

岡山県下に発生した流行性肝炎特に病原体に関する研究

第 3 編

分離ウイルスの血清学的研究感染防禦試験に就て

岡山大学医学部微生物学教室（主任：村上栄教授）

藤 原 清

〔昭和32年3月12日受稿〕

緒 言

著者は既に岡山県下の流行性肝炎患者より分離したウイルスの血清学的研究を行い、補体結合反応に於ては殊に抗原の改良により、中和試験では術式の吟味とにより、ある程度にウイルスの決定が更に肝炎診断の一助となる事実を実験的に証明した。なおその際に於ても分離ウイルスは大略同一の性状を具備するものであることを実証するに至つたが、本編に於ては更に分離ウイルスの抗原性に就て感染防禦試験の上から検討を加えると共に Vaccination に於ける免疫効果に就ても追究した。その実験成績の概要を報告する。

実験材料及び実験方法

供試ウイルス：供試ウイルスとしては昭和27年以来孵化鶏卵で分離した石原、森本、金光株であり、その後マウスの累代で分離した青森、野田株を使用した。之等のウイルスは孵化鶏卵及びマウス累代を行い保存されているウイルスである。

感染防禦試験：夫々の供試ウイルスを各々のマウス50匹宛に接種罹患せしめたる後14日を経たあと、マウスを屠殺肝臓のみを集め秤量した上、滅菌食塩水（pH 7.6）を用い、20%粗乳剤を作り、10,000倍に Marzonin を添加したる後、3週間以上氷室に保存不活化した。次に不活化ウイルスを予め準備したマウス（12～14 gr）に0.25 ml, 0.3 ml, 0.5 ml と3日間隔で3回接種し、2週間後各種釈した生ウイルス

により攻撃し、更に12日後マウスを屠殺剖検した後、各臓器の病理所見殊に肝臓を中心とする病変により判定した。

中和試験及び“Absättigungsversuch”：感染防禦試験の場合と同様に、不活化ウイルスを作り予め用意したマウスに0.25 ml, 0.3 ml, 0.5 ml と3日間隔で3回接種し、2週間後夫々1群50匹のマウスより心臓穿刺により採血、血液を集めて血清を分離冷凍保存し中和試験に用いた。なお生ウイルスでも同様な方法で血清を作り、実験の際の対照に用い比較検討した。中和試験の方法は第2編に於ける実験と同様にウイルスと血清を混和し、24時間氷室に放置後マウスに接種し14日後に於ける臓器の病理標本により判定した。“Absättigungsversuch”は Wildführ の原法に倣つたが適宜改変し判定は中和現象によつた。

実験成績

1) 不活化ウイルスによる感染防禦試験

先の中和試験及び補体結合反応に於ける抗原性の問題即ち分離ウイルスは等しく抗原性を共通するものであるという点と、之等血清反応により得られた抗体価が本実験に於ける感染防禦試験に於て如何に発現するかの問題と共に、将来 Vaccination という究極の問題として、殊に重要なものと考えられるので、不活化ウイルスの免疫と、それより生ずる抗体の動向に就ては詳細に検討した。

感染防禦試験に用いた不活化ウイルスによる免疫は先ず森本株を用いて行い、他の生ウイルスに

よりて攻撃して、マウスの病理所見を判定した(第1表)。

之の実験に於ては病理学的所見が重視され

るのでその標準となる事項に就ては慎重に考慮した(第2表)。判定の標識としては先に感染所見として述べた肝臓に於ける肝細胞障

第1表 不活化病毒による感染防禦試験

攻 撃 株	供 試 動 物 別	ウ		イ		ル		ス		稀 釈	
		10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9		
森本株	免 疫 群	+	⊥	+	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
	対 照 群	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
石原株	免 疫 群	+	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
	対 照 群	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
金光株	免 疫 群	+	+	⊥	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
	対 照 群	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕

註. 不活化病毒: 森本株

第2表 感染防禦試験に於ける病理学的所見

攻 撃 株	病 理 学 的 所 見 供 試 動 物 別	肝 臓						肺 臓					
		壊 変 死	肝 細胞 性	肥 大 及 増 殖	星 芒 細胞 増 殖	肝 索 の 解 離	間 質 内	細 胞 浸 潤	充 血 及 出 血	胞 隔 炎	胞 浸 潤	管 周 圍 閉 塞 及 於 血 管 枝 及 於 血 管 厚	其 他
石原株	免 疫 群	-	-	⊥	-	+	+	+	+	+	⊥	-	-
	対 照 群	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
森本株	免 疫 群	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	⊥
	対 照 群	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
金光株	免 疫 群	-	⊥	-	-	+	+	-	+	+	-	+	⊥
	対 照 群	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕

i) (⊕)~(-) 病変の程度を示す

ii) 不活化病毒 石原株

及び炎症性変化を重視した。肝細胞障として肝細胞の変性及び壊死等があつて、肝細胞の空胞性若くは顆粒性変性の発現があり、限局性壊死巣を形成した部分は単球で囲まれ、その周辺に於ける Mallory 小体の出現も認められる場合が少なくない。細胞浸潤は小葉中心部及び門脈域に、時にグリソン氏鞘周辺に高度に認められる。それと共に星芒細胞の増殖又肝索の解離も散見されるが、これ等の所見は単独に存在する場合は少く、混在し頗る多彩な病理所見を認めることが多い。肺臓に於ては胞隔炎の像が明かであり、間質内に於け

る殊に血管及び気管周辺の細胞浸潤の度が著明なる事も本病毒の特長である。この実験でも対照群にあつては前述の病理所見が高度に認められる事が多いが、免疫群では同種病毒では斯る進行性病変がよく阻止せられ感染は軽度に経過するものの如く、僅少な細胞浸潤が時に認められることがある。既に先述した如くマウスに於ける病理所見は病毒稀釈度により甚だしく異なる事実を述べ10⁻⁶~10⁻⁹程度の稀釈に於て高度の所見を得る事を指摘した。本実験に於ける結果を見るに、感染阻止は病毒稀釈の高い場合に殊の外著明である事

実は興味ある所見と考えられた。なお之等感染防禦試験に於て同種病毒のみならず、他の生病毒によりての感染も阻止する現象が見られた事実は抗原性の共通する事を暗示している。同様な実験を交叉的に反復した結果、之等を使用した不活化病毒の接種により感染防

禦抗体を形成する事実は明瞭であり、確実に免疫性を獲得すると共に、生病毒によりての攻撃に際して感染を阻止する抵抗性を賦与し得たことを証明し得られたと同時に、之等の病毒間には抗原性に殆んど差異はない事を指摘し得られた(第3表)。

第3表 不活化病毒による感染防禦試験

攻撃株	供試動物別	ウ	イ	ル	ス	稀	積		
		10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9
石原株	免疫群	+	+	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥
	対照群	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
森本株	免疫群	+	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
	対照群	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
金光株	免疫群	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
	対照群	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

註. i) 不活化病毒: 石原株

ii) (卅)。(卅)。(+)。(⊥) 病変の程度を示す。

是等の実験に使用した分離病毒は孵化鶏卵によりて分離し、孵化鶏卵及びマウスによりて累代中のものを使用した実験であるが、更に別の材料よりマウスに直接接種し累代中の青森、野田株及び孵化鶏卵累代中の石原株等を使用し交叉的に感染防禦試験を行つて抗原性の差異を検討した(第4、第5表)。

孵化鶏卵で得られた病毒、マウス累代で得た病毒、更に孵化鶏卵とマウスで累代し保存中の病毒間には、型別と呼称すべき程の抗原

性の差は窺うことは出来ない。いずれの場合でもよく感染防禦抗体の産生が見られ、夫々に感染阻止現象を発揮している。免疫群に於ける感染阻止では、感染による防禦性は病理所見によく観察され得たが、夫々にマウス累代により病毒の増強は孵化鶏卵累代より著しい傾向があり、又マウス直接分離の病毒は累代数がまだ新しく定着性が充分でないためか病毒の示す病理学的変化も著明ではなく、自ら不活化病毒の免疫性も遜色がある様に推

第4表 不活化病毒による感染防禦試験

攻撃株	供試病毒別	ウ	イ	ル	ス	稀	積		
		10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9
石原株	免疫群	⊥	⊥	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
	対照群	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
森本株	免疫群	⊥	⊥	⊥	+	⊥	⊥	⊥	⊥
	対照群	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
野田株	免疫群	+	+	+	+	⊥	⊥	-	-
	対照群	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	+

註. i) 不活化病毒: 野田株

第5表 不活化ウイルスによる感染防禦試験

攻撃株	供試動物別	ウ イ ル ス 稀 釈								
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	
野田株	免疫群	+	+	+	+	+	⊥	⊥	⊥	
	対照群	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	
森本株	免疫群	+	+	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥	
	対照群	⊕	⊕	+	+	⊕	⊕	⊕	⊕	
青森株	免疫群	+	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	
	対照群	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	

註. 不活化ウイルス: 石原株 (孵化鶏卵累代)

測された。孵化鶏卵による実験¹⁾²⁾が述べられた孵化鶏卵通過によるウイルスの増強はマウスに累代した場合には殆んど認めぬが、累代を漸次継続することにより次第に馴化性を獲得するに至り、ウイルスの増強として示される様になると共に、感染は高度に免疫性もまた確実に賦与されるに至るものと見做し得るのであ

る。

次に不活化ウイルスによる免疫実験については既に前回までの実験では3回同様な条件のもとに行つた結果、強固な感染防禦力を賦与し得たが、之の免疫は単に1回のみ(腹腔内接種0.5ml)の接種だけでは感染阻止は出来なかつた(第6表)。即ち不活化ウイルス1回の接種

第6表 不活化ウイルスによる感染防禦試験

攻撃株	供試動物別	ウ イ ル ス 稀 釈								
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	
石原株	免疫群	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	
	対照群	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	
森本株	免疫群	+	+	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	
	対照群	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	
金光株	免疫群	⊕	⊕	⊕	+	+	⊕	⊕	⊕	
	対照群	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	

註. i) 不活化ウイルス: 石原株 (1回0.5ml) 接種

だけで生ウイルスの攻撃に軽度の抵抗は認められても感染を確実に近きまで防止する事が出来ない。

発揮された病理所見では免疫群と対照群との差異は全く認められず、感染の増悪したと見做すべき結果を得た場合も少くない。之の場合に特有に発現する病理所見は先述した肝臓を中心とした病変就中肝細胞の変性及び壊死之に随伴する細胞浸潤(實質内に於てリンパ様細胞及び単球を含む)が混在し多彩な所見

であつた。腎細胞浸潤は軽度に発現する場合が対照群の健康マウス臓器乳剤を接種した時に稀に認められたが生体反応と見做し得られ、之等の実験には支障なき事実を確めた。

2) 不活化ウイルス接種によるマウス免疫血清による中和試験及び“Absättigungsversuch”

不活化ウイルス接種によりて感染防禦性が賦与される事実を知り得たが、次に同時期に於ける免疫抗体の消長に就て検討を行つた。

冷凍保存中のマウス免疫血清に就て先の補体結合反応による抗体価の測定を行うと共に、夫々の免疫血清について血清中和能の可否を中和試験及び“Absättigungsversuch”により判定した。之等の実験に於ては病理学的所見

をそれぞれ中和現象により判読したが、夫々の免疫血清では生病毒による免疫の場合中和の促進は顕著ではないが、それぞれに中和による感染の阻止現象は有意に惹起している事実を明に認められた(第7表)。

第7表 Absättigungsversuch

不活化病毒 免疫血清	経日 (週)	補体結合 反応 抗体価	飽和試験 中和の可否	ウ イ ル ス 稀 釈							
				10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
1 マウス血清 (石原株)	—	1 : 8	可能	+	+	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥
2 マウス血清 (森本株)	—	1 : 16	疑	⊕	+	+	+	+	+	⊥	⊥
3 マウス血清 (金光株)	—	1 : 16	疑	+	+	+	⊕	⊕	+	+	+
4 肝炎恢復患者 血清(青江)	30	1 : 8	否	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
5 恢復患者 血清(宇野)	27	1 : 4	否	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
6 マウス 健康血清	—	—	—	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕

註. i) 攻撃病毒 石原株

表示した成績では先の“Absättigungsversuch”と術式をやや異にし生病毒の攻撃は稀釈病毒により具体的に感染の過程を知るべく試みたが、対照に用いた恢復患者及びマウス健康血清と対比するに、明かに判定は容易であつたに拘らず、免疫血清の場合に比較的強い感染が認められた例があり、納得し得ない結果も得たことが少くない。金光株に於ける所見では明瞭に中和が発現し感染阻止がよく発揮された結果が得られた。殊にこの際の感染程度が、稀釈病毒により著しく差異を呈し10⁻⁴~10⁻⁶の稀釈に於て特に強い感染の所見が得られる事實は、在来の“Absättigungsversuch”の術式に聊かの疑念を抱くのである。

Wildführ⁴⁾の原法に就てその術式を再考するに、予め接種された免疫血清の力価が特に高い場合には生体内に吸収される程度の飽和状態にまで達し、爾後の侵入病毒に対する抵抗性を獲得するに至ると見られるが、その際の病毒侵襲が急激に而も感染の高度に起り

易い適度の稀釈で行われた場合には病毒の増殖が旺盛であり、感染も高度に発揮されるとの事實は先の病理所見で推測されたが、若し侵襲病毒の感染の諸種の条件が充分でない場合は感染の程度は軽度が発現するにとどまるものと考えられる。当然この時に於ける抗体に捕捉される場合も考えられるので、先の免疫血清の力価が問題となるであろう。免疫血清の力価の低い場合は“Absättigungsversuch”の値値はかなり低く評価するのが妥当と推測されるのである。

次に之等の実験方法による術式をその儘に中和試験に於て見るに、この際は病毒と免疫血清の混合液を24時間後にマウスに接種し、その病理所見を中和の状態で評価したために、その実験成績は不自然な結果ではない(第8、第9表)。即ち夫々の免疫血清に対しての生病毒の攻撃により10⁻⁶~10⁻⁹の稀釈の限界で耐え、中和現象の促進されている状態が対照群と比較しよく窺われる。同時に行つた血清反応の結果でも補体結合反応では1:16~1:32

第 8 表 中 和 試 験

不活化病毒 免疫血清	経日 (週)	補体結合 反応 抗体価	飽和試験 中和の可否	ウ イ ル ス 稀 釈							
				10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
1 マウス血清 (石原株)	—	1:32	可能	+	+	+	+	+	↓	↓	↓
2 マウス血清 (森本株)	—	1:32	可能	+	+	+	+	↓	↓	↓	↓
3 マウス血清 (金光株)	—	1:16	疑	+	+	+	+	↓	↓	↓	↓
4 患者血清 (青江)	32	1:4	否	+	+	+	+	+	+	+	+
5 患者血清 (宇野)	8	1:4	否	+	+	+	+	+	+	+	+
6 健康血清 (マウス)	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
7 健康血清 (マウス)	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+

註. 攻撃株: 野田株

第 9 表 中 和 試 験

免疫血清の種類	補体結合 反応 抗体価	飽和試験 中和の可否	ウ イ ル ス 稀 釈								
			10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	
不活化病毒血清											
1 石原株	1:32	可能	+	+	+	+	+	↓	↓	↓	
2 森本株	1:16	可能	+	+	+	+	+	↓	+	+	
3 金光株	1:16	疑	+	+	↓	↓	+	↓	+	+	
生病毒血清											
1 石原株	1:64	可能	+	+	+	↓	↓	↓	↓	↓	
2 森本株	1:32	可能	+	+	+	+	↓	↓	↓	↓	
健康血清											
1 No. 1	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	
2 No. 2	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	

註. i) 攻撃株: 森本株

の抗体価を示し、飽和試験に於ても可能なる場合を認めている。

以上の所見を総合して不活化病毒による免疫の成立は考えられ、感染防禦抗体の存在も感染防禦試験及び免疫血清に対する病毒の中和現象を観察する中和試験併に“Absättigungsversuch”等を用いる事により確認した。第2編に於ても述べたが、中和現象を病理学的所見によりて判定する血清反応の術式が最適のものではないが、ある程度に之等血清反応の併用によりて総合判定する事が可能であ

ると推測すべき結果を得た。

総括及び考按

先に分離病毒を用いて血清学的研究を行つたが、分離病毒が等しく肝炎患者に由来すること、之等病毒間には Wildführ (1953) の述べた型別が存在するものでなく、互に抗原性を共有するものである事実を推定し得たと同時に之等病毒を用いて肝炎の血清学的診断が行い得るまでに至つた。

凡そウイルス性疾患の診断には、血清学的

診断法による判定に待つこと大であるが、今日の流行性肝炎に関する研究は未だ病原体の分離及び固定に就て論議されている現況であり、例え分離された病毒を用いた場合でもその血清学的研究は否定的見解⁵⁾⁶⁾に終わっている。

著者は肝炎患者より分離した病毒に就て病原の決定と同時に補体結合反応に於ては抗原の改良を試み、中和試験に於ては術式の吟味とにより、肝炎の血清学的診断の一助となる事実を実験的に証明した。

各々の実験結果から見て大略所望の所見を得たと思われたが、なお肝炎の臨床所見と血清学的所見が納得すべき一致を見なかつた例も少くなかつた。

県下の肝炎の発生状況から見ると、最初の電撃性肝炎から漸次慢性肝炎に移行し臨床診断を一層困難ならしめている現況では、病毒の多岐性も推測され、今後の Vaccination に就ての基礎的研究も当面の問題となるので、著者は感染防禦試験により分離病毒間の抗原性及び免疫効果を知り、将来の Vaccination に就ても検討を加えた。

不活化病毒による感染防禦試験では、不活化病毒の接種により強固なる免疫性を賦与することを得ることが認められたと同時に用いた病毒間には病毒の多岐性と理解すべき抗原

性の差は存在するものでない事実を明かに証明し得た。更に不活化病毒による免疫動物血清に就て行つた中和試験及び“Absättigungsversuch”に於てもなお納得し得ない結果も少くないが、先ず一応の所見が認められた。

之等の血清学的研究に於ける諸反応の術式及び判定が最適と考える訳ではないが、本編に於ては不活化病毒による免疫が確実に成立する事実と共に、病毒間の血清学的性状を明かにし得た点に興味があり、又血清反応就中和試験及び“Absättigungsversuch”も目的に応じて用いられることを証明した。

結 論

岡山県下に発生した流行性肝炎患者よりの分離した病毒を用いて、感染防禦試験及び不活化病毒接種により得られた免疫血清に就ての中和試験及び“Absättigungsversuch”を試みた結果、不活化病毒により強い免疫性を賦与し得られることを明かにしたが、これは将来の Vaccination に対しての希望を抱かせるものである。それと共に血清反応殊に中和試験もまた目的に応じて診断の一助となり得ることが示唆された。

稿を終るに当り、御指導と御教示を戴きかつ御校閲を賜つた恩師村上教授に深く謝意を表する。

主 要 文 献

- 1) 村上等：第2回日本ウイルス学会総会肝炎セッション、1955.
- 2) 村上等：第3回日本ウイルス学会総会要旨、1955.
- 3) 村上等：第4回日本ウイルス学会総会要旨、1956.
- 4) Wildführ: Zeitschr. f. d. Ges. innere. Med. 573, 1953.
- 5) Van Rooyen: Virus Diseases of man, P. 1164, 1948.
- 6) MacCallum: Virus and Rickettsial Diseases, 1955.
- 7) Havens et al.: Viral and Rickettsial infection of man, 1951.

Studies on the Infectious Hepatitis in Okayama Prefecture,
Particularly on its Serological Reactions

III. Studies on the infection protecting test

By

Kiyoshi Fujiwara

Department of Microbiology, Okayama University Medical School
(Director: Professor Dr. Sakae Murakami)

In the preceding two papers the author reported that the complement fixation reaction, by improvement of antigen, and the neutralization test and "Absättigungsversuch", by modifying its procedures, could be of use to some degree for the determination of the virus, and at the same time, could give an aid to the diagnosis of hepatitis. In the present paper the author makes reports on the antigenicity of the isolated strains and, moreover, on the immune-effect of vaccination:

1) The virus was inactivated by the addition of marzonin and preserving it in refrigerator over 3 weeks. Immunization of animals by this inactivated virus could protect them from the attack by the living virus. The fact that the infection-protection was established among the different strains suggested that the strains had no difference of antigenicity to one another but had unitary nature.

2) The modified "Absättigungsversuch" improved by the present author was serologically somewhat significant when the sera had a high titer, but was of little significance when the titer was low. It was suggested, however, that this method could be used as an aid for sero-reaction according to the purpose of tests.
