

岡山県に発生せる流行性肝炎病原体の研究特に孵化 鶏卵に依り分離せるウイルスに就て

第 2 編

分 離 ウ イ ル ス の 性 状 に 就 て

岡山大学医学部微生物学教室 (指導 村上 栄教授)

俵 寿 太 郎

〔昭和 34 年 3 月 25 日受稿〕

実 容 目 次

緒 言

第 1 章 接種方法に関する実験

第 1 節 実験方法

第 2 節 実験成績

第 2 章 ウイルス分布に関する実験

第 1 節 実験方法

第 2 節 実験成績

第 3 章 濾過試験

第 1 節 実験方法

第 2 節 実験成績

第 4 章 最小感染量決定試験

第 1 節 実験方法

第 2 節 実験成績

第 5 章 考 按

結 語

緒 言

孵化鶏卵に依るウイルスの分離は、他の実験動物に比較して自然感染を受ける事が少い事と、多くのウイルスが孵化鶏卵に感受性を有しているという点で、ウイルスの分離には甚だ有利なものである。而して流行性肝炎ウイルスの孵化鶏卵培養に就ての報告は、Siede u Meding(1941) 及び Essen (1943) 等は漿尿膜上接種に依り胎児を死亡せしめ、しかも累代移植が可能なることも示した。尚 Essen は電子顕微鏡写真に依り、漿尿膜及び患者材料に基本小体を見出し、その大きさは 180 m μ の多面体であると報告した。然しこれを追試した Hoyle (1943) 等は陰性に終つている。

最近 Henle 及び Drake (1950) は Akiba 株を組織培養し、次でこれを孵化鶏卵羊膜腔内に累代移植し、更にこれを人体に復原して黄疸の発現は見なかつたが、他の臨床所見並びに肝機能検査に依り陽性の成績を得ている。又この感染羊水を紫外線照射に依り不活化したものを、肝炎患者に皮内接種し、発赤によるアレルギー反応を検した処、90%以上の陽性で、対照成人が30~40%、小児が10%程度の陽

性率であつた。但し濃縮遠沈材料での補体結合反応は陰性であつた。

我国では、北岡 (1945) はマウスでの分離ウイルスが、孵化鶏卵に依り累代可能であり、漿尿膜上接種法で胎児は 3~5 日で死亡し、肉眼的に白斑が認められ、胎児にもウイルスがあるが肉眼的変化はなく、その毒力をマウスで測定して 10⁻³~10⁻⁴ であると報告した。荒川及び多ヶ谷(1946)はマウス固定ウイルスを漿尿膜上に接種して、胎児は 5~7 日で死亡し、これをマウスに戻してウイルスを証明した。その外に山本 (1953)、石井 (1954)、久保等 (1954)、谷口等 (1954) 及び森 (1954) の発表もあるがその詳細は不明である。

以上の如く、これ迄の報告に依れば、各分離ウイルスの性状は各々異つていて、又詳細不明のものが多く、確認されたものもない。

そこで岡山県下に発生した流行性肝炎患者から分離したこれらのウイルスに就て、その性状を詳らかにするべく種々検討を加えてみた。

第 1 章 接種方法に関する実験

孵化鶏卵培養法に依りウイルスを接種する場合、

それぞれのウイルスの種類に依り、鶏卵内でウイルスに感受性のある部分は異つてると同時に、接種方法に依つても異つた分布を示すものであり、接種方法は当然比較検討せられるべきものである。著者は分離当初より、多くの接種方法を行いつつ実験を進めてきたのであるが、更めて比較検討してみることとした。

第1節 実験方法

この分離ウイルスの孵化鶏卵培養に際しては、孵化7日目のものを使用するのが最も良いことは、第1編で述べた通りであり、ここでも専ら7日目卵を主として使用したが、勿論8乃至12日目の孵化卵に就ても行つてみた。

接種に際しては、5個の7日卵にウイルスを漿尿腔内接種し、37°Cに培養後、死亡直前の胎児の眼球及び肢・翼を除いて混じ、生理的食塩水はブイオンで10倍希釈乳剤を作り、3,000 r. p. m. 30分間遠心沈澱後、その上清を10倍階段希釈して、各希釈液を各群3個宛の卵に接種した。尚、この実験に使用したウイルス株は、河本株47株代目、金光株42代目及び森本株41代目のものである。

接種法としては、漿尿腔内接種法、漿尿膜上接種法、卵黄囊内接種法及び羊膜腔内接種法に就て比較し、接種量はそれぞれ0.1 ml, 0.05 ml, 0.05 ml, 及び0.1 mlである。結果の判定は胎児の死亡を以て標識とした。

第2節 実験成績

これらの接種方法に依る結果は、使用した3株共同様の結果を示した。1例として森本株に就ての結果を示せば表1の如くである。

即ち、漿尿腔腔内接種法に依る場合、感染標識である鶏胎児の死亡が示すLD₅₀は、5.0乃至6.0であつて、接種後平均5日乃至7日で死亡した。更にこれらの胎児及び漿尿腔液に依る次代への接種を試みた結果、その感染も可能であつた。尚鶏卵には、漿尿腔液の濁濁及びその他の病変は認められなかつたが、胎児に肉眼的に認め得る出血性傾向を示したものが多かつた。

次に漿尿膜上接種法では、胎児の死亡を示さず、又接種に際して種々の工夫を加えてみても、対照と全く同様で何等の変化をも認めることは出来なかつた。胎児及び漿尿腔液等に依る次代への接種も認められず、この方法に依る感染は全て陰性の結果であつた。

卵黄囊内接種法では、10⁻¹乃至10⁻²程度の希釈

表 1 孵 化 鶏 卵 卵 黄 囊 内 接 種 方 法 の 比 較

接種部位	ウイルス株		LD ₅₀	感染死 (経日)	代料 素材
	河本株	金光株			
漿尿腔内	10 ⁻¹	●●●●●	— 6.8 — 5.8 — 5.8	5~7	可 胎漿 尿尿 液
	10 ⁻²	●●●●●	0 0	死亡せず	不 可 能
	10 ⁻³	●●●●●	— 2.8 — 2.8 — 2.8	1代目の み少数死 亡	不 可 能
	10 ⁻⁴	●●●●●	— 5.5 — 5.1 — 4.5	4~5	可 羊胎 水・ 児
漿尿膜上	10 ⁻¹	●●●●●	— 6.8 — 5.8 — 5.8	5~7	可 胎漿 尿尿 液
	10 ⁻²	●●●●●	0 0	死亡せず	不 可 能
	10 ⁻³	●●●●●	— 2.8 — 2.8 — 2.8	1代目の み少数死 亡	不 可 能
	10 ⁻⁴	●●●●●	— 5.5 — 5.1 — 4.5	4~5	可 羊胎 水・ 児
卵黄囊内	10 ⁻¹	●●●●●	— 6.8 — 5.8 — 5.8	5~7	可 胎漿 尿尿 液
	10 ⁻²	●●●●●	0 0	死亡せず	不 可 能
	10 ⁻³	●●●●●	— 2.8 — 2.8 — 2.8	1代目の み少数死 亡	不 可 能
	10 ⁻⁴	●●●●●	— 5.5 — 5.1 — 4.5	4~5	可 羊胎 水・ 児
羊膜腔内	10 ⁻¹	●●●●●	— 6.8 — 5.8 — 5.8	5~7	可 胎漿 尿尿 液
	10 ⁻²	●●●●●	0 0	死亡せず	不 可 能
	10 ⁻³	●●●●●	— 2.8 — 2.8 — 2.8	1代目の み少数死 亡	不 可 能
	10 ⁻⁴	●●●●●	— 5.5 — 5.1 — 4.5	4~5	可 羊胎 水・ 児

註 表中○生●死を示す。

ウイルス群で、接種後4日乃至7日目の間に胎児の死亡する例がよくみられ、LD₅₀は大体2.8であつた。死亡卵には、特別病変らしいものも認められなかつたし、又胎児、卵黄囊及び漿尿腔液に依る次代接種に際しても、2代目から以後のものに、この様な現象は認められなかつた。これが果してウイルスの感染を意味するものであるか否かの解釈は甚だ困難であつた。

羊膜腔内接種法は、漿尿腔内接種に次いで高率の胎児死亡を示し、3株共LD₅₀は5.0前後であつたこと、及び胎児の死亡日数が幾分早く4日乃至5日目であつたけれども、3日以内に死亡したものは認められず、対照群に死亡卵のみ認められなかつた事などから、技術的過失に依る死亡は、先づなかつたものと考えられ、更にこれらの胎児及び羊水に依る累代を5代目迄行つても、尚可能であつた事などから、羊膜腔内接種法は、このウイルスの孵化鶏卵培養法の中の累代可能なる方法の一つであることが判つた。

使用した孵化鶏卵は、孵化7日目のものが適當なるものと考えられ、それ以後のものでは、孵化日数の増加と共に胎児の死亡数が減少し、7日目より浅い日数の孵化卵では、時に事故死との鑑別が困難なる場合もみられた。

以上の結果を総括してみれば、このウイルスの孵化鶏卵に依る累代は、漿尿腔内接種法に依るのが最も良く、次いで羊膜腔内接種法が良く、その他の方法は好結果を得ることが出来なかつた。又、使用鶏卵は孵化7日目のものを使用するのが、胎児の死亡を以て感染標識とする判定に容易であつた。

第2章 ウイルス分布に関する実験

前述の如く、この分離ウイルスを孵化鶏卵に接種する場合、孵化7日目卵を用いて、漿尿腔内に接種し、胎児及び漿尿腔液を接種材料として累代することの可能なることは判つたが、ウイルスが実験動物である孵化鶏卵に感染した場合、最も良く親和性を有する臓器を知ることは、その後の実験に用いる抗原の作製及びその他の実験に必要な要素であることに違いない。その為、このウイルスを接種した孵化鶏卵内に於けるそれらの分布は、何れの部分に多く、どの程度の量に於て含まれているかを、臓器別に検索してみた。

第1節 実験方法

ウイルスの稀釈液を調製したのは、孵化鶏卵に依り累代中のウイルスを、孵化7日目卵5個の漿尿腔

内に接種し、胎児の死亡する直前に卵を破壊し、臓器をそれぞれ、全胎児、肝、漿尿腔液、漿尿膜、卵黄囊及び羊水の種類別に於て採取した。尚、胎児は眼球と肢・翼等を除き、卵黄囊は生理的食塩水に依る洗滌を行い、極力卵黄の混入するのを防いで使用した。

次にこれら各々の臓器で、生理的食塩水又はブイヨンに依る10倍乳剤を作り、3,000 r. p. m. 30分間遠心沈澱を行つた後、それらの上清を以て各臓器別ウイルス液とした。これらのウイルス液から、更に10倍階段稀釈法に依り、10⁻¹⁰迄の稀釈列を作り、各々を1群3個宛の孵化7日目の漿尿腔内に接種した後、胎児の死亡を以て感染標識とし、M. L. D. に依りウイルスの含有量を測定した。

対照には、健康孵化鶏卵臓器を同様に処理した材料を用いた。

第2節 実験成績

これらの分離ウイルスを、孵化7日目卵の漿尿腔内に接種した場合、孵化鶏卵各部に於けるウイルスの分布状態は、表2に示す如くであつた。即ち、ウイルスは胎児及び肝に最も多く含まれ、両者共に殆んど同程度の分布を示し、10⁻⁷稀釈迄胎児の死亡を示した。これに次では漿尿腔液に多く分布されるが、その含有量は、前2者の半量程度であつた。然し、卵黄囊及び羊水では、極く少量分布されるようにも思われる結果を得たが、漿尿膜に至つては、全く分布は見られなかつた。この様に、孵化鶏卵臓器の種類に依り、ウイルスの分布に差異のあることが認められたが、肝と胎児が殆んど同程度の含有量を示したのは、肝が胎児の主なる部分をなしている為に外ならない。又、対照群には、1, 2の事故死を示したものを除いては、全く胎児の死亡を認めなかつたし、これらの結果は、3株共に同じ臓器順位を示し、M. L. D. の値も同程度であつた。

以上の結果から、これらの分離ウイルスは、孵化7日目卵の漿尿腔内に接種した場合、胎児就中肝に最も多く分布され、次で漿尿腔液に多く含まれ、卵黄囊、羊水及び漿尿膜に至つては殆んど含まれていないことが判つた。

第3章 濾過試験

或種の伝染病疾患で、その病原体がウイルスとして分離せられた場合には、それが各種の濾過器を通過し、濾過液は尚病原性を有していることを確認することが、ウイルスの一つの特徴を知ることである

表 2 孵化鶏卵に於けるウイルスの分布

接種材料	ウイルス株	ウイルス稀釈度									
		10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9	10-10
胎 児	ウ イ ル ス	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	●○○○	○○○○	○○○○
	対 照	●○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○
肝	ウ イ ル ス	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	●○○○	●●○○	○○○○	○○○○	○○○○
	対 照	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○
漿尿腔液	ウ イ ル ス	●●●●	●●●●	●●●●	○○○○	●○○○	●○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○
	対 照	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○
漿尿膜	ウ イ ル ス	●○○○	○○○○	●○○○	●○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○
	対 照	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○
卵黄囊	ウ イ ル ス	●○○○	●●○○	○○○○	●○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○
	対 照	○○○○	○○○○	●○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○
羊 水	ウ イ ル ス	●●○○	●●○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○
	対 照	○○○○	●○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○

註 表中○生●死を示す

と共に、同定の為の一つの大きな要因でもある。

著者は、これ迄にも、これらの分離ウイルスの累代に当つて、3~4日目毎に、Seitz E. K. による濾過を行つてきた結果、濾過液に依る接種後の感染が可能であることを確かめているのであるが、生物学的性状を更に詳しく知る為の一つとして、Berkefeld N 及びWの濾過液とも比較するべく次の濾過実験を試みた。

第1節 実験方法

孵化鶏卵に依り累代中のウイルス株を、各々5個宛の孵化7日目卵の漿尿腔内に接種し、胎児の死亡する直前に、これを破壊し、それらの胎児又は肝を混合して、生理的食塩水又はブイオンに依る10倍稀釈混合乳剤を作り、3,000 r. p. m. 30分間遠心沈殿の後の上清を以て、濾過用ウイルス液とした。

これらの上清を、それぞれ Seitz E. K. 及び Berkefeld N 及びWの濾過器を以て濾し、濾過液を更に10倍階段稀釈法に依り、10⁻¹⁰迄の稀釈液列を作り、各稀釈液群毎に3個宛の孵化7日目卵の漿尿腔内に接種し、胎児の死亡を以て感染標識として結果を判定した。

対照群には、各株の非濾過遠心沈殿上清を同様に10倍階段稀釈して同様に接種した非濾過液群対照と、健康鶏胎児材料から出発して、同様に操作後接種した健康材料濾過液群対照とを作つて、これらを比較検討した。

尚、接種前の非濾過液及び濾過液、接種後の感染

死亡卵に就ては、血液寒天及び嫌気性培養基に依る細菌検査を、48時間培養して観察した。

第2節 実験成績

結果は表3に示す如くで、Seitz E. K. を用いて行つた濾過液群は、3株共同程度のLD₅₀を示し、Berkefeld N に依る濾過液群も、殆んど同程度のLD₅₀を示し、大体その値は、5.1~6.1程度で胎児の死亡を示した。然し、Berkefeld W に於てはLD₅₀は低く、3.5~4.1の値の間にあつた。

而して、対照群中、非濾過液群対照に於ては、それぞれのLD₅₀は6.5~7.8を示す値であつたから、総体的に見て濾過液群の示すLD₅₀よりも値が低く、又、濾過液群中に於ても、Berkefeld W に依るものが、Seitz E. K. 及び Berkefeld N に依る濾過液群よりも低いLD₅₀を示した。この様に、濾過液群が非濾過液群よりも、低い値のLD₅₀を示したことは、濾過操作過程に於て濾過液中に、或程度ウイルスが濾過膜の吸着を受けたものと考えられ、又 Berkefeld W に依る濾過液群が、Seitz E. K. 及び Berkefeld N に依るものより、更に低いLD₅₀を示していることも、濾過器の穴の大きさによる相異として、同様に解釈することが出来る。いづれにもせよ、各種の濾過器に依る濾過液は、孵化鶏卵に対して、尚感染力を有していたし、細菌検査の結果も陰性であつた事は、これらがウイルスであることを、一層意味づけたことになるし、その大きさは、可成り小さいものであろうことが判つた。そしてこれら

表 3 濾 過 試 験 (孵化鶏卵培養に依る)

濾過器	ウイルス	稀 釈 度										LD ₅₀	
		10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9	10-10		
Seitz E. K	河 本 株	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	○●○	○○○	○○○	○○○	6.1
	森 本 株	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	○●○	○○○	○○○	○○○	5.8
	金 光 株	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	○●○	○○○	○○○	○○○	○○○	5.1
Berkefeld N	河 本 株	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	○●○	○○○	○○○	○○○	○○○	5.8
	森 本 株	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	○●○	○○○	○○○	○○○	○○○	5.1
	金 光 株	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	○●○	○○○	○○○	○○○	○○○	5.1
Berkefeld W	河 本 株	●●●	●●●	●●○	●●○	●○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	4.1
	森 本 株	●●●	●●●	●○○	●○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	3.5
	金 光 条	●●●	●●●	●●●	●○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	3.8
対 照	河 本 株	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	○●○	○○○	○○○	○○○	○○○	6.5
	森 本 株	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●○	●●○	○○○	○○○	○○○	7.8
	金 光 株	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●○	○○○	○○○	○○○	○○○	6.8

註 表中○生●死を示す

の死亡胎児乳剤に依る次代への累代も可能であつた。尚、健康材料対照群には、1個の死亡例さえ見られなかつたので、表中から除いた。

第 4 章 最小感染量決定試験

これらの分離ウイルスは、孵化鶏卵培養法で、孵化7日目卵の漿尿腔内に接種することに依り感染し、胎児、肝及び漿尿腔液等に依る累代が可能であり、又胎児の死亡を以て結果を判定出来ることが判つたが、ウイルスが感受性宿主で起す症状に依つて、その存在を知るように、ウイルス活性の量もまた、ウイルスを含む材料の量と、宿主の特異性反応発生の程度、或は稀度との間の量的関係に依つて決められるものである。この意味に於て、生物学的性状の一つとして、孵化鶏卵胎児を死亡せしめ得るウイルス浮游液の最小量を定めるべく実験を行つた。

表 4 最 小 感 染 価 決 定 試 験

ウイルス株	稀 釈 度	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9	10-10	LD ₅₀	平 均
河 本 株	I	●●●	●●●	●●○	●●○	○○○	○○○	7.8	8.3
	II	●●●	●●●	●●●	●●○	○○○	○○○	8.1	
	III	●●●	●●●	●●●	●●○	●●●	○○○	8.5	
	IV	●●●	●●●	●●●	●●○	●●○	○○○	8.8	
金 光 株	I	●●●	●●●	●●●	●●●	○○○	○○○	8.5	8.8
	II	●●●	●●●	●●●	●●○	○○○	○○○	8.1	
森 本 株	I	●●●	●●●	●●●	●●○	○○○	○○○	8.1	8.4
	II	●●●	●●●	●●●	●●●	●○○	○○○	8.8	

註 表中○生●死を示す

第 1 節 実験方法

接種ウイルス浮游液の作製法は、型の如く累代中のウイルス株を用いて、10⁻¹⁰迄のブイヨン又は生理的食塩水10倍階段稀釈液を作ること、前章迄に行つた方法と全く同じであり、いずれも1群3個宛の孵化7日目卵の漿尿腔内に、ウイルス0.1mlづつを接種した。勿論結果の判定は胎児の死亡後の各卵に就ては、血液寒天及び嫌気性培養基を用いて、48時間培養に依る細菌検査を行つた。

第 2 節 実験成績

河本株は15代目のものから、金光株は17代目のものから、そして森本株は13代目のものから2代目毎に最小感染量を測定した。

その結果は表4に示す如くである。表中に示すI、II、III及びIVは、それぞれ2代目毎の累代世代を表示したものである。即ち、河本株では15代目(I)

は、 10^{-8} まで、17代目 (II) ではやはり 10^{-8} まで、そして19代目 (III) 及び21代目 (IV) では 10^{-9} まで感染価を示した。それらの LD_{50} はそれぞれ 7.8, 8.1, 8.5 及び 8.8 と、累代毎に次第にわづか乍ら上昇する傾向を示した。これを平均してみれば 8.3 となり可成り高度の感染価であると言える。

金光株では17代目 (I) 及び19代目 (II) 共に 10^{-8} で、 LD_{50} にして 8.5 及び 8.1 であった。19代目の方が17代目のものより幾分値が下つているが、森本株では13代目 (I) で感染は 10^{-8} 、15代目で 10^{-9} で、 LD_{50} にして 8.1 と 8.8 で平均は 8.4 であった。

以上の結果を総括してみれば、これらのウイルスの最小感染価は、 10^{-7} から 10^{-9} の間にあり、 LD_{50} にして平均 8.0 をわづかに越える程度の値を示した。

然し乍ら、これらの最小感染量は、その後の実験により、累代数を重ねるに従つて、わづかに降下していく傾向がみられたが、これらの累代世代に於ける値は以上の通りであつた。

第5章 考 按

流行性肝炎患者材料から分離したウイルスを、孵化7日目卵に種々の接種法を試みて、それらの生物学的性状を検討した結果、漿尿腔内接種法に依り接種した場合には、胎児は接種後5日乃至7日で死亡し、胎児殊に肝に最も多くウイルスが分布し、次いで尿漿腔液の順序であつた。この様に流行性肝炎の患者材料から分離したウイルスが、胎児の肝に最も良く親和性を有しているということは、甚だ興味深いように考えられた。

漿尿膜上接種法では、胎児は死亡せず、故に接種後4日目から10日目迄、各日毎に卵を破壊して、それらの漿尿膜は勿論、胎児、肝、漿尿腔液、卵黄囊及び羊水を次第えの接種材料として、種々の接種法で累代を試みたが、対照と全く同様の陰性結果しか得られなかつた。

卵黄囊内接種法では、1代目のみが少数の胎児死亡を示し、累代は不可能であつて、これも好ましい接種法とは考えられなかつた。然し、羊膜腔内接種法は漿尿腔内接種法に次いで良い結果を得た。但しこの場合、胎児の死亡率が幾分低く、死亡日数もわづか乍ら早かつた。そして羊水に依る累代も可能であつたが、これは接種方法の相異に依り、ウイルスの分布に差異を示したものとみてよからう。

要するに、接種方法としては漿尿腔内接種法が最も良く、次いで羊膜腔内接種法が良く、漿尿膜上及

び卵黄囊内接種法は、好ましくない結果であつた。

而して、これ迄に流行性肝炎ウイルスの孵化鶏卵培養に関する報告では、Siede (1941) 及び Essen (1943) 等が、流行性肝炎ウイルスを孵化鶏卵の漿尿膜上接種法に依り胎児を死亡せしめ、しかも累代接種が可能なることを報告し、又、Henle 及び Drake (1950) が、同じく羊膜腔内に接種し、しかも人体に復原して陽性結果を得たことを報告した。我国でも北岡 (1945) が漿尿膜上接種で胎児を死亡させ、荒川・多ヶ谷 (1946) も漿尿膜上接種法に依り胎児を死亡せしめている。尚その他数名の学者に依る発表もあるが、接種方法に就ては詳細が不明である。以上の如く、その殆んどが漿尿膜上接種法に依つてゐるが、Hoyle (1943) は Essen の実験を追試して陰性に終つてゐるし、北岡もその後、報告を否定し、その他のものに於ても、以後の報告に接していない。

結局、著者の分離したウイルスは、これ迄報告されてきたものは、全く異なるウイルスであると考えられた。

次に濾過試験に関しては、ウイルスなることを証明する一助となるものでもあり、又、大体の大きさを知ることも出来るわけで、使用した Seitz E, K. 及び Berkefeld N の液は、非濾過対照に比して幾分ウイルスの減少を免かれなかつたが、容易にこれらを通過するものであることが判つた。然し Berkefeld W をも、尚わづかではあるが通過した事から考えて、可成り小さなウイルスであることが想像出来た。そして、これらのウイルスの感染価は、累代数に依り相異なるけれども、10代目頃から20代目頃迄は、 LD_{50} にして平均 10^{-8} 前後を示した。尚グリセリン食塩水に依るウイルスの保存は、2ヶ月後のものに於ても尚病原性を有していた。

以上の生物学的性状は、これ迄の報告の全てと異つた性状のウイルスである。

結 語

流行性肝炎患者材料から孵化鶏卵培養法に依り分離したウイルスの、生物学的性状に就いての実験を試みて、次の事を知ることが出来た。

即ち、これらのウイルスを孵化7日目卵の漿尿腔内に接種する場合、胎児は接種後5日乃至7日目頃に死亡し、胎児就中肝、次いで漿尿腔液に依る累代が可能であつて、最も良い接種方法であつた。これに次いで良いのは、羊膜腔内接種法で、この場合に

は、幾分胎児の死亡が早く、接種後 4, 5 日目であつたが、LD₅₀ 前者の場合よりわずかに低く、羊水に依る累代も可能であつた。卵黄嚢内接種法は 1 代目のみに胎児の死亡がみられたのみで、LD₅₀ は更に低く、累代出来なかつた。

漿尿膜上接種に至つては、如何なる工夫を加えてみても、これを感染せしめることは出来なかつた。漿尿腔内接種法に依る場合のウイルスの分布は、胎児殊に肝に最も多く分布し、漿尿腔液がこれに次ぎ、その他の部分には殆んど分布されていなかつた。

濾過試験では、Seitz E. K. 及び Berkefeld N を

容易に通過し、Berkefeld W では幾分困難乍らやはり通過したことから、可成り小さなウイルスであることが想像出来た。

感染価は累代数に依り差違はあるが、10代乃至20代目の間では、平均 LD₅₀ は 8.0 少々であつた。尚グリセリン食塩水でのウイルス保存も可能であつた。

studies on the Pathogenic Agent of Infectious Hepatitis in Okayama Prefecture, Particularly on the Virus Isolated by the Embryonated Hen's Egg

II: Characters of the Isolated Virus

By

Jutaro Tawara

Department of Microbiology, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Dr. Sakae Murakami)

The author studied the virological characters of the virus isolated by the Chick-embryo technic, and obtained the following results:

Inoculation of the virus into the chorio-allantoic cavity of the 7 day old chick-embryo killed the chick-embryo on the 5th to 7th day after inoculation. The serial passage could be carried out by inoculation of the chorio-allantoic fluid or the chick-embryo liver, of which the latter gave a better result. The amniotic inoculation could kill the chick-embryo on the 4th to 5th day after inoculation, but LD₅₀ was lower than that by the chorio-allantoic route. The yolk sack inoculation could not give a good result.

As for the distribution of the virus by chorio-allantoic inoculation, the virus could be best proved in the chick-embryo, particularly in the liver, the next in the chorio-allantoic fluid and very few in the other parts. The isolated virus easily passed Seitz E. K., Berkefeld N. and also Berkefeld W., though somewhat difficult through the last one; this fact suggests that the isolated virus is pretty small one. Though the infectious index of the virus to the chick-embryo varied with the generations of the passage, the average for 10 to 20 generations was 8.0. The isolated virus could be well preserved in the glycerin-salt solution.
