

岡山県下に発生した流行性肝炎 特にその病原体に関する研究

第二編

分離ウイルスのマウス尾静脈内接種による感染

岡山大学医学部微生物学教室（主任：村上 栄教授）

稲垣 素 臣

〔昭和32年6月6日受稿〕

緒 言

分離ウイルスの孵化鶏卵累代培養を行い、死亡した鶏胎児若しくは肝乳剤をマウス尾静脈内に接種する場合、マウスを短時間に斃死せしめ得る所謂急死毒の存在及びその性状に就て、第一編に於て論述したが、若し斯る急死毒が証明し得ざる場合は感染も成立せぬものか、若し成立するものとすれば病理学的所見は如何に示されるかの疑念のもとに更に引続き実験を行つた。

急死毒の証明は各ウイルス株の間に、多少の強弱の差はあつたが認められた事実から、その一般性状を追究した結果ウイルスの多寡により急死毒の毒性は大きく左右されるものであるとの結論を得たが、急死毒の強い致命率の高い場合は、結局感染もまた高度に惹起するであろうことは推測され、急死毒の毒性の劣る時は感染も軽度である様に予想された。その理由は急死毒はウイルス自体の多数の集合体であつて、而も高度なウイルスの増殖があつた場合に強く發揮される、ウイルスに急死毒は至大なる関係があるからである。マウスの尾静脈内接種によつて短時日の内に死亡した時は中毒死であり、長期間を経て死亡した場合の死亡が感染死の別はあつてもその病因は結局ウイルスによる斃死と先ず考えるのが至当であると思う。

本編に於ては特にマウスの示す病理学的所見を重視し、各ウイルス株の示す急死毒と爾後の感染の経過を中心に実験を進めた。その結果

マウス尾静脈内接種によつても、よく感染が起り而もその病理学的所見は高度である場合が少くない。更に急死毒との関係を窺い得る知見を得たので茲にその大要を報告する。

実験材料及び方法

供試ウイルス：第一編で実験に使用したウイルス株青森、石原、小川株を孵化鶏卵で累代して保存したものを用いた。既に第一編で記載した如く急死毒を証明した各ウイルス株である。

感染及び累代：孵化鶏卵による累代は総て第一編で述べた如く孵化鶏卵胎児若しくは肝臓乳剤を用いて孵化6～7日卵の漿尿腔内に接種し後に鶏胎児の死亡を確認した上、夫々胎児又は胎児肝臓を乳剤とし次代累代接種材料とした。

マウスの感染：本編では前に記載したと同様にマウス尾静脈内に0.2 ml宛接種し20時間前後によるマウスの斃死を急死毒として、致命率を算出し、更に別にその後の死亡があれば感染死として表示し、あとに生残した場合とに別けて病理学的所見により検討を行つた。

実験成績

1) 孵化鶏卵に於ける各ウイルスの接種所見

各ウイルス株を孵化鶏卵の漿尿腔内に接種した場合の特異な感染所見は分離直後の累代の若い時代は定型な鶏胎児の死亡があるが、累代培養を継続する時は胎児の死亡が減少し而

も死亡日数は延長の傾向があることは先に述べた。実験に使用した青森株はマウスで分離累代され、更に孵化鶏卵に累代移植された関係から実験当時は比較的若い時期であり、累代毎に病理所見は不定であつたに拘わらず、急死毒に示された毒性は強い場合が多いのが認められた。石原、小川株は分離より累代数が長期間に亘つており、実験当時は既に第42代累代したためか、感染も一定しており病変は累代毎に左程の動揺を示さないが、毒性の点では青森株に劣つた結果を見せていた。

ii) 各病毒株をマウス尾静脈に接種した場合の所見

前記の各病毒の孵化鶏卵胎児乳剤をマウスの尾静脈内に接種した場合短時間でマウスの斃死が認められるものを第一編では急死毒と呼称したが、爾後の観察によりマウスの斃死が相当数に認められると共に、生残マウスも少くない。この場合の急死毒による斃死は中毒死であり、後より死亡するマウスは感染死であると推定されるが、当然生残つたマウスは死の転帰をとる迄に至らず、感染し治癒したものもあり、感染の不成立の場合も考えられるであろう。之等のマウスに就て病理学的所見より考察して病毒に由来する之等の或は中毒死又は感染死の相互関係を明らかにしたいと考え実験を試みた。

先づ第一編に述べた各病毒株をマウスの尾静脈に接種した場合のマウスに見られる生死の別を表示すれば第1、第2表の如くである。第1表では特に急死毒を重視したので稀釈も1:2~1:128倍に稀釈して接種したが、急死毒により短時間に死亡するが、爾後の感染に見られる死亡数は、夫々日数を附して区別して表示した。而しこの場合における感染死の表示には急死毒によるマウスの斃死数を含めた致命率で比較することにし全毒性と仮称した。

その実験結果から見るに、急死毒の高い青森株及び小川株では19.04及び22.2を示し高率を示していると共に全毒性も52.3及び55.5であり、急死毒の低い石原株では全毒性は著しく低く19.1である。

第2表では急死毒に重点をおかないで、稀釈を高度にし感染死を目標に実験した。その結果では斯る高い稀釈では、全く急死毒は証明せられず従つてマウスの斃死は認められない。之の事実を利用して後の感染死を見るに急死毒が見られた場合と異り、マウスの斃死は高い稀釈迄に見られるが、それでも青森株の致命率40.7より石原株の11.1と、その全毒性は急死毒で見られた各病毒の間の毒性とほぼ同様な傾向が見られた。若し之等の病毒株が一様に全毒性が高い場合には急死毒を見

第1表 各病毒株接種による毒性の比較

病毒株	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	死/全	急致命率	全致命率
青森株	●○○ 2	●●●● 2 16 16	●●●● 2 10 2	●○○● 11 10	●○○○ 11 15	○○○○	○○○○	4/21	19.04	11/21 52.3
石原株	○○○○	●○○○ 2	○○○○	●○○○ 4	○○○○	●○○○ 7	○○●○ 17	1/21	4.75	4/21 19.1
小川株	●●○ 2 2	●○○● 2 10	●○○● 2 12	○○●○ 12	○●○ 10	○●○ 7	○●○ 5	4/18	22.2	10/18 55.5

註. i) 接種材料、病毒株接種死亡鶏胎児乳剤
 ii) 各病株共に上段の数字は急死毒による中毒死
 下段の ○印は生 ●は死亡を示し附した。数字は死亡日数●2は急死毒を意味し他は感染死を示す。
 iii) 死/全は分母は使用マウス総数分子は死亡マウスを意味す。

第2表 稀釈による各ウイルスの毒性の比較

ウイルス株	ウイルス稀釈									死/全	全毒性致死率
	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9		
青森株	○ ○ ●	● ● ○	● ○ ○	● ○ ○	● ○ ○	● ● ○	● ○ ○	● ○ ○	● ○ ○	11/27	40.7
	11	6 9	16	7	7	10 12	11	16	11	9/27	33.3
石原株	● ● ●	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	3/27	11.1
	10 11 7	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	3/27	11.1
小川株	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	6/27	22.2
	7	5 8	11	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	5/27	18.5

註. i) 接種材料は胎児乳剤
 ii) 表中○～●は生死を示し附した数字は死亡日数

で大体の毒性の強さは推測されるであろうが、一般に急死毒は、各ウイルス株により強弱の差があり、而も1:64倍の稀釈では殆んど認められない程度の毒性である。

iii) 各ウイルス接種マウスに於ける病理学的所見

各ウイルスをマウスの尾静脈に接種した場合急死毒及びその後にもマウスの斃死が観察され、而も生残マウスもある事実は既に述べたが、之等の夫々について病理学的所見を窺い感染の様相を知る意図のもとに、夫々のマウスを分ち臓器を採集して病理標本を作りその病理所見を観察した。急死毒で斃死したマウスでは病理学的所見はかつて村上等¹⁾により論述された肝臓を中心とする病変は、定型的には認められない。時に肺に於ける変化がある場合があるが特定のものではなく、肝臓に於ける病変は特記すべきものは認めない。他の感染死と見なされるマウスは斃死日数が4~21の間に認められる例では感染はよく成立し、病理学的所見も高度な場合が多い。先に村上等²⁾の予報に述べられた如く、その変化は特に肝細胞の変性壊死及びこれに伴う肝実質及び間質に於ける細胞浸潤がある。肺臓にあつては胞隔炎及び気管枝及び血管周辺に於ける高度の円形細胞浸潤を挙げることが出来る。之を生残マウスの無症状耐過例に見るに病理学的変化は前者に比して非常に軽度で

あつて、軽度の細胞浸潤が認められるに過ぎない例も少くない。

是等の実験成績に於ける病理学的所見より感染の様相を窺うにウイルス株により病理所見に差異が見られ、マウス斃死率の高い青森株とマウス斃死率の低い石原株とは、その所見に於て明かに差異がある。又感染死を見ても致死率は青森株に於て致死率40.7であり、石原株11.1で示されている。更に感染死マウスにおいては、無症状で経過した例と比較し格段の病理所見に差があり、而も青森株の病理所見が高度である点が注目される。

iv) 接種材料別による病理学的所見

前回までの実験は総てマウスに接種材料とし、各ウイルス株接種により死亡した鶏胎児乳剤を用いた。本実験では第一編と同様に胎児、胎児肝臓、胎児(肝臓を除く)に分ち、夫々に就て急死毒及び病理所見を比較した。又臓器別の急死毒と感染との関係、更に夫々の病理学的所見を検討した(第3, 第4表)。

前述の実験と同様に各ウイルスの急死毒と感染死とに別けて見ると、鶏胎児、鶏胎児肝及び胎児(肝臓を除く)の順に急死毒は19.4~4.75となり、全毒性も52.4~14.3とやや降下する(第5表)。

更に急死毒による中毒死を示さぬ範囲の稀釈迄夫々のウイルス乳剤を稀釈して行つた実験で

第3表 病毒接種マウスに於ける病理学的変化

病理学的所見 接種マウスの区分	肝 臓							肺 臓			
	壊 死	肝 変 細 胞 性	肥 星 大 芒 及 細 胞 生 の	肝 索 の 解 離	実 質 内 に 於 け る 細 胞 浸 潤	間 質 内 に 於 け る 細 胞 浸 潤	充 血 及 出 血	胞 隔 炎	円 形 細 胞 浸 潤	血 管 枝 及 周 圍	胞 隔 肥 厚
急死毒による死亡例 (20時間にて死亡)	上	上	上	-	+	+	上	+	-	+	-
感染死と見られる死亡例 (マウス死亡4~21日)	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
無症状耐過した例 (マウスの死亡なきもの)	-	-	+	+	+	+	-	卅	+	+	-

註. i) 青森株鶏胎児乳剤
ii) (卅)~(-) 感染による病理所見の程度を示す.

第4表 病毒接種マウスに於ける病理学的変化

病理学的所見 接種マウスの区分	肝 臓							肺 臓			
	壊 死	肝 変 細 胞 性	肥 星 大 芒 及 細 胞 生 の	肝 索 の 解 離	実 質 内 に 於 け る 細 胞 浸 潤	間 質 内 に 於 け る 細 胞 浸 潤	充 血 及 出 血	胞 隔 炎	円 形 細 胞 浸 潤	血 管 枝 及 周 圍	胞 隔 肥 厚
急死毒による死亡例 (20時間死亡)	上	上	上	-	+	+	上	上	-	卅	-
感染死と見られる死亡例 (マウス死亡4~21日)	卅	+	+	+	卅	卅	+	卅	+	+	+
無症状耐過した例 (マウスの死亡なきもの)	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-

註. i) 石原株胎児乳剤
ii) (卅)~(-) 病理所見の程度を示す.

第5表 接種材料別による病毒毒性の比較

病毒稀釈 接種材料別	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	死/全	急致死 死亡率	死/全	全致死 毒性率
孵化鶏卵	0/3	2/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	4/21	19.04	
鶏胎児	●●● 4 7	●●●● 2 2 14	●○○ 2	●○○ 2	●●○ 17 20	○○○	●○○	11		10/21	47.5
孵化鶏卵	2/3	0/3	2/3	1/3	0/3	0/2	0/2	0/2	5/19	26.3	
胎児肝臓	●●○ 2 2	●○○ 5	●●●● 2 7 2	●●●● 10 2 14	○○○	○●● 15 11	○○○	○○○		11/21	52.4
孵化鶏卵(胎 児肝臓を除く)	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/21	4.75	
	○○● 4	○○○	○○○	●○○ 2	●○○ 10	○○○	○○○	○○○		3/21	14.3

註. i) 青森株鶏胎児乳剤
ii) 表中 ○~● は生死を示し, 附した数字は死亡日数

は、第5表の結果と同様に全毒性は胎児肝臓を除いた場合急激に低下する。第6表では鶏胎児若くは胎児肝臓では40.7~37.04を示し、胎児肝臓を除いた場合は殆んど全毒性は認められない(第6表)。

第6表 接種材料別による毒性の比較

病 毒 稀 釈 接 種 材 料	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9	死/全	全毒性 致命率
孵 化 鶏 卵	○○○	○○○	○○● 4	○●● 5 7	○○● 12	●○○ 10	○○● 11 11	○●○ 14	●○○ 18	9/27	33.3
鶏 胎 児	○●○ 4	○○○	○●○ 7	●○○ 11	●○○ 11	●●○ 7 12 17	●○○ 20	●○○ 17	●○○ 15	11/27	40.7
孵 化 鶏 卵	○○○	○○○	○○● 12	○○○	○○○	○○○	○●● 7 11 14 17	○●○ 7	○●○ 12	7/27	25.9
胎 児 肝 臓	○○○	○●○ 7	○○○	○○○	○○● 10	○●● 15 5	○●○ 10	●●● 11 14 11	●●○ 11	10/27	37.04
孵 化 鶏 卵 (胎 児 肝 臓 を 除 く)	○○○	○○○	○○○	○○○	○●○ 20	○○○	○○○	○○○	○○○	1/27	3.7
	○○○	○○○	●○○ 11	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	1/27	3.7

註. i) 青森株胎児乳剤
ii) ○~● 表中マウスの生死を示し、附した数字は死亡日数

次に以上の実験結果を病理学的所見の上から見るに、孵化卵胎児若くは胎児肝臓と接種別の場合、病理所見は高度な病変として認められるが、胎児(肝臓を除いた)の時は急激に病変は軽度となり、希には感染の成立が疑問視される例も少くない(第7表)。

第7表 接種材料別による主要病理学的変化

病 理 学 的 所 見 臓 器 の 区 分	肝 臓							肺 臓					
	壊 変	肝 肥 大 星 芒 大 及 細 胞 増 生	肝 索 の 解 離	細 胞 浸 潤	実 質 に 於 ける 細 胞 浸 潤	間 質 に 於 ける 細 胞 浸 潤	壊 死 集 周 辺 に 於 ける 細 胞 変 化	胞 隔 炎	血 管 周 圍 炎	気 管 周 圍 炎	細 胞 浸 潤	胞 隔 壁 の 肥 厚	充 血 及 び 出 血
孵 化 鶏 卵 胎 児	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	+	+	+
孵 化 鶏 卵 胎 児 肝	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	+	+	+
孵 化 鶏 卵 (胎 児 肝 を 除 く)	-	+	⊥	⊥	+	+	+	+	+	+	+	+	-

註. i) 青森株
ii) (卅)~(-) 病理所見の程度を示す。

総 括 及 び 考 按

著者は既に第一編に於て各病毒株をマウスの尾静脈内に接種する時はマウスを短時間に斃死せしめる毒性の存在を証明し急死毒と呼称し、その急死毒に関して諸種の実験を試みた結果、各病毒株の間に証明せられるこれ等

の急死毒は総て病毒自体に由来するものであつて、既に知られているウイルス及びリケッチヤの毒素とほぼ同一の性状を保有するものであること、及び病毒自体より単離出来るものでなく病毒自体である事実について論及した。

既に急死毒について行つた実験結果では未

だその本態は疑問視すべき点が少くない。寧ろ病毒自体の研究から見れば、急死毒の証明は病毒の一部分を窺い得たということとどまる様に推定された。よつて本編に於てはマウスを短時間内に斃せしめる急死毒及びその後に於ける病毒による感染の様相を知る意図のもとに、実験を重ねた。

本編に於ては先づ急死毒によるマウスの斃死及びその後に於けるマウスの斃死を感染死と考え、之等を併せて全毒性と呼称したが、之等の病毒の毒性について知り得た所見のもとに、夫々の場合に於ける感染の様相を病理所見により把握して評価した。

実験の上に表示された病毒の毒性が各病毒株により多少の差異は認められたが一様に病毒を多量に含有した臓器乳剤を使用した時は急死毒による中毒死若くはその後の感染死も多く従つて致命率も高い。而も鶏胎児肝臓の有無により著しく病毒量は異なる。

かつて村上等によつて行われた鶏胎児若くは胎児肝臓による累代は、正当な累代培養であつたことを知るのであつて、間接的にも本病毒の肝親和性を証明したことにもなると思ふ。

又病理学的所見により確めた病変では、定型的な病変を呈す例はマウスの急死毒では全く認められず、ある期日を経て斃死した場合は高度に、斃死しない時は一般に軽度な傾向が認められた。結局急死毒が強い場合はそれに平行してマウスの斃死率も高く、而も全毒性も従つて強い場合が多く致命率も高いものであり、感染も重度に進行する傾向にある。病毒側からいへば病毒の増殖が旺盛な事を意味するものであつて、病毒の増殖の尺度は毒素の証明によつてもほぼ推測され得るものと思われる。

主 要 文 献

- 1) 村上等：第2回日本ウイルス学会総会肝炎シンポジウム，1955。
- 2) 村上等：第4回日本ウイルス学会総会記録，1957。
- 3) Henle and Henle: *jour. Exp. Med.* **84**, 623

結 論

流行性肝炎患者の材料より分離された病毒を、マウスの尾静脈内接種により急死毒の存在を証明した次第は第一編に於て述べた。本編に於ては、更にマウス尾静脈内接種により惹起する急死毒による中毒死と、その後のマウスの斃死による感染死と病理学的所見による感染の様相を、詳細に追究した結果次の所見を得た。

1) 各病毒株をマウス尾静脈内に接種することにより、急死毒とは別に接種後数日にしてマウスの斃死する毒性の存在を確めた。之等の毒性の存在は、各病毒株により多少とも異つても、総ての病毒株に証明せられたが、稀に斃死しないで経過する例もあつた。

2) 之等の二様の毒素は病毒の性状とよく近似しており、孵化鶏卵胎児若くは肝臓乳剤によく証明せられ、肝臓を除いた胎児乳剤の時は毒性が著しく低下する。胎児肝臓の有無が、毒性の強弱を左右している様に推測された。

3) 之等の所見から毒性として示された急死毒若くは感染死で示された毒性は、等しく各病毒株の増殖の高度な場合は強い毒性を発揮するが、弱い時は毒性も低くマウスの斃死を見るに至らないで経過する。

4) 之等の夫々の場合に於ける病理所見では急死毒では定型的な病変は認めないが、他の感染死の時は高度な病変を示すことが多く、更に生残マウスでも希に病変が明瞭なる場合もあるが、感染は概ね軽度な場合が多い。

稿を終るに際し終始御懇篤なる御教示を戴き、且御校閲の勞を賜つた恩師村上栄教授に衷心より謝意を表す。

～639, 1946.

- 4) 北岡：日本細菌学会，**3**，15～17，1948。
- 5) Havens: *Viral and Rickettsial of man*, 1951.
- 6) 中村・伝染性肝炎，1953。

Studies on the Pathogenic Agent of Infectious Hepatitis in
Okayama Prefecture

II: Infection by the inoculation of the virus into
the caudal vein of the mouse

By

Motoomi Inagaki

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

In the present section, the author studied comparatively the death by the lethal toxin and the death by the infection of the virus itself. The caudal vein of the mouse was chosen as the site of inoculation, and the establishment of infection was judged by observing the pathological changes of the inoculated mouse. The results were as follows:

1) By the inoculation of the virus into the caudal vein of the mouse, beside the lethal toxin which killed the mouse within about 24 hours, a toxicity was observed to which the mouse succumbed a few days after the inoculation. This toxicity was proved in all tested strains, though somewhat varied according to the strains of the virus. Some cases were observed, however, in which the inoculated mice survived.

2) These two sorts of toxicity were well demonstrated in the chick-embryo, particularly in the liver. The emulsion of other materials than the liver showed but a little toxicity. It is inferred, therefore, that the liver of chick-embryo plays a very great role in the manifestation of the toxicity.

3) When the multiplication of the virus was very well, the toxicity of these two kinds was very high. When the multiplication of the virus was bad, the toxicity was low and mice survived.

4) In the case of the death by the lethal toxin, the typical pathological findings could not be observed. In the case of the death by infection, however, the typical pathological changes were observed in high degree. Even in the surviving mice, the pathological changes were slightly observed.
