

1 ヘルペスウイルス感染に関する研究

① ヘルペスウイルス感染に関する研究

東京大学医科学研究所ウイルス研究部

多田 愛子 関根 規由
鳥羽 和憲 吉野 亀三郎

研究目的

ヘルペスウイルスの胎児および新生児に対する影響としては、妊娠中の初感染で奇形を生じたという報告(1~4)があり、また最近20歳代の初感染が増えたきた(5)ことから、とくに2型ヘルペスウイルスで起こりやすい陰部感染が新生児に対して産道感染を起こす危険が大きくなりつつある。陰部感染の場合、1型ヘルペスウイルスでもかなりの感染例があり、とくにそのような場合は症状が激烈であることが多いのは(6)初感染例の増加を意味する。

以上の対策としては、先ず妊娠中の初感染をワクチンで予防するという試みは未だ行なわれていないが、これは将来何時か考慮されなくてはならなくなると思われる。もう1つの産道感染に就いては、母体が初感染でしかもその感染時期が妊娠後期であると、新生児は母体由来の抗体を持っていないから非常に危険であり、事実そのような場合の新生児重篤感染死亡例の報告が多い。

この場合、問題になるのは陰部とくに産道に分娩時にウイルスが存在するか否かという点であり、第2には母体血中抗体が陽性か否かという点である。そして母体抗体が陰性もしくは低値であって、しかも局部にウイルスが存在するときは、帝王切開で感染の危険を低減し得る(7)。従って重要なことは、ウイルスの分離によって速やかに診断を下すことと、血清抗体価の高さを速やかに知ることである。しかし今迄はウイルスの分離率が比較的低いので、それで確実な診断は期待できず、しかも時間的にも迅速な分離同定は困難であった。これらの点に就いて改良を行ない、迅速で高率なウイルスの分離同定の手段を確立することが今回の実験の目的である。

方法および結果

1. 検体採取の方法と保存

局所から材料を採る方法とその検査前の保存の間にウイルス活性の低下するのを最小にとどめる方法を考慮した。材料浮遊のためにチャーコールメジウム(8)やベントナイトメジウム(9)が工夫されているが、そのヘルペスウイルス分離率は約60%である。これを100%近くにしたいので、先ず次の6種の液中での1型HF株2型UW-268株ヘルペスウイルスの安定度を調べた。(i)リン酸緩衝食塩水(PBS)(ii)ペニシリン5000u/ml ストレプトマイシン1000r/mlを含む蒸留水(P&S10×)(以上はこれまでに屢々使用されたもの)、(iii)YLE液(Earle液に0.5%ラクトアルブミン水解物と0.1%イースト抽出物を含めたもの)に非働化コウシ血清(CS)2%を加えたもの(YLE-2CS)、(iv)同上のCSが20%のもの(YLE-20CS)、(v)MEM(Eagleのminimum essential medium)にCSを2%に加えたもの(MEM-2CS)、(vi)MEMにCSを20%に加えたもの(MEM-20CS)。

実験方法は鶏卵漿尿膜(CAM)継代のHFとUW-268株の感染CAM乳剤を上記の6種の液に夫々初代鶏胎細胞ブラック形成単位(PFU)で $10^5/ml$ 程度になるように浮遊し、ゴム栓シールの上、冷蔵庫・-20℃冷凍機・-70℃冷凍機の3箇所へ置き、逐時定量して感染価の変動を調べた。その結果は図1に示す。

驚いたことには、従来分離用の局所すき液として使われたPBSやP&S10×が非常にウイルス活性保存力の低かったことと、もう一つは、今迄の報告では2型は1型より高温薬剤その他種々の物理化学的的刺激に弱いことになっ

ているのに反し、適当な液中での冷凍状態におけるその安定度は1型と同じかむしろ少々良い傾向が有ったことである。土の6種の液のうち20%コウシ血清を含むものが非常に良いと思われた。

2. 凍結融解の影響

実際にウイルスを分離する際には、臨床と検査室の間の輸送だけでなく、その間に一時室温に放置されたり、一度冷凍されてまた融解して運ばれる機会も有り得る。とくに夏季にそのような事の起こる率が多い。また同じ建物の内での輸送でなくて、遠く離れた病院からの輸送その他でそのような事の機会は増える。これらの環境でもウイルス活性を維持するにはどれが至適かを調べた。

方法は前実験と同様なウイルス浮遊液を作って凍結融解をくり返し活性低下を定量した。結果は表1のように両型ウイルスともYLE-20CS内で非常に安定であった。

3. 濾過操作時の活性低下に就いて

採取保存材料を細胞にうえる場合、雑菌を除く目的で濾過を行なうが、その際ウイルスが濾過膜に付着してかなりの減少が有り得る。0.45ミリポア膜を使用する際には、緩衝食塩水(BS)で予備濾過しただけでは、ウイルスの減少は防げず、1%PVP(ポリビニルピロリドン)とpH7.2トリス緩衝液の前処理でその減少が妨げることが知られている(10)。ところが、上記のYLE-20CSのように血清を含む液中に浮遊したウイルスの場合は、とくにこのようなPVP前処理をしない膜でも良く通過することが判った。

すなわち、上記と同様なウイルス浮遊液をBS前処理とPVP前処理の0.45ミリポア膜に通してウイルス通過率を見ると表2のごとく、とくにYLE-20CSが通過が良く、PVP前処理を必要としなかった。

4. 分離用細胞の選択に就いて

どのような細胞が最もウイルス分離の効率が良いかという事は、すでにいろいろな継代歴のある保存陳旧株では調べられない。そこで、上記YLE-20CSで採取した臨床材料そのもの

6つを使ってその10,100,1000倍希釈をMEM-20CSで作製し、それを初代サル腎、HeLa, L, Vero, 2代ウサギ腎, RK-13細胞にうえて、5日以内のCPE発現を指標として感度の比較をした。この6株のうち、半数が1型で残り半数が2型のウイルスを含むことが後に判ったが、テストの結果はVero, 2代ウサギ腎(SRK), RK-13が良い事が判った。

5. 迅速簡便なウイルス同定法

細胞に材料をうえてCPEが出た場合、なるべく早くヘルペスウイルスであることの同定できれば、なお型の同定も行なうことが必要である。それにはYang(11)のマイクロプレート法を若干改良して用いると非常に良いことが判った。

上の方法を用いて最近の検査材料採取には局所を先ずP&S10×で濡らした綿棒でぬぐい、それを直ちにYLE-20CSに入れ、そのまま低温で輸送するように指示しており、この指示に従って送られた材料を分離同定した結果を表3に示す。

その分離率はVero細胞使用では、61%、またSRK細胞使用では81%である。

但し、この数字は、検査したすべての検体についての分離率である。臨床的にヘルペスウイルス感染の疑いのない症例を差しひくを、その分離率は、Vero細胞使用では、67.5%、SRK細胞使用では、87.1%となった。

要 約

ヘルペスウイルス分離用液、保存法および使用細胞の選択により分離率が著しく高まったので産道感染の危険を避けることが出来るようになった。

文 献

1. McCallum, F.O.: Virus - related mental defect and disorder. Proc. Roy. Soc. Med. 65: 585-587, 1972.
2. Florman, A.L., Gershon, A.A., Blackett, P.R. and Nahmias, A.J.: Intrauterine infection with

- herpes Simplex virus : resultant congenital malformation. J.A.M.A. 225 : 129-132, 1973.
3. Montgomery, J.R., Flanders, R.W. and Yow, M.D. : Congenital anomalies and herpes virus infection. Amer. J. Dis. child. 126 : 364 ~ 366, 1973.
 4. Cibis, A. and Burde, R.M. : Herpes simplex virus - induced congenital cataracts. Arch. Ophthalmol. 85 : 220 - 223, 1971.
 5. Hondo, R. : A seroepidemiological study of herpes simplex virus. Japan. J. Med. Sci. Biol. 27 : 205-213, 1974.
 6. Kawana, T., Shinkai, K. and Yoshino, K. : Typing of herpes simplex virus strains of genital and nongenital origins. Japan. J. Microbiol. 18 : 235-241, 1974.
 7. Nahmias, A.J., Josey, W.E., Naib, Z.M., Freedman, M.G., Fernandez, R.J. and Wheeler, J.H. : Perinatal risk associated with maternal genital herpes simplex virus infection. Amer. J. Obstet. Gynecol. 110 : 825-837, 1971.
 8. Nahmias, A.J., Wickliffe, C., Pipkin, J., Leibovitz, A. and Hutton, R. : Transport media for herpes simplex virus types 1 and 2. Appl. Microbiol. 22 : 451-454, 1971.
 9. Bishai, R. and Labzoffsky, N.A. : Stability of different virus in a newly developed transport medium. Can. J. Microbiol. 20 : 75-80, 1974.
 10. Yoshino, K. and Morishima, T. : Filtration of virus through membranes coated with polyvinylpyrrolidone. Arch. Ges. Virusforsch. 35 : 399-401, 1971.
 11. Yang, J.P.S., Chiang, W., Gale, J.L. and Chen, N.S.T. : A chick -embryo cell microtest for typing of Herpes virus hominis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148 : 324-328, 1975.

図1 各種分離液のウィルス保存に及ぼす影響

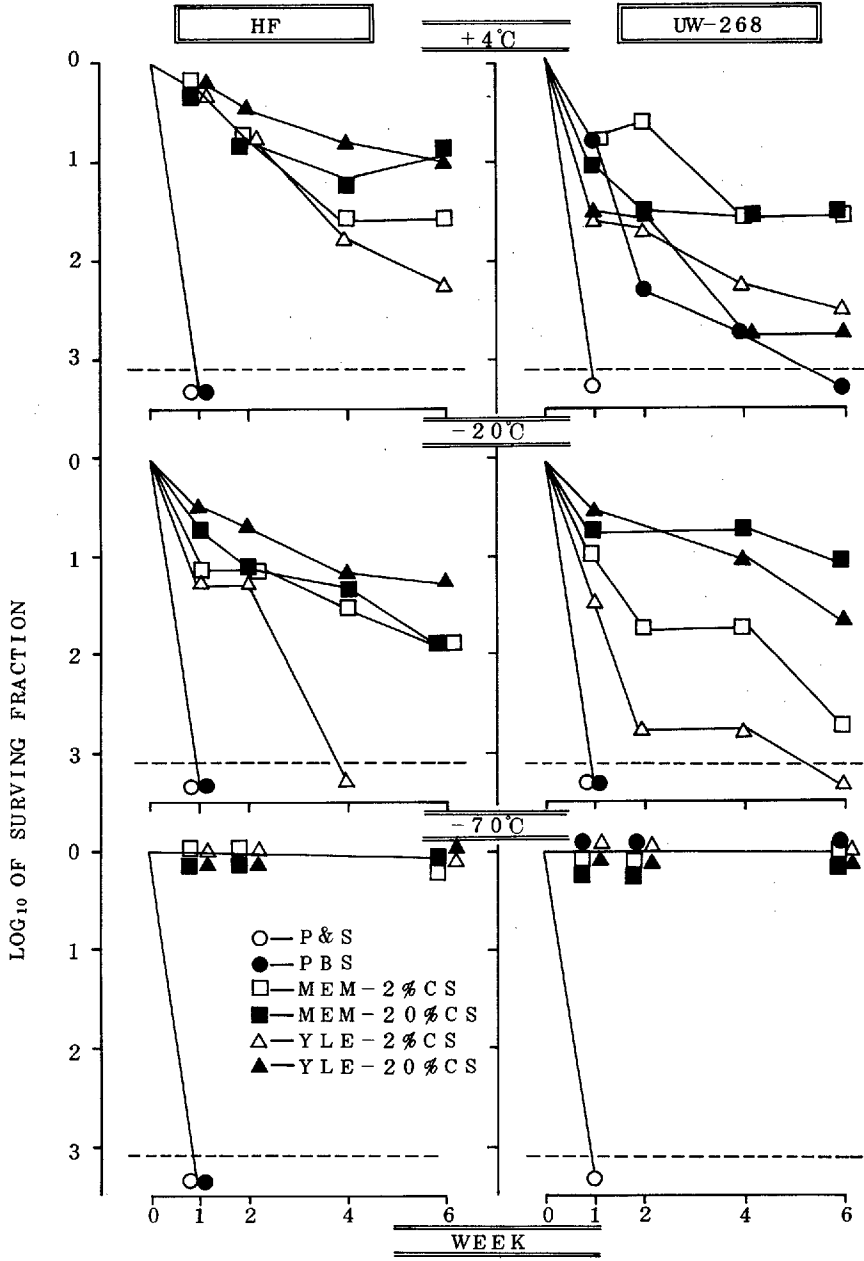


表1 諸メヂウム中のヘルペスウイルスの凍結融解に対する研究

Medium	HSV-1	<u>Freeze and Thawing</u>		
	HSV-2	I	II	III
P & S	HF	0.8※%	0.7%	0.4%
	uW-268	8.5	1.2	0.3
PBS	HF	8.5	4.7	1.2
	uW-268	58	53	13
MEM + 20% c S	HF	94	67	72
	uW-268	145	164	164
YLE + 20% c S	HF	160	130	130
	uW-268	127	211	130

※ Numerals denote per cent of virus recovered after freeze-and-thawing

表2 分離液と濾過によるウイルス減少の関係

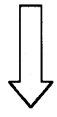
MEDIUM	<u>Pretreatment with</u>	
	1%PVP in BS + Tris Buffer(pH7.2)	BS
P & S	18※%	<0.2%
PBS	44	6
MEM-20%CS	70	62
YLE-20%CS	62	90

※ Numerals denote per cent of virus recovered in the filtrates

表3 Vero細胞と兎腎細胞のヘルペスウイルス分離率の比較

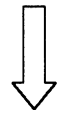
Isolation with Cells	No. of tested sample	<u>Cytopathic effect</u>		HSV		Negative
		Number	Percentage	Type - 1	Type - 2	
	85	52	61 %	49	3	0
secondary Rabbit Kidney	145	117	81	101	15	1※

※ vaccinia



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



研究目的

ヘルペスウイルスの胎児および新生児に対する影響としては、妊娠中の初感染で奇形を生じたという報告(1~4)があり、また最近20歳代の初感染が増えてきた(5)ことから、とくに2型ヘルペスウイルスで起こりやすい陰部感染が新生児に対して産道感染を起こす危険が大きくなりつつある。陰部感染の場合、1型ヘルペスウイルスでもかなりの感染例があり、とくにそのような場合は症状が激烈であることが多いのは(6)初感染例の増加を意味する。