

川崎病の病因ウイルスの探求 (分担研究：川崎病の病因ウイルスの探求)

高橋理明, 白木公康, 奥野寿臣, 山西弘一,¹⁾ 播磨良一, 児島茂男,²⁾
大國英和, 今石秀則,³⁾ 尾上幸子, 二瓶明生,⁴⁾ 中井益代,⁵⁾ 石井経康,⁶⁾
尾崎隆男,⁷⁾ 川崎富作, 柳瀬義男⁸⁾

要約 川崎病患者のリンパ球を材料として特にレトロウイルスの探索に重点をおいた種々の方法によりウイルス分離を試みた。

3・3名の患者リンパ球を継代リンパ球株及び臍帯血からの初代リンパ球と混合培養し調べたが川崎病に特異的なウイルス抗原, ウイルス粒子は見出せなかった。又, 培養液の超遠心沈渣のDNAポリメラーゼを測定し若干上昇のみられたものもあったがpoly rA/poly dAを鋳型とした酵素活性の比は何れも1以下で逆転写酵素ではないことが判明した。新型ヘルペスウイルスHHV 6との関連性も調べたが川崎病とHHV 6との間には因果関係は認められなかった。

患者血清の遠心沈渣を電子顕微鏡でしらべ4例中3例にヘルペスウイルス様粒子をみとめたが, 川崎病との因果関係は不明で目下検討を進めている。

見出し語: ウイルス分離, 逆転写酵素活性, HHV-6

研究目的 川崎病患者のリンパ球を培養し特異抗原の検出, ウイルス粒子の検出を目的とした。レトロウイルス説の真否の確認も目的とした。

研究方法

(1) リンパ球培養

発病後1週間以内の急性期患児33例の末梢血からリンパ球を分離し, 下記の諸条件で培養した。
20%牛胎児血清加PRMI 640を基本培地としこ

1) 大阪大学微生物病研究所 (Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University)

2) 明和病院 (Meiwa Hospital)

3) 大阪市桃山病院 (Osaka Infectious Center)

4) 豊中市市民病院 (Toyonaka Municipal Hospital)

5) 大阪医大 (Osaka Medical College)

6) 箕面市民病院 (Minoh City Hospital)

7) 愛知県昭和病院 (Showa Hospital)

8) 日赤医療センター (Japanese Red Cross Medical Center)

れに PHA (5mg/ml) 一部に 50 単位 IL-2 などを加え培養に用いた。また T 細胞系細胞株 (H-9, HUT78, MOLT3, CEM), monocyte 系細胞株 (U937, B-937), 初代ヒトリンパ球 (臍帯血), ヒト胎児セネイ芽細胞, ヒト血替内皮細胞 (臍帯由来) と川崎病患児のリンパ球を混合培養した。

(2) ウイルス抗原の検出

細胞培養期間中定期的に細胞塗抹標本を作り、補体法、蛍光抗体法で川崎病患児回復期血清と特異的に反応する抗原の検出を試みた。又一部の培養細胞は電子顕微鏡によりウイルス粒子の有無を調べた。

(3) 逆転写酵素活性

培養上清を 100,000 \times 90 分間超遠心沈殿し

その沈渣を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM dithiothreitol, 7.5mM MgCl₂, 0.1% Triton-X, 0.80 Dunit/ml poly rA: oligo dT, 又は poly dA: oligo dT, 1~10 uCi ³H-dTTP に加え 1 時間 37 $^{\circ}$ C で反応させ、³H のとり込みをしらべた。

(4) HHV 6 の培養

HHV 6 は初代リンパ球培養 (臍帯血由来) で継代し、補体蛍光抗体法で川崎病患者血清で染色して抗体価を測定した。

結果 (1) レトロウイルス説に対する追試

1986 年に米国でレトロウイルス説が発表されているので、その記載と同様の方法により追試

Table 1 Results of DNA polymerase assay

Mononuclear cells	Template		Patio rA/dA
	rA	dA	
Kirsten LV	44,575	1,110	40.16
K.D.patients			
F.U.	7,355	29,124	0.25
U.Y.	905	35,541	0.03
I.S.	2,787	37,617	0.07
S.A.	7,865	34,574	0.23
M.A.	905	44,596	0.02
T.A.	3,500	29,782	0.12
U.C.	8,207	29,556	0.28
cord blood	8,915	16,606	0.54
M.A. ²	537	1,970	0.27
(endothelial cellt of cord Vessel)			

Figures represent DNA polymerase activity (cpm) where poly(rA)-oligo(dT) and poly(dA)-oligo(dT) was used as substrates, respectively.

Kirsten LV : Culture medium of Kirsten leukemia virus (LV)-infected cells.

M.A.²: Culture medium of endothelial cells inoculated with culture medium of mononuclear cells from M.A.(KD patient).

を行なった。患者のリンパ球にリンパ球の継代株を加えて(H-9, HUT78, MOLT3, CEM B-937)を混合培養し、その培養上清を集め超遠心沈殿しその沈渣のDNA polymeraseを測定した。川崎病患者17例につき行ない、中には対照細胞に比し高い値を示すものもあったが、一時的であった。高い値を示したものにつき逆転写酵素に特異的とされるpoly rAとpoly dAとprimerに用いたときの酵素の活性の比をしらべた結果をTable 1に示す。典型的なレトロウイルスであるマウスはKirsten白血病の場合にはrA/dAの比は極めて高く約40であるのに比し川崎病患者からのものは何れも1以下を示し逆転写酵素でないことを示した。恐らく細胞由来のrDNA polymeraseであろうと思われる。

又、蛍光抗体法、電子顕微鏡でしらべても特異なウイルス抗原、ウイルス粒子はみられなかった。継代リンパ球ではウイルスに対する感受性が低いかもしれないので臍帯血リンパ球を用いてさらに

10例の川崎病患者のリンパ球との混合培養を行ないpolymerase assay, 蛍光抗体法 assay, 電子顕微鏡試験を行なったが何れも陰性であった。

(2) HHV 6と川崎病との関係

1986年米国でGalloらによりAIDS患者やリンパ腫の患者のリンパ球から新しいヘルペス型ウイルスが分離され、当初HBLV(Human B Lymphotropic Virusの略)と称されたが後にHHV-6(Human Herpesvirus 6)と命名されたが病気との関連性は不明であった。このウイルスが1987年末、米国CDCのLopez博士から私共の研究室に分与され、早速、川崎病との関連性を血清反応によってしらべた。方法は抗補体蛍光抗体法によった。その結果を表2に示す。しらべた17人中数例では抗体価の上昇していると思われる例もあったが全体からみれば不変のものも多くHHV-6が川崎病と因果関係があるとはいえない結果であった(Table 2)。

Table 2 Antibody Titer of Sera from Kawasaki Diseases Patient against HHV-6

patients No.	Antibody Titer		Patients No.	Antibody Titer	
	Acute	Convalescent		Acute	Convalescen
1	16	32	10	8	8
2	<4	4	11	8	8
3	8	32	12	<4	<4
4	4	16	13	8	8
5	8	16	14	16	16
6	4	8	15	8	8
7	4	<4	16	32	32
8	4	4	17	4	4
9	8	8			

(Anticomplement Immunofluorescent Assay)

(3) 突発性発疹ウイルスの分離及び同じ方法を用いた川崎病患者リンパ球から病原ウイルス分離の試み

HHV-6は川崎病とは関係がないという結果にはなったが、小児の多数がこのウイルスに対し抗体をもっていることからHHV-6は小児に普遍的な病気と関係があることが示唆された。そこで小児の大多数がかかり病原ウイルスが分離されていない疾患として突発性発疹が候補と考えられ、突発性発疹患者の回復期血清の対HHV-6抗体価をしらべると高い抗体価がみられた。そこで突発性発疹急性期の患者のリンパ球を培養しウイルス分離を試みた。方法はさきのレトロウイルス追試験のときと、ほぼ同様であるが特にインターロイキン2を加え長期培養に努力した。その結果患者のリンパ球に細胞変性がみられ、蛍光抗体法、電子顕微鏡によりヘルペス型ウイルスが認められ、HHV-6と抗原的に同一であることが明らかとなりHHV-6が突発性発疹の病因であることが確認された。同じ方法を用い水痘患者及び麻疹患

者のリンパ球からそれぞれ水痘ウイルス麻疹ウイルスが分離され、この方法はウイルス分離の方法としてすぐれた方法であることが確認されたので、全く同じ方法により新たに川崎病患者6名のリンパ球からウイルス分離を試みた。しかし蛍光抗体法により陽性の成績は一例も見出せなかった。

(4) 川崎病患者の血清中のウイルス探索

ウイルス分離の困難であった伝染性紅斑の血清中から電子顕微鏡によりパルボウイルスが確認されウイルス分離につながったことが報告されている。川崎病の場合、これまで培養細胞を用いても、患者のリンパ球の直接培養によってもウイルスは分離されない。そこで患者血清を直接超遠心しその沈渣を電子顕微鏡によって観察した。4例中3例に写真のようなヘルペスウイルスと思われるウイルス粒子が見出された。しかしまだ例数が少なく、ウイルスも同定されていないので川崎病との因果関係は不明であり、今後研究を続け明らかにしたい。

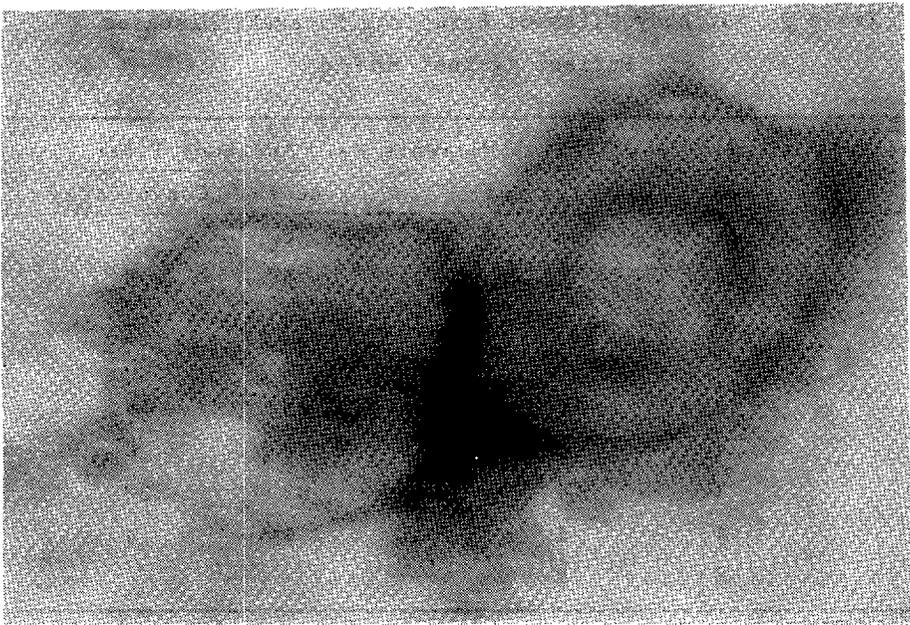


写真1 川崎病患者の血清中に見出されたヘルペスウイルス様粒子(4例中3例陽性)

考察 川崎病の病因ウイルスの探求については培養ヒト上皮、セネイ芽細胞を用いた研究では何れも成功していない。抗体価の測定によりEBウイルスとの関係が注目されているが川崎病の直接原因としては考えにくい。1986年米国でレトロウイルス説が唱えられ、私共はその追試もかねて患者のリンパ球よりのウイルス分離を精力的に試みた。レトロウイルス説に対しては、患者のリンパ球培養上清中に見出される polymerase 活性が真に逆転写酵素活性かどうかを poly rA と poly dA をそれぞれ鋳型として用いた場合の酵素活性の比でしらべた。その結果、その比が対照のマウス白血病ウイルスが高値であるのに比し著しく低値であり、逆転写酵素でないことが明らかとなった。従ってレトロウイルスを考える根拠がないといえる。そしてウイルス抗原、ウイルス粒子の何れの点でも陽性の成績は得られなかった。

この研究を進めている間に同じ方法により今ま

で病因ウイルスが不明であった突発性発疹の患者のリンパ球から新ウイルスが分離されそれが1986年米国で Gallo らにより AIDS 患者などから分離されていた HHV-6 と同一ウイルスであることが明らかになった。従って私共の行ってきたリンパ球からのウイルス分離法は未知のウイルス分離に適したものであるといえる。その後、特に注意深く6例の川崎病患者のリンパ球よりウイルス分離を試みたが何れも陰性であった。これらの結果より川崎病の病因がウイルスであるとしてもリンパ球に感染しているウイルスの可能性は少ないといえる。培養困難であるが伝染紅斑の場合には電子顕微鏡により病因ウイルス粒子が血清中に見出されている。そこで川崎病患者の血清を超遠心し電子顕微鏡によりしらべている。現在までにまだ例数は少ないがヘルペス粒子様のものが見出されたものもある。病因との関連性の追及は容易ではないが目下進めつつある。

Abstract

Trials to Isolate Etiologic Agent of Kawasaki Diseases from Mononuclear Cells of Patients.

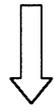
M. Takahashi, K. Shirai, T. Okuno, K. Yamanishi, Y. Harima, S. Kojima, H. Ohkuni, H. Imaishi, S. Onoe, A. Nihei, M. Nakai, T. Ishii, T. Ozaki and Y. Asano.

Isolation of an etiologic agent was attempted from mononuclear cells of 33 Kawasaki diseases (KD) patients. DNA polymerase activity using poly(rA)-oligo(dT) as substrates was examined in the culture supernatants of mononuclear cells from KD patients. Although increase of polymerase activity was observed in the supernatants of a few cases, these activities were found to be associated with DNA dependent DNA polymerase activity, by using poly(dA)-oligo(dT) as substrate. Cultured mononuclear cells were examined by immunofluorescent assay. No specific immunofluorescence was observed in mononuclear cell cultures, nor viral particles could be detected by electron microscopy. While we have succeeded in isolation of HHV-6 from mononuclear cells of patients of exanthem subitum as the causative agent during the course of this study, we could not identify any specific agent in mononuclear cell cultures from KD patients by the same procedure. No definite causative relationship was detected between HHV-6 and Kawasaki diseases.



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



要約 川崎病患者のリンパ球を材料として特にレトロウイルスの探索に重点をおいた種々の方法によりウイルス分離を試みた。

3-3 名の患者リンパ球を継代リンパ球株及び臍帯血からの初代リンパ球と混合培養し調べたが川崎病に特異的なウイルス抗原, ウイルス粒子は見出せなかった。又, 培養液の超遠心沈渣の DNA ポリメラーゼを測定し若干上昇のみられたものもあったが poly rA/poly dA を鋳型とした酵素活性の比は何れも 1 以下で逆転写酵素ではないことが判明した。新型ヘルペスウイルス HHV6 との関連性も調べたが川崎病と HHV6 との間には因果関係は認められなかった。

患者血清の遠心沈渣を電子顕微鏡でしらべ 4 例中 3 例にヘルペスウイルス様粒子をみとめたが, 川崎病との因果関係は不明で目下検討を進めている。