シミアンウイルスの研究: SV₄₁ の性状ならびに ヒト及び各種動物における SV₄₁ 抗体の検索

伊 東 平 八・森 本 義 雄
土 居 穰・三 瓶 恒 雄

STUDIES ON SIMIAN VIRUSES: SOME PROPERTIES OF SV 41 GROWN IN VERO CELL CULTURES AND SEARCH FOR SERUM NEUTRALIZING ANTIBODIES IN HUMANS AND VARIOUS ANIMALS

Heihachi ITOH, Yoshio MORIMOTO, Yutaka DOI and Tsuneo SANPE

Toshiba Institute of Biological Science

Gosen-shi, Niigata-ken, Japan

(Director: Haruo HASHIMOTO, M. D.)

[受付: 9 月 25 日, 1968 年]

総 括

Vero 細胞に継代増殖させた SV 41 についてしらべた結果、血清学的には交叉中和試験によつて他の Paramyxovirus ウイルスと明瞭に区別でき、(CA ウイルスとの間にみられた交叉は極く弱度のものであつた。)生物学のおよび物理・化学的性状については、初代サル腎細胞で増殖させたウイルスで試験した Miller らの報告におおむね一致する成績を得た。但し、温度抵抗性についての成績は異なつており、50°C 加温で予期に反する抵抗性を示した。ホルマリンに対する抵抗については、通常不活化ワクチンの製造に用いている 0.025 %濃度の条件で容易に不活化される。

1960年から66年に至る間、当所に入つたカニクイザル(東南アジア産)、アカゲザル(パキスタン産)、ミドリザル(アフリカ産)総計321頭、391検体を含めて、産地、採血時期を異にする各種動物の血清中に SV41の中和抗体を認めることはできなかつた。特にこのサル血清の陰性成績は、SV 5 中和抗体陽性の頻度に比べて著しく対照的であつた。すなわち、少くとも頻発するシミアンウイルスとは考えられない成績である。ヒト血清では、しらべた 105 名中陽性者が17名あつたが、その意義は不明で

あり、果して SV41 がヒトの疾患に関係するか否かは今後の検討にまつ。

序 文

サルの初代培養細胞がワクチンの製造に用いられている現状では、新しいシミアンウイルスについての報告を軽卒に見逃がすことはできないし、場合によつてはそのウイルスの性状を自らの手でしらべることも必要になる。すなわち、それによつてワクチンへの混入防止に資することは勿論、サル、その組織、培養細胞およびそれに由来する試料などを取扱う作業者への感染防止に役立つねばならない。

Miller らが報告した SV 41 (Miller ら, 1964) は、これが若しも頻発するシミアンウイルスであるならば十分試験に値いするものと考えられた。

本報は R. M. Chanock (米国 NIH) から分与をうけ、当所において Vero 細胞 (安村, 川喜田, 1963) を通過させたウイルスを用い、(1) この Vero 継代 SV41 の同定、(2) 細胞変性効果 (CPE) の強さや実験動物への病原性試験からヒトへの起病力を推量するデータが得られないかどうか、(3) 不活化ワクチン材料に迷入した時、ホルマリンで容易に不活化されるものであるか、(4) 温度に対して抵抗性のあるウイルスであるか、(5) 飼育サルでの感染の頻度は如何、(6) ヒトへの感染を示唆するデータが得られるかどうかなどの諸点説明のため

* 東芝生物理化学研究所, 所長: 橋本治雄博士
本論文の要旨は第3回日本細菌学会中部支部総会
(1966年10月)において発表した。

に実施した試験成績を記述する。

材料と方法

ウイルス株：

SV 41 は 1966 年 1 月 R. M. Chanock から MK/2 ; HK/4 の継代レベルで分与を受けた。試験成績の大部分は当所で Vero 細胞を 3 ~ 4 代継代したウイルスを用いて得たものである。SV 41 以外の使用ウイルス株の由来については既報した (伊東ら, 1968 a)。

培養細胞：

使用した各種細胞株の由来、初代培養細胞の作製法およびこれらの培養細胞に用いたメヂウムは既報 (伊東ら, 1968a) した通りである。いずれも単層培養を静置法で使用した。

抗血清：

SV41 抗血清は R. M. Chanock から分与されたモルモット血清および他のウイルスに対する抗血清と同様当所で作製したウサギ抗血清を用いた。免疫抗原としてはいずれも生ウイルスを用い、SV41 は Vero 2 代通過のもの、その他のウイルス中、HJV, CA, SV5, HA-1, Mumps, Newcastle Disease Virus (NDV) の各ウイルスは Vero 増殖、HA-2 および Parainfluenza-4 (PI-4) はミドリザル腎初代細胞 (pVK) 増殖のものを使用した。免疫は無希釈の低速遠心上清 5 ~ 10 ml を静脈内に 3 ~ 4 日の間隔で 4 ~ 5 回繰返し、さらに 1 回 1 ~ 1.5 カ月後に追加免疫して 7 ~ 10 日後に採血した。抗原の浮遊メヂウムは M-199 のみか、またはこれにゼラチン 0.1% を加えたものである。

感染価測定：

培養細胞での測定はすべて試験管培養を用い、35 ~ 37 °C に静置した。ウイルスの 10 倍段階希釈を M-199 でつくり、適当な希釈段階を 3 ~ 4 本ずつの試験管培養 (メヂウム 1.0 ml 入り) に 0.2 ml ずつ接種した。成績の項に特記した以外は観察期間は 7 日である。SV41 の CPE は明瞭であるが CPE の score との一致をみる目的でモルモット血球吸着試験 (HAd) (Chanock ら, 1964) を観察最終日に行ない、感染価の算定は HAd の成績に基づいて Reed and Muench 法で行なった。この点は他の Paramyxovirus ウイルス (Andrewes and Pereira, 1967) でも同じである。

中和試験：

SV41 の中和試験は Vero で行なった。その他の異種ウイルスの中和試験中 CA, SV5, HA-1, Mumps, NDV には Vero, HA-2, HJV, PI-4 には pVK を用いた。攻撃用ウイルスは試験宿主系と同じ系で増殖させたものを使用した。56°C 30 分間非働化した血清の希釈を

M-199 でつくり、成績の項で特記しない限り、0.1 ml 当たり約 100 TCD₅₀ の濃度のウイルスと等量混合して室温に 1 時間放置後その 0.2 ml ずつを各血清ウイルス混合えて 2 ~ 3 本の試験管培養に接種し、以後は感染価測定の術式にしたがつた。抗体価を測定する場合は、血清の 2 倍または 4 倍段階希釈を用い、各希釈段階での中和陽性試験管数から Reed and Muench の方法で算定した。

Millipore Filter 濾過試験：

方法はおおむね別報 (伊東ら, 1968b) に詳述したところに拠った。対照として用いた Adeno 3 型ウイルスも Vero 増殖のものを用い、試料の感染価測定も Vero で行なった。

クロロホルム感受性試験：

Feldman and Wang (1961) の方法に準じた。詳細はおおむね別報 (伊東ら, 1968 b) に記述したとおりである。対照として用いた Polio 1 型ウイルス (Brunenders 株) はサル腎初代細胞 (pMK) 増殖のもので、メヂウムは M-199 である。Bovine Albumin や牛血清を含んでいない。感染価の測定にはすべて Vero を使用した。

核酸型試験：

方法の詳細は別報 (伊東ら, 1968b) と同様である。5-iododeoxyuridine (IUDR) を Vero 細胞試験管培養のメヂウム中に濃度が $10^{-4.3} M$ になるように加え、感染価測定の方式、すなわち moi を 10 倍段階に通減させてウイルスを接種し、IUDR によるウイルス増殖の抑制を対照列に比べる方法でみた。なお、CPE の観察のみならず次代に植えついでウイルスの存否を確めた。DNA 型ウイルス対照の vaccinia, 大連-1 株は Vero を 2 代通過したものを用いた。

加温試験：

Vero 増殖の SV 41 と、比較の目的で SV 5 とを試験した。後者も Vero 増殖のものである。0.3 ml ずつの aliquots に分け、3 本ずつを一群として 50°C で種々の時間加温した後、試験管内容を混合して感染価の測定を行なった。術式の細部は Wallis and Melnick (1961) に準じた。加温ウイルスのメヂウムは M-199 (NaHCO₃ 0.15% を含有) のみで血清その他蛋白質の添加物を含んでいない。感染価測定の試験管は 14 日間 CPE を観察し、最終日に HAd を行なつて確認した。

ホルマリンによる不活化試験：

不活化急性灰白髄炎ワクチンおよび不活化麻疹ワクチンの製造でわれわれが通常用いている条件すなわち、0.025% ホルマリン (局方：ホルムアルデヒド濃度 37.5%)、37°C、不活化開始時の pH 7.0 附近という条件で不活化速度を試験した。用いたウイルスのメヂウムは上

記加温試験の場合と同じである。pH を 7.1 にしたウイルス液に 0.5 %ホルマリンを最終濃度が 0.025 %になるように添加混合した後、試験管に 4.0ml ずつ分注し、密栓して 37°C に放置し、指定時間ごとにその 1 本を取り出し、直ちに 2.2 % NaHSO₃ を用いてホルマリンを中和した。ついで、同量の牛血清を安定剤として加えて -20°C に凍結保存、一連のサンプルを同時に融解して試験した。不活化試験に用いたウイルスの遠心、不活化中の振盪混合、試験管口附近に附着するウイルス液の処置、ゴム栓の交換などすべて常法通りに行なつた。感染価の測定は 14 日間 CPE を観察し、最終日に HAd によって確認した。成績の項 Fig. 4 中に加えた他のウイルスについての試験方法はおおむね上記と同様であるが、詳細は別報 (伊東ら, 1968b) に記述した。

成 績

Vero 細胞での SV41 の増殖および細胞変性効果

Fig. 1 CPE of SV41 in Vero Cells: 3 days post-inoculation with 10^{3.5} TCD₅₀ of 4th Vero-passaged virus, unstained, 180×

Fig. 2 CPE and hemadsorption of SV41 infected Vero Cells: 3 days postinoculation with 10^{3.5} TCD₅₀ of 3rd Vero-passaged virus, HE-stained, 450×

Arrow indicates cytoplasmic inclusion

Chanock から送付されたウイルスを M-199 で 2 倍に希釈し、Vero 細胞試験管培養に接種したところ、2 日後に CPE の発現を認め、4 日後には大きい融合細胞が広汎にみられる程度まで進んだ。このとき試験管ごと 1 回凍結融解して得た試料を Vero で感染価測定し、0.2 ml 当り 10^{6.5} TCD₅₀ の価を得た。その後 Vero で継代 5 代におよんだが、感染価はおおよそ同等のレベルを保ち、また、濃厚ウイルス接種の際の CPE の進行速度は上記初代の場合と変りがなかった。

CPE の形態 (Fig. 1) は原ウイルスをサル腎 2 代培養細胞 (sMK) に接種した場合およびさらに sMK に植えつた場合にみられた CPE と同様であり、Miller らの記述したものと差異はない。モルモット血球を用いての HAd は陽性であり、またヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色によってエオジン嗜好性の細胞質内封入体を

Table 1 Cross Neutralization Tests among Paramyxoviruses

Antiserum*	Neutralizing Antibody Titers against								
	SV41	HA-2†	HVJ†	CA	SV 5	HA-1	PI-4†	Mumps	NDV
SV41	1280	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
SV-2	<10	640							
HVJ	<10		1280						
CA	20			1280					
SV 5	<10				1280				
HA-1	<10					5120			
PI-4	<10						113		
Mumps	<10							1280	
NDV	<10								1280

* Immune rabbit sera prepared in this laboratory

† Tested in primary green monkey kidney cultures, all others in Vero cells

Table 2 Millipore Membrane Filtration

Virus Tested	Unfiltered	Avg pore diameter (m μ)		
		220	100	50
SV41	6.2*	2.7	-0.5	NT**
Adeno-3	5.5	4.8	2.5	-0.5

* log TCD₅₀ per 0.2 ml

** Not tested

認めた。(Fig 2)

なお, Chanock から分与された SV41 抗血清を用い, Vero 1, 2, および 4 代のウイルスで行なった中和同定は明らかに成立した。(20倍希釈血清が約 10⁶ TCD₅₀ を中和した)。

交叉中和試験

SV41 と他の Paramyxovirus ウイルスとの間で交叉中和試験を行ないその成績を Table 1 に示した。異種ウイルスの抗血清は CA を除いて 10 倍希釈で SV41 を中和せず, 2 型の CA 抗血清のみが 1:20 の中和価を示した。一方 SV41 の抗血清は異種ウイルスのすべてを試験した最低希釈 1:10 で中和していない。

物理・化学的性状の若干

Millipore Filter 濾過試験:

Table 2 に示すように対照として用いた Adeno-3 型ウイルスは平均孔径 100 m μ の膜を通過したが 50 m μ 孔径を通らず, 一方 SV41 は 100 m μ を通過せず, 220 m μ は感染価の低下があつたが通過している。すなわち, Parainfluenza ウイルスの大きさの範囲に入ること示している。

クロロホルム感受性試験:

成績は Table 3 に示しているが, 対照の Polio 1 型ウイルスではクロロホルム処理による感染価の低下がないのに比べて SV41 では完全に失活し無希釈サンプルで感染性を認めなかつた。

Table 3 Sensitivity to Chloroform

Treatment	SV41	Polio-1
Pre	6.5*	7.5
Post	-0.5	7.5

* log TCD₅₀ per 0.2 ml

核酸型試験:

Table 4 に示すように SV41 は IUDR によつて増殖を抑制されず, 対照として用いた DNA 型の Vaccinia ウイルスは約 2.5 log の抑制を受けた。

加温試験:

Table 4 Nucleic Acid Typing Tests

Virus	Titer (TCD ₅₀ per 0.2 ml)		
	Control	IUDR*	IUDR*+TDR**
SV41	5.67	5.50	5.67
Vaccinia	6.36	3.83	6.50

* Used at 10^{-4.8} M** Thymidine used at 10^{-3.0} M

Fig. 3 Heat Inactivation of SV41 and SV5 at 50°C

Fig. 3 に示すように SV41 は 50°C 加温に抵抗性を示し, 加温 9 時間で加温開始時から 5 log 余りの低下をみたが, なお 10^{1.5} TCD₅₀ の残留を示した。この成績はさらに 2 回繰返した試験でも同様であつた。対照とした SV5 はこれに比べて加温による感染価低下が速かつた。

ホルマリンによる不活化試験:

Fig. 4 に示すように SV41 の不活化速度は速い。Measles にやや劣るが, Polio 1 型および SV5 に比べると不活化され易い成績を得た。出発材料 10^{6.5} TCD₅₀ のものが 2 時間後 10^{5.75}, 6 時間後 10^{4.00}, 12 時間後 10^{1.75}, 24 時間後では無希釈試料接種の試験管が 3 本ともすべて陰性であつた。

各種宿主への感染試験

A) 培養細胞:

Table 5 にみられるように HAd で判定した限りは, しらべた全部の細胞系について大凡 Vero に匹敵する感染価を示した。これに比べると CPE の発現はやや劣

Fig. 4 Inactivation by 0.025% Formalin at 37°C

Table 5 Infectivity Titrations of Vero-grown SV41 in Various Cell Cultures

Cell Cultures Tested	log TCD ₅₀ /0.2 ml by	
	HAd	CPE
Vero	6.75	6.75
sVK	7.50	6.75
GMKL	7.25	7.25
FL	6.00	5.50
HeLa	6.50	5.75
HEp-2	5.75	<2.50
PS	6.25	5.75

sVK: Secondary green monkey kidney culture

GMKL: Green monkey kidney cell line (Yoken)

り、特に HEp-2では試験した最低希釈 10^{-3} では CPE を認め得なかつた。各細胞系での CPE の形態は融合細胞が主であり、濃厚ウイルス接種と高希釈ウイルス接種のものとの間に本質的な差がなかつた。HAd の強さはヒト由来の細胞株において、全般的に弱い傾向がみられたが変性細胞の脱落傾向がサル由来の細胞および PS 細胞に比べて強いことおよび途中液換えを行なっていることも考慮に入れねばならない。

B) ふ化鶏卵:

Vero 4 代通過のウイルスを 5 日卵と 6 日卵の尿液腔に 1,000,000, 10,000, 100, 1 TCD₅₀ の各量 (Vero で測定) で 3 個ずつ接種し、毎日検卵して生死を判定するとともに死卵 (死後新しいもの) および頻死期のものを開卵して、胎児の肉眼的観察と一部について尿液の感染価測定とを行なつた。接種後 7 日間生存したものは開卵して肉眼的にのみしらべた。

Table 6 Susceptibility of Developing Chicken Eggs to SV41

Eggs Tested	Virus Doses Inoculated (TCD ₅₀ in Vero)			
	10 ⁶	10 ⁴	10 ²	10 ⁰
5-day old Egg	●●●● 3 3 3	●●●●● <u>4 4 4</u> *	●○○○ 6	●○○○ 6
6-day old Egg	●●●● 3 3 3	●●●●● <u>4 4 4</u>	●●○○ 5 5	⊗○○○ 3

Open circle indicates survived egg for 7 days, crossed open circle nonspecific death, solid circle death on indicated day postinoculation except one with asterisk which was opened at moribund state of embryo. Allantoic fluids of underlined eggs were titrated for infectivity.

Table 6 に示すように 10,000 TCD₅₀ 以上接種のものは全部、100 TCD₅₀ 接種のものは約半数が死亡した。肉眼的に胎児は暗赤色を呈し、死後新しいもの、および頻死期のもので出血性変化を認めたが、他に著しい変化はなかつた。Table 6 の死亡日数にアンダーラインした 7 個の卵について尿液中の感染価測定を行なつたところ試験最高希釈 10^{-5} で全例すべて CPE および HAd 陽性であつた。このウイルスの同定は SV41 ウサギ抗血清による中和で確認した。

C) 実験動物脳内接種:

Vero 通過 3 ~ 4 代のウイルスを試験した。発症はいずれも髄膜脳炎によるものと判定された。定型的な弛緩性麻痺を呈したものはなかつた。

i) マウス。乳のみマウス (生後 24 時間以内) には 0.01 ml, 成熟マウス (4 週令) には 0.025 ml 接種して観察した。前者ではウイルスを大量 (32,000 ~ 3,200 TCD₅₀) 接種した 6 頭はすべて 3 日後に発症し翌日斃死した。症状は失調による横転、痙攣、振顫などを示すものが多く、哺乳不能に陥る。接種ウイルス量の少ないものでは発症が遅れ、生存日数も延びたが試験した最少量 (3 TCD₅₀) でも 2 頭中 2 頭とも 6 日および 7 日後に発症し 1 ~ 2 日後に斃死した。成熟マウスも発症するが乳のみマウスに比べて感受性が低い。症状は立毛、過敏、興奮状態で、ときに旋回跳躍し、軽度の痙攣をみたものもあ

る。発症から死亡まではおおむね1～2日であるが、軽度のは遷延し勝ちで回復して生残るものもあつた。定型的な発症死をみたのは $10^{1.85}$ TCD₅₀以上を接種されたものであつた。

ii) ハムスター、生後24時間以内のハムスター9頭を3頭ずつの3群に分け、50,000, 500, 5 TCD₅₀ ずつを脳内に接種(0.02ml)したところ全部が2～4日で斃死した。症状は乳のみマウスの場合と類似して、振顫、痙攣などをまじえる痙性麻痺であり、発症後大多数は24時間以内に死んだ。

iii) モルモット、体重250g 前後のモルモット3頭ずつのA、B両群にそれぞれ450,000 および4,500 TCD₅₀ ずつ脳内接種(0.15ml)し観察したところ、いずれも発症し、接種後5～9日に死亡した。症状は立毛、振顫、過敏、興奮状態を呈し、頸部の間代性ないし強直性痙攣や施回運動を行なうものもあつた。A群では発症から死亡までが1～2日であつたが、B群ではやや延長し、発症してから4日後に死亡するものがあつた。

iv) ウサギ、生後2日、ウサギを3頭(A群)、2頭(B群)、2頭(C群)の3群に分け、それぞれ300,000, 3,000, 30 TCD₅₀ ずつ脳内接種(0.1ml)していずれにも発症をみた。症状はモルモットと同様であるが、やや軽度であつた。死亡は接種後5～12日にわたつたが、接種動物の一部は(B群の2頭、C群の1頭)発症確認後屠殺したものがある。これらについては1%脳浮遊液をつくり、Vero細胞に接種してSV41のCPEを認めた。

また、体重1.2kg 前後のウサギ2頭ずつの2群にそれぞれ630,000および6,300 TCD₅₀ ずつを接種したが観察30日の間無症状に経過した。

ヒトおよび各種動物における血清中和抗体の検索

A) サル：

1960年から66年に至る期間に当所に入つたカニクイザル162頭(マレイ、カンボヂヤ、ベトナム産)、アカゲザル6頭(パキスタン産)、ミドリザル153頭(ケニア、ウガンダ産)の血清についてSV41中和抗体の有無をしらべた。採血時の当所到着後日数は区々であり、到着当日から最長455日にわたつている。また個々のサルについての採血回数は1～3回であり、検査血清数は合計391になつた。いずれの血清も1:4希釈でSV41の18～56 TCD₅₀と混合し、室温に1時間放置後Veroの試験管培養2本ずつに接種し型どおりの中和試験を行なつた。接種した試験管が2本とも中和陰性の時、その血清は抗体陰性とし、1本でも中和陽性であるものは抗体陽性にとることにした。

Table 7 に示すようにサルの種別や当所での飼育期間の長短に拘らず321頭(391検体)すべてが抗体陰性であつ

Table 7 SV 41 and SV 5 Serum Neutralizing Antibodies in Laboratory Monkeys

NA* vs.	Months after Arrival					Total
	<1	<2	<3	<4	<5	
SV 41	0/105	0/96	0/46	0/32	0/42	0/321
SV 5	7/105	67/96	42/46	27/32	40/42	183/321

Numerator : Number of positives

Denominator : Number tested

* Neutralizing antibody

Table 8 Conversion of Serum Neutralizing Antibodies among Laboratory Monkeys

NA* vs.	Days after Arrival when Bled	
	<10	>45
SV 41	0/30	0/30
SV 5	0/30	21/30

* Neutralizing antibody

た。Table 7 および 8 には同じサルの血清についてのSV 5 中和抗体の成績を対比させて示した。SV 5 の抗体はSV 41 抗体と異なつて、到着後の飼育日数が増すにつれて陽性率が高まつている。Table 8 には2回採血したサルのうち、第1回採血が到着後10日以内でしかも抗体陰性であつたものから、第2回採血が45日以上のもを抜き出して示した。これらのサルは30頭ともすべてミドリザルである。Table 8 にみられるようにSV 5 抗体の陽転率は飼育期間1.5カ月以上で70%になつているのに拘らずSV 41に対する抗体陽転は全くなかつた。

Table 9 Serum Neutralizing Antibody to SV 41 in Laboratory and Domestic Animals

Animal Species	Number of Animals	
	Tested	Positive*
Monkey	321	0
Cattle	62	0
Horse	7	0
Pig	10	0
Sheep	25	0
Rabbit	185	0
Guinea pig	134	0
Hamster	15	0
Mouse	13	0
Chicken	4	0
Goose	6	0

* Higher than 1 : 4

B) サル以外の動物：

Table 9 に示す各種動物の血清中和抗体をサル血清の場合と同じ方法でしらべた。採血地は大部分新潟県内である。例外として、牛、北海道7頭、米国1頭；馬、東京1頭がある。採血年度は1958年から66年にわたっているが、豚の全部と牛の大多数が62年採血である他は、大部分が1964～66年採血のものである。これらの血清にもすべて1:4希釈で中和抗体陽性のものはなかった。

C) ヒト：

手持ちのヒト血清、すなわち当所職員および家庭の健康者（いずれも新潟県在住）43名（76検体）、新潟大学その他の病院の入院患者（麻疹その他）24名（35検体）、新潟市内の某肢体不自由児施設入院者（急性疾患なし）38名（39検体）、合計105名（150検体）についてサル血清と同じ方法で中和抗体の有無を検査し、なお陽性のものの一部については抗体価を測定した。採血年度は1963年を除いて、1960年から66年にわたっているが、64年（68名）、65年（25名）に集中し、他の年は少数である。Table 10

Table 10 Serum Neutralizing Antibody to SV41 in Humans

Age Group (year)	Number	
	Tested	Positive*
3—6	7	1
7—12	48	7
13—24	34	6
25—39	10	2
40～	6	1
Total	105	17

* Higher than 1:4

は任意の年齢階級別に陽性率を示した。

個人別にみると105名のうち17名が陽性であり、これらの陽性者のうち2回以上採血したものの9名についての成績は、5名は2回の血清ともに陽性、他の4名は別の時期の血清は陰性であったが、陽性の場合の抗体価が低かったことと、採血間隔が不適当に長すぎた例が多いため、例外的の1例（後述）を除いては抗体の変動があつたといひ切れる例はなかった。また、年齢層別の人数が区々であるため不備であるが、陽性者の率が各年齢層に一樣であることが見受けられる。当所職員40名の年齢は14歳以上であり、うち陽性者が8名であること、また、サルの飼育に関係しているもの8名中抗体陽性者は1名であつて特に集積していないこと、麻疹患者10名中SV41抗体陽性者は2名のみであつたことを書き添える。

Table 11の成績はTable 10に示した試験でSV41抗体陽性の血清の抗体価をSV41および他のParamyxovirusウイルスに対して測定したものである。血清の最低希釈1:4から2倍段階希釈をつくり、各ウイルスの約100 TCD₅₀と混合して試験した。血清のあるものでは量不足のため再試験が不能になり終末価を得ていない。Table 11にみられるようにSV41の抗体価と他のウイルスに対する抗体価との関連は不規則で一定したものを見出し難い。ただ、HA-1に対しては全部の血清が高い抗体価をもっていること、SV41抗体価が最高(1:64)の血清が他のHA-2, HVJ, CA, HA-1の各ウイルスに対して高い抗体価を示していること、SV41抗体は同じParainfluenza 2型と考えられているウイルスのうち、SV5抗体よりも、むしろCA抗体に相関があるようにみえることである。

前述したが2回以上採血したヒト血清のうち例外的の

Table 11 Neutralizing Antibodies to Other Paramyxoviruses in SV41-positive Human Sera

Human Subject No.	Age (year)	Neutralizing Antibody Titers vs Paramyxoviruses						
		SV41	SV5	Mumps	HA-2	HVJ	CA	HA-1
1	46	11	—*	—	4	6	45	64
2	26	8	11	16	8	16	45	45
3	23	8	6	>23	6	NT	11	>23
4	19	16	6	—	—	—	11	45
5	12	32	6	11	6	11	>23	>23
6	11	64	6	6	>23	>23	45	>90
7	11	4	4	—	11	>23	11	>90
8	10	4	4	8	11	6	11	64
9	9	4	11	—	—	6	11	45

* —; negative at 1:4 serum

NT; Not tested

1 例は Table 11中に示した No. 3の血清である。この血清サンプルより23日前に採った血清は1:4にで中和陰性であった。また、1年2カ月および3年9カ月後に採った血清も同様陰性であり、SV41 抗体が明瞭に変動したとも言いが、他の2回採血の血清の成績に比べて無視することもできない例である。

考 察

以上の成績から主要点をしばつて言うと、われわれが試験に供した Vero 継代のウイルスが SV41の性状をもち、同定されたこと、および SV41は少くとも頻度の高いシミアンウイルスではないであろうということである。

Vero 継代のウイルスの同定は、Chanock から分与された同種抗血清による中和、異種のウイルスとの間に行なつた交叉中和試験の成績、その他、モルモット血球吸着陽性および、核酸型試験、濾過試験、クロロホルム感受性試験、ホルマリン不活化試験などの成績によつて証せられた。物理・化学的性状についての試験は、初代培養細胞継代のウイルス株に起因する迷入因子否定の意味ももっている。例えば、ホルマリンに抵抗の強い SV 40 の迷入がある場合には、低濃度の混入であつてもわれわれの試験条件下でホルマリンによる不活化は困難であり(未発表データ)、したがつて、このホルマリン不活化試験で発見される筈である。

しかし、これらの試験を行なつても、“タネ”ウイルスの中にわれわれが使用している試験システム(Vero 細胞)で発見されない混入ウイルスがある時は、その否定は不可能である。但し、迷入ウイルス自体は Vero で CPE を起さなくても、共在した場合に SV41 の CPE を増強あるいは変容させるような場合にはその否定は部分的に可能になる(濾過試験によつては、共在ウイルスが SV41 よりも大きい場合：核酸型試験では、共在ウイルスが DNA 型である場合である)。

次に SV41 は少くとも頻発するシミアンウイルスでないことは、Table 7 および 8 に示したサル血清中和抗体の陰性成績、殊に同時に行なつた SV 5 抗体の頻度と対比させて明らかである。したがつて、サルの取扱者やサル腎培養作業者などへの感染の危険ははなはだ少ないものと考えられる。ヒトの血清中にみられた中和抗体が SV 41 そのものの感染によるか、あるいは類縁のビトウイルス感染の結果によるものかは結論できない。

各種宿主に対する病原性試験の成績から、このウイルスが特に強い病原性をもつものであるとすることはできないが、われわれが分離した SV 5 (CPE が強い)について行なつた同種類の動物試験成績(未発表データ)

に比べるとかなり強いものである。もしも野生の SV41 がヒトに感染するものであるならば、警戒を要するものの中に入れておいて然るべきものと思う。同じ群の SV5 型ウイルスがヒト由来の試料から分離され (Schultz & Habel, 1959; Hsiung ら, 1962; Liebhafner ら, 1966), 果してサルだけがもっているウイルスであるかどうか、ヒトの疾患と関係があるのではないかという点に疑問が持たれるが、SV41 についてもこのことを考慮に入れておくべきであろう。

なお、他の試験成績について若干の考察を加える。温度抵抗性であるが、50°C 加温で予期に反する抵抗性を示し、Miller らが易熱性とする成績と異なつた。この理由は不明であるが、ウイルス培養の宿主やメデウムの相異も考えに入れることができる。飼育檻、使用後器機の消毒にも関連するデータである。

ホルマリン不活化試験の成績は、SV 41 が仮りに不活化ワクチンの原液に混入した場合でも、Polio ウイルスが不活化される条件で行なえば十分不活化されてしまうことを示している。

サル以外の諸動物に血清中和抗体陽性のものがなかつたことは、ヒトの手近かに感染源のないことを示唆するとともに、牛血清などを細胞培養のメデウム成分やウイルスの安定剤として用いてもこのウイルスに関しては支障のないことを明らかにしている。

各種培養細胞の感受性試験の成績は、サル由来の細胞のみならず、ヒトおよびブタ由来の株細胞も感受性をもち、大部分のものが試験宿主系として用いられることを示した。

追 記

なおヒト血清について中和抗体検索は、東京都立衛研から供与された26名の対血清、新潟県立衛研からの48名の対血清(両群ともに呼吸器系ウイルス病患者と診定されたもの)についても行ない、前者では3名、後者では16名の抗体陽性者があつたことを追記する。これらの詳細については後報にゆずる。

Summary

A strain of SV 41 given by R. M. Chanock was grown and passaged in Vero cells (Cercopithecus kidney cell line). In the reciprocal cross neutralization tests among Paramyxoviruses SV 41 was clearly distinguished from other viruses except that slight crossing was observed against CA virus. Some physico-chemical tests, including size determination by filtration, sensitivity to chloroform and nucleic acid typing using IUDR, and some host range tests gave results essentially consistent

with those described originally by Miller et al. on primary culture-grown viruses. Contrary to our expectation in the heating tests at 50°C SV41 was not labile; that is, after heating for 9 hours a decline of infectivity by 5 logs was demonstrated but still left 1.5 log of infectivity.

Search for serum neutralizing antibodies in humans, monkeys and various experimental and domestic animals revealed that the sole species which gave positive results was humans and no positives were encountered in 321 monkeys including Cynomolgus, Rhesus and Cercopithecus species which were imported from 1960 to 1966 and kept for varying periods of time in this laboratory. Whether the SV41 antibodies in humans are due to infections of SV41 itself or not can not be decided from our present data. Its confirmation waits for future investigations.

文 献

- 1) Andrewes, C. and Pereira, H. G. (1967): Viruses of Vertebrates, Baillière Tindall & Cassell, 2nd Ed., 177.
- 2) Chanock, R. M. and Johnson, K. M. (1964): in Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Diseases, Amer. Public Health Assoc., Inc., 3rd Ed., 475.
- 3) Feldman, H. A. and Wang, S. S. (1961): Sensitivity of Viruses to Chloroform. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 106, 736.
- 4) Hsiung, G. D., Isacson, P. and McCollum, R. W. (1962): Studies of a Myxovirus isolated from Human Blood. I. Isolation and Properties. J. Immunol., 88, (3), 284.
- 5) 伊東平八, 森本義雄, 土居穰, 三瓶恒雄, 角田弘 (1968a): Vero 細胞のウイルス感受性について. ウイルス. 18巻, 3号, 214
- 6) 伊東平八, 三瓶恒雄, 土居穰, 森本義雄, 芝田充男, 篠川至 (1968b): 風疹ウイルスの研究. Vero 細胞における細胞変性効果について. ウイルス. (18, No. 6)
- 7) Liebhafner, H., Krugman, S., McGregor, D. and Giles, J. P. (1966): Studies of a Myxovirus recovered from Patients with Infectious Hepatitis. I. Isolation and Characterization. J. Exp. Med., 122, 1135.
- 8) Miller, R. H., Pursell, A. R., Mitchell, F. E. and Johnson, K. M. (1964): A newly discovered Myxovirus (SV41) isolated from Cell Cultures of Cynomolgus Monkey Kidney. Am. J. Hyg., 80, (3), 365.
- 9) Schultz, E. W. and Habel, K. (1959): SA Virus, A New Member of the Myxovirus Group. J. Immunol., 82, 274.
- 10) Wallis, C. and Melnick, J. L. (1961): Stabilization of Poliovirus by Cations. Texas Rep. Biol. Med., 19, (3), 683.
- 11) 安村美博, 川喜田愛郎 (1963): 組織培養による SV₄₀ の研究. 日本臨床. 21巻. 1201