流行性肝炎に関する実験的研究

第1報 マウス及び孵化鶏卵への病毒分離

村 岡 恒 彦

東京大学伝染病研究所痘瘡特別研究室 (主任 荒川清二博士)

[受付: 12月28日・1957年]

緒 言

流行性肝炎の病原体として, Andersen 及び Tulinius¹⁾, Findlay Mac Callum 及び Murgatroid²⁾ 其他によりウイルスが擬せられていたが, 1941年弘³⁾ が患者血液の濾液を小児咽頭に塗布し黄疸発生に成功して以来, Voegt⁴⁾ (1942) は十二指腸液, 尿, 血液により, Cameron⁵⁾ (1943) は血液, 血清により, Oliphant⁶⁾ (1944) は血清により, 更に Mac Callum 及び Bradley⁷⁾ (1944) は糞便により, 経口或いは非経口的に人体接種実験に成功し, ウイルス説が確認せられた。本病毒の実験動物えの分離は, 以来, 多数の研究者が試みているが, 未だ追試確認されたものはない。即ち 1938年 Andersen 及び Tulinius が十二指腸液, 血液を経口或いは非経口的に豚に接種して肝障害を発生せしめて以来, Dressel, Medding 及び Weineck⁸⁾ (1943) は十二指腸液, 尿, 血液を用いてカナリアや筋肉内及び孵化鶏卵漿尿膜接種で陽性成績を得, Mac Callum 及び Miles⁹⁾ (1946) は血液糞便を用い, 蛋白欠乏食飼育ラッテ 3代通過以後, 肝に病理組織学的変化を証明したといい, Henle¹⁰⁾ (1950) は家兎肝及び鶏胎児組織培養を行い, 更に孵化鶏卵培養を通過継代後, 人体に無黄疸性肝を証明したと言う。又北岡¹¹⁾ (1946) は血液其他を用いてマウスに経鼻感染を行い肺炎を発生せしめ, 更に其の肺乳剤濾液を以て人体を発病せしめたとし, 操及び山田¹²⁾ (1944) は血液を用いてマウス経鼻感染により肺炎を見, 坂本¹³⁾ (1946) は血液其他によりラッテ腹腔内接種後血液像及び組織学的変化を認め, 木村及び堀田¹⁴⁾ (1949), 金丸等¹⁵⁾ (1952) は血液, 血清によりマウス脳内及び腹腔内接種で肝の組織学的変化を認め, 又肝乳剤による人体の発病を報じている。原¹⁶⁾ (1952) は肝材料をマウス腹腔内に接種継代し, 肝の組織学的変化を認め, 又最近村上等¹⁷⁾ は血清其他を用いて孵化鶏卵培養及びマウス腹腔内接種及び継代

を行つている。其他武内¹⁸⁾ (1954), 山本¹⁹⁾ (1953), 木村¹⁹⁾ (1954), 谷口²⁰⁾ (1953) 等多数の研究が報告されている。我が研究室においては荒川及び多ヶ谷²¹⁾ (1946) が患者尿をマウス脳内に接種継代し 5代以後確実に発症死亡し, 之を更に孵化鶏卵漿尿膜に接種して 5乃至7日後に胎児の死亡を見, マウスに接種して病毒の存在を証明し, 又恢復期患者血清との中和関係を認めた。

人体接種実験の結果では, 血液, 十二指腸液, 糞便は明かに病毒を有するが, 尿及び咽頭洗滌液中の病毒存在について諸家の成績は一致していない。即ち Findlay及び Willcox²²⁾ によれば尿中に, Mac Callum 及び Bradley によれば咽頭液中にウイルスを保有しているが, Havens²³⁾ の如く陰性の結果を認めた者もある。又 Neefe, Stokes 及び Gellis²⁴⁾ (1954) によれば人体接種実験においては, 流行性肝炎及び血清肝炎の間に同種免疫は成立するが, 交叉免疫は成立しないことを認めている。

私は1953年以来神奈川県及び東京都内に発生した本症の流行に際し, 患者血清より本病毒のマウス及び孵化鶏卵えの分離固定を試み, 一連の実験を行つたので以下に之を報告する。

実験材料及び方法

患者材料

流行性肝炎患者血清として三田 (都内新宿区) 熊谷及び上野 (都立墨田病院) 岩野 (横浜医大) 長谷川 (横須賀市聖ヨゼフ病院) 三輪 (国保三崎病院) の6例で, この中三田, 熊谷及び岩野の3例は分離固定に用いられ, 且つ熊谷は家族内感染による三兄弟の混合血清である。

MURAOKA, Tsunehiko: Experimental Studies on Epidemic Hepatitis. I. Isolation of the Virus into Mouse and Developing Hen's Egg. Lab. of Smallpox and other Viral Diseases, Institute for Infectious Diseases, University of Tokyo.—Jap. J. of Bact., 13(4), 308-313, 1958.

接種動物

マウスは体重7g内外の幼弱マウスを用い、其の脳内に材料0.025ccを接種し観察を続け、発症乃至死に瀕したものを殺して採脳し、乳鉢中で石英砂を加えて磨碎し、徐々に生理的食塩水(pH 7.6)を加えて10%乳剤とし、3,000 r.p.m.15分間遠心した上清を前記同様マウスに継代接種し、全接種マウスが一定潜伏期を以て発症するに至つたものを固定毒と称した。

孵化鶏卵培養は田中法²⁵⁾により、材料を38°C孵化8日卵に0.1乃至0.2cc宛、漿尿膜に滴下し36°C5日間培養し、この漿尿膜を漿尿液を以て乳剤とし3,000 r.p.m.15分間遠心後上清を前記同様の8日卵に継代接種し、其の遠心上清が一定潜伏期を以て全接種マウスを発症せしめた場合、固定したと称した。

中和試験

病毒の血清による中和試験には11乃至12gのマウスを用いた。10倍段稀釈した病毒液0.2ccを、56°C30分温浴非働化した血清0.2ccと混じり37°C2時間保存後1夜氷室(4°C)に放置し、マウス脳内に0.025cc宛接種し3週間観察した。マウスは各倍段稀釈毎に4匹宛使用しReed-Muench法²⁶⁾によつて各株に対するLD₅₀を求め、中和指数を算出した。同定用家兎免疫血清は、感染漿尿膜及び胎児を生理的食塩水(pH 7.6)を以て10%乳剤とし、3,000 r.p.m.80分遠心後、上清を1昼夜-40°Cに凍結融解し、マーズン(武田薬品工業製エチルメルクリオサリチル酸ナトリウム)を0.01%の割に加え、37°C3日間放置したものを、約2500gの家兎に適當の間隔を以て静脈内注射し、総量約300ccに及び、最終回注射後1週間で採血したものである。対照血清としては健康家兎血清を用いた。

補体結合反応

抗原としては、感染孵化鶏卵漿尿膜及び胎児を生理的食塩水(pH: 7.6)で10%乳剤とし、1夜-40°Cに凍結融解し、3,000 r.p.m.80分遠心後上清を凍結融解5回繰返し、これを4,000 r.p.m.80分遠心して上清をとり、之を用いた。標準血清としては、感染マウス脳10%乳剤を3,000 r.p.m.30分遠心後、上清に0.01%の割にマーズンを加え37°C3日間放置後、其の0.25ccを7日間隔2回モルモット脳内に接種し2回目接種後10日で全採血したものを用いた。方法はアメリカ陸軍軍医学校法²⁷⁾に準じて行い、綿羊血球は3%浮游液を、溶血素は3単位、補体は2充単位を用いた。

なお補体はモルモットの混合血清又は伝研製乾燥補体

を使用した。判定は50%溶血阻止以上を陽性とした。表中の数字は慣行に従い、4, 3, 2及び1は夫々溶血阻止100, 75, 50及び25%を示す。

実験成績

1 病毒の分離及び固定

第1表及び第2表に示す如く、三田株は4代、熊谷株

第1表 病毒のマウス分離実験(直接法)

株(患者)名	代数	培養期間	罹患マウス数	
			接種マウス数	
三 田 (1954年)	1	7日	4/5	
	2	4日	4/5	
	3	5日	3/3	
	*4	3日	5/5	
	5	3日	5/5	

* 固定を示す。

第2表 病毒のマウス分離実験(間接法)

孵化鶏卵継代と各代材料によるマウス接種成績

株(患者)名	代数	培養期間	罹患マウス数	
			接種マウス数	
三 田 1954年	1	5日		
	2	"		
	3	"		
	4	"		
	5	"		
	6	"		
	7	"		
	*8	"	4/4	
岩 野 1955年	1	"		
	2	"		
	3	"		
	4	"	0/4	
	5	"		
	6	"		
	7	"	1/4	
	*9	"	4/4	
熊 谷 1955年	1	"		
	2	"		
	3	"		
	4	"		
	5	"		
	6	"	1/4	
	7	"		
	8	"		
	9	"		
	*10	"	4/4	

* 固定を示す。

及び岩野株は夫々10代及び9代で分離固定せられた。三田株は第3代目に孵化鶏卵培養を含み1, 2, 4, 5代はマウスを用いた。第1代は発症に約7日間を要したが継代と共に潜伏期間は3日間に短縮された。更に馴化の進んだものでは48時間にして発症を示すようになった。

岩野株及び熊谷株は孵化鶏卵のみを通過し、夫々9代、10代で接種マウスを全部発症死亡せしめた。此の際マウスの潜伏期間は5乃至9日間であった。この2株についても馴化の進んだものは48乃至72時間でマウスを発症せしめた。なお三田株について孵化鶏卵のみを通過したものは8代で接種マウスを全部発症死亡せしめた。

2 発症マウスの症状及び病理学的所見

マウスは接種後或る期間を経て立毛、不穏の状態を示し、刺戟に対する反応が次第に著しくなり容器内を跳ねるようになる。此の時期に両指を以て腹部に触れると緊張しているが病症が更に進むと四肢の麻痺が起り、腹部は軟かく感ずるようになる。食餌摂取は不能である。最初の症状発現より四肢の麻痺、死亡に到る迄の時間は24乃至72時間位で、鶏卵材料を接種された場合は稍々延長するようである。

脳内接種マウスを発症後剖検すると、肉眼的に脳及び脳膜の充血及び肝、脾の鬱血を認めることが多く、組織学的には脳及び脳膜炎の像及び鬱血肝を認めるのみで他

に著しい変化が見られない。これは脳内接種では経過が迅速で、各組織に認むべき病変を起す違がないためであろう。弱力病毒腹腔内接種の場合の所見については別報に記述する。

3 三田株免疫家兎血清による各株の病毒中和試験

第3表に示す如く、三田、熊谷及び岩野の各株に対する中和対数は何れも1.25、中和指数は何れも17.8を示

第4表 三田株免疫血清による各病毒株との補体結合反応

抗 原	血 清 稀 釈	対 照	
		抗 原	血 清
		4 × 8 ×	4 × 8 ×
三 田	4 4 3 3 0	0 0	0 0
岩 野	4 3 3 1 0	0 0	0 0
熊 谷	4 3 3 3 0	0 0	0 0

第3表 三田株免疫血清による各病毒株との中和試験

病毒株	対 照 群				LD ₅₀	実 験 群				LD ₅₀	中和指数
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷		
三 田	4/4	3/4	1/4	0/4	10 ^{-5.5}	3/4	0/4	0/4	0/4	10 ^{-4.25}	17.8
岩 野	4/4	2/4	1/4	0/4	10 ^{-5.25}	2/4	0/4	0/4	0/4	10 ^{-4.0}	17.8
熊 谷	4/4	3/4	1/4	0/4	10 ^{-5.5}	2/4	1/4	0/4	0/4	10 ^{-4.25}	17.8

第5表 A 三田株病毒と流行性肝炎患者血清との補体結合反応

患 者	病 日	血 清 稀 釈					対 照				判 定
							抗 原		血 清		
		4 ×	8 ×	16 ×	32 ×	64 ×	4 ×	8 ×	4 ×	8 ×	
長谷川	5	3	3	2	1	0	0	0	0	0	1 : 16
〃	15	3	2	0	0	0	0	0	0	0	1 : 8
三 輪	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(－)
〃	30	3	3	1	0	0	0	0	0	0	1 : 8
〃	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(－)
熊 谷	5	4	2	1	0	0	0	0	0	0	1 : 8
〃	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1 : 4
〃	5	4	3	1	1	0	0	0	0	0	1 : 8
上 野	5	4	3	1	0	0	0	0	0	0	1 : 8
〃	15	4	2	1	1	0	0	0	0	0	1 : 8
〃	20	3	1	0	0	0	0	0	0	0	1 : 4
岩 野	5	4	3	2	0	0	0	0	0	0	1 : 16

第 5 表 B 三田株病毒と流行性肝炎患者血清との中和試験

患 者	病日	対 照 群			LD ₅₀	実 験 群			LD ₅₀	中和指数
		10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶		
長谷川	5	4/4	4/4	1/4	10 ^{-6.75}	4/4	2/4	0/4	10 ^{-5.0}	56.3
三 輪	20	"	"	"	"	3/4	0/4	0/4	10 ^{-4.25}	317
"	30	"	"	"	"	0/4	0/4	0/4	10 ^{-3.5}	1780
"	50	"	"	"	"	3/4	0/4	0/4	10 ^{-4.25}	317
熊 谷	5	"	"	"	"	4/4	1/4	0/4	10 ^{-4.75}	100
岩 野	5	"	"	"	"	4/4	4/4	0/4	10 ^{-5.5}	17.8

し、この三株は略々共通の抗原性を有するものと推察される。

4 三田株免疫モルモット血清による各株病毒との補体結合反応

第 4 表に示す如く、標準血清に対して三田及び熊谷株は 32 倍、岩野株は 16 倍迄陽性を示した。

これ亦、この 3 株が抗原的に近縁であることを推測させるものである。

5 三田株病毒と流行性肝炎患者血清との中和試験及び補体結合反応

補体結合反応については第 5 表 A に示す如く長谷川 (5, 15 病日) 三輪 (20, 30, 50 病日) 熊谷 (三兄弟各 5 病日) 上野 (5, 15, 20 病日) 岩野 (5 病日) の 12 例であり、その中三輪の 20 及び 50 病日は陰性、他は最低 4 倍以上陽性であった。且つ何れも病初期に高値を示し、特に長谷川、上野では病期の進行に伴い陽性度の低下が見られる。最高は岩野の 16 倍陽性であった。中和試験については第 5 表 B に示す如く、長谷川 (5 病日) 三輪 (20, 30, 50 病日) 熊谷 (混合血清 5 病日) 岩野 (5 病日) の 6 例である。中和指数は岩野の 17.8 を最低とし、最高三輪の 1780 であった。特に三輪については、20, 30, 50 病日の中和指数が夫々 317, 1780, 317 であり病期の進行につれて明かな中和指数の昇降が認められる。

考 察

流行性肝炎病毒の各種実験動物への分離が困難な所から、さきに述べた如く、人体接種実験が多く行われ、患者の血液、血清、糞便、十二指腸液更に尿、咽頭洗滌液中にも病毒の存在が認められるに到った。これら諸材料を用いて動物への分離固定が、繰返し試みられているが未だ追試確認を得たものがないことは既述の通りである。実験動物としては Andersen の豚を始め、マウス、ラッテ、モルモット、ハムスター、フェレット、各種の猿、

家禽等が用いられ、接種の方法としては経口的或いは非経口的即ち皮下、筋肉内、脈管内、経鼻、腹腔内、脳内等多くの経路がとられている。

本病毒のマウス或いはラッテへの分離は Findlay Dunlop 及び Brown²⁷⁾ 其他が試みて陰性の成績を得、僅かに Mac Callum 及び Miles が欠乏飼育ラッテに、肝の組織学的変化を認めたのであるが、彼等も亦マウスへの分離は不可能であつたと言う²⁴⁾。我国では操及び山田、北岡、木村及び堀田、藤田²⁸⁾、谷口、原、山本其他が血液血清及び肝材料をマウス脳内、腹腔内に或いは経鼻的に接種して血清学的或いは病理組織学的変化を認めたと報じている。この中、谷口のウイルスは後にエクトロメリアであることが判明した²⁹⁾。之より先、荒川及び多ヶ谷は血液材料をマウス脳内に接種して陰性成績を得たが、尿材料を同様方法で接種継代して 5 代以降分離固定を示す陽性成績を得た。又北岡は経鼻感染で 100 代以上、原は腹腔内接種で 50 代以上、武内も亦 20 代以上継代し得たという。三田株は既に 40 代以上継代して現在に到っている。

本病毒の孵化鶏卵培養については、Siede 及び Meding³⁰⁾ Dressel, Meding 及び Weineck は十二指腸液を漿尿膜に接種し 4 乃至 5 日で胎児の死亡を認め、又 Siede 及び Luz³¹⁾ は同様方法で孵化鶏卵を 8 代通過している。荒川及び多ヶ谷は上記マウス脳固定毒を孵化鶏卵漿尿膜に接種して、胎児が 5 乃至 7 日で死亡するのを認め、且つこの病毒をマウス脳内に接種して其の存在を確認したという。又村上等は漿尿膜内接種により胎児が 2 乃至 4 日で死亡するとし、山本は本法では数代以後の継代は困難であるという。私は上述の如く田中氏法により三田、岩野、熊谷株と夫々 8, 9, 10 代で孵化鶏卵に分離し、マウス脳固定に成功したが、純鶏卵培養も続行継代し、三田株は 60 代以上、岩野株 21 代、熊谷株 17 代に到っている。今回新たにマウスに固定された 3 株中、孵化鶏卵由

来の三田、熊谷、岩野株は固定当初乃至純鶏卵通過のものではマウスに対し、 10^{-3} 乃至 10^{-4} 程度の力価を有するに過ぎないが、2、3代マウス脳を通過せしめると、容易に純マウス脳由来三田株の力価 10^{-5} 乃至 10^{-6} に高めることが出来る。これらの3株は何れも孵化鶏卵漿尿膜内接種により胎児を4乃至7日で死亡せしめ、感染漿尿膜或いは胎児の10%乳剤はマウスを発症死亡せしめる。

又孵化鶏卵由来及びマウス脳由来の各株病毒の免疫学的相関は実験3、4の項に明かである。各株の材料が得られたのは新宿区、墨田区、神奈川県と所を異にし、且つ採取時期においても約1年の差があるにも拘らず免疫学血清学的に近縁関係が認められた。

抑々も、動物分離ウイルスが真に流行性肝炎患者から分離されたか否かを鑑別するに最も有力な根拠は、該患者血清のウイルス中和力が恢復と共に、逐日的に上昇し又下降するか否か、更に又、同様に分離ウイルスに対する補体結合抗体が逐日的に上昇し又下降するか否かである。

各株は免疫学的に共通の抗原性を有するのみでなく第5表Bに示す如く、中和抗体は病初期に比較的低く、特に三輪の場合20、30、50病日において中和指数は317、1780、317と明かな上昇下降を示している。Smadel²²⁾によれば中和指数1~9は陰性、10~49は両義的であり、50乃至それ以上を陽性とみなしているが、私の場合最低17.8、最高1780で陽性且つ上昇下降の変動を明かに認めることが出来た。補体結合反応についても亦第5表Aに見る如く、病期の進行と共に補体結合抗体の低下乃至消失を認め得た。即ち私の分離ウイルスが肝炎患者に由来するものであるとの有力な根拠を提示したと考える。

病理組織学的所見については肝、脾に著変を認めることが出来なかつたが、これはマウス脳内接種において経過が迅速のため、十分な病変を出現する違がなかつた故であらう。故宮崎教授はこれについて、寧ろ肝炎ウイルスとして安心できる点ではないかとされた。既述の如く腹腔内接種の場合については後報に述べる。

結 論

1) 流行性肝炎病毒3株を幼弱マウス脳及び孵化鶏卵に分離固定した。材料はすべて患者血清であつた。三田株は4代でマウス脳に、岩野、熊谷両株は夫々9、10代で孵化鶏卵に固定された。何れも現在迄継代されている。

2) 各株は採取源が時、所を異にするにも拘らず免疫学的に近縁関係にあると考えられる。

3) マウス脳接種では肝に明かな病理組織学的変化は認められなかつた。

4) 患者血清に対する中和試験及び補体結合反応について、明かに抗体の上昇下降を認め、後者は前者に先立つて上昇し、先立つて下降すると考えられる。

擧筆に当り恩師荒川博士の御指導、御鞭撻を深謝し、同室兼子千秋、関富雄、近藤勇、佐藤武典各氏の御協力を感謝する。又血清を恵与された三崎国保病院長継茂、墨田病院小児科部長篠塚輝治、横浜医大山崎勝男、後藤宣政の各氏に厚くお礼申し上げる。

本報告の要は昭和32年6月29日日本細菌学会関東支部例会(第10回)で発表した。

文 献

- 1) Andersen, T. T., Tulinius, S., Acta Med. Scand. 95, 497, 1938.
- 2) Findlay, G. M., Mac Callum, F. O. & Murgatroid, F., Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. 32, 575, 1939.
- 3) Voegt, H., München med. Wschr. 89, 76, 1942
- 4) Cameron, J. D. S., Quart. J. Med. 12, 139, 1943.
- 5) Oliphant, J. W. (35) より引用
- 6) Mac Callum, F. O. & Bradley, W. H., Lancet 2, 228, 1944.
- 7) 弘, 田坂: 児科雑誌, 47, 975, 1941.
- 8) Dressel E. G., Meding, G. & Weineck, E. Zschr. f. Imm.forsch. u. exp. Therap. 103, 129, 1943.
- 9) Mac Callum, F. O. & Miles, J. A. R., Lancet 1, 3, 1946.
- 10) Henle, W., J. Exp. Med. 92, 271, 1950.
- 11) 北岡: 臨床医学, 3, 172, 198, 1946.
- 12) 操, 山田: 日伝誌, 18, 461, 1944.
- 13) 坂本: 病理学雑誌, 4, 47, 1946.
- 14) 木村, 堀田: 東京医事新誌, 66, 307, 1949.
- 15) 金丸: 臨床と研究, 29, 420, 1952.
- 16) 原: Proc. J. Academy 28, 270, 1952.
- 17) 村上: Virus 3, 3, 186, 1953.
- 18) 山本: Virus 3, 3, 187, 1953.
- 19) 木村: Acta Scholac Med. Univ in Kioto 30, 2-133, 1954.
- 20) 谷口: 日本細菌学会誌, 9, 5, 385, 1954.
- 21) 荒川, 多ヶ谷: 日本医学, 3407, 146, 1946.
- 22) Findlay, G. M. & Willcox, R. R., Lancet 1, 212, 1945.
- 23) Havens, W. P. Jr., J. Exp. Med. 83, 251, 1946.
- 24) Neefe, J. R., Stokes, J. & Gellis, S. S., Am. J. Med. Sc. 210, 561, 1945.
- 25) 田中: 実験医学雑誌, 25, 797, 939, 1069, 1941.
- 26) 細菌学実習提要, 丸善, 東京, 1941.
- 27) Findlay, G. M., Dunlop, J. L. & Brown, H. C.,

- Trans. Roy. Soc. Med. & Hyg. 25, 7, 1931.
- 28) 藤田 : 日内誌, 43, 11, 907, 1955.
  - 29) 谷口 : Virus 5, 51, 1955.
  - 30) Siede, W. & Meding, G., Klin. Wschr. 20, 1665 1941.
  - 31) Siede, W. & Luz, K., Handbuch d. inn. Med. III/2, 711, 1953 (Mohr & Stachelin, Berlin)
  - 32) Smadel, J. E. Viral and Rickettsial Infections of Man, Rivers, T. M., London 1952.
  - 33) 武内 : 熊本医学会誌, 28, 1, 96, 1954.
  - 34) Mac Callum, F. O., Mc Farlan, A. M., Miles, J. A. R., Pollock, M. R. & Wilson, C., Infective Hepatitis, H. M. Stationery Office, London 1951.
  - 35) 中村 : 伝染性肝炎, 医学書院, 東京, 1953.