

分離肝炎ウイルスと類似ウイルスとの比較研究

第 1 編

分離肝炎ウイルスと Ectromelia Virus との比較動物実験

岡山大学医学部微生物学教室（主任：村上 栄教授）

松 浦 秀 吉

〔昭和 32 年 11 月 25 日受稿〕

緒 言

肝炎患者材料から孵化卵及びマウスを用いて、村上等により分離された肝炎ウイルスに擬すべきウイルスの生物学及び免疫学的性状については、詳細な報告が行われている⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾が、他の類似ウイルスとの比較研究は、当教室の高田³⁷⁾の行った泉熱ウイルスとの比較研究の他にはない。又種々の方法に従って実施された分離肝炎ウイルスの免疫方法によつても、病原的意義を充分決定づけるまでに至っていないので、他の類似ウイルスの免疫反応と対比して研究する必要がある点からして、本分離ウイルスと類似ウイルスとの比較動物実験を行うことが、先づ要求される次第である。

過去の肝炎ウイルスに関する文献の内、マウスへの移植実験に於て、屢々実験に用いたマウスに潜在していたウイルスにより誤認され、或は失敗に帰した例が尠くない。此の場合の潜伏性のウイルスとして、先づ Ectromelia Virus (以下 Ect. Virus と略記す) 及び類似のウイルスが挙げられる。即ちマウスに偶発性肝炎を惹起するウイルス群に就ては、既に Olizki and Casals (1945)¹¹⁾ を始め、Jordan (1951)、gleidhill (1951)¹²⁾、Nelson (1952)¹³⁾、更に Buscher (1952)¹⁴⁾、Havens (1953)¹⁵⁾ によつて報告され、又我国に於ても遠藤、村上等 (1952)⁴⁾、黒屋 (1953)³⁶⁾、奥野 (1955)²⁶⁾ によつても記載されている。尚別に Ect. Virus 自体に関する業績も既に我国に於て認められている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾、

著者は先づ Ect. Virus (Hampsted 株) の分譲を受け、マウスを用いて動物実験を行い、分離肝炎ウイルスとの性状を比較すると共に、今迄の実験により知り得たウイルスの諸性状の内重要な性状と目されるものに就て、比較研究を行った。其の結果興味ある所見を得たので、茲に報告する次第である。

実験材料及び方法

供試ウイルス：実験に用いた Ect. Virus は本学小坂内科教室に保存中の Hampsted 株を、当教室に於て分譲を受け、マウスにより累代保存されているものである。実験当時はその LD₅₀ は概ね $10^{-6.0} \sim 10^{-7.0}$ 程度を示していた。分離肝炎ウイルスは孵化鶏卵及びマウスで累代保存されていて、稀積度が $10^{-8.0} \sim 10^{-9.0}$ 程度まで、マウスに接種されることにより、感染が成立し病理所見が認められる石原株及び野田株を用いた。

感染及び累代：実験には主に雑系マウスが用いられた。Ect. Virus の場合は、Ect. Virus 罹患マウス肝臓を 3~5 ケ pool して、予め pH 7.6 に補正した滅菌食塩水を用い、10 倍に稀釈し、Homogenizer により 10 倍粗乳剤を作製した。接種に際しては、2,000 r. p. m. 20 min. 遠心して得た上清を腹腔内に 0.3ml 宛接種した。接種後 3~4 日で発症死亡するに至つた時、無菌試験により、雑菌の混入なきを確かめ、次代マウスに累代を行った。尚保存には 50% グリセリン食塩水若くは凍結乾燥により氷室に貯蔵し、用に臨み取り出し、マウ

ス累代 2 ~ 3 代に於て、以前の毒性を恢復するのを待つて実験に用いた。

分離肝炎病毒は、孵化鶏卵累代は病毒接種により死亡した鶏胎児若くは鶏胎児肝臓粗乳剤を、孵化卵漿尿腔内に接種し、次代接種は前記材料を用いた。マウス累代では、マウス肝臓を用いて腹腔内接種を行い、感染の様態は病理学的所見により確められた。

実験方法：先に村上等⁵⁾及び時末²⁶⁾の実験に述べられた分離病毒の諸性状の検討に就ては、夫々の方法と判定要領が試みられたが、Ect. Virus はマウスに接種した場合かならずマウスの発症斃死が認められるので、殆どの場合 LD₅₀ により評価し記載した。尚実験の方法は、総て分離肝炎病毒に採用した方法によつたので、各実験に際しては都度その方法を明記した。本編に於ては、特に Ect. Virus の生物学的性状及び動物実験の成績を記載し、肝炎分離病毒との対比試験を行つた。

実 験 成 績

1) Ect. Virus の性状に就ての検討

本編では Ect. Virus を用いて、一般生物学的性状に検討を加え、間接的に類似病毒である肝炎病毒の特異性状にも触れて考察を行つた。一般性状の内殊に重要な性状と推察される熱に対する抵抗性、孵化鶏卵に対する態度エーテル抵抗性、グリセリン耐性、不活化実験等に就て実験を行つた。

i) 熱に対する抵抗試験

従来ウイルスは熱に対しては一般細菌類と共に 50°C ~ 60°C の温度により殺菌される。抵抗性は弱いものとされていたが、肝炎病毒が熱に対して異常の抵抗性を発揮することは、既に Havens (1944)²⁷⁾ の人体接種実験により 56°C 30min. の温度に耐えることが証明された。其の後の Wildführ G. (1953)¹⁶⁾ Maccallum (1955)²⁸⁾ によりても同様な記載がなされている。

村上等により孵化鶏卵及びマウスにより分離された肝炎分離病毒に就ても同様の耐熱実験が行われた。時末も亦反覆して耐熱試験を

行い、その術式と判定要領に就て詳細に論究している。

著者は Ect. Virus を用いて、時末の実験方法を踏襲し、同様な術式で行い耐熱性を検した。

その判定方法は、マウスに復原試験を行い、マウスの生死により耐熱度を知り、LD₅₀ 値を求めて対照と比較評価した。

次に加熱方法は時末に倣つた。即ち Ect. Virus 罹患マウス肝臓乳剤に、生理的食塩水 (pH 7.6) を添加し 10 倍に稀釈し、倍数稀釈により 10⁻² 稀釈液を作り、予め準備した滅菌アンプルに封入して、夫々の所定の温度に保つた水盤を設け、上記のアンプルを充分に浸漬したる後、所要の温度にコッホ釜を調整し、慎重に加温操作を行つた。而して一定時間後取出し、準備しておいたマウスの腹腔内に 0.3 ml 宛接種し、耐熱度の判定はマウスの生死により LD₅₀ を算定して比較すると共に、肝臓の病変にも注意し、斃死の有無に拘らず、病理標本を作り夫々に検討した。

その実験成績に見るに、対照群に於ては、総て非加熱病毒乳剤であるため、3 ~ 10 日の経日により発症斃死が認められた。剖見するに肝臓は軽く腫脹するものから、帯黄灰白色を呈し点状出血斑の散発するのが認められた。殊に短期間で斃死した肝臓は極めて脆弱の度が強く、従つて褪色の程度も著明であつた。其他の臓器に於ける肉眼的所見は乏しい感がある。

是等の対照群では LD₅₀ 10^{-7.9} を示しているが、本実験に於ける加熱処理を施した例では、56°C 30min. の加熱により殆どの病毒が多量の損傷を蒙るものの如く、LD₅₀ は僅かに 10^{-2.83} と著しい低下を示して、60°C 30min. 以上の加熱によりて殆ど全く斃死例は認められない。尚之の実験例は同様な方法により反覆した実験の成績の平均値を表示したものである (第 1 表)。

次に同様な実験を行い、病毒を接種後も死亡せぬマウスを集め、各臓器をとり、肝肺を

第 1 表 熱に対する抵抗性試験

ウイルス希釈 作用温度及び時間	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	LD ₅₀	
	50°C 30 min.	●●● 1014	●●● 711	●●● 8	●●● 12	●●● 14	○	○	○	○	2.83
60°C 30 min.	○	○● 14	○	○	○	○	○	○	○	—	
70°C 30 min.	○	○	○	○● 16	○	○	○	○	○	—	
80°C 30 min.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	—	
Control	●●● 75	●●● 75	●●● 53	●●● 53	●●● 68	●●● 103	●●● 57	●●● 68	●●● 103	●●● 56	7.9

註. i) 加熱処理はコッホ釜による加熱法による. ii) ○生存 ●死亡附した数字は死亡日数.

中心に病理所見を窺つた.

Ect. Virus のマウス接種に於ては一般に短時日で斃死する例と、比較的長く抵抗を示す例とがあるが、前者の場合は病理所見に於ても病変は著明な場合が多く、後者の場合は病

変は著しく弱い例が多い。著者は前回と同様な耐熱試験を行うと共に、可及的マウスの生死の別に応じて病理学的所見を検討した(第2表).

第 2 表 Ect. Virus の耐熱試験

ウイルス希釈 作用温度作用時間	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	LD ₅₀
	56°C 30 min.	2/3 卅	2/3 +	1/3 卅+	1/3 ++	1/3 ++	0/3 +++	0/3 +++	0/3 +++	0/3 —
60°C 30 min.	0/3 —	1/3 +	0/3 —	0/3 —	0/3 —	0/3 —	0/3 —	0/3 —	0/3 —	—
70°C 30 min.	0/3 —	0/3 —	0/3 —	1/3 —	0/3 —	0/3 —	0/3 —	0/3 —	0/3 —	—
80°C 30 min.	0/3 —	0/3 —	0/3 —	0/3 —	0/3 —	0/3 —	0/3 —	0/3 —	0/3 —	—
Control	3/3 卅	3/3 卅	/ 卅	3/3 卅	3/3 卅	3/3 卅	3/3 卅	1/3 +	0/3 —	7.8

註. i) 3/3マウス3匹を使用し3匹斃死を示す. ii) 各欄の(卅)~(—)病理所見を示す(生存マウスのみ)

即ち対照群に於ては発症死亡する例が多く、その LD₅₀ 10^{-7.8}を示すに拘らず、56°C 30 min 加熱により著しい毒性の低下が見られ、LD₅₀ 10^{-2.8} となり、60°C 30min, 以上の加熱に於ては、斃死率は皆無となる。前回の実験と良く一致する成績である。之の実験に於けるマウスの生死例に就て、任意のものにつき病理所見を検した。

一般にマウスの斃死例には重篤なる所見を呈するものが多く、重篤な場合の病理所見は大別して、肝細胞障害と細胞浸潤が認められる。マウスの斃死の遷延せる例、若くは死をまぬかれた例では、一般に病理所見は乏しいことが認められた。即ち対照群では一般に病理所見の強い場合が多く、肝実質細胞の変性及び壊死は強く、広範囲の壊死巣形成が認め

られた。56°C 30 min の加熱処理により、病理所見は著しく縮小され、変性も弱く、壊死像は限局性となる傾向が見られ、肝細胞障害

よりも細胞浸潤の程度に差が認められるに至る(第3表)。

第3表 耐熱試験に於ける病理学的所見

病理学的所見 加熱温度 及び時間	肝				臓		肺		臓
	肝実質細胞 変性	肝索の 不整 (死類壊死)	大星 及細 び胞 増肥	細胞浸潤 実質内	間質内	胞 隔 炎	る周気 管、 細辺 胞に 浸潤 け	胞隔の 肥厚	び充 出血 血及
56°C 30 min.	+	++	+	+	+	+	+	+	+
60°C 30 min.	+	+	+	+	+	-	+	+	+
70°C 30 min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+

註. i) (++)~(+) 病変の程度を示す。

56°C 30 min. の加熱により、LD₅₀ は急激に低下するが、病理所見に於ても斃死例を始め、生存のマウスに於ても、一般に病変は軽減するのが認められる。60°C 30 min. 以上に於ては全く病理所見は認められない。

以上の所見より Ect. Virus の熱に対する抵抗性は弱く、一般に 56°C 30 min. の加温処置によりて殆ど不活性化され、60°C 30 min. の加温によりて完全に死滅することが、マウスの斃死率より、又病理所見より推測された。
ii) エーテル抵抗性試験

最近ウイルス群をエーテル感受性群と耐性群に区別し、ウイルスの分類に応用されている。

著者も同様な目的から、Ect. Virus に就てその抵抗性を窺つた。既に Ect. Virus に就ては、牛痘、灰白髄炎、狂犬病等の Virus と共に耐性群に属しているが、その術式に就ては諸種の方法があり、村上等の肝炎分離病毒に就て行つた時末、更に Maccallum, 堀田²⁰⁾等の方法を参考にした。

著者は Ether, と Ect. Virus 罹患マウス肝乳剤 10⁻² 稀釈液の同量を混和、充分に振盪し、24 時間 4°C に保存しおき、滅菌シャーレに移したる後、エーテルを飛散せしめて、マウス腹腔内に接種し、生死の別を分ち判定

を行つた。尚生死夫々のマウスに就ても累代を行いウイルスの影響を確めた。

実験成績では明に耐性であり、良くマウスの斃死が認められた。累代に於ても、病理所見に於てもエーテルによる傷害は尠いものと判定すべき結果であつた。

iii) マウスに於ける感染経路と LD₅₀

既に Ect. Virus のマウスに対する感受性は強く、諸種の感染経路をとるものと判断されていたが、本実験では感染経路別に感染価を測定した。

その実験成績より見るに、感染経路を諸種の方法にとり、感染価を測定したが、その斃死率 (LD₅₀) は、腹腔、皮下、尾静脈、経鼻、経口の経路より明に感染を惹起する事実を認めた。

只経口感染に於ては LD₅₀ は著明に低下する事が明かであり、LD₅₀ も 10^{-5.5} を示した。Ect. Virus の感染は、いかなる部位よりも惹起するが、その感染経路を異にすることにより、LD₅₀ の値には多少の差が生じることを窺い得た。

尚之の実験に於ても、任意に抽出したマウスの病理所見は、斃死マウスには高度の所見があり、生存マウスでは軽微な所見が見られたことは、諸種の感染経路を異にした場合と

第4表 感染経路別による感染価

接種部位	ウイルス希釈						LD ₅₀
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹		
ip.	● ● ● 3 7 7	● ● ○ 5 6	● ● ● 5 5 16	● ● ○ 5 5	● ● ● 6 6 11		8.9
sc.	● ● ● 6 6 8	● ● ● 10 11 12	● ● ● 7 9 9	● ● ○ 10 16	● ○ ○ 9		8.5
iv.	● ● ● 4 9 8	● ● ● 4 9 9	● ● ● 6 6 6	● ○ ○ 9	○ ○ ○		7.83
in.	● ● ● 5 5 9	● ● ○ 10 11	● ● ○ 6 12	● ○ ○ 7	● ● ○ 15 16		7.9
po.	● ● ○ 5 10	● ○ ○ 12	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○		5.5
	● ○ ○ 14	○ ○ ● 10	● ○ ○ 8	○ ○ ○	○ ○ ○		5.5

註. i) ip. = 腹腔, sc. = 皮下, iv. = 尾静脈, in. = 経鼻, po. = 経口, 夫々の感染経路を示す。
ii) (○～●) マウスの生死を意味し, 附した数字は死亡日数を示す。

雖も, 著しい差異は認められなかつた。
Ect. Virus は種々の感染経路を選んでも良くマウスを発病させることが知られ, 殊に Fenner の実験 (1947)³⁰⁾ によれば, 皮膚の損傷よりウイルスの侵襲が主であり, 自然の疾病に類似したものを惹起させるのは, 足趾皮下接種及び経口投与が効果的であると述べている。

著者の実験では, 寧ろ経口感染が他の感染経路に比して LD₅₀ は劣り, 他の接種部位よりの感染が LD₅₀ は高い値を示した事実は, 聊か興味をひく事であることが指摘された。もつとも Ect. Virus に於ては, 他の研究者により感染に就ての見解に相違があり, 自然感染に於ても, 時に大流行があるとしても, 稀に感染の殆ど起きない事実があり, 感染の原因, 機作, または感染値に就ての関係は更に検討すべきものであると推測されるのである。

iv) 孵化鶏卵に対する態度

Ect. Virus を孵化鶏卵に接種する場合, 特に漿尿膜上に多数の微細な白斑を形成する事実は, 本 Virus の特徴として指摘されている。
著者の実験でも明に Virus 含有肝乳剤 10⁻² 稀釈液を, 8～10 日の孵化卵の漿尿膜上に接種するに, 鶏胎児は 3～5 日にて死亡し, 膜

上には白斑形成が定型的に認められた。其他の経路, 例えば漿尿腔内, 卵黄嚢内に接種する場合も良く感染が起り, 累代も可能であつた。

又, 之等の Ect. Virus 罹患胎児若くは肝乳剤をマウスに接種する場合も, 良く復原され, マウスの発症, 死亡が認められた。

実験の目的は, Ect. Virus を漿尿腔内に接種し, 感染が成立するが, 更に次代累代は鶏胎児乳剤若くは鶏胎児肝乳剤を用いて可能かの問題であつた。

実験の結果では, Ect. Virus を漿尿腔内に接種するに, 漿尿腔に一般に強い濁濁を招来することは尠いが, 稀に軽き濁濁を生ずる場合がある。鶏胎児は初期に於ては一般に接種後 3～5 日で死亡する場合が多いので割卵するに, 胎児表面には点状出血斑点を密発する場合が尠くなく, 肝臓は暗赤色出血斑を発現する。爾後 5 代に互り, 孵化鶏卵に累代し, 各累代如にマウスに復原して, 検討した結果では, Ect. Virus に於ても累代数を増加するに伴い, 孵化鶏卵の死亡日数が遅延するとか, 鶏胎児の死亡が減ずるとかの傾向が認められた。又累代如にマウスに復原した場合も, 孵化卵の死亡した場合には, マウスの斃死も確實であるが, 著しく鶏胎児の死亡日数が遅れ,

鶏胎児の死亡せぬ場合は、マウスの斃死数も減じる傾向が見られた。Ect. Virus に於ても、孵化鶏卵に対しては鋭敏な感受性を保有するものであるが、孵化卵の漿尿腔内接種による鶏胎児若くは胎児肝臓乳剤の次代累代により、時に孵化卵に於ける Virus 量の増加にも制限があり、感染に軽重があることを窺い得たが

同様な累代により 5 代迄は確実に累代が行われることを知った。尚漿尿腔液を用いて、マウスに復原試験を行つた成績は、前回の鶏胎児若くは鶏胎児肝臓乳剤を用いた成績と比較して、マウスの斃死率は著しく低下したが、累代は行われることを窺い得た（第 5 表）。

表示した成績では、初代累代に於てマウス

第 5 表 孵化卵及びマウスに於ける感染

接種材料	Mause に対する感染											
	漿尿腔液				鶏胎児乳剤				鶏胎児肝臓乳剤			
ウイルス稀釈	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
孵化卵累代												
Exp. 1	2/3	1/3	1/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
2	3/3	1/3	0/3	1/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3
3	3/3	2/3	1/3	0/3	3/3	2/3	2/3	3/3	2/3	3/3	3/3	1/3
4	3/3	2/3	1/3	0/3	2/3	2/3	3/3	1/3	3/3	2/3	2/3	1/3
5	2/3	1/3	0/3	0/3	2/3	2/3	3/3	2/3	3/3	2/3	2/3	1/3

註. i) 各群マウスは 3~5 匹を使用す。

ii) 累代の次代接種材料は 3~5 ケの孵化卵材料を pool した。

iii) マウス接種材料も 3~5 ケの孵化卵の pool したものを。

iv) 2/3 は分母はマウス使用数、分子は死亡数を示す。

に対する病原性は、漿尿腔液と鶏胎児若くは鶏胎児肝臓乳剤と比較し、著しく劣るが、累代を重ねるに伴い、此の傾向は明瞭となり、マウス斃死数は次第に低下する。ウイルス量よりすれば、夫々の接種材料内に含有されるウイルス量は、接種部位に当る漿尿腔液よりも、寧ろ鶏胎児若くは鶏胎児肝臓に於けるウイルス量の増加が行われることは推測されると共に、累代には後者の方が好適の材料であることを知るが、依然累代は行われることを知り得た。

v) グリセリン抵抗性及び濾過試験

既に他のウイルスと同様に、Ect. Virus の保存に就ては、諸種の方法が行われたが、本ウイルス罹患マウス肝臓細片の 50% Glycerin 食塩水 60 日間の保存が可能であり、凍結乾燥の保存によりても長期間の保存によつても、マウス復原試験により、初代の感染発症は、その日数が遅延し 5~7 日に於て斃死する例もあつたが、感染力は保持されていた。

又 10⁻¹ 稀釈罹患肝臓乳剤の Seitz E. K を用

いて濾過した場合も、初代の復原に於て感染力は低下するが、同様に感染の成立が認められた。

vi) 不活化試験

Ect. Virus の不活化試験は、薬剤添加 (0.2% Formalin, 0.01% Marzonin) によるもの、及び紫外線照射を行つた。

薬剤添加の場合は、Ect. Virus 罹患マウス肝臓粗乳剤の 10⁻² 稀釈液に 0.2% Formalin 0.01% Marzonin を添加し、4°C に保存して、所要の日に取り出しマウスに復原試験を行い、不活化を確めた。

紫外線照射は、Ect. Virus 罹患マウス肝臓を pool して、10⁻² ウイルス稀釈液を調製し、直径 9cm のシャーレに 1.0ml 宛分注後 10cm の距離よりマツダ紫外線殺菌灯 (GI-15WL) にて 100V. 3A で照射し、時間おきにマウスに復原し、不活化の有無を判定した。

先づ 0.2% Formalin の不活化実験に於ては、夫々の薬剤を添加 4°C の氷室に保存し、時々振盪を行い 1, 3, 5, 7 日と経日的に取

り出し、稀釈後マウスに接種するに、日を経るに伴い、マウスの斃死が減少し、7日を経た場合は全く斃死を認めぬ状態となる。生存マウスに就て病理所見は極めて乏しい結果であつた点よりウイルスの不活化されたものと判定された(第6表)。

第6表 薬剤による Ect. Virus 不活化試験

ウイルス稀釈	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
0.2% Formalin 添加									
Formalin 添加後 1日	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3				
3日	3/3	3/3	2/3	3/3	2/3				
5日	2/3	3/3	2/3	2/3	2/3	0/3	1/3	0/3	0/3
7日	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3
ウイルス稀釈	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
0.01% Marzonin 添加									
Marzonin 添加後 3日	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	2/3			
5日	2/3	3/3	2/3	0/3	2/3	0/3			
7日	1/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3

註. i) 1/3……分母は使用マウス数、分子は死亡マウス数を示す。

又 Marzonin 添加の場合も大略7日を経て、完全に不活化され得たとの所見を得た(第7表)。要するに Ect. Virus は熱及び薬剤に対し

第7表 Ect. Virus の紫外線照射による不活化実験

照射時間	ウイルス稀釈	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
5 min.		2/3	2/3	1/3	0/3	1/3	1/3			
		3/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3			
10 min.		2/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3			
					0/3	1/3	0/3	0/3		
15 min.		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3			
					0/3	1/3	0/3	0/3		
20 min.		0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3			
					0/3	0/3	0/2	0/3		
Control		3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	2/3		

註. i) 3/3……分母は使用マウス数、分子は死亡数を示す。

て抵抗は極めて弱いものと推測された。又紫外線照射による不活化は、極めて短時間で行われ、5分の照射により大部分のVirusの感染力は傷害され、10分の照射では不活化の目的を達することが出来た(第7表)。之等の実験は Ect. Virus 罹患マウス肝乳剤を用いたために、Virusの存在に肝臓の組織片若くは壊死物質と共に混在していることが

推定されたが、斯る短時間の紫外線照射により、容易に不活化される事実が明かである。この事実は肝炎分離ウイルスの抵抗性の強い点と比較し興味深いものがある。

vii) 赤血球凝集反応

Ect. Virusの赤血球凝集反応に就ては、既に行われた成績があり、マウス赤血球を良く凝集し、更に鳥類の赤血球にも凝集を示すこ

とが知られている。著者は Ect. Virus 罹患マウス肝臓の 10% 乳剤 (食塩水で稀釈し Homogenizer で細挫, 2,000 r. p. m. 20min. 上清) を使用した。

又赤血球はマウス及び鶏より採血し, 型の如く食塩水にて 3 回洗滌し, 夫々 0.25% 浮遊液として使用した。尚対照として, マウス健

康肝臓乳剤を同様に処理して用いた。

マウス赤血球凝集反応では 4 時間後の判定では, 320 倍陽性, 鶏赤血球では 20 倍の凝集価を認めるに過ぎなかつた。Ect. Virus が兎に角血球凝集反応が陽性を示す事実は重要な性状と考えられた (第 8 表)。

第 8 表 Ect. Virus の赤血球凝集反応

血種球の類	稀 積 度		判定時間									
	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	NaCl (対照)		
マウス赤血球	Exp. 1	2 時間後	+	+	+	+	+	+	±	±	-	-
		4 時間後	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	Control	2 時間後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		4 時間後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
鶏赤血球	Exp. 1	2 時間後	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-
		4 時間後	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	Control	2 時間後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		4 時間後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2) 肝炎分離病毒との性状の比較

以上各々の特に重要な性状と解される Ect. Virus に就て実験を行い, その性状を明にしたが, 村上等の分離病毒について更に比較検討を詳細に行つた。

i) 熱に対する抵抗性,

Havens (1944)²⁷⁾ の実験以来肝炎ウイルスの熱に対する抵抗力が強い事実は周知である。又分離病毒の熱に対して抵抗することは村上等及び時末の記載で明である。時末の詳細なる実験例に従えば, 56°C 30min. の加熱に耐え, 70°C 30min. の加温により殆ど病理学的所見の消失する事実を述べている。

此の事実は分離ウイルスの強い抵抗性を示すものとして重要な性状と推測された。

著者は類似病毒である Ect. Virus を実験に用い, 耐熱試験の術式及び判定要領に就て考慮を払つた。従来肝炎ウイルスの耐熱性に就ての検討に当り明かな結果が得られていない理由は, Havens の人体接種実験以来ウイ

ルスの分離が成功していないことにもよるが, 術式若くは判定要領が研究者により異つていたことが大きな原因となつていることは疑なき事実である。

著者は, 此の点に就て詳細に検討する意味から, 従来村上等により行われていた分離ウイルスと同じ要領の耐熱試験を Ect. Virus に於て実施し比較した。

先の実験例に示された如く Ect. Virus は加熱に対しては意外にも抵抗性は弱く, 50°C 30min. に於て感染力は殆ど失われ斃死率は低下すると共に病理所見も生残マウスに於ては, 明瞭に認めることは出来ない点より, 先づ 50°C 30min. の同様な耐熱試験の術式により, 不活化されるものと判定された。一方分離ウイルスに於ては 55°C 30min. の加熱に良く耐過し, 漸次温度の上昇に従い, ウイルスの受ける傷害度は増加するものの如くであるが, よく耐え, 75°C 30min. の加温により感染力を殆ど喪失するに至ることを病理学的所

見により確め得た。この性状は両ウイルスの大きな性状の差異として指摘されるものと思惟された。

ii) エーテル抵抗性試験

エーテルに対する抵抗性試験の術式は、前の Ect. Virus によりて予め実験を試み、同一の要領により分離ウイルスに就て行つた。Ect. Virus ではエーテル耐性の判定をマウスに接種することにより感染及び病理所見の上より判定した結果エーテル抵抗性であることを認めたと、分離ウイルスに於てもエーテルには良く抵抗性を示し、マウスの肝臓を中心とする病理所見により抵抗性を有するものと判定した。本実験に於ける両者の区別は認め難いものであり、Maccallum²⁰⁾の表示したウイルスとも同一の性状を有することも認められた。

iii) マウスに於ける感染経路

実験動物の内、殊にマウスに対する感受性の強いことは、Ect. Virus に就ては良く知られている。又実験室等に於ける流行例も多数報告されている¹⁾⁴⁾。Fenner (1647)³⁰⁾堀江、村上 (1954)¹⁾も諸種の接種経路を示してをり、感染の様相に就て詳細な実験報告を試みている。

著者も前回の実験の如く、腹腔、経鼻、経口、尾静脈、皮下等の接種部位より、Virus の感染が容易に成立することを知つたが、その感染価 (LD₅₀) に著しい差があり、殊に LD₅₀ の値より見れば腹腔内接種等に比較し、経口感染では著しく LD₅₀ は低いことが注目される。

マウスに対する分離ウイルスの感受性は、他の実験動物に比して、比較的強いが、ウイルス接種により発症死亡することは極めて稀であり、病理所見により始めて罹患を知る所謂不顕性感染を惹起するものであることは知られている。更に感染経路に就ても、諸種の実験より腹腔、経鼻⁶⁾⁷⁾、経口³¹⁾、尾静脈内³²⁾皮下⁶⁾⁷⁾等の記載に窺うに殆どどの感染経路を採用しても等しく感染の成立を認められることが述べられた。その感染の標識となるべ

き病理所見では、両ウイルスともに、肝臓を中心に惹起するものであり、肝臓に於ける実質細胞の変性及び壊死とこれに伴う細胞浸潤が挙げられるが、Ect. Virus ではマウスの斃死例に於ては斯る病変は高度に発現するが、著しく死亡の遅延したもの若くは生残したマウスに於ては殆ど病変を認めぬ場合もあり、分離ウイルスの如く比較的平等な病変に遭遇しないことも特長である。

マウスの感染に於て、著者の最も懸念する所は、分離ウイルスがマウスに潜在する Virus と混合するか、若くは Ect. Virus の如き Virus の侵入した場合を予想したが、分離ウイルスの感染及び病理学的所見に於て、明に両者を区別し得られるものと判断するに至つた。もつともマウス潜在性ウイルスは多数あることは予想されるが、その後の累代に於て認められた結果でも、Ect. Virus 様の Virus の混入があつた場合は明瞭に区分されることを経験した。

又、接種されたウイルスが、速かに接種部位を経て、生体内に侵入し、肝臓内に定着し、他方全身性の疾病に移行する所謂感染様相は、両ウイルスともに、指摘する程の差違はなく行われるものと推測されるのである。而してウイルス侵入と共に生体内に於ける抗体の形成が徐々に行われることが予想され、生体は徐々に異つた反応を示しながら経過して行くものと思惟されるのである。

iv) 孵化鶏卵に対する態度

孵化鶏卵に於ける Ect. Virus の培養については、特に漿尿膜上に於ける白斑形成が良く知られている²⁵⁾³⁶⁾。

著者は特に分離ウイルスの孵化卵培養に於ては、その接種方法に漿尿腔内接種方法が行われ、次代接種材料には孵化卵胎児若くは胎児肝臓が用いられている関係から、Ect. Virus の孵化鶏卵培養にも同様な方法を採用し、比較した。もつとも分離ウイルスの他の感染経路よりの感染及び孵化卵の態度については実験が行われ、漿尿膜上に於ける白斑形成等の所見は認められていない。

Ect. Virus 及び分離ウイルス共に漿尿腔内接種により鶏胎児の死亡が認められる。Ect. Virus では一般に分離ウイルスに比較し、鶏胎児の死亡日数が早く2~3日であるが、分離ウイルスでは、分離後数代のものに於ては5~8日を要し、累代を経たものにあつては、死亡日数は著しく延長され7~12日を要することも稀ではない。割卵した際の鶏胎児の所見も略々類似し、胎児外面に於ける出血斑の発現があり、肝臓もやや腫大し、点状出血斑を認めることが尠くないが、この所見のみで両ウイルスを区別することは困難である。又両ウイルス共に漿尿腔液でウイルスの増殖は、行われるとしても量的には少ないものと推測される。累代は此の際鶏胎児若くは鶏胎児肝臓に於ても行われるが、Ect. Virus では累代を増加し、第5代に於ても尚累代が可能であるが、生残するマウスが多少とも実験毎に認められた。分離肝炎病毒に於ても斯る傾向が見られ、初代に於ては鶏胎児斃死例が尠くて、累代を重ねに伴い次第に斃死数を増加し、更に数代持続するが、決して固定した状態ではなく、辛じて定着の域に達したと推定される時期であり、両ウイルスの区別することは出来難い様である。

孵化鶏卵に於ける分離肝炎病毒の増殖は、Ect. Virus と比較して、決して充分ではないことが指摘されるのであり、Henle et al (1950)¹⁷⁾ の述べた所見と略々一致した成績と判定されるのである。

v) グリセリン抵抗性及び濾過試験

グリセリン抵抗性に就ては、Ect. Virus が良く50%グリセリン内に保存されることを証明した。

分離ウイルスに就ては、孵化卵累代石原株と、マウス累代佐藤株を用いた夫々の肝臓片をグリセリン中に投じ保存した成績では、30日迄は確実に保存されることを、マウス復原試験に於て証明した。復原マウス第1代の病理所見は Ect. Virus と同様に感染は軽度であつたが、次第に累代を重ねに伴い快復することを証明したので、両ウイルスの差異は殆ど

認めなかつた。

濾過試験は、両ウイルス同様の条件のもとに、濾過材料も、孵化鶏卵及びマウスの肝臓乳剤が用いられたが、両ウイルスともに確実に通過する事実をマウスの感染実験に於て証明した。ただ Seitz E. K を用いたため、ウイルスの吸着の度がかかなり大きく、マウスの復原に於て、その感染価及び病変に於て、かなりの遜色は認められたが、累代の反覆により恢復を示したことは両ウイルス共に共通して認められた。

vi) 不活化試験

不活化実験としては薬剤(0.2% Formalin 0.01% Marzonin)添加と、紫外線照射が Ect. Virus に就て試みられた結果、前者の薬剤に対しては抵抗性は弱く、薬剤添加後マウスに対する感染より判断して、ウイルスは次第に傷害され、5~7日に於て殆ど全く不活化されるものと判定される結果であつた。又紫外線照射によりては5~10分の照射により完全に不活化された。

既に分離されたウイルスは耐熱性と共に、薬物に対して強い抵抗を示す事実は時末の実験にも明かであるが、薬物添加による不活化実験に於ても、相当の抵抗性を示し、病理所見より判断して少くとも3週間以上保存することにより不活化されるとの所見を得た。紫外線照射に於ても、Ect. Virus と同一条件で行つた場合も良く抵抗し、30~40分間迄の照射により不活化されるものと判断すべき結果であつた。両ウイルスの区別は是等の抵抗性に就ても指摘されるのである。

vii) 赤血球凝集反応

Ect. Virus の重要な性状として赤血球凝集反応が挙げられるが、既に Ect. Virus の実験でマウス赤血球に凝集することが証明された。著者の分離ウイルスに於ける赤血球凝集反応は、諸種の材料殊にマウス肝臓、孵化鶏卵胎児、漿尿腔液又は精製ウイルス³⁸⁾等も用いられたが、いづれも凝集は認められなかつた。別に血球を変え、人、緬羊、兎、海狸、鶏、猿等に就ても同様な方法で行つたが、総

て陰性に終つた。此の性状は最も重要な性状として、他の Virus 群 (Ect. Virus) と鑑別されるものと判断された。

総括及び考按

Ect. Virus の一般性状に就て、詳細に実験を試み、従来の既知ウイルスとして、更に類似ウイルスとして、明確に性状を把握し、新に分離ウイルスと対比して、重要な鑑別点を求め、独立した新ウイルスに対する再検討を行うのが、著者の目的であつた。既に Ect. Virus に就ての詳細な報告は Marchal (1929)³³⁾ により発見されて以来、Fenner (1949)³⁰⁾ Bernet et al. (1946)³⁴⁾、Downie (1951)³⁵⁾ の報告があり、本邦に於ても堀江、村上 (1954)²⁾、

遠藤等 (1952)²⁴⁾ の記載に詳しい。別に最近に至つて、流行性肝炎の研究につれ、新に実験対象として利用されている現況である。

著者もその研究意図が、従来の研究者の如き Ect. Virus 本来の性状を窺うのが目的でなく、肝炎研究に於ける対象として、利用したに過ぎないのであり、Ect. Virus を介して分離ウイルスの性状を究明するにあつたので、その夫々の性状に就ては、肝炎ウイルスに重要な性状をとりあげ、その性状を知り、比較するにあつた。其間に於ける分離ウイルスの実験術式を更に Ect. Virus を用いて検討したことは勿論である。著者の採用した両ウイルスの性状を表示すれば次の如くである (第 9 表)。

第 9 表 Ect-Virus と分離 Virus との比較

ウイルスの区分	Ect. Virus	分離ウイルス
生物学的性状		
1. 熱に対する抵抗	50°C 30 min. ~ 60°C 30 min.	70°C 30 min. ~ 75°C 30 min.
2. エーテル抵抗性	+	+
3. グリセリン抵抗	+	+
4. マウスに対する態度	感受性あり	感受性あり、不顕性感染
5. 孵化卵に対する態度	感受性あり(漿尿腔内接種、感染累代可能)	同左
6. 不活化試験 0.2% フォルマリン	7日	少くとも 3 週間
7. " 0.01% マーゾニン	7日	少くとも 3 週間以上
8. 紫外線照射	10分	30分~40分
9. 凍結乾燥	可能	可能
10. 濾過試験 (Seitz, E. K.)	濾過	濾過、凡そ 50mu と推定される
11. 赤血球凝集反応	++ (マウス血球) + (鶏血球)	- (村上等)

Ect. Virus が従来の肝炎ウイルス研究に於て、良く誤認された理由は、その一般性状が良く類似した点にもあるが、動物によるウイルス分離に際して潜在性ウイルスとして、Ect. Virus が存在し、混合感染を行うことも推測されるのである。

その一般性状に於ても、重要な鑑別法として赤血球凝集反応、耐熱性、耐薬物性の事項を挙げる事が出来るが、他に動物に対する感受性及びエーテル抵抗性等に就ては甚だ類似した点が尠くない。著者の実験では之等の点を含めて、分離ウイルスは Ect. Virus とは明に区分される性状を有してをり、同一の種属に於ける Virus とは考えられないことは

明瞭である。

次に分離に際して、マウスの累代が行われるが、著者の用いた分離ウイルスは孵化鶏卵により累代が行われ、初て分離され、次にマウスの累代により成功した例があり、その系統のウイルスを用いた関係から、先ず潜伏性の Ect. Virus の混合感染は考えられないのであつて、患者に由来するウイルスと考えられるのである。

著者の実験成績よりすれば、分離ウイルスは Ect. Virus とは全くその性状は異り、他の肝炎研究者により記載されたウイルスの性状と全く合致した性状を有することを窺い得るのである (第 10 表)。

第 10 表 分離ウイルスと他のウイルスの性状比較

生物学的性状	報 告 者 分離ウイルス (村上等1953)	Havens et al. (1944)	Wildführ, G. (1953)	Maccallum (1955)
1. 熱 対 する 抵 抗	70°C~75°C30min	56°C30min.<	56°C30 min.	56°C30min<
2. エーテル抵抗性	+	-	+	+
3. グリセリン抵抗	+	-	-	+
4. マウスに対する態度	感受性あり	-	感受性あり	-
5. 孵化卵に対する態度	+	-	+	-
6. 不活化試験0.2%フォルマリン	少くとも3週間	-	-	-
7. " 0.01% マーゾニン	少くとも3週間	-	-	-
8. 紫 外 線 照 射	5~10 min.	-	-	-
9. 凍 結 乾 燥	+	-	-	-
10. 濾 過 試 験	+	+	+	+

以上著者は Ect. Virus を通じて、その性状を究明するとともに、分離ウイルスの性状を対比し所見を得た。もとより分離ウイルスに対する血清学的研究が行われ、その結果が比較されねばならないが、一般生物学的性状に於て明に両ウイルスは鑑別し得るものと思惟された。

結 論

Ect. Virus を用いて一般性状を検することにより、分離ウイルスの性状と対比して、その性状を再検討した結果次の結論を得た。

1) Ect. Virus を介して分離ウイルスの一般性状を詳細に究明し、Ect. Virus と分離ウイルスはその性状に於て甚だ類似性を有して

いるが、詳細に追究するに、熱に対する抵抗性、薬物に対する抵抗性及び赤血球凝集反応等により、十分に鑑別し得られるものである。

2) マウスの累代に於ては潜伏性ウイルスとしての Ect. Virus の混合感染は考慮すべきであるが、分離ウイルスの動物に対する感染の様相、及び一般性状の究明により両ウイルスは明に区分されるものである。

3) 既知のウイルスとして Ect. Virus を用いて、従来の分離ウイルスに就て行つた実験の術式と判定要領を、検討した結果、有意の方法と推測される結果であつた。

稿を終るに当り、恒に御教示御鞭撻を戴き、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る。

主 要 文 献

- 堀江, 村上: *Virus*, 第4巻, 第2号, 1954.
- 尾崎他: *Virus*, 第6巻, 第2号, 1956.
- 土肥: *Virus*, 2, 131~139, 1952.
- 遠藤他: *日本細菌学雑誌*, 7, 646, 1952.
- 村上等: *日本ウイルス学会総会肝炎シンポジウム*, 1950.
- 村上等: *岡山医学会抄録*, 1954.
- 村上等: *中, 四国細菌学会講演要旨*, 1954.
- 村上等: *日本ウイルス学会総会講演要旨*, 1955.
- 村上等: *日本ウイルス学会総会講演要旨*, 1956.
- 村上等: *日本ウイルス学会総会講演要旨*, 1957.
- Olizki and Casals: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 60, 48, 1945.
- Gleidhill, A. W. and Andrewes, G. H.: *Brit. J. Exp. Path.* 32, 559, 1951.
- Nelson, J. B.: *J. Exp. Med.* 96, 293, 1952.
- Bucher: 406 *綜合医学研究所年報*.
- Havens et al.: *J. inf. Dis.* 93, 14, 1953.
- Wildführ, G.: *Zeitschr. f. d. Ges. Inner. Med.* 573, 1950.
- Henle et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 73, 603, 1950.
- Drake et al.: *J. Exp. Med.* 95, 231, 1952.
- 木村, 堀田: *東京医事新誌*, 66, 307, 1944.
- 谷口: *Virus*, 3, 189, 1953.
- 石井他: *日本内科会誌*, 42, 337, 1953.
- 武内: *日本伝染病会誌*, 27, 247, 1953.
- 小林: *日本伝染病会誌*, 27, 247, 1953.

- 24) 遠藤他：第6回日本細菌学会関東支部会報告。
 25) 奥野：第2回日本ウイルス学会肝炎シンポジウム, 1955.
 26) 時末：岡山医学会雑誌, 第69巻, 4号, 1957.
 27) Havens: J. A. M. A. 134, 653, 1947.
 28) Maccallum: Virus and Rickettsial infection of man, P. 269, 1955.
 29) 堀田：日本ウイルス学会総会講演要旨, 1956.
 30) Fenner, F.: J. Imm. 62, 341~373, 1947.
 31) 大賀：岡山医学会雑誌, 第69巻, 4号, 1957.
 32) 稲垣：岡山医学会雑誌, 第69巻, 4号, 1957.
 33) Marchal, J.: J. Path. Bact. 33, 713~728, 1930.
 34) Bernet et al.: J. Imm. 53, 1~13, 1946.
 35) Downie, A. W.: Lancet, 6652, 419~422, 1951.
 36) 黒屋他：日本ウイルス学会総会記録, 1953.
 37) 高田：岡山医学会雑誌掲載予定。
 38) 橋本：岡山医学会雑誌掲載予定。

Comparative Studies on Hepatitis Virus with Analogous Viruses

I: Comparative Animal Experiments on Hepatitis Virus with Ectromelia Virus

By

Hidekichi Matsuura

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

In order to reinvestigate the natures of hepatitis virus in detail, the author studied the general natures of hepatitis virus in comparison with ectromelia virus. The results are summarized as follows:

1) Though hepatitis virus and ectromelia virus are of great similarity in their various natures, collective consideration of the heat-resistance, the drug-resistance, the hemoagglutination reaction etc. makes possible the differentiation between these two sorts of viruses.

2) In the serial passage in mice, though the mixed infection of ectromelia virus should be considered, the discrimination between these two sorts of viruses is possible by observation of infectious aspects and general natures.
