616.36-002.1-02

岡山県下に発生した流行性肝炎特に病原体に関する研究

第 2 編

分離病毒の血清学的研究中和試験に就て

岡山大学医学部微生物学教室（主任：村上栄教授）

藤　原　清

〔昭和32年3月12日受稿〕

緒　言

岡山県下に発生した流行性肝炎の研究の一端として血清学的研究殊に補体結合反応に就ては，主として抗原を改良することにより，肝炎恢復患者に対して或る程度の抗体価を示し，而も特異的な抗原抗体反応であるとの見解を得るに至つたことは既に述べた[1)2)]．

流行性肝炎に就ては既に多数の先人により研究されたが，肝炎病毒分離の試みはなされたに拘らず，殆んど病毒分離は不成功に終つた感があり，その血清学的研究も行われるまでに至らなかつた．最近に行つて Henle et al. (1950)[3)4)] は組織培養及び孵化鶏卵羊水接種により肝炎病毒を分離し得たと述べたが，中和試験及び補体結合反応に於ては否定的見解に終つている．

Wildführ (1953)[5)] は広汎に肝炎患者よりの接種材料を得て，各種動物に接種してその病理学的所見によりて感染の成立を証明し累代もまた可能であると記載した．而も之等分離病毒は従来の既知病毒に比較して極めて慢性の経過を辿り易い特性を認め，その様相を明かにした．更に分離病毒株間には型別が存在する所謂抗原性の差がある事実を "Absättigungsversuch" によりて指摘している．

著者は分離した病毒を用い過去数回に亘り，中和試験及び Wildführ の述べた "Absättigungsversuch" を試み，屢々予報として報告した[1)]．

その後著者は病毒の一般性状が著しく特異的であること，若しくは Henle el al. の陰性結果を報じていることなどに鑑み，中和試験に於ける術式及び各因子に就て，種々改良を試み数回の失敗を経て，漸く所望の結果を得るまでに至つたので茲にその大要を報告する．

実験材料及び方法

供試病毒：　著者の用いた病毒は昭和27年肝炎発生と同時に病原体の分離に努力し，孵化鶏卵及びマウスの累代により得た病毒，金光，森本，石原，小川，野田，青森の6株であり，現在同様な累代のもとに保存されている．マウスに対して同様な性格の病理学的所見を惹起するに至るもので，殆んど抗原性も共通するものと推測されている[2)6)]．

免疫血清：　分離病毒免疫血清を得るには同病毒感染マウス肝臓の10%粗乳剤をその儘家兎の皮下に 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ml, 続いて腹腔内に 1.0, 1.0, 1.0, 1.5, 2.0 ml と10日間連日3頭宛に病毒を接種し，最後の注射より2週間後に採血して翌日血清を分離した後氷室に保存して用いた．マウス血清を得るには各病毒を夫々150匹宛3日間隔5回 (10^{-2} 稀釈 0.2, 0.25, 0.3, 0.3, 0.3 ml) 反復腹腔内に接種して最後の注射より2週間後採血し血清を分離した．氷室に保存した後実験に供した．

中和試験：　各病毒稀釈液に等量の免疫血清を添加し 37° C 孵卵器内に2時間放置す

る場合と，氷室に 2, 24, 48, 72時間とそれぞれに各条件の下に処置したものを比較しながら，中和試験は 0.25 ml 宛腹腔内に接種後14日後に於て屠殺臓器を採取し病理標本を作製した．而して中和能の判読は病理学的所見に拠つた．使用した病毒によりマウスの感染はあつても発症致死が見られぬので前述の方法によつた．

"Absättigungsversuch"(飽和試験)Wildführ の原法に倣つたが，gold-hamster の入手困難なること及び Wildführ の分離病毒と性状を甚だ異にする点等から，やむなくその方法を変更した．即ち著者は病毒に対して感受性の強いマウスを供試し，前記免疫血清を 0.25 ml 宛 2 回皮下接種し 4 時間後に於て各病毒の稀釈液を腹腔内 0.25 ml 宛接種して攻撃し，14日後の各臓器を採取しその病理所見により中和能を確めた．

実 験 成 績

1) 中和試験： 著者の用いた分離病毒はマウスに対して強い感受性を有するものであり，而も不顕性感染が成立し累代もまた可能なる事実は先の実験により証明したが，その判定はマウスの発症致死が認められないために，病理学的所見によつた．

本研究に於ける中和試験及び "Absättigungsversuch に於ける場合にも肝臓を中心とする病理学的所見を重視して，厳密に対照群と比較した上で中和現象を判読した．

既に分離病毒が肝炎恢復患者血清に対して特異な補体結合反応を発現する事実は第 1 編に記載した．中和試験では先に記載した病理所見により判定せざるを得ない制約があり，既知の一般病毒に於ける程の明瞭な免疫力価の測定が困難であるために，中和試験に於ける中和効果を適切に評価し難い憾がはあるが，補体結合反応及び "Absättigungsversuch" の成績と略々平行した傾向を示している事実は注目に価する．即ち補体結合反応で抗体価の発現した片山，三宅血清では夫々に病理所見は乏しく中和の進行を意味し，船越血清の場合は明瞭に病理所見は対照群と同程等若くはそれ以上までも発揮されている．之の傾向は先の感染実験に於ける場合と比較するに，病毒の稀釈された程病理所見は明瞭に，しかも高度となる傾向が強い事実を指摘して著者は分離病毒の特徴をなす性状と記載したが，この中和試験では稀釈が進むにつれ，中和が促進される傾向を呈している(第 1 表)．この傾向はマウス免疫血清の場合に於ても，他の患者血清と比較し，より適確に示されている(第 2 表)．泉熱患者血清に対しても同様の中和試験を行つたが，中和の進行は聊かも認められない(第 3 表)．

第 1 表 中 和 試 験

恢復患者血清	経日(週)	補体結合反応抗体価	ウイルス稀釈 10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
1 船越	31	1.0	++	++	++	++	++	++	++	++
2 片山	35	1:16	++	++	+	+	+	+	±	±
3 三宅	13	1:32	+	++	+	+	+	±	±	±
4 対照血清 No. 1	−	−	++	++	++	++	++	++	+++	+++
5 対照血清 No. 2	−	−	+++	++	++	++	++	++	++	+++

註. i) 供試病毒：石原株
ii) 病毒と血清混和後 2 時間孵卵器保存接種

もとより斯る方法による中和試験の術式が妥当であるか否かは問題であるが，少くとも病理所見に於ては慎重に対照群と比較して有為の差が認められた．病理所見の判定は感染実験に於ける如くマウス肝臓に於ける肝細胞

第 2 表　中　和　試　験　(患者血清)

恢復患者血清	経日(週)	補体結合反応抗体価	飽和試験中和の可否	ウイルス稀釈 10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
1 船越	32	1：0	否	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺
2 片山	35	1：16	可能	⧺	+	+	⧺	+	+	+	+
3 三宅	15	1：16	可能	⧺	⧺	⧺	⧺	+	+	+	+
4 谷合	7	1：4	否	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺
マウス免疫血清	6	1：64	可能	+	+	+	+	+	+	+	+
健康血清 No. 1	—	—	—	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺

註. i) 供試病毒：石原株
ii) 病毒と血清混和2時間孵竈保存接種

第 3 表　中　和　試　験　(患者血清)

恢復患者血清	経日(週)	補体結合反応抗体価	ウイルス稀釈 10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
1 窪田	30	1：64	+	+	⧺	⊥	+	⊥	⊥	⊥
2 小引(泉熱)	10	1：0	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺
3 矢部(泉熱)	9	1：0	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺
4 望月	18	1：0	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺
5 対照血清			⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺

註. i) 供試病毒：石原株
ii) 病毒と血清と混和後2時間孵竈保存接種

障碍と細胞浸潤及び之に伴う肺，腎，脾臓の所見も参考にした．中和現象の見られる場合は殊に肝臓に於ける肝細胞障碍は軽度となり，細胞浸潤の度も散見される程度となるが，再三の実験で確め得た之等の細胞浸潤は一部に於て生体反応の一表現ともなり得ることがあるので，この中和実験では厳密に採点して病毒の影響と評価した場合が少くない．なお肺臓に於ける病毒の示す病変も，胞隔炎及び細胞浸潤等の病理所見も影響を受ける場合があるので併せて綜合判定する様にした．

以上の中和試験の結果でも明かなる如く，示す中和現象も明瞭に表示し難い場合も少くなく納得し難い所見を得る場合も少くない．之等の場合に就て患者血清に於ける状態を調べるに，既に肝炎患者と診定されるに至つた根拠は臨床所見によつたものであり，類似黄疸等他の疾患の混入も考えられるのであり，而も採血時も甚だ明瞭を欠ぐものが認められ，肝炎罹患の様態も明かでない等の事実がある．それと同時に中和試験の術式にも検討すべき事項もあると思われる．

次に家兎免疫血清による詳細な交叉中和試験を行い，更に慎重に検討を試みた．その結果では分離病毒夫々の家兎免疫血清を用いた中和試験では，同種若しくは異種血清でも遜色ない程度までに中和の進行が認められている．之の場合の中和試験の術式では病毒と免疫血清を混和し孵竈内に保つた後氷室に保存2時間後混合液を接種する方法を採用した．その結果感染阻止の状態が病毒の稀釈の高い部分では明かに認められるが，病毒の濃度の濃い部では感染力は残存している事実が窺われるのである(第4表)．

第 4 表 交 叉 中 和 試 験 (家兎血清)

家兎免疫血清	血清の処置	ウイルス稀釈							
		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
1 免疫血清 (石原株) No. 1	非仂化を行わず	+	+	+	+	+	⊥	⊥	⊥
2 免疫血清 (森本株) No. 2		++	++	++	+	+	+	+	+
3 免疫血清 (金光株) No. 3		++	++	+	+	+	⊥	+	+
4 健康血清 No. 1, 2	〃	++	++	++	+++	++	+++	+++	+++

註. i) 供試病毒：石原株
ii) 病毒と血清混和後2時間孵竈保存接種

もし病毒と抗体との接触時間を延長した場合は中和の進行も見られるのではないかとの疑問があるので，接触時間を漸次延長して中和の進行を図つた．接触時間を長く保つ必要から病毒と免疫血清を氷室中に24，48時間と放置した場合に於て同様マウス体内に接種した時は24時間放置の場合中和現象の明瞭なる進行が認められた．この際の対照群に於ける病理所見は高度に出現し極めて判定し易い傾向が認められた．更に48時間後に於ては，対照群の示す病変が漸次減退する如き所見を得た(第5，第6表)．

同様な実験を更に野田株に変えた成績でも略々相似た中和が進行するのを認めた．この場合に於ては病毒と免疫血清との混合液を接種後21日後のマウス臓器の所見を見た．分離病毒が極めて慢性の経過を辿り易い性状を有するための顧慮からである．之等の成績でも多少とも差異はあるが，前回の石原株の場合と同様な傾向を示し，24時間の接触時間をおいた場合，中和の判定が容易であり，対照群との差が判然とする結果を得ている．この中和試験から従来試みられた免疫力価の測定ほどに明瞭に表示出来ない憾はあるが，中和反応にも可能なる限界があることを知り得た(第7，第8，第9表)．

第 5 表 交 叉 中 和 試 験

家兎免疫血清	血清の処置	ウイルス稀釈							
		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
1 免疫血清 (石原株) No. 1	非仂化行わず	+	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
2 免疫血清 (森本株) No. 2		+	++	+	⊥	+	+	⊥	⊥
3 免疫血清 (金光株) No. 3		++	+	+	⊥	+	⊥	⊥	⊥
4 健康血清 No. 1	非仂化行わず	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
5 健康血清 No. 2		++	++	++	++	++	+++	+++	+++

註. i) 供試病毒：石原株
ii) 病毒と血清混和24時間氷室保存接種

第 6 表　交　叉　中　和　試　験

家兎免疫血清	血清の処置	ウイルス稀釈 10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
1 免疫血清（石原株）No. 1	非仂化行わず	+	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
2 免疫血清（森本株）No. 2	非仂化行わず	+	+	+	⊥	+	+	+	+
3 免疫血清（金光株）No. 3	非仂化行わず	+	++	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥
4 対照血清（No. 1）	非仂化行わず	+++	++	++	++	++	++	+++	+++
5 対照血清（No. 2）	非仂化行わず	+++	++	+++	++	++	++	++	++

註．i）供試病毒：石原株
　　ii）病毒と血清との混和後48時間氷室保存接種

第 7 表　交　叉　中　和　試　験

家兎免疫血清	血清の処置	ウイルス稀釈 10^{-2}	、10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
1 免疫血清（石原株）No. 1	非仂化行わず	+	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
2 免疫血清（石原株）No. 2	非仂化行わず	++	++	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥
1 対照血清	非仂化行わず	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 対照血清	非仂化行わず	++	++	++	++	++	+++	+++	+++

註．i）供試病毒：野田株
　　ii）病毒と血清2時間混和後氷室保存接種

第 8 表　交　叉　中　和　試　験

家兎免疫血清	血清の処置	ウイルス稀釈 10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
1 免疫血清 No. 1	非仂化行わず	++	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
2 免疫血清 No. 2	非仂化行わず	++	+	++	+	⊥	⊥	⊥	⊥
3 対照血清 No. 1	非仂化行わず	++	++	++	++	++	+++	++	++
4 対照血清 No. 2	非仂化行わず	++	++	++	++	++	+++	+++	+++
5 対照血清 No. 3	非仂化行わず	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++

註．i）供試病毒．野田株
　　ii）病毒と血清との混和24時間氷室保存接種

第 9 表 交 叉 中 和 試 験

家兎免疫血清	血清の処置	ウイルス稀釈 10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9
1 免疫血清(石原株) No. 1	非仂化を行わず	+	+	±	±	±	±	±	±
2 免疫血清(石原株) No. 2		++	+	+	±	±	±	±	±
1 対照血清	〃	++	++	+	+	++	++	++	++
2 対照血清		++	++	+	++	++	++	+	++

註. i) 供試病毒：野田株
ii) 病毒と血清と混和後48時間氷室保存接種

2) Absättigungsversuch: Wildführ の原法に倣つた．而しながら前述の如く gold hamster の入手困難なことと，病毒の性状が異るためその儘の術式を踏襲し得ない理由があつた．

Wildführ の分離病毒は慢性経過後に於て動物が死亡する事実があり，中和能の判定に当り動物の生死を以て判定する訳であるが，著者の場合では発症致死が非常に少いため，前述の中和試験の術式及び判読を試みる必要がある．

本試験に於ても術式は多少とも異るが，結局中和現象を以て確めるのであるが，その術式に於て異り，管内に於て病毒と免疫血清と接触を行わず，生体内に予め免疫血清が接種され，後に病毒による攻撃が行われる訳である．それ故に免疫血清若くは患者血清中に病毒を中和する抗体が存在する場合は中和が行われ，感染は阻止される理である．之の際の注射された血清の吸収による飽和の状態と攻撃病毒量との相互関係に従つて強弱その程度を異にする中和が認められると想像される．

要するにこの試験に於ても病理所見によるのであつて先の中和試験の際の如く，明瞭な区劃は不可能であり，微妙な推測により結論を得るより策はないと思われる．是等の欠点が挙げられるがマウスを用いて一応中和能の検討を行つた．

その実験成績を見ると，先述した補体結合反応及び中和試験の判定を常に参考にしたが，同血清に対しての病理所見は大体同等の傾向を発揮し中和の促進が認められたが，中和試験の如く階段的に病毒が稀釈されていないために，判定に苦しむ場合が少くない．しかしながら免疫血清の如き比較的抗体価の高いと推測されるものにあつては比較的判定も容易な様である．本試験は更に例数を増加して検討した結果でなければ評価することは出来ないものと思われた(第10，第11表)．

第 10 表 Absättigungsversuch (1)

恢復患者血清	経日(週)	補体結合反応 抗体価	中和試験 中和の可否	判定 病理学的所見		
1 船越	31	1：0	否	+++	+++	++
2 片山	35	1：16	可能	++	±	±
3 三宅	13	1：32	可能	+	+	±
4 対照血清 No. 1, 2	—	—	—	+++	+++	++

註. i) 供試病毒：石原株

第 11 表　Absättigungsversuch (2)

恢復患者血清	経日(週)	補体結合反応抗体価	中和試験中和の可否	判定 病理学的所見		
1 船越	31	1．0	否	⧺	⧺	⧺
2 片山	35	1：16	可能	⊥	+	+
3 三宅	13	1：32	可能	⊥	⊥	+
4 谷合	5	1．0	否	⧺	⧺	⧺
5 マウス免疫血清	6	1：64	可能	⊥	⊥	+
6 健康血清 No. 1	—	—	—	⧺	⧺	⧺

註．i) 供試病毒：野田株

この所見を具体的に知る意味から家兎免疫血清を用いて行つた実験の結果では，比較的中和現象も促進されていて，判定し易い場合が認められた(第12表)．

第 12 表　Absättigungsversuch (3)

家兎免疫血清	経日(週)	補体結合反応抗体価	中和試験中和の可否	判定 病理学的所見		
1 免疫血清 No. 1 (石原株)	—	—	可	+	⊥	+
2 免疫血清 No. 2	—	—	可	+	+	⊥
3 免疫血清 No. 3	—	—	可	⊥	⊥	+
4 マウス免疫血清	6	1：32	可	⊥	⊥	+
5 健康血清	—	—	—	⧺	⧺	⧺

註．i) 供試病毒：野田株

総括及び考按

ウイルスの血清学的研究は病毒の分離後病毒の固定と共に診断の決め手としての血清学的診断法の確立にあつた．而も之等の診断法は補体結合反応及び中和試験等が用いられる事は周知の事実である．

流行性肝炎に於ける血清学的研究は評価されるものとしてはただ Wildführ の "Absättigungsversuch" による型別試験の行われた以外，確認された報告もなく，従つて血清学的診断法の確立は途遠しの感がある．

著者は第1編に於て分離病毒による肝炎恢復患者及び免疫血清に対する補体結合反応を実施したが，それと平行して本編では中和試験及び "Absättigungsversuch" を行つた．前者に於ては肝炎の中和試験は未だ行われていないので，新らしく中和試験の術式と判定を試みた．即ち分離病毒の特性に鑑み，動物の病理所見により判定する方法を採用し，諸種の条件に就て考慮を払つた．之等の実験から著者の採用した方法にも，使用し得る術式と，目的によりかなりの制約がある事実を知り得たが，ともかく中和試験として一応の所望す

る結果を得たと思われる.

肝炎恢復患者血清に対して行つた中和試験ではなお納得し難い点も少くない. 従来の肝炎の診定があくまで臨床所見によりて行われたために, 厳密に肝炎と断定出来ぬ他種の疾患も存在したかも知れない. 又たとえ肝炎に罹患したものでも感染の軽重, 感染の経過等諸種の場合が推定され, それに伴う免疫抗体の増減も予測されるものであるから, 一様に断言し得ないものがある.

反之して家兎免疫血清の場合は免疫力価の確実な定量的証明は不能であつても, 相等度の力価は保有するものとの推測は中和試験に拠つて証明し得た. なおこの実験では分離病毒間の抗原性が共通する事実を明かにすることが出来た.

"Absättigungsversuch" は中和試験と比較し病毒と免疫血清との混合液を試験管内で放置後生体内で中和現象を観察する点に特長があるが, 一種の中和試験に外ならないと思われる. この術式と判定方法を Wildführ は肝炎病毒間の型別試験に用いて効果を挙げたが, 著者は之等の実験の追試はその儘では実施出来なかつたために, 批判する事は出来ないが, 同様な実験を行つた経験から供試血清の免疫力価が高い場合に於てはかなりの効果を挙げ得るものではないかと推測される結果を得た.

結 論

岡山県下に発生した流行性肝炎患者より分離した病毒を用い, 著者は血清学的研究特に中和試験及び "Absättigungsversuch" を行い, 分離病毒が肝炎患者に由来するものであることを血清学的に推定し得る成績を得た. 而も之等の病毒間に抗原性の差は存在しないことと, これ等の病毒を用いて行う中和試験が肝炎診断上ある程度の診断的意義を有することを明にした. 之等の中和試験及び "Absättigungsversuch" の術式が最適のものと信ずるのではないが, 前述の補体結合反応と共に併用することにより, 肝炎の血清学的診断が可能であると信じられるのである.

稿を終るに臨み, 御指導と御鞭撻を戴きなお御校閲を賜つた恩師村上教授に深甚の謝意を表する.

主 要 文 献

1) 村上等 第2回ウイルス学会肝炎シンポジアム 1955.
2) 村上, 俵, 藤原, 石田, 吉岡: 第3回日本ウイルス学会講演要旨, 1955.
3) Henle et al.: J. Exp. Med. 92, 271, 1950.
4) Henle et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 73, 603, 1950.
5) Wildführ: Zeitschr. f. d. Ges. innere, Med. 573, 1953.
6) 村上等 中, 四国細菌学会報告要旨, 1955.
7) Havens: Viral and Rickettsial of man, 1951.

Studies on the Infectious Hepatitis in Okayama Prefecture, Particularly on its Serological Reactions

II: Studies on the neutralization test

By

Kiyoshi Fujiwara

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

In the preceding paper the author reported that the complement fixation test, by improvement of antigen, could be of some use for the serological diagnosis of hepatitis. In addition to this, the author tried the neutralization test and the "Absättigungsversuch" (Wildführ) with the critique of procedures and of criteria for the judgment of results. As the criteria for the judgment of results, the pathological features of animal liver were used. The results were as follows:

1) Using the sera of convalescents, the neutralization test gave appreciable results, though not acceptable as complete.

2) By the combinative use of neutralization test and modified "Absättigungsversuch", however, it was proved that the isolated virus certainly came from the hepatitis patients and no difference was present among the strains of virus. It was approved that these neutralization test and "Absättigungsversuch" were of some diagnostic significance in the combination with complement fixation test.