3) 松山達夫：地研全国協議会，1958，3. 東京 4) 松山達夫，石橋近重：日本細菌学会誌 **13**, 227, 1958, 5) 松山達夫：Virus **8**, 381, 1958 6) 松山達夫：日本細菌学会誌，**13**, 874, 1958, 7) 石田名香雄他：総合医学 **15**, 719, 1958. 8) 松村竜雄他：日本医事新報 No. 1777, p. 15, 1958 9) 松村竜雄他：日本医事新報 No. 1803, p. 14, 1958 10) 松山達夫：Virus **9** (4) 予定 11) van der Veen, J. and Mulder, J.: In Onderzoekingen en Mededelingen Vit het Institut voor Praeventieve Genneskunde, No. 6, Stenfert-Kroese, Leiden, Netherlands, 1950 12) Isaacs, A and Andrewes, C.H.:

Brit. Med. J. ii, 921, 1951 13) Isaacs, A., Gledhill, A. W., and Andrewes, C. H.: Bull. Wld. Hlth. Org., **6**: 287, 1952 14) Fiset, P. and Depoux, R.: Bull. Wld. Hlth. Org., **11**, 987, 1954 15) 石田名香雄：東日本ウイルス学会支部会，1958. 6. 東京 16) 清水喜正：Virus **8**, 254, 1958 17) Isaacs, A.: Lancet **4**, 676, 1953 18) Hale, J. H.: 1957, 9, 30 松山宛私信 19) Isaacs, A.: 1957, 9, 4. 松山宛私信 20) 西川文雄：日本細菌学会関東支部総会，1957, 11, 15. 松山の演題への追加（日経誌 **13**, 277, 1958） 21) 石田名香雄：伝研集談会，1958, 2. 東京 22) 園口忠男他：防衛衛生 **6**, 5, 1959

HSO ウイルス：健康ヒト血清から分離された 1種の HeLa 細胞変性ウイルス*

及 川 達 郎**

TATSURO OIKAWA: HSO VIRUS, AN APPARENTLY NEW
CYTOPATHOGENIC VIRUS ISOLATED IN HELA CELL
CULTURE FROM NORMAL HUMAN SERA.

〔受稿 4月15日 1959〕

健康なヒトの血清をもちいて HeLa 細胞を培養しているとき，細胞に変性をおこす血清のあることにきざし，この血清から1種の細胞変性ウイルスを分離した。このウイルスの物理化学的性状，実験動物，発育鶏卵にたいする病原性，各種培養細胞にたいする変性効果，各種ウイルスとの免疫学的関係などをしらべ，既知ウイルスとの鑑別をこころみたところ，おそらくは新ウイルスではないかと思われる結果がえられたので，とりあえず HSO (Human Serum Orphan) ウイルスとよぶことにした。さらに健康なヒトの間のこのウイルスにたいする中和抗体の分布をしらべたところ，かなりひろく分布していることがわかった。

実 験 法

細胞培養 実験には HeLa 細胞が主として用いられた。培養びん (10×5×5cm) の HeLa 細胞培養

から培養液をすて，リン酸緩衝液 (1/100M, 0.8% NaCl, pH 7.2) で1回洗った後，versenate 溶液 (上述リン酸緩衝液に disodium ethylenediamine tetraacetate を 5000× にとかす) 8ml をくわえ，37°C に数分もち，びんをゆるくふつて細胞をガラス壁からおとす。この細胞浮游液を 1,000 r.p.m. 2分遠心沈澱して上清をすて，培養液に細胞を浮游させ，試験管 (1.5×18cm) または培養びんに分注する。試験管は5度の傾斜で 37°C に24時間静置したのち廻転培養する。培養びんは静置培養する。培養液は，0.5% ラクトアルブミン水解物，0.1% 酵母エキスをくわえた Earle 液 (YLE) 80にウシ血清 (56°C 30分) 20を加えたものを用いた。培養液にはストレプトマイシン 200γ/ml，ペニシリン 100u/ml をくわえた (以下の培地も同様)。試験管には 0.5ml，培養びんには 8ml を用いた。1～3日培養し充分細胞が増殖してから実

*この研究は第6回日本ウイルス学会総会 (10月30日～11月1日) で報告された。

**東京大学伝染病研究所第1細菌研究部 (部長：松本稔 教授)

第1臨床研究部 (部長：北本治 教授)

験に用いられた。ウイルス接種後はウシ血清 10, YLE 液 90 の培養液にかえた。

そのほか H946 細胞 (骨髓細胞, Walter Reed AMC), 肝細胞 (Chang¹⁾), 腸管細胞 (Henle²⁾) などヒト由来の培養細胞株が用いられたが, これらは HeLa 細胞と同様に培養された。

ヒト胎児組織の培養は, ヒト胎児の皮膚筋肉の組織片を, ニワトリ血漿とニワトリ胎児浸出液で試験管壁に固定しておこなわれた。ウシ血清 40, ニワトリ胎児浸出液 2, Hanks 液 58 の培養液を用いた。

サル腎臓細胞, ニワトリ胎児組織は, Youngner³⁾の方法によりトリプシン消化した細胞を試験管に培養して用いられた。培養液は, ウシ血清 5, YLE 95 の混合液である。

免疫血清 分離ウイルスの免疫血清は, 9945 株にたいしウサギ, 6642 株にたいしモルモットでつくつた。9945 株の HeLa 細胞培養液を抗原とし, その 5 ml をウサギ (1.5 kg) に静脈内注射後 1 週おいて, 1~2 ml ずつ 16 回下肢筋肉内注射 (週 2 回), 最後注射後 1 週おいてさらに 5 ml 静脈内注射し, 1 週後に心臓より採血, 血清を分離した。6642 株も HeLa 細胞培養液を抗原とし, 2 ml ずつやく 5 ヶ月にわたり 12 回, モルモットの腹腔内に注射し, 最後注射後 1 週間で心臓より採血し, 血清を分離した。3 頭のモルモットの血清を混合して実験に用いた。血清はいずれも 4°C に保存され, 56°C, 30 分加熱して用いられた。

実験に用いられた各種のウイルスにたいする免疫血清は次の通りである。インフルエンザ, PR8, FM1, Lee 株 (ウサギ)*, HVJ (ウサギ)*, 日本脳炎 (ウマ)***, ヘルペス (モルモット)***, ワクシニア (ウサギ)***, リフトバレー熱 (ウサギ)***, ポリオ, 型 1, 2, 3 (サル)****, ECHO, 型 1~7, 9, 12 (ウサギ)***, コグサキー A, 型 11, 13, 15, 18 (ハムスター)†, アデノウイルス, 型 1~14 (ウサギ)****。

中和実験 各種ウイルス抗血清による分離ウイルスの中和試験は次のようにおこなつた。感染 HeLa 細胞培養液をウイルス材料とし, その感染価を測定する。それにはウイルス材料を YLE 液で 10 倍階段稀釈し (各稀釈 3~5 本), 0.9 ml の培養液を加えて, 1 週間廻転培養して, 細胞変性の出現を観察する。その

結果から TCID₅₀(ml) を Kaerber 法⁴⁾により計算する。中和試験にはウイルス稀釈液 (YLE) に等量の血清稀釈液 (56°C, 30 分加熱, YLE で稀釈) を加え, 37°C, 2 時間おいて, その 0.1 ml ずつを HeLa 細胞培養試験管 2~3 本に接種し, 培養液を 0.9 ml 加えて, 37°C に 5 日間廻転培養し, 細胞変性の有無によりよみをとる。ウイルス稀釈法では 10 倍階段稀釈を用い, 対照, 検査血清の TCID₅₀ (log) の差で中和の程度をあらわす。血清稀釈法では一定量のウイルスにたいする 50% 終末の血清稀釈倍数 (ウイルスとまぜる前の) であらわす。

実験成績

1. ウイルスの分離

HeLa 細胞の培養に用いるため東京のある血液銀行からヒトの血液をかつていたが, 1955 年 5 月から 1956 年 1 月までの間に 3 例 (Nos. 9945, 6642, 6653) の細胞変性をおこす血清にぶつかつた。

これらの血液はそれぞれ別々の健康供血者から採血されたもので, 採血後一夜室温に放置し, 血清を分離した。中試験管にやく 10 ml ずつ分注し, 湯ぶねで 56°C 30 分加熱して, -20°C に保存し, HeLa 細胞の培養に用いた。当時の培養液はウシ血清 40, Hanks 液 58, ニワトリ胎児浸出液 2 からなり, 培養びんに 8 ml ずついれられた。すると, 前述の 3 例の血清を用いた培養では, いつたん細胞がガラス壁について, はじめは何ら異状をみとめないが, 5 日目頃から細胞変性がおこりはじめ, その後 4, 5 日でほとんど全細胞がこわされガラス壁からはがれてしまった。

そこで実験をくりかえしてみた。最初の実験に用いた血清は前に述べたとおりすべて加熱してあつたが, Nos. 6642, 6653 血清は一部加熱しないまま -20°C に保存されていたので, 今度はこれを用いた。No. 9945 の血清は全部加熱してあつたので, それを用いた。これまでに細胞変性をおこしたことの無いヒト血清を対照として用いた。細胞変性の原因がこれらヒト血清にあることをはっきりしるために, HeLa 細胞, Hanks 液, ニワトリ胎児浸出液は検査すべき血清と対照血清両者に同一のものをを用いた。1 本の培養びんに培養された HeLa 細胞を 2 本の培養びんにいれ, 一方に検

* 予防衛生研究所細菌部より, ** 予防衛生研究所ウイルス・リケッチア部より, *** 伝染病研究所第四細菌研究部より, **** 伝染病研究所特別検査室より, † Division of Laboratories and Research, New York State Health Department, より分与をうけた。御厚意を感謝します。

査血清, 他方に対照血清を加えた前述の培養液を用いて培養した。すると上述の血清ではやはり同様の細胞変性がおこつたが, 対照血清ではおこらなかった。細胞変性をしめした培養液の一部を, 対照培養と平行して, 3本ずつの健康 HeLa 細胞培養試験管に接種(培養液は初代培養と同じ)したが, やはり同様の所見がえられ, よういに継代された。

以上の実験をもう一度くりかえしたが, まったく同様の結果がえられた。

このころ HeLa 細胞の培養液を実験法でのべたものにかえたので, この培養液を用いて, あらためて前述の HeLa 細胞培養第1代の材料から出発して HeLa 細胞での継代をおこない, 9945株は14代, 他の2株は6代継代したが, 継代はよいであつた。

なお細胞変性作用のある培養液($10^{5.5} \times \text{TCID}_{50}/\text{ml}$)を1ml ずつ, 普通ブイヨン, 血液寒天平板, 液状チオグリコール酸塩培地, PPLO 培地⁵⁾に接種し, 37°C に7日間培養したが, すべて陰性であつた。

2. 分離された3株間の中和試験

以上の結果, また後述の濾過実験などからある種のウイルスが分離されたと考えられたので, 分離された3株のうち9945, 6642株の免疫血清をつくり, 交叉中和反応をウイルス稀釈法でおこなつた。Table 1にし

Table. 1 Cross neutralization in HeLa cell culture between No. 9945 and No. 6642 strains.

Virus	Neutralization log-index obtained with antiserum immunized against	
	No. 9945, rabbit, 1:5	No. 6642, guinea pig, 1:10
9945	4.3	3.6
6642	4.0	3.0

めすように, 両株は血清学的に同一である。さらに9945株血清1:5, 6642株血清1:10を用い, 3株の試験管あたり $100 \times \text{TCID}_{50}$ にたいし交叉中和試験をおこなつた。各3本ずつの HeLa 細胞培養を用いた。正常血清対照はどのウイルス株でも3本とも細胞変性をおこしたが, いずれの免疫血清でも3株とも完全に細胞変性がおさえられた。この中和試験の結果は, HeLa 細胞における細胞の変化などとあいまつて, 分離された3株が同一ウイルスであることをしめしている。そこで以下の実験には主として No. 9945 株が用いられた。

3. 分離ウイルスの物理化学的性状

濾過 分離ウイルスは Seitz EK, Chamberland L₃, Berkefeld N 濾過器をように通る。濾過には感染 HeLa 細胞培養液をもちい, 濾過器はあらかじめブイヨンを通してから用いた。9945株での成績では, Seitz EK, Chamberland L₃, Berkefeld N 濾過後それぞれ $10^{1.3}$, $10^{0.3}$, $10^{1.0}$ の感染価の減少があつたにすぎない。

超遠心沈澱 9945株感染 HeLa 細胞培養液を 3,000 r.p.m. 10 分間遠心沈澱してあらひ細胞片をおとした後, スピニコ L 型超遠心器の 40# のローターで 10,000 r.p.m. 15 分遠心沈澱した上清をウイルス材料とした。これを 40# のローターでさらに 35,000 r.p.m. 60 分間遠心沈澱した後, 毛細ピペットで上清の上やく 5 mm の層をしずかにとり, これを遠心沈澱前のウイルス材料と TCID_{50} をくらべた。遠心沈澱により $10^{3.0}$ だけ感染価がさがり, ウイルス粒子はこの遠心沈澱により沈降したことがわかつた。

熱による影響 (a) 56°C: 9945株感染 HeLa 培養液の低速遠心上清 (pH 7.6) を 0.5ml 入アンプルに 0.5ml ずつ封じ, 56°C の湯ぶねにしずめ, 種々の時間にアンプルを1本ずつとりだし, ただちに冷水中にひたしたのち, HeLa細胞で感染価を測定した。Fig. 1にしめすように, ウイルスは 56°C 12分で完全に不活化された。

Figure 1. Thermal degradation of the isolated virus. (9945 strain)

(b) 37°C: 試験管に上記のウイルス材料を 5 ml いれ, ゴム栓をしてドラムに入れ, 37°C にたもつた。種々の時間に 0.2ml ずつくみだし, HeLa 細胞で感

感染価をはかった。なお実験中ウイルス材料の pH の変化はなかった。Fig. 1 にしめすように、感染価は96時間まで変化なく $10^{-6.0}$ ml であつたが、その後わずかにさがり、216時間では $10^{-4.5}$ ml となつた。

(c) -20°C : 上記のウイルス材料($\text{TCID}_{50}10^{-6.0}\text{ml}$)を -20°C に保存したが、5 カ月後にわずか $10^{0.6}$ の感染価の減少をしめたにすぎなかつた。

エーテルにたいする抵抗性

9945株の HeLa 細胞培養液を 3,000r.p.m.10分間遠心沈澱した上清をもちいた。エーテル耐性のポリオウイルス (HeLa 細胞継代 Mahoney 株)、エーテル

により不活化されるヘルペスウイルス (H946 細胞9代継代) を対照ウイルスとして用いた。用いたエーテルは麻醉用* のものである。0.6ml のウイルス材料と0.4ml のエーテルとを試験管 ($8\times 95\text{mm}$) 中でまぜ、ゴム栓した。 4°C に24時間おいた後、全内容をシャーレにそそぎ、室温においてエーテルを蒸発させた後、HeLa 細胞培養で感染価を測定した。Table 2 にしめすように、エーテル処理により9945株、ポリオウイルスの不活化はおこななかつたが、ヘルペスウイルスは完全に不活化された。

Table. 2 Ether resistance of the isolated virus

Virus	Treatment	Dilutions of virus material inoculated (in log)					
		0	-1	-2	-3	-4	-5
9945	Ether	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
	None		2/2	2/2	2/2	2/2	
Herpes	Ether	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	
	None	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	
Polio	Ether		2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
	None		2/2	2/2	2/2	2/2	1/2

4. 分離ウイルスの各種培養細胞における細胞病原性と増殖

HeLa 細胞 上にのべたように、このウイルスは HeLa 細胞において細胞変性をともなつてよく増殖する。弱拡大でみると、ウイルス接種量の大きいときは、24時間ですでに細胞に変化があらわれる。はじめ局部的にやゝ小さくなつた円形の細胞群がみとめられ、細胞内の構造が均質化し、わからなくなる。この変化が急速に周囲の細胞にひろがり、しだいに細胞が管壁からはがれ、2, 3 日でほとんど全細胞がこわされる。接種量の小さいときでも、ほぼ接種後1週間でこの変化はおわる。細胞変性ととも培養液の pH が低下しなくなる。

感染 HeLa 細胞を染色標本で観察した。 $15\times 15\times 40\text{mm}$ の小角びんにのせガラスをいれて HeLa 細胞を培養し、 $10^5\times \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ のウイルス材料 0.1ml を接種して培養した。種々の時間にのせガラスをとりだし、リン酸緩衝液で3回あらつたのち、メタノール固定し、ギムザ染色、ヘマトキシリン・エオジン染色

をおこなつた。ウイルス接種後24時間にははつきりした変化があらわれている。まずエオジン好性の塊が核膜に接した細胞質内にあらわれ、しだいに大きくなる。この塊は各細胞に1コできることが多く、形はまるく、比較的是つきりした塊をもち、均一な内部構造をしめす。この塊がしだいに大きくなると、核膜、核質の収縮がおこり、核内の構造がはつきりしなくなり、核濃縮の像がみられる。ついにはこの塊が細胞質の大部分をしめるようになり、核は細胞の縁におしつけられ、つよく萎縮する。さらに変化がすすんだものではこの塊だけ、あるいはわずかの核の破片をつけたものなどがみられる。

HeLa 細胞におけるウイルスの増殖曲線をかいた。10本の HeLa 細胞培養試験管に $10^{6.5}\times \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ の 9945株ウイルスを 0.1ml ずつ接種して培養し、種々の時間に各試験管から 0.05ml ずつ培養液をとり、10本分をまぜて、感染価を測定した。Fig. 2 にしめすように、はじめ感染価が急に低下したのち、24時間で感染価の上昇がみとめられ、その後ほぼ対数的に上昇

* 昭和エーテル KK 製 [Aether Anaestheticus, J.P. VI3, -4-2]

Figure 2. Growth curves of the isolated virus in culture of HeLa cells, skin-muscle cells of human embryo and monkey kidney cells.

して、72時間で $10^{-6.0}$ ml の最高にたつた。

接種量をやゝ小にし、 $10^{3.5} \times \text{TCID}_{50}$ を用いた他の実験では、ウイルスの増殖がおくれたが、ほぼ同一の最高感染価にたつた。すなわち24時間ではウイルスが培養液に証明されなかつたが、48時間でわずかに証明され、その後増殖をつづけ、120時間で $10^{-6.5}$ ml の感染価にたつた。

ヒト胎児筋肉皮膚組織培養 HeLa 細胞とほぼ同様の変性像がみられた。ウイルスの増殖を $10^{3.8} \times \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ の9945株ウイルスを 0.1ml ずつ接種して、HeLa 細胞のときと同様にしたらべた。Fig. 2 にしめすように、ウイルスの増殖がみられたが、HeLa 細胞の場合より増殖の程度は多少わるく、培養液の感染価は最高 $10^{-5.2}$ ml にとどまつた。

サル腎臓細胞培養 Cynomolgus サル、ニホンザル腎臓細胞培養ではこのウイルスは細胞変性をおこさない。 $10^{5.5} \times \text{TCID}_{50}$ の9945株ウイルスを接種し、HeLa 細胞と同様の実験をおこなつて増殖をみたが、培養液の TCID_{50} は48時間培養で $10^{-3.0}$ ml とさがり、その後120, 168時間培養でも $10^{-3.5}$ ml で、あきらかなウイルス増殖をみとめることができなかつた (Fig. 2)。

H946細胞、肝細胞 (Chang)¹⁾、腸管細胞 (Henle)²⁾ これらの細胞においては、HeLa 細胞のときとほぼ同様の変性効果がみとめられた。

ニワトリ胎児組織培養 変性効果をみとめえなかつた。

5. 分離ウイルスの各種実験動物、発育鶏卵にたいする病原性

乳のみマウス 生後36~48時間のマウス (ddD) にウイルス材料 (9945株 HeLa 細胞6代、培養液遠心上清、ストレプトマイシン 2 mg/ml、ペニシリン 400 u/ml) を生後48時間の10匹の各マウスに脳 (0.02ml)、腹腔内 (0.05ml) に注射した。7匹は8日でころし、のこり3匹は2週間観察したが、なんら異状をみとめなかつた。ころした7匹のマウスの脳をいつしよにして、YLE 液で10%乳剤をつくり、また脾、肝、腎をまぜて同様10%乳剤をつくつた (前と同様抗生物質を加えた)。脳乳剤は5匹の生後72時間のマウスの脳内に 0.02ml ずつ、内臓乳剤は他の5匹の同様マウスの腹腔内に 0.05ml ずつ注射した。注射後7日にころしたが、なんの異状もなかつた。脳内注射マウス群から脳乳剤を、腹腔内注射マウス群から脾肝腎混合乳剤を前同様につくり、それぞれ4匹ずつの生後48時間のマウスに脳内、腹腔内に接種した。7日観察したが、なんの異状もなかつた。

同様の実験をくりかえした。ウイルス材料は9945株 HeLa 細胞12代の培養液 ($10^{5.5} \times \text{TCID}_{50}/\text{ml}$) をもちいた。こんどは生後24時間以内のマウスをもちい、脳内接種10匹のうち3匹は接種後7日でころして脳をとり継代に用い、3代めくらつぎした。また各代接種材料について HeLa 細胞でウイルスの検出をおこなつた。各代ののこりのマウスは2週間観察した後、脳、肝、四肢筋肉などの病理組織学的検査をおこなつた。ほぼ同様の実験を肩甲間皮下接種によつておこなつた。この実験では、マウスの頭をのぞいた部分の皮膚をはぎとつて乳剤とし、継代、ウイルスの検出に用いた。その結果、すべてのマウスにおいて臨床的、病理学的になんらの異状をみとめず、各継代材料中にウイルスを検出しえなかつた。

成熟マウス 生後4週の ddD マウス5匹を1群とし、9945株 HeLa 細胞6代ウイルス材料を脳内接種群は 0.025 ml、腹腔内接種群は 0.2 ml 接種し、3週間脳症状および麻痺の有無など臨床的観察をおこなつたが、なんら病的症状はみとめられなかつた。

モルモット 体重 100~120g のモルモット2匹を1群とし、上述のウイルス材料を脳内接種群には 0.1 ml、腹腔内接種群には 2 ml を接種し、23日間毎日観察したが、なんら病的症状はみとめられなかつた。

ウサギ 体重 2 kg のウサギ2匹に上記のウイルス材料を静脈内に 5 ml、皮下に 2 ml 接種して2ヶ月

間観察したが、なんら病的症状はみとめられなかった。

ニホンザル ニホンザル *M. fuscata*, 年令1年6月, 体重やく2 kg のおす2頭を用いた。ウイルス接種前7日間一定時刻に肛門内で体温を測定し、一般状態を観察して、異状のないことをたしめた。

第1例のサルには下腿静脈より HeLa 細胞を12代継代した9945株ウイルス材料 ($10^{5.5} \times \text{TCID}_{50}/\text{ml}$) を1 ml, さらに気管切開をおこない、気管内に0.5ml接種し、第2例のサルには下腿静脈より上記材料を8 ml 接種した。両例ともに毎日一定時刻に一般状態の観察、体温測定、血球計算をおこなった。また第1例は毎日咽頭を綿球でこすつたものと糞便をとり、それぞれ YLE 浮游液とし、またヘパリンをもちいて静脈血を採血した。第2例のサルはウイルス接種後静脈血のみを採取し、いずれも -20°C に保存し、ウイルスの検出にもちいた。

第1例のサルはウイルス接種後8日目にラボナール麻酔後心臓から採血してこし、各臓器を一部はウイルス検出用に YLE に保存し、一部は病理組織学的検査に用いた。第2例のサルはウイルス接種後第4日目に第1例と同様に処理した。

ウイルス接種ニホンザルの一般状態、体温にはいちじるしい変化がなかった。白血球数はウイルス接種後2, 3日目より減少し、正常ではやく $13,000/\text{cmm}$ の白血球数が最低 6,500 から 8,300 に減少した。咽頭分泌物の材料はそのまゝ、糞便材料は 6,000 r.p.m. 30分間遠心沈澱した上清を、血液はそのまゝ HeLa 細胞培養に接種したが、前二者からはウイルスは検出できなかったが、血液中にはウイルス接種後30時間までウイルスを証明できた。

解剖すると、わずかに、肝臓の腫脹がみられ、その前縁がまるみをおびただけで、他に異状をみとめなかった。組織学的には肝細胞の腫脹がみられ、肝毛細管はせまくなり、Disse 腔が不明瞭になつていた。肝細胞の壊死はみられず、感染細胞培養でみられたような細胞質内のエオジン好性の塊もみとめられなかった。剖検時にとつた大脳、肺、心臓、気管、脾、肝、脾、副腎、小腸、大腸内容、背筋、大胸筋の Hanks 液10%乳剤からはウイルスは証明されなかった。

発育鶏卵 9945株 HeLa 細胞培養液(7代)のウイルス材料 ($10^{5.5} \times \text{TCID}_{50}/\text{ml}$) を3コを1群とした5日卵の卵黄のう内に 0.2ml, 10日卵の漿尿膜上に 0.1 ml, 尿膜腔内に 0.1ml 接種し、 37°C に7日間たもつ

た後、それぞれ卵黄のう、漿尿膜、尿膜腔液をとつた。卵黄のう、漿尿膜は生理食塩水で10%乳剤とし、3,000 r.p.m. 10分遠心沈澱した上清を、尿膜腔液はそのまゝ、HeLa 細胞でウイルスの検出をおこなうとともに、初代同様方法で発育鶏卵に継代された。3代めくら継代されたが、胎児、漿尿膜その他になんら病変がみとめられず、初代材料ですでにウイルスは検出されなかった。なお尿膜腔液はニワトリ、ヒト(O型)赤血球を 0°C 、室温で凝集しなかった。

6. 分離ウイルスの各種ウイルス抗血清による中和実験

インフルエンザ (PR8, FM1, Lee), HVJ, 日本脳炎、ヘルペス、ワクシニア、リフトバレー熱ウイルスこれらのウイルスは当実験室であつかつていたので、分離当初とりあえず試験してみた。これらのウイルスの高度免疫血清原液を用い、試験管あたり 100 TCID_{50} の分離ウイルスにたいし中和実験を行つたが、すべての血清がウイルスを中和しなかった。

ポリオウイルス 型1, 2, 3のウイルスにたいするサル抗血清を用いたが、それぞれ同型ウイルスの 100 TCID_{50} にたいし、6400, 12800, 12800の中和能力をもつていた。分離ウイルスの抗血清は9945株にたいするものをもちいた。中和実験には、100倍稀釈のポリオ各型抗血清、ポリオ型1, 2, 3抗血清の等量混合液を各型抗血清が4倍稀釈になるように稀釈したもの、100倍稀釈9945株抗血清を用いた。ポリオウイルスは、Mahoney (型1), MEF1 (型2), Saukett (型3) 株と、分離ウイルスは9945株 HeLa 継代12代培養液を用い、試験管あたり 50 TCID_{50} を用いた。各試験3本ずつの HeLa 培養試験管を用いた。各抗血清は同種ウイルスを中和したにかかわらず、異種のものはすべて中和しなかった。

ECHO ウイルス 用いた ECHO ウイルスの型と株は1 (Farouk), 2 (Cornelis), 3 (Morrissey), 5 (Noyce), 6 (D'Amori), 7 (Garnett), 9 (Guigly), 12 (Travis) であつて、いずれも分離後サル腎臓組織培養継代3~4代のものである。用いた ECHO ウイルス抗血清の型と、50 TCID_{50} の同型ウイルスにたいする完全中和血清稀釈は、1 (256), 2 (4096), 3 (4096), 4 (16), 5 (1024), 6 (4096), 7 (1024), 9 (64), 12 (256) である。

まず試験管あたり 50 TCID_{50} の各型 ECHO ウイルスをもちい、サル腎臓細胞培養 (トリブシン消化、培地その他培養法は HeLa 細胞と同様) において100

倍稀釈9945株抗血清にたいし中和試験を行つたが、すべて中和されなかつた、逆に、各型 ECHO ウイルス抗血清4単位（ただし型4, 9はそれぞれ16, 2単位）と、それぞれ型1, 2, 3（それぞれ64, 1024, 1024単位）、型5, 6, 7（それぞれ256, 1024, 256単位）、型9, 12（それぞれ16, 64単位）の混合液について9945株ウイルス50 TCID₅₀ にたいする中和試験を HeLa 細胞でおこなつたが、これもすべて中和されなかつた。

コクサッキー・ウイルス コクサッキーAウイルス型11, 13, 15, 18の抗血清と型13, 15, 18のウイルスがもちいられた。中和試験には血清はすべて64倍にうすめ、ウイルスは3日間で HeLa 細胞を完全に変性におとし入れる量をもちいた。分離ウイルスは9945株をもちい、その50 TCID₅₀ で9945株免疫血清100倍稀釈にたいして中和試験をおこなつた。各血清は同種ウイルスは中和したが、他の組合せではすべてウイルスの中和がおこななかつた。さらに4種のコクサッキー免疫血清を等量混合し、それぞれの血清が64倍稀釈になるようにしたもので、9945株の中和をおこなつたが陰性であつた。

アデノウイルス 抗血清の型、同型ウイルスにたいする完全中和をしめす血清稀釈、この中和試験に用いた血清稀釈は次のとおりである：1 (128, 10), 2 (256, 8), 3 (512, 4), 4 (512, 10), 5 (64, 4), 6 (128, 4), 7 (512, 4), 8 (64, 4), 9 (64, 4), 10 (256, 4), 11 (128, 4), 12 (? , 10), 13 (8, 4), 14 (64, 4)。これらの血清にたいして、50 TCID₅₀ の9945株ウイルスを用いて中和試験をおこなつたが、いずれの血清もウイルスを中和しなかつた。

7. ヒト血清における分離ウイルスにたいする中和抗体の分布

血清は原液、ウイルスは9945株・200 TCID₅₀ をもちいて中和試験をおこない、抗体の有無をしらべた。その結果東京の成人92名中14名 (14.5%)、茨城県高萩市小学校の子供 (8~10才) 22名中5名 (22.7%) に中和抗体が証明された。成人の中和抗体陽性者の5例について、ウイルス 50 TCID₅₀ にたいする中和試験をおこなつたところ、それぞれ1:5, 1:7, 1:7, 1:14, 1:40の値をしめた。

考 察

上に述べた実験により、分離された3株のウイルスは、用いられたヒト血清に由来するものであり、また同一ウイルスであることはたしかである。また上述の

実験成績から既知ウイルスとの鑑別を行うと、分離ウイルスは新しいウイルスであると考えられるので、とりあえず HSO ウイルスとなづけたが、以下に既知ウイルスとの鑑別を述べる。

分離当初、実験室で用いられていたウイルスの汚染の可能性を除外するため、インフルエンザ (PR8, FM1, Lee), HVJ, 日本脳炎, ヘルペス, ワクシニア, リフトバレー熱ウイルスにたいする免疫血清を用いて、とりあえず中和試験をおこなつたが、すべて HSO ウイルスを中和しなかつた。もちろん、これらのウイルスとの鑑別は、その後の実験によりあきらかにされたこのウイルスの性状によりたやすくできる。

このウイルスの特長をあげると、マウス、モルモット、ウサギなどの小実験動物、発育鶏卵にたいし病原性をもたないこと、HeLa 細胞その他のヒト由来の細胞において変性効果をともなつて増殖するに反し、サル腎臓細胞では細胞変性をしめさず、あきらかな増殖をしめさないことである。これらの点からいおう問題になるウイルスとしては、ポリオ, ECHO, コクサッキー, アデノ, JH, 2060, CA, CCA, HA, Coe, ヒトの唾液腺ウイルスなどである。

ポリオウイルスとは、サル腎臓細胞における態度、HeLa 細胞における細胞変性像などにいちじるしい差があり、また交叉中和試験によつてあきらかに区別される。

ECHO ウイルスは現在までに24型⁶⁾ が知られているが、いずれも rhesus, cynomolgus サル腎臓細胞に変性効果をしめしてよく増殖する点で HSO ウイルスとはちがつている。その中の一部、すなわち型1~7, 9, 12と交叉中和試験をおこなつたが、交叉しなかつた。

コクサッキーウイルスは現在までにA群19型, B群5型が知られている。コクサッキーウイルスは一般に乳のみマウスに病原性をもっている点でこのウイルスとちがつている。しかし組織培養で分離されたコクサッキーウイルスのなかにはまれに組織培養継代をしないとマウスに病原性をしめさない株がある⁷⁾。このような株はサル腎臓細胞に変性効果をしめすので、われわれのウイルスとはちがつている。コクサッキーウイルスの中でA群型11, 13, 15, 18の株は HeLa 細胞に変性効果をしめすが、サル腎臓細胞に変性効果をしめさない点が HSO ウイルスと似ている⁸⁾ ので、とくに交叉中和実験をおこなつた。しかしこれらのウイルスは HSO ウイルスとはまったくことなることがわかつた。

アデノウイルスはヒト由来のもの18型, サル由来のもの4型, チンパンジー由来のもの1型が知られている⁹⁾. これらのアデノウイルスは一般に, HeLa 細胞に接種すると, よく増殖し, 変性効果をしめし, 酸を産生する. また特有の核内封入体をつくる^{10)~12)}. HSO ウイルスは HeLa 細胞できわめてよく増殖し, 細胞変性をおこすが, 酸を産生せず, 核内封入体をつくらぬので, アデノウイルスとは区別される. また HSO ウイルスは, 入手できた型1~14抗アデノ血清では中和されなかつた.

CA ウイルス^{13), 14)}, CCA ウイルス^{15), 16)}, 2060 ウイルス¹⁷⁾, JH ウイルス¹⁸⁾, HA ウイルス¹⁹⁾はサル腎臓細胞で増殖し, 変性効果をしめすので, HSO ウイルスとはちがう. また CA ウイルスはサル腎臓, ヒト羊膜細胞で海綿様のジンチチウムをつくる点¹⁴⁾, CCA ウイルスはヒトの肝臓, KB 細胞の培養にジンチチウムをつくる点^{15), 16)}なども HSO ウイルスとことなっている. さらに CA ウイルス^{13), 14)}, HA ウイルス¹⁹⁾などの Myxovirus にぞくするものは, ニワトリ, ヒト (O型) 赤血球にたいする凝集素を産生し, 発育鶏卵で増殖するので HSO ウイルスとことなっている. ヒトの唾液腺ウイルス²⁰⁾は HeLa 細胞に変性効果をしめさない点で HSO ウイルスと区別できる.

これまでしられたウイルスのなかで HSO ウイルスにもつともよく似ているウイルスは, Lennette 等の Coe ウイルス²¹⁾であろう. HeLa 細胞でよく増殖し, 細胞変性をおこすが, サル腎臓細胞培養では細胞変性をしめさない点, 発育鶏卵に病原性をしめさず, ニワトリ, ヒト (O型) 赤血球にたいする凝集素をつくらぬ点など, 両ウイルスに共通した性状である. しかし, ウイルスは乳のみマウスに弱いながら病原性がある Coe 麻痺などの症状をおこしう点で HSO ウイルスとはちがつている.

このように既知ウイルスとの鑑別をおこなった結果, 分離されたウイルスは新しいものと思われるにいたり, とりあえず HSO (Human Serum Orphan の略) ウイルスとなづけることにしたのである.

HSO ウイルスはヒトの血清から分離されたので, 自然界においてヒトに感染するものと考えられる. 小規模の実験ではあるが, 健康な成人, 子供にかなりの中和抗体陽性者がみいだされることから, このウイルスはヒトの間かなり伝播しているものと思われる. しかしこのウイルスの感染がどのような病気を起こすか, まだわからない.

結 論

健康供血者の血清をもちいて HeLa 細胞を培養しているとき, 細胞変性をおこす3例の血清をみいだし, この血清から細胞変性ウイルス3株を分離した. これらの3株のウイルスは同一ウイルスと考えられ, 次の諸性状をもっている.

(1) Seitz EK, Chamberland L₃, Berkefeld N 濾過器をよいに通過し, 80,000×g, 60分で遠心沈澱される.

(2) 56°C, 12分で不活化され, 37°C で除々に不活化され, -20°C ではきわめて安定である.

(3) エーテル耐性である.

(4) HeLa 細胞, ヒナ胎児皮膚筋肉細胞培養でよく増殖し, 細胞変性をおこすが, サル腎臓細胞では細胞変性をおこさず, あきらかな増殖をしめさない. ヒト骨髄細胞 (H946株), 肝細胞 (Chang), 腸管細胞 (Henle) などで変性効果をしめすが, ニワトリ胎児細胞培養では変性効果をしめさない.

(5) 乳のみ, 成熟マウス, モルモット, ウサギ, 発育鶏卵に病原性をしめさない. ニホンザルでは白血球減少症がみられ, 弱いながら病原性をもっているようである.

(6) インフルエンザ (PR8, FM1, Lee), HVJ, 日本脳炎, ヘルペス, ワクシニア, リフトバレー熱ウイルス免疫血清で中和されない. ポリオウイルス (型1, 2, 3), ECHO ウイルス (型1~7, 9, 12), コクサキ-Aウイルス (型11, 13, 15, 18), アデノウイルス (型1~14) との交叉中和試験はすべて陰性であつた. 3株の分離ウイルスは中和試験で区別されない.

以上の結果から, 既知ウイルスとの鑑別をこころみ, 新しいウイルスであると考えられるにいたつた. そこでとりあえず, このウイルスを HSO (Human Serum Orphan) ウイルスとなづけた.

HSO ウイルスにたいする中和抗体が成人に 14.5% (14/92), 子供 (8~10才) に 22.7% (5/22) みいだされ, このウイルスがヒトの間かなり伝播していることがしめされたが, このウイルスとヒトの疾患との関係はわかつていない.

稿を終るにのぞみ, 御指導を賜つた松本教授, 北本教授に, 深く謝意を表します. また御指導と御鞭撻を賜つた長野教授に深謝いたします. 実験にさいして援助と協力をいただいた伝研病理草野助教授, 青山氏,

PLATE 1

No. 1

No. 2

No. 3

No. 4

- No. 1 Normal HeLa cells in 96 hour culture. Hematoxylin-eosin staining, 200 $\times$.
No. 2 Infected HeLa cells 48 hours after inoculation of $10^{4.5}$ TCID₅₀ of HSO virus. Hematoxylin-eosin staining, 200 $\times$.
No. 3 Normal HeLa cells in 72 hour culture. Phase-contrast microscopy, 200 $\times$.
No. 4 Infected HeLa cells 24 hours after inoculation of $10^{4.5}$ TCID₅₀ of HSO virus. Phase-contrast microscopy, 200 $\times$.

伝研第4細菌研究部務台氏に深謝いたします。また細胞、ウイルス、血清の分与その他種々の便宜を与えられた各位に深謝いたします。

文 献

1) Chang, R. S. Continuous subcultivation of epithelial-like cells from normal human tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **87**: 440-443, (1954) 2) Henle, G. and Deinhardt, F. The establishment of strains of human cells in tissue culture. *J. Immunol.*, **79**: 54-59, (1957) 3) Youngner, J. S. Monolayer tissue cultures. I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **85**: 202-205, (1954) 4) Kaerber, G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Path. Pharm.*, **162**: 480-483, (1931) 5) 本間遜, 草野信男. 慢性肺炎から分離した Pleuropneumonia-like organism について. *日本細菌学雑誌*, **9**: 1121-1124 (1954) 6) Melnick, J. L. and Sabin, A. B. The ECHO virus group. In "Viral and Rickettsial Infections of Man," 3rd ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 547-569, (1959) 7) Melnick, J. L. Problems associated with viral identification and classification in 1956. *Ann. New York Acad. Sci.*, **67**: 363-382, (1957) Tissue culture techniques and their application to original isolation, growth, and assay of poliomyelitis and orphan viruses. *Ann. New York Acad. Sci.*, **61**: 754-772, (1955) 8) Dalldorf, G., Melnick, J. L. and Curnen, E. C. The Coxsackie virus group. In "Viral and Rickettsial Infections of Man," 3rd ed., J. B. Lippincott Co. Philadelphia, 519-546, (1959) 9) Huebner, R. J., Rowe, W. P. & Chanock, R. M. Newly recognized respiratory tract viruses. *Ann. Rev. Microbiol.*, **12**: 49-76, (1958) 10) Boyer, G. S., Leuchtenberger, C. and Ginsberg, H. S. Cytological and cytochemical studies of HeLa cells infected with adenoviruses. *J. Exp. Med.*, **105**: 192-216, (1957) 11) Lépine, P., Chang, C., Maurin, J. and Carré, M. C. Etude des virus APC, (adeno-virus). II. Evolution des lésions cellulaires provoquées par le virus APC in vitro. *Ann. Inst. Pasteur*, **92**: 728-734 (1957) 12) Barski, G. Character of the specific cellular lesion caused in vitro by the viruses of the APC group and its diagnostic value. *Ann. Inst. Pasteur*, **91**: 614-622, (1956) 13) Chanock, R. M. Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup. *J. Exp. Med.*, **104**: 555-576 (1956) 14) Chanock, R. M. Reco-

very of a new type of myxovirus from infants with croup. *Ann. New York Acad. Sci.*, **67**: 287-295 (1957) 15) Chanock, R. M., Roizman, B. and Myers, R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Amer. J. Hyg.*, **66**: 281-290, (1957) 16) Morris, J. A., Blount, R. E., Jr. and Savage, R. E. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **92**: 544-549, (1956) 17) Pelon, W., Mogabgab, W. J., Phillips, I. A. and Pierce, W. E. A cytopathogenic agent isolated from naval recruits with mild respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **94**: 262-267, (1957) 18) Price, W. H. The isolation of a new virus associated with respiratory clinical disease in humans. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **42**: 892-896, (1956) 19) Andrews, B. E., Bell, J. A., Reichelderfer, T., Kapikian, A. Z., Mastropa, F. M. and Huebner, R. J. Newly recognized myxoviruses from children with respiratory disease. *New England J. Med.*, **258**: 207-213, (1958) 20) Smith, M. G. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic virus from human salivary gland virus (S. G. V.) disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **92**: 424-430, (1956) 21) Lennette, E. H., Fox, V. L., Schmidt, N. J. and Culver, J. O. The Coe virus: an apparently new virus recovered from patients with mild respiratory disease. *Amer. J. Hyg.*, **68**: 272-287, (1958)