猿におけるポリオ弱毒生ウイルスワクチンの 経口投与に関する研究

神 原 佳 子*

YOSHIKO KAMBARA: STUDIES ON THE ORAL ADMINISTRATION OF LIVE ATTENUATED POLIOVIRUS VACCINE IN THE MONKEY

〔受稿 2月28日 1961〕

緒 言

Enders 等⁴⁾ によつて組織培養がはじめられて以来、ポリオの予防に関する研究は長足の進歩をとげ、1953年には不活化ワクチンの成功をみたが¹⁷⁾、一方において抗体産生能力、免疫持続期間、野生株の伝播阻止、製造方法および投与方法の簡便さ等数多くの点で不活化ワクチンにまさると考えられる生ウイルスワクチンの研究が Cox²⁾, Koprowski⁶⁾, Sabin¹⁶⁾ 等によつてそれぞれ進められ、すでに Minnesota¹⁾, Frolida⁵⁾ をはじめ各地において野外実験が実施された。

我国においても1958年教室の岡島¹⁵⁾はCox vaccineを健康乳幼児に投与して種々の基礎的研究を行ない、その免疫効果と安全性を立証したが、マウスの脊髄内接種試験の成績から生ウイルスワクチンの生体内通過による病原性の変化の問題については、さらに詳細な検討が必要であることを述べた。ワクチンの向神経性については、猿の脳内接種および脊髄内接種法が行なわれ、いずれの生ウイルスワクチンでもある程度の発症およびかなりの組織学的所見を呈することが認められている⁹⁾¹⁰⁾。しかしこれらの生ウイルスワクチンを猿に経口投与した報告はみられない。

私は西沢教授の提案にもとづき、Cox vaccine を猿に経口投与し、臨床的ならびにウイルス学的検索を行なうとともに、逐日剖検し、特に中枢神経の病理組織学的所見について詳細な観察を行なつた。

実験材料および方法

1) ワクチン; Lederle 社製の Cox vaccine の I, II, III 型液状ワクチン (monovalent vaccine) および 3 型混合液状ワクチン (trivalent vaccine) の 2 種類を使用した。

ワクチンの力価は、monovalent vaccine は I 型^{104.5} TCD₅₀/ml, II 型^{104.5} TCD₅₀/ml, III 型^{103.5} TCD₅₀/ml であり、trivalent vaccine は ^{106.5} TCD₅₀/ml であつた。

2) 実験動物ならびにワクチン投与方法; 動物は体重 2.0~2.5kg のカニクイザル 7 匹を使用した。実験にさきだち、ツベルクリン反応、糞便中の寄生虫卵およびウイルス、ポリオに対する血清中和抗体を検索し、いずれも陰性であることを確認した後使用した。

ワクチンはすべてカテーテルを用いて直接猿の胃内に注入した。実験 I は 3 匹の猿 (A, B, C) に対して trivalent vaccine 2 ml 宛を投与し、実験 II では 2 匹の猿 (D, E) に monovalent vaccine の各型 2 ml ずつを混合して計 6 ml を投与した。実験 III は少量投与実験で、猿の体重 1 kg あたりのワクチン投与量が幼児の体重 1 kg あたりの投与量にほぼ等しくなるように monovalent vaccine の各型 0.4 ml ずつを混合して計 1.2 ml を F 猿に対して投与した。

他の一匹は対照猿として無処置で別に飼育した。

3) 組織培養法; Scherer の試験管組織培養法¹⁸⁾ を応用し、細胞は予研北岡博士より分与された FL 細

* 大阪大学医学部小児科学教室 (主任 西沢義人教授)

(本論文の要旨は昭和35年4月第34回日本伝染病学会総会 (大阪) および同年7月小児ウイルス疾患の研究、研究班第1回協議会 (東京) において発表した)

胞を使用した。細胞の増殖用培養液としては LE (Earle's solution + 0.5% Lactalbuminehydrolysate) に牛血清 (56°C 30分非働化) を 20% に加えたものを使用し、ウイルス接種後の細胞維持液としては、LE に非働化仔牛血清を 2% に加えたものを使用した。いずれの培養液にも Penicilline 200 u/ml, Streptomycine 200 γ /ml を添加した。

4) ウイルスの分離；細胞が単層に増殖した試験管の培養液を維持液 1 ml で交換した後、検体 0.5 ml ずつを 2 本の試験管に接種した。血液は股動脈血をガラス玉の入った滅菌瓶の中で約 3 分間振盪して脱線維したものを接種し、髄液は後頭下穿刺によつて採取後ただちにそのまま接種した。糞便は Hanks 液で 20% 乳液とし、咽頭分泌物は綿棒を以て咽頭より採取した分泌物をただちに少量の Hanks 液に浸し、尿はそのまま、いずれも 3,000 r.p.m., 30分間遠沈して、その上清に Penicilline 500 u/ml, Streptomycine 500 γ /ml の割合に添加し、4°C の氷室に 1 晩放置した後接種した。

猿の剖検に際して得られた脳、脊髓、心、肺、肝、脾、腎、腸間膜リンパ節、小腸、大腸、扁桃腺、筋肉、小腸内および大腸内糞便の一部を乳鉢で磨碎し、Hanks 液で 20% 乳液とし、その遠沈上清を用いて、これら臓器からのウイルスの分離を行なった。

検体を接種した試験管は 10 日間毎日顕微鏡下で観察を行ない、細胞変性を認めたものは、ただちに継代接種を行なった。2~3 代にわたつて定型的なポリオの細胞変性を確認したものを陽性と判定した。

5) 分離ウイルスの同定；分離ウイルスの 50 倍稀釈液とポリオ標準免疫血清の 50 倍稀釈液の等量を混合して 37°C 30 分間静置した後、その 0.2 ml ずつを 2 本の組織培養試験管に接種し、4 日目に判定を行なった。標準免疫血清は伝染病研究所試験製造室で製造された免疫猿の乾燥血清粉末で 1 アンプルを 0.5 ml の蒸留水に溶解したものを原液として保存した。100 TCD₅₀ の homotype のポリオウイルスに対する血清の中和能力は I 型 6400 倍、II 型 12800 倍、III 型 12800 倍である。

6) 中和抗体値の測定；無菌的に採取した猿の股動脈血より分離した血清を 56°C 30 分間非働化した後、Hanks 液で 5 倍より始まる 5 倍段階稀釈を行ない、これに 100 TCD₅₀/0.1 ml のウイルス液の等量を混じ、37°C、1 時間静置した後、その 0.2 ml ずつを 2 本の組織培養試験管に接種した。判定は 4 日目に行ない、中和抗体値は被検血清の稀釈倍数をもつてあらわした。

抗原として用いたポリオウイルスは、1958 年に北岡博士より分与されたもので、I 型は Brunhilde 株 (TCD₅₀ は 10^{-7.5})、II 型は MEF₁ 株 (TCD₅₀ は 10^{-6.5})、III 型は Leon 株 (TCD₅₀ は 10^{-6.5}) である。

7) 補体結合抗体値の測定；測定の術式は Kolmer の変法⁷⁾を用いた。すなわち Veronal 緩衝液をもつて 4 倍に稀釈した被検血清を 60°C、20 分間非働化した後、4 倍より始まる 2 倍段階稀釈を行なったもの 0.1 ml、2 単位を含む抗原 0.1 ml および 2 単位を含む補体 0.1 ml を混合し、14~18 時間 4°C に静置し、その後綿羊血球を 3% に含む感作血球液 0.2 ml を加えて 37°C の恒温槽に 30 分間ひたした後、75% 以上溶血阻止をもつて陽性と判定した。抗原は中和試験に用いたと同じ株を FL 細胞に感染させ 48~72 時間後に採取し凍結融解を 2 回行ない、3,000 r.p.m., 30 分間遠沈し、その上清をさらに 4°C で 10,000 r.p.m., 30 分間遠沈し、上清の box titration を行なった後使用した。

なお D, E, F 猿の血清では 56°C、5 分加熱抗原も使用した。

実験に使用したポリオの補体結合抗体陽性血清は伝研内田博士より分与されたものである。

8) 実験猿の臨床的観察；ワクチン投与後毎日 2 回体温を肛門で測定し、また麻痺の有無、元気、食欲等の一般状態を観察した。血液検査は耳朶で行なった。髄液はエーテル麻酔下の後頭下穿刺によつて採取し、その 1 滴を直接 Fuchs-Rosenthal 計算板に滴下して細胞数を概算し、さらに 1 滴でグロブリン反応を行ない、残った髄液をウイルス分離実験に使用した。

9) 病理組織学的検索；ワクチン投与後、A 猿および D 猿は 5 日目、B 猿、E 猿、F 猿は 10 日目、C 猿は 29 日目にそれぞれエーテル麻痺下に心臓穿刺を行なつて失血死させ、ただちに解剖した。

臓器の固定には 10% ホルマリンおよび 80% エチルアルコールを用い、染色は Hematoxylin-Eosin 染色を主とし、そのほかに Methylgreen-Pyrolin 染色 (核酸染色)、Sudan III 染色、Nissl 染色、Bielschowsky 神経原線維染色、Pal-Weigert 髄鞘染色を行なった。

実験成績

1) 実験猿の臨床経過；(第 1 表~第 6 表)

いずれの猿においても麻痺を認めず、発熱もなく、一般状態に著変を認めなかつた。血液像ならびに髄液所見にも異常なく、感染を疑わせるような所見はみられなかつた。

Table 1 Laboratory tests and clinical symptoms of Monkey A.

Days after adm.	Bef.	1	2	3	4	5
Blood						
Hb. (Sahli%)	70	73	64	68	65	70
R. B. C. ($\times 10^4$)	590	539	590	634	586	447
W. B. C.	21,100	13,900	17,200	22,600	20,000	13,700
Differential count (%)						
Bas.	0	0	0	0	0	0
Eos.	3	1	1	3	1	4
St.	0	0	3	1	1	0
Seg.	71	54	58	50	62	67
Lymph.	26	45	37	44	34	29
Mon.	0	0	1	2	1	0
Pl.	0	0	0	0	1	0
Spinal fluid						
Pandy						(-)
Polymorph.						0
Lymph.						0
Temperature	37.1	37.0	36.0	35.4	35.2	34.4
Paralysis	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Appetite	← Somewhat poor →	← Good →	← Somewhat poor →	← Poor →		
Activity	← Somewhat poor →	← Good →	← Poor →			

Table 2 Laboratory tests and clinical symptoms of Monkey B.

Days after adm.	Bef.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Blood											
Hb. (Sahli %)	75	66	79	60	60	67	67	75	75	65	68
R. B. C. ($\times 10^4$)	864	432	676	490	503	533	518	608	526	554	443
W. B. C.	31,000	24,500	13,100	18,500	26,000	24,200	16,800	18,700	22,000	38,400	19,100
Differential count (%)											
Bas.	0	2	0	2	0	0	2	1	0	0	0
Eos.	0	1	2	4	1	2	1	2	7	1	1
St.	0	0	3	2	1	1	1	0	1	1	1
Seg.	58	60	35	54	61	68	56	49	64	72	58
Lymph.	42	37	59	36	36	29	40	47	27	25	40
Mon.	0	0	1	2	1	0	0	1	1	1	0
Pl.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Spinal fluid											
Pandy							(-)		(-)		(-)
Polymorph.							0		0		0
Lymph.							0		0		0
Temperature	38.0	37.8	37.1	36.9	37.1	37.0	37.3	36.5	37.1	37.9	36.0
Paralysis	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Appetite	←	Good					→				
Activity	←	Good					→				

Table 3 Laboratory tests and clinical symptoms of Monkey C.

Days after adm.	Bef.	1	2	3	4	5	6	7	9	12	16	20	24	28
Blood														
Hb. (Sahli %)	97	95	75	75	75	68	63	67	63	64	55	85	75	75
R. B. C. ($\times 10^4$)	530	573	589	565	530	468	375	502	452	464	435	534	510	564
W. B. C.	13,400	17,900	18,360	16,800	16,100	18,200	12,400	13,400	15,800	28,100	12,500	16,700	19,000	21,900
Differential count (%)														
Bas.	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Eos.	6	4	4	7	5	5	3	4	0	0	1	0	3	2
St.	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	1	0	1	2
Seg.	29	63	51	54	49	60	43	59	73	69	59	58	84	64
Lymph.	64	33	43	38	45	35	54	34	26	30	37	42	12	32
Mon.	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
Pl.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Spinal fluid														
Pandy								(+)	(-)	(±)				(-)
Polymorph.								0	0	0				0
Lymph.								0	0	4				0
Temperature	38.5	37.8	37.7	37.7	37.9	37.4	37.5	36.4	37.4	37.2	37.6	35.8	35.8	37.2
Paralysis	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Appetite	←———— Good —————→													
Activity	←———— Good —————→													

Table 4 Laboratory tests and clinical symptoms of Monkey D.

Days after adm.	Bef.	1	2	3	4	5
Blood						
Hb. (Sahli %)	90	86	83	88		77
R. B. C. ($\times 10^4$)	711	796	692	654		652
W. B. C.	15,100	11,700	14,100	9,400		12,500
Differential count (%)						
Bas.	0	0	0	0		0
Eos.	1	1	0	0		0
St.	0	1	0	1		0
Seg.	32	45	31	25		39
Lymph.	66	51	69	63		60
Mon.	1	2	0	1		1
Pl.	0	0	0	0		0
Spinal fluid						
Pandy			(±)	(±)		
Polymorph.			0	0		
Lymph.			8	5		
Temperature	39.0	39.1	38.5	38.1	38.9	39.1
Paralysis	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Appetite	←———— Good —————→ ← Somewhat poor → ←———— Good —————→					
Activity	←———— Good —————→					

Table 5 Laboratory tests and clinical symptoms of Monkey E.

Days after adm.	Bef.	1	2	3	5	7	10
Blood							
Hb. (Sahli %)	94	84	85	85	82	86	82
R. B. C. ($\times 10^4$)	695	630	590	565	697	600	548
W. B. C.	20,600	15,600	14,500	11,200	12,200	9,750	11,800
Differential count (%)							
Bas.	0	0	0	0	0	0	0
Eos.	0	3	1	1	3	4	3
St.	0	0	0	0	0	0	0
Seg.	49	34	30	33	24	42	37
Lymph.	51	62	69	64	73	54	58
Mon.	0	1	0	2	0	0	2
Pl.	0	0	0	0	0	0	0
Spinal fluid							
Pandy		($\pm$)	(-)	($\pm$)		(-)	(-)
Polymorph.		0	0	0		0	0
Lymph.		$\frac{4}{3}$	5	11		3	4
Temperature	38.7	39.1	39.1	40.1	39.9	39.3	38.8
Paralysis	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Appetite	←			Good			→
Activity	←			Good			→

Table 6 Laboratory tests and clinical symptoms of Monkey F.

[illegible]

Table 7 Virus isolation from blood, spinal fluid, feces, urine, and throat.

	Monkey	Days after adm.	Bef.	1	2	3	4	5	7	10	15	20	29
Exp. I	A	Blood		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)					
		Spinal fluid						(-)					
		Feces	(-)	(mix)	(mix)	(-)	(-)	(-)					
		Urine					(-)						
		Secretions of the throat						(-)					
	B	Blood			(-)	(-)	(-)	(-)	(-)				
		Spinal fluid						(-)	(-)	(-)			
		Feces	(-)	(mix)	(mix)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)			
		Urine						(-)		(-)			
	C	Blood			(-)	(-)	(-)	(-)	(-)				
		Spinal fluid							(-)	(-)			(-)
		Feces	(-)	(mix)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
		Urine				(-)		(-)		(-)			(-)
		Secretions of the throat						(-)		(-)	(-)	(-)	
Exp. II	D	Blood		(-)	(-)	(-)		(-)					
		Spinal fluid		(-)	(-)	(-)							
		Feces	(-)	I	(-)	(-)		(-)					
	E	Blood		(-)	(-)	(-)		(-)	(-)	(-)			
		Spinal fluid		(-)	(-)	(-)		(-)	(-)	(-)			
		Feces	(-)	II	I	(-)		(-)	(-)	(-)			
Exp. III	F	Blood		(-)	(-)	(-)		(-)	(-)	(-)			
		Spinal fluid		(-)	(-)	(-)		(-)	(-)	(-)			
		Feces	(-)	(-)	(-)	(-)		(-)	(-)	(-)			
Cont.	Cont.	Feces	(-)										

(mix) indicates isolation of polioviruses of more than 2 types.

2) ウィルス学的, 免疫血清学的検索成績; (第7表~第10表)

実験猿の血液, 髄液, 尿, 咽頭分泌物からのウィルス分離実験の結果はすべて陰性であった。糞便からはワクチンの少量投与を行なったF猿以外の5匹の猿において投与後1~2日間にわたってポリオウィルスを分離することができた。しかし3日目以後の糞便からはウィルスを証明することはできなかった。

分離ウィルスの typing の結果, A, B, C 猿の糞便より分離したウィルスはいずれも2種以上のポリオウィルスが混合していたため型別不能であったがこれらのウィルスをマウスの脊髄内に接種すると1日ないし

7日の潜伏期をもつて四肢の弛緩性麻痺をきたし間もなく死亡した。発病マウスの脳脊髄乳液の typing の結果はいずれもI型であった。D猿においてワクチン投与翌日の糞便より分離したウィルスはI型であり, E猿においては投与後1日目の糞便からはII型, 2日目の糞便からはI型をそれぞれ分離した。(第7表)

血清中和抗体値の上昇は軽度でA猿の5日目とB猿の10日目の血清でIII型のみに対して4倍の上昇を認めた。(第8表)

補体結合抗体は生ウィルス抗原を用いた場合にE猿の10日目の血清でI型に対して4倍の上昇を示したほかはすべて陰性であり, また56°C, 5分加熱抗原を用

Table 8 Serum neutralizing antibody levels.

	Exp. I									Exp. II						Exp. III			Cont.		
Monkey	A			B			C			D			E			F			Cont.		
Types	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Days	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Before	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	4 ×	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
10				(-)	(-)	4 ×	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15							(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
20							(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
28							(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(-) indicates levels less than 4.

Table 9 Serum CF antibody levels. (live virus antigen used.)

Monkey	Exp. I									Exp. II						Exp. III		
	A			B			C			D			E			F		
	Types																	
Days	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Before	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)									
10				(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)				4×	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15							(-)	(-)	(-)									
20							(-)	(-)	(-)									
28							(-)	(-)	(-)									

(-) indicates levels less than 4.

Table 10 Virus isolation from tissues.

Monkey	Exp. I			Exp. II		Exp. III	Control
	A	B	C	D	E	F	
Tissue							
Cerebrum	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Spinal cord	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Heart	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
Lung	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
Liver	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
Spleen	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
Kidney	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
Mesenteric lymph nodes	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
Small intestine	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
Large intestine	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
Feces in small intestine	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
Feces in large intestine	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Tonsil	(-)	(-)	(-)				
Muscle	(-)	(-)	(-)				

いた場合にも上昇例を認めなかつた。(第9表)

剖検時採取した臓器ならびに腸管内の糞便からのウイルス分離実験の結果はすべて陰性であつた。(第10表)

3) 病理組織学的所見;

a) 肉眼的所見; 剖検時猿の体重は 2,000~2,500g で臓器の重量は、大脳50~60gr, 心臓 6~8 gr, 肺臓, 左 4~6 gr, 右 5~8 gr, 肝臓 50~60gr, 脾臓 2~6 gr, 腎臓左右共 3~6 gr であつた。

肉眼的には、A猿の肝臓に黄色調を認め、F猿の小腸粘膜に小出血斑を認めた以外には特に変化を認めなかつた。脳および脊髄はいずれも肉眼的には異常を認めなかつた。

b) 病理組織学的所見;

中枢神経系の所見を第11表に、その他の臓器の所見を第12表に要約しあわせてワクチン投与後の日数による病変の差を比較検討した。

大脳; 特に前中心回転を中心に検索したが神経細胞

Table 11 Histological findings of nervous system of vaccinated monkeys.

			Exp. I			Exp. II		Exp. III	Cont.
		Monkey	A	B	C	D	E	F	Cont.
Spinal cord	Cervical	Number of neuron decrease	(+)	(+)	(±)	(±)	(+)	(±)	(-)
		Degeneration of nerve cell	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
		Neurophagia	(+)	(-)	(+)	(-)	(±)	(+)	(-)
		Demyelinization	(-)	(-)	(±)	(-)	(-)	(-)	(-)
		Gliosis	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
		Hyperemia	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
	Thoracal	Number of neuron decrease	(±)	(+)	(±)	(±)	(±)	(±)	(-)
		Degeneration of nerve cell	(±)	(+)	(+)	(+)	(±)	(±)	(-)
		Neurophagia	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(±)	(-)
		Demyelinization	(-)	(-)	(±)	(-)	(-)	(-)	(-)
		Gliosis	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(±)	(-)
		Hyperemia	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
	Lumbal	Number of neuron decrease	(-)	(+)	(±)	(±)	(+)	(±)	(-)
		Degeneration of nerve cell	(±)	(+)	(+)	(+)	(+)	(±)	(-)
		Neurophagia	(-)	(-)	(+)	(-)	(±)	(±)	(-)
		Demyelinization	(-)	(-)	(±)	(-)	(-)	(-)	(-)
		Gliosis	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
		Hyperemia	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
	Sacral	Number of neuron decrease	(-)	(-)	(-)	(-)	(±)	(±)	(-)
		Degeneration of nerve cell	(±)	(-)	(±)	(-)	(±)	(+)	(-)
		Neurophagia	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(±)	(-)
		Demyelinization	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
		Gliosis	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
		Hyperemia	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
Cerebrum		←—————Not remarkable—————→							
Cerebellum		←—————Not remarkable—————→							
Medulla		←—————Not ramarkable—————→							

の変性および神経膠細胞増殖，充血などの所見を認めなかつた。脳膜および脈絡叢にはほとんど充血や炎症細胞の浸潤はなかつた。

小脳； 歯状核，ブルキンエ細胞の変性は特に認めなかつた。

脊髓； すべてのワクチン投与猿において，神経細胞の変性は後角神経細胞群より前角神経細胞群に多く認められ，その変化としては一般に神経細胞数の減少，神経細胞の膨化および萎縮，Nissl 小体の崩壊，消失，空泡および脂肪顆粒の出現，核の偏在，濃縮，消失，神経原線維の不染，凝集，神経細胞の貪食，神

経膠細胞の増殖などがみられ，血管系の反応としては充血，出血を認めた。しかしながら単球，リンパ球等の炎症細胞の浸潤は全例に認められなかつた。

いずれの猿においても病変は頸髄および腰髄において他の部分より著明であつた。特にC猿では神経細胞の変性および貪食がもつとも著明であり，またF猿では神経膠細胞の増殖，血管の充血およびその周囲の出血が認められた。

以上の所見はポリオウイルスによる定型的な脊髄前角炎に比較すればきわめて軽度ではあつたが対照猿との間には，あきらかに差異を認めることができた。

Table 12 Histological findings of vaccinated monkeys.

	Monkey	Exp. I			Exp. II		Exp. III	Cont.
		A	B	C	D	E	F	Cont.
Small intestine	Inflammation	(+) in part	(±)	(±)	(+)	(±)	(+)	(干)
Large intestine	Inflammation	(+)	(±)	(±)	(+)	(±)	(+)	(干)
	Hypertrophy of lymphfollicle			(+)				
Liver	Fatty deg.	(+)			(+)		(+)	
	Fatty infiltr.		(±)	(±)		(±)		(+)
	Cell infiltrat. of portal triad				(+)		(+)	
Mesenteric lymphnodes	Tissue reaction	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(±)
Spleen	Tissue reaction	(+)	(+)	(+)	(±)	(+)	(+)	(+)
Lung	Bronchopneumonia	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(±)	(-)
Heart		← Not remarkable →						
Kidney		← Not remarkable →						
Adrenal		← Not remarkable →						

小腸： 粘膜上皮には変性がみられ、粘膜間質は浮腫状となり、リンパ球、単球を主とする炎症細胞の浸潤があり、組織球内にエオジン嗜好性の微細顆粒の出現を認めた。（この微細顆粒は Methylgreen-Pyrolin 染色で赤く染まる）粘膜下組織も浮腫状となり、リンパ濾胞の増生、充血および上記炎症細胞の浸潤を認めた。比較的炎症の強いものには筋層内血管周囲および漿膜に軽度の炎症細胞の浸潤がみられ、特にA猿では神経叢に出血および単球、リンパ球の浸潤を認めた。

大腸： 粘膜上皮の変性、剝離、粘膜下組織の細胞浸潤等小腸とほぼ同様な所見を認めたが、組織球内のエオジン嗜好性顆粒を認めず、一般にリンパ濾胞の増生が著明であつた。

腸間膜リンパ節： リンパ濾胞は増生し、胚中心は拡大し、一部のものにはエオジン嗜好性物質の沈着を認めた。洞内にはリンパ球、形質細胞および網内皮細胞の増生を認め、赤血球貪食像もみられた。

肝臓： A, D, F 猿では肝細胞内に微細な脂肪顆粒を認め、その他では脂肪滴の浸潤を認めた。一般に星細胞は軽度増殖し、D, F 猿ではグリソン氏鞘へのリンパ球、単球の浸潤を認めた。

脾臓： リンパ小節は増生し胚中心の拡大が見られ、胚中心内には、エオジン嗜好性物質の沈着を認め

た。洞内にはリンパ球、形質細胞および軽度の好中球の浸出があり、網内皮細胞の増殖も認めた。時には赤血球貪食も見られた。

その他の臓器では、A, E, F 猿の肺に軽度の肺炎像を認めたほかには、心、腎、副腎などいずれも異常所見を認めなかつた。

考 按

私は Cox vaccine を猿に経口投与して、臨牀的、ウイルス学的に感染の有無を追跡するとともに、剖検によつて脊髄をはじめ全臓器の反応を詳細に検討した。

その結果発熱、麻痺を認めず、血液像、髄液所見に異常なく、また血液、髄液からのウイルスの分離にも成功しなかつた。糞便へのウイルス排泄期間はワクチン投与後1乃至2日の短期間のみであり、また中和抗体値、補体結合抗体値の上昇も軽度で、ワクチンをヒトに投与した場合の岡島¹⁵⁾の成績とはかなり相違するが、Lansing 株を猿に経口投与した北岡⁸⁾の報告でも、viremia を証明し得たにもかかわらず糞便へのウイルス排泄期間は24時間までであり、中和指数の上昇は1.2にすぎなかつた。

Lansing 株経口投与猿における病理組織学的所見については、すでに西沢¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾、真島¹¹⁾、陳³⁾等の詳細

な報告があり、生ウイルスワクチン接種猿における病変については、脳内および脊髄内接種によるものであるが、ポリオの virulent strain 接種による病変と類似していると報告されている¹⁰⁾。ワクチン経口投与猿において私の得た所見はきわめて軽度ではあつたが脊髄の主として頸髄、腰髄前角部ならびに小腸、大腸、腸間膜リンパ節、肝、脾などの臓器に前記の報告に類似したポリオウイルスによるものと思われる病変を認めた。また小腸、大腸の粘膜組織では、炎症細胞の浸潤を見、腸間膜リンパ節には洞炎の所見を認めた。これらの所見については、真島¹¹⁾は、Lansing 株投与猿において同様の所見を観察してこれらの部位でウイルスの増殖が起つたことを推定している。

これらの所見は、A, B, C 猿で得た結果を、D, E 2 匹の猿によつて追試確認したものであり、さらに少量投与を行なつた F 猿でもほぼ同様の所見を得た。

なお脊髄および臓器からポリオウイルスを分離し得なかつたが、このことについて弱毒生ウイルスワクチンを猿の脳内および脊髄内に接種した場合には virulent strain の場合の如く必ずしも病理組織学的所見に平行してウイルスを分離し得ないという報告もあり¹⁰⁾、また組織培養における接種材料乳液の濃度を増すとか、観察期間を延長するなど実験方法の改良によつてウイルス分離が可能となるかも知れない。

実験猿における以上の成績から Cox の trivalent vaccine をヒトに投与する場合には多少の危険性が感じられる。その理由の 1 つとしてはワクチンそのものがなお若干の向神経性を有していることがあげられるが、いま 1 つの理由はポリオの I, II, III 型を混じた trivalent vaccine を用いたこと、および monovalent vaccine の I, II, III 型を同時に混合投与したことにあると思う。Sabin vaccine で現在まで事故をみていないのは、I, II, III 型を分割投与している点も考慮すべきである。したがつて現段階においては、Sabin vaccine, Cox vaccine を問わず 3 型を 1 度に投与することは望ましくないと思う。その理由の説明については、今後の研究にまたねばならない。

結 論

1) 6 匹のカニクイザルに Cox のポリオ弱毒生ウイルスワクチンを投与したが麻痺、発熱などポリオの感染を疑わせる症状は全く認めず、また血液像、髄液所見にも異常を認めなかつた。

2) ワクチン投与後、猿の血液、髄液、糞便、尿、

咽頭分泌物からのウイルス分離を試み、5 匹の猿の糞便からワクチン投与後 1～2 日間ポリオウイルスを証明したが、他の材料からは証明し得なかつた。

3) 血清中和抗体値は、A 猿の 5 日目と B 猿の 10 日目の血清において III 型ポリオに対してのみ 4 倍まで上昇を認めた。また補体結合抗体値は E 猿の 10 日目の血清において I 型に対して 4 倍の上昇を認めた。

4) ワクチン投与猿の剖検時に採取した臓器ならびに腸管内糞便からのウイルス分離実験はすべて陰性であつた。

5) 病理組織学的検索の結果、脊髄では主として頸髄、腰髄の前角細胞群において、神経細胞数の減少、神経細胞変性、神経細胞貪喰像を認めた。また腸管系の粘膜組織には炎症細胞の浸潤を認め、腸間膜リンパ節にも洞炎の所見を認めた。

終りに臨み御指導および御校閲を賜つた西沢教授、荒木教授、陳講師に心から感謝いたします。また材料を御提供下さつた日本レダリー伊藤部長、ならびに教室の兄玉助教授、牧講師、真島博士に謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Barr, H., Kleinman, H., Johnson, E. A., Maurico Martin da Silva & Kimball, A. C.: The use of orally administered live attenuated polioviruses as a vaccine in a community setting. J. Am. M. Assn. **170**, 893-905, 1959.
- 2) Cox, H. R.: Poliomyelitis: Its control and prevention, Symposium, Active immunization against Poliomyelitis. Bull. New York Acad. Med. **29**, 943-960, 1953.
- 3) 陳震東: ビールス性炎症の形態学的表現について—脊髄前角炎を中心とした向神経ビールス性炎症の形態学的研究—京都医学会雑誌, **5**; 133~140, 1954.
- 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 1949.
- 5) Elipse, M. E., Erickson, G. M., Hoffert, W. R., Sigel, M. M., Schneider, N. J., Clayton, L. B., Menzin, A. W., Markush, R. E., Howell, F. Jr., Crossley, M. I., Cato, T. E., Hardy, A. V., Evans, F. J.: preliminary report on a large-scale field trial with the oral Cox-Lederle attenuated poliomyelitis vaccine in Dade County (Miami), Florida. Live Poliovirus Vaccines, Second International Conference. Scient. Pub. no. 50 of the Pan American Health Organization pp 435-444, 1960.
- 6) Koprowski, H., Jervis, G. A. and Norton, T. W.: Immune responses in human volunteers upon oral administration of rodent-adapted strain of polio. yelitis virus, Am,

Fig. 1 Cervical cord of Monkey A. H-E stain. Nerve cell swells and nucleus becomes eccentric.

Fig. 2 Cervical cord of Monkey F. H-E stain. Degeneration of nerve cells and slight gliosis.

Fig. 3 Cervical cord of Monkey A. H-E stain. Neurophagia.

Fig. 4 Lumbar cord of Monkey F. H-E stain. Hyperemia, but no infiltration of inflammatory cells.

Fig. 5 Lumbar cord of Monkey A. Bielschowsky stain. Degeneration of nerve cell and axis cylinder.

Fig. 6 Cervical cord of Monkey D. Nissl stain. Nissl granulars disappear, and clumped together.

Fig. 7 Small intestine of Monkey E. H-E stain. Leucocytes and plasma cells infiltration in mucous and submucous tissues.

Fig. 8 Large intestine of Monkey C. H-E stain. Hypertrophy of lymphfollicle. Lymphocytes and plasma cells infiltration in mucous membrane.

Fig. 9 Mesenteric lymphnode of Monkey A. H-E stain. Hypertrophy of germinal center and slight reticulosis.

Fig. 10 Spleen of Monkey A. H-E stain. Hypertrophy of germinal center. Lymphocytes and plasma cells infiltration in sinus, and slight reticulosis.

Fig. 11 Liver Monkey of D. H-E stain. Fatty degeneration of liver cells and lymphocytes and plasma cells infiltration in portal triad.

Fig. 12 Liver of Monkey A. H-E stain. Fatty degeneration of liver cells.

J. Hygiene **55**, 108-126, 1952. 7) 甲野礼作: ウイルスの血清反応の実際(Ⅱ) 臨床検査 **2**; 523~529, 1958 8) 北岡正見, 三浦悌二, 堀菊子: 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— ウイルス **4**; 204~209 1954 9) Melnick, L.J., and Brennan, J.C.: Monkey neurovirulence of attenuated poliovirus vaccines being used in field trials. Live Poliovirus Vaccine, First International Conference. Scient. Pub. no. 44. of the Pan American Health Organization. pp. 65-101, 1959. 10) Murray, R., Kirchstein, R., Van Hoosier, G. Jr., Baron, S.: Comparative virulence for rhesus monkeys of polio virus strains used for oral administration. Live Poliovirus Vaccine, First International Conference. Scient. Pub. no. 44. of the Pan American Health Organization. pp. 39-64, 1959. 11) 真島栄一: 急性灰白髄炎の感染経路に関する研究, 大阪大学医学雑誌, **9**: 1011~1016, 1957 12) 西沢義人: 急

性灰白髄炎の臨床および治療, 日本伝染病学会誌, **26**: 1~8, 1952 13) Nishizawa, Y. & Okano, K.: The significance of viremia in the pathway of infection of poliomyelitis. Archives of Pediatrics **70**, 71-80, 1953. 14) Nishizawa, Y. & Majima, E.: Studies on the pathway of infection of poliomyelitis. Archives of Pediatrics, **74**, 449-455, 1957. 15) 岡島慎治: 健康乳幼児に対するポリオ弱毒生ウイルスワクチンの作用, ウイルス11巻5号掲載予定, 1961 16) Sabin, A.B.: Present status of attenuated live-virus poliomyelitis vaccine. J. Am. M. Assn. **162**, 1589-1596, 1956. 17) Salk, J. E.: Studies in human subjects on active immunization against poliomyelitis. 1. A preliminary report of experiments in progress. J. Am. M. Assn. **151**, 1081-1098, 1953. 18) Scherer, W.F., Syverton, J.T., & Gey, G.O.: Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis virus. J. Exp. Med., **97**, 695-709, 1953.

1960年阪大病院におけるインフルエンザ 生ワクチン予防接種について

中 村 観 善*・奥 野 良 臣*

KANZEN NAKAMURA and YOSIOMI OKUNO: VACCINATION WITH
LIVE ATTENUATED INFLUENZA VIRUS AT THE OSAKA
UNIVERSITY HOSPITAL IN 1960.

〔受稿 3月6日 1961〕

緒 言

1960年2月下旬より各地にインフルエンザの流行が始まった。この時分離されたウイルスはすべてインフルエンザA2であつた。阪大病院においても3月初旬よりインフルエンザ様の疾患が流行し始め、一罹患者よりA2型インフルエンザウイルスを分離することに成功した。流行が更に大きくなることが予想されたので総婦長よりその対策について相談を受けた。前に報告した如く³⁾ 我々の教室では生ワクチンによる予防接種がすでに実施の段階にあつたので、これを実施することになった。

材料及び方法

ワクチン: 奥田株³⁾ 鶏卵継代92代, 98代及び143代, 衣笠株³⁾ 119代の材料を用いた。ワクチンは感染漿尿液を集め3,000 rpm 20分遠心しその上清を用いた。ワクチンの力価は1 ml 当り 10^9 - $10^{9.5}$ EID₅₀, 4096 HAUであつた。

接種方法: ネブライザーをコンプレッサーに連結し、ネブライザーの管口を被接種者の鼻孔の前約2 cmに保持し、ワクチンを微細な霧状にして10秒間吸入させた。噴霧使用した材料は1人につき0.01-0.06 mlであつた。

* 大阪大学微生物病研究所ウイルス学部