

精製肝炎ウイルスに関する実験的研究補遺

第二編

精製肝炎ウイルスの一般性状についての検討

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

鈴木 孝 道

〔昭和 34 年 7 月 15 日受稿〕

緒 言

著者は第一編に於て¹⁾分離された肝炎ウイルスを孵化鶏卵漿尿腔内に接種し、超高速遠心法により精製ウイルスを得て、耐熱試験を行つた結果、分離肝炎ウイルスは依然抵抗性を保持しているが、熱に対して抵抗する限界は、一般に 70°C~75°C 30 min. であり、同温度により殆んど不活化されることを、マウスの病理学的変化を観察することにより、明らかとなつた報告を行つた。

之等のウイルス株は、孵化卵累代を継続され、村上等の子報 (1958)²⁾、橋本 (1958) により示された如く、数十回の精製に用いられ、孵化卵に対する病原性、マウスに示す起病性ともに強く、しかも、電子顕微鏡により、ウイルス粒子が多量に認められる。良く馴化したウイルス株であるので、主としてこの両株を用いた。

ウイルスの感染及び累代：第一編に記載した如くであるが、本編では、実験に使用したウイルスは、全部精製ウイルスであるので、ウイルス罹患孵化鶏卵漿尿腔液より出発して精製を行つた。精製要領及び窒素量の測定等は、第一編に記載した如くである。

各性状の検討方法：精製ウイルスの動物に対する感受性、分離肝炎ウイルスの精製過程に於ける病性原、薬剤に対する抵抗性、濾過性、エーテル耐性試験、紫外線による不活化等であるが、実験方法は総て、夫々の実験成績の部分で述べた。著者は更に、従来迄の分離肝炎ウイルスの研究⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾が、粗製ウイルスを用いた実験に終始している事実を鑑み、超高速遠心法による橋本の精製方法に倣い、精製ウイルスを得て、他の一般性状の夫々について検討を行つた。

精製ウイルスは従来の粗製ウイルスと比較して、

組織片若くは細胞産生物質が可及的除去され、しかも電子顕微鏡により、小円形若くは随円形のウイルス粒子の集合体として観察され、比較的ウイルスが単離に近い状態にあること、及びマウスに対して、常に高度の病原性を発揮する事実が、ウイルスの一般性状を把握するには恰好の条件と推測されたので、夫々の性状を窺うために、精製ウイルスによる検討を重ねた結果、興味ある所見を得たので、その大要を報告する。

実験材料及び方法

供試ウイルス：既に村上等 (1955~1958) が、孵化鶏卵の累代により、肝炎患者材料より分離後累代保存されている小川、石原両株を用いた。他の事項は第一編と同様である。

実験成績

1) 精製ウイルスの病原性、殊に感染経路との関係
分離肝炎ウイルスに就ての病原性に就ては従来迄村上等 (1955~1957) により詳細に論議され、精製ウイルスについても既に橋本の報告がある。之等の報告では、マウスに対して感染するが、病理変化を示すに留る不顕性感染であつて、通常の感染経路では、感染致死することは尠いと述べられている。

著者は、之等の実験成績を確めるべく、精製ウイルスを用いて経口感染及び尾静脈内接種を行つた。

i) 経口感染実験 経口感染実験の方法は大賀 (1957)⁵⁾ に倣い行つた。即ち可及的刺戟を少なくする意味より、細いビニール製の細管を自然に挿入する様に努め、挿入後注射器を装着して 0.25 ml 宛注入した。この際鼻孔より逆流したものは全部実験より除外した。感染の如何は、14日後に於ける、肝臓を中心とした病理学的所見により判定した。病理学的所見は凡そ次の如きものである。

先づ注目すべきは、橋本の報告と同様に、肝細胞の変性及び壊死、星細胞の腫大及び増生肝索の解離、限局性壊死巣を中心に起る単球の出現 Mallory 氏小体、単球中に混在する好中球の存在、高度の実質内の細胞浸潤、間質の細胞浸潤等が挙げられ、次に肺臓に認むべき所見は胞隔炎、血管及び気管周辺における小円形細胞浸潤、胞隔の肥厚、肺充血若くは出血等がある。

経口感染に於ては、精製ウイルスを用いた場合にも、マウスの感染致死は認められない。高度の病理学的変化を認めたが、之等の病変は主としてウイルスの増殖によつて惹起されたものと理解しなければならない。而してウイルスの侵入定着により、一定の増殖が起り、これに炎症性変化が伴つた病理所見を示していることは粗製ウイルスの場合と略々同様である(第1表)。

第1表 精製ウイルスのマウスに於ける主なる病理学的変化

ウイルス株	病理学的所見	肝臓				肺臓						
		壊死	肝細胞変性	壊死細胞周辺における変化	星細胞の増殖	肝索の解離	間質内	細胞浸潤実質内	胞隔炎	血管周囲に胞お浸潤	胞隔の肥厚	充血及び出血
小川株 (35,000 r. p. m.) による精製		卅	卅	卅	+	+	卅	卅	卅	卅	+	+
石原株 (35,000 r. p. m.) による精製		卅	卅	卅	+	+	卅	卅	+	卅	+	+

- 註 i) 感染ルート経口感染 0.25 ml~0.3 ml を投与した
 ii) 病変の程度は(卅)~(上)で表示した
 iii) ウイルス株それぞれにマウス4~5匹を用いた
 iv) 35,000 r. p. m. 精製ウイルスは NaCl 10.0 ml に平等に浮遊した

腹腔内感染に比して、確実に感染が惹起すること、病変の高度な場合が多く、しかも、ウイルス稀釈液に余り左右されぬことは、優れた感染ルートであることが証明されるのである。

実験に用いた石原、小川両株の間に於ける病理所見の程度は略々同傾向を呈するもので、病変に於ける差は認められない(第1表)。

ii) 尾静脈感染は、既に同僚稻垣(1957)⁹⁾が行つた方法であるが、マウス尾静脈より精製ウイルスを注射し、14日間観察して、後に病理所見を窺い、感染の程度を確めた。漿尿腔液より出発して得た精製ウイルスによるマウスの感染致死は認められなかつた。

実験成績では、優れた病変が窺はれ、殊に経口感染に比較して、肝臓の所見が高度の場合が多く認められた点が注目せられた。即ち肝臓の病理所見では、ウイルス稀釈域に於ては 10^{-2} ~ 10^{-6} 程度に強い反応が現われ、類壊死及び小壊死巣の形成が散見せられ、病巣部に於ける星細胞の腫大及び増生が高度で、必ず之等の病巣部分を圍繞した形で、単球の集合があつて、少許の好中球を含む、本ウイルスによる定型

的な病変が窺われたことが指摘された。 10^{-7} ~ 10^{-9} 稀釈と度を増すとやや病変が増加することも一般に認められた。

2) 精製過程に於けるウイルスの病原性

先に報告された橋本のウイルス精製法により、本ウイルスは比較的能率良く、しかも簡単に精製純化されることが認められたが、著者も亦同様の方法で、高速遠心沈澱法を応用して、精製過程に於ける夫々の分割を得、マウスに対する起病性を確め、予備実験として、病変の程度を十分に観察しておいた。

実験には先の実験と同様に夫々の分割を総て経口的に投与し、14日後に於ける病理所見を比較する方法によつた。

実験成績では、夫々の分割に於て病原性を認めたが、之等の各種分割は、それぞれに4,000 r. p. m. 上清、10,000 r. p. m. 上清、35,000 r. p. m. 沈澱と分れるため、必ずしも同一条件のもとに作られた沈澱ではない。殊に35,000 r. p. m. 沈澱は滅菌食塩水10.0 ml に浮遊して用いたために、表示した所見では、病変に大差はない様に認められるが、同

時に夫々の分割より作つた電子顕微鏡の標本では、 35,000 r. p. m. 30 min. の沈澱浮遊液では、濃厚にウイルス様粒子の存在が、かなりの程度に差があり、 認められた (第2表)。

第2表 精製過程に於ける各分割のマウスに対する病理学的変化

精製要領	病理学的所見	肝 臓							肺 臓					
		壊死	肝細胞変性	病巣周囲の細胞変化	星状細胞の増殖	及細胞の腫大	肝索の解離	間質内	細胞浸潤	実質内	肺隔炎	血管及び気管周囲の浸潤	肺隔の肥厚	肺充血及び出血
石原株	4,000 r. p. m. 上清	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10,000 r. p. m. 上清	+	+	+	+	+	+	++	+	++	+	+	+	+
	35,000 r. p. m. 沈澱	++	++	++	+	+	+	++	+++	++	++	+	+	+
小川株	4,000 r. p. m. 上清	+	+	+	+	+	+	++	+	++	+	+	+	+
	10,000 r. p. m. 上清	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	35,000 r. p. m. 沈澱	++	++	++	++	+	+	+++	+++	++	++	+	+	+

註 i) (++)~(+) 病変の程度を示す

ii) マウス使用数一群4~5匹を用いた

iii) 感染は経口感染 0.3 ml を用いた

3) 薬剤に対する抵抗試験

精製ウイルスに於いては以上の実験により、マウスに示す起病性が高度であり、而も電子顕微鏡に於て多数のウイルス様粒子の存在を、かなりの程度に純化した状態できり出すことが容易であることを知つたので、薬剤に対する抵抗試験を続けて行つた。本実験に於ても、熱に対する抵抗試験と同様に、精製ウイルスに各種薬剤を添加、4°C の冷庫に保存しおき、3, 5, 10, 15, 21, 28, 36日間に亘り再びとり出しマウスに経口的に投与し、更に14日後の病理所見による感染の程度を比較して判断した。この実験に用いた薬剤は Carbol, Formalin, Morzonin, であり、不活化が目的であるために、夫々0.2%, 0.2%, 0.01%を用いた。

本実験では、以上3種の薬物を夫々の割に添加保存する間、精製ウイルスの抵抗性と、不活化するにどの程度の期間を要するか、の検討を加えるにあつた。

之等夫々の経日に於ける、先づ小川株を経口的に感染せしめた場合を見るに、3, 5, 7, 10日に至る間に於ては殆ど抵抗を示し、病理学的所見も対照と変らないが、15日、18日に及ぶと次第に病変の軽減が見られ、21日に達すると、病変は著しく減少若くは消失する如くである。次に石原株に於ても凡そ同様な経過を辿り、3週間にして病変は認めぬ迄に至

ることが窺い得られた。既に村上等の予報等で本ウイルスの特性として薬剤に対する抵抗性は甚だ強い事実が目ざされていたが、著者の実験では、可及的組織片若くは細胞成分より、単離した形に於て、接触の場を広く保つた結果を、検討したいとの念願であつた。経日と共に抵抗性を確めた実験成績が、他の混在物例えば不活化された蛋白成分等の注入による組織反応も一応考慮しなければならぬことは予想されるが、ウイルスの減毒の傾向を窺うことは可能であり、3週間程度で充分不活化することが、病理所見より推測された。3週間目に於けるウイルスの示す病変の程度を見れば、病理所見は軽度になり、

第3表 精製ウイルスの各種薬剤に対する抵抗性(2)

薬剤の種類	保存日数 経日	薬剤濃度							
		3日	5日	7日	10日	15日	18日	21日	28日
Carbol	0.2 %	++	+	++	+	±	±	+	+
Formalin	0.2 %	++	++	+	+	±	±	±	±
Morzonin	0.01%	++	++	++	+	+	+	±	±
Control	No. 1	+++	++	++	++	++	++	++	+
	No. 2	+++	++	++	++	+	++	++	+

註 i) 石原株精製ウイルスを用いた

ii) (++)~(+) は病変の程度を示す

第4表 精製ウイルスの各種薬剤に対する抵抗性(1)

薬剤の種類	薬剤濃度	保存日数経日							
		3日	5日	7日	10日	15日	18日	21日	28日
Carbol	0.2%	++	+	+	+	±	+	+	±
Fomalin	0.2%	++	++	++	+	+	±	+	±
Morzonin	0.01%	++	++	++	+	+	+	±	±
Control		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

註 i) 小川株精製ウイルスを田いた

特異な病変を認めることは出来ない。ただ僅に散発性の小壊死巣の形成を稀に認めるか、軽い細胞浸潤を散見するに止ることが知られた。この実験成績より、之等薬剤に対する抵抗性は相当に認められ、不活化にも凡そ3週間を要するが、之等の保存期間に於ても、ウイルスの損傷を蒙る率は、経日と共に増加することが、病理所見より推定された(第3, 4, 5表)。

第5表 薬剤添加保存後に於ける精製ウイルスの抵抗

薬剤の種類	病理学的所見	肝臓						肺臓						
		壊死	肝実質細胞変性	病巣周囲における変化	細胞の増大	星状細胞の腫大	肝索の解離	間質の内	細胞浸潤	実質内	肺隔炎	血管及び気管周囲の浸潤	肺隔の肥厚	充血及び出血
		Carbol	+	±	±	±	±	+	+	±	+	±	±	±
Formalin	+	±	±	±	±	++	+	+	+	±	±	±		
Morzonin	+	+	+	±	±	+	+	±	+	±	±	±		
Control		++	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+		

註 i) 21日後に於ける病理所見

3) 濾過性

本ウイルスの濾過性に就ては、総て村上等の予報にも詳しいが、著者の実験では Seitz E. K のみの濾過を行い、その濾液を用いて濾過試験をなし、同様マウスに経口投与して、病理所見により濾過性を検した。第1代の病変は軽減することが多いが、累

代2代に於ては、病変が良く発揮されることが認められた。続けて第5代迄の累代を行つた結果では、良く累代が行われることが証明されたので、第1代に於ける濾過では、濾紙によるウイルスの吸着が考えられるが、次の第2代以下では病理所見が揃つて認められる点より、本ウイルスの Seitz E. K 通過

第6表 Seitz E. K. 濾液より累代した病理所見の比較

ウイルス株	病理学的所見	肝臓						肺臓						
		壊死	肝実質細胞変性	病巣周囲における変化	細胞の増大	星状細胞の腫大	肝索の解離	間質の内	細胞浸潤	実質内	肺隔炎	血管及び気管周囲の浸潤	肺隔の肥厚	充血及び出血
		石原株	++	+	++	+	±	++	++	±	±	±	±	±
小川株	++	+	++	+	±	++	++	±	±	±	±	±		
対照		++	+	++	+	+	+++	++	+	+	+	+		

註 i) 累代第五代の所見

ii) (++)~(±)病変の程度を示す

iii) 群4~5匹のマウスを用いた総合成績を示した。

iv) 実験には肝乳剤を用い経口感染を行つた。

第7表 Seitz E. K. 濾液よりの累代実験

累代数	ウイルス稀釈	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9
		第1代	+	⊥	⊥	+	+	+	+
第2代		+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	+
第3代		⊥	+	⊥	⊥	⊥	+	+	⊥
第4代		⊥	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
第5代		⊥	⊥	⊥	+	⊥	⊥	+	+

- 註 i) ウイルス株は小川株精製ウイルス
- ii) (⊥)~(⊥)病変の程度を示す
- iii) 累代は肝乳剤を用い経口感染を行った

は行われるものと判断された(第6, 7表).

4) エーテル耐性試験

精製ウイルスとエーテルを等量混合良く振盪後シャーレ内に拡げ、エーテルと分ち、37°C 30 min. 保存のものと、40°C 24時間保存のものと、2種類にして、夫々マウスに経口投与を行い、先の実験と同様に病理変化を窺つて、エーテル耐性の有無を検した。エーテルに対する抵抗性は小川、石原両株と

にもあるものの如く、夫々の処置の場合にもいづれも病理変化が良く認められた。両株の処理時間の病変に及ぼす影響を、詳細に検討するに、石原株に於ては37°C 30 min. の処理に於ては各ウイルス稀釈域それぞれに、病変は高度であり、殊に肝実質細胞の変性並に壊死巣の形成が著しいが、40°C 24 h. 処理では細胞浸潤が良く認められ、肝細胞の変化は尠い。小川株では、夫々の処理時間により差がない。

対照にはエーテル処理を行わぬ同様の接種材料を用いたが、エーテル使用の場合と比較して殆んど病理変化が認められない、病変のみで判断し難い点もあるので、累代してりめたが、第2代には主要病変は殆んど恢復した感があり、一般に病理変化は著明である。

要するに本ウイルスのエーテルに対する態度は、いづれも多少の傷害を、病理変化の上の観察では示されるが、ウイルスは抵抗性を示すことが明らかに認められた(第8, 9表)。

第8表 精製ウイルスのエーテルに対する抵抗性

ウイルス株	ウイルス稀釈	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9
		処理時間							
石原株	37°C 30 min.	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
	4°C 24 h.	+	⊥	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
小川株	37°C 30 min.	+	⊥	+	+	⊥	⊥	+	+
	4°C 24 h.	+	⊥	+	+	⊥	⊥	+	+
対照	37°C 30 min.	+	+	+	⊥	⊥	⊥	+	+
	4°C 24 h.	⊥	+	⊥	+	⊥	⊥	+	+

- 註 i) (⊥)~(⊥)病変の程度を示す
- ii) 一群4~5匹のマウス用いた。判定は之等の病理変化の綜合成績を示す

第9表 小川株(精製)のエーテル抵抗性

ウイルス株	累代数	ウイルス稀釈	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9
			処理時間							
小川株	第一代	37°C 30 min.	⊥	+	+	+	⊥	⊥	⊥	+
		4°C 24 h.	+	+	+	+	⊥	+	+	+
小川株	第二代	37°C 30 min.	+	⊥	+	+	⊥	+	+	+
		4°C 24 h.	⊥	⊥	+	⊥	⊥	⊥	+	+
対照	第二代	37°C 30 min.	⊥	⊥	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥
		4°C 24 h.	⊥	+	+	+	⊥	⊥	⊥	+

5) 紫外線による不活性化試験

紫外線照射による精製ウイルスの不活性化試験は次の方法で行った。即ち 35,000 r. p. m. 遠心処理を行つた後の沈澱を、秤量し滅菌食塩水により 10^{-9} 稀釈液を作り、直径 9 cm のシャーレ内に 1.0 ml 宛分注しておき、10 cm の距離からマツダ紫外線殺菌灯 (GI-15WL) により 100V, 3 A にして、シャーレを絶えず振盪し乍ら、照射を続け、一定時間照射した後、夫々に動物に接種して、病変により不活性化の如何を判定する法に従つた。

実験は、紫外線照射時間毎にマウスに接種して不活性化を確かめたが、その成績に於ては、先づ原株を用いた実験に於て、5 min. 照射に於てもウイルスの

損傷を蒙るかに推定されたが、10 min. 照射にては、未だ限局性の小壊死巣が散見せられる部分があり、ウイルスの感染能力を有することが推測された。次に 20 min, 30 min, 40 min, と時間を増すにつれ殆ど病変は認められない迄に至るが、之の成績を確かめる意味より行つた肝臓を用いた累代実験に於ては、20 min, 照射に於ても、小壊死巣の認められる部分があるので、20 min. 照射によつて、完全にウイルスの不活性化が行われるとは考えられない。この所見より、紫外線照射により、精製ウイルスでは良く傷害を受けるが、尚抵抗して感染能力を保有するものであり、40 min. 以上の照射により大体不活性化する限界にあるものと推測された (第10表)。

第 10 表 紫外線照射による精製ウイルスの不活性化

照射時間	ウイルス株累代数	石原株 (累代第一代)	累代第二代
		病理学的所見	病理学的所見
5 min.		肝：軽度の細胞浸潤(実質) 肺：変化なし	肝： } 変化なし 肺： }
10 min.		肝：限局性の小壊死巣形成あり病巣周囲の細胞(単球)密集した中に好中球の混在を認む部分がある	肝： } 変化なし 肺： }
20 min.		肝：軽度の細胞浸潤あり 肺：著変なし	肝：限局性の小壊死巣形成、細胞浸潤 肺：血管周囲の軽度の円形細胞浸潤
30 min.		肝： } 変化なし 肺： }	肝：軽度の細胞浸潤あり 肺：変化なし
40 min.		肝： } 病変なし 肺： }	肝： } 変化なし 肺： }

6) 感染防禦試験

先の実験で、消毒薬及び紫外線照射により精製ウイルスの不活性化が行われることは明らかとなつた。本実験では、夫々の方法で精製ウイルスの不活性化を行い、爾後の免疫を行うことによる感染防禦能を獲得する能力の程度を、生ウイルスで攻撃し、耐過マウスの病理学的変化を判定することにより、感染防禦抗体の証明を試みた。

先づ小川株、石原株 夫々の不活性化は、消毒薬の内 0.2%, Formalin, 0.01%, Marzonin 添加の際は 4°C 氷室に 3 週間以上保存した後、免疫に供し、紫外線照射の場合は、40 分の照射後免疫に用いた。免疫の要領は、不活性化精製ウイルスを夫々、0.3 ml, 0.5 ml 宛 3 回腹腔内接種を行い、2 週後に於て生ウイルスで攻撃し、更に 2 週間後に於て、肝臓を中心とした病理学的所見に基き判定した。

先づ紫外線照射試験の結果では、40 min 照射に

より、ウイルスの不活性化は行われることの結果を得たので、小川株及び石原株のそれぞれ精製したウイルス株の不活性化を行い、予め十分に不活性化されたのを確かめた後、不活性化ウイルスの接種免疫を続け、生ウイルスで攻撃した結果を、病理所見で窺うに、対照と比較して病変は一般には緩和され、小川株では、稀釈域に於ては稀に疑しい部分も示されたが、良く抑制されている。又石原株でも、同種精製ウイルス石原株の攻撃に、良く耐過している所見を得た。かつて粗製ウイルスの同種の実験でも同様な所見を得た報告があるが、精製ウイルスの場合は、病理変化の抑制が甚だ優れた結果を示して、感染防禦効果が良く認められる事実が注目された (第11表)。同様な実験をフォルマリン、又はマーゾニン加不活性化ウイルスを用いて行つた成績では、病変の出現即ちウイルスの増殖と見做す部分が、僅かながら、ウイルス稀釈域によつては幾分ともに残存する傾向が

第11表 紫外線照射精製ウイルスの免疫効果

攻撃株	ウイルス稀釈	10-2 10-3 10-4 10-5 10-6 10-7 10-8 10-9											
		免疫群		対照		免疫群		対照		免疫群		対照	
小川株(精製)	免疫群	上	上	上	±	±	上	上	上	上	上	上	上
	対照	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
石原株(精製)	免疫群	上	上	上	±	±	±	+	+	上	上	上	上
	対照	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

- 註 i) 不活化精製ウイルスは紫外線照射(40min)によつた
 ii) 一群夫々3~4匹宛マウスを用いた
 iii) (卅)~(上)病変の程度を示す

示される部分が、聊か納得出来ない点であるが、他には良くウイルス増殖の抑制即ち免疫効果が、観察出来る。之等の所見が、病理所見による判定であるため免疫効果を明瞭に指摘出来ない憾はあるが、病理所見に於てはかなりの対照との差が見られる事実

から、まづ有意な免疫効果と判断して大過なきものと推測された(第12表)。

次に小川、石川両株を用い、交叉免疫を行い感染防禦能の程度を確めた。之等両株とも抗原性は略々一致して、互に感染防禦が交叉的に成立する。紫外線照射による不活化ウイルスを用いた実験に於ても、(第13表)先の実験に見られたと同様に、ウイルスの稀釈域により、時に病変の発現が示される部分があり、薬剤による不活化ウイルスを用いた実験でも(第14表)時に良く病変を完全にまで防禦する部分があり、数回の実験により、病理変化を完璧に近く抑制してしまう結果は得難いことが理解されたが、之等の実験を総合して、不活化ウイルスの接種により、ウイルスの感染の抑制若くは阻止、又はウイルス増殖をある程度に牽制させるに足る抗体の形成は、窺われるものであつて、病理学的所見による判定も、斯るウイルスの一般性状の検討には有意な方法であることが示唆された。

第12表 不活化ウイルスによる免疫効果

攻撃株	ウイルス稀釈		10-2 10-3 10-4 10-5 10-6 10-7 10-8 10-9															
			不活化の方法		免疫群		対照		免疫群		対照		免疫群		対照			
小川株	フマオリ	不精製	イ活	ル化	ウイルス	免疫群	上	上	上	+	±	±	±	+	上	上	上	+
						対照	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
石原株	マニ	活製	ル	化	ウイルス	免疫群	上	上	上	+	±	±	+	上	上	上	上	上
						対照	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

- 註 i) 0.2%フォルマリン、0.01%マーズニン添加3週間以上永室保存
 ii) マウス使用数は一群3~4匹を用いた
 iii) (卅)~(上)病変の程度を示す

第13表 不活化精製ウイルスによる交叉免疫試験

攻撃株	ウイルス稀釈		10-2 10-3 10-4 10-5 10-6 10-7 10-8 10-9												
			免疫別		免疫群		対照		免疫群		対照		免疫群		対照
小川株(精製)	免疫群	免疫群(小川株)	上	上	上	上	±	+	±	上	上	上	上	上	上
		対照	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	
	対照	免疫群(石原株)	上	上	上	+	+	±	±	上	上	上	上	上	上
		対照	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	
石原株(精製)	免疫群	免疫群(石原株)	上	上	上	上	+	±	上	±	上	上	上	上	上
		対照	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	
	対照	免疫群(小川株)	上	卅	上	+	+	±	±	±	上	上	上	上	上
		対照	卅	±	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	

- 註 i) ウイルス不活化は Marzonin (0.01%) 添加永室3週間以上保存したもの
 ii) (卅)~(上)は病変の程度を示す iii) 一群4~5匹のマウスを使用した

第14表 不活化精製ウイルスの交叉免疫試験

攻撃株	ウイルス稀釈 免疫別	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
		小(精川株製)	免疫群(小川株)対照	⊥	⊥	⊥	±	±	±
	免疫群(石原株)対照	⊥	⊥	⊥	⊥	±	+	±	+
	免疫群(小川株)対照	⊥	⊥	⊥	+	+	+	+	+
石(精原株製)	免疫群(石原株)対照	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	±	⊥	±
	免疫群(小川株)対照	⊥	⊥	⊥	+	+	±	±	⊥
	免疫群(石原株)対照	⊥	⊥	⊥	+	+	+	+	+

註 i) ウイルス不活化は紫外線照射 (40 min) によつた

ii) 交叉して免疫を行い異なるウイルス株で攻撃した iii) (⊥)~(⊥)病変の程度を示す

総括及び考按

肝炎患者材料より、孵化鶏卵の累代によつて分離されたウイルスを、超高速遠心法によりて精製し得られるとの報告は橋本³⁾の報告に詳しい。

著者は、従来迄分離肝炎ウイルスの実験に用いられた粗製ウイルスに関する報告を更に確認する意味より、専ら精製ウイルスを用いた実験を試みた。粗製ウイルスを用いた実験では、常に考慮すべき条件が附随していた。即ち本ウイルスによるマウスの発症致死は認められないで、病理学的所見によりて感染の判断を下す必要があり、そのためには、ウイルスと共に混死する他の組織片等の夾雑物の反応が、必ずともに発現することであり、病理変化を吟味する上に、検討の必要があることが推定された。

著者は斯る点より、ウイルスを可及的単離に近い状態までに、精製純化を行い、感染経路を最も刺戟の多いと思われる経口感染にとり、病理学的所見を判定する方法を採用した。

ウイルスの感染を確認するには、接種動物の発症致死の必ず伴うとの条件は、ウイルスの感染実験に於ては、必要にして欠ぐべからざる条件であるが、ウイルスの性状が、本ウイルスの如く、病理変化のみで感染の様相を判断する所謂不顕性感染を惹起する場合は、病理学的所見に依存しなければ、感染の判定は容易ではない。又他に適當の感受性をもつ動物が存在すれば良いが、本ウイルスでは、現在迄認められていない。(Wildführ (1953)の用いたGoldhamster 就ては未だ実験を行つていないので推定することは至難である)。斯る点よりウイルス

を最も精製された状態で、ウイルスの多量を得ることを目的に精製濃縮されたウイルスを使用し、最も重要と思われるウイルスの一般性状を具に検討した。

第一編に於ては、熱に対する抵抗性を、本編に於ては同様な方法で、薬剤に対する抵抗性、更に濾過性、エーテル耐性試験、紫外線照射による不活化試験を試みたが、いずれの場合にも、夫々のウイルスの一般性状と比較して、抵抗性が強く、しかも耐える限界がより高いことを病理学的所見では判断し得た。之の様な性状は、一般に粗製ウイルスで行つた実験成績と、殆ど一致した傾向を示すことも指摘された。もとより病理変化のみで、総てウイルスの増殖形式とは判断されないが、病理学的変化の高度の場合は、ウイルスの増殖は、それに依つてかなりの程度に旺盛であることも推測されるので、病理変化の程度に依つて、著者の試みた判定法を採用することも、試みるべき一法であると思料された。翻つてウイルスの感染による発症致死の場合を考えて見ても、発症致死を招来しない時でも、病理変化が発現することがあることは推定されるので、著者の判定に論議はあるとしても、幾分の誤差として評価されるものであろう。

次に病変の程度に依つて、或は感染の様相を窺い得るウイルスの性状を確認する方法を採用したため、病変の種類により、耐過する程度をも、時により斟酌して判断し、更に考慮する必要も生ずる訳であつて、その判定をどの程度にするかの問題があるが、本実験では、専ら病理学的所見として、肝臓を中心に検討したため、肝細胞障害を主に総合判定した。

以上の点から、精製ウイルスを用いた実験の成績

では、夫々の性状は一般ウイルスの特性と甚だ異り、殊に熱に対する抵抗力は強く、又薬剤に対する抵抗力も亦かなりの抵抗を示す事実が明らかであつて、特異な性状と指摘出来る。

かつて Havens (1944)¹⁰⁾ の記載以来肝炎ウイルスの特性に関しては、Lichtman (1949)¹¹⁾ は 56°C ~60°C の温浴内に 30~60 min の抵抗を示すことを認め、Neefe et al. (1946)¹³⁾ は諸種防腐剤を含む血清内では月余に亘り活性を有するとし、更に Neefe et al. (1945)¹²⁾ も同様の実験を示し、紫外線照射1時間にして不活化されると述べている。Maccallum & Bradley (1944)¹⁴⁾ は乾燥状態に於ては14ヶ月間の活性を示したと報告している。又我国に於いては木村 (1954)¹⁵⁾ 又は村岡 (1958)¹⁶⁾ の報告にも、乾燥及び低温に強く抵抗を示し、しかもある程度の耐熱性を有することが示されている。之等の報告例を詳細に窺うに、研究者夫々により、それぞれ分離されたウイルスの性状が異り、又抵抗力もそれぞれ差があるのは止むを得ないし、未だ病原体の確認されていない現況では、抵抗力の判定方法にも、それぞれに差異があるので、一概には論議されないが、他のウイルスと異り、極めて強い抵抗力を有することは、重要な特性として指摘されるのである。

著者の実験に於ても、最良の条件で検討した結果、本ウイルスの特性をかなり明確に把握し得たと思料されるが、ただ判定方法に於て病理学的所見によつた観察であつたので、温熱、薬剤、紫外線等に対する抵抗力の限界は、多少でも動揺があるのではないかとの疑念は遂に解明されるに至らなかつた。

結 論

肝炎患者材料より分離されたウイルスを用い、橋本の方法によりて精製ウイルスを得、ウイルスの精

製純化された最良の条件で、本ウイルスの一般性状中殊に重要と思われる薬剤に対する抵抗力、濾過性、エーテル耐性、紫外線による不活化等を吟味した結果次の知見を得た。

1) ウイルスの一般性状の検討に於ては、既に行われている病理所見により判定する方法によつた。この判定については未だ論議があると思はれるが、粗製ウイルスの実験と比較して、殆どその成績が一致する点より有意な方法と判断された。

2) ウイルスの性状中、薬剤に対する抵抗力はかなり強く、不活化には3週間以上を要することが示されたが、経日と共に病変は漸減の傾向を示した。

3) 他の性状では、Seitz E. K. 濾過性、エーテル耐性が認められ、紫外線照射実験では 40 min. 以上の照射を受けて完全に不活化されるものと推測された。

4) 不活化された精製ウイルスの腹腔内接種を行つた免疫試験に於ては、3回不活化ウイルスの接種により、同種若くは異種のウイルスの攻撃に耐えることが認められたが、時に軽度の病変が残存していて、判定の困難となる例も尠くなかつた。之等の残存する病変に対する評価は十分ではないが、不活化ウイルスによる免疫効果はある程度に認められた。

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導を受け、尚校閲の勞を賜つた恩師村上栄教授に衷心より感謝の意を表する次第である。

参 考 文 献

- 1) 鈴木：岡山医学会雑誌掲載予定。
- 2) 村上等：第五回日本ウイルス学会総会講演要旨。
- 3) 橋本：岡山医学会雑誌第70巻，7号，1958。
- 4) 時未：岡山医学会雑誌，第69巻，4号，1957。
- 5) 大賀：岡山医学会雑誌，第69巻4号，1957。
- 6) 真鍋：岡山医学会雑誌，第69巻，6号，1957。
- 7) 松浦：岡山医学会雑誌，第69巻，12号，1957。
- 8) 藤原：岡山医学会雑誌第69巻，4号，1957。
- 9) 稲垣：岡山医学会雑誌，第69巻，6号，1957。
- 10) Havens：J. A. M. A. 134, 653, 1947。
- 11) Lichtman, S. S.: Diseases of the liver, Gallbladder and Bile Ductes, p. 394, Philadelphia Lea & Febiger 1949。
- 12) Neefe J. R. Stokes J. Jr Baty. J. B. & Reinhold J. G.: J Am. Med. Assn. 128, 1076, 1945。

- 13) Neefe J. R. Gellis, S. S. & Stokes J. Jr.: Am. J. Med. 1, 3, 22, 1946.
- 14) Maccallum F. O. & Bradley W. H.: Lancet 2, 228, 1944.
- 15) 木村: Acta. Scholae Med, Univ. in Kioto 30, 2, 133, 1954.
- 16) 村岡: 日本細菌学雑誌, 第13巻, 第10号, 1958.
- 17) 伊藤: 岡山医学会雑誌掲載予定, 1959.

A Further Studies on Purified Hepatitis Virus

Part II Findings on the Some Properties of Purified Hepatitis Virus

By

Takamichi SUSUKI

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

Using the hepatitis virus isolated from hepatitis patient. the author purified the virus by HASHIMOTO's method, and studied some properties that were supposed to be important for the virus; the resistance to disinfectant and ether, the inactivation by ultraviolet rays and the filtrability. The following results were obtained.

1) For the study of the properties of the virus the author adopted the pathological findings as to determine the causable change by the infection. This method was assumed to be reasonable in spite of the dispute for the good agreement of both results obtained by tests on the purified and unpurified virus.

2) The virus was resistant fairly good for disinfectant, hence it needed for over 3 weeks to inactivate the virus completely by the action of disinfectant, and the virus gradually lost its activity as the duration of disinfectant treatment.

3) It was confirmed that the virus was filtrable well through the Seitz EK filter and resistant to the action of ether. Also the virus could stand against the irradiation of ultraviolet rays for less than 40 min.

4) By the intraperitoneal injection of inactivated virus for 3 times, the animal could be immunized for the challenge of the same or the other type virus. But in sometime slight pathological changes were observed, and this implied the immunization thus obtained was not so stiff as capable for immunising the all challenge.
