

精製肝炎ウイルスに関する研究

第 1 編

精製ウイルスの比較研究殊に泉熱ウイルスとの比較

岡山大学医学部微生物学教室 (主任: 村上 栄教授)

津 田 哲 郎

〔昭和 34 年 7 月 16 日受稿〕

緒 言

流行性肝炎に関する研究就中病原体に対する論議は、遠く Andersen 及び Tulinius (1938)¹⁾, Findlay, Maccallum, Murgatroid (1939)²⁾ によりウイルスと推定されて以来、患者材料よりウイルス分離の試み、感受性動物の探索、人体接種実験等が、各国の研究者により行われたに拘わらず、未だ確認されるまで至っていない。その間に於ける各国の研究報告の内、病原体分離に関しての陽性例として注目されるのは、Siede u. Meding (1941)³⁾, Dresel, Meding 及び Weineck (1943)⁴⁾, Siede u. Luz (1953)⁵⁾ の独乙学派により孵化鶏卵によるウイルス分離である。この報告は更に Wildführ, G. (1953)⁶⁾ により広汎な分離実験が行われ、各種実験動物に対する分離もまた可能であつて、分離ウイルスは夫々に特異な感染所見を示すと共に、慢性化の経過を辿り易い性状を有することを指摘した。又 Essen u. Lembke (1953)⁷⁾ は、同様のウイルスを電子顕微鏡により把えて、ウイルス粒子の形態学的研究を報告している。

次に Henle (1950)⁸⁾ により、孵化鶏卵及び組織培養の併用によつて、一種のウイルスを分離するに至り、該ウイルスを用いて皮膚反応を行い、更に人体接種試験に於ては、病型は不全型ながら、復原の可能な事実を報告した。

我国に於ては、荒川、多ヶ谷 (1946)⁹⁾, 木村、堀田 (1949)¹⁰⁾, 荒川等 (1957~1958)¹¹⁾, 村岡 (1958)¹²⁾ の報告があるが、之等の報告の内、研究の継続されている荒川等 (1957~1958)¹¹⁾ の実験報告によれば、肝炎ウイルスの全貌は漸く解明されかけた感がある。即ち荒川等は、肝炎ウイルスの分離に成功し、続いて分離ウイルスによる一般性状殊

に血清学的研究を行い、その性状を明確に示し、しかも肝炎患者に由来するウイルスである事を主張し、なお電子顕微鏡により、ウイルスの形態学的所見を観察している。

村上等 (1953~1958)¹³⁾ は先に肝炎患者材料より、孵化鶏卵を用いて、一種のウイルスの分離に成功した。この分離ウイルスの一般性状に於ては、甚だ特異的な性状として既に Havens (1944)¹⁴⁾ の人体接種実験に於て、推定された熱に対する抵抗性を有し、又各種薬剤に対しても、ある程度の抵抗性を示す事実を、本ウイルスも示すことを報告し、血清学的性状の内補体結合反応等により、患者血清とにある関連性を認めた。その後橋本 (1957)²²⁾ によるウイルス精製法が創案され、容易に、しかも能率良くウイルスの精製純化が行われるに至つて、再びウイルスの性状に関する検討が行われた²³⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾。

他方分離ウイルスと類似ウイルスとの比較研究も、Ectromelia ウイルス¹⁷⁾, 又は泉熱ウイルス¹⁶⁾ に就て行われたが、之等のウイルスの内殊に類似した性状を有することで知られた泉熱ウイルスに就ては、既に高田 (1957)¹⁶⁾ の報告の如く、両ウイルスともにマウスに感染して病変は示すが、発症致死せしめないで所謂不顕性感染を惹起すること、感染所見は共に病理学的所見に依存されなくては判定出来ない。血清学的研究が十分に行われない。等の諸条件が、共通していて、両ウイルス間の異同に就ては異論があるとしている。この実験は共に、両ウイルスともに粗製ウイルスを用いたために、実験的誤差も考えられる訳であり、更により良い条件で検討した場合、或は両ウイルスの異同も明確に論議し得るのではないかと推測されたので、著者は泉熱ウイルスを、既に精製純化された肝炎ウイルスと同様な手段により精製純化して用い、両ウイルスの比較検討を重ねた。

その結果興味ある知見を得られたと信ずるので、その概要を報告する。

実験材料及び方法

供試ウイルス： 実験に用いたウイルスは、先に村上等により分離され、孵化卵累代により引続き保存されている肝炎ウイルスの内の石原、小川両株、泉熱ウイルスとしては先に大日方¹⁵⁾により分離されたのを、当教室に於てマウス累代によつて保存している社株であり、先に同僚高田により、北里研究所笠原四郎博士より分譲を受けた三井株と、同一性状を有するものと確認されたものである。

孵化卵による感染及び累代： 孵化卵による累代方法は両ウイルス共に次の方法に做つた。

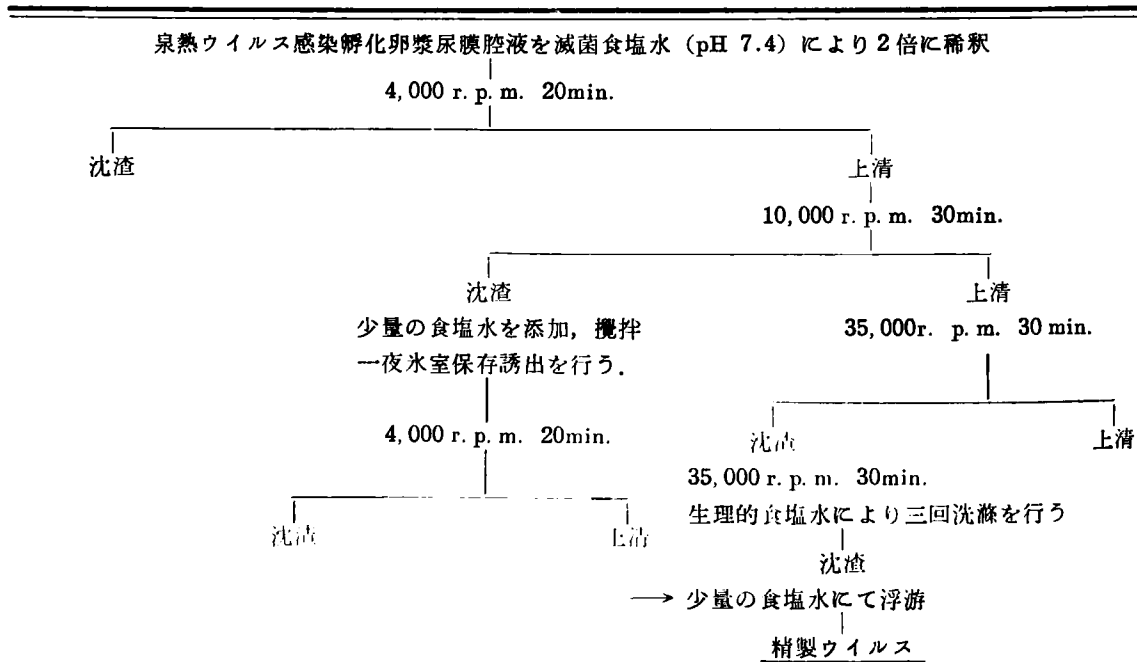
即ち孵化後10~12日卵の漿尿腔内に予め準備したウイルス感染乳剤を0.25 ml 宛接種した。初代ウイルス感染乳剤としては、肝炎ウイルスの場合は孵化卵のウイルス感染を惹起した胎児乳剤若くは胎児肝臓乳剤を作つたが、之等の各種臓器乳剤調製には、予め罹患臓器を3~4個宛集め、秤量した後、感染卵の漿尿腔液を用いて稀釈し、Homogenizerによつて均等な乳剤を得、更に2,000 r. p. m. 20 min. 遠心した上清液に、Penicillin 100 u/ml, Streptomycin 100 µg/mlを添加して用いた。又泉熱ウイルスにおいては、罹患マウスの肝、腎、肺を集めて秤量し、滅菌食塩水(pH 7.6)を加えて、Homogenizerにより細挫した上、10倍稀釈乳剤を作製し、同様

2,000 r. p. m. 20 min. 遠心上清液を得て、漿尿腔内に0.25 ml 宛接種を行つた。接種後は毎日2回観察し、胎児の死亡ある場合は直ちに、胎児の生存する場合は、ウイルス接種後7~9日にして屠殺し、各胎児より同様な方法で胎児臓器乳剤を作り、次代接種材料とした。著者の分譲を受けた両ウイルス株では、夫々3代まで累代を行い、以後の実験に用いた。3代までの累代に於ては、肝炎ウイルスでは、比較的胎児の死亡が良く認められたが、泉熱ウイルスでは殆んど胎児の死亡が認められなかつた。

孵化卵の漿尿腔内に両ウイルスを接種するとき、ウイルスの増殖があることは、先に小笠原¹⁵⁾、又は高田¹⁶⁾の所見であるが、著者もまた漿尿腔内にウイルスを接種後ウイルスの精製を試みた。その精製要領は次の如くである。

ウイルスの精製要領： ウイルスの精製要領は、橋本の行つた超高速遠心による反覆精製法に做つた。その方法は表示した(第1表)。著者はこの肝炎ウイルス精製方法により、泉熱ウイルスの精製もまた同様に行つた結果、良結果を得た。その方法の概要は、ウイルス感染漿尿腔液を多量に集め、4,000 r. p. m. 20 min. 超高速遠心を行い上清液を得、粗大なる組織片を除去し、更に10,000 r. p. m. 30 min. 遠心して、夾雑物を除き、得た上清を35,000 r. p. m. 30 min. 遠心して得た沈渣を、少許りの食塩水に浮遊し精製ウイルスとして用いた。肝炎ウイルスでは予め橋本の行つた確認法として、電子顕微鏡による

第1表 泉熱ウイルスの精製方法



観察，マウスに対する起病性を確めているので，著者も両ウイルスに就て同様な実験を行い，ウイルスの精製純化の程度，若くはウイルス様粒子の存在を確めた。

実験成績

1) 精製ウイルスを用いた両ウイルスの一般性状の比較実験

i) 両精製ウイルスのマウスに対する病原性

既に高田により報告せられた如く，未精製ウイルスをマウスに接種した場合，それぞれマウスは感染致死することはないが，特有の病理所見を示す不顕性感染を惹起することが知られているが，著者は同様な精製方法で，精製純化したウイルス浮游液を，更にマウスに接種し，精製した場合の起病性を窺つた。肝炎ウイルスに於ては，その病理所見としては，先づ肝臓を中心とした病変が挙げられた。即ち肝臓に於ては，肝細胞の変性及び壊死，類壊死若くは壊死巣周辺における単球の集合，病変の高度な場合には少許りの好中球を混在するか，明瞭に Mallory 氏小体の出現等が認められ，星細胞の腫大及び増生，肝索の解離，更に実質及び間質内に円形細胞の浸潤等がよく認められた。次に肺臓に於ては胞隔炎，気管及び血管周辺における円形細胞浸潤，更に胞隔の肥厚，肺充血若くは出血等の病変が窺われたが，他の脾，腎に於ける病変が少いことが注目

せられた。精製肝炎ウイルスに於ては殊に肝臓の病理所見が高度な場合が多く，常に病変の発現が平等であることも興味が深く，可及的夾雑物を除去し，純化した状態に於ては，組織片等の混在によるウイルスの増殖の抑制を受けない，ウイルスの感染には最良の状態にあるものと推測された。

次に泉熱ウイルスに於ては，先づ孵化卵に於けるウイルスの累代により，漿尿腔内でよく増殖が行われることは認められたので，肝炎ウイルスと同様に累代を重ねた。肝炎ウイルスに比較し，孵化卵の胎児死亡率が低く，しかも胎児の病変が少いことは，ウイルスの感染標識とはなり難い点であるので，マウスに復原して感染の様相及び程度は，病理所見により窺つた。

又泉熱ウイルスの感染標識として認められる病理変化は，一般に各臓器に於て認められた。即ち先づ肝臓に於ては，小葉内小壊死巣の形成，肝索の解離，肝細胞の変性，血管周囲の細胞浸潤，星細胞の腫大，増生，単球又は組織球よりなる小結節形成等であり，肺臓には間質性肺炎，血管周辺の単球・組織球の増生が挙げられるが，他に脾臓には細網細胞の増生等，腎臓では上皮細胞の変性，間質に於ける細胞増殖，充血若くは出血等が認められ，未精製ウイルスと比較して，病理学的変化は高度な場合が多く，しかも病変が確実に，平等に出現することは，肝炎ウイルスの時と同様である（第2表）。

第2表 精製ウイルスによる病変の比較

精製ウイルス	病理学的所見	肝 臓						肺 臓				脾 臓		腎 臓					
		肝細胞の変性及び壊死	小葉内壊死巣形成	肝索の解離	星細胞の肥大、増生	実質内細胞浸潤	間質周辺の細胞浸潤	単球、結核、組織球の形成	間質性肺炎	胞隔炎	気管、血管周囲の浸潤	円形細胞の肥厚	充血及び出血	単核細胞の増殖	充血	上皮細胞の変性	間質の細胞増殖	充血及び出血	
精製肝炎ウイルス		++	++	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
精製泉熱ウイルス		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

註：(++)~(+) 病変の程度を示す。

以上両ウイルスのマウスに於ける病理変化を列挙したが，一般に示す病理所見は甚だ類似した部分が少くない。殊に肝臓の病変はよく類似して、明瞭に区別し難い部分があるが，肝臓だけに限局するならば，病変が高度な場合は，肝炎ウイルスの示す病変，殊に類壊死若くは壊死巣形成の周辺に於ける

単球又は組織球の集合した部分の細胞変化（少許りの好中球を混在し，Mallory 氏小体の散見せられる部分）が泉熱ウイルスに於ては殆んど認められなかつた。病変の軽度な場合は，単に限局性の小壊死巣形成とか，軽度の細胞浸潤を示す程度で全く区別出来ない。次に肝炎ウイルスでは，肺臓の変化も伴う

が、他の臓器に於ては殆んど特記すべき病変が指摘されないにも拘わらず、泉熱ウイルスに於ては、一般に他の臓器にも等しく認められる事実が明かである。

既に高田の報告による未精製ウイルスにあつては、殆んど病理変化の出現している両ウイルスの病理所見は一致するかの印象を受けるが、精製ウイルスに於てはかなりの程度に病理所見による区分が明かになつたように推測された。

次に之等両ウイルスの稀釈試験を行い、ウイルス稀釈に伴う感染の程度若くは病理所見の比較を行つた。未精製ウイルスに於ては、肝炎ウイルスの場合稀釈域を 10^{-6} ~ 10^{-9} 程度の高い稀釈にするほど、病変が良く発現する現象が見られた。この現象を説明するに組織片の混在によるウイルス増殖の抑制と解釈したが、高田の報告では泉熱ウイルスに於ても

同様の現象を認めている。

著者も両ウイルスの、精製したものを用いて、同様の稀釈試験を行つた。精製肝炎ウイルスではかつて鈴木の実験で証認されたが、本実験に於て肝炎ウイルスと同様な傾向を有し、低稀釈に於ては病変が常に抑制されるかの印象を受け、高稀釈に於て病変は一定して、なお且高度な場合が多い。之等の病理変化を詳細に窺つて見ても、 10^{-6} ~ 10^{-9} の稀釈域に認める類壊死若くは壊死巣の形成が著明であつて、広汎な壊死巣周辺における細胞変化殊に単球又は組織球の集合等、更に星細胞の増殖腫大等の変化も、一様に高度である例が多い。之を精製泉熱ウイルスに就て見るに、泉熱ウイルスには寧ろこのような傾向が左程著明ではなく、稀釈度に応じて確実に病理変化が窺われた。この稀釈試験は再三に亘つて試みたが、同様な傾向を指摘し得た(第3表)。

第 3 表 精製ウイルスの稀釈による病変の比較

ウイルス稀釈	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
肝炎ウイルス(精製)社株	+	+	+	+	+	+	+	+	+
泉熱ウイルス(精製)石原株	+	+	+	+	+	+	+	+	+

註：(+)~(+) 病変の程度を示す。

之の実験成績から見れば、未精製ウイルスに於ては相等度に組織片又は細胞産生物質の混在があるものと判断され、斯る夾雑物のウイルス増殖に対する干渉的な役割も考えられたが、精製肝炎ウイルスに於ては斯る夾雑物は可及的除去されたが、なお不活性の蛋白成分が残存することは明らかであり、ウイルスだけが純粋な形で、濃縮純化されたと評価されないの、夾雑物によるウイルスの抑制も考えられる。この稀釈実験のみより、ウイルス相互の干渉現象も考えられなくはないが、本ウイルスの増殖の様相より見て、先づ夾雑物の混在によるウイルスの増殖の抑制を考慮するが妥当と推測された。

精製された両種のウイルスを、濃縮純化された形で、それぞれの一般性状を比較検討した。

ii) 耐熱性

肝炎ウイルスでは最も重要と思われる性状であつて、Havens 以来よく述べられているが、鈴木が行つた実験と同様に、肝炎ウイルスを用い、別に泉熱ウイルスの耐熱性をも吟味した。

肝炎ウイルスの耐熱性は、極めて特異的である。即ち精製肝炎ウイルスを用いて実験に於て、常に 70° ~ 75° C 30 min. により病理学的所見が軽減若く

は消失することが認められた。反之して泉熱ウイルスに於ては、病理変化は 55° ~ 60° C 30 min. の加熱により病変の消失が認められる事実より、既知のウイルスと同様に、 55° ~ 60° C に加熱することにより殆んど不活化されるものと推測された。之等の一般性状の比較に於ては、常に両ウイルスともに、マウスの発症致死を認めず、特異な病理所見により判定したために、既知のウイルスと比較することは困難であるが、殊にこの耐熱性試験に於ては、可及的純粋な状態にまで精製濃縮したウイルスにより、泉熱ウイルスの抵抗力は著しく減少し、未精製の実験よりも確実に判断された。又反対に肝炎ウイルスに於ては、精製ウイルスを用いても、その耐熱性は殆んど低下せず、依然として 70° ~ 75° C の加熱により漸く不活化される事実が明かであつて、肝炎ウイルスの特性として注目される性状であることが指摘された。

iii) 濾過性

肝炎ウイルスの濾過性に就ては、既に述べられたが²⁰⁾、Seitz E. K. を通過することが知られている。他方泉熱ウイルスにしても、笠原、大日方等の実験成績で確認されている。しかしながら両方ともに、

ウイルスの形態学的検討はなされていない現況である。即ち泉熱ウイルスの大きさに就ても、佐 (1939)²¹⁾ は 30~40 m μ と推定し泉は 40~120 m μ と記載したが、確認されていない。肝炎ウイルスに就ても村上等の計測に従うに 50 m μ と推定されていて、形態は小円形若くは小楕円形と電子顕微鏡的所見を述べている。斯る大きさの面より見れば両方のウイルス共に Seitz E. K. により濾過され得ることは推測されるが、一部により吸着され濾過されるウイルス粒子の減少は考えられる。その結果あたかも、濾過第 1 代に於て濾過し尽されたとは言い難い点も生ずる訳である。このような理由からすれば、精製された、夾雑物の少ない、比較的単離された状態に近い、好条件の場合の精製された状態のものを濾過された場合が、良結果を得ることが考えられたので、肝炎ウイルスと同様に、泉熱ウイルスも十分に精製した上で、濾過性を検討した。

実験の成績を見るに、精製された状態では能率良く濾過は行われるが、Seitz E. K. の濾過膜により一部は吸着されるものの如く、動物復原第 1 代に於ては、病理所見がやや軽減する傾向があるが、次第に累代を継続するに恢復する点より、両方のウイルス共に、Seitz E. K. は通過するものと判断された。

iv) エーテル抵抗性

エーテル感受性群と、抵抗群とにウイルスを区別することは知られている。著者も、堀田 (1956)¹⁹⁾ の方法に倣い、精製された両ウイルス 10⁻² 稀釈液に同量のエーテルを添加し、37°C 30 分間及び 40°C 24 時間保存して、マウス皮下に 0.3 ml 宛接種を行い、14 日後のマウスの病理所見により、耐性の有無を判定した。未精製の肝炎ウイルスに就ては既に時末の報告があり、精製の場合に於ては鈴木²²⁾ の報告があるが、共に抵抗性を有することが認められている。著者の実験に於ては、実験の正確を期して、エーテルとの接触後、累代を行い確めたが、両ウイルス共にマウスに対する病理学的所見は緩和されず、病変が定型的に認められた事実より、両ウイルス共に抵抗性群に属するウイルスであり、両ウイルスの鑑別にはならないことを確認するに至つた。

v) 薬剤に対する抵抗性

肝炎ウイルスが薬剤に対して強い抵抗性を示す事実は時末の実験にも詳しい。著者は精製された両ウイルスを用い、詳細に検討を行つた。

実験の方法は、時末の報告に倣い、精製した両ウイルスに 0.2% Formalin, 0.01% Marzonin, 0.2%

Carbol を夫々添加して、4°C に保存したる後、所定の時期にとり出し、マウスに接種後病理所見により判定する方法を採用した。

実験成績に見るに、之等の薬剤の添加により、5, 7, 10 日と日を経るに伴い、泉熱ウイルスの病変は漸次軽減している傾向が窺われ、12 日に於ては殆んど病理所見は認められぬまでに至る。

反之して肝炎ウイルスに於ては、12, 14 日と、病変が持続するが、21 日頃より次第に病理所見を見出すに困難を感じるに至つた。それぞれの薬剤についてこの傾向があるが、0.2% Formalin が最も強い性能を発揮し、次で 0.2% Carbol, 0.01% Marzonin が之についだ。この病理所見を総合して見るに、3 種の薬剤により、泉熱ウイルスの場合は、7~10 日で殆んど完全に不活化されるものと判断されるが、肝炎ウイルスの場合は、之等薬剤に強い抵抗性を示し、3 週間前後を要することが判明した。この場合の不活化の判定が病理所見に従つた点より、従来のウイルスと比較し、動物の生死による判定と、多少の差が生ずることは考慮に入れても、3 種の薬剤に対する抵抗性は、泉熱ウイルスでは既知のウイルスと同様に大略 7 日前後、肝炎ウイルスの場合は 20 日前後と解釈することが可能であると思料された。

vi) 紫外線照射による不活化試験

前記の薬剤不活化試験と同様に、紫外線照射を試みた上、時間毎にマウスに接種して病理所見による判定を行つた。

肝炎ウイルスに於ては、5, 10, 15, 20, 25 min. と紫外線照射を継続しても、病理所見は聊かも変化はないが、次第に 30 min., 40 min. と経過するに病変は殆んど消失する。病理変化の種類より見れば 15~20 min. の照射を蒙ることにより、ウイルスは相当の損傷を受けるものの如く、肝臓の病変殊に肝細胞障害と見られる変性乃至壊死等の所見は少くなり、軽い細胞浸潤のみが認められる。ウイルスが不活化されたか否かの点を、之等の病変のどの部分の抑制に於て評価するかは問題であるが、一応之等の細胞浸潤を含めて判定すれば、ウイルスの不活化は 30 min. 程度の照射により行われるものと推測された。

泉熱ウイルスでは、紫外線照射によりかなり早い病理所見の緩和が認められた。即ち 5 min., 10 min. でかなり強い傷害を受けるものの如く、20 min. では病変は殆んど証明されない。ウイルスの増殖は甚だ強く障害されるものと判断された。薬剤の抵抗性

の部でも認めたと、ウイルスの動物体内侵入に伴い、親和性臓器に定着増殖するために、該当臓器の反応性変化が、ウイルスの量とか、ウイルスの状態、ウイルスの条件等に支配され、諸種の反応を誘発し、炎症性変化も之れに伴うことは明かであるが、ウイルスの場合は可成りの夾雑物の混和されたことも考慮されなくてはならないので、判定が困難であるが、著者の実験では、可及的最良の条件を有する精製ウイルスを用いた点に意義をもつものと考えられたの

で、実験を行つたが、軽度の細胞浸潤はかならず、之等両ウイルスの病理所見として認められ、しかも有意な病変とも判断されるので、紫外線照射に於ては、病理所見の重要な所見として評価した。この成績より見て、肝炎ウイルスは可成り強く抵抗性を示すが、泉熱ウイルスは既知のウイルスと同様に5~10 min.の照射により殆んど不活化の状態になるものと判定され、両ウイルスの抵抗性は異なるものと判定されるに至つた。

第 4 表 紫外線照射によるウイルスの不活化試験

ウイルス	紫 外 線 照 射 時 間	肝 臓					肺 臓			脾 臓		腎 臓		
		肝細胞の変性及び壊死	肝素の解離	星細胞の腫大増生	実質、間質の細胞浸潤	小結球又は組織球の形成	間質性肺炎	胞隔炎	気ける円形細胞の浸潤	単核細胞の増殖	充血	上皮細胞の変性	間質の細胞増殖	充血及び出血
泉熱ウイルス (社株)	5 min.	+	±	±	+	±	++	+	+	+	+	++	+	+
	10 min.	±	⊥	⊥	+	⊥	+	⊥	+	⊥	⊥	+	⊥	⊥
	15 min.	⊥	⊥	⊥	±	⊥	+	⊥	⊥	⊥	⊥	±	⊥	⊥
	20 min.	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	+	⊥	±	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
	25 min.	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
肝炎ウイルス (石原株)	5 min.	++	+	+	++	++	+	++	++	+	⊥	⊥	⊥	+
	10 min.	++	+	+	++	+	+	+	+	+	⊥	⊥	⊥	+
	25 min.	++	+	+	+	+	+	+	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥
	30 min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	⊥	⊥	⊥	+
	40 min.	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	⊥	⊥	+

註：(++)~(⊥) 病変の程度を示す。

2) 精製ウイルスによる電子顕微鏡的所見

両精製ウイルスを用いて、動物の起病性及び他に重要と思われる生物学的性状の内、耐熱性、濾過性、エーテル耐性、薬剤抵抗性、紫外線照射等を行い、両ウイルスを比較検討して、異同を明かにしたが、更に電子顕微鏡により、形態学的にウイルス粒子について比較を試みた。

先づ肝炎ウイルスは前に橋本により記述された如く、孵化卵漿尿腔内のウイルス増殖の程度は優れていて、精製により殆んど大半が 35,000 r. p. m. 30 min. 遠心沈澱に移行するため、電子顕微鏡的にも、多数の小円形若しくは小楕円形のウイルス様粒子の存在を確認した。形態は殆んど様の粒子と見られ、大きさは凡そ 50 mμ 程度と推測された。多少のウイルス様粒子の間の大きさに不同があるが、一

般に形は同様であり、粒子全体が平等に隆起しているものと判断された。反之して泉熱ウイルスもまた、前者に比較して、孵化卵漿尿腔液に於けるウイルスの増殖は、動物試験の結果より判断してやや劣るようであるが、肝炎ウイルスと同様に、35,000 r. p. m. 沈澱に能率良く精製濃縮されることが認められた。

ウイルス様粒子は肝炎ウイルスと比較して見るに良く類似性を示し、小円形若しくは小楕円形であつて、同様に一様に隆起しているように認められた。計測した結果では、30~110 mμ と形状に於て差は見られるが、整つた形を示す粒子は凡そ 70 mμ と推定された。之等のウイルス様粒子が、再三の電子顕微鏡標本に於て多数集合した形で存在するが、一部では漿尿膜の細胞の腔内に脱落したと推測される細

胞に附着し、又は離脱する如き形で認められた場合もあつた。両ウイルスともに、形状に於てやや差が示されるのは、完全粒子又は不完全粒子があり、発育段階の形状も混在するものと推測された。

要するに形態学的所見に於ては、殆んど両ウイルス共に、甚だ類似した形態、大きさを示すことが指摘されるのであつて、形態による鑑別は殆んど不可能であることが判断される。

総括及び考按

肝炎ウイルスの分離及び固定を行うに当り、各種のウイルスとの鑑別は、最も重要であるが、最も類似性を示す泉熱ウイルスとの区別はなかなか容易ではない。特にマウスに対する感受性の側から見ても、両ウイルスともに発症致死しない性状は、他の Ectromelia virus と区別は出来ても、両ウイルス共にマウスに対する感染は、病理所見のみを示す不顕性感染である事実は、容易に諸性状を把握し難いことが注目され、しかも同定し難い点にも通ずるよう推測された。

かつて同学高田は同様な意図のもとに、実験を行つたが、充分な実験結果を得られなかつたので、著者は之等のウイルスの生物学的性状を明瞭に把握する目的から、先づ可及的夾雑物を含まぬ、純粹に近い状態にまでウイルスを濃縮純化した上で、各種の実験を重ねて見たいと願ひ、両ウイルスを単離に近い状態まで精製を試みた後、実験に用いた。

著者の両ウイルスに用いた精製方法では、比較的簡単に濃縮化されたので、多量のウイルス粒子を含む濃厚な浮游液を、最良の条件下に維持して実験に用いた。

之等の精製ウイルスを用いて、両ウイルスの動物に対する起病性、一般生物学的性状を検討して比較を行い、更に他方形態学的にも比較した結果を、簡単に表示するに(第5表)、両ウイルス共に甚だ類似性を示すことが指摘される。先づ動物の起病性に関しては、精製ウイルスを用いた場合、両ウイルスともによくマウスに対して感染を示すが、感染標識としては病理学的変化のみである所謂不顕性感染を惹起するが、肝炎ウイルスではその病変の発現が肝臓を中心に発現するに拘わらず、泉熱ウイルスでは寧ろ全身臓器(腎、脾、肺、肝)に病変が発現することが注目された。又肝臓の肝変化のみに局限して見ても、肝炎ウイルスの示す肝細胞障害(肝実質細胞の変性、若くは類壊死乃至壊死巣の形成等)が甚だ

第5表 両精製ウイルスの主な性状の比較

ウイルスの種類 一般諸性状	泉熱ウイルス (精製社株)	肝炎ウイルス (精製石原株)
マウスに対する病原性	マウスに対し感受性あり、腹腔、経口感染成立す、病理所見あり。	マウスに対する感受性あり、腹腔、経口感染成立す、病理所見あり。
熱に対する抵抗力	55~60°C, 30min. により不活化。	70~75°C, 30min. により、漸く不活化。
薬剤に対する抵抗力	0.2% Formalin 0.01% Marzoniin 14日以内で不活化。	0.2% Formalin 0.01% Marzoniin 3週間以上で不活化。
濾過性	Seitz E, K, 濾過	Seitz E. K. 濾過
エーテルに対する感受性	抵抗力あり。	抵抗力あり。
形態学的所見	小円形凡そ70 μ m	小円形凡そ50 μ m

著明であつて、泉熱ウイルスでは斯る病変は社株を用いた実験では稀であつた。しかしながら感染経路に就いては腹腔よりの接種により、感染の成立が見られ、更に経口感染がよく成立する等の条件は甚だよく類似する。動物の起病性に関しては、詳細に検討すれば鑑別は可能であることが示唆された。

次に一般生物学的性状の内、分離肝炎ウイルスの殊に重要な性状と注目された耐熱性、消毒薬に対する抵抗と、紫外線照射に対しての抵抗等が挙げられた。既に耐熱性に就ては、同門の鈴木、時末の実験成績があるが、慎重を期して著者も同様な実験を反覆し、泉熱ウイルスと対比したが、泉熱ウイルスが、斯る抵抗力を示さず、一般ウイルスと同様に55°Cの熱で不活化され、消毒薬に対しても、少くとも14日以内で不活化されることが判断され、更に紫外線照射に於ても、15~20 min. の照射で不活化される事実が認められ、肝炎ウイルスと明かに区別される。このような性状は、肝炎ウイルスの特性とも推測されるものである。

形態学的には、電子顕微鏡所見により比較したが、形態は殆んど類似した小円形若しくは小楕円形を呈して、大きさも、肝炎ウイルスは凡そ50 μ m、泉熱ウイルスは約70 μ m とほぼ同程度であり、鑑別の目標にはなり難いと推定された。

結 論

既に村上等により、肝炎患者材料より分離されたウイルスの性状は、詳細に検討されたが、特に泉熱

ウイルスとよく類似性を示すことが知られている。著者は橋本により試みられた超高速遠心により、ウイルスの精製純化を行つた上、分離肝炎ウイルスと泉熱ウイルスを比較し、併せてウイルス学的性状を明かにした。その結果を次の如く結論した。

1) 両ウイルスともに、橋本の超高速遠心法により、容易に、しかも能率よく精製純化された。しかも之等精製ウイルスは、マウスに対し強い起病性を示し、定型的な病変を示すが、マウスを感染致死せしめない。即ち病理所見を示すが、所謂不顕性感染を惹起する点で共通している。

2) ウイルス学的性状中、両ウイルスの著しく異なる点は、温熱に対する抵抗性、薬剤に対する抵抗性であり、分離肝炎ウイルスに於ては殊に抵抗性が強いことが指摘された。即ち温熱に対して、肝炎ウイルスは 70°~75°C 程度まで耐えるに反し、泉熱ウイルスに於ては、55°~60°C 30 min. で不活化され、薬剤に対しても、0.2% Formalin, 0.01%

Marzonin の添加によつて、不活化に 3 週間以上を要したが泉熱ウイルスでは、14日で殆んど不活化されることが病理学的所見で判断された。

3) その他紫外線照射によつても、肝炎ウイルスに於ては 40 min. 以上の照射により漸く不活化されるに拘わらず、泉熱ウイルスに於ては 5~20 min. の照射で傷害は大きく、総て不活化されることが、病理学的所見によつて認められた。之形態学的観察は、電子顕微鏡で行つたが、両ウイルスともに、小円形若くは小楕円形の凡そ 50~70 mμ 程度のウイルス様粒子として証明された。

稿を終るに当り、御指導を戴き、且つ御校閲の勞を賜つた恩師村上教授に感謝の意を表する。

参 考 文 献

- 1) Anderson, T. T. Tulinius, S.: Acta Med. Scand. 95, 497, 1938.
- 2) Findley, G.M. MacCallum, F. O. & Murgatroid, F.: Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. 32, 575, 1939.
- 3) Siede u. Meding: Klin. Wschr. 20, 1665, 1941.
- 4) Dresl, Meding, u. Weineck: Zschr. f. Imm. forsch. u. Exp. Therap. 103, 129, 1943.
- 5) Wildführ, G.: Zeitschr. f. d. Ges. inner. Med. 573, 1953.
- 6) Siede a. Luz: Handbuch. d. inn. Med. III/2, 711, 1953 (Mohr & Stachelin. Berlin)
- 7) Essen u. Lembke: Zbl. f. Bact. 159, 1953.
- 8) Henle, W.: J. Exp. Med. 92, 271, 1950.
- 9) 荒川, 多ヶ谷: 日本医学, 3407, 146, 1946.
- 10) 木村, 堀田: 東京医事新誌, 66, 307, 1949.
- 11) 荒川等: 第 5, 6 回日本ウイルス学会講演要旨, 1957~1958.
- 12) 村岡: 日本細菌学会雑誌, 第13巻, 4号, 1958.
- 13) 村上等: 肝炎シンポジウム.
- 14) Havens: J. A. M. A. 134, 653, 1947.
- 15) 小笠原: 岡山医学会雑誌, 第70巻, 第7号, 1958.
- 16) 高田: 岡山医学会雑誌, 第69巻, 11号, 1957.
- 17) 松浦: 岡山医学会雑誌, 第69巻, 12号, 1957.
- 18) 大日方: 岡山医学会雑誌, 岡山医学会, 第62回総会, 3, 4 回泉熱協議会.
- 19) 堀田 第 4 回日本ウイルス学会総会講演要旨.
- 20) 時末: 岡山医学会雑誌, 第69巻, 第4号, 1957.
- 21) 俵: 岡山医学会雑誌, 掲載予定.
- 22) 橋本: 岡山医学会雑誌, 第70巻, 第7号, 1958.
- 23) 伊藤: 岡山医学会雑誌, 第71巻, 3の1号.
- 24) 浅木: 岡山医学会雑誌, 第71巻, 5の2号, 掲載予定.
- 25) 鈴木: 岡山医学会雑誌, 掲載予定.
- 26) 津田 岡山医学会雑誌, 掲載予定.

Studies on the Purified Heratitis Virus
Part I Comparative Studies on Virological Properties with
IZUMI Fever Virus

By

Tetsuro TSUDA

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

MURAKAMI and his collaborator had reported already the properties of the hepatitis virus isolated from hepatitis patient in detail, and they pointed out some similarity of the virus with the IZUMI fever virus. The author obtained both viruses in purified form by means of ultracentrifuge, and carried out further investigation on the virological properties of these viruses. The following results were obtained.

1) It was confirmed that both viruses could be obtainable easily and efficiently in purified form by means of ultracentrifuge, and showed powerful pathogenicity to mouse capable of inducing the typical pathological changes by infection; however, the infection of either virus did not render the lethal effect and was detectable as latent infection in that only the pathological findings were informative. And by the electronmicroscopical study, both viruses were observed in minute round or oval form whose diameter was 50—70 m μ .

2) From the viewpoint of the virological properties, both viruses were much different in the resistance to heat and disinfectant: the purified hepatitis virus could stand against heating at 70°—75°C and against the action of disinfectant, 0.2% formalin or 0.01% marzolin, for less than 3 weeks; on the other hand the IZUMI fever virus was inactivated by heating 55°—60°C for 30 min. or by action of the disinfectant for 2 weeks.

3) By the irradiation of ultraviolet rays, it is needed to inactivate the purified hepatitis virus for 40 min. irradiation, but in the case of IZUMI fever virus it was completely inactivated by only 5—20 min. irradiation.
