

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°C 1 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。

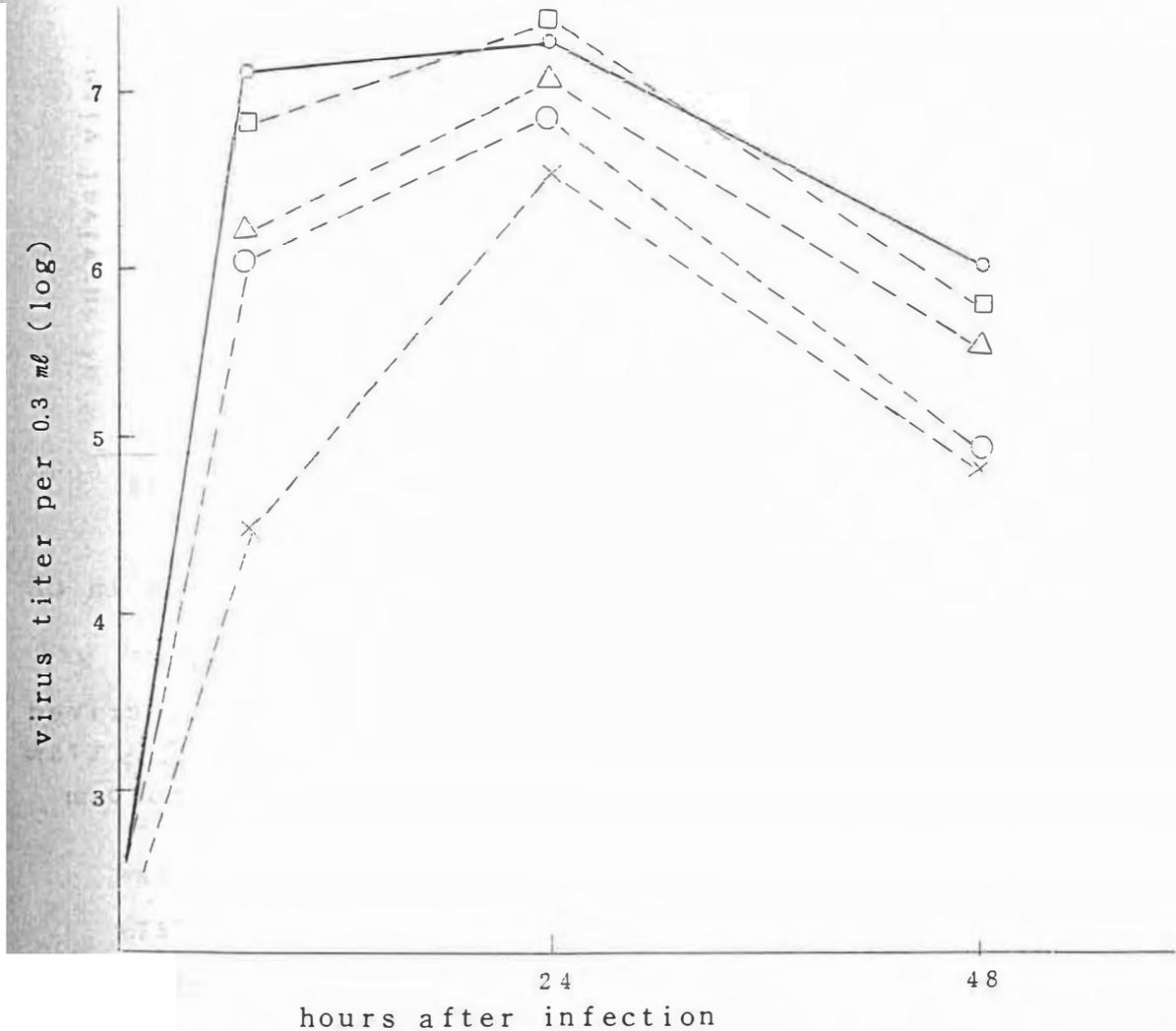


Fig 1-a Effect of chionoform on Sindbis virus multiplication in CE cells.

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.

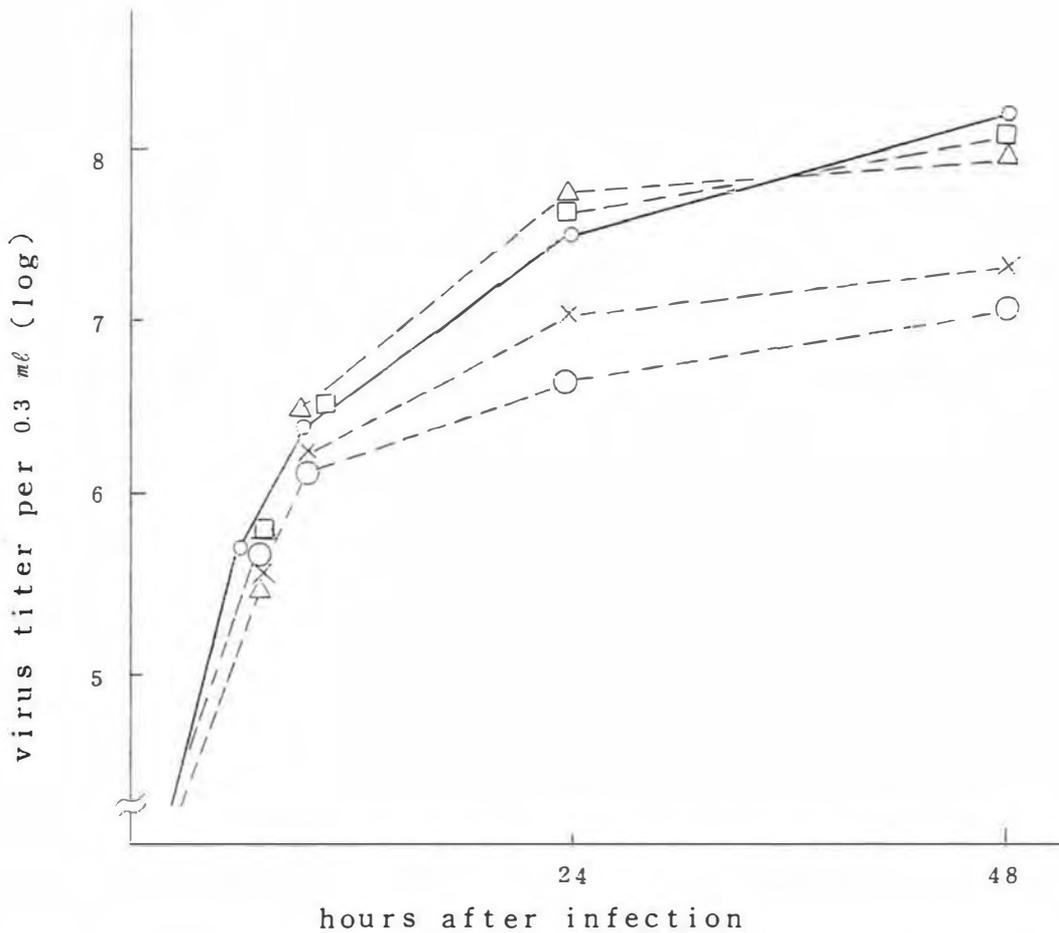


Fig 1-b Effect of chionoform on NDV multiplication in CE cells

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。

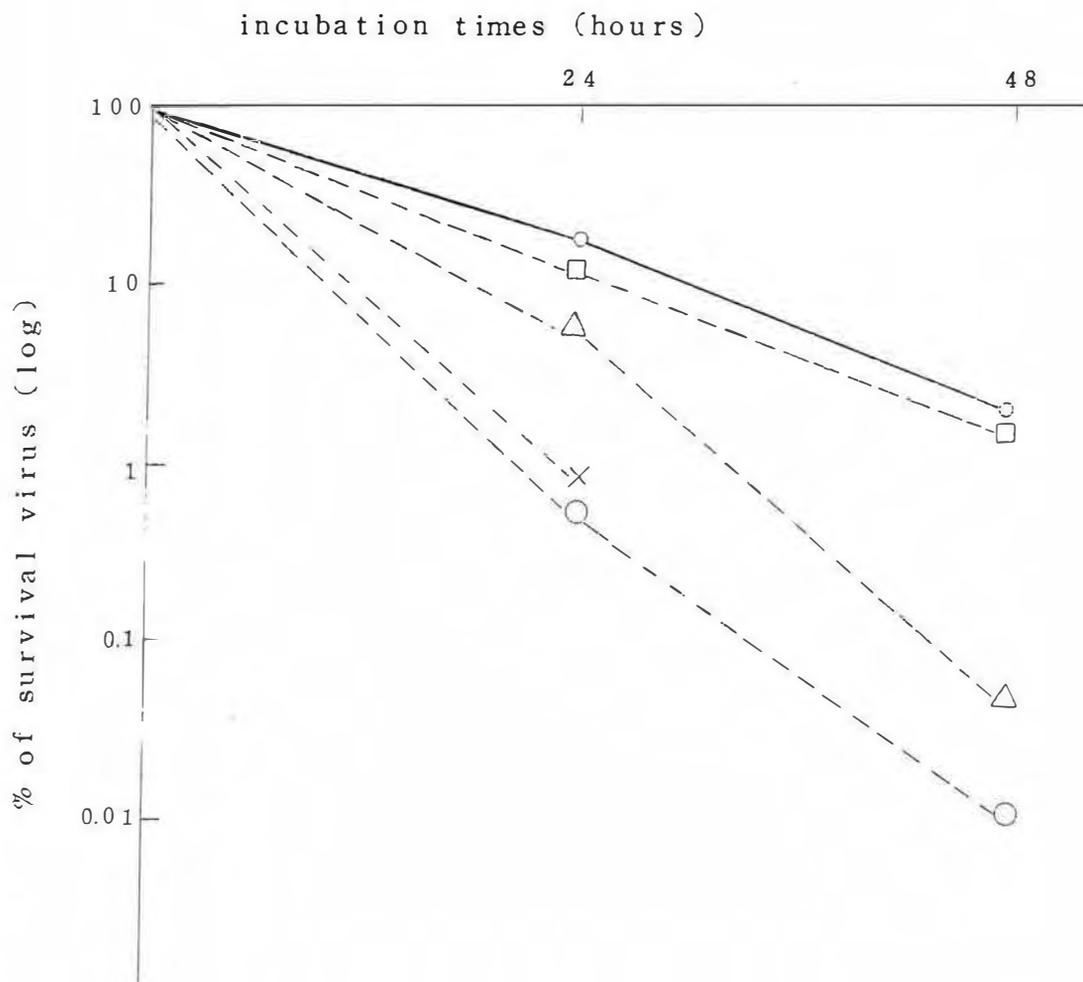


Fig 2-a Inactivation of Sindbis virus by chionoform

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 (○—○).

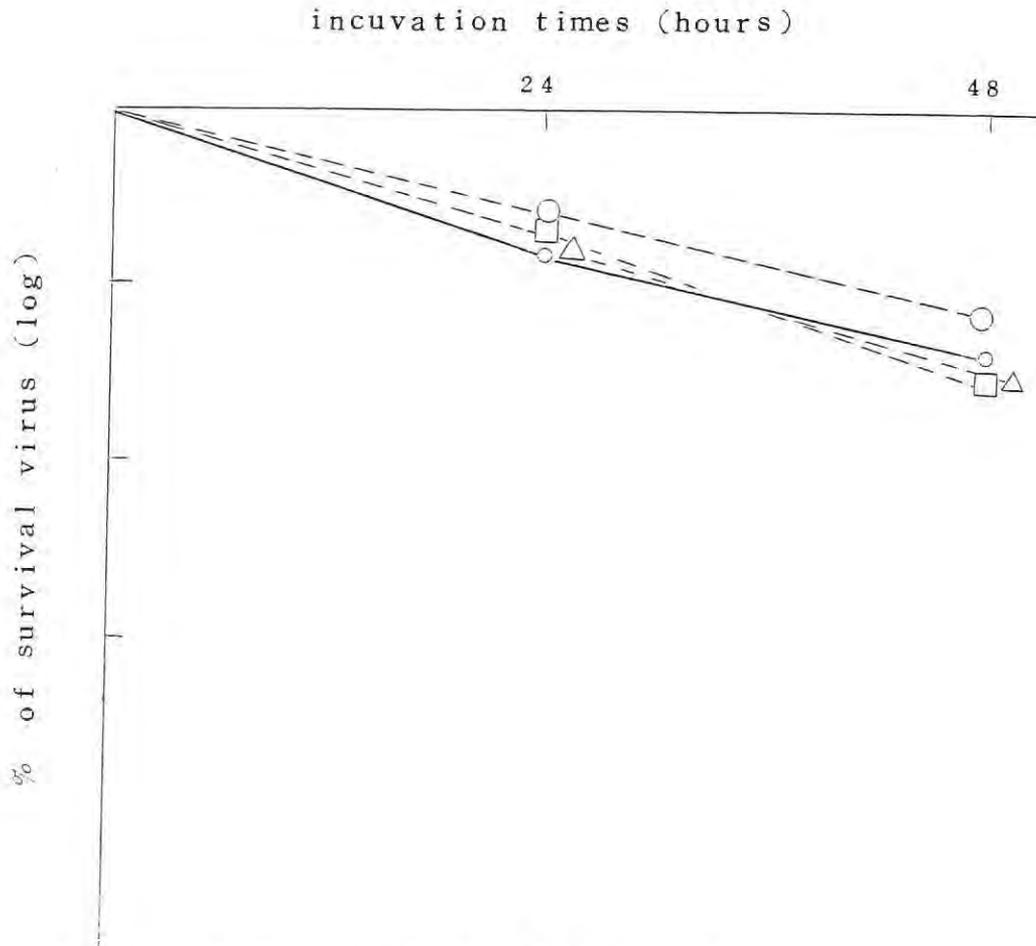


Fig 2-b Inactivation of NDV by chionoform

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カ価, 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。

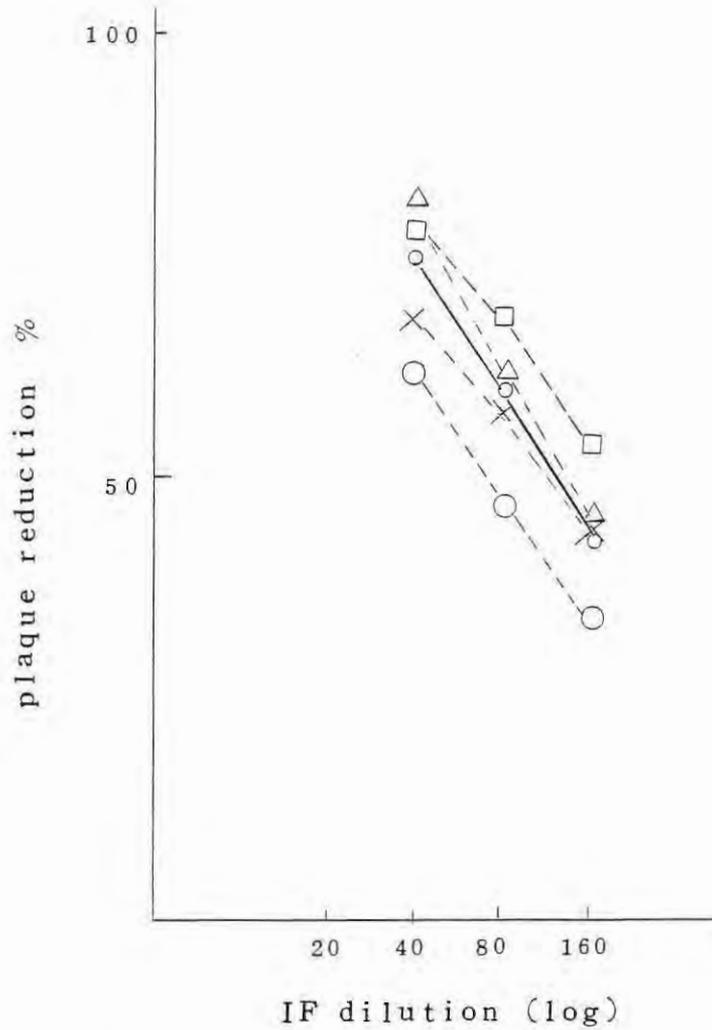


Fig 3-a Effect of chionoform on IF production by Sindbis virus in CE cells

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.

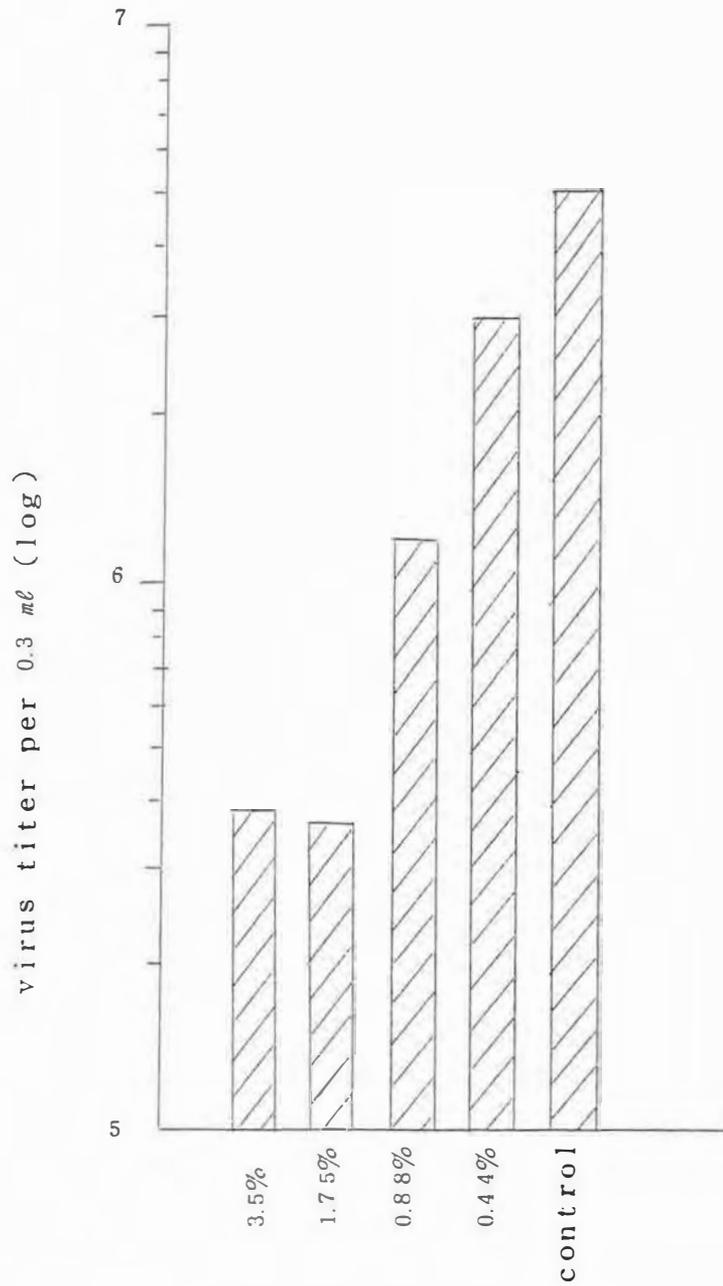


Fig 3-b Effect of chionoform on Sindbis virus multiplication in CE cells.

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カ価をプラック法で測定した。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った。

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でつくった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った。

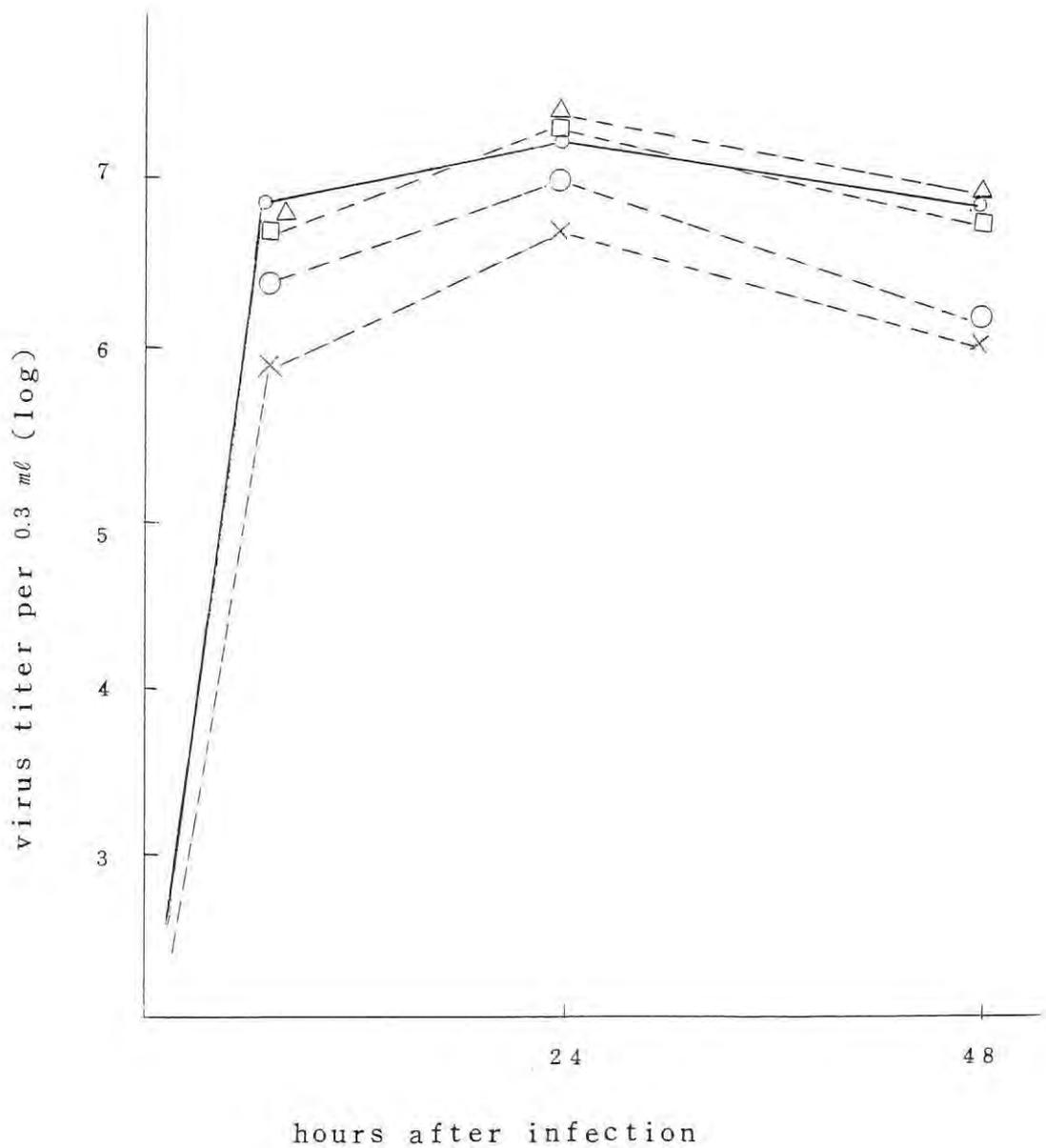


Fig 4-a Effect on the yield of Sindbis virus in CE cells by pretreatment of chionoform

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 (○—○).

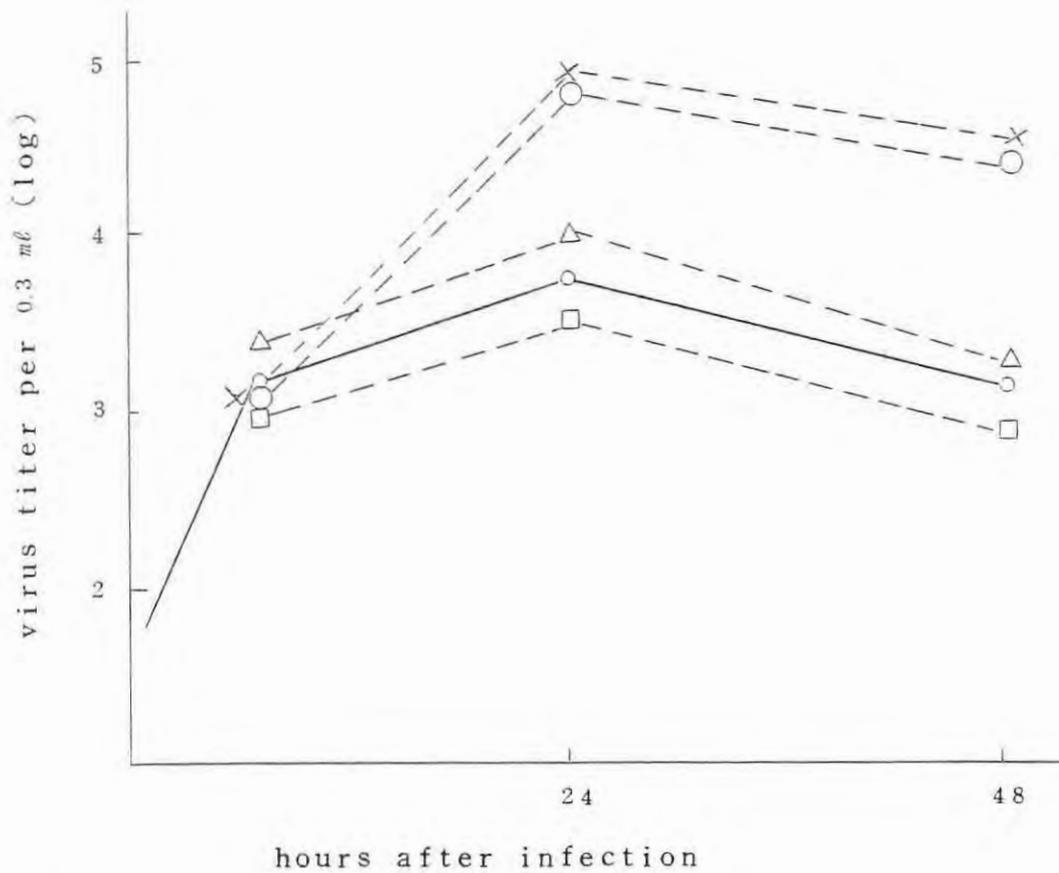


Fig 4-b Effect of chionoform on the action of IF

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).

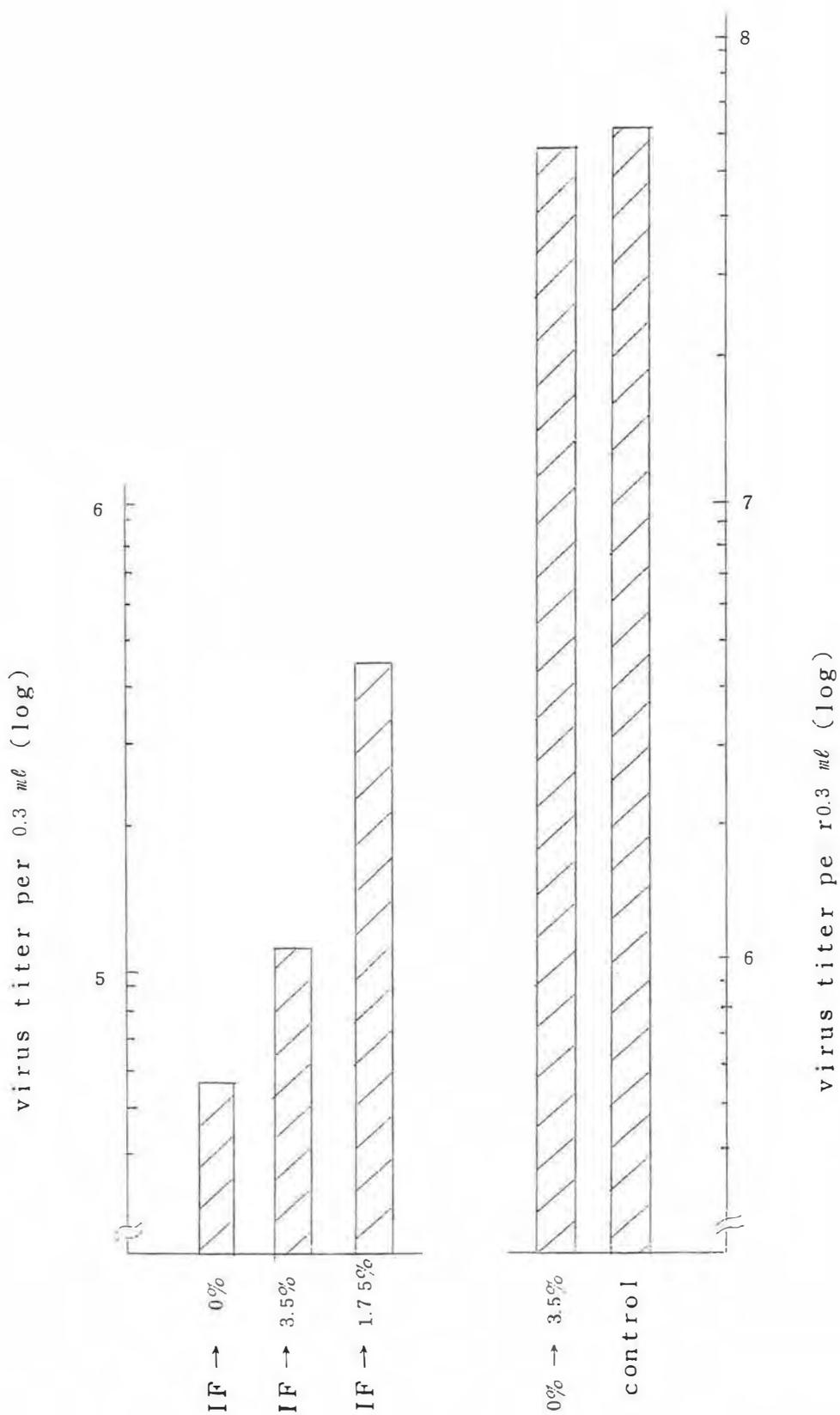


Fig. 4-c Effect of chionoform on the yield of Sindbis virus in IF pretreated cells.

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 μ 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、 $-\log TCID_{50}/ml$ 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にした。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 (卅)
- №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 (卅)

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、2ml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

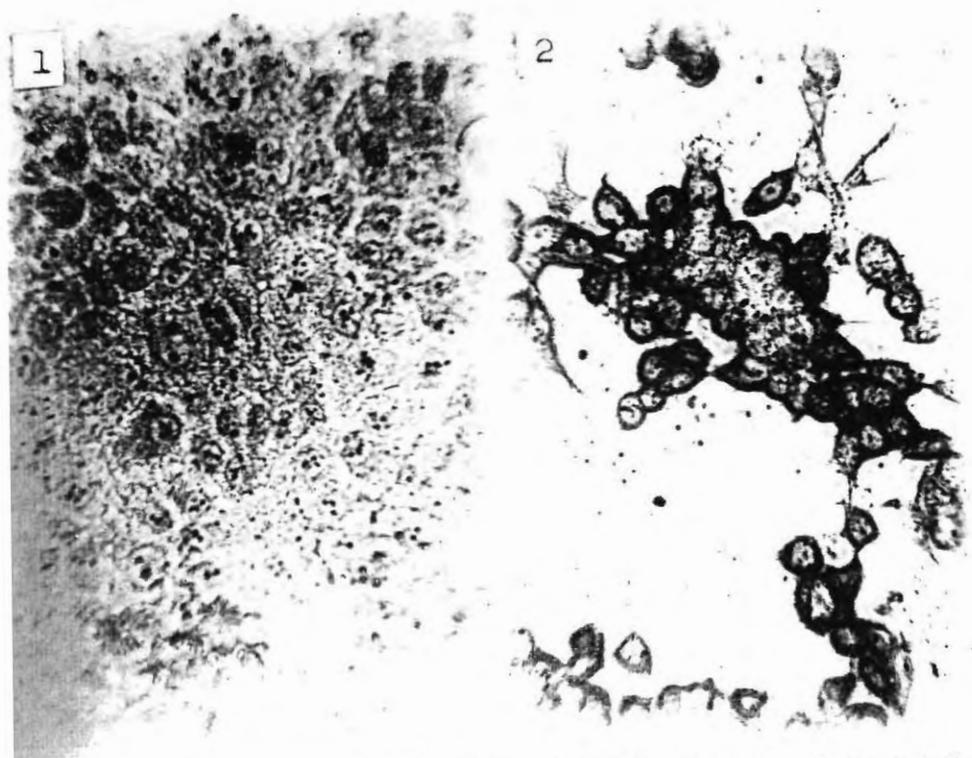


図 1. (1) は健康人糞便接種後 4 日の MDCK 細胞で、なほ健全なる細胞の単層発育を示す。
 (2) は SMON 患者糞便接種 3 日の MDCK 細胞にみられる CPE を示す。

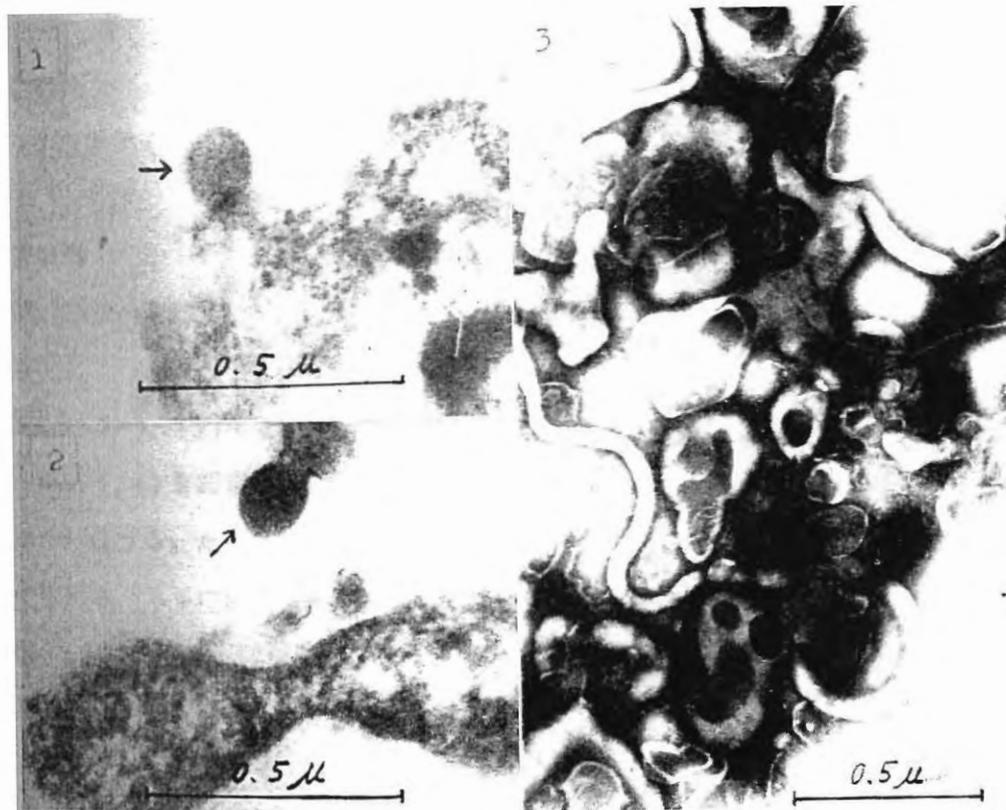


図 2. (1) および (2) の矢印はウイルス粒子を示す。
 (3) は PTA で陰性染色したマイコプラズマで、球状からフィラメント状までの多形態性を示す。

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。