Polio ウイルスの猿への経口感染試験

——牛γグロブリンのウイルス血症に及ぼす影響——

北岡正見*, 三浦悌二*, 堀菊子*, 緒方隆幸*, 野村昌子*

MASAMI KITAOKA, TEIJI MIURA, Kikuko HORI, Takayuki OGATA AND SHIGEKU NOMURA : STUDIES ON THE ORAL ADMINISTRATION OF POLIOMYELITIS VIRUSES IN MONKEYS. INFLUENCE OF COW γ-GLOBULINS UPON THE VIREMIA.

[受稿: 4月27日, 1954]

Polio に感染し定型的に発症するのは、一般にはウイルスが経口的に摂取され、一旦腸管壁の細胞組織に到達してそこで増殖し、ついでそこから神経線維を伝はり、最後に中枢神経系統に達し、中枢の神経細胞を侵して病変を作り症状を起すものと推定されている。¹⁾そして Polio の不顕性感染とは、腸管内に侵入したウイルスが、恐らくは腸管壁等では増殖してもそれ以上中枢神経系統にまで進展せず、そのまま排泄される場合であり、また不全型の感染とは腸管壁で増殖したウイルスの一部が中枢神経系統に到達するがそこに部分的小病変を起す場合と見なされている。その推定の根拠として、例えば polio 患者に見られる軽度の咽頭炎は咽頭粘膜でのウイルスの増殖を想像させ、又扁桃腺の摘出が激しい polio の発病を起すことも屢々認められている。²⁾

所が最近の組織培養法による研究は、polio ウイルスが神経以外の組織でも増殖し得ることを明にした。³⁾また過去において患者の血液から polio ウイルスを証明することは極めて稀であつたが、⁴⁾最近に到り、猿に経口的にウイルスを与えると比較的早期に猿の血液中にウイルスが証明されている。^{5,6,7,8,9)}従つて患者にも麻痺出現前の時期に、ウイルス血症が起るであろうことが推定され、また事実患者の血液から直接 polio ウイルスが証明されたとの報告もあり、^{10,11,12,13)}又胎内感染例からも人におけるウイルス血症の存在が推定されている。^{14,15)}しかし、もしこのようにウイルス血症が発症前に起るとすれば、腸管壁のウイルスが中枢神経系統に到達する経路として、必ずしも電子顕微鏡下で追求されたように¹⁶⁾神経線維を伝はらなくとも血行を介して全身感染を

起し、その結果として中枢神経系統に病変を起すとも考へられる。そして自然の感染発症がもしウイルス血症によるとすれば、polio の免疫血清或は化学的治療予防の実現性に大きな望がかけられることになる。しかし一方には古くからある神経線維を伝はつて行はれる感染経路説も未だ強く主張され、¹⁷⁾ウイルス血症は神経系統の感染による二次的の結果であるともいはれている。¹⁸⁾

そこでジャワ猿を用い、polio ウイルスの中で第2型に属する Lansing 株及び東京株を経口的に投与し、猿の発症の有無、又血液や糞便中のウイルス証明を逐目的に検討した。更にウイルス経口投与を受けた猿に牛γグロブリンを注射してウイルス血症に及ぼす影響の検討を試みた。

実験材料

猿: 使用した15頭の猿はフィリッピンから輸入された、体重およそ 1.5~1.8kg のジャワ猿である。いづれも polio 以外の実験に一度使用され、全く発症しなかつたものである。

ウイルス株: Lansing 株は¹⁹⁾1947年 Dr. Hammon より分与を受け、当所においてマウス脳内に8代継代したものである。²⁰⁾東京株は1952年当所において分離同定され、マウス脳内に5代継代したものである。

γグロブリン: 東京屠殺場で入手した数頭の健康牛血清を混和し、Hess, Deutsch の方法に準じ、²¹⁾低温エタノール法によつて作つた自家製γグロブリンで、そのβ+γグロブリンとしての純度は、電気泳動法によりおよそ70~80%であつた。

* 国立予防衛生研究所 リケッチャウイルス部

実験方法

経口投与方法：Lansing 株又は東京株を脳内に接種して罹患発症したマウスの脳脊髄の5四分をそのまま食塩水等を加えることなく乳剤として、一本のバナナに挟んで猿に与え、猿が自由にこれを食べたことを毎回確かめた。

猿の感染及び罹患の判定：ウイルスを経口的に与えた猿が感染或は罹患したか否かを判定するため、毎日検温して臨牀的所見を観察すると共にウイルス血症や抗体出現等の有無について追求した。

血液及び糞便よりのウイルスの証明：ウイルスを食べた猿の血液及び糞便から、3～6時間後、及び翌日より毎日24～30間に亘りウイルスの証明が試みられた。血液は股静脈より採血され、直に5～6匹のマウスの脳内に接種された。糞便はペニシリン 500u/cc 及びストレプトマイシン 1 mg/cc を加えた食塩水でおよそ20%の乳剤となし、6000回転20分間遠心してその上清をそのままマウス脳内に接種した。

分離ウイルスの同定：猿の血液或は糞便より分離されたウイルスの同定は、罹患マウスの症状、次代マウスへの移殖及び既知標準血清による中和試験の成績によつた。即ち定期的に発症した、或は死んだすべてのマウスは、脊髄をとり出し、ブイヨンで10%乳剤とし、次代のマウス脳内に接種された。次代マウスが発症すると、その脳脊髄はドライアイス中に保存され、後になつて Lansing 株、Brunhilde 株及び Leon 株の免疫血清による中和試験が行はれた。

中和試験の術式については既に発表した²²⁾が、こゝで行つた方法は、分離ウイルス罹患マウスの脳内及び脊髄の20%乳剤を作り、その遠心上清を予め Lansing, Brunhilde 及び Leon 株各ウイルスで充分に免疫した免疫猿血清（各血清は、マウス或は廻転試験管法による人胎児組織培養法を用いた中和試験を行つて、それぞれの株に対してのみ4.0に及ぶ中和指数を有することが確かめられた）の原液と等量に混合し、暫く室温に放置してから各4～6匹宛のマウス脳内に接種して発症と死亡を観察し、第2型の免疫血清によつてのみ特異的に中和されていることを確かめた。

猿血清の中和試験：ウイルスを経口的に投与する前及び経口投与後11～94日目に採血し、Lansing 株に対する中和試験を行つた。中和試験の術式は前に発表した方法²²⁾に準じた。

γ-グロブリンの注射：γ-グロブリンは pH 7.4 の生理食塩水に溶解し、ウイルス投与の当日に10cc、翌日5 cc、その翌日10cc、計25ccを背部筋肉内に注射した。

実験成績

1. Lansing 株の経口投与試験

1953年1月28日に3頭、また3月23日に6頭、計9頭のジャワ猿に Lansing 株罹患マウス脳脊髄の5四分宛を食べさせた。

第1回の3頭 (No. 74, 78, 79) のうち、1頭 (No. 78) のみにおいて5日後の血液からウイルスが証明されたが、それ以外の血液及び糞便はすべて陰性に終つた。

第2回の6頭のうち2頭 (No. 94, 95) は、ウイルス投与の日から3日間γ-グロブリンの筋肉内注射を受けた。この2頭の血液及び糞便はすべて陰性に終つたが、残りの4頭のうち1頭 (No. 85) では5日後の血液からウイルスが証明され、また3時間後に4頭の糞便を一括した材料からもウイルスが証明された (Table 1)。

2. 東京株の経口投与試験

マウス脳内で累代している Lansing 株を経口的に与えた実験では、ウイルス血症の検出率が予期以上に低かつたので、分離後間もない、しかもその毒力が Lansing 株より幾分強いと思はれる同型の東京株を用いて、経口投与試験を繰り返した。

1953年4月25日に2頭 (No. 86, 89) 6月24日に4頭 (No. 88, 89, 90, 91)、計6頭のジャワ猿が用いられた。糞便からのウイルス分離は各回毎に一括した材料について行はれた。

第1回の2頭では、投与翌日 (No. 87) 及び5日後 (No. 86) にウイルス血症が証明され、また糞便からも投与当日のものからのみウイルスが証明されたが他は陰性であつた。

第2回の4頭では投与の翌日 (No. 88)、4日後 (No. 88)、及び5日後 (No. 90) にウイルス血症が証明され、また投与翌日の糞便からもウイルスが証明された。

これらの血液或は糞便から分離されたウイルスは Lansing 株免疫血清により殆んど中和されたが、Brunhilde 及び Leon 株血清では全く中和されなかつた。

3. 猿血清の中和試験

Table 1. Virus isolation from blood and feces of monkeys following oral administration of poliomyelitis viruses "Lansing" and "Tokyo" strains

Name of strain		Lansing										Tokyo									
date of experiment		Jan. 28, 53			March 23, 53							April 25 53			June 24, 53						
monkey No.		74	78	79	94	95	pool- led	85	92	93	96	pool- led	86	87	pool- led	88	89	90	91	pool- led	
test material		*B	F	B	F	B	F	B	B	B	B	F	B	B	F	B	B	B	B	F	
hrs or days after oral administration	3 hrs					—	—		—	—		1/5									
	4	**											—	—		—	—	—	—	—	
	6	—	—	—	—																
	1 day	—	—	—	—		—	—	—			—	—	1/5	1/5	1/5	—	—	—	1/5	
	2	—	—	—	—	—			—	—			—	—	—		—	—	—	—	
	3	—		—			—					—	—	—	—			—	—		
	4	—	—	—	—	—			—	—		—	—	—	—	1/5	—	—	—	—	
	5	—	—	*** 1/5	—	—		1/5	—	—	—		2/5	—	—	—	—	—	1/4	—	—
	6	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	7	—	—	—	—	—	—		—	—		—	—	—	—		—			—	
	8	—		—	—		—		—	—		—		—	—			—	—	—	
	9						—		—			—	—	—	—	—	—			—	
	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	11					—		—		—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	
	12	—	—	—	—					—			—	—	—	—	—	—	—	—	
	13													—	—	—				—	
	14	—	—	—	—		—	—				—					—	—	—	—	
	15						—						—								
	16					—		—		—	—		—	—	—	—				—	
	17													—	—	—					
	18	—	—	—	—									—	—	—				—	
	19					—	—		—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	
	20															—					
	21															—					
	22							—									—	—	—	—	—
	23												—								
	24	—	—	—	—	—															—
	25																				
	26					—	—	—	—	—	—	—	—			—	—	—	—	—	—
	27							—					—	—	—	—					
28							—					—									
29							—					—				—	—	—	—	—	
30							—					—									
note		γ-gl. injected																			

* B : blood, F : feces ** negative in 5 inoculated mice

*** numerator : no. of positive mice, denominator : no. of inoculated mice

Table 2. Neutralization test of monkey sera before and after oral administration of poliomyelitis virus

Name of strain	date of oral administration	monkey No.	neutralization index			
			before oral administration (1)	days after oral administ.		(2) or (3) - (1)
				15-25 (2)	30 + (3)	
Lansing	March 23 '53	No. 93	1.3	0.3	0.5	*—
		94	1.0	0.6		—
		95	1.1	1.4		0.3
		96	1.3	0.3		—
Tokyo	April 25 '53	86	0.8	0.2		—
		87	0.5	0.5	0.6	0.1
	June 24 '53	88	0.3		1.5	1.2
		89	0.5		0.5	0
		90	0.4		0.3	—
		91	0.3		1.1	0.8

" (1) > (2) or (3)

第2表に示すようにウイルス投与の前後に中和試験の行うことが出来た10頭の猿の血清について見ると、経過と共に著明な中和抗体の上昇を示したものは無かった。たゞ No. 88 の猿血清のみは中和指数で1.2 の上昇を見た。この猿のみは、たまたまウイルス血症が2回証明された唯一の猿であつた。

總括と考按

Lansing 株、或は東京株を15頭の猿に経口的に与えたが1頭も発症しなかつた。しかし15頭中6頭においてウイルス血症が認められたことは、このことが発症に対して如何なる意義を有するにせよ経口的に投与された polio ウイルスが何らかの経路で血行中に侵入したことを証明するものである。そのウイルス血症の時期と頻度についてみると1日後(翌日)に2例、4及び5日後にそれぞれ1及び4例が陽性となり、その他はすべて陰性であつた。いづれにしてもウイルス血症が証明されながら、それが発症にまで進展しなかつたのは与えられたウイルスの量や毒力等との関連において、使用猿が Lansing株に対し、ウイルス投与前の血中中和抗体が陰性であつたにしても、果して完全に無抵抗であつたか否かも問題となりうるであろう。

他方において糞便からウイルスの証明されたのは、投与当日に1回、その翌日に2回、計3回のみで、それ以後はウイルス血症の陽性の時期でもすべて陰性に終つた。この成績は従来糞便よりのウイルスの証明が

より長期間に亘つて成功している成績とは一致していない。

Fig. 1 Viremia and virus in stool after feeding of poliomyelitis virus on monkeys

これらの関係を Fig. 1 に図示した。図からも明かのように、ウイルス血症には2つ、糞便からのウイルスの証明には一つの山が認められた。

これらの事実を総合すると、polio ウイルスの経口投与と発症との間におけるウイルス血症の意義に関して次の一仮説の想定が許され得るであろう。第一次ウイルス血症の山は経口的に投与されたウイルスの一次的血中侵入に基くものであり、第二次のそれは、第一次の侵入に結果して起つた内臓におけるウイルス増殖(内臓相)後に、増殖したウイルスが再び血行を介し

て全身に撒布される為と解される。投与されたウイルスの体内侵入点はおそらくは咽頭粘膜や腸管壁であろう。中枢神経系統におけるウイルスの増殖（脊髓相）が、内臓相に併行して起つているものであるのか、或は第二次ウイルス血症の結果として起るものであるのかは、更に慎重な病理組織学的及びウイルス学的検討によつて決定さるべきであろう。この際、もし猿の感受性が充分に高い場合には中枢神経系統にもウイルスが著明に増殖して病変をつくるに至り、polio の定型的或は不全型の罹患となるものであろう。いづれにせよ polio は、2回のウイルス血症により、内臓相に次で脊髓相を呈する一系統疾患であるとも考えられる。そうだとすると免疫血清或は化学薬剤の投与による発症阻止の可能性が考えられるし、又 polio の吸血昆虫媒介説の可能性も全く否定出来なくなる。しかしながら、一部に称えられているように¹⁸⁾、もし逆にウイルス血症は脊髓相の原因ではなく、それによつて二次的に起つたものであるならば、これらの可能性は全く否定されるものである。

糞便中にウイルスの証明されたのは第一次ウイルス血症の時期に限られたが、それは罹患猿⁸⁾、或は患者の糞便からのウイルスの証明の場合とはおもむきを異にし、時間的には、経口的に投与されたウイルスがそのまま排泄されたものと解される。その後の第二次の糞便内からのウイルスの証明（増殖したウイルスの消化管内への排泄）は陰性に終つたが、それはこれらの猿が罹患しなかつた為にか、ウイルスの排泄量がマウスを罹患させる程度に達しなかつた為であろう。この事からも腸管内のウイルス増加はウイルス血症に先行されるものであろうと考えられる。

本実験で、Lansing 株を用いた場合は9頭中2頭（ γ -グロブリンを接種した2頭を除けば7頭中2頭、29%）に、東京株を用いた場合は6頭中4頭、67%にウイルス血症が証明された。恐らくは、東京株が Lansing 株よりもマウスに対する毒力が強く、しかも分離後間もないためにウイルス血症を起し易いのではないかと思はないかと思はれる。

上述のように、Lansing 株ウイルスを食べさせた2頭の猿に、25cc宛の γ -グロブリンを筋注したところ、ウイルス血症も、糞便内のウイルスもすべて陰性に終つた。しかし γ -グロブリンの注射を受けなかつた4頭でも、ウイルス血症と、糞便内ウイルスが1回づゝしか証明されていないので、この所見のみからでは、 γ -

グロブリンの注射が、ウイルス血症と、糞便内へのウイルス排泄とを完全に阻止するものと結論するのは早計である。この点について、もつとウイルス血症を起し易い条件の下に、更に多数の猿について検討すべきである。

結 論

1. ジャワ猿15頭を用い、9頭に Lansing 株ウイルスを、6頭に東京株ウイルスを、バナナに挟み経口的に投与したが1頭も発症しなかつた。

2. 15頭中6頭の猿において、ウイルス投与の当日又は4～5日後の血液からウイルスが証明された。又7群中3群の猿の糞便から、当日又は翌日にウイルスが証明された。ウイルスの検出率は東京株を与えた猿の方が、Lansing 株を与えた場合よりも高いのであろうと思はれる。

3. 牛 γ -グロブリン25ccの注射を受けた2頭の猿では、ウイルス血症も、糞便内のウイルス証明も陰性に終つた。

4. これらの猿血清においては、中和抗体の著しい上昇は認められなかつた。

文 献

- 1) Howe, H. A. : Poliomyelitis. in *Viral and Rickettsial Infections of Man*. Lippincott, Philadelphia. 1948.
- 2) Horstmann, D. M. : Clinical aspects of acute poliomyelitis. *Amer. Jour. Med.*, **6**, 592—605, 1949.
- 3) Francis, T. Jr. Krill, C. E., Toomey, J. A., and Mack, W. N. : Poliomyelitis following tonsilectomy in five members of a family. *J. Amer. Med. Assn.* **119**, 1392—1396, 1942.
- 4) Enders, J. F., Weller, T. H., and Robbins, F. C. : Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science*, **109**, 85—87, 1949.
- 5) Ward, R., Horstmann, D. M. and Melnick, J. L. : The isolation of poliomyelitis virus from human extra-neural sources. IV Search for virus in the blood of patients. *Jour. Clin. Invest.*, **25**, 284—286, 1946.
- 6) Horstmann, D. M. : Poliomyelitis virus in the blood of orally infected monkeys and chimpanzees. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **79**, 417—419, 1952.
- 7) Bodian, D. : Experimental studies on passive

- immunization against poliomyelitis, III. Passive active immunization and pathogenesis after virus feeding in chimpanzees. *Amer. Jour. Hyg.*, **58**, 81—100, 1953. 8) Bodian, D. : A reconsideration of the pathogenesis of poliomyelitis. *Amer. Jour. Hyg.*, **55**, 414—438, 1952. 9) Nishizawa, Y. and Okano, K. : The significance of viremia in the pathway of infection of poliomyelitis, *Arch. ped. New York.*, **70**, 71—80, 1953. 10) Kausche, G. A., and Bender, A. : Zurkeuntnis des poliomyelitis virus. *Arch. f. d. ges. virusforsch.* **4**, 217—223, 1951. 11) Koprowski, H., Norton, T. W., and McDermott, W. : Isolation of poliomyelitis virus from human serum by direct inoculation into laboratory mouse. *Pub. Health Rep.* **62**, 1467—1476., 1947. 12) Horstmann, D. M. and McCollum, R. W. : Poliomyelitis virus in human blood during the “Minor illness” and the asymptomatic infection. *Proc. Soc. Exp. Biol., Med.*, **82**, 434—437, 1953. 13) Mule, F. : La viremia della malattia di Heine Medin. *Rend. Ist. super. Sanità*, **15**, 220—225, 1952. 14) Faber, H. K., and Baskin, J. L. : poliomyelitis in the newborn. *Amer. Jour. Dis. child.*, **80**, 999—1001, 1950. 15) Jhonson, J. F., and Stimson, P. M. : Clinical poliomyelitis in the early neonatal period. Report of a case. *Jour. Pediat.* **40**, 733—737, 1952. 16) De Robertis, E., and Schmitt, F. O. : An electron microscope study of nerves infected with human poliomyelitis virus. *Jour. Exp. Med.*, **90**, 283—290, 1949. 17) Bodian, D., and Howe, H. A. : Neuronal pathways as determining factors in dissemination of poliomyelitis in the central nervous system. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **41**, 540—545 1939. 18) Faber, H. K. and Silverberg, R. J. : Studies on entry and egress of poliomyelitis infection. IV. Centrifugal spread of the virus into peripheral nerve : with notes on its possible implications. *Jour. Exp. Med.*, **97**, 455—465, 1953. 19) Armstrong, C. : The experimental transmission of poliomyelitis to the eastern cotton rat *Sigmodon Hispidus* *Pub. Health Rep.*, **54**, 1719—1721, 1939. 20) 北岡正見, 三浦悌二, 堀子 : 急性灰白髄炎ウイルス東京株の分離, *医学と生物学*, **26**, 185—188, 1953. 21) Hess, E. L., and Deutsch, H. F. : Biophysical studies of blood plasma proteins. VIII. separation and properties of the γ -globulins of the sera of normal cows. *Jour. Amer. Chem. Soc.*, **70**, 84—88, 1948. 22) Kitaoka, M., and Miura, T. : The neutralization test of normal and convalescent human sera in Tokyo, against the mouse-adapted poliomyelitis virus “Lansing” strain. *Jap. Med. Jour.*, **2**, 285—294, 1949. 23) Horstmann, D. M., Melnick, J. L., and Wenner, H. A. : The isolation of poliomyelitis virus from human extraneural sources. III. persistence of virus in stools after acute infection. *J. Clin. Invest.*, **25**, 278—283, 1946.