

# 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30~100TCD<sub>50</sub>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 <sup>a</sup>	Result of virus isolation <sup>b</sup>
1		Sep. 18, '69	Nov. 19, '69		+ <sup>c</sup>
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, '59		Mar. 5, '70	-
7		Mar. 30, '68		Feb. 4, '70	+ <sup>d</sup>
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 <sup>o</sup>
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	+	

<sup>o</sup> 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 <sup>a</sup>
No. of patient			
1	62	+ <sup>b</sup>	
2	84	+	
3	159	- <sup>c</sup>	
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 TCD<sub>50</sub> 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 <sup>a</sup>	320	160	< 5	< 5
strain aseptic meningitis	50	320	N.D. <sup>b</sup>	< 5	< 5
strain aseptic meningitis	50	320	160	< 5	< 5

a. 50% endpoint of serum dilution against 30~100 TCD<sub>50</sub>

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 <sup>a</sup>	+ <sup>b</sup>	+
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 $\mu$  の filter を通過するが100 m $\mu$  の filter は通らない。

第 7 表

### Filtrability of the virus

Average pore diameter	Log <sub>10</sub> TCD <sub>50</sub> post filtration
450 m $\mu$	4.5 <sup>b</sup>
220 m $\mu$	1.5
100 m $\mu$	<0.5
prefiltration <sup>a</sup>	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 <sup>a</sup>
2	for 18hrs, at 4°C	< 0.5	5.3
3	for 6 hrs, at 4°C	2.3	5.5

a. Log<sub>10</sub> TCD<sub>50</sub> 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<sup>-1</sup> 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 <sup>50</sup>	Yield <sup>a</sup> (TCD <sub>50</sub> /ml)	CPE <sup>a</sup>
Sample				
Dilute passage at 10 <sup>-1</sup>	The 1st (A), 0.1 ml	3.5 <sup>b</sup>	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. Log<sub>10</sub> TCD<sub>50</sub>

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℃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℃			
	0	1	2	3
8.0	5.8 <sup>a</sup>	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. Log<sub>10</sub> TCD<sub>50</sub> 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

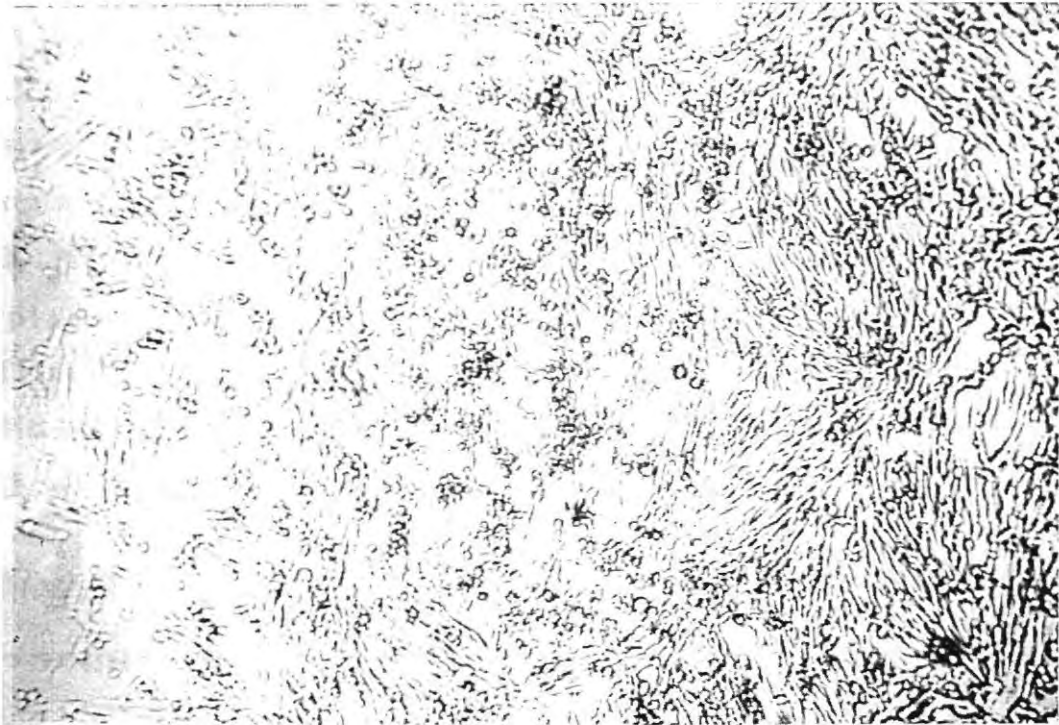
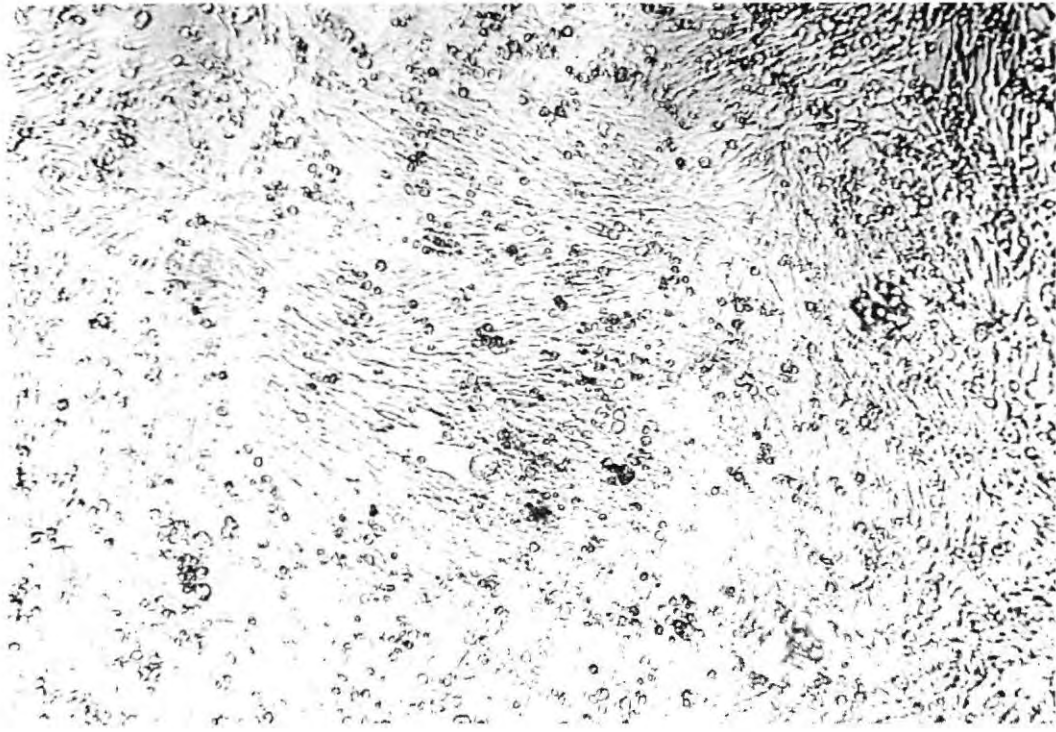


図 1. 上：正常 BAT-6 細胞，無染色。  
下：ウイルスによる細胞変性効果（CPE）。

# 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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>

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） $2 \gamma/ml$ ，テトラサイクリン（明治の crystalline tetracycline hydrochloride） $5 \gamma/ml$  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  $70 \sim 110 m\mu$  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  $^3\text{H}$ -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。

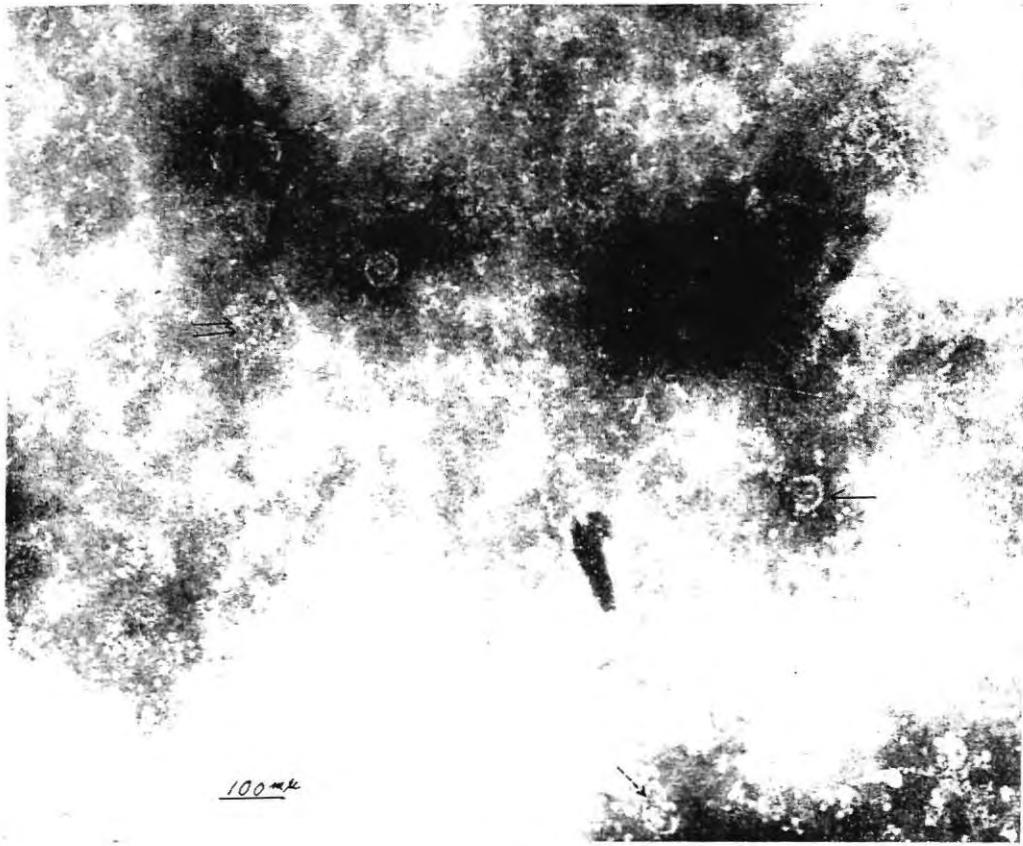


图 1

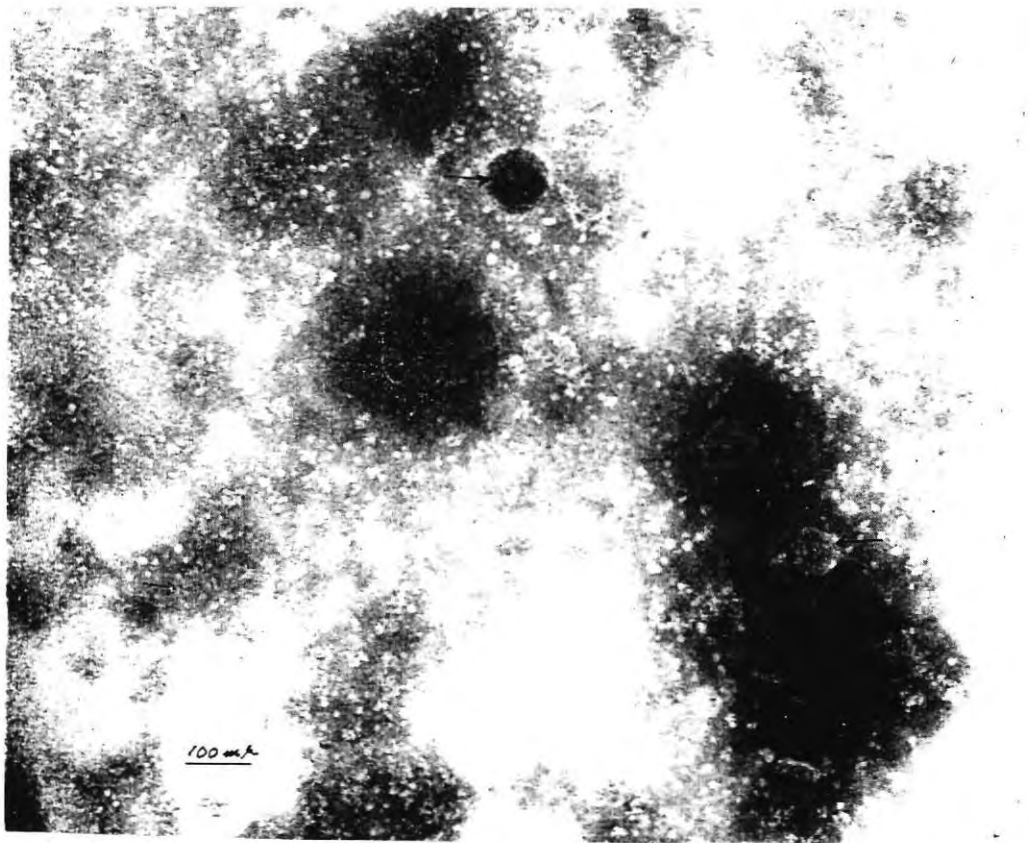
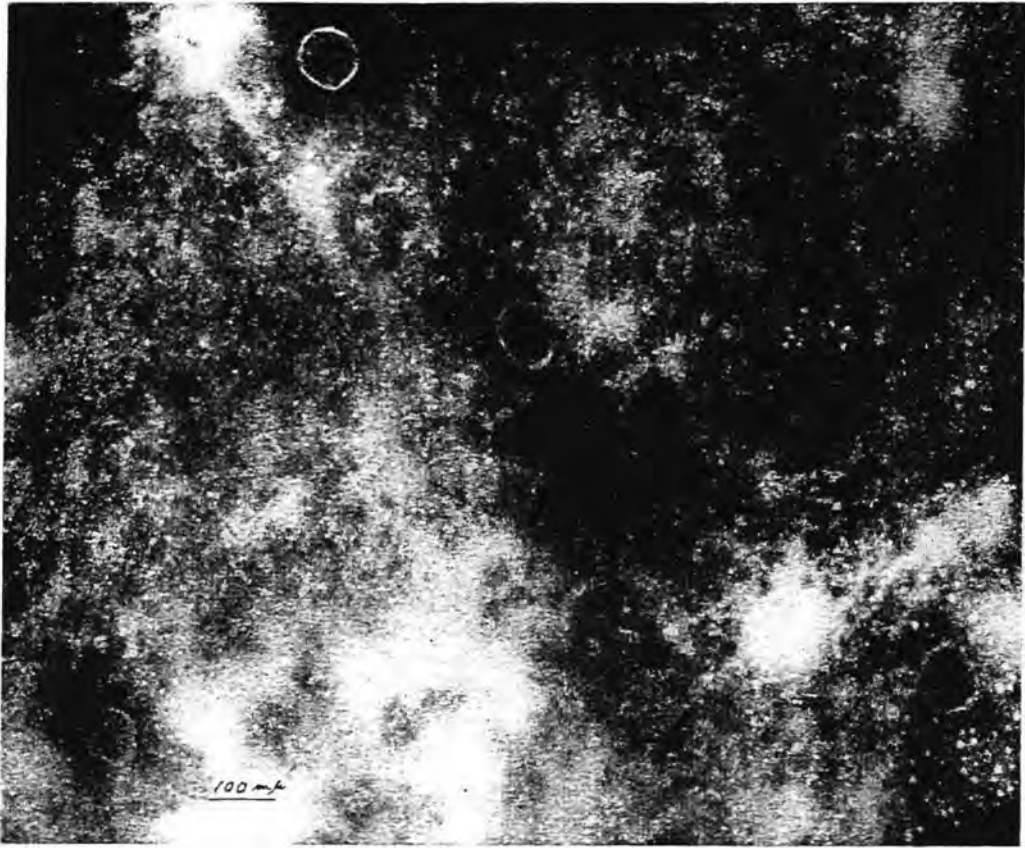
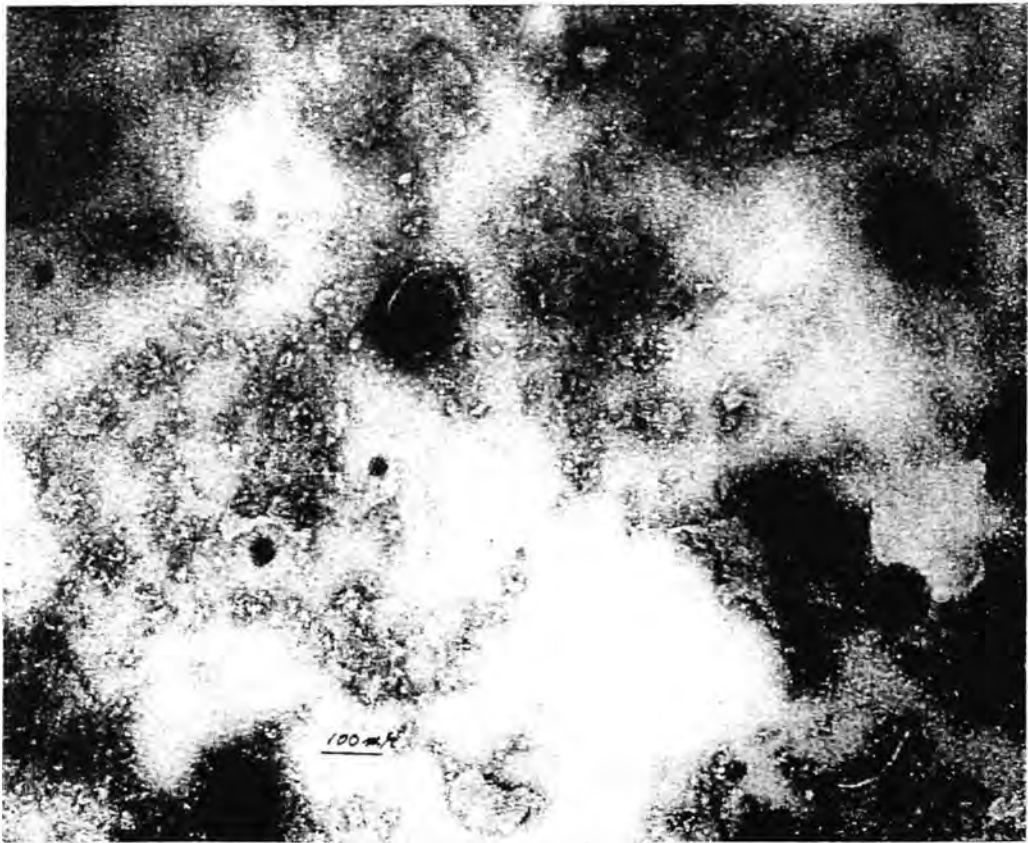


图 2



☒ 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。<sup>1)</sup>

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，<sup>2)</sup> 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0.2mlを接種，37°C1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200TCD<sub>50</sub>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0.2ml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つたが，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つたが，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， $10^{5.5}$  TCD<sub>50</sub>/0.2ml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(450mμ)とGS(220mμ)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1mlにクロロホルム0.05ml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 $10^{5.5}$  TCD<sub>50</sub>/0.2ml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5γ/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) PPLO-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。<sup>3)</sup>

#### 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 SA<sub>7</sub> 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つた。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。