

スモン調査研究協議会研究報告書

No.3

昭和 45 年度病原班研究報告

昭和 46 年 3 月

スモン調査研究協議会

目 次

序	1
SMONにおける Echo 21 型ウイルスの役割	新宮正久 3
SMON患者血清の Echo 21 型ウイルスに対する補体要求性中和抗体について	原 稔 ほか 11
スモン患者の Echo 21 型ウイルスに対する補体要求性中和抗体について	上田重晴 ほか 14
SMON患者血清のエンテロウイルス抗体保有状況の調査研究	多ヶ谷 勇 18
北海道における SMON の病原に関する研究	飯田広夫 ほか 25
SMON のウイルス学的研究	井上幸重 ほか 31
SMON 病原の電顕的観察	東 昇 43
〔付〕 SMON 病原のネガティブ染色の電子顕微鏡的研究	東 昇 45
BAT-6 細胞に関する追試実験成績	甲野礼作 ほか 49
スモン患者よりのウイルス分離の試み	奥野良臣 ほか 54
スモンのウイルス学的検討	永田育也 ほか 58
培養細胞による病原分離の試み	俵 寿太郎 ほか 73
スモン研究班報告	石田名香雄 ほか 81
SMON 患者の舌苔および糞便よりの Mycoplasma の検出	本間 遜 ほか 83
SMON 患者由来マイコプラズマによる患者血清反応	富山哲雄 93
スモン患者舌よりのマイコプラズマの分離	中村昌弘 98
SMON 患者材料よりのマイコプラズマ分離の試み	甲野礼作 ほか 103

BAT細胞におけるMycoplasmaの汚染	尾形 学ほか	107
岡山県井原市民病院入院SMON患者の細菌血清学的検査成績		
1. Salmonella infantisを分離した1死亡例を含む大便の細菌学的検査	中谷林太郎 ほか	117
岡山県SMON患者の細菌血清学的検査成績		
2. サルモネラ・赤痢菌に対する血清凝集素価	中谷林太郎 ほか	122
SMON患者における細菌血清学的検索	小沢 教 ほか	130
北大阪地区SMON患者の細菌血清学的検索	三輪谷俊夫	145
スモン患者の腸内細菌叢とキノホルム	中谷林太郎 ほか	153
SMON患者の緑尿および緑便に含まれる緑色物質の本態	田村 義 蔵	159
SMON患者の緑色舌苔からのキノホルムの検出	田村 善 蔵	162
生体組織よりキノホルム検出の試み 蛍光比色法その他一、二の方法	上田 喜 一 ほか	164
キノホルムグルクロナイドの合成およびその性状	田村 善 蔵	170
血清中の非抱合型キノホルムの定量	田村 善 蔵	173
生体試料からの非抱合型キノホルムの微量分析	田村 善 蔵	176
SMON患者の臓器および組織へのキノホルムの貯留について	田村 善 蔵 ほか	179
SMON患者のイソケットピン酸負荷試験	田村 善 蔵 ほか	181
マウスの抗ヒツジ赤血球抗体産生に及ぼすキノホルムの影響	松橋 直 ほか	184
キノホルムの毒性に関する研究	池田良雄 ほか	190
キノホルム経口投与による猿の両下肢マヒ	高橋理明 ほか	201
スモン患者の臓器、尿、尿および緑色舌苔中の重金属測定	池田良雄 ほか	207
会議開催状況及び会員名簿		215

序

昭和45年11月スモン調査研究協議会研究報告書第1集を発刊してから約半々年、臨床、病原、病理の各班の研究報告書を相次いで刊行するに至つたことは、会の世話役として大変喜ばしいことである。

さて昭和45年度は「スモンの病因と治療に関する特別研究」に対し、厚生科学特別研究費5,000万円が認められ、引続きその研究が調査研究協議会に委託された。

調査研究協議会の研究方針は、原因不明疾患の研究の常道によつてmulti-disciplinaryの原則に従い、可能な限り、また考え得る限り各方面から、それぞれの専門家の手によつて、アプローチを試みたわけである。

従つて研究班員の数も、昭和44年度の方に対し、23名が新たに追加され、総計64名となつた。

これら研究班員各位の問題解決に対する熱意と努力の結果として、スモンの病因究明に対する多くの有力な手掛りが、昭和45年度の研究から生れてきた。この網にかかつた最も大きな魚はキノホルムであるといえよう。とくに、調査研究協議会の研究成果に基いて、昭和45年9月8日キノホルム発売中止の処置が、政府によつて行われてからスモン患者の発生が激減をみたことは特筆しなくてはならない。

もとより現時点においてはキノホルムを原因と断定するのは時期尚早ではあるが、スモン発症に対する影響はもはや何人も否定できないと思われる。しかしなおウイルス、マイコプラズマ、腸内細菌などの微生物因子や農薬の影響などにも考慮を払いつつ研究を推進しなくてはならない。

病因研究の華々しさに対比して、治療研究の成果が少ないのは遺憾であるが、事の性質上止むを得ない面がある。しかし、少しずつではあるが、地道な努力が治療やレハビリテーションの改善に払われ、成果が現われつつある。

ことに昭和44年9月2日スモン調査研究協議会発足以来、昭和45年度までの臨床、病原、病理研究成果のあゆみを今回の第2、3、4集にまとめ世に送る次第である。

昭和46年3月

スモン調査研究協議会

会長 甲 野 礼 作

SMONにおけるECHO 21型ウイルスの役割

新宮正久（久留米大学医学部ウイルス学講座）

I 緒 言

SMONの病因に関しては中毒説，アレルギー説，代謝障害説，ビタミン欠乏説，感染説があるが，次のような理由から感染性因子特にウイルスの存在が最も考えられる。

- 1) 月別発生をみると6月から9月にかけて患者が多発するということ。
- 2) 流行地があるということ。しかも，この流行は3～4年で終わり，他地区に移るということ。
- 3) 医療関係者に患者が多いということ。
- 4) 浸染度前進現象がみられることがあるということ。⁽¹⁾
- 5) 家族集積性が約20%にみられるということ。⁽²⁾
- 6) 家族内2次患者発生間隔が約2.5ヶ月であるということ。
- 7) 院内発生がみられることがあること。
- 8) SMON患者末梢リンパ球のPHAによるBlastoid Formationの低下がみられるということ。⁽³⁾ これはウイルス性疾患の傍証になると考えられる。
- 9) SMON患者のツペリクリン反応の陰性化がみられるということ。インフルエンザ，麻疹，ポリオ，風疹等のウイルス性疾患の際にしばしば観察される現象から，これもウイルス性疾患の傍証になると考えられる。

しかし，これがウイルス性疾患だとしても単純なる感染症とは考えがたく，むしろ，ウイルスは引き金であって免疫学的機序が発病機序に重要な役割を果すものと考えられる。

著者はSMONの病因について，次のような成績の積み重ねから，病原としてECHO 21型ウイルスを，発病機序としてはECHO 21型ウイルス初感染によるものではなく，再感染をうけた際に発病するという，いわば，特定の神経組織で起こるアレルギー反応であることを主張してきた。^{(5)～(9)}

- 1) かって，SMON患者材料からECHO 21型ウイルスを分離した。しかし，この分離率は高いものではなく，諸条件を揃えた場合でも14%の分離率であった。これは他のウイルス病に比して極めて低いものである。この分離率の低いことは発病機序から説明することができると思われる。
- 2) SMON患者血清中に発病初期，腹部症状出現後1カ月以内にIgMを主とするECHO 21型ウイルスに対する中和抗体を証明することができる。また，SMON患者の80%に神経症状発現時か

ら3ヵ月以内は高いECHO 21型ウイルスに対する補体要求性中和抗体を血清中に、あるいは髄液中に証明することができる。

- 3) 本症患者の同一症例から1カ年以上にわたり数回採血した16例の血清について、補体要求性中和抗体を測定してみると、神経症状の再燃時には補体要求性中和抗体が著明に上昇している。
- 4) SMON流行地(釧路, 室蘭, 呉), 非流行地(防府, 山口, 門司, 久留米, 大村, 宮崎, 日南)の健康人血清1800例をほぼ同時期に集め、ECHO 21型ウイルスに対する中和抗体保有状況を調査したが、本症の流行地は非流行地に比して抗体保有率が高い。
- 5) 最近、わが国住民のECHO 21型ウイルスに対する中和抗体保有率が高くなってきつつある。例えば、九州地方では1964年には40~44%であったものが、1970年には60~70%となり6年間で20~26%も抗体保有率の上昇がみられる。

本論文では、ECHO 21型ウイルス粒子と神経組織との間に共通抗原が存在すること。ECHO 21型ウイルスに対して高い抗体価を維持させることにより、サルにSMON様症状をおこさせることに成功したので、これらの成績についてのべた。

II 実験材料及び方法

モルモット：アレルギー性脳炎を起すに適切なモルモットとして白黒茶ブチのものを特に用意した。

サル：ブタオザル及び日本ザルを用いた。

ECHO 21型ウイルス：prototypeであるFarina株を用いた。

神経組織：ヒト及びカニクイザルの神経組織を用いた。

中和抗体価，補体要求性中和抗体価の測定：既報の方法に準じて行った。⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾

共通抗原を検索する手技：in vitro cell migration inhibition test及びECHO 21型ウイルス免疫血清中の抗体が神経組織乳剤に吸着するか否かを調べる方法によった。

III 実験成績

a) ECHO 21型ウイルスと神経組織との間に存在する共通抗原：

サルを用いてECHOウイルス各型の抗血清を作製する仕事が、わが国でも米国でも行なわれたが、このECHO 21型ウイルスはいずれも最も抗体価の低い抗血清しか得ることができていない。また、ECHO 21型ウイルス髄膜炎患者において、ウイルスが髄液から分離されているにもかかわらず、抗体価の上昇が認められなかったという報告も2~3みることができる。これは、ECHO 21型ウイルス粒子構成成分と生体組織のあるものが類似の抗原性を示しているために、よい抗原とはなりえないのではないかと想像される。そこで、もし、このようなウイルスに対して抗体が高力価に生体内にできたとすると、その抗体は自己の特定の組織を障害する抗体ともなると考えられる。

ヒトの神経白質組織と完全アジュバントを混合してモルモットの皮内に注射すると、約2週間後にア

アレルギー性脳炎を起こして斃れるが、その際血清中にECHO 21型ウイルスに対する補体要求性中和抗体を証明することができる。一方、モルモットにECHO 21型ウイルスと完全アジュバントを混合して免疫を行ない約3週間後に腹腔内に流動パラフィンを注入し、游出してくる腹腔内細胞を集めて、*in vitro cell migration*を行なうと、この*cell migration*はECHO 21型ウイルスの添加によって阻止されるが、ヒトの神経白質組織抽出液を与えても阻止することができる。これらの知見は、ECHO 21型ウイルスと神経白質との間に共通抗原の存在を示すものであろう。

次に体液性免疫の面から検討を加えた。ECHO 21型ウイルスで免疫したサル免疫血清と神経組織乳剤とを混和し、37°C1時間保つたのち、残存する抗体量を中和抗体価で測定した。使用した神経組織は延髄、脊髄、大脳、小脳、交感神経、後根神経節、視神経及び髄膜である。特に脊髄については部位による抗原物質含有量の差を考慮して、脊髄を13等分して検討を加えた。脊髄特に胸髄から腰髄にかけてECHO 21型ウイルスと同一の抗原性を示すものが存在した。又、小脳及び交感神経にも存在した。一方、大脳、後根神経節、視神経、髄膜には証明しえなかった。更に脊髄組織を0.32Mと0.8Mの蔗糖液を用いて、超遠心法にて分画を試みた。このミエリン画分にECHO 21型ウイルスと共通抗原を証明することができた。

b) サルを用いたSMONの動物実験：

サルにECHO 21型ウイルスを与えて高い抗体価を維持させるべく努力した。サル6頭を用いてウイルス接種法をかえて実験を行なったが、 5×10^8 のECHO 21型ウイルスと完全アジュバントを筋肉中に注射し、3週間後より毎日 10^8 のウイルスの注射を行なった10才以上(ヒトの年齢にして30才以上)の老令のブタオザル *Macaca nemestrina*に50,000倍以上の高い補体要求性中和抗体を長期にわたり接続させることに成功した。このサルは50,000倍以上の高い抗体価を5週間持続した頃から下肢の異常を示し、約9週目には平衡感覚障害、膀胱直腸障害、軟便、大腿中央部以下の痛覚麻痺、下肢趾の冷却感が強いとみられる症状を呈してきた。これらの所見は、いずれもヒトのSMONと極めて類似する症状である。初回免疫後17週目の剖検によれば、腰髄部の側索、特に後脊髄小脳路(Flechsig)および中隔縁束(Flechsig)に薄染色性をみとめた。また、後根神経節細胞の膨化、変性萎縮を認めた。全く同一の条件下で免疫したが、抗体価が3,000倍にしか上昇しなかった日本ザルには、このような所見は認めなかった。また、免疫方法の異なった、しかも抗体価が1,000倍程度にしか上昇しなかった他の4頭のサルにも、このような所見は認められなかった。腸管の組織標本においては、小腸上部から大腸にわたる広範囲な腸管にプラズマ細胞を主とする粘膜への細胞浸潤、一部は筋層におよぶ慢性の炎症が認められた。しかし、この実験では抗体価を高く、しかも長く持続させるために 10^8 のウイルスを毎日連続して与えるという極めて不自然な操作が行われている。このため、注射部位の末梢神経組織を損傷して、これが抗原となり、このため、神経症状が出現したのではないかという危具が残る。そこでECHO 21型ウイルスをDEAEカラムクロマト超遠心法を用いて精製濃縮を行い $10^{10.5}$ TCD50のウイルスを用い、この濃縮ウイルスと完全アジュバントを混和

して体重 8.7 Kg のブタオザル (♂) に注射した。また、対照実験として ECHO 21 型ウイルスの宿主細胞である FL 細胞を同一の精製濃縮操作を行い、完全アジュバントと混合し、体重 5 Kg のブタオザル (♂) に接種した。ウイルス接種ザルは接種後 16 日目に前述のような下肢麻痺が出現したため、剖検を行なったが、前述の病理所見と同様の脊髄の後脊髄小脳路 (Flechsig) の異染色性、脊髄神経節細胞の膨化、変性萎縮がみられ、小腸および大腸における粘膜脱落、プラズマ細胞浸潤、肉芽形成等が認められた。一方、対照の FL 細胞接種ザルには異常を認めず、接種後 56 日目に剖検したが、病理組織学的にも変化を認めなかった。

一方、発症したザルの血清について ECHO 21 型ウイルスに対する中和抗体と補体要求性中和抗体を測定したが、極めて高い補体要求性中和抗体を証明することができ、又、中和抗体価より 8 倍以上も高いことから、SMON 患者にみられた血清学的特長と一致した。

IV 総括並びに考按

SMON の病因について、キノホルム中毒説が注目されているが、次にあげる点については説明がなお必要であると考えられる。

- 1) SMON 流行地があり、しかも、この流行地では 3~4 年で非流行地となること、これは釧路、徳島、室蘭、大牟田等ですでに経験済みである。もしキノホルムに原因があるとすれば、その薬剤を好んで投与する医師は更につづけて投薬するために、常に患者が多発せねばならない。
- 2) SMON 患者は男性より女性に多くみられるということ。橋本氏病、リウマチ性関節炎や紅斑性狼瘡のような自己免疫疾患では男性より女性に多いことが知られていることから、これらの疾患と同じ発病機序が最も考え易い。
- 3) SMON 患者の既往歴に虫垂切除が多いこと。虫垂切除者は正常人すなわち非切除者に比して 8 倍も SMON にかかり易いといわれている。これは虫垂が I g M 抗体産生に関与した中樞リンパ組織であるという花岡博士⁽¹²⁾の研究と考え合わせると SMON の発病機序に抗体産生の異常をもたらす条件や、免疫学的発病機序を考えねばならない。
- 4) すでに国体開催地や水害罹災地においてキノホルム製剤が県衛生部で一括購入されてブランケット投与が広く行なわれてきているが、何故 SMON 発生の多発地にならないのであろうか。
- 5) 外国でのキノホルム中毒の症例、例えば Lancet にみられる Berggren 等⁽¹³⁾、Etheridge 等⁽¹⁴⁾の acrodermatitis enteropathica に用いられた中毒例はわが国の SMON と同一疾患とはとても考えられない。
- 6) キノホルムの動物実験といわれている例の大多数はヒトに適用できない程の大量の薬剤が、しかも経口投与以外の方法でなされている。

キノホルムは古くから広く用いられている薬剤であり、もしこの副作用が問題となるとすれば、この薬剤の神経毒性が症状を修飾しているにすぎないのではないだろうか。

むしろ従来問題にならなかったものが最近問題になったことは、キノホルムの副作用を増加させている生体側にこそ問題があるとも考えられる。すでに本邦におけるECHO 21型ウイルスの浸淫は近年、特に広範囲にしかも高度になっており、このウイルスに対する補体要求性抗体は脊髄及び交感神経の神経白質ことにミエリンに対する抗体となることを細胞性免疫と体液性免疫の両面から指摘した。

今までの研究を総括する意味でECHO 21型ウイルスのSMONにおける役割をまとめてみよう。

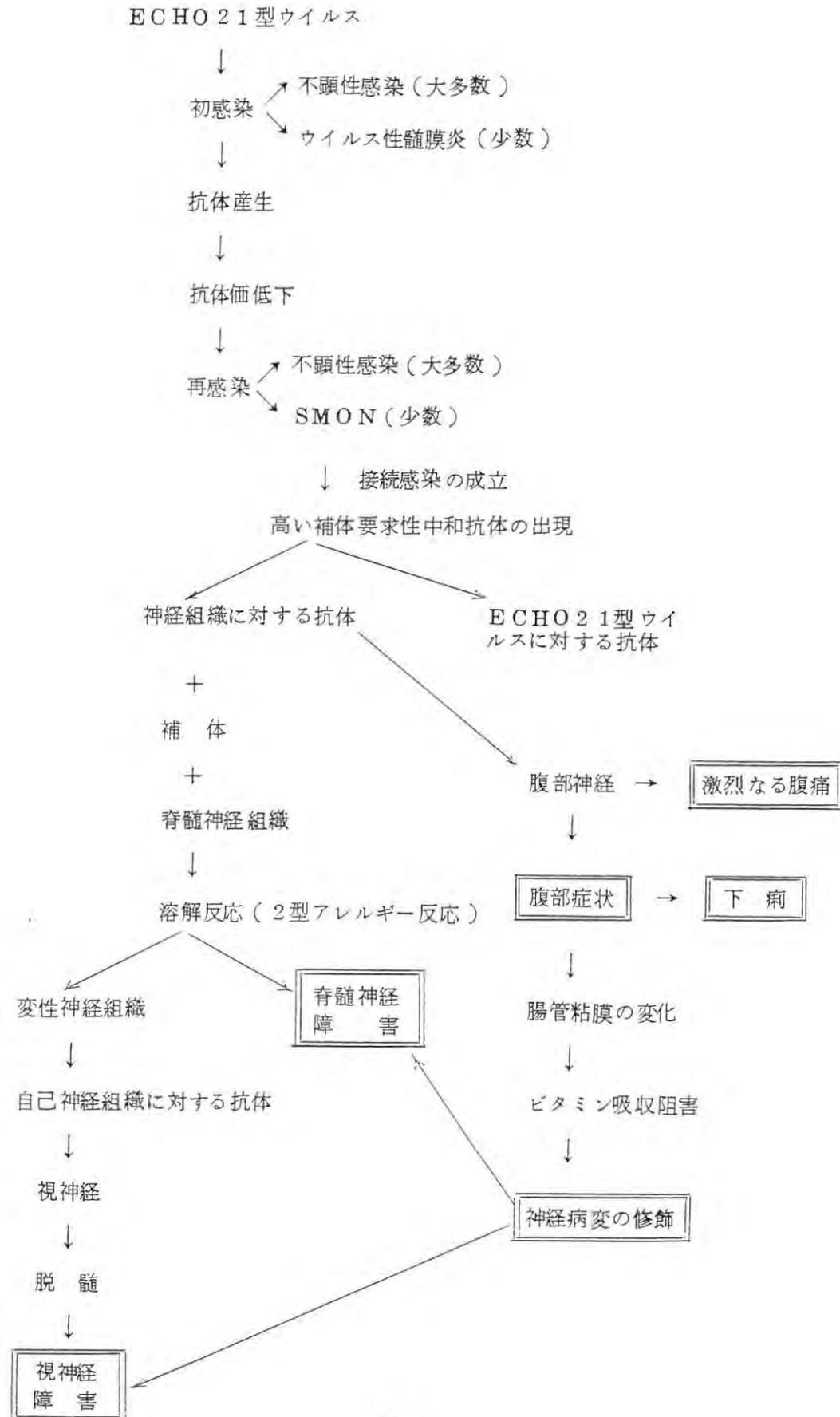
ECHO 21型ウイルスの初感染は多くの場合、幼児期からみられ、他の腸管系ウイルスに比して感染率は低いが過半数の人は30才までにこのウイルスの洗礼をうける。この際、多くの人は不顕性感染に終わり、なんら発病することなく、ECHO 21型ウイルスに対する抗体を獲得する。少数の人は、このウイルスによってウイルス性髄膜炎を起こす人もある。

しかし、いずれの場合でも抗体産生がみられる。長い年月がたち、この幼児が次第に成長するにつれ、抗体価は低下してくる。この時、再感染をうけると多くの人はbooster効果で抗体が再び上昇して不顕性感染に終わるが、特定の人は体内に残っていた抗体がウイルス増殖を許す程度であり、しかも増殖したウイルスとは完全に結合せず持続感染のような型をとった時、SMONという病像を形成するものと考えたい。

この再感染によって出現した持続感染は高い補体要求性中和抗体を出現させ、この抗体はECHO 21型ウイルスに対する抗体であるが、一方、自己の神経組織の特定部分に対する抗体ともなり、この抗体は補体の関与によって特定の神経組織を障害する。この障害はいわゆるtype2のallergic reactionによるものであろう。

腹部神経を障害すれば腹部症状を呈し、激烈なる腹痛、下痢となり、腸管粘膜の病理変化をもたらし、腸管よりのビタミン吸収障害に働けば神経病変の修飾をもたらすことも考えられるし、又異常吸収が増加すれば、キノホルムの吸収が増加することも考えられる。脊髄神経の障害は神経症状を呈し、変性神経組織はさらに抗原となり、自己免疫機序によって脊髄神経の障害を修飾し、さらには視神経の脱髄をもたらし、視神経障害にまで進展するものと考えたい。

図1 SMONの発病機序についての考え方



V 結 論

ECHO 21 型ウイルス粒子と神経組織ことにミエリン画分に共通抗原の存在を体液性免疫と細胞性免疫の両面から指摘することができた。ゆえに、ECHO 21 型ウイルスに対して高い抗体が出現することは自己の神経組織、特にミエリンを障害する抗体となると考えられる。

サルに ECHO 21 型ウイルスとアジュバントを注射し、高い補体要求性抗体を長く持続させることにより、下肢の知覚障害を伴った麻痺を起すことに成功した。又、この発症したサルの血清にみられた抗体像は SMON 患者にみられる血清学的特長と一致した。

SMON における ECHO 21 型ウイルスの役割について今迄の研究成果をまとめ、発病機序についての考察を行った。

参 考 文 献

- (1) 緒方正名，他：岡山県で発生した腹部症状を伴う非特性脳脊髄炎症（SMON）の疫学，日本公衛誌，16：687，1969
- (2) 島田宣浩，他：腹部症状を伴う脳脊髄炎症（SMON）の疫学的研究，岡山県井原市における観察，日伝染会誌，43：99，1969
- (8) 伊藤康彦，松岡幸彦：SMON 患者末梢リンパ球の PHA による Blastoid - formation，医学のあゆみ，74：163，1970
- (4) 近藤喜代太郎，椿忠雄：いわゆる腹部症状を伴う脳脊髄炎症と虫垂切除，臨床神経学，8：143，1968
- (5) 新宮正久，他：腹部症状に続発する脊髄炎の病原に関する研究，日伝染会誌，39：139，1965
- (6) 新宮正久：腹部症状に続発する脊髄炎の発病機序に関する研究，日伝染会誌，39：442，1965
- (7) 新宮正久，他：腹部症状に続発する脊髄炎の近年増加に対する疫学的考察，日伝染会誌，40：247，1966
- (8) 新宮正久，他：腹部症状に続発する脊髄炎の血清疫学，日伝染会誌，40：454，1967
- (9) 新宮正久：SMON 病因論 SMON における ECHO 21 型ウイルスの役割り，最近医学，24：2407，1969
- (10) 野見山重之：ECHO 21 型ウイルスの基礎的性状に関する研究，久留米医誌，33：1413-1424，昭45
- (11) 田中義博：ECHO 21 型ウイルスの免疫学的性状に関する研究，久留米医誌，

33 : 1425 - 1439 , 昭45

- (12) 花岡正男：虫垂と免疫　その免疫中枢としての可能性，科学，39：574 - 581，1969
- (13) L Berggren & O.Hansson：Treating acrodermatitis enteropathica，
Lancet，I，52，1966
- (14) James E. Etheridge Jr. and G.T. Stewart：Treating acrodermatitis
enteropathica. Lancet，I，261 - 262　1966

SMON患者血清のEcho 21型ウイルス に対する補体要求性中和抗体について

原 稔，多ヶ谷 勇（予研，腸内ウイルス部）

I はじめに

久留米大の新宮博士はSMON病の原因としてEcho 21型ウイルスの再感染アレルギー説を主張している。Echo 21型ウイルス説の根拠として、分離率は低いがSMON患者からEcho 21型ウイルスを分離したこと、SMON流行地と非流行地の正常人血清のEcho 21型ウイルスに対する中和抗体保有状況調査によれば、SMON流行地は非流行地に較べてEcho 21型ウイルスの高度の侵淫を示していること等をあげている。

また、SMON患者のEcho 21型ウイルスに対する補体要求性中和抗体価は、神経症状発現からかなり期日を経たものでも中和抗体価より高く、通常この抗体価の比は8倍以上であり、これは本症の血清学的診断に役立てることが出来る。この診断基準として現在2つの条件を用いている。その1つは中和抗体価と補体要求性中和抗体価の比が8倍以上のものであり、他の1つは128倍以上の補体要求性中和抗体価を証明するものである。そこで臨床診断とこの血清学的診断を対比してみると、1つ以上の条件を満足するものは、血清採取の病日を考慮しないで集めた患者血清についてみると、SMONの診断名の場合は83%、SMON疑症では53%、その他の診断名がついている場合は24%であった。これをさらに神経症状発見3ヶ月以内に血清を採取した患者のみに限定してみると、スモンの診断名の場合は95%、スモン疑症では70%が合致を示した。この血清学的診断法はスモンの診断に役立てることが可能である。と述べている。¹⁾

私どもは例数は少ないがSMONと診断された患者血清の補体要求性中和抗体価について、可能な限り久留米大の方法に忠実に従い、厳密な意味での追試を行ったので、その結果について報告する。

II 材料及び方法

患者血清はいずれも岡山県のもので、患者の年齢、性別、発病及び採血年月日については〔表〕に記載したとおりで、井原地区から7名、うち2名は2回採血の計9血清、湯原地区から5名、うち1名は2回採血で計6血清の合計12名の15血清で、神経症状発現から採血までの期間は短いもので2ヶ月、長いものでは23ヶ月であった。

使用したウイルス及び細胞はいずれも久留米大より分与を受けたもので、ウイルスは標準Echo 21

型 Farina P-10 株，細胞は FL 細胞 HS 株である。培養液は久留米大処方による FL 細胞 HS 株のための組織培養液（増殖用として 10% 仔牛血清加 Melnick-Hanks 液，維持用として重曹を除いた 1% スキムミルク加 Melnick-Earle 液）を使用した。

補体要求性中和抗体の測定法も大略久留米大の方法〔血清 0.4 ml を 4 倍希釈し 56°C 30 分非動化後，4 倍段階で 1024 倍まで希釈し，各段階希釈液を 0.5 ml ずつ 2 本の tube に分注し（原法では 0.6 ml ずつ分注とあるが，1.2 ml から 0.6 ml ずつ 2 本はとれない）一列を対照列，一列を補体例とし，対照列には Mg^{++} 食塩水 0.25 ml（原法では 0.3 ml）を各 tube に加え，補体列にはあらかじめ nonspecific inhibitor の含まれていないことを確めた新鮮モルモット血清を 10 倍に Mg^{++} 食塩水で希釈したものを 0.25 ml（原法では 0.3 ml）加える。更にウイルス液（0.1 ml に 200 TCD₅₀ ウイルス含有）を 0.25 ml（原法では 0.3 ml）ずつそれぞれの tube に加えてよく混和し，37°C 1 時間保ち，その 0.8 ml をとり，0.2 ml ずつ 4 本の FL tube に接種する。対照ウイルス液はまず 2 倍に希釈し，これを原液として 10¹ より 10⁴ まで希釈し，2 列の control virus titration を行う。一列は正常の FL tube で他の一列は前述の補体液を更に 2 倍に希釈し，各 tube に 0.1 ml ずつ加えたものである。0.1 ml 接種とする。FL tube は 4～5 日目に titer が 100 TCD₅₀ を示し，この時の血清の中和抗体価を 50% 中和点で判定する。〕に従った。

III 結 果

それぞれの SMON 患者血清の中和抗体価及び補体要求性中和抗体価の成績は〔表〕に記載したとおりである。

〔表〕

地区	血清番号	年令	性	発病年月日		採血年月日	神経症状発現からの月数	中和抗体価	補体要求性中和抗体価	備考
				腹部	神経					
井原	408	35	F	44. 4.12	44. 4.23	44.6.25	2	<4	8	408 と同一人
	409	〃	〃	〃	〃	44.7.23	3	<4	6	
	415	18	F	44. 6. 7		44.8.18	(2)*	<4	<4	
	442	57	F	43. 6.		44.6.20	(12)	8	16	
	451	35	F	43. 3.	43.12.17	44.6.20	6	6	8	451 と同一人
	452	〃	〃	〃	〃	44.8.20	8	6	8	
	456	50	F	44. 4.15	44. 5.22	44.8.18	3	<4	<4	
	460	62	M	44. 5.13	44. 5.18	44.8.14	3	<4	<4	
	468	27	F	43.11.20	44. 1.29	44.6.20	6	<4	8	
湯原	517	23	F	45. 3.		45.6.	(3)	<4	8	530 と同一人
	518	24	M	44.10. 3	44.10. 3	45.6.	9	<4	<4	
	530	31	M	45. 4.		45.8.	(4)	<4	<4	
	544	〃	〃	〃		45.9.	(5)	<4	<4	
	535	44	F	43. 8.30	43. 9.21	45.8.	23	32	128	
	551	71	F	44. 8.22	44. 9.23	45.9.	12	<4	8	

* カッコ内は腹部症状発現からの月数

中和抗体価では4倍以上抗体保有者は12名中3名(25%)で、最高32倍であり、9名は4倍以下を示した。

補体要求性中和抗体価では4倍以上抗体保有者は12名中7名(58%)で、最高128倍を示し、補体要求性中和抗体価の方が中和抗体価よりやや高い値を示したものが7名あったが、その差は最高が4倍で殆んどは2倍前後であり8倍以上のひらきのあるものはなかった。残る5名(42%)は中和抗体価も補体要求性中和抗体価もともに4倍以下で、そのうち3名(血清番号408, 456, 460)は神経症状発現から3ヶ月以内の血清であった。同一患者で2回採血(間隔1~2ヶ月)した3組の血清では、採血時期による抗体価の差は認められなかった。

IV 考察ならびにまとめ

以上の結果を新宮博士のSMON診断基準の条件に当てはめてみると、第1の中和抗体価と補体要求性中和抗体価の比が8倍以上という例は1例もなく、第2の128倍以上の補体要求性中和抗体価を証明するものは、12例中1例のおずか8.3%であった。このように、臨床診断と血清学的診断と対比して、1つ以上の条件を満足するものは、血清採取の病日を考慮しないで集めた患者血清についてみると、SMONの診断名の場合は83%が合致するという新宮博士の成績を肯定することは出来なかった。

また、中和抗体価のみについてみても、私どもの調べた血清は数は少いがすべてSMON流行地の患者のものであるという点から考えて、新宮博士の述べている、SMON流行地の正常人血清の4倍以上の抗体保有率(例えば釧路9.7%, 呉8.7%)は異常に高いと考えざるをえない。²⁾

なお、本実験に用いたFarina P-10株、FL細胞HS株の系を使って、WHO標準馬血清の中和抗体価を測定した結果は8,090倍であった。私どもがMK継代したFarina MK-30株でMK細胞で測定した標準血清の中和抗体価は10,240倍、血清番号535についての価は64倍を示し、Farina P-10株、FL細胞HS株の系で行った場合とほぼ等しい成績がえられた。

文 献

- 1) 新宮正久; 病因論— SMONにおけるEcho21型ウイルスの役割, 最新医学24, 2407-2411, 1969
- 2) 新宮正久, 他; 腹部症状に続発する脊髄炎の血清疫学, 日本伝染病学会誌 40, 454-459, 1967

スモン患者の Echo 21 型ウイルス に対する補体要求性中和抗体について

上田重晴 高橋理明 奥野良臣(阪大微研)

I はじめに

久留米医大の新宮博士はスモン病の原因として Echo 21 型ウイルスの再感染アレルギー説を主張して居り、その中でスモン患者の 80% は神経症状発現時から 3 ヶ月以内では Echo 21 型ウイルスに対し高い補体要求性中和抗体価を示し、中和抗体価に比し 8 倍以上高い値を示すことを報告している。私共は北大阪地区の大手前病院、新千里病院からスモン患者血清の提供を受け、Echo 21 型ウイルスに対する中和抗体価及び補体要求性中和抗体価を測定したので報告する。

II 実験材料及び方法

1. ウイルス

大阪府立公衆衛生研究所より分与を受けた Echo 21 型ウイルスを用いた。同ウイルスは健康児糞便よりカニクイ猿腎細胞を用いて分離、同定され、FL細胞で数代継代されたものである。ウイルス液の FL細胞での感染価は $10^{7.5}$ TCID₅₀/0.1 ml であった。

2. 細胞

当研究室に於てクローニングした Echo 21 型ウイルスに良好な感受性を示す FL細胞 H 2 株を用いた。10% 仔牛血清 (CS) 加 Eagle's MEM (E-MEM) に浮遊させた 15×10^4 コ/ml の細胞を 1 ml づつ 13 mm × 90 mm の tube に分散し 2 日後に使用した。

3. ウイルス希釈液

最終濃度 0.5% ゲラチン加 Dulbecco's PBS(-) (pH 7.0) を用いた。

4. 患者血清希釈液

E-MEM (pH 7.0) を用いた。

5. 補体

新鮮モルモット血清 (10 匹の血清をプールした) を Mg⁺⁺ 食塩水で 10 倍に希釈したものを補体として用いた。補体は中和反応に用いる前に nonspecific inhibitor の含まれていないことを確かめた。

6. 患者血清

患者血清はE. MEMで4倍に希釈し, 56°C 30分加熱, 非動化したのち中和反応に用いた。

7. 中和反応

1.2 mlのE. MEMを入れた tubeの中で前述の4倍希釈患者血清0.4 mlを移す方法で4倍段階希釈し, それを0.6 mlづつ2列の tubeに分けた。1列を対照列, 他の1列を補体列とし, 対照列にはMg⁺⁺食塩水0.3 mlを, 補体列には補体0.3 mlを加えた。次にウイルス液(200 TCID₅₀/0.1 ml)を0.3 mlづつ両列の tubeに加えよく振とう混和したのち, 37°Cに1時間保った。ついで各希釈について0.2 mlづつ各列4本づつのFL tubeに接種し, 37°C 1時間ウイルス吸着処理後2% CS加 E. MEMを1 mlづつ加えて37°Cに incubate しCPEの出現を待った。

中和反応に用いたウイルス液は0.5%ゲラチン加PBS(-)を用いて2倍に希釈し, これを原液として10¹より10⁴まで希釈し, 2列の challenge virus titration を行い実際の感染価を測定した。1列は対照でMg⁺⁺食塩水0.1 mlづつを加えたFL tubeであり, 他の1列は前述の補体をMg⁺⁺食塩水で更に2倍希釈したものを0.1 mlづつ加えたFL tubeである。challenge virus は各希釈について0.1 mlづつ接種した。4~5日間37°Cにて incubate した後, challenge virusの titerが100 TCID₅₀を示した時に被験血清の中和抗体価を50%中和点で測定した。

III 成績

別表の通りである。

表 スモン患者血清のEcho 21ウイルス中和抗体価

ニ	年令	性	発症年月日	採血年月日	中和抗体価	補体要求性 中和抗体価
* 1.	32	F	44. 7. 6	44.11. 9	16	16
* 2.	61	F	44. 9.	44.11. 9	4	4
* 3.	22	F	44. 8.	44.11. 9	4	4
* 4.	56	M	44. 9.	〃	<4	<4
* 5.	31	F	44. 8.	〃	16	16
* 6.	49	F	44. 8.	〃	4	4
* 7.	27	F	44. 8.25	〃	64	256
* 8.	75	M	44. 9.	〃	16	16
* 9.	27	M	44. 9.	〃	16	16
* 10.	20	F	44. 5.	〃	<4	<4
* 11.	35	F	44. 9.	44.12.25	<4	<4

	年齢	性	発症年月日	採血年月日	中和抗体価	補体要求性 中和抗体価
*12.	42	F	44.1.0	44.12.25	16	16
13.	46	F	44. 1.	44.11. 9	16	16
14.	23	F	43. 7.	//	16	64
15.	38	F	44. 4.	//	4	4
16.	38	F	44. 1.	//	64	64
17.	59	F	43.1.1.	//	4	16
18.	60	F	43.1.0.	//	16	16
19.	42	F	43.1.2.	//	16	16
20.	36	M	41. 2.	44.11. 9	16	16
21.	47	F	42. 5.	//	64	64
22.	63	F	39. 7.	44.12.25	<4	4
23.	50	F	43. 3.	//	<4	4
24.	65	F	44. 3.	//	<4	<4
25.	45	M	41.1.0.	//	4	16
26.	58	F	41. 4.	//	16	16
27.	59	F	40. 8.	//	4	4
28.	34	M	43. 9.	//	64	64
29.	63	M	40.1.0.	//	64	64
30.	48	F	42. 5.	//	4	16
31.	22	F	43. 6.	//	<4	<4
32.	81	M	40.	45. 1.28	<4	<4
33.	39	F	41. 4.	45. 3.25	4	4
34.	65	F	39.	45. 3.25	4	4
35.	63	F	43. 7.	//	16	16
36.	38	F	42. 7.	//	4	4

* 1～12は神経症状発現から3ヶ月以内に採血したもの

IV 考 察

我々の成績では神経症状発現後3ヶ月以内の患者血清12例を含めてスモン患者血清36例中、補体要求性中和抗体価が中和抗体価に比し8倍以上上昇した例は1例も見出せなかった。又特に高い補体要

求性性中和抗体価も見出せなかった。中和反応に用いたmedium, ウイルス株等は新宮博士のものとは異なるが, 一定量のウイルスを用いての中和反応としてはウイルス学の常法に従ったものである。これらの結果からスモンの原因がEcho 21型ウイルスに特に起因していることは考え難い。

V 結 び

スモン患者36例の血清についてEcho 21型ウイルスに対する中和抗体価及び補体要求性中和抗体価をしらべた。中和抗体価は1: < 4 ~ 1: 64, 補体要求性中和抗体価は1: < 4 ~ 1: 256であり, 補体要求性中和抗体価; 中和抗体価の値は4倍のもの4例, 8倍以上のものはなかった。患者の中, 神経症状発現より3ヶ月以内が明瞭な者12名中, 同上比が4倍上昇したもの1名のみで他は上昇はみられなかった。

文 献

新宮正久, 宇野克彦, 中川 洋: 腹部症状を伴う脳脊髄炎症 (SMON) の免疫学的診断法, 第17回 日本ウイルス学会総会演説抄録

SMON患者血清のエンテロウイルス抗体 保有状況の調査研究

(昭和44-45年度成績のまとめ)

多ヶ谷 勇 (国立予防衛生研究所)

I はじめに

SMON研究協議会病原班の研究活動の一部として、既知の病原ウイルスがSMONの症状発現に何らかの関係がありそうか、またはそのような可能性を否定し得るかを明らかにする必要があることが議論されて来た。このような研究の手はじめとして、エンテロウイルスのいくつかの型に対する中和抗体保有状況を、SMON患者血清および健康人血清について比較検討することとなり、6研究機関の共同研究がなされた。参加機関及び責任者は下に示す通りであった。

北海道衛生研究所	飯 田 広 夫
宮城県衛生研究所	今 野 二 郎
国立予防衛生研究所	中 野 稔
千葉県衛生研究所	芦 原 義 守
受知県衛生研究所	山 田 不 二 造
大阪府公衆衛生研究所	国 田 信 治

II 材料並に方法

SMON患者血清は1968年、1969年に岡山県の湯原、井原両地区で採血されたもので、予研ウイルス中央検査部に凍結保管されていたものである。血清量が限られていることと、出来るだけ多くのウイルスに対して同じ血清の抗体価を測定したいとの要望から、5検体ずつの血清をプールして、湯原地区血清6プール(1969年春採血)、井原地区11プール(1968年春および1969年秋採血)について抗体測定が行われた。健康人血清としては、各機関で手持ちの、あるいは採血し得るもので、SMON患者と年齢、性別など出来るだけ同じ条件のものを、5検体ずつのプールを作って抗体測定を行うことが決められた。

使用ウイルスおよび対応するWHO標準馬血清(約200単位/0.1 mlに希釈されたもの)は予研腸内ウイルス部から分与された。200単位の希釈血清をつくるための希釈倍数はWHOの記載^{1~3)}による抗体価から計算して定められたがエコー33型血清のみはWHOの記載が発表されていないので予研腸内ウイルス部で得られた抗体価から計算された。(表1)

表1 WHO標準血清の中和抗体価

標準血清 ウイルス型	W H O 〔共同研究機関の値の幾何平均値〕	予研腸内ウイルス部
CA 7	10,000 (100)	7,100 (36)
CA 9	7,300 (108)	5,700 (200)
CB 1	33,200 (200)	7,100 (340)
CB 2	12,700 (143)	2,500 (320)
CB 3	4,400 (113)	8,000 (32)
CB 4	26,500 (76)	2,900 (54)
CB 5	40,000 (166)	30,000 (100)
CB 6	65,400 (112)	82,600 (55)
Echo 1	12,500 (85)	13,000 (110)
Echo 4	930 (163)	790 (320)
Echo 6	17,200 (96)	41,000 (40)
Echo 7	17,200 (181)	22,000 (310)
Echo 9	8,910 (102)	8,600 (61)
Echo 12	26,260 (119)	33,000 (145)
Echo 14	2,700 (215)	520 (200)*
		5,880 (180)**
Echo 16	11,400 (136)	5,600 (180)
Echo 25	2,060 (68)	5,120 (68)
Echo 33		40,950 (215)

()は中和に用いられたウイルス量(TCI D₅₀)を示す。

* 濾過しないウイルス ** ミリポアフィルターで濾過したウイルス

研究機関のコードをA, B, C, D, E, Fとし, (A, B), (C, D), (E, F)の3群に分け, 同一群の2機関は同じプール血清を二重に測定するように調整された。今回用いたウイルス型は18の血清型で, 下に示すように5ウイルス群(IからVまで)に分けて, 各研究機関群に割り当てられた。

ウイルス群	ウイルス血清型
I	CA 9 , CB 1 , CB 2 , CB 3
II	CB 4 , CB 5 , E 4 , E 6
III	E 7 , E 9 , E 1 2 , E 2 5
IV	CA 7 , CB 6 , E 1
V	E 1 4 , E 1 6 , E 3 3

註 CA:コクサツキーAウイルス, CB:コクサツキーBウイルス, E:エコーウイルス
 ウイルスはE 4 (Du Toit 株), CA 7 (ABN株)以外はすべて prototype が用いられた。E 1 4 は中和に先立ち, ミリポアフィルターで濾過したものが用いられた。

研究機関群	A, B			C, D			E, F		
ウイルス群	I	IV	V	II	IV	V	III	IV	V
被検血清	2	1	6	2	9	4	4	5	19
プール番号	3		15	3	16		5	18	
	6			7			7		
	14			8			10		
	17			9			13		

患者血清プールは56°30分非働化したのち4倍に希釈されたものが各機関に配られ, 各機関ではそれから更に4倍階段希釈列を作り, 約100 TCID₅₀/0.1 mlのウイルス液と等量混合, 37°に2時間置いた後にサル腎初代細胞培養に接種した。血清の1希釈あたり4本の細胞培養試験管を用いて0.2 mlずつ接種, 7日間観察した。ウイルス接種細胞の維持には0.5%ラクトアルブミン水解物加アール液(重炭酸ナトリウム0.22%)を用いた。ウイルス, 血清の希釈もこの液を用いて行った。7日後またはウイルス対照が約100 TCID₅₀を示した時に判定が行われ50%中和血清希釈終末価の計算が為された。

III 結 果

(a) 標準血清中和抗体価測定の結果

表2に各機関から報告された抗体価をまとめて示してある。概ね予想された200倍前後の値が得られているが, 機関Aでは4種の血清で中和抗体価が得られず, 2種の血清で中和終末価が得られなかった。これは用いた血清希釈列の幅がせまかったことと, 攻撃ウイルスが多すぎたことが原因であろう。機関Bでは1種の血清で中和終末価が得られず, 2種の血清が中和抗体価を示さなかったが, そのうちの抗Echo 16血清については, 機関Fでも同様の結果が示された。機関Fでは3種の血清で中和終末価が得られなかった。機関C, D, Eでは, このような結果は認められず, すべての血清について中和抗

体価が示された。以上述べたような例外的な場合を除けば、各機関で得られた抗体価は比較的よく一致していた。

表2 各機関により測定された希釈WHO標準血清(200単位)の中和抗体価

標準血清 ウイルス型		機 関					
		A	B	C	D	E	F
CA	7	>800 (562)	59 (450)	220 (32)	171 (50)	400 (32)	>512 (502)
CA	9	<50 (178)	159 (170)				
CB	1	40 (100)	118 (316)				
CB	2	>800 (56)	≦59 (1000)				
CB	3	<50 (1000)	200 (100)				
CB	4			43 (32)	242 (100)		
CB	5			330 (250)	133 (75)		
CB	6	100 (>1000)	398 (32)	510 (47)	N D	86 (32)	256 (502)
Echo	1	<50 (1000)	280 (32)	159 (320)	185 (50)	154 (32)	256 (502)
Echo	4			59 (320)	308 (50)		
Echo	6			490 (320)	146 (50)		
Echo	7					200 (32)	>512 (126)
Echo	9					132 (32)	354 (759)
Echo	12					222 (32)	>512 (126)
Echo	14	50 (>1000)	≧560 (456)	490 (47)	83 (100)	400 (100)	512 (795)
Echo	16	50 (177)	≦3 (316)	74 (320)	143 (450)	222 (32)	<16 (795)
Echo	25					286 (32)	128 (502)
Echo	33	<50 (177)	≧280 (42)	71 (100)	100 (200)	200 (300)	16 (126)

()は中和に用いられたウイルス量(TCI D₅₀)を示す

ND: 実施せず。

(b) SMON患者および健康人の血清のエンテロウイルス中和抗体価

各機関より報告されたものをまとめたのが表3である。同一血清に対して同一ウイルスを用いて異なる2機関で得られた抗体価を上下に並べて載せてある。それぞれの血清型のウイルスに対する中和抗体を測定する際に、WHOの標準血清を同時に測定しているため、その時の中和ウイルス量は表1に示されたものである。結果を通覧して見られるように、大部分の血清について、異った2機関により、ほぼ等しい中和抗体価が示されているが、時として同一ウイルスに対する同一血清の中和抗体価が10倍以上の差を示した場合もあった。中和抗体価が証明されない場合や、中和終末価の出なかった場合もあったが、一応比較の便のために、2機関で得られた同一ウイルスに対する同一血清の中和抗体価の幾何平均を出して表に並記すると同時に、SMON患者血清のそれぞれのウイルスに対する中和抗体価の幾何平均値を表に示した。SMON患者血清で特に何らかの特定のウイルス型に対して異常に高い中和抗体を含むものは見られなかった。健康人血清は機関B、Dで、それぞれ2プールずつが測定されたのみで、広く全般的な傾向をうかがうことが出来ないが、概してSMON患者血清より中和抗体価が高いようであった。これは、あるいはSMON患者ではステロイドホルモンが治療に用いられることもあることと関係があるかも知れないが、健康人血清の検査例数が少ないので何とも云えない。機関Eでも9人の健康人血清の中和抗体測定が為されたが、個別別に測定がなされ、且つ中和終末価の得られていないものもあったので、集計からはずされた。

以上の結果から、しらべられた18の血清型については、SMON患者血清で特に異常に高い中和抗体価を有するものは見られず、直接ないしは間接の関係を示唆するような成績は得られなかった。今回しらべたウイルスは過去7年間のある時期、あるいは何年かに亘って相当多くの分離が病的材料(主として小児の疾患)から為されたものとして、CA9、CB1-5、E4、6、7、9、12、14の各ウイルスが含まれ、それ程多くはないが分離のみられたものとしてE1、25、33があり、あまり分離がみられていないウイルスとしてCA7、CB6およびE16が含まれている。近年比較的高い頻度で分離されたエンテロウイルスは今回の調査にほとんど含まれているが、これ以外のあまり分離頻度の高くないもの、あるいはわが国では未だ分離の報告のない型のウイルスに対する抗体の保有状況もしらべる必要があると思われる。なお、今回は健康人血清があまり数多くしらべられなかったが、今後この仕事を継続して行う場合には、この点の考慮も必要であろう。また標準血清の抗体価測定に際して時として見られたように、機関による大きな差の生じる原因の解明も、この種の共同研究にとっては重要なことである。

表3 スモン患者及び健康人血清のエンテロウイルス中和抗体価

ウイルス型	スモン患者血清															健康人血清					
	湯原1969					井原1968				井原1969						幾何平均	機関B		機関D		幾何平均
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	15	16	17		18	19	1	2	
CA 7	64 <4 (16)				8 8 (8)				32 84 (39)				40 48 (44)		8 16 (11)	19	95	32	128	32	60
CA 9		8 24 (14)	8 32 (16)		8 96 (28)					16 96 (39)			<8 16 (11)			19	128	≥181		155	
CB 1	<8 9 (8)	24 24 (24)			<4 8 (6)					8 8 (8)			<8 3 (5)			9	32	16		23	
CB 2		16 96 (39)	16 24 (20)		128 40 (72)					16 32 (23)			16 32 (23)			31	32	32		32	
CB 3	<8 16 (11)	<8 16 (11)			<4 24 (10)					<8 24 (14)			<8 32 (16)			12	64	≥165		105	
CB 4		16 32 (23)	100 48 (69)			100 64 (80)	100 72 (85)	40 32 (36)								52			>256	>256	>256
CB 5		8 12 (10)	8 18 (12)			<4 <4 (<4)	4 <4 (4)	<4 <4 (<4)								6			64	128	91
CB 6	<8 16 (11)				8 8 (8)			6 18 (10)					8 <4 (6)	16 365 (76)		13	64	40	128	>256	96
Echo 1	<8 7 (7)				<4 6 (5)			<4 16 (8)					6 32 (14)	4 6 (5)		7	24	24	128	64	47
Echo 4		4 12 (7)	8 48 (20)			8 16 (11)	16 48 (28)	10 64 (25)								16			>256	>256	>256
Echo 6		32 48 (39)	10 32 (18)			32 48 (39)	10 18 (13)	8 32 (16)								22			128	32	64
Echo 7			32 128 (64)	32 256 (91)		8 64 (23)	8 128 (32)	8 45 (19)								38					
Echo 9			20 32 (25)	4 8 (6)		20 16 (18)	8 22 (13)	32 32 (32)								16					
Echo 12			8 45 (19)	4 45 (13)		24 90 (47)	16 128 (45)	8 45 (19)								25					
Echo 14			38 128 (70)	8 3 (5)				8 8 (8)					8 16 (36)			18	64	10	>256	128	68
Echo 16			<4 4 (4)	9 <4 (6)				8 <4 (6)					16 16 (16)			7	<4	≤3	>256	>256	30
Echo 25			16 90 (38)	8 32 (16)		20 180 (60)	20 256 (72)	16 128 (45)								41					
Echo 33			8 12 (10)	8 6 (7)				8 16 (11)					6 90 (23)			12	32	95	128	128	85

A, C, E機関で得られた値は上段, B, D, F機関で得られた値は下段に, ()は2機関で得られた値の幾何平均値を示す。
中和終末価が得られていないものは, しらべられた最低または最高希釈倍数を用いて幾何平均を計算した。

文 献

- 1) Melnick, J.L. & Hampil, B.: WHO Collaborative studies on enterovirus reference antisera (1st report) Bull. Wld Hlth Org. 33, 761-772, 1965
- 2) Hampil, B. & Melnick, J.L.: idem (2nd report) ibid 38, 577-593, 1968
- 3) Melnick, J.L. & Hampil, B.: idem (3rd report) ibid (in press)

北海道におけるSMONの病原に関する研究

飯田 広夫，桜田 教夫，熊谷 満，奥原 広治，佐藤 七七朗，
上田 正義，野呂 新一（北海道立衛生研究所）

I 緒 言

北海道では昭和33年頃よりSMON患者がみられるようになった。北海道衛生部の調査によると昭和44年までに331名の患者が発生している。患者発生数のピークは昭和40年の84名であり、次は昭和41年の53名である。昭和42年以降は減少し、毎年22名の患者がみられるのみである。地区別では釧路市が最も多く、121名であり、室蘭市は89名であった。性別では人口10万対女8.5男3.9で女性に多かった。

われわれは昭和39年からSMONの病原に関する研究を始めた。最初はSMONが特定の地区に集中して発生し、夏季に比較的多く、腹部症状を伴うことから、人の腸管内に増殖するEnterovirusあるいはAdenovirusが原因ではないかと考えた。

したがってこれらのウイルスに重点をおいてウイルス分離の作業を行った。また昭和45年からは感染以外の要因を考慮して尿中のタリウム定量を行うと共に患者血清について血清蛋白分画、 γ -globulin定量、コリンエステラーゼ定量も行った。

II 実験材料および方法

ウイルス分離の目的で採取された患者材料は凍結状態で研究室に送られた。便は10%乳剤としてから、リコール、のどスワブ、尿はそのまま抗生物質を加えてから接種材料とした。ウイルス分離と血清学的検査は微生物検査必携¹⁾に準じて行った。

血清蛋白分画はセルロースアセテート膜（国産セパラックス使用）により0.0012mlの試料を塗布した。ペロナール緩衝液（pH 8.6， $\mu = 0.05$ ）を使用し、0.6 mA/cmの定電流で約40分±5泳動し、弁色乾燥後デンストメーター（OZUMOR-SD91）で波長500m μ で測定した。

γ -globulin定量はバルチゲン（Behring werke社）により規定の方法に従って実施した。

コリンエステラーゼは柴田，高橋法によった。

尿中のタリウム定量は鈴木，小南，宮本らの記載した方法に従って実施した。^{2) 3) 4)}

III 結 果

1. ウイルス分離

昭和39年から行った患者材料からのウイルス分離成績を第1表に示した。分離材料を採取した患者数は347名である。昭和41年からは患者の家族および患者の周辺の人の材料についても分離を試みた。分離材料は便とリコールが主体である。昭和42年のその他の項の47件は昭和40年にSMON研究班で行った共同研究の材料の一部であって、⁵⁾この材料については人胎児腎細胞を用いて分離を行った。

表1 ウイルス分離

年 度	対 象		分 離 材 料							細胞の種類 哺乳マウス (SM)	結 果
	患 者	接 触 者	便	剖 検	リ コ ール	血 液	の ス ワ ど ブ	尿	そ の 他		
39	7	0	6	0	0	0	1	0	0	MK, HeLa, FL, Hep2, SM	0
40	58	0	41	23	41	0	1	0	0	MK, HeLa, SM	CoxA2,1: A4,8:A10,1
41	46	54	51	7	23	3	3	1	0	MK, HeLa, FL, SM	CoxA4,2
42	42	3	33	0	38	3	1	6	47	MK, HeLa, FL, SM	CoxA4,1
43	78	83	150	0	26	0	3	5	0	FL, Vero	0
44	60	21	63	0	42	0	0	0	0	HeLa, Vero, SM	0
45	56	0	40	0	47	0	0	0	0	FL, HeLa	0
計	347	161	278	30	197	6	9	12	47		CoxA, 13株

ウイルス分離は前述のようにEnterovirusとAdenovirusに重点をおいたので、これらのウイルスに感受性のある初代さる腎細胞(MK)、哺乳マウス(SM)および各種の継代細胞を用いた。第1表にみられるようにこれらの細胞の組合せは一定せず、実験室の条件に適したものを用いた。

総件数は579件であって、昭和40年から昭和42年にかけて13株のCoxsackie A群ウイルスが分離された。

2. 血清学的検査

SMONがウイルス感染によるとすれば、既知の病原ウイルスと未知のウイルスに分けられるが、一応既知のウイルスと考え、比較的分離される頻度が高く、しかも、しばしばまひの原因となるウイルスを抗原としてSMON患者血清の中和抗体とHI抗体を測定した。仮に1つのウイルスに対して抗体保有率が高く、かつ高い抗体価の分布を示した場合にそのウイルスを病原と考える方針で行った。

昭和34年から昭和39年までに釧路市で採取された21件の患者血清について、14株のEnterovirus, Adenovirusを含む7株のRespiratory virus, 2株のArbovirusを抗原

として抗体価の測定を行った。⁶⁾ (表2)(表3)

表2 Enterovirus の中和抗体価

No.	virus Type	Polio			Cox A			Cox B					ECHO			
		I	II	III	7	9	23	2	3	4	5	2	4	6	16	
1		8	64	16	32	4	< 4	8	< 4	8	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	
2		8	16	16	32	< 4	4	16	< 4	16	< 4	16	8	8	8	
3		4	4	8	32	< 4	4	16	< 4	< 4	< 4	4	< 4	< 4	4	
4		8	4	16	32	4	< 4	16	< 4	< 4	< 4	4	< 4	< 4	8	
5		16	8	8	32	< 4	4	32	< 4	4	< 4	4	8	< 4	< 4	
6		64	32	128	128	4	< 4	32	64	64	64	4	32	32	8	
7		16	8	16	32	< 4	< 4	< 4	16	8	128	< 4	< 4	4	4	
8		32	128	16	128	< 4	< 4	64	64	8	64	4	< 4	< 4	8	
9		4	16	128	64	< 4	< 4	16	64	4	64	32	< 4	< 4	8	
10		< 4	32	16	128	< 4	< 4	512	16	4	8	8	4	< 4	4	
11		8	8	16	32	< 4	< 4	8	4	32	64	< 4	< 4	< 4	4	
12		32	8	8	16	< 4	< 4	256	16	4	8	< 4	< 4	< 4	4	
13		1,024	4	64	8	4	< 4	64	< 4	64	8	< 4	< 4	< 4	< 4	
14		16	32	8	16	< 4	< 4	16	8	8	< 4	< 4	< 4	< 4	4	
15		4	128	8	4	< 4	8	16	8	< 4	< 4	4	4	< 4	< 4	
16		128	64	16	128	< 4	8	32	8	32	< 4	32	4	4	4	
17		128	8	32	128	< 4	< 4	64	4	8	< 4	8	8	4	4	
18		8	8	< 4	128	< 4	< 4	64	< 4	4	< 4	8	4	< 4	8	
19		< 4	16	4	64	< 4	< 4	4	8	8	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	
20		32	8	< 4	16	< 4	16	8	< 4	8	4	64	< 4	< 4	< 4	
21		32	32	128	32	< 4	8	< 4	4	< 4	< 4	8	< 4	< 4	4	

表3 Respiratory & Arbo viruses の抗体価

No.	virus Type	Adeno			Influenza		HVJ	Mumps	Arbo	
		2	3	7	A 2	B			中山	JaGAR
1		16	< 4	< 4	< 32	256	256	512	< 40	< 40
2		16	< 4	< 4	128	< 32	32	128	< 40	< 40
3		4	< 4	< 4	64	64	64	128	< 40	< 40
4		16	< 4	< 4	512	64	32	256	< 40	< 40
5		16	< 4	< 4	128	1,024	128	128	< 40	< 40
6		< 4	< 4	< 4	< 32	< 32	32	256	< 40	< 40
7		< 4	< 4	< 4	< 32	512	128	256	< 40	< 40
8		16	< 4	< 4	< 32	256	< 32	128	< 40	< 40
9		< 4	< 4	< 4	< 32	256	128	256	< 40	< 40
10		32	< 4	< 4	< 32	1,024	128	256	< 40	< 40
11		< 4	< 4	< 4	< 32	< 32	32	128	< 40	< 40
12		< 4	< 4	< 4	< 32	512	64	256	< 40	< 40
13		32	< 4	< 4	< 32	64	512	512	< 40	< 40
14		16	< 4	< 4	< 32	32	128	128	< 40	< 40
15		< 4	< 4	< 4	< 32	< 32	128	128	< 40	< 40
16		8	< 4	< 4	< 32	512	< 32	256	< 40	< 40
17		16	< 4	< 4	< 32	256	64	256	< 40	< 40
18		16	< 4	< 4	< 32	128	64	128	< 40	< 40
19		32	< 4	< 4	< 32	256	64	128	< 40	< 40
20		4	< 4	< 4	< 32	32	64	64	< 40	< 40
21		16	< 4	< 4	*NT	NT	NT	NT	< 40	< 40

注 Not tested

Enterovirus 中和抗体の内, Coxsackie A7と Coxsackie B2 に対しては比較的高い抗体保有率を示している。昭和44年から多ヶ谷らが6研究機関の共同研究により SMON患者血清の Enterovirus 抗体保有状況をみたが, 特に上述の2株に対しては高い抗体保有率を示していない。⁷⁾したがってこの2株は血清採取時期に釧路市とその周辺に侵いんしていたと考えられる。

Respiratory virusと Adenovirus の場合は Adenovirus に対してのみ中和抗体を測定し他は全部 HI抗体を測定した。第3表からは特に SMONに関連のあるウイルスはみられない。

昭和40年から42年に13株の Coxsackie A群ウイルスが分離されたので, この時期に採取された SMON患者血清について, 分離株と同型の抗原を用いて補体結合抗体を測定した。(表4)

表4 SMON患者の Cox A群ウイルス CF抗体保有状態

抗体価 抗原	<4	4	8	16	32	64	128	計
Cox A2	60	25	9	3	1	0	0	98
Cox A4	72	13	10	2	1	0	0	98
Cox A6	85	9	3	0	1	0	0	98
Cox A10	86	7	2	2	1	0	0	98

各抗原に対する抗体の保有率はきわめて低い。補体結合抗体は中和抗体と比較すると, 早期に低下することが知られているが, 神経症状の出現の時期は腹部症状の発現時よりもかなり経過しているので腹部症状の発現と関係があるかもしれない。しかしその後の時期の分離実験がすべて陰性であることから一過性にこれらのウイルスの侵いんがあったと考えられる。

新宮は昭和40年頃から SMONの病原が ECHO 21であると主張している。^{8),9)}昭和40年から42年にわたって北海道において採取された190名の患者血清について ECHO 21株に対する中和抗体価を測定した。(表5)

表5 SMON患者の ECHO 21 中和抗体保有状態

抗体価	<4	4	8	16	32	64	128	256	512
陽性数	76	9	48	15	27	7	4	1	3

使用した細胞は FL, 抗原は ECHO 21 Farina株である。190名中76名(40%)が陰性であり, 64倍以上の抗体価を有するものは15名(7.9%)であって, Enterovirus感染症としてはかなり低い抗体保有状態である。なお補体要求性抗体については検討していない。

3. 生化学的検査

61人の患者血清について血清蛋白分画を行い, アルブミン, α_1 , α_2 , β の各分画の濃度比(%)をみ

るとともに総蛋白量とA/G比をみた。個体差はみられるが1つの分画に共通した増減はなく、ほぼ正常値の変動範囲内にあった。総蛋白量とA/G比にも異常はみられなかった。

44件の血清についてIgA, IgG, 47件の血清についてIgMの定量を行った。IgGの増量が29件, IgMの増量が10件にみられた。

47件の血清についてコリンエステラーゼの定量を行ったところ, 27名に低下がみられた。

48件の患者尿について実施したタリウムの定量の結果は表6の通りである。

表6 スモン患者尿のタリウム定量

タリウム (ppm)	件数
0.0 ~ 0.10	14
0.11 ~ 0.20	8
0.21 ~ 0.30	11
0.31 ~ 0.40	8
0.41 ~ 0.50	2
0.51 ~	5
計	48

IV 考 察

SMONを感染症と考えたのは特定の地区に患者が夏季に集団発生するという報告からであるが、その後の調査によると患者同志に接触はなく、散発的に発生しており、冬季にもかなりの患者がみられている。

現在までに行ったウイルス分離成績ではEnterovirusとAdenovirusによる感染の可能性は一応否定されるが、神経症状によりSMONと診断される時期は、これらのウイルス分離の目的には遅すぎると考えられる。この種のウイルスの分離は狭い地区で、短い期間に患者が多発する条件が望ましい。

IgGの増量が62%にみられたことはSMONが慢性感染症あるいは自己免疫疾患であることを示唆する。

コリンエステラーゼの減少は実質性肝障害、有機燐、水銀中毒、抗コリンエステラーゼ剤使用時にみられるが、57%に低下がみられたことは、SMONが慢性に経過する消耗性疾患であるためと考えられる。

タリウムの定量を試みたのは、タリウムがOptic neuritisあるいはGeneralized polyneuritisの原因となり、病理解剖学的所見がSMON患者の脊髄の病理解剖像に類似しているからである。¹⁰⁾ なおタリウムをさるに接種すると脊髄の脱髄と側脳室の近くのニューロンの対称性消失によって後肢の失調性のまひを来すとされている。¹¹⁾

タリウム中毒患者の尿中のタリウム定量の例数は少ないが、鈴木が2名のタリウム中毒患者について測定したタリウム量はそれぞれ0.48 ppmと0.20 ppmであったことから、²⁾ SMON患者尿中のタリウム量はかなり高いと考えられるが、今後定量法について更に検討するとともに、多数の健康者およびSMON患者の尿中タリウム量を測定し、比較検討する必要がある。¹²⁾

V 要 約

昭和39年から現在まで、347名のSMON患者と167名の接触者から採取した579件の材料からウイルス分離を試み、13株のCoxsackie A群ウイルスを分離した。Polio, ECHO, Coxsackie B群およびAdeno virusは分離されなかった。Coxsackie A群ウイルスが分離された時期の98名の患者血清について補体結合抗体価を測定したが、同ウイルスが病原agentと考えられる抗体保有状態はみられなかった。

昭和40年から42年に採取された190名のSMON患者についてECHO 21株に対する中和抗体価を測定したが、76名が抗体を保有せず、抗体保有者でも特に高い抗体価を有するものは少なかった。

昭和45年から患者血清について、血清蛋白分画、 γ globulin定量、コリンエステラーゼ定量を行った。44名の血清中、IgGの増量が29名にみられ、47名の血清中コリンエステラーゼの減量が27名にみられた。なお尿中のタリウムの定量も行った。

文 献

- 1) 厚生省監修：微生物検査必携，1966，日本公衆衛生協会
- 2) 鈴木俊雄：Japan Analyst，14，130，1965
- 3) 小南文四郎，小野双葉：Japan Analyst，18，573，1969
- 4) 宮本益夫：Japan Analyst，10，102，1961
- 5) 甲野礼作：最新医学，24，2043，昭和44年
- 6) 桜田教夫，奥原広治，伊東弓多果：北海道立衛生研究所報，第16集，51，昭和41年
- 7) 多ヶ谷勇：スモン調査研究協議会班研究報告プログラム，昭和45年
- 8) 新宮正久ほか：日本伝染病学会誌，39，139，1965
- 9) 新宮正久ほか：日本伝染病学会誌，39，442，1965
- 10) Gottwald, W: Nervenarzt，28，315，1957
- 11) Pentschew, A, Ebner, F, Kovatch, R: Proceediuzs of the 4th International Congress of Neuropathology, V3, 300, 1962
- 12) 飯田広夫：北海道医学雑誌，44，7，1969

SMONのウイルス学的研究

井上幸重，西部陽子，中村良子（京都大学ウイルス研究所）

木村輝男（大阪市立衛生研究所）

I 序

われわれは以下に述べる研究結果から，SMON患者糞便よりBAT-6細胞に高率に分離された新しいウイルスをSMONの病因ウイルスとして推定するに至った。こゝにその初段階の研究のみ報告する。

II 研究材料並びに方法

1. SMON患者材料：岡山のSMON患者の糞便並びに血清は岡山大学医学部俵教授から分与載き，大阪のSMON並びに非SMON患者の脊髄液は大阪，北野病院神経内科の木島部長から分与載いた。また北海道のSMON患者脊髄液は札幌医大の金光教授から分与して載いた。

2. BAT-6細胞とその取り扱い：BAT-6細胞はわれわれの研究室で樹立されたもので，ウシadenovirus 3型により形成されたハムスター皮下腫瘍のクローン化継代細胞である。

i) 保存継代：Growth meium は5% fetal calf serum 加Eagle MEMでpHは6.5 継代は普通4日毎。先ずgrowth mediumを捨てた後室温の0.25% trypsin in 0.5% lactaldumin hydrolysate Earle 液を中角瓶の場合10ml加えて室温で30秒～1分間作用させて捨てる。残つたわずかのtrypsin液で振り乍ら細胞を消化する。細胞がはがれたら遠心することなく4倍量のgrowth mediumにsuspendして分注培養する。

ii) tubeの作り方：cell suspensionを0.5ml宛tubeに分注して培養。2日目に1mlのmaintenance mediumで交換する。maintenance mediumは2% fetal calf serum並びに0.1% yeast extract (Difco) 加Eagle MEMでpHは6.5。tubeはmaintenance mediumに変えてその日のうちに供試する。感染後6日間の観察を行う。

iii) CPEの観察：細胞変性効果(CPE)は弱拡大(40倍)で広いcell sheetを全体的に読む様にする。CPEはcell sheetの上部より始まるincomplete CPEである。(第1図参照)

iv) mycoplasma対策：BAT-6細胞或いは糞便由来材料にみられるmycoplasmaの汚染はmediumにleucomycin (Toyo Zyozo Co.) 2r/ml添加により防除することが

出来る。

4. 抗ウイルス免疫血清：ウイルス感染BAT-6細胞培養液のみ採取して5,000rpm30分遠心上清をウイルス抗原としてウサギを免疫した。免疫方法はFreund complete adjuvantと共に皮下注射，その後ウイルス抗原のみ静脈内注射をくり返して免疫した。

5. 中和試験：ウイルス30~100TCD₅₀に対する血清稀釈法によつて行つた。反応時間は37℃1時間。

III 結果

1. 岡山地方SMON患者糞便からのウイルス分離：第1表に示す如く，ウイルスは5例のSMON患者糞便乳剤全例よりBAT-6細胞に同種の細胞変性効果(CPE)を示して初代で分離された。その一つ佐藤株は連続継代培養を行つて代表株とした。これに対し健康者2例の糞便材料からは同一方法でウイルスは分離されなかつた。

第 1 表

Results of virus isolation from stool and spinal fluid of SMON patients in Okayama and Osaka

No. of patient	Residence	Date of onset	Date of stool collected	Date of SF collected ^a	Result of virus isolation ^b
1		Sep. 18, '69	Nov. 19, '69		+ ^c
2		Aug. 4, '69	Nov. 19, '69		+
3	Okayama Prefect.	Jun. 13, '69	Nov. 19, '69		+
4		Oct. 27, '69	Nov. 19, '69		+
5		May 21, '69	Nov. 19, '69		+
6		Dec. 28, '69		Mar. 5, '70	-
7		Mar. 30, '68		Feb. 4, '70	+ ^d
8		Jun. 15, '69		Feb. 4, '70	+
9		Aug. 27, '69		Feb. 4, '70	+
10	Osaka Prefect.	Feb. 20, '70		Jun. 15, '70	+
11		1960		Jun. 15, '70	+
12		Mar. 20, '70		Jun. 15, '70	+
13		Jun. 13, '70		Jul. 15, '70	-
14		May 10, '70		Jul. 15, '70	+
15		Jul. 10, '70		Jul. 23, '70	+

a. SF: spinal fluid

b. All strains were cultivated more than 2 passages.

c. Sato strain, prototype from stool, was cultivated more than 20 passages.

d. Kanayo strain, prototype from SF, was cultivated more than 10 passages.

2. 大阪地方 SMON 患者脊髄液からのウイルス分離：第 1 表に同じく示す如く，10 例の SMON 患者脊髄液のうち 8 例から BAT-6 細胞に CPE を示すウイルスが分離された。この中には発病後 10 年に及んでなお入院中の陳旧例の脊髄液からウイルス分離が陽性であった事実が含まれている。これらのうち金谷株を代表株として連続継代培養を行った。

3. 北海道地方 SMON 患者脊髄液からのウイルス分離：第 2 表に示す如く，29 例の SMON 患者脊髄液のうち 23 例からウイルスが分離された。No. 96 株を代表株として連続継代培養を行った。

第 2 表

Results of virus isolation from spinal fluid
of SMON patients in Hokkaido

No. of patient	Date of onset	Date of SF collected	Result of virus isolation	Positive rate ^o
S-F				
1	Sep. 10, '69	Apr. 4, '70	+	
6	Mar. 3, '70	Apr. 4, '70	+	
19	May 8, '70	May 28, '70	+	
24	Dec. '69	Jun. 4, '70	+	
33	May 5, '70	Jun. 23, '70	+	
38	Jun. 17, '70	Jun. 24, '70	-	
47		Jun. 9, '70	+	
51	Jun. 15, '70	Jun. 26, '70	+	
55	Mar. '69	Jun. 23, '70	-	
56	Jan. '70	Jul. 2, '70	+	23/29
59	Apr. '70	Jul. 2, '70	-	
81	Jun. 20, '70	Jul. '70	-	
82	May 29, '70	Jul. 24, '70	+	
90			+	
94	May '70	Aug. 10, '70	+	
96	May '70	Aug. 10, '70	+	
104			+	
108			+	
112		Aug. 6, '70	+	
113		Aug. 6, '70	+	
114		Aug. 6, '70	+	
159	Jun. '70	Aug. 6, '70	+	
180		Sep. 5, '70	+	
187		Aug. 6, '70	+	
191		Aug. 5, '70	-	
194		Oct. 1, '70	+	
196		Oct. 8, '70	+	
202		Oct. 28, '70	-	
206	Nov. '69	Oct. 30, '70	+	

^o No. of positive / No. of person tested

4. 非 SMON 患者脊髄液からのウイルス分離：大阪地方の非 SMON 患者脊髄液 1・8 例から BAT-6 細胞にウイルスは全く分離されなかつた。

5. 分離ウイルスの同定：BAT-6 細胞はこれまでのテストから多くのヒトの腸内ウイルスに感受性を示さないことが明らかであり，そのウイルス分離はかなり選択的である。しかして，岡山の SMON 患者糞便由来の佐藤株ウイルスに対する抗血清で大阪並びに北海道の SMON 患者脊髄液由来の全ウイルスは中和されることから，BAT-6 細胞に同種の CPE を示して分離されたウイルスは血清学的に

同一とみなされる。

6 SMON患者血清の中和抗体価：第3表に示す如く，SMON患者血清では15例中13例に血清稀釈5～10倍と言う低い中和抗体を証明出来るが，非流行地の健康者成人血清10例の中和抗体はいずれも5倍以下であつた。

第 3 表

Positive rate of neutralizing antibody
in normal and patient sera

Sero tested	Days after onset	Result of NT test	Positive rate ^a
No. of patient			
1	62	+ ^b	
2	84	+	
3	159	- ^c	
6	67	+	
7	676	+	
8	234	+	
9	161	+	
16	149	+	13/15
17	61	+	
18	(36 77	(- +)	
19	(28 67	(+ (5) + (10)	
20	(137 172	(- -)	
21	304	+	
22	50	+	
23	112	+	
No. of normal adult			
1~10		-	0/10

a No. of positive / No. of person tested

b + : 50% endpoint of serum dilution against 30~100 TCD₅₀ was 5~10

c - : < 5

7. SMONと無菌性髄膜炎の関係：第4表に示した大阪地方の無菌性髄膜炎患者2例の脊髄液からBAT-6細胞にCPEを示すウイルスがそれぞれ分離された。しかし，初代サル腎細胞，HeLa細胞には同一材料からCPEを示すウイルスは分離出来なかつた。

第 4 表

Patient materials of aseptic meningitis

Age	Sex	Date of onset	Date of spinal fluid collected	Date of serum collected	Prognosis
63	♂	Jul. 2, '70	Jul. 20, '70	Aug. 19, '70	cure
43	♀	May 6, '70	Jul. 13, '70	Aug. 3, '70	cure

第 5 表

Cross reactions among viruses isolated
from patients of SMON and aseptic meningitis

Virus used	Antiserum			Normal serum	
	Soto rabbit	Nagao patient	Inoue patient	rabbit	human adult
strain ON	50 ^a	320	160	< 5	< 5
strain aseptic meningitis	50	320	N.D. ^b	< 5	< 5
strain aseptic meningitis	50	320	160	< 5	< 5

a. 50% endpoint of serum dilution against 30~100 TCD₅₀

b. Not determined

分離されたウイルスの血清学的性状は第5表に示す如く中和試験により佐藤株ウイルスと完全に同一であつた。そして無菌性髄膜炎患者の回復期血清中和抗体価は320倍並びに160倍と言う高い価を示した。

8. 分離ウイルスの2・3の性状：この様にしてSMON患者の糞便並びに脊髄液から高率に分離されたウイルスの性状に関する詳細は次報にゆずるが、2・3の知見は以下の様である。

i) HeLa 細胞，初代サル腎細胞，ヒト胎児腎細胞に対するCPE：第6表に示す如く上記培養細胞に対するCPEは認められない。

第 6 表

Cytopathic effect of the virus
to different cells

Cells tested	Source of virus	
	Stool susp.	Virus grown in BAT 6 cells
BAT-6 cells ^a	+ ^b	+
Hela cells	-	-
Monkey kidney cells	-	-
Human embryonic kidney cells	-	-

a. Hamster tumor cells induced by type 3 bovine adenovirus.

b. Determined by CPE.

ii) filtrability について：第7表に示す如く，average pore size 220 m μ の filter を通過するが100 m μ の filter は通らない。

第 7 表

Filtrability of the virus

Average pore diameter	Log ₁₀ TCD ₅₀ post filtration
450 m μ	4.5 ^b
220 m μ	1.5
100 m μ	<0.5
prefiltration ^a	5.5

a. Supernatant after centrifugation at 5,000 rpm for 30 min..

iii) エーテル感受性について：第8表に示す如くエーテル sensitive ウイルスである。

第 8 表

Sensitivity to ether

No. of exp.	Condition of treatment	Treated with 20% ether	Treated with 20% PBS
1	for 18hrs, at 4°C	< 0.5	5.3 ^a
2	for 18hrs, at 4°C	< 0.5	5.3
3	for 6 hrs, at 4°C	2.3	5.5

a. Log₁₀ TCD₅₀ per ml

iv) 原液並びに稀釈継代の影響：第9表に示す如く，原液継代で von Magnus 様現象がみられ，継代培養は 10⁻¹ 稀釈で行う必要がある。

第 9 表

Effect of dilute and undilute passage
on the yield of virus in BAT-6 cells

Inoculum per tube		TCD ⁵⁰	Yield ^a (TCD ₅₀ /ml)	CPE ^a
Sample				
Dilute passage at 10 ⁻¹	The 1st (A), 0.1 ml	3.5 ^b	6.8	+
	The 2nd	4.8	7.5	+
	The 3rd	5.5	6.5	+
	The 4th	4.5	6.5	+
Undiluted passage	The 1st, 0.1 ml	4.5	4.8	±
	The 2nd	3.8	2.8	±
	The 3rd	1.8	5.5	±
	The 4th	4.5	5.0	±
(A), 0.1 ml + uninoculated cell extract, 0.1 ml		3.5	6.5	+

a. after 5 or 6 days

b. Log₁₀ TCD₅₀

V) pHの影響：ウイルス感染価に及ぼすmedium pHの影響をBAT-6細胞のmaintenance medium について検討した結果，第10表に示す如くウイルス感染価はpH8.0以上或いは5.0以下で36°Cにおいて急速に不活化され最も安定なpH域は他のウイルスより少し低い6.5~6.0の範囲にあることが見出された。

第 10 表

Effect of pH on the infectivity
of virus

pH of medium	Days after incubation at 36°C			
	0	1	2	3
8.0	5.8 ^a	1.3	<0.5	<0.5
7.5	5.8	1.8	0.8	<0.5
7.0	5.8	3.8	1.8	<0.5
6.5	5.8	5.3	3.5	0.8
6.0	5.8	5.0	4.0	0.8
5.5	5.8	4.3	2.8	<0.5
5.0	5.8	1.3	<0.5	<0.5

a. Log₁₀ TCD₅₀ per 0.1 ml

IV 考 察

1. 岡山の SMON 患者糞便から分離されたウイルスは大阪並びに北海道の SMON 患者しかもその髄液に高率に証明された。非 SMON 患者脊髄液から同ウイルスは通常証明されない。従つて、SMON とこのウイルスの関係は地域によつて異なることなく明瞭である。

2. 例外的に非 SMON 患者髄液にウイルスの証明された 2 例は無菌性髄膜炎患者であり、回復期患者血清は高い中和抗体価を示した。これに対し SMON 患者の極めて低い中和抗体産生状況をみると SMON を免疫反応不全に伴う新種ウイルス感染症と考える。

3. SMON 患者からウイルス分離が高率であることは免疫反応不全にもとづく持続性ウイルス感染のためと考えられ、SMON 症状の亜急性経過或いは再燃にもつらなる点であろう。

4. SMON 患者糞便由来のウイルスはそのエーテル感受性、特異な host range 等から新種のウイルスと推定される。その性状は病原性を含めて今後の報告で明らかにする予定である。

5. SMON の病型或いは疫学の全貌はこの新種ウイルスとの関連において明らかにされねばならない。

6. SMON のウイルス学的研究を進めるにはまず旧来の常識にとらわれない研究の姿勢が必要である。BAT-6 細胞にみられる弱い CPE の判定をめぐつて努力抜きの不毛の論議が行われるのは患者不在の研究者のエゴイズムによるものとする。

V 結 論

岡山の SMON 患者糞便より既知の腸内ウイルスと性状を異にする新しいウイルスが高率に分離された。同種ウイルスは地域を異にする大阪並びに北海道の SMON 患者の脊髄液からも高率に分離される。同ウイルスに対して SMON 患者血清は極めて低い中和抗体価を示すが、健康者成人血清には証明されない。また非 SMON 患者の脊髄液から同種ウイルスは通常分離出来ない。しかし、例外的に 2 例の成人の無菌性髄膜炎患者の脊髄液から同ウイルスが分離され、回復期患者血清は高い中和抗体価を示した。故に、SMON を免疫反応不全に伴う新種ウイルス感染症と考える。SMON の病型或いは疫学の全貌はこの新種ウイルスとの関連において追求されねばならない。分離ウイルスの性状はその病原性を含めて、今後の報告で明らかにする予定である。

文 献

1. 井上幸重, 西部陽子, 中村良子: スモン患者糞便より高率分離された新しいウイルス。医学のあゆみ, 72: 321~322, 1970
2. 井上幸重, 西部陽子, 中村良子: スモン患者糞便より高率に分離された新しいウイルス(第2報) 医学のあゆみ, 73: 68, 1970

3. 井上幸重：スモンは果して日本に特有な疾患なのか，医学のあゆみ，73：222，1970
4. 井上幸重，西部陽子，中村良子：SMON患者糞便より高率に分離された新しいウイルス（第3報）
医学のあゆみ，75：370～371，1970
5. 井上幸重：SMON患者から分離された新しいウイルス，日本臨床，29：30～33，1971

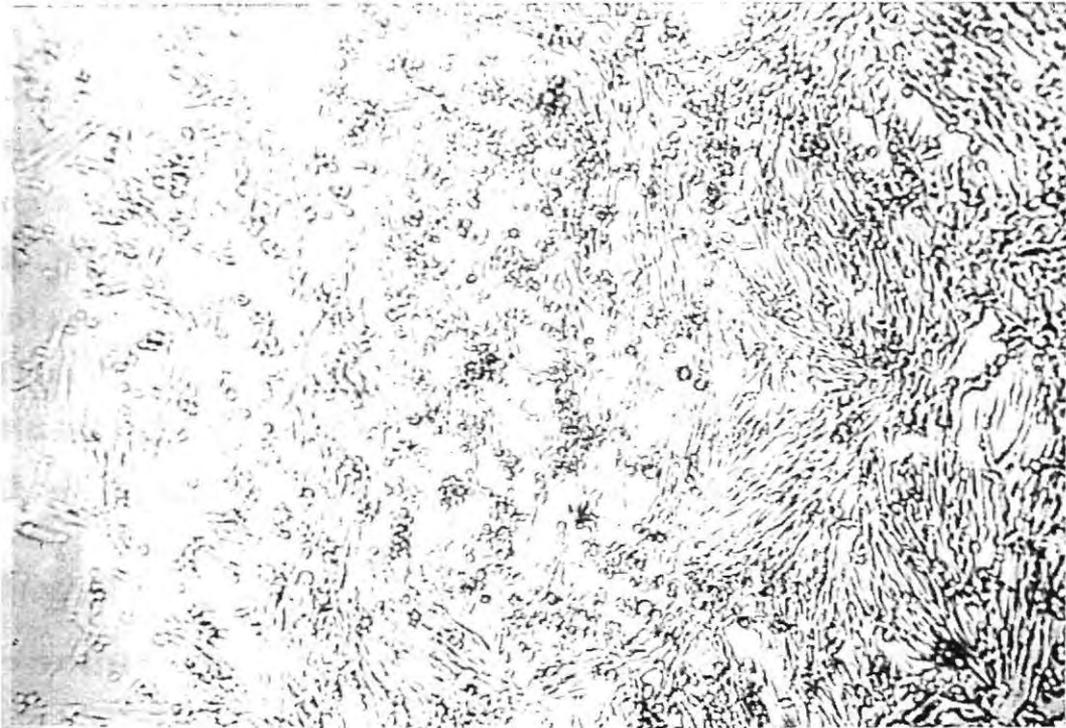
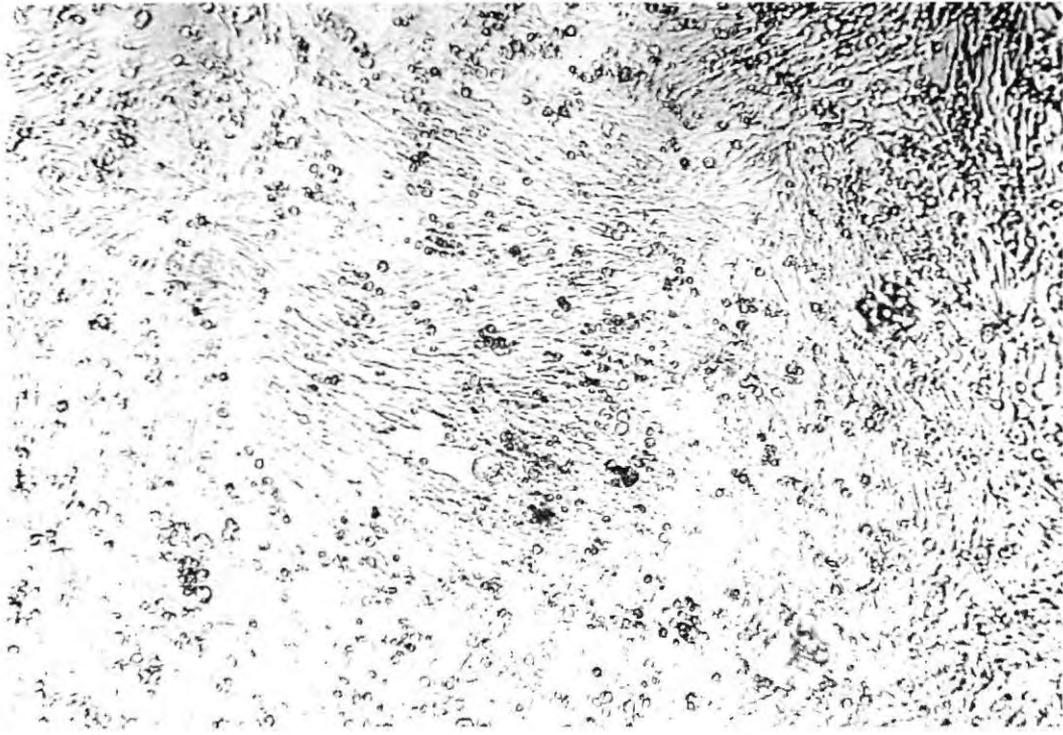


図 1. 上：正常 BAT-6 細胞，無染色。
下：ウイルスによる細胞変性効果（CPE）。

SMON病原の電顕的観察

東 昇 (京大ウイルス研究所)

I はじめに

SMON病原の病因論については甲野の論文¹⁾にくわしい。吾々はいくつかの病因論のひとつに挙げられているウイルスをSMON病原と疑つて電顕的実験を行つている。現在、超薄切片についてだけ実験がなされているので、精製濃縮を行つてnegative染色を実施し、粒子の性状特にNucleo-capsidの特徴をみる必要がある。

II 実験材料と方法

第1材料：感染材料はスモン患者(岡山地方)糞便，分離に用いた細胞はBAT-6細胞，この細胞で10代以上継代されたものを供試した。佐藤株・BAT-6細胞系²⁾

第2材料：感染材料はスモン患者(大阪地方)脊髄液。BAT-6細胞で病原体を分離し，この細胞で7代累代した後，NTS細胞(慶大中沢博士より分与)で2代継代された。金谷株・NTS細胞系

第3材料：第1材料が10代継代後，NTS細胞に2代通過されている。佐藤株・NTS細胞系
mycoplasmaによる汚染はロイコマイシン(東洋醸造製)2 γ /ml，テトラサイクリン(明治のcrystalline tetracycline hydrochloride)5 γ /mlで除去された後，電顕的研究を行つた。
以上の材料は井上幸重博士より供与された。これら3種の実験材料にマイコプラズマは認められない。

実験方法：常法による。高分解能観察をめざした外，特記すべきことはない。

III 成績と考察

上記いづれの材料も，細胞変性効果を呈したもの(培養4日～6日)について超薄切片をつくり鏡検した。

流行地を異にする2種の感染材料，2種の宿主細胞による上記3つの実験系において，同一性状の特徴ある粒子が見出された。一方，正常BAT-6細胞，正常NTS細胞にはこのような粒子は認められない。

粒子の基本形はhexagonal，大きさは径70～110m μ をはかる。
粒子はヌクレオキャプシドと2重膜性エンベロープとよりなる。エンベロープにはスパイクの兆がある。

電子密なヌクレオキャプシドの構造とその大きさは、粒子発育と切断面とに応じて区々である。

このような粒子は、細胞質膜部および細胞質空胞内に認められる（勿論細胞外にも存する）のである。核内に認めることはできない。

粒子の他の特徴として、細胞質膜およびmicrovilliでの発芽による粒子形を明らかにすることができる。

このような形状、大きさ、構造と発芽形成を営むものは既知ウイルスの中に求めることはできない新種ウイルスであると言える。以上述べた実験成績と井上らの生物学的実験（第1報：医学のあゆみ321, 1970, 第2報：医学のあゆみ73, 68, 1970. 第3報：第18回日本ウイルス学会演説とを総合し、このウイルスをスモン病原ウイルスとみなし、スモンウイルスと命名したい。

なお若干附記する。いずれの実験系においても、感染細胞に認めるウイルス粒子数が少い。吾々のウイルスについての実験例に照応するに、粒子数の少いのは感染価の低いためと考えられる。スウイルスのむずかしさの一面であろう。粒子数のふえることを期待して培養条件をかえた（32°Cが、結果は同じであった。

当初、核を丹念に調べた。ウイルス粒子は認められず、特別な核変性像もみられない。

IV まとめ

BAT細胞で分離培養した井上幸重らの標本について電顕的観察を行った。標本はCPEを示し（試験内培養）ものについて、型の如く固定、包埋、超薄切片をつくり鉛、ウラニウム二重染色を電子光学的拡大20,000倍で観察した。スモンウイルスは発芽形式により粒子を形成する。宿主のplasma membraneおよび細胞質空胞内の空胞膜において粒子形成をみる。特徴としては片あたりの粒子数が少いことである。

文 献

- 1) 甲野礼作：SMON病因論—感染説の立場から，最新医学，24，2403，昭44．
- 2) 井上幸重ほか：スモン患者糞便より高率に分離された新しいウイルス，医学のあゆみ，72，1970．

[付]

S M O N 病原のネガチフ染色の電子顕微鏡的研究

東 昇 (京大ウイルス研究所)

実験材料は井上, 西部らによるスモンウイルス佐藤株, BAT-6 細胞系で得られた fluid 1,000ml を濃縮 (1/1,000) し, CscI 濃度勾配 (20~40%, W/V) 遠心で精製したものである。

鏡検フラクションは ^3H -チミジンのとりこみのあるもので且つ感染性と一致するフラクションである。1% agar plate 上で試料を乾燥させ, ついで 0.7% コロジオン液を乾燥寒天の上におき, 水面にコロジオン膜を剝離する。膜上にメッシュをのせて, すくい上げる。乾燥後 PTA をのせ 1 分間乾燥させる。PTA 液 (1%) は之に 0.001% の crystalline bovine serum を加えたものである。

写真説明

図 1. 矢印の粒子 (大きさ $5.3\text{m}\mu$) はペプロスで囲まれ, 且つスパイクが放射状に突出している。スパイクの先端は knob に終っている。断線矢印の粒子は部分的破壊を示す。なお, 二重矢印の部分は高度の粒子破壊を示し, サブユニットだけが認められる。さらにサブユニットは視野一面に散在している。ウイルス粒子は本実験における処理法に対し, かなり不安定であることを示す一方, ある程度粒子の濃縮には成功しているようである。

図 2. 大きさ, $5.5, 7.0, 10.0\text{m}\mu$ の粒子 (矢印) を認める。本図ではスパイクを認め難い。本図でも粒子崩壊, 散在性サブユニットを認める。

図 3. 粒子の大きさ $9.0\text{m}\mu$, naked virion も認められる。

図 4. enveloped virion, naked virion, 崩壊した virion を認める。ペプロス, スパイクはかなり本実験処理に対し不安定であるので, 目下検討中である。

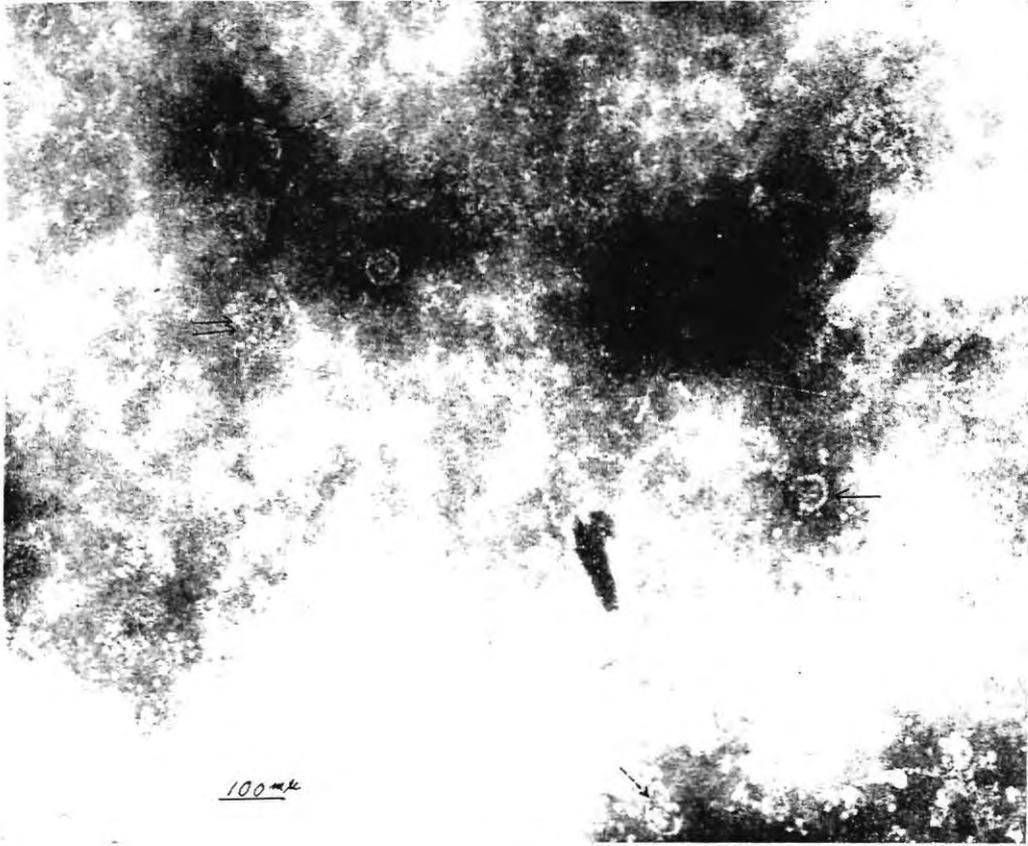


图 1

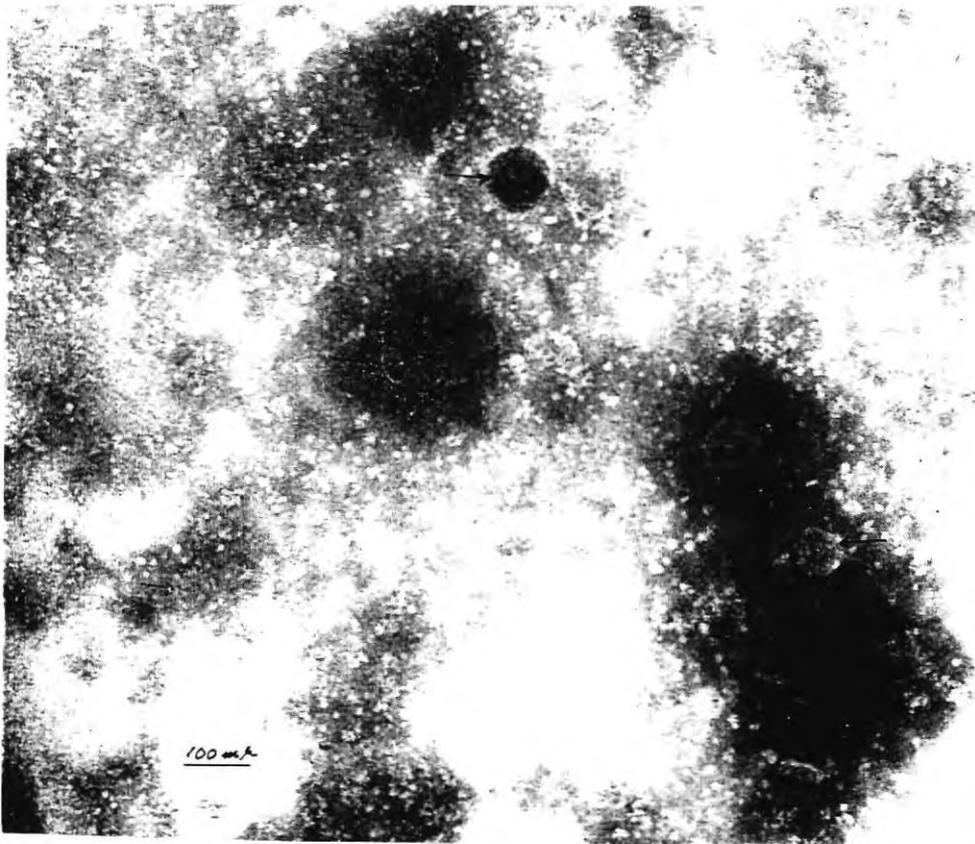
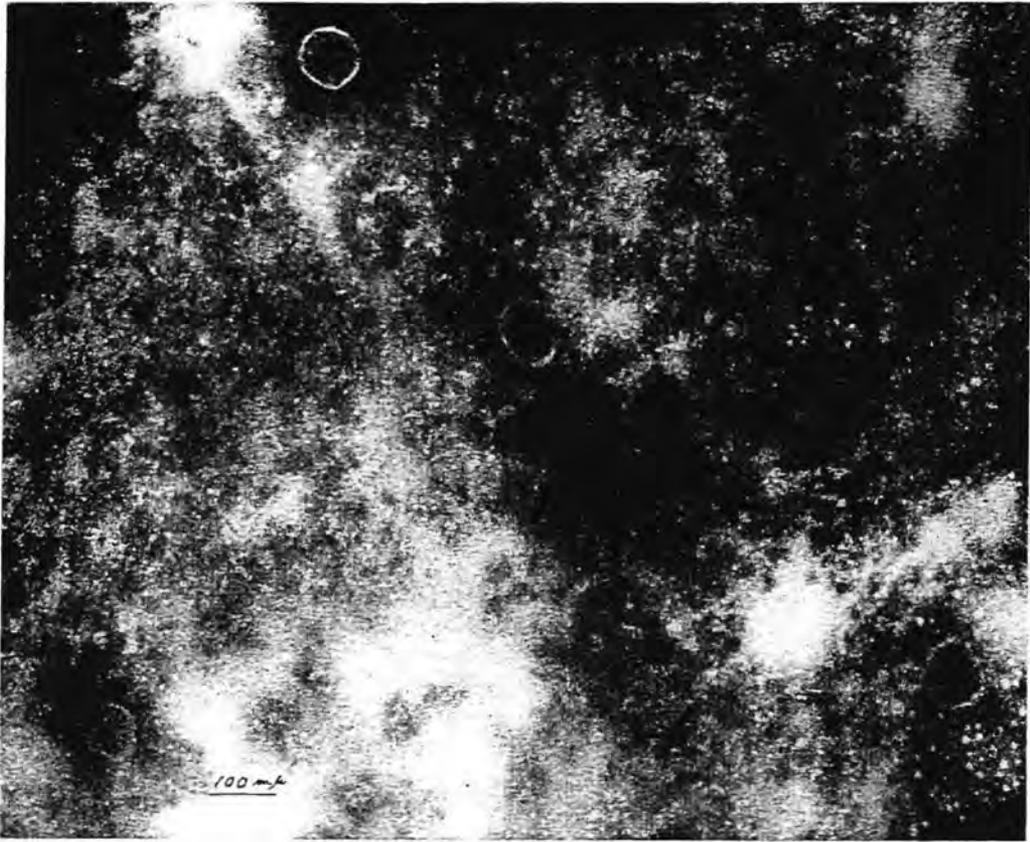
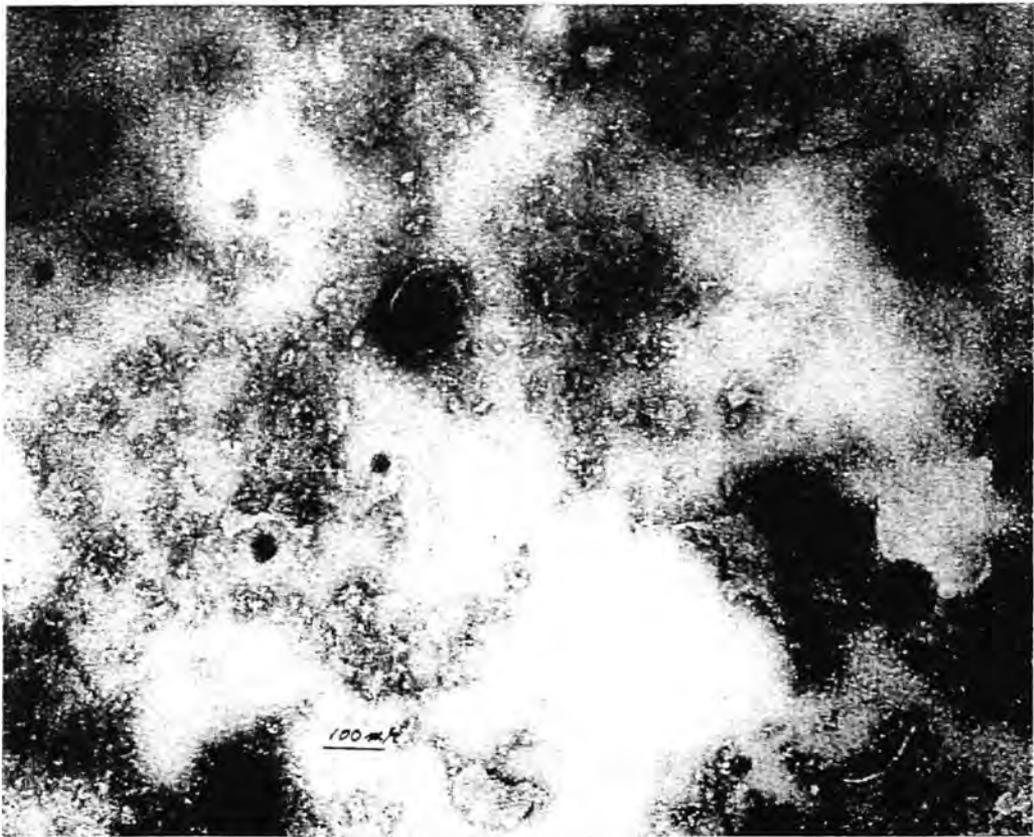


图 2



☒ 3



☒ 4

B A T 6 細胞に関する追試実験成績

甲野礼作，吉井孝雄，石井慶蔵（国立予研ウイルス中央検査部）

I はじめに

われわれはSMONがウイルス性疾患の可能性があると考え，数年前より各地の患者材料よりのウイルス分離を種々の細胞を用いて試みた。その成績はすでに発表したように，すべて陰性に終わった。¹⁾

1969年末に京大ウイルス研の井上幸重博士がウシのアデノ3型ウイルスでtransformしたハムスター由来のBAT-6細胞を用いてSMON患者材料からCPE agentを分離し，²⁾ その追試を依頼された。早速同博士よりBAT-6細胞と分離されたagentの代表株である佐藤株の分与を受けて，ウイルス分離，佐藤株の性状及び同株による中和試験を行ったのでその知見について述べる。

なおこの実験は1970年5月までに行つたものである。

II 実験材料及び方法

a) 細胞とその培養：BAT-6細胞は10% fetal bovine 血清加イーグルMEMを用い37°Cで増殖させ，維持液としては2% fetal bovine 血清加イーグルMEM培養液を用い，37°Cに静置培養した。なおイーグルMEM培地は初めKM加日水製を，後半においてはKMを含まない大五栄養製を用いた。

b) ウイルス分離用被検材料：表1に示したように，岡山県井原市，岡大入院患者（うち1例は湯原町の患者）及び東京都内の患者22例，27検体で，例の1材料（脊髄）を除いて他はすべて糞便である。これら材料は岡大島田助教授，緒方教授，俵教授及び東大神経内科井形博士の御好意で入手し，予研において-70°Cに使用まで密栓保存したものである。なお表にみられるように材料は神経症状発現から日の浅いものを選んだ。その中には採取月日は異なるが，井上博士が，CPE agentの分離に成功した患者の材料も含まれている。また対照として東京において採取した白色便下痢症の糞便10件でもウイルス分離を試みた。

表1 ウイルス分離用SMON患者材料

地区	患者	年齢	性	発病年月日	採取年月日	備考
岡山 山 県 井 原 市		73	M	9.28'68	12.4'68	
	〃	〃	〃	〃	10.26'68	
		35	M	8月'68	10.30'68	
	〃	〃	〃	〃	12.6'68	
		40	F	9.20'68	12.6'68	
		33	F	7.17'68	11.1'68	
	〃	〃	〃	〃	12.6'68	
		33	M	9.3'68	10.25'68	
	〃	〃	〃	〃	12.3'68	
		57	F	10月'68	11.10'68	
	〃	〃	〃	〃	11.17'68	
		19	F	11.27'68	11.30'68	
			M	10月'68	12.3'68	
			M		12.3'68	
		37	M	8.30'68	11.29'68	
		F	11.29'68	12.4'68		
		F		11.28'68		
	38	F	8月'68	12.3'68		
	57	F	10月'68	11.20'68	脊髄	
岡 大 入 院		67	M		11.19'69	
		45	F		〃	
		53	F		〃	
		39	F		〃	
		61	F		11.5'69	湯原地区
東 京		28	F	10月'68	11.29'68	
		50	M	11.10'68	12.11'68	
		35	F	11.4'68	〃	
		28	F	11.14'68	〃	

c) 患者血清：表 2 に示す 10 例の岡山県井原市における 10 例の SMON 患者血清を用いて佐藤株に対する中和試験を行った。被検血清としては神経症状発現から日が浅く，経過にそつて 2～3 回採血されたものを選んだ。なおこのうち 3 例の血清は井上博士にも提供し，同博士も測定されたものである。なお対照としては同年徳島市において採取した健康人血清 10 例を用いた。

表 2 佐藤株 の SMON 患者血清の中和抗体価測定成績

患者	年齢	性	発病年月日	採血年月日	中和抗体価
* []	33	F	7.17 '68	11. 1 '68	< 1 : 4
				12. 6 '68	< 1 : 4
* []	40	F	9.20 '68	10.26 '68	< 1 : 4
				12. 6 '68	< 1 : 4
				1. 8 '69	< 1 : 4
* []	73	M	9.28 '68	10.26 '68	< 1 : 4
				12. 4 '68	< 1 : 4
				1. 8 '69	< 1 : 4
[]	35	F	9.24 '68	10.24 '68	< 1 : 4
				12. 5 '68	< 1 : 4
				1. 8 '69	< 1 : 4
[]	17	F	8月 '68	10.21 '68	< 1 : 4
				1. 8 '69	< 1 : 4
[]		F		11.28 '68	< 1 : 4
				12.10 '68	< 1 : 4
[]	19	F	11.27 '68	11.29 '68	< 1 : 4
				1. 8 '69	< 1 : 4
[]		F		12. 4 '68	< 1 : 4
				1. 8 '68	< 1 : 4
[]		M		12. 3 '68	< 1 : 4
				1. 8 '69	< 1 : 4
[]	27	F	11.28 '68	12. 3 '68	< 1 : 4
				1. 8 '69	< 1 : 4

* この 3 例の血清は井上博士にも提供したものである。

d) ウイルス分離試験：BAT-6 細胞培養チューブの各 2 本に被検材料 0.2 ml を接種，37°C 1 時間後，培養液を交換，37°C に 5～6 日間静置培養した。毎日観察し，5～6 日後に 2 回凍結融解し次

代に継代，3代継代しCPEを生じないものを陰性とした。なお糞便はPc, SM加LE液で10%乳剤にし，常法の如く遠心した上清を採種した。

e) 中和試験：被検血清を56°C30分非働化し，1：4血清稀釈から2倍階段稀釈し，この稀釈系列に200 TCD₅₀のagentを等量混合し，37°C2時間反応させた。つぎにその血清ウイルス混合の0.2 mlづつを各2本の細胞培養チューブに接種，6日間培養，観察した。

III 成績

a) ウイルス分離試験：表1に示したSMON患者糞便27例，患者脊髄1例，対照患者10例の糞便を接種し，3～5代継代観察したがすべてウイルス分離陰性に終わった。この材料の大部分について後にKMを含まないイーグルMEMに培養液を代えて反覆分離実験を行ったが，結果は同様であつた。

b) 中和試験：SMON患者10例血清23検体(表2)及び対照血清10検体について中和試験を行ったが，その抗体価はすべて<1：4であつた。

c) 佐藤株の性状

i) 感染価 佐藤株のCPEは分与された当初はあまり明瞭でなかつた。継代を重ねて明瞭となり，予研で5代以上継代したものは安定し， $10^{5.5}$ TCD₅₀/0.2 mlであつた。

ii) 細胞に対する感受性 佐藤株をヒト胎児腎細胞とヒト胎児肺2倍体細胞に接種したが，CPEを認めることはできなかつた。

iii) 濾過試験 ミリポアフィルターHA(450 m μ)とGS(220 m μ)を用いてagentの大きさを測定した。その結果，HA濾過では感染価がlogで1.0低下し，GS濾過では濾液に感染性が認められなかつた。

iv) クロロホルム感受性試験 佐藤株の1 mlにクロロホルム0.05 mlを加え，振盪，室温10分放置，遠心した上清の10倍稀釈液に感染性が認められなかつた。対照は $10^{5.5}$ TCD₅₀/0.2 mlであつたので， $10^{4.5}$ の感染価の低下があり感性と判定された。

v) 抗生物質に対する感受性 佐藤株接種BAT-6細胞ではCPEのみられるほか，培養液がうすく緑色を帯びることが観察された。この着色はCPEの終末点とほぼ一致し，毎常明瞭に認められ，佐藤株がウイルス以外のagentである可能性が推定された。そこでテトラサイクリン(TC)，クロラムフェニコール(CP)を培養液に5 γ /ml加え感受性を調べた。その結果TC，CP共に加えた培養では佐藤株はBAT-6細胞にCPEも形成せず，また着色もみられなかつた。

vi) PPL0-Agarへの培養 佐藤株培養液を東大医科研本間教授のもとで培養を試み，定型的マイコプラズマのコロニーを形成し，この集落を浮遊させ，再びBAT-6細胞に接種した。その結果細胞継代株と同様のCPEを生じ，培養液も緑色を呈した。このマイコプラズマは後に東大農学部尾形教授の教室で M. hyorhinis と同定された。また未接種のBAT-6細胞にも当時 M. orale のあつたことが明らかにされた。³⁾

IV 考察並びに結論

1970年初頭に井上博士から入手したSMONの1患者由来の佐藤株なるCPE agentにみられたCPEは一種のMycoplasma (M. hyothinis と後に同定)に因るものであることを明らかにした。このもののCPEは井上博士の成績と異り、岡山のスモン患者の血清によつては阻止をうけず、佐藤株Mycoplasma に対する中和抗体は岡山流行地の患者血清には含まれてないと結論された。

このMycoplasma がBAT-6細胞の継代中に混入したものが、元の患者尿便に含まれたかは現在の時点では不明であり、両方の可能性があろう。SMON患者の糞便中からその後Mycoplasma が分離されている。中和試験の結果は佐藤株Mycoplasma が患者と関連なしという成績であるが、Mycoplasma の中和反応には新鮮血清の添加後陽性に出ることもあるので、このような処置を講ずれば、結果は違ったものになる可能性はあろう。

BAT-6細胞に対する佐藤株Mycoplasma のCPEはテトラサイクリン、クロラムフェニコールをメデイウムに添加することにより容易に消失し、このものを引続いて培養しても対照BAT-6細胞と差がみられず、別にCPE agent が存在するという証拠は得られなかつた。

一方BAT-6細胞により別の患者材料28例について、CPEを指標として分離を試みたが、継代可能なCPE agent を分離し得なかつた。

我々の経験ではBAT-6細胞は増殖が旺盛である反面極めて脆弱な細胞で、無接種の対照において自発的な細胞の変性崩壊が強く、CPEを指標とする限り、余程これが明瞭である時は別として、CPEが弱い時には判定が非常に困難であると考え。特に糞便材料等の毒性物質に弱いため、初代培養時はウイルスに因るCPEが現われたのではないかと考えられた場合があつたが、継代を続けるに従い陰性化してしまうのが常であつた。

なお、何も接種していないBAT-6細胞には、興水らによつてM. orale が汚染していることが報ぜられたが、増菌法などを施した後にはじめて分離されるので、数も少く、これはCPEには直接関係ないと考える。

引用文献

- 1) 甲野礼作：SMON病因論—感染説の立場から，最新医学，24：2403，1969
- 2) 井上幸重ほか：スモン患者糞便より高率に分離された新しいウイルス，医学のあゆみ，72：321，1970。
- 3) 尾形 学，興水 馨：BAT細胞におけるMycoplasma の汚染，スモン調査研究協議会報告，1970年11月。

スモン患者よりのウイルス分離の試み

奥野良臣，納寿一郎，高橋理明（阪大微研）

I はじめに

スモンの原因を探索する目的で患者からのウイルス分離を試みた。スモンが消化器症状を呈することから先づ糞便からのウイルス分離を試みた。又神経症状を呈することからリコールからの分離も試みた。又トリマレック氏病の場合生きた細胞からでないとウイルス分離が困難であり血液細胞から高率に分離されることが報告されて居る。それとの類似性をも考え患者血液からの分離も試みた。又患者血液をそのまゝ猿に静脈注射し病変がおこるかどうかもしらべた。

II 材料並びに方法

1. 細胞

ミドリ猿腎細胞（GMK），人胎児腎細胞（HEK），ハムスター腎細胞（HamK），ハムスター胎児細胞（Ham E）をそれぞれ標準のトリプシン法によつて短試験管又は小角瓶（50 ml）に培養した。培養液は通常LE（Lactalbumin 加 Earles 氏液）+5% calf serum である。

2. 糞便

患者材料は大手前病院，新千里病院，阪大微研病院，阪大病院，吹田市民病院より提供されたものである。

以下の如く処理して用いた。

stool 1容に15容のLE添加後 suspend
|
40°Cにて3,000rpm 20分遠心
|
上澄液の上部 $\frac{1}{2}$ を採取
|
採取液とLEを等容混合後 suspend
|
4°Cにて3,000rpm 20分遠心
|
上澄液の上部 $\frac{1}{2}$ を採取

LEに1ml当り	100u	penicillin	} を含む
	100r	streptomycin	
	50r	erythromycin	
	100r	kanamycin	

3. 血液

血液の凝固をさけるため citrate 又はヘパリンを加えて血液を採取し、そのまま 0.5 ml を小角瓶の GMK に接種し、2.0 ml を猿の静脈内に注射した。

4. リュール

採取後出来るだけ速かに GMK, HK に tube 当り 0.5 ml 接種し、培養液 0.5 ml を加えて観察した。

5. 細胞変性の観察及び継代

患者材料接種後培養液 (LE に calf serum の代りに 5% bovine albumin solution を加えたもの、ウイルスに対する inhibitor の存在を考慮して) を加え、7~14 日観察した。CP の出たものも、出ないものも、細胞を含んだ液を次の培養細胞に接種し少くとも 3 代以上盲継代して同様の期間観察した。

III 成 績

1. 糞便

GMK, HK, Ham K, Ham E に糞便材料を接種した。最初の 1~2 代では細胞変性のあらわれたものもあるが 3 代以上確実に継代できたものはなかった。1~2 代に於ける CP は糞便の toxicity によるものと考えられる。GMK 細胞では数例 CP の継続したものがあつたがそれは simian virus によるものと判明した。

表 1 糞 便

大手前病院	24 例	} {	人胎児腎細胞 (HK)
新千里病院	14 例		ミドリ猿腎細胞 (GMK)
微 研	1 例		ハムスター腎細胞 (Ham K)
吹田市民病院	2 例		ハムスター胎児細胞 (HaE)

何れも 3 代以上継代し得る特異的な細胞変性効果 (CPE) を認めず。

13 例につき、サルアデノウイルス SA₇ ハムスター腫瘍細胞に接種、特異的 CPE(-)

2. 血液

10 例 GMK に接種したが、特異的な CP は認められなかった。又直接 5 頭のカニクイ猿に接種し 6 ヶ月間観察したが何等の変化もみられなかった。

表 2 血液及び髄液

新千里病院 6例

阪大病院 4例

1) Citrate 加患者血液10例をGMKに接種

CPE(-)

2) // 6例をカニクイ猿に静脈注射(2回),

6ヶ月間変化なし。

髄液(リコール)

昭和45年5月~6月, HK, GMKに接種

CPE(-)

GMK: CPE(+) 1代, 2代

GMK: CPE(+) 1代

HK: CPE(+) 1代

昭和45年10月 大手前病院より7例

何れもCPE(-)

3. リコール

45年5~6月頃6例の患者のリコールをGMK, HKに接種したが, 3代以上継代し得るCP agentは見つからなかった。しかしその中3例のリコールでは1~2代でCPがみられ, 何か毒性物質が含まれていることが疑われた。しかし10月中旬に採取した7例のリコールでは何等のCPもおこらなかった。CPのあらわれた3例のリコールの患者について問合わせたところ全部当時キノホルム剤を服用していたことが判明した。

IV 考 察

糞便41例, 血液10例, リコール13例を種々の細胞に接種し, 又猿に静脈注射して変化の有無をしらべたが全部陰性に終った。これだけで断定はできないが, スモンがウイルスによつて引き起されている可能性は非常に少いと考えられる。

リコールに何か毒性物質らしいものが含まれている3例のあつたことは意外であつた。これがキノホルムであることが疑われるのでそれを猿を用いてモデル実験することを計画した。

V 結 び

スモン患者の糞便，血液，髄液（リコール）よりウイルス分離を試みた。

1. 糞便

4 1例につきミドリ猿腎細胞（GMK），人胎児腎細胞（HEK），ハムスター腎細胞（Ham K）ハムスター胎児細胞（Ham E）を用いてウイルス分離を試みた。何れも数代のblind passageをしたが3代以上継代し得るCP（細胞変性）agentは見つからなかった。

2. 血液

患者血液10例をGMKに接種しウイルス分離を試みたが，全部陰性であつた。又患者5名から1週間隔で2回採血し5頭のカニクイ猿に2回ずつ静脈内注射し，6ヶ月間観察したが猿には何等の変化も見られなかった。

3. リコール

13 sampleをGMK，HKに接種したが3代以上継代し得るCP agentは認められなかった。

スモンのウイルス学的検討

永田育也，木村吉延（名大・医・無菌研）

伊藤康彦（名大・医・内科）

スモンの病因については，感染説，中毒説などの多くの考え方が提出され，その各々の説も内容において次第に変化していると思われる。しかし現在までのところ「スモン」と言う一つの疾患があると仮定するとき，この疾患の全経過を一元的に説明し得る病因論はまだないようである。

第一内科祖父江グループは早くからこの疾患に注目し多くの観察又は成績を報告しているが，我々もこの疾患について祖父江グループの示唆をもととして，ウイルス学的立場からの検討を試みてきた。

先ず，本疾患がウイルス性疾患か否かを検討するため，主として剖検例の材料を中心とし同時に患者糞便，脊髄液からのウイルス因子の検出を試みた。一方井上博士は本疾患の糞便及び脊髄液から高率に一つのウイルス因子を分離したことを報告したので，この因子（井上因子）の性状を検討することとした。

以上ウイルス因子が直接本疾患に関与するか否かを検討すると共に，最近キノホルムが本疾患に深いかわりのあることを示唆するような成績が色々な方面から報告されていることから，キノホルムの一般生物学的活性を知る目的で，その既知ウイルスに対する作用，並びにインターフェロンの産生及び作用に及ぼす影響について検討した。

本報告の第一部はウイルス因子の検索及び井上因子の検討に関するものであり，第二部はキノホルムの生物学的活性に関する成績である。

第一部 スモン患者材料からのウイルス因子分離の試みと井上因子に関する検討

スモン患者材料からのウイルス因子の検出はすでに各所で行なわれているが，我々も患者糞便乳剤，脊髄液，及び剖検例2例について内部臓器乳剤，腸管内容物から，各種培養細胞によるCP因子の検索を行つた。

実験材料及び方法

患者糞便並びに剖検材料はPBS又は2%牛血清加イーグル培地で0%乳剤とし，5,000rpm 30分低温遠心上清を接種材料とした。なお脊髄液についてはそのま を使用し，滅菌PBSを用いた

咽頭うがい液は 5,000 rpm 30 分低温遠心後の上清を使用した。なお患者材料及び剖検例は第一内科祖父江グループによつてスモンと診断された患者の材料である。

使用した細胞は HeLa, KB, FL, RK13, ウシ腎初代培養細胞, モルモット腎初代細胞, ヒト胎児細胞, ヒト羊膜細胞並びに HeLa HVJ(carrier culture cells) である。また井上因子の検討には井上博士より分与された BAT 細胞を使用した。

増殖用培地としては主として 10% ウシ血清加 YLE 培地を用いたが, ヒト羊膜細胞は 20% 血清, 10% 牛羊水を含むイーグル培地を使用し, 維持培地としては血清含有量を 2% とした。BAT 細胞は 5% fetal calf serum 加イーグル培地で培養し, 維持培地としては FCS を 2% として 0.5% にイーストエキスを添加した。なおこれらの培地には抗生物質としてカナマイシン, フランギソンを用い, BAT 細胞には更にロイコマイシンを添加した。

なお, 井上因子の検討には井上博士の分離された代表株(佐藤株), BAT 細胞, 培地, 器具等, 殆んどすべての材料の提供を受けて実験を行つたので, ここに井上博士に深く感謝する。

実験結果

患者糞便, 脊髄液及び剖検例 2 例について, 上記各種細胞を用いて CP 因子の分離を試みてきたが, 今日までのところ継代可能な因子は検出されていない。しかし, ウイルス因子の検索には宿主細胞の選択と共に, 培養細胞に Abortive infection をきたす可能性, また感染組織中にその因子が latent の状態で存在する可能性なども考慮に入れることが必要であると考えている。

次に井上博士の因子については, まず BAT 細胞が極めて維持の困難な細胞である点に第一の問題点がある。即ち 2% 維持培地にイーストエキス 0.5% を加えても 5~6 日目頃に急速に細胞変性を示し始めることである。またこの細胞は温度に対する感受性が強く, 34°C 以下で培養すると, いわゆる epithelial な形態に変化する傾向がある。以上の点を考慮に入れ, fibroblastic な BAT 細胞を用いて, 井上博士と共に観察した結果, 佐藤株の比較的高濃度の接種により, 対照に比べてより強い細胞変性を示すことが認められた。高希釈においては対照と殆んど差は見られなくなるが, その終末点を求めることは極めて困難である。なおその再現性についても細胞維持が極めて困難であり, 実験結果のばらつきが見られるので今後さらに検討したいと考えている。従つてこの系は必ずしも CPE 観察に適切な系ではないと思われ, この因子のウイルスとしての性状を明らかにするためには, よりよい assay system, 又は検出の方法が必要であると考えられる。この目的のために, 井上博士より分与された抗血清(抗佐藤株血清及び抗 BAT 細胞血清)による組織培養での蛍光抗体法, 電顕による粒子の検索, アイソトープによる実験などが現在進行中である。

第二部 キノホルムの生物学的活性に関する検討

キノホルムの一般生物学的活性を知る目的で, 既知ウイルスに対する作用, 並びにインターフェロン

(IF)の産生及びその作用に及ぼす影響について検討した。

実験材料及び方法

ウイルス：Sindbis ウイルスは鶏胎児細胞継代株を，NDVは発育鶏卵継代株を使用した。

鶏胎児細胞培養（CE細胞）：10日卵より鶏胎児をとり出し頭部，内臓を除去したのち，0.25% Trypsin 処理し培養液にて細胞浮遊液をつくり，シャーレに各4mlずつ分注し，35°CのCO₂ボンキにて静置培養した。

培養液：牛血清5%加YLEにPenicillin 200 units/ml，Streptomycin 200 µg/ml，Phenol red 0.005%を加えたものを使用した。維持液としてはキノホルムを各種濃度で含有させた場合は血清濃度として最終的に3.5%となるよう不足の牛血清を追加した。それ以外の場合には2～3%牛血清加YLEを維持液として使用した。

IFの調製：Sindbis ウイルスによるIFはCE細胞にウイルスを接種し，35°C1時間吸着後0%YLE液で1回洗滌し，維持液4mlを加え24時間後の培養液を38000rpm 2時間超遠心しその上清をPH2.1のClark液で4°C24時間，再びPH7.2 Hanks液で24時間透析し3000rpm 10分低速遠心した上清をIF材料とした。NWSウイルスによるIFは，10日フ化鶏卵の漿尿管にウイルスを接種し48時間35°Cで培養した後尿液を24000rpm 1時間超遠心しその上清をSindbis ウイルスの場合と同じように処理した。

IF 価の測定：常法のブラック法を用いた。すなわち，維持液で倍数希釈したIF材料を各希釈当り3枚のCE細胞に加え，35°C8時間以上作用させた後，液を除去し約50～100PFU/0.1mlのSindbis ウイルスの0.1mlを接種した。1時間35°Cにて吸着後4mlのover lay mediumを重層した。72時間35°C培養後のブラック数が対照の50%減になるIF希釈倍数をIF値とした。又キノホルムによるIF活性の変化を調べる為に，challenge ウイルスのyieldを対照と比較する方法を用いた。

ウイルス感染価の測定：上記IF測定と同じように常法のブラック法を用いた。

キノホルムの調製：キノホルム純末10µgを牛血清1mlに浮遊させ，2000rpm 10分遠心を3回くり返えし，その上清をキノホルム100%とした。このキノホルム含有牛血清をYLE液に0.44%から3.5%までになるよう加えた。牛血清濃度を3.5%に同一にするため不足の分は正常牛血清をそれぞれ追加した。本実験におけるキノホルム溶液はすべてこのように作製した。なお，この濃度のキノホルムによつては液のPHには変化なくCE細胞に認むべき細胞変性もきたさなかつた。キノホルムを分与された予研江頭博士に感謝する。

実験結果

1. 既知ウイルスの増殖に対するキノホルムの影響

CE細胞にウイルス液(Sindbis ウイルス 3×10^6 PFU/0.1 ml, NDV 1×10^8 PFU/0.1 ml)を0.1 ml接種し35°C1時間吸着後0% YLE液にて3回洗滌した後各種濃度キノホルム含有維持液を4 ml加え35°Cで培養した。ウイルス接種後経時的に液中のウイルス感染価を測定した結果をFig 1-a, Fig 1-bに示す。図から明らかなようにSindbis ウイルス及びNDVの増殖は各々キノホルムによつて対照に比しおよそ90%抑制される。又キノホルムとウイルス増殖抑制について、特にキノホルム3.5%と1.75%の間でdose responseが成立しないことがしばしば観察されたが、これについては現在検討中である。

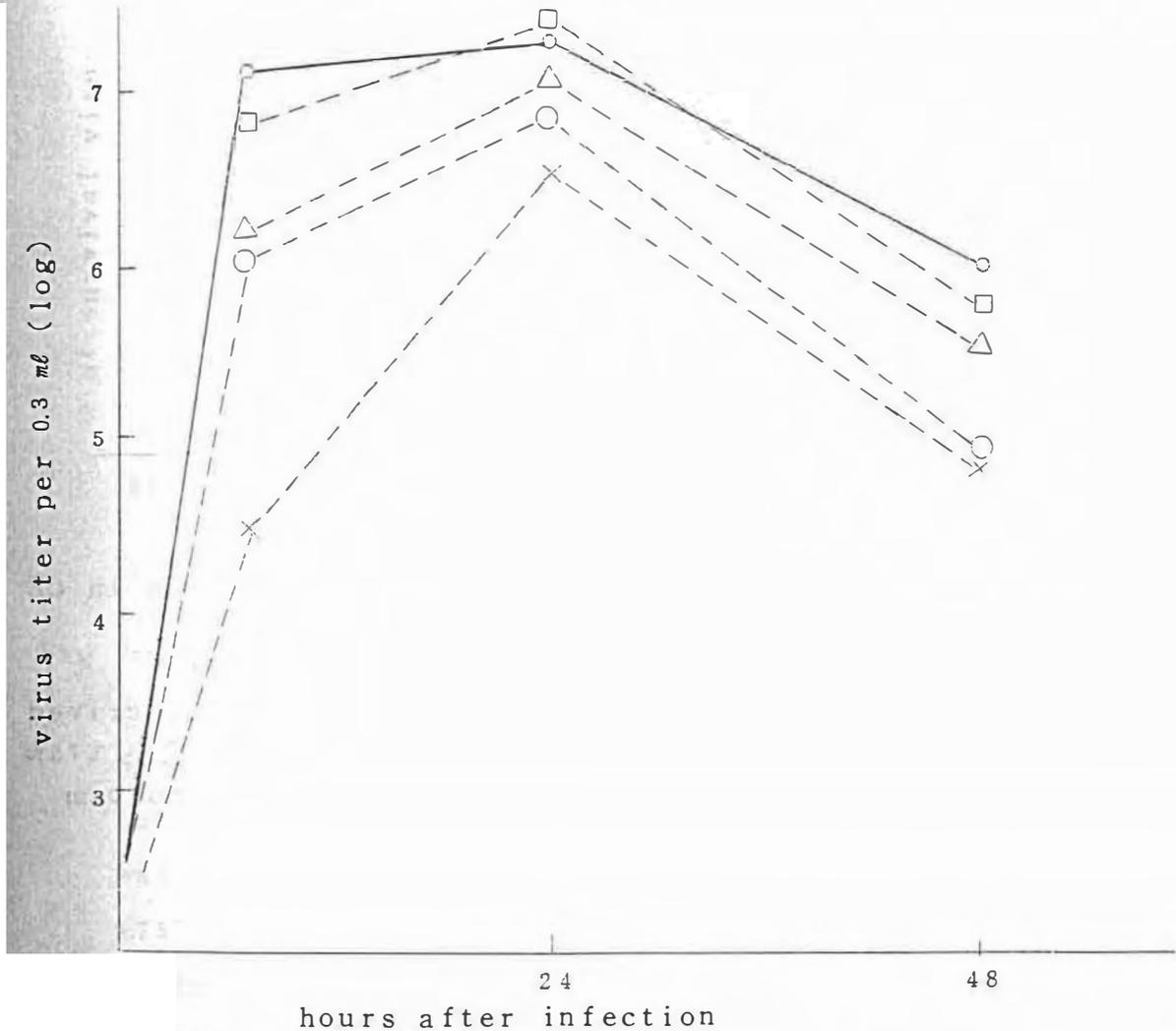


Fig 1-a Effect of chionoform on Sindbis virus multiplication in CE cells.

Sindbis virus was inoculated to CE cells. After adsorption for 1 hour, cells were washed twice and each dish provided with YLE medium containing 3.5% (○—○), 1.75% (x--x), 0.88% (△--△), 0.44% (□--□), chionoform and no chionoform (○—○), respectively. Culture fluids were harvested at various times of incubation and assayed for virus infectivity.

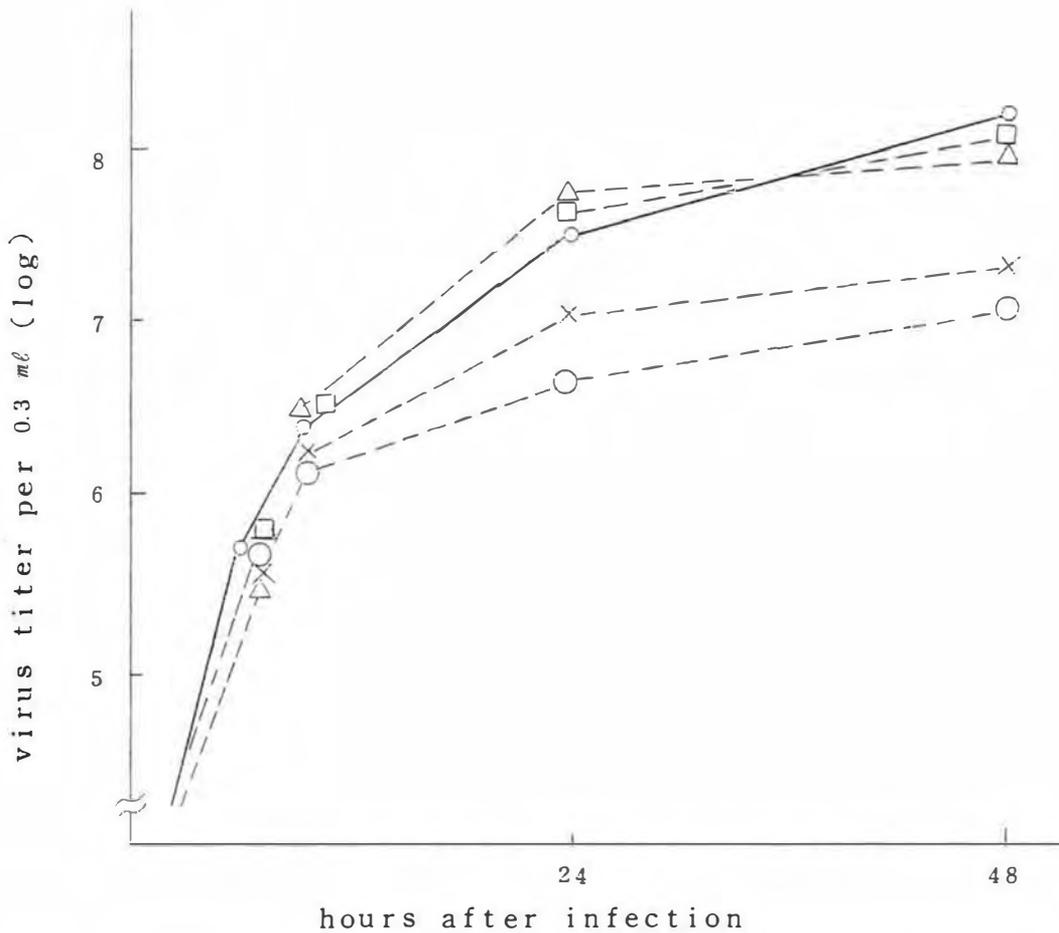


Fig 1-b Effect of chionoform on NDV multiplication in CE cells

Experiment was done with the same procedure described in Fig 1 a. concentration of chionoform 3.5% (○—○), 1.75% (×—×), 0.88% (△—△), 0.44% (□—□) and no chionoform (○—○).

2. 既知ウイルス粒子の感染価に及ぼす影響

一定の感染価を有するウイルス液 (Sindbis ウイルス液 3×10^5 PFU/0.1 ml, NDV 1×10^7 PFU/0.1 ml) にキノホルム含有牛血清を各種濃度で入れ、牛血清濃度を同一にするため不足の分は正常牛血清を加えた。このウイルス液をシャーレに 4 ml ずつ入れ 35°C で一定時間作用させた後ウイルス感染価を測定した。Fig 2-a, Fig 2-b に示すように、Sindbis ウイルスはキノホルム 3.5% の場合、22 時間で対照に比し 97% 感染価が低下するのにも、NDV ではキノホルムによる感染価の低下はほとんど認められない。又、キノホルム 3.5% によつて 97% 感染価が低下した Sindbis ウイルスを 100 mμ のフィルターで濾過した場合、その前後で感染価が 33.4% 低下するが、これは対照実験でも濾過により 34.3% 低下することから、キノホルムによつてウイルスが凝集したためではないと考えられる。

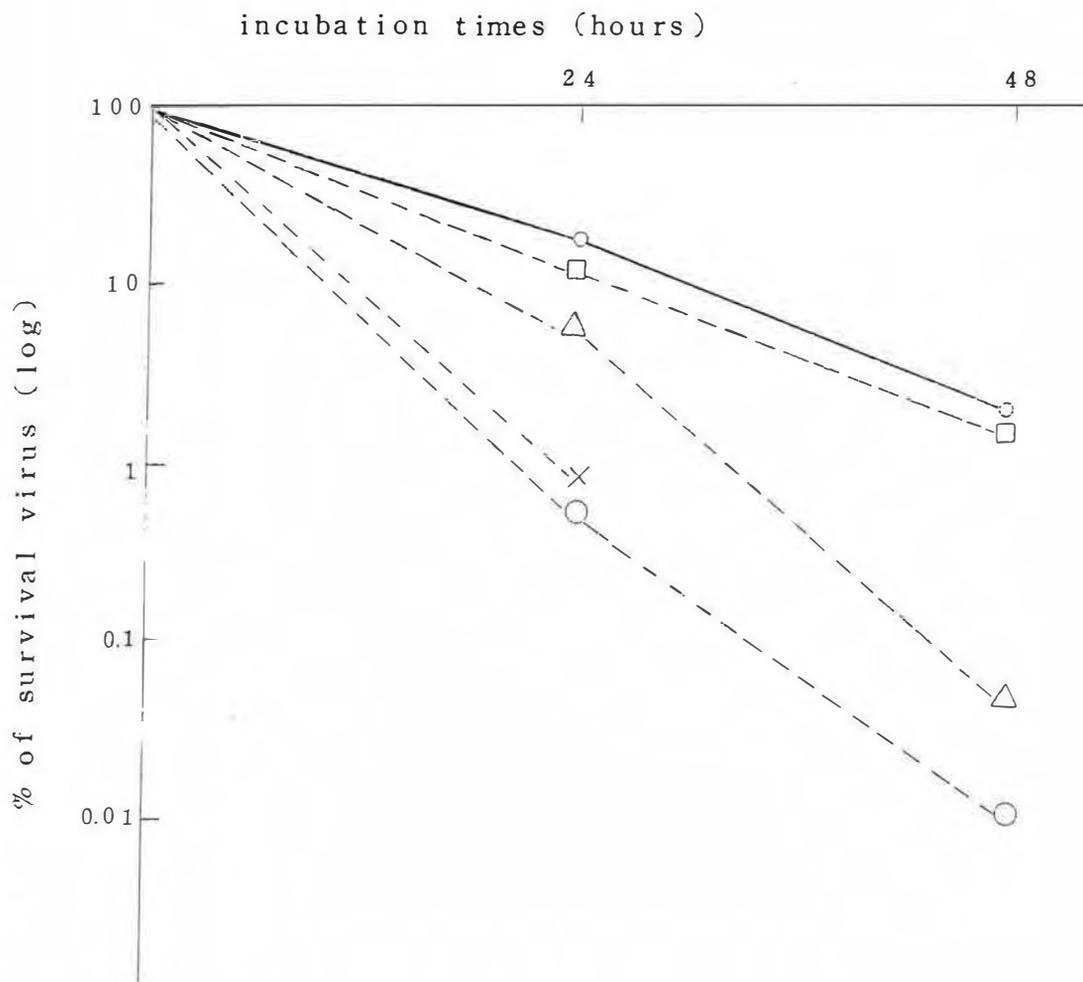


Fig 2-a Inactivation of Sindbis virus by chionoform

Sindbis virus was mixed with YLE medium containing chionoform. After incubation at 35 °C, virus infectivity was assayed. concentration of chionoform 3.5% (○--○), 1.75% (×--×), 0.88% (△--△), 0.44% (□--□) and no chionoform (○—○).

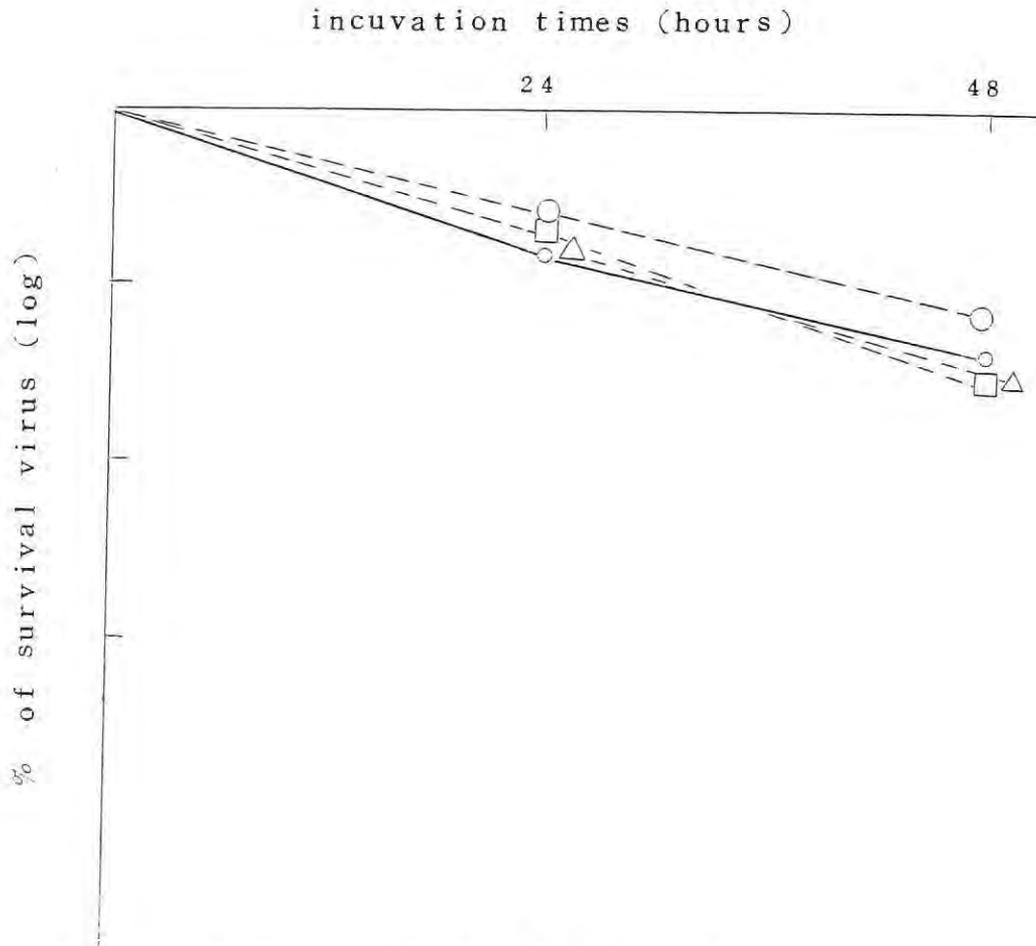


Fig 2-b Inactivation of NDV by chionoform

Experiment was done with the same procedure describe in Fig 2-a. Concentration of chionoform 3.5% (○---○), 1.75% (×---×), 0.88% (△---△), 0.44% (□---□) and no chionoform (○—○).

3. IF 産生に及ぼす影響

CE細胞に Sindbis ウイルス (1.3×10^6 PFU/0.1ml) 0.1ml を接種し, 35°C 1時間吸着後, 0% YLE液で洗滌し, 各種濃度のキノホルム含有維持液を 4ml ずつ加え, 35°C 24時間培養した。その液中の IF 価, 及びウイルス感染価をそれぞれ Fig 3-a, Fig 3-b に示す。ウイルスの増殖はキノホルム 3.5%, 及び 1.75% の場合, 対照に比しておよそ 93% 近く抑制されているがその時点で IF はほぼ対照と同じ位産生されていると考えられる。

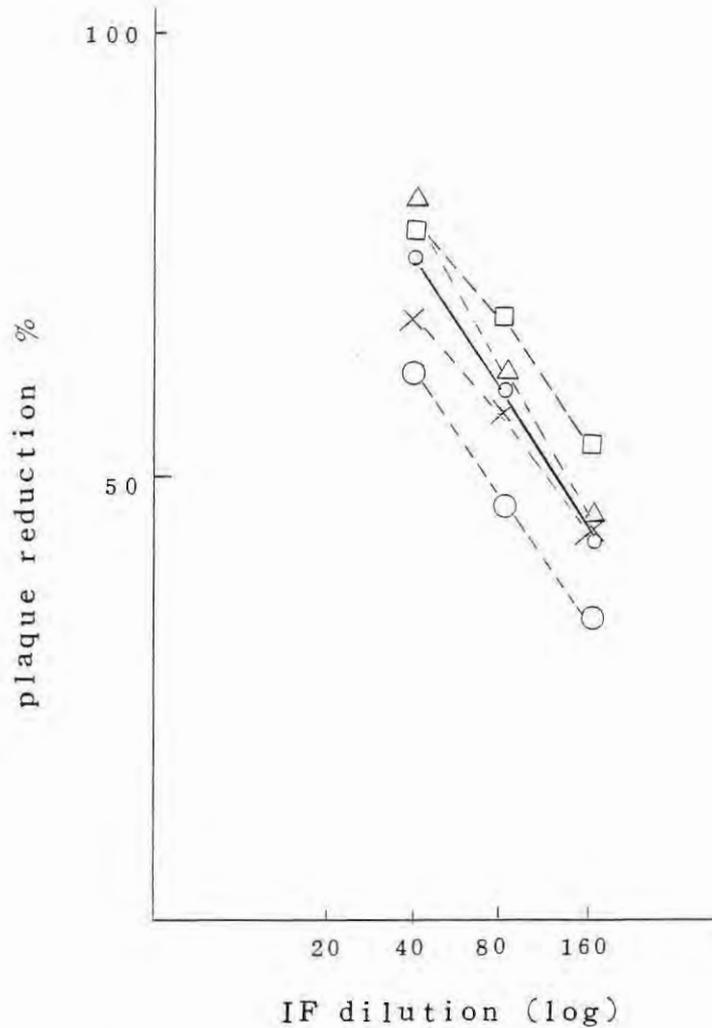


Fig 3-a Effect of chionoform on IF production by Sindbis virus in CE cells

Sindbis virus was inoculated to CE cells. After 1 hour, cells were washed and each dish provided with YLE medium containing 3.5% (○--○), 1.75% (×--×), 0.88% (△--△), 0.44% (□--□), chionoform and no chionoform (○—○) respectively. After 24 hours incubation, IF titer of the culture fluids was assayed by plaque reduction method.

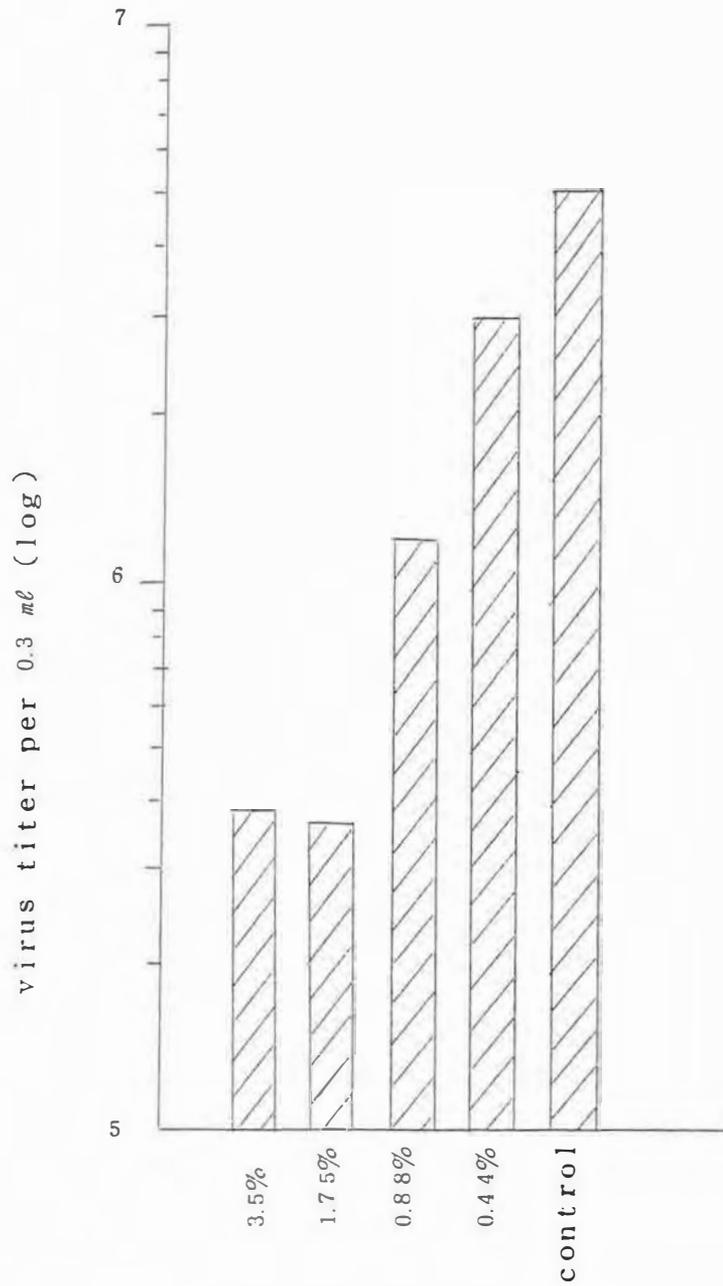


Fig 3-b Effect of chionoform on Sindbis virus multiplication in CE cells.

Virus titer of the culture fluids at 24 hours after Sindbis virus inoculation.

4. IF分子に対するキノホルムの直接作用

NWSウイルスで作ったIFをまず0%YLE液で10倍に希釈し、それを用いてキノホルムの各種濃度液をつくり、35°C48時間反応させた後、そのIFカ価をブラツク法で測定した。しかし、キノホルムによるIFカ価の低下は全く認められなかつた。

5. IF活性に対する影響

CE細胞をIFとキノホルムを含んだ維持液で8時間以上前処置した後維持液を除去し、Sindbisウイルス(2×10^6 PFU/0.1 ml)を0.1 ml接種し、35°C1時間吸着させ、2回0%YLE液で洗滌し、2%牛血清加YLE液を4 ml加えて35°Cで培養した。経時的に測定したその液中のウイルス感染価をFig 4-a, Fig 4-bに示す。Fig 4-aは各種濃度のキノホルムを前処置した場合、Fig 4-bはNWSでつくつた25単位のIFと各種濃度キノホルムとの混合液を前処置した場合のSindbisウイルスの増殖曲線である。Fig 4-aより明らかなようにキノホルムを前処置した場合、その後キノホルムを除去してもウイルスの増殖はおよそ70%抑制される。にもかかわらず、IFとキノホルムの混合液を前処置した場合には、IFだけを前処置した時よりも逆に12倍も多くのウイルス産生がみられた(Fig 4-b)。このキノホルムによるIF作用の抑制機構を知るために、CE細胞に25単位のIF溶液を8時間前処置し、その液を除いた後、次に各種濃度のキノホルム溶液で更に3時間作用させ、液を除去してSindbisウイルス(2×10^6 PFU/0.1 ml)を0.1 ml接種した。35°C1時間吸着後、0%YLE液で2回洗滌し維持液4 mlを加えてウイルスの増殖をしらべた。ウイルス接種後15時間目の液中のウイルス感染価を測定した結果Fig 4-cに示すように、第1回目の前処置としてIFを充分作用させた場合でも、2回目にキノホルムを短時間作用させると、IF作用の抑制がみられた。又、第1回目の前処置を普通の維持液とし、次にキノホルムを3時間作用させたものはほとんど対照と同じ程度のウイルス産生があつた。

なお、キノホルムやIF等の前処置によるCE細胞へのウイルス吸着の影響を未吸着ウイルスの定量によつて調べた限りでは、ほとんど有意の差は認められなかつた。

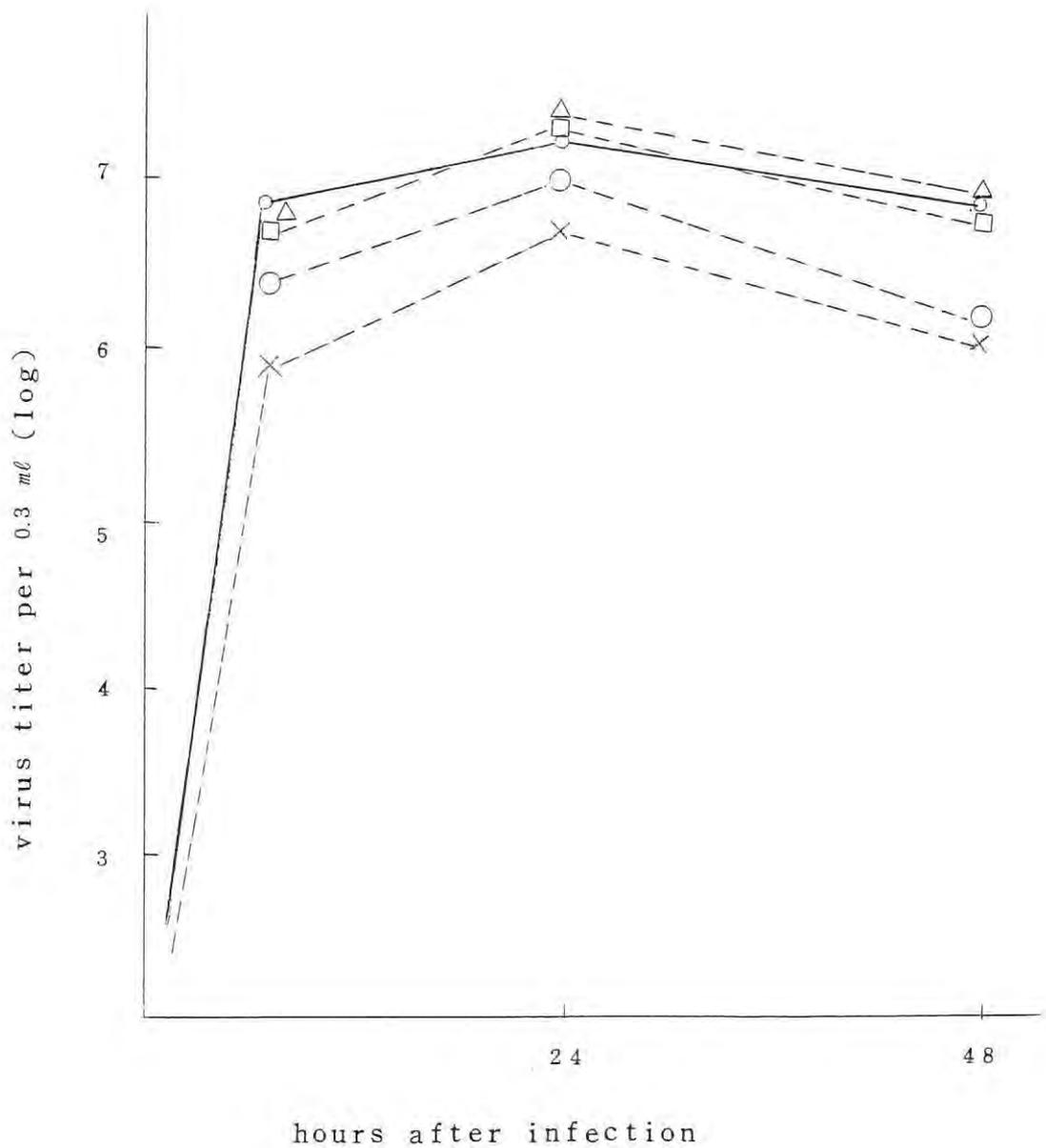


Fig 4-a Effect on the yield of Sindbis virus in CE cells by pretreatment of chionoform

Cells were treated with chionoform for 8 hours, then washed and inoculated with Sindbis virus. After 1 hour cells were incubated with chionoform free medium. concentration of chionoform of pretreatment media 3.5 % (○—○), 1.75 % (×—×), 0.88 % (△—△), 0.44 % (□—□) and no chionoform (○—○).

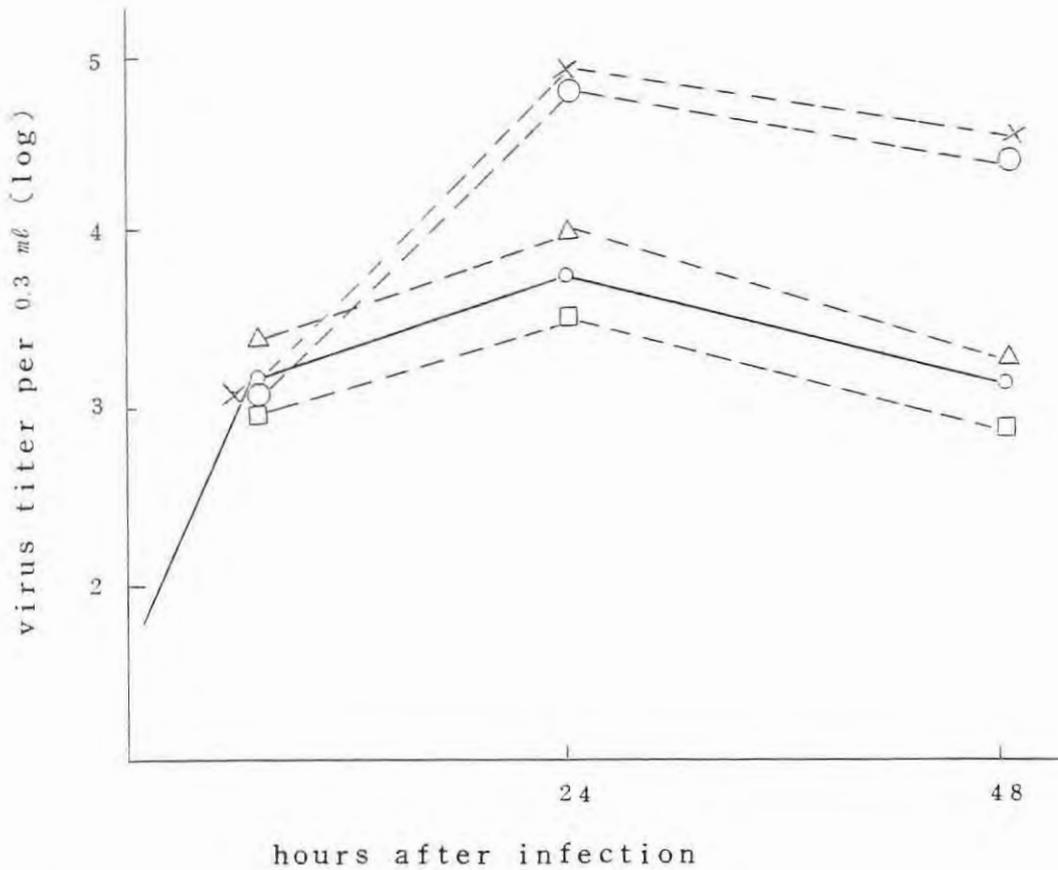


Fig 4-b Effect of chionoform on the action of IF

CE cells were treated with mixture of IF and Chionoform for 8 hours, and further treated as in the experiment described in Fig 4-a. IF titer in the mixture was 25 units per 4 ml, concentration of chionoform 3.5% (O--O), 1.75% (x--x), 0.88% (△--△), 0.44% (□--□) and no chionoform (o--o).

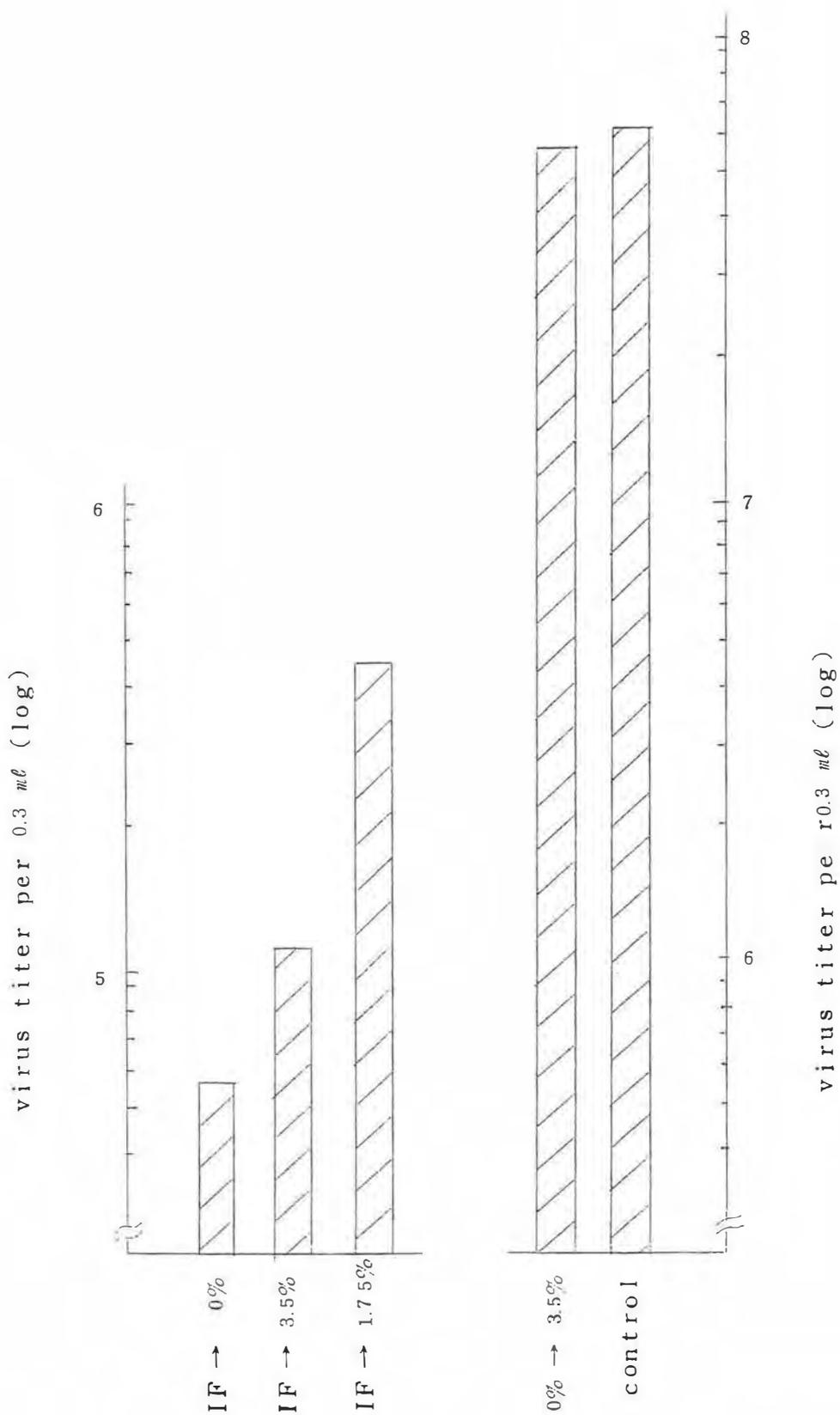


Fig. 4-c Effect of chionoform on the yield of Sindbis virus in IF pretreated cells.

CE cells were pretreated with IF for 8 hours. After

removal of IF, reincubated with chionoform for a further 3 hours, then Sindbis virus was infected, and at 15 hours after infection infectivity of culture fluids were assayed.

考 察

高濃度のキノホルムをCE細胞に作用せしめると、細胞は変性しガラス壁から離脱し死滅する。従って本実験には、細胞のmacroscopicな変化が認められない濃度で使用した。

Sindbis ウイルス粒子不活化に関するキノホルムの作用機序については、現在検討中である。又、キノホルムによつてSindbis ウイルスやNDVの増殖は抑制されるが、しかしSindbis ウイルス感染によるIF産生は対照と同程度まで充分行なわれることがわかつた。NDVの場合、ウイルス粒子はこの濃度のキノホルムによつては不活化されないことから、このウイルス増殖抑制は、細胞内でのウイルス増殖のいずれかの過程にキノホルムが関与しているものと考えられる。

一般に細胞にIFを作用させるとウイルス増殖は抑制される。しかるに、IFとキノホルムを同時に作用させた場合、キノホルムのウイルス増殖抑制作用があるにもかかわらず、IFだけを作用させた場合よりも、かえつてウイルスの増殖が良くなることがわかつた。更に、IFを8時間以上作用させ、細胞側にウイルスに対する抵抗性を充分そなえさせた後、即ち、IFによつて細胞側にいわゆるAntiviral Proteinがつくられた後でもキノホルムを短時間作用させただけでIF活性は抑制された。このことから、キノホルムのIF活性抑制作用は、AVPの合成以後にもあり、選択的にAVP合成阻害によるものとは考えられない。ウイルス増殖には勿論、IF産生、IF作用の為にRNA合成や蛋白合成が必要であり、一般的なキノホルムの呼吸阻害だけでは以上の実験結果を説明することが出来ない。ウイルス粒子及びIFに対するキノホルムの作用については、今後引き続き検討したい。

総 括

キノホルムは本実験に使用した濃度でSindbis ウイルスの粒子そのものの感染性を低下させる作用があるが、NDVは、その濃度ではほとんど不活化されない。

キノホルムは、CE細胞におけるSindbis ウイルス及びNDVの増殖を抑制する。

CE細胞とSindbis ウイルスの系におけるIF産生については、本実験に使用したキノホルムの濃度ではほとんど影響なく、対照と同程度のIF産生がある。

キノホルムは I F 活性に対する抑制作用を有する。その作用は I F 分子を直接的に不活化するものではなく、I F によるいわゆる Antiviral Protein 合成以後にも、その I F 活性抑制が認められた。

培養細胞による病原分離の試み

俵寿太郎，金政泰弘，林 英生，赤塚和也，市川弘幸，岡部昭延，

(岡山大学医学部微生物)

SMON患者糞便材料から，培養細胞を用いてウイルスとマイコプラズマとを混合分離した。ウイルスについては患者血清との間の中和試験が陽性とは言い難いし，マイコプラズマと患者血清との関連については目下尚検討中であり，これらを病因であるというわけにはゆかないが，いずれもSMON患者に由来したものであることに間違いはないと考えられる。

そこで予備的実験として，犬にキノホルムと分離マイコプラズマを経口的に接種した結果，マイコプラズマのみを投与した犬は，何ら症状を示さなかったが，キノホルムのみを投与した犬は，後肢の麻痺症状を示し，マイコプラズマとキノホルムを投与した犬は，前後肢の麻痺と失明をきたし歩行不能となった。

I 緒 言

SMONを感染説の立場から，その病因を微生物に求めようとするとき，多くのものが考えられるわけであるが，そのうちウイルスに関連して報告されたものでは，1969年までのものは甲野⁽¹⁾により総括報告されており，その後のものでは新宮⁽²⁾，井上⁽³⁾⁽⁴⁾，武内⁽⁵⁾，東⁽⁶⁾，太田⁽⁷⁾らおよび俵らの報告が行なわれている。そしてマイコプラズマに関連して報告されたものでは，本間⁽⁹⁾，富山⁽¹⁰⁾，甲野⁽¹¹⁾らおよび俵⁽⁸⁾らによるものがみられる。

われわれは，昭和43年秋以来1年間，岡山県下に多発したSMON患者の材料から，動物実験，培養細胞による実験および細菌検査等による病原体分離を繰返えし試みてきた結果，培養細胞を用いてウイルス学的検討を加えてみる必要を感じたわけである。そしてウイルスとマイコプラズマを同時に分離したのであるが現在までに得られたところを，まとめてみる次第である。

II 実験材料ならびに方法

使用した培養細胞は人系，マウス系，豚系，猿系，犬系およびハムスター系等広範囲の細胞種であるが，主としてHeLa・S3細胞，およびMDCK細胞を用い，無血清YLEで維持培養した。

分離方法は，材料の患者糞便をPBSで10倍希釈し，遠心沈澱上清をミリポアフィルター(HA)で濾過したもの，あるいは上清にペニシリンおよびストレプトマイシンを加えたものをもって接種材

とした。すなわち、その0.1 ml を細胞培養試験管に接種し、培養液0.9 ml を加え、37℃で静置培養し乍ら、2～3日毎に液替えを行ってCPEを観察した。

Ⅲ 成 績

SMON患者糞便10例中8例に(表1)、そして健康人糞便7例中1例に同様のCPEを示すAgentを分離し得た。すなわち糞便材料を細胞に接種すると2～3日後に、細胞は特有の収縮円形化するCPEを示し(図1) cell to cell による継代が数代に限り可能でついに消失した。細胞の染色標本では、microvilli の数量の増加がみられるが封入体は認められず、電子顕微鏡的切片標本の観察では、細胞表面からbudding してくる直径130～150 mu のやや楕円形でelectron denseなウイルス粒子をみとめた(図2)。このウイルスの感染価は至って低く、 $-\log \text{TCID}_{50} / \text{ml}$ 3.1程度である。

表1 患者症状の概略

	細胞変性 効果 (CPE)	性 別	年 令	症 状 の 概 略				
				軽重度	腹部症状	知覚障害	運動障害	視力障害
	+	♀	61	重症	腹痛 水様便	乳房の下より足先まで	歩行不能	あり
	+	♂	38	重症	腹痛 下痢	剣状突起以下のしびれ	歩行困難 (高度)	あり (中等度)
	+	♂	61	中等症	腹痛 便秘	大腿中部以下のしびれ	歩行困難 (中等度)	なし
	+	♀	27	中等症	腹痛 下痢	下腿のしびれ	歩行困難 (中等度)	なし
	+	♂	33	軽症	腹痛 下痢	下腿のしびれ	なし	あり (軽度)
	-	♀	39	中等症	腹痛	膝以下のしびれ	なし	なし
	+	♀	41	中等症	腹痛 下痢	下腿部以下のしびれ	歩行困難 (軽度)	なし
	+	♀	67	軽症	腹痛 下痢	膝以下のしびれ	歩行困難 (軽度)	なし
	-	♀	62	中等症	腹痛 下痢	以下の知覚まひ	歩行不能	あり (軽度)
	+	♀	29	中等症	腹痛 下痢	以下の知覚まひ	歩行不能	なし

このようなCPEを示すウイルス分離株について、さらにPPL0寒天培地によるマイコプラズマの培養を行ったところ、全分離株から培養が陽性であった。すなわち、ウイルスとともにマイコプラズマの混在が認められたわけで、対照にMDC K細胞からマイコプラズマは認められずマイコプラズマも患者材料に由来しているものであることが判った。マイコプラズマのみによるCPEは、ウイルスと混在した状態で示されるものより円形化の程度が弱く、その発現までに7～10日の長時間を要

した。マイコプラズマの大きさは、PTAによる陰性染色像で100 $m\mu$ から2 μ 以上のものまであって、形も球形からフィラメント状のものまで大小不同多形態性を示していた(図2)。

次に、これら分離ウイルスおよびマイコプラズマと患者血清との中和試験については、ウイルスでは陽性結果を得ることが出来なかった。その1例を示せば表2の如くで、健康人血清との間に差を認めることが出来なかった。またマイコプラズマについては、その結果の判定に可成り考慮すべきものがあり、目下尚検討中である。

表2 中和試験成績の1例

血 清	番号	採取年月日	中和抗体価(血清稀釈度)	
			O-DH株	O-KK株
患 者	1	45. 1. 17	1:4	1:2
	2	45. 7. 21	1:32	1:4
健 康 人	1	45. 7. 21	1:2	1:2
	2	45. 7. 21	1:2	1:2
	3	45. 7. 21	1:16	1:2

以上のような結果から、勿論これらをSMONの病原体であるということとは出来ない。しかしながら、いずれもSMON患者材料に由来しているものであることは考えられる。

ここで、これらの分離材料の動物実験を犬によって予備的に試みることにし、あわせてキノホルムとの関係をもみることとした。使用した分離材料は新しく分離した細胞培養マイコプラズマ(O-DM株)であり、これとエマホルムとを用いた。使用した犬は一腹から生れた生後1ヶ月の雑犬4匹で、いずれも径口的に与えたものであるが、接種材料別区分は下記の如くである。

- №1……〔分離材料(O-DM株)〕+〔エマホルム〕……症状 (卍)
- №2……〔分離材料(O-DM株)〕+O……………症状 (一)
- №3……O + 〔エマホルム〕……………症状 (+)
- №4……〔患者糞便→犬→糞便〕+〔エマホルム〕……………症状 (±)
- 〔症状出の№4〕+〔分離材料(O-DM株)〕 症状 (卍)

すなわち、№1の犬は培養細胞で継代中のマイコプラズマ(O-DM株)の2 ml づつを、5~6日間隔で36日間に7回経口投与し、その後64日間無接種のまま症状の発現するのを観察したが無症状であった。それからエマホルムの投与をはじめ、実験開始131日(エマホルム約24.5g投与)で後肢の麻痺が見られ次第に症状は強くなり、前肢にも麻痺が及んで歩行困難となり、146日(エマホルム約45.5g投与)で失明し148日で歩行全く不能となった。

分離材料のみを№1と同じように与えて、エマホルムを全く与えていない№2の犬は、179日

間観察したが何ら発症はなかった。そして、 No. 1 と同じ方法でエマホルムのみを与えて分離材料を与えていない No. 3 の犬は、130日(エマホルム23♀投与)で後肢の麻痺がみられ、この状態は179日(エマホルム83♀投与)まで続き、症状はそれ以上に強く進行することはない。

No. 4 の犬は、SMON患者糞便(O-DM株とは異なる患者)そのものを経口的に投与し、その後3日して排出した下痢便を、更にもう一度2代目の犬すなわち No. 4 の犬に投与し、前3者の犬と同様にエマホルムを与えたものである。これは126日(エマホルム15.5♀投与)で後肢に麻痺がきたが、3日間続いただけでこの麻痺は回復し、その後31日間エマホルムの投与を続けながら観察したが何ら症状はみられなかった。ここで分離材料O-DM株の経口接種を開始したところ、2m ℓ づつ11日間与えた時点で後肢の麻痺が表われ、14日で前肢にも麻痺がみられるようになり、歩行困難となった。尚目下観察継続中である。

IV 総括ならびに考案

昭和43年秋以来、岡山県下に多発したSMON患者から病原体の分離実験を試みてきた。すなわち分離用材料として用いたものは、患者の糞便、尿、血液、脳、髄液および舌苔である。これらの材料を各種実験動物と各種培養細胞に種々の方法で接種し、長時間観察を行ったのであるが、すべて陰性結果のみで病原らしきものを分離することは出来なかった。

しかし、無血清培地による培養細胞を用いることにより、ウイルスとマイコプラズマを混合分離することが出来た。ウイルスは継代が至って困難であり、数代にして消失し、しかも患者血清との間の中和試験は陽性であるとはいえなかった。そしてマイコプラズマと患者血清との間の関連性については尚検討中で不明である。このようにウイルスもマイコプラズマも現状では、SMONの病因として認めるわけにはゆかないが、ともにSMON患者に由来して分離されたものであることに間違いはなく、SMONと何らかの関係があるのではないかと考えるわけである。

そこで、最近キノホルムがSMONに関係ありとする報告が多くなってきたので、エマホルムと培養細胞で増殖継代しているマイコプラズマとを犬に経口的に与えてみたのであるが、その結果マイコプラズマのみを与えた犬は発症せず、エマホルムのみを与えた犬は後肢に麻痺がみられ、両者を与えた犬は前後肢の麻痺と失明をきたし歩行不能になって、SMONを思わせるような症状を示した。

恰もマイコプラズマのみ或いはキノホルムのみ投与では、発症はないか或は麻痺のみを表わすが、両者をあわせ与えることにより症状はSMONに似たようなものになるとの印象を与える。しかしこれは、あくまでも予備的に行なったもので、例数は少なく、病理組織像は、いまだ検査途上でもあり、人のSMONにおける病理所見との比較が問題となることは勿論でSMONによく似た症状が犬にみられた現象があったというにすぎない。再検討を要する実験であると考えられる。

この研究はスモン調査研究協議会の研究費によるものである。最後に、実験について種々お世話になっている甲野会長、本間教授その他多くの方々に対し心から感謝の意を表する次第である。

文 献

- 1) 甲野礼作：スモン病因論—感染説の立場から。最新医学，24，2403—2406，1969
- 2) 新宮正久：SMON流行地と非流行地における住民のECHO 21型ウイルスに対する抗体保有状況，スモン調査研究協議会。第3回病原班会議抄録，1970
- 3) 井上幸重，西部陽子，中村良子：スモン患者糞便より高率に分離された新しいウイルス。医学のあゆみ，72，321～322，1970
- 4) 井上幸重，西部陽子，中村良子：スモン患者糞便より高率に分離された新しいウイルス。（第2報）。医学のあゆみ，73，68～68，1970
- 5) 武内忠男，桜間信義，富尾延江：SMONの特異な腸病変とそれより検出されたウイルス。医学のあゆみ，73，65～68，1970
- 6) 東昇：スモン病原体の電子顕微鏡的研究。SMON調査研究協議会，第3回病原班会議抄録，1970
- 7) 太田善介，大藤真，SMON患者より分離されたウイルスの電顕像。医学のあゆみ，74，600～602，1970
- 8) 俵寿太郎，金政泰弘，林英生，赤塚和也，市川弘幸，坂本鈴江：培養細胞によるSMON病原体分離の試み。医学のあゆみ，75，66～68，1970
- 9) 本間遜，帖佐浩，榎本美枝子，渡辺肇，富山哲雄，青山友三，甲野礼作，齊藤守，スモン患者の舌苔よりの菌の検索。SMON調査研究協議会，第3回病原班会議抄録，1970
- 10) 富山哲雄：SMON患者由来マイコプラズマと患者血清の血清反応。SMON調査研究協議会，第3回病原班会議抄録，1970
- 11) 甲野礼作，赤尾頼幸，志賀定同：スモン患者咽頭および糞便からのマイコプラズマ分離の試み。SMON調査研究協議会，第3回病原班会議抄録，1970

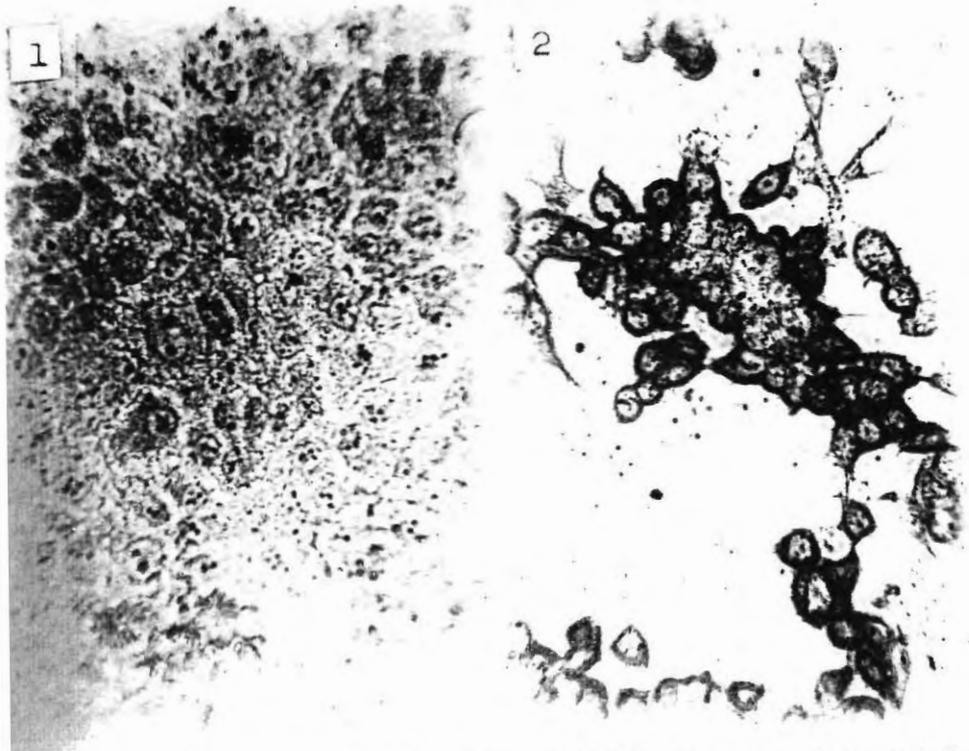


図 1. (1) は健康人糞便接種後 4 日の MDCK 細胞で、なほ健全なる細胞の単層発育を示す。
 (2) は SMON 患者糞便接種 3 日の MDCK 細胞にみられる CPE を示す。

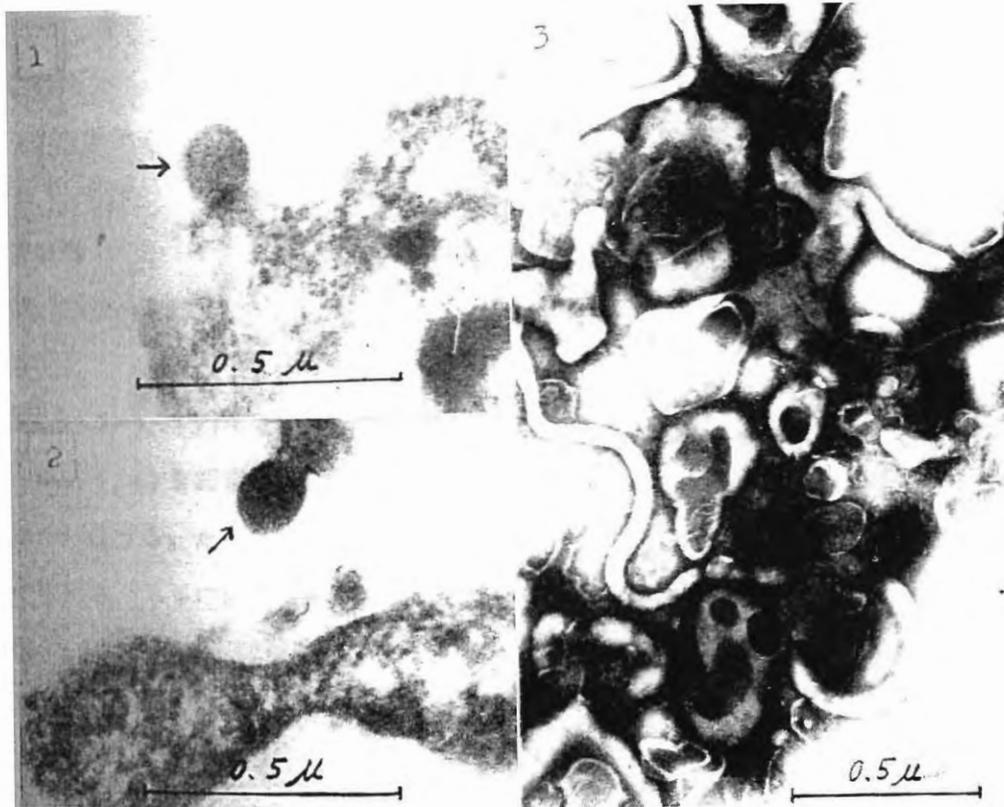


図 2. (1) および (2) の矢印はウイルス粒子を示す。
 (3) は PTA で陰性染色したマイコプラズマで、球状からフィラメント状までの多形態性を示す。

スモン研究班報告

石田名香雄，本多光代（東北大，医，細菌）

スローウィルス感染症の個体に於て，炎症乃至機能低下が出現する臓器は脳神経細胞であることが多い。他にAu抗原で代表される肝炎ウィルスが肝細胞に固定され，麻疹ウィルス（或いはパラインフルエンザウィルス）が全身性エリテマトーデス（SLE）として腎臓の糸球体や真皮の乳頭に固定される。

我々はスローウィルス感染症の病理機構をウィルス学的ならびに免疫学的に解析する事を目標に研究をすすめており，この立場からスモン研究班に参加した。特に最近1年間は脳神経組織の組織培養法の確立を目標に研究をすすめて来たので，その成果について報告する。

実験方法

1. 使用動物：

ニワトリ胎児（9日），マウス胎児（18日），ハムスター胎児（15日），ヒト流産胎児（4ヶ月）

2. 使用臓器：

大脳，小脳，背髄

3. 培養法：

① **Explant type**：コラーゲンかプラスマクロットをカバーグラスに敷きその上に組織片（ $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ ）を固定し，MEM 60% + 仔牛血清 30% + ニワトリ胎児浸出液 10% の組成の培地で培養する。ただし髄鞘形成を目的にするときはMEM 30% + 仔牛血清 30% + ニワトリ胎児浸出液 30% の組成の培地を用いた。5% CO_2 フランキを用い36℃で培養した。

② **Monolayer 法**：新生児マウスから大脳及び小脳を取り出し，実体顕微鏡下に脳膜を取り除いた後細切し，トリプシン消化を行った。—PBSにトリプシン0.2%，EDTA 0.02%，仔牛血清 0.5%，PC $100\ \mu/\text{ml}$ を加え室温で20分消化し，上清を2,000 rpm 遠心後，MEM（5倍 glucose，2倍 L-glutamin を含む）に仔牛血清 20% 加えた medium にサスペンドする。これを3回繰り返す， $10^6/\text{ml}$ になるよう調整し，試験管あるいはブラック瓶を用いて37℃で培養した。

得られた結果

1. 用いたすべての動物種の各神経組織からグリア細胞とせんい芽細胞の旺盛な増殖が3日頃より認められ、5～6日でmonolayerを形成した。ただし3週間の観察に於ても髄鞘形成を認めるまでに到らなかった。
2. すべての神経組織についてトリプシン消化後tube cultureを試み、細胞培養に成功したが、細胞の種類は多岐にわたり、神経細胞とグリア細胞の細胞種を生化学的に判断するまでに到らなかった。
3. Tube cultureの神経細胞維持は一般に困難で用いた培養液の水質、pHなどに敏感に反応し死滅する。
4. Herpes simplex Virus (HEF₁株)感染の経過追跡
マウスの脳細胞のmonolayerにm.o.i. = 4でHEF₁株を感染させると、Astrocyte様細胞とせんい芽細胞に感染し、CPEは明らかでないがWatkins現象(感作赤血球の吸着反応)が陽性となる。Oligodendrocyte様細胞にはWatkins現象が証明されなかった。

SMON患者の舌苔および糞便 より *Mycoplasma* の検出

本間 遜，帖佐 浩，榎本 美枝子，渡部 肇（東大医科研）
富山 哲雄（東京大学分院中検），甲野 礼作（国立予研）

I はじめに

SMON患者に緑舌がみられ，これが臨床上重要な所見であることは井形昭弘博士（東大神経内科）等の強調したところである。私共は齊藤守（東大医科研），井形両博士の依頼により緑舌の原因となる菌の検索を行なうことになった。患者の腸内細菌叢の検索は中谷林太郎博士（公衆衛生院）が行なうことになっているので，私共の目標は舌苔について特に依頼された緑膿菌の他に *Mycoplasma* に限って検索することになった。

昨年（1969年）11月中島病院，東大神経内科入院患者について，今年2月井原病院入院患者について4回にわたり舌苔より菌の分離を試みた結果，高率に *Mycoplasma* を分離したのでその成績について報告する。¹⁾

その間SMON患者よりウィルスの分離がづいづいと報告され，その材料が *Mycoplasma* に汚染されているかどうかについて検索を依頼された。その結果はいずれの材料よりもCPEで測定されたウィルス粒子の数と同じ濃度で *Mycoplasma* が検出された。これらのウィルスは患者の糞便より分離されたものであるので，今年8月井原病院入院患者の新鮮糞便より直接 *Mycoplasma* を分離することを試み，4例中2例より分離に成功した。

これらの *Mycoplasma* の同定およびSMONとの関連は今後の問題であるが，ここに中間報告として今までの結果を報告する。

II 材料および方法

患者材料：舌苔材料は水で数回うがいした後，舌苔を綿球で強くこすり寒天培地に塗抹した。最後にこれを液体培地に投入した。培養は嫌気性および好気性に行なった。糞便材料は新鮮便1gを液体培地10mlに投入し，Gas Pak（BBL）で嫌気状態にしてもち帰り，37℃，5日間増菌後，寒天培地にうえ，嫌気的および好气的に培養した。さらに一方では増菌した液体培地を3,000rpm 30分後，上清を再び液体培地に継代した後，寒天培地に接種した。5日目および10日目に観察した。

培地：PPLO寒天，PPLOブロス（Difco）に新鮮25%イースト（ニッテン）抽出液10

%, 馬血清 20% になるように加え, それぞれ寒天地培地, 液体培地とした。舌苔よりの分離の場合にはペニシリンおよび酢酸タリウムをそれぞれ 1000 U/ml , 50 mcg/dl に加えた。糞便よりの場合には $\text{CB-PC } 100 \text{ mcg/ml}$, $\text{CER } 100 \text{ mcg/ml}$ とした。

生物学的性状の検査: グルコース, マンニト, マンソース, キシロース, デキストリン, ラクトース, フルクトース, ゼルチット, サッカロースについて行なった。菌の増殖の有無は寒天培地に階段希釈液をぬり, 生じた集落数から判定した。テトラゾリウム還元能, メチレン青の還元, アルギニン分解能, 血球吸着能, 溶血能等すべて常法²⁾によった。

患者血清と分離株の血清反応: 井原市民病院, 青梅市立総合病院で SMON と診断された患者血清を使用した。抗原の調整に使用した *Mycoplasma* は中島病院と東大病院から分離された NH_2 株, NH_4 株の 2 株を用いた。一つの株を寒天培地 200 枚に塗抹し嫌気性に 37°C , 2 日間培養した。pH 7.2 の $\text{M}/15 \text{ PBS}$ を加えて菌体を集め, フェノールを 0.5% に加え 37°C , 2 日間, さらに 56°C , 30 分加温して抗補体性を除去した。これを $38,000 \text{ rpm}$ 2 回洗滌し, 20 ml の PBS にうかべて CF 抗原とした (CF 抗原価は 512 単位であった)。

IHA 抗原にはこの菌体を 10 Kc 20 分超音波処理して使用した。

コントロール血清をつくるため抗原 1.5 ml に Complete adjuvant 1.5 ml を加え約 3Kg のウサギの筋肉内に注射した。3 週間後に採血して血清を分離し, これに馬血清 $1/10$ 容を加え氷室に 2 日間おき吸収操作を行ない, 遠心上清をコントロール血清として用いた (CF 抗体価は 2,048 単位)。

CF は Ko lmer 法によった。4 単位の抗原の他に 32 単位, 64 単位の抗原を使用した。

IHA は等量の $1:20,000$ タンニン酸処理 2.5% 感作血球 0.05 ml , 希釈液 0.6% NRS 加 pH 7.2 $\text{M}/15 \text{ PBS}$ で管底用試験管を用いて行なった。

NT , (GI) は倍々希釈した患者血清 0.1 ml に液体培地 0.9 ml および *Mycoplasma* を加え, 37°C 2 日間嫌気培養した後, 寒天培地に brushing して 37°C , 2 日間嫌気培養して判定した。

III 実験結果

1. 舌苔よりの検出

1969年11月28日と1970年1月12日の両日にわたり東大病院, 中島病院入院患者 16 名について舌苔より *Mycoplasma* の分離を試みた。表 1, 2 に結果を示したが 2 回の検索を通じて舌苔の緑色の有無に拘らず, 16 例中 12 例 (75%) に *Mycoplasma* が検出された。

第1表 舌苔よりの菌の分離

患者名	性別	年齢	経過	再日 発時	第1回検査 44.11.28		第2回検査 45. 1.12	
					緑舌	Mycop	緑舌	Mycop
1	F	48	1年 3月		-	+	/	/
2	F	61	2年10月		-	+	/	/
3	M	50	1年 1月		+	+	/	/
4	F	33	4月		+	+	/	+
5	F	28	6月		-	+	/	+
6	F	60	4月		+	+	/	/
7	F	60	9月		-	-	/	/
8	F	65	10月		+	-	/	/
小計 (総計)					6/8		2/2 (6/8)	

東大関係と協同調査

第2表 舌苔よりの菌の分離

患者名	性別	年齢	発日 病時	再日 発時	第1回検査 44.11.28		第2回検査 45. 1.12	
					緑舌	Mycop	緑舌	Mycop
9	F	33	41	45	/	/	+	+
10	M	37	40		/	/	+	-
11	F				/	/	+	+
12	F	42	41. 2		/	/	-	+
13	F	30	42	45	/	/	+	+
14	M	36	45. 3		/	/	+	+
15	F	75	44.12		/	/	+	-
16	F	73	45. 2		/	/	+	+
総計					6/8		6/8	

東大関係と協同調査

以上は散发例であったので井原のように疫学的に流行を思わせる地域の患者についても調査し、比較検討することになった。表3, 4はそれらの検査成績を示したものである。表3には舌苔が厚く、緑色あるいは褐色に着色しているものをのせたが、9例中9例にMycoplasmaが検出

された。表4には臨床的に軽いもので舌苔も薄く、色も薄いピンクまたは黄色、あるいは白色の例を集めたが、2回の検査を通じて9例中6例(66%)に本菌を検出した。

第3表 舌苔よりの菌の分離

患者名	性別	年齢	発日 病時	再日 発時	第1回検査 45. 2. 23		第2回検査 45. 5. 9	
					舌苔	Mycop	舌苔	Mycop
1	M	42	44.1.2		+++	+	+	+
2	M	23	42. 8		+++	+	+	+
3	M	60	44. 1		+++	+	+	+
4	F	37	44. 4	44.1.0	+++	+	+	+
5	F				+++	+		
6	F	39	43. 6	44.1.0			+++	+
7	M	19	43. 7	44.1.2			+++	+
8	M	55	44. 5				+++	+
9	M	34	45. 3				+++	+
小計 (総計)					5/5		8/8 (9/9)	

岩野郁造，広田滋（井原市民病院）との協同調査

舌苔+++は着色した厚い舌苔。+は薄く着色した舌苔。

第4表 舌苔よりの菌の分離

患者名	性別	年齢	発日 病時	再日 発時	第1回検査 45. 2. 23		第2回検査 45. 5. 9	
					舌苔	Mycop	舌苔	Mycop
10	F	40	43. 3	44. 7	+	+	+	+
11	F	32	44. 5	44.1.0	+	+	+	+
12	F	52	44. 4		+	+	+	+
13	M	63	44. 5	44. 8 1.2	+	+	+	-
14	F				+	-		
15	F	29	44. 7		+	+	+	+
16	F	22	44. 2	44.1.0	+	+	±	+
17	F	19	43.1.2		+	-	±	-
18	F	74	43.1.0		+	-		
小計 (総計)					6/9		5/7 (6/9)	

岩野郁造，広田滋（井原市民病院）との共同調査

これらすべての *Mycoplasma* は嫌氣的に培養されたもので、初代好氣的に 1 個の集落でも形成したものはなかった。東大、中島両病院入院患者より培養された 12 株を 6 代継代後も同じ菌液を寒天培地にぬり、好氣性、嫌氣性の両方で培養を試みた。その結果 10 株は嫌氣性でのみ集落の形成をみた。他の 2 株は嫌氣性のプレートの集落数に比べて極めて少数の集落が好氣性培養で認められた。

分離株のマウスの脳内接種とモルモットに対する毒性

舌苔より分離されたものであるから当然、*M. Salivarum*, *M. orale* 等人由来の既知の *Mycoplasma* が混在していることは容易に想像される。これらの *Mycoplasma* 中に本病因とみられる菌株があるかどうかは今回は問題とされるわけである。従って単個集落分離を行なうことなく分離直後の継代しないプレート上の全集落をマウスの脳内に接種することにした。直径 6.5 cm のシヤレーに 2 ml の液体培地を加え、菌懸濁液をつくり、それをマウス (ddY, 4 週令) の静脈内に 0.2 ml または 0.3 ml を注射した。同時にその 0.01 ml を矢追針を用いて脳内に接種した。接種後 5 日、7 日、10 日、14 日、のいずれかの日に殺し、脳、肝、腎、脾、肺をとり出し、ガラス棒または乳鉢で細挫し、これを寒天培地に塗抹し嫌氣性に 37℃ に培養した。その結果脳のみから回収できたが、他の臓器からは検出できなかった。そこで東大、中島、井原病院よりの分離株計 20 株について脳内接種を行なって脳内から再検出できるかどうか、検出できた場合はその株を分離し検査することを試みた。その結果、東大、中島病院の 12 株より 10 株、井原病院の 8 株より 6 株がマウスの脳から再検出できた。この際対照無処置のいずれのマウスの脳および他の諸臓器からは菌は検出できなかった。

12 株の中の 1 株である NH4 株について脳内接種の実験をくりかえして行なった。表 5 に示すように接種後、1 日、2 日、4 日、5 日、9 日目に 5 匹ずつ殺し脳内よりの分離を試みた。その結果検出例数は 5 日目、9 日目で半減した。

NH4 株を N₂ ガス中でフアーマセル (NB5) で 37℃ に培養し、その 2 日、3 日の全培養をモルモット (200 ㏍) の腹腔内、静脈内に注射した。いずれの注射の場合にも注射直後に歩行困難、痙攣等の症状を示した。数日後注射した 4 匹は全部死亡した。対照として培地のみ同量注射したものではいずれの変化もみられなかった。

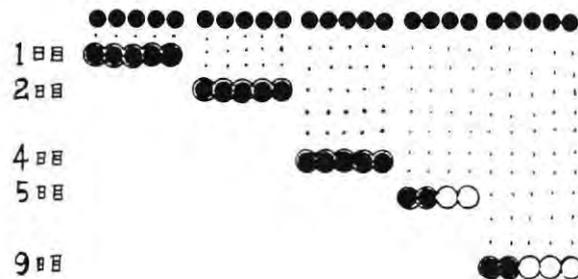
しかしその後同じ株で実験を反覆したが、注射直後の症状は多少弱い認められたが、死亡するものはなかった。その他の株についても同様の実験を行なったが、注射直後からの耳朶の充血、咳、跳躍等の症状はみられたがいづれも恢復し 1 ヶ月間の観察中に異常は認められなかった。

ハムスターに対しては前記注射直後の症状は軽微であった。

表5 SMON患者 舌由来Mycoplasma のマウス
脳内よりの再検出

1. マウス脳内接種後，5日以後に再検出されたMycoplasma (例数)

東大病院関係	10/12
井原病院関係	6/8
2. NH-4株接種マウス脳内よりのMycoplasma再検出数の変化



3. 分離株のBAT6細胞に対するCPE

東大，中島病院よりの4株についてしらべた。NH₄，NH₅，TH₄，の3株を液状培地に数代継代し，その原液および10⁻¹希釈液をBAT6細胞培養に0.1 ml ずつ4本接種した。初代ではTH₄，NH₄の2株では6日目CPE(-)であったが，NH₅株では6日目CPE(++)となった。この時対照の未接種BAT6細胞はCPE(-)であった。各々の培養液を2代継代したところ，10⁻²希釈でTH₄株は3日目CPE(++)，NH₄株，NH₅株は4日目でCPE(+)となった。即ちこれらの3株はBAT6細胞にCPEを示した。

つぎにNH₂株の寒天培地7代継代したものをさらに液状培地に1代継代し，BAT6細胞に接種した。初代は6日目CPE(+)であったが，対照に比べて前者程強くなかった。しかし陽性であった。2代継代したものについては行なわなかったが，継代によって強くなる可能性は前の3株の実験からみて濃いといえよう。

4. 分離株の生物学的性状

本来からいえば前述のように単集落分離しなければ菌株が純培養でない可能性が濃いので，現在この株の“クローン化”を行なっている。しかし，分離株の数代継代したものについて一応生物学的性状をあたってみた結果を表6に示した。

*京大ウイルス研井上助教授がBovine adenovirus type 3によりtransformしたハムスター由来のCell line.

第6表 分離したMycoplasma 20株の生物学的性状

糖分解能(1%糖含有)

アラビノース	グリコーゲン	グルコース	
トレハロース	イノシトール	スターチ	
マンノース	マニトール	デキストリン	
イヌリン	キシロース	ズルチツト	
ガラクトース	ラクトース	サツカロース	
フルクトース	すべて		陰性
溶血能(4%馬血液, 5%綿羊血液)			陰性
血球吸着能(0.5%馬血液)			陰性
テトラゾリウム還元能(0.02%含有)			陰性 (2株陽性)
メチレン青還元能(0.3%メチレン青)			陰性
ゼラチン液化(20%ゼラチン含有)			陰性
アンモニアの産生(尿素3%含有)			陰性
硫化水素の産生(酢酸鉛0.1%含有)			陰性
フィルムスポット	15株陽性	5株陰性	
アルギニン分解能			陽性

5. 分離株の薬剤感受性

デイクス法でしらべた結果を表7に示した。PC, AB-PC, SM, CFR, CEX, CL, PMX-P, NA, NBには耐性であったが, CP, TC, OTC, MC, DMCT, SPM, LM, GM, フラン, FRMには感受性であった。

第7表 抗生物質感受性

PC	—	CP	卍	LCM	卍
AB-PC	—	TC	卍	NA	—
MPI-PC	—	OTC	卍	NB	—
SM	—	MC	卍	GM	卍
KM	卍	DMCT	卍	Panfurans	卍
CER	—	EM	—	FRM	卍
CEX	—	OM	—		
CL	—	SPM	卍		
PMX-P	—	LM	卍		

6. 分離株 NH 2, NH 4 と患者血清との反応

30例の患者血清につき, CF, IHA, NT (GI)を行なったが3法ともすべて陰性であった(表8)。

第8表 分離株 NH 2, NH 4 と患者血清との血清反応

病院	日時 氏名	CF _{4u}	CF _{64u}	IHA	NT	病院	日時 氏名	CF _{4u}	CF _{64u}	IHA	NT	
井原	4.21	-	-	-	-	井原	4.22	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
	5.9	5.9	-	-	-	-	对照	4.25	-	-	-	-
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
青梅		6.9	-	-	-	-	对照	4.26	-	-	-	-
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
对照	5.9	-	-	-	-	对照	4.27	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
对照	5.9	-	-	-	-	对照	1084	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
对照	5.9	-	-	-	-	对照	1086	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
对照	5.9	-	-	-	-	对照	1088	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
对照	5.9	-	-	-	-	对照	1097	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
对照	5.9	-	-	-	-	对照	1098	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
对照	5.9	-	-	-	-	对照	1099	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
对照	5.9	-	-	-	-	对照	445	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
对照	5.9	-	-	-	-	对照	446	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
对照	5.9	-	-	-	-	对照	448	-	-	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
对照	5.9	-	-	-	-	对照	449	-	1:8	-	-	
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			

CF(-): 1:4未満, IHA(-): 1:10未満, NT(-): 1:10未満

7. 患者糞便よりの検索と検出株の性状

糞便よりウイルスを分離したといわれる培養細胞液4種類の分与を受け, 全例よりウイルス粒子と殆ど同数のMycoplasmaを分離した。これらの中1株は好気性で他の3株は嫌気性であった。集落の性状は嫌気性3株はよく似ていたが好気性の1株とは明らかに相違していた。

そこで同じ井原病院入院患者の新鮮糞便4検体を前述の方法に従ってMycoplasmaの分離を試みた結果, 2例から好気性, 嫌気性の両培養から分離できた。集落は小さく頭粒状で好気性

の方が嫌気性よりもやや大きい集落をつくった。

500 ml の肩つきコンベルに液状培地 200 ml を入れ、分離株を接種し振盪機で 36℃ で培養し、これを菌液および全培養として動物に注射した。ウサギ、モルモット、マウスに静脈内、腹腔内、脳内に注射したが 2 カ月間の観察で外見上いずれの異常もみとめられなかった。解剖所見も肉眼では異常はみとめられなかった。

はじめに述べたように一般細菌全般にわたっての検査は行なわなかった。ただ井原病院患者の舌苔 18 例中 4 例に *Serratia marcescens* を分離したことをのみを報告する。これを液状培地 (*Mycoplasma* 用) で培養し、その全培養液を綿球にしみこませて 37℃ に培養すると綿球は黒緑色に着色した。これを冷蔵庫 5℃ に放置すると、灰色、ピンク、黄色と時間の経過と共にいろいろの色調を呈した。

IV 考 察

SMON 患者 18 症例の舌苔より 15 例に *Mycoplasma* を検出できた。舌苔が厚く毛様の角化のひどい 9 例からは全例に検出された。これは舌苔のひどいものでは他の好気性の細菌も多数検出されていることから *Mycoplasma* の検出率も一段と高いことは容易に想像される。なかでも 18 例中 4 例に *Serratia marcescens* が検出されたことは興味深い。舌苔の鮮明な緑色がキノホルムによることは証明された³⁾。しかし舌苔の黒緑色、灰白色、ピンク、黄色に *Serratia marcescens* が関係していないとは断言できない。*Mycoplasma* の検出率であるが Heyflick⁴⁾ によれば 280 例中口腔より 8% の割合と述べている。石田らは最近歯石より高率に⁵⁾ 分離したことを報告している。

現在まで分離された菌株は同定されていないのは本文に述べた理由からである。今後クローン化を行ない血清学的検査を併試することによって同定を行なう予定である。ただ現在の検索で特徴と思われるものを強いて述べれば舌苔より分離したすべての株が嫌気性に増殖し、好気性にはごく一部の株しか生えないこと、しかしその集落数は嫌気性培養に比べて著しく少ないことである。またマウスの脳内に接種した場合 5 日以後 14 日まで再検出できる株が大部分であったことである。しかし脳内で増殖している証拠はまだえられていない。漸次消滅してゆくことと思われる。中村らは⁶⁾ 人由来 *Mycoplasma* をマウスに脳内接種した場合再検出できるのは高々 48 時間で 3 日目には消滅すると報告している。私共は SMON との関係で実験を進めている関係上、人由来株の汚染からもし含まれるとすれば脳親和性株のみが選択的に増殖しないかと考えて、脳内接種を行なったわけであるが、再検出された株についての調査はまだ終わっていないのでいずれとも結論することはできない。一方、同じ理由でモルモット、ウサギ、ハムスター等に対する病原性、毒性をしらべたわけであるが、現在まで明確な現象をつかまえていない。

患者血清と分離した *Mycoplasma* との関係であるが、これは NH₂、NH₄ の 2 種類のみを

抗原として用いたこと、抗原の調整方法、特にフェノール処理等抗原側の問題も決して万全を期したとはいえない。一方患者血清も採血の時期、保存方法等もさらに検討を要しようが、このような条件下では何等の関連は見出されなかった。今後株についてはクローン化され同定分離が行なわれた後、多くの株について抗原の作製方法も考慮に入れた上で再吟味したい。

V 結 論

SMON患者の舌苔18例より15例にMycoplasmaを分離した。このMycoplasmaは大部分は嫌気性であり、マウスの脳に接種する時は5日頃まで検出できるが、その後消滅の傾向を示した。その同定は進行中である。SMON患者血清との間にまだ何等陽性成績をえていない。

SMON患者新鮮便4例より2例にMycoplasmaを分離したが、これは好気性の方が嫌気性よりよく発育した。さらにSMON患者の便より分離されたとするウイルス材料(組織培養)4種より全例Mycoplasmaを分離した。これらのうち1株は好気性で他の3株は嫌気性であった。

集落の性状は嫌気性の3株はよく似ていたが好気性の1株とは明らかに相違していた。これらの株の同定は進行中である。

本研究は豊倉康夫教授、井形昭弘博士(東大神経内科)、中島 穰博士、畠山正己博士(中島病院)岩野郁造博士、広田滋博士(井原市民病院)、緒方正名教授、鳥田宣浩博士(岡山大学)、吉植庄平博士(青梅市立総合病院)の御協力をえて行なわれたものであり、ここに厚く謝意します。

文 献

- 1) 本間 遜, 帖佐 浩, 榎本美枝子, 渡部 肇, 青山友三, 富山哲雄, 甲野礼作: SMON患者の舌苔よりの菌の検出
第23回日本細菌学会関東支部例会抄録, 42, 1970
- 2) B. B. Aluotto, R. G. Witter, C. O. Williams and J. E. Faber : Standardized bacteriologic techniques for the characterization of Mycoplasma species. Intern. J. System. Bacteriol., 20: 35-58, 1970
- 3) 吉岡正則, 田村善蔵: SMON患者の緑色々素の本態。医学のあゆみ, 74: 320-322, 1970
- 4) L. Hayflick and E. Stanbridge: Isolation and identification of Mycoplasma from human clinical materials, Ann. N. Y. Acad. Sci., 143: 608-621, 1967.
- 5) 熊谷勝男, 由利恭子, 岩 武介, 宮本 勉, 日沼頼夫, 石田名香雄: 口腔内のマイコプラズマの生態。医学のあゆみ, 73: 639-640, 1970.
- 6) 中村昌弘, 坂本博章: ヒト由来マイコプラズマとウイルスとのマウスへの混合感染実験。日本細菌学雑誌, 25: 362-368, 1970.

SMON患者由来マイコプラズマによる患者血清反応

富山 哲雄 (東大分院中央検査部)

I はじめに

SMON患者舌苔から異常に高率にMycoplasma が分離されることが本間等により報告されたが、これらのMycoplasma がSMON発症とどういう関係にあるのかは未だに判然としていない。そこで、これらのMycoplasma とSMONの因果関係を解明する為の一つの方法として、分離したMycoplasma による血清反応を行ない、患者血中の抗体検出を試みた。

方法としては、通常Mycoplasma 抗体検出に応用されている三法、すなわち、補体結合反応、受身血球凝集反応、中和反応である。

II 試料及び方法

1. 患者血清

患者血清は、岡山県井原市民病院及び東京都青梅市立病院で定型的SMONと診断された症例から採取したものである。

2. Mycoplasma

抗原の調製に使用したMycoplasma は、本間により埼玉県中島病院及び東大病院SMON患者舌苔から分離されたもので、諸種の条件から、NH₄、NH₂両株を使用した。いずれもMycoplasma 培地及び寒天で継代し、用に望んで寒天平板に分離してから用いた。

3. 抗原の調製

1) 補体結合抗原

抗原調製用Mycoplasma は次の培地で培養した。

PPLO Broth w/o CV (Difco)	12g
Bacto Agar (Difco)	10g
Fresh Yeast Extract (自製) 25%溶液	80ml
Dextrose. 40%溶液	20ml
Horse Serum	160ml
精製水	560ml

培地はシャーレに 2.5 ml ずつ分注して平板とし、Broth で前培養した NH₂, NH₄ 両株を接種し、コンラージ棒で塗抹した。培養は 37℃ 2日、嫌気ジャーを用いて、触媒下、水素ガス置換法で行った。

培養後、先ず 0.15 M PBS (pH 7.2) を平板上に注加し、コンラージ棒で菌体を集め、これを三角コルベンに集めて、フェノール 0.5% を加え、37℃ 2日、更に 56℃ 30分加熱して抗補体性を除去した。このものを、超遠心機にかけて集菌し、38,000 rpm 2回 PBS で洗滌して、PBS に suspend して補体結合抗原とした。

この抗原は、ウサギ免疫血清との間に Box Titration を行って抗原価を測定したところ、512 単位であり、又、全く抗補体作用を示さなかった。

2) 受身血球凝集反応抗原

補体結合抗原を、10 KC 20分、超音波処理をして受身血球凝集抗原として使用した。

4. コントロール血清の調製

CF 抗原価 512 単位の抗原約 1.5 ml に Complete Adjuvant 1.5 ml を加え、よく混和して emulsion とし、約 3 Kg の家兎に約 10ヶ所筋注、更に、2週間後に追加免疫して3週間後に全採血して血清を分離し、これに馬血清を 1/10 容加えて氷室 2日吸収、3,000 rpm 30分遠心して、上清をとり、コントロール血清とした。

この血清は Box Titration で、補体結合抗体価 2048 単位を示した。又、1:32 以上で抗補体性を示さなかった。

5. 血清反応

1) 補体結合反応

すべて Kolmer 法に準拠し、Micro-titer で行った。抗原は 4 単位の他に、32 単位、64 単位を用いた。

2) 受身血球凝集反応

新鮮羊赤血球を洗滌して 2.5% 浮游液とし、これに等量の 1:20,000 タンニン酸を混合して、氷水中 15分処理し、2回 PBS で洗滌し、原量の PBS に Suspend して、タンニン血球とした。次いで、37℃ 15分間抗原感作を行い、1回洗滌してから NRS 0.6% 加 0.15 M PBS に suspend して感作血球とした。患者血清は、管底用小試験管を用いて、PBS-NRS で 2ⁿ 稀釈を行い、これに 1/10 量の感作血球を加え、室温で 18時間反応させ、管底鏡で判定した。

3) 中和試験

患者血清を 2ⁿ 稀釈し、この稀釈血清 0.1 ml に P P L O Broth 0.9 ml, Mycoplasma 浮游液 1滴を加え、37℃、2日、嫌気培養を行った。判定は、これを P P L O Agar に滅菌濾紙で brushing をして、更に 37℃、2日嫌気培養して行った。

III 結 果

補体結合反応，受身血球凝集反応，中和反応の結果は次の通りである。

病院	月日氏名	CF _{4u}	CF _{64u}	IHA	NT	病院	月日氏名	CF _{4u}	CF _{64u}	IHA	NT	
井原	4.21	-	-	-	-	井原	4.22	-	-	-		
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
		-	-	-	-			-	-			
	5.9	青梅	-	-	-	-	青梅	6.9	-	-	-	
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
			-	-	-	-			-	-		
-			-	-	-	-			-			
-			-	-	-	-			-			
-			-	-	-	-			-			
対照			-	-	-	-	対照		425	-	-	-
			-	-	-	-			426	-	-	-
			-	-	-	-			427	-	-	-
			-	-	-	-			1084	-	-	-
			-	-	-	-			1086	-	-	-
-	-	-	-	1088	-	-	-					
-	-	-	-	1097	-	-	-					
-	-	-	-	1098	-	-	-					
-	-	-	-	1099	-	-	-					
-	-	-	-	445	-	-	-					
-	-	-	-	446	-	-	-					
-	-	-	-	448	-	-	-					
-	-	-	-	449	-	1:8	-					

CF(-): 1:4未満, IHA(-): 1:10未満, NT(-): 1:10未満

即ち，三法とも，いずれの患者においても陰性であった。対照群の一例にのみ64単位の抗原を用いた補体結合反応で1:8という弱い陽性を示した。

IV 考 察

SMON患者舌苔より分離されたMycoplasmaを抗原として行った血清反応で，いずれの患者も陽性を示さず，この限りにおいては，このMycoplasmaとSMON発症との関係に知見を得ることはできなかった。ただ，この結果から直ちに，これらのMycoplasmaが本症の病因として無関係であることは断定できない。それは，ここで得られた結果から次の三つの場合が考えら

れるからである。

1. Mycoplasma が本症の病原であったとしても、尚、抗体が検出できなかった可能性

1) 株の選択の問題

ここでは分離された株を無選択に使用したが、この株が病原株であったかどうかは全く判然としない。多数の株の中には本症の病原となっているものが混在していた可能性を否定できない。あたかも腸管に *Salmonella* あるいは *Shigella* が常在菌の中に少数存在する如く、この場合も多数の常在 *Mycoplasma* の中に少数の病原 *Mycoplasma* が存在していたのかもしれない。しかし、現在この様な特殊な *Mycoplasma* に対する分離培地、更にはこの様な株の発育する培地についての知見はないので、この様な可能性をも考えて、培地及び培養法に考慮を払って更に検索を進めることが必要であろう。

2) 方法及び抗原調製法の問題

ここでは *Mycoplasma* に従来応用されてきた三つの方法を使用した。これらの方法の適用でよいかどうか、は問題であろう。又、本菌が強い抗補体性を示す為に、常用されているフェノール処理、加熱処理を行ったが、これらはいずれも抗原の性状に少なからぬ影響を与えるものであるから、抗原の処理法にも問題が残る。

3) 毒素の可能性

動物ではマウスの rolling disease の様に神経毒素産生 *Mycoplasma* が知られており、もしも本症がこの例の様に、感染 *Mycoplasma* の産生する毒素によるものであるとするならば、抗毒素としては検出されても、通常の抗体としては検出されない、という可能性もあり得よう。

4) 組織抗体の可能性

いわゆる液性抗体の形をとらずに、細胞性抗体の様な存在も考慮しなければならないであろう。

5) その他

その他にも、採血期の問題、抗血清の保存の問題、等々も考える必要があるであろう。

2. 病原ではあっても抗体が上昇しない可能性

本 *Mycoplasma* が病原ではあっても、これに対し抗体が産生されない、又は、されにくく、検出できない、という可能性も否定できない。

3. 病原ではない可能性

SMONが可成慢性的経過をたどることから、*Mycoplasma* の様な微生物が異常に増殖することは、むしろ自然の現象であって、ここから分離される *Mycoplasma* は原因ではなく単なる結果であるのかもしれない。

以上、可能性としてのみ三つの場合を考慮したが、この内のいずれであるかは現在全く不明で

あり，上述の諸要因，可能性を考えて，本症とMycoplasmaの相関を更に追求していかなければならない。

V 要 旨

SMON患者舌苔由来のMycoplasmaを抗原として，本症患者血清について，補体結合反応，受身血球凝集反応，中和反応を行ったところ，いずれの方法においても全例陰性であった。

本研究を遂行するに当り，終始懇切な御指導と御協力をいただいた東大医科学研究所本間遜教授，患者試料について御高配いただいた井原市民病院岩野郁造，広田滋両博士は深謝する。又，本実験に当り技術的助力を惜しまれなかった東大分院中央検査部南波邦治，桜井敏子，高橋文子，神奈川県立こども医療センター検査科高橋明子の諸氏に感謝する。

スモン患者舌よりのマイコプラズマの分離

中村昌弘，川口元也（久留米大学医学部微生物学）

I 序

本間等⁽¹⁾はスモン患者の舌より高率にマイコプラズマを分離し，これが従来報告されているマイコプラズマとマウス脳での滞留性その他の性状に於て著しく異っていることを報告した。

われわれもスモン患者の舌よりマイコプラズマ(M)の分離を試みたので，その成績を報告する。なお，対照として慢性疾患々者，歯科疾患々者及び健康者の舌よりの分離も平行して行った。

II 方法と材料

1. スモン患者舌よりのMの分離

1) 材料採取病院：

国立呉病院および久留米大学病院

2) 材料採取年月日：

1970年9月18日と1971年1月29日の2回に亘って材料を採取したが，その間に不定期にも採取した。これらの月日は実験成績の項に示した。

3) 材料採取方法とM分離方法

滅菌綿球で患者の舌をぬぐい，この綿球を直ちにPPLO broth (5ml) に投入し，持ち帰る。翌日PPLO broth 中の綿球を取り出しPPLO agar に塗株37℃でN₂下で培養3日，及び7日にコロニー発生の有無を観察，一方，綿球は再びPPLO broth に投入し，普通フラン器で7日間培養後その0.1mlをPPLO agar へ塗抹N₂下で培養す。マイコプラズマ様コロニーは確認のため，そのコロニー一部のblock を agar - agar とPPLO agar に培養した。（前者37℃，後者37℃N₂下）

マイコプラズマの同定は形態と血清による発育阻止試験によった。

2. 対照実験

対照実験として慢性疾患々者，歯科疾患々者及び健康者の舌より同上の方法で材料をとり，Mの分離を試みた。疾患の種類については実験成績の項に示した。

1. スモン患者舌よりのMの分離

材料採取を2回行った成績を表1に一括する。初回の採取でMの陽性のものが15名中10名で66%であった。次回は15名中6名で40%であった。前者は秋季であり、後者は冬季であった。前回陽性であって、次回陰性になったものが5名あり、前回は次回も共に陽性であったものが5名、前回陰性で次回陽性になった者は1名であった。この陽性率は後述する他の疾患の舌よりの分離率より高率である。

表1 スモン患者舌よりのマイコプラズマ分離成績(材料2回採取)

患者No.	年齢	性	発病年月	緑舌の有無	材料採取年月日	
					1970.9.18	1971.1.29
9-99	26	♀	45.8	-	+	-
2-3	51	♀	42.2	-	-	-
18-20	53	♀	44.7	-	+	+
3-4	54	♀	43.5	-	+	+
5-1	55	♀	43.7	-	-	+
13-7	55	♀	45.4	-	+	-
12-11	57	♀	43.6	-	+	+
6-2	65	♀	41.7	-	-	-
4-5	65	♀	43.6	-	+	-
11-12	66	♀	45.6	+	+	+
17-21	66	♀	44.5	-	+	-
1-29	66	♀	42.7	-	-	-
10-8	69	♀	44.1	-	+	+
16-17	69	♀	42.12	-	-	-
14-10	70	♀	45.5	-	+	-
計	15名				10(66%)	6(40%)

次に追加して分離が試みられなかった5名の成績については表2に示す。3名は国立呉病院入院患者、2名は久留米大学病院患者であった。成績は5名中3名陽性で60%を示した。この分離成績も同率であった。

次に追加してのみ分離を試みた患者における分離成績は表3の如くである。この成績では特に培養方法による差を示したが共に同率で15名中6名で40%であった。

なお分離されたMはすべてM. salivariumであった。

表2 スモン患者舌よりのマイコプラズマ分離成績(材料1回採取) (1)

病院名	患者	年齢	性	発病年月	緑舌の有無	材料採取年月日	Mの分離
国立呉病院	S	27	♀	45.2	+	45.9.18	-
	A	51	♀	44.8	-	45.9.18	+
	O	54	♀	43.5	-	45.9.18	+
	S	39	♂	45.5	-	45.6.27	+
	I	56	♀	45.4	-	45.6.6	-
計	5名						3(60%)

表3 スモン患者舌よりのマイコプラズマ分離成績(材料1回採取) (2)

患者No	年齢	性	発病年月	緑舌の有無	成績(培養方法別)	
					好気性	嫌気性
24	31	♂	45.9	-	+	+
19	32	♂	45.1	-	-	-
22	35	♂	38.11	-	+	+
25	47	♂	44.11	-	+	+
15	53	♀	45.4	-	-	-
16	58	♀	45.7	-	-	-
23	62	♂	42.3	+	-	-
26	63	♂	45.4	-	-	-
13	67	♀	40.5	-	+	+
14	70	♂	43.12	-	-	-
30	70	♀	44.4	-	+	+
18	73	♂	43.8	-	-	-
27	73	♀	44.10	-	-	-
28	74	♀	43.5	-	+	+
6	77	♀	44.5	-	-	-
計	15名				6(40%)	6(40%)

2. 対照実験

対照として表4に示すような疾患についてMの分離を試みた。即ち慢性疾患者としては結核および白血病を含む癌疾患、更に肝疾患その他を選んだ。

歯科疾患としては歯槽膿漏、歯肉炎、う蝕症、歯周囲炎を選び、健康者も対照に加えた。成績は秋季における分離率と冬季における分離率を示した。

一般に慢性疾患々者、健康者共Mの分離率は約10%の恒常値を示した。歯科疾患については歯槽膿漏では約30~40%、歯肉炎も30~40%で、う蝕症は10名以下の分離率であった。

表4 慢性疾患，歯科疾患および健康者舌よりのマイコプラズマ分離

疾患名		件数	M分離数	M分離率(%)	計 (%)
慢性疾患	結核	12 ※	1	8.3	12.5
		12 ※※	2	16.7	
	癌 (含白血病)	9	1	11.1	5.3
		10	0	0	
	肝	18	2	11.1	11.1
	その他	15	2	13.3	13.3
歯科疾患	歯槽膿漏	61	20	32.8	35.9
		31	13	41.9	
	歯肉炎	17	7	41.2	39.1
		6	2	33.3	
	う蝕度	3	0	0	6.8
		41	3	7.3	
	その他	3	0	0	0
健康者		51	5	9.8	9.0
		126	11	8.7	

※ 上段：前回報告分

※※ 下段：今回報告分

IV 考 察

本間等⁽¹⁾のスモン患者の緑舌よりのMの分離率に比すればここで行った実験成績は低率であるが、それでも、他の疾患々者の舌よりの分離率に比すれば高率である。本間等の成績は緑舌を示した患者よりの分離であるのに対してこの材料では殆んど緑舌を示さなかったものであるその点に分離率の差が生じたのかも知れない。しかし、スモン患者の舌よりのMの分離率が高率なのがスモンの発病と如何に関係があるのか、或はスモンの発病後の結果なのか将来の検討に待たなければならない。

興味あることは、前回も次回もMが陽性であったものが前回陽性数10例中5例もあることで、この点、更に分離を試みて意義づけたいと思う。

対照として行った分離材料のうち、歯科疾患々者より約30～40%の率でMの分離がみられたが、この分離源は明かに歯科疾患病巣であるので、全身感染症と思われるスモン患者よりのMの分離率と比較すべきではないと思われる。

従って、スモン患者舌よりのMの高率の分離率は明かに何らかの意義を有するものと推察される。

V 結 論

延べ50名のスモン患者の舌よりマイコプラズマの分離を試み、40%より60%に及ぶ率でマイコプラズマを分離しえた。対照として慢性疾患患者・歯科疾患患者及び健康者を対象として分離を試みた成績はそれぞれ10%、30~40%及び10%であった。スモン患者より分離されたマイコプラズマは*M. salivarium*であった。

謝 辞

スモン患者より材料を採るについて、快く便宜を計っていただいた国立呉病院、大村一郎博士に深甚なる謝意を表す。

文 献

- 1) 本間遜, 帖佐浩, 榎本美枝子, 渡部肇, 青山友三, 富山哲雄, 甲野礼作: SMON患者の舌苔よりの菌の検出, 日本細菌学雑誌 25(12), 684-685, 1970
- 2) 川口元也, 池田敏昭, 犬塚昌穂, 江原勝弥, 永田孝之: 歯科疾患よりのマイコプラズマの分離, 久留米医学雑誌 33(6)864-867, 1970
- 3) 川口元也・池田敏昭・犬塚昌穂・江原勝弥・永田孝之・中村昌弘・大曲靖夫: 歯科疾患患者舌よりのマイコプラズマの分離, 久留米医学雑誌 33(12), 1682-1685, 1970

SMON患者材料よりのマイコプラズマ分離の試み

甲野礼作，志賀定嗣，篠川旦，赤尾頼幸（国立予研・ウイルス中央検査部）

スモン患者の緑舌より高率にマイコプラズマが分離され，これがマウス脳での滞留性その他の性状で，従来報告されたマイコプラズマと異なることが本間等によって報告された。⁽¹⁾

われわれもスモン患者材料，主として便よりマイコプラズマの分離を試み，一部分離菌の性状，実験動物に対する病原性について検査したので，その成績を報告する。

I 材料と方法

分離材料：岡山，東京，千葉の各地より採取したスモン患者の咽頭ぬぐい液10例，舌苔ぬぐい液4例，便20例，髄液4例についてマイコプラズマの検出を行った。

分離方法：咽頭ぬぐい液，舌苔ぬぐい液はそのまゝ，便はDifco PPLO Brothで10%乳剤を作り，3000rpm 20分間遠心分離し，その上清を検査材料とした。

マイコプラズマの分離方法はPurcellら²⁾の方法に準じて37℃で好気および嫌気培養（H₂+10%CO₂混合気体で空気を置換した嫌気培養瓶内で行った）を行った。接種したPPLO—Agar平板は培養後4日，7日にコロニーの発生の有無を観察した。一方，同時にPPLO—Brothに接種し，増菌培養を行った試験管より，培養4日，7日に一白金耳をPPLO—Agar平板に移植してコロニー発生の有無を検査した。

検査材料はPPLO Broth 5代，めくら継代を行い，PPLO—Agar平板でコロニーの認められないものを陰性とした。

マイコプラズマの同定は，形態と普通寒天に発育しないこと，抗血清による発育阻止試験によった。

II 実験成績

1) スモン患者材料よりのマイコプラズマの分離

材料別の分離成績を表1，2，3，4に示す。

咽頭ぬぐい液10例中6例，便20例中9例に3代以降のめくら継代でマイコプラズマ様のコロニーの出現が認められたが，これらのコロニーは定型的なNippleを欠き周縁は不整で，中心部

に網目状構造を有するもので、継代は可能ではあるが、P P L O — B r o t h , A g a r 培地で増殖力が弱い。一部のコロニーは継代10代まで増菌培養を行ったが、増殖傾向が弱く同定は不可能であった。

表1 咽頭ぬぐい液

地域	年齢	性別	発病月日	採取月日	菌分離	
					好気	嫌気
岡山	48	♀	42. 8.	44.2.10	(+)*	N D
"	45	♀	43. 9.20	"	(+)	—
"	62	♀	43.10. 5	"	(+)	—
"	57	♂	43.12.10	"	—	N D
"	51	♂	44. 3.11	"	—	N D
"	61	♀	44. 4.21	"	(+)	(+)
"	35	♀	44. 9.10	"	—	N D
"	24	♀	44.10. 3	"	(+)	N D
"	37	♂	44.10.18	"	(+)	(+)
"	不明	♀	44. 2.10	44.2.15	—	—

* (+)はマイコプラズマ様コロニーであるが、定型的なNippleを欠き、周辺は不整なものが多く、中心部に網目状構造を有する。継代は可能だが増殖傾向が弱い。同定は不可能である。

表2 便

地域	年齢	性別	発病月日	採取月日	菌分離	
					好気	嫌気
岡山	53	♂	44. 5.12	44. 8.23	(+)	N D
"				44. 9.24	(+)	N D
"	46	♀	44. 5.31	44. 6.23	(+)	(+)
"	18	♀	44. 6. 7	44.11.19	(+)	(+)
"	28	♀	44. 7. 1	"	(+)	(+)
"	67	♂	UN	"	(+)	(+)
"	45	♀	"	"	(+)	N D
"	53	♀	"	"	—	"
"	39	♀	"	"	—	"
"	61	♀	"	"	—	"
東京	34	♀	44. 9.	45. 2.13	—	"
"	UN	♀	44.12.29	45. 2. 3	(+)	"
"	56	♀	44.11.27	45. 2. 4	(+)	"
"	UN	♂	UN	UN	—	"
"	50	♂	45. 3.15	45. 6. 8	(+)	—
"	67	♂	45. 3.15	45. 6. 8	—	—
"				45. 5.11	—	—
千葉	46	♀	45. 5.25	45. 5.23	—	—
"				"	—	—
"				"	—	—

舌苔からの分離は4例中2例に定型的なマイコプラズマが検出された。分離株の生物学的性状は、

表3 舌 苔

地域	年齢	性別	発病月日	採取月日	菌 分 離	
					好 気	嫌 気
東京	67	♂	45.3.10	45.6.8	—	+※
"				45.6.9	—	+※
"				45.6.10	—	—
千葉	46	♀	45.5.23	45.5.28	—	—

※ CDC-2株, M, orale type 1

嫌気性発育で、液体培地でのにごりは認められず、ブドウ糖は分解せず、アルギニンを分解する。分離された2株はマイコプラズマ同定用NIH標準血清による発育阻止試験によって Mycoplasma orale type 1 と同定された。

髄液4例からのマイコプラズマ分離は陰性であった。

表4 髄 液

地域	年齢	性別	発病月日	採取月日	菌 分 離	
					好 気	嫌 気
東京	67	♂	45.3.10	45.6.8	—	—
"				45.6.9	—	—
"	50	♂	45.3.15	45.6.8	—	—
千葉	46	♀	45.3.25	45.5.28	—	—

2) 分離株の動物試験

スモン患者舌苔より分離されたCDC-2株の動物に対する病原性、毒素産生の有無を検討するために、培養菌をマウスの脳内、静脈内、モルモットの腹腔内に接種した。陽性対照として医科研本間教授がスモン患者舌苔より分離した犬塚株を同時に接種した。

接種培養菌の菌量は、CDC-2株 $10^8/ml$ 、犬塚株 $10^6/ml$ で、マウス脳内接種は0.03 ml 静脈0.1 ml、モルモットの腹腔には0.2 ml を接種した。

マウス脳内接種群は、接種後6日と10日に殺処分し、5倍脳乳剤を作り、3,000rpm 20分間遠心分離し、上清の菌量を測定した。

CDC-2株は、接種後6日で $1.5 \times 10^1/Brain$ 、10日 $1.0 \times 10^1/Brain$ の生存を示した。犬塚株は、接種後6日 1.5×10^2 、の菌量の生存を認めたが、10日では陰性であった。

マウスの静脈内接種、モルモットの腹腔に接種した群では、接種後2週間観察を行ったが、いずれも無症状に経過した。

III 考察および結論

スモン患者材料からのマイコプラズマの分離を行った。検査例が少ないので明確な結論は下せないが、

スモン患者の緑舌よりのマイコプラズマの分離率は、本間らの指摘するように高率で4例の舌苔より2例からマイコプラズマが分離された。

咽頭ぬぐい液、便からの分離では、定型的なマイコプラズマのコロニーを示すものは認められず、非定型のコロニーが、めくら継代3代以降に咽頭ぬぐい液中に60%、便からは45%に出現した。分離株は、PPLO-Broth中での増殖性が悪く、同定不可能であった。

これらスモン患者から分離された株と発病との関係は今後の検討に待たなければならない。

分離株についてマウス、モルモットとの病原性を検討したが、マウス脳内での増殖、病原性はないように思われる。

文 献

1) 本間遜, 帖佐浩, 榎本美枝子, 渡部肇, 青山友三, 高山哲雄, 甲野礼作: SMON患者の舌苔より菌の検出, 日本細菌学雑誌 25(12), 684-685, 1970

2) Robert H. Purcell, and Robert M. Chanock,
Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections
4th edition 780~823, 1969.

BAT細胞におけるMycoplasmaの汚染

尾形 学, 奥水 馨 (東大農学部家畜微生物)

I はじめに

各種の培養細胞株にMycoplasma (以下Mと略)の潜在的汚染が認められることは1956年Robinsonら⁹⁾の報告以来各国で追試がなされ,組織培養を用いてウイルス学的検索を行なうに際してはMの検索が必須な条件であることは多くの研究者によって認められている。著者ら⁶⁾もわが国の各種培養細胞株60株中52株(86.7%)がMによって汚染していることをすでに明らかにしている。

SMONの病因が京大・井上ら⁴⁾によってウイルス学的に検討され,新しいウイルスが分離されているが,本研究はスモン調査協議会の甲野会長より依頼を受け,井上らがウイルス分離に使用しているBAT-6細胞におけるMの汚染の有無につき検討したものである。以下その研究の概要を報告する。

II 材料および方法

1) 細胞株: Mの汚染を検索した細胞株は京大・井上らによって樹立されたBAT-6細胞(ハムスター皮下腫瘍のクローン化継代細胞)で,予防衛生研究所において継代中のものを,甲野スモン調査協議会長より送付を受けた。

2) 分離培養基および培養法: BAT細胞よりのMの分離には変法Adler培地⁶⁾および変法Edward培地⁶⁾を用い,好氣的培養および,CO₂10%,N₂90%のガスを充満した嫌氣的培養法を併用した。変法Edward培地に細胞培養液の1,500rpm,5分遠沈上清を1白金耳塗抹する直接法と,変法Adler培地に細胞培養液の0.1mlを接種,37℃,3日増菌後,変法Edward培地に移植し5~7日後に集落の発生を観察する増菌法を同時に行なった。

3) Mycoplasma株: 著者らの分離株はMycoplasma-BAT株,本間らが分離し同定を依頼された株はMycoplasma-S TM株とされた。本研究に対照株として使用し,また家兎免疫血清作製のため用いたMのうち,M. hominis-C ATCC, M. orale N-1, M. salivarium C Hup 127, M. fermentans C ATCCは,久留米大・中村教授より, M. hominis PG 21, M. neurolyticum PG 28, M. hyorhinis PG 29はD. G. ff

Edward(Wellcome Research Laboratories, England)より, *M. hyorhinitis* E-1 および *M. hyorhinitis* E-2 は T. Estola(The State Veterinary Medical Institute, Finland)より, *M. hyorhinitis* S は W. P. Switzer(The Iowa State University, U. S. A.)よりそれぞれ分与を受けた。その他の *M. hominis* DH は HeLa 細胞より, *M. hyorhinitis* SEP123 および *M. hyorhinitis* SEP40 は ブタ流行性肺炎より著者らが分離したものである。

4) 血清学的性状の検査: 抗M家兔免疫血清は Lemcke⁵⁾の方法に準拠して作製した。ヒト由来のMの抗血清の一部は久留米大・中村教授および東北大・石田教授より分与を受けた。Mの血清学的性状の検査は Clyde³⁾のディスク法による発育阻止試験を用いて行なった。

5) 生物学的性状の検査: 分離株および対照株の生物学的性状の検査は, Aluotto¹⁾らによって記載された方法, および著者ら⁶⁾が先に報告した法に基づき, 血清要求性, 液体培地のこん濁, 好気・嫌気条件下の発育, テトラゾリウムブルーの還元およびβ-アルギニンの分解などにつき検討した。嫌気的条件下の性状検査はMを接種後, 小試験管の培地上層部に滅菌流動パラフィンを約1cmの高さに重層した。

III 実験成績

1) BAT細胞からのM分離成績: カナマイシン無添加のイーグル液で継代された無接種BAT細胞およびカナマイシン60 γ /ml添加イーグル液で継代された無接種BAT細胞より, CO₂-N₂嫌気的条件下において, 直接法および増菌法ともにMが分離された。好気的条件下では, いずれの方法でもMの分離は陰性であった。(表1)

表1 BAT細胞からのMycoplasmaの分離成績

Cell line	Tissue culture maintenance medium	Detection of mycoplasma		
		Culture condition	Direct method	Subculture method
BAT-6 cell	Eagle's solution (no Kanamycin)	AE ※	—	—
		AN ※※	+	+++
BAT-6 cell	Eagle's solution (60 γ /ml Kanamycin)	AE	—	—
		AN	+	+++

※ AE: Aerobically

※※ AN: Anaerobically with CO₂ 10%:N₂ 90%

2) 分離株の血清学的性状：BAT細胞から分離されたMycoplasma-BAT株は対照のM. orale N-1株と共に抗M. orale 家兔免疫血清によって明らかに発育阻止が認められた。またMycoplasma-STM株は対照のM. hyorhinis PG29と共に抗M. hyorhinis 家兔免疫血清によって発育阻止が認められた。BAT細胞から分離されたこれらのMはいづれもM. salivarium, M. fermentans, M. pulmonis, M. neurolyticumとは交差が認められなかった(表2)。

表2 各種MycoplasmaおよびBAT細胞から分離した株の交差発育阻止試験

Mycoplasma	Strain	Origin	Growth inhibitory zone with antisera																	
			M. hominis-c	M. hominis PG21	M. hominis DH	M. orale N-1	M. orale O-1	M. orale O-2	M. salivarium-C	M. salivarium S-1	M. salivarium S-2	M. fermentans-C	M. fermentans-F-1	M. pulmonis PG22	M. neurolyticum PG28	M. hyorhinis E-1	M. hyorhinis E-2	M. hyorhinis S	M. hyorhinis SEP123	M. hyorhinis SEP40
M. hominis-C	ATCC	Human	3	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M. hominis	PG21	Human	ND	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M. hominis	DH	HeLa cell	ND	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M. orale	N-1	Human	0	0	0	3	8	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mycoplasma-BAT		BAT-cell	0	0	0	0	7	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M. salivarium-C	Hup 127	Human	0	0	0	0	0	0	6	10	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M. fermentans-C	ATCC	Human	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M. pulmonis	PG22	Rodent	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
M. neurolyticum	PG28	Rodent	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
M. hyorhinis	PG29	Swine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	+
Mycoplasma-STM		BAT-cell	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	3	4	2

※ 数字はディスク周辺よりの発育阻止帯の巾(mm)を示す。

ヒト由来の菌株および抗血清の一部は久留米大・中村教授，東北大・石田教授より分与を受けた。

十印は弱い発育阻止が認められるが明瞭な阻止帯を形成しないことを示す。

3) 分離株の生物学的性状：Mycoplasma-BAT株は血清要求性があり，嫌気条件下のみ発育する。その集落形態は写真1に示す。液体培地をこく濁せず，ブドウ糖を分解しない。テトラゾリウム・ブルーを還元しない。アルギニンの分解は好氣的・嫌氣的条件下共に明瞭でなく，この点を除くと表3に示すように対照株のM. orale N-1と一致した性状を示した。Mycoplasma-STM

株は、血清要求性あり、液体培地を弱くこん濁する。その集落形態は写真2に示す。好氣的・嫌氣的にいずれもよく発育する。ブドウ糖の分解およびテトラゾリウム塩の還元は陽性であるがアルギニンの分解は認められなかった。その性状は対照株の *M. hyorhinis* PG29 と完全に一致した。

表3 各種 *Mycoplasma* およびBAT細胞から分離された株の生物学的性状

Biological characters	Mycoplasma strain								
	<i>M. hominis</i> -C ATCC	<i>M. hominis</i> PG21	<i>M. hominis</i> DH	<i>M. orale</i> N-1	<i>Mycoplasma</i> -BAT	<i>M. salivarium</i> -C	<i>M. fermentans</i> -C ATCC	<i>M. hyorhinis</i> PG29	<i>Mycoplasma</i> -STM
Serum requirement	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Turbidity of liquid medium	-	-	-	-	-	+	-	±	±
Growth in aerobic or anaerobic condition	$\frac{AE}{AN}$	$\frac{AE}{AN}$	$\frac{AE}{AN}$	$\frac{AE}{AN}$	$\frac{AE}{AN}$	$\frac{AE}{AN}$	$\frac{AE}{AN}$	$\frac{AE}{AN}$	$\frac{AE}{AN}$
Glucose break down	—/— [※]	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	+/+	+/+
Tetrazolium reduction	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	±/+	+/+	+/+
Arginine hydrolysis	+/+	+/+	+/+	+/+	±/-	+/+	+/+	—/—	—/—

※ $\frac{AE}{AN}$ の性状を示す

4) 分離株の同定：分離株の血清学的性状および生物学的性状により *Mycoplasma*-BAT株は、*M. orale*, *Mycoplasma*-STM株は *M. hyorhinis* と同定された。

IV 考 察

Robinsonら⁹⁾の報告以来、培養細胞株にMの汚染があることが世界各国で追試され、HeLa細胞をはじめ多くの細胞株の40-100%がMによって汚染されていることが明らかにされた。これらの汚染Mには各種のspeciesが含まれているが、これまでに報告されたMのうちでは、*M. hominis*が大部分を占め、その他少数ながら *M. orale*, *M. hyorhinis*, *M. granularum*, *M. gallisepticum*, *M. laidlawii*, *M. arginini*, *M. arthritidis* などの汚染が報告されている。*M. hominis* および *M. orale* はヒトの咽喉頭部における常在菌の一種である。これらが細胞株汚染Mの大部分を占めることは、細胞株の取扱者が細胞株継代中に人為的に汚染をもたらしたと考えられる。*M. hominis* および *M. orale* は、培養液中のアルギニンを分解するが、その他の生物学的活性は弱く、一般には培養細胞に対し細胞変性効果を示さないので通常Mの汚染有無の不明のまま組織培養が使われ

ている場合が多く、今回のBAT細胞のM. oraleによる汚染もこの例にもれない。一方、M. hyorhinisはブタの鼻腔常在菌であるが、ブタ流行性肺炎の二次的侵入因子、多発性漿膜炎および関節炎の病原因子としても知られている。このようなブタを宿主とするM. hyorhinisがいかなる経路で細胞株汚染を来たしたかは不明である。M. hyorhinisの細胞株における汚染については1964年Butlerら²⁾が、HEP₂細胞を継代中に培養基が酸性に変わって細胞変性がおこり継代が不能になったものから一種のMを分離したことに始まる。このMはGDL株と呼ばれていたが、後にPurcellら⁸⁾によってM. hyorhinisと同定された。M. hyorhinisは培養液中のブドウ糖を分解し酸を産生し生物学的活性も強いので、各種の組織培養細胞に対し細胞変性をおこすことが予想される。著者らが行なった実験によれば、HeLa細胞に対しては細胞変性効果は認められなかったが、トリ腎初代培養細胞に対しては明らかな変性効果を示した。

Mの組織培養汚染は培養細胞に影響を与えるのみならず、共存するウイルスの増殖にも種々な影響を与えることが知られている。Rouseら¹⁰⁾はアデノ2型ウイルスのブラック形成がMの汚染によって抑制されることを、また、Somersonら¹²⁾はラウス肉腫ウイルスの増殖が、M. oraleの感染によって抑制されることを明らかにしている。坂本¹¹⁾は鶏卵漿尿膜組織培養を用いて、インフルエンザウイルスとM. pneumoniaeあるいはM. oraleとの同時感染がウイルスの増殖抑制をおこすことを報告した。

このように組織培養におけるM感染は、単に培養細胞に影響を与えるのみならず、共存するウイルスの増殖にも著しい影響をもたらすことが明らかにされている。SMONの病因がウイルス学的に検索され各種の組織培養が使用されていると思われる。もし、SMONをslow virus infectionの立場からその病因としてのウイルスを分離し、さらにそのウイルスの性状を検討するのであれば、組織培養中に存在するMの影響は決して軽視できないものであろうと考える。

今回、BAT細胞から分離されたM. oraleは、カナマイシン $60 \text{ } \mu\text{g/ml}$ の濃度に耐性であった。このMのカナマイシンに対する最高耐性度は測定されなかったが、著者⁷⁾はさきにHeLa細胞汚染のM. hominisをカナマイシンで除去することを試み、 $100 \text{ } \mu\text{g/ml}$ では除去されず、 $1,000 \text{ } \mu\text{g/ml}$ で除去しうることを報告した。しかしこの濃度のカナマイシンでも除去できないMも存在することも認められたので、細胞株汚染Mの除去の確認は極めて慎重でなければならない。M-freeの確認には人工培地による培養法がもっとも確実であり必要と思われる。

V 要 約

SMONの病因のウイルス学的検索に使用されているBAT細胞にMycoplasma(以下Mと略)が潜在的に汚染していることを明らかにし、そのMの生物学的性状および血清学的性状を検討することによって同定を行なった。これらのMは2種類あり、未接種BAT細胞から著者らが分離したMは嫌気性のM. oraleと同定された。また、京大・井上らのSMONウイルス接種BAT細胞

胞から医科研・本間らによって分離されたMはM-hyorhinitisであることが明らかたされた。

参 考 文 献

- 1) Alutto, B. B., R. G. Wittler, C. C. Williams and J. E. Faber (1970): Standardized bacteriologic techniques for the characterization of mycoplasma species. *Int. J. Sys. Bact.*, 20, 35-58.
- 2) Butler M. and R. H. Leach (1964): A mycoplasma which induces acidity and cytopathic effect in tissue culture. *J. gen. Microbiol.*, 34, 285-294
- 3) Clyde, W. A. (1964): Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antiserum. *J. Immunol.* 92, 958-965.
- 4) 井上幸重, 西部陽子, 中村良子 (1970): スモン患者糞便より高率に分離された新しいウイルス, *医学のあゆみ*, 72, 321-322
- 5) Lemcke, R. M. (1964): The serological differentiation of mycoplasma strains (pleuropneumonia-like organisms) from various sources. *J. Hyg.*, 62, 199-219.
- 6) Ogata, M. and K. Koshimizu (1967): Isolation of mycoplasmas from tissue cell lines and transplantable tumor cells *Jap. J. Microbiol.*, 11, 289-303.
- 7) 尾形学, 興水馨, 秦 泰子 (1965): 培養細胞株におけるMycoplasma (PPLO) の汚染について, *ウイルス*, 15, 328-329.
- 8) Purecell, R. H., N. L. Somerson, H. Fox, D. C. Turner, and R. M. Chanock (1966): Identification of acid-inducing agent and related mycoplasma as *Mycoplasma hyerhinitis*. *J. Nat. Cancer Inst.*, 37, 251-253.
- 9) Robinson, L. B., R. H. Wichelhausen and B. Roizman (1956): Contamination of human cell cultures by pleuropneumonia-like organisms. *Science* 124, 1147.
- 10) Rouse, H. C., V. H. Bonifas, R. W. Schlesinger (1963): Dependence of Adenovirus replication on arginine and inhibitory of plaque formation by pleuropneumonia-like organisms. *Virology* 20, 357-365.

- 11) 坂本博章(1968):人系マイコプラズマに関する研究. 久留米医学会雑誌, 31, 964
991.
- 12) Somerson, N.L. and M.K. Cook(1965):Suppression of Rous sarcoma virus growth in tissue cultures by Mycoplasma orale. J. Bact., 90, 534-540.

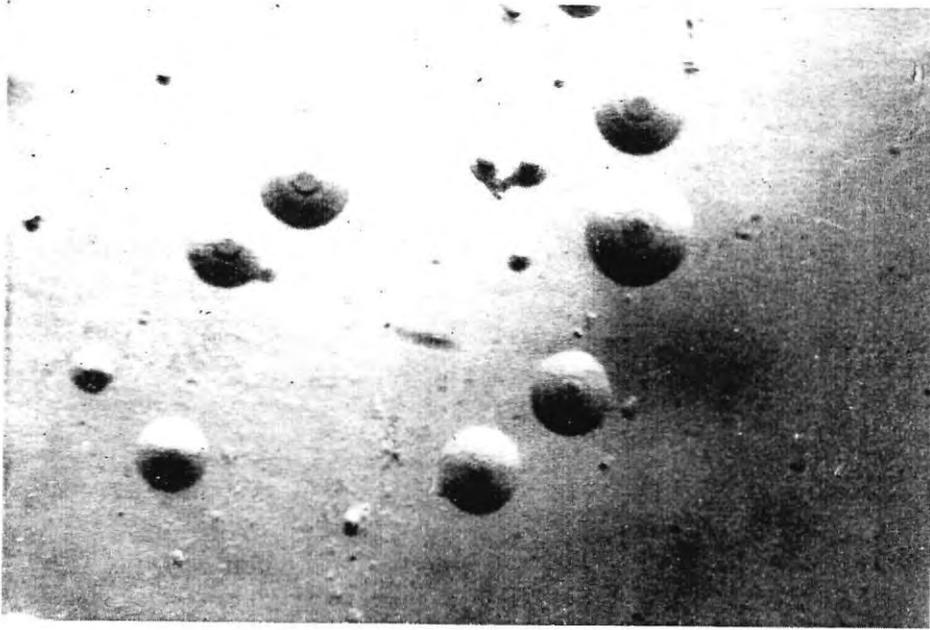


写真 1. *Mycoplasma orale* BAT 株。

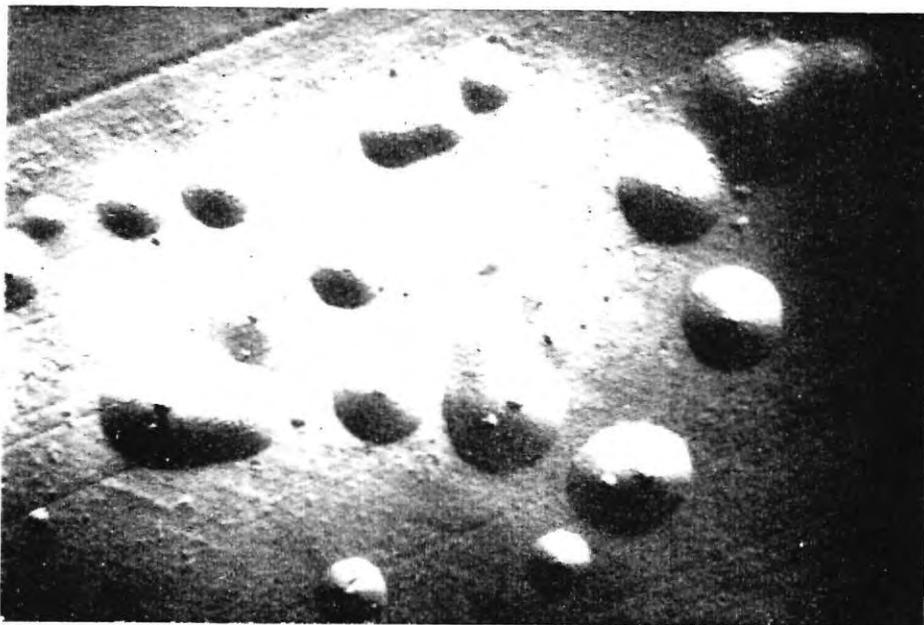


写真 2. *Mycoplasma hyorhinitis* STM 株。

岡山県井原市民病院入院 S M O N 患者の細菌血清学的検査成績

1. Salmonella infantis を分離した 1 死亡例を含む大便の細菌学的検査*

中谷林太郎, 山崎恵子, 吉田洋子, 中野英一, 犬上洋子, 後藤延一 (国立公衆衛生院衛生微生物学部) 島田宣浩 (岡山大学医学部第一内科教室) 広田滋, 高木新, 岩野郁造 (岡山県井原市民病院内科) 甲野礼作, 石井慶蔵 (国立予防衛生研究所ウイルス中央検査部)

I はじめに

S M O N に病原腸内細菌が関与しているかどうかを調べることを目的として, 岡山県井原市民病院に 1969 年後半に入院していた S M O N 患者の大便について, 主としてサルモネラ・赤痢菌その他の病原菌の分離培養を試みた。

S M O N の病原および発症機序に関しては多くの研究が行なわれてきているが, まだ決定的な結論は出されていない。また S M O N 患者についての従来の細菌学的検査も日常検査の域をはずし, 既知病原細菌の関与の有無についても決定的な成績が発表されていない。小沢ら¹⁾は S M O N 死亡例から Salmonella meleagridis を分離し, この菌に対する血清凝集素価を S M O N 患者ならびに非 S M O N 例について測定した。その結果, S M O N 患者血清は S. meleagridis を比較的よく凝集することをみいだした。

われわれも以下に述べる検査において, 30 例の S M O N 患者のうちの 1 例の大便から Salmonella infantis を分離した。この症例がサルモネラ検出 15 日後に死亡した事実から, S M O N 経過中にサルモネラその他の腸管系病原菌の感染に対する監視の必要性を強調する意味において, 本症例を中心に検査成績を述べる。

なお, 今回検査対象となった患者から, 採便とほぼ時期を同じくして採取された血清について, サルモネラ・赤痢菌に対する凝集素価を測定し, S M O N 患者におけるこれらの菌による感染を血清疫学的に調査した成績に関しては次報に報告する。

II 材料と方法

対象患者と検体: 表 1 に示すように, S M O N 30 例からの 69 検体, 同じ病院入院患者で非 S M O N 2 例からの 2 検体, 計 71 検体の大便について検査を実施した。これらの大便は採便後 -20℃ で凍結保存されていた。

細菌学的検査: 大便を室温溶解後, その一部は直接に分離培養に供し, 一部は亜セレン酸塩培地に加えて 43℃ で 1 夜増菌後, また他の一部は G N ブイヨンに加えて 37℃ 4~6 時間増菌後, 分離培養を行

* (医学のあゆみ 75(3):120-122, 1970.)

表1 対象患者と検体

患者	例数	性		年齢	大便 検体数/例数 (採便期間)
		男	女		
SMON	30	7	23	17~62	69/30 (1969. 6. 16~12. 15)
非SMON	2	0	2	40, 64	2/2 (1969. 8. ~ 9. 30)
計	32	7	25		71/32

なった。分離培地として、BTB乳糖寒天、DHL、SS、TCBS、NACの平板培地を使用した。このうちTCBSとNACは直接分離培養にのみ使用した。検査実施時期は1970年3月であった。分離菌の同定は腸内細菌同定法²⁾によった。

III 成績

病原腸内細菌の分離：SMON患者1例(HK)の大便から*Salmonella infantis*が分離された。また非SMON患者1例(YS)より、*S. typhimurium*が検出された。

赤痢菌、腸炎ビブリオなどの病原菌はすべての例において陰性であった。なお、SMON患者1例から緑膿菌が検出された。

症例

46歳 女 SMON.

1969年2月初旬から腰痛があり、2~3日後から下腹部痛を訴え軟便を伴った。2月に病院内科で受診。腹部圧痛、膝反射亢進、下肢振動覚低下を認め、SMONと診断されステロイド投与が始められた。2月入院、以後経過良好で4月退院、外来加療を受けていたが、4月末頃から足裏の知覚異常が出現した。5月頃から再び腹痛が始まり、6月より腹部症状が増悪したため、再燃として再入院し、ステロイドの増量投与が行われた。しかし以後しだいに神経症状が増悪し、6月より歩行不能となった。7月末には上肢にもしびれ感が出現、以後上肢の脱力が進行した。8月初旬に言語障害を認めるようになった。8月に39.4℃までの発熱あり3日で下熱したが、下痢は伴わなかった。7月に両側とも1.2であった視力が8月には右0.2、左0.3に低下した。8月より再び38.7℃までの弛張性の発熱あり、死亡2日前の8月頃まで持続した。8月より意識障害が出現し、しだいに昏垂状態となり、8月死亡の転帰をとった。家族のうち長男は同じ頃SMONにかかったが軽症でほぼ全快し、他の3人は健康であった。臨床検査成績では、白血球数が8月4日11,200、

8月23日19800と増加を示したこと，8月21日頃肉眼的血尿を認めたこと，および症状の進行とともにほぼ正色素性の血清鉄低下を示さない貧血が認められたが，その他には特記すべき所見はなかった。

8月13日採便の大便是緑褐色有形便で，これを検査した結果，直接分離培養に使用したDHL培地上にのみ*S. infantis*の集落が6コ純培養の状態で見出された。本菌はクロラムフェニコール，テトラサイクリン，ストレプトマイシン，カナマイシン，アミノベンジルペニシリンに感受性であった。なお8月13日採血の血清は本菌ならびに他のサルモネラ・赤痢菌に対する凝集素を含まなかった。

症例

38歳 女 非SMON

1969年8月中旬頃から腹痛を訴え，過敏性大腸として加療中，9月 腹痛・発熱(38.8℃)のため 入院，抗生剤投与で下熱し，以後腹痛軽快し，10月 に退院した。神経症状の発現はみられなかった。父親がSMONであったが，他の家族3人は健康であった。

9月30日採取の大便是黄褐色軟便で，分離培養の結果，*S. typhimurium*が見出された。本菌はテトラサイクリンに耐性を示したが，他の上記の薬剤には感受性であった。

大便の色調と性状：SMON随伴症状の一つとして緑毛舌³⁾，緑便⁴⁾があるが，最近SMON患者の多くに投与されているキノホルムは塩化第二鉄と反応し緑色を呈することが明らかにされ，またSMON患者緑便からキノホルムが見出されるにいたって，キノホルムとSMONとの関係が問題になっている⁵⁾。われわれは，保存されていた大便検体の細菌検査に際して，その色調と性状を観察したので，結果を表2に示す。SMON患者では58%の例が緑便ないし緑色調便を排出しており，同一患者から2～4回採取されたものを含めた全検体中の48%は緑便ないし緑色調をおびた便であった。またSMON患者では泥状便が多いような印象を受けた。

表2 大便の色調と性状※

患者と検体数		色 調		性 状			計
		緑便 緑色調便	その他	軟	泥 状	有 形	
SMON	例 数	17	12	4	12	13	29
	検体数	28	30	8	20	30	58
非SMON	例 数	1	1	1	0	1	2
	検体数	1	1	1	0	1	2

※ 同一患者で2回以上採便された例では，色調に関しては1回でも緑便または緑色調便を排出したものは緑便・緑色調便の例に含め，性状に関

しては1回でも軟便または泥状便を排出した例はそれぞれの例に含めた。なおSMON患者で例数・検体数とも表1より少ないのは、大便の色調・性状を調べなかった例が除外されているからである。

IV 考 察

SMONの必発症状の1つとして腹部症状があげられている。その原因はまだ明らかでないが、われわれは胃腸炎、大腸炎の原因となる既知の病原菌が関与しているか否かを探る目的で今回の検査を実施した。今回はかなり長期間保存された大便検体について細菌学的検査を行なったので、サルモネラや赤痢菌、とくに腸炎ビブリオの検出には必ずしも良好な条件ではなかったと考えられる。しかし、30例のSMON患者のうち1例から*S. infantis*が検出された。また非SMON患者2例中に1例の*S. typhimurium*による胃腸炎を発見できた。*S. infantis*を分離したSMON例は、本菌検出15日後に死亡しているが、その直接原因がサルモネラ感染であったかどうかは不明である。しかし、本菌検出前後に発熱をみたことからサルモネラ感染症を伴っていたことは推定できる。小沢ら¹⁾のサルモネラ検出SMON例も死亡していることと今回の症例を考えあわせ、またSMONの経過が長期にわたり、腹部症状の再燃例も多く、ステロイドの投与も頻繁であることなどを考慮すれば、SMON経過中にサルモネラ感染を監視し、迅速適切な治療を試みる事が重要であると思われる。

われわれは現在までにSMON患者につき約100例近くの細菌検査を行ってきたが、サルモネラを含む既知病原菌の検出例は上記の1例のみである。一方、小野川ら⁶⁾によれば1966～1967年の東京都内の小中学生および食品取り扱い者の健康保菌者検索におけるサルモネラ陽性率はそれぞれ、0.14%と0.05%であった。SMON患者におけるサルモネラ保菌率が高いかどうかを決めるにはまだ資料が不足であるが、少なくともサルモネラがSMONの一次的な病因であるとは考えにくく、むしろSMON経過中にサルモネラ感染をおこすと不幸な転帰を招く可能性があることを指摘したい。

V ま と め

岡山県井原市民病院に1969年後半に入院していたSMON患者30例および非SMON例2例について、その大便から病原腸内細菌の分離同定を試みた結果、SMON患者1例から*Salmonella infantis*を検出し、非SMON例(胃腸炎)1例から*S. typhimurium*を検出した。赤痢菌その他の病原菌は検出されなかった。

検査した大便は58%の例で緑色ないし緑色調をおびており、また泥状便が多い感じをうけた。

サルモネラ検出SMON例は検出15日後に死亡した例である。SMON経過中のサルモネラ感染の監視の必要性について考察を加えた。

文 献

- 1) 小沢 敦, 後藤甚作, 小島逸子, 片岡喜久雄: SMON患者糞便より分離された *Salmonella meleagridis* とその凝集抗体。本誌・74:71-72, 1970.
- 2) 中谷林太郎, 坂崎利一訳: 腸内細菌同定法 (Edwards & Ewing 著)。一成堂, 1964.
- 3) 高須俊明, 井形昭弘, 豊倉康夫: SMON患者にみられる緑毛舌について。本誌・72:539-540, 1970.
- 4) 井形昭弘, 高須俊明, 豊倉康夫: SMON患者糞便中の緑色物質(予報)。本誌・72:637-638, 1970.
- 5) 吉岡正則, 田村善蔵: SMON患者の緑色色素の本態。本誌・74:320-322, 1970.
- 6) 小野川 尊, 寺山 武, 坂井千三: 健康保菌者検索によるサルモネラ保菌の実態について—主として小中学生を対象とした場合。日伝染会誌・43:225-231, 1969.

岡山県 S M O N 患者の細菌血清学的検査成績

2. サルモネラ・赤痢菌に対する血清凝集素価

中谷林太郎，山崎恵子，吉田洋子，犬上洋子，扇和子，中野英一，後藤延一（国立公衆衛生院衛生微生物学部）島田宣浩（岡山大学医学部第一内科教室） 広田滋，高木新，岩野郁造（岡山県井原市民病院）甲野礼作，石井慶蔵（国立予防衛生研究所ウイルス中央検査部）

I はじめに

さきに岡山県井原市民病院入院 S M O N 患者の大便からのサルモネラ・赤痢菌等の分離同定を実施した成績を報告した¹⁾。ここではその時の患者の血清と，その後別の患者および対照例から採取された血清とについて，サルモネラ・赤痢菌による感染を調べる目的で抗体保有状態を検査した成績を報告する。

II 材料と方法

対象患者と血清検体：表 1 および表 2 に示すように，井原市民病院に 1969 年後半から 1970 年 8 月までに入院中の S M O N 患者（50 例），岡山大学第一内科入院 S M O N 患者（10 例）から採取された血清と非 S M O N 例（60 例）からの血清について検査した。1969 年の井原市民病院 S M O N 患者 36 例からは，採便と平行して¹⁾，時期を異にして数回採血されていたので，実際に検査した血清検体数は 106 検体であったが，本稿に示す成績の中には各例について 1 検体のみの値を取って集計した。対照例は健康者，非 S M O N 患者から構成されていたが，性別分布が S M O N 群とやや異なっていた。血清は検査するまで -20℃ に凍結保存されていた。

表 1 サルモネラ・赤痢菌に対する血清抗体価検査の対象と検体数

対 象	例数	性		採 血 時 期	地 域 域	検体数
		男	女			
S M O N	60	16	44	1969年6月～ 1970年8月	井原市 岡山市	130
非 S M O N	60	32	28	1968年12月～ 1970年10月	井原市 岡山市 東京都	60
計	120	48	72			190

抗原；サルモネラ；つぎの 3 株を用いた。 Salmonella meleagridis H6 1 (抗原構造, 3, 10

: e, h-l, w) (国立東京第2病院 SMON 死亡例由来²⁾, 小沢敦博士から分与された)。 S. ty-
phimurium 339 (1, 4, 5, 12: i-1, 2) (井原市民病院非 SMON 症例 由来¹⁾)。 S. in-
fantis 392 (6, 7: r-1, 5) (井原市民病院 SMON 死亡症例 由来¹⁾)。 O 抗原は penas-
say 寒天 (Difco) 培養菌を生理食塩液に浮遊し, 100℃, 1時間加熱後洗浄し, 1万倍マーズン
生理食塩液に再浮遊し, O. D. を 0.45 (波長 650m μ) にあわせて使用した。 H 抗原は各菌株の第 1
相と第 2 相を誘導したものを別々に Penassay ブイヨン (Difco) に培養し, ホルマリンを 0.3% に
加え, 両相菌液を等量に混合して使用した。

赤痢菌; Shigella flexneri 2a および S. sonnei の 2 菌株を用い, 感染性腸炎研究会が東芝
工業微生物理化学研究所に依頼試作した菌液を, O. D. を 0.45 に希釈して使用した。

凝集素価測定法: 血清を 1 万倍マーズン生理食塩液で 10 倍から 80 倍まで倍数希釈し, 各希釈液
を 0.25 ml ずつ小試験管に分注した。これらに上記の各菌液を等量加えてよく混和したのち, 水浴中で
1 夜反応させた。 SMON 患者血清の場合, S. meleagridis に対する凝集反応価は, 37℃と 52
℃とで異なることがあるといわれているので (小沢敦, 私信), サルモネラ抗原を用いる反応は同一血
清で 2 組作り, 保温を 37℃と 52℃との両方で実施した。赤痢菌抗原を加えた反応液は 52℃のみで
保温した。判定は肉眼で行ない, 血清を含まない生理食塩液に菌液を加えたものを対照とした。凝集素
価は凝集が陽性に出た最終血清希釈倍数で表わした。なお, サルモネラ抗体価は, 37℃で反応させた
場合と 52℃での場合と大差がなかったことと, 標準法としては 52℃での反応が用いられていること
から, 以下の成績には 52℃での測定値のみをとりあげた。平均凝集素価を求めるときには, 凝集素価
20 倍以下のものは 10 倍とみなし, 160 倍またはそれ以上のものは 160 倍として, 幾何平均によ
って計算した。

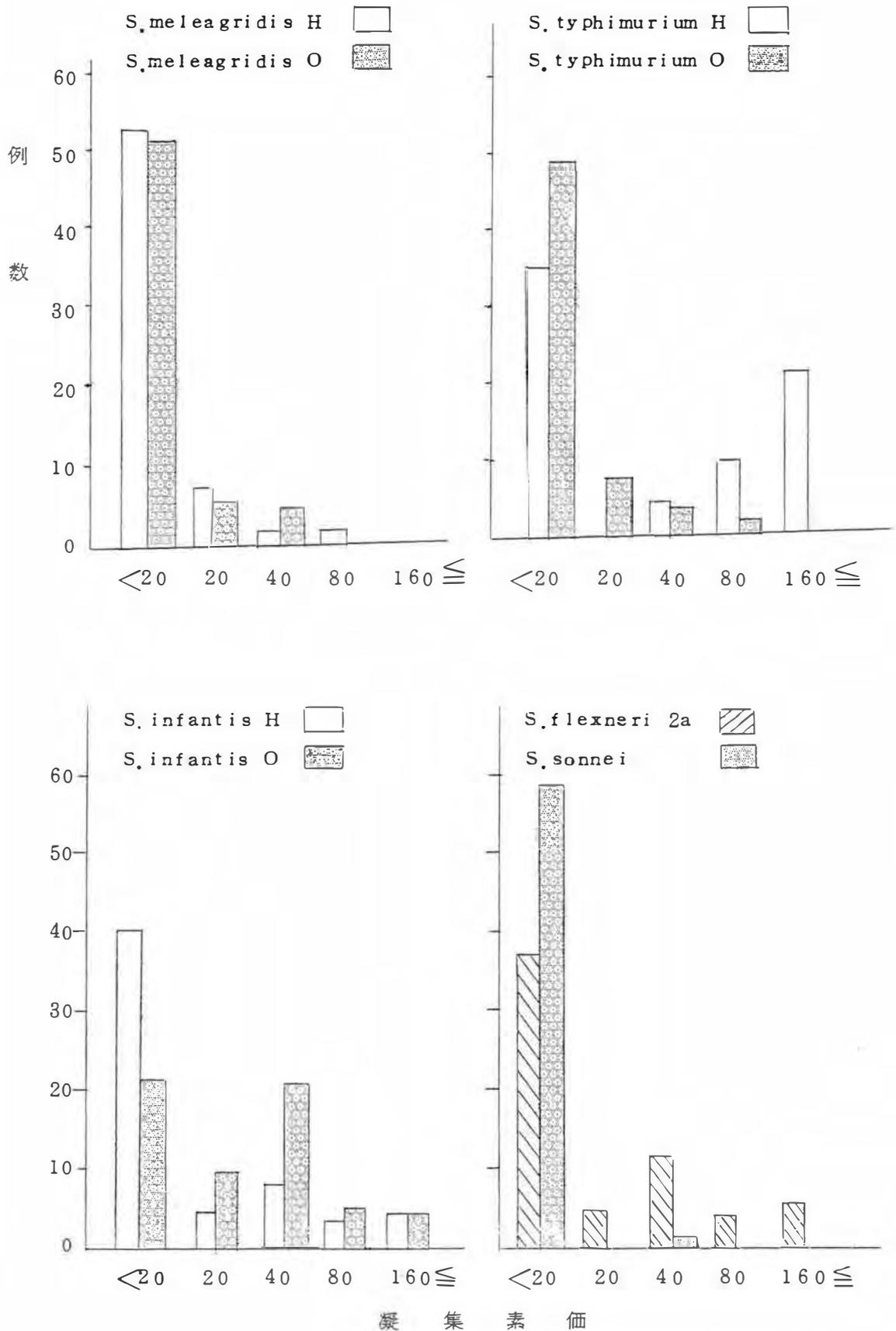
III 成 績

抗体価の分布: 図 1 に SMON 患者群 60 例 (A), 非 SMON 例群 60 例 (B) の各菌型に対する凝集素
価別の度数分布が示してある。また表 2 には対象群別の各菌型に対する凝集素価の平均値が示してある。

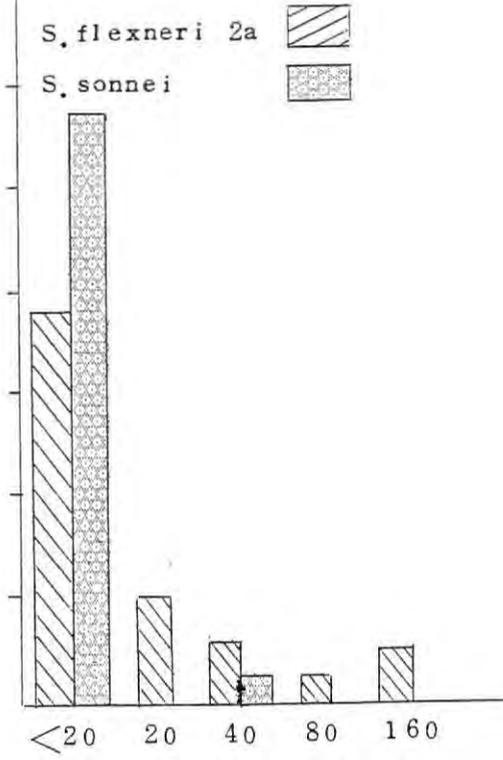
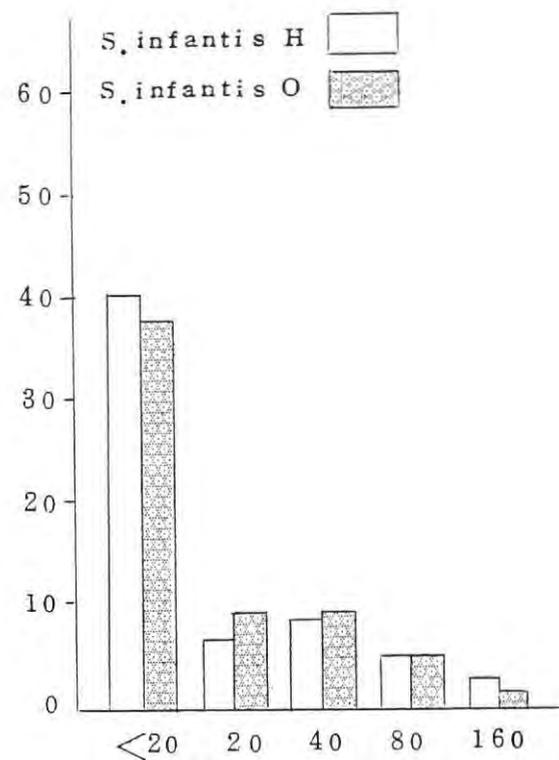
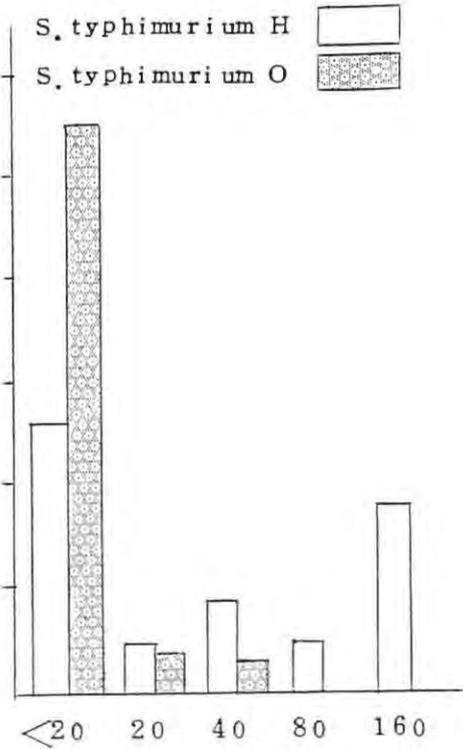
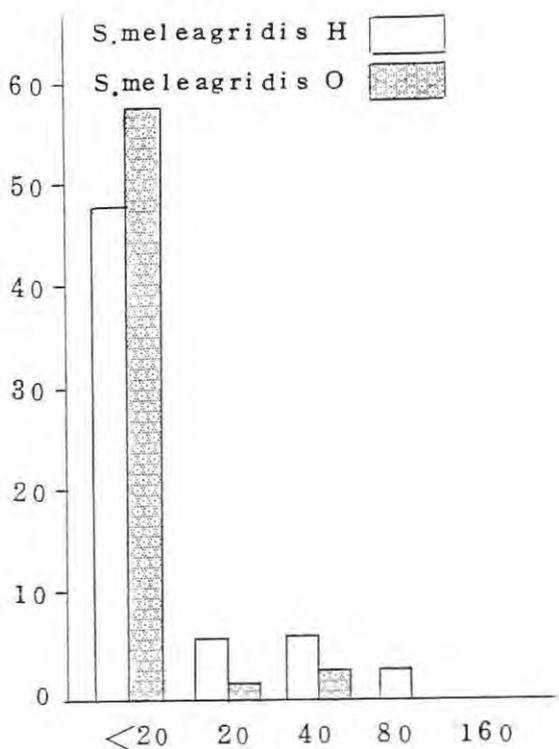
S. meleagridis O および H 抗体価が 20 倍以上あった例は両群ともに少数で, 平均凝集素価も 20
倍以下であった。S. typhimurium O 抗体価についても同様であった。これに対し, H 抗体価は両群
ともに半数以上の例が 20~160 倍程度の値を示し, 平均凝集素価も SMON 群 41 倍, 非 SMON
群 33 倍であった。この値の間には有意差があり ($P < 0.01$), SMON 群の方が高かった。S.
infantis O 抗体価は SMON 群に高いものが多く, その平均凝集素価は 25 倍で, 非 SMON 群の
値 (17 倍) との間には有意差が認められた ($P < 0.01$)。 S. infantis H 抗体価は両群とも低い
ものも多く, 平均凝集素価も 20 倍以下であった。

赤痢菌に対しては, 両群間の抗体分布に明確な差は認められなかったが, 注目すべきことは S. so-
nni に対して 40 倍の凝集素価を示した例が SMON 群に 1 例, 非 SMON 群に 2 例検出されたこと

図1 サルモネラ・赤痢菌に対する血清抗体価の分布



A SMON患者(岡山県, 1969~1970年, 60例)



凝 集 素 価

B 非SMON例(岡山県・東京都, 1968~1970年, 60例)

である。これらの例にはノンネ菌感染があったことをよく示唆する。すなわちSMON患者の中にも赤痢感染経過者が混在していると考えられる。

表2 SMON患者および非SMON例の地域別・年次別に見たサルモネラ・赤痢菌に対する平均血清抗体価

対 象	例数	平均凝集素価 ※						
		<u>S. meleagridis</u>		<u>S. typhimurium</u>		<u>S. infantis</u>	<u>S. flexneri</u>	<u>S. so nnei</u>
		O	H	O	H	O H	2a	
SMON 井原-69	36	12	12	12	19	22 17	16	10
非SMON 井原-69	3	10	16	10	10	10 20	13	10
SMON 井原-70	14	11	11	12	132	46 14	31	10
非SMON 井原-70	11	11	13	11	27	13 17	19	10
SMON 岡山-70	10	12	12	12	130	21 19	23	10
非SMON 岡山-70	8	12	12	13	134	24 16	17	10
非SMON 東京	38	10	13	10	30	17 16	18	11
SMON (総計)	60	12	11	12	41	25 17	19	10
非SMON(総計)	60	11	13	11	33	17 16	17	11

※ 血清希釈倍数

地域別・年次別の抗体価：上のようなSMON群と非SMON群における、一部の菌型もしくは抗原に対する抗体価が高い事実は、地域的・年次的な偏りに基づくものか否かを検討する意味で、表2のように対象を区分し、平均凝集素価の比較を行なってみた。これから明らかなように、S. typhimurium H抗体価は1970年の井原市民病院SMON群に高かったこと、第一内科の例では両群ともに高かったことである。また非SMON群東京の場合もやや高い平均値を示した。S. infantis O 抗体価にも同じ傾向がみられ、井原市民病院の1970年SMON群でとくに高かった。以上のことから、SMON群と非SMON群を全体として比較したときに認められた抗体価の有意差は、主として井原地区SMON患者、とくに1970年の患者によるものであることが明らかになった。

サルモネラ分離患者の血清抗体価：SMON症例 (S. infantis 分離, 死亡例)¹⁾ の死亡前15日前に採血した血清の凝集素価は、いずれの抗原に対しても20倍以下であった。非SMON症例 (S. typhimurium 分離) より、腹痛・発熱のみられた日から2日後(1969年9月26日)に採血された血清について調べた結果では、S. meleagridis H抗原に対し40倍、S. flexneri 2aに20倍の値が示されたのみで、他の抗原に対しては20倍以下であった。この採血日より4日後に採便された大便から、今回の実験で抗原のひとつに用いたS. typhimurium

菌株が分離されたのであるが、これに対する抗体上昇は、採血時点ではまだ認められなかった。

IV 考 察

サルモネラや赤痢菌に対する血清凝集素価を測定することによって、これらの菌による感染の有無を retrospective に診断できる。とくにO凝集素価の上昇は、かなり特異的に1~3カ月以内における感染を疑わせる。また菌体凝集反応を用いれば、*S. sonnei* 感染の場合は抗体の存在を検出できたときには、かなり確実な診断が下せる。一方、H抗体は特異性が高いが、抗体持続期間が長期にわたるため、たとえ上昇があっても最近の感染を疑う資料としてはあまり適当ではない。

今回の検査成績では、SMON患者群の *S. typhimurium* 抗H(i-1, 2)抗体価が対照群に比しても高いこと、*S. infantis* 抗O(6, 7)抗体価も高いことが観察された。抗H(i-1, 2)抗体価は、1970年の井原市民病院SMON群と非SMON群との間で差が著明であり、第一内科の両群ではともにも高い値を示し差が見られなかった。一般に抗(1, 2)抗体はH抗原(1, 5)ともつよい交差反応を示すが³⁾、今回の成績では *S. typhimurium* 抗H抗体価の高い例でも *S. infantis* H抗原(1-1, 5)に対する抗体価の高いものは少なかった。もし *S. typhimurium* H抗体中に抗(1, 2)抗体が含まれていれば、*S. infantis* H抗体価も平行して高くなっているはずである。ところが実際にはこれが高くなかったわけで、したがって *S. typhimurium* H抗体価の高い例の血清中には、抗(1, 2)抗体以外の抗(i)抗体または他の非特異的凝集素が存在していたと考えねばならない。したがって1970年の井原市民病院SMON群および第一内科のSMON群、非SMON群の中には、そのような抗体産生を刺激するなんらかの原因が加えられた例があったと思われるが、それが何であったかは不明である。一方、*S. infantis* O抗体価は井原市民病院SMON群でもっとも高値を示し、第一内科では両群ともほぼ等しい値であった。この事実は、井原市民病院SMON患者群には1969年の死亡例から分離された *S. infantis*、またはそれと同一O抗原をもつ菌の感染をうけた例があった可能性を考えさせる。

SMONの病因に関してはキノホルム中毒説⁴⁻¹¹⁾が有力になってきたが、われわれはSMON患者の腸内細菌叢の変化¹²⁾、およびキノホルム服用と腸内細菌叢異常との相関関係¹³⁾などを明らかにしてきた。今回の研究はSMON発症の前駆腹部症状の本態を明らかにする目的で実施されたものの一部である。最近までの諸研究を総合して考察すると、SMON患者に特異な腸管感染症が見当たらず、SMON患者の腹部症状は非SMON例でもみられると同様な各種の病原体の感染による胃腸炎や、非特異的な腹部症状が混在している可能性がつよいと考えられ、これにキノホルム服用が関与してSMONのおもな成因を構成するものと思われる。

V ま と め

岡山県のSMON患者60例、同地区および東京の非SMON60例の血清について、3型のサル

モネラと2型の赤痢菌に対する凝集素価を測定した。

SMON群では、Salmonella infantis O凝集素価、およびS. typhimurium H凝集素価が、非SMON群に比較して高い値を示した。この傾向は井原市民病院患者につよくみられた。これは同病院SMON患者の中にはO抗原(3, 10)をもつ菌の感染を経過したものがあつた可能性を示唆する。他の菌型ないし抗原に対しては両群間に差はなく、値も低かつた。

両群にShigella sonneiに対する抗体価を認めたものが1~2例ずつあり、これらは本菌による感染があつたことをつよく示す。

細菌血清学的検査知見からみたSMONの発生機序について考察をのべた。

(非スモン患者血清のご分与を載いた順天堂大学医学部小酒井望教授に深謝する。)

文 献

- 1) 中谷林太郎, 山崎恵子, 吉田洋子, 中野英一, 犬上洋子, 後藤延一, 島田宣浩, 広田滋, 高木新, 岩野郁造, 甲野礼作, 石井慶蔵: 岡山県井原市民病院入院SMON患者の細菌血清学的検査成績. I. Salmonella infantis を分離した1死亡例を含む大便の細菌学的検査. 医学のあゆみ. 75: 120-122, 1970.
- 2) 小沢敦, 後藤甚作, 小島逸子, 片岡喜久雄: SMON患者糞便より分離された Salmonella meleagridis とその凝集抗体. 医学のあゆみ. 74: 71-72, 1970.
- 3) 中谷林太郎, 坂崎利一訳: 腸内細菌同定法 (Edwards & Ewing 著). 一成堂, 1964.
- 4) 井形昭弘, 藤原研司, 西忠博, 島山正巳: 肝および腎にキノホルム沈着をみた1症例(予報). 医学のあゆみ. 75: 491-492, 1970.
- 5) 井形昭弘, 長谷部碩, 辻昭雄: SMON患者の緑色色素—緑色尿を呈した2症例—. 日本医事新報. №2421: 25-28, 1970.
- 6) 井形昭弘, 豊倉康夫: キノホルムによる神経障害に関する研究—キノホルム静注家兎における末梢神経障害. 医学のあゆみ. 75: 309-310, 1970.
- 7) 高須俊明, 井形昭弘, 豊倉康夫: SMON患者にみられる緑毛舌, 神経症状とキノホルムの関連. 日本医事新報. №2427: 24-32, 1970.
- 8) 田村善蔵: スモンとキノホルム. フアルマシア. 6: 788-791, 1970.
- 9) 椿忠雄: SMON. 診療と保険. 13: 33-37, 1971.
- 10) 吉岡正則, 田村善蔵: SMON患者の緑色色素の本態. 医学のあゆみ. 74: 320-322, 1970.
- 11) 吉武泰男, 井形昭弘: 腹部手術後に発症したSMONの検討 — キノホルム投与との関連. 医学のあゆみ. 74: 598-599, 1970.
- 12) 中谷林太郎: SMONの細菌血清学的研究. 日本臨床. 29: 759-765, 1971.

- 13) 中谷林太郎, 中野英一, 山崎恵子, 吉田洋子, 犬上洋子, 扇和子, 後藤延一, 光岡知足, 井形昭弘, 小沢敦, 後藤甚作, 大村一郎: スモン患者の腸内細菌叢とキノホルム. スモン調査研究協議会病原班研究報告. 第1集, 1971 (印刷中).

SMON患者における細菌血清学的検索

小沢 敦，後藤甚作，小島逸子，片岡喜久雄（国立東京第二病院）

I はじめに

SMONという病気の病因については感染説をはじめとしてビタミン欠乏，代謝障害，薬物中毒などいろいろな仮説が論議されているが，いまだにその本態については結論が出されていないのが現状であろう。一般的にいつて腹部症状（腹痛，下痢など）が神経症状にかならず先行するということがSMONに特徴的な一つの臨床像であることから，われわれは患者糞便中の細菌叢を定量的に追跡して，これを正常健康人糞便中の細菌叢の生態学的解析の結果と比較検討するとともに患者血清中の免疫グロブリンの定量と各種血清反応による抗体価の追跡をこころみたのでそれらの結果について報告したいと思う。

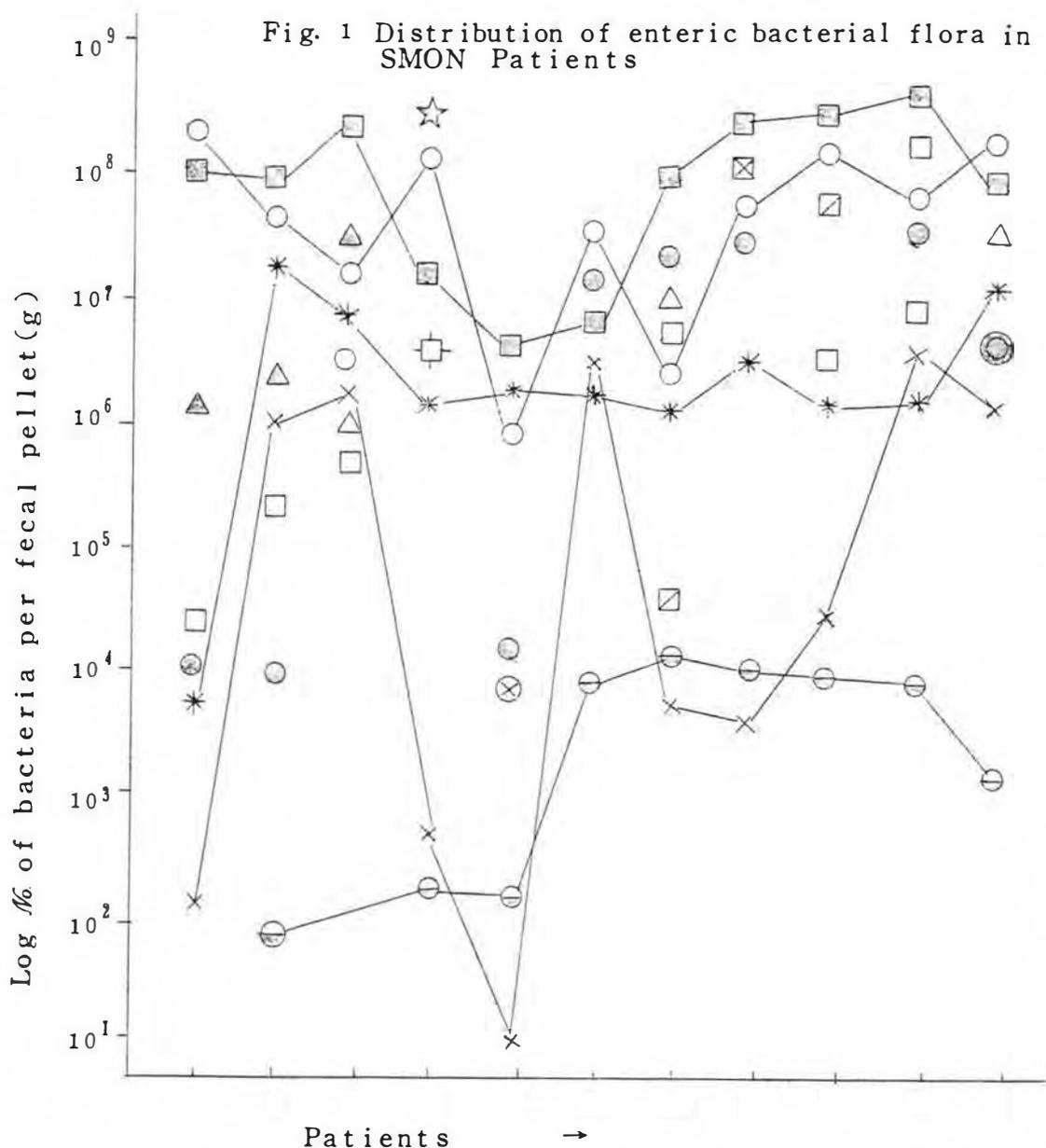
II 方 法

国立病院 SMON 共同研究班診断基準にもとづいて確実に SMON と診断された患者について排出糞便中の各種細菌叢 (obligate anaerobes を含めての検索であるが Bacteroides, Catenabacterium, Veillonella 等の無芽胞嫌気性菌についての積極的な検索はしなかつた) を定量的に評価しこれを正常健康人のものと比較検討した。そして SMON 患者で両側性沈降性肺炎を合併して死亡した 1 例の糞便から Salmonella meleagridis を分離したので該菌と SMON 患者 46 例の血清および健康人 23 例，肺結核患者 8 例，糖尿病患者 8 例，下痢患者 7 例の血清を用いて定量的凝集反応を実施しその凝集素価を比較検討した。血清学的検索としては患者血清を用いて ASLO 反応，CRP テスト，寒冷凝集反応，Paul-Bunnell 反応，LE テスト，RA テスト，Widal 反応，梅毒血清反応を施行すると同時に総蛋白量の測定，オキシド膜電気泳動法による血清蛋白分画，免疫電気泳動，薄層ゲル濾過法 (TLG) およびパルチゲンによる免疫グロブリンの定量を実施した。

III 成 績

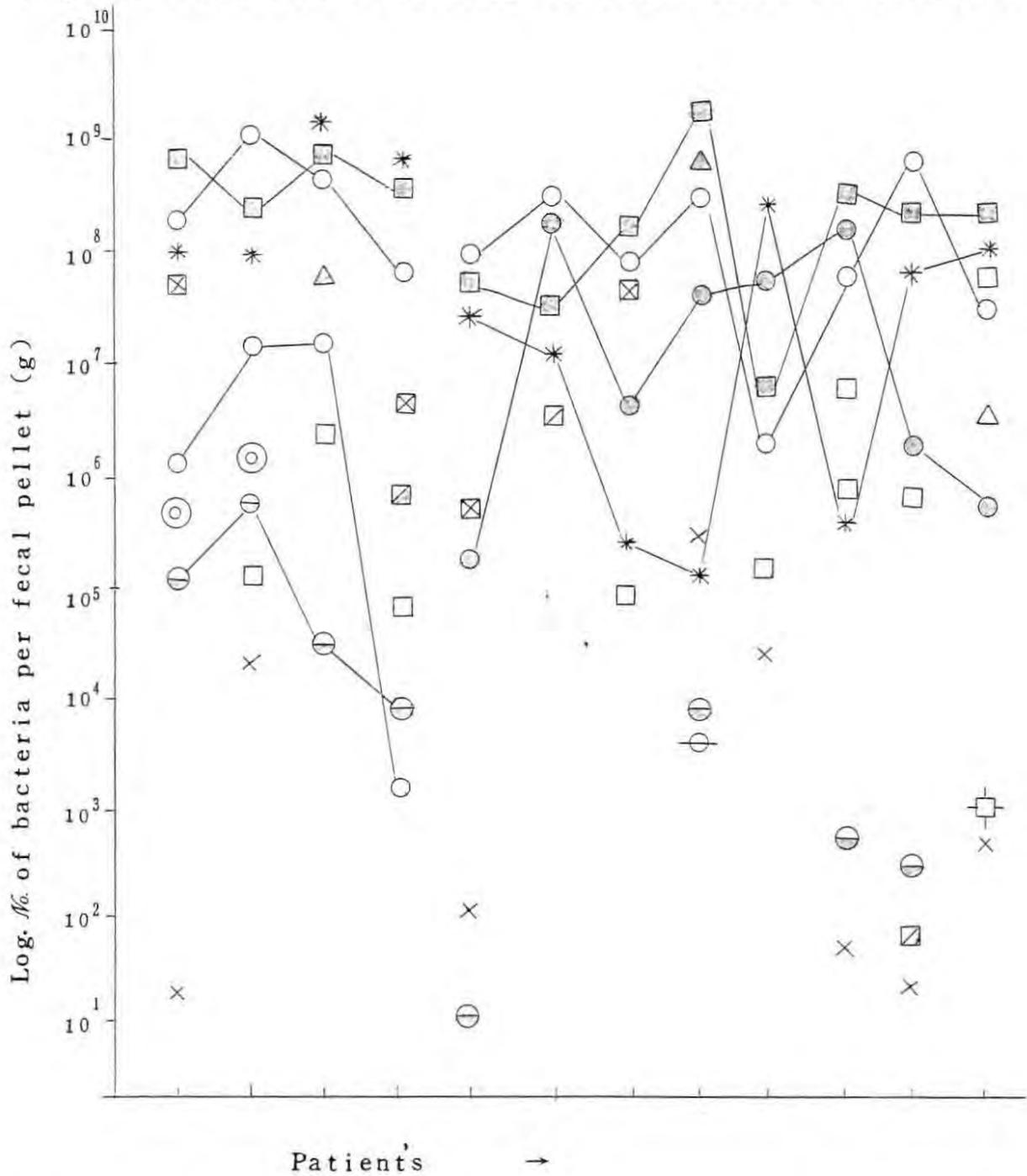
(1) 細菌学的検索：SMON 患者の 20 例についての糞便 1 g 当りの各種細菌叢を定量的に追跡した結果 E. coli, Enterococcus, Lactobacillus はすべての患者から検出され $10^6 \sim 10^8$ の幅をもつて菌数の変動を示した。一方，Klebsiella は 20 例中 17 例に検出され 10^4

$\sim 10^8$ の幅をもつて変動し、Staphylococcus epidermidis は20例中18例において検出され $10^1 \sim 10^6$ の間で大きく動揺している。Candida は20例中14例において検出され $10^2 \sim 10^5$ の間で動揺していた。その他Clostridium perfringens(20例中5例)、Proteus vulgaris、Proteus mirabilis、Citrobacter 等が出没しているのが観察される。そして2例のSMON患者の糞便からSalmonella meleagridis が 10^7 個 Salmonella bredeney が 10^6 個検出された。(Fig. 1, 2)



○ : E. coli, ⊙ : Klebsiella, △ : Proteus vulgaris, □ : Citrobacter
 ■ : Enterococcus, ▲ : Proteus mirabilis, × : Staphylococcus epidermidis, ⊖ : Staphylococcus aureus, ☆ : Rettgerella, ◻ : Pseudomonas,
 * : Lactobacillus, ⊕ : Candida, ◻ : Clostridium perfringens
 ⊗ : Enterobacter, ⊠ : Morganella, ⊙ : Salmonella meleagridis.

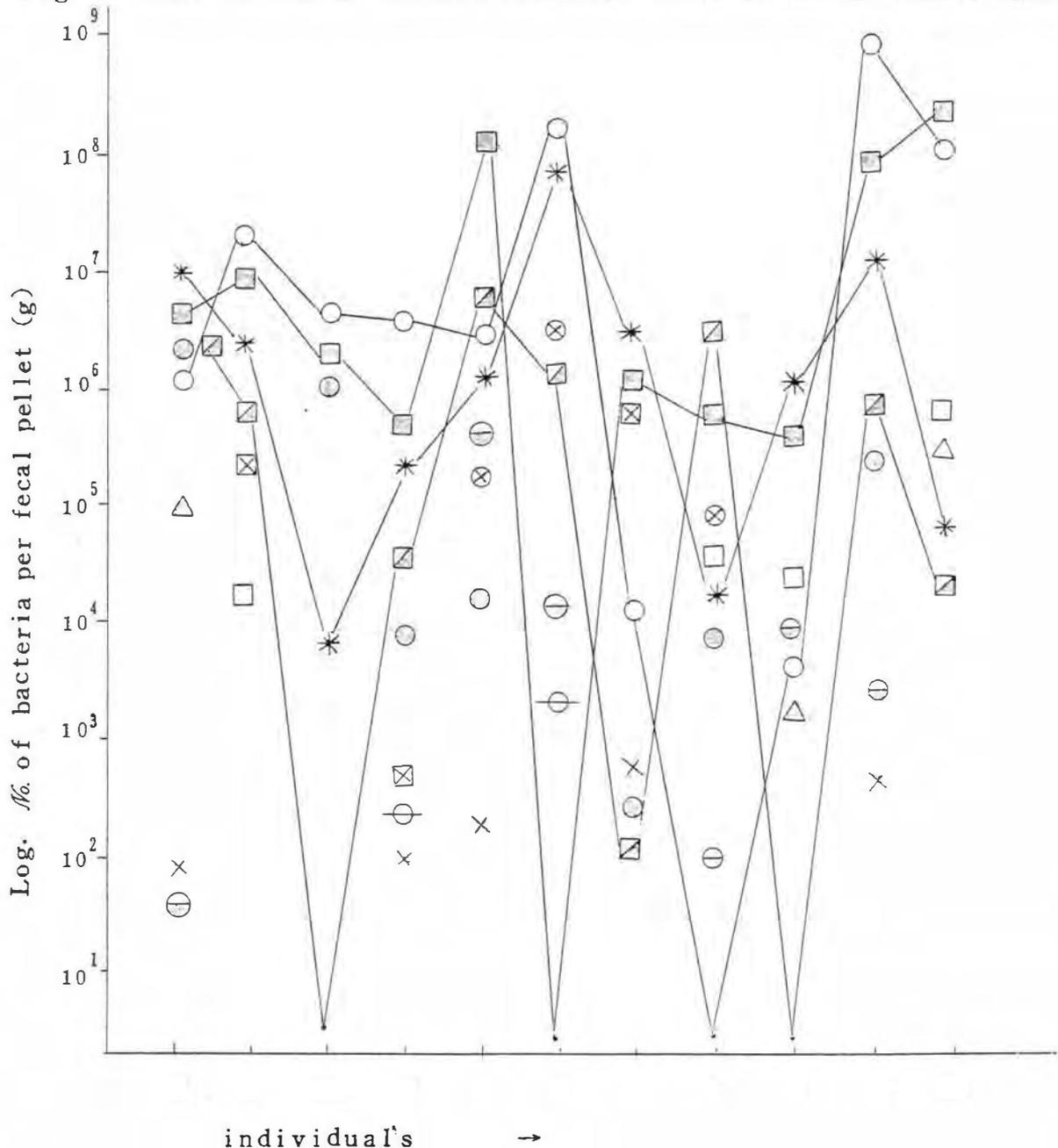
Fig. 2 Distribution of enteric bacterial flora in SMON patient



○: *E. coli*, ⊙: *Klebsiella*, △: *Proteus vulgaris*, □: *Citrobacter*,
 ⊠: *Enterococcus*, ▲: *Proteus mirabilis*, ×: *Staphylococcus epider-*
midis, ⊖: *Staphylococcus aureus*, ⊞: *Pseudomonas*, *: *Lactobacillus*,
 ⊕: *Candida*, ⊚: *Clostridium perfringens*, ⊗: *Morganella*,
 ⊛: *Salmonella bredeney*

つぎに正常健康人（40才～50才の女性）11例の糞便1g当りの各種細菌叢を定量的に追跡した結果SMON患者の場合と比較してその様相が異なり菌叢の上はかなりな動揺がみられた。すなわちE. coli, Enterococcus は11例中10例において検出されたが、菌叢の動揺ははげしくかなりなばらつきがみとめられた。Lactobacillus は全例から検出されたが $10^4 \sim 10^8$ の幅をもつて動揺していた。そしてClostridium perfringens は11例中9例から検出され $10^2 \sim 10^7$ の幅で動揺を示していた。その他Staphylococcus epidermidis（11例中5例において検出）、Candida（11例中6例において検出）、Klebsiella, Citrobacter, Staphylococcus aureus などが出没していた。（Fig. 3）。

Fig. 3 Distribution of enteric bacterial flora in normal individuals



(2) 血清学的検索

前述したように死亡したSMON患者糞便より分離された *Salmonella meleagridis* の生菌と100°C 1時間加熱死菌(菌液の濃度は540mμのフィルターで透過率61%にあわせた)を用いてSMON患者46例の血清との間で定量的凝集反応を実施し(37°Cの温浴中で1昼夜放置後判定)その凝集抗体価を追跡した。その結果,46例中40例に凝集抗体がみとめられ加熱死菌にたいする抗体価は生菌のそれより高く評価される傾向にあつた。そのうち80倍以上の抗体価を示したものが32例ありそのうち160倍以上の抗体価を示したものが16例あつた。(Fig. 4,5)

これに反し,正常健康人23例,肺結核患者8例,糖尿病患者8例,下痢患者7例,計46例の血清における *Salmonella meleagridis* にたいする凝集抗体価を検討すると46例中19例に凝集抗体価がみとめられそのうち80倍以上の抗体価を示したものは下痢患者血清1例のみであつた。(Fig. 6,7)。

以上のようにSMON患者血清中には非SMON患者に比較して *Salmonella meleagridis* にたいしてかなり高い凝集抗体がみとめられたが,これらの凝集抗体は50°Cの温浴中で凝集反応をおこなつた場合に強く抑制される傾向がみとめられた(Fig. 8)。

一方血清蛋白分画の分析により免疫グロブリンの定量的追跡をおこなつた結果,IgGの増強をみとめたもの7例,IgGの減少をみとめたもの7例,IgMの増強をみとめたもの8例,IgMの減少をみとめたもの1例,IgAの減少をみとめたもの1例あつた。その中の一部の成績はTable 1に示される通りである。

また各種血清反応においては特にみとむべき変化はなかつたがCRP陽性のものが2例,RAテスト陽性のもの4例,Widal反応で比較的高値を示したものが5例みとめられた(Table 2,3,4,5)。

Table 1. Serum protein analysis on SMON patients

Patient's	Sex and age	Total Protein (g/dl)	Serum Protein fractions					Immuno- electrophoresis	T L G mg/dl			partigen mg/dl		
			Alb	α_1	α_2	β	γ		A-fr	G-fr	M-fr	IgG	IgA	IgM
	♀45	7.6	55.4	5.4	10.1	12.1	16.9	IgM ↗	4260	1880	1480	960	920	300.0
	♀31	7.2	53.5	6.4	12.8	13.4	15.9	IgM ↗	5150	1290	960	592.5	213.6	233.5
		6.8	65.0	3.9	9.4	10.0	11.7	Normal	4580	1340	880	980.0	176.0	175.0
		6.8	55.8	6.7	12.5	9.2	15.8	IgG ↘	4850	2750	893	720.0	232.0	157.5
		♀62	6.5	65.7	4.6	11.4	9.2	9.2	IgM ↘ IgG ↘	4700	1120	625	510	264
	7.2		66.0	4.6	7.8	7.0	14.7	Normal	4410	1950	835	1180	142	100
	7.8		53.3	4.3	9.8	13.6	19.0	IgG ↗	4920	2280	585	1600	480	120
	7.5		68.8	2.5	3.3	10.7	14.7	Normal	4320	2220	965	1320	328	102.5
	♀56	8.3	59.2	6.0	7.6	10.9	16.3	IgA ↘ IgM ↘	4600	1970	824	876	920	90.0
	♀57	6.5	58.6	5.3	8.3	11.3	11.5	IgG ↘	4500	1300	710	860	280	187.5
	♀49	6.3	73.5	3.8	5.2		9.5	IgG ↘	3710	1550	1030	735	244	142.5

Fig. 6. Agglutinating antibodies against *Salmonella meleagridis* appearing in the sera derived from normal individuals.

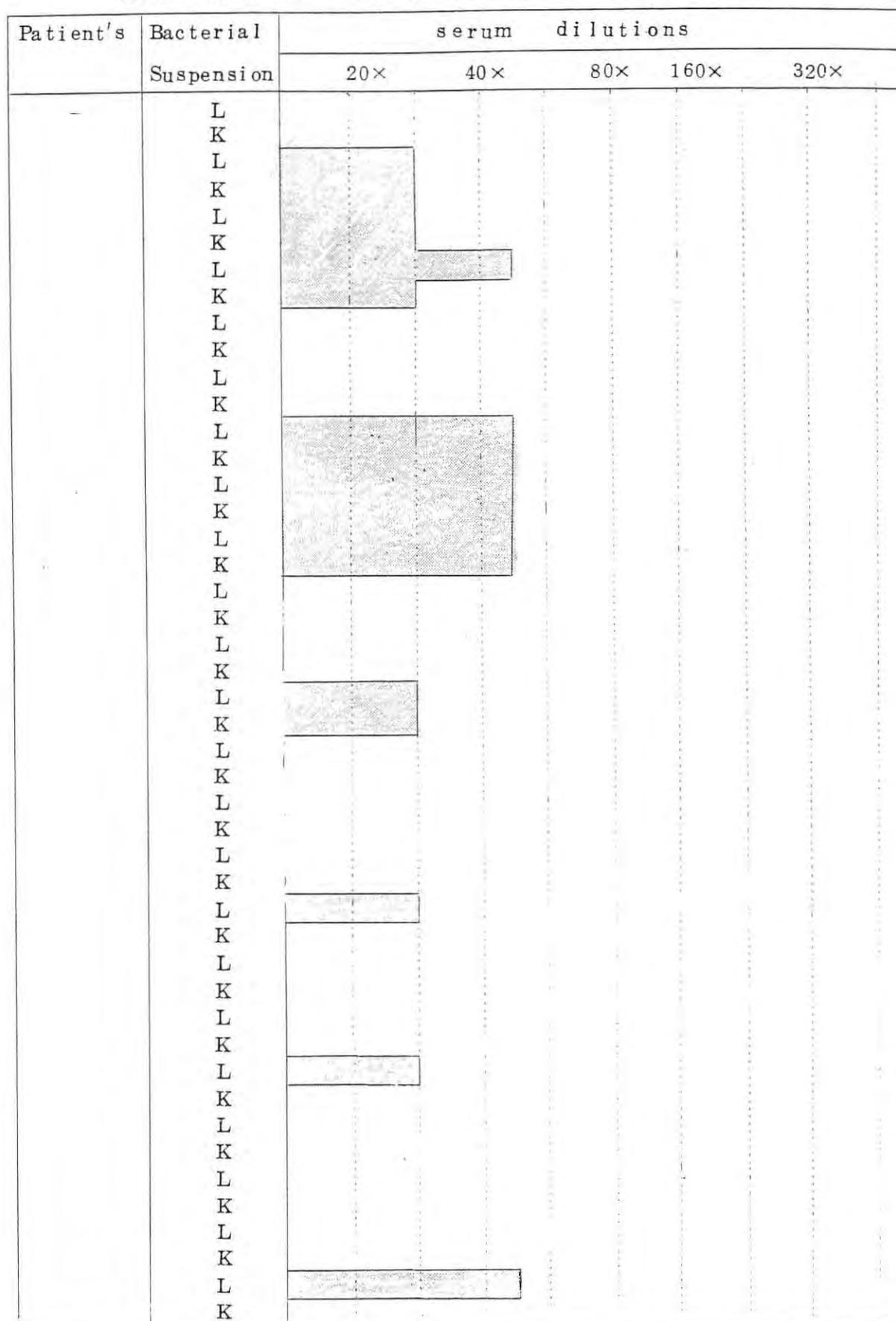


Fig 7. Agglutinating antibodies against *Salmonella meleagridis* appearing in the sera derived from the patients with pulmonary tuberculosis, diabetes mellitus and diarrhoea.

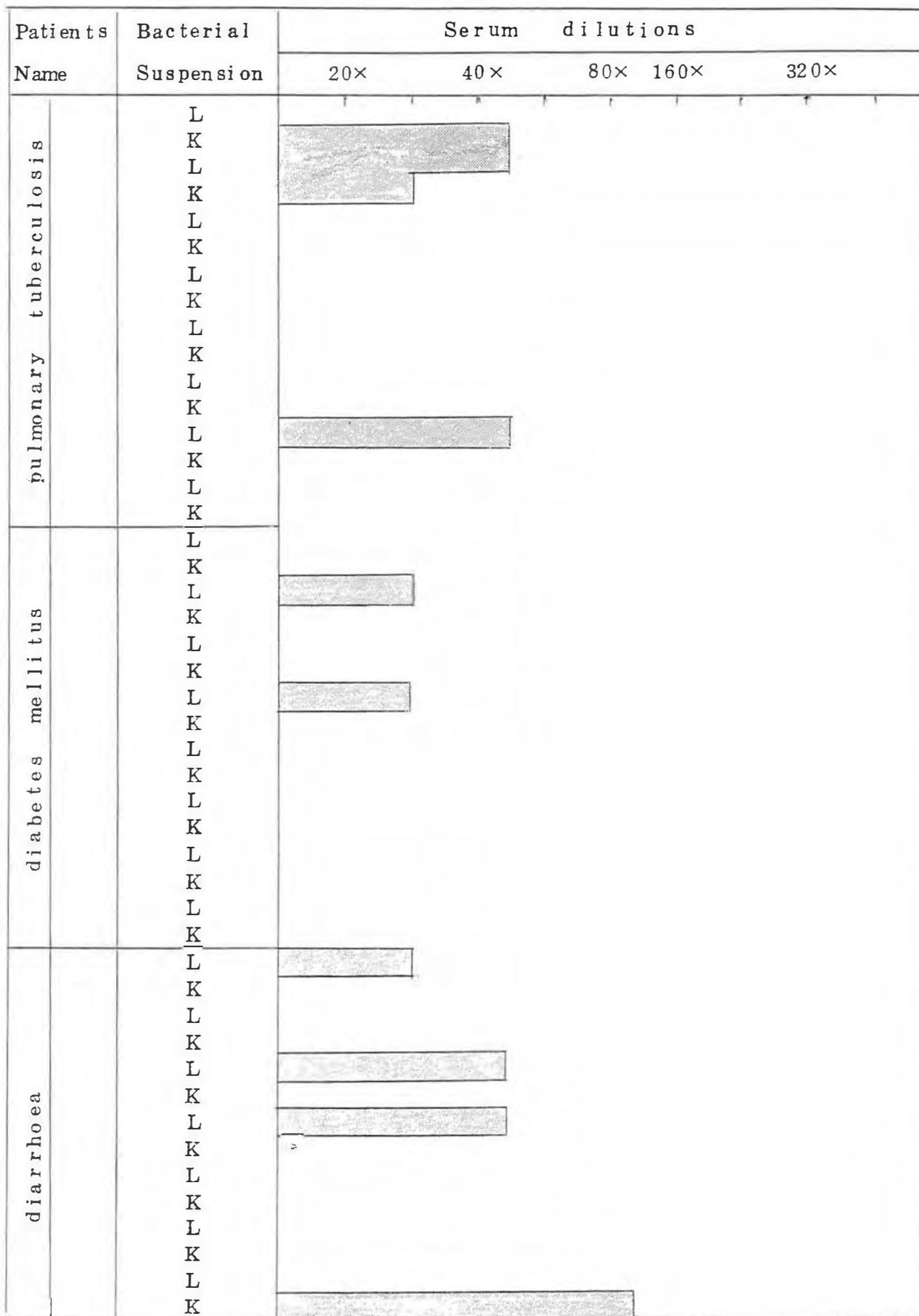


Fig. 8. Disappearance of agglutinating antibody against *Salmonella meleagridis* in 50°C incubation.

Patient's	Incubation temperature	Serum dilutions						
		20×	40×	80×	160×	320×	640×	1280×
	37 °C	■						
	50 °C							
	37 °C	■						
	50 °C	▨						
	37 °C	■						
	50 °C	▨						
	37 °C	■						
	50 °C							
	37 °C	■			■			
	50 °C							
	37 °C	■						
	50 °C							
	37 °C	■						
	50 °C	■						
* Rabbit anti-Ser	37 °C	■						
	50 °C	▨						
Rabbit anti-Ser	37 °C	■						
	50 °C	▨						
Rabbit anti-Ser	37 °C	■						
	50 °C	▨						



: Titers in 37°C



: Titers in 50°C

* anti rabbit serum againsts *Salmonella meleagridis*.

Table 2. Serological reactions on the sera derived from SMON patients.

Patient's Name	Sex and age	CRP	ASLO	Widal reaction				S. T. S.		
				T	PA	PB	Vi	Comp. fixation	Slide	TPHA
		-	166	20>	20>	20>	20>	-	-	-
		-	50>	20>	20>	20>	20>	-	-	-
		-	50>	20>	20>	20>	20>	-	-	-
		-	50	20>	20>	20>	20>	-	-	-
		-	125	20>	20>	20>	20>	-	-	-
		-	333	20>	20>	20>	20>	-	-	-
		2+	125	20>	20>	20>	20>	-	-	-
	♀62	1+	50>	20>	20>	20>	20>	-	-	-
	♀64	-	50>	20>	20>	20>	20>	-	-	-
		-	100	20>	20>	20>	20>	-	-	-
	♀49	-	50	20>	20>	20>	20>	-	-	-
	♀15	-	250	20>	20>	20>	20>	-	-	-
	♀40	-	125	20>	20>	20>	20>	-	-	-

Table 3. Serological reactions on the sera derived from SMON patients.

Patient's	Widal reaction							Cold agglutination	Paul-Bunnell	R.A.	L.E
	T-OH	T-O	Vi	PA-OH	PA-O	PB-OH	PB-O				
	160	20>	20>	20>	160	20>	20>	20>	40	-	-
	20>	20>	20>	20>	20>	160	20>	20>	40	-	-
	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	-	-
	20>	20>	20>	20>	20>	40	20>	20	20	-	-
	20>	20>	20>	20>	20>	20>	80>	40	40	-	-
	80>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	80	-	-
	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20	20	-	-
	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	80	+	-
	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	+	-
	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20	-	-
	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	0	20>	-	-
	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	40	20>	-	-
	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20	20	-	-
	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20	20	-	-

Table 4. Serological reactions on the Sera derived from SMON patients.

Patient's	Widal reaction							Cold agglutination	Paul-Bunnell	R.A.	L.E.
	T-OH	T-O	Vi	PA-OH	PA-O	PB-OH	PB-O				
	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20	-	-
	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	40	20 >	20 >	20	-	-
	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20	40	+	-
	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20	20	-	-
	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20	-	-
	80	40	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20	20	-	-
	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20	-	-
	40	40	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20	-	-
	40	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20	-	-
	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20	+	-
	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	40	-	-
	160	40	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20	-	-

Table 5. Serological reactions on the Sera derived from SMON patients.

Patient's	Widal reaction							Cold agglutination	Paul-Bunnell	R.A.	L.E.
	T-OH	T-O	Vi	PA-OH	PA-O	PB-OH	PB-O				
	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20	-	-
	80	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20	-	-
	20	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	40	-	-
	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20	-	-
	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20	20	+	-
	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20	+	-
	320 <	320 <	20 >	20 >	20 >	320	160	20 >	20	-	-
	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	160	20 >	20 >	20 >	-	-
	40	20 >	20 >	20 >	20 >	80	80	20 >	20 >	-	-
	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	40	-	-
	40	20 >	20 >	20 >	20 >	80	40	20 >	20	-	-
	40	40	20 >	80	20 >	320 <	320 <	40	20 >	-	-
	80	40	20 >	40	20 >	80	40	20	40	-	-
	40	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	20 >	40	-	-

IV 考 察

1つの病気の病因を解析するにあたって病気を生体のなかでおこる現象として把握追求する立場とその個体が生活している集団の中で病気の消長経過をとらえてゆく立場とがある。このような立場に立てて臨床、疫学、病理、病原的方面からのSMONへの積極的な挑戦が展開されてきたにもかかわらずこの病友の本態はいまだ解明されないまゝで残されているのが現状である。感染説の視点からその病因追求への銚先はもつぱらウイルス感染にむけられそれに関する報告および仮説¹⁾⁻⁵⁾がその論議の中心となってきたが最近になつてキノホルムがスモンの病因に密接に関連するという成績が相次いで報告されている⁶⁾⁻⁷⁾。われわれは臨床、疫学、病理組織学的研究の事実から提出された問題点をふまえてSMONに感染ということが何らかの形で関与しているのではないかという考え方の上になつて細菌学的、血清学的な面からの追跡を企図し、それらの成績を提示した。SMON患者の腸管内細菌叢の質的、量的な解析の結果を正常健康人のそれと比較検討した結果、それらの菌叢の変動のpatternの上になかなか差がみとめられresident floraと考えられるE. coli, Enterococcus, Lactobacillusなどの菌叢の変動はSMON患者においては比較的動揺は少なく安定していたが、正常健康人においてはかなりの幅の動揺を示しており、またClostridium, Candidaの出没のpatternの上にも差がみとめられた。このように正常健康人においてもそのfecal floraはかなりの変動がみとめられることはGorbachら⁸⁾によつても報告されているが、と同時にenteric floraの動きは年齢、食事および各個体のintestinal movementの差によつても影響される⁹⁾⁻¹³⁾ということ念頭に於いてさらに例数を追加した腸管内細菌叢の動態的追跡が推進されるべきであろう。またSMON患者においては正常健康人および非SMON患者に比較してSalmonella meleagridisにたいする凝集抗体価がかなり高く評価されたことが何を意味するかは今後さらに解析をすゝめてゆかなければならない問題点であろうかとも思われる。と同時に免疫グロブリンIgG, IgMにおける変化が何を物語るかまたこれが虫垂切除者にSMONが多発するという臨床疫学的事実¹⁴⁾と虫垂が抗体産生の中樞制御器管でありIgM抗体産生に中樞的な役割をもつリンパ組織である¹⁵⁾ということと如何なる関係をもつかは今後の検討にまきたい。

SMONの病理組織像がビタミンB complexのdeficiencyのそれに類似していることと¹⁶⁾ニコチン酸、ビタミンB₆, B₁₂, パントテン酸などが腸内細菌によつて合成されるという事実、また、Hartmann¹⁷⁾が広域性抗生物質投与による菌交代症の一つであるブドウ球菌性腸炎の発症に腸管内細菌叢の攪乱によるパントテン酸の欠乏ということが大きく関与していることを強調していることなどをあわせてSMONの発症機序を考えると、細菌であれ、ウイルスであれそれらの持続感染による腸管内細菌叢の攪乱とそれによつてもたらされるビタミン合成障害、吸収障害がその基盤に存在して、その症状にたいする一つの引金役を演じているのではないかという発想が生れてくるように思われる。したがつてSMONのethiology, pathogenesisという問題を追求する場合、病原側の要因と同時にこれと平行して生体側の要因の分析が臨床、疫学、病理学的視野から追跡され、宿主寄

生体関係 (Host-parasite relationships) の上に立つた総合的な解析こそ本態解明への重要な課題であることを認識して地道な努力が積みかさねられるべきであろう。

いままでえられた細菌血清学的追跡による成績を土台として、さらに動態的な腸管内細菌叢の質的、量的な解析すなわち fecal microecological な研究を推進して臨床的に多彩な病像を示す SMON の病因解明への足掛りを抽出してゆきたいと考える。

V 結 論

SMON に感染ということが何らかの形で関与しているのではないかという考え方の上に立つて SMON 患者糞便中の各種細菌叢の質的、量的な解析を実施し、これらの fecal flora の pattern は正常健康人のそれとはかなりな差がみとめられたことを示唆する成績が提示された。このことは今後さらに多くの SMON 患者について fecal microecological な研究を推進してゆく必要性を提起するものと思われる。また 2 例の SMON 患者糞便より *Salmonella meleagridis*, *Salmonella bredeney* が分離されたが、SMON 患者においては正常健康人および非 SMON 患者に比較して *Salmonella meleagridis* にたいする凝集抗体が高く評価された事実が何を意味するかは今後解析をすゝめてゆかなければならない一つの問題点と思われる。

おわりに患者血清をこころよく分与して下さった国立呉病院大村博士、国立国府台病院津金沢博士、国立大蔵病院横田博士に深く感謝致します。

文 献

- 1) 新宮正久: SMON における ECHO 21 型ウイルスの役割, 最新医学, 24(12), 2407-2411, 昭和44年。
- 2) 井上幸重他: スモン患者糞便より高率に分離された新しいウイルス, 医学のあゆみ, 72(6), 321-322, 昭和45年。
- 3) 俵寿太郎: 培養細胞による病原体分離のこころみ, SMON 病原班会議, 昭和45年2月16日。
- 4) 武内忠男他: スモン剖検4例の消化器所見について, スモン調査研究協議会, 第2回病理班会議, 昭和45年3月19日。
- 5) 甲野礼作: SMON 病因論, 感染説の立場から, 最新医学, 24(12), 2403-2406, 昭和44年。
- 6) 椿忠雄他: SMON の原因としてのキノホルムに関する疫学的研究, スモン調査研究協議会班会議研究報告プログラム, 23-25, 昭和45年11月13日。
- 7) 井形昭弘他: キノホルム投与家兎における末梢神経障害, スモン調査研究協議会班会議研究報告プログラム, 27, 昭和45年11月14日。
- 8) Gorbach, S.L. et al: Studies of Intestinal Microflora, I Effects

of diet, age and periodic sampling on numbers of fecal microorganisms in man, *Gastroenterology*, 53(6), 845-855, 1967.

9) Haenel, H. & W. Müller-Beuthow: Vergleich der faekalen Mikrokologie verschiedener Personengruppen. *Ernaehrungsforschung*, 8, 263-275, 1963.

10) Ketyi, I. & K. Barna: Studies on the human intestinal flora. I. The normal intestinal flora and the stability of its constituents. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 11, 173-183, 1964.

11) Rettger, L. F. & H. A. Cheplin: A treatise on the transformation of the intestinal flora with special reference to the implantation of *Bacillus acidophilus*, Yale University Press, New Haven, Connecticut, 1921.

12) Haenel, H., W. Feldheim, W. Müller-Benthow & H. Ruttloff: Versuche zur Umstimmung der faecalen Flora des gesunden Erwachsenen. *Zbl. Bakt. (Orig.)*, 137, 76-96, 1958.

13) Thomson, S.: The role of certain varieties of *bacterium coli* in gastroenteritis of babies. *J. Hyg. (Camb)*, 53, 357-367, 1955.

14) 近藤喜代太郎, 椿忠雄; いわゆる腹部症状を伴う脳脊髄炎症と虫垂切除, *臨床神経*, 8, 143-151, 昭和43年。

15) 花岡正男: 抗体産生中枢制御器管としての虫垂, 第11回日本医学会シンポジウム, 免疫グロブリン, その構造と産生機構, 昭和44年6月13日。

16) 松山春郎他: SMONの病理, *最新医学*, 24(12), 2469-2478, 昭和44年。

17) Hartmann, H. A. & Angevine, D. M.: Pseudomembranous colitis complicating prolonged antibiotic therapy. *Amer. J. Med. Sci.*, 232, 667-673, 1956.

北大阪地区 S M O N 患者の細菌血清学的検索

三輪谷 俊夫 (阪大微研)

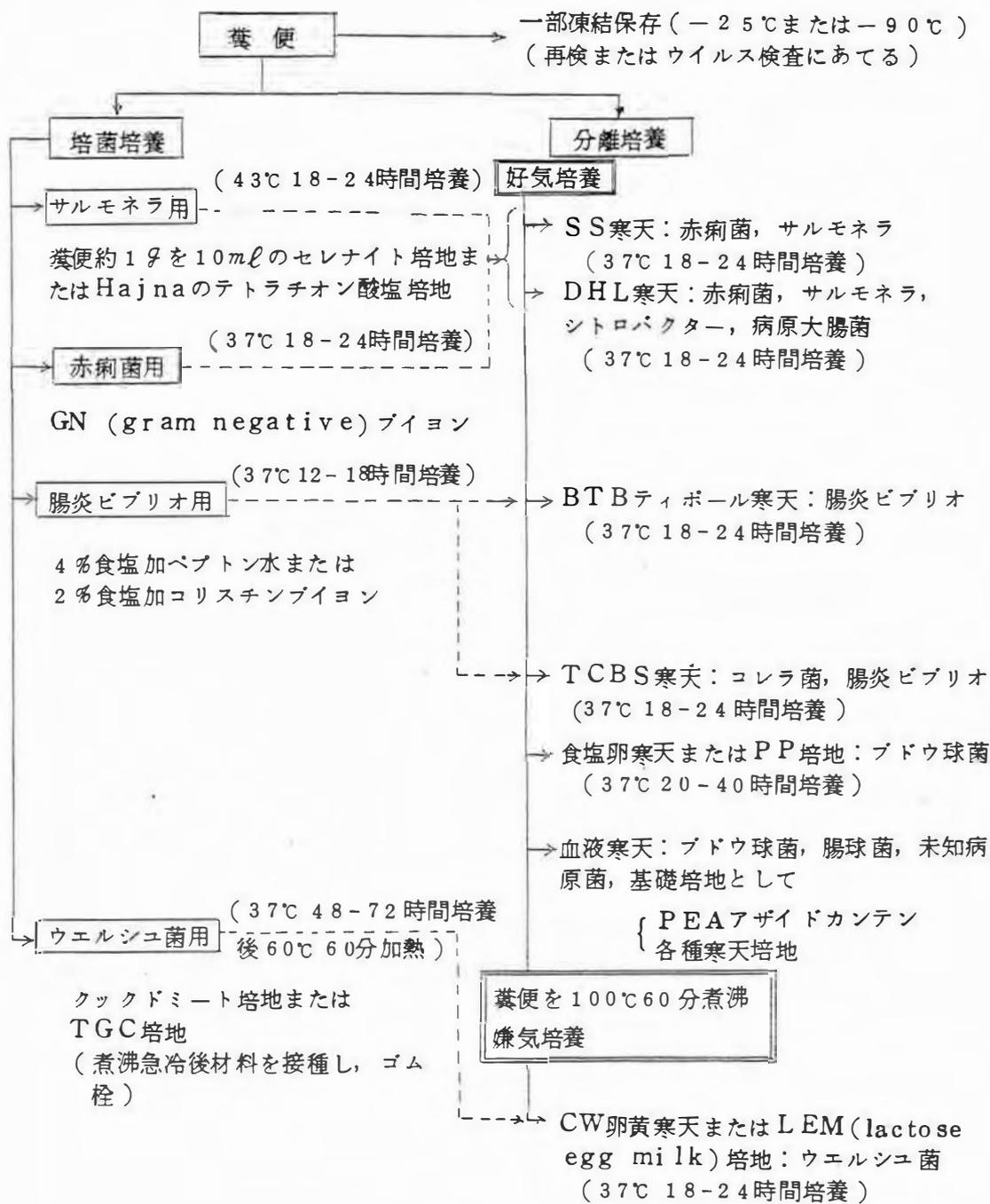
I はじめに

スモン調査研究協議会の病原班員として腸内細菌に関する研究に参加するよう呼びかけられた私として、SMONにみられる腹部症状から、細菌学的検索目標に腸管感染原因菌のうち *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, 腸炎ビブリオおよび病原ブドウ球菌を重視した。昭和41年のことだったと思うが、大阪府立病院に入院中のSMON患者の糞便から *Salmonella* (CまたはE1群)が高頻度に分離され、且つこの分離株に対する患者血清の凝集価が比較的特異的に上昇しているという私信をえていたため、当初は特に *Salmonella* に重点をおき、日常検査術式に従って昭和45年1月より検索を開始した。

II 材料および方法

- 1) 患者材料：いずれも北大阪地区にある吹田市民病院，新千里病院，阪大病院，微研病院および大手前病院に通院または入院中のSMON患者（確定診断のもののみ）より採取されたものである。
- 2) 糞便の培養検査法：説明を簡略にするため患者糞便の細菌培養検査の進め方を表1にまとめた。これは細菌性食中毒を含む急性胃腸炎のときの日常検査法¹⁾である。但し、*Clostridium* に関しては、食中毒の際には検査材料（増菌の場合も）を100℃60分加熱するが、SMON患者のときは60℃60分加熱することにした。
- 3) SMON患者の血清学的検索：大阪府立病院において昭和41年度にSMON患者の糞便より分離した *Salmonella* (E1群)の加熱(100℃, 2時間)死菌，ホルマリン(0.5%)死菌に対するSMON患者血清中の凝集素価を検べた。術式はWidal反応に準じたが、小沢ら²⁾の示唆により反応条件は37℃および50℃の湯槽中にて15～18時間反応させてのち肉眼的に判定した。
- 4) リコール(髄液)よりの病原細菌および *Mycoplasma* の培養検査法：病原細菌に関しては血液寒天，TGCブイヨン，Trypticase Soy broth を用い、*Mycoplasma* に関しては尾形ら²⁾の方法にのっとり次の培地を用いた。

表1 患者糞便の細菌培養検査の進め方



a) 分離用培地 (Mycoplasma用)

Difco-PPLO agar	70ml
メンブラン・フィルター(0.2μ)・濾過滅菌ウマ血清	20ml
2.5%酵母(ニツテン)加熱抽出液	10ml
0.2%DNA(thymus)(NBC)	1ml
M-K2HP4	2ml

2.5 % thallium acetate 1 ml
 100,000 U/ml Penicillin G 1 ml

(ときに Amphotericin B を 10 r/ml の割に添加する)

b) 増菌用培地 (Mycoplasma用)

5% ウマ血液寒天斜面 (基礎培地は Difco-brain heart infusion agar) に上記分離用培地から寒天をぬいたもの (すなわち, Difco-PPLO broth で調製したもの) を重層し, 増菌培養として使用した。

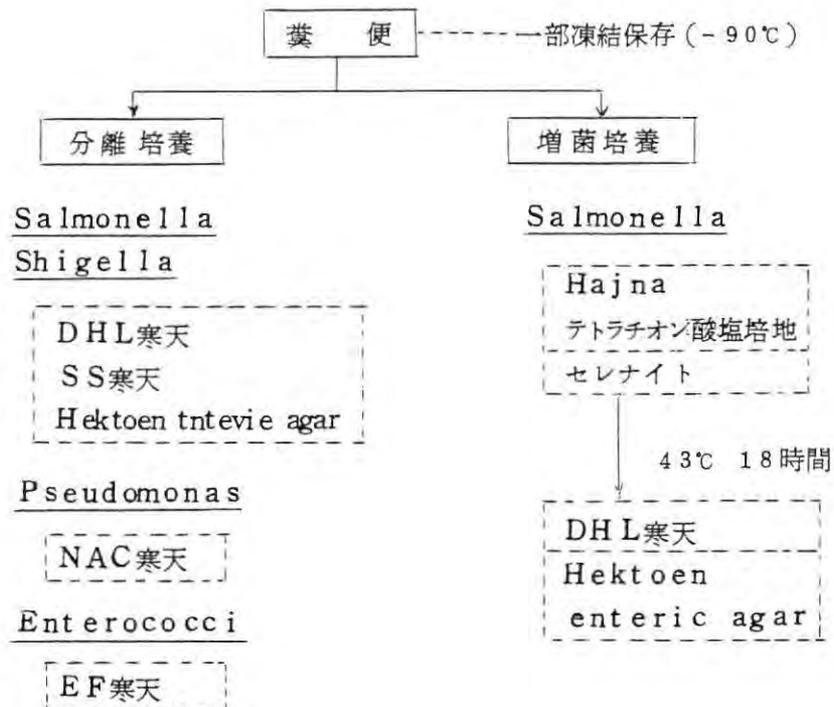
III 結 果

1. 糞便の細菌学的検索

昭和45年6月14日までに提出された47検体について表1の術式に従って検査した結果, 菌検出率は Salmonella 0/47, Shigella 0/47, 腸炎ビブリオ 0/47, Staphylococcus aureus 1/12, Clostridium 20/47 であった。

昭和45年6月15日以後は, Salmonella, Shigella の分離に好成績をえた Hektoen enteric agar をも使用して表2に表すような検索方法によって SMON 患

表2 SMON患者糞便の細菌培養検査法

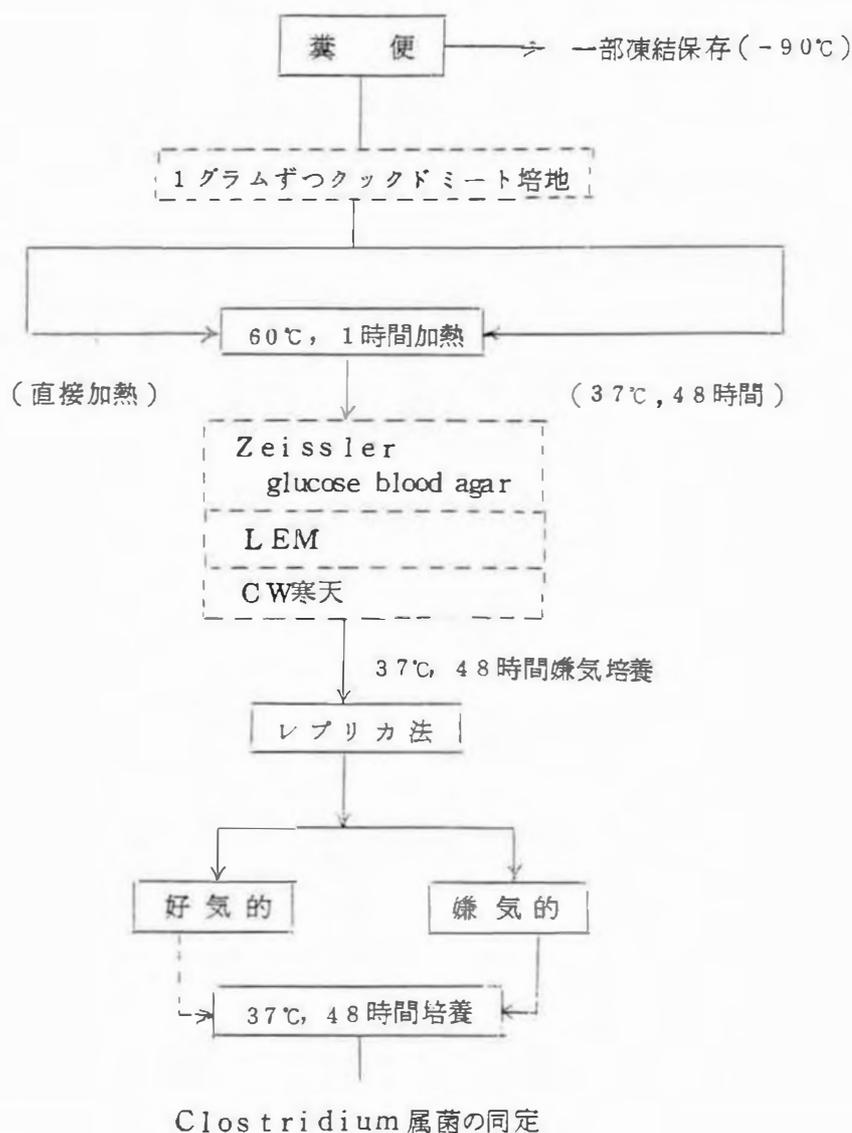


者18例について Salmonella, Shigella, Pseudomonas, 腸球菌, Clostridium に重要をおき, 菌の検索を行なった。その培養検査の結果は表3に示すように, やはり

Salmonella, Shigella は検出されなかった。しかし, Clostridium に関しては 15/18 例に検出され, しかも 1 検体より 1~3 種類の菌種が認められている。

このように高頻度に Clostridium 属菌が検出されたため, 非SMONの糞便材料 50 例について表 4 に示す術式に従って Clostridium 属菌の検索を試みたところ, 表 5 に示すよ

表 4 Clostridium 属菌の培養検査法



うに分離培養法によって検出率に多少のずれがみられるが, 綜括的にみて 49/50 例の高頻度で Clostridium 属菌が検出された。

以上の如く菌の検索にあたって今までのところ SMON に特有なものは検出していない。

表5 非SMONの糞便からのClostridium属菌の検出率

検査件数50例 うち陰性1例	菌検出 例数	分離方法別にみた菌検出例数		
		直接加熱処理	増菌培養と 加熱処理	2方法とも 陽性
検出菌種				
<i>C. perfringens</i>	26	19	1	6
<i>C. bifermentans</i>	35	1	23	11
<i>C. butyricum</i>	2	1	1	0
<i>C. difficile</i>	2	1	1	0
その他（同定中）	40	12	24	4
計	105			

2. 血清学的検索

方法の項で記載したように、大阪府立病院において昭和41年度にSMON患者の糞便中より分離したSalmonella（E1群株、小沢敦班員の私信によると2相菌の誘導によりS. meleagridisである）の分与を受け、本菌の加熱（100℃、2時間）およびホルマリン（0.5%）死菌に対するSMON患者血清中の凝集価を患者38名について反応温度37℃と50℃で検べた結果を表6に示す。非SMON血清30検体の凝集価は表示しなかったが、表6の結果は非SMONの血清と比較して優位の差は認められなかった。

3. リコールからの病原細菌とくにMycoplasmaの検索

大手前病院から8例、吹田市民病院から5例、提出されたSMON患者のリコールについて前項に記載した培地を使用し、分離培養に際しては好氣的（5% CO₂添加）並びに嫌氣的（嫌気ジャーを使用し10% CO₂添加窒素ガスに置換）培養を併用し、2週間培養したが、いずれも菌は検出されなかった。

表6 SMON患者の糞便より分離した *Salmonella* (E1) の加熱死菌
ホルマリン死菌に対するSMON患者血清中の凝集素価



検 体	血 清 希 釈					
	×10	×20	×40	×80	×160	×320
24	37℃ホルマリン死菌					
25						
26	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌				
27	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃加熱死菌			
28						
29						
30						
31						
32	37℃ホルマリン死菌					
33						
34						
35	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌				
36	37℃ホルマリン死菌					
37	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌				
38	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌			
39	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌		
40	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌		
41	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌			
42						

検 体	血 清 希 釈					
	×10	×20	×40	×80	×160	×320
43	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌			
44	50℃ホルマリン死菌					
45						
46						
47	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌				
48						
49	50℃ホルマリン死菌					
50	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌			
51	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌			
52						
53						
54	37℃ホルマリン死菌					
55	37℃ホルマリン死菌					
56						
57	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌				
58	37℃ホルマリン死菌	50℃ホルマリン死菌				
59	37℃ホルマリン死菌					
60						
61	50℃ホルマリン死菌					

IV 考 察

SMON患者について病原細菌の検索、血清学的検索を試みたが、実験成績から明らかなようにすべて陰性におわった。

一方、SMON患者の緑色色素の本態がキノホルムであることが田村ら³⁾によって指摘されたことに端を発し、SMONとキノホルムの関係が椿ら⁴⁾によって疫学的に大きくクローズアップされ、井

形，豊倉^{ツノ}によって動物実験で実証された。その他多くの人々によってキノホルムがSMONの重要な原因物質であるらしいという証拠が提出されている。著者らはニワトリのヒナを用いて，キノホルム投与によるSMON様症状の発現と腸管感染の関係を追求している。

V 結 論

北大阪地区にある吹田市民病院，新千里病院，阪大病院，微研病院および大手前病院より提出されたSMON患者（通院または入院中の確定診断がくだされたもののみ）材料について細菌学および血清学的検索を行なった。

- 1) 糞便65検体について腸管感染症の原因菌の検索を行なったが，Clostridium属菌以外は陰性であった。Clostridium属菌は $35/65$ の検出率であったが，非SMONの糞便からの検出率は $49/50$ であり，菌種，および菌量からみてSMONの場合の方が検出率は低い。
- 2) 大阪府立病院においてSMON患者の糞便より分離されたSalmonella E1群株に対する凝集価をSMON患者血清38例について検べたが，凝集価の特異的な上昇は認められなかった。
- 3) リコール13例について病原菌とくにMycoplasmaの検索を試みたが陰性であった。

共同研究者：

倉堀知弘，竹田美文，今村邦男，大川貞二，上村高明

文 献

- 1) 三輪谷俊夫：腸管感染症の細菌学的検索，臨床検査，14(12)，139～146，1970
- 2) 小沢敦ほか：SMONの週辺——特に細菌血清学的な立場から——医療，24(9)，23～31，昭和45年
- 3) 吉岡正則，田村善蔵：SMON患者の緑色色素の本態，医学のあゆみ，74(7)，320～322，1970
- 4) 椿 忠雄ほか：SMONの原因について，日本神経学会第34回関東地方会発表，1970年9月5日
- 5) 井形昭弘，豊倉康夫：キノホルムによる神経系障害に関する研究——キノホルム静注家兎における末梢神経障害，医学のあゆみ，75(6)，309～310，1970

スモン患者の腸内細菌叢とキノホルム

中谷林太郎，中野英一，山崎恵子，吉田洋子，犬上洋子，扇和子，後藤延一（国立公衆衛生院），光岡知足（理化学研究所），井形昭弘（東京大学脳研究所），小沢敦，後藤甚作（国立東京第二病院），大村一郎（国立呉病院）

I 緒 論

腹部症状がスモンの必発症状の一つであることから，スモンの病原を探るためには，細菌学的にも十分な検討が行なわれなければならない。その研究の一つとして，われわれはスモン患者の腸内細菌叢が，健康人のそれと比較して変化がみられるか否か，もしみられるとすれば，いかなる種類の菌群に増加または減少がみられるかを明らかにし，それが，スモンとどのような関係にあるかを検討するため研究を行なった。

II 材料および方法

検査材料：表1に示すように，国立呉病院入院スモン患者（1970年5月29日）10例と，東大神経内科の入院および外来患者を主とする東京地域のスモン患者41例（1970年6月～12月）の新鮮排泄便を用いた。これらの患者の病期は単一ではなく，発病後数年のものも新鮮患者も含まれていて，また腹部症状も必ずしも一定でなく，とくに検体採取時に下痢を呈していた例は比較的少数であった。なお対象として引用した健康人大便の細菌叢は，すでに光岡（発表予定）

表1. 検査対象

対 象	地 域	例 数	合 計
スモン患者	呉	10	51
	東京 [※]	41	
健 康 人	東京	35	35

※東大，三栄，中島，関東中央，東京
医科歯科大の各病院

が23才～85才の成人について検査した35例の成績である。厳密な意味での対照としては，各スモン例に適切に対応する非スモン例をとるべきであったが，現在の段階で大まかな目安をつけるという意味では，これを対照として比較することで十分な意味があると考えた。

検体の処理：腸内細菌叢のバランスは，排便後きわめて急速に変化しやすいので，検体は新鮮排出便を用い，輸送する場合には，嫌氣的に保存した0.05% L-cystein HCL・H₂O，0.1% agar加Brain heart infusino broth (Difco) 9 mlに約1gの検体を取りこれを氷冷し，極力菌叢の変化を防ぐ措置をとった，検査は排便後できるだけ短時間に行ない，長くとも24時間以内には培地への接種が終わるようにした。

検体の希釈は嫌気性希釈液 (KH₂PO₄ 4.5g, Na₂HPO₄ 6.0g, L-cystein HC H₂O 0.5g, Tween 80 0.5g, Agar 1.0g, 精製水 1.000ml)^{3) 4)} で10倍段階を行ない, その10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ 希釈を非選択培地に, 10⁻¹, 10⁻³, 10⁻⁵, 10⁻⁷ を選択培地に接種した。

培地・培養法・成績の判定: 表2に示す培地を用い, 光岡ら^{3) 4)}の方法に準拠して実施した。

表2. 検索培地と培養法

	使用培地	対象菌種	培養法
非 選 択 培 地	EG agar	嫌気性菌	CO ₂ 置換スチール ウール法, 3~4日 好気性, 1~2日
	BL agar	グラム陽性嫌気性菌	
	Trypticase soy	好気性菌	
	blood agar		
選 択 培 地	BS agar	<u>Bifidobacterium</u>	CO ₂ 置換スチール ウール法, 3~4日
	CS agar	<u>Catenabacterium</u>	
	NBGT agar	<u>Bacteroidaceae</u>	
	Neomycin Nagler agar	レンチナーゼ陽性 <u>Clo-</u> <u>stridium</u>	
	変法VS agar	<u>Veillonella</u>	CO ₂ 置換, 2日 好気性, 2日 好気性, 1日 好気性, 2~3日
	変法LBS agar	<u>Lactobacillus</u>	
	TATAC agar	<u>Streptococcus</u>	
	DHL agar	<u>Enterobacteriaceae</u>	
	PEES agar	<u>Staphylococcus</u>	
	Potato dextrose agar	真菌類	

上述の如く, 適当に希釈した検体を培地に定量的に塗布し, 所定の培養後, 發育した集落について菌種の同定, 大便1g中の各菌群の数を算定した。

III 成 績

健康人とスモン患者の大便1g中の総菌数および各菌群の菌数を対数によってあらわし, その均値を対比した成績は表3の通りである。

総菌数はスモン患者群では健康人群より約 1/5 に減少していた。この減少の主因を各菌群別菌数の変動に求めてみれば, 健康人で最優勢菌叢を構成する Bacteroidaceae, Catenabacterium および Bifidobacterium などの偏性嫌気性菌群の著明な減少に起因していることが明らかであり, またこれらの菌群の検出率をみると, スモン患者群では Catenabacterium および Bifidobacterium の検出率が著しく低下していることが認めら

た。

Lactobacillus は菌数としては健康人で大便中の総菌数の0.1% 足らずを占めるにすぎない菌群であるが常に検出されるのに対し、スモン患者では検出率78%に低下し、また検出例における菌数も減少していることが認められた。

一方 Streptococcus や Enterobacteriaceae の菌群は、両群とも全例に検出されてはいるが、菌数を比較すると、スモン患者群の方がやや多い傾向にあることが観察された。

Veillonella に関しては、両群間に検出率の差はなかつたが、検出例における菌数は、スモン患者群の方がかなり高かつた。

Staphylococcus はスモン患者群での検出率が著明に低下していた反面、検出例の菌数は逆にスモン患者群において増加していることがうかがわれた。

Clostridium および Yeast も、検出率はスモン患者群では低かつたが、菌数には差がみられなかつた、その他の菌群に関しては、両群とも検出例が少ないので比較は困難である。

なお、Enterobacteriaceae に属する菌群中で、通常は優勢を示す乳糖発酵性大腸菌の菌数が比較的少ない例が多く、それに代って乳頭非発酵性菌 (Proteus, Citrobacter 等) や Klebsiella などが多く認められる場合が少なからずあった。

表3 健康人とスモン患者の腸内細菌叢の比較

菌種	健康人大便 (35例)			スモン患者大便 (51例)		
	平均 ^a (log/g)	検出範囲 ^b	検出率 (%)	平均 ^a (log/g)	検出範囲 ^b	検出率 (%)
<u>Bacteroidaceae</u>	10.2	8.1 ~ 11.2	97	9.2	6.2 ~ 10.8	96
<u>Catenabacterium</u>	9.7	7.3 ~ 10.9	91	8.7	3.8 ~ 10.5	75
<u>Bifidobacterium</u>	9.9	8.3 ~ 10.7	94	8.8	5.7 ~ 10.4	82
<u>Peptostreptococcus</u>	8.7	3.0 ~ 10.4	34	8.3	6.4 ~ 10.0	33
<u>Lactobacillus</u>	7.4	3.7 ~ 9.8	100	6.5	3.0 ~ 9.1	78
<u>Streptococcus</u>	8.2	5.3 ~ 10.6	100	8.7	4.5 ~ 10.6	100
<u>Enterobacteriaceae</u>	8.2	4.1 ~ 10.5	100	8.4	4.7 ~ 10.3	100
<u>Clostridium</u>	6.2	3.2 ~ 9.0	67	5.9	2.5 ~ 9.1	49
<u>Veillonella</u>	4.5	2.3 ~ 9.3	67	6.9	2.3 ~ 9.3	65
<u>Staphylococcus</u>	3.9	2.3 ~ 7.3	94	5.2	2.2 ~ 10.1	61
<u>Bacillus</u>	3.1	2.6 ~ 3.5	5.7	6.4	2.6 ~ 8.3	20
Mold	2.5	2.3 ~ 3.0	14	3.2	3.2	2.0
Yeast	3.8	2.3 ~ 6.9	74	4.2	2.3 ~ 8.7	59
Total	10.7	9.9 ~ 11.2		10.0	6.9 ~ 11.0	

a 検出された例のみの平均値

b 全く検出されない例を除く

さて、今回の成績を個々の例についてさらに分析・考察を考えてみた。すなわち、Catenabacterium、Bifidobacterium、Lactobacillus および Bacteroidaceae の菌数が著明に減少している点、また Streptococcus、Enterobacteriaceae、Veillonella、Staphylococcus が比較的増加している点を総合的に考慮して、細菌叢のバランスの乱れの甚しいものを「異常」とみなし、その程度の軽い例を「やや異常」として腸内細菌叢の異常例数を健康人群とスモン患者群との間で対比してみた。その成績は表4に示されている。これによれば、スモン患者群では異常な細菌叢を示す例が著明に多いことが明らかにされた。

表4. 健康人とスモン患者の腸内細菌叢の異常例数の比較

対 象	例 数	異 常	やゝ異常	正 常	異 常 率 (%)	
					異常+やゝ異常	異常のみ
スモン患者	51	28	7	16	69	55
健 康 人	35	1	2	32	8.6	2.9

最近、高須ら⁵⁾は、一部のスモン患者に緑毛舌が特異的なことを重視し、それにひきつづいて井形ら¹⁾により一部のスモン患者に特異的な緑便・緑尿が発見されたことから、スモン患者における緑色物質がにわかに注目されはじめ、その本態に関する解析が急速に展開された。そして吉岡・田村⁶⁾によって、それがキノホルムと Fe^{3+} のキレート化合物であることが明らかにされ、キノホルム中毒がきわめて有力なスモンの病因として登場した。

そこでわれわれは、検索した上記51例のスモン患者の腸内細菌叢をキノホルム服用との関係において検討した。すなわち、大便採取前7日間以内にキノホルム製剤を服用していた群と非服用群とに分けて、各群の細菌叢の異常率および各種菌群の検出率並びに菌数を比較してみた(表5, 6)。その結果、服用群に異常率が高く、また検出率・菌数においても、スモン患者と健康人との間で観察された相違とほぼ同様な傾向が、キノホルム服用群と非服用群との間でも存在することが観察され、Bacteroidaceae および Catenabacterium の検出率並びに菌数、Clostridium および Staphylococcus の検出率は、健康人群に比べキノホルム服用群において非服用群よりも低下が著しく、Enterobacteriaceae の菌数は、キノホルム非服用群では健康人群と同じ値であるのに対し、キノホルム服用群では著しい増加がみられ、また Streptococcus の菌数の増加においても、キノホルム服用群の方が顕著であった。これに対し、Bifidobacterium および Lactobacillus の変動はこれとやや異なり、キノホルム服用群で検出率が著明に低下しているにもかかわらず、検出例における菌数はキノホルム非服用群の方がむしろ低かった。このやや矛盾した事実と、Bifidobacterium が *in vitro* においてキノホルム $60 \mu/ml$ に対してもなお耐性であることと総合すれば、Bifidobacterium の減少～消失の原因はキノ

表5 キノホルム服用スモン患者とキノホルム非服用スモン患者の腸内細菌叢の比較

	キノホルム非服用 (35例)		キノホルム服用 (16例)	
	平均 (log/g)	検出率 (%)	平均 (log/g)	検出率 (%)
<u>Bacteroidaceae</u>	9.3	100	9.0	88
<u>Catenabacterium</u>	8.8	83	8.4	56
<u>Bifidobacterium</u>	8.7	89	9.0	69
<u>peptostreptococcus</u>	8.3	31	8.3	38
<u>Lactobacillus</u>	6.4	80	6.8	75
<u>Streptococcus</u>	8.5	100	9.1	100
<u>Enterobacteriaceae</u>	8.2	100	8.6	100
<u>Clostridium</u>	5.8	63	6.2	19
<u>Veillonella</u>	6.9	66	7.0	63
<u>Staphylococcus</u>	5.1	63	5.6	56
<u>Bacillus</u>	6.5	20	6.4	19
Mold	3.2	2.9	0	0
Yeast	4.5	60	3.6	56
Total	10.1		10.0	

ホルム直接の殺菌作用とは考えられず、むしろ生体の病的状態とより深い関連をもっていることが推察される。同様の現象は、すでに HAENEL²⁾ が、病的状態では疾病の種類に関係なく Bifidobacterium の減少がみられることを報告している。

最後に、以上のようなスモン患者の腸内細菌叢の異常が、スモンといかなる因果関係を有するかについて考察しよう。われわれが取

扱ったスモン患者には、発病後すでにかかりの月日を経過したものも含まれているから、その結には生体の異常状態、薬剤など各種の要因が強く影響しているものと考えられる。腸内細菌叢の常をもたらした原因として、キノホルムを含む何らかの原因によっておきた神経症状の1つの発としての腸管生理の異常あるいは腹部症状の結果としての細菌叢の異常が考えられるし、一方でスモン患者に多く服用されているキノホルムなどの薬剤の直接の殺菌作用としての腸内細菌叢のバランスの攪乱が考えられ、この両者が複雑にからみ合って表現されている場合も少なくないものと

表6 スモン患者のキノホルム服用、非服用と腸内細菌叢の異常例数の比較

キノホルム服用	正常*	異常	異常率 (%)
+	4	12	75
-	19	16	46
計	23	28	55

*やや異常を含む

定される。しかしながら、これらの異常を惹起する前段階におけるスモンの前駆腹部疾患の原因や、発病のための生体側の素因などの発病初期における病因や、腸内細菌叢の異常とスモンの病像の進展との関係については現在のところなお不明で、今後さらに検討が進められなければならない。

V 要 約

スモン患者51例について大便細菌叢の検索を行ない、健康人のそれと比較したところ、スモン患者では異常な細菌叢を示す例が著しく多いことが明らかとなった。すなわち、総菌数は、スモン患者では健康人の約 $1/5$ に減少し、Bacteroidaceae、Catenabacterium、Bifidobacterium およびLactobacillus の菌数は約 $1/10$ に減少し、これとは逆に、Streptococcus、Enterobacteriaceae およびVeillonella は2～200倍に増加していた。

さらに、これを大便採取前7日間以内にキノホルム製剤を服用していた群と非服用群とに分けて検討してみたところ、服用群に明らかに異常率が高く、とくにBacteroidaceae、Catenabacterium、Streptococcus およびEnterobacteriaceae などの菌群の菌数における健康人との相違は、非服用群に比べて、さらに著しいことが認められた。一方、Bifidobacterium およびLactobacillus の検出率は、キノホルム服用群の方が低いが、検出例における菌数は、むしろ非服用群より高かった。

文 献

1. 井形昭弘, 高須俊明, 豊倉康夫. (1970)
SMON患者糞便中の緑色物質(予報). 医学のあゆみ 72: 637-638.
2. HAENEL, H. (1965) Gesetzmäßigkeiten in der Zusammensetzung der fäkalen Mikroflora. Eubiose und Dysbiose der menschlichen Darmbesiedlung. Ernährungsforschung 10: 289-301.
3. 光岡知足. (1970) 腸内フローラとその分離法, モダンメディア 16: 171-185.
4. MITSUOKA, T. SEGA, T. und YAMAMOTO, S. (1965)
Eine verbesserte Methodik der qualitativen und quantitativen Analyse der Darmflora von Menschen und Tieren. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 195: 445-469.
5. 高須俊明, 井形昭弘, 豊倉康夫. (1970)
SMON患者にみられる緑毛舌について. 医学のあゆみ 72: 539-540.
6. 吉岡正則, 田村善蔵. (1970) SMON患者の緑色色素の本態. 医学のあゆみ 74: 320-322.

SMON患者の緑尿および緑便に含まれる緑色物質の本態

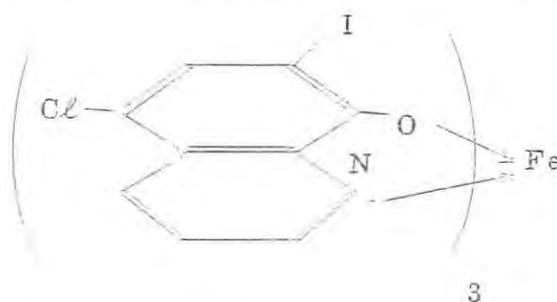
田村善蔵（東大薬学部）

I 緒言

SMON患者の症状悪化時にしばしばみられる緑色舌苔、緑便および緑尿などが臨床において一つのナゾとされていたので、¹⁾ この色素の本態を究明することを目的として以下の実験を行なった。

II 方法と結果

本学医学部 井形博士、三楽病院 長谷部博士より提供された緑尿²⁾（2/3日分）から色素を図1のように精製している際に多量の微黄色結晶AおよびBを得た。このAおよびBは同一物質であり、その融点（175°分解）、元素分析、IR、UVおよびNMR—スペクトルからキノホルムと同定された。キノホルムは Fe^{3+} とキレートを作り緑色を呈すことから色素の本態は



ではないかと考え、これを合成した。³⁾ 合成色素と分離精製した緑色物質を CH_2Cl_2 溶媒でUV—スペクトルを比較すると全く一致した。

またこの合成色素が薄層クロマトグラフィーより精製色素と一致することが確認された。さらに緑便より CH_2Cl_2 抽出した色素とも一致した。（図2）

Green urine (500ml) from a SMON patient

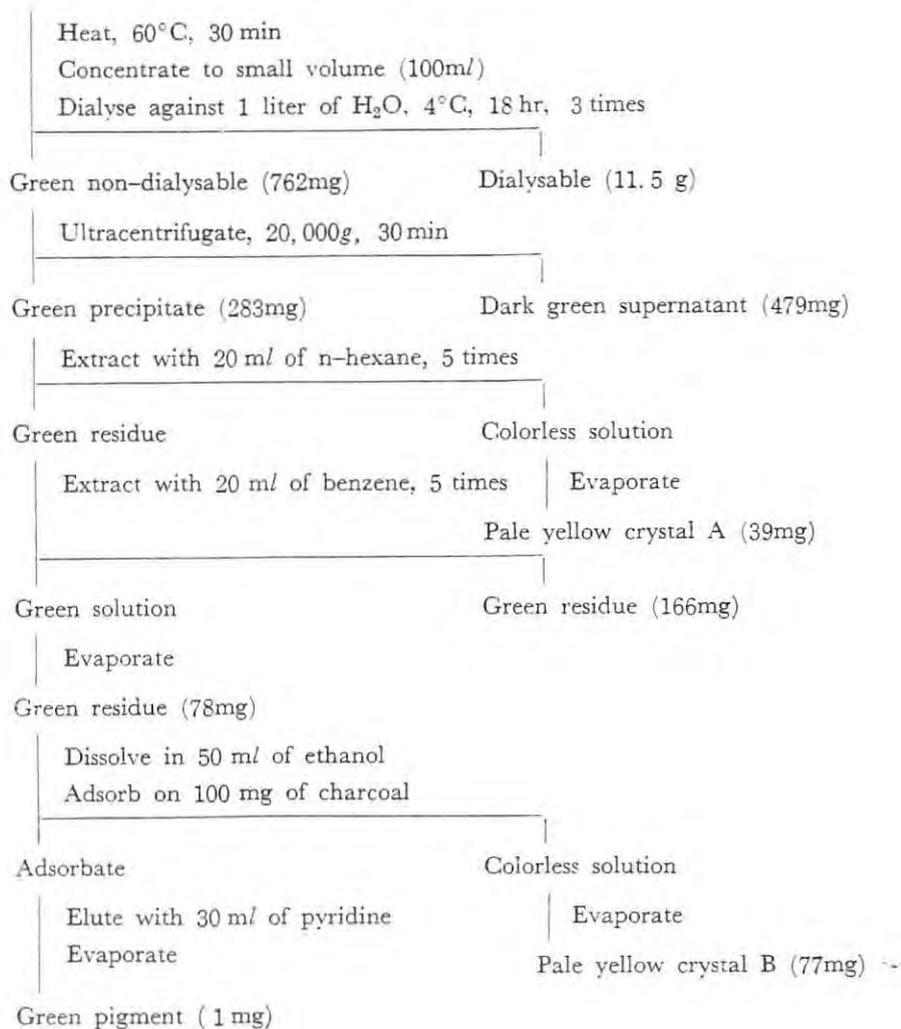


図1 緑尿からの分離

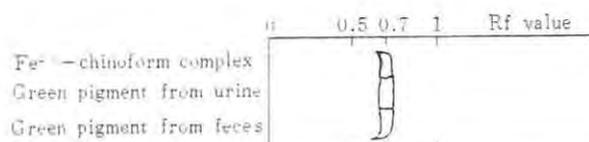


図2 酢酸で展開したシリカゲルG上の薄層クロマトグラム

Ⅲ 考 察

これらの結果より投与薬剤を調べると、キノホルム（1日2g）とフマル酸第一鉄を服用していることがわかった。正常人尿に0.25%キノホルムのメタノール溶液を滴下しても緑色は生じなかった。さらに第二鉄塩を加えたところ緑色となった。したがって吸収されたキノホルムと同じく服用していた鉄剤と反応して尿が緑色を呈したと思われる。

以上、述べた様にSMON患者の尿中にはキノホルムが抱合体としてではなく、鉄キレートあるいは遊離のかたちで多量に（投与量の10%程度）排泄されていたが、この事実はSMONの病因解明に大きな手懸りとなるだろう。

Ⅳ 要 旨

SMON患者の緑尿，緑便に含まれる緑色物質はキノホルムの鉄(Ⅲ)キレートであった。

なお，この緑尿中には多量の遊離キノホルムが排泄されていた。

文 献

- 1) 井形，高須，豊倉：医学のあゆみ，72，539，1970，同，72，637，1970
- 2) 井形，長谷部，辻：日本医事新報，No.2421，P25，1970
- 3) 吉岡，田村：医学のあゆみ，74，320，1970

SMON患者の緑色舌苔からの キノホルムの検出

田 村 善 蔵 (東大 薬学部)

I 緒 言

著者らはSMON患者の緑尿および緑便中の緑色物質がキノホルムの鉄キレートであることを前報で明らかにしたが、舌苔の緑色物質については組織と強固に結合していて溶媒抽出が困難であったため直接証明できなかった。

そこでキノホルムのガスクロマトグラフィー(GC)を検討し、これにより緑色舌苔中のキノホルムの存在を追究した。

II 方法と結果

キノホルムのトリフルオロアセチル(TFA)誘導体、トリメチルシリル(TMS)誘導体およびアセチル(Ac)誘導体の保持時間は表1に示す通りである。本研究においてはTFA誘導体により実際にキノホルムの分析を行ったが、TFA化に際して金属キレートからは金属イオンが脱離し、遊離のキノホルムと同一の誘導体を生じた。

表1 保持時間 (min)

column* temperature- carrier gas	2% OV-1 (1.5m × 4 mm) 170° 60ml/min	2% OV-17 (2 m × 4 mm) 180° 100ml/min	2% QF-1 (1.5m × 4 mm) 150° 60ml/min	2% XF 1105 (2 m × 4 mm) 180° 85ml/min
BHC (i.s.)	5.95	9.15	3.05	2.80
Chinoform-TFA	9.20	13.40	5.06	3.75
Chinoform-TMS	18.85	22.65	5.77	6.50
Chinoform-Ac	19.90	45.50	14.85	8.45

* Glass tube was packed with each stationary phase on Gas-Chrom P (60~80 mesh)

〔操作法〕 キノホルム(約5~50 μg)に酢酸エチル0.1 mlおよび無水トリフルオロ酢酸0.05 mlを加え、1~2 μlを直接ガスクロマトグラフに注入する。

SMON患者の緑色舌苔に含まれる緑色物質はアセトン、ベンゼン、クロロホルム等で抽出されなかったため、緑色舌苔をピリジンに浸し、1週間放置したところ、緑色舌苔が褐色に変わった。そこでピリジン層を減圧乾固し、操作法に従ってTFA化後GCを行うと、2% QF-1および2% OV-

Iのカラムでキノホルムに一致するピークを認めた。(図1参照)。またピリジン抽出後の残渣を酢酸エチルと無水トリフルオロ酢酸によってTFA化しながら抽出するとさらに多量のキノホルムが検出され、2%OV-17, 2%XF-1105のカラムによっても検出された。従って緑色舌苔にキノホルムが含まれることは確実である。

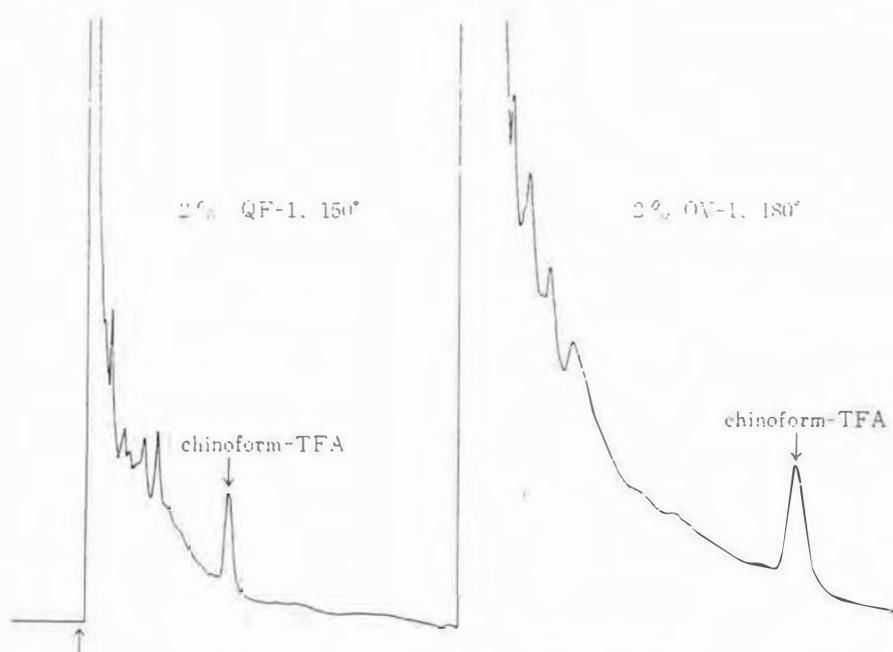


図1 緑色舌苔からのキノホルムの検出 (検出器: 水素炎イオン化検出器)

III 考 察

さきに科学警察研究所の孤塚氏らによってSMONの緑色舌苔中に異常に多量のヨウ素が含まれていることが発見され、¹⁾これがキノホルムであると推定されていたが、上記の実験事実からキノホルムの存在が確認された。従って舌苔中の緑色物質も緑尿や緑便と同様にキノホルムの Fe^{3+} キレートであることが確実となった。²⁾

キノホルムおよび Fe^{3+} キレートがSMON患者の舌苔に蓄積される機構は今後解明すべき問題であろう。

IV 要 旨

SMON患者の緑色舌苔にもキノホルムが含まれていることが判明した。

文 献

- 1) 孤塚寛, 他: 医学のおゆみ, 75, 372, 1970
- 2) 今成, 田村: 医学のおゆみ, 75, 547, 1970

生体組織よりキノホルム検出の試み

— 螢光比色法その他一、二の方法 —

上田喜一，河合正計，前橋浩，矢崎武，
山中すみへ（東京歯科大学衛生学教室）

I 実験計画

SMONの病因としてキノホルムが疑われる以上、この物質またはその代謝物質が神経組織に存在することを定量的に検出し、症状の重さと濃度とを関連づけることが必要である。さらに病理組織学的に特有の病変部位に高濃度に局在することを証明できればさらに確実となるであろう。

8-オキシキノリンは各種金属の螢光分析用試薬としてオキシンの名で実用化されている。キノホルム（5-クロル-7-ヨード8-オキシキノリン）も当然このような性質を有すると考えられる。ヨウ素のような重ハロゲンの導入は螢光度を減少させるといわれるが、この点はキレートさせる金属の選択により打消す方針をとった。

今回は予備試験として、ラットおよびマウスの経口亜急性中毒実験時の脳、脊髄、肝、腎について検出の可能性を検討した。

組織内局在性については螢光顕微鏡による組織化学的検出を試みた。

また物理学的組織化学法としてエレクトロンプローブマイクロアナライザーの応用も試みた。

ガスクロマトグラフ法では水素炎イオン化検知器に比較して数百倍ないし千倍の高感度であるとされる電子捕獲型検知器（エレクトロン・キャプチャー・デテクター）を応用してみた。

II 実験方法

1) キノホルムとキレートする金属の中で、螢光が強く、しかも溶媒抽出が可能であるものを選び出す目的で、オキシンに関する研究報告^{1) 2)}から類推し、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Y^{3+} 、 La^{3+} 、 Zr^{4+} を選んだ。ガスクロマト法にも応用する関係からベンゼンを抽出溶媒とする予定なので、上記キノホルム錯塩のベンゼン溶液中の励起波長、螢光波長、螢光度を日立螢光光度計により測定した。

2) 中毒動物

皮下或は筋注投与も試みたが、剖検時に注射局所に残留する濃厚キノホルムによる汚染を生じたので、経口投与方法を採用した。

どんりゆう系ラット（体重100～150g）にキノホルム（田辺製薬呈供）懸濁液を胃内に強制投与した。

亜急性中毒とし、薬量レベルは1000 mg/kg, 450 mg/kg群は2日間隔で計4回、150 mg/kg, 50 mg/kg群は連日10日間経口投与した。

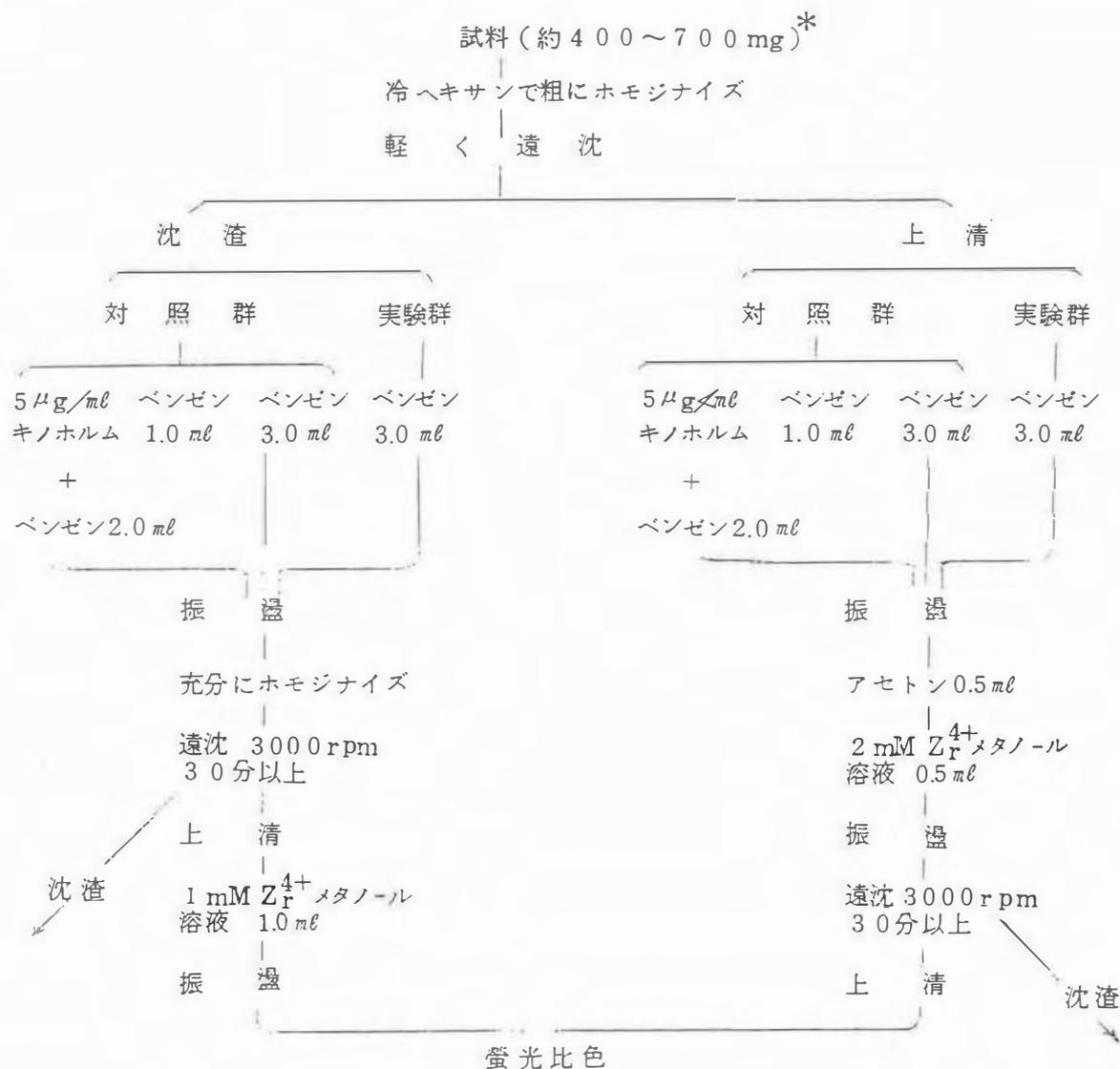
3) 組織からの抽出および蛍光比色

クロロホルム抽出も可能であるが、ガスクロマトグラフ用試料と兼用の場合不都合であるので、ベンゼンを採用した。

対照群の組織も相当程度の盲蛍光を呈するので、対照群の数匹からのそれぞれの組織を混合平均し、これにキノホルム標品一定量を添加して内部標準を毎回作製し、蛍光比色の基準とした。

抽出の操作を図式で示した(表1)。蛍光比色は八木式微量蛍光光度計(UM-S型)を使用し、励起光選択フィルターUV-V₁, 励起光遮断フィルターUV-O₁, 蛍光選択フィルターFL-B₂を選んだ。

表 1



* 対照群試料は、数匹分の試料を磨砕し、これより検体相当重量をとり、平均された対照として使用する。但し通常内部標準法をとるから対照群は2倍量を使用する。

III 実験成績

1) 標品ジルコニウム・キノホルム錯塩はベンゼン中で励起波長386 mμで最強の蛍光(波長520 mμ)を示し、検出限度は0.01 μg/mlで、後述のガスクロマトグラフ法より50倍程度高感度であった。0.1~0.2 μg/mlの範囲でほぼ直線性が得られた。

2) 実験動物組織濃度

中毒動物はいずれも中毒神経症状を示さなかった。

測定値は表2に示すように個体差による変動が大きい、1000mg/kg群では全8例に定量可能な値が示され、450mg/kg群では測定限界以下(検出せず=N.D)の例が現われ、それ以下の薬量レベルでは測定可能な例数の方が少ない。

表2 ラット経口投与による組織キノホルム量

	1000 mg/kg 2日間隔4回投与	450mg/kg 2日間隔4回投与	150mg/kg 連日投与10回	50mg/kg 連日投与10回
脳 μg/g 脳重量	0.78 0.28 0.14 0.35 0.50 0.32 0.36 1.6 n = 8 mean 0.54 median 0.53	0.64 0.07 0.1 N.D 5 samples n = 8 mean 0.27 median 0.1	0.15 N.D 7 samples n = 8	0.15 N.D 7 samples n = 8
脊髄 μg/g 脊髄重量	1.7 2.8 2.9 3.7 n = 4 mean 2.8 median 2.9	3.2 1.2 2.2 N.D n = 4 mean 2.2 median 2.2	0.13 0.43 N.D N.D n = 4 mean 0.28	0.55 N.D N.D N.D n = 4

注：脊髄は半数をガスクロマト法の試料としたので例数が少くなる。

N.D = non-detectable

脳と脊髄では、常に後者の濃度が高く、1000 mg/kg群では450 mg/kg群と比較して脳内濃度は2倍程度高いが、これを体重kg当りキノホルム1g投与の場合に換算すると表3に示すようにほぼ等しい値となり、総投与量に比例することを意味する。

脊髄では450 mg/kgの方が投与量に対して高能率に組織に移行していて、脳：脊髄の比は高濃度群では1：5であるのに、450 mg/kg群では1：8になった。

しかし脊髄はガスクロ用試料としてサンプル数が半減しているため統計的信頼度が少なく、また450 mg/kg群では検出不能個体が含まれるので公平な平均とは言えないであろう。

表3 投与量と組織濃度との関係

A. 1000 mg/kg 2日間隔 4回経口投与の場合			
脳	0.14 $\mu\text{g/g}$	脳重量	/Chinofom g/kg体重
脊髄	0.7 $\mu\text{g/g}$	脊髄重量	/Chinofom g/kg体重
B. 450 mg/kg 2日間隔 4回経口投与の場合			
脳	0.15 $\mu\text{g/g}$	脳重量	/Chinofom g/kg体重
脊髄	1.2 $\mu\text{g/g}$	脊髄重量	/Chinofom g/kg体重

IV 考 察

本実験に使用した抽出法でキノホルムが組織から完全に抽出されたかどうかの検討は不十分である。グルクロナイド型, MgまたはFeとのキレートは抱合の解離, pHの調整, 或は Zr^{4+} を直接試料に作用させるなどの検討を加えなくてはならないと考えられる。

蛍光法は高感度であるが, 波長に特異性が少いので盲蛍光が高い欠点を免れない。これに打勝つためには他の分離法を前処理として併用する必要がある。

これらの諸点を改良した後, 患者試料に応用したいと考える。

V その他の検出法

1) キノホルムの組織化学(蛍光)的検出の試み

クリオスタットによる凍結切片をアルコール液で脱水, Zr^{4+} メタノール溶液(20 $\mu\text{g}/100\text{ml}$)に10分間浸し, 無蛍光グリセリンで封入し蛍光顕微鏡で検鏡した。(励起波長365 $m\mu$)。

キノホルム結晶粉末は強い蛍光を発するが, 中毒動物の臓器では肝の血管壁にのみ蛍光物質の沈着を認めたが, 対照群にも類似所見が認められたので, 他の物質と考えられる。腎, 脊髄では強い蛍光を認めず, 現在のところ満足すべき成績を得られなかった。

2) エレクトロン・プローブ マイクロアナライザー(E.P.M.A.)の応用

キノホルム分子中にヨウ素を含有することに着目して, ヨウ素の甲状腺以外の組織に分布すること, ことに局在性を証明すれば組織化学的証明になると考え, 当大学設置の日立XMA-5型を利用した。

ヨウ素の特性X線波長 $L\alpha = 3.14 \text{ \AA}$ であるが, キノホルム標品について波長検査を行うと, この波長で最大特性X線強度を得た。

1000 mg/kg投与群ラットの脊髄を10%ホルマリンに固定した後, クリオスタットで凍結切片(約20 μ)を作製した。検出操作としては, 試料にアルミニウム蒸着を施し, 波長を3.14 \AA に固定して線分析および面分析を行った。脊髄の白質部および灰白質部について, 検出操作を行ったが, いずれからも陽性所見は得られなかった。

EPMAによる検出には相当高濃度の存在が必要なこと，代謝によりヨウ素が離脱している可能性（スイスの文献記載），試料作製法の不完全などの種々の条件の検討が完了していないが，濃度不足が最大原因と考えられる。一応中間報告として経過を報告する。

3) ガスクロマトグラフ法

すでに田村らは，キノホルムを沸点の低いトリフルオロ酢酸エステルとしてガスクロ測定（水素イオン化検知器）が可能なことを報告したが，私共は電子捕獲能の大きいヨウ素の分子内存在に着目して，electron capture detectorによる直接ガスクロ分析を試みた。

ガスクロ条件：充填剤 2% DEGS + 0.5% リン酸，担体 Chromosorb WAW, HMDS, ガラスカラム， $\phi 4\text{ mm} \times 1.5\text{ m}$ ，温度 注入部 172° ，カラム 182° ，検出器 200° ，キャリアガス N_2 25 ml/min

キノホルム標品では $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ ベンゼンまで検出可能であったが，生体試料では $2.5\text{ }\mu\text{g/g}$ 程度の検出感度であった。

上記中毒ラットの組織抽出液では 1 例を除き検出不能で，再現性が低かった。これは濃度の点で当然の結果と考えられ，さらに抽出法の改良，抽出液の濃縮の検討が必要であろう。

VI 要 旨

キノホルムが金属蛍光分析試薬オキシンと類似構造を有することに着目し，その金属キレートを検討しジルコニウム（Zr）錯塩が最も蛍光が強いことを見出した。

被検中毒ラットはキノホルム懸濁液を胃内に強制注入した。そのレベルは 1000 および 450 mg/kg ，2 日間隔 4 回の 2 群， 150 および 50 mg/kg ，連日 10 日間の 2 群。

臓器組織はヘキササン抽出沈渣を少量のベンゼンで抽出，Zr-メタノール溶液と反応させ，微量蛍光度計で定量した。盲蛍光が高いので対照群の数匹から得た該当臓器のヘキササン抽出残渣に一定量のキノホルムを添加して内部標準として定量の基準とした。

その結果，最高濃度群の脳 $0.54\text{ }\mu\text{g/g}$ ，脊髄 $2.8\text{ }\mu\text{g/g}$ ， 450 mg/kg 群ではそれぞれ $0.27\text{ }\mu\text{g/g}$ および $2.2\text{ }\mu\text{g/g}$ を得たが，このレベルでは脳 8 例中 5 例，脊髄 4 例中 1 例の検出不能例があり，さらに低濃度投与群では検出可能例の方が少なくなった。

今回の抽出法では組織存在量の一部しか抽出し得ないという疑があるが，この成績から脊髄には脳の数倍の高濃度に移行することが示された。

同一方法で直接に組織蛍光化学的検出を試みたが成功しなかった。

エレクトロンプローブ マイクロアナライザーによりヨウ素の特性 X 線波長 3.14 \AA で中毒ラットの組織切片から非破壊的組織化学的検出を試みたが，線分析でも面分析でも陰性所見しか得られなかった。

電子捕獲型検知器を具えたガスクロマトグラフによるキノホルム検出感度は，標品では $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$

ベンゼンであったが、生体試料からの検出感度は $2.5 \mu\text{g/g}$ 程度で、上記中毒ラットの脳、脊髄からは1例を除き、検出不能であった。

文 献

- 1) 西川泰治，重松恒信：無機けい光分析に用いられる有機試薬(1)，ドータイトニュースレター，17(2)，2～10，1969
- 2) 西川泰治：蛍光分析法に関する研究(第10～11報)，オキシン金属錯塩の蛍光特性とその蛍光分析法への適用性について，日本化学雑誌，79，1003-1007，1958
- 3) 今成登志男，田村善蔵：SMON患者の緑色舌苔からのキノホルムの検出。医学のあゆみ，75，10，547-548，1970

キノホルムグルクロナイドの合成 およびその性状

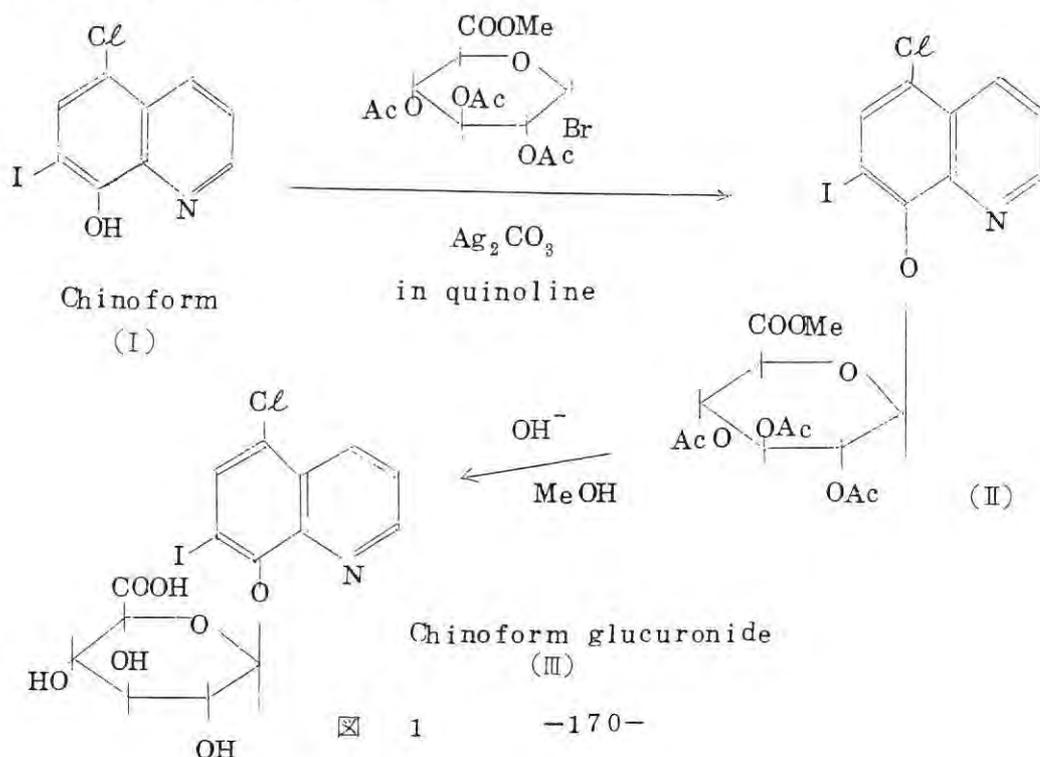
田 村 善 蔵 (東大 薬学部)

I 緒 言

キノホルムの抱合体の定量法を確立するため、およびその生体に対する作用を調らべるためにキノホルムのグルクロナイドの合成を試みた。従来Haskinsら¹⁾によってキノホルム投与ウサギの尿中より粗なグルクロナイドが分離されているが、いまだ純粋な結晶として分離されていない。

II 合 成²⁾

図1のような経路に従って合成した。すなわちキノホルムとアセトブromグルクロン酸メチルエステルを炭酸銀および焼石膏の存在下キノリン中で24~48時間室温で反応させ40~50%の収率で縮合物(II)を針状晶として得た。融点213~214°, $[\alpha]_D^{25} -5.0^\circ$ (C=0.35 dioxane), UV $\lambda_{\max}^{\text{dioxane}}$ $m\mu$ (ϵ): 250(32,300), 305(4,260)。元素分析:理論値C, 42.50; H, 3.40; N, 2.25, 実測値C, 42.34; H, 3.28; N, 2.27%。マスペクトル: M^+ 検出されず, $M - \text{AcOH}$ (562 m/e)。キノホルム (305 m/e), グルクロン酸部分 (317 m/e), 沃素 (127 m/e), アセチル (43 m/e) を検出する。



縮合物Ⅱをメタノールに懸濁し氷冷下1N NaOHを加え保護基を加水分解し、カチオン交換樹脂カラムを通し、水洗した後、樹脂に吸着したグルクロナイドをピリジン-水(1:9)で溶出し、キノホルムグルクロナイドを80~90%の収率で得た。NaOHの代りに当量のBa(OH)₂メタノール溶液を氷冷下加え一夜氷室に放置した後当量のシュウ酸を加えpH約4にし沈澱物を除去し母液を濃縮し、クロロホルム抽出した残渣をアセトンで熱時抽出を行い同様な収率でキノホルムグルクロナイドを得た。白色針状晶、融点176~177°(分解)、 $[\alpha]_D^{21} -11.4^\circ$ (C=0.22, MeOH), $UV \lambda_{max}^{MeOH} m\mu$ (ϵ): 250(31,900), 305(4,470)。元素分析:理論値C, 37.41;H, 2.72;N, 2.91, 実測値C, 37.50;H, 2.73;N, 2.94%。

Ⅲ 一般的性質

キノホルムグルクロナイドはメタノールに比較的よく溶解する。熱水にも溶解し、冷却するとゲル状になる。アルカリによく溶解する。エタノール、アセトンに難溶であるが加熱すれば溶解する。ベンゼンあるいはクロロホルムに不溶であるので遊離のキノホルムとはベンゼンあるいはクロロホルム抽出で分離できる。

またキノホルムグルクロナイドは遊離キノホルムのようなキレート性はない。

Ⅳ ガスクロマトグラフィー

イオン交換樹脂、ポリスチレン樹脂などで選択的に生体中からキノホルムグルクロナイドを分離し、ジアゾメタンでカルボキシル基をメチルエステルに導き、ついでピリジン中へキサメチルジシラザンとトリメチルクロシランでトリメチルシリル化し、2% QF-1または2% OV-1, 220°の条件でガスクロマトグラフィーを行えば単一なピークとして分析できる。なおこの分析方法について検討中である。

Ⅴ β-グルクロニダーゼによる加水分解

0.1 M酢酸緩衝液(pH 4.63), 38°で牛肝β-グルクロニダーゼ(東京臓器:100倍稀釈)と基質複合体の解離定数K_mを測定し比較的加水分解されやすいフェノールフタレインモノグルクロナイド(PMG)と比較した。遊離したキノホルムはALキレートとし蛍光法で測定した。PMGより加水分解を受けやすい(図2)。

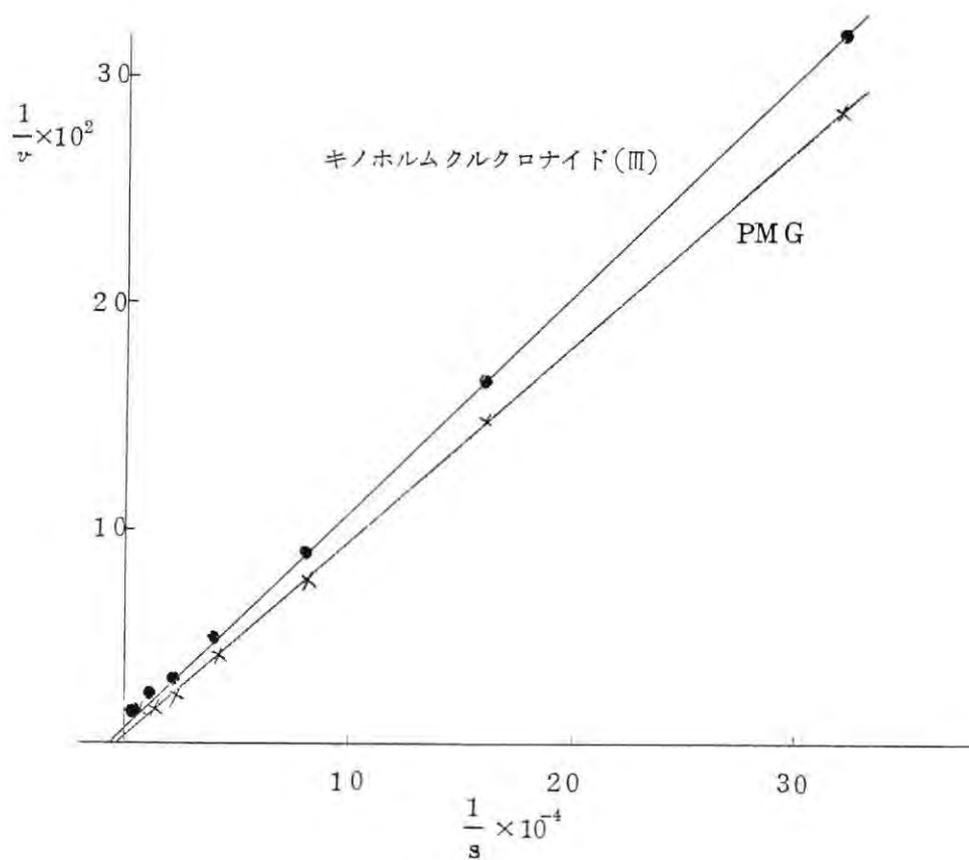


図 2

VI 要 旨

キノホルムのグルクロナイドを合成した。グルクロナイドは水にとけるが、キレート生成能を欠き、 β -グルクロニダーゼで比較的容易に加水分解される。

文 献

- 1) W. T. Haskins et al.: J. Pharmacol. Exptl. Therap., 109, 201, 1953.
- 2) I. Matsunaga et al.: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 19, 1971, in press.

血清中の非抱合型キノホルムの定量

田 村 善 蔵 (東大 薬学部)

I 緒 言

キノホルムと SMON 発症との関連が注目され、疫学的調査が進められている現在、キノホルムの生体内に於ける動態を研究することは重要である。経口投与された適量のキノホルムは肝で抱合され水溶性となつて速やかに尿中に排泄されるといわれている。しかし著者らはすでにキノホルムを投与された患者の尿から遊離のキノホルムまたは鉄キレート を証明しており、これらのことは大量投与あるいは何らかの原因によって抱合能を上まわるキノホルムが吸収されると、遊離のキノホルムが血中をまわる可能性を示しており、これは脂溶性であり、しかも Fe, Co, Cu, Zn 等多くの金属イオンとキレートを生成する能力を持つためにその生体における影響は重大であろう。即ちキノホルムの急性毒性および SMON との関連は生体内におけるこれらの非抱合型のキノホルムの存在を考慮することなしには論じられないだろう。そこで著者らはウサギにキノホルムを経口投与し、血清中の非抱合型活性キノホルムを測定することを試みた。

II 方 法

ウサギの耳静脈より約 2 ml をヘパリンで潤した注射器を用いて採血し、分離した血清 1 ml に氷冷下 10% TCA 1 ml, ベンゼン 4 ml および内部標準物質として γ -BHC 10 μ g を含む酢酸エチル 0.1 ml を加えよく振とうする。これを遠心分離してベンゼン層をとり、水洗した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧乾固する。次に酢酸エチル 0.1 ml および無水トリフルオロ酢酸 0.1 ml を加え TFA 化し、ガスクロマトグラフに注入する。ピーク高比から定量を行なう。添加回収実験の回収率はほぼ 100% であった。

III 結 果

図 1 の如くキノホルム投与ウサギの血中非抱合型のキノホルムが存在することが認められた。なお同様の方法によって、それらの尿および胆汁からも非抱合型のキノホルムが検出された。

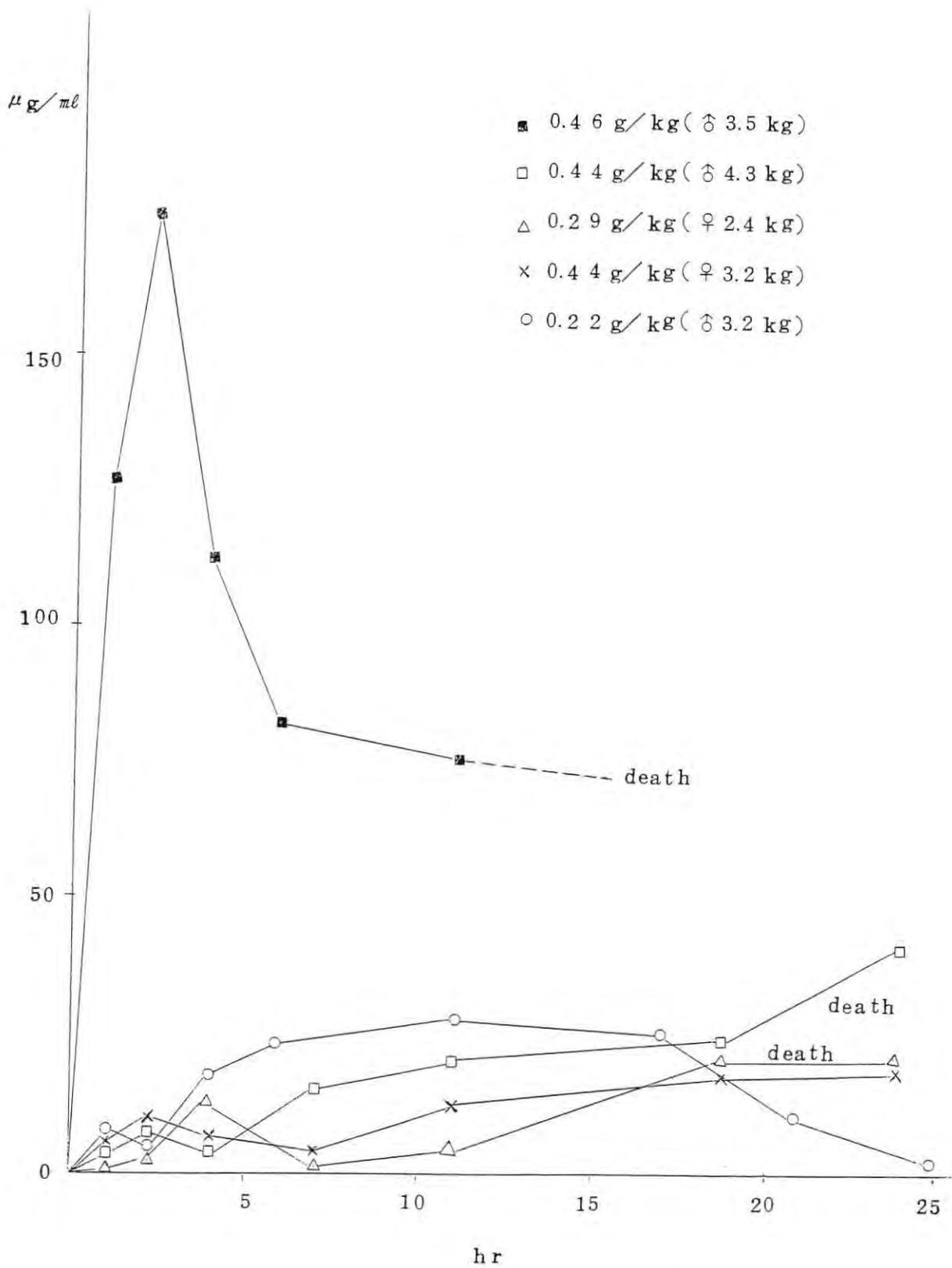
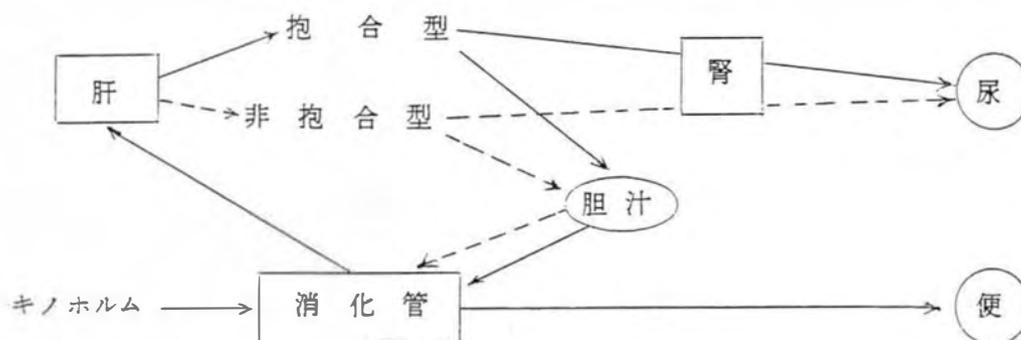


図1 キノホルム経口投与後の家兎血清中の非抱合型キノホルム

IV 考 察

これまでの知見を総合するとキノホルムの主な代謝排泄経路はつぎのようになる。



図の実線は従来から知られていた系路であり，点線はキノホルムを投与された患者の尿および抱合能を上まわる量のキノホルムを投与されたウサギの血清，尿，胆汁を用いて著者らが実証したものである。しかしこの測定法で抱合体の一部が遊離型として測り込まれる可能性が残るので，今後キノホルムのグルクロナイドおよび硫酸エステルを合成し，これらを含めて信頼性の高い分析法を確立して行く必要がある。

V 要 旨

抱合能を上まわる量のキノホルムが消化管から吸収されると非抱合型のキノホルムが体内を廻り，胆汁や尿に排泄されることがわかった。

生体試料からの非抱合型キノホルムの微量分析

田 村 善 蔵 (東大 薬学部)

I 方法の検討

1. ガスクロマトグラフィー (GC) による分析

微量のキノホルムを分析するために検出器には特異性および感度に優れた ECD を使用した。次にキノホルムとその関連化合物についてアセチル (Ac) 体, メチル体 (Me) 体を調製し, GC の条件を設定した。(表 1) 実際の分析にあたっては, 主として Ac 体を用いた。また, キノホルムを定量する場合は 5, 7 - di - Cl - 8 - hydroxyquinoline を内部標準物質として 0.1 ~ 3 μ g の範囲で良好な検量線が得られた。

表 1 RELATIVE RETENTION TIMES

condition		2%XF-1105	10%SE-52	2%OV-17	2%QF-1
		190°	190°	190°	150°
8-hydroxyquinoline		50ml/min 1.5mx0.4mm	85ml/min 1.5mx0.4mm	65ml/min 2.0mx0.4mm	50ml/min 1.5mx0.4mm
5-chloro-	Ac	0.66	0.64	0.66	0.71
	Me	7.50	0.50	0.48	0.41
5,7-dichloro-	Ac	1.00*1	1.00*2	1.00*3	1.00*4
	Me	0.63	0.68	0.56	0.42
5,7-dibromo-	Ac	2.01	2.03	2.35	2.02
	Me	1.27	1.36	1.31	0.80
5-chloro-7-iodo-	Ac	2.08	2.13	2.55	2.09
	Me	1.31	1.44	1.38	0.81

The retention times for *1, *2, *3 and *4 are 4.7, 3.3, 9.8 and 11.5 min respectively.

2. アルミナによる吸着および溶出

生体試料中のキノホルムを分析するためには, 前処理法の検討が重要であり, 著者らはアルミナによ

る特異的な吸着および溶出を検討した。

a 吸着

キノホルムの溶液にアルミナを加え振盪するとキノホルムを完全に吸着し、有機溶媒中でこのアルミナに紫外線をあてると黄色の蛍光を発する (Feigl: Spot Tests)。特にアセトン、酢酸エチル中での蛍光は目による鑑別に感度がよい。20~30 mg のアルミナを用いれば絶対量 0.3 μ g の検出も可能であり、スクリーニングテストとして役立つ。

b 溶出

一旦アルミナに吸着したキノホルムは種々の有機溶媒で溶出されない。アルミナの溶解を最少限におさえ、キノホルムを能率よく溶出する条件を検討した結果、NaF 溶液を加え、よく振盪した後、ベンゼン抽出を行なう方法を見出した。

3. 生体試料からの抽出

キノホルムは生体試料中の高分子物質に強く吸着される傾向がある。そこで抽出方法を種々検討した結果、溶離剤としてピリジン、抽出剤としてベンゼンを用いる方法が最良であった。

以上、検討の結果より図 1、図 2 に示す分析操作法を設定した。

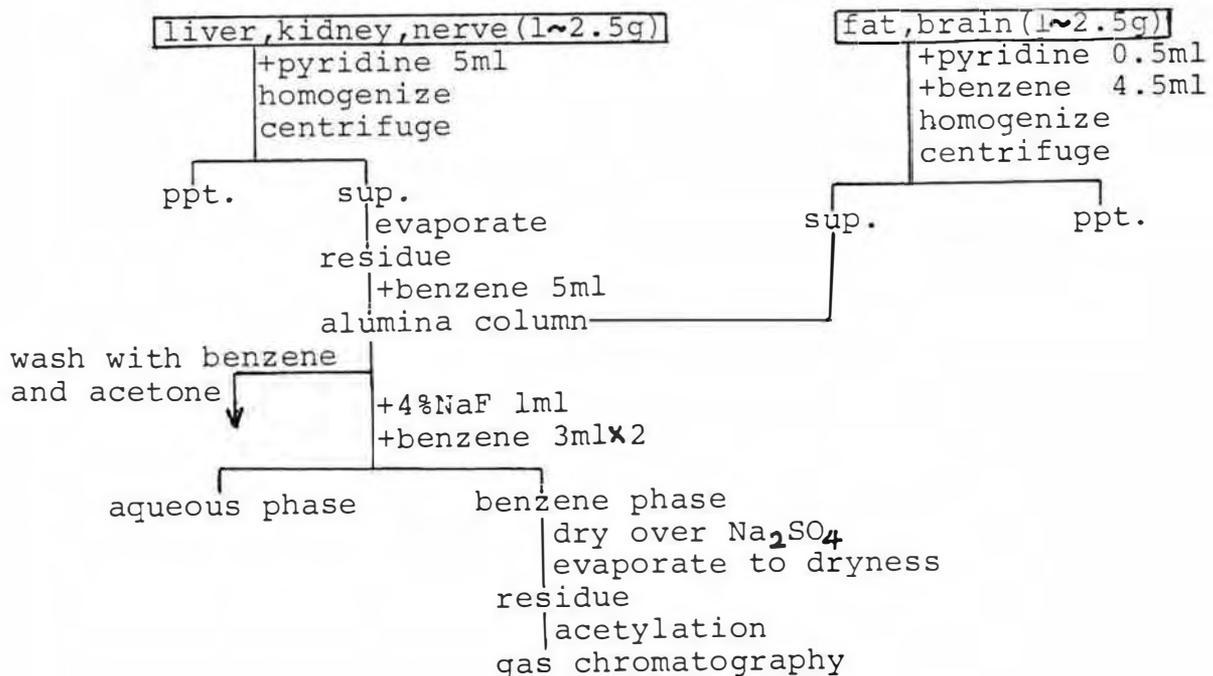


図 1

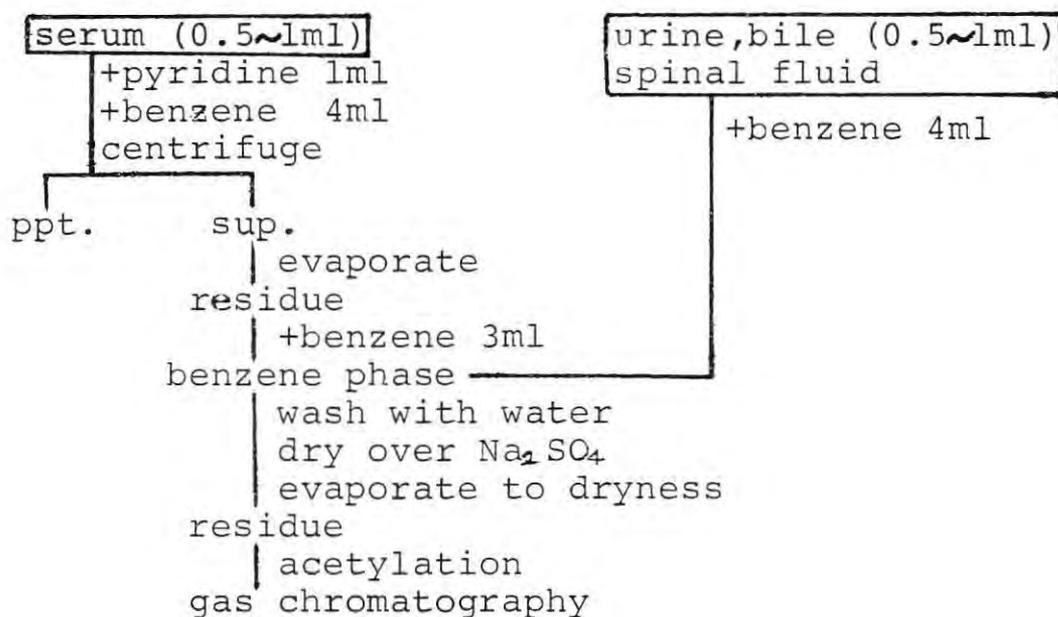


図 2

III 考 察

臓器および組織の分析に関しては本法はまだ半定量法の段階で、肝および脂肪をホモジナイズした試料にキノホルムを添加し、回収率を調べると30~40%であった。今後試料からの抽出率、アルミナへの吸着、溶出の条件等を検討して定量法にまで発展させる計画である。

IV 要 旨

生体試料からピリジンとベンゼンを用いて非抱合型キノホルムを抽出し、アルミナに吸着させて洗った後、NaF水溶液で溶出し、アセチル体としてガスクロマトグラフィーを行なう方法を開発した。

SMON患者の臓器および組織へのキノホルムの貯留について

田村善蔵(東大・薬学部), 豊倉康夫(東大・医学部)

I 緒言

投与されたキノホルムがどのように体内に貯留するかを見るためにウサギにキノホルムを経口投与し、前報で開発した微量分析法を用いて各臓器への沈着および貯留を調べた。また長期間キノホルムを服用し、中止後しばらくして死亡したSMON患者の各臓器および尿中からキノホルムの検出を試みた。

II 方法と結果

まず、ウサギに各々200 mg/kgのキノホルムを1回経口投与後、3日および2.5ヶ月後における各臓器および体液中の非抱合型キノホルムを分析した(表1)。

Period after CF Administration	liver μg/g	fat μg/g	brain μg/g	nerve μg/g	serum μg/ml	bile μg/ml
3 days	>5	>5	>1	N.D.	1.4	>5
2.5 months	N.D.	>0.1	N.D.	N.D.	0.03	N.D.

N.D.: not detected

表1 キノホルム経口投与(200 mg/kg)後のウサギの各種臓器及び体液中への貯留

肝, 脳, 胆汁には3日後ではキノホルムが検出されたが, 2.5ヶ月後では検出されなかった。これに対して脂肪, 血清では2.5ヶ月後でも検出された。神経は坐骨神経を用いたがいずれからも検出できなかった。今後キノホルムの投与量を変えたり, 連続投与した場合の貯留を検討する必要がある。

次にSMONで死亡した3例の患者の臓器を分析した(表2)。肝では3例中, 全例に微量のキノホ

ホルムを検出した。これらの患者には通常の臨床検査では肝障害は認められないが、このような患者の肝にも微量のキノホルムが貯留することが判明したので、これが肝機能に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。またこの3例の腎からはキノホルムを検出できなかったが、井形らは腎障害を伴ったSMON患者に多量のキノホルムの貯留を認めている。脂肪は腸管のまわりのものを用いたが3例全部から検出された。ウサギの実験でも見られたこの事実はキノホルムが脂肪に富んだ臓器や組織に長期間貯留することを推定させる。神経では患者1の坐骨神経のみから確実に証明されたが他の2例では検出できなかった。

($\mu\text{g}/\text{g}$)

Patient	Period after CF Treatment	liver	kidney	fat	nerve
1	9 months	>0.5	N.D.	>0.3	>0.1
2	3 months	>0.05	N.D.	>0.05	N.D.
3	1 month	>0.05	N.D.	>0.05	N.D.

N.D. : not detected

表2 SMON患者の各種臓器へのキノホルムの貯留

患者1はしばしば再燃をみた例であるが、死直前再燃時の尿中から抱合型を含めてTotalで約 $0.03\mu\text{g}/\text{ml}$ のキノホルムを検出した。その他、2例のSMON患者の尿についても調べたが検出できなかった。

以上、非抱合型キノホルムがSMON患者の体内に長期間貯留していたことを明らかにしたがこの事実がスモン発症との関連を考える上で一つのカギとなる可能性がある。

III 要 旨

キノホルム投与を中止9ヶ月後に死亡したSMON患者の肝、腸管の脂肪および坐骨神経からそれぞれ $0.5\mu\text{g}/\text{g}$ 、 $0.3\mu\text{g}/\text{g}$ 、 $0.1\mu\text{g}/\text{g}$ 以上のキノホルムが検出された。なおこの患者の再燃時の尿に微量の抱合型キノホルムが含まれていた。

SMON患者のイソケトピン酸負荷試験

田村善蔵（東大・薬学部），豊倉康夫（東大・医学部）

I 緒 言

イソケトピン酸（Isoketopinic acid，以下 Iso と略）は Vitacampher の代謝物で人に経口投与した場合，大部分は肝でグルクロン酸抱合を受け（Iso-G）一部はそのまゝ尿中に排泄される。したがって Iso を投与後尿中に排泄される Iso-G および Iso を測定すれば肝のグルクロン酸抱合能が測定でき，これが一種の肝機能検査法として利用される可能性があり，東大・薬・分析化学教室と東大・医・第一内科とが協力してこの方法の有用性を検討中である。

今回は SMON 患者のグルクロン酸抱合能を調べる目的で 10 例に対して本負荷試験を実施した。

II 方 法

1. 実施要領

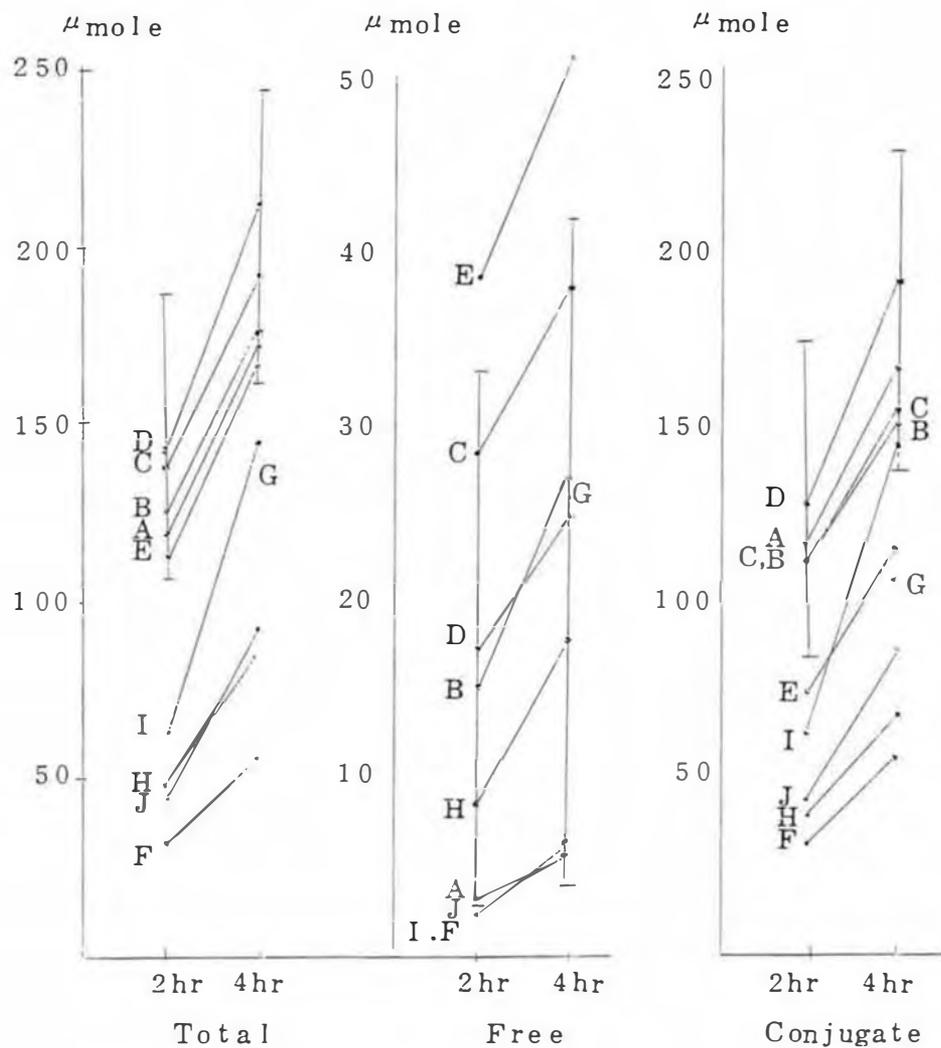
早朝空腹（午前 7 時頃）に Iso と重そうを混合した試薬（Iso 300 μ mole, NaHCO₃ 50 mg）を水 50 ml に溶解して患者に飲ませる。患者の摂取水分量が制限されていなければ，さらに適当量の水を飲ませる。投与後 2 および 4 時間目の尿を正確に尿コップにとる。

2. 分析法

a) Free Iso : 尿 1 ml を共栓つき 10 ml の遠沈管にとり，10% HCl 3 滴を加え酸性とする。これに内部標準物質である cinnamic acid クロロホルム溶液（148.2 mg/100 ml）0.2 ml を加え，さらにエーテル 4 ml を加えて 2 回抽出する。エーテル層を芒硝で乾燥後，ジアゾメタン・エーテル溶液を加えメチル化し，乾固後アセトン溶液としてガスクロマトグラフィー（条件：5% Neopentylglycol succinate (1.5 m \times 4 mm)，160 $^{\circ}$ ，N₂ 60 ml/min，HFID）を行なう。Iso と Cinnamic acid のピーク高比を求め，あらかじめ作製した検量線によって Iso の量を算出する。

b) Total Iso : 尿 1 ml をとり 1 N NaOH 3 滴を加え 70 $^{\circ}$ ，10 分間加温する。冷後これに 10% HCl 6 滴を加え酸性とした後 a) と同様に操作する。

c) Conjugated Iso : Total Iso と Free Iso との差を Conjugated Iso とする。



健常者の平均値 $\pm 2\sigma$

図

III 結果と考察

表に示すように SMON 患者 10 例の殆どが他の肝機能検査で正常と見なされるにも拘らず本負荷試験では健常者との間に有意の差が認められた。この実験結果からだけでは、これらの SMON 患者が先天的にグルクロン酸抱合能が低かったものか、キノホルムの服用によって抱合能の低下を来たしたものであるかの結論を出すことは出来ない。また消化管の吸収異常も考慮に入れる必要もあるので、今後これらの問題点を解明してゆく計画である。

患者	性	年齢	GOT	GPT	AL-P	膠質反応	⊕中止後 期 間	その他
A	♂	45	22	22	5.7	—	6ヶ月	中等症
B	♂	28	18	16	5.7	—	6ヶ月	〃
C	♀	39	29	27	3.2	—	約 3ヶ年	やゝ重症
D	♀	37	22	22	2.4	ZS 6	5ヶ月	〃
E	♀	34	30	28	4.4	ZS 12 T 6	9ヶ月	重症
F	♂	33	9	16	3.2	ZS 7 T 3	4ヶ月	人工肛門
G	♀	65	15	8	7.0	ZS 4.1 T 1.1	約 2ヶ年	失明
H	♀	65	30	9	6.0	ZS 4.2 T 1.0	6ヶ月	重症失明
I	♀	58	30	19	18.8	ZS 16	8ヶ月	軽症
J	♀	65	31	22	5.0	ZS 3	約 1 2ヶ月	軽症

AL-P < 10, ZS < 12, T (Thymol) < 4 が正常

表

IV 要 旨

早朝空腹時イソケトピン酸 300 μ mole を経口投与し、2時間および4時間までに尿中に排泄されるイソケトピン酸グルクロナイドの量を測定するとSMON患者10例中5例は健常者の平均値 $\pm 2\sigma$ より低値を示した。

マウスの抗ヒツジ赤血球抗体産生 に及ぼすキノホルムの影響

松橋 直，渡辺 貞，芳賀邦夫，臼井美津子，成内秀雄（東大医科研）

キノホルム製剤をウサギ，イヌ等に投与することにより，SMON類似の症状をひき起こすことが井形ら，俵らによって報告されているが，マウスを用いて，我々も検討し，同時にヒツジ赤血球に対する抗体の産生におよぼす影響について検索を行った。その結果は，我々が用いたキノホルム剤投与量では，SMON様症状をうることはできなかったが，抗ヒツジ赤血球溶血素の産生を抑制する例がかなりの高頻度に出現するので，以下に報告する。

I 実験材料と方法

1. キノホルム製剤：腹腔内あるいは静脈注射には，エンテロビオホルム（チバ薬品）を使用し，経口投与にはキノホルム（岩城薬品）を使用した。
2. マウス：表1に示すようにDDD系またはDDN系を使用し，大部分は雌を使用した。
3. 投与方法
 - a 腹腔内あるいは静脈注射：0.3mlの食塩水にエンテロビオホルム0.9mg、あるいは，0.3mlの食塩水にエンテロビオホルム0.9mgとアリナミン0.2mgを含むように調製し，オートクレイブで15分間滅菌し，体温に近い温度に保ち，よく混和して注射を行なった。
 - b 経口投与：カルボキシメチルセルロースの0.5%溶液0.2mlにキノホルム剤を3mg，2mg，および1mgを含むよう調製し，投与した。
4. ヒツジ赤血球の注射：ヒツジ赤血球を無菌的に滅菌生理食塩水で洗浄し，20%の浮遊液を作り，0.1mlをマウスの腹腔内に注射した。
5. 採血：採血は，20%ヒツジ赤血球浮遊液0.1mlを腹腔内に注射後，4日目，6日目，8日目，および，11日目に1部採血を行ない実験に使用した。なお，第2回注射では，抗原注射前，1日目，および，3日目に，1部採血を行なった。
6. 溶血素価の測定
 - a 抗血清：10倍より倍数稀釈を行なった。
 - b 緩衝液：GVBを使用した。
 - c 補体：10倍稀釈液を使用した。

d ヒツジ赤血球浮遊液：1%ヒツジ赤血球浮遊液を使用した。

溶血素価はMicrotiterにより測定した。

II 成 績

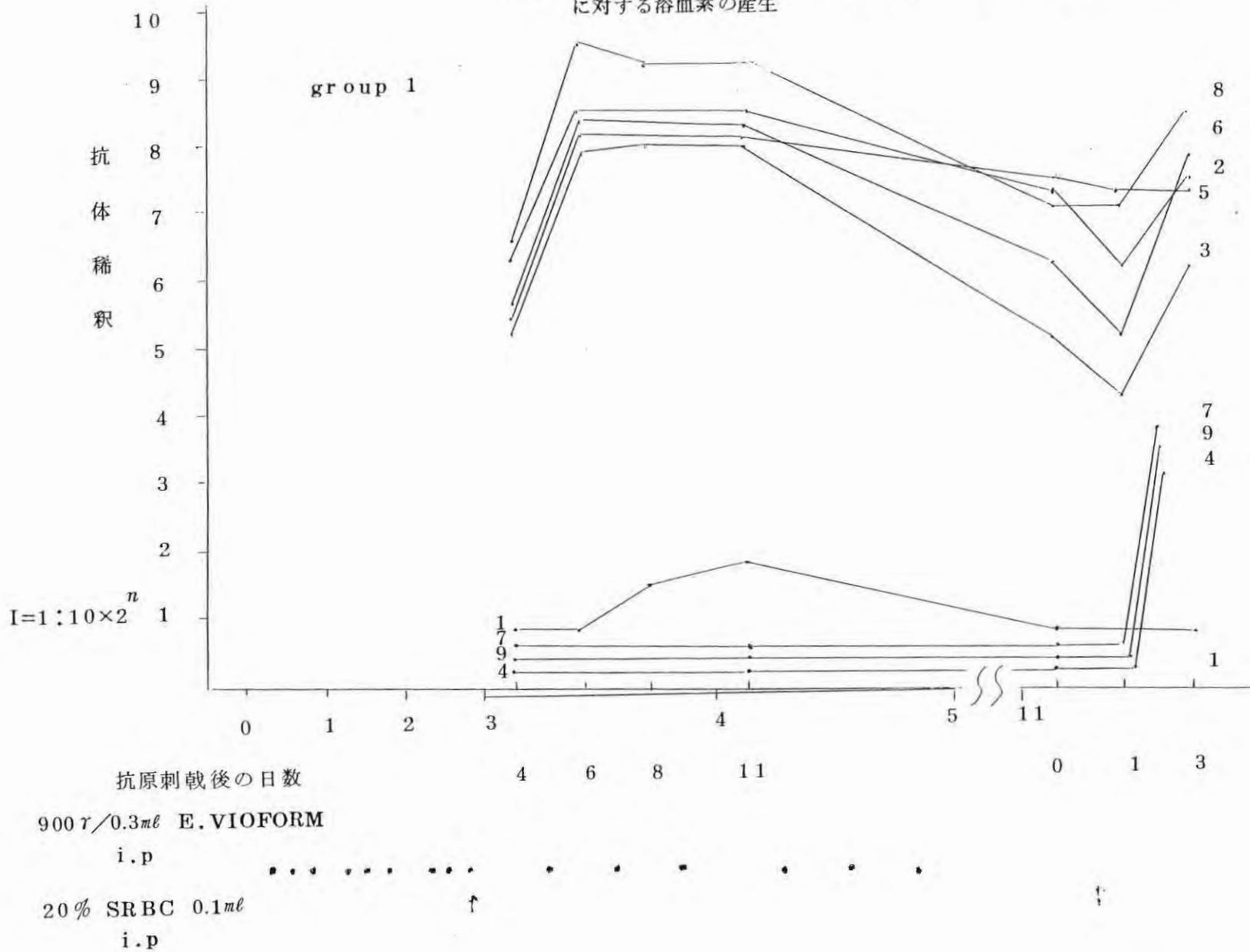
キノホルム剤をマウスに腹腔内，静脈内，経口的に隔日または，連日に投与し，その間にヒツジ赤血球を注射し対応する抗体の産生を溶血反応を用いて検討した（表1）。

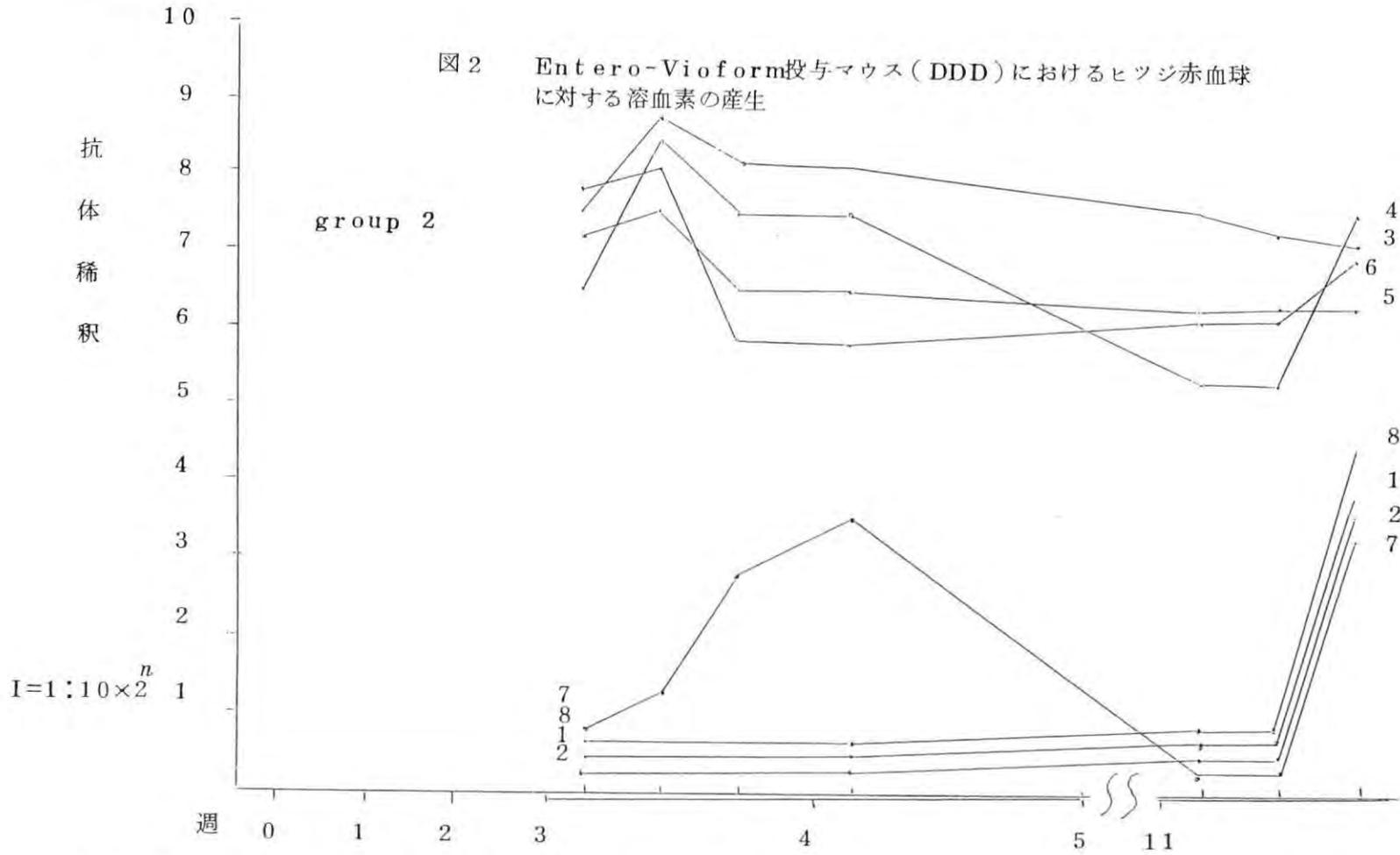
キノホルム剤投与群では， $\frac{1}{5}$ ～ $\frac{2}{5}$ 前後のマウスで抗体産生が悪く溶血素価は，1：10以下であった。しかし残りのマウスは対照群と同様で，多くは1：80～160以上の溶血素価を示した。キノホルム剤投与マウスの溶血素価の変動について，代表例を図1，2に示しておく。この傾向はキノホルム剤の投与方法にはあまり関係ないらしく，何れもほぼ同じような成績であった。キノホルム剤投与量については，まだ十分なる検討が加えられていないが，0.9 mg/匹/日を連日，または隔日に投与した時，比較のおこりやすいようである。抗体産生が悪かったマウスでも，キノホルム投与中止後，ヒツジ赤血球を再注射すると，抗体産生がみられ，これは，2ME感受性であった。この現象については目下検討中である。

表1 マウスにおけるキノホルム投与法と溶血素価

実験群	マウス			キノホルム投与法			麻痺	死亡	ヒツジ赤血球注射(20% 0.1ml/匹)							
	系	雌雄	匹	mg/匹×日, 経路	日数	総計(mg)			注射時のキノホルム投与量小計	第1回注射4~6日 溶血素価・匹数			第2回注射1~3日 溶血素価・匹数			
										<1:10	1:10 ~ 1:20	1:40≤	<1:10	1:10 ~ 1:10	1:40≤	
1	DDD	雌	9	0.9×15 ip	隔日	13.5	0	0	6.3	4	0	5	1	0	8	
2	"	"	8	(アリナミン ip)	"	"	0	0	"	4	0	4	0	0	8	
3	DDD	雌	5	0.9×11 iv	隔日	9.9	0	0	5.4	2	0	3	/			
4	"	"	5	(アリナミン iv)	"	9.9	0	0	5.4	1	0	4				
5	DDN	雌	5	0.9×11 ip	連日	9.9	0	0	6.3	2	0	3	/			
6	"	"	5	1.8×11 ip	"	19.8	0	0	12.6	0	0	5				
7	"	"	5	0		0	0	0	0	0	0	5				
8	DDD	雌	10	0.9×13 ip	連日	11.7	0	0	6.3	3	0	7	0	0	10	
9	"	"	10	4.5×13 ip	"	58.5	0	0	31.5	2日	2	6	0	0	10	
10	"	"	10	0		0	0	0	0	1(4日) 0(6日)	1	8	0	0	10	
11	DDN	雄	10	3×2 po	連日	6	?1日	2	解剖	6.0	2	0	2	/		
12	"	雌	8	2×3 1×5 po	"	11	?2日 ?2日 ?7日(1)	3 → 3	解剖 1 解剖 3	4.0	0	0	5			
13	"	"	8	1×8 po	"	8	0	0	2.0	0	2	6				
14	"	"	8	0(CMC)		0	0	0	0	0	1	7				
15	DDD	雌雄	22	/			/		/		0	0	22	0	0	14
16	DDN		30	/			/		/		0	1	29	/		
17	DDNetc		41	/			/		/		0	2	39	/		

図1 Entero-Vioform投与マウス(DDD)におけるヒツジ赤血球
に対する溶血素の産生





I=1:10×2ⁿ

抗原刺戟後の日数
900r-E. VIOFORM } /0.3 ml
200r ALINAMIN }
i.p

20% SRBC 0.1 ml
i.p

Ⅲ 考察と結論

以上のような少数例の実験群から結論を導き出すことは危険であるが、我々の条件では、マウスにキノホルム剤を投与することにより神経麻痺症状をおこすことはできなかったが、しかし、ヒツジ赤血球に対する抗体の産性を抑制することができるものもあった。この抗体の産生抑制の特徴は、ALSや他の抗体産生抑制剤にみられるようなものと異なり、抑制効果がある群と、無効群とに、明らかに2分される点である。すなわち、抗体産生抑制群では、いわゆる、免疫学的無反応者(non-responder)のような態度をとっている。しかし、キノホルム剤の効果がなくなったと思われる時期に、ヒツジ赤血球を再注射すると、抗体産生がみられ、しかも、産生される抗体は、2ME感受性のものであるから、この時点で1次反応が起ったものと考えられよう。したがって、抗体産生抑制群では、抗原の認識が第1回のヒツジ赤血球で行われなかったために、免疫学的記憶も、もたれなかったものと思われる。これに反し、無効群では、対照マウスにヒツジ赤血球を注射した場合と同様の反応がみられている。

キノホルム剤投与マウスで、何故、このような抗体産生抑制群を無効群に分かれるかについては、その成立機序について目下検討を続けている。

キノホルムの毒性に関する研究

池田良雄、戸部満寿夫、鈴木康雄、小林和雄、鈴木幸子、川崎 靖

(国立衛生試験所 毒性部)

I 結 言

スモン患者で特異な緑色舌苔を呈する例のあることが井形ら⁽¹⁾によって指摘され、さらに患者の尿中⁽²⁾に緑色物質が見出されスモンと緑色物質との関連が注目されるに至った。その後田村⁽³⁾はこの緑色物質がキノホルムであることを同定し、さらに椿らはこの結果に基づいて疫学的調査を行い、キノホルムとスモンとの密接な関係を指摘した。

キノホルムの副作用あるいは毒性に関しては若干の報告を見るが、それらのいづれでもスモン病像の特徴とされる知覚異常、末梢神経ならびに脊髄の変化を具備した変化を示すものは見当らない。われわれはキノホルムの毒性を一層明らかにする目的でニワトリおよびモルモットによる急性ならびに長期毒性実験を行っているが、現在までに得た成績について報告する。

II ニワトリによる実験

方 法 検体として局方キノホルムを用い、これをゼラチンカプセルに封入し、いづれも経口で一回および連続(毎日1回)投与を行った。

動物は体重1.2～1.5 Kgの市販のホワイトコーニッシュ種のメンドリで、一回投与実験では1群1～2羽からなる5群を、また連続投与実験では1群6羽からなる4群を用いた。一回投与実験では死亡および一般症状を観察指標とし、連続投与実験では一般症状、体重、死亡率、および死亡した動物と末期症状を呈した動物を殺してそれぞれの病理的検索を観察指標とした。なお殺処分は先づ1.0%の生理的食塩水による全身灌流を行い、続いて10%ホルマリンで同様に灌流した。

病理組織学的検索は、肉眼的所見を記録し臓器(脳、脊髄、坐骨神経、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓)を秤量した後、10%ホルマリンで固定し、切片を作製し、H-E重染色、Sudan III染色を行い、別に脊髄についてはLuxol fast blue cresyl echt violet、Masson's Trichrome 染色を行った。

結 果

一回投与実験：300～7000 mg/kg のキノホルムを一回経口投与した後2週間観察した。

7000 mg を投与した例では投与後凡そ7時間までは変化を認めないが20～24時間後、緑色便の排泄をみ、両眼瞼を閉じ勝で、口腔内に粘液が充満し、殆んど自発運動がなくなる。死亡状況は表1に示すとおりである。

表1.	投与量 (mg/kg)	死亡率
	300	0/2
	1000	0/2
	3000	0/2
	5000	2/2 (12日, 14日)
	7000	1/1 (7日)

7000 mg を与えて死亡した例では、腸粘膜の殆んど全域に亘って充血し、腺胃部に小潰瘍を認める。

連続投与実験：4群に0, 200, 500, および1000 mg/Kg/day のキノホルムを経口投与し、0および200 mg 群は現在(46.2.18日)115日、また500 mg 群では44日を経過した。

体重の推移

図1に開始後35日間の体重変化を示す。200 mg および500 mg 群では初期凡そ2週間に亘ってやや減少傾向を示すがその後は対照群と差がなくなる。しかし1000 mg 群では3日目頃より減少傾向が生じ、初期体重に比べ5日目では約10%, 20日前後では約20%減少を示す。

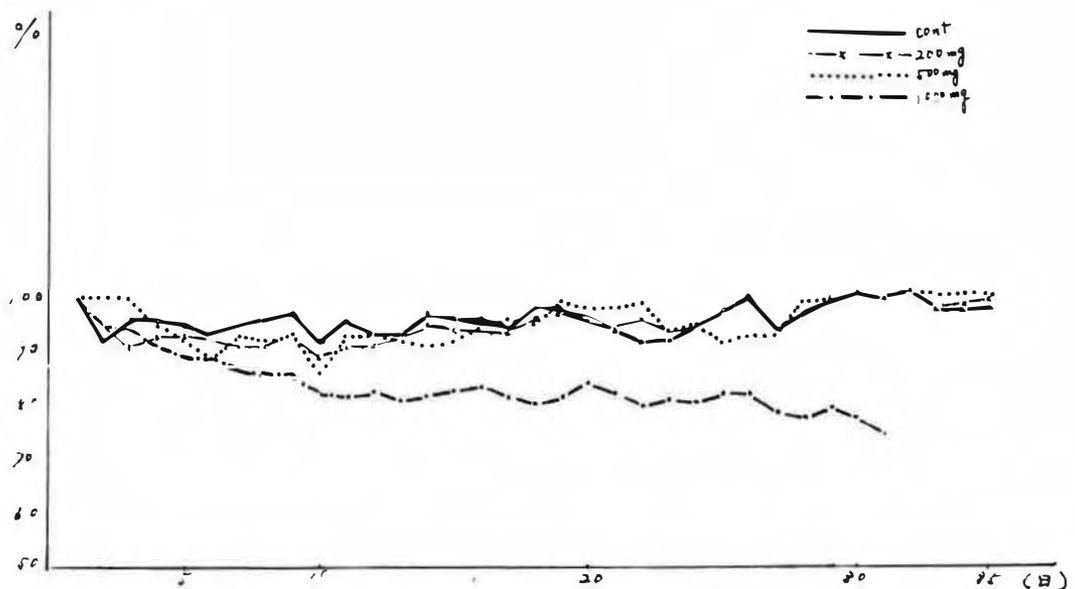


図1 体重変化率

一般症状（表2）

200 mg 群：実験開始後115日を経過したが、対照群に比べ差がなく、変化を認めない。

500 mg 群：20日目に2例が軽度の体重減少を伴う歩行障害（写真参照）ないしは歩行困難，開口症状を呈し，うち1例は21日目に殺処分し，他の例は28日目に死亡した。

1000 mg 群：12日目に2例，その後14，18，20，および25日目にそれぞれ1例づつ，体重の減少を伴う歩行障害（写真参照）ないしは歩行困難，後趾伸展麻痺，深部知覚異常（亢進），流涎，開口症状，舌の肥厚などの諸症状を呈する。歩行障害はその後強まり，殆んど自発運動がなくなり末期へと移行する。症状発現から末期までの間隔は短いもので12時間，長いもので11日を要する。

表2

投与量 (mg/Kg)	発症例数	死 亡 率			
		10	20	30	35 (日)
0	0/6	0/6	0/4	0/4	0/4
200	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
500	2/6	0/6	0/6	2/6	0/4
1000	6/6	0/6	3/6	1/3	2/2

死 亡 率（表2）

自然死をおこした動物は500 mg 群で28日目に1例と1000 mg 群で19日目（18日目に発症）に1例でほかの500 mg で1例と1000 mg の5例はいずれも末期症状を呈したために殺処分したものである。なお対照群で12日目に2例を殺処分して比較に供した。

剖検所見

500 mg 群：2例について解剖したが，肉眼的に殆んど対照群の所見と差がなく，変化を認めない。

1000 mg 群：全例で肝の表面に微細な黄色斑点が彌漫性に認められ，やゝ褪色を呈する。また2例において舌表面が痲皮状を呈するが，その他の臓器および組織に変化をみない。

組織学的所見

組織学的検索を終った1000 mg/kg/day を投与し12日目に前述の症状を呈し，同日目に殺処分した1例について述べる。肝の中心性の脂肪変性が認められ，末梢神経（坐骨神経）の軸索変性および髄鞘脱落，脊髓前索および後索の変性像が認められる。

III モルモットによる実験

方 法 検体として局方キノホルムを用い，ニワトリの場合と同様に経口による一回投与と連続投

与実験を行った。

検体の投与剤形は一回投与ではオリーブ油に懸濁して、また連続投与では5% lecithin 液に検体を3.3%の割合に懸濁したものと、別にゼラチンカプセルに封入した2種類とした。動物は体重300g前後の雌のモルモットを用い、一回投与実験では投与後2週間に亘って一般症状と死亡を観察し、連続投与実験では、一般症状、体重、死亡率を観察し、死亡動物と末期症状を呈した動物を放血して殺し病理学的検査を行った。

病理学的検査は肉眼的所見を記録した後、臓器(脳、脊髓、末梢神経(坐骨神経)、肝、腎)を10%ホルマリンで固定し、ニワトリの場合と同様に切片を作製した。

結果

一回投与実験：100、200、300および1,000 mg/Kg を一回経口投与すると、1,000 mg/Kg 投与後4時間前後に緑色尿の排泄をみるが外に著しい症状をみない。200 mg では6日目、300 mg で5日目に、また1,000 mg では4日目に死亡するが、死の1日前からいづれも四肢の運動障害を認める。投与後2週間の死亡状況は表3に示すとおりである。

表3	投与量(mg/kg)	死 亡
	100	0/1
	200	1/1
	300	2/2
	1000	1/1

連続投与実験：投与量と投与剤形を変えて2種の実験(i, ii)を行った。

i) 2群(各群7匹)の動物に各々10および50 mg/Kg の検体を毎日1回胃ゾンデで12週間経口投与し、別の1群(6匹)には懸濁液のみを同期間投与して対照とした。

一般症状

10 mg および50 mg 群ともに特に症状の発現をみないが、10 mg 群で8週目、また50 mg 群で9週目にそれぞれ1例が強い体重減少を伴って死亡する。50 mg 群の1例では死の前日から後肢の運動障害が軽度に認められる。

体 重

12週間の体重の推移を図2に示す。

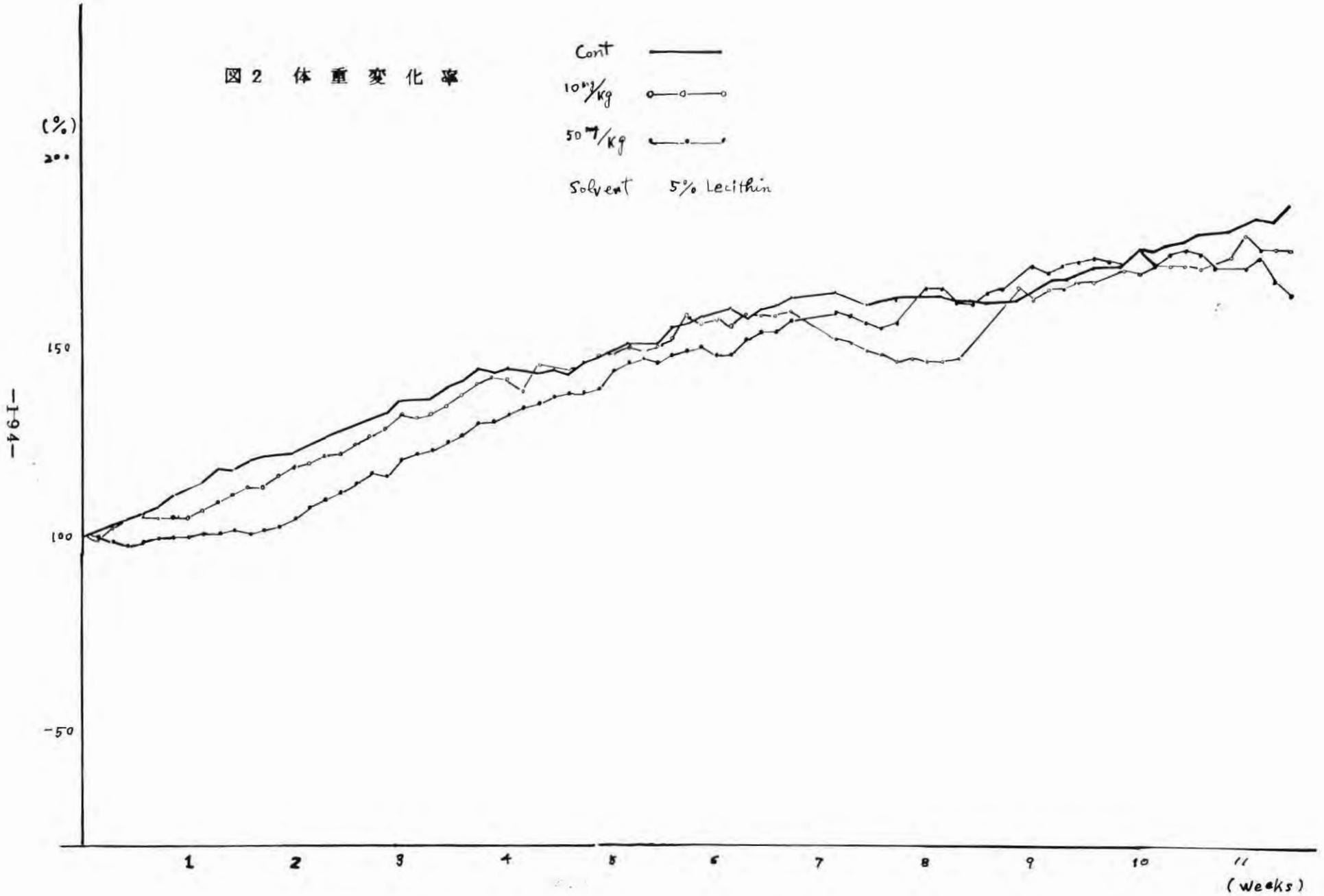
10、50 mg 群ともに対照群に比べ増加の抑制を生じ、開始後4週前後までは50 mg でその差が強い。12週目では、それぞれ6例の平均で対照群が642.2g、10 mg 群で578.3g、また50 mg 群で537.7gである。

死 亡 率

10 mg で8週目に、また50 mg 群で9週目にそれぞれ1例が死亡するが、ほかに死亡例を

图2 体重变化率

Cont ———
10^{mg}/kg ○—○—○
50^{mg}/kg ●—●—●
Solvent 5% Lecithin



みない。死亡した2例ではいずれも肉眼的に脂肪肝を認めるが、ほかに変化像をみない。

病理学的所見

12週目に全動物を解剖して行った肉眼的検査では対照群で2/6例、10および50mgとともに4/6例に肝表面の微細(経0.5mm程度)な白色斑点の散在が認められ、また50mg群では全例に腎の褪色を認める。

ii) 一群7匹からなる3群に検体を0, 50, および100mg/Kg/day をカプセルに封入して毎日1回口腔内に投与し、現在(46.2.18日)85日を経過した。

一般症状

50mg および100mg 群ともに特に症状の発現を認めない。50mg 群で4日目に1例、また100mg 群で、4, 6, 13および75日目に各々1例が死亡するが、これらはいずれもその数時間ないし1日前から後肢の運動障害が軽度に認められる。

体 重

体重の推移は図3に示すとおりで、投与開始直後から50mg, 100mg ともに増加が強く抑制され、ことに100mg では著しく40日以降殆んど体重の伸びがみられない。

死 亡 率

50mg 群で1/7, また100mg で4/7の死亡を生じ、対照群では死亡例をみない。

死亡した5例ではいずれも肝表面に無数の微細な白色斑点の出現がみられ、100mg では脾および腎の褪色が軽度にみられる。さらに、100mg で75日目に死亡した例では腎の褪色が強度で表面が凹凸状を呈し、かつ表面に微細な白色斑点をみる。

IV 考 察

キノホルムの致死量については、その経口LD50がモルモット⁽⁴⁾で凡そ175mg/Kg, ラット⁽⁵⁾で10g/Kg 以上というように動物種による差が大きいことが伺われるが、今回のニワトリおよびモルモットの結果でもその差の著しいことが明らかであった。

一方、その症状として、Entero-Vioform を治療の目的で1回与えたイヌで投与後数時間で生ずる“てんかん様発作”が報告されているが、今回の1回投与実験ではニワトリ、モルモットともに、特に著しい症状の発現を見なかった。その理由は不明であるが、その一つとして種差をあげることができるかも知れない。キノホルムの連続投与実験については詳細な検索を行ったと見られる報告は見当たらないが、Püschner & Fankhauser⁽⁷⁾(1969)がキノホルムを0.6~1.0%添加した飼料で2週間マウスを飼育した成績は今回のニワトリの成績と関連して興味深い。

即ち、彼等によれば早い例では開始4時間から片側性あるいは両側性の四肢攣縮・しんせんなどの神経症状が認められ、その後鎮静状態となり、病理組織学的に開始後2~3日でアンモン角さら

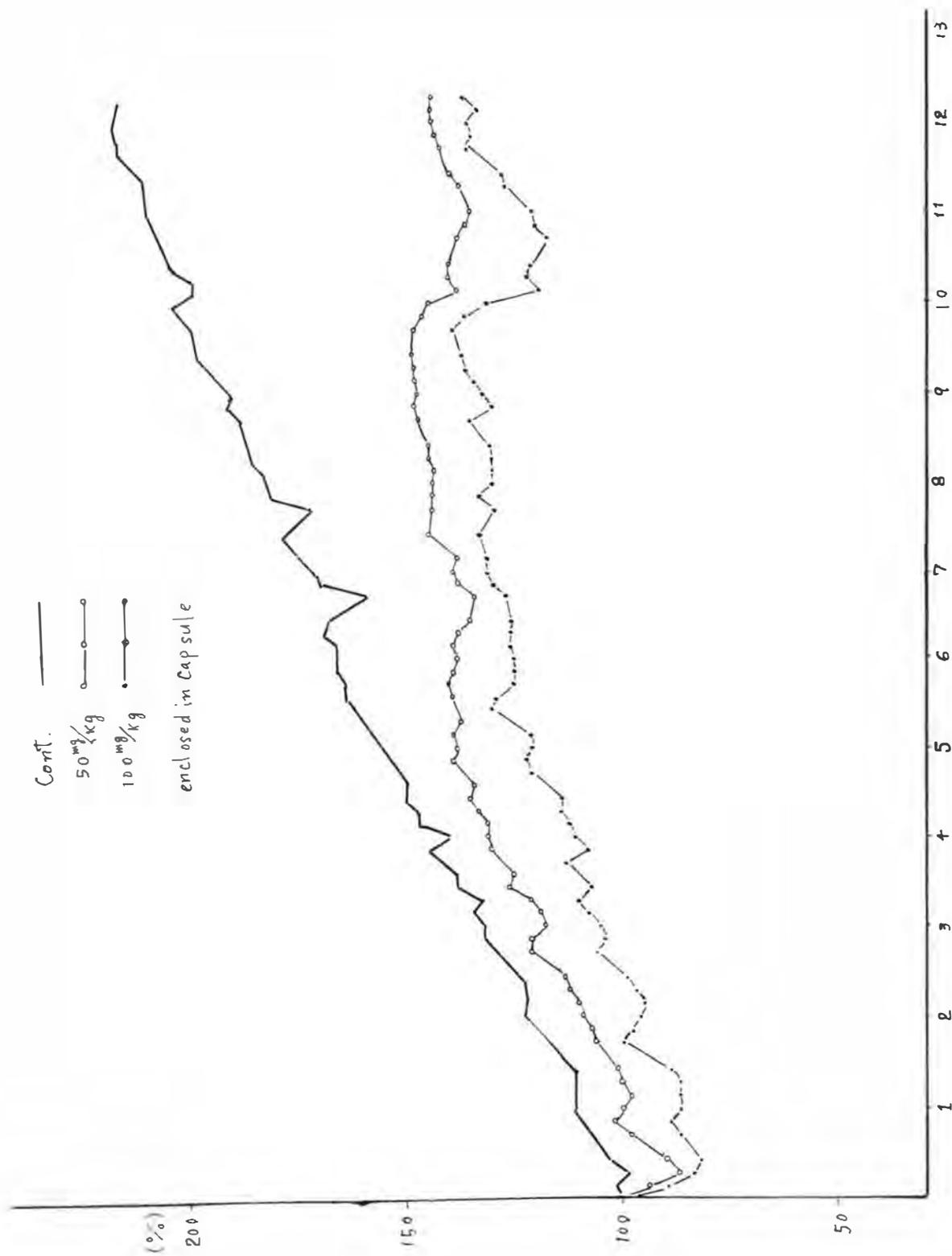


图3 体重变化率

扁桃核に壊死性の神経細胞を認めるといふ。この報告や、イヌでの“てんかん様けいれん”はいづれもキノホルムが中枢神経系に対して影響することを示すものとみられ500および1000 mg/Kg/dayのニワトリで生じた麻痺性の歩行障害ないしは歩行困難が神経系の障害によることを支持する成績と考えられる。しかしこの2つの報告例では症状の発現がいづれも極めて短時間でみられる点で、ニワトリの成績と相異なる。

⁽⁸⁾ 豊倉らはキノホルムを連続して静注したウサギで末梢神経の髄鞘脱落を見ている。またキノホルムの近縁物質の一つである5-nitro-8-hydroxyquinoline⁽⁹⁾を投与したマウス、ラット、およびネコで四肢あるいは下半身の麻痺と坐骨神経の髄鞘脱落が認められているが、これらの成績もニワトリでの末梢神経の変化を支持するものと考えられる。

しかしニワトリでみられた脊髄の変化については、他にこれを示唆する報告がなく、今後の検索を待たなければならない。

また1000 mg/Kg/dayのニワトリでみられた舌の肥厚については、まだ詳細な検索が済んでいないが、スモン患者で特異な舌苔がみられることと関連して特に注目すべき現象と考えられる。

モルモットの実験では成績で明らかなように軽度の後肢の麻痺がみられたが、その発現と死との間隔が長くて1日程度であることから、それがキノホルムに特有な作用によるのか、あるいは死に前駆する一般的症状であるかは組織学的検索を行った後で結論すべきであろう。

なお、この実験でキノホルムの100 mg/Kg/dayをオリーブ油に懸濁して3匹のモルモットに経口投与したところ、カプセルに封入して与えた場合とで死亡の状態に差がみられたことは、剤形の差による作用発現の時間的差あるいは強度差を示唆するものとして、考慮すべき問題と言えらる。

V 総 括

ニワトリおよびモルモットを用いキノホルムの急性ならびに長期毒性実験を行った。

急性実験ではその経口致死量がモルモットでは200 mg/Kg、ニワトリでは5000 mg/Kgと推定された。

長期実験では、ニワトリに於て両側性の歩行障害が500 mg/Kg/day 経口以上で高頻度に出現し同時に末梢神経および脊髄前索、後索の変化を示す1例を認めた。

引 用 文 献

1. 高須俊明ら：スモン研究協議会 1970；医学のあゆみ 72：539，1970
2. 井形昭弘ら：日本医事新報，2421：25，昭45
3. 田村善蔵，吉岡正則：スモン研究協議会 1970；医学のあゆみ，74：320，1970
4. David, N.A. et al. : Am. Jr. Trop. Med ; 24: 29, 1944

5. Brückner, R. et al : *Arz.Mittel Forsch* ; 20 : 575 , 1970
6. Hangartner, P : *Schweiz. Arch. Tierheilkd* ; 107 : 43 , 1965
7. Püschner , H. und Fankhauser, R ; *Schweiz. Arch. Tierheilkd* ;
111 : 371 , 1969
8. 豊倉康夫ら : スモン研究協議会 1970
9. Roesch, E. et al : *Arch. Toxikol* ; 20 : 313 , 1965



キノホルム経口投与による

猿の両下肢マヒ

高橋理明，納寿一郎，奥野良臣（阪大微研）

I はじめに

45年5～6月頃スモン患者の髄液（リコール）からのウイルス分離実験の際，6例中3例のリコールはHK（人胎児腎細胞）GMK（ミドリ猿腎細胞）に対して細胞変性を示した。しかしこの細胞変性は継代出来ず，リコール中に何か毒性物質が含まれていることが推定された。10月頃になってキノホルム説が有力になってきたので以前のリコールにキノホルムが含まれていたのではなかと疑われたが既に残存分がなく確認することは出来なかった。そこで新たに7名のスモン患者からリコールを採取してもらい，しらべたが全部細胞変性をおこさなかった。しかしそのときは既にキノホルムの服用が禁止されて1ヶ月半以上たっていたので当然の結果とも思われた。そこで経口投与されたキノホルムがリコールに移行するかどうかをしらべるために猿を使ってのモデル実験を試みた。即ちカキイ猿にキノホルムを服用せしめ一定期間後にリコールを採取してキノホルムが含まれているかどうかをしらべようとしたのである。しかしその目的が十分達せられないうちに投与開始後2～6週で猿は両下肢マヒをおこし，スモン類似の症状を呈してきたので報告する。

II 材料及び方法

1. 猿，体重1.5～2Kgのカキイ猿を使用した。
2. キノホルム剤

エマホルム（田辺製薬製，キノホルム含有量90%）を用いた。

3. 投与方法

最初約2週間エマホルム約0.5g（1匹当り）を水に混じ注射筒を用いて強制投与した。しかしこの方法は手間がかかる上，吐き出す場合等があって適当でなく，以後は飲料水に加えて経口投与した。しかしキノホルムは水に難溶性であるので摂取されずに残った分もあったが投与量の少くとも50～60%は摂取されたものと思われる。

III 成績

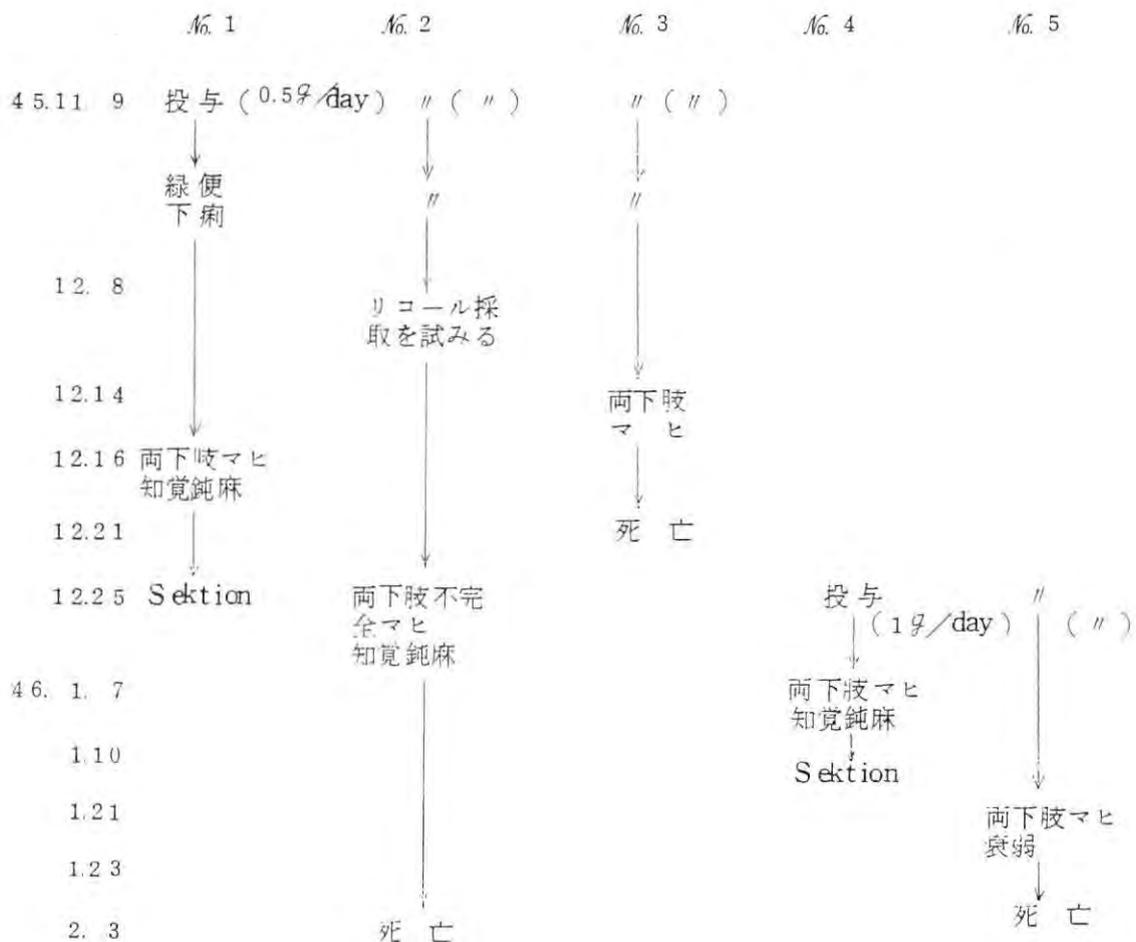
1. 第1のグループの猿

カニクイ猿 3 頭にエマホルム 0.5 g/day づつ投与を始めた。2 週間位して緑便，下痢をおこしてきた。約 1 ヶ月後，リコール採取を試みたが極めて困難で十分な量をとることが出来なかった。しかし 3 5 日頃より 2 匹の両下肢にマヒが出現してきた。マヒは左右とも殆んど完全で，下肢による運動は不可能であった。その中 1 匹は 4 2 日目に死亡，他の 1 匹は 4 5 日目に解剖した。解剖した猿の脊髄では頸髄の後索に弱い変性がみられ，また腰髄，仙髄の前角細胞にも変性がみられた。又採取できた新鮮な尿に $FeCl_3$ を加えると線色を呈しキノホルムが排出されていたものと思われる。4 5 日頃より最後の 1 匹にも両下肢の不完全マヒ，知覚鈍麻があらわれてきて投与開始後 7 0 日目に至って死亡した。これらのマヒをおこした猿の糞便を採取してウイルス分離を試みたが全部陰性であった。また解剖例の脊髄の一部の suspension をつくりウイルス分離を試みたが陰性であった。従って混入ウイルスによるマヒの可能性は極めて少いといえる。

2. 第 2 のグループの猿

以上の経過中更に 2 匹の猿に経口投与を開始した (1 g/day)。投与開始後 2 週間で 1 匹の猿に両下肢マヒ，上下肢知覚鈍麻が出現した。他の 1 匹は 1 5 日頃より下痢をおこし，約 3 0 日目頃に至り不元気，両下肢マヒをおこし死亡した。

表 1 カニクイ猿へのキノホルム経口投与



IV 考 察

キノホルムを経口投与することにより猿に高率に両下肢マヒ，知覚鈍麻等スモン類似の症状が生ずることが明らかとなった。又解剖例に於ても頸髄後索の軽度の変性，腰髄，仙髄の前角細胞の変性等の変化がみられた。これらの変化は人の解剖例程著明ではないが，人体例は殆ど慢性の経過をたどって死亡した例であり，猿では急性の経過をたどったものであることを考えれば差異のあるのが当然かも知れない。今後投与量，投与期間を考慮することによって人体解剖例にもっと類似した病変を猿におこすことを計画している。

人に最も近い猿にキノホルムを経口投与することによりスモン様症状を呈せしめることが可能となったことはスモンの病因究明に今後大いに役立つことと思われる。

V 結 び

体重1.5～2.0 Kgのカキイ猿3頭にキノホルム剤(エマホルム)を0.5g/day，2頭に1g/dayを飲料水に入れ経口投与した。キノホルムは水に難溶性であるが，投与量の少くとも50～60%は摂取されたものと思われる。投与開始後2～6週後，全部の猿が両下肢マヒ，完覚鈍麻をおこし，解剖した例を除き死亡した。解剖した例においては脊髄の頸髄後索の弱い変性，腰髄，仙髄の前角細胞の変性をみとめられた。

参 考 文 献

井形昭弘，豊倉康夫：キノホルムによる神経系障害に関する研究—キノホルム静注家兔に於ける末梢神経障害，医学のあゆみ，75，309，1970

謝 辞

猿の病理標本作製指導について谷口春夫博士(大阪府立成人病センター，病理部)，釜洞静太郎博士(大阪大学総長)，石原博士(京都府立医大，病理学教室)の御援助を受けたことに対して深甚の謝意を表します。



写真 1

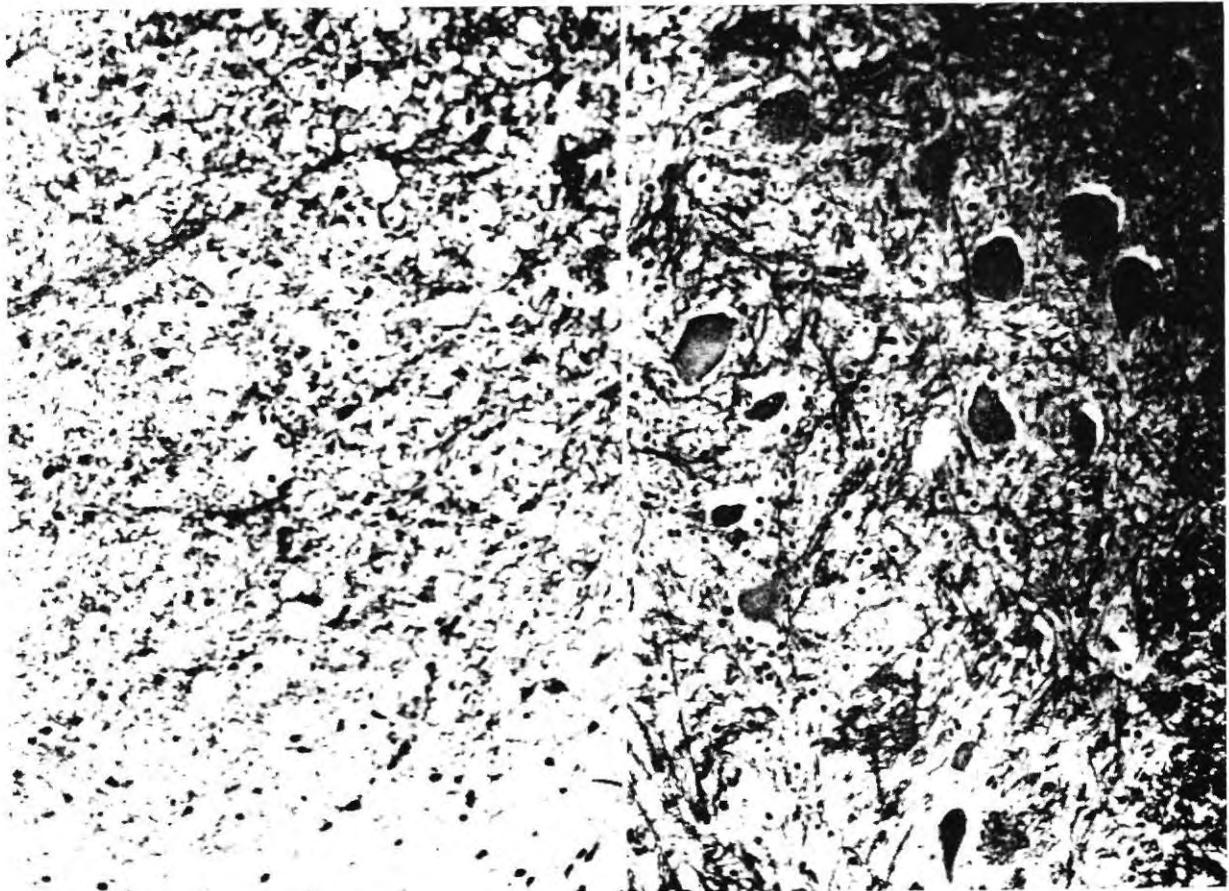


写真 2

写真 3

- 写真 1 キノホルム剤(エマホルム)経口投与(0.5 g/day)45日後雨下肢マヒをおこしたカニクイ猿。
写真 2 同上サル頸髄後索 (LFB+HE染色) 全体に染色性が薄くなっている。
写真 3 同上サル仙髄, 前角細胞の変性 (LFB+HE染色)。

スモン患者の臓器、尿、尿および 緑色舌苔中の重金属測定

池田良雄，戸部満寿夫，鈴木康雄，小林和雄，鈴木幸子，川崎靖

(国立衛生試験所 毒性部)

I 緒 言

スモンの病因として、主として疫学的調査結果からみでの感染説あるいはウイルス説と、主としてその病理像に基いての非感染説あるいはキノホルム説があるが、なおその本態は不明である。

われわれは、スモンの症状が重金属類ことにタリウム中毒に類似することなどから、体内の特定重金属の変化あるいは重金属間の均衡の乱れを想定し、その究明が原因解明への一手段となると考え、患者の臓器、尿、および尿中の若干の重金属を測定した。

また、この測定を実施中に、高須ら⁽¹⁾が発見したスモンに特有と考えられる緑色舌苔、さらに緑色尿などについても重金属を測定する機会を得たので、それらの結果を併せて報告する。

II 臓器、尿、および尿中重金属

1 方法

測定試料：5名の患者と3名の対照例について脳、脊髄(但し対照例では欠如)、肝、および腎の4臓器、また別の患者6名と対照例5名について尿、さらに別の患者5名と対照例3名の尿について表1に示す重金属の測定を行った。

〔表1〕

試料	測定金属						
臓器	Mn	Fe	Cu	Zn	Tl		
尿	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	Cd	Tl
尿	Mn	Fe	Zn	Cd	Tl		

金属測定法：臓器ではそれぞれ乾燥して一定量(0.2g)を、尿はそれぞれ乾燥した全量(0.1~0.8g)、また尿はそれぞれ20mlを、硝酸および過塩素酸で分解したのち、Tlを除く6種の金属についてはIN-硝酸で溶かして直ちに原子吸光法で、またTlはIN-臭化水素酸に溶かし、抽出を行ったのち鈴木⁽²⁾の法に従ってマラカイトグリーンによって比色定量を行った。

2 結 果

臓器中重金属

東京大学病理学教室から提供された 5 名の患者および 3 名の対照例の脳, 脊髄, 肝および腎中の 5 種重金属の測定成績 (数値はいずれも ppm) は表 2 に示すとおりである。脊髄では対照例がなく, 比較ができないが, その他の臓器および個々の重金属で対照例に比べて特に著しい変化を示す例はみられない。しかし, 脳および腎では個々の測定値の変動が大きい平均値で比べると脳ではやゝ低く, また腎では逆にやゝ高い傾向を示す。

〔表 2〕

		脳				
		Mn	Fe	Cu	Zn	Tl
患 者	1	5.8	35.8	31.2	64.0	0.109
	2	2.4	29.4	28.4	63.2	0.175
	3	2.4	28.4	19.4	54.4	0.109
	4	-	-	-	-	-
	5	2.2	25.2	24.6	44.0	0.109
		3.20	29.70	25.90	56.40	0.126
		±1.74	±4.44	±5.11	±9.34	±0.033
対 照	6	-	39.8	36.0	98.8	0.218
	7	2.2	19.0	26.6	53.6	0.218
	8	4.0	34.6	48.2	36.0	0.0
			3.10	31.13	36.93	62.80
		脊 髄				
		Mn	Fe	Cu	Zn	
患 者	1	19.2	39.2	43.2	89.6	
	2	-	-	-	-	
	3	3.74	70.2	36.2	59.8	
	4	-	-	-	-	
	5	2.52	21.0	17.6	32.8	
		8.49	43.47	32.33	60.73	

肝

#	Mn	Fe	Cu	Zn	Tl	
患者	1	10.2	56.8	22.8	76.8	0.218
	2	5.0	63.2	27.4	84.6	0.327
	3	2.8	55.8	15.0	62.4	0.218
	4	4.0	61.0	21.8	42.4	0.305
	5	2.2	36.6	31.6	68.0	0.065
	4.89 ±3.19	54.68 ±10.55	23.72 ±6.25	66.84 ±16.07	0.227 ±0.104	
対照	6	4.0	75.8	15.6	88.8	0.218
	7	2.2	75.8	14.0	58.4	0.645
	8	3.0	63.0	17.4	25.6	0.218
	3.07	71.53	15.67	57.6	0.364	

腎

#	Mn	Fe	Cu	Zn	Tl	
患者	1	7.8	35.8	14.8	48.8	0.327
	2	4.2	88.4	29.8	109.6	0.0
	3	2.6	59.8	10.8	47.2	1.091
	4	1.6	28.4	9.8	20.0	-
	5	3.0	22.2	19.8	60.8	0.239
	3.84 ±2.40	46.92 ±27.22	17.00 ±8.17	57.28 ±32.84	0.414 ±0.472	
対照	6	1.6	76.8	16.4	66.4	0.218
	7	3.0	15.8	7.4	32.0	0.0
	8	2.0	24.2	21.4	19.2	0.873
	2.2	38.93	15.07	39.20	0.364	

尿中重金属

協議会保管の患者尿から、発症時期と採取時期の間が比較的狭いことを理由に選んだ男3名と女3名の計10サンプルと、対照例として健康な男5名の5サンプルについて測定した結果(ppm)を表3に示す。

同一患者で2つ以上のサンプルのあったものは、採取の経過に従って上から下に列記した。

〔表 3〕

	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	Cd	Tl	
患者	女	567	1333	13.9	119.0	863	2.64	8.30
		244	436	9.4	46.0	863	1.98	0.0
		411	378	6.6	42.0	416	1.14	0.09
	女	56	400	6.9	40.6	405	1.56	0.0
		111	426	7.5	40.6	341	1.86	0.0
	女	122	462	7.5	44.8	353	1.44	1.64
		211	733	12.9	50.4	401	1.92	8.20
	男	167	551	-	49.0	446	-	-
	男	189	507	6.4	54.6	488	1.50	0.35
	男	156	489	7.3	54.6	375	1.62	-
平均	223.4	571.5	8.71	54.18	495.1	1.74	2.45	
	±154.08	±285.92	±2.81	±23.37	±198.54	±0.43	±3.63	
対照	平均	453.6	828.4	9.59	98.5	549.8	3.49	0.194
	(男5名)	±342.9	±451.0	±2.31	±35.2	±127.1	±1.16	±0.184

患者からの10サンプルの平均と対照例のそれを比べると を除いて、いずれも低値を示す。しかし患者および対照例ともに偏差が大きく、有意差を示す例をみない。

患者 . の1回目の尿では7種の金属全てで他のサンプルより高値を示し、またCdを除く6種で対照例の平均値を上回る値を示す。同一患者で採取時間による差をみると、患者は経過につれて低下する傾向が、患者 . では2回の成績に殆んど差がなく、また患者 . では増加の傾向をみる。

さらに性別による差はいずれの金属でも殆んど認められない。

尿中重金属

埼玉県戸田市中島病院に入院加療中の患者5名(表4参照)および対照として当所に勤務する健康な男3名のそれぞれ24時間尿について測定した。

患者尿は昭和44年12月1日に採取したもので、その一般性状は表5に示すとおりであった。

〔表4〕	性	発症時期	入院日	45.2.12日現在
	A 男	43. 11. 28	44. 6. 11	退院(45. 1. 下旬)
	B 女	40. 8. 24	44. 11. 18	入院中
	C 女	40. 9 上旬	44. 10. 14	退院(44. 12 下旬)
	D 女	44. 9 5	44. 9 10	入院中
	E 女	43. 8. 8	44. 8. 8	入院中

〔表 3〕

	全量 (ml)	比重	pH	外 観
A	1600	1.015	6.2	透明, 黄色
B	2100	1.015	6.4	透明, 黄色
C	1500	1.013	7.0	混濁(炭酸塩), 淡黄色
D	1100	1.012	7.2	混濁(炭酸塩), 淡黄色
E	1680	1.013	6.4	透明, 淡黄色

重金属測定結果を表6に示す。

〔表 6〕

	Mn	Fe	Zn	Cd	Tl	
患 者	A	0.020	1.326	0.853	0.060	0.023
	B	0.009	2.188	0.601	0.055	0.011
	C	0.018	1.512	0.286	0.050	0.024
	D	0.008	1.288	0.744	0.035	0.026
	E	0.024	2.188	0.380	0.040	0.023
	0.016 ±0.007	1.700 ±0.453	0.573 ±0.239	0.048 ±0.010	0.021 ±0.006	
対 照	F	0.026	1.867	0.310	0.055	0.011
	G	0.024	1.400	0.100	0.060	0.012
	H	0.024	4.589	0.217	0.040	0.011
		0.025	2.619	0.207	0.052	0.011

対照例数が少なく、推計学的に差を検討できないが、それぞれの平均値で比べると、MnとFeでは対照例よりやや低く、ZnとTlでは逆に高値を示す。

発症の時期と測定値の間には一定の関係が認められない。

Ⅲ 緑色舌苔および緑色尿中重金属

1 材料及び方法

測定試料：三楽病院入院患者で緑色舌苔を呈するとともに、導尿管用カテーテル（塩化ビニール製）内壁に緑色物質の附着をみ、さらにその後緑色尿の排泄を生じた1例の、緑色舌苔、カテーテル附着緑色物質と24時間尿、および緑色尿の4試料を用いた。

金属測定法：緑色舌苔は乾燥後秤量したもの、カテーテル付着物を掻き落して乾燥した後秤量したもの、24時間尿はそのまま10mlを、さらに緑色尿はそのまま1mlと2mlにベンゼ

ン5 ml を加えて可溶性部分と非可溶性部分に分離したもの3種、計6種の検体をそれぞれ硝酸および過塩素酸を加えて灰化し、さらにIN硝酸に溶かして原子吸光法で測定した。Tlについては灰化後、先のI項の方法で述べたと同様にして測定した。

2 結 果

4種の試料について行った重金属測定の結果を表7に示す。

〔表 7〕

試 料	検体量	Fe	Ni	Cu	Zn	Tl
緑色舌苔	4.41mg	1218	0	64	13860	0.00
カテーテル 付 着 物	3.32mg	5163	15	70	14494	-
24時間尿	10ml	3.732	0.190	0.072	1.862	-
緑 色 尿	1ml	-	-	-	-	0.00
	ベンゼン 可 溶 性	12.374	0.100	0.245	7.688	-
	2ml					
	ベンゼン 不 溶 性	10.625	0.850	0.331	4.562	-

IV 考 案

臓器内重金属の結果で脳および腎で対照例とやゝ差がみられたが、例数が少く、かつ個体間の差が大きいため、これらから何らかの示唆を期待することができなかった。

またスモンの病理像から考え脊髄での変化が重要と思われるが、対照例がなく、さらに、文献上でも脊髄での測定値が見当たらないので比較ができなかった。しかしその値を脳のそれと比べ著しい差がないことからみて、例え変化があるにしても数値的に大きいものではないように思われる。

また臓器内量の評価では、用いた対照3例が重症筋無力症、心筋梗塞、脳血栓症と診断された病理解剖例であることも考慮されなければならないかも知れない。

尿中重金属では患者Y.H.の1回目のサンプルと各サンプルのTlを除いて、殆んどが対照平均値を下廻る値を示すこと、また同一患者で経日的変化がみられかつその変化に一定の傾向がないことが解るが、それらの意義については今回の成績からだけでは明らかでなかった。尿中重金属値については多くの報告をみるが、測定条件が異なるために参考になる資料が得られなかった。

尿中重金属ではZnとTlが対照例より高値を示し、ことにTlでは実測値が凡そ2倍であった。鈴木⁽²⁾は7例のタリウム中毒患者の尿中Tl量を測定し、1例で0ppmとしているが残り6例では0.12~0.48ppmの値を報告している。

従って今回のスモン患者の成績は凡そ $1/10$ 量と見做され、この意味でT1をとくに重視しなければならない理由は見当らないと思われる。

一方Znについては、正常人では 0.3 mg/day （凡そ 0.2 ppm ）とされており⁽³⁾、今回の対照例の平均値 0.207 はそれに略々一致する。従って患者での 0.573 ppm は約 2.5 倍に相当するが、ことに患者AおよびBでは 0.853 および 0.744 ppm と高く、かつその発症時期が比較的新しいことが注目される。しかしこの変化の意義あるいは確実性を論ずるには例数の不足が指摘されよう。

一方平均値でやや減少傾向を示すMnについてはマンガン中毒の診断指標としてもその尿中排泄量の意義が疑問視されており、Flinnらは中毒患者でもその排泄量は少なく $0.004\sim 0.048\text{ ppm}$ としている⁽³⁾。

またFeについて須野によれば正常人で 1.4 ppm である⁽⁴⁾。従ってMn及びFeの尿中排泄量にはむしろ差がないとも考えられる。

一方緑色舌苔およびカテーテル付着物質ではFeおよびZnの値が高い。このような特殊な試料については比較すべき対照がないが、例えばZn量についてヒトの皮膚で 26 ppm （乾燥）、爪で 108.3 ppm （乾燥）、頭髮で 255 ppm （乾燥）とする報告に⁽⁵⁾比べてもその値が著しく高いことが指摘されよう。

東京大学神経内科高須博士から提供された緑色を呈さないスモン患者舌苔について測定した結果ではFe： 1298 ppm 、Zn： 463 ppm であった。この1例によって結論することはできないが、舌苔に限って言えば、その緑色については少なくともZnの占める位置を無視することはできないと思われる。

また緑色尿についてもFeとZnが明らかに高値を示し、さらにCuでもその正常人での排泄量 $0.08\sim 0.725\text{ mg/day}$ を⁽⁴⁾越えるものと考えられる。

これらの緑色舌苔と、尿に関連する緑色物質との間には、単に緑色と云う共通の対象は別として、何等かの共通する因子の存在を考えてよいように思われる。

V 総括

スモン患者の脳、脊髄、肝、腎、尿および尿中の重金属、および緑色舌苔、緑色尿を呈したスモン患者1例のそれら試料中の重金属を測定した。

尿および尿では対照例に比べ若干の変化が認められ、緑色舌苔および緑色尿では鉄および亜鉛の含量が著しく高いことが解った。

これらの結果を報告し、併せて若干の考察を行った。

貴重な試料を積極的に分与され、かつ有益な助言を頂いた東大神経内科の井形、高須両博士に衷心から謝意を呈します。

また試料提供の煩いを、快諾された国立公衆衛生院中谷博士、中島病院、東大病理学教室に感謝いたします。

引用文献

- 1) 高須ら：スモン研究協議会 1970；医学のあゆみ，74：320 1970
- 2) 鈴木俊雄：分析化学，14：130，1965
- 3) Browning, E. : Toxicity of Industrial Metals, 2nd ed. 1969,
Butterworths, London
- 4) 林香苗編：解剖学及び生理学計数，1956，解剖生理計数表刊行会
- 5) 松浦新之助編：無機化学全書Ⅷ-1亜鉛，1962，丸善

昭和 4 5 年度会議開催状況

昭和 4 5 年 5 月 8 日	幹 事 会	4 5 年度研究方針の討議及び診断指針(案)の決定
6 月 2 5 日	班 長 会	研究方針の討議
6 月 2 9 日	幹 事 会	研究方針ならびに研究体制の決定
6 月 2 9 ~ 3 0 日	総 会 及 び 研 究 班 会 議	研究方針ならびに研究成果の発表
6 月 3 0 日	地 域 ブ ロ ッ ク 支 部 長 会 議	地域ブロックの発足ならびに活動方針の討議
7 月 2 7 日	幹 事 会	研究費配分方法の決定
9 月 1 9 日	幹 事 会	キノホルム病因説の現状分析とその研究方針の討議
1 1 月 1 3 日	幹 事 会	研究の現状分析と保留研究費の配分についての討議
1 1 月 1 3 ~ 1 4 日	研 究 班 会 議	研究成果の発表ならびに研究打合せ
1 2 月 7 日	班 長 会	研究の現状分析
昭和 4 6 年 1 月 1 2 日	幹 事 会	保留研究費の配分決定
"	組 織 標 本 検 討 会	全国剖検例の第一回討議
2 月 2 8 日	臨 床 班 有 志 懇 談 会	診断指針改訂に関する討議
3 月 1 ~ 2 日	総 会 及 び 研 究 班 会 議	研究成果の発表と総括
3 月 2 日	幹 事 会	研究の現状分析と討議
3 月 8 日	幹 事 会	4 6 年度研究方針の討議

昭和45年度スモン調査研究協議会班員名簿

◎会長 ○班長 △幹事 □監事 ※ブロック支部長

氏名	名称	職名	〒	所在地
疫学班				
青木国雄	愛知県がんセンター研究所疫学部	部長	464	名古屋市千種区田代町鹿子殿 81-1
大平昌彦	岡山大学医学部衛生学教室	教授	700	岡山市鹿田町2-5-1
緒方正名	岡山大学医学部公衆衛生学教室	教授	700	岡山市鹿田町2-5-1
※金光正次	札幌医科大学衛生学教室	教授	063	札幌市南1条西17丁目
倉恒匡徳	九州大学医学部公衆衛生学教室	教授	812	福岡市堅粕1276
児玉栄一郎	秋田県衛生科学研究所	所長	010	秋田市千秋明德町1-40
○△重松逸造	国立公衆衛生院疫学部	部長	105	東京都港区白金台4-6-1
宮坂忠夫	東大医学部保健学科保健社会学教室	教授	113	東京都文京区本郷7-3-1
山本俊一	東大医学部保健学科疫学教室	教授	113	東京都文京区本郷7-3-1
病理班				
青山友三	東大医科学研究所病理学研究部	助教授	105	東京都港区白金台4-6-1
○△江頭靖之	国立予防衛生研究所病理部	部長	141	東京都品川区上大崎2-10-35
太田邦夫	東大医学部病理学教室	教授	113	東京都文京区本郷7-3-1
小川勝士	岡山大学医学部病理学教室	教授	700	岡山市鹿田町2-5-1
小宅洋	新潟大学脳研究所神経病理学教室	教授	951	新潟市旭町通1
河合忠	日本大学医学部駿河台病院臨床病理科	助教授	101	東京都千代田区神田駿河台 1-8-13
斉藤守	東大医科学研究所癌体質学研究部	教授	105	東京都港区白金台4-6-1
△※白木博次	東大医学部脳研究所病理部	教授	113	東京都文京区本郷7-3-1
妹尾左知丸	岡山大学医学部病理学教室	教授	700	岡山市鹿田町2-5-1
武内忠男	熊本大学医学部病理学教室	教授	860	熊本市本庄2-2-1
松山春郎	脳性麻痺研究所病理部	部長	190 -12	東京都武蔵村山市中藤3260

氏 名	名 称	職 名	〒 所 在 地
米 沢 猛	京都府立医科大学病理学教室	助教授	602京都市上京区河原町広小路
渡 辺 豊 輔	長崎大学熱帯医学研究所病理	教 授	850長崎市坂本町12-4
病 原 班			
飯 田 広 夫	北海道大学医学部細菌学教室	教 授	060札幌市北15条西7丁目
池 田 良 雄	国立衛生試験所毒性部	部 長	154東京都世田谷区上用賀1-18-1
石 田 名香雄	東北大学医学部細菌学教室	教 授	980仙台市星陵町2-1
上 田 喜 一	東京歯科大学衛生学教室	教 授	101東京都千代田区三崎町2-9-18
尾 形 学	東京大学農学部 家畜微生物学研究室	教 授	113東京都文京区弥生町1-1-1
奥 野 良 臣	大阪大学微生物病研究所	教 授	564大阪府吹田市山田上
小 沢 敦	国立東京第二病院細菌科	主 任	152東京都目黒区東ヶ丘2-5-1
◎○甲 野 礼 作	国立予防衛生研究所 ウイルス中央検査部	部 長	190 -12 東京都武蔵村山市中藤3260
新 宮 正 久	久留米大学医学部微生物学教室	助教授	830 -91 久留米市旭町67
多ヶ谷 勇	国立予防衛生研究所 腸内ウイルス部	部 長	190 -12 東京都武蔵村山市中藤3260
俵 寿太郎	岡山大学医学部微生物学教室	教 授	700岡山市鹿田町2-5-1
富 山 哲 雄	東大病院分院細菌血清検査室	医局長	112東京都文京区目白台3-28-6
永 田 育 也	名古屋大学医学部 附属無菌動物研究施設	教 授	466名古屋市昭和区鶴舞町65
中 村 昌 弘	久留米大学医学部微生物学教室	教 授	830 -91 久留米市旭町67
△中 谷 林太郎	国立公衆衛生院微生物学部	部 長	105東京都港区白金台4-6-1
東 昇	京都大学ウイルス研究所	教 授	606京都市左京区聖護院河原町53
本 間 遜	東大医科学研究所細菌研究部	教 授	105東京都港区白金台4-6-1
松 橋 直	東大医科学研究所アレルギー部	教 授	105東京都港区白金台4-6-1
光 岡 知 足	理化学研究所動物薬理研究室	主 任	351埼玉県北足立郡大和町広沢2-1
三輪谷 俊 夫	大阪大学微生物病研究所	助教授	564大阪府吹田市山田上
田 村 善 藏	東大薬学部薬品分析化学教室	教 授	113東京都文京区本郷7-3-1

氏名	職名	所在地
井上幸重	京都大学ウイルス研究所 助教授	606 京都市左京区聖護院河原町53
臨床班		
伊東弓多果	伊東内科医院 院長	085 釧路市住吉町9
右京成夫	京都大学医学部第一内科 助手	606 京都市左京区聖護院河原町53
大月三郎	岡山大学医学部神経精神医学教室 教授	700 岡山市鹿田町2-5-1
大藤真	岡山大学医学部第三内科 教授	700 岡山市鹿田町2-5-1
奥田観士	岡山大学医学部眼科 教授	700 岡山市鹿田町2-5-1
大村一郎	国立呉病院第一内科 医長	737 呉市青山町1-10
□※補井賢造	和歌山市立城南病院 院長	640 和歌山市真砂町2-14
※黒岩義五郎	九州大学医学部 脳神経病研究所神経内科 教授	812 福岡市堅粕1276
小坂淳夫	岡山大学医学部第一内科 教授	700 岡山市鹿田町2-5-1
越島新三郎	国立東京第一病院神経科 医長	162 東京都新宿区戸山町1
鹿野信一	東大医学部眼科学教室 教授	113 東京都文京区本郷7-3-1
※杉山尚	東北大学医学部 温泉医学研究施設鳴子分院内科 教授	989-68 玉造郡鳴子町新屋敷67-1
祖父江逸郎	名古屋大学医学部第一内科 助教授	466 名古屋市昭和区鶴舞町65
※高崎浩	三重県立大学医学部附属病院 教授	514 津市栄町1-96
※椿忠雄	新潟大学脳研究所神経内科 教授	951 新潟市旭町通1
○△豊倉康夫	東大医学部脳研究所神経内科 教授	113 東京都文京区本郷7-3-1
早瀬正二	岐阜大学医学部附属病院 内科学第二教室 教授	500 岐阜市司町40
△※平木潔	岡山大学医学部第二内科 教授	700 岡山市鹿田町2-5-1
藤原哲司	京都大学医学部附属病院第三内科 助手	606 京都市左京区聖護院河原町53
三好和夫	徳島大学医学部第一内科 教授	770 徳島市蔵本町3丁目

スモン調査研究協議会研究報告書

№ 3

昭和45年度病原斑研究報告

昭和46年3月20日発行

発行所 スモン調査研究協議会
東京都品川区上大崎 2-10-35
国立予防衛生研究所内

代表者 甲野礼作

印刷所 瑞穂印刷産業有限会社
渋谷区幡ヶ谷 3-69-5