

B 型肝炎ウイルスのさる接種実験について (第1報)
B 型肝炎誘発血漿のさる継代実験

Primates as a Experimental Model for Type B Hepatitis (Part 1)
Transmission of Plasma Known to Induce Type B Hepatitis
to Rhesus and Cynomolgous Monkeys

桜田 教夫 佐藤七七朗 野呂 新一
上田 正義 伊藤 碩候* 宮川 明**

Norio Sakurada, Nanao Sato, Shinichi Noro, Masayoshi Ueda
Hiroyoshi Ito Akira Miyagawa

緒 言

現在急性肝炎の大半はウイルスによるとされており、主として臨床症状と感染経路によってA、Bの両型に大別されているが、いずれの型においても病原ウイルスが分離されていない。肝炎ウイルス以外の人の病原ウイルスの大半が細胞培養法の導入によって分離され、性状が明らかにされているにもかかわらず人の肝炎ウイルスが分離されない理由としては新しい方法の確立とともにこれらのウイルスが宿主に侵入してから生ずる免疫反応の機序についての説明が必要であると考えられる。

1963年に Blumberg らによって発見された HB (Hepatitis B) 抗原は、それ自身が感染性の agent であるか、いわゆる polymorphism に属するかは明らかでないが、B型肝炎の研究上ウイルス感染の指標になると考えられるので HB 抗原陽性であり、かつB型肝炎を誘発した血漿をあかけざる、かにかくいざるに接種し、経過を観察してから、継代を行なった。

実験方法

1. 接種材料

接種材料は市立札幌病院において心臓手術の際に輸血を行なった後にB型肝炎を誘発させた2本の血液の血漿であって、血漿A、血漿Bと名付けた。両血漿と輸血後の患者の経過を Fig. 1 と Fig. 2 に示した。

Fig. 1 は HB 抗原価が CFT (Complement Fixation Test) で 1 : 64 の血漿Aを含む10単位の血液の輸血を受けた患者の経過であって、輸血後4週目から HB Ag が ID (Immune Diffusion) と CF で陽性になり、8週目から GOT (Glutamic oxalacetic transaminase), GPT (Glut-

amic pyruvic transaminase) の上昇がみられた。Fig. 2 は HB 抗原が CF で 1 : 128である血漿Bを含む13単位の血液の輸血を受けた患者の経過であって、5週目から HB 抗原が、CF, ID で陽性、10週目に GOT, GPT の上昇がみられている。

血漿A、Bは滅菌 PBS で10倍に希釈してから 10,000 rpm 30分間遠心し、その上清をさるの筋肉(血漿B)あるいは静脈内(血漿A)に 2~3 ml あて接種した。

2. さる接種と継代

実験に用いたのは、わが国において比較的入手が容易であるかにかくいざるとあかけざるである。入手するまでの経過は不明である。接種前に採血して HB 抗原、抗体、トランスアミナーゼ値の測定を行なった。接種後は毎週下肢の静脈より採血し、HB 抗原、抗体、トランスアミナーゼ値の測定を行なった。なお接種、採血に当たっては筋注用ケタラール50の、体重 1 kg 当たり 5-10 mg 注射による麻酔を行なった。

血漿Aはあかけざる、かにかくいざるとあかけざるの順に継代し、3代目から2匹のあかけざると1匹のかにかくいざるに継代した。血漿Bはかにかくいざるとかにかくいざるに継代した。なお継代に当たってはすべて静脈内接種を行ない、2~3 ml の血清を静脈内に接種した。

3. HB 抗原、抗体トランスアミナーゼ値の測定、一般組織学と酵素組織学的検索

HB 抗原と HB 抗体は、ID, CF, CIE (Counterimmunoelectrophoresis), Rheophoresis 法を用い、実験の後半からは RIA (Radioimmunoassay) 法も用いた。GOT と GPT は光電比色法により測定し、Carmen 単位で示した。

一般組織学的検査は HE 染色により、酵素組織学的検索に当たっては LDH (Lactic dehydrogenase), SDH (Sorbitol dehydrogenase), Al-P (Alkali-Phosphatase),

*北海道赤十字血液センター

**斗南病院

Fig. 1 Source of HB Ag positive inoculum (R1→C2→C3)

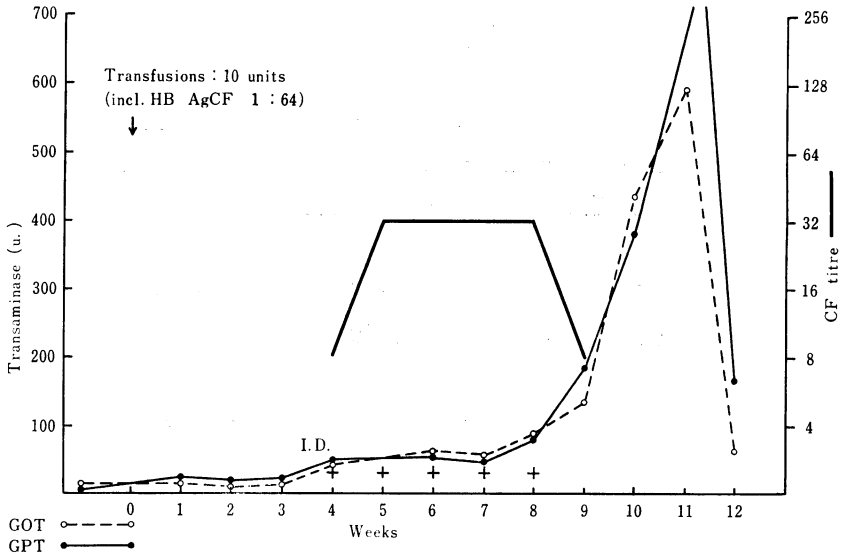
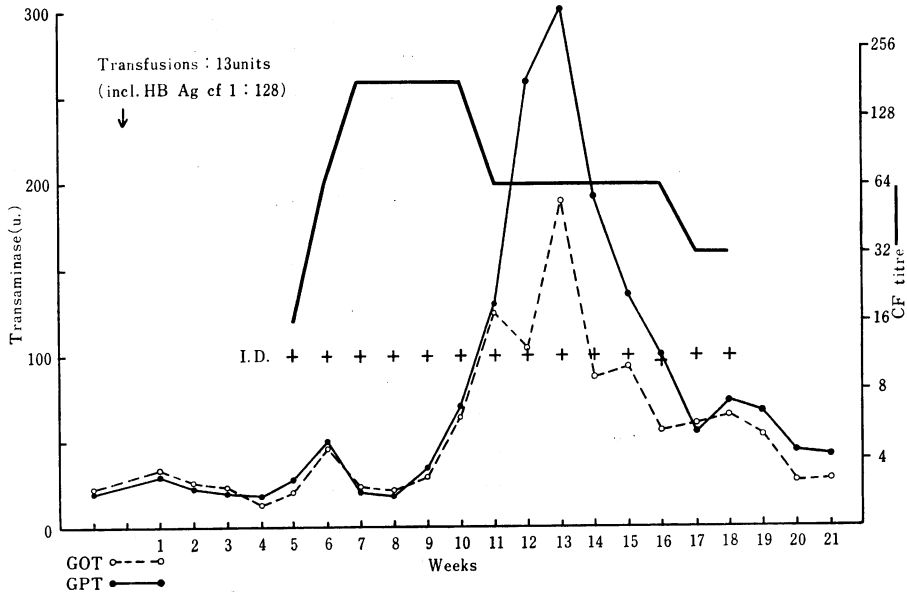


Fig. 2 Source of HB Ag positive inoculum (C1→C2)



Ac-P (Acid Phosphatase) の測定を行なった。²⁾

実験結果

1. HB 抗原と HB 抗体の産生

血漿A, 血漿Bを接種, 継代したすべてのさるにおいて ID, CF, CIE, Rheophoresis 法によりHB 抗原, HB 抗体は陰性であった。

RIA 法は途中から採用したため全血清について実施しなかったが, 血漿A接種さるに最初から RIA によって HB 抗原が存在し, 継代さるの7週目の血清に RIA により抗体が検出された。また血漿B接種さるの8週目と12週目に抗体が検出されている。しかし RIA 法により検

出される HB 抗体が抗モルモットグロブリン抗体による cross-reaction であることが指摘された同じキットを使用したために今回検出された抗体については再検討の必要があると考えられる。³⁾⁴⁾

対照の3匹の非接種かくにいざるはすべての方法によって HB 抗原, HB 抗体は陰性であった。

2. トランスアミナーゼ値の消長

GOT, GPT の上昇のみられたのはいずれも両血漿を接種した初代のさるである。血漿A接種さるの3代目までと血漿B接種さるの2代目までの結果を Fig. 3 と Fig. 4 に示す。

血漿A接種さるは Fig. 3 にみられるように5週目に,

Fig. 3 Transaminase in Rhesus and Cynomolgus monkeys

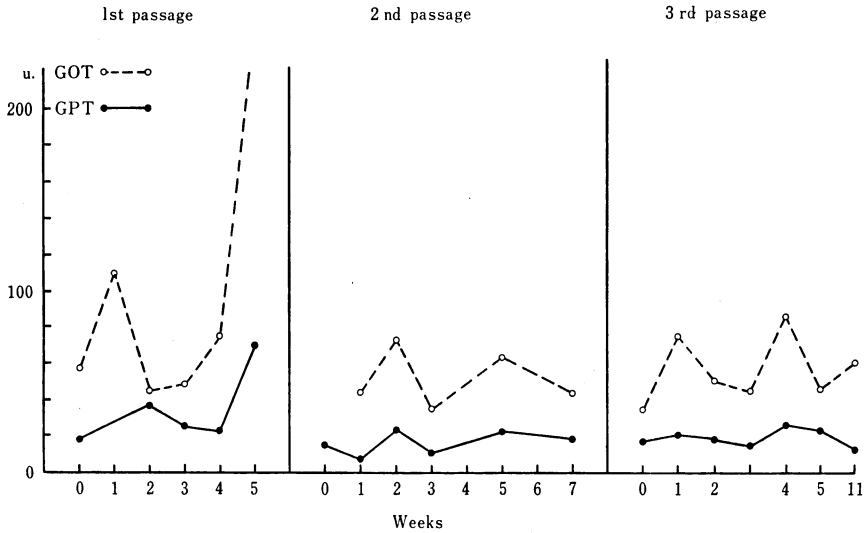
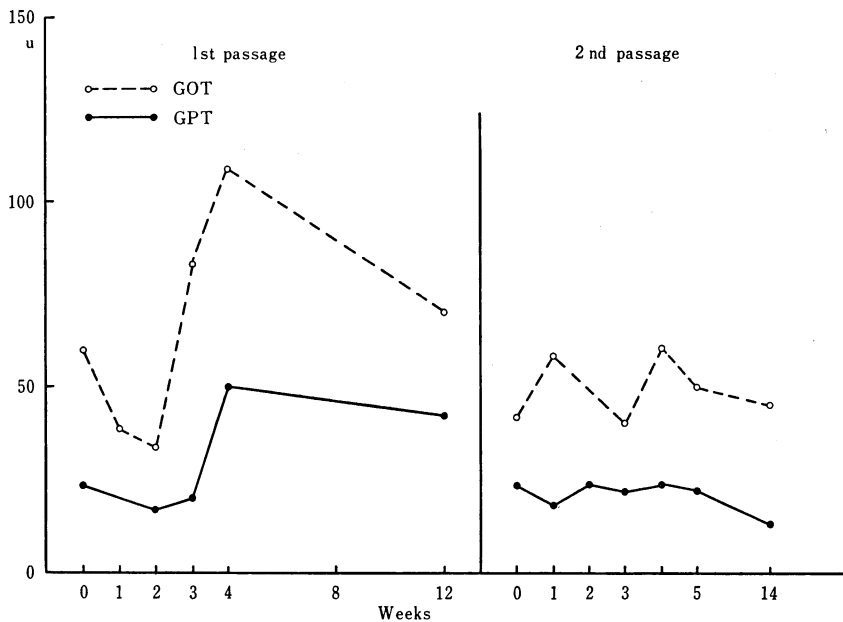


Fig. 4 Transaminase in Cynomolgus Monkeys



GOT > 200, GPT 69.0, 血漿B接種さるは Fig. 4 に示すように4週目に GOT 109.1, GPT 42.0 の上昇がみられた。ただし血漿Aの継代さると血漿Bの2代目においてはトランスアミナーゼ値の上昇はなかった。

なお非接種さる群においてはGOTが26.0~56.0, GPTが7~14であった。Laboratory Primate Handbook によるとあかげさるにおいてGOTの正常値は 40.4 R-F unit, GPT の正常値は 27.9 R-F unit であって, GOT が高い。5)

3. 一般組織学的所見

血漿Aを接種後5週目に GOT, GPT の上昇したあか

げさるの肝についてみると, ほぼ肝全体にわたり肝細胞の壊死像および肝細胞胞体の好酸化を呈するものも認められ, それと並んで肝細胞再生像もみられた (Fig. 5)。またグリソン鞘および小葉内には中等度までの小円形細胞浸潤像を認め, Gitter faser の断裂像 (Fig. 6), およびいわゆる diffuses Eisen の出現も中等度にみられており, (Fig. 7), ウイルス性肝炎を示唆している像がみられた。

血漿Aの2代目の継代かにくいさるは7週目に殺した。本例においては軽度ではあるが肝細胞の壊死像と並んで胞体の好酸性化も認められ, Gitter faser の変化および diffuses Eisen の出現も認められており, 肝炎初期を示唆

Fig. 5 Hepatocellular necrosis, hepatocellular regeneration and presence of acidophil bodies

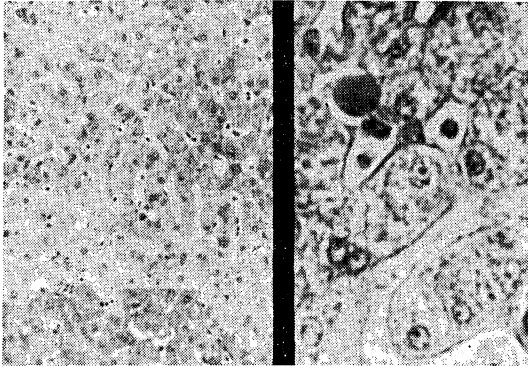
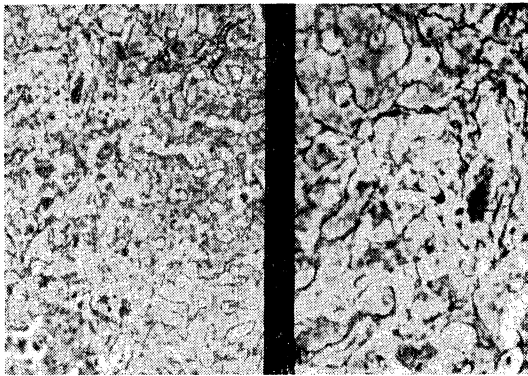
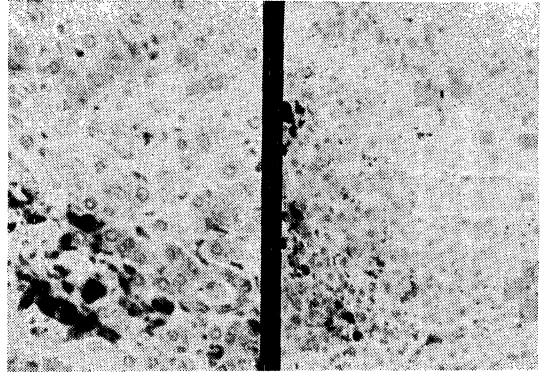


Fig. 6 Discontinuity of Gitter Faser



している像と考えられる。本例から3代目に継代したかにくいさを11週目に殺した。この例では軽度の肝細胞壊死像が認められると共に diffuses Eisen の出現もあるが細胞浸潤像や Gitter faser の著変は認められず、この例においては肝炎の初期像あるいは軽快像であると考えられ

Fig. 7 Appearance of diffuses Eisen



る。4代目のあかけさは133日目に殺した。肝は表面が fine granuliert であって、一見硬変を思わせる。組織学的には各所に好酸体の出現が認められ、diffuses Eisen の出現、Gitter faser の変化および Fibrose も認められ、肝炎のやや時日の経過した像と考えられる。4代目のかにくいさるでは肝細胞の壊死、再生像がごく軽度に認められる他は組織学的に著変がなく肝炎と断定が出来なかった。

血漿Bを接種したかにくいさは3カ月後に殺したが肝細胞壊死像、細胞浸潤像 Kupffer cell の再生像等は比較的軽度であって、Gitter faser の断裂も著明でなく、diffuses Eisen の出現もみられず、肝炎としての所見は著明でない。なおこの例の血清を継代した2代目のかにくいさるの14週目の肝においても多発性の小膿瘍形成がみられた以外にはその他の部位において肝炎とみられる所見はなかった。

なお対照として3匹の非接種かにくいさるにおける一般組織学的所見は時に軽度の Gitter faser の断裂像ならびに Kupffer cell の増生像を認める以外に著変はみられなかった。

Table 1 Common Histological Findings

		R 1	C 2	C 3	R 4	C 4	C 1	C 2	Controls
Hepatocellular Necrosis		+++	+	+	+~++	±	±	-	- - -
Hepatocellular Regeneration		+	-	±	+	±	-	-	- - -
Cellular infiltration	intralobular	+	±	-	±	±	+	-	- - -
	intracapsular of Glisson	+~++	-	-	±	-	+	-	- - -
The so called Diffuses Eisen		+~++	+	+~++	+	-	-	-	- - -
Gitter faser	Discontinuity	+~++	+	±	+~++	-	+	-	± - -
	Hyperplasia	±	-	±	++	±	-	-	- - -
	Collagenization	±	-	±	++	±	-	-	- - -
Fibrosis		-	-	-	+~++	-	-	-	- - -
Proliferation of Kupffer cell		++	+~+++	+	+	+	+~+++	±	- - ±

Table 2 Histochemical Findings

		R 1	C 2	C 3	R 4	C 4	C 1	C 2	Controls		
LDH	Liver cell	NT	-	±	+	+	±~+	++	++	++	
	Vascular		-	±	+~++	+~++	-	++	±	±	+
	Bile duct		-	+	+~++	+	-	++	±	±	+
SDH	Liver cell	NT	+	~±	±	-	±	+~++	+	++	+~++
	Vascular		-	-	-	±	-	±	-	-	-
	Bile duct		-	+	-	±	-	+~++	-	++	-~+
Al-P	Liver cell	NT	-	±	±	+	-	±	±	±	-~+
	Vascular		±	+~++	±	+	+	++	++	+~++	±~+
	Bile duct		++	+	±	+	-	+~++	-	-~++	+
Ac-P	Liver cell	NT	++	++	++	++~+++	++	++~+++	+~+++	+~+++	++~+++
	Vascular		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bile duct		-	±	-	-	-	-	-	-	-

以上の継代実験における一般組織学的所見の総括を Table 1 に示した。

4. 酵素組織学的所見

剖検肝の酵素組織学的所見に関しては Table 2 に示してあるが、3匹の非接種対照のかにくいさるの肝においては、LDH, SDH, Ac-P の各酵素の肝細胞内活性が著明であるが、Al-P の活性はこれに反し、肝細胞ではほとんどその活性を認めないが、血管系および胆管系に強い活性が示されていた。

血漿Aを接種した初代のあかげさるについては酵素組織学的検索を行っていないが、2代目の継代かにくいさるにおいては LDH, SDH の活性は明らかに低下を示し、Al-P は血管系の活性残存を認める以外、胆管系の活性はほぼ完全に消失していた。Ac-P はほぼ正常範囲の活性を示していたが顆粒の凝集化と粗大化の傾向がみられた。3代目のかにくいさるにおいては LDH, SDH, Al-P は共に活性減弱が著明であり、かつ Ac-P の軽度の活性減弱傾向がみられた。4代目のあかげさるにおいても Ac-P を除く他の酵素の活性の著しい減弱が示され、4代目のかにくいさるも同様の所見がみられた。

血漿Bを接種したかにくいさるにおいては一般組織学的には肝炎としての所見はないが、酵素組織学的検索では LDH, SDH の活性は明らかに低下を示し、また Al-P 活性は血管系の活性残存を認め、胆管系の活性はほぼ完全に消失していた。これに反して Lysosomal marker である Ac-P はほぼ正常範囲の活性を示していたことが軽度の凝集化、粗大化傾向がみられた。このことからこの例では一般組織学的に明らかに肝炎像を呈しない時期に、既に酵素活性に明らかな異常がみられた。なお2代目の継代かにくいさるには著変はみられなかった。

考 察

さるを用いてのB型肝炎ウイルスの増殖の指標には血液中の HB 抗原, HB 抗体の産生, 生化学的検査, 剖検あるいは Biopsy 肝の一般組織学的検査, 酵素組織学的検

査, 電顕あるいは蛍光抗体法による HB 抗原粒子の追及等がある。

今回の実験において HB 陽性材料の接種によっても、HB 抗原, HB 抗体の産生を証明することが出来なかったことは、あかげさる, かにくいさるにおいては HB 抗原を heterologous antigen として識別出来ないのではないかと考えられる。このことは Blumberg らの総説にあるように、¹⁾ これらのさるにおける HB 抗原の保有率が Blumberg らのかにくいさる 91 匹, あかげさる 256 匹, Lighter らの16匹のあかげさる, Hirshman らの176匹のあかげさるに 0 であり、Desmyer らも14匹のあかげさるに検出していない、²⁾ 等の諸報告を裏づけている。

一方 HB 抗原はチンパンジーにおいては高率に検出され、¹⁾ ²⁾ かつ人における抗原と同一であることが確認されていることから、³⁾ 最近 Barker ら⁴⁾ および Desmyer ら⁵⁾ のチンパンジー接種実験が報告されており、接種後に HB 抗原が産生されることからチンパンジーにはそれ自身に抗原産生能があると考えられる。

血漿A, 血漿Bの接種によって初代のさるにトランスアミナーゼ値の上昇をみたことは、剖検肝における一般組織学的所見および酵素組織学的所見とあいまって、接種材料中に含まれる agent によって肝実質細胞の障害があったことは明らかである。Hartwell らはチンパンジーの肝炎の急性期における GOT, GPT の値が人におけるよりも低いことを報告しており、Smetana は肝炎ウイルスの感染におけるさるにおけるトランスアミナーゼ値の低値はさるが老齢であって既に感染を受けている場合と逆に若年のために肝細胞の酵素産生能の低下があるとしている。¹⁰⁾

血漿Aを接種したさるにおいては4代目まで一般組織学および酵素組織学的に肝炎を疑わしめる所見があり、血漿B後接種さるにおいても初代には酵素活性に異常が認められた。非接種群のさるには異常を認めないことから、これらの一連のさるの肝における所見からB型肝炎ウイルスの継代が行なわれたと考えられる。

A型肝炎ウイルスのマーモセット感染実験にみられるよ

うな感染様式と再現性の確立¹¹⁾がB型肝炎ウイルス感染さるにはみられないことから、Smetana はさるにおける肝炎の non-fetal case は一般組織学的に人における所見と類似しているが、はるかに軽度であると述べ、さらにさるの肝炎ウイルス感染実験においては、肝における組織学的所見が最も重要であると述べている。¹⁰⁾

Kalter の総説にあるようにさるを用いての肝炎ウイルスの実験に当たっては接種材料中に sufficient potent virus を含むことと、さるが以前にウイルスに感染していないという条件は絶対に必要であろうと考えられる。¹²⁾

結 語

B型肝炎を誘発した血漿A、血漿Bをあかげさる、かにくいさるに接種後継代を行なった。全例に HB 抗原、抗体の産生はみられなかった。

初代のさるにおいてはいずれもトランスアミナーゼ値の上昇がみられた。血漿Aを接種したさるは4代まで一般組織学および酵素組織学的に肝炎を疑わしめる所見が得られた。血漿Bを接種したさるにおいては初代のさるに酵素活性に異常がみられた。

本研究は厚生省特定疾患難治性の肝炎調査研究費による。

文 献

- 1) Blumberg, B. S. et al. : Australia Antigen and Hepatitis, 56, CRC Press (1971)
- 2) 高松英雄他 : 臨床検査 15, 140 (1971)
- 3) Sgouris, J. T. et al. : New Eng. Jr. Med., 288, 160 (1973)
- 4) Prince, A. M. et al. : Lancet, 1, 1346 (1973)
- 5) Whitney, R. A. et al. : Laboratory Primate Handbook, 112 Academic Press, New York (1973)
- 6) Desmyter, J. et al. : Vox Sanguinis, 24, 17 (1973)
- 7) Lichter, E. A. : Nature, 224, 810 (1969)

- 8) Barker, L. F. : J. Inf. Dis., 127, 648 (1973)
- 9) Hartwell, W. V. et al. : Am. J. Vet. Res., 29, 1449 (1968)
- 10) Smetana, H. F. : Pathology of Simian Primates, Part II, 663, (1972)
- 11) Holmes, A. W. : Pathology of Simian Primates, Part II, 684, S. Karger, Basel (1972)
- 12) Kalter, S. S. : Nonhuman Primates and Medical Research, 120, Academic Press, New York (1973)

Primates as a experimental model for type B hepatitis (Part 1)

Transmission of plasma known to induce type B hepatitis to Rhesus and Cynomolgous monkeys

Norio Sakurada, Nanao Sato, Shinichi Noro, Masayoshi Ueda (Hokkaido Institute of Public Health)
 Hiroyoshi Ito (Hokkaido Red Cross Blood Center)
 Akira Miyagawa (Tonan Hospital)

Rhesus and cynomolgous monkeys were inoculated with plasma A and plasma B known to induce post-transfusion hepatitis and serially passed.

Hepatitis B antigen and antibody could not be demonstrated in the sera of any of the monkeys in this experiment. Both SGOT and SGPT values increased in the first inoculated monkeys. However none of the passed monkeys became elevated levels of transaminases.

Histopathologic and histochemical changes in the autopsied liver indicative of viral hepatitis were seen in the 1st to 4th plasma A passed monkeys. Only histochemical changes were noticed in the 1st to 2nd plasma B passed monkeys.