

6 昭和27年度北海道において流行したインフルエンザのウイルス分離

北海道立衛生研究所 (所長 中村 豊)
技師 寒河江 和子
技師 佐伯 潔

昭和27年暮から28年にかけて北海道各地で発生したインフルエンザの流行は、患者についての血清学的検査の結果はA'型ウイルスによるものと考えられた。(北海道衛生部予防課：1952～53年冬季北海道に流行せるインフルエンザに関する研究・1954年1月発行)

Andrews, Laidlaw & Smith (1934)¹⁾ 及び Francis (1934)²⁾ はマウスがインフルエンザ、ウイルスに感受性があり、ウイルスは鼻腔内接種により肺で増殖することを発見した。更に Smith (1935)³⁾ はインフルエンザ、ウイルスの増殖のためにマウスのみならず孵化鶏卵をも用い得ることを見出し、Burnet (1940)⁴⁾ は人からウイルス分離を試みる場合には、羊膜腔内接種が最も感受性の高いことを見出した。それ以来、孵化鶏卵及びマウスを用い世界各地において多数のインフルエンザ、ウイルスが分離されている。

われわれは血清反応と同時にマウスと孵化鶏卵を用い患者含嗽液からウイルスの分離を試みたのでこゝにその結果を報告する。

材料と方法

1. 含嗽液：発病後3日以内の患者の咽頭を乾熱滅菌した綿棒でよく拭きとり、これを10ccのブイヨンの中に入れ、よく洗い、試験管壁に押しつけて附着している液を除いた。これを試料の含嗽液とした。これは接種まで凍結して保存し、接種前2～4名分ずつ合併したものを9例、合併しないものを3例つくり、ペニシリンを1000u./cc、ストレプトマイシンを2.5mg/ccに加え雑菌の可及的除去を行つた。

2. 免疫血清：ウイルスの標準株と分離株の感染孵化鶏卵漿尿液を牡鶏の静脈内に10ccずつ1週間の間隔で2回注射し、最後の注射から7～10日後に全採血して得た血清を使つた。

3. マウスによる分離

体重約15gのマウスを用い、5～10匹を一群とした。マウスは軽くエーテル麻酔をかけ、抗生物質を加えた含嗽液の0.05ccを経鼻感染させた。

感染させたマウスは5日間観察し、途中で斃死したものはその直後、生存していたものは5日後に放血死させて肺をとつた。

肺1箇につき1ccのブイヨンに加え、ホモジナイザーで乳剤とし、その遠心上清で雑菌試験を行つた後、上記の量になるようにペニシリンとストレプトマイシンを加え、次の群のマウスに継代感染させた。

第1代から第2代に継代の際、第1代接種マウスで生存マウスがいるときは、その肺を第2代目に感染させた。

各代の肺乳剤で鶏及びモルモット赤血球による血球凝集反応⁵⁾を行つた。このときメジウムには0.1%にそれぞれの血漿を加えた食塩水を使つた⁶⁾。

4. 孵化鶏卵による分離

11~12日の孵化鶏卵の4~5個を1群として使った。0.2ccの含嗽液又は感染マウス肺乳剤を羊膜腔内に接種し、35°Cに2~4日間おいた後水室に1夜おいて胎児を殺し羊水と漿尿液をとった。継代接種には羊水を用い、2~3代継代後の羊水でも血球凝集を認められないときは、分離陰性とした。

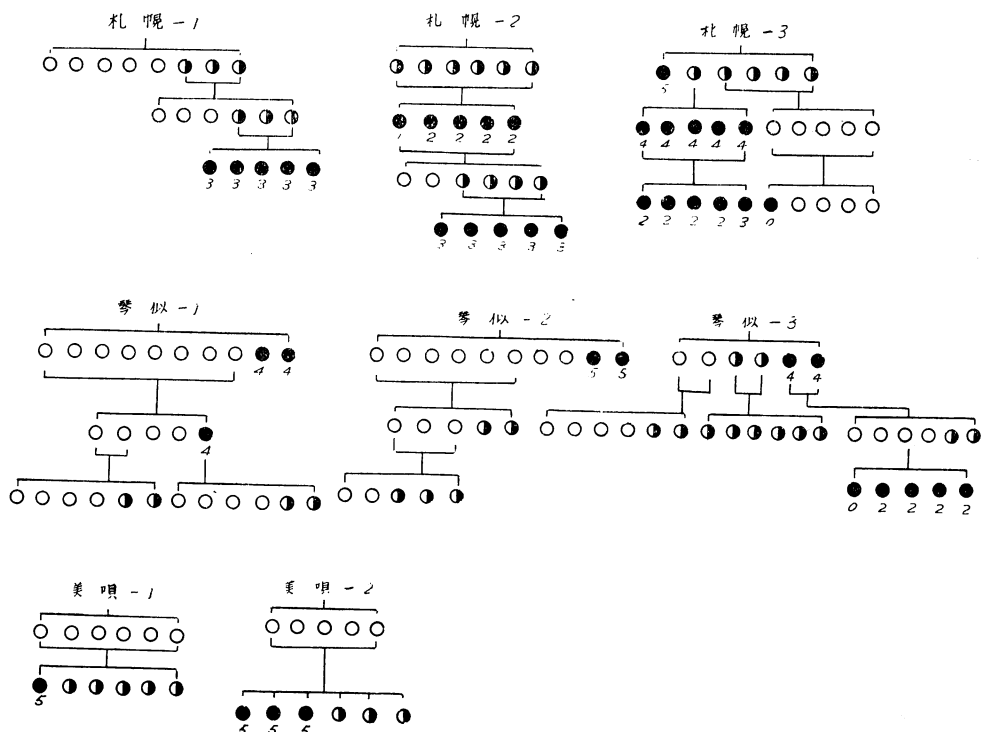
5. 交叉的赤血球凝集抑制反応 標準株と分離株ウイルスを抗原とし、それぞれの免疫血清と交叉的に凝集抑制反応⁵⁾を行つた。メジウムにはすべて上記の0.1%血漿食塩水を用いた。

結 果

1. マウスによる分離

患者試料からのインフルエンザ・ウイルスの分離に優秀とされている孵化鶏卵が揃わなかつたので、一部の分離にマウスを使つた（その方法は既述）。その成績は次の表で示してある。

第1図 マウスによる分離



黒丸は斃死、半黒丸は生存していたが肺に病変を認めたもの、白丸は生存しており病変の認められなかつたものをあらわす。又黒丸の下の数字は接種から斃死までの日数を示す。

札幌-1, 2, 3, 琴似-3の含嗽液で感染させたマウスは一部において第1代目から斃死或は肺に Consolidation を示していた。2代から4代継代感染させたマウスは大部分感染の徴候を示していた。

これらの肺の10倍乳剤で血球凝集反応を行つたが、すべて鶏赤血球では2~4倍稀釋でも凝集せず、モルモット赤血球の凝集も試みたが、赤血球が不安定で明確な凝集像を認めることが出来なかつた。

以上の成績からみると、患者の材料を経鼻的に気道に送つてマウス肺でインフルエンザ・ウイルス

スを分離しようとした企図は不成功であつたように見える。然し先に述べたように、これ等のマウスの肺は半数以上ウイルスによる特有の変化として知られている Consolidation を認めている。即ちこのことは確かにウイルスが肺で増殖していることを想定させる。このウイルスが何等かの原因で（これに関しては後述考察の処に述べてある）血球凝集を示さなかつたのであろう。

一般にインフルエンザ・ウイルスの分離には、いきなり試料を孵化鶏卵に接種する方法が行われている。そこで吾々は以上の実験マウス肺を乳剤として孵化鶏卵の羊膜腔内に接種して、次のような検索を行つた。

2. 孵化鶏卵による分離

これは 1. 前述マウスによる分離を試みた肺の乳剤によるもの及び 2. 患者試料を直接孵化鶏卵に接種して分離を行つたものの 2 実験からなる。いずれも羊膜腔に接種した。

i マウス肺乳剤の接種

結果は第 1 表に要約して示した。札幌—1 から美唄—2 までマウス肺乳剤を孵化鶏卵の羊膜腔内に接種したものは、琴似—2 を除く 7 株において接種第 1 代から羊水及び漿尿液の赤血球凝集を認めることが出来た。その凝集価は羊水では 10~40 倍以上で漿尿液では 16~320 倍であつた。

これらの羊水を更に第 2 代目に接種したところ、羊水も漿尿液も共に第 1 代目より凝集価の上昇を示した。併し琴似—2 のみは 2 代継代接種後にも鶏赤血球を凝集しなかつたので分離陰性とした。

ii 札幌—4, 5, 6 は患者含嗽液をマウスを経ずに直接孵化鶏卵の羊膜腔内に接種した。

札幌—4 は 3 代、他は 2 代継代接種したが羊水、漿尿液ともに赤血球凝集反応は陰性であつたので継代を中止した。即ちこれ等の試料からのウイルスの分離は不成功であつた。

第 1 表 孵化鶏卵接種

	接種材料	継代数	血球凝集	
			漿尿液	羊水
札幌—1	マウス肺乳剤	1	+	+
札幌—2		1	±	+
札幌—3		1	+	+
琴似—1		1	+	+
琴似—2		2	—	—
琴似—3		1	+	+
美唄—1		1	+	+
美唄—2	1	+	+	
札幌—4	含嗽液	3	—	—
札幌—5		2	—	—
札幌—6		2	—	—

3. 分離株の型の決定

分離に成功した札幌—1 の第 2 代接種鶏卵から得たウイルスで免疫血清を作り、標準株即ち PR 8, FM—1, Lee 及び松本株と交叉的に赤血球凝集抑制反応を行つて分離株の型を知ろうとした。

第 2 表 交叉的血球凝集抑制反応

血清			ウイルス											
			PR8	FM1	松本	札幌—1	札幌—2	札幌—3	琴似—1	琴似—3	美唄—1	美唄—2	Lee	
P	R	8 (A 型)	13	6	4	2	3	4	3	3	<4	5	<1	
F	M	1 (A' 型)	5	>12	10	2	4	4	5	5	<4	5	<1	
		松本 (A' 型)	5	12	>12	4	4	4	5	5	3	4	3	
		札幌—1	5	5	8	13	13	9	7	10	9	8	<2	
L	e	e (B 型)	<1	<1	2	<2	2	2	1	2	1	<2	>12	

第2表に明らかなように、先ず標準株 Lee (B型代表株) との関係を見ると交叉反応は成立しない。即ち Lee 株の免疫血清は分離株の何れによつても血球凝集抑制を示さないし、又分離株の免疫血清は Lee の凝集を抑制しない。従つて分離株はB型に属するものではない。

次に分離株は PR8 株 (A型代表株) の免疫血清では松本株 (A'株) と同程度に抑制され、FM—1 株 (A'型代表株) の免疫血清では PR8 と同じ程度に抑制される。そして松本株免疫血清によつても FM—1 と大体同じような態度を示す。

又分離株札幌—1 免疫血清の側からみると、松本、FM—1、PR8 の順に凝集を抑制する。

この結果から分離株が FM—1、松本株に最も近く、これらの如く A'型に属するものであると考えられる。併し抗原構造において FM—1、松本株と少し違いがあるようである。

考 察

吾々の実験で興味あることは患者含嗽液即ちウイルス分離用試料をマウスに接種し肺からの分離を試みた場合に、その乳剤は鶏赤血球を凝集しないで、それを鶏卵に接種して初めてその羊水などの凝集反応陽性成績からウイルス分離が成功していくことを知つたことである。

然らば如何なる理由によつて含嗽液を継代接種していたマウス肺乳剤は鶏赤血球を凝集しなかつたのであろうか？

第1に考えられるのは、マウス肺においてはウイルスが分離されているに拘らず鶏赤血球により凝集像を示し得る程度に増殖していなかつたということである。

このマウス肺を孵化鶏卵に接種した場合、既に鶏卵接種第1代において、その羊水及び漿尿液は鶏赤血球を凝集している。但しその凝集価が比較的低かつたが、それでも既にマウス肺でウイルスの分離が出来ていることを否定することは出来ない。

第2に考えられることは、マウス肺に含まれる inhibitor についてである。

正常マウス肺にはインフルエンザ・ウイルスの血球凝集作用に対する阻止物質 inhibitor が存在することが知られている (Friedewald, Miller & Whatiey 1947)。⁷⁾ この物質は肺内でウイルスがある程度増殖すると、その酵素作用によつて消失すると云われる。吾々の実験で先ずマウス肺で分離を試みた場合、ウイルス増殖の程度が低く、従つて inhibitor を消失せしめるには至らなかつたのではなからうか。そしてこれも亦、赤血球凝集反応が陰性に終つた一因をなしているのではないかと想像される。

いずれにしても吾々の実験はマウス肺を更に孵化卵に継代接種してウイルスを證明し得たのであるから、ウイルス分離の目的は達している。

分離したウイルスがマウス肺炎ウイルスでないことの證明：吾々は、はじめ実験動物としてマウスを用いたのであるから、一応正常マウスが潜在性に持つている肺親和性のウイルス、殊にマウス肺炎ウイルス (以下 PVM と略す) と間違つていのではないかと云うことを考慮に入れる必要がある。

PVM はマウスの赤血球を凝集し (Mills & Dochez, 1944)⁸⁾、その凝集価は加熱によつて上昇すると云う (Mills & Dochez, 1945)⁹⁾。

そこで吾々は各代の肺乳剤の無処置のものと、56°C30分加熱した遠心上清について、マウス赤血

球凝集反応を行つた。その結果は、いずれも全く凝集像を認めることは出来なかつた。この点において分離株ウイルスは明らかに PVM と異なることがわかる。

交叉的血球凝集抑制反應の施行によつて吾々の分離株が A' 型であることを確認しなければならない。

これは FM—1 及び松本株抗血清と分離株ウイルス及び分離株ウイルスと標準株及び分離株抗血清について行つた。

これ等の反応成績を考察すると、吾々の分離株が FM—1、松本株について PR8 に近親関係があることを思わせるような抑制価を示している。これは広義では A' ウイルスも A 型に属するものなのであるから奇とするに足らない。

結 論

1952～1953年に北海道に發生したインフルエンザの流行に際して、患者含嗽液からウイルス分離を試み、A' に属する7株のウイルスを分離した。

本研究を行うに當つて患者材料の蒐集について御助力下さつた衛生部予防課、札幌市立中央保健所及び西保健所の防疫関係の方々並びに種々御援助下さつた当所飯田技師に感謝する。

文 献

- 1) Andrewes, Laidlaw & Smith ; Lancet, 2, 859, 1934.
- 2) Francis ; Science, 80, 457, 1934.
- 3) Smith ; Brit. J. Exp. Path., 16, 508, 1935.
- 4) Burnet ; Austral. J. Exp. Biol. & Med., 18, 353, 1940.
- 5) 厚生省編纂；衛生検査指針(1), 301, 昭27.
- 6) 山田, 寒河江；北海道立衛生研究所報, 第3集, 28, 1952.
- 7) Friedewald, Miller & Whatiey ; J. Exp. Med., 86, 65, 1947.
- 8) Mills & Dochez ; Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y., 57, 140, 1944.
- 9) Mills & Dochez ; Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y., 60, 141, 1945.