

## 小児神経系疾患のヒョリンエステラーゼに関する研究

## 第 2 篇

## ウイルス感染哺乳マウスの組織ヒョリンエステラーゼに関する研究

岡山大学医学部小児科教室 (指導: 浜本英次教授)

江 草 安 彦

〔昭和 34 年 2 月 10 日受稿〕

## 緒 言

脳組織に Achetylcholine (以下 Ach と記す) が含まれていることは Chang & Gaddum<sup>1)</sup> 以来, 多数報告され, Nachmansohn<sup>2)</sup> は Ach 生成酵素を見出し, 之を Cholinacetylase と名づけた. 更に彼は Ach より安定な Cholinesterase (以下 ChE と記す.) を定量的に測定し, 広く動物組織中, 殊に人脳中の分布状況を報告した. 1941年, Hawes & Alles<sup>3)</sup> により, 脳組織, 筋肉に存在する ChE は Ach のみを特異的に分解する真性 ChE であることが明らかとなり, 神経系における Ach の生理的意義の解明が行われつつある<sup>4)8)</sup>. 一方, ウィルス感染組織における Ach の代謝研究はまだ十分ではなく, 近年漸く, ウィルスの増殖機転, 発症などの関連などが検討されはじめた. 又, ウィルス性神経疾患において, 神経組織の ChE を研究したものは二, 三<sup>9)11)</sup> 散見する.

私はウィルス感染に際して表れる組織 ChE の変化とその意義を知らんとして, コクサキウィルス, ポリオウィルスの各々の単独接種哺乳マウス, 及びポリオ, コリサキ両ウィルスの重接種哺乳マウスの脳脊髄及び筋肉についてワールブルグ検圧法<sup>12)</sup> により ChE の動態を検討し, 組織 ChE 値が感染哺乳マウスの組織学的所見及び臨床症状とほぼ一致する成績を得たので報告する.

## 実験材料及び実験方法

## 実験材料

## 1) 使用マウス

岡山大学小児科教室飼育室における初回分娩の哺乳マウスを使用した.

## 2) 使用ウィルス

## A. コクサキウィルス

## i) 奥本株 (A-2)

## ii) 土肥株 (A-19)

## iii) 吉光株 (B-1)

奥本株, 及び土肥株は, いづれも藤原, 古前,<sup>9)</sup> により, 吉光株は古前<sup>10)</sup> により, いづれも岡山大学医学部小児科教室において分離されたものである. 奥本, 土肥株は感染動物の筋肉を, 吉光株は脳を夫々の接種材料に用いた. 即ち, 之等の組織を乳鉢で等滲圧磷酸緩衝液 (pH=7.4) により10%乳剤とし, 哺乳マウスを用い LD<sub>50</sub> を求め, その 10<sup>1</sup> LD<sub>50</sub> (0.03 cc) を脳内に接種した.

## B. ポリオウィルス

## i) ランシング株

## ii) マホネイ株

## iii) レオン株

使用にあたって, いづれも等滲圧磷酸緩衝液 (pH=7.4) を用いて, 感染動物の脳脊髄の乳剤をつくり, 成熟マウスにより LD<sub>50</sub> を求めた. ランシング株, マホネイ株は 10<sup>2</sup> LD<sub>50</sub> (0.02 cc) を, レオン株は 30 LD<sub>50</sub> を哺乳マウスの脳内に接種した. なおレオン株, マホネイ株はいづれもマウス馴化株である.

## 実験方法

接種後, 4~5日目(後述)に上記マウスを断頭, 頭蓋, 脊髄を切解し, 脳及び脊椎を取出し, 筋肉は四肢のみを剝離し, 夫々秤量し, 之等を Potter & Elvehjem 型硬質硝子製ホモディザーで各々のリンゲン液による50倍稀釈懸濁液を作った. 採取組織材料が少量である場合には, 二四分を集めて一つとした場合もある. なお使用リンゲン液は, その都度, 新たに調製した. 組織 ChE 値の測定は第1篇<sup>11)</sup> と同様に Warburg 検圧法<sup>12)</sup> に従った.

## 1) 基質溶液

Little & Lawson<sup>5)</sup>, 後藤<sup>7)</sup> に従い, 2.5%塩化 Ach

(Roche) 水溶液 0.2 cc を容器側室に入れ、主室には組織懸濁液 2.0 cc を入れ、混和後の容器主室の全量を 2.2 cc とした。なお、測定時 pH=7.4 となる様にした。

## 2) 測定方法

ガス腔を炭酸ガス 5% 混合窒素ガスで十分に充填した後、振盪を開始する。37.5°C の恒温水槽で振盪回数毎分 78 回内外で 5 分間の予備振盪後、圧の平衡を確かめた上で、側室内容と主室内容とを混和し、Ach 混和後、10 分より「読み」を開始し、30 分迄測定し、

組織懸濁液 1.0 cc から 30 分間に発生する炭酸ガス量の立方根で、ChE 値を示した。なお測定は各群につき、各 5~8 回行つた。

## 実験成績

### 1) コクサキウイルス接種哺乳マウス

生後 2~3 日の哺乳マウスに脳内接種を行い、接種後 3~5 日で麻痺の出現したもののみを用い、その脳及び脊髄と筋肉の ChE 値を測定した。成績は第 1 表の通りであつた。即ち

第 1 表 コクサキ・ウイルス接種哺乳マウス組織 ChE 値

例数	脳 及 び 脊 髄		筋 肉		
	動 揺 範 囲	M ± σ	動 揺 範 囲	M ± σ	
健 康 群	8	60.5 ~ 81.0	72.0 ± 6.6	34.1 ~ 48.0	42.5 ± 6.5
対 照 群	7	42.5 ~ 73.0	59.7 ± 10.2	37.5 ~ 45.2	41.6 ± 2.6
奥 本 株 接 種 群	7	48.5 ~ 68.6	60.9 ± 8.3	31.3 ~ 46.2	39.8 ± 5.2
土 肥 株 接 種 群	6	44.5 ~ 73.3	60.7 ± 8.7	28.0 ~ 37.2	33.1 ± 1.8
吉 光 株 接 種 群	6	35.0 ~ 52.0	45.4 ± 5.3	35.5 ~ 49.5	41.6 ± 4.9

### i) 健康群

脳及び脊髄は 72.0 ± 6.6 であり、筋肉は 42.5 ± 6.5 であつた。

### ii) 対照群

生後 2~3 日の哺乳マウスに、健康マウスの筋肉の 50 倍稀釈懸濁液をつくり、その上清を 0.03 cc 脳内に接種し、接種後 4~5 日目に之を殺し、ChE 値を測定した。脳及び脊髄の値は 59.7 ± 10.2 で健康群の 72.0 ± 6.6 に比して 17.0% 減少していたが、5% の危険率では有意差を認めなかつた。筋肉では両者に差がみとめられなかつた。

### iii) コクサキウイルス接種群

脳及び脊髄の ChE 値は対照群に比べ、奥本株 (A-2)、土肥株 (A-19) では変化なく、吉光株 (B-1) の場合には、23.9% 減少し、危険率 5%

で有意差をみとめた。筋肉の ChE 値は対照群に比べ、奥本、吉光株は変化なく、土肥株は 19.5% の減少があつた。この値では 5% の危険率で有意差があるとはいへなかつた。

### 2) ポリオウイルス接種哺乳マウス

生後 2~3 日の哺乳マウスに上記の量の、ランシング、レオン、マホネイ株を脳内に接種した。ランシング接種群は 4~5 日に発症し、他の二株接種群は異常を認めなかつたが、いずれも接種後 4~5 日目に型の如く、処理して脳及び脊髄と筋肉の ChE 値を測定した。成績は第 2 表の通りであつた。即ち、脳及び、脊髄では発症したランシング株接種群にかぎり、対照群に比べて、56.8% ChE 値が増加しており、推計学上有意差をみたが、この外、マホネイ株接種群の脳及び脊髄が対照群に比べて 15.0% 減少

第 2 表 ポリオ・ウイルス接種哺乳マウス組織 ChE 値

例数	脳 及 び 脊 髄		筋 肉		
	動 揺 範 囲	M ± σ	動 揺 範 囲	M ± σ	
健 康 群	8	60.5 ~ 81.0	72.0 ± 6.6	34.1 ~ 48.0	42.5 ± 6.5
対 照 群	7	42.5 ~ 73.0	59.7 ± 10.2	37.5 ~ 45.2	41.6 ± 2.6
ランシング株接種群	7	68.0 ~ 116.0	93.8 ± 15.8	36.0 ~ 48.5	41.7 ± 3.6
マホネイ株接種群	5	39.5 ~ 69.5	52.0 ± 11.3	39.0 ~ 61.5	42.2 ± 8.0
レオン株接種群	5	47.3 ~ 67.0	58.3 ± 6.4	36.5 ~ 55.5	44.4 ± 6.1

をみたが、この値では5%の危険率で有意差とは云えなかつた。レオン株の脳及び脊髄とランシング、マホネイ、レオン株の筋肉は対照群に比べ殆んど増減しなかつた。

3) コクサキー、ポリオ重接種哺乳マウス  
 生後2~3日の哺乳マウスの脳内に上記の量の各種ポリオウィルスを接種し、その後2日目に既述の如く、奥本、或は土肥株を第3表の如き組合せによ

第3表 コクサキー、ポリオウィルス重接種哺乳マウス組織 ChE 値

例数	脳 及 び 脊 髄		筋 肉		
	動 揺 範 囲	M ± σ	動 揺 範 囲	M ± σ	
健 康 群	8	60.5 ~ 81.0	72.0 ± 6.6	34.1 ~ 48.0	42.5 ± 6.5
対 照 群	7	42.5 ~ 73.0	59.7 ± 10.2	37.5 ~ 45.2	41.6 ± 2.6
ランシング + 奥本	8	55.8 ~ 74.3	67.0 ± 6.9	32.5 ~ 48.0	40.2 ± 4.8
マホネイ + 奥本	5	46.0 ~ 65.0	53.8 ± 6.7	35.5 ~ 44.0	38.8 ± 2.9
レオン + 奥本	6	44.0 ~ 59.5	50.1 ± 5.5	31.5 ~ 43.0	37.7 ± 4.1
マホネイ + 土肥	5	43.0 ~ 49.3	44.4 ± 3.3	33.5 ~ 41.0	36.7 ± 2.7
レオン + 土肥	5	42.5 ~ 67.6	51.3 ± 8.6	33.5 ~ 47.5	40.9 ± 5.1

つて皮下に接種した。接種後4~5日で発症したマウスを型の如く処理して組織 ChE 値を測定した。其の結果、脳及び脊髄ではランシング株、奥本株の重接種群が対照群に対し、12.2%増加を示し、マホネイ、土肥重接種群は25.6%減少したが、之等はいづれも推計学上有意差があるとは云えなかつた。その他の組合せでは、脳及び脊髄の ChE 値は、いづれも対照群に比べ、10.9乃至18.1%の減少傾向を示した。筋肉ではマホネイ土肥重接種群が13.0%の減少を示したが、その他の組合せでも、僅かに減少の傾向を示した。

考 按

真性 ChE が神経組織において刺戟興奮の伝導に果す役割は周知のところである。私は第1篇<sup>11)</sup>に於て、神経疾患の種類により、真性 ChE である髄液 ChE が変動することを報告した。本篇に於ては、更に一步をすすめて、向神経性ウィルスに感染した哺乳マウスの脳及び脊髄と筋肉の ChE 値の変動を検してみたのである。

従来、ウィルス感染脳 ChE 値については、日本脳炎<sup>6)14)</sup>、狂犬病<sup>14)</sup>で減少し、Neurotropic Yellow Fiever<sup>5)</sup>で僅かに減少し、インフルエンザ<sup>13)</sup>では却つて上昇することが知られている。ポリオウィルスについては、ランシング株についてのみ<sup>13)14)15)</sup>若干の見解が述べられている。私はポリオウィルスにおいて、ランシングの外にマホネイ、及びレオン株、更にA-2、A-19、B-1の各種コクサキーウィルスの感染について哺乳マウスを用いて、その

脳及び脊髄と筋肉の ChE 値を測定した。

まづ、脳内接種の機械的、化学的刺戟の影響を検するため、正常動物の筋肉乳剤を接種したところ、無処置の健康マウスに比して、脳及び脊髄で ChE 値が17.0%の減少をみた。

この値は危険率5%では有意差をみなかつた。しかし以下各種ウィルス接種群の値を比較する基準にはこの対照群の値を用いたのである。

コクサキーウィルスA群、奥本株、土肥株を接種したマウスの脳及び脊髄では ChE 値の変化はなく、筋肉では土肥株が19.5%減少を示した。この値では5%の危険率で有意差はなかつた。B群吉光株、を接種したマウスでは、脳及び脊髄に於て23.9%減少し有意差をみとめたが、筋肉の値では変化がなかつた。一般にコクサキーA群<sup>16)</sup>は感染哺乳マウスに瀰漫性筋炎を起すが、脳及び脊髄に著変がなく、之に反し、B群は主として脾臓、脂肪組織、並びに脳脊髄に病変を認め、筋炎は比連的軽度で止まる事が知られている。私の見た ChE 値の変動も略々この組織学的変化に並行するものであることが分つた。

ポリオウィルス接種マウスの脳 ChE 値はランシング株で Bauer<sup>13)</sup>は変化なく、西沢<sup>15)</sup>は増加し、浜田<sup>14)</sup>は接種後、一時減少するが、72時間目には正常にかえると述べている。ランシング株では私の成績は対照群に比べ、56.8%増加して、西沢<sup>15)</sup>の成績に一致していた。レオン、マホネイ株はいづれもマウスに馴化<sup>17)18)</sup>されたものを使用したが、之等は、臨床的にも発症せず、ChE 値の動揺も殆んどなかつた。このことは之等マウス馴化レオン、マ

ホネイ株は脊髄腔内接種によつて発症するものであり、脳内接種では、発症が困難であるとされているがそのためにかかる値が出たものと考えられる。私の実験は哺乳マウスで行つたもので、脊髄腔内接種は非常に困難であり、やむを得ず、ランシング株にならつて脳内接種によらねばならなかつた。又大原<sup>19)</sup>は哺乳マウスを用い、コクサキープリオウィルスの重接種を行つて干渉現象の有無をしらべ、ランシング株の脳内接種後2日目に奥本株を皮下に接種した場合にのみ干渉現象をみとめている。私の成績でもランシング、奥本重接種群でランシング単独接種の如く ChE 値は上昇せず、その脳脊髄 ChE 値は僅かに12.3%増加したのみであり、之の変化は正常範囲内に止るものであつて、有意差とはいえ、誠に興味深いところであつた。他の組合せではいづれもむしろ減少の傾向を示した。この事よりも干渉現象の一端が如実にうかがえたものと思われた。

以上、ポリオ、並びにコクサキープリオウィルスの感染によつて、哺乳マウスの脳脊髄、及び筋肉の ChE 値の変動を検討したところ、ChE 値と各ウィルスが惹起する組織学的所見、臨床症状とが略々対応して変化する成績を得た。私はワールブルグ検圧法による組織 ChE 値の測定でウィルス感染組織の態度の一端を定量的に知り得たが、私の実験では哺乳マウスを使用した関係で、脳、及び脊髄の各部の ChE の分布状況を細部にわたつて検討することが出来なかつたのは残念であつた。この点、沖中<sup>4)</sup>、宇尾野<sup>5)</sup>なども述べている如く、組織化学的検索法を併行して実施するならば組織における Ach の動態がもう一段と精密にうかがえるものと思われた。

## 結 論

コクサキープリオウィルス A 群 2, 19 型, B 群 1 型, 及びポリオウィルス, ランシング株, マウス馴化マホネイ及びレオン株を哺乳マウスに、単独接種又は各種組合せによる重接種を行い、之等の脳脊髄及び筋肉の ChE 値を測定し、次の結果を得た。

1) 健康な哺乳マウスの脳及び脊髄の ChE 値は

72.0±6.6で、筋肉の ChE 値は42.5±6.5であつた。

2) 施術侵襲による脳脊髄及び筋肉 ChE 値の変化を考慮して、健康哺乳マウスの筋肉乳剤を健康哺乳マウスの脳内に接種して ChE 値を測定し、之を対照値とした。その結果、この値は健康哺乳マウスに比べ、脳及び脊髄で17.0%減少し、筋肉では変動を示さなかつたが、この変化は5%の危険率で有意差とはいへなかつた。

3) コクサキープリオウィルス A 群 2, 19 型接種哺乳マウスの脳脊髄 ChE 値は対照に比べ変化なく、筋肉 ChE 値は19型で19.5%減少したが、之も推計学的に有意差ではなかつた。B 群 2 型接種で、脳脊髄 ChE 値は23.9%減少したが、之は5%の危険率で有意差とみとめられた。又、筋肉 ChE 値には変化がなかつた。而して組織 ChE 値の変動と組織学的所見はほぼ並行した。

4) ポリオウィルス接種群では、コクサキープリオウィルス感染の反対でランシング株接種で発症した哺乳マウスの脳脊髄 ChE 値が56.8%の著増を示したが、発症しなかつたマウス馴化マホネイ、レオン株接種哺乳マウスでは、脳脊髄 ChE 値はむしろ減少傾向をみた。又筋肉 ChE 値の変化はなかつた。

5) コクサキープリオウィルス重接種群では干渉現象のみられたランシング、奥本株重接種群では、ランシング株単独接種の如く著しくはなく脳脊髄 ChE 値が12.3%増加したに止つた。その他の組合せでは10.9%乃至18.1%の減少傾向を示し、筋肉 ChE 値ではマホネイ、土肥重接種群が13.0%の減少を示した。又その他の組合せでも、僅かに減少の傾向を示した。これらの値はすべて5%の危険率で有意差とはみられなかつた。

摺筆するにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師浜本教授に深甚なる感謝を捧げます。実験に際し、終始御教示を賜つた山内博士、及び多大の御援助をいただいた古前博士、大原博士に深謝致します。

## 文

- 1) Chang, H. C. & Gaddum, J. H. : J. Physiol, 79; 255, 1933.
- 2) Nachmansohn, D. & Machado, A. L. : J. Neurophysiol, 6; 397, 1943.
- 3) Hawes, R. C. & Alles, G. A. : J. Lab. Clin.

## 献

- Med, 26; 845, 1941.
- 4) 沖中(重), 吉川(政)・日新医学, 40; 7, 371, 昭和28.
- 5) Little, M. & Lawson, R. S. : J. Immunol, 66; 405, 1951.

- 6) 福島米治：大阪市立医科大学雑誌，2；273，昭和27。  
 7) 後藤重弥：日新医学，37；434，昭和25。  
 8) 宇尾野公義：綜合臨床，6；1，189，昭和32。  
 9) 藤原弘，古前敏明：Virus，3；32，昭和27。  
 10) 古前敏明他：Virus，5；213，昭和30。  
 11) 江草安彦：岡山医学会雑誌投稿中。  
 12) Reiss, M., Hemphill, R. E. : Nature, 16; 18, 1948.  
 13) Bauer, D. J. : The Second Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge, 63; 1953.  
 14) 浜田樹：小児科紀要，4；455，昭和33。  
 15) 西沢義人・ビタミン，6；311，昭和28。  
 16) 浜本英次・小児のウイルス疾患，165，昭和33。  
 17) Li, C. P. & Habel, K. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med, 78; 233, 1951.  
 18) Li, C. P. & Schaeffer, M. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med, 82; 477, 1953.  
 19) 大原俊夫 Virus, 8; 2, 141, 昭和33.

## Studies on Cholinesterase in the Infants with Disease of the Nervous System

### Part 2. A Study on the Tissue Cholinesterase in Suckling Mice infected with Virus

By

Yasuhiko Egusa

Department of Pediatrics Okayama University Medical School  
 (Director: Prof. Eiji Hamamoto)

With the purpose to know the significance of the changes in the tissue cholinesterase (Ch E) occurring in the viral infection, the author inoculated to suckling mice either singly or in various combinations such viruses as Coxsackie group A type-2, type-19, group B type 1, poliovirus, the Lansing strain, and the mouse-adapted Mahoney and Leon strains; and studied the fluctuations in Ch E of the brain, spine and muscles by Warburg's techniques. As the result it has been found that tissue Ch E values roughly coincide with histological findings and clinical symptoms of the infected mice.

1. The Ch E value of the brain and spine in the normal suckling mice is  $72.0 \pm 6.6$  and that of muscles is  $42.5 \pm 6.5$ .

2. In consideration of the changes in the Ch E of the brain, spine and muscles to be brought about by virus invasion, the emulsion of muscles from normal suckling mice is inoculated into other normal suckling mice and the Ch E values are estimated. These values are taken as the control. The ChE value of the brain and spine is  $59.7 \pm 10.2$ , 17 per cent less than that in normal suckling mice; while the Ch E of the muscles is  $41. \pm 2.6$ , showing no difference from the control. Such changes in the range of 5 per cent error can not be construed as a significant difference.

3. The ChE values of the brain and spine in the suckling mice inoculated with the group A-type2 of Coxsackie virus or with the type 19 do not differ from the control, and the ChE of the muscles in the animals inoculated with the type 19 is 19.5 per cent less than the control, stochastically showing no significant difference. In the animals inoculated with the group B-type 2 the ChE value of the brain and spine is decreased by 23.9 per cent, and this shows a significant difference from the control in the range of 5 per cent error. However,

no difference can be observed in the ChE of the muscles as compared with the control. Moreover, the changes in the tissue ChE approximately coincide with histological findings.

4. In the group inoculated with poliovirus, conversely to the group inoculated with the Cocksackie strain, the ChE of the brain and spine in the suckling mice showing the symptoms of disease by the inoculation of the Lansing strain presents a marked increase of 56.8 per cent, while in those inoculated with the mouse-adapted Mahoney and Leon strains but showing no symptoms of disease the ChE values of the brain and spine rather show a decreasing tendency. In addition, the ChE of the muscle show no difference from the control.

5. In the group inoculated with both Cocksackie and polio viruses an interference phenomenon can be observed, while in the group inoculated with the Lansing and Okumoto strains (A-2) the ChE values show no marked increase such as observable in the group inoculated singly with the Lansing strain, and showing only the increase of 12.3 per cent in the ChE of the brain and spine, but the value, fluctuating within the normal range, can not be said to show any significant difference from the control. Other group given inoculation of Cocksackie combined with poliovirus tend to show the decrease of 10.9 per cent to 18.1 per cent. As for the ChE of muscle the group inoculated with both Mahoney and Dohi strains (A-19) a decrease of 13 per cent can be seen. Still other groups given different sets of inoculation show a slightly increasing tendency. All these values in the range of 5 per cent error, however, can not be considered to present any significant differences.

---