

スモン調査研究協議会研究報告書

No.10

昭和 46 年度微生物部会研究報告

昭和 47 年 3 月

スモン調査研究協議会

序

本書は実質的にはスモンをめぐる微生物学的研究に関する第二の報告集である。しかし前回の分は病原班研究報告という形で、キノホルムに関する実験研究報告も含まれていたもので、今回の報告は唯一の純粋な微生物学部の研究報告書となる。

スモン調査研究協議会は昭和47年3月13日の総会において、「スモン患者と診断された患者の大多数はキノホルム剤の服用によって神経障害を起したものと判断される」という結論を下した。では微生物学的研究は無駄であったかという点、ウイルス・マイコプラズマの病原的意義についてのネガティブの成績は派手ではないが、上記の結論を下すための陰の支持者として立派な役割を果たして来たといえる。またスモン患者の腸内菌叢とキノホルムの係わり合いに関する地道な研究成績は腸内細菌学に新しい一頁を加えたものである。

とくに問題になったいわゆる「井上ウイルス」の追試成績は実際は新しいスモン班の中で昭和47年7月20日検討会を行い、特に新しい事実が現われない限り追試研究を凍結するという処置をとったのであるが、その時に発表された成績の多くが、Ⅱ. ウイルス学的研究の中に含まれている。組織上はスモン調査研究協議会から特定疾患調査研究スモン班へ発展的に変ったが、スモンの場合は研究は連続的に進行しており、ある程度報告がオーバーラップするのは止むを得ないところであった。

スモン調査研究協議会

会 長 甲 野 礼 作

目 次

序.....	1
I 細菌学的研究	
A スモンと腸内細菌叢	
Vioform 経口投与によるマウス腸管内細菌叢の変動と宿主の反応	
小沢 敦ほか	3
キノホルム投与によるSMON様症状発現に対する腸管感染の意義	
三輪谷俊夫	10
サル・ニワトリの腸内細菌叢におよぼすキノホルムの影響	
光岡 知足	12
キノホルムの健康人腸内細菌叢に及ぼす影響 ...中谷林太郎ほか	15
数種類の腸内細菌叢構成菌群のキノホルム感受性	
中谷林太郎ほか	16
スモン剖検例の細菌学的検査成績	20
SMON患者の腸内細菌叢——連続検査成績とキノホルム服用	
中谷林太郎ほか	23
キノホルム投与中止1年後のSMON患者の腸内細菌叢の変化	
中谷林太郎ほか	25
B スモンとマイコプラズマ	
マウスにおける <u>Mycoplasma neurolyticum</u> の病原性に関する実験的研究 ...	
尾形 学ほか	31
イヌを用いたマイコプラズマおよびキノホルムの接種実験例	
俵 寿太郎ほか	37
SMON患者舌よりのマイコプラズマの分離... 中村 昌弘ほか	41
SMON患者の舌苔および糞便より分離したMycoplasmaの同定	
本間 遼ほか	44
SMON患者由来 <u>Mycoplasma salivarium</u> によるCFおよびPHA反応	
富山 哲雄	49

II ウイルス学的研究

S M O N のウイルス学的研究 — 1971 —	井上幸重ほか	55
S M O N 患者脊髄液の新生マウス接種実験	松岡 幸彦ほか	67
「井上ウイルス」の追試に関する分担研究報告	奥野 良臣ほか	69
井上博士のスモン関連ウイルスに関する追試	飯田 広夫ほか	70
S M O N 病原因子の検討	北原 典寛ほか	75
S M O N 病原因子の検討		
2. 接種マウスの病理組織学的検索	内田 信之ほか	80
スモン研究班報告	石田名香雄ほか	88

I 細菌学的研究

A スモンと腸内細菌叢

Vioform経口投与によるマウス腸管内細菌 叢の変動と宿主の反応

小沢 敦，後藤 甚作

(国立東京第二病院 細菌科)

坂 口 弘

(慶応義塾大学医学部 病理学教室)

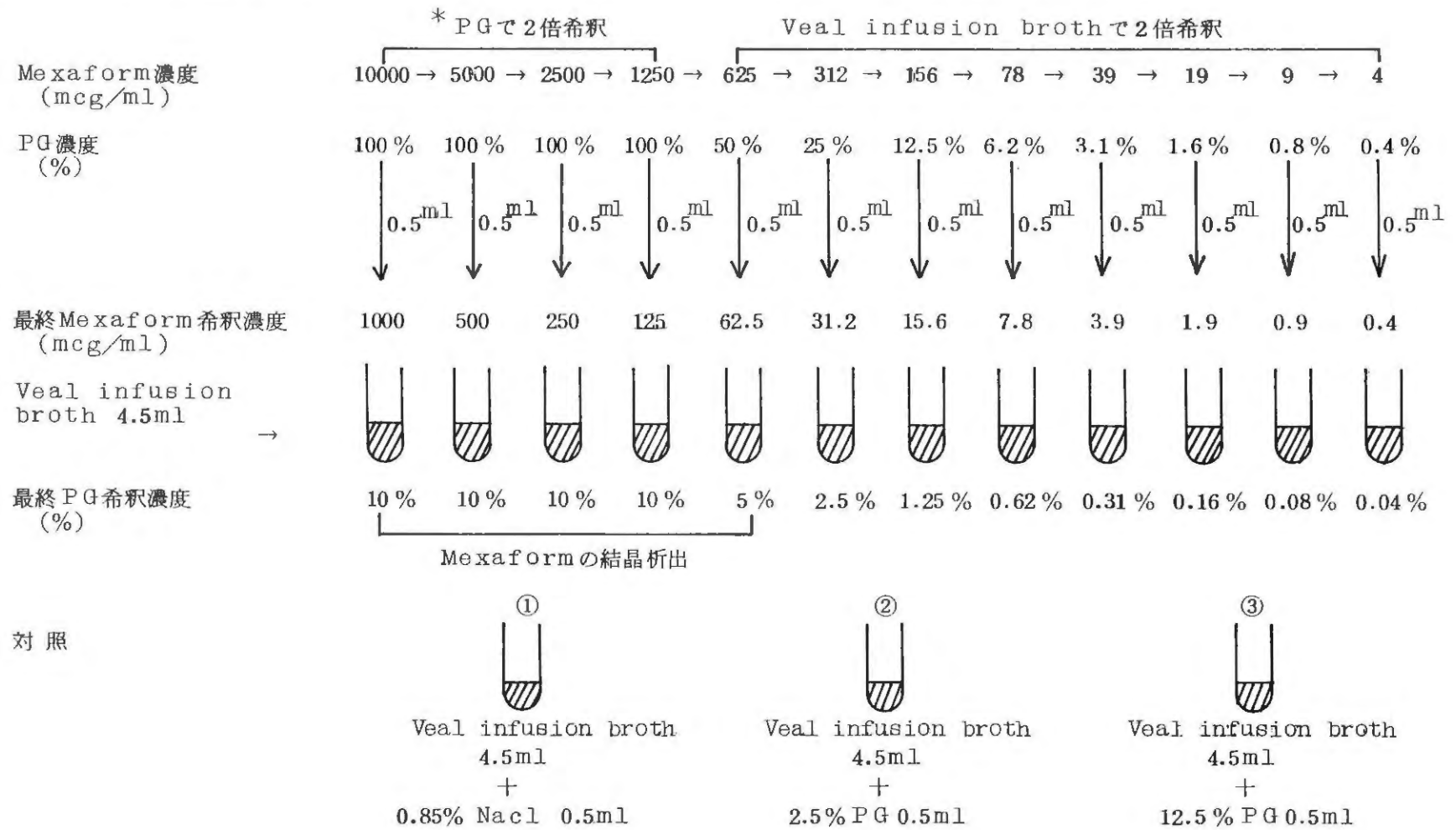
我々は、Mexaform およびVioform(5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline)の各種細菌にたいする抗菌作用とVioform経口投与によるマウス腸管内細菌叢の変動 および 宿主の反応について検討を加えたのでそれらの結果について報告したい。

実験方法

1) MexaformおよびViiformの抗菌試験; MexaformはViiform;Entobex=10;1の割合に混合して1-2propylene glycol(PG) に加温溶解して使用した。また使用した培地はveal infusion broth(Difco)である。Mexaformの抗菌試験の方法は図1に示すごとくであり mexaformの溶解度はPGの濃度とmexaformの濃度とに相関し、Mexaform 62.5 mg/ml 以上の濃度においてはMexaform の結晶が析出し、抗菌試験を実施することは不可能であったので、実験は 31.2 mg/ml 以下の濃度について実施された。なお対照として3本の試験管を用意し、PGそのものによる菌の増殖抑制効果を検討するため、2.5%PG含有veal infusion broth1.25%PG veal infusion broth と食塩液対照とを設けた。使用菌株は、スモン患者糞便由来、胆汁由来の各種菌株および非スモン患者由来の大腸菌(*E. coli*)を使用した。接種菌液は寒天平板培地24時間培養菌より菌液を作製し、光電比色計540 mμ のfilter を用い、透過率を61%に合わせたものを使用し、その0.1mlを接種して24~48時間後に増殖阻止効果を判定した。3本の対照群については、それぞれ菌の定量的評価を行った。

2) マウス経口投与実験; 供試マウスは市販雑系(dd 系)マウスおよび、*Salmonella enteritidis* に対して均一の感受性を示す近交系のDKIマウス(慶大医学部 微生物学教室より分与)の15~17gの体重のものを雌雄の別なく使用した。Vioform は0.85%NaCl液を用いて、0.24 mg per ml, 2 mg per ml, 10 mg per ml の3段階の濃度の懸濁液を作成し、上記のマウスに1ml づつ経口投与して、投与後経日的に糞便を採取し、糞便1コあたりの各種細菌叢(non-sporingのobligate anaerobesであるCatenabacteria, Veillonella Peptostreptococcus についての積極的な検討はしなかった。)の定量的評価をして、Vioform 投与前のそれと比較検討した。また上記のように、Viiform の各種濃

図1. Mexaformの抗菌試験方法



* : PG= 1.2- Propylene Glycol の略

度の懸濁液を経口投与されたマウス群の他に、つねに0.85% NaCl液のみの経口投与群設けて、対照群として経日的に糞便中の各種細菌叢の動態的観察をおこなった。死亡したマウスおよび適当な時期に屠殺したマウスの各臓器は10%ホルマリン液に固定し、病理組織学的検索用に供した。

成 績

1) MexaformおよびVioformの抗菌作用

mexaform のスモン患者および非スモン患者糞便由来の各種菌株に対する抗菌効果は、菌種の差により著名な差異は認められないようであり、その最小発育阻止濃度(MIC)は15.6~31.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間に認められた。また菌種によって2.5% PGそのものによっても部分的な増殖抑制効果が認められたが、この傾向はとくにCitrobacter, Klebsiella等の菌株において出現するように思われた。一方Vioformのみによる臨床材料(尿および胆汁)から分離されたE. coli, Pseudomonas, Klebsiella, Citrobacter, Proteus, mirabilis, Retlgerella等に対する抗菌作用はMexaform(Vioform:Entobex=10:1に含まれている)のそれと比較して差は認められず、その最小発育濃度は15.6~31.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間にあった。

2) マウス経口投与実験

雑系dd系マウスにVioform 0.24 mgが連日投与された場合の糞便内細菌叢の動態を経日的に追跡すると、投与前と比較して著明な細菌叢の攪乱は認められず、また対照群(NaCl液のみ連日投与された群)と比較しても菌叢の動きに差異は認められないようである。すなわち、Lactobacillus, Enterococcusは安定した変動を示し、 $10^7 \sim 10^8$ の菌数の幅で動揺していた。またCandidaも $10^5 \sim 10^6$ のレベルで動揺は少いが、E. coliは投与群で $10^4 \sim 10^8$ の幅で動揺を示し、対照群でも大体投与群と同様 $10^4 \sim 10^8$ の幅で、比較的変動が激しかった。E. coliの変動のパターンと類似した様相がStaphylococcus epidermidisにおいても観察され、その他Klebsiella, Citrobacter, Proteus vulgaris, Pseudomonasが出没し、Clostridiumは検出されなかった。また投与群6匹中2匹が投与後18日目、20日目に死亡したが、その中の1匹においてある種の神経症状の発現が認められたが、そのマウスの各臓器の病理組織学的所見では、著明な変化はみられなかった。

つぎにDKIマウス(純系マウス)にVioformを連日2 mg投与した場合の糞便中の各種細菌叢の定量的追跡を、かなり長期(約2カ月間)にわたって経日的に実施した。その結果、Vioform投与群と非投与群の対照マウスとの間の各種菌叢の、質的量的な変動のPatternに著明な差異は認められないが、投与群において投与開始後2週間目頃よりCandidaが出没している傾向が認められた。投与群、対照群において、Enterococcus, Lactobacillusの量的な動揺の幅は少く、 $10^7 \sim 10^8$ の間で比較的安定しており、E. coliおよびStaphylococcus epidermidisは投与群、対照群ともに量的変動の幅が大きく、 $10^1 \sim 10^7$ の幅で大きく動揺している。その中でPseudomonasが $10^2 \sim 10^5$ の幅で動揺しているのがみられた。Vioform投与マ

ウス8匹中1匹が、投与開始後41日目で死亡した。そして生残マウスは投与開始後60日目で屠殺、10%ホルマリン中に全臓器が固定され、病理組織学的所見の検策がなされた。

Vioform 2mg 連日投与期間中、5日目、13日目、19日目、26日目、34日目、53日目にマウス糞便から分離された E. coli の Vioform に対する感受性を Vioform 投与前にマウス糞便から分離された E. coli のそれと比較すると、それらの抗菌効果の上に著明な差はみとめられないようであるが、投与開始後19日目以降に分離された E. coli に対する Vioform の抗菌作用は、やや減弱されているように思われた。

さらにまた、DKIマウスに Vioform を連日 10 mg 経口投与して動態的に糞便中の各種細菌叢を定量的に追跡した。Vioform 10 mg 投与マウスは、全例(6匹)投与開始後12日目から51日目の間に死亡し、Vioform の DKIマウスに対する毒性が高く評価されたようである。死亡したマウスは、肉眼的に共通して腎の腫大が認められたのが注目された。

Vioform 10 mg 投与群マウスおよび非投与対照群マウスの糞便中各種細菌叢の動態的追跡の結果、10 mg 投与群マウスにおいては対照群マウスに比較して、E. coli の菌数(per, fecal, pellet) の著明な増加のパターンが観察され、このような E. coli の動きのパターンに相呼応して、Staphylococcus epidermidis の菌数の動きが認められ、E. coli の動きのパターンと、Staphylococcus epidermidis の動きのそれとは類似していた。投与群マウス糞便中の E. coli の菌数の増加は、投与前の $10^3 \sim 10^4$ のレベルから $10^7 \sim 10^8$ のレベルにまで増加していたが、対照群では $10^3 \sim 10^5$ のレベルで動揺していた。Enterococcus, Lactobacillus Bacteroides の糞便中の菌数は、投与群、対照群ともに著明な差異は認められず、Enterococcus, Lactobacillus は $10^8 \sim 10^9$ のレベルでの動揺で安定していた。

投与群の1例のマウスにおいては、糞便中の E. coli の菌数の増加が著明でなく、他のマウスに比較して死後の延長(51日目に死亡)が認められたのが注目されよう。

一方において、2 mg 投与群、10 mg 投与群、および対照群のマウスの各臓器の病理組織学的検策の結果、つぎのような所見が観察された。腎は対照群、2 mg 投与群ではほとんど変化が認められない。間質の小円形細胞浸潤が見られたものもあるが、対照群にもみられるので、これは non-specific な変化と思われる。1例に水腎症がみられたが、これは薬剤の影響によるものでなく、実験以前からあった変化と思われる。他の1例は皮髄境界部(近位尿細管直部およびヘンレ係蹄大脚)に空泡変性がみられた。この部は最も薬剤の影響を受けやすい部分なので、キノホルムによる変化を否定できない。

10 mg 投与群では、いずれも近位遠位尿細管、それ以下乳頭管に至るまで内腔の拡大が著しく、上皮は扁平、淡明となっており、腔内には近位では顆粒粉、遠位では硝子様円柱を入れている。ことに乳頭管では、やや黄色調の強い物質が腔内にみられる。(鉄染色陽性ならば、キノホルムの可能性があろうか)。いずれにしても全体の像は、ネフロン上部の細胞の変性崩壊物が腎内下部尿路、すなわ

ち乳頭管を機械的に閉塞し、尿細管内に尿の停滞したいわゆるnephrohydrosisの像を示している。肝は10 mg 投与群では所々肝細胞原形質が濃縮、一部では細胞質の濃縮、核崩壊など軽い単細胞壊死(single cell necrosis)の所見を示している。また4例中3例はKupfferの星細胞に、ヘモジデリンと思われる褐色色素の沈着がみられる。その他10 mg 投与群では、肺にうっ血を増すものがやや多く認められたが、その他の臓器ではVioform 投与群と対照群との間に差はみとめられなかった。腎、肝における組織学的所見は表 1 に一括して示してある。なお脊髄などの病理組織学的所見の追跡はなされていない。

表 1 Vioform 2mg, 10mg 投与マウスの腎、肝における病理組織学的変化

Vioform 投与量	腎				備 考	肝				
	糸球体	近位尿細管	遠位尿細管	集合管・乳頭管		細胞濃縮	脂肪変性	小円形細胞	出血	星細胞 ヘモジデリン
	ボーマン腔 拡大	変 拡 円 性 大 柱	変 拡 円 性 大 柱	変 拡 円 性 大 柱		質 縮				
2 mg	—	— — —	— — —	— + —	水腎症 皮髄界 空泡変性	—	—	—	—	—
2	—	— — —	— — —	— — —		—	—	—	—	—
2	—	+ — —	+ — —	— — —		—	—	—	—	—
2	—	— — —	— — —	— — —		—	—	—	—	—
10	—	+ 卅 +	+ 卅 +	+ 卅 +	水腎症	+	—	+	—	+
10	+	+ 卅 +	+ 卅 +	+ 卅 +		+	—	—	—	+
10	—	+ 卅 +	+ 卅 +	+ 卅 +		+	—	—	—	+
10	—	+ + +	+ + +	+ + +		卅	+	—	—	—
対 照	—	— — —	— — —	— — —		—	—	—	—	—
対 照	—	— — —	— — —	— — —		—	—	+	—	—

考 察

Sackmannら¹⁾がMexaformおよびVioformの各種菌株にたいする抗菌作用を検討し、MexaformおよびVioformのbacteriostatic activityは2~32 mcg/mlの間の幅で存在し、両薬剤の静菌作用は同程度に評価されたと報じている。さらに mexaform は Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus, Salmonella typhi, Shigella sonnei, Candida albicansに対してVioformに比較して、相加的、あるいは相乗的のbactericidal activityを発揮したが、Pseudomonas aeruginosa, E. coli, Streptococcus faecalisに対してはbacteriostatic

activityは4~32^{mcg}/_{ml}の間で評価されたが、bactericidal activityは著明に低下しており、1000^{mcg}/_{ml}以上でも認められなかったとしている。私の実験においては、以上のようなMexaformの菌株の差によるselectiveなbactericidal activity に対する検討を行っていないが、Mexaformの溶媒であるPG(1,2-propylene glycol)の濃度が高くなれば、PGそのものによってもbactericidalな効果が出てくることを考慮にいてbactericidal activityを評価すべきであり、Sackman らの実験においてこれらのことが如何に反映されているかがひとつの疑問点として残されている。Vioform を漸次増量投与して、マウス腸管内細菌叢の反応を観察すると、小量(0.24 mg, 2 mg)連日投与した場合においては、総体的に対照群と比較して糞便中細菌叢の量的、質的な変化は認められず、また宿主にたいする障害作用も著明ではないが、大量(10 mg)投与の場合においては共通して、E. coliの著明な増加(E. coliの増加のパターンはStaphylococcus epidermidisの菌数の動きに類似していた)が認められ、宿主にたいする障害作用もかなり強く発現され、腎においては近位尿細管、遠位尿細管、集合管において変性と拡大を主徴とした変化がみとめられ、肝においては細胞にヘモジデリン色素の沈着が認められる結果が得られた。E. coliの菌数の著明な増加がVioformによる他の菌叢(Bacteroides, Enterococcus, Lactobacillus)の攪乱によって引き起こされたものであるのか、またVioformによる宿主側の要因が修飾された結果として発現したのかは、今後の解析に待たねばならないが、少なくとも提示された実験成績は、E. coli以外の菌叢の量的平衡状態が破れてその結果として、E. coliの菌数の増加が引き起こされたものであろうという考え方を積極的に支持するものではない。Eismanら²⁾は、ラットにたいするMexform投与実験において、Mexaformが糞便中のE. coliの菌数の増加とCandidaの増殖抑制効果を指摘し、これらの効果はnormal enteric floraが外来菌の感染に抵抗し、ecological barrierとしての役割に関連して重要であるとのべている。一方Sackmann らはMexaformをラットに投与し、糞便中の細菌数が増加することを報じ、これはMexaformの各種菌株にたいするSelectiveなbactericidal activityによるものであろうとし、このようなMexaformのもつ選択的な抗菌スペクトラムが、腸管感染を支配する重要なFunctionであろうとしている。腸管内におけるnormal enteric inhabitantsが外来菌の感染に抵抗し、そのecological barrierとしての役割が高く評価されてきた一連の研究の流れの中で、Vioformの小量連続投与のenteric floraにたいするaction pattern, すなわちそのecologicalなbalanceを攪乱しないという一面をとりあげて考察するとき、Vioformのもつantibacterialなfunctionとenteric floraのもつ生態学的排除機構の和としてVioformの作用を評価していいではなからうか。一方においてVioformの大量連続投与がマウス腸管内細菌叢の攪乱とくにE. coli菌数の増加をもたらすと同時に宿主にたいして障害的に作用するという事実は、薬剤とnormal enteric floraお

よび宿主という3つの因子の相関の上にたって考察評価すべきであろうと思われる。E. coliの増加とVioformによる宿主障害作用とが如何に連関するかは、さらに解析的研究が推進されなければならないが生体に経口投与されたVioformの代謝に腸管内細菌叢の質的、量的な構成が関与しているであろうことを認識する必要性が提起されているように思われる。

文 献

- 1) Sackmann, W and Kraddfer, F: Antibakterielles Spektrum and Beeinflussung der Darmflora von Ratten durch Jodchloroxy-chinolin, Phenanthrolinchinon and deren Kombination. (Mexaform). Zbl. Bakt., 181, 539-550, 1961.
- 2) Eisman, P. C, Weerts, J, Jaconia, D. and Barkulis, S. S: The effect of Mexaform on the intestinal flora of rats. Antimicrob. Agents Ann., 224-230, 1960.

キノホルム投与によるSMON様症状発現に 対する腸管感染の意義

三 輪 谷 俊 夫

大阪大学微生物病研究所

キノホルム投与によるSMON様症状発現に対する腸管感染の意義を検討するため、まず、ニワトリを用いてコントロール実験を行なった。

1. 孵化鶏卵に対するキノホルム毒性

オートクレーブにて120°C、10分間滅菌したキノホルム懸濁液10mg、1mg、および0.1mg/0.4mlを1群6コ、孵化6日卵の卵黄嚢内に0.4mlずつ1回注射した。10mg投与群では24時間ですでに血管は退化し、3日目には発育を中止した。キノホルム投与群のうち0.1mg投与群の1コのみ例外を除き、3～7日目に発育は中止し、孵化鶏卵に対してキノホルムは強い毒性を示した。

2. ニワトリの幼若ビナ（孵化3～7日目）に対するキノホルム投与実験

雑系ニワトリの予備実験後、孵化7日目のブロイラ用（ハバード種）の幼若ビナ（60～65g）、♂、♀、について1群10羽とし、キノホルム単独、CMCまたはポリエチレングリコールで乳剤にしたものの経口投与実験を行なった。

第1回目の実験（観察期間：2カ月）では最初の1カ月間は200mg/kg 1日1回投与、第2カ月目は400mg/kgを経口投与したが、特記すべき病変は認められなかった。

第2回目の実験では4カ月間キノホルムを次のように投与した。

第1カ月目	500mg/kg	（CMC、またはポリエチレングリコールにより乳剤として経口投与した）。
第2カ月目	1,000mg/kg	
第3カ月目～第4カ月目	2,000mg/kg	

の投与により3カ月目の終り頃からキノホルム投与群すべてに軽重の差こそあれ、歩行の異常をみとめた。歩行異常は漸次増悪し、4カ月の終りには視力障害をみとめるものもあった。投薬開始後4カ月半目に視力障害を認めたものを屠殺し、病理学的検索を行なった。

病理学的処見

1. 後根神経節の核濃縮、核消失、ノイロフギアが随所にみられた。
2. 坐骨神経：軸索線維の不規則化および髄鞘の不揃いがみられた。
3. 脊髄神経：対照に比し髄鞘の不揃いがみられた。ただし、対照にあっても哺乳動物に比べ末梢神経の髄鞘は粗であるため、投与群の髄鞘変化は哺乳動物の場合ほど顕著ではない。
4. 脊髄の病変：腰髄の灰白質部に限局性のstatus spongiosis（海綿様状態）を認めた。これは哺乳動物（イヌ、サル、ヒト）のキノホルム症には認められない変化である。

後索、側索には顕著な変化は認められない。これはミエリンが対照でも少ないことによるのかも知

れない。（以上の病理学的検索は共同研究者，谷口の協力によるものである。）

以上の結果から，キノホルム投与によるスモン様症状発現の機作を解明する動物実験系としてはニワトリは不適であると結論せざるをえない。（共同研究者：谷口春生 大阪府立成人病センター）

サル・ニワトリの腸内菌叢におよぼすキノホルムの影響

光岡 知足

(理化学研究所)

要 旨

サルおよびニワトリにキノホルムを経口投与し(サルでは, 300 ~ 400 mg/day, ニワトリでは, 1 g/kg/day), その腸内菌叢におよぼす影響を検討したところ, 対照群と比較し, キノホルム投与群において, 総菌数・Bacteroidaceae, Catenabacterium, Lactobacillus, Bifidobacteriumの減少とEnterobacteriaceaeの増加することが認められた。これは, SMON患者の腸内菌叢の変動においてみられた所見とよく一致した。

はじめに

さきにわれわれは,¹⁾ SMON患者の腸内菌叢が健康人のそれと比較し, 異常率が高いことを報告し, さらにその傾向は, キノホルム服用群において著しいことを認めた。今回は, ヒトに最も近似した腸内菌叢をもつサルとニワトリ(盲腸)にキノホルムを投与した場合, 腸内菌叢にいかなる影響をおよぼすかを検討し, これをスモン患者にみられた腸内菌叢の変動と比較した。

材料および方法

ニワトリは, ふ化後10日令のヒナを対照群(9羽), キノホルム投与群(9羽)の2群に分け, キノホルム投与群は, キノホルム1000 mg/kg/dayを抗生物質を含まない飼料に混じて連続投与し, 投与後2週目において, 対照群, 投与群各5羽, 5週目において各4羽をと殺し, その盲腸内容について菌叢の検索を行なった。

サルは, 予研江頭らがキノホルム300 ~ 400 mg/dayを連日投与した10匹で, そのキノホルム投与後22日目の大便を用いた。対照としては, キノホルム投与群とほぼ同一日令の10匹のサルの大便を用いた。

菌叢検索の方法はMITSUOKA et al.(1965), MITSUOKA(1969)に準拠した。

成 績

サルにおいては, キノホルム投与群と対照群の間に著しい差異が認められた(表)。すなわち, キノホルム投与群においては, 対照群に比して総菌数・Bacteroidaceae・Catenabacterium, Spirillaceae・Spirochaetaceaeの著しい減少~消失($P < 0.01$), Lactobacillusおよびyeastsの中等度の減少($P < 0.005$), Enterobacteriaceaeの著しい増加($P < 0.01$)が認められた。

一方, ニワトリにおいては, キノホルム投与群のうち2例は, キノホルム投与2~3日目に片脚の運動障害を起こし, うち1例は, 14日目に食欲減退, 翼をたれ, 視覚障害を起こした。他の1例では

SMON 患者またはキノホルム経口投与動物における腸内菌叢の変動

菌 種	Man (中谷ら) ¹⁾		Monkey		Chicken	
	Normal (35例)	SMON (51例)	Control (10例)	Chinoform (10例) 300-400mg/day	Control (9例)	Chinoform (9例) 1g/kg/dag
Total counts	10.7±0.4 ^a	10.1±0.7 **	10.9±0.4	10.2±0.5 **	10.4±0.4	10.0±0.4 *
Bacteroidaceae	10.2±0.6 (97) ^b	9.2±1.2 ** (96)	10.3±0.4 (100)	7.4±1.6 ** (80)	10.2±0.2 (100)	4.1±0.3 ** (22) **
Catenabacteria	9.7±0.7 (91)	8.7±1.4 ** (75) *	10.1±0.5 (100)	8.8±0.7 ** (60)	9.5±0.4 (100)	0 (0) **
Bifidobacteria	9.9±0.6 (94)	8.8±1.1 ** (82)	10.1±0.5 (100)	9.8±0.6 (100)	9.5±0.7 (100)	9.1±0.6 (78)
Peptostreptococci	8.6±2.0 (34)	8.3±1.0 (33)	9.8±0.5 (100)	9.2±1.0 (80)	9.0±0.5 (100)	0 (0) **
Lactobacilli	7.4±1.8 (100)	6.5±1.7 * (79)	9.5±0.4 (100)	8.8±1.0 * (100)	9.2±0.5 (100)	8.6±0.8 (100)
Streptococci	8.2±1.5 (100)	8.7±1.4 (100)	9.7±0.8 (100)	9.2±0.8 (100)	6.0±0.4 (100)	9.7±0.5 ** (100)
Enterobacteriaceae	8.2±1.3 (100)	8.4±1.3 (100)	8.1±0.7 (100)	9.1±0.7 ** (100)	7.4±0.4 (100)	9.2±0.5 ** (100)
Clostridia	6.1±1.5 (69)	5.9±2.2 (49)	10.4±0 (10)	0 (0)	3.2±0 (11)	5.5±0 (11)
Spirillaceae	n.t.	n.t.	9.6±0.3 (70)	0 (0) **	n.t.	n.t.
Spirochaetaceae	n.t.	n.t.	10.1±0 (20)	0 (0)	n.t.	n.t.
Veillonellae	4.5±1.7 (69)	6.9±2.0 ** (63)	6.8±0.4 (30)	5.6±1.0 (60)	0 (0)	0 (0)
Staphylococci	3.9±1.2 (94)	5.2±2.1 ** (61) *	4.3±1.0 (100)	4.3±1.7 (90)	2.7±0.7 (100)	2.7±0.8 (33) *
Yeasts	3.7±1.3 (74)	4.2±1.5 (59)	5.3±1.2 (100)	4.0±0.8 * (80)	1.7±0.8 (22)	2.0±1.0 (11)

*, **: SMON患者またはキノホルム投与群と対照群とを比較し、推計学的にそれぞれ5%および1%

以下の危険率で有意差あり。 n.t. 検査せず

a: 全く検出されない場合を除き、検出された菌数の平均値のlog±標準偏差

b: 検出率 (%)

右足の運動障害を起こしたが、その他の例では、とくに異常は認められず、体重増加も正常であった。キノホルム投与群の腸内菌叢は対照群と比較し明らかな変動が認められた(表)。すなわち、キノホルム投与群においては、総菌数の減少($P < 0.05$), Bacteroidaceae, Catenacterium, Peptostreptococcus の著しい減少または消失($P < 0.01$) Streptococcus および Enterobacteriaceae の著しい増加($P < 0.01$) が認められた。なお推計学上有意差はなかったが、Bifidobacterium および Lactobacillus においてもやや減少の傾向が認められた。

考 察

以上の成績を、SMON患者にみられた腸内菌叢の変動と比較すると、総菌数Bacteroidaceae, Catenabacterium, Peptostreptococcus, Bifidobacterium, Lactobacillits の減少, Enterobacteriaceae の増加などほとんど両者の変動に一致が認められる。このことは、SMON患者にみられた腸内菌叢の変動が、キノホルム服用と関連をもつ可能性を示唆している。

文 献

1. 中谷林太郎, 中野英一, 山崎恵子, 犬上洋子, 吉田洋子, 後藤延一, 光岡知足, 小沢敦, 後藤

甚作, 井形昭弘, 大村一郎, (1971) SMON患者の腸内菌叢の変化とキノホルム, 医学のあゆみ 78 : 472 ~ 473.

2.. MITSUOKA, T, SAGA, 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.

3. MITSUOKA, T, (1969) An improved method for comprehensive investigation of intestinal flora. Proc. VIII International congress on Nutrition. Prague, Aug, 28 - Sept 5, 422 ~ 424.

キノホルムの健康人腸内細菌叢に及ぼす影響

中谷林太郎，山崎恵子，犬上洋子，吉田洋子

（国立公衆衛生院衛生微生物学部）

S MON患者の大便内細菌叢を調べた結果，異常を呈する例が多いことを見出し，すでに報告した（中谷ほか，1971），（表1参照）。このような細菌叢の異常は，細菌叢構成細菌に対するキノホルムの直接的な発育抑制作用によることも強く考えられたので，健康人大便の細菌を分離同定する際，培地にキノホルムを加えると，各菌群の菌数ならびに検出率がどのように変化するかを調べ，キノホルムの各種菌群に対する発育抑制作用を検討した。

方 法

健康人大便7検体を使用した。腸内細菌叢の定量培養検査には従来どおり光岡らの方法を用いた。同時にキノホルムを $5\mu\text{g}/\text{ml}$ および $50\mu\text{g}/\text{ml}$ に加えた培地を使用し，キノホルムを含まない培地で測定された菌数や検出率と比較した。

結 果

表1に示すとおりである。

1. キノホルム含有培地で測定した菌数の変化

Catenabacteria, *Peptostreptococci*, *Streptococci*, *Veillonellae* 等ではかなり著明に菌数が減少し，また総菌数および他の菌群の多くも菌数減少傾向を示した。しかし *Enterobacteriaceae* ではほとんど影響がみられなかった。

2. 検出率の変化

キノホルム $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培地では，一部の菌群が検出されない例が増加した。

3. S MON例との比較

キノホルム含有培地での総菌数，*Catenabacteria* 菌数の減少などはS MON患者の場合とよく似ている。また各種菌群の検出率の減少もS MON患者の場合と同様な傾向がみられた。

考 察

以上の結果は，S MON患者で観察された腸内細菌叢の異常状態の一部はキノホルムの直接効果と考えても矛盾しないことを示している。しかしキノホルムの抗菌力は弱いためS MON患者におけるほどの著明な変化はみられなかった。しかし，S MON患者では長期間キノホルムの投与を受けていた例も多いので，感受性菌は減少をつづけ，一方非感受性菌は変化しないか，増加するような可能性も十分想像される。その結果，キノホルムの弱い抗菌作用が増巾されて，菌叢の異常状態をきたしたと考えられよう。

表 1 . キノホルム含有培地における健康人腸内細菌叢構成菌群の発育の変化

菌 群	健 康 人 (7 例) ^a						健 康 人 ^b (3 5 例)		S M O N 患者 ^b (5 1 例)	
	培 地 中 キ ノ ホ ル ム 含 有 量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)									
	0		5		50					
	菌 数 ^c	検 出 率 ^d	菌 数	検 出 率	菌 数	検 出 率	菌 数	検 出 率	菌 数	検 出 率
Total	10.6		10.3		10.1		10.7		10.1 ^{**}	
<u>Bacteroidaceae</u>	10.3	100	10.0	100	9.9	100	10.2	97	9.2 ^{**}	96
<u>Catenabacterium</u>	10.4	71	8.3	57	8.3	57	9.7	91	8.7 ^{**}	75 [*]
<u>Bifidobacterium</u>	9.4	100	9.3	86	9.0	86	9.9	94	8.8 ^{**}	82
<u>Peptostreptococcus</u>	9.2	71	8.2	71	8.3	71	8.6	34	8.3	33
<u>Lactobacillus</u>	6.1	100	6.2	100	5.9	100	7.4	100	6.5 [*]	79
<u>Streptococcus</u>	7.1	100	6.2	100	5.4	71	8.2	100	8.7	100
<u>Enterobacteriaceae</u>	7.1	100	6.8	100	7.1	100	8.2	100	8.4	100
<u>Clostridium</u>	5.5	86	4.8	86	4.8	57	6.1	69	5.9	49
<u>Veillonella</u>	6.7	86	6.7	86	4.2	57	4.5	69	6.9 ^{**}	63
<u>Staphylococcus</u>	3.7	43	3.6	29	2.3	14	3.9	94	5.2 ^{**}	61 [*]
<u>Bacillus</u>	4.1	57	2.8	43	0	0	3.1	6	6.4	20
Mold	0	0	0	0	0	0	2.5	14	3.2	2 [*]
Yeast	4.1	71	3.4	71	0	0	3.7	74	4.2	59

a 男 4 例 (32 ~ 46 才), 女 3 例 (26 ~ 49 才)

b 中谷ほか : S M O N 患者の腸内細菌叢の変化とキノホルム . 医学のあゆみ , 78 : 472 - 473 , 1971

c 大便 1 g あたりの菌数の対数平均値

d パーセント

数種類の腸内細菌叢構成菌群のキノホルム感受性

中谷林太郎，山崎恵子，犬上洋子，吉田洋子

(国立公衆衛生院衛生微生物学部)

S MON 患者における腸内細菌叢の異常の原因としてキノホルムの作用が考えられるが，その作用を実験的に調べるためのひとつの方法として，ヒトの腸内細菌叢を構成する主な菌群のうちの数種類の菌群について，キノホルム感受性値を調べた。

方 法

局方キノホルム末をpolyethyleneglycol に5mg/mlの濃度に溶解し，希釈液を作り，これらをEG agarおよびBL agar にそれぞれ5，12.5，25，50 μ g/mlになるように加えて平板とした。対照としてキノホルムを含まない培地を使用した。菌株は21株の偏性嫌気性菌と5株の通性

表1．数種類の腸内細菌叢構成菌群のキノホルム感受性値

Bacterial strain	EG agar		BL agar	
	MIC	ID ₅₀	MIC	ID ₅₀
<u>Bacteroides fragilis</u> 6869	50	25	≥ 50	~ 25
<u>B. thetaiotaomicron</u> AS-126	> 50	~ 25	> 50	> 50
<u>B. distasonis</u> E-32	50	12.5	> 50	50
<u>B. vulgatus</u> F-92	50	12.5	> 50	> 50
<u>Bacteroidaceae</u> EBD 1/4a	5	< 5	5	< 5
<u>B.</u> EBF 59/96p	5	< 5	12.5	< 5
<u>B.</u> EBF 61/42	> 50	12.5	> 50	> 50
<u>B.</u> A 402-44	50	12.5	> 50	> 50
<u>Zuberella girans</u>	50	12.5	> 50	50
<u>Sphaerophorus funduliformis</u> 2377	5	< 5	> 50	> 50
<u>S. pseudonecrophorus</u> 2392	5	< 5	> 50	25
<u>Catenabacterium</u> sp. 62	50	12.5	> 50	> 50
<u>C.</u> 77	50	5	> 50	> 50
<u>C.</u> 2	5	< 5	5	< 5
<u>Bifidobacterium adolescentis</u> E 194 a	> 50	50	> 50	> 50
<u>B. adolescentis</u> A 202-16	> 50	> 50	> 50	> 50
<u>B. longum</u> E 1946	> 50	25	> 50	> 50
<u>B. bifidum</u> E 319	> 50	> 50	> 50	> 50
<u>B. infantis</u> S 12	> 50	25	> 50	> 50
<u>B. parvulorum</u> S 50	50	25	> 50	> 50
<u>B. sp.</u> IV	> 50	~ 25	> 50	50
<u>Streptococcus faecalis</u> H62	> 50	> 50	> 50	> 50
<u>Escherichia coli</u> K12 csH-2	> 50	> 50	> 50	> 50
<u>E. coli</u> 0136 633	50	~ 25	> 50	> 50
<u>E. coli</u> 0146 905/65-3	> 50	> 50	> 50	> 50
<u>E. coli</u> 0146 905/65-26	> 50	50	> 50	> 50

MIC Minimal inhibitory concentration (μ g/ml)

ID₅₀ , 50 per cent inhibition dosis. \sim , およその値

嫌気性菌を用いた。(偏性嫌気性菌の大部分は光岡博士から分与を受けた, 表1)。平板培養菌を約 10^8 /ml に緩衝食塩液に浮遊したものを0.05ml ずつ各種平板に塗布し, 37°C で2日間, CO_2 置換スチールウール法によって嫌氣的に培養したのち, 発育集落数を数え, MICと ID_{50} を求めた。

結 果

結果を表1に示す。

1. 培地によるキノホルム感受性値の差

BL agarに較べるとEG agarの方が感受性が低い値にでる傾向が認められた。キノホルムはこれらの培地において溶解が悪いため, $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度以下でのみ実験が可能であった。したがってEG agarを使用することが菌株間の感受性値を比較するのに便利であると思われる。

2. 各種菌群のキノホルム感受性

主としてEG agarにおける ID_{50} 値によって判定し, 他の値を参考にして判断すると次の結果となる。Bacteroidesとその近縁菌11株中4株は高い感受性を示し, 他の5株は中等度の感受性を示した。Catenabacterium 3株中の2株は高い感受性を示し, 1株は中等度の感受性を示した。これに対しBifidobacteria 7株, Streptococcus 1株, E. coli 4株はキノホルムに対し非感受性であった。

考 察

SMON患者の腸内細菌叢のうちBacteroidesやCatenabacteriaは健康人のそれらに比べて明らかに減少している事実が認められている。今回の実験で得られた結果は, これらの菌の多くがキノホルムに比較的感受性であることを示している。したがって, SMON患者の腸内細菌叢の変化がキノホルムの長期服用の影響によると考えても矛盾しないように思われる。ただ今回検査したBifidobacteria菌株はキノホルム非感受性であったことは, SMON患者におけるこの菌群の減少の事実に一致しない。しかしこれは一部のSMON患者の常在菌である Bifidobacteria にキノホルム感受性のものがあるということも考えられるし, また, SMON患者における腸管の病的変化や細菌叢の変化に起因する二次的現象として本来はキノホルムに非感受性なBifidobacteriaの菌数も減少したのとも考えられる。

一方, SMON患者においてStreptococciやEnterobacteriaceaeの菌群の菌数にはほとんど減少が見られず, かえってやや増加の傾向にある事実は, これらの菌がキノホルムに対し非感受性であることから説明できよう。

総 括

Bacteroides 3株, Bifidobacteria 7株, Streptococcus 1株, E. coli 4株のキノホルム感受性を調べた。

1) キノホルム感受性検査にはEG agarのほうがBL agarより感度がよい。

2) BacteroidesやCatenabacteriaはキノホルムに比較的感受性が高いが,

Bifidobacteria や Streptococci, Enterobacteria 非感受性である。

以上のことはSMON患者における腸内細菌叢の異常は、キノホルムに対する各種菌群の感受性の差を示すものと考えられる。

SMON剖検例の細菌学的検査成績

中谷林太郎，中野英一，山崎恵子，犬上洋子

（国立公衆衛生院）

井 形 昭 弘

（東大神経内科）

青 山 友 三

（東大医科研）

光 岡 知 足

（理科学研究所）

1. 4 例の SMON 患者剖検例

1) 症例 Ⅰ 57 才 1970 年 3 月 11 日剖検

病院 キノホルム（1969 年 12 月 30 日～70 年 3 月 11 日，エマホルム毎日 2 g）

髄液：増菌〔カルチャー・ボトル №.2（臨床用チオグリコレート培地），以下同様〕により，

Corynebacterium sp. を検出。

胆汁・小腸内容・大腸内容：Klebsiella pneumoniae を検出。胆汁，小腸内容からはほとんど純培養。

2) 症例 Ⅱ 40 才 1970 年 6 月 10 日剖検

病院（井形ら：肝および腎にキノホルム沈着をみた 1 症例。医学のあゆみ，75：491, 1970）

髄液：増菌により，Klebsiella pneumoniae, Streptococcus を検出。

血液：増菌により，Klebsiella pneumoniae, Streptococcus を検出。

大便：（表 1）菌叢異常。

3) 症例 Ⅲ 49 才 1970 年 8 月 20 日剖検

病院（井形ら：SMON 患者の緑色色素—緑色尿を呈した二症例—。日本医事新報，№. 2421：25，1970，症例 2）キノホルム（4 月末～5 月 9 日，2 g/日・5 月 10 日～6 月 26 日，5 g/日
大便（生前，5 月 26 日）：（表 1）菌叢きわめて異常。

大便（剖検時，8 月 20 日）：（表 1）菌叢きわめて異常。

髄液：増菌により，Enterobacteriaceae, Streptococcus, Staphylococcus, Bacteroidaceae を検出。

胆汁：増菌により，Acidophilus N, Lactobacillus fermenti I を検出。

4) 症例 Ⅳ 73 才 1970 年 9 月 6 日剖検

病院（症例 Ⅰ 同一論文中的症例 1）

キノホルム（2 月 25 日～8 月 7 日，2 g/日）

大便（生前，5月26日）：（表1）菌叢異常。

大便（剖検時，9月6日）：（表1）菌叢異常。Klebsiella pneumoniae を検出。

髄液：増菌により，Bacteroidaceae，Enterobacteriaceae（Proteus），Pseudomonas aeruginosa，Streptococcus，Clostridium，Staphylococcus，Lactobacillus を検出。

血液：増菌により，Bacteroidaceae，Enterobacteriaceae，Streptococcus を検出。

2. SMON患者髄液からの細菌検出例

症例 35才 1970年8月4日検査

病院 キノホルム〔検査前1週前より以後は（－）〕

髄液：増菌により，Staphylococcus epidermidis を検出。

大便：（表1）菌叢異常。

表1. 腸内細菌叢（剖検3例，患者1例）

菌 種	症 例（検査月日）					
	(6.10)	(生前) (5.26)(8.20)		(生前) (5.26)(9.6)		(8.4)
1. <u>Bacteroidaceae</u>	9.6*		4.0	6.9	8.8	9.0
2. <u>Catenabacterium</u>						9.5
3. <u>Bifidobacterium</u>	9.5			6.3		9.1
4. <u>Peptostreptococcus</u>		8.2				
5. <u>Lactobacillus</u>		2.6	5.0	6.3	9.4	3.0
6. <u>Streptococcus</u>	8.5	10.2	6.8	10.3	8.9	8.7
7. <u>Enterobacteriaceae</u>	9.9	8.8	7.4	9.3	8.9	8.8
8. <u>Clostridium</u>			7.3		7.9	5.2
9. <u>Veillonella</u>					6.8	6.0
10. <u>Staphylococcus</u>	7.4			4.8	8.6	8.2
11. <u>Bacillus</u>						
12.Mold						
13.yeast	4.3		3.3			3.7
Total	10.2	10.2	7.7	10.3	9.7	9.8
判 定	異常	異常	異常	異常	異常	異常

*大便中1g当りの菌数のlog

3. 考 察

1) 髄液，血液，胆汁中から種々の菌が検出された。これらの菌が一次的病因であるとは考えられないが，i) 死後の侵入，ii) 材料採取時の汚染，iii) 増菌による正常にも存在しうる少数菌の検出等

も否定できないとはいえ、各種細菌の体内侵入に対する抵抗力の減少が一つの可能性として示唆される。

2) 剖検3例の腸内細菌叢は生前、死後を通じて異常であった。

3) 剖検4例中3例から Klebsiella pneumoniae が検出された。重症度と本菌の関連性が示唆される。

SMON患者の腸内細菌叢

—連続検査成績とキノホルム服用—

中谷林太郎，中野英一，山崎恵子，犬上洋子

（国立公衆衛生院）

光岡知足

（理科学研究所）

井形昭弘

（東大神経内科）

腸内細菌叢を2～3回にわたって調べることできたSMON患者6例と剖検例2例（中谷ら，前報）について，検査時におけるキノホルム服用と菌叢の異常との関係を検討した。

菌叢の検査成績を表1に示す。なお剖検例の成績は前報の表1に示した。

菌叢の正常・異常とキノホルム服用の関係をまとめて表2に示す。(1)検査当時にキノホルムを全く服用していなかった群2例，(2)検査期間中ひきつづき服用中の群2例，(3)最初の検査時には服用，のちには非服用の群4例にわけて示してある。

なお症例 ↓は人工肛門からの小腸内容と旧肛門内容を示べた特殊例である。その成績も同じ表に示してはあるが，これは他の症例とは別に考える必要があると思われる。

キノホルム服用中の菌叢は5/7の割合で異常であり，非服用中のそれは3/8の割合で異常であった。

またキノホルム服用中で異常な細菌叢を示した例では，異常の度合がはなはだしい場合が多かった。

以上の所見はSMON患者でみられた腸内細菌叢の異常（中谷ら）はキノホルム服用と密接な関連を有することを強く推定させる。

表2. 腸内細菌叢連続検査例におけるキノホルム服用と菌叢の関係

キノホルム服用	症例	菌 叢	備 考
1. ⊖ → ⊖		⊖異 → ⊖正 ⊖正 → ⊖正	
2. ⊕ → ⊕		⊕正 → ⊕正 ⊕異 → ⊕異	
3. ⊕ → ⊖		⊕異 → ⊖正 → ⊖やゝ異	
		⊕異 → ⊖異	死亡（前述）
		⊕異 → ⊖異	死亡（前述）
		⊕？ → ⊖？ ⊕異 → ⊖異	人工肛門内容 旧肛門内容

表1. 連続検査例の腸内細菌叢 (7例15検体)

菌種	症 例 (検査月日, キノホルム服用⊕, ⊖)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
	⊖		⊖		⊖		⊖		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕		⊕	

キノホルム投与中止1年後のSMON患者の腸内細菌叢の変化

中谷林太郎，山崎恵子，犬上洋子，中野英一

（国立公衆衛生院衛生微生物学部）

光岡知足

（理科学研究所）

井形昭弘

（東京大学医学部脳研神経内科・鹿児島大学医学部内科第3講座）

健康人の大便内細菌叢に比較すると，SMON患者では異常を呈する例が多く（表1参照），この現象はキノホルムによる直接間接の影響によるものであらうと推察した。今回はキノホルム投与中止1年後に，1970年6～12月に検査した51例中の16例のSMON患者について，再検査したのでその結果を報告する。

方 法

16例のSMON患者の大便を1971年9月に，従来と同一方法を用いて検査した。患者は東京地域在住のものであった。

表1．キノホルム投与中と投与中止後1年後のSMON患者の腸内細菌叢の比較

菌 群	(a) SMON患者 (51例, 1970. 6～12)		(b) SMON患者 (16例, 1970.6～ 8.再掲)		(c) SMON患者 (16例, 1971.9)		(d) 健康人 (35例)	
	菌数 ^a	検出率 ^b	菌数	検出率	菌数	検出率	菌数	検出率
Total counts	10.1		10.3		10.6		10.7	
Bacteroidaceae	9.2	96	9.6	100	10.2	100	10.2	97
Catenabacteria	8.7	75	9.2	75	8.9	81	9.7	91
Bifidobacteria	8.8	82	9.2	81	9.7	81	9.9	94
Peptostreptococci	8.3	33	8.4	25	8.4	44	8.6	34
Lactobacilli	6.5	79	6.5	94	7.5	94	7.4	100
Streptococci	8.7	100	8.9	100	7.9	100	8.2	100
Enterobacteriaceae	8.4	100	9.0	100	8.4	100	8.2	100
Clostridia	5.9	49	6.3	32	7.1	81	6.1	69
Veillonellae	6.9	63	7.7	75	7.0	88	4.5	69
Staphylococci	5.2	61	6.1	56	3.4	56	3.9	94
Bacilli	6.4	20	5.9	19	5.1	19	3.1	6
Molds	3.2	2	0	0	0	0	2.5	14
Yeasts	4.2	59	3.9	63	4.0	81	3.7	74

(a), (d) : 中谷ほか, 1971. SMON患者の腸内細菌叢とキノホルム, 医学のあゆみ

(b) : (a)の中の16例 78:472～473

(c) : (b)の16例をキノホルム投与中止1年後(1971年9月)再検査したもの,
男6例(22～46才) 女10例(33～64才) (年齢は1971年9月現在)。

^a 大便1gあたりの菌数の対数平均値. ^b パーセント.

結 果

1 腸内菌叢の比較(表1)

i) 菌数：キノホルム投与中止1年後〔表1(c)〕には1970のキノホルム投与中〔表1(b)〕に比べて、総菌数 *Bifidobacteria*, *Lactobacilli*, *Clostridia* が増加の傾向を示し、*Streptococci*, *Enterobacteriaceae*, *Veillonellae*, *Staphylococci*, *Bacilli* は減少の傾向を示した。このうち、*Lactobacilli* の増加と、*Streptococci* および *Staphylococci* の減少は著しかった。

なお、*Catenabacteria* の菌数は1年後の方がかえって減少していたが、この意義についてはよく分らない。

ii) 検出率：1年後〔表1(c)〕には *Clostridia* および *Peptostreptococci* の検出率は著明に上昇した。また、*Catenabacteria*, *Veillonellae* および *Yeasts* でもやや上昇の傾向にあった。

2. 異常細菌叢の改善傾向(表2, 3)

キノホルム投与中止1年後の細菌叢がどのように変化したかを各症例ごとに比較した結果を表2に示す。細菌叢の異常、やや異常、正常の判定は、健康人の細菌叢を基準として各症例の細菌叢のバランスを総合的に考慮して行なった。この結果によると、16例中9例(56%)に好転ないし改善がみられ、3例(19%)は不変、4例(25%)は悪化を示した。全体としては改善の傾向がみられたように考えられる。

表2. キノホルム投与中止1年後のSMON患者の腸内細菌叢の異常状態の改善傾向

腸内細菌叢 の変化	例数	変 化	
		1970年 → 1971年	例数
好 転	9	異常 正常	3
		やや異常 正常	3
		異常 やや異常 ^a	3
不 変	3	正常 正常 ^b	1
		やや異常 やや異常 ^b	1
		異常 異常	1
悪 化	4	正常 やや異常	3
		やや異常 異常 ^c	1

a 1例は時々下痢。

b 3日間抗生物質投与中。 c 軟便下痢。

またこれら16例を各検査年度ごとにそれぞれ1集団とみなして比較してみたのが表3の結果である。これからみても、キノホルム投与中止1年後には異常例が減り、正常、やや異常の例数が増加している傾向が明らかである。しかしまだ健康人集団に比べると正常例は少ない。

表3. キノホルム投与中止1年後のSMON患者の腸内細菌叢の異常率の変化

SMON患者(16例)	異常(%)	やや異常(%)	正常(%)
1970年6～8月検査	7(44)	5(31)	4(25)
1971年9月検査	2(12)	7(44)	7(44)

3. 臨床症状の変化と腸内細菌叢の変化の相互関係(表4)

キノホルム投与中止1年後にこれら16例の臨床像がどのように変化したかを、腸内細菌叢の変化と対応させて集計した結果を表4に示す。この1年間に臨床症状がほぼ全治ないし軽快したものは9例(56%)で、不変5例(31%)、悪化2例(13%)となっている。しかし表4にみられるように、

表4. キノホルム投与中止後の臨床症状の変化と腸内細菌叢の変化の相互関係

臨床症状 の変化	腸内細菌叢の変化			計
	好転	不変	悪化	
全治～軽快	4	2	3	9
不変	3	1	1	5
悪化	2	0	0	2
計	9	3	4	16

臨床症状の改善は必ずしも腸内細菌叢の改善と平行しているわけではなく、両者の間にはそれほど明確な相関関係はみられないようである。

考 察

キノホルム投与中止1年後のSMON患者の腸内細菌叢は、全体的な傾向として、各種菌群の菌数と検出率に改善がみられ、また異常例数も減少した。このことは先にキノホルム投与中にみられたSMON患者の高率で高度な腸内細菌叢の異常状態は、キノホルムによる直接的影響が強かったことを示唆している。

一方これらの症例では臨床症状にも改善傾向が認められたが、必ずしも腸内細菌叢の変化と平行していない。この事実、腸内細菌叢の異常状態がキノホルムの直接的影響を強く受けて惹起されると考えられるのに対し、臨床症状の回復は単に腸内細菌叢の改善にのみよるものではなく、他の多くの要因の総合的結果として発現されると考えることによって説明できよう。

総 括

S M O N 患者の16例について、キノホルム投与中と投与中止後1年後に大便内細菌叢の検査を行い、菌数、検出率、菌叢異常率、臨床症状の対比を行なった。投与中止1年後の細菌叢は健康人のそれに近づいた傾向が明らかであった。しかし、臨床症状の改善との相関関係はそれほど明確でなかった。S M O N 患者に認められた腸内細菌叢の異常には、投与されていたキノホルムの直接的影響が大きな要因として関与していたと考えられる。

B スモンとマイコプラズマ

マウスにおける *Mycoplasma neurolyticum* の病原性に関する実験的研究

尾形 学, 跡部ヒサエ, 奥水 馨

(東京大学農学部家畜微生物学教室)

I 要 約

SMONの病因と *Mycoplasma* (以下Mと略)の毒性の関連性に着目し、本菌 中唯一の神経毒素産成菌種として知られる *M. neurolyticum* のマウスにおける毒性について実験的研究を行なった。市販 (conventional) マウスの鼻腔 (29~38%), 気管 (21~25%), 肺 (0~20%), 脳 (0~25%) に *M. neurolyticum* の潜在的感染があることを明らかにしたが、これらのマウスには何等の神経症状も認められなかった。これらのM分離株の24時間培養菌液はマウスの尾静脈内接種により、横回転、運動失調、向上性麻痺などの症状を示し、5時間以内で死亡した。その毒素量は $LD_{50} = 2^{3.2} \sim 2^{5.3} / 0.5 \text{ ml}$ であった。SMONの原因としてMが関与する役割は現段階では否定的である。

II 緒 言

SMON患者の舌苔、糞便あるいは咽頭ぬぐい液から、本間³⁾、中村⁶⁾、甲野⁵⁾、俵¹⁰⁾、妹尾⁴⁾らによってMが分離された。これらのMのうち中村⁶⁾らが患者舌苔より分離したMは *M. salivarium*、甲野⁵⁾らが舌苔より分離したMは *M. orale* Type 1 と同定されたが、他の分離株を含めてこれらのMがSMONの病因としてとくに直接の意義をもつという証拠はえられていない。しかしながら、本間³⁾らは、患者舌苔より分離した株をモルモットの腹腔ならびに静脈内に接種したところ、歩行困難、痙攣等の症状を示し、またこのMはマウスの脳で長期にわたって滞留することを報告した。また妹尾⁴⁾らは、患者下痢便から分離したMをマウスに脳内接種したところ、毛皮立毛、不安状態、知覚麻痺、異常動作などを示すことを報告した。これらのことから、著者らはSMONの病因とMの毒性の関連性に着目し、本菌属中唯一の神経毒素産生菌種として知られる *M. neurolyticum* とマウスの実験系を用い、本菌種のマウスにおける分布ならびに毒性について実験的研究を行なった。以下その成績の概要を報告する。

III 材料および方法

- 1) マウス: *M. neurolyticum* の分離をころみたマウスは外見的に健康な (conventional) 1カ月、および5カ月令dd系 (2飼育場由来) 28匹、ならびに7~14カ月令GPC系14匹である。毒性試験に用いたマウスはICR系 (SPF), ddY系 (SPF) で業者より購入した。
- 2) 分離培養基ならびに分離培養法: Mの分離培養基はPPL0-Agar (Difco) に馬血清20%, 25% (W/V) イーストエキストラクト (日甜) 10%, ペニシリンG 1,000 u/ml, 2.5% 酢酸ナトリウム1%を加えたものを使用した。分離培養法は鼻および気管からは滅菌綿棒によ

り粘液を採取し、肺、脳等はPPL O-Broth (Difco) を用い10%乳剤としたものを分離培地に直接接種し、好氣的に37°C 3~7日間培養した。

3) Mycoplasma株：Mの同定ならび毒性試験に对照として用いた標準株のうち、M. neurolyticum PG-28, M. pulmonis PG-22, M. arthritidis PG-6は、D. G. ff. Edward (Wellcome Research Laboratories, England) より分与を受けた。

4) Mycoplasmaの同定：血清学的性状はClyde¹⁾によって報告された発育阻止試験により決定した。各種生物学的性状の検査は著者ら⁷⁾により先に報告された方法にもとずいて実施した。

5) マウス毒性試験：Mの増殖に用いた培地は、前記分離培地のうちPPL O-Agar (Difco) をPPL O-Broth (Difco) に代え、また酢酸タリウムは除外した。Tully¹¹⁾の法に従がいSPFマウスの尾静脈にMの24時間培養菌液の0.5 mlを接種し、以後症状の経時的観察を行ないマウスの生死を判定の指標とした。

IV 実験成績

1) M. neurolyticumの分離成績

表1に示すように、マウス系統別(飼育場別)ではdd-s系35%, dd-F系50%, GPC系36%であった。これをマウスの部位別にみると鼻腔29~38%, 気管21~25%, 肺0~20%, 脳0~25%であった。このことからマウスの系統(飼育場別)によっては、呼吸器道ばかりでなく、肺、脳等にもかなりのM. neurolyticumが潜在的に感染していることが明らかとなった。

これらのMはすべて、M. neurolyticum PG-28 株家兎免疫血清によって発育阻止され、その生物学的性状はブドウ糖分解性(+), アルギニン分解性(-), メチレンブルー還元性(+), テトラゾリウム塩還元性(+), 溶血性; モルモット血球(β), 馬血球(α)フィルム・スポット産生性(-)であった。

表1 外見上健康なマウスからのM. neurolyticumの分離成績

Mouse strain	Age*	No of mice	Mice	Number of isolations from :								
				Nose		Trachea		Lung		Brain		
				No.pos.%	No.pos %	No.pos.%	No.pos.%	No.pos.%	No.pos.%	No.pos.%	No.pos.%	
dd-s	1	20	7	35	ND		ND		3/16	20	5/20	25
dd-F	5	8	4	50	3/8	38	2/8	25	0/8	0	1/8	13
GPC	7-14	14	5	36	4/14	29	3/14	21	0/14	0	0/14	0

ND: Not done

*: Months

2) 毒性試験

分離株は、株により毒性の強弱の差が認められたが、全株が毒素産生株であった。また株の分離部位による毒性の差は認められなかった(表2)。マウスの系統による毒素感受性の差は認められなかった(表3)。多くのマウスは10～20分の潜伏期のあと、横回転、運動失調、向上性麻痺などrolling disease特有な症状を示し、5時間以内で死亡した。強い毒素産生株では2～5分以内に口から出血性の泡を出して死亡した。24時間培養の毒素量はiv投与法で測定した時、№1株は $LD_{50} = 2^{32} / 0.5 \text{ ml}$, №9株では $LD_{50} = 2^{53} / 0.5 \text{ ml}$ であった(表3)。接種経路による死亡率は静脈内5/5、腹腔内4/5、脳1/5、皮下0/5であった(表4)。

マウス各部位から分離されたM. neurolyticumの毒性試験

表 2

Mycoplasma		Mouse toxicity ****
Recovery site	No. of strains tested	
Nose	8	5 / 5
Trachea	6	5 / 5
Lung	1	5 / 5
Brain	2	5 / 5
Nose	3	4 / 5
Trachea	3	4 / 5
Brain	1	4 / 5
Brain	1*	0 / 5
Lung	1**	0 / 5
Joint	1***	0 / 5

* M. neurolyticum PG-28

** M. pulmonis PG-22

*** M. arthritidis PG-6

**** No. dead / No. inoculated

マウスにおける M. neurolyticum の毒素定量試験

表 3

Strain	Mouse strain	Broth * dilution	Time of death min. after inoculation					Mouse toxicity	LD ₅₀
No. 1	ICR (SPF)	Undiluted	2	2	120	180	180	5/5	23.3
		1 : 2	10	10	10	180	240	5/5	
		1 : 4	60	60	120	120	180	5/5	
		1 : 8	300	460	460	760	—	4/5	
		1 : 16	—	—	—	—	—	0/5	
	dd-Y (SPF)	Undiluted	20	20	60	180	240	5/5	23.1
		1 : 2	60	20	120	120	240	5/5	
		1 : 4	60	80	80	240	300	5/5	
		1 : 8	330	480	960	2880	—	4/5	
		1 : 16	—	—	—	—	—	0/5	
No. 9	ICR (SPF)	Undiluted	3	3	4	4	60	5/5	25.5
		1 : 2	3	3	5	5	180	5/5	
		1 : 4	30	30	60	120	180	5/5	
		1 : 8	60	120	120	180	180	5/5	
		1 : 16	180	180	180	210	240	5/5	
		1 : 32	180	180	180	300	630	5/5	
		1 : 64	—	—	—	—	—	0/5	
	dd-Y (SPF)	Undiluted	3	3	5	5	20	5/5	25.1
		1 : 2	3	3	3	180	240	5/5	
		1 : 4	25	60	60	120	330	5/5	
		1 : 8	60	60	120	180	—	4/4	
		1 : 16	180	210	330	490	540	5/5	
		1 : 32	180	640	900	—	—	3/5	
		1 : 64	—	—	—	—	—	0/5	

* 24 hr broth culture

マウス接種経路による M. neurolyticum 毒性試験

表 4

Route of inoculation	Dose (C F U)	Incidence of death [*]
Intravenous	0.5 ml (4×10^7)	5 / 5
Intraperitoneal	0.5 ml "	4 / 5
Intracerebral	0.03 ml "	1 / 5
Subcutaneous	0.5 ml "	0 / 5

* No. dead / No. inoculated

V 考 察

M. neurolyticum は Mycoplasma 菌属中唯一の神経毒素産生菌種として、マウスに実験的に rolling disease をおこさせることが知られている。しかしながら自然界においては、ウイルスあるいは原虫などをマウスの脳内で継代中に潜在的な M. neurolyticum が活性化し、rolling disease が発現された報告があるのみである。²⁾⁸⁾⁹⁾ 今回の研究から明らかになったように、市販 (conventional) マウスは程度の差はあれ、呼吸器あるいは脳に本菌種の潜在的感染が認められた。しかしながら、このようなマウスは外見的には何等症状はなく、これから分離された M. neurolyticum 菌株の人工培養菌の接種によってのみはげしい神経症状が認められた。

一般に M の病原性を確認することはきわめて困難である。それは本菌属が通常健康な動物あるいは人の呼吸器、性生殖器粘膜の正常細菌叢を構成しており、他の原因による疾病の際に本菌属の分離率が若干高率になることが知られているからである。従って S M O N 患者の口腔、糞便等からの M の分離あるいは分離率の上昇が病因としか結び付くかは、にわかに判定しがたい。現在人由来の M は 8 菌種が知られているが、これらのうち M. pneumoniae を除いてその病原性は確定していない。従って S M O N 患者由来の M については、まずその確実な同定が先決と考えられる。さらに分離された M のマウス等に対する動物実験において、本研究において明らかにされたように使用されるマウスの潜在的 M 感染に慎重な考慮が払われなければならない。特に M 感染の場合、その症状の発現は潜在性の M¹²⁾ あるいは他の微生物および物質の存在によってきびしく規制されることが知られているからである。

今回の研究により、一見健康 (conventional) マウスは M. neurolyticum の潜在感染を広くうけていることが明らかになったが、これらのマウスは何等の神経症状を示さなかった。これ

らのことから、現在の段階でSMONの原因としてMを唆示する結果は全く得られなかった。

文 献

- 1) Clyde, W.A., Jr.(1964):Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by special antisera. J. Immunol., 92, 958-965.
- 2) Findlay, G.M., E.Klieneberger, F. O. MacCallum and R. D. Mackenzie (1938):Rolling disease.New syndrome in mice associated with a pleuropneumonia-like organisms.Lancet, 235, 1511-1513.
- 3) 本間遜, 帖佐浩, 榎本美枝子, 渡部肇, 富山哲雄, 甲野礼作(1971):SMON患者の舌苔および糞便よりMycoplasmaの検出。スモン調査研究協議会研究報告書, №3, 83-92.
- 4) 妹尾左知丸, 井上正直, 横村英一, 俵寿太郎(1971):スモンの病因に関する実験的研究。スモン調査研究協議会研究報告書, №4, 174-179.
- 5) 甲野礼作, 志賀定嗣, 篠川旦, 赤尾頼幸(1971):SMON 患者材料よりのマイコプラズマ分離の試み。スモン調査研究協議会研究報告書, №3, 103-106.
- 6) 中村昌弘, 川口元也(1971):スモン患者舌よりのマイコプラズマの分離。スモン調査研究協議会研究報告書, №3, 98-102.
- 7) 尾形学, 太田哲英, 跡部ヒサエ(1967):齧歯類のMycoplasmaに関する研究 —— ラットの慢性呼吸器病由来Mycoplasmaについて —— 日本細菌学雑誌, 22, 618-627.
- 8) Sabin, A.B.(1938):Isolation of a filterable, transmissible agent with "neurolytic" properties from toxoplasma infected tissues.Science, 88, 189-191.
- 9) Sabin, A.B.(1938):Identification of the filterable, transmissible neurolytic agent isolated from toxoplasma-infected tissues as a new pleuropneumonia-like microbe.Science, 88, 575-576.
- 10) 俵寿太郎, 金政泰弘, 林英生, 赤塚和也, 市川弘幸, 岡部昭延(1971):培養細胞による病原分離の試み。スモン調査研究協議会研究報告書, №3, 73-77.
- 11) Tully, J.G.(1964):Production and biological characteristics of an extracellular neurotoxin from Mycoplasma neurolyticum. J.Bact., 88, 381-388.
- 12) Tully, J.G.(1969):Murine mycoplasmas, In: The Mycoplasmatales and L-Phase of Bacteria, Edited by Hayflick L.pp.571 — 605, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

イヌを用いたマイコプラズマおよび キノホルムの接種実験例

俵 寿太郎，金政泰弘，市川弘幸，赤塚和也，岡部昭延

（岡山大学医学部微生物学教室）

小川勝士，堤 啓，元井 真

（岡山大学医学部病理学教室）

実験動物として雑犬を用い，これにキノホルムを経口投与することにより前肢後肢に麻痺をきたしたものがあり，さらにスモン患者から分離したマイコプラズマを併用投与したものは，臨床症状が一層増悪し失明したものがみられた。そしてこのことは既に微生物部会¹⁾およびキノホルム部会²⁾で報告してきた。しかしこれが果して再現性のあるものかどうかを長期観察例について追試中であり，その結果とこれまでに報告したものとを合せてまとめた次才である。

実験材料および方法

キノホルムは100~300mg/kg/day で連日経口与投与した。使用したマイコプラズマはスモン患者糞便から培養細胞を用いて分離後DifcoのPPL O培地で継代中のO-DM株であり，別に Mycoplasma gallisepticum を比較対照として使用した。それらの使用濃度は 3000 colonies/ml のものを投与した。

結 果

キノホルムを投与中マイコプラズマを併用投与したイヌの1例を示すと表1の如くである。

すなわち分離したマイコプラズマO-DM株のみを10日間投与したがその後61日間無症状であった。そのため62日目からキノホルムの経口投与を開始した。そして152日間連続投与したところで，マイコプラズマ2mlを10日間投与したが，投与中止後6日してイヌは失明し，後肢と前肢の麻痺が同時に現われた。失明はその後90日間続いたが，前後肢の麻痺は3日間で回復した。そこで前後肢麻痺回復後70日経過したところで，再びマイコプラズマ2ml宛を12日間投与したが，投与中止後5日して後肢に弱い麻痺が現われたので屠殺剖検した。この間のキノホルム投与総量は150gである。病理組織学的所見では，脊髓は頸髄から胸髄にかけて後索に変性像がみられ，グリアの増殖を伴っていた。頸髄のGoll索の病巣は境界明瞭で，一部でズダンⅢ陽性顆粒の集簇性の出現をみた。腰髄の側索にあたり，少数の軸索に変性と思われる像を認めた。

キノホルム投与によるイヌの発症々状は一般にはこのようなもので，後肢麻痺がまず現われ，歩く時によろけるようになり，しばらく歩いた後は坐してしまって歩行しなくなった。

その後，前肢にも麻痺が現れるようになって歩行は不能になり立つことも出来なくなって，ついには失明するに至った。

表 1

日 数 (日)	1~28	~89	~241	~254	~260	~263	~333	~345	~349	剖 検
キノ ホルム 量 (g)			(106.4)				(150.8)			
症 状	失明									
	前マ 後肢ヒ									
O-DM株	1 ml × 10				2 ml × 10					

(O-DM株, 3000 colonies/ml)

これらの症状をもって発症とし、後肢麻痺のみを示したものを十、前肢後肢ともに麻痺をきたしたものを卅、前後肢麻痺に失明を示したものを卅、そして発症しなかったものを一とすると、キノホルム投与例を一括した表2において、実験群Iは同時にエマホルム投与を開始したものであるが全てが発症した。

イヌにおける発症例

表 2

実験群	番号	接 種 材 料	症状	註
I	1	(エマホルム) + (O-DM株)	卅	卅卅十一
	2	(エマホルム) + (O-DM株)	卅	・
	3	(エマホルム) + ()	十	・
	4	() + (O-DM株)	一	・
II	5	(キノホルム) + (O-DM株)	卅	前後陰
	6	(キノホルム) + (O-DM株)	卅	後肢性
	7	(キノホルム) + (O-DM株培養上清)	一	肢肢麻
	8	(キノホルム) + ()	一	痺痺痺
III	9	(キノホルム) + ()	一	・
	10	(キノホルム) + ()	一	失明
	11	() + (O-DM株)	一	
	12	(キノホルム) + (M.gallisepticum)	一	
	13	(キノホルム) + (M.gallisepticum)	一	

エマホルム投与にマイコプラズマ分離株を併用したものは卅と卅で、症状が強かったのに反し、エマホルムのみ投与例は十で、マイコプラズマ分離株のみを与えたものは勿論発症しなかった。そして実験群ⅡとⅢの例はキノホルム粉末により、Ⅰ群にみられた現象の再現性の確認実験をしたものであるが、Ⅱ群の5および6の例、つまりキノホルムとマイコプラズマ分離株を併用したものに卅と卅の症状が出た時に、その他の例、即ちキノホルムのみ、マイコプラズマのみ、マイコプラズマ培養遠沈上清およびMycoplasma gallisepticumとの併用例等はいずれも発症していなかった。

もっとも、その後キノホルム投与群はいずれも十または卅の発症をしたが、以上の結果は、キノホルムとマイコプラズマ分離株の併用投与例のみは、その他のものよりも発症が早く、しかも症状の強いことが考えられる結果であって、エマホルムの投与例と同じ結果を得たわけである。これら実験群ⅡとⅢの5および6の例の発症時期におけるキノホルム投与量と体重との関係を示したものが表3であるが、キノホルムとマイコプラズマ分離株との併用投与群は、その他の投与群よりもキノホルムの投与量が少いか、あるいは同程度の投与量で既に発症したわけである。

キノホルム投与量と発症の関係

表 3

実験群	番号	接 種 材 料	症状	体重Kg	キノホルム全量(g)	キノホルム投与期間(日)
Ⅱ	5	(キノホルム)+(O-DM株)	卅	9	150.8	256
	6	(キノホルム)+(O-DM株)	卅	6	158.0	260
	7	(キノホルム)+(O-DM株培養上清)	—	7	158.0	260
	8	(キノホルム)+(———)	—	7	158.0	260
Ⅲ	9	(キノホルム)+(———)	—	3	72.9	183
	10	(キノホルム)+(———)	—	8	152.3	179
	11	()+(O-DM株)	—	5	—	—
	12	(キノホルム)+(M.gallisepticum)	—	5	92.3	175
	13	(キノホルム)+(M.gallisepticum)	—	5	107.7	171

(2月10日現在)

考 案

生後1カ月のイヌを用いてキノホルムおよびマイコプラズマ分離株を投与したところ、後肢麻痺につづいて前肢麻痺が現われ、さらに失明するにいたる症状を示し、病理組織学的には頸髄から胸髄にかけて後索に変性像がみられ、グリアの増殖を伴っていた。なおgoll索の病巣は境界明瞭で、一部でズダンⅢ陽性顆粒の集簇性の出現をみたが、これらの所見はスモン患者の所見と酷似している。この症状と病理組織像は、キノホルムのみを与えたものにおいてもみられたので、それらの主役を演ずるものはキノホルムによるものであることは、大いに考えられることである。そしてこれらの症状の発現を促進するものとして多くの要因があると考えられるが、スモン患者糞便から分離したマイコバ

ラズマを、キノホルムと併用投与したものは、キノホルムのみの投与群よりも発症が早く、症状が少
少強く現われたので、これも促進要因のうちの一つである如き感がある。因みに対照として用いた
Mycoplasma gallisepticumでは、マイコプラズマ分離株による如き促進症状はみられ
なかった。

文 献

- 1) マイコプラズマおよびキノホルムの犬による実験例，微生物部会才一回ウイルス研究会
(46.8.5)
- 2) 犬に於けるキノホルムおよびマイコプラズマの接種実験，キノホルム部会才3回研究会
(47.2.28,29)

SMON 患者舌よりのマイコプラズマの分離

中村昌弘・川口元也・松岡康恵・^{*}大村一郎

(久留米大学医学部微生物学^{*}・国立呉病院)

I 序

本間等^{1,2)}はSMON患者にみられる緑舌の細菌検索にさいして緑膿菌とマイコプラズマに目標をおいて検索を進めたところ、東大神経内科・中島病院および井原病院入院患者より異常に高率にマイコプラズマを分離した。中野ら³⁾もSMON患者の舌苔より60%の割にマイコプラズマを分離した。われわれもSMON患者の舌よりのマイコプラズマの分離を試みたのでその成績を報告する。これらの成績の一部はスモン調査研究協議会研究報告書⁴⁾3においてすでに報告したが、今回は前回の分離対象よりさらに1回の分離を試みる機会を得たので、前回の成績も加えて総合した成績を報告することにする。この報告はすでに中村ら⁴⁾によって公表されたものであるが、改めて研究協議会報告書としてまとめることにした。

II 方法と材料

1 対象患者と検体

国立呉病院入院SMON患者36名、うち11名からは3回、12名からは2回、13名からは1回材料を採った。久留米大学医学部付属病院入院SMON患者2名からは1回材料を採取した。対照として、結核、癌、肝疾患などの慢性疾患患者76名、歯科疾患患者162名、および健康者177名からも材料をとった。

2 マイコプラズマの分離法

材料は滅菌綿球で舌をぬぐい、それを直ちに5mlのPPL0 broth, (PPL0 broth, [Difco] 7容, ウマ血清2容, 新鮮イーストエキス[ニッテン]1容, ペニシリン1000u/ml, 酢酸タリウム0.5mg/mlを含む)へ投入して持ち帰り、3~4日間37℃で培養後(その間ときどき軽く振盪)、培養液の0.1mlをPPL0 agar 平板に塗抹、37℃で好気的および嫌氣的(ガスバック使用[BBL])に培養、3~7日後にコロニー発生の有無を観察した。

マイコプラズマの同定はコロニーの形態と型免疫血清を含むdiscによる発育阻止試験(growth inhibition)のみによった。

III 成 績

国立呉病院入院SMON患者よりのマイコプラズマの分離成績は表1のようである。第1回目の分離試験では好氣的培養のみしか試みていないが検出率66.6%であり、第2回、第3回目では嫌氣的培養も試みたが、第2回は40%、第3回目は72.7%の検出率であった。3回分離試験ができたものの検出率は3回とも陽性が36.4%で、2回が27.3%、1回のみ陽性が18.2%で、3回とも陰性が18.2%であった。

SMON患者の舌よりのMycoplasmaの分離成績

表1

患者No.	年令 性	発病年月	材 料 採 取 年 月 日									分 離 率
			9/18/1970		1/29/1971			8/23/1971				
			好気	菌 型	好気	嫌気	菌 型	好気	嫌気	菌 型		
5-1-5	56 ♀	1968 7	-		-	+	M.saliv.	-	+	M.saliv	2/3	3/3 ...36.4%
2-3-1	52 ♀	1967 2	-		-	-		-	-		0/3	
3-4-3	55 ♀	1968 5	+	M.saliv.	+	+	?	-	+	M.saliv.	3/3	
4-5-2	66 ♀	1968 6	+	M.saliv.	-	-		-	+	M.saliv.	2/3	2/3 ...27.3%
13-7-9	56 ♀	1970 4	+	M.saliv.	-	-		-	+	M.saliv.	2/3	
10-8-13	70 ♀	1969 1	+	M.saliv.	+	+		+	-	M.saliv.	3/3	
11-12-10	67 ♀	1970 6	+	M.saliv.	+	+		-	+		3/3	1/3 ...18.2%
18-20-12	54 ♀	1969 7	+	M.saliv.	-	+		-	+	contami	3/3	
17-21-21	67 ♀	1969 5	+	M.saliv.	-	-		-	?		1/3	
1-29-8	67 ♀	1967 7	-		-	-		-	-		0/3	0/3 ...18.2%
16-17-16	80 ♀	1967 12	-		-	-		-	+	M.saliv.	1/3	
6-2	66 ♀	1966 7	-		-	-					0/2	1/2
9-9	27 ♀	1970 8	+	M.saliv.	-	-					1/2	
14-10	71 ♀	1970 5	+	M.saliv.	-	-					1/2	
12-11	58 ♀	1968 6	+	M.saliv.	-	+					2/2	2/2 ...33.3%
6-6	78 ♀	1969 5			-	-		-	-		0/2	
13-4	68 ♀	1965 5			+	+		-	+	M.saliv.	2/2	
18-22	74 ♀	1968 8			-	-		+	+	M.saliv.	1/2	1/2 ...33.3%
19-17	33 ♂	1970 1			-	-		-	+		1/2	
22-20	36 ♂	1963 11			+	+		-	+	M.saliv.	2/2	
23-18	63 ♂	1967 3			-	-		-	-		0/2	0/2 ...33.3%
30-11	71 ♀	1969 4			+	+	M.saliv.	+	?	M.saliv.	2/2	
15-7	54 ♀	1970 4			-	-		-	-		0/2	
7-	28 ♀	1970 2	-								0/1	1/1
8-	53 ♀	1969 8	+	M.saliv.							1/1	
15-	55 ♀	1968 5	+	M.saliv.							1/1	
14-	71 ♂	1968 12			-	-					0/1	0/1 1/1 ...61.5%
16-	59 ♀	1970 7			-	-					0/1	
24-	32 ♂	1970 9			+	+					1/1	
25-	48 ♂	1969 11			+	+					1/1	0/1 ...38.5%
26-	64 ♂	1970 4			-	-					0/1	
27-	74 ♀	1969 10			-	-					0/1	
28-	75 ♀	1968 5			+	+					1/1	1/1 1/1 1/1
-14	39 ♀	1971 5						-	+		1/1	
-15	61 ♂	1968 12						-	+		1/1	
-19	61 ♂	1970 5						-	+		1/1	
分 離 率			12/18(66.6%)		12/30(40.0%)			16/22(72.7%)				

2回分離試験ができたものの成績は表1に示すように33.3%で、1回のみの試験では61.5%が陽性であった。久留米大学付属病院入院SMON患者では2名の菌検出を試みたが、1名のみ陽性であった。なお、得られたマイコプラズマはすべてM. salivariumであった。

対照として試みた慢性疾患患者でのマイコプラズマの検出率は陽性者8名、10.5%、歯科疾患患者では45名陽性、27.8%、健康者では16名陽性で9%の検出率であった。

IV. 考 察

本間ら^{1,2)}の示したSMON患者舌苔よりのマイコプラズマの分離率は異常に高く80%以上であるが、われわれの試みた成績でも66, 72%という高値であった。第2回の試みは寒冷のため検出率が悪かったと思われる。それでも対照として試みた他の患者および健康者の検出率よりはるかに高い。富山⁵⁾はSMON発症とマイコプラズマの検出率との間の因果関係を調べているが成績は不明のまま終っている。われわれの場合もなぜこのような高値の検出率が得られるか、その原因は不明のままである。

文 献

- 1) 本間遜, 帖佐浩, 榎本美枝子, 渡部肇, 静山友三, 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) 本間遜, 帖佐浩, 榎本美枝子, 渡部肇, 富山哲雄, 甲野礼作: SMON患者の舌苔および糞便よりのMycoplasmaの検出, 日本臨床 29, 753-758, 1971.
- 3) 甲野礼作, 志賀定祠, 篠川旦, 赤尾頼幸: SMON患者材料よりのマイコプラズマの分離の試み, スモン調査研究協議会研究報告書, 昭和45, 病原班研究報告, №3, 103-106, 1971.
- 4) 中村昌弘, 川口元也, 松岡康恵, 大村一郎: SMON患者の舌よりのマイコプラズマの分離, 医学のあゆみ, 80(6), 399-400, 1972.
- 5) 富山哲雄: SMON患者由来マイコプラズマによる患者血清反応, スモン調査研究協議会研究報告書, 昭和45, 病原班研究報告, №3, 93-97, 1971.

SMON患者の舌苔および糞便より分離したMycoplasmaの同定

本間 遜，帖佐 浩，李 貴連

(東大医科研微生物株保存施設)

SMON患者の菌の検索にあたり私共はMycoplasmaの分離と同定を分担することになったが、患者の舌苔および糞便よりのMycoplasmaの検出の方法及び結果については前報^{1,2}のとおりであるが、これらの方法で舌苔より分離した株23株とその病原性をしらべる目的でマウスの脳内に接種して再分離した6株および糞便より分離した株2株で計31株について生物学的性状及び血清学的性状をしらべ同定したので報告する。

実験方法

患者材料および分離方法：前報参照^{1,2}

被検菌株：SMON患者舌苔由来株23株と糞便由来株2株、それに舌苔由来株23株中の6株をマウスに脳内接種を行い、マウスの脳を通過したそれらの株の6株計31株の同定を行った。対照株として既知の標準株として人由来5株、齧歯類由来株1株を用いた。これらのMycoplasmaはスキムミルク3%、ブドウ糖5%(PH7.6)を分散媒として凍結したものを使用した。

培地はChanock等(3)のPPL0用の寒天培地、液状培地を用いた。37℃3日間ないし7日間好氣的、嫌氣的培養を行いその菌体を検査材料とした。検査方法は以下に記す⁶

ブドウ糖の分解能：液状培地に1%になるようにブドウ糖溶液と0.2%PR液を加えてPHが7.4になるように1N NaOHで修正し菌を加えて37℃3日間ないし7日間好氣的、嫌氣的に培養を行った。

アルギニン分解能：液状培地に1%になるようにアルギニン溶液と0.2%フェノールレット試液を加えてPHが7.0になるように1N HClで修正し菌を加えて37℃で3日間ないし7日間好氣的、嫌氣的に培養を行なった。

テトラゾリウム還元能：2,3,5, triphenyl tetrazolium chlorideをPPL0用の寒天培地に0.02%になるように含ませた培地とMycoplasmaの孤立した集落面のある寒天ブロックを切りとり培養面を重ね合せ37℃で3日間ないし7日間好氣的、嫌氣的培養を行いコロニーの紅変の存無をしらべた。

オプトヒン感受性：Mycoplasmaの 10^6 /mlコロニー程度の菌液をPPL0用の寒天培地に全面に塗布してその上にオプトヒン感受性ディスク(BBL製Taxo Pディスク及び昭和オプトヒン感受性ディスク)を置いて37℃3日間ないし7日間好氣的、嫌氣的に培養を行ないディスクの周囲に阻止帯が出来たものを(BBL製Taxo Pディスクの場合は紙の端から1mm以上の阻止帯で昭和製感受性ディスクは紙の端から5.8mm以上の阻止帯)陽性とした。これは一応肺炎球菌の陽性

S M O N 患者より分離した Mycoplasma の同定

No.	由来	Strain	Glucose breakdown	Arginine hydrolysis	Tetrazdium reduction	Methylene blue reduction	Film and spots	Sensitivity to optochin	Hemolysis β (Sheep cells)	Growth inhibition test							同定
										M. pneumoniae	M. fermentans	M. arithritidis	M. hominis	M. salivarium	M. orale	M. pulmonis	
1	舌苔	NH-1	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	M. orale
2	"	NH-2	-	+	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	M. Salivarium
3	"	NH-3	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	"
4	"	NH-4	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	"
5	"	NH-5	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	M. orale
6	"	NH-6	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	M. Salivarium
7	"	TH-1	-	+	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	"
8	"	TH-2	-	+	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	"
9	"	TH-3	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	"
10	"	TH-4	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	"
11	"	TH-5A	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	M. orale
12	"	TH-5B	-	+	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M. Salivarium
13	"	IO-1	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	"
14	"	IO-2	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	"
15	"	IO-3	-	+	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	"
16	"	IO-4	-	+	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	"
17	"	IO-5	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	"
18	"	IO-6	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	"
19	"	IO-8	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	"
20	"	IO-9	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	M. orale
21	"	IO-12	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M. Salivarium
22	"	IO-13	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	"
23	"	IO-14	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	"
24	糞便	古林	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	M. hominis
25	"	佐々木	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	"
26	マウス脳	TH-5BCR	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	M. Salivarium
27	"	TH-5ACR	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	M. orale
28	"	TH-1CR	+	-	-/+	-/+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	M. pulmonis
29	"	TH-2CR	+	-	-/+	-/+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	"
30	"	IO-4ACR	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	M. Salivarium
31	"	IO-8ECO	-	+	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	"
32	コントロール	PG-27	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	M. arithritidis
33	"	PQ-6	-	+	-/-	-/-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	"
34	"	Mac	+	-	+/+	-/+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	M. pneumoniae
35	"	PG-21	-	+	-/-	-/-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	M. hominis
36	"	Orale ATCC 15539	-	+	-/-	-/-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	M. orale
37	"	Salivarium	-	+	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	M. Salivarium

の規準に従って判定したものである。

メチレン青還元試験：0.1%メチレン青液をMycoplasmaの増殖した液状培地に2滴加えて好氣的嫌氣的に24時間培養を継続しメチレン青液の脱色をもって陽性とした。

溶血能試験：10%綿羊赤血球を加えたPPL0用寒天培地をMycoplasmaの増殖したPPL0用寒天培地に薄く重層して好氣的に37℃に3日間ないし7日間培養を行ない溶血(β)したものを陽性とした。

増殖阻止試験：増殖したMycoplasmaの $10^6/ml$ 集落の菌液をPPL0用寒天培地に全面に均一に塗抹してその上にClydeの方法⁴で人由来Mycoplasmaの抗血清0.02mlを経6.5mmの濾紙に吸収させたもの及びBBL製Taxo 1ディスク～Taxo 6ディスクを置いた。濾紙に吸収させたものは濾紙の外端より2mm以上のものを陽性としBBL製Taxoディスクは1mm以上のものを陽性とした。

実験結果：Mycoplasmaの同定に必要な諸検査を行なった結果以下のような同定の成績を得た。これを表Iに記す。

舌苔より分離したMycoplasma 22例中に同一患者1名より2株分離されたものを加えて計23株について同定を行った。その結果19株はM. salivarium 4株はM. oraleと同定された。なお同一患者から分離された2株はM. salivariumとM. oraleであった。糞便を濾過し組織培養を行ったウイルス材料から分離したMycoplasmaの2株はいずれもM. hominisであった。今回の検索は病原株混入の有無をしらべるのが元来の目的であったから単個集落分離を行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生理食塩水浮遊液としてマウスの脳内に接種した。そして再分離されたMycoplasma 6株を接種前の6株と比較同定した。その結果4株はマウスの脳内に接種したものと同一であったが他の2株は一致しなかった。すなわちM. salivarium 3株とM. orale 1株で他の2株はM. pulmonisと同定された。

前報^{1,2)}に記したとおりこれらの分離株は嫌氣性だけに増殖し好氣性培養では全く増殖しなかった。しかし継代を数代重ねるにしたがい好氣性にも極めて少数の集落を生ずるものも出てきた。しかしこれはわずかであるためにすべて嫌氣性の状態で検索した。

考 察

舌苔より分離したMycoplasmaの同定の結果は予想通り口腔に常在するM. salivariumとM. oraleであった。これらのMycoplasmaは正常人の舌表面より極めて分離率が高いのは舌苔の角化がひどく毛様物質は長いものでは1cmにも達するという異常な舌表面に関係があると考えられる。これは石田等⁵が歯石より高率に分離をみているように口腔内局所の汚染の甚しい場合にみられる現象と考えてもよいのではなかろうか。私共は他の菌の検索はしていないがたまたまSerratiaを多数分離同定した結果^{1,2)}からの汚染部には好氣性の菌と嫌氣性のMycoplasmaが共存して見出されたものとする。さきにも述べた通り今回は病原性Mycoplasmaの検出の有無がその目的であるの

でこれが存在しているとしても多数の常在Mycoplasmaと混在することが当然予想されるわけで、その分離を如何にするかについて考えた。その結果分離Mycoplasmaをクローン化する前に直ちにマウスの脳内に接種したわけであるがその結果は新しいMycoplasmaを分離することは出来なかった。たゞ6株のM. salivariumを接種し、脳内通過後M. salivariumと異なるM. pulmonisを2株分離する結果になった。これは患者材料にM. pulmonisが混在していたか、又はマウスの脳に既に存在していたものか、又は脳内接種によって誘発されたものか不明である。しかし私共が正常マウス4週令迄は15匹の脳をしらべた結果ではその飼育所のマウス脳からは何のMycoplasmaも分離できなかった。

糞便を濾過し組織培養を行ったウイルス材料中のMycoplasmaの検索を依頼されその結果組織培養液より分離したMycoplasmaの2株はいずれもM. hominisであった。これが腸管由来のものであるか、組織培養が既に汚染されていたものか不明である。又SMONの病原検索にあたっていくつかのウイルスの分離が報告されたが私共によってその材料中にMycoplasmaが存在することが見出された。今後もウイルスの検索に当ってはこの点を充分に吟味することの必要性を痛感する。以上の実験を通じてMycoplasmaが直接にSMONの病原とのつながる証拠は得られなかった。唯、口腔内の汚染に伴い極めて高率に分離されることが見出された。

SMONの検索の初めに緑舌が注目され緑色々素の原因の究明のため斎藤守教授および井形教授より緑膿菌検索の依頼があったのが私共班研究参加のそもそもの初まりであった。ついで私共は緑膿菌の存在を否定し、Mycoplasmaを多数分離し、色素産生菌としてSerratiaを検出した。この菌が舌苔の毛根部に着色物質を産生する可能性はin vitroの実験から推定されるがその鮮明な緑色はキノホルムによることが明らかにされた。緑色の追求から井形教授が患者の緑色々素の結晶を多数混じった尿をもってこれら菌によるものかを問われた。その結晶は驚くべき程多く直ちに化学分析することをおすすめしたがこれがキノホルムの検出につながったことは興味深い⁷。

同時にウイルス材料の組織培養に薄い緑色色素が入っているとして、ウイルスに疑問をもちMycoplasmaの検索を私共に依頼された甲野博士の感も甚だすどかったと云わねばなるまい。

SMONの原因追求が終始緑色に関連して動き遂に目的を達したことは班長始め班員の熱烈な研究心によるものであるが、その経過は回顧すれば誠に興味深いものである。

結 論

SMON患者の舌苔および糞便より分離されたMycoplasma 31株について生物学的、血清学的性状の検討を行った。その結果

- 1) 舌苔より分離されたMycoplasma 23株中19株はM. salivarium, 4株はM. oraleであった。
- 2) 舌苔より分離された23株中6株のMycoplasmaの病原性をしらべる目的でマウスの脳内の通過を行って再び分離したMycoplasma 6株について同定を行った。マウス通過後の6株

のうち5株はM. salivariumで1株はM. oraleであった。しかしマウス脳通過後分離した6株中3株はM. salivariumで1株はM. oraleでマウス脳通過前と同じであったが2株はM. fulmonisで通過前のM. salivariumとは異った。

- 3) ウイルス組織培養液2種より分離したMycoplasmaの同定を行った結果2株ともM. hominisであった。
- 4) マウス脳通過前と後で分離された2株のMycoplasmaが違っていたことの原因について考察を加えた。

以上の結果を通じSMON患者の舌苔及び糞便より新しい病原性Mycoplasmaを分離同定しえなかった。しかし舌苔の汚染部より人由来Mycoplasmaが多数かつ高率に分離された。

文 献

- 1) 本間遜, 帖佐浩, 榎本美枝子, 渡部肇, 富山哲雄, 甲野礼作, SMON患者の舌苔および糞便よりMycoplasmaの検出
スモン調査研究協議会研究班報告書No.3 昭和45年度病原班研究報告書83~92頁
- 2) 本間遜, 帖佐浩, 榎本美枝子, 渡部肇, 富山哲雄, 甲野礼作: SMON患者の舌苔および糞便よりのMycoplasmaの検出, 日本臨床29巻2号 昭和46年2月号
- 3) Chanock, R.M., Hayflick, L. and Barile M.F. (1962): Proc. Natl. Acad. Sci., 48, 41~49
- 4) Clyde, W.A.: J. Immunol. 92, 958~965
- 5) 熊谷勝男, 由利恭子, 岩淵武介, 宮本勉, 日沼瀬夫, 石田名香雄: 口腔内マイコプラズマの生態医学のあゆみ, 73: 639~640, 1970.
- 6) Barбора B. Aluttc, Ruth G Wittler, Carol O Williams and John E. Faber (1970):
International Journal of Systematic Bacteriology 20, 1, 35~58
- 7) 田村義蔵: SMON患者の緑尿および緑便に含まれる緑色物質の本態
スモン調査研究協議会研究班報告書No.3 昭和45年度病原班研究報告書159~161頁

SMON 患者由来 *Mycoplasma salivarium* による CF および PHA 反応

富 山 哲 雄

(東大分院中央検査部)

要旨：岡山県井原地区 SMON 患者由来 *Mycoplasma salivarium* 3 株を抗原として、井原地区 SMON 患者につき、CF 及び PHA 反応を行ったが、全例陰性であった。

I はじめに

前報のように SMON 患者に患者舌苔由来 *Mycoplasma* に対する抗体がみいだされず、高率にみられる保有 *Mycoplasma* と SMON 発症の因果関係は判然としなかった。しかし、ここで使用した *Mycoplasma* が埼玉県戸田地区患者からの分離株であり、患者血清が岡山県井原地区及び一部東京都青梅地区患者であった為の問題もなしとしなかった。

そこで、この点を追求する為、今回は井原地区患者由来 *Mycoplasma* 3 株で抗原を調製し、同地区患者血清につき CF 及び PHA 反応を試みた。

II 試料及び方法

1 患者血清

患者血清はすべて岡山県井原市民病院で定型的 SMON と診断された症例から採取されたものである。

2 *Mycoplasma*

抗原の調製に使用した *Mycoplasma* は井原市民病院 SMON 患者舌苔より昭和 45 年 8 月に分離したもので、*Mycoplasma* 寒天培地で継代し、 -80°C に保存したものから、用いて臨み寒天平板に分離してから用いた。

3 抗原の調製

前報と同様に *Mycoplasma* 寒天平板に培養後菌体を集め、フェノール処理、加熱後、超遠心機で集菌し、超音波処理を行って抗原とした。

4 血清反応

1) CF 反応

Kolmer 法に準拠し、Microtiter 法で行った。

2) PHA 反応

羊血球を使用し、 $1:100,000$ タンニン処理、抗原感作を行って感作血球を調製し、希釈患者血清と Microtiter plate で反応させ、管底像で判定した。

III 結 果

CF、および PHA 反応の結果は表 1 のとおりである。

井原地区SMON患者におけるMycoplasma抗体

表 1

反 応	C F			P H A			反 応	C F			P H A		
抗 原	1	2	3	1	2	3	抗 原	1	2	3	1	2	3
4/21原 ○	-	-	-	-	-	-	○ 林	-	-	-	-	-	-
○ 井	-	-	-	-	-	-	馬 ○	-	-	-	-	-	-
橋 ○	-	-	-	-	-	-	○ 合	-	-	-	-	-	-
○ 井	-	-	-	-	-	-	鈴 ○	-	-	-	-	-	-
河 ○	-	-	-	-	-	-	○ 木	-	-	-	-	-	-
○ 林	-	-	-	-	-	-	花 ○	-	-	-	-	-	-
馬 ○	-	-	-	-	-	-	○ 永	-	-	-	-	-	-
○ 合	-	-	-	-	-	-	○ 辺	-	-	-	-	-	-
鈴 ○	-	-	-	-	-	-	4/22花 ○	-	-	-	-	-	-
○ 木	-	-	-	-	-	-	○ 原	-	-	-	-	-	-
5/9 原 ○	-	-	-	-	-	-	渡 ○	-	-	-	-	-	-
○ 井	-	-	-	-	-	-	○ 本	-	-	-	-	-	-
橋 ○	-	-	-	-	-	-	森 ○	-	-	-	-	-	-
○ 井	-	-	-	-	-	-	対照 425	-	-	-	-	-	-
河 ○	-	-	-	-	-	-	426	-	-	-	-	-	-

CF(-): 1 : 8 以下, PHA(-) 1 : 40 以下

すなわち、井原地区分離 Mycoplasma による抗原を用いても、同地区患者に抗体は見出されなかった。

Ⅳ 考 察

SMON 患者舌苔に高率にみられる Mycoplasma と発症との関係を血清学的に検討したが、井原地区患者分離株由来抗原でも患者に抗体は見出されず、この限りにおいては Mycoplasma と本症発症との関係を見出すことはできなかった。Mycoplasma が SMON のようなキノホルム投与例での慢性疾患に単に結果として見出されるのか、更に何らかの関与をしているのかは依然として判然とはしないが、舌苔にこれだけ多量にみられる Mycoplasma に対し、CF、PHA 両法共に全く抗体は見出されなかったことは、少なくとも舌苔由来 Mycoplasma が有意の agent である可能性は少ないと思われる。

この研究について、種々御配慮をいただいた東大医科研本間遜教授、井原市民病院岩野郁造、広田滋両博士に感謝する。

II ウイルス学的研究

SMON のウイルス学的研究 —1971—

井上幸重，西部陽子，中村良子（京大ウイルス研）

木村輝男（大阪市衛研）

I. 序

われわれはこれまでに行ってきたSMONのウイルス学的研究結果から，われわれが分離した新種のウイルスをSMONの病因と考えている。今年度の報告は分離ウイルスの性状に関するその後の研究成績並びにC57BL/6マウスにおけるウイルスの病原性に関するものである。また，配分された研究費は40万円である。

II. 研究材料並びに方法

1970年度の報告に記載したものは省略する。

1. Human diploid cell ; T6L細胞として東大薬学部山田教授より分与をうけたものであり，BAT-6細胞と同じ培養方法で供試した。

2. ^3H 標識ウイルス：BAT-6細胞をmaintenance mediumで液交換して2日後にウイルスを感染，同時に ^3H -thymidine又は ^3H -uridineを $1\mu\text{C}/\text{ml}$ 濃度に加えて3日間ラベルした。

3. ウイルスの精製：infected fluidの10,000rpm 30分の遠心上清を28,000rpm 100分遠心し（HITACHI, RP30ローター），生じたpelletを最初の $1/500$ 容量のphosphate buffer saline（PH6.5）にsuspendし15秒間sonicationを行った。5,000rpm 30分の遠心上清を15～35% CsCl density gradientにかけ24,000rpm 180分遠心した（HITACHI, RPS25ローター）。tube底部よりfractionをとり一部は直ちにmaintenance mediumに希釈して感染価測定を行った。また一部はacid-insoluble部につきradio activityをカウントした。

4. VSVとの干渉：vesicular stomatitis virus（VSV）は名大無菌研の永田教授より分与をうけた。BAT-6細胞にウイルスを接種後，VSVをchallengeし2日後にVSVのCPEを指標として干渉の有無を判定した。即ち，対照VSVのCPEがgrade 4のとき2以下のものを干渉（+）とした。

5. ホルマリン不活化ワクチン：局方ホルマリンを0.05%になるように加えて4℃30日間不活化したものをホルマリン不活化ウイルスワクチンとした。

6. ワクチン免疫原性テスト：成熟ddマウス（5週）に不活化ワクチンを0.5ml宛腹腔内接種した。免疫回数は1～4回，最終免疫から7日後に採血して中和抗体を測定した。

7. マウス感染実験：dd, C57BL/6, CF1 strainの新生児マウスを供試した。とくにC57BL/6マウスは京大ウイルス研前田博士，愛知ガンセンター石本博士，並びに京大医学部解剖

西村教授の好意によって分与された。ウイルス接種後2～3ヶ月間観察すると共に、1週間以内の死亡マウスは観察結果から除外した。

8. マウスに接種したウイルス材料：供試ウイルス材料は以下のものである。

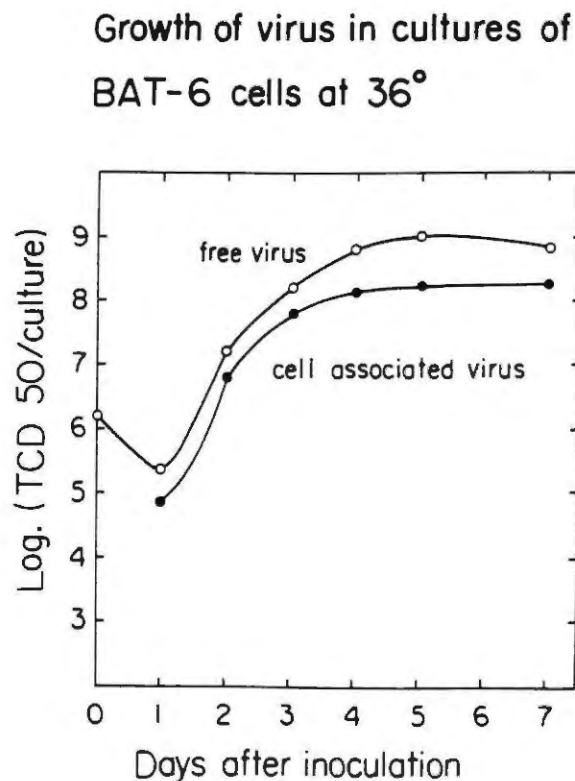
(株 名)	(患 者 材 料)	(分 離 材 料)
Sato	岡山の患者糞便	BAT-6細胞
Watanabe	北海道の患者髄液	human diploid cell
Aoki	大阪の患者髄液	human diploid cell
Nishimata	北海道の患者髄液	直接マウス
Kishimoto	岡山の患者髄液	直接マウス

9. 病理検査：発病あるいは対照マウスは4% paraformaldehyde加Millonig buffer (pH7.0) で環流固定、パラフィン切片としてHematoxylin-eosin, Luxol-fast-blue, 並びにBodian染色を施した。病理学的研究は京大精神科の松岡龍典博士並びに同研究グループの指導を戴くと共に、多くの病理学者の助言によって行った。

Ⅲ. 分離ウイルスの性状—1971—

1. BAT-6細胞における増殖：図1に示すごとくウイルスは容易に液相に放出され、液相中のウイルス感染価は早くからcell associated virusより高い価を示す。

図1



2. HeLa 細胞並びにhuman diploid細胞における増殖：図2並びに図3に示すごとく，ウイルスは両細胞においてCPEを示すことなく増殖する。ウイルスは除々に液相に放出され感染後期にはcell associated virusより高い価を示す。

図2 Growth curves in HeLa cell cultures at 36°C

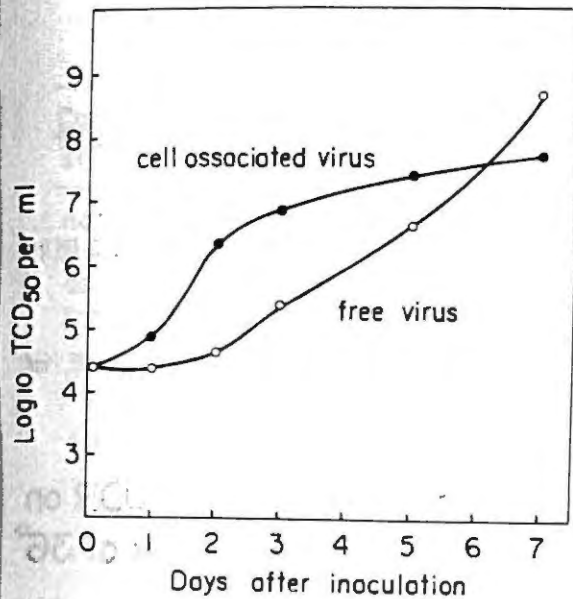
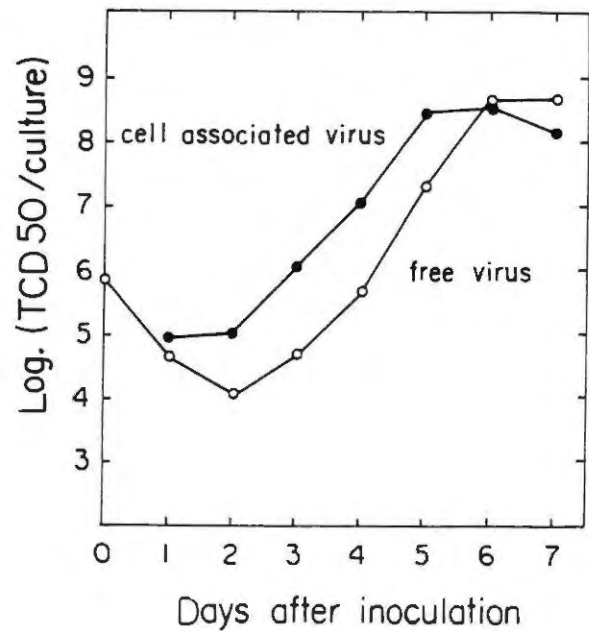


図3 Growth of virus in cultures of human diploid cells at 36°C



3. Human diploid cell によるウイルス分離：患者髄液から直接human diploid cell へのウイルス分離の結果は表1に示すごとく，ウイルスはCPEを示すことなく分離継代される。ウイルスの感染価測定にのみBAT-6細胞を用いた。また供試髄液はいずれも初代サル腎細胞，HeLa細胞に対してもCPEを示さない。human diploid cell に分離したAoki並びにWatanabe株とBAT-6細胞に分離したSato株並びにKishimoto株は交

表1 Isolation of the virus from spinal fluid of S.M.O.N. patients and passage in human diploid (T6L) cells

Log. (TCD50/0.1 ml.) of spinal fluid		No. of passage in T6L cells	Cumulative log dilution of first inoculum	Log. (TCD50/0.1 ml.) of culture fluid from uninfected cells
Strain Aoki	Strain Watanabe			
4.5	4.5	0		<0.5
5.5	5.3	1	2.3	<0.5
6.3	6.3	2	4.6	
6.8	6.8	3	6.9	
6.8	6.8	4	9.2	
6.3	5.5	5	11.5	

表 2 Cross reactions among the viruses isolated
from S.M.Q.N. patients in different places

Virus strain	Place isolated	Challenge TC D ₅₀	Dilution for 50% reduction of TCD ₅₀	
			Anti-Sato rabbit ser.	Anti-Watanabe guinea pig ser.
Sato, from faeces	Okayama	100 200	1,280	320
Kishimoto, from spinal fluid	Okayama	300	600	160
Aoki, from spinal fluid	Osaka	100	2,560	320
Watanabe from spinal fluid	Hokkaido	50 100	2,560	320

差中和試験によって同一のものであり、また地域を異にする S M O N 患者から同一のウイルスが分離されることを表 2 は示している。

4. 紫外線によるウイルスの不活化：ウイルス浮遊液は 10 cm の距離で 20 W 殺菌灯による照射で図 4 に示すごとく急速に不活化される。

5. IUDR, FUDR の影響：DNA 合成阻害剤である IUDR あるいは FUDR 30 μ g/ml 存在下におけるウイルスの増殖は図 5 に示すごとく抑制される。

図 4 Inactivation of virus infectivity
by UV- irradiation

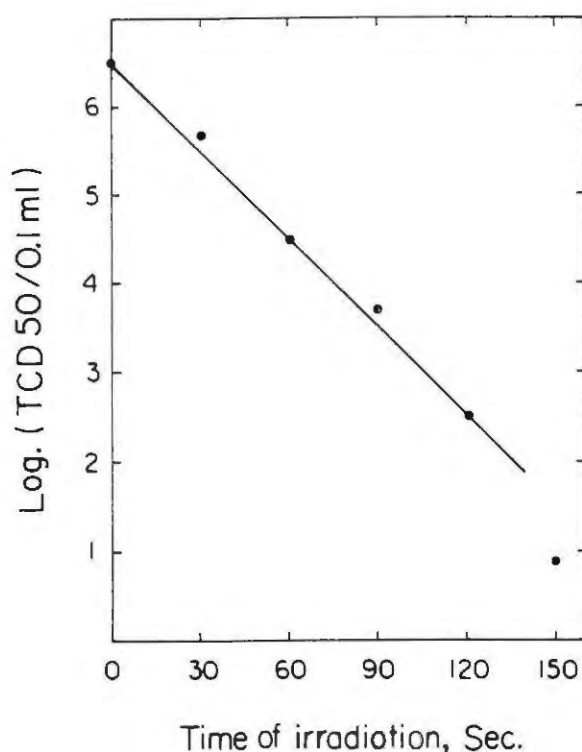
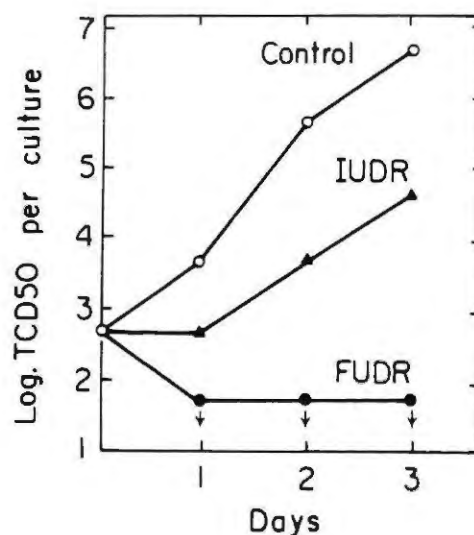


図 5 Effect of IUDR and FUDR on
the replication of virus at 36°



6. ウイルス感染価に及ぼす遠心の影響：表 3 に示すごとく、5,000 rpm 30 分、あるいは

10,000rpm 30分の遠心は全く感染価に影響しないが100,000g 100分の遠心でウイルスは上清に殆んど残らない。そしてsedimentからは約 $1/10$ のウイルス感染価が回収される。

7. ウイルス感染価に及ぼすsonicationの影響: 表4に示すごとく, 10KC30秒までの処理にウイルスは安定である。

表3

Effect of centrifugation on the infectivity of virus

Condition of centrif.	Material tested	Log ₁₀ TCD ₅₀ /ml
not centrif.		7.3
at 5,000rpm for 30min.	sup.	7.3
at 36,000rpm (100,000g) for 150 min.	sup.	2.3
	sediment	6.3

表4

Effect of sonication on the infectivity of virus

sonicated ^a (sec.)	TCD ₅₀ /ml
0	6.3
15	6.3
30	6.3
60	6.0
120	4.8
180	3.5

a. with 10KC

8. CsCl density gradient centrifugation: ³H-thymidine 標識ウイルスをCsCl density gradientにかけると図6に示すごとくradioactivityとinfectivityのpeakは完全に一致する。このpeakを示すfractionのbuoyant densityは1.21~1.22である。さらにこのfractionを再遠心すると再びinfectivityとradioactivityのpeakが一致する。これに対し³H-uridineを標識に用いた場合, ウイルスspecificなradioactivityのpeakはえられなかった。この結果からウイルスはDNAウイルスと考えられる。

9. ウイルスの凍結乾燥: maintenance mediumの状態ではウイルスを凍結乾燥すると完全に不活化されるが, 表5に示すごとく, 安定剤特にlactoseとpolyvinylpyrrolidoneの添加により安定した凍結乾燥が可能であり, 少なくとも室温2週間で凍結乾燥ウイルスの感染価は低下しない。

10. VSVとの干渉: ウイルス接種とVSV challengeとの間隔が2日以下, 5日以上で干渉はみられず3日が最も良い結果を示した。一方VSV challenge doseは10TC₅₀以下ではCPE発現が遅く干渉をみわけ難い。また多すぎてもCPEのgradeに差がみられず, 最もconstantに干渉がみられるのは50TC₅₀前後であった。干渉によってウイルスを

Density Gradient Centrifugation

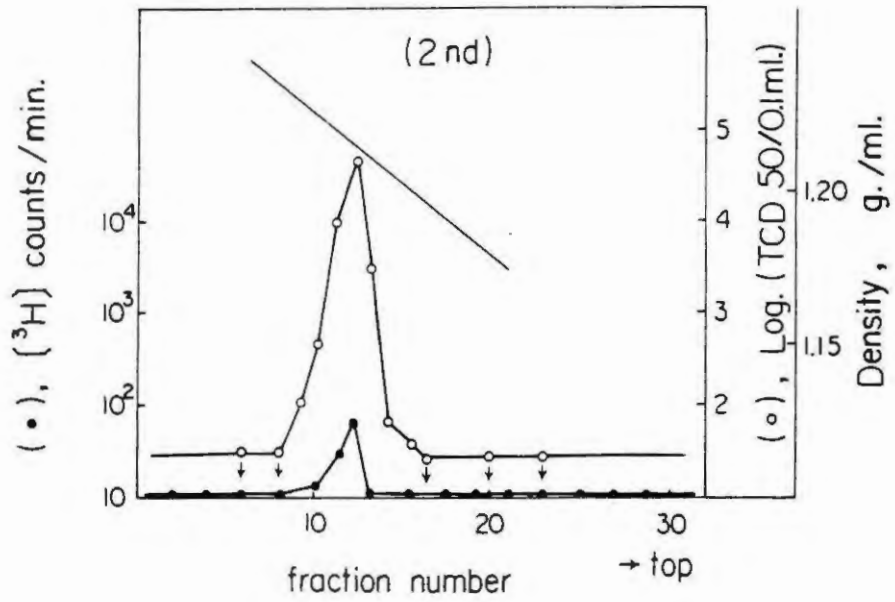
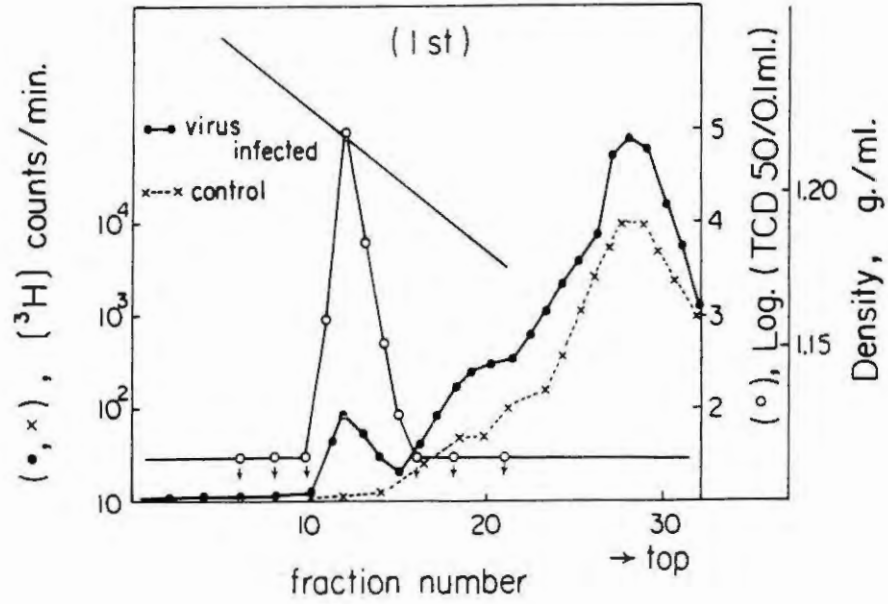


表 5

Lyophilization of the virus in different media

Medium	Before lyophy.	After lyophy. at 25C		
		0	7 days	14 days
The maintenance medium for BAT-6 cells ^a	7.3 ^b	<1.0	<1.0	
The maintenance medium plus equal volume of medium A	7.0	6.3	6.3	6.3
The maintenance medium plus equal volume of medium B	7.0	5.8	5.8	5.8

a. See the text.

b. Log₁₀ TCD₅₀ per 0.1 ml

Medium A = 10% lactose; 0.3% polyvinylpyrrolidone (K-90)

Medium B Sucrose 74.62g ; KH₂PO₄ 0.52g ; K₂HPO₄ 1.25g;
 L-glutamic acid sodium salt 0.83g ; Albumin,
 Egg 10g in 1000 ml H₂O

assay した代表的 protocol を表 6 に示す。干渉は control fluid では表 7 に示すごとく全くみられない。また表 8 に示すごとくウイルス材料を 90,000 g を 100 分遠心すると上清には干渉能がなくなり、沈査に証明される。表 9 に示すごとく干渉能は UV 感受性である。このように VSV との干渉はウイルス自体によるものと考えられる。しかし、constant にウイルスの感染価測定に利用できるほど条件は安定しない。この実験は名大永田教授の最初の観察に基づくものである。

表 6

A representative protocol of virus assay with interference

Virus dilution	Challenged with 35 TCD ₅₀ of VSV ^a		Log ₁₀ TCD ₅₀ determined by interference
	Grade of CPE of each tube ^b	Interference	
10 ⁻¹	2	+	6.8 / 0.1ml ^c
	2	+	
	2	+	
10 ⁻²	3	±	
	2	+	
10 ⁻³	3	±	
	2	+	
10 ⁻⁴	1	+	
	1	+	
10 ⁻⁵	±	+	
	2	+	
10 ⁻⁶	1	+	
	1	+	
10 ⁻⁷	3	±	
	1	+	
10 ⁻⁸	4	—	
	4	—	
Control culture	4	—	
	4	—	

a. VSV was challenged after 3 days of virus inoculation.

b. CPE was observed after 2 days of VSV challenge.

c. Log₁₀ TCD₅₀ determined by CPE was 7.3 / 0.1ml.

表 7

Failure of interference with control culture fluid of BAT-6 cells

No. of exp.	Materials for pre-treatment	Challenge dose (TCD ₅₀) of VSV	Interference	Log ₁₀ TCD ₅₀ / 0.1ml determined by interference
1	infected fluid	40	+	6.3 ^a
	control fluid		—	
2	infected fluid	30	+	4.3
	control fluid		—	

a. Log₁₀ TCD₅₀ determined by CPE was 7.3 / 0.1 ml through the experiments.

表 8 Effect of ultracentrifugation on interfering activity of the virus.

Materials for pre-treatment	Challenge dose (TCD ₅₀) of VSV	Interference	Log ₁₀ TCD ₅₀ /0.1ml determined by interference
pellet ^a	150	+	α 5.8 ^b
supernatant		-	
pellet	30	+	α 7.5
supernatant		-	

Virus was centrifuged for 100 minutes at 90,000g in the HITACHI RP30 rotor.

a Pellet was suspended in maintenance medium.

b Log₁₀ TCD₅₀ determined by CPE was 7.3/0.1ml through the experiments.

表 9

Interference by UV-inactivated virus

UV-irradiated time (Sec.)	Log ₁₀ TCD ₅₀ /0.1ml determined by CPE	Interference	Log ₁₀ TCD ₅₀ /0.1ml determined by interference
0	6.3	+	6.5
30	5.5	+	5.8
60	4.3	+	4.8
90	3.5	+	3.5
120	2.3	+	2.3
150	0.8	-	<0.5
180	<0.5	-	<0.5

IV. 分離ウイルスの病原性—1971—

供試ウイルス株の history は研究材料の項を参照。

1. Sato株ウイルスについて：66匹のdd マウス新生児脳内接種の場合、9匹のみに立毛、体重減少、脳水腫などの所見がみられた。そして27匹のCF1 マウスについては異常は認められなかった。dd マウスの場合にも、一般には感受性を示さず litter によって時に感受性のものが観察されたと理解される。感染dd マウスの脳内ウイルス量と血中中和抗体価を1カ月後のマウスについて検討した結果、表10に示すごとく、発病マウスの脳内ウイルス量は高く、血中中和抗体価は低いことが見出されたが、非発病マウスのウイルス感染価は低く中和抗体価は高かった。

表 10 Relationship between the virus titer and the antibody titer in infected dd mice^a

Clinical Symptom	No. of mouse	Log ₁₀ TCD ₅₀ per 0.1ml in brain ^b	NT titer ^c
Yes	1	6.5	
	2	6.5	
	3		<20
	4	6.5	20
	5		20
No	1	5.3	40
	2	<1.0	160
	3	<1.0	160
	4		40
	5	5.5	40
Control	1	<1.0	<10
	2	<1.0	<20
	3	<1.0	<20

a. one month after inoculation

b. 10% brain suspension

c. 50% endpoint of serum dilution against 100 TCD₅₀

表11に示すごとく、C57BL/6マウスが脳内接種で感受性を示すことが見出された。ウィルス接種マウスは2～3週間以上の潜伏期を経て多くは体重減少、立毛、後期麻痺を示して発病する。発病マウスのうち軽症のものは回復、重症のものは殆んど死亡する。また組織培養原液のウィルス材料は発病をinhibitする傾向があるが希釈ウィルスは例えば30TCID₅₀でも発病する。C57BL/6マウスの場合にもlitterによって感受性は可なり異なる。したがって、各希釈あたりの供試litter数をますなどの工夫をしなければマウスで感染価を求めることは困難である。非感染の培養液あるいは特異的免疫血清で中和したウィルス材料ではマウスは発症しない。

表11 Susceptibility of C57BL/6 mice to Sato strain isolated in BAT-6 cells

Dilution	Lot No.	Infected cult. fluid		Control cult. fluid
		Log ₁₀ TCD ₅₀ per mouse	Results	Results
undiluted	A	6.5	0/7 ^a	0/8
	B	6.5	0/7	
10 ^{-0.7}	A	5.8	5/5 8/8 5/5 0/5	0/5 0/7 0/4
	B	5.8	0/4 1/4	
10 ⁻¹	B	5.5	4/9 0/9	0/6
10 ⁻²	B	4.5	1/10 5/7	
10 ⁻³	B	3.5	4/9 2/4	
10 ⁻⁴	B	2.5	6/6 1/4	
10 ⁻⁵	B	1.5	0/5 5/5	
10 ⁻⁶	B	0.5	0/5 0/6	

a. No. of mice diseased / No. of mice observed

2. Watanabe並びにAoki 株について：表12に示す如く、ヒト2倍体細胞に分離されたウィルスもBAT-6細胞に分離されたsato株ウィルスと同じ潜伏期並びに症状をもってC57BL/6マウスを発病させる。発病マウス脳乳剤からウィルスがBAT-6細胞に再分離される。対照群マウスの中でみられた立毛、体重減少を示したマウス脳からウィルスはBAT-6細胞によって検出されなかった。更に発病マウス脳から分離されるウィルスは中和試験によってSato株ウィルスと同一であることが確かめられた。Watanabe株についてはマウス脳継代も行われている。

3. Nishimata, Kishimoto 株について：これらの株は患者脊髄液より直接C57BL/6マウス脳に分離したものであり、脳から再分離されたウィルスは中和試験によりSato株と同一であることが確かめられると共に、マウス脳で5代まで継代されている。表13参照。

4. 病理所見：岡山大学解剖学教室の新見教授によるとヒトとマウスの脊髄の比較解剖学的所見は図7のごとくである。

表 12 Susceptibility of C57BL/6 mice to Watanabe and Aoki strain isolated in human diploid cells

Virus used	Inoculum			Results	TCD ₅₀ /0.1 ml in the brain of diseased mouse ^b
	No. of passage	Log ₁₀ TCD ₅₀ per 0.1 ml	Dilution		
Watanabe - Hokkaido	2	6.0	undiluted	7/7 0/7 ^a	10 ^{6.5}
			10 ⁻¹	3/6	
	4	6.8	10 ^{-0.7}	8/8	
Aoki - Osaka	2	6.5	undiluted	5/5	10 ^{6.5}
Control culture fluid			undiluted	1/7 0/6	<10 ^{1.0}

a. No. of mice diseased / No. of mice observed

b. 10 % brain susp.

表 13

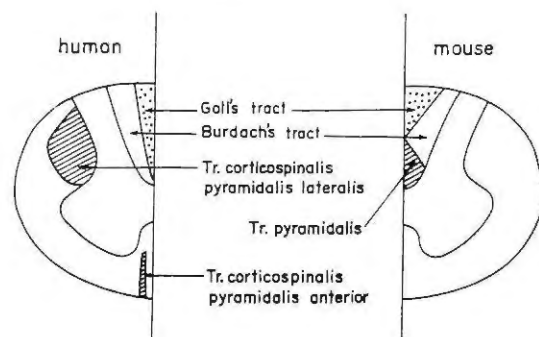
Direct inoculation of spinal fluid of SMON patients into C57BL/6 mice

Spinal fluid used	Inoculum			Results
	No. of passage	Dilution	Log ₁₀ TCD ₅₀ per 0.1 ml	
Nishimata - Hokkaido	1st	undiluted	5.3	2/5 ^a
	2nd	10% brain suspension	6.5	0/7 2/4
		1% susp.	5.5	2/5
		10% susp.	6.5	0/6
	3rd	1% susp.	5.5	1/7 0/6
		0.1% susp.	4.5	9/9 2/4
		1% susp.	5.5	7/7
		0.1% susp.	4.5	1/6
Kishimoto - Okayama	1st	undiluted	6.3	0/4 3/8
	2nd	0.1% susp.	4.5	6/6

a. No. of mice diseased / No. of mice observed

図 7

Comparative anatomy of spinal cord in man and mouse (After Prof. Niimi)



しかして、発病マウスの主要な病理所見は表 1 4 に示すごとくであって、Golli素の変化は頸髄に、そして錐体路の変化は腰髄あるいは錐体路全域に及んでいる。脳には変化はなく、また炎症反応はみられない。しかもこの種の所見は表 1 5 に示すごとく剖検マウス（重症例）2 6 件中 1 9 例に観察された基本的所見である。

表 14

Main pathological changes
observed in diseased miceSymmetrical bilateral changes in
the medial or central area of the
posterior column in the spinal cord

- 1) pallor or demyelinated change
(L.f.b)
- 2) Fragmentation and breaks in
nerve fibers (Bodian)
- 3) Decrease in number of nerve
fibers (Bodian)

表 15 Pathological findings in the
diseased C57BL/6 mice

Group of exp.	Virus strain inoculated	Place isolated	Results	Total
1	Sato strain isolated in BAT-6 cells from stool of a patient	Okayama	6/9 ^a	
2	Watanabe strain isolated in human diploid cells from spinal fluid of a patient	Hokkaido	6/7	
3	Aoki strain isolated in human diploid cells from spinal fluid of a patient	Osaka	2/3	19/26 (73%)
4	Nishimata strain isolated directly in mice from spinal fluid of a pati- ent	Hokkaido	4/5	
5	Kishimoto strain isolated directly in mice from spinal fluid of a patient	Okayama	1/2	
Control	Inoculated with control culture fluid		0/4	0/8
	Non treated		0/4	

a. No. of positive cases / No. of mice examined

5. 末梢感染症について：Watanabe株並びにAoki株について腹腔内並びに皮下接種による感染実験の結果，newborn C57BL/6マウスは脳内接種の場合と同じように発症することが見出されると共に，発病マウスの病理所見も脳内接種の場合と同一であることが確認された。末梢感染に対する感受性の程度等については現在検討中である。

V. 血清疫学（予報）

SMON患者血清は中和抗体価が低く，かつウイルスが髄液から高率に分離されること，一方健康な成人血清には中和抗体が普通検出されずウイルスも髄液から分離されないこと。更に同種ウイルスが髄液から証明された3例の無菌性髄膜炎の回復期血清が160～320倍と云う高い中和抗体価を示すことは既に指摘したところである。

その後，更に健康な成人血清63例（昭和44年7月採血）についてウイルス中和抗体をテストした結果，59例は<10倍で他の4例は≤20倍であった。後者にはSMON患者を家族にもつ1例が含まれている。これに対して，SMON患者の診療，看護に従事した10例の血清は6例が40～160倍の抗体価を示し，ウイルスの研究に従事した4例の血清はいずれも陽性で20倍1例，40倍1例，2例は160～320倍を示した。

V. 不活化ウイルスワクチンの試作（予報）

協同研究者 小沢恭輔（目黒研究所）

ウイルスはホルマリン0.05%の添加によって急速に不活化され、4℃48時間で感染価は $1/100,000$ となり、72時間でもはや検出されなかった。しかし、4℃30日間にわたって充分に不活化したものをワクチンとした。Human diploid cellで分離継代されたWatanabe株ウイルスの不活化ワクチンによって1回免疫では抗体反応はみられなかったが、3回以上免疫したマウスの血清には20～320倍の中和抗体価が証明された。

VI. 考 察

1. SMON患者の脊髄液から高率にBAT-6細胞に分離したウイルスは、human diploid細胞あるいはC57BL/6マウスにも直接分離することが出来るのでBAT-6細胞由来ウイルスの可能性は否定された。また、BAT-6細胞に観察されるCPEの判定の確かさはウイルス材料のblind testによって証明することが可能である。

2. 分離ウイルスはエーテル、FUDRに感受性でUVで不活化される。220mμ Millipore filterを通過するが100mμは通らない。DNA型ウイルスでdensityは1.21～1.22 in CsClである。電子顕微鏡的形態は今後の研究として残される。

3. ウイルスはnewborn C57BL/6マウスに接種すると後肢麻痺を主として発病する。その病変は脊髄にみられるところの炎症反応を欠く系統変性病変であり、基本的にヒトのSMONと同じと考えられる。今後、病変部の電子顕微鏡的所見などが更に検討されねばならない。

4. キノホルム中止後に岡山大学小坂内科で観察されたSMON症例の脊髄液からも依然としてウイルスが分離される。

5. われわれは既にウイルスワクチンの試作について研究を進めているので、患者救済のために将来免疫血清の治療効果についても検討が望まれる。

6. SMON患者の脊髄液にC57BL/6マウスを発病死させるウイルスが存在すると云う極めて重要な事実を十分に評価し得なかったスモン調査研究協議会の運営と総括は極めて遺憾である。

7. 早い機会に外国における本ウイルスの感染状況の調査が望まれる。

VII. 結 論

SMONは免疫反応不全に伴う新種ウイルス感染症である。このウイルスを軸としてSMONを含めた病型あるいは疫学の全貌が解明されねばならない。

分離ウイルスはエーテルFUDRに感受性でUVで不活化される。220mμのMillipore filterを通過するが100mμは通らない、DNA型ウイルスでdensityは1.21～1.22 in CsClである。newborn C57BL/6マウスに接種するとマウスは後肢麻痺を主として発病する。発病マウスの病変は脊髄の炎症反応を欠く変性性である。その病原性からみてウイルスは新種のSlow virusと考えてよい。

SMON患者脊髄液の新生マウス接種実験

松岡幸彦, 伊藤康彦, 木村吉延, 永田育也(名古屋大学医)

SMONの病因論として, 京大井上氏らによってウイルス説が強く主張され, 多方面の実験結果が報告されている。我々は井上氏らの実験結果の追試の一つとしてC57BL/6 新生マウスに井上-agent(渡辺株), SMON患者脊髄液を接種して, 体重の変動, 神経症状の発現, 死亡の有無, 及び病理組織学的検索を行った。

<animal>

- C57BL/6 ① 実中研
② 名大純系
③ 京大(井上氏の好意による)

<Sample>

渡辺株

- SMON患者脊髄液 ① K 株
② Y 株
③ A 株

×10にして使用

<接種方法>

0.02ml を intracranial injection, intraperitoneal injection.

実験結果

脳内接種例について報告する。

渡辺株接種マウスで1/9, K株接種マウスで2/9 明らかな後肢の異常が認められた。即ち、『強制的に歩行を継続させた場合, 片側後肢に, 伸展したまま屈曲し得ない状態を生じた。しかし, これは一過性で, 休めばまもなく回復した。』

K株接種例では, 4Wまでの死亡率が高く, 成長したマウスの9例中6例まで何らかの異常を認めた。後肢の異常を認めたマウスは(Fig 1)体重減少が著しく, 出生后15日前後で成長が止まってしまう。後肢の異常については京大井上氏らの観察したものと同一ものと思われる。

病理所見

K株接種例3匹(接種後27日, 43日, 43日), 渡辺株 接種例2匹(34日, 35日), 対照1匹(47日)を井上氏らの方法により固定し, 脳, 脊髄の病理学的検索を行った。K株, 及び渡辺株接種例の中にはそれぞれ後肢の異常を示した一匹を含む。

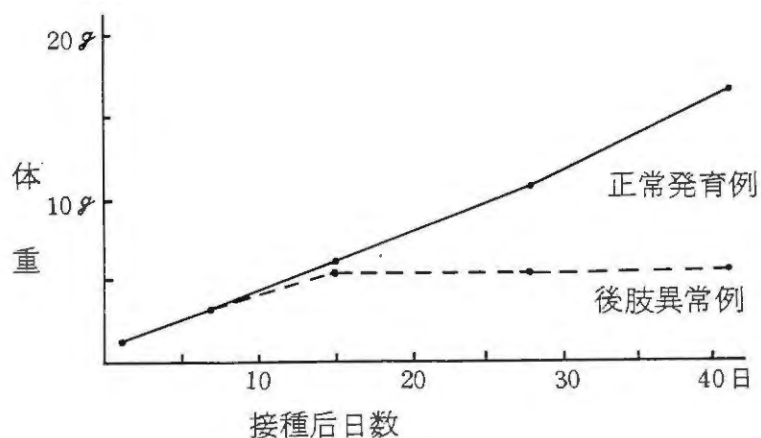
実験例のいずれにも, 対照に比して明らかに有意な病変は認められなかったが, 現在, この6匹以

外についても病理学的検索を続行中である。

腹腔内接種例，脳内接種で後肢の異常を示めさなかった例（Y株接種例）へのMTXの投与等の実験は経過観察中である。

	実験数	死亡	正常	マヒ	体重減
対 照	10	1	9	0	0
渡辺株 ($10^{6.5} / 0.1$)	10	3	5	1	1
K 株 ($10^{5.3} / 0.1$)	19	10	3	2	1 ⊗
Y 株 ($10^{4.8} / 0.1$)	16	3	13	0	0

⊗ Wasting を示めたもの3匹



Sample の提供，実験方法についてのadviceを
名古屋大学・医・内科 祖父江助教授より受けた。

「井上ウイルス」の追試に関する 分担研究報告

奥野良臣, 高橋理明

山西弘一 (阪大 微研)

本年(1972) 2月2日, 京大ウイルス研究所井上幸重博士より凍結乾燥の「井上ウイルス」及びBAT6細胞の分与を受け, 以下の通り追試を行った。

1. CPEの観察

「井上ウイルス」浮遊液を階段希釈し, BAT6細胞を用いてtitrationを試みた。すなわち分与された「井上ウイルス」1バイアルを滅菌蒸留水1mlで溶解し, あらかじめ用意したBAT6細胞に10倍の段階希釈したウイルス液を1段階4本宛のチューブに接種し, 7日間観察した。

尚, 培養温度は35°~36°Cであり, 培地はEagle MEMに2% 仔ウシ血清を加え, PH 6.5であった。

観察の結果, 対照細胞に比し特異的なCPEは確認できず, 従ってウイルスの感染価は測定できなかった。

2. H^3 -thymidineのウイルス粒子へのとり込み

「井上ウイルス」をhuman embryo lung cellに接種し, H^3 -thymidineを培養液中に加え, 7日後にharvestしその上清を30,000 rpm, 120分遠心し, 沈渣部分を10mlのmediumにsuspendし, DNase処理したのち, 更に30,000 rpm, 120分遠心し, そのsedimentをsucrose density gradient (20~40%) 上におき, 35,000 rpm 105分遠心したのち, dropwiseに集めて放射能を測定した。

その結果, 肉眼では遠心チューブに明瞭なバンドは見られず, アイソトープのカウントでもウイルス特異的と思われるpeakは見られなかった。

3. 「井上ウイルス」感染細胞の電子顕微鏡的観察

「井上ウイルス」感染human embryo lung cellの感染後7日目の超薄切片を作り, 電子顕微鏡で観察した。多数の標本について綿密に調べられたがウイルス粒子らしいものは見られなかった。なお, この実験は当研究所の新居助教授に依頼し, 同氏によって行われたものである。

井上博士のスモン関連ウイルスに関する追試

桜 田 教 夫

(北海道立衛生研究所),

飯 田 広 夫

(北海道大学医学部細菌学教室)

要 約

井上博士らは昭和45年に北海道で採取された29件のスモン患者髄液から、BAT6細胞を用いて23株のスモン関連ウイルスを分離した。われわれは同一材料についてC57B/6マウスの脳内接種を行なったが発症したのは29件中3件であった。発症に要する日数は一定してなく、リッター中全部のマウスに発症はみられなかった。3例中1例のマウスの脳、肝、脾乳剤を継代したが陰性であった。

標準株である渡辺株をC57B/6マウスの脳内と腹腔内に接種したところ、10倍希釈液の腹腔内接種マウスが13日目に発症したが他は全部陰性であった。

患者材料と標準株接種マウスの病理組織学的検査を行なったが、脊髄には対照に比較して特記すべき変化はみられなかった。

陽性であった患者髄液および標準株の原材料についてC57B/6マウスに再接種を行なったがすべて陰性であって再現性はみられなかった。

結 言

スモンは患者発生の地域的な片寄りと、夏季に比較的多いことから最初は病原微生物による感染が想定され、いくつかの細菌、マイコプラズマ、ウイルスが候補に上っていたが、いずれも追試による確認と再現性が不可能であって、最終的には井上博士らの主張するスモン関連ウイルスに的がしぼられるようになった。¹⁾

スモン関連ウイルスは最初はBAT6細胞にのみに感受性があるとされ、BAT6細胞における細胞病原性の判読と細胞の維持の困難なことから井上博士の周辺の一部の研究者によってのみ研究が進められていた。しかし昭和46年8月5日に開催された微生物部会、ウイルスグループの第1回研究会において井上博士はC57/Black/6系マウスが感受性が高く、脳内接種によって2～3週間後に発症、斃死することを発表し、本ウイルスの追試、確認の道が開かれた。

材料および方法

1) 患者材料

井上博士らがBAT6細胞によって高率にスモン関連ウイルスを分離した⁽²⁾北海道のスモン患者髄液は昭和45年に北海道内の保健所、病院から送付された材料であって、-30℃のフリーザーに保存されてあった。これらの材料は送付後直ちに2分してあったので融解の影響は少いと考えられる。

2)標準株

井上博士から分与された人2倍体細胞に増殖した渡辺株である。凍結乾燥アンプルの内容を1mlの滅菌蒸留水で溶してからEagle MEM pH6.5の希釈液で希釈した。

3)C57B/6マウス

主として脳内接種に用いたC57B/6マウスは日本クレア株式会社から妊娠マウスを入手し、出生後24時間以内の哺乳マウスの脳内に0.02~0.03ml接種した。接種後マウスは最初は1ヶ月、後に3ヶ月間観察した。

結 果

1)北海道のスモン患者髄液についてのスモン関連ウイルスの追試

スモン患者の髄液はそのまま、あるいは滅菌食塩水で5~10倍に希釈してからC57B/6マウスの脳内に接種した。結果は表1に示す通りである。

表1

コード	発病年月日	採取年月日	BAT6分離成績	C57/6 接 種	
				希 釈	成 績
SF 1	S44.9.10	S45.4.4	+	0	—
SF 6	S45.3.3	S45.4.4	+	1:10	—
SF 19	S45.5.8	S45.5.28	+	1:10	—
SF 24	S44.12	S45.6.4	+	1:5	—
SF 33	S44.5.5	S45.6.23	+	0	—
SF 38	S45.6.17	S45.6.24	—	1:5	—
SF 47		S45.6.9	+	1:5	—
SF 51	S45.6.15	S45.6.26	+	0	+
SF 55	S44.5	S45.6.23	—	0	—
SF 56	S45.1	S45.7.2	+	0	—
SF 59	S45.4	S45.7.2	—	0	—
SF 81	S45.6.20	S45.7	—	0	—
SF 82	S45.5.29	S45.7.24	+	0	—
SF 90			+	0	—
SF 94	S45.5	S45.8.10	+	0	—
SF 96	S45.4.16	S45.8.10	+	0	+
SF104			+	0	—
SF108			+	0	—
SF112		S45.8.6	+	1:5	—
SF113		S45.8.6	+	1:5	—
SF114	S45.4	S45.8.6	+	1:5	+
SF159	S45.6	S45.8.6	+	1:5	—
SF180		S45.9.5	+	1:5	—
SF187	S45.8.6	S45.8.6	+	1:10	—
SF191		S45.8.5	—	1:5	—
SF194		S45.10.1	+	1:5	—
SF196		S45.10.8	+	0	—
SF202		S45.10.8	—	1:5	—
SF206	S44.11	S45.10.30	+	1:10	—
計			23/29		3/29

29件の髄液をC57/6マウスの脳内に接種して3件が発症している（10.3%）。BAT-6細胞では23件が陽性であって分離率は非常に高い（79.3%）。発症例はいずれもBAT-6細胞陽性例と一致するが井上博士の研究室でC57B/6脳内接種陽性であったSF196はわれわれの追試では陰性であった。

発症したマウスは動作が緩慢になり、立毛、しんせん、四肢特に後肢のまひ、体重の減少がみられ、これらの症状は中村らの報告と一致する。⁽³⁾

発症に要する日数とリッター中の発症マウスの数は一定していない。表2にみられるようにSF51は10日目、SF96は17日目、SF114は15日目に発症している。またSF51は4匹中2匹、SF96は7匹中3匹、SF114は5匹中3匹のみが発症した。

表 2

C57B/6の脳内接種後の発症マウスの経過

日	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
SF 51	● ● ●P ●P	● ●	○P ○P									
SF 96	○○ ○○ ○○ ○	○○ ○○ ○○ ○	○○ ○○ ○○ ○	○○ ○○ ○○ ○	○○ ○○ ○○ ○	○○ ○○ ○○ ○	○○ ○○ ○○ ○	○○ ○○ ○○ ○	○○ ○○ ○○ ○	○○ ○○ ○○ ○	○○ ○○ ○○ ○	○○ ○○ ○○ ○
SF 114	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○
Watanabe株 (10 ⁻¹ , i, p)	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○	○○ ○ ○ ○

注： ○生存、●発症、●死亡、P病理組織学的検査

病理組織学的検査ではSF51は脳、脊髄に脱髄、細胞浸潤はなく、神経細胞に変化はみられなかった。SF96とSF114は対照に比較して特記すべき変化はない。

SF51、SF96、SF114については原材料を初回と同一の希釈を行ない、C57B/6マウスの脳内に接種したが陰性であった。

SF96の初回の接種の際、発症死亡したマウスの脳と肝、脾の乳剤を作り、それぞれ脳内と腹腔内に接種したが陰性であった。

対照としては正常人髄液2件、Eagle MEM pH6.5、0.1%イーストエキストラクト加培地および同培地に2%胎児牛血清を加えたものを用いたが全例陰性であった。

C57B/6マウス接種により陽性であった髄液が採取された患者の病歴は次の通りである。

SF51は48才の女性で住所は空知郡北村字砂浜である。昭和40年6月15日に腹部症状が出現し、6月18日より両側の手指、肘、ひざに知覚異常が出現した。キノフォルム服用の有無は不明である。髄液は6月26日に採取された。SF96は釧路市の46才の女性である。昭和45年4月16日から下痢があり、エマフォルム1日1g、16日間の投与を受けた。6月3日よりしびれ感、6月10日より歩行不能を来した。髄液の採取は8月10日である。SF114は年齢不詳、小樽市の女性であり、昭和45年より下痢が出現し、メキサフォルム14錠の投与を受けた。6月よりしびれ、歩行障害を来した。髄液の採取は8月6日である。

2)標準株についての追試

標準株、渡辺株を1:5, 1:10, 1:1000の希釈を行ってから、1:5と1:1000は脳内、1:10を腹腔内に接種した。脳内接種分はすべて陰性であったが、腹腔内接種群は第2表にみられるように13日目に5匹中1匹が死亡し、14日目に4匹が発症した。発症した4匹中3匹は病理組織学的検査を行なったが残った1匹はその後回復し、生存し続けた。

発症マウスの病理組織標本(Klüver-Barrera染色)は昭和47年2月19日のスモン調査研究協議会微生物部、病理部合同会議の際、供覧したところ、病理部会の白木博士は脱髄はみられず、おそらくミエリン形成の抑制されたものであろうとの見解を述べた。

渡辺株はその後1:10希釈液を2リッターのC57B/6マウスの腹腔内に、1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000希釈液を脳内に接種したが全例陰性であった。

考 察

昭和47年3月13日に開催されたスモン調査研究協議会の総会において、スモンと診断された患者の大多数はキノフォルム剤の服用によって神経障害を起したものであるとする研究総括がなされた。しかし総括に述べられているように、患者発生の状況は地域的な集団発生とか、特定の病院、家族に集積する等、キノフォルムのみによってスモン患者が発生したと考えることの困難な場合もあった。

昭和47年7月20日に国立予研で開催された井上博士の提唱された因子に関する追試成績の検討会では、国立予研の腸内ウイルス部と病理部における成績の発表がなされた。C57B/6マウス脳内接種によっては発症マウスのリッター毎の頻度はきわめて低く、病理組織学的検査では正常マウスにおいても生後2週間までの哺乳マウスでは脊髄のミエリン形成の不全があることが指摘された。

われわれは現在スモンの感染説における病原体の唯一の候補である井上博士のスモン関連ウイルスについてC57B/6マウスを用いて追試を行なった。しかし実験成績では発症頻度はきわめて低かった。スモン調査研究協議会微生物部会第3回に井上博士は、同一材料を多数のリッターに接種すること、希釈材料を接種すること、観察期間を3ヶ月以上とすることを要請したが、これらの実験条件を守ったとしても結果的に陰性例が圧倒的に多く、しかも発症マウスの病理組織像に特異的な所見が

得られないことから、SMONがウイルス感染によるという確定的な根拠は乏しいものと考えられた。

本研究を遂行するに当り病理組織学的な検査に御協力戴いた石倉正嗣博士（北大第2病理）と奥山富三博士（札幌大第2病理）に深謝する。

文 献

- 1) 井上幸重ほか：スモン調査研究協議会研究報告書. №3・31～44, 昭和46年.
- 2) Y.K.Inoue et al. Lancet. Vol.1:853-854, 1971.
- 3) Y.Nakamura et al. Lancet. Vol.1:223-226, 1972.

SMON 病原因子の検討

北 原 典 寛，多 ヶ 谷 勇

(国立予防衛生研究所 腸内ウィルス部)

I 序

井上博士等は S M O N 患者由来の材料から B A T - 6 細胞に C P E を起す因子を分離し又この因子は C 5 7 B L / 6 , d d 系等のマウスに R U N T I N G , 立毛, 四肢麻痺等の症状を惹起すると報告している。^{1, 2}

之等の報告の速やかな追試確認はかねがね望まれていたところであるが, B A T - 6 細胞を良好な状態に継代維持することが容易でないこと, C P E の判定がウイルスによる従来の C P E の場合と趣を異にすることから, B A T - 6 細胞における C P E の検討は容易ではないと考えられるのであるが, マウスにおける R U N T I N G , 立毛, 四肢麻痺等の症状はその判定が比較的容易であると思われたので, B A T - 6 細胞における C P E の検討に先立って今回はマウスにおけるスモン因子の病原性についての井上博士等の報告の追試を行うこととした。

追試の方法としては S M O N と関連のある人由来の材料, 主としてリコールをその儘又は人胎児肺細胞を2回通過した後 C 5 7 B L / 6 の生後24時間以内の新生児マウスに接種, 接種後3ヶ月間観察して異常の発生の有無をみることにした。試験したリコールのうち1例は名古屋大学永田教授から分与された S M O N 患者のリコールであるが他は予研甲野, 多ヶ谷博士を介して入手されたもので之等材料の由来等の詳細については全く知らされていない。なお追試の具体的方法, 手技については混乱を避ける為に井上博士等の方法と可及的に同様の方法を採用することに努めた。

II 実験材料ならびに方法

マウスに接種した材料は次の通りである。

S L - N a g o y a 0 : 名古屋大学永田教授から分与戴いた S M O N 患者からのリコールである。このリコールは井上博士に送付され B A T - 6 細胞での C P E について検討され陽性と判断されたものである。

S L - N a g o y a P - 2 : 上記リコールの人胎児肺細胞2回通過材料である。

S L - 16.6 P - 2 および S L - 16.7 P - 2 : 予研甲野, 多ヶ谷両博士を通じて供試されたりコールのうちの2例の人胎児肺細胞2回通過材料である。これ等のリコールについての詳細は知らされていない。

S L - 16.0 P - 2 : 供試リコールの人胎児肺細胞の通過と併行して, 最初の人胎児肺細胞培養への接種をblankにした外, リコールを通過したのと全く同様な処置をして得られた人胎児肺細胞培養液対照である。

リコール通過に用いた人胎児肺細胞は人胎児から直接準備されたもので, 10%牛胎児血清加 Eagle

氏液で継代したもので、リコールの通過にはその14乃至16代の継代を用いた。通過に当ってはリコールのEagle氏液での10倍希釈の0.1 mlを、ローラーチューブに完全にシートを作り培養液を2%牛胎児血清加Eagle氏液1 mlに交換された人胎児肺細胞に接種し、 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ に1週間培養した後、その培養液のみを採集した。この培養液をEagle氏液で10倍に希釈したものの0.1 mlを再び初代通過と同様にして人胎児肺細胞を通過した後、培養液を採集3,500 RPMで20分間遠沈し、上清を2%牛胎児血清加Eagle氏液で10倍に希釈して保存した。リコール、人胎児肺細胞通過材料等はすべて常に -70°C 以下(REVCO冷凍器)に保存した。

接種に用いたマウスはC57BL/6の生後24時間以内の新生児である。リコール原液又はその人胎児肺細胞2代通過材料を2%牛胎児血清加Eagle氏液で10倍に希釈したものの0.02~0.03 mlを脳内に接種した。観察期間は90日間とし、異常を呈したマウスは死亡寸前と判断される時期に予研病理部へ送付した。異常を認めなかったマウスもその一部を対照として病理部へ送付した。

III 実験成績

現在までに得られた成績を表1に示す。リコール材料接種群に接種後主として2~3週後にCRUNTING, 立毛, 四肢麻痺を示すマウスが認められた。この症状を呈するものを一応発症と見做した。井上博士等は四肢麻痺と記載されているが発症と認められるマウスは無理に歩行を強いると当初歩行が困難であるが、繰り返して歩行を強いると可成りよく歩行する様になり、時間をおいて観察すると再び歩行困難になっており特異な歩行障害の症状であった。

表1. SMON材料のマウス接種成績

接 種 材 料	リ ッ タ ー 毎 の 成 績				
SL-Nagoya θ	$\frac{1(17)}{1(16)} \\ 0$ 6	$\frac{2(15,15)}{0} \\ 0$ 4	$\frac{0}{0} \\ 0$ 6	$\frac{1(56)}{0} \\ 0$ 9	
SL-NagoyaP-2	$\frac{1(13)}{0} \\ 0$ 10	$\frac{0}{0} \\ 0$ 8	$\frac{1(12)}{1(36)} \\ 0$ 6	$\frac{1(22)}{1(22)} \\ 0$ 5	$\frac{0}{0} \\ 0$ 7
SL-N.6 P-2	$\frac{0}{0} \\ 0$ 5	$\frac{0}{0} \\ 0$ 3	$\frac{0}{0} \\ 0$ 6		
SL-N.7 P-2	$\frac{1(11)}{0} \\ 0$ 5	$\frac{1(17)}{1(74)} \\ 0$ 7	$\frac{0}{0} \\ 0$ 10		
SL-N.0 P-2	$\frac{0}{0} \\ 0$ 6	$\frac{0}{1(9)} \\ 2(9,9)$ 9	$\frac{0}{0} \\ 2(7,7)$ 4	$\frac{0}{3(32,53,66)} \\ 0$ 7	$\frac{0}{1(22)} \\ 1(66)*$ 7
	$\frac{0}{0} \\ 0$ 8	$\frac{0}{0} \\ 0$ 5	$\frac{0}{1(59)} \\ 0$ 6		
無 処 置	$\frac{0}{0} \\ 8(12,12,19,19,33,33,34,34)$ 10			$\frac{0}{2(14,14)}$ 7	

マウスはC57BL/6, 接種材料の10倍希釈液0.02~0.03 ml を生後24時間以内の新生児の脳内に接種, 接種後3ヶ月間観察

SL-Nagoya θ: 永田教授より分与, SMON患者リコール原液

SL-Nagoya P-2: 上記リコールの人胎児肺細胞2回通過

SL-№.6 P-2 } リコールの人胎児肺細胞2回通過
SL-№.7 P-2 }

SL-№.0 P-2: 人胎児肺細胞培養液対照

1^イ (17) =

イ. 発症と見做されるマウス数

1^ロ (16)

ロ. 明確な発症を認められることなく死亡したマウス数

0^ハ

ハ. 正常の儘病理部へ送付したマウス数

6^ホ

ニ. 括弧内のアンダーラインは病理部へ送付したマウスを示し, 数字は接種後病理部への送付迄の又は死亡迄の日数を示す。

ホ. 3ヶ月間の観察数, リッター毎, 接種後1週間以内の死亡例を除く。

* このマウスのみは運動が活発でなく両後肢に運動障害が認められた。

材料接種群にも対照群にも明らかな症状の発見をみることなく死亡するマウスがあり, 発症と認められ病理部へ送付されたものを死亡としてリッター毎の死亡数を比較すると材料接種群と対照群との間に有意の差は認められなかった。(表2)

表2. 発症と見做されるマウス及び明らかな症状を認められることなく死亡したマウスのリッター毎の発生頻度

接 種 材 料	リ ッ タ ー 毎 の 発 生 頻 度				
SL-Nagoya θ	2/6	2/4	0/6	1/9	
SL-Nagoya P-2	1/10	0/8	2/6	1/5-1	0/7 1/7
SL-№.6 P-2	0/5	0/3	0/6		
SL-№.7 P-2	1/5	2/7	1/10		
SL-№.0 P-2	0/6	1/9-2	0/4-2	3/7	1/7-1
	0/8	1/5	1/6		
無 処 置	0/10-8	0/7-2			

発生数

接種後3ヶ月間の観察数

分母の減じた数は正常の儘病理部へ送付したマウスの数, 従って分子には含まれない。

しかし明らかに発症と見做されたマウスについてみると、対照群にはその発生はなく、発症と認められるマウスは材料接種群にのみ発生した。ただしその頻度は低く、リッター当り2匹をこえることはなかった。

表 3. 発症と見做されるマウスのリッター毎の発生頻度

接 種 材 料	リ ッ タ ー 毎 の 発 生 頻 度					
SL-Nagoya θ	1/6	2/4	0/6	1/9		
SL-Nagoya P-2	1/10	0/8	1/6	1/5-1	0/7	0/7
SL-No. 6 P-2	0/5	0/3	0/6			
SL-No. 7 P-2	1/5	1/7	0/10			
SL-No. 0 P-2	0/6	0/9-2	0/4-2	0/7	0/7-1	
	0/8	0/5	0/6			
無 処 置	0/10-8	0/7-2				

発生数

接種後3ヶ月間の観察数

分母の減じた数は正常の儘病理部へ送付したマウスの数、従って分子には含まれない。

Ⅳ 考 察

井上博士等の報告する新生児マウス脳内接種により惹起される症状即ち立毛, RUNTING

四肢麻痺を呈するものがリコール材料を接種したマウスにみられた。対照群にはその様な症状を示したものはなかった。しかしながらRUNTING, 立毛, 歩行障害等の症状を呈したものは1リッターに1又は2匹で、井上博士等の報告の如く高率には認められなかった。又対照群にも死亡するものがあり、それ等の死亡例にはRUNTING, 歩行障害等は認められなかったが、単に死亡したマウスの数から判断するとリコール材料接種群と対照群との間に差は認められなかった。しかし明らかにRUNTING, 歩行障害を呈したマウスの発生は対照群には認められなかったことから、この発症は接種されたリコール材料と何等かの関連を有するものと考えられる。

表に示された成績は何れもリコール又はリコールの人胎児肺細胞の2代通過材料を10倍に希釈したものを接種して得られた成績であるが、更に高希釈の材料を接種した場合の異常マウスの発生頻度

を検討することが必要であり、又異常を呈したマウスの材料からの継代実験を行うことが肝要である。しかしながら異常を呈したマウスが特異的な発症であるか否かを確定する方法が現在のところ未だ無く、又異常を呈するマウスの発生頻度が低いので、接種材料の希釈と異常マウスの発生頻度を定める実験、マウスによる継代実験を行うことは極めて困難であると考えられる。

この点を解決するために材料接種による異常マウスの発生頻度を高める何等かの方法を見出すことが望まれる。

ENDOXAN(塩野義)の使用を一部試みたが予備実験の域に留った。

V 要 約

井上博士等のSMON因子のマウスに対する病原性についての報告の追試を行った。

供試されたリコール材料を接種されたマウスに井上博士等の報告の如くRUNTING, 立毛, 歩行障害を呈するものが認められた。しかしその発生頻度は低かった。

接種材料の希釈に伴う発症頻度の検討, 継代実験による検討を行うにいたらず, SMONの病原因子の存否を定める明確な成績を得るに至っていない。

文 献

- 1) 中村良子, 井上幸重: SMONのウイルス学的研究 II. 分離ウイルスの病原性 1971, ウイルス オ 21 巻オ 3 号, オ 19 回日本ウイルス学会総会記録 P. 92~95.
- 2) Y. NAKAMURA, Y. KANDA INOUE: Pathogenicity of Virus associated with Subacute Myelo-Optico-Neuropathy 1972, Lancet, Jan. 29, P. 223~226.

SMON 病原因子の検討

2: 接種マウスの病理組織学的検索

内 田 信 之, 大 川 時 忠,
橋 本 魁, 江 頭 靖 之

(国立予防衛生研究所病理部)

I 序

井上等の提唱する S M O N 病原因子につき, 予防衛生研究所腸内ウイルス部の北原等はマウスを用いて実験を行った。吾々は病原因子接種マウス(発症したと思われるマウスを含む)と, 対照として培養液のみを接種したマウス及び無処置マウスを剖検し, 主として中枢神経系の所見を観察した。これとは別に, 井上等の実験において C 5 7 B L / 6 マウスは発症し病変も起るが, d d マウスでは起らないという現象を理解するために, 病理部において飼育した 2 系統 (C 5 7 B L / 6 と d d Y) の無処置マウスの中枢神経系を組織学的に生後 3 ~ 3 0 日間観察し, これら両系列の材料の観察結果から病変を検討した。

II 実験材料ならびに方法

接種材料, 接種法は北原等の報告に記載されている。

異常を呈したマウスは, 概ね死亡直前の状態で病理部に渡された。マウスの組織固定は井上博士から送られたメモに記載された方法にできるだけ忠実に従って組織像の解釈以前の問題がないように努力した。即ち, Nembutal (Abbott Lab. 製) 60 mg / Kg をマウスの腹腔に接種し, 深麻酔下で胸部を切開し, 固定液 (主成分は paraformaldehyde) に連なる注射針を左心室に穿刺し, 右心耳を切断してから除々に灌流固定を行った。中枢神経系の取出し方や其他についても井上等の方法に準じて行った。

組織の脱水, パラフィン包埋, 薄切等は通常の組織標本製作法に従い, 染色はヘマトキシリン・エオシン 2 重染色, 髄鞘について luxol fast blue 染色及び軸索について Holmes の鍍銀法を用いた。なお適宜これらを重染色として全一標本に利用した。

III 実験成績

A. 北原らの実験マウスの病理組織学的検索.

病理所見の記載の便宜のためにマウスに個体番号をつけた。従って北原等の表 2 にこの個体番号を加えたものを表 1 にかかげた。番号の初めの数字はリッターの番号で, 後の数字は個体のリッター毎の通し番号である。マウスへの接種は生後 2 4 時間以内に行われたので接種後日数と生後日数は同一とみなしてよい。組織学的に検索した接種群と対照群のそれぞれの検索時期と個体番号を表 2 にまとめた。

表1.

C57BL/6マウスのリッター毎の発症並に死亡

発生頻度と組織検索番号表

(北原の表1, 2を参照せよ)

接種材料		発生 頻度	マウス No	発生 頻度	マウス No	発生 頻度	マウス No	発生 頻度	マウス No
SL-Nagoya θ		2/6	No 2-1	2/4	No 4-1 4-2	0/6		1/9	
SL-Nagoya P-2		1/10	No 21-1	0/8		2/6	No 23-1	1/5-1	No 24-1 24-2
		0/7		1/7					
SL-No6 P-2		0/5		0/3		0/6			
SL-No7 P-2		1/5	No 8-1	2/7		1/10			
対 照	SL-No0 P-2	0/6		1/9-2	No 19-1 19-2	0/4-2	No 20-1 20-2	3/7	
		1/7-1	No 27-1	0/8		1/5		1/6	
	無 処 置	0/10-8	No 7-1 7-2 7-3 7-4 7-5 7-6 7-7 7-8	0/7-2	No 11-1 11-2				

表 2.

接種材料別の発症頻度と
組織検索例の接種後日数表

		マウス数			組織学的検索		
接種材料		全 数	発 症	非死 発症 亡	匹 数	個体番号	接種後日数 (生後日数)
SL-Nagoya θ		25	4	1	3	4 - 1 4 - 2 2 - 1	15 15 17
SL-Nagoya P-2		43	3	2	4	23 - 1 21 - 1 24 - 1 24 - 2	12 13 22 22
SL-№6 P-2		14	0	0	0		
SL-№7 P-2		22	2	2	1	8 - 1	11
対 照	SL-№0 P-2 (培地接種)	52	0	7	5	20 - 1 20 - 2 19 - 1 19 - 2 27 - 1	7 7 9 9 66
	無 処 置	17	0	0	10	7 - 1	12
						7 - 2	12
						11 - 1	14
						11 - 2	14
						7 - 3	19
						7 - 4	19
						7 - 5	33
						7 - 6	33
						7 - 7	34
						7 - 8	34

(1) 接種群の病理所見： マウスに病原因子を接種後病理学的検索したうち最も早い例は11日(168-1)である。この例は脊髓の頸、胸、腰髄について脊髓錐体路がluxol fast blue (以後LFBと略す)に染りが弱い(写真1)。12日例(1623-1)の症状としては、北原等の記載にあるように発症していたが、剖検で極めて強い脳水腫が認められた(写真2)。このマウスの組織所見としては胸髄と腰髄の錐体路のLFBの染色性が弱い、他の部分も染色性がある程度弱かった。従って脊髓錐体路のみの特異的病変とは考えられなかった。

15日例(164-1, 4-2)は2匹とも頸髄の錐体路が他の部に比してLFBの染色性が弱かった(写真3)。17日例(162-1)は、脊髓上部の錐体路のLFB染色性が弱かったが、腰髄は一部染色性を示す処があった。

22日例の1624-1は症状を示し、1624-2は症状を示さなかったが、2匹とも胸髄の錐体路のLFBの染色性が弱かった(写真4, 6)。1624-1の腰髄は髄鞘の通常存在する部分はすべてLFBに良い染色性を示した。なを1624-2は症状がなかったが脳水腫が強く、脳皮質は萎縮し、中枢神経系の發育障害があるものと考えられた(写真5)。

以上の脊髓錐体路のLFBに対して染色性が弱い部分を鍍銀法によって軸索を検索した。併し顕著な変性は見られなかった。ただ脊髓錐体路には、対照群においても全じであるが、少数の散在する太い軸索が分布していて、他の後索知覚領域の中間の太さの軸索の密集している分布と比較すると、前者は鍍銀法によって染色性が薄めに、後者はやや濃く見えると云う相異は見出された。

(2) 対照群の病理所見： 対照として生後7～66日迄C57BL/6, 15匹を検索した。

7日例(1620-1, 20-2)は2匹とも脊髓の髄鞘の染色性がやや少いが、特に錐体路の染色性が弱く、他の部分との間に差があった(写真7)。9日例(1619-1, 19-2)は2匹とも脊髓の髄鞘は全般的にLFBに対してやや染色性が弱い、錐体路が特に染色性が弱かった。

14日例(1611-1, 11-2)は1611-2の腰髄を除いて、脊髓錐体路のLFBに対する染色性がやや弱かったが、殊に1611-1の胸髄の錐体路は明らかに染色性が弱かった。19日例(167-3, 7-4)は2匹とも脊髓錐体路のLFBの染色性が弱かったが、特に167-4の頸髄の錐体路は弱かった(写真8)

33日例(167-5, 7-6), 34日例(167-7, 7-8)は何れの部分でも、髄鞘がLFBに良く染っていた(写真9)

66日例(1627-1)は發育悪く、発症類似の症状を示したので検索した。脳には、脳水腫による脳室拡張があり、脊髓の髄鞘存在部位はLFBに良い染色性を示し、腰髄の錐体路は他より寧ろ強く染っていた。

B. C57BL/6系とddY系との脊髓發育段階の比較.

病理部において飼育したC57BL/6とddYを生後3～30日組織学的に検索した。C57BL/6は髄鞘のLFBに対する染色性が全般的に10日頃まで弱く、特に錐体路の部分が弱い(写真10,

11)。30 日になると脊髓髄鞘の染色性が錐体路でむしろ強くなっている。これに比べて軸索は10 日頃より染色性が良くなる。これに対してd d Yの脊髓髄鞘の染色性は5 日までやや弱く、特に錐体路は殆んど染っていない(写真12)。10 日になると髄鞘の染色性が出て来るが、錐体路はやや染色性が弱い。軸索はC 5 7 B L / 6 と全じく10 日以後染色性が良くなる。

Ⅳ 考 案

井上等の論文においては、中枢神経系のうち殊に脊髓の後索に特有な変化があり、これはヒトの S M O N に類似の病変であると記載してあるので、吾々もこの点に特別の注意を払いつつ観察した。

以上の吾々の検索結果から見ると井上等の因子を接種したマウスのうち少数は、脊髓錐体路の髄鞘の L F B に対する染色性が弱い(写真1, 3, 4, 6,)ことは確かである。しかしこれらの例の軸索を検索した限りでは特に変性があるとは見えなかった。即ち少くとも軸索変性と髄鞘の変性とが共存する病巣は観察されなかった。

なお接種群の何れにおいても脊髓後索知覚領域に変化は見られず、ヒトの S M O N の時に見られる知覚領域に特に強い変化を示す所見と比較すると相異があることになる。

更に対照例を検索すると、19 日例及びそれ以前においては、脊髓錐体路髄鞘の L F B に対する染色性は弱いことがわかった(写真7, 8)。一般に L F B に対する染色性は、生後一定の期間に生理的に次第に現われてくるものと考えられる。なお33, 34, 66 日の対照例では、この時期に髄鞘が完成しているためか、錐体路の染色性もよくなっている。

これらの所見をよりよく理解するために更に、北原等の実験とは別に飼育した C 5 7 B L / 6 系と d d Y 系マウスについても、観察を行い、その結果マウス幼若時の髄鞘の染色性についての知見はかなり確実になったと思う(写真10, 11, 12)。

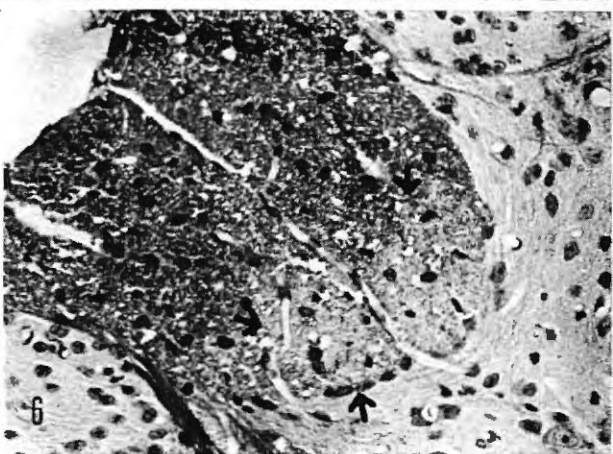
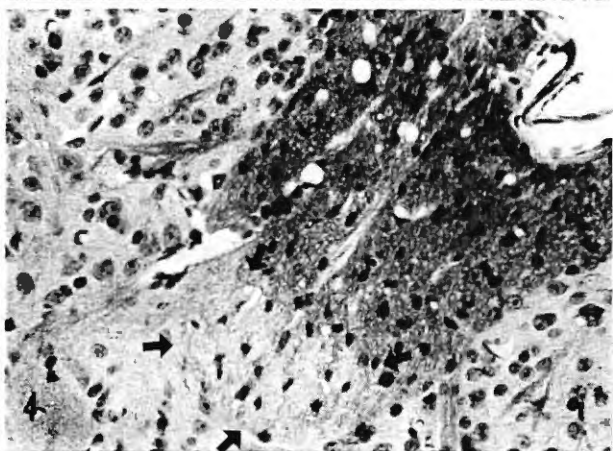
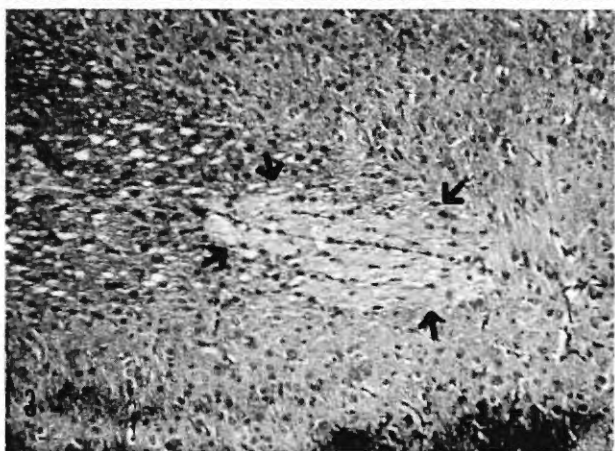
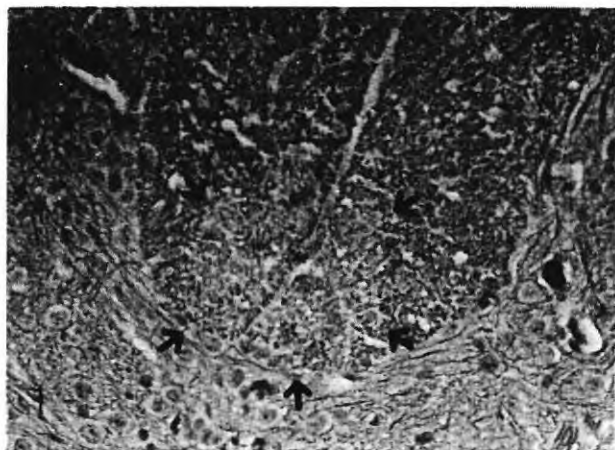
又接種群、対照群の何れにも脳水腫を示す例があった。

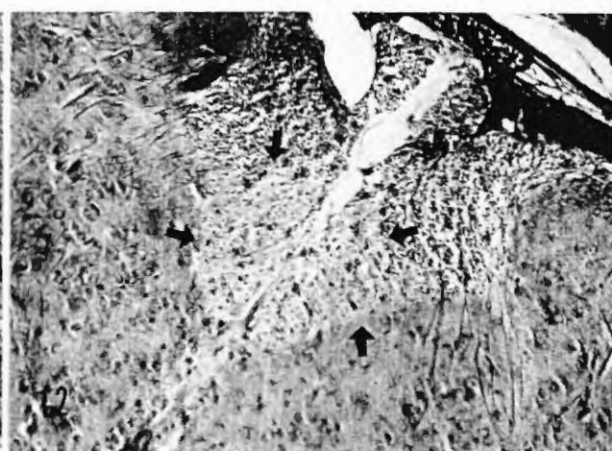
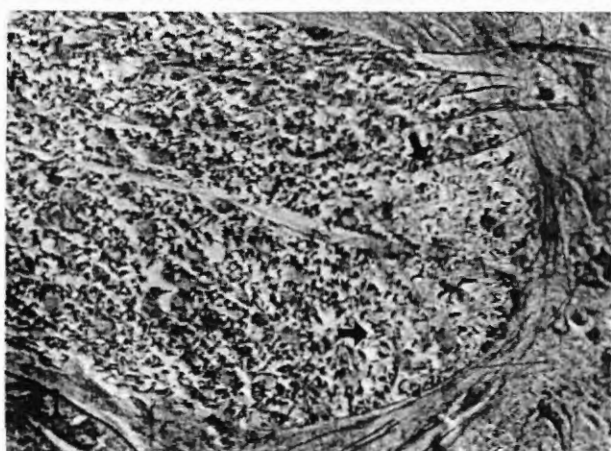
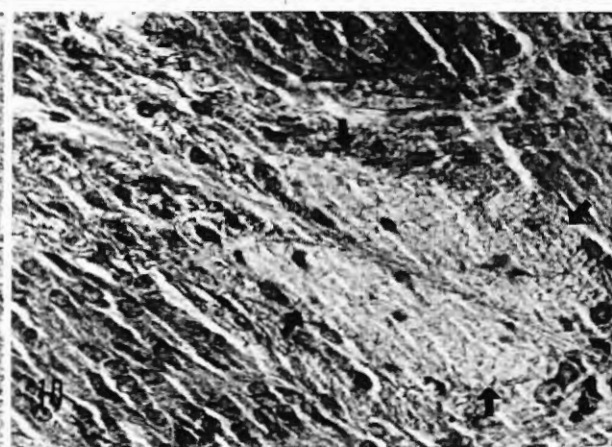
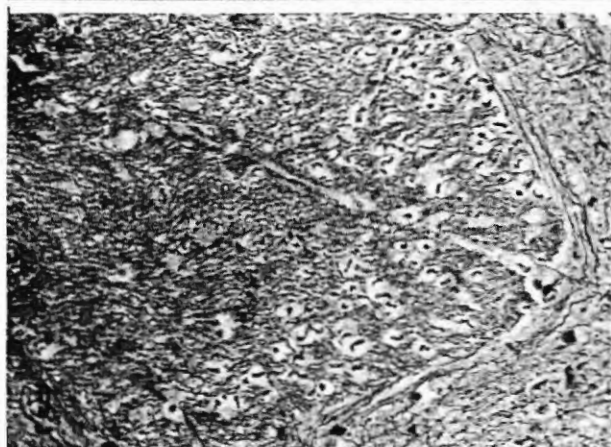
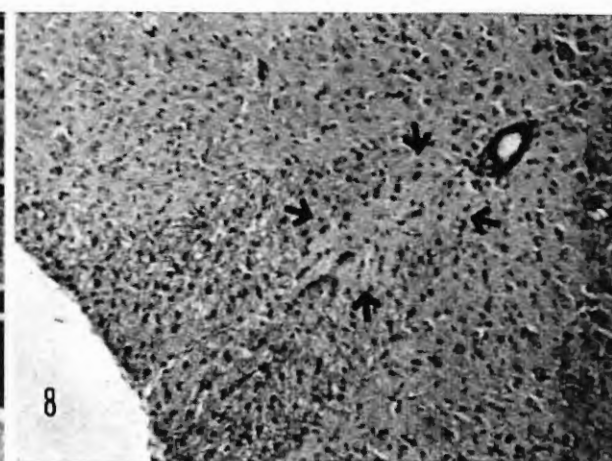
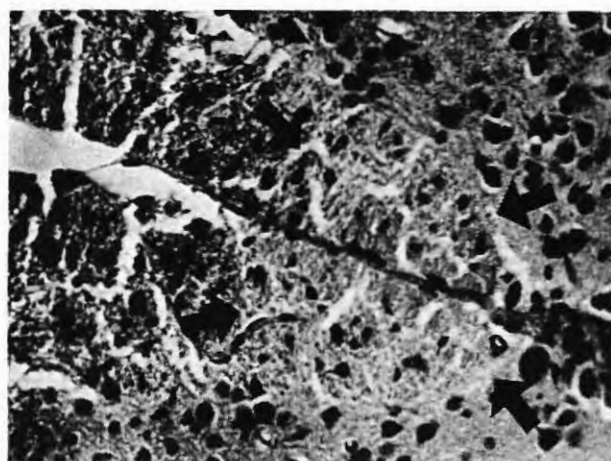
以上の所見から考えると、上記接種群マウスに見られた脊髓錐体路の髄鞘の L F B 染色の弱さを髄鞘の変性と解して、その組織像と井上等の病原因子を接種したマウスのうち少数に起った臨床症状とを関連づけ、組織像と病原因子との間に直接の因果関係を求めるのにはなお問題があり、更に今後の検討を必要とするものと考える。

又ヒト胎児肺細胞培養液のみを接種した群で死亡例がかなりあるが、所謂発症とみなされる症状を示して死亡する例が少いことの原因も追求する必要があると思われる。

V 結 論

井上等の病原因子を検討するために北原等が C 5 7 B L / 6 系マウスを用いておこなった実験について、病原因子接種マウスと対照マウスの中枢神経系、とくに脊髓を組織学的に検索した。同時に d d Y 系マウスを対照としておこなったマウス脊髓についての髄鞘の発達時期を追求した実験結果をも考慮すると、脊髓錐体路の髄鞘の弱染性と病原因子接種との間に直接の因果関係があることを肯定できる結果を得るにいたらなかった。





写真説明

矢印はすべて脊髄錐体路と他の部分の境を示す。

1. №8-1, SL-№7 P-2接種. 11日. 胸髄後索. Holmes-LFB重染色, $\times 250$.
2. №23-1, SL-Nagoya P-2接種. 12日. 大腦(腦室拡張). HE 2重染色, $\times 25$.
3. №4-1, SL-Nagoya θ 接種. 15日. 頸髄後索. LFB染色, $\times 100$.
4. №24-1, SL-Nagoya P-2接種. 22日. 胸髄後索. LFB染色, $\times 250$.
5. №24-2, SL-Nagoya P-2接種. 22日. 大腦(腦室拡張). HE 2重染色, $\times 25$.
6. №24-2, SL-Nagoya P-2接種. 22日. 胸髄後索. LFB染色, $\times 250$.
7. №20-1, SL-№0 P-2接種. 7日. 頸髄後索. LFB染色, $\times 250$.
8. №7-4, 無処置. 19日. 頸髄後索. LFB染色, $\times 100$.
9. №7-6, 無処置. 33日. 腰髄後索. LFB染色, $\times 250$.
10. C57BL/6, 正常無処置. 3日. 胸髄(斜断)後索. Holmes-LFB重染色, $\times 250$.
11. C57BL/6, 正常無処置. 10日. 胸髄後索. Holmes-LFB重染色, $\times 250$.
12. ddY, 正常無処置. 5日. 頸髄後索. Holmes-LFB重染色, $\times 100$.

参考文献

Nakamura, Y., Kanda Inoue, Y. Lancet, 1972, 7744, 223.
Pathogenicity of virus associated with subacute myelo-optico-neuropathy.

スモン研究班報告

石 田 名香雄, 中 村 喜代人

(東北大・医・細菌)

はじめに

分離ウイルス学は発病病理機構の解明にまで責めを負わねばならない。われわれはかねてからスローウイルス感染症に興味をもち、その病理機構をin vitro系に於て理解することを目標にして研究をつづけており、この立場からスモン研究班に参加している。近年、SSPEの病原体としての麻疹ウイルスが脚光をあびて来たが、その発病病理機構に関しては全く推定の域を出ず、単にそれを解析するための手がかりを得たと云うに過ぎない。本疾患に代表されるように、スローウイルス感染症の多くは中枢神経系を主な病変の場としている。このことは

- 1) 脳に於けるウイルスの増殖は、いわゆる致死感染系とは可成り異なったパターンを示しているのではないか。
- 2) また抗体存在下でもウイルスが存続し得るような条件を備えているのではないか。

と云う可能性を考えさせる。このような可能性をラット由来のグリオーマ細胞と麻疹ウイルスの系を用いて検討した。

材料と方法

1. ウイルス：麻疹ウイルスEdmonston株のHela-S3細胞継代培養液を親ウイルスとして用い、感染価の測定はVero細胞を用いたブラック法で行った。
2. RG-6細胞：ラットグリオーマ由来のクローン化細胞(P. Benda et al., Science 161, 370, 1968)で、慶大医学部中沢博士から分与を受けた。培養には10%の牛血清を含むMEMを用いた。
3. 蛍光抗体法：麻疹ウイルスに対して高い中和抗体価をもつ成人血清を一次抗体とする間接法で行った。
4. 抗麻疹ウイルス家兎血清：S3細胞で増殖したウイルス液で家兎を免疫して得られた血清で512倍の中和抗体価を示すものを用いた。

実験成績と考察

1. RG単層培養に麻疹ウイルスをm.o.i. 10倍で感染させると、感染後24時間目から抗原合成細胞が出現し、以後急速にその数を増し、30～48時間で最大値に達する。しかしその時の抗原合成細胞は全体の5%を占めるに過ぎず、残りの95%の細胞では抗原の合成は認められない。
2. これらの抗原合成細胞の数とVero細胞上での感染中心の数とは一致することから、ウイルス感染グリオーマ細胞は完全なウイルスゲノムを持つものと思われる。
3. 次にこれらの細胞での感染性粒子の合成を検討した。RG細胞をm.o.i. 4で感染させreleased

virus及びcell-associated virusを経時的に測定したところ、両者共に最大値は感染中心の数の1/10に過ぎない。このことはグリアの感染細胞内ではウイルスの感染を極端に妨げるような機構が存在していることを示唆している。

4. 既に述べたように大部分のグリア細胞では抗原の合成を認めることは出来ないが、これらの細胞は麻疹ウイルスの感染に遺伝的に抵抗性をもつ細胞集団なのであろうか。RGから略ぼ50ケのクローンを得てウイルス感染を行ったところ、完全に抵抗性を示すクローンを得ることは出来なかった。

5. RG細胞集団に対するウイルスの吸着効率をS3細胞集団に於けるそれと比較したところ、両者間に有意の差を認めることは出来なかった。このことは抗原合成を行っていない細胞でもウイルスの吸着は起こっているものと思われる。しかしそれ以後の過程については不明である。

6. RG細胞でのウイルス粒子の合成は非常に少ないが、感染細胞はすべてVero細胞上で感染中心となり得る。そこでウイルス感染RG細胞からVero細胞へのウイルス伝播様式を抗血清を用いて解析した。ウイルス感染RG細胞を抗体を含む培地に浮遊しVero細胞の単層培養に接種し培養を続けると、3日目にウイルス抗原をもった巨細胞が出現する。このことはRG細胞からVero細胞へのウイルス伝播は中和抗体の作用を受けない形で進行する事を意味する。またRG細胞は巨細胞を作らないのでVero細胞間のウイルス伝播も同様の機構によって起こっているものと思われる。

ま と め

1. 麻疹ウイルスをラットグリオーマ由来のRG-6細胞に感染させると、5%の細胞にしか抗原合成を認めることが出来ない。その細胞での成熟粒子の形成は平均0.1ケ以下であるが、その細胞はVero細胞上ですべて感染中心となり得る。残りの95%の細胞は遺伝的に抵抗性をもつものではなく吸着過程は正常に進行するものと思われる。従ってRG細胞に於ては吸着以後のウイルス増殖過程を強く抑制する機構が存在し、しかもその抑制の度合は細胞側の生理的条件によって種々の程度に表現されるものと思われる。

2. 麻疹ウイルス感染RG細胞及びVero細胞から非感染Vero細胞へのウイルス伝播は中和抗体の存在下にも進行する。その機構は不明であるが、その事は脳に於けるウイルス存続の理解に役立つものと思われる。

スモン調査研究協議会研究報告書

No. 10

昭和46年度微生物部会研究報告

昭和47年3月25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2-10-30
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