

精製肝炎ウイルスに関する研究

第 2 編

精製ウイルスの比較研究殊に泉熱ウイルス との血清学的性状の比較

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

先に第 1 編に於て、肝炎ウイルスと泉熱ウイルスを、橋本 (1958)¹⁾の方法で精製濃縮を行い、一般生物学的性状中殊に重要と思われる耐熱性、薬剤抵抗性、又は形態学的観察を試み、ウイルスの類似性に就て論議したが、更に血清学的性状を吟味する目的から、免疫学的諸反応を行い両精製ウイルスの性状を詳細に比較検討を重ねた。

既に肝炎ウイルスの血清学的性状については、村上等 (1955~1957)²⁾³⁾⁴⁾の研究以来、報告され、精製ウイルスを用いた実験もまた同僚浅木⁵⁾により詳細に報告された。その成績より見るに、精製ウイルスを抗原とした場合の補体結合反応には優れた抗体価を証明し得、患者血清に対しても、認むべき抗体の証明が見られ、患者との関連性が窺われたが、他の中和試験及び *Absättigungsversuch* (Wildführ G.) 等の方法では、中和の傾向は窺われたが、他の既知ウイルスに見られる如き納得すべき点が得られなかつたと報告している。

他に泉熱ウイルスに於ても、いまだ血清学的性状が明かでない⁷⁾、ウイルスの分類上の位置も判然としていないようである。同門高田 (1957)⁸⁾も既に実験を試みたが、有意な結果は少い。

以上両ウイルスの血清学的性状が判明しない理由は、実験動物に対して、感染発症致死が惹起しないので、総て病理所見が見られるだけの不顕性感染を示すことが、従来のウイルスの免疫反応に示された明瞭な中和形式と同一視することが困難であることが挙げられた。更に肝炎ウイルスの一般生物学的性状が甚だ特異的であるために、既知のウイルスと同様に評価出来ない等の事実は注目されるのであつて、

血清学的性状を具さに知るためには、類似の性格をもつ 2 種類のウイルスを組合せ、一方のウイルスの性状を明瞭に確めておき、他方のウイルスの性格を、比較しながら異同を明かにし、血清学的研究の確実な標識を作り、夫々のウイルスの特質を知る方法により、検討を試みた。

実験材料及び方法

i) 実験に用いたウイルス・第 1 編と同様に、肝炎ウイルスは、教室保存の石原、小川、野田、丹原、古川、春名等の諸株であつて、いずれも患者材料より孵化鶏卵の累代若くはマウスの累代により分離され、引続いて累代中のものであり、生物学的性状及び血清学的性状も、総て同一の性格をもつウイルスであることが確かめられている。

又泉熱ウイルスは、大日方により泉熱患者より分離された社株であつて、累代中であるが、同僚高田⁸⁾は北里研究所笠原四郎博士より分譲を受けた三井株と比較研究を行い、同一の性状をもつウイルスと推測すべき結果を得ているので、当教室保存中の社株を、更に累代して確かめて用いた。

ii) 感染及び累代：第 1 編の記載と同様に行い、孵化卵累代により保存された。

iii) 補体結合反應用抗原の調製・先に浅木の行つたウイルス精製浮游液を用いた。又泉熱ウイルスに於ても同様の精製要領で、確実にしかも能率よく精製純化される事実を確認しているので、同一の精製を行つた。即ち孵化卵漿尿腔内に両ウイルスを接種して感染せしめ、7~10日の後孵化鶏卵の漿尿腔液を、多数の卵より集め pool した後、雑菌の混入なきを確かめて橋本¹⁾の方法で精製を行い、精製ウイルスを得た。なお抗原として使用するに当

つては、マーゾニンを10,000倍の割に添加して、4°Cに1週間保存して、不活化したものをを用いた。

iv) 抗血清の製造： 之等精製ウイルスの抗血清を得るには、家兎を用意しておき、35,000 r. p. m. 沈渣を30.0 mlの生理的食塩水に浮遊せしめ、0.5 ml, 0.6 ml, 0.7 mlと3日おきに腹腔内に注射し、引続き0.5 ml, 1.0 ml, 1.5 mlと漸次増量して耳静脈内に接種して免疫を行い、3日間隔10数回接種し、最後の注射より、3週間を経て心臓穿孔により採血、免疫血清を分離して用いた。

v) 補体結合反応の術式： 補体結合反応の術式はアメリカ陸軍軍医学校法に倣つた。即ち倍数希釈した抗血清、若くは患者血清を0.25 mlに、等量の4単位の抗原及び2充単位の補体0.5 mlを添加してよく混和した後、1夜氷室に保存し、次で30分間室温に放置して、溶血系0.5 ml (3%綿羊赤血球を3単位の溶血系で感作した血球浮遊液)を加え、よく振盪混和後37°C浴槽内に30分反応させて結果を判定した。

中和試験の判定： 中和試験の術式も、当教室の浅木の法に倣つた。即ち夫々の精製ウイルス希釈液に、夫々の抗血清を添加し、37°C 孵卵器内に所要時間放置した後(実験に応じて時間を24時間まで延長したこともある)予め用意したマウス腹腔内に0.25 ml宛接種し、14日後に屠殺、夫々の臓器をとり、ホルマリンにより固定して病理標本作製した。之等両ウイルスともに、精製純化した場合でも、マウスの発症致死は認められぬので、中和試験の判定には、厳密に対照をおき、肝臓を中心とする病理所見に従つた。

Absättigungsversuch. 肝炎ウイルスの血清学的研究に用いられた一種の中和試験であるが、実験の都合上、Wildführ (1953)の方法を改変して行つた。

即ち抗血清0.25 ml宛30分おき2回皮下接種し、4時間後に、精製ウイルスの各希釈液を、腹腔内に0.25 ml宛接種攻撃し、2週間後において、屠殺後、夫々の臓器より、病理標本作製して、病理学的所見を検し、中和効果を判定した。

実 験 成 績

1. 補体結合反応による成績

先に伝染性肝炎患者より分離したウイルスを用い、肝炎恢復患者血清及び分離ウイルス免疫血清との間に行つた補体結合反応に於て、有意な結果を得¹⁾、更に精製肝炎ウイルスを抗原として使用した補体結

合反応に於ても、確実な成績が得られた。

著者も同様の実験方法により、泉熱ウイルス社株を孵卵漿尿腔内に接種し、同様の精製を行い、ウイルスの精製純化を試み、抗原としての価値を検討した。

先づ精製過程に於ける各分劃即ち4,000 r. p. m., 10,000 r. p. m., 35,000 r. p. m.の遠心沈澱より得た分劃を抗原として用いた。之等の分劃の内、4,000 r. p. m.遠心分劃を抗原とした時には、軽度ながらも抗補体作用が示されるが、血清希釈1:4~1:16と夫々抗原価は低いが発現している。次に10,000 r. p. m. 30 min.分劃を用いるに、抗補体作用は全く認められず、抗原価もまた1:4~1:64とやや上昇した価が示されるが、血清希釈1:10に於て抗原価1:64, 1:20希釈では1:16, 1:40希釈に於て1:8, 1:80では1:8と血清希釈に伴う抗原価の漸減はあるが、一応確実に示されているのが注目された。最後の35,000 r. p. m.分劃を抗原とする場合は、前の分劃と同様に抗原が、精製した上清液として得られぬため、遠心沈澱により得た沈渣を、少許りの食塩水に更に浮遊して平等な抗原液を得た。実験に際して斯るウイルス浮遊液をもとの原液まで食塩水により置換え、更に抗原希釈を行つた。補体結合反応を行つた結果、本分劃に於ても抗補体作用は全く認められず、抗原の希釈域の1:4~1:64と夫々に確実抗原価が得られている。血清の夫々の希釈に於ては1:10に於て1:64, 1:20に於て1:32, 1:40に於て1:8, 1:80に於ても1:16と、反応価を保つことが認められた (Fig. 1)。

この実験によつて、ウイルス感染孵卵漿尿腔液より、精製ウイルスを得るまでの過程における分劃によつては、10,000 r. p. m.の遠心分劃を用いても可成りに使用に耐え得る抗原を得ることが明らかであることが判明したが、35,000 r. p. m.の分劃を抗原として用いるに、なお一層の有意な成績が得られることを確認した。

次に以上3種の分劃中、10,000 r. p. m. 30 min.上清及び35,000 r. p. m.沈渣浮遊液が、補体結合反応抗原として用いられることを知つたので、同様に家兎免疫血清を使用し、抗原及び血清の希釈域を知るとともに、抗補体作用若くは非特異性反応の発現の有無を再三検討した。

本実験に於ても、10,000 r. p. m. 30 min.処理上清は抗原的価値を有し、血清の希釈に応じ、夫々抗原価は1:64, 1:16, 1:8, 1:8それぞれ抗原性

Fig. 1 Antigen titer of each fraction in the purification of antigen.

Nature of antigen	Dilution of immune rabbit Serum	Antigen dilution								
		Virus antigen (Yashiro-strain)						Control antigen		
		4	8	16	32	64	128	4	8	16
Crude Suspension (4,000 r. p. m. 20min.)	1:10	4	4	4	2	1	0	3	0	0
	1:20	4	4	4	3	0	0	0	0	0
	1:40	4	4	0	0	0	0	0	0	0
	1:80	4	2	0	0	0	0	0	0	0
Centrifuged (10,000 r. p. m. 30min.)	1:10	4	4	4	4	4	0	0	0	0
	1:20	4	4	4	3	1	0	0	0	0
	1:40	4	4	2	1	0	0	0	0	0
	1:80	4	2	2	0	0	0	0	0	0
Centrifuged (35,000 r. p. m. 30min.)	1:10	4	4	4	4	4	2	0	0	0
	1:20	4	4	4	4	0	0	0	0	0
	1:40	4	4	2	0	0	0	0	0	0
	1:80	4	4	1	0	0	0	0	0	0

Note: 4 Complete fixation
 3.2 proportionately lesser fixation
 0 Complete haemolysis

を發揮している。又 35,000 r. p. m. 沈渣もまた食塩水で稀釈されるが、抗原価は 1:128, 1:32, 1:16, 1:16 と夫々有意の成績であつて、夫々の抗原の Optimal dilution は 8~16 倍を示している。之等の各実験に於て、非特異的の反応とか、血清高濃度部分に於て、溶出反応を呈する所謂 Zone phenomenon の如き現象は認められなかつた (Fig. 2)。

次に之等の実験と平行して、先に村上等により分離された肝炎ウイルスを精製して、同様の家兎免疫血清を用意しておき、泉熱ウイルスと交叉的に補体結合反応を行い、両ウイルスを比較した。

肝炎ウイルス小川株 35,000 r. p. m. 分割を抗原とした場合、先に浅木の報告にも示されたがよく反応し、同種抗血清に於ては血清稀釈に応じ 1:128, 1:32, 1:8, 1:4 と示され、同種の石原株血清にも、1:64, 1:16, 1:16, 1:4 と確実に抗原価が認められ、同種のウイルスと判断され、新に仙石²¹⁾により分離された春名株血清に対しても 1:32, 1:16, 1:8, 1:4 と、殆んど遜色のない程度の反応を示している。

反之して、泉熱ウイルス (社株) の免疫血清に対しては、全く反応を示さず、陰性に終つた (Fig. 3)。

同様な形式のもとに、石原株を抗原として用いた実験でも、同種石原株血清に 1:256, 小川株に 1:

Fig. 2 Antigen titer of each fraction obtained in the purification of antigen (Yashiro strain)

Antigen		Immun serum of rabbits				Normal antigen			
Fraction	Dilution					Serum dilution			
		10	20	40	80	10	20	40	80
10,000 r. p. m. 30min. Supernatant	1:4	4	4	4	4	0	0	0	0
	1:8	4	4	4	4	0	0	0	0
	1:16	4	4	3	1	0	0	0	0
	1:32	4	3	2	0	0	0	0	0
	1:64	4	1	1	0	0	0	0	0
	1:128	1	1	1	0	0	0	0	0
35,000 r. p. m. 30min. Sediment.	1:4	4	4	4	4	0	0	0	0
	1:8	4	4	4	4	0	0	0	0
	1:16	4	4	4	4	0	0	0	0
	1:32	4	4	1	0	0	0	0	0
	1:64	4	2	0	0	0	0	0	0
	1:128	4	1	0	0	0	0	0	0

128 と強い抗原価を示し、春名株に於ても 1:64 と殆んど大差のない程度の反応を示しているに拘わらず、社株に於ては全く陰性に終つてることが確認された (Fig. 4)。

Ishihara (hepatitis virus) (35,000 r. p. m. sediment)	1:10	0	0	0	0	0	0
	1:20	0	0	0	0	0	0
	1:40	0	0	0	0	0	0
	1:80	0	0	0	0	0	0
Haruna (hepatitis virus) (35,000 r. p. m. sediment)	1:10	0	0				
	1:20	0	0				
	1:40	0	0				
	1:80	0	0				
Ectromelia virus (crude suspension)	1:10	2	1	1	0	2	0
	1:20	2	0	0	0	1	0
	1:40	0	0	0	0	0	0
	1:80	0	0	0	0	0	0

ただ表示した患者血清には、肝炎患者血清の殆んどは慢性に経過した患者の恢復血清若しくは臨床所見及び臨床検査の結果疑わしいと診定された血清も含み、決して適当な血清ではなく、泉熱患者血清も、散発例であつて、臨床家に依頼して採血した血清であるので、補体結合反応に適した血清でないことは遺憾であるが、適当な血清を得難い状態にあつたので、やむを得ず、参考までに実験を行つた。

実験の結果では、肝炎患者血清に対して、肝炎ウイルス石原株の精製ウイルスを抗原とした場合、低い陽性結果を示した例があつたが、社株には反応せず、泉熱患者血清にこれも低いながらも陽性結果を示すことが認められた。之等の成績はかならずしも、よい成績ではないが、可成りの結果を得られるように推測されたが、なお多くの例数を用いて検討する必要があると判断された (Fig. 6)。

Fig. 6 C. F. T. using patients serum and purified of antigen.

Antigen	Dilution of serum	Yashiro strain							Ishihara strain						Control antigen		
		2	4	8	16	32	64	128	2	4	8	16	32	64	2	4	
Patient serum	Weeks after on set																
	1. Mizushima (he.)	5	0	0	0	0	0	0	0	4	3	1	0	0	0	0	0
	1. Osaki (he.)	20	0	0	0	0	0	0	0	3	1	1	0	0	0	0	0
	1. Makiishi (he.)	16	0	0	0	0	0	0	0	4	4	3	0	0	0	0	0
	1. Oda (he.)	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1. Baba (he.)	13	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
	1. Takayama (he.)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1. No. 1 (Iz.)	1	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1. No. 2 (Iz.)	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1. No. 3 (Iz.)	1	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1. No. 4 (Iz.)	1	4	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1. No. 1 (N.S.)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1. No. 2 (N.S.)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Note : he. = hepatitis serum Iz = Izumifever serum N. S. = Normal serum

小 括 及 び 考 按

岡山県下に発生した流行性肝炎患者材料を用い、孵化鶏卵培養を行い、一種のウイルスの分離に成功した村上等 (1955~1958) は、本ウイルスの一般性

状を詳細に追究し、従来 Havens (1947)¹⁸⁾ の人体実験により推定された肝炎ウイルスの性状とよく類似した性状を具備することを認めた。

爾来、本ウイルスの性状を更に検討する意味から、血清学的性状についても実験を重ねた結果、同門橋

本はウイルスの精製に就て十分な成果を挙げ、この精製ウイルスを抗原として用いるに、補体結合反応に於て有意な成績が得られることは、浅木が詳細に報告した。

著者はかつて高田が本ウイルスと泉熱ウイルスとの比較研究を行つた成績を、更に詳細に検討する意味から、橋本のウイルス精製法に倣い、両ウイルスを精製純化して、補体結合反应用抗原としての価値を窺い、併せて両ウイルスの性状を詳細に吟味すべく試みた。

既に浅木の報告に示されたが、前記流行性肝炎の血清学的研究は、未だ確認されたウイルスがない現状では、報告は乏しい。ただ各研究者により、夫々に分離されたウイルスを用いた血清学的研究としては、Henle et al(1950)¹²⁾¹³⁾、Wildführ G.(1953)⁶⁾、村岡(1958)¹⁴⁾等の報告があるが、之等の報告に於て、用いられたウイルスの性状は、夫々異つた性状をもつことが推測され、いずれが肝炎ウイルスとも判断されない憾があり、しかも之等の研究成績が、一様な結果を得ていない点に就ても、未だ論議すべき余地が残つている。

況して県下に発生した流行性肝炎の蔓延状況に於ては、次第に病状は急性経過より慢性経過を辿るものが時に増加し、臨床診断によつては、ますます診断を困難ならしめる事態に至つているので、確実な血清学的診断法の確立は急務であることは、十分に納得されるのである。

又一方泉熱ウイルスに就ても、ウイルス学的研究は多数の先入¹⁰⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾により行われたに拘わらず、血清学的研究は充分に行われず、真の病原ウイルスに就ての論議は未だに行われていない現況である。

著者は村上等の報告に従い、分離ウイルスを橋本の方法で精製し、補体結合反应用抗原として用いられると述べた浅木の所見に倣い、補体結合反応を行うと同時に、類似の性状を有する泉熱ウイルスの血清学的研究を行う段階として、同様な精製法を応用し、十分に補体結合用抗原としての価値を認めたので、両ウイルスを用い交叉的に補体結合反応を行つた。

実験の結果、夫々のウイルス家兔免疫血清に対する補体結合反応に於ては、両ウイルスの精製純化されたものを抗原として使用するに、よく使用に耐え得ることが明かとなり、補体結合反応に於て、両ウイルスは容易に区別され、夫々に独立したウイルスであることが推測される所見を得た。

又夫々肝炎及び泉熱患者血清を用いた実験では、未だ例数が少く、十分な結論が得られなかつたが、僅少な例数ながら可成りの結果が得られた。これ等の所見は決して満足すべきものではないが、両種の疾病ともに、定型的な発病を招来したとは言い切れない患者血清を用いたために、特に肝炎恢復血清では、慢性例が殆んどであつて、従来藤原、浅木の補体結合反応の成績でも、慢性肝炎患者血清に於ては十分な成績が得られない結果を見ても、満足すべき肝炎血清とは言えない。又泉熱患者もまた、散发例であり、定型的な発病と診定出来ないものであつたので、有意な所見が得られぬものと推測された。

元来両疾患ともに、ウイルス学的若くは血清学的にも、種々異論があり、たとえウイルスが共に分離されたとしても、血清学的性状、就中疾病に罹患後に於ける抗体の消長とか、抗体の形成等に関しては、詳細に吟味する必要があると思われるが、著者の補体結合反応の成績は、寧ろ精製純化されたウイルスを抗原として用い、類似して2種のウイルスの、補体結合反応に一応使用せられ得ることが明かであり、補体結合反応に於ける詳細な検討とか、血清学的な面に於ける技術的な要素等に関しては、更に克明な追究が必要であることは言を俟たない。

なお、村岡¹⁴⁾の報告によれば、自ら分離されたウイルスを用いた補体結合反応を行つて、効果を挙げているが、著者の行つた実験と比較して、ウイルスの一般性状若くは補体結合反応に就ても幾分の差があり、一様に評価することは出来ないものと推測された。

2. 中和試験における成績

村上等は、流行性肝炎患者よりの分離ウイルスを用いて、中和試験を行い報告している。その術式は、従来他のウイルスに於て行われた動物の生死による判定が出来ないので、専ら病理学的所見により、中和効果を判定する方法によつている。之の術式は更に追究され⁵⁾¹¹⁾、詳細に検討されている。

泉熱ウイルスに就ても笠原¹⁰⁾の同様な研究があつて、同様な中和効果の判定を試みている。

著者は先の浅木の方法に倣い、両ウイルスの中和実験を平行して行い、夫々の中和現象を病理所見によつて評価し、更に交叉的中和反応を行うことにより、夫々のウイルスの中和試験に於ける差異を窺つた。

実験に用いた家兔免疫血清は、前記補体結合反応に用いた、精製ウイルスによる免疫血清を使用した。

肝炎ウイルス抗血清は 1:256, 泉熱ウイルス血清 1:64 の抗原価を示すものであり, 夫々 3~4 頭の家兎血清を混和して用いた。

実験に用いた精製ウイルスは, 超高速遠心沈澱法により精製純化された 35,000 r. p. m. 沈澱を, 少許の食塩水で稀釈を行い, 更に倍数稀釈を重ねたものである。

以上稀釈されたウイルス液に同量の抗血清を添加後, 孵籠中に 2 時間静置した後接種した群と, 24 時間冷庫 (4°C) に放置し, 十分に接触せしめた後接種した群とに分ちて, 夫々に病変を判定することにした。

病変の判定に際しては, 嚴重に対照を附して病変を窺い, その病変の種類, 程度に応じて, 中和の進行を比較検討した。肝炎ウイルスに於ては特に肝臓の病変に注目した。即ち実質細胞の変性及び壊死, 壊死巣周辺に於ける細胞変化, 星細胞の肥大及び増生, 肝索の解離, 実質及び間質の細胞浸潤等があり, これに伴う肺臓の病変が挙げられた。

泉熱ウイルスに於ては, 既に第 1 編に述べた病変であるが, 前記の肝炎ウイルスの病変と比較して, 肝, 脾, 腎, 肺等の各種の臓器に病変が存在したが, 肝臓だけに限局して見れば, 肝臓によく病変を發揮する肝炎ウイルスの所見が高度であることが指摘された。

先づ泉熱ウイルス社株抗血清に対する同種社株ウイルスとの組合せで行つた実験では, 2 時間処置の場合でも可成りの病変の阻止が認められるが, 稀にウイルス稀釈域に於ては, 軽度の病理所見が示された例が認められた。更に 24 時間処置して行つた実験では, 病変は著しく緩和され, 抑制された傾向があり, 中和効果が明かに認められた。之等の実験に於て, 時に稀釈域が 10⁻¹~10⁻⁴ の限界に於て, 軽度の細胞浸潤が示されることがあつた。このような判定に於ては, 数回同様な所見を得ることが重要と考えたので, 同様な実験を反覆して判定した。之等の実験結果では, 一部分の中和効果が見られるに止る例があつたが, 一般に社株免疫血清を用いれば, 病変の軽減或は緩和がある事実があるので, 中和効果と判定して大過なきものと推測された。反之して肝炎ウイルス株として用いた小川, 石原, 春名の諸抗血清に対して中和が全く認められず, 部分によつては寧ろ病変が高度になり, 対照とした健康血清に対すると同様な結果を認めた。既に補体結合反応に於て, 再三の実験を反覆した結果全くの関連性がな

Fig. 7 Neutralization test.

Immune serum	Hours of treatment	Virus dilution (Yashiro)							
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Yashiro (Izumi-fever)	2hrs.	⊥	+	⊥	⊥	±	+	⊥	⊥
	24hrs.	±	±	±	±	⊥	⊥	±	⊥
Ogawa (Hepatitis)	2hrs.	++	+	+	++	+++	++	++	+
	24hrs.	++	+	+	+	+++	+++	++	+
Ishihara (Hepatitis)	2hrs.	++	+	+	++	++	++	++	+
	24hrs.	+	+	++	++	++	++	+++	++
Haruna (Hepatitis)	2hrs.	++	+	+	++	++	++	++	+
	24hrs.	+	+	+	++	++	++	++	+
Control	2hrs.	++	+	+	+	++	++	++	++
	24hrs.	++	+	+	++	++	++	++	++

Note: (++)~(+) Indicate the degree of pathological change (average of 4~5 mice)

Fig. 8 Neutralization test.

Immune serum	Hours of treatment	Virus dilution (Ogawa)							
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Ogawa (Hepatitis)	2hrs.	⊥	⊥	⊥	⊥	±	⊥	⊥	⊥
	24hrs.	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
Ishihara (Hepatitis)	2hrs.	⊥	⊥	±	±	±	⊥	⊥	⊥
	24hrs.	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
Haruna (Hepatitis)	2hrs.	±	⊥	⊥	±	⊥	⊥	⊥	±
	24hrs.	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	±	⊥	⊥
Yashiro (Izumi-fever)	2hrs.	++	++	++	+	++	+++	+++	++
	24hrs.	+	+	+	+	+	++	+++	+++
Control	2hrs.	+	+	+	++	++	++	+	+
	24hrs.	+	+	+	++	++	++	++	+

Note: (++)~(⊥) Indicate the degree of pathological change (average of 4~5 mice)

かつたが、中和実験に於ても、関連は示されず、中和効果はないものと判定された (Fig. 7).

次に分離肝炎ウイルス小川株を用いて、夫々の家兔免疫血清との中和試験を行つた。肝炎ウイルスと抗血清との間の中和試験に於ては、同門浅木の成績と同様に、病理所見は殆んど緩和若くは抑制が見られ、中和効果が示された。同種の春名、石原両株の抗血清に於ても、殆んど完全な形まで中和が進行しているが、泉熱ウイルス抗血清に於ては、之等の中和傾向は窺うことが出来ない (Fig. 8).

小 括 及 び 考 按

中和試験が、既に従来のウイルスの固定若くはウイルス性疾患の診断に応用されているが、その目的は、ウイルスと抗血清との接触により、中和抗体の証明するにあつた。

斯る中和試験の術式は、殆んどウイルスと抗血清を一定時間試験管内に於て接触せしめておき、動物体内に接種し、動物の生死により、特異な中和抗体の産生を証明する法が採用された。若し動物の生死では判定出来ずに終る場合は、かつて泉熱ウイルスの中和試験に於ける笠原 (1953)¹⁰⁾ の如く、病理変化によつて、中和効果を判読する方法も行われた。

村上等の業績に於ては、分離肝炎ウイルスがマウスに強い病理所見を示すに拘わらず、等しく不顕性感染に終るため、中和試験の判定は、前記笠原の病理所見による方法を採用する外なかつた。著者は実験に用いた両精製ウイルスともに、動物に接種するに、不顕性感染を示し、病理変化のみ定型的に認められるので、病理所見による判定方法を行つた。之等の中和試験の術式は勿論討議すべきことではあるが、動物の生死による判定と比較して、判定の困難性、若しくは難点を多分にもつことは否定出来ない。

著者の実験では、実験の条件として、可及的多数の対照を附すること、同様な実験を再三行い、実験成績を総合判定すること、等を考慮して実験を重ねた。

之等の所見で見ると、泉熱ウイルスでは同種抗血清に、肝炎ウイルスでは、肝炎ウイルス抗血清に夫々よく中和され、病理変化の抑制がよく認められた。ただ判定の時間を2時間、24時間に保つた場合、2時間では多少とも病理所見が認められるものでも、24時間では病変の抑制が認められた例があり、24時間でも殆んど2時間の抑制と異らぬ例があり、成績

が一樣でない場合も示された。夫々の場合、ウイルスと抗血清との接触により、充分な両者の結合が行われる場合もあり、24時間に於て漸く均等な結合が行われる場合も想像出来るが、長時間の両者の接触では、ウイルスへの影響も考えられるので、ウイルスと抗血清との接触時間に就ては速断することは出来ない。

以上を総合して、精製泉熱ウイルス及び肝炎ウイルスを用いた場合に於ても、動物の生死による中和試験の判定は不可能なので、専ら病理所見の抑制の程度による判定を行つたのであるが、家兔抗血清による中和試験の結果より見て、容易に、しかも、有意な鑑別が可能であり、両ウイルスともに夫々独立したウイルスであることが証明された。ただ之等の中和効果の判定に関しては、ウイルスの稀釈域に於ては、軽度の病変が発現する例があり、又ウイルスの高度稀釈域 (10^{-6} ~ 10^{-9}) で病変が残存する等の例があつて、納得出来ない clear cut の状態でない部分も指摘されたが、之等の病変は夫々対照例と比較して明瞭に区分された。

3. “Absättigungsversuch” の成績

Wildführ G. (1953) の創案にかかる本法は、広義の中和試験に外ならないが、ウイルスと抗血清の結合が、動物体内で行われことに特異性があり、従来の中和試験と異なることが指摘された。Wildführの原法に於ては、Goldhamster を用いて、動物の生死を長期間観察して、判定する方法を用い、分離した肝炎ウイルスの型別を証明している。

村上等は、斯る Wildführ の原法を改良して、ウイルスの性状、感受性動物の選択等に就て、都合良い変法を試みた。ウイルスによる動物の発症及び斃死例が認められず、Goldhamster の容易に入手し難い事実があるためである。

著者は先の浅木の報告に倣い、泉熱社株精製ウイルスを用い、中和試験と同様に、社株抗血清 (補体結合反応による抗原価 1:64) を動物体内に注射後、精製ウイルスを接種し、両者を動物体内で十分に接触せしめ、飽和の状態で維持し、爾後の動物の生死によらず、14日後に於ける病理所見により、中和の効果を確かめた。

先づ社株抗血清をマウス体内に処置し、稀釈した精製ウイルスを用いて攻撃を行つた成績に於ては、可成りの程度に病変の抑制が示された。一部のには、稀釈域に軽度の病変が発現する。之等の病変は、精製ウイルスを用いた実験であるため、組織成分若く

は細胞産生物質の混在による影響は少いと考えられるので、軽度の感染はあつたことを意味する。補体結合反応に於て、ある程度の抗体が産生されている事実があるので、寧ろこの実験成績では、体内に於けるウイルスと抗体との結合が充分でなかつたことを意味するもので、十分な所見とはいひ難い。肝炎ウイルス抗血清としては、石原、小川、春名株血清を用いたが、病変の抑制は全く認められず、対照と同様に、明瞭な病理所見が示された。

この実験成績より、社株と肝炎ウイルスの諸株との、飽和試験に於ては、一応病理所見の上では、病変の緩和若くは抑制という面より、中和現象が判定されたが、詳細に病理所見を吟味すれば、泉熱ウイルス対抗血清の間に於て、病変が完全に抑制される所謂完全に中和されたと結論するには、多少の軽度の病変が残存することより、納得出来ない部分があるが、両ウイルスの本質的な差異は認められることが推測された (Fig. 9)。

Fig. 9 Absättigungsversuch (1)

Immun serum (Rabbits)	C. F. T. (Titer)	Neutralization test	Virus dilution (Yashiro)							
			10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9
Yashiro-immun serum (Rabbits)	1 : 64	+	±	⊥	⊥	⊥	⊥	±	⊥	⊥
Ogawa-immun serum (Rabbits)	—	—	⊥	+	+	+	+	⊥	⊥	⊥
Ishihara-immun serum (Rabbits)	—	—	⊥	+	+	⊥	⊥	+	+	+
Haruna-immun serum (Rabbits)	—	—	⊥	+	+	+	+	⊥	⊥	⊥
Control normal serum (Rabbits)	—	—	⊥	⊥	⊥	+	+	⊥	⊥	⊥

Note : (⊥)~(⊥) Indicate the degree of histopathological change (average of 4~5 mice)

同様な“Absättigungsversuch”を、社株を用いて免疫した海狸、マウスの抗血清と、精製ウイルスとの組合せで試みた。社株を接種する場合、海狸及びマウスに確実な病理所見を示すことは、かつて大日方の成績にも詳しいが、之等動物抗血清に於ては、先の家兎抗血清の成績と比較して、病理変化の抑制は著しく弱く、従つて中和効果は甚だ少いものと判定された。本実験に於ても痛感されたことは、家兎

抗血清の如く、比較的補体結合反応に於て抗体価の高い場合は判定も比較的容易であるが、海狸又はマウス血清の如く、抗体価の低い例では、病理所見に於ける中和効果の判定は甚だ困難であることが指摘された。この所見はかつて俵¹⁰⁾、又は藤原¹¹⁾の患者例について得られた成績とよく一致するものである (Fig. 10)。

Fig. 10 Absättigungsversuch (2)

Immun serum	C. F. T. (Titer)	Neutralization test	Virus dilution (Yashiro)							
			10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9
Immun-serum (Rabbits)	1 : 64	+	⊥	⊥	⊥	⊥	±	⊥	⊥	⊥
Immun-serum (Guinea pig) No. 1	1 : 8	—	⊥	+	±	±	+	+	+	+
Immun-serum (Guinea pig) No. 2	1 : 16	±	+	+	+	+	+	⊥	+	+
Immun-serum (Mice)	1 : 16	—	+	+	+	+	⊥	+	+	+
Normal serum (Guinea pig)	—	—	⊥	+	+	+	+	⊥	⊥	⊥

Note : (⊥)~(⊥) Indicate the degree of histopathological change (average of 4~5 mice)

なお、肝炎ウイルス小川株を用いた夫々の抗血清との組合せでは、肝炎ウイルスの諸株小川、石原、春名株血清との飽和試験で、同種小川株抗血清の間にも、多少の病変が残り、石原、春名株抗血清との

間にも病変が軽度に認められる事実があつて、軽度の感染のあつたことを示すが、病変の程度より、一応肝炎ウイルスの諸株は、夫々抗原性を共有し、一様に中和効果があつたことを示唆した (Fig. 11)。

Fig. 11 Absättigungsversuch (3)

Immun-serum (Rabbits)	C. F. T. (Titer)	Neutralization test	Virus dilution (Ogawa)							
			10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9
Hepatitis-serum (Ogawa)	1 : 128	+	⊥	⊥	⊥	⊥	±	⊥	⊥	⊥
Hepatitis serum (Ishihara)	1 : 128	+	+	+	±	±	⊥	⊥	⊥	⊥
Hepatitis Serum (Haruna)	1 : 128	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	+	⊥	⊥
Izumi-fever serum (Yashiro)	—	—	⊕	+	+	+	⊕	⊕	⊕	⊕
Normal-serum (Control)	—	—	⊕	+	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕

Note : (⊕)~(⊥) Indicate the degree of histopathological change (average of 4~5 Mice)

小 括 及 び 考 按

Wildführ (1953) の原法に倣い、中和試験と平行して、泉熱ウイルス社株と、肝炎ウイルス各株間との間の“Absättigungsversuch”を試みた。

著者の実験では、之等の中和形式では、ウイルスの動物接種による生死が判読されぬ憾があつて、やむなく病理所見により判定する方法による外なかつた。

斯る病理所見の緩和若くは抑制による、中和効果の判定には、動物の生死による判定ほど明確ではない。著者の実験で示した如く、抗体の形成が可成り高い場合は、病理変化の発現が、ある程度に抑制され、可成り中和効果を発揮したと推測される所見を得ることも少くないが、抗体の形成が極めて少い場合は、病変の上で、中和効果と推測するに甚だ困難である。従つて“Absättigungsversuch”に於ける病理所見では、寧ろ完全なる中和効果は望み難いものと判断された。

結 論

村上等により肝炎患者材料より分離された肝炎ウイルスの報告は、更に詳細に検討が行われたが、その後橋本によりウイルスの精製が容易に行われるようになったので、爾後の研究は精製ウイルスにより行われた。

著者は分離肝炎ウイルスと相類似する性状を有する泉熱ウイルス(社株)を用いて、同様の精製が比較的能率よく、しかも容易に行い得られることを証明したので、肝炎ウイルスを対照とし、血清学的研究を行つた。この研究の目的は、もとより泉熱ウイルスと、肝炎ウイルスの比較研究であるが、泉熱ウイルスを介して、肝炎ウイルスの性状を明瞭に把握するにあつた。本編に於ては次の結論を得た。

1) 精製泉熱ウイルス(社株)を抗原とし、家兔

免疫血清との間に、補体結合反応を行つた。

先づ精製ウイルスにより、家兔を免疫するに、免疫力価の高い抗血清が得られた。斯る抗血清を用いると、社株では1:64の抗原価を示した。又肝炎ウイルスの抗血清には陰性の結果であつた。別に肝炎ウイルスと当該抗血清による補体結合反応では、石原、小川、春名の諸株に夫々1:128の抗原価を示し、斯る抗血清に対し社株は全く反応しない。

又夫々の患者血清に於ても、夫々同種の抗血清に反応するが、異種の血清には反応しないことを確かめた。

2) 中和試験と、Absättigungsversuch (Wildführ G.) の実験では、精製ウイルスと抗血清が同種の場合はよく中和反応が惹起することが、病理所見により推測されたが、異種の場合は中和効果は全く認められない。之等の実験の結果は、前記の補体結合反応の如く、明瞭な判定が困難な部分であり、納得出来ない結果も少くないが、病理所見よりの病変の緩和若くは抑制と、補体結合反応の結果と併用することによつて、有意な結果を得られるものと判断された。

3) 以上の所見を総合して見るに、両ウイルスともに、類似性を示すが、独立したウイルスであつて、ウイルス学的性状又は血清学的性状より検討するに、明かに区別されることが証明された。

稿を終るに当り、御懇篤なる御教示と御鞭撻を受け、且つ御校閲の労を賜つた恩師村上教授に深甚の謝意を表す。

参 考 文 献

- 1) 橋本：岡山医学会雑誌，第70巻，第7号，1958.
- 2) 村上等：第2回日本ウイルス学会肝炎シンポジウム，1954.
- 3) 村上等：第3回日本ウイルス学会講演要旨，1955.
- 4) 村上等：第5回日本ウイルス学会講演要旨，1957.
- 5) 浅木・岡山医学会雑誌，第71巻，5の2号掲載予定.
- 6) Wildführ, G.: Zeitschr. f. d. Ges. inner. Med. 573, 1953.
- 7) 笠原：第6回日本ウイルス学会講演要旨，1956.
- 8) 高田：岡山医学会雑誌，第69巻，第11号，1957.
- 9) 大日方：岡山医学会雑誌，第65巻，第4号.
- 10) 笠原：ウイルス，第3巻，4号，1953.
- 11) 藤原：岡山医学会雑誌，第69巻，第4号，1956.
- 12) Henle et al.: J. Exp. Med. 92, 271, 1950.
- 13) Henle et al.: Proc. Soc. Exp. Biol & Med. 73, 603, 1950.
- 14) 村岡：日本細菌学雑誌，第13巻，第4号，1958.
- 15) 黒屋，吉成，石田，野田，小野：ウイルス，4, 37~43, 1954.
- 16) 村上，俵，大日方，正岡：泉熱研究協議会プリント.
- 17) 吉岡：ウイルス，第1巻，号1号，1957.
- 18) Havens: J. A. M. A. 134, 653, 1947.
- 19) 俵：岡山医学会雑誌，掲載予定.
- 21) 仙石：未発表.

Studies on the Purified Hepatitis Virus

Part II Comparative Studies on Serological Properties with
IZUMI Fever Virus

By

Tetsuro TSUDA

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

As has been reported in the part I, the author obtained the hepatitis virus, and IZUMI fever virus in purified form by means of ultracentrifuge method proposed by HASHIMOTO, and studied comparatively on some serological properties of these purified viruses. The results obtained were following.

1) The antiserum obtained by inoculation of the purified IZUMI fever virus (YASHIRO's strain) had high titer and showed the titer of 1:64 on the complement fixation test to the YASHIRO's strain, but did not give the positive reaction to the purified hepatitis virus when it was used as antigen. *Vis-a-vis*, the antiserum obtained by inoculation of the purified hepatitis virus showed the titer of 1:64—1:128 to the hepatitis virus and negative reaction to the IZUMI fever virus. Hence, in the view of complement fixation test, the serological properties of the viruses were evidently different.

2) Concerning to the results of neutralization reaction and "Absättigungsversuch" after WILDFÜHR, it could be postulated by the pathological findings the occurrence of effective neutralization reaction when the test conducted between a virus and the antiserum obtained by inoculation of the same virus; contrarily to this the neutralization reaction between a

virus and the antiserum obtained by the inoculation of other virus did not occur. Since the reaction thus observed was not so evident as the complement fixation reaction described above, sometimes it was hardly possible to identify the definite reaction. However, this reaction was still informative, especially in referential use of the reaction to complement fixation test, because of the occurrence of certain inhibition or mitigation of pathological changes as the result of the neutralizing effect.

3) From the facts described above, it could be concluded that the evident difference of properties was noticeable in both viruses tested despite of the presence of some similarity on serological properties.
