

流行性肝炎の病原体に関する研究

第 1 編

肝炎患者より新に分離したウイルスを用いて行つた実験的研究

岡山大学医学部微生物学教室（主任：村上 栄教授）

仙 石 晃 久

〔昭和 34 年 7 月 22 日受稿〕

緒 言

岡山県下に発生した流行性肝炎の、病原体に関する研究は、既に村上等（1955～1958）¹⁾²⁾³⁾⁴⁾により詳細に検討された。又肝炎ウイルスの分離及び固定に関する研究は、可成り多くの先人によつて行われたものであるが、未だ決定的な所見を得るに至らぬ現況であるので、諸種動物への移植に重点をおき、従来迄に成功していない動物実験が引続いて行われた。

之等の動物実験の結果、本ウイルスの感受性動物の探索に於て、孵化鶏卵が感受性を示すことを発見した。尚孵化鶏卵累代中、肝炎ウイルスと推測されるウイルスの分離に成功し、更に本ウイルスのウイルス学的性状が詳細に追究された。その後ウイルスの精製濃縮が行われた結果、ウイルス様粒子の存在を確認した。之等の実験を経て、本ウイルスを用いた血清学的研究が試みられるに至り、精製ウイルスを補体結合反応用抗原として使用し得ることが、明になり、本ウイルスと肝炎患者との間に至大の関連性を有することが、実験的に証明されるに至つた。

著者は村上等の実験方法に従い、肝炎患者の殊に重症例より、患者材料を得て、新に孵化鶏卵累代によるウイルスの分離及び固定を試み、従来迄に分離され保存中のウイルス株と比較し、得られたウイルスを精製純化して、ウイルス学的及び血清学的性状の検討を併せて行つた。

従来の先人の報告を見るに、肝炎ウイルスの分離及び実験動物への移植実験に就ては、確實な定説なく、殆ど失敗に帰しているとも言い得るのであつて、僅かに今日迄兎に角、ウイルスを分離した例は、Henle 一門⁵⁾⁷⁾ Wildführ G. (1953)⁸⁾ 荒川等⁹⁾¹⁰⁾の報告を見るのみである。

之等の実験報告を詳細に検討するに、夫々の研究

者によりて、ウイルス学的性状は夫々異り、Wildführ の記載した如く、本ウイルスにも型別が存在するかの印象を受けるのであつて、一元性のものと推測することが出来ない。

著者は斯る意味から、村上等の分離したウイルス及び著者の分離したウイルスのウイルス学的性状を詳細に吟味し、比較検討を行つた。その結果興味ある知見を得たので、その大要を報告する次第である。

実験材料及び方法

ウイルス 実験に用いたウイルス株は、既に村上等により分離後、孵化鶏卵により累代保存されている石原、小川株であつて、新に分離した春名、古川、丹原の諸株及び小川¹¹⁾により肝炎患者糞便を仔犬に経口投与して新に得られた No. 7. 8 株を対照に用いた。之等ウイルス株の由来は表示した（第 1 表）。

ウイルスの分離及び累代： 肝炎患者材料を、村上等に倣い、孵化卵漿尿腔内接種を重ねて、夫々分離した。春名、古川、丹原の諸株は、孵化卵通過 7～12 代の累代により、漸く固定の域に達したが、孵化卵累代のみで、鶏胎児の全例が死亡する迄に至らないので、マウスに接種して、肝臓を中心とした病理学的所見により、感染の程度を判定した。マウスに於ては病理所見を示すが、発症致死しない所謂不顕性感染を示すことは、従来の成績と一致した。

孵化鶏卵の累代は、ウイルス乳剤を漿尿腔内に接種し、6～9 日後胎児の死亡例のみ、鶏胎児を集め、pool した後、頭、嘴、羽、翼、肢、等を除き Homogenizer により粉碎し、滅菌食塩水（pH 7.6）により 10 倍乳剤を得、2,500 r. p. m. 10 min. 遠心して上清をとり、次代接種材料とした。

感染の標識としては、孵化鶏卵に於ては胎児の死

第 1 表 供 試 ウ イ ル ス の 由 来 及 性 状 の 比 較

供試ウイルス	接 種 材 料	分離年月日	患 者 発生場所	分 離 方 法 及 び 累 代
石 原 株	急性肝炎患者肝 (重症死)	1954. 6. 2	岡 山 市	分離: 孵化卵累代 累代: 孵化卵295代マウス107代
小 川 株	急性肝炎患者肝 (重症死)	1954. 9. 3	岡 山 市	分離: 孵化卵 累代: 孵化卵385代マウス140代
春 名 株	慢性肝炎血清	1957. 3. 10	岡 山 市	分離: 孵化卵 累代: 孵化卵102代
丹 原 株	急性肝炎患者血液	1957. 11. 20	岡 山 市	分離: 孵化卵 累代: 孵化卵87代
古 川 株	急性肝炎患者肝 (重症死)	1957. 7. 10	早 島	分離: 孵化卵 累代: 孵化卵93代
No. 7, 8 株	急性肝炎患者糞便	1956. 4. 12	—	分離: 経口的に仔犬に投与, 腹 腔内接種 累代: 孵化卵累代87代

亡が挙げられるが、接種卵全例に認められる訳ではないので、全部マウスに接種してマウスの病変によつた。マウスの病理所見として注目されるのは、殊に肝臓の病理所見であつて、肝細胞の変性壊死、これに伴う炎症性変化が挙げられ、又実質及び間質周辺における円形細胞浸潤が指摘された。尚之れと同時に肺臓に於ても胞隔炎、血管周辺における細胞浸潤も亦良く認められた。

ウイルスの精製: 先に橋本¹²⁾により行われた超高速遠心沈澱法によつた。即ち各株ウイルスを夫々孵化鶏卵漿尿腔内に接種し、7~10日後死亡した鶏卵の漿尿腔液を多数の卵より集め、poolした後、雑菌の混入なきことを確かめ精製を試みた。その精製法を略記すれば、ウイルス感染漿尿腔液を、生理的食塩水 (pH 7.4) で2倍に希釈し、4,000 r. p. m. 20 min. 遠心沈澱を行い、粗大組織片を除去し、その上清を、10,000 r. p. m. 30 min. 遠心を行い上清を得、再び此の上清を 35,000 r. p. m. 30 min. 遠心を行つて沈澱を、更に3回以上反覆滅菌食塩水により洗滌を行い、少許の食塩水に浮遊することにより精製ウイルスを得た。補体結合反應用抗原として用いるには、之に 10,000 の割合に Marzonin を添加して保存しおき、不活化して用いた。

精製ウイルスを実験に用いるに際しては、夫々精製ウイルスを電子顕微鏡により、小円型若くは類円形のウイルス様粒子の多数散在することを確認するとともに、マウスに復原して、肝臓を中心とする病理所見を確かめておいた。

免疫血清の調製法: 各ウイルス株の免疫血清を

得るために、主として家兎を用いた。予め準備した家兎にウイルス感染漿尿腔液 30.0 ml を精製して得た 35,000 r. p. m. 沈澱を 30.0 ml の生理的食塩水に浮遊して 0.3 ml. 0.5 ml. 0.7 ml と3日おきに腹腔内に接種して感染せしめ、続いて 0.5 ml. 1.0 ml. 1.5 ml と漸次増量して、耳静脈内に接種して免疫を行い、3日間隔10数回の接種を継続した後、最後の注射より2週間後に採血、免疫血清を得た。血清は夫々に採血した後保存しておき、用に臨んで実験に用いた。

補体結合反応の術式: 補体結合反応の術式は、浅木の実験に倣つた。即ち倍数希釈した抗血清若しくは患者血清 0.25 ml に、等量の4単位の抗原及び2充単位の補体 0.5 ml を添加して良く混和した後、一夜氷室に保存し、次に30分間室温に放置し、溶血系 0.5 ml (3% 緬羊血球を3単位の溶血系で感作した血球浮游液) を添加して、良く振盪混和後 37°C 浴槽内に30分間反応させた後、結果を判定した。

中和試験の判定: 中和試験の術式は、次の方法に倣つた。即ち夫々の精製ウイルスの希釈液に、夫々の抗血清を添加し、37°C 孵卵器内に所要時間放置した後、予め準備したマウスの腹腔内に 0.25 ml 宛接し、2週間後に於いて屠殺、それぞれの臓器を採取し、病理標本を作製した。精製ウイルスの各株ともにマウスの発症斃死は認められぬので、中和効果の判定には、肝臓を中心とする病理所見により行つた。

実験成績

1) 新に分離したウイルス株の生物学的性状の検討

従来実験に用いられてきた、石原、小川株を対照におき、新に分離されたウイルス株のウイルス学的研究は、肝炎ウイルスとして殊に注目されている性状中、殊に耐熱性、耐薬剤性、感染経路、濾過性、エーテル抵抗性、電子顕微鏡による形態の観察を行つた。これらのウイルス学的性状は、かつて Havens (1944)¹³⁾ の人体接種実験以降ウイルスの分離が成功しなかつた例に於いても、Maccallum (1955)¹⁴⁾ Wildführ G. (1953) によりて指摘され、検討を加えられたものである。

既に村上等により、これらの生物学的性状を知るために、諸種の方法が採用されてきたが、分離肝炎ウイルスが、他の研究者の分離したウイルスの性状とやや異り、感受性動物に対して、病理所見を発現するが、動物を発症致死せしめない所謂不顕性感染を示すこと、及び他の既知ウイルスと異なる特異性状を発揮すること等が、ウイルス学的研究を一層困難ならしめている点が尠くない。

著者の分離ウイルスの性状を追究するに当つても、かかる面に於いて、新らしい方法を探ることが出来ず、村上等の実験方法をその儘踏襲し、先に分離されたウイルス株と比較検討する方法を試みた。

実験に用いた春名、小川、円原、No. 7, 8 株のウイルス学的諸性状は、従来村上等の研究に用いられた石原、小川株と殆んど同一の性状を示すことが、粗製ウイルスで確かめられた。よつてこれらの株を孵化鶏卵の漿尿腔内接種を行い、超高速遠心沈澱法により精製を重ね、最後の 35,000 r. p. m. 遠心沈澱を、少量の生理的食塩水 (pH 7.6) に浮游して、諸種の一般性状を窺つた。これらそれぞれの精製ウイルス株は、マウスに接種する場合、動物の感染致死は認められず、病理所見のみを発現する所謂不顕性感染を惹起するので、一般生物学的性状を検討するに当つては、病理学的所見に従い、感染標識を定めて判定した。

実験に用いた諸株の精製純化ウイルスを、肝炎ウイルスに擬して、肝炎ウイルスの特性として認められている。重要な一般性状について詳細に検討した。

1) 熱に耐する抵抗性

既に分離した肝炎ウイルスの温熱に対する抵抗性については、時末²⁶⁾、鈴木¹⁵⁾の実験に詳しいが、

著者も同様な方法で、熱に対する抵抗性を窺つた。温熱に対する抵抗試験の術式は、鈴木の方法に従つた。即ち精製ウイルスの各稀釈液を用意しおき、50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C の6組をそれぞれ各株如に作り、それに加温操作を行つた。これらの加温に当つては、予め滅菌したアンプルを用意し、それぞれに稀釈した精製ウイルスを充し、温湯内に沈め、更にコッホ釜内に収めて、所要の温度のもとに加温処理を行い、各稀釈液如にとり出して、マウス3~5匹宛に、腹腔内0.3 ml 宛の接種を行い、2週間後に於ける、肝臓を中心とした病理学的所見により、抵抗性を判断した。これらの実験に当つては、もとより厳密に対照を附して、判定には慎重を期した。

実験成績に於いては、殊に 50~55°C 30 min. の温度に於いて、病理学的所見は殆んど対照と差異は認められず、各株とも良く抵抗を示し、肝臓に於ける細胞変性及び壊死と細胞浸潤の程度は甚だ強いことが指摘された。60~65°C の温熱に対しては、一般に病変が減少した感を抱かせるが、未だ壊死巣の形成等は限局して認められる部分が尠くなく、細胞浸潤は未だ残存して認められた。70~75°C まで温度を上昇せしめると、ウイルスの減毒は著明に示され、病理学的変化は減少する。就中肝臓に於ける肝細胞の変性若しくは類壊死乃至壊死巣の形成は、全く認められず、軽度の細胞浸潤が稀に認められるに至る。この様な病理学的変化は、春名、古川、丹原、No. 7, 8, 更に対照とした石原、小川の諸株に共通して証明された。ただウイルス稀釈域により多少の細胞浸潤が認められる部分もあつたが、本実験の成績から判定して、先づ 70~75°C の温熱に対して、殆んど減毒されるに至るものと判断された(第2表、第3表)。

初め精製ウイルスを温熱により処置し、マウスに接種して、病理所見によりウイルスの抵抗性を判定するに当つては、特に接種ウイルスに含まれる組織成分が問題となるが、本実験では精製純化されたウイルスを用いたために、可成りに判定は容易であつた。

小括及び考按

流行性肝炎ウイルスの温熱に対する抵抗性は、Havens (1944) の人体接種実験により確かめられ、強い抵抗性を示すことが知られたが、本ウイルスの実験動物への移植が困難であつたため、余り多くの

第 2 表 温熱に対する抵抗性

精製ウイルス株 処理温度 及び時間	ウイルス希釈	春 名 株		古 川 株		丹 原 株		No. 7, 8 株		石 原 株		小 川 株	
		10 ⁻²	10 ⁻⁶	10 ⁻²	10 ⁻⁶	10 ⁻²	10 ⁻⁶	10 ⁻²	10 ⁻⁶	10 ⁻²	10 ⁻⁶	10 ⁻²	10 ⁻⁶
50°C 30min.		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55°C 30min.		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60°C 30min.		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
65°C 30min.		+	+	+	±	+	+	⊥	+	+	±	⊥	+
70°C 30min.		⊥	+	⊥	+	⊥	+	⊥	⊥	⊥	+	⊥	⊥
75°C 30min.		⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
Control I.		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
II.		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

註. i) (+)~(-) 病変の程度を示す.

ii) 使用マウスは一群 3~5 匹を用いた.

第 3 表 精製ウイルスの温熱に対する抵抗
(主要病変の比較)

精製ウイルス株 処理温度 及び時間	主要なる 病理学的 所見	肝 臓					肺 臓				
		肝細胞変性	肝細胞壊死	星細胞の肥大	肝索の溶解	実質の細胞浸潤	間質の細胞浸潤	血管及び気管周囲炎	肺充血	肺出血	肺出血
春名株	55°C 30min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	75°C 30min.	⊥	⊥	⊥	⊥	±	±	±	±	⊥	⊥
古川株	55°C 30min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	75°C 30min.	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
丹原株	55°C 30min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	75°C 30min.	⊥	⊥	⊥	⊥	±	±	+	⊥	⊥	⊥
No. 7, 8 株	55°C 30min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	75°C 30min.	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	±	⊥	⊥
石原株	55°C 30min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	75°C 30min.	⊥	⊥	⊥	⊥	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥
対 照	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

註. i) (⊥)~(⊥) 病変の程度を示す

ii) 精製ウイルス希釈液は10⁻²を用いた

報告がある訳ではないが, Lichtman (1949)¹⁶⁾ は 56~60°C の温浴に 30~60 分の抵抗したと述べ, MacCallum (1955)¹⁴⁾ の記載に従えば, ウイルス A, B 型ともに強い抵抗性を示すことが, 特性として示されている. 又 Wildführ G (1953) も同様の所見を認めている. これらの先人の研究報告では,

本ウイルスの温熱に対する抵抗性は可成りの強さをもつことが示されているが, 抵抗性試験に於いては, 確実にウイルスを動物試験により分離して行つた実験は尠く, その実験成績を比較することは甚だ困難である. と同時に温熱の抵抗性を詳細に吟味出来ない感がある.

著者は斯る点を考慮し, 実験を行つたが, 先づウイルスを可及的組織成分若しくは細胞産生物質より除去する橋本¹²⁾の方法によつて, 精製純化を計つた. 実験に際して斯る夾雑物の混在することは, 病理所見上まぎららしい結果を生じる事實は, 既に時末により指摘されている. よつて実験には超高速遠心法によりて, 十分に精製された 35,000 r. p. m. 遠心沈上清を少量の滅菌食塩水に浮遊し, 原液として用いた.

次に病理変化の判定には, 予め病理所見を定め, 採点法によりて, 病変の程度を表示して, マウスの 3~5 匹の病理所見を慎重に記録しておき, 総合判定する方法をとつた.

又実験には, 厳重な対照をおき, 絶えず病理所見を比較して判読した.

斯る点を考慮して, 病理学的所見による判定を行つたが, 本法は先述した如く, ウイルスの感染程度により, 温熱に対する抵抗性の吟味は出来ても, 明らかに抵抗性の限界を指摘出来ぬ感があるので, 実験の結果に於いて, 50~55°C では影響がないが, 60~65°C で病変の程度が減少する事実から, ウイルスの温熱に対する影響は可成りの程度にあり, 70~75°C に於いて, 著るしい減毒を招来するものと推測されるものと判断された.

実験に用いた諸株の病理所見を判読して, ウイル

スの温熱に対する抵抗性を間接的に判断するに、それぞれの多少の抵抗性に差が示された部分もあつたが、大体耐熱性の上での比較では、略々同程度の抵抗性を示すものと判断され、従来実験に用いられた石原、小川株と新分離株とも、殆んど同一のウイルス株であることが推測された。

2) 濾過実験

濾過試験に於いても、先の耐熱性実験と同様に、判定法が考慮されなければならない。

著者は先の実験と略々同様に、35,000 r. p. m. 沈渣した精製ウイルスをそれぞれの株より得て、Seitz E. K. 及び Berkefeld N. の濾過を行い、濾液を一群3～5匹のマウスに接種して、14日後に屠殺病理標本を作り、マウスの感染を、病理所見により判断して、後累代を行い、濾過性を確めた。

実験の結果では、Seitz E. K. 及び Berkefeld N. の濾液を接種した。マウスの病理学的所見では、多少とも病変の減少が一般に認められた。これらの実験は、時期をおいて3回同様な方法で濾過を行い、それぞれの病変を比較したが、Seitz E. K. を用いるに、春名、石原株に於いては比較的平等な病理変化を認めるに拘らず、古川、No. 7, 8 小川株においては、病理所見が可成り減少を示すが、病変の程度に軽度の差が見られるだけで、一般に病変の種類には関りなく、病理所見の上でのウイルスの性格は、略々類似したものと解釈され、濾紙による吸着がある程度ある外には、良く濾過する事実を認めた。Berkefeld N. に於いても同一の所見で、容易に濾過されるが、可成りの吸着によるウイルスの減少が伴うことが示唆された。

濾過に伴う病理学的変化の減少は、主として精製ウイルス接種に伴う肝実質細胞の変性とか、壊死巣形成等の所見が、限局した病変に変化し、左程著明でなくなり、肝実質及び間質周辺に亘る細胞浸潤の程度も、従つて軽度となる傾向が示され、肺臓の病理所見は著しい減少を示すことが認められた(第4表)。

小 括 及 び 考 按

分離ウイルスの濾過性に関しては、既に村上等の予報又は鈴木¹⁵⁾・俵¹⁷⁾によりて詳述された。先の橋本の所見に従えば、精製ウイルスの電子顕微鏡的研究の結果 50 m μ の小円形若しくは類円形の粒子を認めたと報告している。

従来の流行性肝炎の研究により、濾過性に関して

第4表 精製ウイルスの濾過試験

濾過器の種類	精製ウイルス株 濾回数	春名株	古川株	丹原株	No. 7, 8株	石原株	小川株
Seitz E. K.	Exp. I	++	+	+	+	++	+
	Exp. II	++	+	+	+	++	+
	Exp. III	++	+	++	+	++	+
Berkefeld N.	Exp. I	++	+	+	++	+	+
	Exp. II	+	++	+	++	+	++
	Exp. III	++	+	++	++	+	+

- 註. i) 精製ウイルスは 10^{-2} 稀釈液を用いた
 ii) (++)~(+) 病変の程度を示す
 iii) 1群3～5匹のマウスの病変より総合判定した

報告した Wildführ G. の見解にも、凡その細菌濾過器の通過が容易なる事実を記載し、Maccallum の記載にも、等しく濾過性を有するとの記述がある。

著者の実験に於いても、分離したウイルス株より精製ウイルスを得、実験を行つた結果、それぞれのウイルス株によりて、マウスの病理学所見に於いては病変の程度に差が窺われるが、一様に濾過されていることを、病理所見により判定することが出来た。

又これらの所見より、本ウイルスの大きさは、凡そ推測される訳である。

3) 経口感染実験

従来迄肝炎ウイルスの伝染経路は、経口感染が信じられ、ウイルスの排泄は糞便に多い事実が知られている。既に村上等の報告に詳しく、感染経路について、分離ウイルスを用いた感染実験が行われている。

著者も亦前述の諸株を用いて、経口感染を行い、病理所見を確めて、感染の様相を窺つた。従来迄に、著者の実験では総て腹腔内接種による感染経路を採用していたが、本実験ではそれぞれ精製ウイルスを用意し、大賀¹⁸⁾の行つたビニール製の細管を用いて、マウスに投与感染せしめて後、型の如く、病理標本による病変の判定により、感染の程度を確めた。

従来実験に用いた石原、小川株と比較して、新に分離して用いた諸株の経口感染は、実験成績より見て、それぞれ成立していることが、病理学的所見より判断することが出来た。即ち各ウイルス株を用いた経口感染に於いては、それぞれの株別により、多少の病理学的所見は異なるが、一般に肝臓を中心とした病理所見では、肝実質細胞の変性及び類壊死乃至

壊死巣の形成は、高度に、しかも比較的広汎に認められ、細胞浸潤の程度も亦著明である。精製ウイルスの希釈域に於いても、各株に於いて差が示されたが、殊に 10^{-6} 希釈程度の場合が、一様に病理学的変化は強い傾向が認められた。この所見は大賀又は伊藤¹⁹⁾の所見と略々一致する様である(第5表)。

第5表 精製ウイルスのマウス経口感染実験

精製ウイルス株	精製ウイルス希釈									
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	
春名株	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
古川株	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
丹原株	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
No.7.8株	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
石原株	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
小川株	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

註. i) (++)~(+) 病変の程度を示す

ii) 1群3~5匹のマウスを用い、肝臓を中心とした病変による総合判定によつた

小 括 及 び 考 按

流行性肝炎の経口感染説は、既にWillcox(1948)¹⁹⁾の報告があり、Van Rooyen²²⁾ Neefe et al.²³⁾ Fraasser²⁰⁾ Hallgren²⁴⁾等が食物及び水系伝染を報告している。我国に於いても石田²¹⁾の成績があつて、一般に信ずるべき感染経路として、Fecal oral Route が推測されている。又別に Bernet²⁵⁾はおそらく最初の感染場所として、腸粘膜を挙げ、第二次的乃至全身顕性感染場所として、肝臓を認めている。

先に分離されたウイルスを用いて大賀が、精製ウイルスを用いて伊藤が、経口感染実験をマウスを用いて行い、ウイルスの体内分布、又は経口的に投与されたウイルスが、肝臓に達して、侵入増殖を惹起するに至る過程を、病理学的所見により追求した成績を報告しているが、著者の実験では、経口感染が、それぞれのウイルス株によりて成立するかどうかを、病理所見により知るにあつた。

既に本ウイルスの腹腔内感染は、十分に成立することを知つたが、本実験によりて、容易に各株のウイルスが、経口的にも感染が成立することが知られ、可成りの高い希釈に於いても、著明な病理所見を呈す事実から、ウイルスの経口投与後に於いては、伊藤の記述した如く、腸壁殊に空廻腸壁より吸収され、

Bernet のいう肝臓に於いて、全身顕性感染が認められるに至るものと推測された。又ウイルス排泄は糞便に於いて認められることが明らかである。

尚新に分離した諸株の示す病原性は、略々同程度であることが、病理学的所見より推定されたが、それぞれのマウスの示す病理所見には、同一ウイルス株でも、病変に於いては可成りの動揺若しくは巾があり、確実な病原性を比較することは、困難であるが、病変の判定には一群3~5匹宛の、マウスの病変の総合判定を行い確実を期した。又病変の性格は、略々類似したものであつて経口的感染では、それぞれの実験ウイルス株ともに良く成立するものと判断された。

4) 薬剤に対する抵抗性

薬剤に対する抵抗性を検討する意味から、薬物として Formalin, Corbol, Marzonin, を用いて抵抗性を見た。Formalin は精製ウイルス液に2.0%水溶液を加え、それぞれ0.05%, 0.1%, 0.2%とし、Corbol は1.0%水溶液を用い、それぞれ0.01%, 0.1%に、Marzonin は1.0%水溶液を加え、それぞれに0.01%, 0.05%, 0.1%とした。これらの薬物添加後混和し 37°C 及び 40°C に保存した。これを所定期日後にとり出し、マウス腹腔に 0.3 ml 宛接種して、病理所見による判定を試みた。

実験結果に於いては、37°C に保存した場合にあつては、良く耐え0.01%添加では殆んど影響なく、0.1%にも、病理所見の上では、1週間以後に於いて、漸次病変の漸減があることが窺われた。この成績から、Corbol の添加により可成りの影響を蒙るとしても、尚3週間にしても多少の病変が残存していて、充分なウイルスの不活化が行なわれるに至っていないことが示された。

次に Formalin に於いても、同様の傾向が認められ、0.05%, 0.1%, 0.2%と薬剤を増量した成績に於いて、1週間程度は病理所見が持続するが、その後の経日と共に、病変は軽度となるが、尚証明されていて、ウイルスの生存が疑われる。Marzonin の場合も、3週間は病変が示されている。以上の所見より、本ウイルスの薬剤の抵抗に対する抵抗性は、可成り強く、前記の用いた薬剤の濃度では、3週間以上の保存に耐えることが判断された。4°C に保存した場合は、3種の薬剤を添加して保存しておいても、頑強に抵抗することが、病理所見の上で明瞭である(第6表、第7表)。

これらの実験に於いては、総て薬剤に対するウイル

第 6 表 精製ウイルスの不活化に要する日数

保存日数 使用薬剤及び 濃度ウイルス株		2	3	5	7	10	15	18	21
		10 ⁻² 10 ⁻⁶	10 ⁻² 10 ⁻⁶	10 ⁻² 10 ⁻⁶	10 ⁻² 10 ⁻⁶	10 ⁻² 10 ⁻⁶	10 ⁻² 10 ⁻⁶	10 ⁻² 10 ⁻⁶	10 ⁻² 10 ⁻⁶
Carbol (春 名)	0.01%	++ ++	+ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ +	+ ++	++ ++
	0.1 %	+ ++	+ ++	++ ++	+ +	+ ++	+ +	+ ++	+ +
Formalin (古 川)	0.05%	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+ +	+ ++	+ +	+ +
	0.1 %	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+ +	+ +	++ +	+ ++
	0.2 %	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+ +	+ +	± ±	± ±
Marzonin (石 原)	0.01%	++ ++	++ ++	++ ++	++ +	++ +	+ +	+ +	+ +
	0.05%	+ ++	+ +	+ ++	++ ++	++ ++	++ +	+ +	+ +
	0.1 %	+ ++	+ ++	++ ++	++ ++	+ +	+ +	+ +	+ ±
Control	No. 1 (春 名)	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+ +	+ +	++ +	+ +
	No. 2 (古 川)	++ ++	++ ++	+ +	++ +	++ +	++ +	+ +	+ +

註. i) 37°C に保存した場合の結果を示す
 ii) (++)~(±) 病変の程度を示す
 iii) マウスは 1 群 3~5 匹を用いた

第 7 表 精製ウイルスの不活化に要する日数

保存日数 使用薬剤・濃度 ウイルス株		2	3	5	7	10	15	18	21
		10 ⁻² 10 ⁻⁶	10 ⁻² 10 ⁻⁶	10 ⁻² 10 ⁻⁶	10 ⁻² 10 ⁻⁶	10 ⁻² 10 ⁻⁶	10 ⁻² 10 ⁻⁶	10 ⁻² 10 ⁻⁶	10 ⁻² 10 ⁻⁶
Carbol (春 名)	0.01%	+ ++	++ ++	+ ++	++ ++	+ +	+ +	+ +	+ +
	0.1 %	++ ++	+ +	+ +	+ +	+ +	++ ++	+ +	+ +
Formalin (古 川)	0.05%	+ +	+ ++	++ +	++ ++	+ +	+ +	+ +	+ +
	0.1 %	+ +	+ +	++ +	++ ++	+ ++	+ +	+ +	+ +
	0.2 %	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ ++	± +	+ +
Marzonin (No. 7, 8)	0.01%	+ ++	++ ++	++ ++	+ +	++ +	++ +	+ +	+ +
	0.05%	++ ++	++ ++	++ ++	+ ++	++ ++	++ +	+ +	+ +
	0.1 %	++ ++	++ +	+ ++	++ ++	++ ++	+ +	+ ±	± +
Control	No. 1 (丹 原)	++ ++	++ ++	++ ++	+ +	++ +	++ +	+ +	+ +
	No. 2 (小 川)	++ +	+ +	+ ++	+ +	+ ++	++ +	+ +	± +

註. i) 4°C に保存した場合の結果を示す
 ii) (++)~(±) 病変の程度を示す
 iii) マウスは 3~5 匹宛 1 群として用いた

スの抵抗を、病理学的所見の上に立つて判定した。まづ病理所見の評価によつた判定では、良く薬剤に対して抵抗することが認められ、しかも、3 週間の保存でも、充分な不活化が行われないことは、本ウイルスの特性と推測された。

小 括 及 び 考 按

肝炎ウイルスの薬剤に対する抵抗性が強い事実は、既に先人の報告にも詳しい。Neefe (1946)²⁸⁾ は石

炭酸、トリクレゾール等を含む血清内では月余に亘り活性を有すると述べており、Maccallum の記載にも肝炎ウイルスは強い抵抗性を示すことを記述している。他に本ウイルスの薬剤に対する抵抗は、他のウイルスと異り、可成り強い事実が知られている。

村上等の肝炎分離ウイルスも亦、強い抵抗を示す事実は、精製ウイルスを用いた鈴木の実験によりて詳細に報告された。著者も同様な術式で、実験を行

い、新らしく分離されたウイルスと、在来分離後累代保存されているウイルスとの比較を行い、薬剤の影響を確めた。これらの不活化実験に於いては、薬剤の不活化と共に、不活化されたウイルスの免疫原性が、重要視されなければならないことは勿論であるが、不活化の面をのみ問題とするに、分離ウイルスの薬剤に対する抵抗は可成り強く、容易に不活化され難いことが推測された。

5) エーテルに対する抵抗性

既に従来分離され累代保存中の石原、小川両株のエーテル耐性は鈴木により示されたが、著者と同様な術式で、新に分離された諸株にも用い比較検討した。

実験方法は、精製ウイルスのそれと、エーテルを等量宛良く混和振盪後、滅菌シャーレ内に拡げ、エー

テルを分ち、37°C 30 min 保存のものと、4°C 24 時間保存のものと2種類にして、それぞれマウスの腹腔内接種を行い、病変の程度に応じて、エーテルに対する態度を窺った。

実験成績では、用いた精製ウイルスの各株ともに病変の減少を認めず、等しく病理変化が示された事実より、エーテルに対する抵抗性を有するものと判定された。先づ 37°C 30 min. 保存の場合を見るに、エーテルの処置により、各ウイルス希釈ともに病変の緩和若しくは抑制は認められない。更に 4°C に保存24時間の場合に於いても、等しく病変が残存していて、エーテルによる影響は甚だ渺い結果で、精製ウイルス諸株ともに、鈴木の結果と一致して、エーテル抵抗性のウイルス群に属することが明らかである(第8表)。

第 8 表 精 製 ウ イ ル ス の エ ー テ ル 抵 抗 性

ウ イ ル ス 株	精製ウイルス 株希釈 処置時間	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9
春 名 株	37°C 30min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4°C 24h.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
古 川 株	37°C 30min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4°C 24h.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
丹 原 株	37°C 30min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4°C 24h.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No. 7. 8 株	37°C 30min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4°C 24h.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
石 原 株	37°C 30min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4°C 24h.	+	+	+	+	+	+	+	+	+

註. i) (++)~(±) 病変の程度を示す

ii) マウスは1群3~5匹を用いた

小 括 及 び 考 察

エーテルに対する抵抗性を示すことは、既に肝炎ウイルスにおいては Maccallum の記載があつて、肝炎ウイルスA, B型ともに、抵抗性を示すことが知られている。

著者の新らしく分離された各株ともにエーテルに対する態度は、略々一致していて、病理所見は減少せず、等しく病変が保持されている点より、エーテル抵抗性を示すものと判断した。

6) 紫外線照射による不活化実験

実験方法は先の鈴木の方法に倣つた。即ち各株の精製ウイルスを 10⁻² 希釈を行い、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て照射を続け一定時間照射したあと、それぞれに接種して病変による判定を行った。

ウイルス各株の照射後接種したマウスの病理変化を時間如に照射したそれぞれの時間に於いて比較した。

先づ5分間の照射に於いては、肝臓を中心とする病理所見には著変はない。10分間に於いても、差は窺うことが出来ない。20~30分の照射では、病変が次第に減少し始め、軽度の細胞浸潤を散見するに至る程度になり、40分照射において著しい病理変化の消失が示された。各株ともに一般に同様な傾向を示しているが、20~30分の照射時間では、ウイルス

の不活化が一部分に於いて惹起している如く、病変は漸減し始めているが、軽度の病変が残存していて、40分照射により殆んど病理変化が消失する如くである。

諸株の病変より判定して、一般に充分ウイルスの不活化が行われるのは、40分以上の照射が望ましいものと推測された(第9表)。

第9表 紫外線照射ウイルスのマウスに示す病変の比較

ウイルス株	照射時間				
	5min.	10min.	20min.	30min.	40min.
春名株	++	++	+	+	+
古川株	++	+	+	⊥	⊥
丹原株	++	++	++	+	+
No. 7, 8株	+	+	+	⊥	⊥
石原株	++	+	+	⊥	⊥
小川株	++	+	+	+	⊥
対照(石原株)	++	++	++	++	++

小括及び考按

肝炎ウイルスの紫外線照射による報告では Neefe (1945)²⁰⁾ は紫外線照射1時間により、不活化されると述べている。又 Maccallum の記載は判然としていない。

先に同様な実験は同門鈴木により試みられ、従前より用いられていた石原、小川株により、照射を行つて、不活化を確かめているが、その成績では、略々40分照射により、不活化の目的を達し得ると述べている。

著者は新分離株の春名、古川、丹原、No. 7, 8 と、保存株小川株のそれぞれに就いて、同様な術式により、照射を行い、5, 10, 20, 30, 40 min. 照射後マウスに接種して、病理所見により、不活化の判定を行つた。

ウイルス株によつては、20~30 min. 照射で、著しい傷害作用を蒙るものの如く、病理所見の減少する例があるが、未だ丹原、春名株に於いては可成りの抵抗を示し、後に 40 min. 照射においても、肝臓に於ては特有の小壊死巣を散見する例があつて、かならずしも、一樣ではないが、概ね 40 min. 以上照射することにより、不活化し得るものと推測する結果であつた。

2) 新に分離したウイルスの血清学的性状について

新に孵化鶏卵累代により分離したウイルス株を橋

本の超高速遠沈法により、精製ウイルスを得て、ウイルス学的性状を検討し、従来村上等の分離されたウイルス株と、殆ど同様な性状を具備していることを明にした。次いで血清学的性状を窺う意味より、同門浅木²¹⁾ により試みられている補体結合反応を主に、中和試験併びに“Absättigungsversuch”を行い、免疫学的性状を詳細に吟味した。

1) 精製ウイルスを抗原として用いた補体結合反応の成績

実験に用いた補体結合反応用抗原は、各ウイルス株ともに浅木の行つた如く 35,000 r. p. m. 遠心沈澱を、少量の生理的食塩水(pH 7.6)に浮遊せしめ、それぞれに 1:10.00 の割に Merthioleate を添加して、保存し、不活化したものを用いた。別に分離ウイルス株のそれぞれの家兎免疫血清を準備しておき、前記の抗原との組合せて、それぞれに反応せしめた。又これらの諸株と抗血清とを組合せて、交叉的に反応せしめて、ウイルス株相互間の免疫学的性状を知る方法を試みた。更に同様な操作のもとに、対照抗原を準備して、慎重に補体結合価を判定することに努めた。

先づ春名株抗原を使用し、同種春名抗血清及び他種各抗血清で行つた成績では、共に抗補体作用又は非特異的反応は認められない。春名抗血清に 1:128 の抗原価を示し、抗体価 1:128 の抗原価を示し、抗体価 1:80 であつて良く反応を認めた。又他の古川抗血清では、抗原価 1:128、丹原株抗血清では 1:64 とやや低いが、No. 7, 8 では 1:128 と定まり、従来使用してきた石原、小川株抗血清に 1:64 と共に低い現れがあるが、春名株抗原に対してウイルス抗血清は良く反応するものと認められた(第10表)。

次に保存中の小川株を抗原とした場合の各種抗血清との間の反応を見るに、同種小川株抗血清の間には良く反応し、1:128 の抗原価を示すもので、石原株に於いても同等の反応値を有する。新らしい分離株抗血清との間の成績を窺うに、春名株抗血清に 1:64、古川、丹原 No. 7, 8 とともに抗原価は略々一定した成績である(11表)。

これらの成績を見て、総合して一致した所見は、これらのウイルス各株を精製純化して、家兎を免疫した場合、それぞれに 35,000 r. p. m. 分劃中に高度に免疫抗体を産生することが可能であつたことであり、しかも、しかも、従来村上等により分離された石原、小川株と、新に分離された春名、古川、丹

第10表 補体結合反応(1)

免 疫 ウ イル ス 株	血 清 稀 釈	抗 原 稀 釈						抗原稀釈		
		精製ウイルス抗原 (春名株)						対照抗原		
		8	16	32	64	128	256	4	8	16
春 名 株	1:10	4	4	4	4	4	0	0	0	0
	1:20	4	4	4	3	1	0	0	0	0
	1:40	4	4	3	2	1	0	0	0	0
	1:80	4	1	0	0	0	0	0	0	0
古 川 株	1:10	4	4	4	4	4	2	0	0	0
	1:20	4	4	4	2	0	0	0	0	0
	1:40	4	4	2	0	0	0	0	0	0
	1:80	3	1	1	0	0	0	0	0	0
丹 原 株	1:10	4	4	4	4	1	0	0	0	0
	1:20	4	4	3	1	1	1	0	0	0
	1:40	4	4	1	0	0	0	0	0	0
	1:80	3	1	0	0	0	0	0	0	0
No. 7, 8 株	1:10	4	4	4	4	4	1	0	0	0
	1:20	4	4	4	3	1	0	0	0	0
	1:40	4	3	1	1	0	0	0	0	0
	1:80	4	1	0	0	0	0	0	0	0
石 原 株	1:10	4	4	4	4	2	0	0	0	0
	1:20	4	4	3	2	0	0	0	0	0
	1:40	4	4	1	1	0	0	0	0	0
	1:80	2	1	1	0	0	0	0	0	0
小 川 株	1:10	4	4	4	4	1	1	0	0	0
	1:20	4	4	4	3	0	0	0	0	0
	1:40	4	1	1	0	0	0	0	0	0
	1:80	2	0	0	0	0	0	0	0	0

註. 4, 3, 2, 1 は溶血阻止の程度を示す

原株と、又別の分離方法をとつた No. 7, 8 株が、ともに同様に反応することであつて、これらの各株は略々抗原性を共有することが推定された。もつとも、詳細に場の形に示された補体結合反応では抗原価にやや差異が示される部分もあるが、本実験では判定し難いものである。斯る免疫学的性状を吟味する目的から、それぞれのウイルス株と抗血清とを組合せて、交叉的に補体結合反応を、重ねて行い確めた。

保存していた石原株を抗原とした実験では前の実験成績と同様に、石原抗血清にも 1:128 と反応するのを始め、春名株抗血清に 1:64 丹原株抗血清にも 1:64 の抗原価を示し、抗体価も亦 1:80, 1:40, 1:40 とまづ同等の成績を発現していて、それぞれに交叉的に反応することが明らかである

第11表 補体結合反応(2)

免 ウ イル ス 疫 株	血 清 稀 釈	抗 原 稀 釈						抗原稀釈		
		精製ウイルス抗原 (小川株)						対照抗原		
		8	16	32	64	128	256	4	8	16
春 名 株	1:10	4	4	4	4	2	1	0	0	0
	1:20	4	4	4	3	1	0	0	0	0
	1:40	4	4	2	1	0	0	0	0	0
	1:80	3	1	0	0	0	0	0	0	0
古 川 株	1:10	4	4	4	4	3	0	0	0	0
	1:20	4	4	4	1	0	0	0	0	0
	1:40	4	4	1	1	0	0	0	0	0
	1:80	2	0	0	0	0	0	0	0	0
丹 原 株	1:10	4	4	4	4	1	1	0	0	0
	1:20	4	4	4	2	0	0	0	0	0
	1:40	4	4	3	1	1	0	0	0	0
	1:80	3	1	0	0	0	0	0	0	0
No. 7, 8 株	1:10	4	4	4	4	2	0	0	0	0
	1:20	4	4	4	3	1	0	0	0	0
	1:40	4	4	2	1	0	0	0	0	0
	1:80	2	0	0	0	0	0	0	0	0
石 原 株	1:10	4	4	4	4	4	0	0	0	0
	1:20	4	4	4	4	2	0	0	0	0
	1:40	4	4	3	1	0	0	0	0	0
	1:80	0	0	0	0	0	0	0	0	0
小 川 株	1:10	4	4	4	4	4	2	0	0	0
	1:20	4	4	4	4	3	0	0	0	0
	1:40	4	4	4	2	0	0	0	0	0
	1:80	4	2	1	0	0	0	0	0	0
泉 熱 ス ウ 社 イ 株	1:10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1:20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1:40	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1:80	0	0	0	0	0	0	0	0	0

註. 4, 3, 2, 1 は溶血阻止の程度を示す

(第12表).

古川株を抗原として用いた実験に於いても、同様な反応があつて、それぞれ新旧ウイルス株抗血清に拘らず、抗原価は 1:64~1:128 と確実な反応値を示すことが認められた(第13表).

又丹原株を抗原とするに、同種丹原株抗血清に 1:256 以上の抗原価を示したことが注目された。同種抗血清には良く反応することが本実験でも認められていたが、丹原株では殊に著明であつて、他の抗血清に於いては、春名株 1:32, 古川株 1:64, No. 7, 8 1:64, 石原株 1:32 とやや抗原価は劣

第12表 補体結合反応(3)

免疫ウイルス株	血清希釈	抗原希釈						対照抗原		
		精製ウイルス抗原(石原株)						抗原希釈		
		8	16	32	64	128	256	1	8	16
石原株	1:10	4	4	4	4	4	0	0	0	0
	1:20	4	4	4	4	2	0	0	0	0
	1:40	4	4	3	1	1	0	0	0	0
	1:80	4	1	0	0	0	0	0	0	0
春名株	1:10	4	4	4	4	3	0	0	0	0
	1:20	4	4	4	3	2	0	0	0	0
	1:40	4	4	3	2	1	0	0	0	0
	1:80	3	1	1	0	0	0	0	0	0
丹原株	1:10	4	4	4	4	0	0	0	0	0
	1:20	4	4	4	2	0	0	0	0	0
	1:40	4	4	3	1	0	0	0	0	0
	1:80	2	1	1	0	0	0	0	0	0

第13表 補体結合反応(3)

免疫ウイルス株	血清希釈	抗原希釈						対照抗原		
		精製ウイルス抗原(古川株)						抗原希釈		
		8	16	32	64	128	256	4	8	16
春名株	1:10	4	4	4	4	2	2	0	0	0
古川株	1:10	4	4	4	4	4	1	0	0	0
丹原株	1:10	4	4	4	4	2	0	0	0	0
No. 7, 8株	1:10	4	4	4	4	1	0	0	0	0
石原株	1:10	4	4	4	4	4	0	0	0	0
小川株	1:10	4	4	4	4	4	0	0	0	0

第14表 補体結合反応(3)

免疫ウイルス株	血清希釈	抗原希釈						対照抗原		
		精製ウイルス抗原(丹原株)						抗原希釈		
		8	16	32	64	128	256	4	8	16
春名株	1:10	4	4	4	3	2	0	0	0	0
丹原株	1:10	4	4	4	4	4	4	0	0	0
古川株	1:10	4	4	4	4	3	1	0	0	0
No. 7, 8株	1:10	4	4	4	4	2	0	0	0	0
石原株	1:10	4	4	4	3	1	1	0	0	0

る結果であつた(第14表)。

No. 7, 8株を実験に用いた成績でも、同様な成績であつた。即ち同種 No. 7, 8株抗血清には 1:256 と反応するが、他種抗血清では、やや抗原価は劣り、1:32~1:128 の抗原価を示すことが窺い得られた(第15表)。

精製ウイルスを抗原として用い、各株の家兎免疫

第15表 補体結合反応(4)

免疫ウイルス株	血清希釈	抗原希釈						対照抗原		
		精製ウイルス抗原(No. 7, 8株)						抗原希釈		
		8	16	32	64	128	256	4	8	16
春名株	1:10	4	4	4	3	1	1	0	0	0
	1:20	4	4	3	1	0	0	0	0	0
丹原株	1:10	4	4	4	4	2	0	0	0	0
	1:20	4	4	3	0	0	0	0	0	0
古川株	1:10	4	4	4	4	1	0	0	0	0
	1:20	4	4	2	1	0	0	0	0	0
No. 7, 8株	1:10	4	4	4	4	4	4	0	0	0
	1:20	4	4	4	3	1	0	0	0	0
石原株	1:10	4	4	4	4	2	0	0	0	0
	1:20	4	4	1	1	0	0	0	0	0
小川株	1:10	4	4	4	4	4	0	0	0	0
	1:20	4	4	4	2	0	0	0	0	0

血清に対する補体結合反応を行つた以上の成績から、村上等の分離株と著者の分離株ともに、補体結合反応の結果では、抗原性は略々共通した性状を有することが証明された。又ウイルス株相互間の交叉補体結合反応に於いては、同種抗血清には強く反応する傾向を示し、他種抗血清にはやや抗原価は劣る傾向があるが、相互に良く反応する事実から、精製ウイルスを抗原とする場合の抗原的価値若しくは精製ウイルスを用いて家兎を免疫した際の血清の示す抗体価等を考慮して、本補体結合反応の成績は有意な所見と推測された。

次にこれらの成績に徴して、肝炎患者血清に対する、これら精製ウイルスの関連性を窺う意味より、肝炎回復血清を用いて、同様な術式による補体結合反応を行つた。

先づ患者回復血清では、比較的経日の明らかなものに就いて反応を行つた。実験成績に見るに、各ウイルス株を抗原として用いた場合、それぞれに抗原価は低い感はあるが、比較的一致した反応値を示している。又経日に就いても、第7週の水島血清で 1:16 と確実な抗原価が出る例と、第17~20週に於いて抗原価は全く示されぬ例があり、又第40~60週に於いて 1:8 の抗原価を示す例があつて、かならずしも一樣の結果を得られぬことが少くない(第16表)。

更に集団検診で採血された臨床的所見により肝炎の疑いのもとに得られた数例に於いては、各株とも

第 16 表 補 体 結 合 反 応 (5)

患者血清		抗原 経日 (週)	抗 原 稀 釈																対 照							
			小 川 株					石 原 株					春 名 株					丹 原 株								
			2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	
巻 石	島	12	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	2	0	0	0	4	4	3	0	0	0	0	0	0
		7	4	4	4	4	1	4	4	4	2	0	4	4	3	1	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0
小 畑	直	15	4	4	1	0	0	4	1	0	0	0	4	4	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0
		20	4	1	0	0	0	4	4	0	0	0	4	4	0	0	0	4	4	1	0	0	0	0	0	0
池 田	島	17	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		20	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
津 遠	藤	60	4	4	4	2	0	4	4	0	0	0	4	4	1	0	0	4	4	4	0	0	0	0	0	0
		32	3	1	1	0	0	3	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
森 紀	井	40	4	4	4	0	0	4	4	4	1	0	4	4	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
		17	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	
馬 難	波	42	4	4	1	0	0	4	4	0	0	0	4	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0
		40	4	4	4	1	0	4	2	1	0	0	4	4	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0	
芳	形																									

第 17 表 補 体 結 合 反 応 (6)

患者血清	精製ウイルス抗原	抗 原 稀 釈																対 照	
		春 名 株					古 川 株						No. 7, 8 株						
		4	8	16	32	64	4	8	16	32	64	128	4	8	16	32	64	125	4
小幡	4	4	4	1	0	4	4	1	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0
遠藤	4	3	1	0	0	4	1	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0
紀井	3	2	1	1	0	3	1	1	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0
広直	4	4	4	2	0	4	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
石原	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
池田	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
鷹取	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0
芳形	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
中桐	4	1	1	0	0	4	2	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
森時	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0
万波	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
難波	3	1	1	0	0	4	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
北村	4	4	1	0	0	4	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0

に、大体共通した抗原価を示すが、抗原価は概ね 1 : 4 ~ 1 : 16 に終っているが、陰性例も亦多くて、容易に判断出来ないが、これらの反応より見て精製ウイルスに対するある程度の関連性が窺い得られるものと思料された (第17表)。

最後に本学小坂内科に肝炎として入院中の患者血清を譲り受け、同様の反応を行つた成績では、従来実験に用いられた石原、小川株と、No. 7, 8 株、丹原株、古川株の各株の新らしく分離した株を抗原とする場合、それぞれに於いて、抗原価は 1 : 4 ~ 1 : 8 と甚だ低いが、確実に示され、陰性例も亦、同様な結果が得られている (第18表)。

これらの補体結合反応の成績から、精製ウイルスを抗原とした場合、肝炎恢復患者血清との間に、陽性に反応する例が尠くない事は明らかである。

2) 精製ウイルス各株を用いて行つた中和試験及び“Absättigungsversuch”の成績

既に浅木²⁷⁾は、村上等により分離した石原、小川株を用い、橋本の超高速遠心沈澱により精製純化されたものを用いて、補体結合反応を行い、有意な方法であることを示した。更に中和及び“Absättigungsversuch”に就いても、用いられる方法ではあるが、それに条件が伴い、而も、中和現象を病理学的変化に求めなければ、判定が出来ない

第 18 表 補 体 結 合 反 応 (7)

患者血清	抗 原	抗 原 稀 釈																				対 照							
		No. 7, 8 株					丹 原 株					古 川 株					小 川 株								石 原 株				
		2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8	16	32	2	4	8
塩原	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0
飯間	4	1	1	0	0	0	4	1	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0
萩原	4	2	0	0	0	0	3	1	0	0	0	4	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
三宅	4	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
宮口	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
吉号	4	4	4	2	0	0	4	4	4	0	0	4	1	0	0	0	4	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0
難波	4	4	2	0	0	0	4	4	0	0	0	4	1	0	0	0	4	4	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0
沖本	2	1	0	0	0	0	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
岡村	4	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0
大塚	4	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
西山	4	1	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0
平野	4	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	1	0	0	0	4	4	2	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0
尾崎	4	4	3	3	0	0	4	4	3	0	0	4	1	0	0	0	4	4	1	0	0	4	4	1	0	0	0	0	0
横飛	4	4	3	2	0	0	4	4	4	2	0	4	0	0	0	0	4	4	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0

点に、従来の中和試験と異り難点があると述べた。

著者は楠体結合反応を用い、分離肝炎ウイルス諸株について、交叉楠体結合反応を応用して充分に特異的にして、有意な結果が得られることを指摘し、これらの成績から、用いた各株の抗原性は略々共通したものであることを知った。又患者恢復血清を用いた同様の反応に於いても、有意な抗原価が得られた。

本実験では、精製ウイルス対該当抗血清及び交叉中和試験の形で、諸種の抗原対抗血清を組合せて、中和若しくは“Absättigungsversuch”を行つたが、これらの反応は、補体結合反応と異り、更に術式、又は中和の判定要領に就いても、検討の要があるものと推測される結果を得たので、以下家兎免疫血清を用いてのみ実験した。

先づ中和試験に於いては、従来¹⁾の保存株である石原、小川株をもとに、新しい分離株である春名、丹原、古川、No. 7, 8 の諸株による交叉中和の形式をとつた。判定は病理学的変化におき、嚴重に对照と比較検討した。

実験の結果では、同種抗血清では、比較的病理学的変化の抑制と見られる部分が明瞭である。ウイルスと抗血清との接触時間を24時間迄延長して判定した結果でも、2時間の接触と左程の変化がないが、他種抗血清に於いては、ウイルス稀釈域に於いて($10^6 \sim 10^{-7}$) 可成りの程度の病変が、認められる事が多い。 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ のウイルス稀釈域は、感染

実験に於いて、病変の高度に示される部分として注目されていたが、中和試験に於いても、ウイルス性変化が尚残存する場合が多い。石原株を抗原とし、各ウイルス株抗血清と組合せた中和試験に於いて、石原株と該当血清との間の示す病変は可成りの抑制を示し、中和の進行が明らかに窺われる。他種の春名株、丹原株、小川株、古川株に就いて見るに、小川株が可成り病変の緩和が認められる程度であつて、他の諸株では、いづれも、ウイルス稀釈域 (10^{-2} , 10^{-6} , 10^{-7}) に於いて、可成りに病変の発現があつて、他の稀釈域では、病変の抑制と考えられる病理学的所見が著るしい軽減を示すことが明らかであつた。これらの現象が、どの様に解釈されるべきか、更に検討を要すると思料された (第19表)。

次に分離株である脊名株に就いて見るに、各種抗血清に対して、同種脊名株とも可成り中和が進行して病変の抑制があり、保存株である石原、小川株に対しても、同等に病変の抑制があることが注目され、丹原、No. 7, 8 株に於いて病変が可成り示されている（第20表）。

これらの成績を綜合して、中和試験に現われたこれらの現象が、ウイルス対抗体間の接触若しくは捕捉についての疑念とすべきか、それとも、かつて Wildführ G の述べた如き、免疫学的にも型別が存在するかも推測されるが、これは容易に結論出来ない。

次に Absättigungsversuch を試みた。

第19表 中和試験(1)

抗血清	精製ウイルス 接觸時間	抗原稀釈(石原株)							
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
石原株	2時間	±	⊥	⊥	⊥	⊥	+	+	+
	24時間	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	+	+	+
春名株	2時間	+	⊥	⊥	+	⊥	+	+	+
	24時間	⊥	+	+	+	⊥	⊥	±	+
小川株	2時間	±	±	±	⊥	±	+	+	+
丹原株	2時間	⊥	+	+	±	+	⊥	+	+
古川株	2時間	+	⊥	⊥	+	⊥	+	+	+
対照	2時間	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥

実験成績を見るに、ウイルス稀釈域を問わず、一様に病理学的変化の緩和若しくは抑制があるので、肝細胞の変性とか、壊死巣の形成は殆んど認められないが、依然細胞浸潤は可成りの程度に残っている場合が尠くない。病理変化は軽減しても、生体の反応としての病変はある以上、感染は勿論否定することは出来ない。

石原株を抗原とした場合に於いては、同種石原株抗血清に於いて、病変の抑制はあるが、他種血清に

第20表 中和試験(2)

抗血清	精製ウイルス 接觸時間	抗原稀釈(春名株)							
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
春名株	2時間	⊥	⊥	⊥	±	+	+	+	+
	24時間	⊥	⊥	⊥	⊥	+	+	+	+
石原株	2時間	⊥	+	+	⊥	+	⊥	+	+
	24時間	⊥	⊥	⊥	⊥	+	+	+	+
小川株	2時間	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	+	+	+
丹原株	2時間	±	±	⊥	⊥	⊥	⊥	+	+
No. 7.8	2時間	±	⊥	⊥	±	⊥	+	+	+
対照	2時間	⊥	⊥	+	⊥	⊥	⊥	⊥	+

於いては、殆んど病変の発現があつて、中和の進行は認められない(第21表)。

春名株を抗原とする各株抗血清に対する反応では、春名株抗血清には可成りの病変の阻止があつて、中和の進行が推測されたが、他種抗血清には、病理変化が可成りの程度に現われたことは、中和が起らなかったと解釈されるが、用いた抗血清は、表示したようにそれに相当の免疫抗体を有することから、ウイルスと抗体との接触が充分でないことが、斯る成

第21表 Absättigungsversuch (1)

抗血清	補体結合反応 抗原価	中和反応 の可否	抗原稀釈(石原株)							
			10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
石原株	1:128	可	⊥	⊥	⊥	⊥	+	+	+	+
春名株	1:64	一部中和	⊥	⊥	⊥	⊥	+	+	+	+
丹原株	1:64	一部中和	±	+	+	+	+	+	+	+
小川株	1:128	可	+	+	⊥	±	+	⊥	+	⊥
対照	—		⊥	⊥	⊥	+	⊥	⊥	⊥	⊥

第22表 Absättigungsversuch (2)

抗血清	精製ウイルス	補体結合反応 抗原価	中和反応 の可否	抗原稀釈(春名株)							
				10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
春名株		1:64	可	⊥	⊥	⊥	⊥	+	+	+	+
丹原株		1:64	部分中和	⊥	+	⊥	⊥	+	+	+	+
No. 7, 8株		1:64	〃	+	+	⊥	⊥	⊥	+	+	+
古川株		1:64	〃	+	+	⊥	⊥	⊥	+	+	+
石原株		1:64	〃	⊥	⊥	+	⊥	+	+	+	+
小川株		1:128	可	⊥	⊥	⊥	+	+	+	+	+
対照		—		⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥

績となつたものと解された(第23表)。

総括及び考按

流行性肝炎の特に病原体に関する可成り多くの研究報告がなされた。肝炎ウイルスの一般性状を把握していると解される研究の成績を比較して見るに、それぞれの研究者によりて、肝炎ウイルスの性状は、相等の差を有することが認められる。Maccallum は A, B, 型をウイルス学的性状によりて区別し、Wildführ G. は免疫学的に、型別が存在することを認めている。

ただこれらの報告に共通した性状は、一般に他の既知のウイルスと比較して、温熱、薬剤に対する抵抗性が、可成りの程度に強いことである。Havens (1944) の人体接種実験の報告以来それぞれの研究者が強く支持していることが注目されている。ただこれらの性状を判定する方法が、各研究者により、或いは人体接種実験により、臨床検査によりて推定し、或いは、分離ウイルスを、感受性動物に接種して、病理学的所見によりて判定しているので十分に比較検討出来ないうらみがある。

著者は、村上等の分離肝炎ウイルスをもとに、新に分離したウイルス株を、それぞれ同様な方法で精製純化を行い、ウイルス学的性状及び心血清学的研究を行つて、それぞれのウイルスの一般性状中、特に重要な性状と考えられている。耐熱、耐薬物性、紫外線照射等に就いて実験を行い、詳細に比較検討を重ねた。又血清学的研究に於いては、補体結合反応及び中和試験及び“Absättigungsversuch”等により、ウイルス各株の血清学性状を窺つた。その結果村上等の分離株と、著者の分離株は共に、同一の性状を具備し、しかも肝炎患者に由来するウイルスであると推測すべき所見を得た。

ただこれらの性状を窺うに、殆んどの実験の判定要領は、主としてマウスに対する病理学的所見に拠つているために、他の研究者の用いたウイルス株とも異り、判定方法も亦異なるために、先人研究者の用いたウイルスの一般性状とやや異なる点もあるが、可成りの一致を見ていることも指摘された。

又補体結合反応又は中和試験等に認められた。ウイルス株相互間の反応では多少の差異が認められたが、これは従来一部で唱えられている。同一ウイルス間にも型別が存在するか、それとも、肝炎ウイルスの特性として判断すべきか、容易に結論出来ない問題であると推測された。

結 論

村上等により、肝炎患者材料を用い、孵卵培養によりて分離されたウイルスをもとに、新に患者材料より分離したウイルスを使用して、ウイルス学的性状を検討した。その結果、次の結論を得た。

1) 実験に用いたウイルスは総て精製ウイルスを用いた。ウイルス学的性状として既に指摘された重要な性状について検討した結果、温熱に対する抵抗薬物に対する抵抗性は甚だ強く、本ウイルスの重要な特性と考えられた。

2) 紫外線照射に対しても、強く抵抗を示した。又エーテルに対しても、抵抗を有する。

3) マウスに対する経口感染が容易に成立し、精製した各ウイルス株の経口投与により、病理学的変化は著明に発現し、しかも、各株とも病変の性格は一致した。

4) 血清学的研究に於いては、精製ウイルスを抗原として用いるに、有意な抗原性を発揮し、家兔免疫血清に対しては、良く反応し、抗原価はそれぞれ 1 : 64 ~ 1 : 128 を示した。又肝炎患者恢復血清を用いた、補体結合反応に於いては、抗原価は低いが、確実に反応が示され、血清学的診断法としては有意な方法と判断された。

5) 中和及び“Absättigungsversuch”に就いて、もつとも問題となるのは、中和効果の判定であるが、実験に用いた病理学的変化の抑制により、中和反応を判定する場合は、同種血清には明らかな抑制が認められるが、他種血清には充分ではない。“Absättigungsversuch”に於いても、試験管内でウイルス抗体との接触が行われず、生体内で行われるためか、病理学的変化の緩和若しくは抑制は充分に認められなかつた。術式、判定方法に就いて、更に検討を要するものと思料された。

稿を終るに当たり、絶えず御懇篤なる御指導と御鞭撻を辱うし、且御校閲の労を賜わつた恩師村上栄教授に深甚の謝意を表する。

主 要 文 献

- 1) 村上等：第2回日本ウイルス学会肝炎シンポジウム, 1955.
- 2) 村上等：第3回日本ウイルス学会講演要旨, 1955.
- 3) 村上等・中四国細菌学会講演要旨, 1955.
- 4) 村上等・第4回日本ウイルス学会講演要旨, 1957.
- 5) 村上等：第5回日本ウイルス学会講演要旨, 1958.
- 6) Henle et al.: J. Exp. Med. 92, 271, 1950.
- 7) Henle et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 7, 603, 1950.
- 8) Wildführ, G.: Zeitschr. f. d. Gesa. inner. Med. 573, 1953.
- 9) 荒川等：日本ウイルス学会講演要旨, 1957.
- 10) 荒川等：第5回日本ウイルス学会講演要旨, 1958.
- 11) 小川等：日本病理学会雑誌, 第46巻, 458, 1957
- 12) 橋本：岡山医学会雑誌, 第70巻7号, 1958.
- 13) Havens: J. A. M. A. 129, 17, 1944.
- 14) MacCallum: Virus and Rickettsial Diseases 1955.
- 15) 鈴木：岡山医学会雑誌, 掲載予定.
- 16) Lichtmann: Diseases of the liver. Gall bladder and Bile Ducts P. 394, Philadelphia Lea & Febiger 1949.
- 17) 俵：岡山医学会雑誌, 第71巻, 第5の2号, 1958.
- 18) 大賀：岡山医学会雑誌, 第69巻第4号, 1957.
- 19) Willcox: Lancet (ii) 594, 1945.
- 20) Frasser: Canad. publ. Helth. 22, 396.
- 21) 石田：日本公衆衛生学会雑誌, Vol 3, No. 7, 1956.
- 22) Van Rooyen: Virus Disease of man P. 1164, 1948.
- 23) Neefe, J. R.: Stokes J. Jr. Baty. J. B. & Reinhold: J. Am. Med. Assn. 128, 1076, 1945.
- 24) Hallgren: Acta. Med. Scand. 1943.
- 25) Bernet: 動物ウイルス学 (東昇訳)
- 26) 時末：岡山医学会雑誌, 第69巻第4号, 1957.
- 27) 浅木：岡山医学会雑誌, 第71巻第5の2号, 1958.
- 28) Neefe, J. R., Gellis, Stokes J. Jr.: Am. J. Med. 1, 3, 22, 1946.

Studies on the Pathogene of Infectious Hepatitis

Part I Experimental Studies by the Newly Isolated
Virus from Hepatitis Patient

By

Akihisa SENGOKU

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

MURAKAMI and his collaborator had isolated the hepatitis virus from hepatitis patient and cultured in the chorio-allantoic cavity of chick embryo. The author newly isolated the hepatitis virus from the patient and studied on virological properties of the virus having obtained the purified virus. The following results were obtained.

1) In the treatment by heating or by disinfectant, the purified virus showed high resistance to these treatment, and these resistances were thought to be the featuring properties of the virus.

2) Also it was observed that the virus was highly resistant to irradiation of ultraviolet rays, and to action of ether.

3) The purified virus was highly infectious to mouse by peroral administration of it. The pathological changes were observed conspicuously, and moreover the changes induced

were just the identical in any case.

4) By the serological study, it was observed that the purified virus had an eminent antigenic capacity and reacted with the immune serum obtained by inoculation of the virus to rabbit giving the antigenic titier of 1:64—1:128. Also the virus showed distinctive reaction in the complement fixation test using the convalescent patient's serum from hepatitis; hence, this test might be highly valuable for the serological diagnosis of hepatitis despite of rather low titer than the above.

5) The most difficult problem was the identification of neutralizing effect in the neutralization test and "Absättigungsversuch". For this purpose the author adopted the mitigation of pathological changes caused by the neutralizing effect and observed the marked mitigation of the changes on the test using the virus and corresponding immune serum; but this evidence was not observed in the test of the virus and uncorresponding serum. The mitigation of the changes was not distinct in the "Absättigungsversuch" possibly by the occurrence of combination of the virus and its anti-body in the body of animal instead of in the test tube. It is to be expected the further study on the test procedure and the method of identifying the neutralization effect.
