泉熱の病原体に関する研究

第 4 報

分離ウイルスの性状

前 田 道 明 小 沢 芳 治

国立予防衛生研究所リケッチアウィルス部

〔受付： 6 月 3 日 1954 年〕

さきに我々は第2報に於て各種実験動物の分離ウイルスに対する感受性について検討し、マウスが最も感受性の高いことを報告し、次いで第3報に於てマウスの脳及び脊髄に於いてこれが特異的な病理組織学的所見を呈することを報告したが、こゝには本ウイルスのその他の性状について報告する。

毒 力

マウスの脳内接種法によつて分離ウイルスの毒力を検討してみると、分離後10代以上脳内接種法によつて継代したウイルスでは、その LD_{50} は $10^{-7.5} \sim 10^{-9.0}$ であった。これを季節的にみると、一般に夏期では冬期に比べてその毒力がやや低下している傾向が認められた。

濾過実験

分離ウイルス13株をそれぞれ脳内に接種したマウスの10%脳乳剤の遠心上清を用いて、Berkefeld W 及び Gradocol 膜（平均孔径 $0.62 \sim 0.49 \mu$ のもの）の濾過実験を行つた結果、いずれの材料もすべてこれらの濾過器を通過し、それらの濾液は脳内接種によつてマウスを発症斃死せることが出来た。即ちこれらの分離ウイルス13株はいずれも一種のウィルスであることを証明し得た。なおまた平均孔径 0.28μ の Gradocol 膜をも通過することを認めたので、更に限外濾過実験も行つたが、その成績についてはウイルスの大きさの項で報告する。

温度のウイルスに対する影響

分離ウイルスに罹患したマウスの脳を採り、そのまゝ50%グリセリン加食塩水中に浸して、 $0 \pm 4^\circ C$ の氷室中に保存すると、約18ヵ月後に於てもなお相当度の毒力を保有していた。即ち本ウイルスの保存は比較的容易であることを認めた。

次に泉熱が最も多発する4月下旬から5月にかけて、本ウイルスの稀釈液を室温（ $18 \sim 26^\circ C$ ）に放置した場合の毒

力の変化を検べた。即ち、マウスの脳内接種法で検べて LD_{50} が $10^{-8.9}$ である ASK₁ 株罹患マウス脳乳剤を、生理食塩水（pH 7.0）で 10^{-1} , 10^{-2} , $10^{-3} \dots$, 10^{-9} の9種に稀釈し、これらを室温に放置して、一定の期日毎に3週目までそれぞれの試験管中のウイルスの存否を、マウスの脳内接種法によつて検べた。その成績は図1の通りである。即ち、その LD_{50} は $10^{-8.9}$ のものが1週目には $10^{-5.0}$ と急激に低下し、2週目には $10^{-3.5}$ となり3週目では $10^{-3.3}$ となつて、徐々に低下しつゝあるこ

図 1 ASK₁ 株病室室温保存による毒力の変動

MAEDA, Michiaki & OZAWA Yoshizi: Studies on the causative agent of "Izumi" fever. IV. Other characters of the isolated virus. National Institute of Health, Japan — Jap. J. of Bact., 10 (1), 1—4, 1955.

とを示していた。即ち 10^{-8} 稀釈のウイルス液は3週目でもなお相当度の毒力を保持していた。この成績から、泉熱の多発する4~5月の自然状態のまゝでは本ウイルスの稀釈液は相当長期間毒力を保持し得るものと考えられる。

凍結乾燥ウイルスの保存性

我々の分離ウイルス罹患 マウス脳を50%グリセリン 加生理食塩水中に浸して氷室中に保存すると、約18ヵ月間は確実に病原性を保有していることを認めたので、更に凍結乾燥ウイルスについてその保存性を試験した。

まず分離ウイルスを脳内接種法で罹患させたマウスの死亡直前の脳を採り、Bouillon で20%乳剤を作り、この乳剤を内容約1ccのアンプルに0.3ccずつ分注し、ドライ・アイスとアセトンとで急速に凍結した後、凍結乾燥装置に連結し、油拡散ポンプで 10^{-4} Hg 程度の陰圧下に五酸化リンの吸湿下で乾燥し、乾燥後直ちに密封した。凍結乾燥ウイルスは直ちに $5\sim 8^{\circ}\text{C}$ の氷室内に保存し、乾燥後119日目及び491日目に取り出して試験に供した。なお乾燥終了のアンプルは乾燥直後にその真空度をテスター・コイルで検査し、またアンプル中のウイルスの活性なることも検査した。

試験時には各分離ウイルス株毎に2つつのアンプルを開封し、それぞれに0.3ccの滅菌蒸留水を加えて原量の浮游液とし、各ウイルス株毎に2本のアンプル内容を混和した後3000 rpm 15分間遠心した上清について、マウスの脳内接種法によつてウイルスの存否を検査した。

試験の結果、表1の如く、供試ウイルス株は4株共すべてウイルスが証明され、その発症までの日数及びマウスの示す症状などは、乾燥後119日目及び491日目のいずれに於ても乾燥前と大差は認められず、完全にウイルスが保存されていたことを認め得た。

第1表 凍結乾燥ウイルスのマウス接種試験成績

分離ウイルス株	凍結乾燥前	119日目開封	491日目開封
ASK ₁	3 4 4 5 6	5 5 5 6 6	6 6 7 7 7
ASK ₂	3 3 3 3 4	3 5 5 6 6	6 6 6 7 7
ASK ₃	4 4 5 5 6	4 4 5 6 9	4 5 5 6 7
ASK ₉	3 3 5 5 7	7 7 9 9 10	4 8 8 8 9

註：数字はマウス死亡までの日数

分離ウイルスの大きさ及び形状

我々は分離ウイルスの大きさを検べるために、電子顕微鏡像の撮影及び限外濾過実験を行つた。

ウイルスの精製：一超遠心器による分画遠心によつて精製を行つた。その実施法は表2の通りである。

表2 ウイルスの精製法

即ち、Hartley の Bouillon を用いて、分離ウイルス株罹患マウス脳の10%乳剤を作り、この遠心上清をまず砂バルブ層で濾過し、その濾液を空気駆動式の超遠心器を用いて分画遠心を行つた。即ち、容量約3ccの合成樹脂製の遠沈管に試料を容れ、20,000 rpm (最大遠心重力29.100 g), 20分間遠心し、更にその上清を30,000 rpm (最大遠心重力65.600 g), 60分間遠心すると、ゲラチン状の Pellets が管底に少量認められるから、上清を注射器で静かに吸い出し、なお管底に残っている溶液を遠沈管を傾けて除き、Pellets を1/100 M, pH 7.6 の磷酸緩衝液加食塩水に再浮遊して原量に戻した。これを低速遠心した後、その上清を再び30,000 rpm, 60分間遠心した後、この得られた Pellets を蒸留水を加えて原量の1/3容に濃縮した後、5,000 rpm, 10分間遠心すると、微蛋白様の透明な溶液が得られた。この上清を精製液として検査に用いたのである。

以上の精製過程に於て、ウイルスの移行状態をみるために超遠心を行う毎に、その上澄及び沈渣の LD_{50} をマウスの脳内接種法によつて測定した。その結果、表3の如く最初 $10^{-8.0}$ の LD_{50} を有した乳剤は砂バルブ層の濾過

ではその毒力を減弱せず, 第1回の超遠心によつてその上澄に $10^{-1.8}$ のウイルスが残存し, 第2回の超遠心によつても上澄に $10^{-4.3}$ のウイルスが残つた。即ち 30,000 rpm, 60 分間遠心した上澄にもかなりのウイルスが含まれていることから, 本ウイルスは小型のウイルスであろうと推定された。

なお同様の方法によつて本ウイルスの精製を再度実施したが, ほゞ上述と同様の成績が得られた。

電子顕微鏡像: 一以上の方法によつて精製された最終液 ($LD_{50}=10^{-6.3}$) の数滴を採つて, コロジウム膜上で乾燥し, クロームを用いて Shadowing ($\tan\theta \approx 1/5$) を行い, 日本電子光学製 (JEM-III 型) の電子顕微鏡を用いて写真を撮影した。その結果, 図2, 3のように, 大小不同の球形の粒子が多数認められた。この粒子の直径は第1実験 (図2) では $34.6 \pm 4.5 \mu$ ($25 \sim 47 \mu$) となり, 第2実験 (図3) では $34.9 \pm 5.6 \mu$ ($23 \sim 49 \mu$) となつて, ほゞ同一の成績を示した。従つて本ウイルスは直径 $20 \sim 50 \mu$ の大きさの粒子中に含まれているものと考えられる。

図2 分離ウイルスの電子顕微鏡像 (37500 倍)

図3 分離ウイルスの電子顕微鏡像 (35000 倍)

限外濾過実験: 一上述の方法によつて精製された最終液を用いて, 矢追の法に従つて限外濾過実験を行い, その濾液をマウスの脳内に接種して, その発症斃死の状況をみた結果, 平均口径 98μ の Gradocol 膜は通過するが, 42μ のものは通過しないことが解つた。

そこで分離ウイルス ASK₁ 株罹患マウスの 10% 脳乳剤をまず数回凍結融解し, その遠心上清を砂パルプ層で濾過した後, 平均口径 530μ の Gradocol 膜で濾過したものを, 更に表2の如く, 口径 318, 123, 98, 42μ の Gradocol 膜に順次通過させてみた。そしてこれらの各濾液をマウスの脳内に接種した結果, 98μ 通過のものでは発症を認めたが, 42μ 通過のものでは発症を認めなかつた。

第2表 限外濾過実験成績

Gradocol 膜 平均口径	脳内接種法によるマウスの罹患状況							
濾 過 前	● 3	● 4	● 4	● 5	● 6	● 6	● 7	● 8
318 μ	● 3	● 4	● 5	● 5	● 6	● 7	● 8	● 9
123 "	● 4	● 5	● 5	● 5	● 6	● 6	● 8	● 9
98 "	● 4	● 5	● 6	● 6	● 7	● 8	● 8	● 9
42 "	○ 4	○	○	○	○	○	○	○

● 5 病毒接種後5日目に発症斃死したもの

○ 4 病毒接種後4日目に不明死したもの

以上2回の実験の結果同一の成績を得ることが出来た。しかし平均口径 98μ と 42μ との間の大きさの Gradocol 膜がなかつたので, その濾過最終口径は求め得なかつた。従つて本ウイルスの大きさは 21μ と 49μ との間であろうと推定された。

分離ウイルスの大きさに関する以上の実験成績では, 電子顕微鏡像による測定値と限外濾過法によるそれとの間には同一の値が得られた。一般にはこの両方法による測定値間にずれが認められるが, この点については更に詳細に検討を加えてみる必要があると考える。

他の種々なウイルスとの差異

我々は本ウイルスの分離過程においてマウスを用いているために, 所謂マウスに存在するウイルスの迷入が最も問題となる。しかし我々が分離したウイルス中2株は, 孵化鶏卵内培養を2~4代行つた後マウスの脳内に接種すると, 初

代からすべてのマウスに於て発症斃死が起るのを認め得たし(第1報 図2参照), また同一分離方法によつて昭和24年以来毎年いずれの流行例に於ても血清学的並びに病理組織学的に同一性状のウイルスが分離され、泉熱患者材料からは本ウイルス以外のウイルスは分離されなかつたこと、また同時に行つた泉熱以外の疾患患者の材料からはウイルスを証明していないこと、また更に実験室を数カ所かえて或は術者をかえてウイルス分離を試みても同一の成績が得られたことなどの諸点から考えて、我々の分離ウイルスが使用した雑系マウスに存在するウイルスの迷入とか或はその他実験途中での迷入であるとは速断し得ないと思う。

次に、血清学的に中和試験法によつて、日本脳炎ウイルス中山株、Lansing 株ウイルス、デング熱ウイルスとの関係を検べたが、いずれとも全く関係のないことを認めた。また試験動物の感受性及び罹患動物の症状、或は第3報に述べた如きな特異的な病理組織学的所見などからみても、狂犬病ウイルス、日本脳炎ウイルス、デング熱ウイルス、Lansing 株ウイルス、Theiler 株ウイルス、Choriomeningitis ウイルスなどとも異なるものと考えられる。

小 括

我々の分離ウイルスは、動物に対する感受性に於ても、ま

た病理組織学的所見からみても、マウスに於て最も特異的な変化を認めることは、さきに第2、3報で報告したが、その他の性状としては次のことを認めた。

- 1) 本ウイルスのマウスに対する毒力は LD_{50} が $10^{-7.5} \sim 10^{-9.0}$ である。
- 2) 本ウイルスは Berkefeld W を通過する。即ち我々が分離したものは一種のウイルスである。
- 3) 本ウイルスは室温に於ても比較的長期間生存し得る。
- 4) 本ウイルスの大きさは、電子顕微鏡像及び限外濾過実験の成績からみて、直径 $20 \sim 50 m\mu$ の粒子である。
- 5) 本ウイルスは、血清学的検査成績、動物に対する感受性及び罹患動物の症状、或は病理組織学的所見からみて我々の経験したことのない新しいウイルスであると考えられる。

(本研究に当り、超遠心器について御援助下さつた日立製作中央研究所須藤卓郎氏及び後藤保夫氏に対し、また電子顕微鏡写真撮影に御協力下さつた日本電子光学研究所伊藤二男氏及び家畜衛生試験場片田真彌氏に対して厚く感謝する。また限外濾過装置について御協力下さつた伝染病研究所兼子千秋氏に深謝する。)