

精製肝炎ウイルスに関する実験的研究補遺

第一編

精製肝炎ウイルスの耐熱性に就ての検討

岡山大学医学部微生物学教室（指導：村上 栄教授）

鈴木 孝 道

〔昭和34年7月15日受稿〕

緒 言

流行性肝炎の病原体が、一種のウイルスであるとの考えは、既に Havens (1944)¹⁾ の人体接種実験により推測された。Havens は当時流行した肝炎患者材料を用い、人体に復原するに際して、ウイルスの一般性状、殊に耐熱性、濾過性、抵抗性等を詳細に究めて、ウイルス分離は成功していないが、本ウイルスの存在を確かめ、その特異性状の一端を明らかにした。

爾来幾多の研究者により、ウイルス性疾患であろうとの推測はされながらも、各種の実験動物を用いた、動物体への移植若くはウイルスの分離に就ての各研究者の見解は、異論が尠くなく、決定的な結論を得るに至っていない。

之等の研究報告の内、Siede u. Meding (1941)²⁾ に始まる独乙学派³⁾⁴⁾ は始終陽性成績を挙げているのが注目され、近年に至つて Essen u. Lembke (1953)⁵⁾ 更に Wildführ G. (1953)⁶⁾ の実験研究は、疑問視されていた本ウイルスの研究を更に進め得たと推定せしめる卓越した業績である。

即ち、Wildführ は従来独乙学派の行つた実験成績を、更に多数の患者材料を用いて検討を行い、夫々実験動物によりウイルスの分離及び累代が可能であることを、実験的に証明し、本ウイルスが特異な性状を示すとともに、慢性の経過を辿り易い性状を述べ、更に創案にかかる Absättigungsversuch により型別の存在を認めたと、肝炎ウイルスに関する研究としては、まことに示唆に富む報告である。

其他に陽性報告を得た例では Henle a. Drake (1950)⁷⁾⁸⁾ が組織培養、次で孵化鶏卵羊膜内接種により、ウイルス分離に成功し、人体復原試験では不全型であるが、陽性結果を得ているにも拘らず、血

清学的研究ではいづれも失敗に終つている。

岡山県下に於ける伝染性肝炎の流行に際しては、村上等 (1955)⁹⁾ によりウイルス分離実験が試みられ、孵化鶏卵の累代により、一種のウイルスの分離に成功するに至り、その後の研究¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾ により、肝炎ウイルスと推測すべき所見を得た。既にウイルス分離当時より、本ウイルスの特異性状に関しては注目されていたが、時末 (1957)¹³⁾ により、本ウイルスの一般性状は次第に明らかとなつたが、実験材料が粗製ウイルスを用いたため、尚明確を欠ぐ憾があつた。その後村上¹¹⁾ 及び橋本 (1958)¹⁴⁾ により、孵化鶏卵により培養された本ウイルスが、容易に、而も能率良く精製し得ることが報告されるに至つたので、著者は、本精製方法を用いて、ウイルスの精製を行い、精製ウイルスによるウイルスの一般性状を詳細に追究した結果、興味ある所見を得たので、その成績を報告する次第である。

実験材料及び方法

ウイルス：肝炎患者材料を用い、村上等 (1955～1958) が孵化鶏卵累代により分離した石原、小川株及びマウス累代により分離された野田株との別はあるが、共に孵化卵及びマウスにより累代保存されていた。之等のウイルス株は総て、孵化卵にあつては鶏胎児の斃死、マウスに於ては肝臓に特異な病理所見が確認されているもので、抗原性は略々同一のものであることが既に証明されている。夫々のウイルス株の由来及び性状は表示した如くである（第1表）。

ウイルスの感染及び累代：村上等の予報⁹⁾ 及び時末¹³⁾ の実験に倣い、マウスの感染にはマウスの肝臓乳剤を用い、夫々腹腔内に 0.25 ml 宛接種し、14日後に屠殺して肝臓を pool し、Homogenizer に

第1表 供試ウイルスの由来及び性状概要

ウイルス株	分離材料	分離年月日	分離動物及び累代方法
野田株	急性肝炎患者肝 (重症死)	1955 1.2	i) 患者肝をとり乳剤となしマウス直接腹腔内接種を行う ii) 現在までマウス累代により保存中
石原株	急性肝炎患者肝 (重症死)	1954 6.2	i) 分離 孵化卵 ii) 孵化卵累代とマウス累代を行い保存中
小川株	急性肝炎患者肝 (重症死)	1954 9.3	i) 分離 孵化卵 ii) 孵化卵累代で保存中

より均等な食塩水 (pH 7.6) 乳剤を調製して、次代接種材料に用いたが、接種に際しては予め 2,500 r. p. m. 10 min. 遠心し、その上清を採取して用いた。感染の判定は、14日後に於ける病理学的所見に従った。

孵化鶏卵に於ては、接種材料を孵化後7日卵の漿尿腔内に接種しておき、鶏胎児の死亡するのを待つて、鶏胎児若くは鶏胎児肝臓を夫々集め、稀釈には予め採取しておいた漿尿腔液により行い、10倍稀釈鶏胎児を Homogenizer で細挫し均等な浮遊液となして、2,500 r. p. m. 10 min. 遠沈上清を次代接種材料に用いた。尚孵化卵のウイルス感染は、鶏胎児に肉眼で判定し得られるに十分な所見が得られぬ場合が尠くないので、小笠原¹⁸⁾の試みた如く、更に

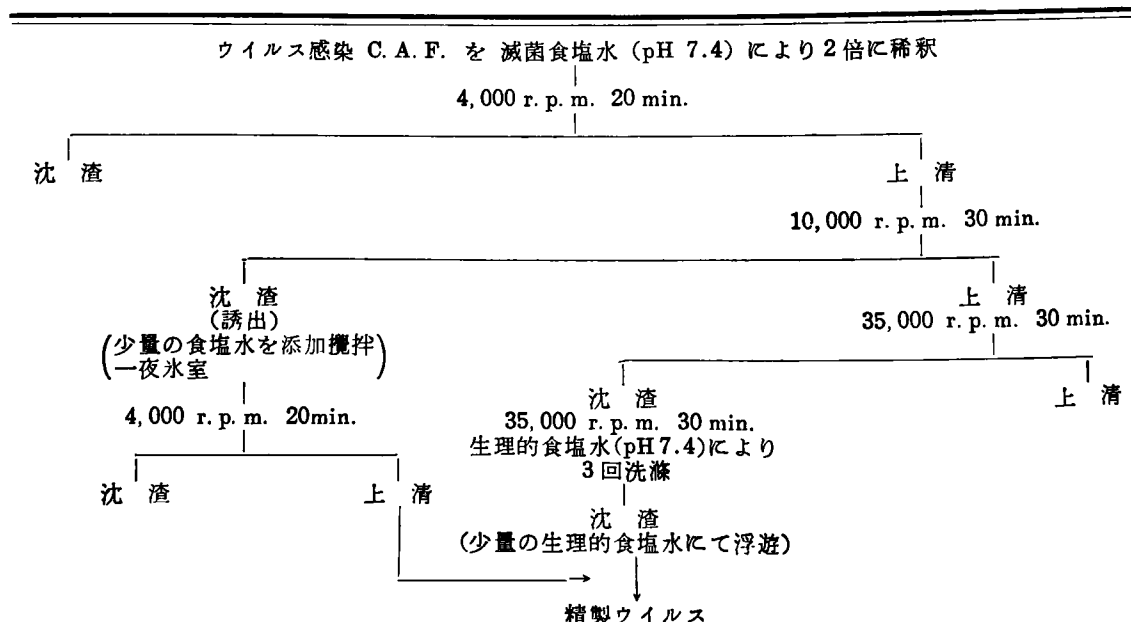
マウスに復原して、肝臓の病理所見により判定した場合もあつた。

耐熱性試験の方法： 時末¹³⁾の実験に従つたが、その要領はウイルス罹患感材料を諸種の温度の下に加熱処理した後稀釈マウス腹腔内に接種し、肝臓を中心とした病理学的所見を検討した上、示す病理学的所見により、耐熱性の程度を比較した。又先に橋本¹⁴⁾の行つた精製ウイルスを用いる場合も、実験方法は前記の要領に準じて行つた。

稀釈ウイルスの加熱処理は時末に倣い、予め準備した滅菌アンプル内に、ウイルス稀釈液を封入し所定の温度に保つたコッホ釜内に、所望の温度を示す温水を充した一定の容器を収め、その内に封入したアンプルを浸漬して浮上せぬ様に保ち、30~60 min. 加熱してとり出し、夫々の時間毎にマウス腹腔内に 0.25 ml 宛接種した。尚対照として、健康マウス肝乳剤をも同様に処理して嚴重な対照とした。之等の耐熱度の判定には、マウスに接種後14日目に夫々屠殺した上で肝臓を中心とした病理所見により総合判定を行つた。

ウイルスの精製： 橋本の実験方法に倣い、二種のウイルス株を7日卵の漿尿腔内に 0.25 ml 宛接種し、多数の卵の感染漿尿腔液を集め、これを粗製ウイルスとして精製を行つた。その精製方法は、既に試みられている表示の方法によつた (第2表)。即ちウイルス感染漿尿腔液を生理的食塩水 (pH 7.4) により2倍に稀釈し、4,000 r. p. m. 30 min.

第2表 ウィルス精製方法



遠心沈澱を行つた上、粗大組織片を除き、上清液を更に 10,000 r. p. m. 30 min. 遠心沈澱し、上清と沈澱に分つた後、上清を 35,000 r. p. m. 30 min. 遠心沈澱して得た沈澱を 3 回同様な要領により反覆洗滌を施したものを最終濃縮液若しくは精製ウイルスと呼称して用いた。尚この沈澱を蒸留水に浮遊し、電子顕微鏡試料として検した結果、ウイルス様粒子の多数存在することを確認した後に於て実験に用いた。

経口感染方法 経口感染法は大賀⁵⁾の方法に倣い、マウス自体に可及的刺戟を少くし、しかも逆流を防止する意味から、細いビニール製の細管を用いてマウスの口より自然に挿入することに努め、挿入後注射針を装着して、0.25 ml 宛を注入した。この際鼻孔より逆流したものは全部実験より除外したことは勿論である。

ウイルス精製過程の各分割の窒素量測定 総て Mikrokjeldahl 法により、窒素量を測定して比較しておいた。

実験成績

供試ウイルスを諸種の加熱温度により処理し、夫々マウスに接種するに、粗製たと精製であるとを問わず、ウイルス感染による感染死は認められず、肝臓を中心とした病理学的所見により判断すると共に、感染の様相も亦推測しなければならないが、本実験に於ける如く耐熱性試験に於ても同様に、病理所見により、熱に対する抵抗力若しくは減毒の程度を推定しなければ、容易に判読されない。著者は以上の理由より、熱に対する抵抗力を吟味する目的で、諸種の実験材料と方法を組合せて実験を反覆して行つた。

1. 野田株を用いた実験

先の時末¹³⁾の実験では各株のウイルスを用いて、マウスに感染せしめた後、加熱処理を行つて病理所見を比較していたが、本実験では一応時末の実験を追試した後、更に実験を重ねた。

即ち時末の加熱試験に倣い、各種温度に対する抵抗力の程度を、主に肝臓を中心とした病理学的所見の上に窺つた成績は表示した(第3表)。

既に分離ウイルスの熱に対する抵抗力の非常に強い事実は村上等の予報及び時末が指摘したが、実験の上では Havens の報告した温度の限界を参考にして、55°C~75°C の温度に保ち、厳密な加熱処理を行つた。本実験は慎重を期し、同様な実験を再三反覆して行い正確を期したことは勿論である。

第3表 稀釈ウイルスを用いた加熱抵抗力

ウイルス 稀釈	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁶ 10 ⁻⁷ 10 ⁻⁸ 10 ⁻⁹								
	加温温度及び時間								
50°C 30 min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60°C 30 min.	+	⊥	+	⊥	+	+	+	+	+
65°C 30 min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
70°C 40 min.	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	±	⊥	
75°C 30 min.	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	
Control	+	+	+	+	+	+	+	+	+

註 i) 野田株

ii) (⊥)~(⊥)に病変の程度を示し各臓器所見の総合成績を示す

iii) 各群使用マウス数は4~5匹を用う

実験成績を見るに先づ肝臓の病変では、55°C 30 min. の加温においては殆ど対照と遜色のない病理所見を窺い得られるが、次第に温度の上昇に伴い、先づ肝実質細胞の変性壊死の程度が軽度となり、之に伴う細胞浸潤の度も次第に減少して、70°C 30 min. の加温によつては殆ど病理所見は軽い細胞浸潤を散見するだけとなり、75°C 30 min. の加温により病変は認められぬ場合が尠くない。次に肺臓の病変においても同様に病理所見は次第に軽減して、70°C 30 min 加温により全く病変は消失する。之等の実験に於て用いたウイルス乳剤は、ウイルスのみによる乳剤とは勿論考えられぬ訳であり、他にウイルスの増殖に伴う細胞産生物もあり、又損傷を蒙つた細胞破壊物質もあることは推測される。又ウイルスの位置も、或はウイルスの浮遊状態の儘のものもあり、又細胞内に位置している場合もあつて、外界からの温熱により抵抗力も甚だ異なることは周知の事実である。

又病理学的所見より吟味する場合は、当然細胞とか、他の夾雑物の混在により、多少の病変は発現するものであることは、既に時末も指摘しているが、斯る病変は著者の実験でも確めた結果では、甚だ軽度の細胞浸潤を認めるにすぎず、まづ病理所見の程度により、ウイルスの抵抗力は判断し得られるものと推定された。

熱に対する抵抗力は、本ウイルスでは殆どの場合他のウイルスに比較してやや強い傾向があるが、70°C 30 min. ~75°C 30 min. の加温により大略一様に損傷を蒙り、不活化されるものと判定される結果を得た。

次に本実験の結果を更に確認する意味より、各種稀釈ウイルスを用いて、同様マウスに対する病理所見より耐熱性を窺つた。その病理所見の程度より、ウイルスの感染の様相を推測するに、稀釈域を広く 10^{-1} ~ 10^{-9} の限界に於て、前記肝臓の病変及び肺臓の病変は夫々様に惹起するが、低濃度域よりも、高濃度域 10^{-6} ~ 10^{-9} に於て、病変は殊に著しい場合が屢々認められる。低稀釈濃度ウイルスの場合は、ウイルスも多いと共に他の組織片若くは細胞産物も濃厚に混在することが考えられ、高稀釈濃度ウイルスに於てはウイルスの存在も次第に減少するが、他の夾雑物も亦少くなるが推測されるのである。又他方ウイルスの稀釈濃度により、混在する組織若くは壊死性物質 Necrotic Cell product (Smith)¹⁵⁾によるウイルスの抑制も当然考えられ、而も之の現象の惹起する可能性は、低次稀釈の場合に多いことも推定される。

斯る理由を総合して、高次稀釈ウイルスを接種した場合に、より強い病変を示す事実は熱に対する抵抗性を評価するに、ウイルスが外界の温度によりても損傷を受け難いこと、又ウイルスの耐熱性を見る上に比較的夾雑物による保護作用若くは温熱による不活化し難い条件の内にある等の耐熱の判定試験の妨げとなる如き状態を排除した恰好の条件にあるものと考えられるので、本実験の病理所見によるウイルスの抵抗性は有意な所見と判断される。

更にウイルスの熱に対する抵抗性を詳細に知る考えから加熱ウイルス材料を予め各種温度で処理しお

き、夫々の加熱処理材料を 3,000 r. p. m. 10 min. 遠心上清を得、健康マウス肝乳剤をも同様処理し、マウス接種に際し等量混和液を作り、各稀釈毎にマウスに接種し病理所見を窺つた。その目的はウイルス増殖に伴う壊死性物質を含むウイルスの存在が、恒に斯る耐熱性を示すものならば他の条件即ちウイルスに罹患しない組織片及び細胞成分と置換えたとしても、同様抵抗性を示すことが予測されると思われ、而もウイルスの組織内に位置した儘のものは可及的除かれた形で、ウイルスの単離したと推定される部分が比較的温熱の作用を蒙つているとも解釈される。又マウスの病変に發揮された感染の程度にもある程度の差は生ずると推測されたので本実験を試みた。

其の成績に於ては、55°C 30 min. 加温処理によりては、対照の病変との比較に於て殆ど差はない程度の病理所見が窺われ、同温度に対して良く耐えることが理解されるが、次第に温度の上昇に伴う病変の性状は、病変の程度、病変の種類が異なる傾向を示すことが注目せられた。

殊に肝実質細胞に於て変性若くは類壊死又は壊死巣の形成が認められるが、之等の病巣周辺に於ける細胞の所見で興味あるのは病巣を圍繞する形に於て単球の密集が散見され、而も Mallory 氏小体が見られると共に、少許の好中球が混在することであるが、之等の特異な病理変化は、60°C min. 以上の加温によりては全く証明せられず、小葉中心部とか、グリソン氏鞘周辺に於ける軽度の細胞浸潤が認めら

第 4 表 加温処理によるウイルスの抵抗性 (病理学的所見)

作用温度及び時間	病理学的所見	肝			臓			肺		臓		
		壊死	肝実質細胞変性	星状細胞増殖	肝索の解離	実質細胞浸潤	間質細胞浸潤	壊死細胞に於ける変化	胞隔炎	血管及び気管周囲に於ける浸潤	胞隔の肥厚	充血又は出血
55°C 30 min.		++	++	+	+	+++	++	++	++	+	+	+
60°C 30 min.		+	+	+	+	++	++	+	++	+	+	↓
65°C 30 min.		+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+
70°C 30 min.		↓	↓	↓	↓	±	↓	↓	↓	↓	↓	↓
75°C 30 min.		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
対 照		++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	+

註 i) (++)~(-)病変の程度を示す
iii) 野田株を用いた

ii) 一群マウス数は4~5匹を使用した
iv) ウイルス稀釈は 10^{-2} を用いた

れるに過ぎない例も尠くない。

以上の実験により、本ウイルス罹患マウス肝乳剤を用いた場合、マウスに於ける病理所見に於ては温熱により、ウイルスはかなり抵抗性を示すことが、病変により推測された(第4表)。

2. 石原株を用いた実験

野田株を用いた実験により、粗製ウイルス中に含まれたウイルスの熱に対する抵抗性は先づ70°C 30 minの温度により、不活化されることが認められたが、更に詳細に究める意味より、孵化卵により引続いて累代中の石原株を用い、橋本に倣い精製ウイルスを得、可及的ウイルスの純粋な形でとり出し

同様の実験を行つた。

精製要領は表示したが(第2表)この方法により能率良く精製純化された。実験に際して電子顕微鏡で確め、小円形のウイルス様粒子の存在を知り、更に精製度を確認するために窒素量及び蛋白質量を測定し、夫々の精製過程の様態を窺つておいた。

再三反覆して精製を行つた結果、著者の行つた精製で十分にウイルスの濃縮純化は行われるが、最後の精製ウイルス浮遊液にも不活性蛋白の存在がかなりの程度に認められる様である(第5表)。斯る石原株精製ウイルスを前述の加温処理要領により、ウイルスの熱に対する抵抗性を検した。

第5表 精製分割のN.P.の定量値

ウイルス株 N. P. 値	石 原 株		小 川 株		対 照 (健 康)	
	Nmg/ml	Pmg/ml	Nmg/ml	Pmg/ml	Nmg/ml	Pmg/ml
4,000 r. p. m. Supernatant.	0.5413	3.383	0.546	3.456	0.532	3.325
10,000 r. p. m. Supernatant	0.5495	3.4345	0.546	3.413	0.378	2.8473
35,000 r. p. m. Sediment	0.406	2.5375	0.404	2.540	0.455	2.3625

註 i) 夫々のN.P.値は三回実験を行い平均値を示した

ii) Controlは健康卵より得た漿尿腔液より同様の精製方法で行つた精製液である

iii) 35,000 r. p. m. 沈査は食塩水10.0mlに浮遊して用いた

此の実験では、35,000 r. p. m. 30 min. 沈澱を更に10.0 ml 宛の滅菌食塩水に平等に浮遊して用い、他の分割との混和を避けた。尚感染方法は腹腔内接種により行つた先づ前実験と同様に行つた抵抗性試験の結果を見るに、55°C 30 min. 加温材料を接種した病理所見は、対照の非加温材料を接種した場合と比較して病変は殊に著明であり、高度であることが注目された。特に肝細胞の変性及び類壊死若くは壊死巣の形成がかなり広範囲に於て散見せられ、而も肝小葉中心部又はグリソン氏鞘に於ける単球の浸潤も亦著しい。

精製ウイルスに於ては、粗製ウイルスと異り、他の組織等に由来する夾雑物がかなりの程度に除去され、外界の温度による影響を蒙り易い状態にあるものと予想されるに拘らず、55°C 30 min. に加温に耐うることが明らかに認められるものと推測された。次に60°C~70°C min. の加温に於ては、斯る病理所見がいまだかなり残存していることが認められた。即ち70°C 30 min. 処理群に於ては肝細胞の変性と

か壊死巣の形成が未だ軽度ながら証明せられる部分があり、細胞浸潤も亦殊にグリソン氏鞘周辺において認められることが尠くない等の所見を総合して、ウイルスは60°C~70°C 30 min. の加温により、多少の損傷を蒙るが、尚一部に於て抵抗し、耐過するものと解釈されるのである。更に75°C 30 min. 処理では斯る病理所見は全く消失し、稀に細胞浸潤が軽度に見られることがあるが、先づウイルスの熱に対する抵抗温度は、この限界であることが推測された(第6表)。

以上の実験は加温材料を腹腔内に接種して用いたが感染経路を変え、経口感染法によりウイルスの示す病理所見を窺つた。経口感染法は先の大賀⁵⁾、伊藤¹⁷⁾の方法に倣い、ビニール製小管により加温材料を所要量宛投与した。

之等加温材料の経口投与により同様に病理所見によりウイルスの耐熱性、感染の様相を詳細に窺うに、前回の腹腔内接種実験と略々同様な病理所見を認め、即ち55°C 30 min. では十分に抵抗を示し、

第 6 表 加温処理による精製ウイルスの抵抗性

加温温度及び時間	病理学的所見	肝 臓						肺 臓		
		壊死	肝細胞の変性	星状細胞の増殖	肝索の不整	間質内	細胞浸潤実質内	壊死細胞周辺における変化	肺隔炎	血管及び気管周辺に
55°C 30 min.		+	+	+	+	+	+	+	+	+
60°C 30 min.		+	+	+	+	+	+	+	+	+
65°C 30 min.		+	+	+	+	+	+	+	+	+
70°C 30 min.		+	+	+	+	+	+	+	+	+
75°C 30 min.		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control		+	+	+	+	+	+	+	+	+

註 i) 石原株35,000 r. p. m. 精製ウイルスを用いた ii) (++)~(-)は病変の程度を示す
iii) 感染方法は腹腔内接種を行った

75°C 30 min. では殆ど病変は消失した事実が、かなり明瞭に確認された。之の実験に於ても、55°C~60°C 30 min. の加温により、著しく病理所見が優れた場合があつて、加温により病変を増加した如き印象を受ける場合も認められたことは興味があつたが、

一部に於ては著しく病変の軽減した所見があつて、一様には判断されぬがまづウイルス自身ある程度に温熱の影響を蒙り、かなりの損傷を受けるための病変の減少と解すべきものと推測された(第7表)。

第 7 表 加温処理による精製ウイルスの抵抗性

加温温度及び時間	病理学的所見	肝 臓						肺 臓			
		変性	肝実質細胞壊死	星状細胞の増殖大生	肝索の解離	細胞浸潤(実質)	細胞浸潤(間質)	壊死細胞周辺における変化	肺隔炎	血管及び気管周辺に	肺隔肥厚
55°C 30 min.		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60°C 30 min.		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
65°C 30 min.		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
70°C 30 min.		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
75°C 30 min.		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

註 i) 石原株35,000r. p. m. 遠心精製ウイルスを用いた ii) (++)~(+)は病変の程度を示す
iii) 感染方法は経口感染によつた

3. 小川株を用いた実験

石原株と同様に、孵化卵の漿尿腔内にウイルスを接種したる後、罹患孵化卵鶏胎児若くは肝臓を用いて累代保存中のウイルスを多数の孵化卵漿尿腔内に接種し、ウイルス罹患漿尿腔液を集め、精製を行つ

た。かくて精製ウイルスを得、熱に対する抵抗試験を行い、マウスの病理所見によりウイルスの耐熱度を評価した。

病理所見は石原株と同様に 55°C 30 min. の加温によつては良く抵抗していることが、病変の状態に

より推定されたが、次第に温度を上昇せしめるに伴い病変も漸次軽減した。而して肝細胞障害として挙げられる変性（膨満、好酸性萎縮等）とか類壊死若しくは壊死巣の形成とかの病変が漸次緩和され、これに伴う細胞浸潤の程度も軽度となる傾向が指摘された。石原株と小川株は、従来の研究ではその性状が略々類似したものと考えられているが、本実験に於ても熱に対する抵抗性は大凡同程度と判断すべきものと解釈された。

以降の実験は、小川、石原株を同様に併用し実験を行つた。

従来の熱に対する精製ウイルスの抵抗試験は、孵化卵の漿尿腔液より出発して、高速遠心沈澱を反覆して行い、最後の 35,000 r. p. m. 遠心沈澱を pH 7.4 の滅菌食塩水 10.0 ml に浮遊して用いたため、ウイルス希釈液に就ての考慮は払われていない。著

者は各種の pH の異つた希釈液の夫々 pH 2.0, pH 7.4, pH 8.2 を用いて、同一の精製ウイルスを希釈し、前回と同様に抵抗性を検し、更に数代の累代をも試み、耐熱性を窺つた。

まづ小川株を用いた実験成績によれば、ウイルス希釈が pH 2.0 と酸性域に於て加温処理を行つた場合、ウイルスは著しく傷害を蒙るものの如く、病理所見も 60°C 30 min. 又は 65°C 30 min. の加温に際して甚だ軽度に止む例があり、70°C 30 min. の加温により病変は殆んど認められない。反之して pH を 7.4~8.2 に保つ場合は、抵抗性は残存するものの如く、未だ 70°C 30 min. の加温によりても病理所見を見出す例が尠くない。斯る所見は一般のウイルスの性状に近似していることが指摘されるのである（第 8 表）。

第 8 表 ウイルス希釈液に及ぼす温熱の影響

稀釈液 pH ウイルス 希 釈	PH 2.0					pH 7.4					pH 8.2				
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
加温温度 及び時間															
55°C 30 min.	++	++	+	++	+	++	++	+++	+	++	++	+	+	+	+
60°C 30 min.	+	+	+	+	⊥	+++	++	++	++	++	+	+	+	+	+
65°C 30 min.	+	++	+	+	+	+	+	+	+++	++	+	+	+	+	+
70°C 30 min.	⊥	⊥	⊥	±	⊥	+	+	⊥	⊥	+	+	+	+	+	+
75°C 30 min.	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
Control	++	++	+	++	++	+++	++	++	++	+++	++	++	++	+	++

註 i) 小川株を用いた ii) (++)~(⊥)病変の程度を示す iii) マウス使用は一群 4~5 匹を用いた

石原株に於ても、略々所見が得られることが再三の実験に於て確認された（第 9 表）。

次に以上の実験により確めた病理所見を、更に累代により実証したいと考え、夫々のウイルス株を 2~5 代迄累代して、各累代毎に病理学的所見を検討した。

実験では、石原、小川株を用いたが、これらの精製ウイルスを用いた場合でも粗製ウイルスを用いた実験と略々同様な結果を示した。即ち両ウイルスの精製されたものを、型の如く夫々の温度に加温し、マウスに接種して後に病理学的所見を比較した。

先づ 55°C 30 min. の加温によつては病理所見は殆ど対照と変わらないが、60°C~65°C 30 min. と加温するに伴い、漸次病変が軽減されている傾向がある。病変の程度を総合して見れば、多少とも石原株

よりも小川株の病変は軽度であり、熱に対する抵抗は小川株が劣ることも考えられるが、明瞭に指摘し得るまでに判然とした所見は得られなかつた。更に 70°C に至れば著しい病変の軽減が見られ、累代は可能であるとは知られるが確実な病理所見が認められぬ事実より、相当の影響を蒙つたものと推測され、75°C 30 min. に於ては、殊に病理所見が不確実となり、或は消失する等の所見より、累代は次第に不確実となることが各代の累代により推定された。夫々の温度により 1~6 代に亘り、各累代毎に病理所見を検討して、夫々の病変を比較して熱に対する抵抗性を窺つた所見に於ても、先の耐熱性の試験と略々一致して 70°C~75°C 30 min. が、本ウイルスの熱に対する限界であることが推測された（第 10 表）。

第10表 累代によつた加熱試験の確認

加熱時間 加熱温度	ウイルス株		石原株					小川株						
	累代		初代	二代	三代	四代	五代	六代	初代	二代	三代	四代	五代	六代
	50°C 30 min.	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
60°C 30 min.	+	++	+	++	++	++	+	+	+	++	++	++	+	
65°C 30 min.	+	++	++	++	++	++	+	+	+	+	++	++	+	
70°C 30 min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
75°C 30 min.	+	+	±	±	+	+	+	+	+	±	+	+	+	
80°C 30 min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Control	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	

- 註 i) (++)~(+)病変の程度を示す
 ii) ウイルス稀釈は精製ウイルス 10⁻² を用いた
 iii) 累代材料は肝乳剤を用いた

総括及び考按

肝炎ウイルスの特性として、Havens(1944)の人体接種試験以来信じられている耐熱性については種々論議されているが、ウイルスを分離固定する段階が未だに確認されていないので、ウイルスの性状を把握する迄には至っていない。

著者は、村上等の分離ウイルスの譲り受け、橋本の試みたウイルス精製法に倣い精製ウイルスを得、可及的純粋なウイルスの単離された状態に於て加熱を行い、耐熱性を検討した。

既に時末により粗製ウイルスを用いた同様な実験が行われたが、粗製ウイルスに於ては当然組織片若くは細胞産生物質等が残存し、ウイルスの病理所見に微妙な影響を発生せしめるに至ることは推測され、ウイルス増殖に対する組織片の抑制作用も亦当然考慮すべきものと思料されるので、著者は斯る不合理な夾雑物を十分に除去し実験を行った。

本実験を通じて最も懸念されたのは耐熱性を窺うに際して、加熱に耐えたウイルスの示す病理所見を観察することにより、間接的に耐熱性の程度を判定する法を採用しなければ、ウイルスの性状が窺い得られないと云う条件が附されることである。この判定に従うならば、まづマウス接種材料を充分に精製濃縮して用いること、又嚴重な対照を附することが試みるべき充分な確実な結果を得る方法と推測された。

著者は斯る考えより、特に耐熱試験に際しては精製ウイルスの純化に万全を期し、混在する組織成分を除くと共に、夾雑物の混入を避けるべく努めた。

実験結果に於ては精製によりて斯る夾雑物は殆ど除去されるが、尚不活化された蛋白成分はかなりの量に残り、而も高速遠心の速度を増加し、35,000 r. p. m. 遠心しても、未だ相当量の存在が認められることはかつて脳炎ウイルスの精製を行つた川喜田等(1953)¹⁶⁾の述べた如き不活性の蛋白内に埋れた形で存在することも考えられるが、本論文では精製が目的ではないので35,000 r. p. m. 遠心したウイルスを電子顕微鏡でウイルス粒子の多量の存在を知ると共に、窒素量、蛋白量ともに対照と比較しながら用いた。

実験所見では、本ウイルスが既知のウイルスと比較して甚だ熱に抵抗を示すことを知つた。時末の所見と比較しても熱に対する抵抗の限度は70°C~75°Cの温度と推定された。即ち55°C 30 min.の加熱には良く抵抗するが、60°C、65°Cと温度が加わるに従いウイルスは影響を蒙るものの如く、病理所見は次第に軽減してくるが、70°C~75°Cに至れば殆ど抵抗性が喪失していることが、病変の程度により又は累代により証明された。此の性状は肝炎ウイルスの特性と判断され、Havens(1944)Maccallum(1955)¹⁷⁾の報告と相通ずる知見であると思料された。

結 論

肝炎患者材料より分離されたウイルスを、孵化鶏卵漿尿腔内に接種し、超高速遠心法により得た精製ウイルスを用いて肝炎ウイルスの重要な性状と考えられる熱に対する抵抗性を吟味した。

ウイルスのマウスに対する感染は、病理所見のみで示される不顕性感染を惹起するもので、動物の感染致死は認められないために、先づ精製ウイルスを加熱処理し、更にマウスに接種し、肝臓を中心に病理変化を窺い、間接的に耐熱性の程度を判定する方法によつた。その所見を次の如く結論した。

1) 精製ウイルスの熱に対する抵抗試験を反覆して行つた結果、病理所見より判定して55°C 30 min.の加熱には良く耐えるが、60°C~65°C 30 min.と温度の上昇に伴い、不活化されるものもあるが尚抵抗を示し、70°C~75°C 30 min.の加熱により、抵抗性を喪失するものと判断された。

2) 精製ウイルスの耐熱性は70°C~75°Cが限界であることが以上の抵抗性試験、更に累代等により確められた。しかしながらウイルスの熱に対する抵抗性は加熱処理、加熱時のpH等の条件が加わる

ことにより、幾分の差が生じることが示唆された。

稿を終るに当り、絶大なる御指導と御鞭撻を受け、更に御校閲の労を賜つた恩師村上栄教授に衷心より感謝の意を表する。

参 考 文 献

- 1) Havens : J. A. M. A. 126, 17, 1944.
- 2) Siede u. Meding: Klin. Wchensch. 20, 1665, 1941.
- 3) Dresel. Meding u. Weineck · ZSchr. f. Imm.forsch. u. Exp. Therp 103, 129, 1943.
- 4) Siede W. S Luz K: Klin. Wchensch, 22, 70, 1943.
- 5) Essen u Lembke : Zbl. f. Bact 159, 1953.
- 6) Wildführ, G.: Zeitschr. f. d. Ges. inner. Med 573, 1953.
- 7) Henle et al.; J. Exp. Med. 92, 271, 1950.
- 8) Henle et al.: Proc. Soc. Exp. Biol & Med. 7, 603, 1950.
- 9) 村上等 : 第 2 回日本ウイルス学会肝炎シンポジウム, 1955.
- 10) 村上等 : 第 4 回日本ウイルス学会総会講演要旨, 1956.
- 11) 村上等 : 第 5 回日本ウイルス学会総会講演要旨, 1957.
- 12) 村上等 : 第 6 回日本ウイルス学会総会講演要旨, 1958.
- 13) 時未 : 岡山医学会雑誌, 第70巻, 7号, 1958.
- 14) 橋本 : 岡山医学会雑誌, 第70巻7号, 1958.
- 15) Smith : J. Exp. Path 14, 162~170, 1933.
- 16) 川喜田等 : 日本細菌学雑誌, 第8巻, 2号, 1953.
- 17) Maccallum . Virus and Rickettsial Diseses 1955.
- 18) 小笠原 . 岡山医学会雑誌第70巻, 7号, 1958.
- 19) Havens · Rivers. Viral a. Rickettsial of infection of man 1959.

A Further Studies on Purified Hepatitis Virus

Part I Studies on the Heat Resistance of Purified Hepatitis Virus

By

Takamichi SUSUKI

Department of Microbiology, Okayama University Medical School
(Director : Prof. Sakae MURAKAMI)

Using the hepatitis virus isolated from hepatitis patient, the author cultured the virus by serial passage in chorio-allantoic cavity of chick embryo, collected it in purified form by means of ultracentrifuge and observed the resistance to heat that was supposed to be a important feature of the virus. For the infection of the virus it does not render the lethal effect on mouse, only pathological findings have the significance for identification of the infection. On account of this, the author adopted pathological findings on the liver of the mouse, that was inoculated the heat-treated purified virus, as to determin the resistance to heat. The following results were obtained.

1) From the results of repeated test that the heat resistance of purified virus was examined, it could be concluded that the heating at 55°C for 30 min. did not affect its activity at all; but the heating at 60°—65°C for 30 min. showed serious effect on the activity, however, whole virus could not be inactivated by this treatment; and the heating

at 70°—75°C for 30 min. inactivated the virus completely.

2) The result of the inactivation test described above, in that the complete inactivation of the virus was achieved by heating at 70°—75°C, was confirmed further by the serial passage of the virus. However, the resistance of the virus was supposedly varied to some extent by the heating method and the pH of medium at heating.
