

岡山県下に発生した流行性肝炎の病原体に関する研究

特に分離ウイルスの組織培養に就いて

岡山大学医学部微生物学教室 (主任: 村上 栄教授)

川 崎 病 院 (院長: 川崎 祐宣)

前 田 幸 寛

〔昭和32年9月18日受稿〕

緒 言

村上等¹⁾によつて岡山県下に発生した流行性肝炎患者材料より一ウイルスが分離され、其後詳細に種々の実験が行われ論議された²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾。

流行性肝炎ウイルスに関する研究は既に先人により試みられたが、ウイルスと推定されながらも確実に分離され、而も動物に累代移植が成立したとの確証は得られないで経過した。

最近に至つて Henle (1950)⁶⁾⁷⁾等により、組織培養次で孵化鶏卵羊膜腔内に累代移植を行い、これを人体に復原して不全型ながら陽性成績を得ている。此の実験では肝炎ウイルスの組織培養の可能性を暗示している。

次で Wildführ G. (1953)⁸⁾は多くの肝炎患者材料より肝炎ウイルスと推定されるウイルスの分離に成功し動物実験を行い、感染スペクトルを確め、感受性動物に於ける感染が容易に而も累代培養が可能なる事実を認め感染所見として病理学的所見を追究し、更に慢性経過に就て詳細に論述した。之の実験成績では従来困難視されていたウイルスの各種動物による感染及

び累代の行われる事実をも明かにした。

著者は肝炎患者より分離された各ウイルス株を用い、各種の組織培養を試みた。既に本ウイルスの一般性状に就ては論議され、孵化鶏卵及びマウスが強い感受性をもつ事実も明らかである。よつて先づ分離ウイルスの組織培養を計画したが、その目的は組織培養による培養が可能かどうかを知り、可能であつた時に他のウイルスで述べられた細胞変性作用が認められるかを解決する企図のもとに行つた。その結果一応の所見が得られたので茲にその大要を報告する。

実験材料及び方法

供試ウイルス: 既に村上等の予報に述べられたウイルス株の内孵化鶏卵で分離し孵化卵で累代を継続保存している孵化卵適応性株 (embryo-adapt) のものと、マウスで分離しマウスで累代中のマウス適応性株 (mouse-adapt) のウイルス株であつて前者は石原、小川の両株、後者は青森、野田株を用いた。之等の交叉免疫実験では免疫原性の差はなく殆んど一元性の

第 1 表 供試ウイルスの由来及び性状概要

供 試 病 毒	接 種 材 料	分 離 年 月 日	使用実験動物及累代
石 原 株	急性肝炎患者肝臓 (重症死)	1954. 6. 2	孵 化 鶏 卵 45代 マ ウ ス 累 代 32代
小 川 株	急性肝炎患者肝臓 (重症死)	1953. 6. 7	孵 化 鶏 卵 74代 マ ウ ス 累 代 18代
野 田 株	急性肝炎患者肝臓 (重症死)	1955. 4. 2	マ ウ ス 累 代 27代
青 森 株	肝炎患者肝臓 (重症死)	1955. 2. 7	マ ウ ス 累 代 18代

性状をもものと推測されている³⁾⁵⁾。是等の病毒の性状及び由来の概要は表示した(第1表)。

培養組織：供用した組織は主に孵化鶏卵(8~12日卵)の鶏胎児の皮膚、筋肉、肝臓等である。外にマウスの生後数日(1~6日)を経た胎児組織を用いた。是等の供試材料は孵化卵では卵殻より無菌的に取出し、マウスの胎児組織は同様無菌操作のもとに採出し、Hanks液で数回洗滌を繰返し、眼科鉗によつて直径約1mm前後に細切して用いた。

鶏胎児浸出液：入卵後10日前後経過した孵化鶏卵を剖卵して鶏胎児を取出し眼球、翼、肢等を除去し、予め準備したHanks液にて洗滌後、秤量し同量のHanks液を用い、homogenizerにて細挫粉砕し2000 r. p. m. 20分遠心沈澱を行い、その上清液を凍結保存し、その都度融解して軽く遠心沈澱してその上清液を用いた。尚使用に際してはpenicillin 100 u/ml, streptomycin 100 γ /mlを添加して雑菌の混入を防いだ。

plasmaの作製：成鶏の空腹時に翼下静脈若くは心臓穿刺法により採血した。凝固抑制にはheparinを0.0025%になる様に添加し2000 r. p. m. 20分の遠心上清を使用した。

組織培養液：実験によつては諸種の方法を行つたが、Hanks液60%、Seitz濾過人血清30%、鶏胎児浸出液10%の混合液を用い、別に鶏胎児浸出液と同量に(lactalbuminを0.25%に溶解したもの)を添加した例もあつた。実験に際してはその混合の割合は書き加えた。之等の培養液は浸出液と同様に抗菌性物質を添加した。

組織培養法：組織培養法も諸種の方法を用いたが、主に吉岡²¹⁾の方法に倣つた点が多い。即ち試験管は15×150mmのものを滅菌しおき、毛細管ピペットを用いて予め滅菌シャーレ内で直径1mm程度に細挫した組織片を投じ、鶏胎児浸出液(若くはlactalbumin添加液)plasmaを夫々0.3~0.5ml宛添加し、用意したスパーテルにて試験管の内壁の下側半分が、鶏胎児とplasmaの混合液で充分に

被われる様に広げ、投入していた組織片を丁寧に一例に管壁に附着する様にして室温に横臥の儘30~40分放置する。

組織片の固着した時期を待つて前述の培養液を1.5ml宛加え、組織片が培養液に浸る程度の傾斜に保ち、roller tube drumに架装して1時間6~8回転36°Cの孵籠内で培養を行つた。組織片の充分な発育を待つて病毒の接種を行つた。

病毒接種及び累代方法：初代病毒培養は罹患鶏胎児乳剤若くはマウス肝臓乳剤にpenicillin 100 u/ml, streptomycin 100 γ /mlを含むHanks液を添加10⁻¹稀釈液を作り、3000 r. p. m. 10分遠心沈澱し上清液を得、之を病毒液として実験に供し、更に稀釈を行い感染を行つた。予め培養している組織片ではout growthが生じた時期に取り出し、培養液を捨てて前記病毒液を0.1~0.2ml宛管内に入れ、outgrowthがこの病毒液で様に浸る様に横臥せしめて30分室温に放置する。その後病毒液を捨て去り、plasmaを加えて新しい培養液を更に添加孵籠内で培養を継続する。累代の場合はスパーテルにて組織片を集め乳鉢にて粉砕し、従来の培養液を添加して乳剤とし、その上清液を0.2ml宛初代培養と同様にして新しく培養した試験管内に加えて行つた。病毒を添加した培養試験管は各累代共pHの変化及び爾後経目的に取出し顕微鏡下に細胞変性作用の有無を観察し、累代はその一部の試験管を用い、4日目毎に行つた。培養試験管に於ける培養液の更新は4日目に行い、同時にplasmaも同様に補給してplasma被膜を保つた。

動物に対する復原試験：前述の如く培養した各累代の4日培養後の組織片及び培養を用いて作つた乳剤を夫々高稀釈まで稀釈を行い、孵化鶏卵及びマウスに接種して復原試験を行つた。孵化卵に於ては村上等²³⁾の予報に倣い漿尿腔内に0.25ml宛接種し、鶏胎児の死亡若くは鶏胎児のマウス接種により感染の有無を知り、マウスでは腹腔内に0.25ml宛接種し肝臓を中心に病理所見を窺うことにより

感染を確めた。村上等⁴⁾の実験によれば分離ウイルスのマウスに対する病理変化は一般に安定して、定型的な病変の発現が認められるので、マウスの個体差はこの実験では考慮せずに雑系マウスを用いた。尚供試ウイルス中 egg-adapt strain も、mouse-adapt strain も同様に孵化鶏卵及びマウスに感染実験を行い、その成績を比較検討した。

実験成績

回転試験管法による分離ウイルスの培養

8日乃至10日孵化卵の鶏胎児組織、特に皮膚、筋肉組織及び肝臓を用いた。分離ウイルスの各株を4日毎4代に互り培養を行つた。各累代共に14日間に互り観察したが明瞭な細胞変性作用は認めることは出来なかつた。各株とも3~4代累代後マウス及び孵化卵に復原してその病理標本を作成し観察した。

孵化卵の皮膚、筋肉組織更に肝臓の培養より復原したマウス及び孵化卵の病変と生死等の感染標識は夫々に表示した(第2, 3表)。

マウスに於ける病変は表示した如く、既に村上等¹⁾⁶⁾により指摘された肝臓に於ける実質細胞の変性及び壊死またはこれに伴う細胞浸潤が挙げられる。殊に興味ある事実は小葉内に於ける類壊死若くは壊死巣の形成である。即ち之等の壊死巣の周辺には単球又は組織球の浸潤が認められ、而も壊死巣を圍繞した形をとり、中心部に於て好中球の混在が比較的高度に見られる場合が稀ではない。この所見はかならずしも、ウイルス性変化と断言し難

いが、炎症を伴つたウイルス性変化と解釈されるものである。又この部分に於ける Mallory 氏小体の出現も注目された。又他の実質内に於ては、組織球に単球を混在した細胞浸潤が認められ、限局性の小結節を形成していることも少くない。グリソン氏鞘内に於ける円形細胞の浸潤も亦見られた。

一般に之等の病変は、混在し極めて多彩な病理所見を呈するものであつて、時に肝細胞の変性及び壊死変化が強い時には、細胞浸潤の度が一般に少いことはある様である。

又肺臓に於ては、種々の程度の胞隔炎及び気管支周辺に於ける円形細胞の浸潤若くは間葉性細胞の増加が散見せられ、他に稀に胞隔の肥厚及び出血等が見られたが、一般に肝臓に於ける所見が著明な場合が多く、肺臓に於ける病変の程度は軽微であることも注目された(第4表)。

以上の所見は皮膚及び筋肉組織に於ける所見としてその病変の程度に差が多少とも見られたが、肝臓組織に於ては一般にマウスの所見は弱いことが挙げられる。

之等の所見はウイルス株を egg-adapted の石原株であつたが、mouse-adapted の青森株を用いた場合にも等しく認められたが、青森株を用いた時の病変の程度は常に高度であつた。

以上の所見が認められたが、更に培養液、培養条件、培養日数、培養方法、分離ウイルス等に就て詳細に検討を行つた。

尚之等のウイルスの組織培養に当り、マウス及び孵化鶏卵に復原し、感染の有無を確める方

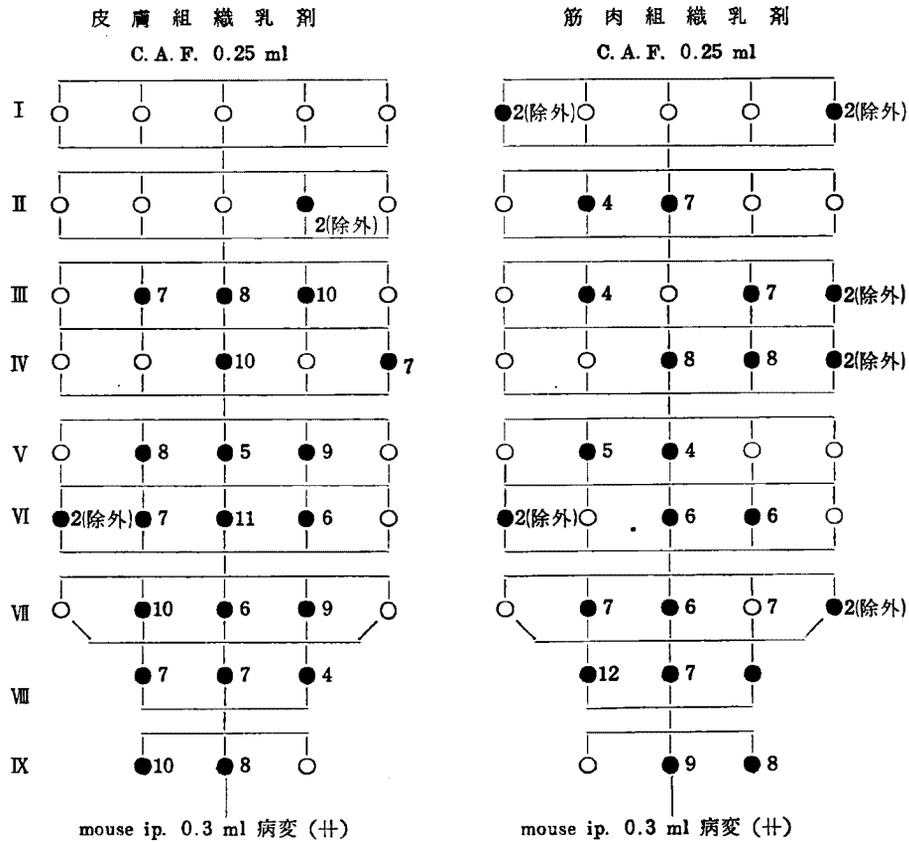
第2表 マウスに於ける病理学的所見

病理学的所見 培養組織別	肝			臓			肺			臓		
	変実 性質 及細 胞死	殖肥星 大芒 及細 胞増	肝葉の 解離	形け実 成る質 小内 結に 節於	細於間 胞け質 浸る周 潤円辺 形に	充血及 出血	胞 隔 炎	潤円胞 形に 細於 胞於 浸る 周囲	及気 管支 管周 周囲	胞 隔 肥 厚	其 の 他	出 血
孵化卵胎児皮膚	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
鶏胎児筋肉	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
鶏胎児肝臓	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-

註. i) 石原株 ii) (+)~(-)病変の程度を示す。

第3表 4代培養後に於ける孵化卵累代

4代培養後孵化鶏卵に復原した累代石原株接種，次代累代材料は鶏胎児若くは胎児肝乳剤を用いた。



第4表 マウスに於ける病理学的所見(2)

病理学的所見	肝				臓				肺				臓		
	壊	変	実質細胞の死	殖肥星大芒及細胞増の	肝索の解離	形け実成る小内結に節於	浸潤ける細細胞に	間質の周細胞に	充血及出血	胞隔	潤形に細胞に浸る	円形に血管周囲	気管支周囲	胞隔の肥厚	出
孵化卵胎児 皮膚	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
孵化卵胎児 筋肉	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
孵化卵胎児 肝臓	+	+		+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
漿尿膜	+	+		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

註. i) 青森株 ii) (+)~(-) 病変の程度を示す。

法を採用するのが常であつたが，既に時末⁹⁾の試験に見る如く病毒乳剤を解凍中に保存する場合はよく生存する事実を記載しているが，本実験に於ても培養臓器に病毒を感染せしめた場合，感染は成立しない場合でも，病毒が

試験管内に残存する場合も考えられるのであり，細胞変性作用が認められない本実験のマウスに於ける感染は増殖か，残存かの懸念がある。よつて実験毒に厳密に対照をおき，病毒の保存による抵抗性を見た。病毒株によつ

第 5 表 培養方法による病理所見

病理学的所見 培養方法	肝				臓				肺		臓		
	壊死	実質細胞変性	限局性	細胞浸潤	潤間質細胞浸	殖肥大	星芒状細胞の増	肝索の解離	充血及出血	胞隔炎	管周浸潤	気管支及び血管の肥厚	充血及出血
回転試験管による方法	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
静置培養による方法	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+

註. (++)~(+) 病変の程度を示す

ては高濃度の病毒粗乳剤で感染せしめた際は、相当に病毒の抵抗性を示すものの如くマウスに復原せしめた時は、軽度なる肝臓の細胞浸潤を認めた例があつたが、 10^{-6} ~ 10^{-9} の高度の稀釈病毒で感染せしめた場合は、通常対照にした病毒粗乳剤の保存液よりも一般に病変は強い傾向があり、病毒の増殖によるものと推測される結果を得たので、感染は成立するものと判定した。

孵化鶏卵の鶏胎児皮膚及び筋肉組織を培養する場合増殖する細胞は fibroblasten であり、漿尿膜では上皮性細胞が大部分であつた。肝臓の細片よりの肝細胞は殆んど認められないで他の種類の細胞の様に思われたが、皮膚及び筋肉組織よりも増殖は悪く、従つて肝細胞の増殖が良好でないために、マウスに於ける病変の程度は不良であつた。以下諸種の条件が及ぼす病毒の組織培養の影響に就て検討を加えた。

1. 培養液等に就ての検討

予め先述した培養液を調製したが、実験に際しては 2.5% laktalbumin 及び鶏胎児浸出液に就て実験した。通常鶏胎児浸出液の代用として laktalbumin を使用した結果でも、病毒を 4~6 日毎 4 代に互つて培養を行つた時も各累代 2 週間の観察に於ては細胞変性作用は認められなかつた。而しながら前の実験で見た病変殊に肝臓に於ける所見では、稀に肝細胞の変性及び壊死の度が強く、単球若くは組織球よりなる散在性の小結節形成が見られた場合も少くなかつた。肺臓に於てはしかなしながら一般に病変は軽く、胞隔炎の程度は

劣り、時に間葉性細胞の増加が一部に認められた程度である。この点から充分に代用は可能であると推定された。

次にプラスマを使用し、組織細片を管壁に固着させ、培養液を 4 日毎に交換し孵化卵の皮膚及び筋肉組織を培養し、青森株を感染せしめた実験例に於て、laktalbumin による培養液 (laktalbumin 加 Hanks 液 60% Seitz 濾過人血清 30%、鶏胎児浸出液 10%) を用いた。之の実験でも累代を行い、毎日観察をしたが明瞭な細胞変性作用は認められなかつた。マウスに培養組織片乳剤を接種した結果では、稀に肝臓の変性が強く、而も実質内に於ける限局性壊死巣の形成及び単球及び組織球様細胞の浸潤が混在した所見が得られたが、肺臓に於ける胞隔炎は一般に低く、処々に認められる程度であつて、間葉性細胞の増加は余り著明ではなかつた。而し乍ら培養液を変え、laktalbumin の添加によつても、病毒による感染及び累代が行われる事実が明かとなつた。

又病毒株を egg-adapted strain と mouse-adapted strain として石原、青森両株を用いて同様実験を反覆した結果では、マウスに於ける病変では殆んど差異は認められないが、孵化鶏卵では鶏胎児の死亡はかえつて青森株に於て強い傾向が見られた。この事実は既に池田²³⁾も認めているが、分離後の累代が長い期間に及ぶと、次第に孵化卵の死亡が少く、而も死亡する時期が遅れることが認められているので、分離後累代の若い時期の青森株に強いものと認められるのである。

更に進んで全く鶏胎児浸出液を用いないで、次の培養液 (laktalbumin 加 Hanks 液 70%, Seitz 濾過人血清 30%) でも同様の効果を挙げ得た。この意味から laktalbumin も使用に耐え得るものと推定された。

他の実験として培養液 (2.5% laktalbumin Hanks 液) のみによる時でもマウスに復原した時軽度ながら所見が認められたことはウイルスの生存は十分に推定された。

著者の実験例から見れば、培養液は先に実験方法で記載した Hanks 液 60%, Seitz E. K 濾過人血清 30%, 鶏胎児浸出液と同量に laktalbumin を 1.0% 添加したものが、比較的に平等な結果が得られる様であつたので、以下の実験ではこの培養液を採用した。

2. 培養方法に就ての検討

培養方法は前述の回転培養法を行うと同時に、静置培養を行つた成績でも、マウスの復原試験では病変の発現が認められた。両培養方法の優劣は速に結論し難いが、病変の程度による比較は表示した如くである (第5表)。

即ち病変の比較では、明らかなる差異は認められないが、再三反覆して実験を行つた結果では、回転培養に於ける結果が、大略平等な、而も確実な病理所見を得られる結果であつた。

培養材料に就ての検討

培養組織としては孵化鶏卵の皮膚及び筋肉組織が良好な結果が得られ、而も肝臓組織は非常に劣ることを認めたが、マウスでは生後 1 乃至 2 日の幼若のもの皮膚、筋肉組織片が肝臓組織よりも発育は良好であつた。これらの各代共 14 日間の観察に於ても細胞変性効果は認めなかつた。4 代～5 代累代後マウスに復原し、病理切片により検索を行つた。

是等の実験結果では、ウイルスが mouse-adapted であつても、egg-adapted strain でも、等しく肝臓を中心に実質細胞の変性及び壊死が共通して見られ、その程度は筋肉皮膚組織片の培養に強く、肝臓組織を用いたものは軽度であつた。筋肉若しくは皮膚組織の場合は肝実質細胞の空胞性又は顆粒変性、類壊死

若くは壊死巣を形成した周辺に於いては好中球を混じた円形細胞及び単球組織球の出現が良く観察された。反之して肝臓組織の時は、単球組織球等を混在した細胞浸潤が僅かに散見されるに過ぎなかつた。結果的には孵化卵に於ても、mouse に於ても一様に培養組織の増殖にも差異があり、而もウイルス増殖の度にも、従つて差異が発現する事実を知り得た。

3. 培養条件についての検討

組織細片を管壁に固着せしめて、回転試験管法によつて培養し、一定時日後にウイルスを感染せしめる方法が、一般に採用されたが、他に諸種の培養条件に就ても検討した。

例えば培養液を取換える日数を多少ともも変更し、培養液の交換の際に、敢てプラズマ補給を行わないで、培養を継続した場合もあつたが、累代はよく継続され、而もマウスに感染が成立する事実を確かめたことは、予想外に之等の培養条件は、不可欠の要素ではないことを経験したが、一般に前述の術式を正確に踏襲した場合が、良結果を得るとの印象を強く受けた。

最も実験に供したウイルスが、極めて抵抗性が強く死滅し難い特性があるので、実験は多少とも粗雑の場合でも、抵抗し増殖を来したとも解釈される点もあるので、一般ウイルスにこれ等の事項が該当するかどうかは疑問である。

4. 動物復原試験に於ける観察

回転組織培養を行い、3 代累代を継続した培養組織乳剤を用い、マウスに於ける病理所見より、ウイルスの感染及び増殖の程度が比較された訳であるが、先述した如くウイルスを保存する場合、相当度に抵抗し、残存する事実が知られているので、マウスによる復原試験には次の点に考慮を払つた。

i) ウイルスの稀釈：既に村上等の実験に指摘された如く、ウイルスの稀釈に応じて、病変の状態及び程度は、ある程度異なることが知られている。即ち高濃度のウイルス稀釈よりも、低濃度例えば 10^{-5} ～ 10^{-9} 程度の稀釈の高いウイルス剤を接種した場合が、病理所見に於て優れて

いることが報告されている。

之の事実を鑑み、著者は感染組織乳剤を順次稀釈し、その病変の程度を比較した。この

実験は同様な条件のもとに3回行い、その結果を表示した(第6表)。

第6表 稀釈によるマウスの病理所見の比較

病 毒 株	病 毒 稀 釈	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9	10-10
石 原 株		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
青 森 株		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
保存病毒	青 森 株	+	+	+	+	±	±	+	±	+	+

註. i) 病変の判定は肝臓を中心に病変を判定. ii) (+)~(-)病変の程度を示す. iii) 稀釈如一群3~5匹のマウスを用いた.

之等の表示に見るに、その病変は高い稀釈例えば 10^{-6} ~ 10^{-9} に於ては病変は極めて高度に示されていることが注目された。殊に 10^{-6} の稀釈に於ての変化は、肝臓に於ける実質内の壊死巣若くは類壊死巣の形成が典型的に発現し、而もその周辺に於ける単球、好酸球、組織球性細胞、又は好中球の出現があり、類壊死巣中心部に於ては好中球の混在が著しい。又類壊死巣を圍繞する細胞の内に Mallory 氏小体の出現がある等、組織所見は甚だ高度である(附図参照)。

之等の場合の病理学的変化を、一様にウイルス性変化と解釈することは困難であるが、一部炎症性変化に伴うウイルス性変化と考うべきものと思われた。 10^{-1} ~ 10^{-4} と濃い病毒乳剤では、病理変化に遜色が見られ、実質内グリソン氏鞘の円形細胞浸潤が注目され、肝細胞障害は特に軽微であることも指摘される。之の様な現象を如何に解釈すべきか、容易に断言出来ないが、その理由として、ウイルスの自己干渉、或は混入組織片の抑制とか、考えられる条件ではあるが、前者では左程のウイルスの増殖は推定されないし、後者では更にウイルスの純粹の状態で検討した後に、判定される問題だと思ふが、容易に結論し得ない。

ii) 室温の影響：一般にウイルスを取扱う条件殊に室温の影響は大きいことは、かつて教室の稲垣²⁷⁾の実験に於ても示されたが、冬期(10°C)と夏期(30°C ~ 32°C)に於て、著しく感染による病理所見は異つて示される

ことを経験している。殊に冬期と夏期に別つて同様な実験を行つた例では、冬期に於ける場合の titration に於ては、比較的安定した所見を得るに反して、夏期に於ては不安定であることが注目された。

更に稀釈液の影響、接種部位、病毒別等によつて、病理学的所見に於て可成りの差があるので、実験に當つては、特に注意して行つたが、特に悪影響を与えらると思はれる条件に就ては、可及的排除して実験を行う如く努めた。

5. 類似病毒の培養及び動物実験に於ける比較

分離病毒とその一般性状の極めて類似する泉熱病毒及び ectromelia 病毒を用いて同様の実験を行つた。その目的は回轉組織培養に対する術式が、他のウイルスにも適用されるものかの疑問と、組織培養に於ける鑑別を目的とした訳である。

回轉組織培養には、前述の方法を用い、分離病毒株としては青森株、泉熱病毒として社株を用いた。更に組織として孵化鶏卵の胎児皮膚及び筋肉組織が用いられた。実験結果では等しく細胞変性作用は明かに認められなかつたが、培養後マウスに夫々復原した場合は、ectromelia 病毒では、その titration に於て $\text{LD}_{50} 10^{-5.0}$ ~ $10^{-6.0}$ 前後の斃死が示され、明かに病毒の増殖があつたことが認められた。

泉熱病毒では感染の成立の有無は病理所見によつて確めたが、かつて大日方²⁸⁾の記載した病毒の示す肝、腎、肺、脾臓に於ては特異的な病変が認められた点は、病毒の培養の可能

性を指摘し得られた点に興味があるが、本実験に用いた分離病毒との間の相違は、組織培養のみでは容易に表示することが出来なかつた。

6. 慢性化の実験

かつて倉内²⁵⁾の指摘した如く、分離病毒をマウスに接種して感染せしめた場合、良く慢性の経過を辿る事実を実験的に証明するに至つた。著者も同様培養組織乳剤を、マウスに接種し、長期に亘りマウスの病理所見を窺う

ことによつて慢性経過の様相を追究した。

先述の実験に於ける病理所見は、病毒接種後2週後に於ける所見があるが、あと21, 30, 45, 70, 100, 150, 200日と順次日を追つて夫々の病理所見に発現する病変の状態を詳細に検討し、慢性化の過程に就て吟味した。対照としては、同一条件で、孵籠内に放置された病毒乳剤を、同様な方法でマウスに接種され、病理所見が比較された(第7表)。

実験結果では、慢性化に伴う病変の程度は、

第7表 マウスに於ける慢性化実験

病毒株	経過日数	7	14	21	30	45	70	100	150	200
	石原株		+	++	+	++	+	++	++	+
青森株		+	++	++	++	++	++	+	+	++
保存病毒青森株		±	↓	↓	±	+	↓	↓	↓	+

註。(++)~(-) 病変の程度を示す。

供試病毒株により、或は接種方法により、多少の動揺が示されたが、一般に青森株は石原株よりも、病変は著明である傾向がありながら、稀に高度な病変がある場合があり、時に軽度な病変に終始することがあつて、一様な結果ではない。当然斯る病変の程度によつて、感染の軽重は評価出来ないが、慢性化の過程に於けるウイルスの増減は常時起つている事実は明らかである。病理所見では、前述の成績と同様に肝臓を中心によく認められるが、就中肝実質細胞の変性及び壊死(類壊死)と、それに伴う細胞浸潤が多彩に混在しているのが見られた。肝細胞の変性及び壊死は、限局性であつて周辺に於て円形細胞、単球、好酸球、好中球と多種多様に混じた細胞浸潤が認められる場合が少くない。之等の所見はウイルス性変化と一様に断言し得ない部分もあるが、一応炎症性変化に伴うウイルス性変化と解釈された。又肺臓に於ける変化も胞隔炎及び気管支及び血管周囲に著明に発現する円形細胞若しくは間葉性細胞の浸潤の程度に軽重が見られたが、認められる所見として注目された。

次に石原株について慢性化の経過を辿るに、30, 70, 100, 200日の所見では殊に肝臓に於

ける病変は高度に、21, 45, 150日ではその病変は比較的軽度である。青森株では21, 30, 45, 70, 200日では病変は高度であり、100, 150日に於ては病変が極めて軽度である。即ち感染経過の時期を異にして、病変に軽重が見られる。この事実は倉内の慢性化実験に於ても指摘されている。

更に之に伴う病変の状態に於ても、肝細胞の変性が空胞性若しくは顆粒性変性が特に強い時に遭遇する場合もあり、その周辺に於ける細胞の変化の強いものもある。一般に慢性化の経過を経ることにより、肝実質細胞の変性及び壊死は次第に軽微となり、細胞浸潤の像がよく観察された。150日~200日を経過した場合でも、治癒的傾向が認められないことも、興味深い所見と思料された。

肺臓に於ての変化は、肝臓に於ける変化と、やや時期的には遅延する傾向が認められたが、胞隔炎及び気管支及び血管周囲に於ける円形細胞若しくは間葉性細胞浸潤の程度、胞隔肥厚等の所見には軽い動揺が示されているが、依然として150~200日の経日に於ても、病変を保有していることは認められた。

之等の慢性化実験に於ける、マウスの病変に見る所見は、接種されたウイルスの体内に

長い期間に亙り滞留することを意味し、而もその間に於けるウイルスの増減が、絶えず繰返しているものと考えられ、組織培養ウイルスに対するマウスの細胞の反応形式として、注目されるものであり、又斯る慢性の感染経過を辿るウイルスの特性とも推測された。

7. 組織培養ウイルスの不活化及び不活化ウイルスによる感染防禦試験

以上の実験に於て得られた組織培養乳剤を用いて、マウスに接種感染実験を行つた結果、ウイルスの増殖が明に推定される所見を得たので、培養ウイルス乳剤に 10,000 倍の割合に marzonin を添加して不活化したる後、その免疫原性を検討した。

不活化実験は時末⁹⁾の実験に倣い、予めウイルス稀釈液を調製し、石原、青森の両株の培養ウイルス乳剤に marzonin を 0.01% の割合に添加、氷室内に 3 週間以上放置して充分に不活化を行い、準備したマウスに 3 日おきに ip. 0.3 ml, 0.5 ml, 0.5 ml, 0.5 ml, 0.5 ml と 5 回に亙り接種し免疫を行いたる後、最後の注射より 2 週間後に、更に青森株生ウイルス 10⁻² 稀釈液にて攻撃を行い、14 日後に於けるマウスの病理学的所見によつて、防禦性の多寡を判定した。

既に先人¹⁰⁾の報告にも記載した marzonin

第 8 表 不活化ウイルスによる感染防禦試験

病 毒 株	病 毒 稀 釈									
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	
石 原 株	⊥	⊥	⊥	+	+	+	+	+	+	
青 森 株	+	⊥	⊥	⊥	+	⊥	+	+	⊥	

註. i) 不活化ウイルスは石原株 ii) (⊥)~(-) 病変の程度を示す。

次に青森株を用いた免疫では、他のウイルス株を用いて、感染防禦能を検討したが、之等の実験に於ても同株の青森株によく耐過したが、他のウイルス株による攻撃では、多少とも防禦能は劣るかの如く、病理所見が認められる場合も少くない。而しよく耐過することは、分離ウイルスの間には免疫性のほぼ共通した性状を有するものであることが推定され、Wildführ の指摘した型別の如きものは存在しないと述

加不活化ウイルスの接種による感染防禦試験に於ては、同株若くは異株のウイルスの攻撃にある程度耐過する事実が知られている。

著者の実験成績でも、表示した如く、不活化ウイルス石原株で免疫し、石原、青森両株で攻撃を行つた結果、双方ともよく耐過しているが、殊に同株の石原株によく耐える事実が窺われるが、先の生ウイルスで免疫した場合と比較するにやや感染防禦性は劣る様であつて、病理所見の軽度の発現が見られる部分が少くない。この事実は換言すれば、組織培養によるウイルス乳剤では、ウイルス量が少く、接種することによつても、充分に免疫性が賦与されるに至つていないものと解釈されるのである。

殊にその病理学的所見より窺うに、稀に肝実質細胞の変性及び壊死の可成り発現する例があり、細胞浸潤の度も軽度に認める例は稀ではない。而し対照と比較する時は、その病変は一般に著しく緩和されており、これは免疫の賦与による防禦と解すべき有意の差と推測された。更に感染防禦性を保有することは、孵化卵系ウイルスでも、マウス系ウイルスにおいても、互に抗原性を共有していることを意味するものであつて、免疫原性の劣るのは、ウイルス量の寡少に由来すると解し得られる (第 8 表)。

べた村上等の所見とよく一致した結果であつた (第 9 表)。

さて以上の感染防禦能を病理所見の上に、詳細に検討するに、村上等の実験成績と比較して、防禦能が多少とも劣る傾向があり、将来の vaccination に用いる場合は、ウイルス量に於ては更に高度に増殖した組織培養乳剤を、又別に免疫方法に就ても吟味する等の考慮を払ふべき諸点があると推測された。

第 9 表 不活化ウイルスによる感染防禦試験

病 毒 株			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
青	森	株	+	±	±	±	+	+	⊥	⊥	±
石	原	株	+	⊥	⊥	⊥	+	+	⊥	⊥	⊥
小	川	株	+	⊥	⊥	+	+	+	+	⊥	⊥
野	田	株	⊥	⊥	⊥	+	+	+	⊥	+	±
金	光	株	⊥	⊥	⊥	+	+	+	⊥	⊥	+

註. i) 不活化ウイルスは青森株 ii) (+)~(±) 病変の程度を示す.

総括及び考按

回転組織培養法 (roller tube cultur) が, Gey (1933~1936)¹⁾²⁾ により, 或は Lewins (1935)¹³⁾ により試みられてより, Enders et al. (1949)¹⁴⁾ による小児麻疹ウイルスの増殖及び細胞変性作用が報告されると共に, 組織培養によりウイルスを培養する試みは, 各種のウイルスに利用され, その術式は次第に進歩向上するに至つた. 組織培養に於ける細胞変性作用の見られる各種のウイルス, 例えばコクサッキーウイルス¹⁵⁾, ニューカッスルウイルス¹⁵⁾, 犬肝炎ウイルス¹⁷⁾, 麻疹ウイルス¹⁸⁾, インフルエンザウイルス¹⁹⁾, リフトバレー熱ウイルス²⁰⁾等が挙げられており, 他に細胞変性作用は惹起しないが, ウイルスの増殖が見られ, 而も累代が可能であると報じられた泉熱ウイルス²¹⁾等の報告も認められている現況である.

此の培養法では, 細胞変性作用の出現するウイルス群では, 明らかに該ウイルスの特異性を指摘することにもなり, 宿主対寄生体の相関関係を理解する上に, 頗る有意義であることは言を俟たないが, 細胞変性作用を全く発現しないウイルス群では, ウイルスの感染及び増殖の程度を知るには, 組織培養液を更に他の感受性動物に接種して, 感染及び増殖の程度を判定しなければならぬ訳である.

翻つて肝炎ウイルスに関する組織培養に就て見るに, かつて Henle a. Drake(1950)⁶⁾⁷⁾ が始めて孵化鶏卵及び組織培養を試み, ウイルスの分離に成功した事実を報告した. 而し乍ら本ウイルスが明らかに肝炎ウイルスと同

定された訳ではなく, それに続いて組織培養により, 肝炎ウイルス研究が推進されるに至つた記載もない.

著者は先人の記載に倣い, 村上等によつて岡山県下に発生した流行性肝炎患者材料より, 孵化鶏卵及びマウスの累代により, 分離されるに至つたウイルスの分譲を受け, roller tube cultur を試みた.

此等の実験術式及び方法を, 種々吟味した結果, 分離したウイルスの組織培養液は, Hanks 液 60%, Seitz E. K 濾過人血清 30%, 鶏胎児浸出液と同量に lactalbumin を 1.0% に添加した場合が, 比較的安定した結果が得られた.

培養組織としては, 従来動物実験として使用されている孵化鶏卵の胎児に於ける皮膚及び筋肉組織更に肝臓組織を使用した, いづれの組織の場合も, 特異的な細胞変性作用は発現しない. 皮膚及び筋肉組織を用いた場合は, 比較的安定したウイルスの増殖があるものの如く, 培養液を孵化鶏卵に接種することにより復原することも可能であり, マウスに接種した時は, 特異的な病理所見の発現によつて, 増殖度が推測された. 肝臓を用いた場合は, 良結果を得難い点は, 本培養法に於ける大きな難点であることが指摘し得られた.

一般に著者の組織培養に於ける感染及び増殖の程度は, 特別な例を除き, 常時確実に, 而も常に高度でなく, 率る平等を欠く感があり, 将来の vaccination にまで発展せしめるには更に充分な検討を要するものと推測された. 尚組織培養が良好に行われた場合は, 殊に孵化鶏卵胎児の皮膚, 若くは筋肉組織を使

用した実験例では、高度の稀釈に於ても尚マウスに於ける病変は高度に発来し、既に村上等により動物実験に於て指摘されている、肝臓を中心とした病理所見が特異的であることは、将来の実験に希望を抱かせるものと信じられるのである。

更に実験に際して著者の度々経験したことは、本ウイルスの如く細胞変性作用が特異的に発現しないで終始した場合、培養液内に於て、実際にウイルスの増殖があつたものか、またウイルスが残存していたものか、の疑問にも考慮しなければならない。著者はかかる点に配慮して、培養病毒の稀釈実験に於て、マウスに於ける病理所見の判定では、大略病毒の増殖と推測する結果を得たが、本ウイルスの如き極めて強い抵抗性を保有すること、及び高稀釈によつても尚伝染性を保持する性状である事実等は充分注意して実験が行われなければならないと考えられる。

結 論

昭和27年以来、岡山県下に発生した流行性肝炎患者材料より、村上等は一種のウイルスの分離に成功し、而も該病毒の性状に就て、生物学的及び血清学的研究を進め、次第に分離病毒の全貌を明かにし、明かに肝炎患者に由来する特有のウイルスであることを論述するに至つた。

著者は本ウイルスの分譲を受け、回転組織培養を行つた結果、次の所見を得るに至つた。

1) 孵化鶏卵及び幼弱マウスの皮膚及び筋肉組織を用いて、回転組織培養を行い、分離病毒を接種感染せしめて培養を行つたが、各実験例に於て明かなる細胞変性作用は認められなかつた。而し乍ら此等の組織培養液を用

いてマウスに定型的なる病理所見を発現せしめる事実より、ウイルスの増殖があるものと推測した。

2) 回転組織培養がかならずしも優れた培養法ではないが、著者の実験では培養液、術式等詳細に吟味した結果、殊に孵化鶏卵胎児の皮膚及び筋肉組織等を用いた場合、よく組織の増殖があり、而もウイルスの感染増殖が認められ、ウイルスの累代も可能であることを知つた。

3) 孵化鶏卵又はマウスの皮膚及び筋肉組織の培養により、増殖する細胞は fibroblasten が大部分である。肝臓片の場合は上皮性の細胞であつた。皮膚及び筋肉組織の培養では、outgrowth の増加が良好であつたが、肝臓片では充分でないことが多く、従つてマウスの病変の程度も著しく劣ることから、ウイルスの増殖は少いものと判定された。

4) 組織培養不活化病毒乳剤を用いた、感染防禦試験に於ても、罹患動物組織乳剤を用いた村上等の実験と比較して、抗攻撃能の程度に遜色が見られる点から、常時ウイルスの増殖はあるとしても、決して高度の増殖は惹起していないことが示唆された。而し乍ら、或る程度の感染防禦能が賦与されていることは窺い得られ、将来の vaccination に対する研究が期待されるのである。

以上、著者の用いた回転組織培養法が、肝炎患者よりの分離病毒の培養に、最も好適なる方法であるかどうか、は別として、組織培養の基礎的研究を行うことにより、本培養法も亦用い得べき一法と、推測する所見を得た。

稿を終るに当り、御教示及び御校閲の労を賜つた恩師村上教授に深謝する次第である。

主 要 文 献

- 1) 村上等：第2回日本ウイルス学会総会肝炎シンポジウム，1955。
- 2) 村上等：第3回日本ウイルス学会総会講演要旨，1956。
- 3) 村上等：中四国細菌学会講演要旨，1956。
- 4) 村上等：第4回ウイルス学会講演要旨，1957。
- 5) 村上等：岡山医学会総会講演要旨，1956。
- 6) Henle, W., Harris, S., Henle, G., Harris, F. N., Drake, M. E., Mongold, F. and Stokes, J. Jr.: *Exp. Med.* **92**, 271, 1950。

- 7) Drake, M. E., Kitt, A. W., Blanchard, M. C., Farquhar, J. A., Stokes, J. Jr. and Henle, W. J.: *Exp. Med.* **92**, 283, 1950.
- 8) Wildführ, G.: *Zeitschr. Ges. Inn. Med.* **8**, 573~581, 1953.
- 9) 時末: 岡山医学会雑誌, 第69巻, 4号, 1957.
- 10) 藤原: 岡山医学会雑誌, 第69巻, 4号, 1957.
- 11) Gey, G. O.: *Am. J. Cancer.* **17**, P. 752, 1933.
- 12) Gey, G. O.: *Am. J. Cancer.* **27**, P. 45, 1936.
- 13) Lewins, W. H.: *Contrib. Embryol.* **25**, No. 150, P. 161, 1935.
- 14) Enders, J. F., Weller, T. H. & Robbins, F. C.: *Science*, **109**, 85~87, 1949.
- 15) Bang, E. B.: *Bülljahns. Hopkins Hosp.* **92**, 291~308, 1953.
- 16) Stulberg, C. S., Schapira, R. & Eidam, C. R.: *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **81**, 642~646, 1952.
- 17) Cabasso, V. J., Stebbins, M. R., Norton, T. W. & Cox, H. R.: *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **85**, 239~245, 1954.
- 18) Enders, J. F. & Peebles, T. C.: *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **86**, 277~286, 1954.
- 19) Henle, G., Giraldi, A. & Henle, W.: *J. Exper. Med.* **101**, 25~41, 1955.
- 20) Takemori, N., Nakano, M., Hemmi, M., Ikeda, H., Yanagida, S. & Kitaoka, M.: *Nature*, **174**, 698~700, 1954.
- 21) 吉岡: *Virus*, 第7巻, 第1号, 1957.
- 22) 勝田: 組織培養法, 1955.
- 23) 池田: *Virus*, 第5巻, 第4号, 1955.
- 24) Van Rooyen, C. E.: *Virus diseases of man* P. 1202, Williams, & Wilkins co. Baltimore, 1948~1951.
- 25) 倉内: 未発表.
- 26) 大日方: 岡山医学会雑誌, 第65巻, 6号, 1953.
- 27) 稲垣: 岡山医学会雑誌, 第69巻, 6号, 1957.

写 真 説 明

Roller tube cultur 4代の培養液をマウス腹腔内に接種し, 14日後屠殺して各臓器をとり, 特に肝臓及び肺臓の変化を示した。染色は総て Hamatoxylin-Eosin 染色である。

Fig. 1. 石原株 Glisson 氏鞘に接する肝実質に境界明瞭なる好中球を混ざる円形細胞の浸潤あり, 一部の肝実質内では肝細胞の核に色質流失等の核変性像を示す。瀰漫性に星細胞の増殖を認む。弱拡大

Fig. 2. 石原株肝細胞の限局性類壊死。弱拡大

Fig. 3. 青森株肝臓に於ける限局性壊死巢形成を示す。実質細胞境界に明瞭なる類壊死に陥り, 好中球の浸潤があり, 円形細胞の浸潤も亦認められる。又 mallory 小体の出現あり, 炎症を伴うウイルス性の組織変化と解せられる。強拡大

Fig. 4. 小川株肝臓に於ける限局性細胞浸潤と類壊死, 多形核と円形細胞の浸潤を示す。強拡大

Fig. 5, 6. 青森株胞隔性肺炎, 肺胞中隔細胞の瀰漫性増殖, 円形細胞及び少数の好中球を伴った浸潤を認む。胞隔高度に肥厚し, 肺胞腔も消失す。弱拡大

Studies on the Tissue Cultivation of the Virus of Infectious Hepatitis in Okayama Prefecture

By

Yukihiro Maeda

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

Kawasaki Hospital

(Director: Dr. Sukenobu Kawasaki)

By the "roller tube" technic, the author tried the tissue cultivation of the virus of infectious hepatitis. The hepatitis virus isolated by Murakami et al. from hepatitis patients with the embryonated hen's egg or mouse was used throughout this work. The result were as follows:

1) The inoculation of the virus into the medium composed of fragments of skin or muscle of the chick embryo, or suckling mouse did not produce any cytopathogenic effect. The inoculation of each generation of the serial cultivation into the mouse, however, produced the typical pathological changes; this might be taken as the evidence that the multiplication of virus occurred, at least to some extent, in tissue cultures.

2) Judged from the pathological changes in the mouse inoculated with the emulsion of virus-infected tissue fragments, the multiplication of virus appeared to be worse in the medium of liver fragments than in that of skin or muscle.

3) When used as the antigen for infection protecting test, the inactivated emulsion of the tissue cultures of virus was less effective than that of the chick embryo by Murakami et al.; this might be the evidence that a high degree of virus multiplication could not be obtained by the tissue cultivation. However, the fact that some degree of infection protective power was obtained by the inoculation of tissue cultures of virus, suggested the possibility of practical application of tissue cultures of hepatitis virus to the vaccination.

前 田 論 文 附 図

Fig 1

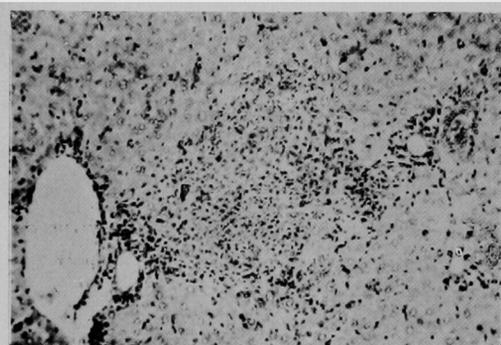


Fig 2

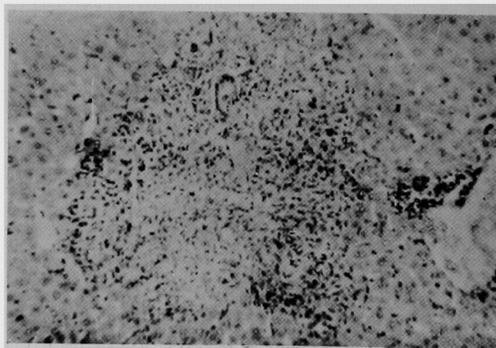


Fig 3

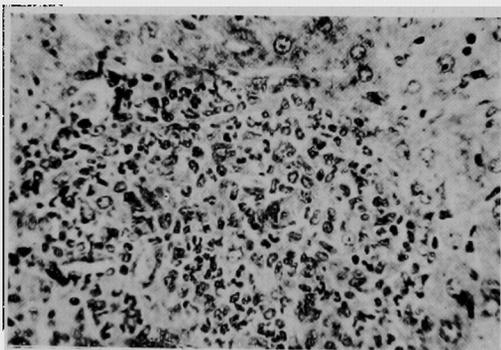


Fig 4

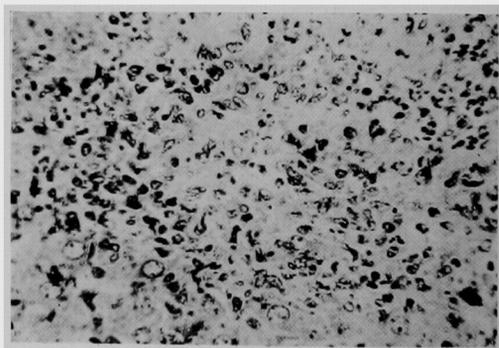


Fig 5

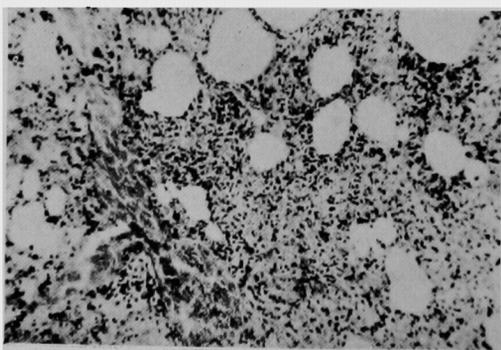


Fig 6

