インフルエンザウイルスの赤血球凝集能と 感染能及免疫能との関連性

iv インフルエンザウイルスの卵馴化株がマウスに対して
非病原性であるがマウス肺に於て増殖するとうことに就て私達の実験並に考察

中西 謙三* 高田 雄正**,*** 吉岡 勇雄***
岩田賢太郎**** 村山 寿**

KENZO NAKANISHI, Y. TAKATA, I. YOSHIOKA, K. IWATA and H. MURAYAMA : STUDIES ON HEMAGGLUTINATING ACTIVITY, INFECTIVITY AND IMMUNIZING ABILITY OF INFLUENZA VIRUS

iv STUDIES ON THE GROWTH OF EGG-ADAPTED LINES OF INFLUENZA VIRUS FM1, WHICH ARE NONPATHOGENIC TO MICE, IN THE LUNG OF MICE.

〔受稿 9月16日 1957〕

緒 言

中西¹⁾²⁾は先にインフルエンザウイルスの赤血球凝集能と感染能との解離についてのべ、その際インフルエンザウイルス FM1 株が継代接種を重ねて動物種に馴応 (adapt) して来るとマウス馴化株と卵馴化株とは明かに区別される様になり、卵馴化 FM1 株は赤血球凝集能と雞胎感染能を保有するがこれをマウスに接種してもマウス肺には殆ど病変を生じないことを報告した。Cheng-I Wang³⁾はマウス非病原性(マウス非馴化)の A'型 Rhodes 株がマウス肺に著実に増殖すること、たゞその増殖の割合が Rhodes 株のマウス馴化株に比して低く且凝集価も低いと報告して居る。更に、F. M. Davenport and T. Francis Jr.⁴⁾は A 型及び B 型インフルエンザウイルスを用い、そのマウス馴化株は接種後非馴化株より速かに増殖を始め、稀薄ウイルス液接種の場合には両株の増殖の割合には相違はないが、非馴化株の最高感染価は馴化株のそれより低く且その離反は大量ウイルスの接種に伴つて増加することを報告して居る。私達は病変を生じなくてもウイル

スは増殖することは感染発症並に免疫に重要な意義を有し且それがワクチン製造に應用されるのではないかと考え、次の実験を試みた所、Wang, Davenport 等とはいささか異なる結果を得たのでここにその実験成績を報告し、且考察を加えたいと思う。

実 験

ウイルスは業室保存の雞卵馴化の A 型 FM1 株を用いた。即ち、雞卵尿膜腔内に接種継代したもので接種雞卵の尿膜腔液を採取後24時間以内にウイルス液として使用した。又マウスは白色雄マウスで研究室内で飼育繁殖した体重10~12gのものである。C.C.A. 価はパターン法で測定した。

実験1 卵馴化FM1株の尿膜腔液(C.C.A.価 10×26)の 10^{-1} 稀釈液をマウス10匹にエーテル麻酔下0.03cc宛経鼻接種し、接種後4日目エーテル麻酔で殺した。マウス肺は何れも肉眼的に病変を認めることはなかつた。組織学的には僅かに充血を認める程度で対照のマウス馴化 FM1 株接種マウスの肺に於ける様な胞隔炎の像は認められなかつた。うち5匹のマウスの肺を集

* 東京医大、内科、臨床ウイルス・リケツチア部

** 東京医大小児科(教授 飯島 孝)

*** 北里研究所ウイルス・リケツチア部(部長 笠原四郎)

**** 千葉県血清研究所(越後貫所長)東京医大細菌(大黒教授)

め磨砕し生理食塩水で5倍に稀釈し 2,000 r.p.m. 20分遠心後上清をとり(上清 C.C.A. 価 $<10\times$), その上清より肺の 10^{-1} ~ 10^{-5} 稀釈液を作り11日卵に各々0.1ccを尿膜腔内に接種し更に孵卵48時間後に尿膜腔液を採取しその C.C.A. 価を測定した. その成績は第1表に示す如く何れも 10×26 以上の価を示し, ウイルスが増殖して居ることを示した. 即ちマウス肺には何等病変を示さなくてもウイルスがマウス肺内に保有されて居ることを示した. 然しこれが果してマウス肺に於ける病変を示さないウイルスの増殖であつたか, 或は単なる接種ウイルスの生残であつたかは尚考察を要する所である.

Fig. 1. Mice inoculated with low diluted egg-adapted(nonpathogenic to mice) Influenza Strain FM1.

Dilution of Lung inoculated into eggs	C.C.A. of Liq. allant. inoculated with lung-suspension
10^{-1}	+ ($>10\times 26$)
10^{-2}	+ (//)
10^{-3}	+ (//)
10^{-4}	+ (//)
10^{-5}	+ (//)

Mice inoculated with 10^{-1} liq. all. (C. C. A. titer 10×26)

実験2 卵馴化 FM1 株増殖の尿膜腔液 (C.C.A. 価 10×27) を 10^{-5} に稀釈し, 之をマウス5匹に接種し3日後エーテルで殺しその肺を集め5倍に稀釈し 2,000 r.p.m. 20分遠心後上清をとり(上清 C.C.A. 価 $<5\times$)更に之を基として肺の 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 稀釈液を作り, 10^{-5} 液 0.03cc を10匹のマウスにエーテル麻酔下に経鼻接種すると共に 10^{-4} ~ 10^{-7} 液を10日卵3ヶ宛に0.1cc 尿膜腔内接種し 48時間孵卵後尿膜腔液を採取しその C.C.A. 価をしらべた所第2表に示す如く何れも

陰性であつた. 又マウスは4日目にエーテルで殺し, そのうち5匹は組織学的に検したが何等の変化を認めることが出来なかつた. 他の5匹はその肺を集め前記同様にして 10^{-1} (C.C.A. 価 $<10\times$), 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 稀釈液を作り各3ヶの9日卵尿膜腔内に0.1cc 宛接種し 48時間孵卵後尿膜腔液を採取しその C.C.A. 価をしらべたが同じく第2表に示す如くすべて陰性であつた. この成績によつて見ると稀釈ウイルス液をマウスに接種した場合, マウス肺にはウイルスの保有は認められず, 卵馴化ウイルスがマウス肺内で増殖する証拠は何等認めることが出来なかつた.

実験3 卵馴化 FM1 株を増殖させた尿膜腔液(C.C. A. 価 10×27)を 10^{-3} に稀釈し之をマウス10匹にエーテル麻酔下0.03cc宛を経鼻接種し接種後3日目エーテルで殺した. 肺には肉眼的に何等病変を認めず組織学的にも僅かに充血を認めるほかは特記すべき変化はなかつた. そのうち5匹の肺を集め5倍に稀釈し 2,000 r.p.m. 20分遠心後上清をとり(上清 C.C.A. 価 $<5\times$)それを基として肺の 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} 稀釈液を作り各々4ヶ宛の11日卵に0.1cc尿膜腔内に接種した. 又 10^{-3} 稀釈液を10匹のマウスに0.03cc宛エーテル麻酔下経鼻接種した. 被接種卵は更に48時間孵卵後尿膜腔液を採取しその C.C.A. 価を検した所第3表に示す様に 10^{-2} 液接種卵及び 10^{-4} 液接種卵では何れも512倍以上であつたが 10^{-6} 液接種卵では1ヶのみ陽性(C.C.A. 価 $>512\times$)で他は何れも陰性であつた. 即ち 10^{-2} , 10^{-4} 液接種卵ではウイルスの増殖を認めたが 10^{-6} 稀釈ではウイルスの増殖は不確定であつた. 二代目マウスは接種後4日目にエーテルで殺した. その肺は肉眼的にも組織学的にも何等病変を認めることがなかつた. そのうち5匹のマウスの肺を集め前記同様にして 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} 稀釈液を作り11日卵各5ヶ宛に尿膜腔内に0.1cc接種した. 48時間孵卵後尿膜腔液を採取しその C.C.A. 価を測つた所第3表に示す如く 10^{-2} 稀釈液接種卵の尿膜腔液は何

Fig. 2. Mice inoculated with high diluted egg-adapted Influenza Virus Strain FM1

Dilution of lung * (1st generation)	C.C.A. of liq. Allant. inoculated with lung suspension	Dilution of lung ** (2nd generation)	C.C.A. of lip. Allant. inoculated with lung suspension
10^{-4}	—	10^{-1}	—
10^{-5}	—	10^{-2}	—
10^{-6}	—	10^{-3}	—
10^{-7}	—	10^{-4}	—

* Mice inoculated with 10^{-5} liquor allant. (C.C.A. titer 10×27)

** Mice inoculated with 10^{-5} lungs of 1st generation mice.

Fig. 3. Mice inoculated with egg-adapted Influenza Virus Strain FM1

Dilution of lung * (1st generation)	C.C.A. of liq. Allant. inoculated with lungsuspension		Dilution of lung ** (2nd generation)	C.C.A. of liq. Allant. inoculated with lungsuspension	
	positive	negative		positive	negative
10 ⁻²	4 (>512)	0	10 ⁻²	5 (>512)	0
10 ⁻⁴	4 (>512)	0	10 ⁻⁴	1 (>512)	4
10 ⁻⁶	1 (>512)	3	10 ⁻⁶	0	4

* Mice inoculated with 10⁻³ liquor allant. (C.C.A. titer 10×27)** Mice inoculated with 10⁻³ lungs of 1st generation mice

れも512倍以上のC.C.A. 価を有しウイルスが増殖したことを示したが10⁻⁴ 稀釈液接種卵では僅かに1ケのみ512倍以上のC.C.A. 価を示したが他の4ケはすべて陰性であつた。10⁻⁶ 稀釈液接種卵では4ケ共すべてC.C.A. 価を示さずウイルスの増殖は認められなかつた。即ち10⁻² の低稀釈のみ尿膜腔内でのウイルスの増殖を示し、10⁻⁴、10⁻⁶ の高稀釈ではウイルスの増殖は明らかでなかつた。されば二代目マウスではその肺に於て卵馴化ウイルスが僅かに保有されてはいたが増殖したという明確な証拠は認められなかつた。

総括並に考按

ここで以上の実験を総括して私達の見解を述べてみよう。卵馴化 FM1 株はマウス肺には何等病変を生じることなく従つて私達は FM1 卵馴化株はマウス肺では増殖しないものと考えて居た。然し雞卵にて分離したインフルエンザウイルスが初めはマウス肺に何等病変を示さないものもマウス継代接種を行うことによつて次第にマウスに馴化し、遂にはマウス肺に病変を生ずるに至るのであるからマウス肺内では全く増殖しないということは云えないであろう。然しそれは分離当初のインフルエンザウイルス株であるが、私達の用いた FM1 株は永く業室保存のものであり、マウス馴化と卵馴化との区別がついてから久しいものであつて、卵馴化株はマウス肺には何等病変を示さない様になつたものである。Wang³⁾ の用いた Rhodes 株はフェレット3代羊膜腔2代尿膜腔4代継代のものであり、Davenport & Francis Jr.⁴⁾ が行つた実験で使用したマウス非馴化株はA型 Rhodes 株はフェレット3代雞卵6代のものでありB型 Warner 株は雞卵13代継代のものであつて、何れも卵馴化とマウス馴化と分化した程度が小さいのではなからうか。然し、彼等は卵馴化株を用いて実験してそれがマウス肺に非病原性(non-pathogenic)であつて而もマウス肺内で増殖す

ることを示して居る。彼等の実験成績を見るとマウス肺内のインフルエンザウイルスは接種後時間を逐つて増殖して居るので卵馴化株もマウス肺内で明らかに増殖するのであると見做さざるを得ない。然し乍ら、私達の実験に於ては、実験1に示す所では確かに卵馴化 FM1 株がマウス肺内で増殖したかの如く見えるが、この場合最初の原液のC.C.A.価は10×26であつてその10⁻¹ をマウスに接種しその肺の10⁻¹~10⁻⁵ を更に卵に接種してC.C.A.価を認めたのであるが、これは果してウイルスがマウス肺内で増殖したのであろうか、或は接種されたウイルスが肺内に生残して居たのであろうか。C.C.A.価と感染価との比を約10⁻⁶ とする Fazekas de St. Groth 等⁵⁾ の意見に従つてウイルス稀釈度を計算するとウイルスがマウス肺内で増殖したのではなくて肺内に生残して居たと考えてもよいことになる。ついで実験2に於て高稀釈でウイルス接種を試みた所、第1代マウスは勿論、第2代マウスでもその肺を接種した卵には尿膜腔液にC.C.A.価は認められなかつた。原液のC.C.A.価とその稀釈度から考えて卵馴化株はやはりマウス肺内では増殖しなかつたものとするのが妥当ではなからうか。もし肺で増殖するものとするれば原液のC.C.A.価10×27でその10⁻⁵ 液をマウスに接種したのであるからそれらの肺の接種卵にはC.C.A.価が認められる筈である。もし初代に出ないとしても第2代マウスの肺にはウイルスが認められて然るべきものではなからうか。更に実験3ではその中間のウイルス稀釈度を取りC.C.A.価10×27の卵馴化株を10⁻³ に稀釈してマウスに接種したのであるが肺には何等病變なくそのマウス肺接種卵の尿膜腔液は10⁻²、10⁻⁴ 液接種のものではC.C.A.価を認め10⁻⁶ 液では不確實であつた。これより見ると10⁻⁴ 稀釈(或は10⁻⁵ 稀釈のものまでC.C.A.価陽性であつたかもしれない)まで接種卵内でウイルスが増殖したのは原液のC.C.A.価が10×27でありマウスにはその10⁻³ を接種したのであるから原液

の凡そ 10^{-8} を卵に接種したことになるので必ずしもマウス肺内でウイルスが増殖したと強張するには当らない、マウス肺内でウイルスが生残したと考えてはいけなからうか。ウイルスが肺内で増殖するものならば実験3に於ても第二代マウス肺内ではウイルスは更に増殖して居る筈である。初代マウス肺の 10^{-3} を二代目マウスに接種した所がその第二代マウスのウイルス接種後4日目の肺の 10^{-2} 稀釈液はウイルスを保有して居たが 10^{-4} 稀釈液では殆ど保有して居らず 10^{-6} 液では全くウイルスを認めなかつた。第二代マウス肺の 10^{-2} 液は初代マウス肺に対する稀釈度が凡そ 10^{-6} になつて居るのであるから初代マウス肺の 10^{-6} でウイルスの保有不確実であつて第二代マウス肺の 10^{-2} 稀釈でウイルスの保有を認めたのはやはりウイルスのマウス肺に於ける単なる生残のみではなく僅かではあるがやはり肺内で増殖して居たのかもしれない。従つて増殖したとしても極めて軽度の増殖であつてマウス肺に対してこれといった病変を現わさないのかもしれない。然しこの程度の稀釈度の差は或は誤差範囲かも知れないと考えれば、必ずしも増殖と考えなくてもたゞのウイルスの生残と考えられないであらうか。然し卵馴化株をマウスに継代して行つてマウス肺に馴化する場合には当然マウス肺でウイルスは増殖してマウス肺に病変を生ずるのであるからこの際の卵馴化株がマウス肺で増殖する機転については今後の研究を俟たなければならない。

以上を総括すると、マウス肺馴化と卵馴化とに充分分化した後の卵馴化 FM1 株は マウス経鼻接種後その

肺内に於て数日に亘り生残するが増殖することは殆どない。仮に増殖しても極く少量であつてマウス肺に病変を示す程にはならない。

結 語

私達はインフルエンザウイルス FM1 の卵馴化株を用いてそれがマウス肺内で病変を示さないが増殖はするか否かということに関して実験を試み、その実験成績を報告し且つ私達のそれに対する見解を述べた。よく分化した後の卵馴化 FM1 株は マウス経鼻接種後数日に亘り肺内に生残するが肺内で増殖を示すことは殆どなく又マウス肺に病変を生ずることもない。たとえ肺で増殖するとしても極く軽度であるとしか考えられない。

文 献

- 1) 中西謙三：インフルエンザウイルスの赤血球凝集能と感染能及免疫能との関連性, I, VIRUS, **4**, 193-194, 1954.
- 2) 中西謙三, 越後貫 博, 岩田賢太郎：同上, III, VIRUS, **7**, 1957, 印刷中
- 3) Wang, Cheng-I: The Relation of Infectious and Hemagglutination Titers to the Adaptation of Influenza Virus to Mice. J. Exper. Med., **88**, 515-519, 1948.
- 4) Davenport, F. M. and Francis, T. Jr.: A Comparison of the Growth Curves of Adapted and Unadapted Lines of Influenza Virus. J. Exper. Med., **93**, 129-137, 1951.
- 5) Fazekas de St. Groth, S. and Cairns, H. J. F.: Quantitative Aspects of Influenza Virus Multiplication. IV. Definition of Constants and General Discussion. J. Immun., **69**, 173-181, 1952.