

# 分離肝炎ウイルスと類似ウイルスとの比較研究

## 第 3 編

### 分離肝炎ウイルスとマウス肝炎ウイルス (Busher 株) との比較研究

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

一種のウイルスが同一宿主に於て、他のウイルスの増殖を妨害する所謂干渉現象の本格的な研究は、比較的最近に始まり、本現象の基礎的解明と、その応用面の研究は、ようやく盛んになつてきた。

即ち Henle (1945)<sup>1)</sup> は、向神経性ウイルスとインフルエンザ・ウイルスの干渉現象について記載しており、A. Vilches 及び G. K. Hirst (1947)<sup>2)</sup> は、やはりインフルエンザ・ウイルスが、マウス脳内に於て、西部馬脳炎、その他の向神経性ウイルスの増殖を阻害したが、孵化鶏卵の漿尿腔内では、本現象を証明し得なかつたと述べている。又辻本 (1953)<sup>3)</sup> は日本脳炎ウイルスは孵化鶏卵の漿尿腔内で、インフルエンザ・ウイルスの増殖を抑制することを報告している。

而して、流行性肝炎患者から分離したウイルス株 (以下分離株と称す) と、マウス肝炎ウイルスである Busher 株との間に於ても、干渉現象が有るか無いかを比較研究し、鑑別の一助とする目的で次の実験を行つてみた。

即ち、Busher 株の性状をマウス及び孵化鶏卵を使用して比較観察し、而る後に両ウイルスの間の干渉試験を行い、併せて血清学的試験も行つてみた。尚 Busher 株についてのこれ迄の記載は、著者の調査した範囲では未だ見あたらないようである。

#### 実験材料

分離株にはマウス系、孵化鶏卵系共に森本株、石原株及び青森株を使用し、Busher 株は予防衛生研究所北岡博士より分与されたものであり、両ウイルスを互に Interfering virus と Challenge virus とし、実験動物は生後 2 週以内の哺乳マウスと成熟マウスを選び、孵化鶏卵は専ら孵化 7 日卵を使用した。

#### 実験方法及び実験成績

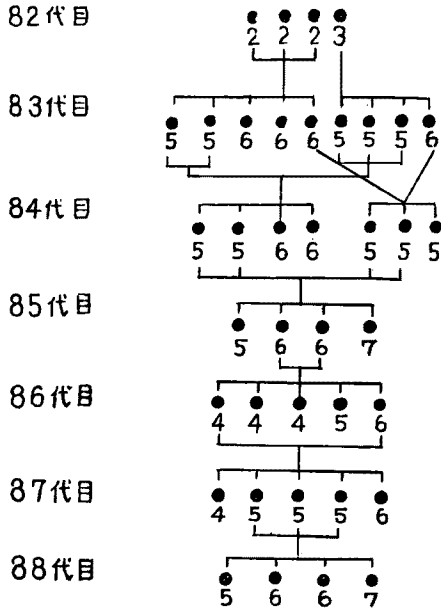
実験 I : Busher 株のマウス累代接種試験

〔方法〕: 累代接種に際しては、死亡直前又は直後の感染マウス肝の生理的食塩水 10 倍稀釈乳剤を作り、3000 r. p. m. 30 分間遠沈後の上清を接種材料として、その 0.5ml を次代の哺乳マウスの腹腔内に 0.1ml 接種する方法とした。尚感染標識は、マウスの死亡することにより判定した。以下接種抗原の作製法及び感染の判定法は同じである。

〔成績〕: Busher 株の分与を受けた 82 代目から 88 代目までのものを表 1 に示した。即ち、接種後マウスの死亡する迄の日数は 2 日から 7 日位の間であり、この日数はマウスの生後の日数により相当相違してくる傾向があり、発毛が完全になる頃以後のマウスに於ては、全く死亡することがなく、これを更に哺乳マウスに復元しても、もはや哺乳マウスも死亡することがない。

次に死亡に至るまでにマウスは、食慾不振、立毛、その他著るしい症状を示すことなく、

〔表1〕 Busher 株の累代接種



註. 数字は接種後死亡する迄の日数を示す.

剖検してみると、肉眼的には肝臓その他の臓器の肥大、呈色度等にも特徴的な所見は認められず、対照との間に大差はない。但し病理組織学的検査では肝臓に於ける、肝細胞の強度の変性、壊死の認められることである。

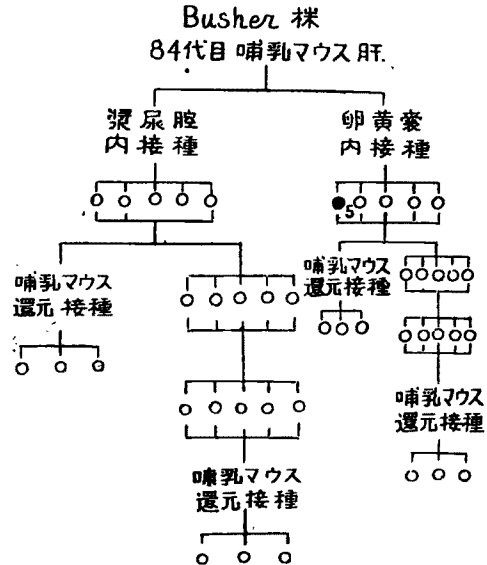
実験II： Busher 株の孵化鶏卵培養試験

〔方法〕： Busher 株の 84 代目、86 代目及び 88 代目のマウス肝から始まり、夫々孵化 7 日卵の漿尿腔内及び卵黄囊内に接種し、継代に際しては、各卵の漿尿腔液、胎児及び卵黄囊を接種材料として 3 代まで継代した。而して第 1 代のもの及び第 3 代のものを、再び哺乳マウスに還元接種して、ウイルス感染の有無を検した。

〔成績〕： 表 2 は 84 代目の哺乳マウス肝から始まつて孵化鶏卵培養を行つた系統図である。その結果、漿尿腔内接種法及び卵黄囊内接種法によるも鶏胎児の死亡することはなかつた。故に次代への接種は、接種後 10 日目以後の過程に於て、卵を破壊して行つた。尚漿尿腔液の濁濁、胎児の出血等も認められなかつた。又孵化鶏卵接種第 1 代目及び第 3 代目

の材料を哺乳マウスに各群 3 匹宛腹腔内接種して還元性を検したが、マウスは死亡することはない、ウイルスの伝達されていないことを認めた。

〔表2〕 Busher 株の孵化鶏卵累代接種及び哺乳マウスの還元接種



実験III： Busher 株の最小感染価決定試験

〔方法〕： Busher 株の最小感染価を測定するべく、分離株と比較しながら行つた。故に哺乳マウスを使用した場合と、孵化鶏卵を用いた場合との二通りを実施してみた。

哺乳マウスの場合は、実験 I の如く作製した接種抗原を  $10^{-9}$  まで、生理的食塩水で階段稀釈し、各群 3 匹宛のマウスの腹腔内に夫々 0.1ml 宛接種し、マウスの死亡を以て結果の判定とした。

又孵化鶏卵を使用した場合は、接種抗原の鶏胎児及び漿尿腔液混合乳剤を上記同様  $10^{-9}$  まで階段稀釈し、各群 3 個宛孵化 7 日卵を用い、それ等の漿尿腔内に夫々 0.1ml 宛接種して胎児の死亡するのを以て結果の判定とした。

〔成績〕： 哺乳マウスの場合は表 3 の如くで、Busher 株はマウスの死亡を示し、M. L. D. は  $10^{-5}$  或は  $10^{-6}$  の附近にある。而して分離株の森本株及び石原株ではマウスの死亡するこ

表 3 Busher 株の M. L. D. (哺乳マウス)

病 毒 別	継代数	病 毒 稀 釈 度									LD <sub>50</sub>
		10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9	
Busher 株	8 3 代目	●●● 5 5 6	●●●● 5 5 5	●●●● 5 5 5	●●●● 5 6 6	●●●○ 5 6	●○○○ 7	○○○○	○○○○	○○○○	-5.5
Busher 株	8 6 代目	●●●● 4 4 5	●●●● 4 4 5	●●●● 4 5 5	●●●● 5 6 6	●●○○ 6	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	-4.8
森 本 株	4 6 代目	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	0	
石 原 株	4 3 代目	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	0	

とはなく、両ウイルスの間に判然たる性質の差異を認めることが出来る。

次に孵化鶏卵に於ける場合の結果は表4の如くで、Busher 株は鶏胎児を死亡させることなく、分離株は2株共胎児を、接種後5日乃至8日目位で斃し、哺乳マウスの場合と全く逆の結果を示したわけであるが、ここに於ても Busher 株と分離株の両ウイルスの間に判然たる差異のあることが認められる。

但し哺乳マウスの場合、分離株を接種した

マウスが死亡しない結果ではあるが、これは分離株がマウスに対して感受性の無いことを示すものではなく、M. L. D. を以て判定した結果であることに注意を要する。

又孵化鶏卵の場合 Busher 株で10<sup>-2</sup>で1個、10<sup>-6</sup>で1個胎児の死亡したものがあがるが、これ等は雑菌試験は陰性、哺乳マウスへの還元接種でも陰性であつた。自然死によるものと考える。

表 4 Busher 株の M. L. D. (孵化鶏卵培養)

病 毒 別	継代数	病 毒 稀 釈 度									LD <sub>50</sub>
		10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9	
Busher 株	マウス 8 3 代目	○○○	●○○ 3	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	0
Busher 株	マウス 8 4 代目	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	●○○ 3	○○○	○○○	○○○	0
森 本 株	5 7 代目	●●●● 6 6 6	●●●● 5 6 6	●●●● 6 6 7	●●●● 6 7 8	●●●● 7 7	●●●● 7 8	○○○○	○○○○	○○○○	-5.8
石 原 株	5 1 代目	●●●● 5 6 6	●●●● 5 5 6	●●●● 6 6 7	●●●● 6 6 6	●●●● 6 7 7	●○○○ 7	○○○○	○○○○	○○○○	-5.8

実験IV：哺乳マウスに於ける干渉試験

〔方法〕：両ウイルス接種の時間的間隔を0時(同時)、24、48、72及び96時間として、同一哺乳マウスの腹腔内に接種した。即ち Interfering virus として Busher 株、Challenge virus として分離株を用いる場合と、その逆の場合とである。この場合、実験動物が哺乳マウスであるため、Busher株によるマウスの死亡を以て結果を判定することは勿論である。

接種方法は、先づ Interfering virus 0.1 ml をマウスの腹腔内に接種し、所定の時間後に Challenge virus 0.1ml を同一マウスに接種す

るのである。但し0時(同時)の場合は、両ウイルスを0.1ml宛同時に接種することになり、接種量の多いことによる被害をなくするため、両ウイルス感染肝臓を同量混じり量後、生理的食塩水による乳剤を作り、その0.1 ml を接種した。

〔成績〕：表5は Intefering virus が Busher 株、Challenge virus が分離株の場合であるが、健康マウス材料を対照として Challenge したものと、全て同一結果であり、表6に於ては、Interfering virus が分離株、Challenge virus が Busher 株で、健康材料を対照として

表 5 干 渉 試 験 (哺乳マウス)  
Interfering virus ..... Busher 株      Challenge virus ..... 分離株

Interfering virus	Challenge virus	0 時	2 4 時	4 8 時	7 2 時	9 6 時
Busher 株	森 本 株	● ● ● 5 5 6	● ● ● 5 5 5	● ● ● 5 6 6	● ● ● 5 5 6	● ● ● 5 6 6
	石 原 株	● ● ● 3 4 5	● ● ● 5 6 6	● ● ● 5 5 5	● ● ● 6 6 6	● ● ● 5 6 6
	対 照	● ● ● 4 5 5	● ● ● 5 5 6	● ● ● 4 5 5	● ● ● 5 6 6	● ● ● 5 5 6

表 6 干 渉 試 験 (哺乳マウス)  
Interfering virus ..... 分離株      Challenge virus ..... Busher 株

Interfering virus	Challenge virus	0 時	2 4 時	4 8 時	7 2 時	9 6 時
森 本 株	Busher 株	● ● ● 5 6 6	● ● ● 6 6 6	● ● ● 5 6 6	● ● ● 5 6 6	● ● ● 5 5 6
石 原 株		● ● ● 5 6 6	● ● ● 6 6 7	● ● ● 5 5 6	● ● ● 6 6 6	● ● ● 5 6 6
青 森 株	対 照	● ● ● 5 5 5	● ● ● 4 5 5	● ● ● 5 6 6	● ● ● 5 6 6	● ● ● 5 6 6
青 森 株		○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○

Challenge したものは、全く死亡せず、Busher 株を Challenge したものは完全に発症死亡した。

又、表 5 及び 6 共に Busher 株を接種した時からの死亡までの日数が、0 時間と 96 時間迄共に差異がなく、結局、両ウイルスの間には、何等干渉現象は認められなかつた結果である。

実験 V：孵化鶏卵に於ける干渉試験

〔方法〕：孵化鶏卵を用いて、実験 IV に於ける如く、両ウイルスを時間的間隔を以て、同一孵化鶏卵の漿尿腔内に接種した。即ち、孵化 7 日卵に Interfering virus 0.1 ml を接

種後、35°C の孵卵器中に孵化を続行し、所定の時間毎に Challenge virus を接種して、胎児死亡を結果の判定とした。但しこの場合の胎児死亡は分離株ウイルスによるものであるから、死亡迄の日数は分離株接種からの日数になるわけである。

〔成績〕：表 7 は Interfering virus を Busher 株、Challenge virus を分離株とした場合である。分離 3 株（森本、石原、青森）は、いずれも接種後 5 乃至 8 日で胎児の死亡を認めているに反し、健康材料を Challenge した対照は死亡せず、わずか 2 個ほど自然死と考えられるのを見たに過ぎない。又、72 時間、96 時間で死亡日数が延長したり、生存卵の認めら

表 7 干 渉 試 験 (孵化鶏卵培養)  
Interfering virus ..... Busher 株      Challenge virus ..... 分離株

Interfering virus	Challenge virus	0 時	2 4 時	4 8 時	7 2 時	9 6 時
Busher 株	森 本 株	● ● ● ● ● 5 6 6 6 7	● ● ● ● ● 5 5 6 6 6	● ● ● ● ● 4 5 5 5 6	● ● ● ○ ○ 6 7 8	● ● ○ ○ ○ 8 8
	石 原 株	● ● ● ● ● 5 5 5 6 7	● ● ● ● ● 4 5 6 6 7	● ● ● ● ● 5 5 5 6 6	● ● ● ○ ○ 7 7 7	● ○ ○ ○ ○ 7
	青 森 株	● ● ● ● ● 5 6 6 6 6	● ● ● ● ● 4 5 5 5 6	● ● ● ● ● 4 5 6 6 6	● ● ● ● ○ 6 6 7 8	● ● ○ ○ ○ 7 8
	対 照	● ○ ○ ○ ○ 3	● ○ ○ ○ ○ 6	○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○

れて来るのは、分離株を接種する卵の孵化日が、その最良の7日目から次第に遠ざかつて、不適当な条件となつていくために外ならない。

表8は Interfering virus を分離株、Challenge virus を Busher 株とした場合の結果で

あるが、前表の如き経過で胎児は感染死亡し、対照と比較して差が認められず、結局表7及び8からも、孵化鶏卵培養でも両ウイルス間に何等干渉現象は全く認められなかつた結果を得たと信ずる。

表 8 干 渉 試 験 (孵化鶏卵培養)  
Interfering virus ..... 分離株      Challenge virus ..... Busher 株

Interfering virus	Challenge virus	0 時	2 4 時	4 8 時	7 2 時	9 6 時
森 本 株	Busher 株	●●●●● 4 5 5 6 6	●●●●● 5 5 6 6 6	●●●●● 5 5 6 6 7	●●●●● 6 8 8 8 8	●●●●● 5 5 6 6 7
石 原 株		●●●●● 4 4 5 6 6	●●●●● 5 6 6 7 7	●●●●○ 6 7 7 8	●●●●● 8 6 6 6 7	●●●●● 4 5 5 5 6
森 本 株		●●●●● 4 5 5 5 6	●●●●● 5 6 6 6 7	●●●●● 5 5 6 7 8	●●●●● 6 6 6 7 7	●●●●● 5 5 6 6 6

実験VI : Absättigungsversuch

[方法] : Wildführ (1953) に従い、流行性肝炎回復期患者血清と、分離株による家兎免疫血清とによる Absättigungsversuch を行つて、両ウイルスの間の免疫血清学的関連性を検査した。

即ち各群3匹宛の哺乳マウスに、各種血清0.1cc 宛を皮下接種し、3時間後に、各階段希釈した Busher 株ウイルスの0.1ml 宛を同一マウスの腹腔内に接種して、発症の有無を観察する方法である。

[成績] : 結果は表9の如く、回復期患者血清による結果と、健康人血清による結果と全く差は認められず、又家兎免疫血清について

も同様の結果である。尚、患者血清中の森朝血清は、孵化鶏卵培養に於ける森本株との中和試験で、約100倍程度の中和能を示した血清であるにも拘わらず、結果は全く陰性であつたわけである。血清学的にも何ら関連性は認められないようである。

以上の外、鶏赤血球凝集反応を行つてみたが陰性の結果しか得られず、省略することとした。

総括及び考按

以上の実験に於て、マウス肝炎ウイルス (Busher 株) は、流行性肝炎患者から分離した分離株ウイルスとは、種々の点に於て異なるものであることが判つた。

即ち、Busher 株ウイルスは、極く幼若な哺乳期のマウスのみ感受性があり、成熟マウスでは全く感受性が認められなかつた。しかも、その感染標識はマウスの死亡であり、病理組織学的に肝細胞の強度の変性壊死が特徴である。

孵化鶏卵は、感受性は全くないが、或は更に研究検討の上、可能となることがあるかも知れない。

又哺乳マウス及び孵化鶏卵による両ウイルスの間の干渉現象は全く認められないし、Absättigungsversuch でも、血清学的に何ら

表9 Absättigungsversuch (哺乳マウス)  
抗原.....Busher 株  
血清.....流行性肝炎患者及び家兎免疫血清

血清別	患者名	病 毒 稀 釈 度		
		10-4	10-5	10-6
肝炎患者血清	森 朝	●●●	●●●	●○○
	伊 奈	●●●	●●●	○○○
	森	/	●●●	○○○
	宇 野	/	●●○	●○○
対 照	健康人	●●●	●●●	○○○
家兎免疫血清	石原株	●●●	●●●	○○○
対 照	健康家兎	●●●	●●●	●○○

関連性は無いように思われる。

これ等の事により、Buscher株と分離株は全く別個のウイルスであると断言し得る。

### 結 論

1) Buscher 株は哺乳マウスのみ感受性を有し、マウスを数日中に死亡させる。分離株は死亡させることはない。

2) Buscher 株は孵化鶏卵培養で感受性を有せぬが、分離株は感受性を有し、胎児を数

日中に死亡させる。

3) Buscher 株と分離株の両ウイルス間の干渉現象を、哺乳マウス及び孵化鶏卵を用いて行つて、いづれのウイルスを Interfering virus 又は Challenge virus としても、全く干渉現象は認められない。

4) Absättigungsversuch による免疫血清学的試験でも、両者の間に関連性は無いようである。以上の結果から Buscher 株と分離株は全く別個のものであることが判つた。

### 文 献

- 1) Henle, W. and Henle, G.: Interference between inactive and active viruses of influenza. III. Cross interference between various related and unrelated viruses.: Am. J. M. Sc., 210, 362—369, 1945.
- 2) Vilches, A. and Hirst, G. K.: Interference between neurotropic and other unrelated

viruses.: J. Imm., 57, 125—140, 1947.

3) 辻本信久: 孵化鶏卵内に於けるウイルスの干渉現象, Virus. Vol. 3, No. 1, 50—53, 1953.

4) G. Wildführ: Experimentelle Versuche mit dem Hepatitisvirus., Zeit. für Gesamte Inn. Med. und ihre Grenz. 3, 573—581, 1953.

## Comparative Studies on Hepatitis Virus with Analogous Viruses

### III: Comparative Studies on Infectious Hepatitis Virus with Mouse Hepatitis Virus (Buscher Strain)

By

Hidekichi Matsuura

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

In order to discriminate the isolated infectious hepatitis virus from mouse hepatitis virus (Buscher strain), of which both are very similar in their various natures, the author carried out various experiments and obtained the following results:

1) Only the suckling mouse is susceptible to mouse hepatitis virus and succumbs to its infection, whereas it is rarely killed by the isolated hepatitis virus.

2) The chick embryo is little susceptible to mouse hepatitis virus, but is highly susceptible to hepatitis virus and is killed in a few days.

3) Whichever of the suckling mouse and chick embryo may be used as the test animals, and whichever of both viruses as the interfering or challenging virus, no interfering phenomenon can be observed between mouse hepatitis virus and the isolated infectious hepatitis virus.

4) In the immunological test, "Absättigungsversuch", no relation can be observed between these two viruses.

All of these results suggest that mouse hepatitis virus and the isolated infectious hepatitis virus are clearly different to each other.