

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 吉野亀三郎

研究目的

ヘルペスウイルスが妊婦に初感染を起こしたときに胎児に奇形を生ずるといふ報告(1~4)が出て以来、各国でこの方面に検討が行なわれているがまだ決定的な結論には到っていない。一方、妊婦が重篤なヘルペス脳炎やカポジ病あるいは全身感染に罹患したにも拘らず健康な子を出産した例(5~7)も報告されており、母体の感染が必ずしも胎児に影響を及ぼすとは考えられない。そこで考えられるのは母体の感染の妊娠時期と感染部位が重要だということである。すなわち、妊娠の早期に感染したときのみ何らかの影響があるだろうという予測は風疹の例からも類推されるし、また事実ヘルペスの場合についての Nahmiasら(8)の統計では、妊娠20週以内のヘルペス初感染で流産が多いとされていることから一応疑ってもよいと思われる。第2の妊娠のヘルペス感染部位に就いては、2型ヘルペスウイルスを主とする陰部感染が重要であることは言うまでもない。ただし、顕性感染だけでなく、不顕性感染も危険率は同程度と考へて調べる必要がある。

そこで調査のスケジュールとしては、多数の妊婦に就き逐時的採血をして、抗体陽転とくに2型のヘルペスウイルスに対するそれを調べ、もし妊娠数ヶ月以内に陽転のあった者はその出産時に子の異常を精査するということになる。しかるに、この種の研究が全く行なわれていない原因は、第1にそのような多数の血清の抗体を調べるための簡単な方法がなかったこと、第2に1型と2型の交叉反応のため2型抗体だけを選択的に調べる簡便な方法がなかったことによる。

われわれは先ずこの点を解決して上のスケジュールの大規模な調査を可能にすることが急務と考へた。そこでラジオノム法・蛍光抗体法その他のいろいろの方法と、血清からの両型共通抗体の吸

収法をいろいろ試みた結果、マイクロトレイに中和法がほぼ所期の目的を達しうるといふ見通しがつくに到ったもので、この方法の基礎的検討を行なった。とくに他のスタンダードの中和反応との感度比較と型識別能力の比較に重点を置いた。

研究方法

1. ウイルス：1型ヘルペスウイルスHF株と2型UW-268株を用いた。各々についてHeLa細胞継代・卵漿尿膜継代・Vero細胞継代の平行継代を行ない、HeLa細胞継代株はウサギの免疫に用い、卵漿尿膜継代株はブラック中和法に用い、Vero細胞継代株はマイクロトレイ中和法および中和曲線法に使用した。ウイルス感染価は初代=ワトリ胎児細胞モノレヤー形成単位(PFU)で表わした。

2. 稀釈液：0.01Mリン酸緩衝液加生理食塩水(BS)を血清稀釈に用いた。細胞の稀釈液としてはイーグルMEM培地に非働化コウシ血清を2%に加えたものを維持液(MM)として用いた。また上記BSに新鮮卵黄を0.1%に加えたもの(YS)をウイルス定量用の稀釈液とした。

3. マイクロトレイ中和法：縦8横12の計96穴平底プラスチックのトレイ(ファルコンmicrotest II 3040)を用い、横を血清の2倍階段稀釈(MM使用)とした。各穴には稀釈血清1滴(0.025ml)次にMMで適宜に稀釈したウイルス1滴を加え、1分間パイプレーター振盪後5%炭酸ガス37℃ふらん器に1時間放置、つづいて各穴にMM1滴とVero細胞1滴を加えた。Vero細胞液はモノレヤーのVero細胞をトリプシン分散した上、MMに $5 \times 10^5/ml$ に浮遊したものである。つづいて振盪1分の後ふらん器に戻し、4~5日後10%フォルマリン加0.2%ゲンチアナ紫液で染色し、細胞脱落をもって感染の指標と

した。テストは各ウイルス稀釈を平行4段で行ない、同時に使用ウイルス力価定量は0.5 log₁₀ 階段稀釈で上の方法同様にして血清を省いたもので4列に行ない、TCD₅₀を計出した。Vero細胞の代りにニワトリ胎児細胞を用いるときには6 × 10⁶/mlの細胞液を用いた。

4. ブラック中和法：BS階段稀釈血清と一定濃度ウイルス（対照に約100PFU/0.05ml 入るようにしたもの）の混合を37℃1時間作用後、各々を3枚のニワトリ胎児細胞にうえ、対照ブラック数を50%以下に下げた血清最高稀釈を終末値とした。

5. 中和曲線法：約10⁶PFU/mlのウイルスと抗血清を混ぜ10および20分後にその1部を100倍稀釈して定量しK値を算出した。その方法は既法(9)の通りである。

6. ウサギ血清：両株とも超免疫血清を用い、何れも使用前56℃30分加熱した。

結果と考按

図1と2はそれぞれVero細胞とニワトリ胎児細胞を使用して、マイクロトレ法で1型2型ヘルペスウイルスの同型間の中和をボックス定量した結果である。ウイルス量の変動に対して中和値の動きが少ないことは測定値誤差が少ないことを意味する。交叉反応はかなりあって、これが1型既往者の2型感染の際の2型抗体測定を邪魔するものである。両細胞を比べ2と同一TCD(PFUと同値)量に対してはほぼ同じレベルの終末値が得られる。

この方法の感度と、交叉反応の程度を他のスタンダード中和法と比べると表1のようになった。すなわち、どの方法も交叉反応の出方は余り変わらないこと、およびマイクロトレ法の100TCDでの終末値はブラック中和法のそれと同じであることが判った。

マイクロトレ法は時間と労力と材料の点で他とは比較にならない上、トランスファープレートとダイリクターを併せ用いれば、かなり多数の血清材料を容易に消化できる。たゞ問題は交叉反応であるが、ニワトリ胎児細胞がVero細胞同様に使えることから、ニワトリ胎児細胞にかゝらな

い1型株で吸収して2型微量抗体を計れる道が開けた。豫備的実験ではそのような1型ウイルス液をマイクロトレの穴に1滴落すことで期待通りの吸収が出来るという結果が得られている。

要 約

多数の妊婦の逐時採血血清検査で妊娠早期にヘルペスウイルスとくに2型の抗体陽転例を探し、不顕性感染を含む初感染の出産児に及ぼす影響を調べる試みに於いて、簡便な型別ヘルペス抗体測定法の確立が前提なので、種々比較の結果、われわれの工夫したマイクロトレ中和法が従来の方法に比して感度も型識別も劣っていないことを確認し、さらにニワトリ胎児細胞使用で1型吸収により2型特異抗体測定の方法が開けた。

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. Anderson, J.M. and Nicholls, M.W.N. : Herpes encephalitis in pregnancy. Brit. Med. J. 1:632, 1972
6. Rekant, S.I. : Eczema herpeticum and pregnancy. Obstet. Gynecol. 41:387-391, 1973.
7. Young, E.J., Killam, A.P. and Gre-

- ene, J.F., Jr. : Disseminated herpesvirus infection: association with primary genital herpes in pregnancy. J.A.M.A. 235:2731-2733, 1976
8. Nahmias, A.J., Josey, W.E., Naib, Z.M., Freeman, 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
9. Kawana, T., Yoshino, K. and Kasamatsu, T. : Estimation of specific antibody to type 2 herpes simplex virus among patients with carcinoma of the uterine cervix. Gann 65:439-445, 1974

表1. 抗1型および抗2型ウサギ免疫血清のスタンダード法による中和値比較

抗血清	ウイルス	ブラック中和法	中和曲線法(K値)
1型	1型	1280	9.04*
	2型	80	0.42*
2型	1型	640	0.58*
	2型	80	2.39*

* 抗1型血清は10倍, 抗2型血清は40倍で使用し, 何れも10分と20分の作用時間で得た値の平均。

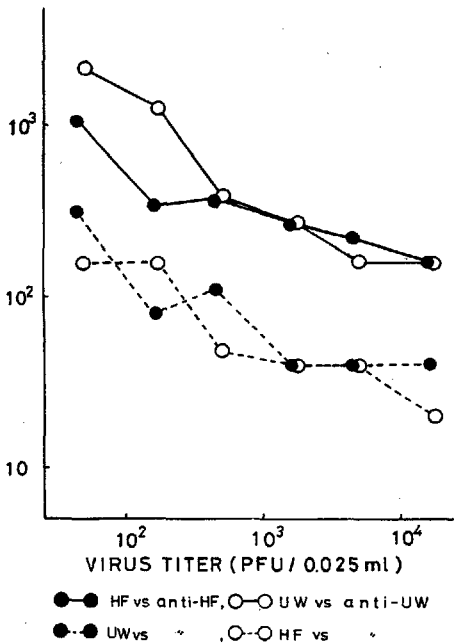


図1 Vero細胞を用いたマイクロトレ中和法による1型(HF)と2型(UW-268)ヘルペスウィルスのウサギ免疫血清中和値比較

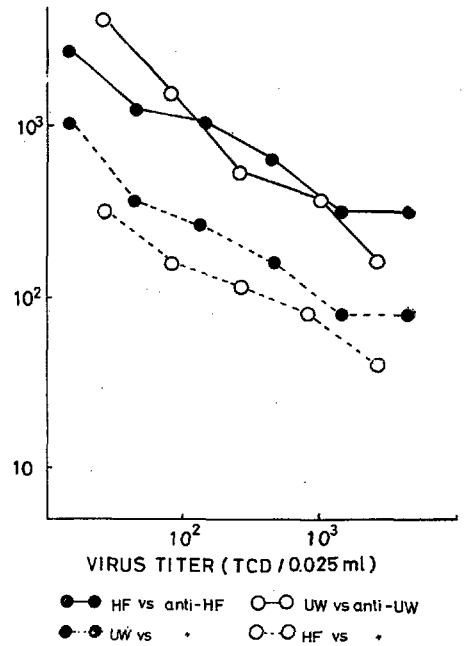


図2 ニワトリ胎児細胞を用いたマイクロトレ法による1型(HF)と2型(UW-268)ヘルペスウィルスのウサギ免疫血清中和値比較

↓
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

ヘルペスウイルスが妊婦に初感染を起こしたときに胎児に奇形を生ずるという報告(1~4)が出て以来,各国でこの方面に検討が行なわれているがまだ決定的な結論には到っていない。一方,妊婦が重篤なヘルペス脳炎やカポジ病あるいは全身感染に罹患したにも拘らず健康な子を出産した例(5~7)も報告されており,母体の感染が必ずしも胎児に影響を及ぼすとは考えられない。そこで考えられるのは母体の感染の妊娠時期と感染部位が重要だということである。