ ml}$  になる如く調整し, 一連の実験では同時稀釈の物を用い, Count 測定は一連の実験終了後まとめて行う様にして誤差を最小限に止める様留意した。尙対照群は健康マウス肝乳剤の同一稀釈の物を腹腔内注射したもので, 各実験毎に対照群を併用し実験を行つた。尙一つの実験毎にマウスはすべて 3 匹宛を用い, 生物的誤差を平均化せしめる様注意した。

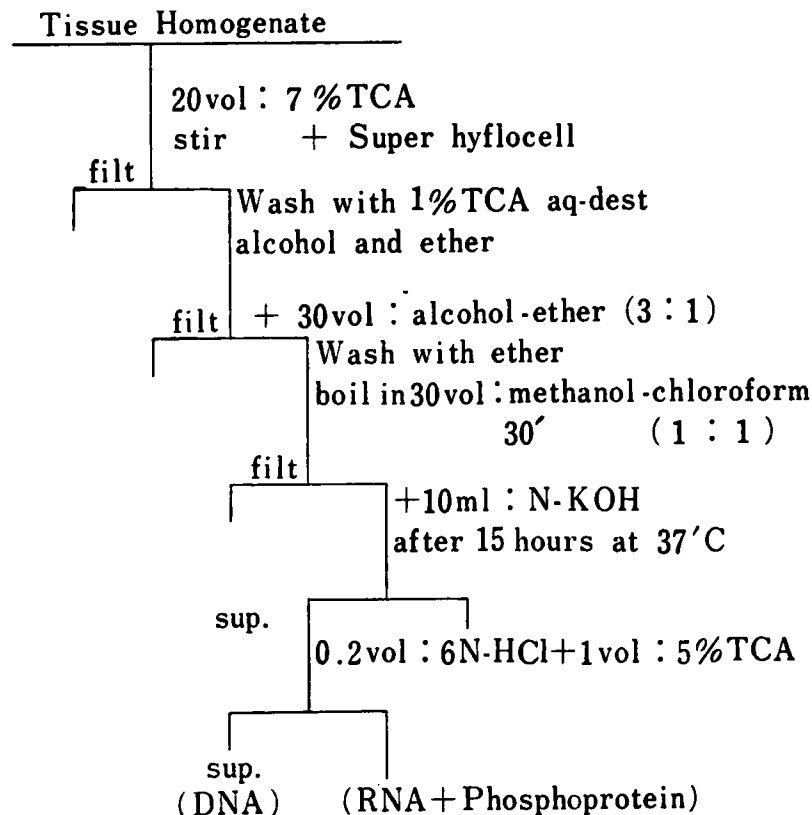
$P^{32}$  注射後 6 時間及び 24 時間にマウスを失血死せしめて肝を取り出し, 冷生理的食塩水にて洗滌後秤量を行い, Schmidt-Thanhauser<sup>3)</sup> 法によつて核酸分割を行つた。

即ち, 摘出した肝 1~2g を Waring brender にかき Homogenate にし, これに 20 容の氷冷 7% 三塩化醋酸 (TCA) を加え機械的に 20 分攪拌す。後

Hyflo の濾過助剤をしいた Büchner ロートで濾過する。残渣を 1% TCA 及び蒸溜水で洗い, 更にアルコール及びエーテルで洗う。次に残渣を湿量の 30 容アルコール・エーテル混液 (3:1) に懸濁し数分間沸騰せしめる。冷却後濾過し残渣をエーテルで乾燥せしめ, 乳鉢で細かくすりつぶし 30 容のメタノール・クロロホルム混液 (1:1) 中で 30 分間沸騰せしめる。冷却後濾過し残渣をエーテルで洗つて乾燥せしめる。かくして得られた乾燥試料に 10~20ml の N-苛性カリを加え 15 時間放置した後遠心沈澱によつて濾過助剤を除く。上清に 0.2 容の 6N-HCl と 1 容の 5% TCA を加えて沈澱を起させると, 沈澱は DNA を含み, 上清は RNA 及び燐蛋白の分解物を含んでいる。

かくして得られた 2 分割試料をキエルダールコルベンに取り, 第 1 編と同様の方法にて湿性灰化を行い, マグネシア混液添加により燐マグネシアアンモンの沈澱を作り, 測定皿に集めて Count 測定を行つた<sup>4)</sup>。

尙燐の比色定量<sup>5)</sup> を行う必要のある場合は, 灰化後



直ちに一定量を定量用試験管に分取しておく。(後述)

### ■ 実験成績

流行性肝炎患者より分離した病毒が, 孵化鶏卵継代後マウスの肝臓に親和性を有して来る事は当教室の幾

多の実験により追究されて居り, 又肝臓に物質代謝の変動を与える事は第 1 編に於て述べた, 著者は此等の実験を参照し, 核酸代謝の面を更に DNA 及び RNA, PP に分割して追究せんとして, 小川株, 森本株に就いて更に実験を進め, 以下 3 項に分けて詳述する。

1) 小川株10<sup>-2</sup>稀釈病毒接種に於ける成績  
 小川株接種マウスの肝を取り出し、10<sup>-2</sup> 稀 釈 病 毒  
 0.3 ml を腹腔内接種したマウスに就いて、6, 7,  
 12, 13, 22, 23病日に於ける肝のDNA及びRNAと磷  
 蛋白の磷代謝を検討した。即ち、即ち、6, 12, 22病

日を選んでマウスの腹腔内に P<sup>32</sup>の所定量を注射し、  
 6時間及び24時間後に肝を取り出し分割実験を行った。  
 (P<sup>32</sup> 注射後24時間のものは病日が1日加算される。)

此等の成績は表1~表3に示す通りでP<sup>32</sup>の inco-  
 rporation のみに就いて行った。何れも前述の如く1

表 1 Results of 6 days mouse after agent inoculation

Ogawa Strain 10<sup>-2</sup>

mouse No.	6 hours after P <sup>32</sup> injection				24 hours after P <sup>32</sup> injection			
	agent inoculation		control		agent inoculation		control	
	DNA	RNA PP	DNA	RNA PP	DNA	RNA PP	DNA	RNA PP
I	162	3018	120	3225	177	4242	165	4251
II	180	4010	102	3594	255	4817	150	3837
III	171	3660	87	3153	222	4011	162	4275
average	171	3563	103	3324	218	4357	159	4121

表 2 Results of 12 days-mouse after agent inoculation

Ogawa Strain 10<sup>-2</sup>

mouse No.	6 hours after P <sup>32</sup> injection				24 hours after P <sup>32</sup> injection			
	agent inoculation		control		agent inoculation		control	
	DNA	RNA PP	DNA	RNA PP	DNA	RNA PP	DNA	RNA PP
I	220	4315	130	3301	293	4256	180	3751
II	201	3865	151	3541	278	4501	192	3925
III	188	3652	106	3012	307	4952	175	4018
average	203	3944	129	3285	293	4570	182	3898

表 3 Results of 22 days- mouse after agent inoculation

Ogawa- Strain 10<sup>-2</sup>

mouse No.	6 hours after P <sup>32</sup> injection				24 hours after P <sup>32</sup> injection			
	agent inoculation		control		agent inoculation		control	
	DNA	RNA PP	DNA	RNA PP	DNA	RNA PP	DNA	RNA PP
I	208	2875	140	3112	254	2985	190	3451
II	195	2319	125	2985	232	2456	145	3119
III	254	2518	178	3277	285	3013	127	3095
average	219	2904	148	3125	257	2818	154	3222

回の実験には3匹宛を用いしかも表に示す如く3回実験を行つて各算術平均を行つた。此等に就いて見ると、6~7日と云う時期に於ては、DNAはP<sup>32</sup>注射後6時間及び24時間に於てP<sup>32</sup>のincorporationが著明な増加を認めている。これに比しRNA、P.Pは僅かに増加している程度の結果が得られ、感染初期に於ては酸溶性磷分劃増加に伴う派生的結果よりは別にDNAの著増を示し、ウイルス増殖に伴う細胞内変動を窺はしめる。更に12、13病日に於ては、DNAは6病日より更にP<sup>32</sup> incorporation増加の傾向を示している。又RNA及びPPに於ても正常肝に比し増加の傾向を示している。これは第I編に報告した12、13病日に於ては核酸磷分劃へのP<sup>32</sup> incorporationが最強であつたのを裏書きし、更にはDNA及びRNAを同一分劃として観察していたのに比し、マスクされていたDNA分劃の変動が詳細に突きとめる事が出来る訳である。22、23病日の感染末期に於てはやはりDNA分劃は減少の傾向をたどるとは云へ尙正常肝はより大なるincorporationを示して居り、RNA及びPPにては正常肝よりも減少の傾向を示して来る。流行性肝炎病毒接種マウスは感染発症もしくは感染死を起さしめるものではなくて不顕性感染で肝その他に於ける病理変化のみを主徴とするため、以上の実験と平衡して余分の肝を取り、病理組織標本を作製して実験の確実性を保ち、且つ代謝系の変動と病理変化の関連性を追究した。此等の病理的所見

は次の第4表に示す如くであつた。

即ち、感染初期に於ては星芒細胞の肥大増殖、実質細胞の侵潤、肝索解離等が現はれ始めるが、この時期は藤原等に依れば第一次Viraemieの時期に相当し、感受性肝細胞に定着するものと考えられる。一方P<sup>32</sup>使用の代謝系はこの時期にDNAの変動が激しくウイルスの発現に伴いかかる結果を得たものと考えられる。更に12~13病日に至ると此等の病変は更に高度となり、肝細胞壊死も起る一方実質細胞侵潤、肝索解離も高度となり、第二次Viraemieに相当し、肝組織内に大変動を惹起し、P<sup>32</sup>使用実験ではこの期にはDNAのみならずRNA及びPPにも変動を認めている。更に末期即ち22、23病日頃に至ると急性炎症性の所見は少なくなり、変性、肝索解離等の所見が残存して慢性の傾向に移行し始める。この時期にはRNA及びPPの分劃はincorporationが減少して来る結果を得た。

2) 森本株の各種病毒接種に於ける成績

上記実験に於ては、接種病原材料は10<sup>-2</sup>稀釈の物を0.3ml宛腹腔内接種を行つた。然し大賀等に依る感染価測定の実験報告では、高稀釈のものにても著明な病理変化を認め10<sup>-6</sup>~10<sup>-8</sup>稀釈ではむしろ10<sup>-2</sup>稀釈に比較して強い病理変化を認める事は第I編で既に述べ、Schneider法にて検討を加えた次第であるが、更にSchmidt-Thanhauser法に依つても検討を加えて見た。但しこの項に於ける実験はP<sup>32</sup>注射後12時間で肝を取り出して分劃を行つた。

表4 Histopathologic changes of liver Ogawa-Strain 10<sup>-2</sup>

Days after virus inoculation Histopathological change	Ogawa-Strain 10 <sup>-2</sup>					
	6	7	12	13	22	23
Necrosis of liver cell	-	-	+	+	+	+
Degeneration of liver cell	+	+	++	++	+	+
Hyperplasia of Kuffer cell	++	++	+	+	-	+
Wandering cell infiltration to parenchyma	+	++	+	++	+	+
Wandering cell infiltration to interstitial tissue	-	-	+	-	+	++
Dissociation of hepatic cords	+	+	+	+	++	++
Congestion	+	+	+	-	-	-

(++), (++) , (+), (+), (-) .. indicate the degree of histopathological change. (average of 3 mice)

表5 Results of dilution test of inoculated agent (12 hours after P<sup>32</sup> injection)

Days after virus inoculation Dil.		Morimoto-Strain		
		7	13	23
10 <sup>-2</sup>	DNA	295	342	261
	RNA PP	3425	3550	2198
10 <sup>-4</sup>	DNA	215	319	254
	RNA PP	3345	3699	2453
10 <sup>-6</sup>	DNA	345	457	211
	RNA PP	3211	4012	3845

先ずDNA分劃に就いて見るに、何れの稀釈に於ても最高のP<sup>32</sup> incorporationを示すのは13日である事には相違はない。然し此等の内でも10<sup>-6</sup>稀釈のものは他に比しincorporateが大であり、しかも7日の成績に於ても他より僅か乍ら高い価を示している。

RNA 及び PP の分割に於ても各稀釈共同様の傾向が見られ、13日が最高の incorporation を示している。各稀釈を比較するとこの分割に於ても10<sup>-6</sup>稀釈のものはやはり13日に於ても4012と高く、且つこの場合は22病日に於ても3845とかなり高い P<sup>32</sup> incorporation が残存する結果を得た。これらの成績と併行して行った病理組織標本に於ける所見は第6表の如くであるが、やはり10<sup>-6</sup>稀釈接種のものは他に比しやや強い病変が認められ22, 23病日に於ても強い病変が残存している結果が得られている。

表6 Histopathological changes of mice liver inoculated with various dilution virus

Morimoto Strain			
Dilution	Days after virus inoculation		
	7	13	23
10 <sup>-2</sup>	+	+	+
10 <sup>-4</sup>	+	+	+
10 <sup>-6</sup>	+	++	++

(++) (+) (+) : indicate the degree of histopathological change

3) 森本株10<sup>-4</sup>稀釈病変接種マウスに於ける P<sup>32</sup> Incorporation 特に DNA 及び RNA・PP 分割に於ける SA に就て

前記の実験にては供試マウスの肝を冷生理的食塩水にて洗滌後、正確に秤量して Schmidt-Thanhauser 法にて DNA 及び RNA・PP に分割したもので単位重量当りに換算した P<sup>32</sup> incorporation のみを示したのであるが、分割実験中に幾分の誤差が考えられ、しかも各病期の肝に於ける磷絶対量は夫々異なる訳である。かかる考察の基に P<sup>32</sup> incorporation count/p絶対量で示される Specific activity を算出して検討を加えた。即ち秤量後、DNA 及び RNA・PP に分割を行い、硫酸法にて湿性灰化を行った試料に就いて蒸溜水にて増量した後正確に 1/20 量の試料を定量用試験管に取り第1編に述べた法に依り比色定量を行った。残りの試料は実験方法にて述べた如く P<sup>32</sup> count 測定を行った。かくして得られた比色定量値及び P<sup>32</sup> count 数は全量に換算後第7表、第8表に示した。

かくして得られた SA を比較すると今迄に述べた差が更に著明なる事が分る。即ち磷交替率が何れの分割も初期に於て非常に昂進している。DNA に就いて見るに6, 7病日と云う初期に於て P 交替率は早くも

表7 Specific activity of P<sup>32</sup> incorporation (6 hours after P<sup>32</sup> injection)

Morimoto Strain 10 <sup>-4</sup>					
Days after agent inocul.					
	6	12	22	control	
DNA	Count	217	402	241	165
	P-γ	1060	1480	1800	1100
	SA	0.205	0.271	0.134	0.150
RNA	Count	6115	8241	4726	4687
	P-γ	3040	2440	3580	2650
	SA	2.01	3.37	1.32	1.77

表8 Specific activity of P<sup>32</sup> incorporation (24 hours after P<sup>32</sup> injection)

Morimoto Strain 10 <sup>-4</sup>					
Days after agent inocul.					
	7	13	23	control	
DNA	Count	247	513	244	232
	P-γ	1050	1610	1660	1180
	SA	0.285	0.319	0.147	0.197
RNA	Count	6622	9030	5652	5230
	P-γ	2440	2400	2340	2040
	SA	2.71	3.76	2.42	2.57

昂進して居り Virus 性疾患に特有な結果が得られている。12, 13病日に至ると交替率は更に上昇し、対照に比して約2倍近くの交替率を示し、P<sup>32</sup> incorporation のみにて観察していたのに比して差は更に明確となつて来る。22, 23病日には対照と略々等しいか、むしろ減少の傾向を示している。

RNA 及び PP の分割に就いて見ると6, 7病日に於てやや増加の傾向を示し、12, 13病日に至ると急に昂進した結果を得ている。22, 23病日に至ると DNA の場合の時と同様で対照に比して略々等しいか、やや減少した結果を得た。

#### IV 総括及び考按

著者は第1編に於て、流行性肝炎病変接種マウスの肝に於ける磷代謝の様相を窺う目的で Schneider 法に依つて、酸溶性磷、脂質磷、核酸磷、蛋白磷の分割に分ち些かの知見を得た事は既に報告した。その内で核酸磷分割に於ける変動がかなり著明である事が解明し、此等はウィルス性疾患に於ける宿主側の特異的

な変化であることと推論したが、更にこの編に於ては核酸を更に DNA 及び RNA と蛋白磷に分割して検討を行い、以上の成績を得たが総括すると次の如くなる。

即ち流行性肝炎ウイルス接種マウス肝に於ける核酸分割の  $P^{32}$  incorporation は、

1) DNA 分割への  $P^{32}$  の incorporation は、6, 7 病日と云うかなり早期に於て既に昂進して居り、12, 13 病日で最高値を示す。22, 23 病日と云う爾後慢性化に移行する時期に於ては、対照群との間に著変を認めなくなり寧ろ減退する傾向がある。

2) RNA 及び蛋白磷分割に於ては、6, 7 病日では対照群との間に於ては、6, 7 病日では対照群との間に著変は認められず、12, 13 病日に至つて初めて  $P^{32}$  incorporation の強い昂進が認められる。22, 23 病日では外観的には正常に復し対照群との間に著差は見出されなくなる。

3) マウスへの接種ウイルスの稀釈実験では、 $10^{-2}$ ~ $10^{-6}$ 稀釈のものにて実験を行つたが、 $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ にて  $P^{32}$  incorporation に強い変動を与え、病理所見と相俟つてかなりの病変を起すものと考えられる。

4) 更に核酸内磷代謝の様相を正確につかむ為に磷の絶対量を測定し、Specific activity にて示される磷交替率を算出した結果では、6, 7 病日及び12, 13 病日に於ける DNA の交替率は著明に昂進して居り、又12, 13 病日に於て RNA 分割が昂進している事が把握し得た。此処に行つた実験成績から見ると、流行性肝炎罹患マウス肝に於ては核酸代謝に変動のある事が窺われる。

既に Davidson 等<sup>6)</sup>等は、臓器に於ける DNA 及び RNA 量に就いて実験を行い各臓器によつて異なることを報告して居る。一方 Casperson<sup>7) 8)</sup>は、RNA は細胞質に主として関係し急激に増殖する癌細胞等では大量に含まれている事を見出して居り、一般組織に於ても RNA に比してかなりの交替が行われていると考えられる。之に反して DNA 分割は核染色質に於て居り、静止核に於ては極めて安定した平衡状態にあり  $P^{32}$  等も入り難いことが報告されている<sup>9)</sup>。DNA の交替率は、小腸粘膜に最も大きい事を Hevesy<sup>10)</sup> が Radioautograph で証明して居り、肝では非常に低いと述べている。著者の得た成績から見ても DNA 分割への  $P^{32}$  incorporation 乃至 SA は低い値が得られている。かかる為第1編で得られた Schneider 法に依る核酸分割の変動を検討しただけでは DNA 分割の変化はとかく見逃す危険性を伴う。かかる見地か

ら Schmidt-Thanhauser 法に依り分割を行い検討を加えた次第である。

DNA に於ては6, 7 病日と云う初期から incorporation 又は SA の増強を認め、12, 13 病日で更に高度の増加を認めた。前述の如く肝に於ける DNA は非常に安定であり、Davidson 等<sup>6)</sup>は再生肝に於ては高く有糸分裂に平行する事を報告しているが、単なる炎症性変化とか、絶食や蛋白缺乏では変動するものではない。著者の行える実験の場合、マウス肝に於ける病理所見でも6, 7 病日では壊死等は見られず、星芒細胞の肥大増殖や僅かの細胞浸潤、変性が見られる程度で再生的所見は見られないのに、DNA は初期に於て既に交替の増加を来して居り、所謂ウイルス性疾患に於ける特色ある所見ではないかと思惟する。この方面に関しては既に Hydén<sup>11)</sup> がウイルス感染に伴う宿主細胞の核酸変動を紫外線顕微鏡により観察し、堀田等<sup>12)</sup> がデング熱ウイルス罹患マウス脳に於て初期より核酸に大変動の起る事を指摘し、又、市川<sup>13)</sup>、小沢<sup>14)</sup>、長田<sup>15)</sup>、内田<sup>16)</sup>、方円<sup>17)</sup>等が日本脳炎罹患マウス各臓器で、DNA 分割に交替率の増強を認めている。著者の得た成績も此等と対比して大体同様の傾向ではないかと考えられる。一方流行性肝炎ウイルスをマウス腹腔内に接種した場合、6, 7 日は親和性臓器への定着の時期に相当する事を藤原等が動物感染実験で認めているが、親和性のある肝細胞内にウイルスが入り込み、宿主細胞内に於ける DNA に大変動を与えるものと考えられる。12, 13 病日に至り更に  $P^{32}$  交替の昂進を見ているがこの時期は細胞の浸潤も強くなり、肝細胞の変性、壊死が高度となり、肝索解離等が強く見られる様になる為、ウイルス性疾患独特の DNA 交替増強以外に非特異的な細胞交代によるものと考えられる。RNA 分割に関しては Schmidt-Thanhauser 法に依ると、蛋白磷を併合せる為に正確に RNA のみを追究する事は困難であるが、第1編に於て Schneider 法に依つて得た核酸磷及び蛋白磷分割への incorporation から推論すると、この分割への  $P^{32}$  の incorporation の内  $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{3}{4}$  は RNA へのものと考えられ大勢が窺える事になる。Kasterlitz<sup>18)</sup>、Davidson<sup>19)</sup>等に依れば、肝に於ける RNA は DNA と比較してかなり変動しやすいものであることは事実である。著者の得た成績でも RNA の交替率は DNA の約10倍の値を得た。この RNA 分割に対する流行性肝炎ウイルス接種の影響を見ると12, 13 病日で最高の incorporation を示し、6, 7 病日では僅かに増加の傾向を示すのみである。蛋白磷が全期を通じて減少す

る結果を得ている為これを考慮に入れると *incorporation* が少々大であるかも知れないが、6, 7病日に於ける変化はDNAに於ける程大きくなく、12, 13病日はDNAより大なる交替率を示している。此等は病理所見と対比すると、変性壊死、浸潤等が12, 13病日にかなり増強する為細胞質内に於ける代謝昂進が起きている為のものと考えられる。そもそもウイルス性疾患に於ける宿主側の核酸代謝の変動は、ウイルスの化学的成分により大きく左右される事が報告されている。ウイルスの化学成分に関しては、高い含量の蛋白質に伴つて核酸の存在する事が見出され、一概には云えないが植物性ウイルスは核酸としてはRNAを含み、細菌性ウイルス、動物性ウイルスはDNAを主として有している<sup>20) 21) 22)</sup>。核酸を主成分とし、而も細胞寄生性が特に厳密であれば、ウイルス自体の増殖に伴い細胞側でも一致した核酸分割に変動を伴う事は窺える訳である。

1949年 Rafelson<sup>23)</sup>等は動物性ウイルスであるにも拘らずRNAのみを含むとされている向神経性の Theiler's virus を用いてマウス脳に於ける磷代謝を観察し、RNA分割にのみ増加並びに交替率の昂進を認めている。又DNAを主体とする伝染性軟疣腫、伝染性疣等は宿主細胞側のDNAの蓄積を起す事も Hydén 等<sup>11)</sup>に依つて報告されている。

翻つて著者の行つた実験では、RNAにも代謝昂進が現われるが寧ろDNAの方に更に大なるウイルス性疾患独特の代謝昂進があると勘案した。上記の説に従えば、流行性肝炎ウイルスは動物性ウイルスで一般に云えるDNAを主核酸として含有するウイルスであろうと想像される訳である。しかしRNA分割にも変化が現われるのであるからあく迄推論に過ぎない。

接種病毒の稀積度を種々変えて行つた実験では、何れの稀積に於ても病理所見及び核酸分割の代謝変化を認めた。而も強いて云えば10<sup>-6</sup>稀積の場合が高度の変化をもたらしている結果を得た。当教室の大賀<sup>24)</sup>、

橋本<sup>25)</sup>等の粗病毒又は精製病毒に於ける成績でもかなりの高稀積度の時の方が病理所見の強い場合が多い事を述べているが、此等と一致する結果を見る事が出来る。

## V 結 論

岡山県下に発生した流行性肝炎患者よりの病毒分離及び性状等に関してはここ数年来当教室に於て幾多の研究がなされている。著者はこれら肝炎病毒接種マウスの肝に於ける磷代謝を第1編に於て追究し、核酸分割に特異の変化のある事を認めたので更にP<sup>32</sup>を用い Schmidt-Thanhauser 法に依つてDNA及びRNA、蛋白磷に分割して此等分割に於ける磷代謝の動的観察を行い次の結果を得た。

1) DNA分割へのP<sup>32</sup> incorporation は、6, 7病日と云うかなり早期に於て昂進して居り、12, 13病日で最高値を示す。22, 23病日では対照群との間に著変を認めなくなる。以上より病毒接種群では初期よりDNA分割に激しい変動の起る事が推察された。

2) RNA及び蛋白磷分割に於ては初期には著変は認められず、12, 13病日に至つて高度のP<sup>32</sup> incorporationを示し、細胞内に特異的若しくは非特異的な代謝昂進を認めた。尙末期に至つては対照群との間に著差を認め得なかつた。

3) マウスへの接種病毒の稀積実験では10<sup>-4</sup>、10<sup>-6</sup>稀積にても強い変動を与える事が判明した。

4) 以上の実験結果は第1編に於て Schneider 法に依つて観察せられた結果と同様の傾向にある。又初期よりDNA分割に代謝昂進を見出したので流行性肝炎ウイルスも他の動物性ウイルスと同様DNAを主核酸として含むのではないかと想像する。

稿を終るに際し御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた恩師村上教授並びに御支援を賜つた金政講師に衷心より感謝の意を表すると共に、御協力を煩わした仁熊、山本両氏にも併せて謝意を表する。

## 文

- 1) Stanley, W. M. : J. Gen. Physiol., 25, 881, 1942.
- 2) 田辺 : 岡山医学会雑誌, 71, 1959.
- 3) Schmidt, G. & Thanhauser, S. J. : J. Biol., 161, 83, 1945.
- 4) 菊池等 : 最近医学, 6, 816, 1951.
- 5) Allen, R. J. L. : Biochem. J., 34, 858, 1940.
- 6) Danidson, G. N. : Cold Spring Harbor Sy-

## 献

- mp. Quant. Biol., 12, 50, 1947.
- 7) Casperson, T., : Naturwiss, 29, 33, 1941.
- 8) Casperson, T. & Santesson, L., : Acta Radiol. Supplem., 46, 1942.
- 9) Euler, H. & Heesy, G., : Arh. Kemi. Min. Geol., A17, No. 30, 1944.
- 10) Hevesy, G. : Rev. Modern Physiol., 17, 102, 1945.

- 11) Hyden, H. : Cold spring Harbor symp. Quant. Biol., 12, 104, 1947.
- 12) 堀田, 藤中, 田辺 : Virus, 2, 101, 1952.
- 13) 市川 : 医学と生物学, 16, 267, 1950.
- 14) 小沢 : 日本体質学雑誌, 18, 100, 1953.
- 15) 長田 : 岡山医学会雑誌, 67, 961, 1955.
- 16) 内田 : 岡山医会雑誌, 68, 333, 1956.
- 17) 方円 : 岡山医学会雑誌, 68, 1005, 1956.
- 18) Kasterlitz, H. W. : J. Physiol., 106, 194, 1947.
- 19) Davidson, J. N. & Waymouth, C. : Biochem. J., 38, 379, 1944.
- 20) Knight, C. A. : Cold spring Harbor Symp. Quant. Biol., 12, 115, 1947.
- 21) Markham, R. : The Nature of virus multiplication, Cambridge Univ., 82, 85, 93.
- 22) Beard, J. W. : J. Immunol., 58, 49, 1948.
- 23) Rafelson, M. E., Winzler, R. J. & Pearson H.E. : J. Biol. chem., 181, 583, 1949.
- 24) 大賀 : 岡山医学会雑誌, 69, 1095, 1957.
- 25) 橋本 : 岡山医学会雑誌, 70, 2547, 1958.

## Experimental Studies on the Infectious Hepatitis

### Part 2 Studies on the phosphorus metabolism of the pathogene-inoculated mouse liver by Schmidt-Thanhauser's method.

By

Kenya TANABE

Department of Microbiology, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Dr. Sakae Murakami)

In the past few years, the pathogene of infectious hepatitis occurred in Okayama prefecture was isolated, and the study of characteristics of its pathogene were carried out in our department. Previously the author observed the significant changes on nucleic acid fraction by the investigation of phosphorus metabolism of the pathogene-inoculated mouse liver and reported its results in part I. The author studied further the phosphorous metabolism of DNA fraction and RNA-protein fraction after the fractionation of phosphorous compound by the Schmidt-Thanhauser's method and obtained the following results,

1) The  $P^{32}$  incorporation into DNA fraction was increased at the 6th and 7th day of the inoculation, the maximum incorporation was found at the 12th and 13th day.

However, the incorporations at the 22nd and 23rd day showed no difference against control group.

Hence, the intense change of phosphorus metabolism was presumed to occur at the early stadium after the inoculation.

2) The  $P^{32}$  incorporation into RNA-protein fraction was not increased at the early stadium, but the incorporation showed the maximum at the 12th and 13h day; the maximum incorporation indicated the occurrence of increased specific or non-specific metabolism in the cell.

At the late stadium, the difference in the incorporation between tested and control group was not observed.

3) In the dilution test of the pathogene, it was found the serious affection on phosphorus metabolism of mouse in the dilution of  $10^{-4}$  or  $10^{-6}$ .



4) These results showed the similar tendencies in the phosphorus metabolism as part I in which the study was carried out by means of Schneider's method.

The occurrence of increased phosphorus metabolism of DNA fraction at the early stage after inoculation presumably indicated that the pathogene investigated contained DNA as main nucleic acid just alike animal viruses.

---