

羊膜腔内継代により得られたインフルエンザ・ウィルス PR 8 株の変異株について

千葉大学医学部細菌学教室 (主任 川喜田愛郎教授)

長 沢 仁 一

ZINITI NAGASAWA

(昭和37年2月20日受付)

まえがき

G. Henle⁽¹⁾⁽²⁾はおたふくかぜウィルスによつて、HeLa 細胞および猿の腎上皮細胞の Cytolytic action をみる実験で、流行株および卵の羊膜腔内で数代継代されただけのものは、Cytolytic action を示すと同時によく増殖するが、これに反し、漿尿膜腔内で継代されて来た株は、大量接種によつてのみ Cytolytic action を現わすが継代出来ないことを報告した。

また、インフルエンザ・ウィルスにあつては HeLa 細胞に対しては、NWS が Cytopathogenicity があり、PR 8 株にはそれがないことが知られている⁽³⁾。しかし Granoff⁽⁴⁾は PR 8 株を用いても plaque count が出来たと報告しているが、詳細な報告はまだみられない。

おたふくかぜウィルスの成績は Egg-adopt と non-adapt の差によるもののように見えるが、卵の漿尿膜と羊膜という増殖の場の相違によつて似たような現象がみられないだろうか。

インフルエンザ・ウィルスを発育鶏卵の漿尿膜腔内に接種すると、漿尿液中にウィルスが証明されるのは当然ながら、これよりもいくぶん低い値で、羊水中にもかなりのウィルスが証明されることは Köhler⁽⁵⁾も報告しているところである。

しかし、この二つの場所に現われるウィルスの生物学的性状が同一なものであるかどうかはしらべられていない。この報告では、羊水中に出て来たウィルスを最初の接種材料にして、羊膜腔内継代を行つたところ、ある点において、かなりの差のある変異株を含んだウィルス液が得られたので、その獲得状況、性状がのべられる。

実験材料と方法

ウィルス株——発育鶏卵で継代されてきたインフ

ルエンザ PR 8 株の漿尿膜腔内接種後 48 時間の羊水を出発材料として使用した。漿尿液及び羊水の血球凝集価 (以下 HA 価と記す) は、それぞれ 4096, 2048 倍まで陽性であつた。

羊膜腔内接種方法——孵化 10~11 日卵の胎児に近い側面に人工気室を作り、直径約 2 cm の窓を開け、ここから羊膜腔内にウィルス液を 0.1 ml 接種する。その際気泡を入れて、針先が羊膜腔内に必ずあることをたしかめる。窓はカバーガラスとパラフィンで封じた。

漿尿膜腔内接種方法——通常の継代でなく、ここに述べられる実験では、確実に尿膜腔内に接種されることが必要なため、羊膜腔内接種方法に準じて、人工気室を作り、窓を開けて接種された。接種量は 0.2 ml である。

感染価——ウィルスの 10 倍階段希釈液を 12~13 日卵の漿尿膜腔内接種 (開窓法によらず、各群 3~5 個) 後 48 時間 37°C においたのち -20°C に 30 分間置いて殺し、尿膜腔液をとり、HA 能の証明によつて、感染と判定した。

HA 価——ウィルスの 2 倍階段希液 0.25 ml に 0.25% ニワトリ赤血球浮遊液 0.25 ml を加え、室温に 60 分間放置して管底の沈降像で判定し、価はウィルス液の最高稀釈価でとつた。稀釈液は PH 6.8 の $\frac{1}{100}$ M 磷酸緩衝食塩水である。

HA 抑制試験——赤血球加血清 2 倍階段希釈液 0.5 ml にウィルスを加えた際、ウィルス液の濃度が 2 凝集単位になるように行つた。

実験成績

1. 羊膜腔内継代

第1表において、第4代では2ケのうち1ケが48時間以内に死亡し、胎児は著明な出血反応を呈し、漿尿液、羊水ともに透明で、サイオグライコレート培地による無菌試験では陰性であつた。第5代は

10^{-8} を接種された卵で、出血死亡はみられなかつたが、 10^{-2} のものでは全く同様の所見が得られた。

この出血の様子には Burnet⁽⁶⁾ や Stuart-Harris⁽⁷⁾ 等の向神経株によるものや、ニューカッスル病ウィルスほどには脳の出血は著明でなく、むしろ体部において著明であつた。第 6 代の接種材料としては、 10^{-8} を接種されて出血、死亡を示さなかつたが AM₅-1 の羊水の 10^{-2} を用いて出血、死亡がみられ以後同様の所見を呈する継代が可能である。

第 1 表の HA 価が第 3 代以後、異常に高い値を示しているが、感染試験と矛盾しない。なお尿膜腔液の値と羊水の値とを比較すると尿膜腔内継代では常に尿膜腔液 $\geq$ 羊水 (CAF $\geq$ AMF) の関係であつたものが、羊膜腔内継代では、第 3 代以後は CAF $\leq$ AMF と逆の関係になつている。

このことは、胎児の出血性反応と相関して興味あることと思われる。

第 1 表 羊 膜 腔 内 継 代

継代	継 料 代 材 及 び 稀 釈	死亡	出血	HA 価	
				C. A. F.	A. M. F.
PR 8	ml.	—	—	4,096	> 2,048
AM ₁	羊水原液 0.1	—	—		8,192
AM ₂	AM ₁ 10^{-2}	—	—		
AM ₃ -1	AM ₂ 10^{-2}	—	±	4,096	
2		—	±	16,384	< 65,536
3		—	±	16,384	> 8,192
4		—	±		65,536
AM ₄ -1	AM ₃ -1 10^{-2}	—	—	8,192	< 32,768
2	AM ₄ -2 10^{-8}	+	±	4,096	
AM ₅ -1	AM ₄ -2 10^{-2}	—	—	512	< 65,536
2		+	±		
3					
4		+	+		
AM ₆ -1	AM ₅ -1 10^{-2}	+	+	4,096	< 20,480
2					
3		+	+		2,048
4		+	±	16,384	
5		+	+	8,192	< 20,480
6		+	±	8,192	< 10,240
AM ₇ -1	AM ₆ -5 10^{-2}	+	+		
2		—	—	256	< 65,536
AM ₈ -1	AM ₇ -2 10^{-1}	+	+		
2					
AM ₉ -1	AM ₈ -1 10^{-3}	+	+		
2		+	+		
3		+	+		

2. 卵感染量と卵致死量及び出血反応との関係

羊膜腔内継代をうけた羊水中のウィルスの EID (egg infective dose) と ELD (egg lethal dose) 及び出血反応との関係を第 2 表にあらわしてある。EID は 10^{-8} まであつたものでも ELD は 10^{-6} ま

で不規則にみられただけで、出血反応も 10^{-1} 、 10^{-2} といった濃いところでも 100% にはみられなかつた。この理由については明らかでない。しかし 10^{-7} 以下のところでは、羊膜腔内に接種をうけたにも拘らず、ウィルスは漿尿膜腔内に出現して羊膜腔には存在せず、卵の出血死亡は 10^{-7} 以下ではみられなかつたことと興味のある現象である。

以上のことから、継代されてきた羊水中のウィルスに変異株があるとしてもその量は全活性ウィルスのごく一部にすぎないと推察される。

第 2 表 EID と ELD および出血反応との関係
AM₉-1

		HA		死亡	出血
		C. A. F.	A. M. F.		
10^{-1}	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	—	—
10^{-2}	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	—	—
10^{-3}	1	+	+	+	+
	2	+	+	—	—
	3	+	+	—	—
	4	+	+	—	—
10^{-4}	1	+	+	+	+
	2	+	+	—	—
	3				
10^{-5}	1	+	+	+	±
	2	+	+	—	—
	3				
10^{-6}	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	—
	3				
10^{-7}	1	+	—	—	—
	2				
	3				
10^{-8}	1	+	—	—	—
	2	+	—	—	—
	3				
10^{-9}	1	—	—	—	—
	2	—	—	—	—
	3	—	—	—	—
10^{-10}	1	—	—	—	—
	2	—	—	—	—
10^{-11}	1	—	—	—	—
	2				

3. マウス脳内接種

Burnet, Stuart-Harris, Francis⁽⁸⁾ 等にならつて、マウスの脳内接種を試みたが、羊水、胎児脳乳剤のいずれを用いても陰性の成績で、一部死亡したものは Foxic reaction と思われ、継代が不能であつた。(第 4 表)

第3表 マウス脳内接種

AM ₆ -5 (HA=10240)			AM ₆ -1 の脳乳剤
10 ⁻¹	● ₂	● ₃	○
10 ⁻³	○	○	○
10 ⁻⁵	○	○	○
10 ⁻⁷	○	○	○
↓ 10% 脳乳剤			
			AM ₆ BM ₁
			AM ₆ BM ₂
			BM ₃
			BM ₄
			BM ₅
			BM ₆ (-)
i. c., i. p. 共に陰性			

4. 尿膜腔液および羊水中に出現したウイルスの羊膜腔内における態度

尿膜腔内継代された PR 8 株の尿膜腔液と羊水とをとり、羊膜腔内に接種した実験である。第4表で明らかなように、この両者の羊膜腔内に接種されたときの態度に差があり、第1には、尿膜腔液の場合には濃度の如何にかかわらず常に HA 価が CAF>AMF となつてゐるが、羊水の方は 10⁻² と 10⁻³ の間で CAF と AMF の大小が逆になつてゐる。第1表に既にあげたと同じような関係がみられる。第2には、羊水の接種をうけた場合、羊膜腔内に接種されているにもかかわらず尿膜腔液に 10⁻⁵ までウイルスが検出されるに反し、羊水の方は 10⁻³ までしか出ていない。第3には、CAF<AMF のところには胎児の出血、死亡がみとめられたことで、この第2と第3の現象は第2表と全く同じで、羊水中に含まれる変異株の量は非常に少ないことが判る。

しかもこの場合は、未だ羊膜腔内継代されてい

第4表 PR 8 株の漿尿液および羊水を羊膜腔内に接種した場合

	PR 8 (C.A.F. HA=1:48)		PR 8 (AM HA=1:4)		出血
	C.A.F.	A.M.F.	C.A.F.	A.M.F.	
10 ⁻¹ 1	32,768	> 2,048	4,096	< 16,384	+
2			32,768	< 65,536	
3					
10 ⁻² 1	16,384	= 16,384	1,024	< 1,600	+
2	65,536	> 16,384	4,096	< 16,384	
3	65,536	> 32,768	4,096	< 16,384	
10 ⁻³ 1			8,192	> 2,048	
2			2,048	> 0	
3					
10 ⁻⁴ 1	16,384	= 16,384	8,192	> 0	
2	65,536	> 32,768	128	> 0	
3	65,536	> 8,192			
10 ⁻⁵ 1			1,024	> 0	
2			0	0	
3			0	0	
10 ⁻⁶ 1	65,536	> 8,192	0	0	
2	65,536	> 4,096	0	0	
3					

い出発材料にあたるもので、これが第2表の実験を行つた第9代のもと同じ成績を示していることは、最初に尿膜腔内に接種をうけて羊水中に出現してきたウィルス中に既に変異株が混じて居り、しかもその後選択 (selection) による影響をうけていないのではないかとすることを考えさせる。

5. 卵感染価と血球凝集価

これまでの羊水の HA 価が異常に高い価を示していたが、この EID/HA をしらべたところ、第5表の示すような結果が得られた。このことから羊膜腔内におけるウィルスの増殖は特に incomplete growth を考える必要はないと考えられえ。

第5表 E. I. D. と HA 価

AM ₅ -1			
10 ⁻⁶	●	●	●
10 ⁻⁷	●	●	●
10 ⁻⁸	●	●	●×
10 ⁻⁹	●	●	●
10 ⁻¹⁰	○	○	○
10 ⁻¹¹	○	○	○
↓			
EID ₅₀ ≐9.5			∴ EID/HA≐5

6. 復元実験

羊膜腔内継代株をもとの漿尿膜腔内継代にもどした場合どうなるかをみたのが第6表である。死亡、出血は起らず、尿膜腔液中にウィルスが証明されるが、羊水には証明されないものもあつて、原株と全く同一と云うことは出来ないようである。しかしこの実験は繰り返して行つていないので、決定的な所見とは云えない。

第6表 復元実験

	材 料		HA 価	
			C.A.F.	A.M.F.
AM ₆ N ₁ -1	AM ₆ -8	10 ⁻³	8,192	0
2				
N ₂ -1	N ₁ -1	10 ⁻⁴	4,096	0
2			32,768	1,024
N ₃ -1	N ₂ -1	10 ⁻³	32,768	*0
2			1,024	0
N ₄ -1	N ₃ -1	10 ⁻²	8,192	0

* AM₆N₃-1 の羊水を尿膜腔内に原液を接種したところ感染しなかつた。

7. 変異株の抗原性

使用した株は PR 8, FM 1, Lee, NDV, AM₅-1, AM₆-4, AM₆N₃C で免疫血清はニワトリで作り、血球凝集抑制試験でしらべた。

第7表に示すように AM5-1 は原株や、第6表での復元実験をした株と差がなく、FM 1, Lee とは区別される。又、NDV, AVJ との試験も行つてみたが、明らかに区別されて、Contamination の疑はないものと考えられる。

ただ、問題は第3表で記した通り変異株が羊水中のウィルスのほんの一部にすぎないため、純粋な変異株の Clon をとらないことには血清学的異同の問題は決定出来ない。

8. O-D 相について

継代の色々な時期について O-D 相をしらべたと

第7表 HA 抑制試験

ウイルス	PR 8	AM ₅ -1	AM ₆ N ₃ C	FMI	Lee
血清					
PR 8	2560	1280	5120	320	80
AM ₆ -4	2560	1280	5120	320	80
AM ₆ N ₃ C	5120	2560	5120	640	160
ウイルス	AM ₆ -1	N. D. V.			
血清					
AM ₆ -4	2560	80			
N. D. V.	0	256			
H. V. J.	<40	<40			

第8表 O-D 相

ウイルス	PR 8	AM ₅ -2	AM ₅ -1	AM ₅ 8	AM ₇ -2	AM ₆ N ₁ C	AM ₆ N ₄ C
血 球							
ニ フ ト リ	8,192	81,920	102,400	12,800	51,200	4,096	8,192
モ ル	4,096	40,960	51,200	3,200	6,400	8,192	1,024
ニ フ ト リ / モ ル	2	2	2	4	8	$\frac{1}{2}$	8

ころ原株と同じ D 相を示していた。これも第8表と同じく変異株を選択してからでないことと決定出来ない。

論 議

尿膜腔内継代と羊膜腔内継代との卵の各部分におけるウィルスの分布状態が異なることは Köhler⁽³⁾, Burnet⁽⁸⁾⁽⁹⁾の報告しているところである。

しかしこれが単に接種部位の異なるためでないことは、実験4により明らかなように、羊膜腔内に出現したウィルスのある割合に尿膜腔内には見られない性状をもつた変異株が存在すること、また、実験1から羊膜腔内継代により胎児に出血性反応と死亡が不規則ながらみられることがわかった。

この出血および死亡が羊膜腔内でのウィルスの増殖が異常によく、その大量のウィルスによつて起るある種の中毒反応ではなからうかという問題が当然考えられる。しかしウィルスの量だけの問題でなく質の問題、すなわち存在する変異株によつて起るのであるということは実験1, 4の尿膜腔液を羊膜腔内に接種した場合と、羊水を羊膜腔内に接種した場合とから考えられる。

この変異株が羊水中のウィルスのごく一部にすぎないことは実験2, 4で示した。しかもこの両実験の比較から判るように、羊膜腔内継代を繰り返したことの効果は表われず、全活性ウィルス量に対する変異株の割合は殆ど変化していない。このことは

羊膜腔内に変異株に対して選択的に働くある種の機構が存在しないことを示している。

いいかえれば羊膜腔内におけるウィルスの増殖は、原株も変異株も殆ど同等に支持される、ということが出来よう。もし、そうなら、この変異株はどこから来たものであろうか。この問題を考えるにはどうしても限界稀釈による純粋なウィルス系を得て、変異株の獲得を再現してからでなければならない。われわれは限界稀釈によつて純系をとる実験を再三行つたがこの目的を達することができなかつたので変異株の由来を論議する手がかりが一つ欠けているのが遺憾である。

尿膜腔液のウィルスが羊膜腔内でのみ増殖して変異株が出来るか否かをしらべることが出来ればよいと思われるが、この実験も初代に既に羊膜腔から尿膜腔液中にウィルスが現れているため、当然逆の径路からすなわち尿膜腔から羊水中へのウィルスの出現があり、量の問題で初代では実験4に示されたようにウィルス量は多くても出血、死亡を示さず、羊水を羊膜腔内に接種された初代のものと著明な差を示したが、第2代ではほとんど両者に差がなくなつてしまい、尿膜腔液を羊膜腔内でのみ継代する実験は實際上不可能なわけである。

ただ羊膜腔内では、原株も変異株もその増殖が同等に支持される。と考えてよい前記の実験成績から、推論が許されるならば、変異株の由来は、尿膜腔内に接種されたウィルスが羊膜腔内に至る途中の

どこかにありそうだと考えている。

総 括

1. PR 8 株の尿膜腔内継代の際の羊水を接種材料として、羊膜腔内継代することによつて、胎児を出血、死亡させる変異株が存在することをみとめた。

2. このとき、異常に高い HA 価を示すが EID/HA の値が約 5 となり、incomplete growth の問題はある程度除外出来るものと考えられる。

3. 抗原性に関しては、この変異株と差はなく、また、ほかのウィルスの混入は否定出来るが、厳密には変異株を純粋にとつてからでないと決定出来ない。

4. O-D 相についても、原株と同じではあるが、同様の制約があてはまる。

5. マウスの脳内接種により脳炎を起させることは出来なかつた。

6. 原株を尿膜腔内に接種して得られる尿膜腔液と羊水とは、これが羊膜内に接種されることにより、異つた態度を示す。

7. 6 のこの所見は、羊膜腔内継代のものと同じで、従つて変異株は継代をうけない羊水中に出現していることがわかつた。

8. 羊水中の変異株は全活性ウィルス量のごく一部にすぎない。

9. 羊膜腔内継代では原株と変異株とは、その増殖は同等に支持される。

10. 変異株出現の機序については、限界稀釈を行つて純粋なウィルスを取り、その上で色々な実験を行わなければ明らかに出来ない。

なお、NDV. および HVJ の免疫血清を御分与下さつた家畜衛試大森博士および予研堀江博士の御厚意を謝し、川喜田教授の御指導と教室諸兄の御意見に感謝の意を表します。

本報告は 1957 年第 5 回 ウィルス学会総会に発表された。

文 献

- 1) Henle G., Deinhardt F. & Girardi A.: Cytolytic effects of mumps virus in tissue cultures of epithelial cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 87, 386-393, 1954.
- 2) Henle, G, Deinhardt F. & Girardi A.: Propagation and primary isolation of mumps virus in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 89, 556-560, 1955.
- 3) Granoff A.: Plaque formation with influenza strains. *Virology* 1, 252, 1956,
- 4) Köhler, H. K.: Über die pathogenese der Influenza Infektion des Hühnerembryo nach Virus Infektion in die Allantois höhle. *Zentralblatt für Bak., parasitenkunde, Infek., u. Hygiene*, 163, 92-117, 1955.
- 5) Burnet, F. M.: Influenza virus on the developing egg: 1. Changes associated with the development of an egg-passage strain of virus. *Brit. J. Exp. Path.*, 17, 282-293, 1936.
- 6) Stuart-Harris, C. H.: A neurotropic strains of human influenza virus. *Lancet*, No. 6027, 497-499, 1939.
- 7) Francis, T. & Moore, A. E.: A study of the neurotropic tendency in strains of the virus of epidemic influenza. *J. Exp. Med.*, 72, 817-828, 1940.
- 8) Burnet, F. M.: Influenza virus infections of the chick embryo by the amniotic route. 1. General character of the infections. *Australian J. Exp. Biol. & Med. Sci.*, 18, 353-360, 1940.
- 9) Burnet, F. M. & Foley, M.: Influenza virus infections of the chick embryo by the amniotic route 3. Changes in the activity of influenza virus on continued amniotic passage. *Australisn J. Exp. Biol. & Med. Sci.*, 19, 101-105, 1941.