文 献

- 1) Enders, J. F. et al.: Science, **109**, 85, 1949.
- 2) Rowe, W. P. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **84**, 570, 1953. 3) Hilleman, M. R. & Werner, J. H.: Ibid., **85**, 183, 1954. 4) Neva F. A. et al.: J. Immunology, **72**, 315, 1954.
- 5) Huebner, R. J. et al.: New Engl. J. Med., **251**, 1077, 1954. 6) Ginsberg, H. S. et al.: Am. J. Pub. Health, **45**, 915, 1955. 7) Parrott, R. H. et al.: New Engl. J. Med., **251**, 1087, 1955.
- 8) Bell, J. A. et al.: J.A.M.A., **157**, 1083, 1955.
- 9) Enders, J. F. et al.: Science, **124**, 119, 1956.
- 10) Rowe, W. P. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **91**, 260, 1956. 11) 中村兼次: 小児科最近の進歩, 1956. 12) 中尾亨: 臨床小児医学, **4**, 544, 1956. 13) 館野功: 総合医学, **12**, 1079, 1955.
- 14) 福見秀雄: Virus, **7**, 77, 1957. 15) Dascomb, H. E. et al.: Am. J. Med., **21**, 161, 1956. 16) J. L. Reed, & H. Muench: Am. J. Hyg., **27**, 493, 1938. 17) 伝研学会編: 細菌学実習提要, 第2版, 507, 1952. 18) 竹森信之: 著者への私信 1956. 19) 庄司淳一: 日本小児科学会雑誌, **60**, 864, 1956. 20) 浜本英次: 日本小児科学会雑誌,

- 60**, 661, 1956. 21) 石田名香雄: 第5回日本ウイルス学会の発表より引用, 1957. 22) Jordan, W. S. et al.: J. Lab. & Clin. Med., **44**, 816, 1954.
- 23) Huebner, R. J. et al.: J. A. M. A., **159**, 986, 1955. 24) Hilleman, M. R. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **92**, 377, 1956. 25) Jawetz, E. et al.: Science, **122**, 1190, 1955. 26) Ginsberg, H. S. et al.: J. Clin. Invest., **34**, 820, 1955.
- 27) Hilleman, M. R. et al.: Am. J. Pub. Health, **45**, 203, 1955. 28) Rowe, W. P. et al.: Am. J. Hyg., **61**, 197, 1955. 29) Hilleman, M. R. & Werner, J. H.: Ibid., **61**, 163, 1955. 30) Neva, F. A. et al.: J. Immunology, **72**, 307, 1954.
- 31) 石田名香雄: 医事新報, **1689**, 19, 1956. 32) 三井幸彦: Virus, **7**, 63, 1957. 33) Scherer, W. F. & Syverton, J. T.: Am. J. Path., **30**, 1057, 1954. 34) Young, N. C.: A. J. Med. Science, **33**, 499, 1948. 35) 厚生省編纂: 衛生検査指針, 第4版, 292, 1950. 36) 和泉成之: 児科診療, **15**, 579, 1952. 37) Berg, T. O. et al.: Am. J. Hyg., **62**, 283, 1955. 38) Ward, R.: J. Ped., **49**, 1956. 39) 松本稔, 他: 第5回日本ウイルス学会の発表より引用, 1957. 40) 福見秀雄, 中村兼次, 他: 小児科診療, **20**, 14, 1957.

簡単で Reproducibility の高い Influenza Virus の 組 織 培 養 法

石田名香雄* 安斉 温* 堀米栄吉* 川村慶二* 清水喜正*

NAKAO ISHIDA, ON ANZAI, EIICHI HORIGOME, KEIJI KAWAMURA and
NOBUMASA SHIMIZU: SIMPLIFIED TISSUE CULTURE METHOD FOR
THE MULTIPLICATION OF INFLUENZA VIRUS.

最近 Tamm & Horsfall (1953)¹⁾ や Wunder 等 (1954)²⁾ は孵化鶏卵漿尿膜を用いた influenza virus の組織培養法 (Maitland type) を簡易化し, 前者は特にその再現性と変動の理由に就いてふれ, 後者は肉汁ブイオンを培地に用い, PR₈ に就いて卵で測定した場合とこれ等方法で測定した場合との感染価の差を問題として取り上げて居る。我々は化学療法剤の screening を行つた際, いろいろと培養法の簡易化をはかり 1 つの推せんすべき方法を見出したので要に報告したい。

方 法

14~15日発育鶏卵漿尿膜を, アルコール綿で消毒し気室部約2/3の Chorioallantoic のみ (Gelatinous の部分は使用しない) 卵殻を着けたまま用意した直径 15mm の円型パンチで切り取り Hanks 液で軽く洗滌後, 卵殻より離さずに組織片として使用した。

培養の実際は綿栓中試験管 (6分) に Penicillin, Streptomycin を含んだ Hanks 液 2.7ml を分注, それに 4 個以上の卵からとつた上記組織片を各々 4 片づつ

* 東北大学医学部細菌学教室 (主任: 黒屋政彦 教授)

しずめ、ウイルスを Hanks液 で適当に稀釈したものを0.3ml加え総量3.0mlとしPR₈の場合24時間、37°Cで振盪培養した。液中の赤血球凝集素(HA)は Salk の Pattern法で稀釈液0.5mlに0.5%鶏赤血球0.5mlを加え

Fig. 1. Multiplication of the PR₈ virus in the system with different inoculum size.*

* The figure illustrated the typical one from 5 repeated experiments.

+ 0.3ml of each diluent was put into 2.7ml of culture medium.

Fig 2. The distribution of the HA titer through 69 experiments.

* HA titer expressed as 6.3 includes the experiments judged as 6.0, 6.3 and 6.5.

て判定した。50%組織培養感染価 (TclD₅₀) 及び50%鶏卵感染価 (EID₅₀) は Reed & Muenchに従い求めた。

結 果

先ず Standard Passage した PR₈ の漿尿液を 10⁻¹ ~ 10⁻¹⁰ になる様試験管でうすめ、これを2.7mlの培地に0.3ml加え各々の24時間値を測定すれば Fig.1. に示した通り(1)inoculum sizeが10⁻³ 及10⁻⁴ で最高値を示し、(2)その際EID₅₀は9.45/mlに対し TclD₅₀は8.2, 8.45 及 8.45/mlを示した(3回の実験)。なお1枚のパンチした漿尿膜の平均湿潤量は16mg、面積1.8cm² で現在推定する尿膜細胞数は6×10⁶附近にある。(なお計算の根拠は次の如くである。即ち、14日卵の漿尿膜の内 Chorioallantois 部分の湿潤量は平均580mgである故、パンチ片4枚だと16mg×4=64mgで約1/9となり、又面積からすると14日卵の Chorioallantois は平均64cm²である故⁴⁾、パンチ4枚だと1.8cm²×4=7.2cm²と約1/9となる故、14日卵の Chorioallantois の細胞数⁴⁾⁵⁾は約5×10⁷×1/9=6×10⁶と算出される)。

その後実際の応用に入り、4枚のパンチ切片を使用してPR₈漿尿液の10⁻³ を inoculum として培養を繰返し化学療法剤の効果を判定したが、最初の頃の実験対照を全く作為なしに69回集めて推計学的に処理してみると、その平均及平均信頼限界は2の冪数に就いていうと6.14±0.32で誤差の平均は17%、1%の危険率で最も平均値から離れても22%と判明した。計算の内容は次に示した。

$$1. \text{ 平均値 } \bar{x} = 423.5/69 = 6.14$$

$$2. \text{ 不偏分散 } u^2 = 2668.52 \sim 6.14 \times 69/69 - 1 \\ = 1.02 \bar{x} = 1.01$$

$$3. \text{ 平均信頼限界 } \bar{x} \pm u\sqrt{F/N} = 6.14 \pm 0.32 \\ (\text{但し } F(0.01) \stackrel{n_1=1}{n_2=68} \doteq 7.04)$$

$$4. \text{ 平均値に対する誤差の平均 } u/\bar{x} = 17\%$$

$$5. \text{ 母集団の } \alpha \text{ から推定した平均値の巾}$$

$$\frac{\mu^2}{\alpha_2^2} F(0.01) \stackrel{n_1=68}{n_2=\infty} \doteq 1.52 \quad \therefore \alpha^1 = 0.28$$

$$\frac{\alpha_2^2}{\mu^2} F(0.01) \stackrel{n_1=\infty}{n_2=68} \doteq 1.56 \quad \therefore \alpha_2 = 1.26$$

$$\therefore \frac{\alpha_2}{\bar{x} - \mu\sqrt{F/N}} \sim \frac{\alpha_1}{\bar{x} + \mu\sqrt{F/N}} = 22\% \sim 13\%$$

従つて1回の実験毎に通常やる如く3本の対照をたてたとすれば対照の標準誤差は12%に納まる。この事

実は不断実験で感じている事即ち卵殻を持つ漿尿膜を使用する様になつてから力価の変動が殆んど認められないと云う事実と一致する。更に本法を使用以来雑菌の混入は全くなく、pHの変動が殆んどない事を非常に大きな特徴として強調したい。但し卵殻抽出液の抗菌力を調べたが、前者を支持する証拠は得られなかつた。結局方法の簡易化に伴う汚穢の機会の減少も一つの原因と考えたい。pHがconstantである事は卵殻が沈降炭酸カルシウムと同様に働く故と思われる。

総 括

以上の実験を総括して、

- 1) ウイルスの増殖に殆んどふれがない。
- 2) 雑菌感染が殆んどない。
- 3) pHの変動が殆んどない。
- 4) 実験方法が簡単のため手軽に多数の材料を処理出来る。

と云う4つの特徴を挙げる事が出来よう。大方の御追試を願いたい。

文 献

- 1) Tamm, I, et al, J. Exp. Med., **98**, 229, 1953.
- 2) Wunder, C.C., Brandon, F.B. and Bampton, C.C., Jr. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **86**, 561, 1954.
- 3) Cairns, H.J.F. et al., J. Imm., **78**, 191, 195.
- 4) 稲森啓三, ウイルス, **5**, 312, 1955

不活化インフルエンザ・ウイルスおよび HVJ による マウス肺コンソリデーションの形成

コンソリデーション因子の研究 (1)

小 笠 原 一 夫* 会 田 真*

KAZUO OGASAWARA, MAKOTO AIDA: LUNG CONSOLIDATION BY
NASAL INOCULATION WITH INACTIVATED INFLUENZA
VIRUS OR HVJ IN MICE

[受稿 1月24日 1958]

い と ぐ ち

ウイルスやリケッチヤの毒性に関する最初の報告は Gildemeister u. Haagen¹⁾ によるリケッチヤ毒素についてのそれである。その後、本邦においても鈴木²⁾ の研究がある。ウイルスの毒性効果乃至肺コンソリデーション形成作用については、まず(1) Burnet³⁾ が NDV について高濃度の NDV をマウスの鼻腔内に接種することにより肺に高度のコンソリデーションをおこすことをみた。しかしこの病変組織を接種材料とし累代するも次代以降にコンソリデーションをおこし得ず継代の不能なことをみとめた。また(2) Ginsberg⁴⁾ はそれにより詳細に研究し次のことを確めた。すなわち(i) NDV とその抗血清とを混和して経鼻接種すると、肺コン

ソリデーションは完全に防がれるが、ウイルスを先に接種しておいて後に抗血清を与えても防がれない。

(ii) $10^{4.3}$ EID 量のウイルスを経鼻接種したときはコンソリデーションは77%におこるが、これを16倍にうすめて接種すると約37%に低下し、32倍にうすめて与えたとおこらなくなる。(iii) 高速遠心および赤血球への吸着遊離の実験で、この肺に病変をおこす能力はつねにウイルス粒子と行動を共にしているので、この作用はウイルス粒子によるものである。(iv) 紫外線照射、加熱、保存等によるウイルス感染力の低下とコンソリデーション形成能力とは常に平行する。(v) RDEで感受性細胞のリセプターをこわすとウイルス接種によるコンソリデーションはおこらなくなる。(vi) インフルエンザ・ウイルス(略してIV)を前もつて経鼻接種

* 名古屋大学医学部細菌学教室