

眼ヘルペス感染症の実験室診断における家兎 水晶体上皮細胞の有用性

—ウイルスの分離・型同定を中心として— (図13, 表3)

白 井 淳 — (岩手医科大学医学部眼科学, 細菌学教室)

Cultured Rabbit Lens Epithelial Cells in the Laboratory Diagnosis of Ocular Herpes Simplex Virus Disease

Junichi Shirai

*Department of Ophthalmology, Department of Bacteriology,
School of Medicine, Iwate Medical University*

要 約

家兎水晶体上皮細胞 (rabbit lens epithelial cell: RLE 細胞) を単純ヘルペスウイルス (HSV) 感染症の実験室診断, とくに分離・型同定 (ブラック法, DNA の制限酵素切断法) に用いてその有用性を検討した. 臨床検体よりの HSV の分離率は RLE 細胞で62.5%, vero 細胞では57.5%であった. 細胞変性効果 (CPE) の出現, 進行も RLE 細胞の方が早かった. 型同定においては, RLE 細胞を用いたブラック法でブラックサイズ1.0mm 以下を HSV-I, 1.6mm 以上を HSV-II とすると, 蛍光抗体法, DNA の制限酵素切断法, 生化学的同定法による型同定の結果とすべて一致した. RLE 細胞はほぼ株化しており, HSV の実験室診断において有用な細胞であることが示された. また, 今回分離した角膜ヘルペス株の中に, DNA 切断像により, 同型異株の存在が明らかとなった. (日眼 92: 1071—1080, 1988)

キーワード: 家兎水晶体上皮細胞, 単純ヘルペスウイルス, 分離, 同定

Abstract

The usefulness of cultured rabbit lens epithelial cells (RLE cell) for isolation and identification of herpes simplex virus was investigated. Isolation rate of HSV was 62.5% in case of RLE cell and 57.5% in vero cells, indicating that RLE cell was more suitable for isolation of HSV. As for identification of HSV, the findings of RLE cell plaque assay, immunofluorescent antibody method, cleavage patterns with restriction endonuclease and biochemical methods showed same results, provided that small plaque (less than 1.0mm in diameter) and large plaque (more than 1.6mm in diameter) are regarded as HSV-I and HSV-II respectively in RLE plaque assay. In addition, cleavage patterns of the isolated HSV proved the existence of a genetically different strain among HSV with the same sero type. This report indicates that RLE cell is useful for isolation and identification of HSV. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1071—1080, 1988)

Key words: Rabbit lens epithelial cell, Herpes simplex virus, Isolation, Identification

I 緒 言

単純ヘルペスウイルス (Herpes simplex virus: HSV) は、多くの場合は、乳幼児期に初感染後、宿主の神経節に終生潜伏し、再活性化することによって他に伝播する特徴を持つウイルスで^{1)~3)}、眼科領域では重篤な視力障害を惹き起こす⁴⁾⁵⁾ことから、特に潜伏・再発に関して従来より多くの研究が^{6)~9)}なされている。他方、HSV による角膜感染症の診断は、基本型(樹枝状角膜炎)では比較的容易であるが、複雑型ではウイルスの実験室診断にその判定を待たねばならぬことも多く¹⁰⁾¹¹⁾、さらに最近では抗ヘルペス剤として特異的に有効な薬剤も開発されつつあり¹²⁾、ウイルス感染症の迅速、確実かつ詳細な診断が要求されるに至っている。

今回は、家兎水晶体より株化した家兎水晶体上皮細胞 (rabbit lens epithelial cell: RLE 細胞) の、HSV 感染症の実験室診断、とくに分離と型同定における有用性を検討した。また、モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法の迅速診断法としての有用性をも調べた。さらに、HSV の DNA を制限酵素切断法で分析することによって、HSV の型同定および同一血清型 HSV 間の株の識別を実施したので合わせて報告する。

II 実験方法

1. 実験材料

1) 検体

臨床的に角膜あるいは眼瞼のヘルペスが疑われたそれぞれ38症例および2症例、合計40症例の角膜擦過物あるいは眼瞼水疱の内容物を検体とした。検体の採取は角膜の場合は病巣部の上皮をスパーテルで擦過し、眼瞼の場合には水疱を注射針で穿破して綿棒にて内容物を採取した。検体の一部をウイルス分離用として、3ml の0.5%ウシアルブミン加ビール・インヒュージョン液 (以下ウイルス培養液) に浮遊させて、-70℃に保存した。また一部は、蛍光抗体法用に、ゼラチンコーティングスライドグラスに塗抹した。

2) RLE 細胞

健康な雄性成熟白色家兎の水晶体上皮細胞を10%ウシ胎児血清添加 Eagles' MEM (以下10%MEM) で初代培養し、5%MEM で50~70代継代培養したものを用いた。細胞の形態学的観察は、カバースリップに単層培養したものについて、位相差顕微鏡、透過型および走査型電子顕微鏡で行った。

2. ウイルス分離

3ml のウイルス培養液に浮遊させた検体を3,000 rpm で30分間遠心した後、その上清の0.2ml を RLE 細胞あるいは vero 細胞が単層に発育した試験管に1検体あたり4本宛接種し、33℃で14日間回転培養を行った。その間、RLE 細胞の細胞変性効果 (cytopathic effect: CPE) を連日光学顕微鏡で観察し、CPE が出現した場合にウイルス分離陽性とした。CPE が観察されなかった検体については、原則としてさらに盲継代を3回実施し、CPE が出現しなかったものを分離陰性とした。また、検体接種から CPE 出現まで、および CPE 出現から CPE が試験管全面に広がるまでの日数を調べた。

さらに、分離陽性の場合にはその検体の Bud R 感受性、クロロホルム感受性および酸感受性 (pH 3.0) を調べることによって、その生化学的性状を検索して HSV の型を同定した。

HSV によって CPE を生じた RLE 細胞の形態学的観察は、RLE 細胞の CPE が(++)となった状態のものを、位相差顕微鏡、透過型および走査型電子顕微鏡にて行った。

3. 蛍光抗体法

ゼラチンコーティングスライドグラスに直接塗抹した検体を風乾し、その後アセトン (-20℃) で固定し、再度風乾した。HSV 診断用モノクローナル抗体 (Micro Track[®], Syva 社製) の抗 HSV-I あるいは抗 HSV-II を、検体上に数滴滴下して、37℃ 1時間モイストチェンバー内で反応させた。これを0.01M/l リン酸緩衝食塩水、次いで蒸留水で洗浄後に風乾、無蛍光グリセリンで封入し、落射型蛍光顕微鏡 (BH2-RFK[®], オリンパス社製) で観察、写真撮影し、HSV 抗原の確認と HSV の型を特徴的な蛍光色調 (apple green) で HSV であることを判定した。また、直接塗抹標本とは別に、前記の方法で CPE が確認された RLE 細胞の塗抹標本を作製して同様の蛍光抗体法を行い、直接塗抹標本の結果と比較した。

4. 分離株の型決定

対象の40症例から分離された25株およびその他に、既知の HSV-II 型株として当細菌学教室で産婦人科の陰部ヘルペス患者より分離した4株および UW-268 株 (東大医科研 吉野亀三郎教授より分与をうけ、vero 細胞で継代保存していたもの) の各ウイルスについて下記の2種の方法で型の決定を行った。なお、分離株は vero 細胞で継代して凍結保存し、以下の実験に用

いた。

1) RLE 細胞を用いたブラックアッセイ

上記の各ウイルス0.2mlを5%MEMで 10^{-1} から 10^{-8} まで10倍階段希釈し、その0.5mlずつを、ティッシュカルチャーフラスコ(25cm², Nunc社製)に単層培養されているRLE細胞に接種した。37℃で1時間吸着させた後、5%MEMを加えた4%メチルセルロース溶液10mlをRLE細胞に重層させ、33℃で2日間培養してブラックを形成させた。その後、メチルセルロースを除去し、10%ホルマリン-0.2%ゲンチアナバイオレットで染色固定し、フラスコのブラックの直径を、スケールルーペで計測した。

2) 制限酵素による HSV DNA の切断法

a. ウイルス感染細胞

ルー瓶に単層培養したRLE細胞に、前項4の各ウイルスを感染の多重性(multiplicity of infection: MOI) ≥ 1.0 で接種し、CPEがルー瓶の全面に広がるまで33℃で静置培養して、感染細胞を作製した。

b. ウイルス感染細胞 DNA の精製

Fujinagaら¹³⁾, Uenoら¹⁴⁾の方法に準じて実施した。すなわち前項のルー瓶で作製したウイルス感染RLE細胞をルー瓶ごと凍結融解法で破壊し、遠心($\times 1,000$ rpm, 3分間)した。沈渣を3mlのTris-HCl bufferに再浮遊させ、さらに1mlの4% sodium dodecyl sulfateおよび40μlのpronaseを加え、37℃の温水に2.5時間静置した。試料をフェノール法にて除蛋白を行い、エタノールで核酸を沈殿させた。さらにRNase処理およびpronase処理を行い、核酸をフェノールで抽出し、エタノールで沈殿させた。沈殿した核酸を37℃で乾燥させ、400μlの0.1×SSC(SSC: 0.15M NaCl + 0.015M sodium citrate)に溶解させたのち、4℃で保存した。

c. 制限酵素によるウイルスDNAの切断 (Table 1)

前項の保存試料40μlとreaction buffer 40μlに制限

酵素(BamHI, KpnI, Sal IあるいはBgl II, いずれも宝酒造社製)を40単位加え、37℃で12時間反応させ、terminataion bufferで反応を停止させた。制限酵素の反応用緩衝液はTable 1に示すものを使用した。

d. 電気泳動

電気泳動は、HSVの型決定を短時間で実施するための条件(0.8%アガロース平板ゲル・50V, 1.5時間)と、より鮮明な切断像を得る目的の条件(0.8%アガロース平板ゲル・35V, 36時間)とで行った。前項で切断したHSV DNAの試料をアガロース平板ゲルの各溝に5~10μl入れ、Loening's buffer[36mM Tris-HCl (pH 7.7), 30mM NaH₂PO₄・2H₂O, 10mM EDTA-Na₂]を用いて電気泳動した。泳動終了後、ethidium bromide (0.5μg/l)でDNA断片を染色し、紫外線照射下で観察および写真撮影を行った。

5. RLE細胞およびvero細胞におけるHSVの増殖

RLE細胞およびvero細胞におけるHSVの増殖の程度を50%感染終末点(TCID₅₀)法で経時的に定量することによって比較した。分離陽性株の試料(方法4.のウイルス)0.2mlを、RLE細胞あるいはvero細胞が単層培養されている試験管に接種し、37℃で回転培養した。接種後1, 6, 8, 16, 32, 40および48時間後のHSV量をTCID₅₀法で求めた。

6. RLE細胞におけるHSV-IおよびHSV-IIの増殖

蛍光抗体法とDNAの制限酵素切断法でHSV-IあるいはHSV-IIと同定された分離株の、RLE細胞における増殖の差異を、ブラック法により求めた。すなわちHSV-IあるいはHSV-IIの試料を、ティッシュカルチャーフラスコに単層培養したRLE細胞にMOI=1で接種し、33℃で培養した。その後、経時的に試料を回収し、vero細胞を用いたブラック法を実施し、ブラック数を数えることによって、HSVを定量した。

Table 1 制限酵素の反応緩衝液

Bam HI : 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 7mM MgCl ₂ , 100mM NaCl, 2mM 2-mercaptoethanol, 0.01%ウシ血清アルブミン
Kpn I : 6mM Tris-HCl (pH 7.5), 6mM MgCl ₂ , 6mM NaCl, 6mM 2-mercaptoethanol, 0.02%ウシ血清アルブミン
Sal I : 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 7mM MgCl ₂ , 175mM NaCl, 0.2mM EDTA, 7mM 2-mercaptoethanol, 0.01%ウシ血清アルブミン
Bgl II : 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 7mM MgCl ₂ , 100mM NaCl, 7mM 2-mercaptoethanol

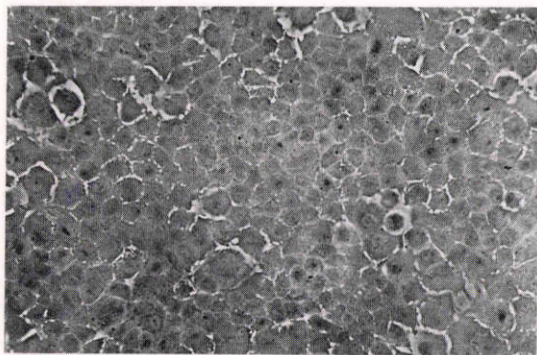


Fig. 1 RLE 細胞の位相差顕微鏡像 (100×)

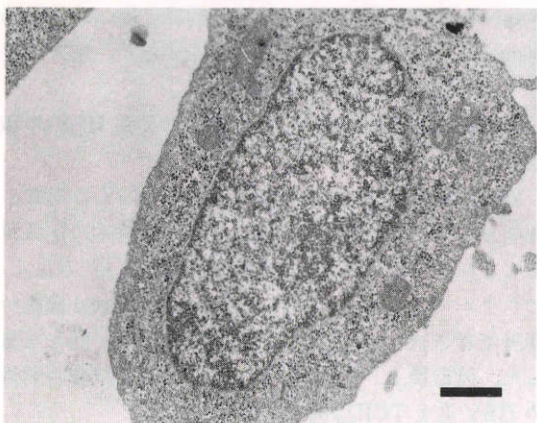


Fig. 2 RLE 細胞の透過型電顕像 (scale : 1,000nm)

Table 2 RLE 細胞および vero 細胞における HSV 分離率

	ウイルス分離 (+)	ウイルス分離 (-)	分離率
RLE cell	25	15	62.5%
vero cell	23	17	57.5%

III 結 果

1. RLE 細胞の形態 (Fig. 1, 2)

継代培養した RLE 細胞は位相差顕微鏡下では、透明性が強く、多角形で、敷石状に配列し、境界は比較的明瞭で、上皮様形態 (Fig. 1) を示していた。透過型電子顕微鏡では、細胞質にリボソーム、粗面小胞体、ミトコンドリアが豊富に認められ、核は楕円形で電子密度がやや高く観察された (Fig. 2)。

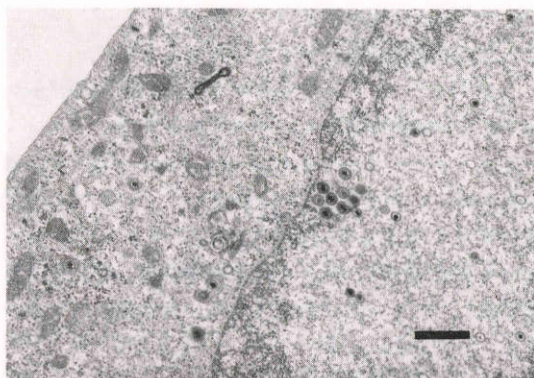


Fig. 3 HSV-I 感染 RLE 細胞中のウイルス粒子の透過型電顕像 (scale : 500nm)

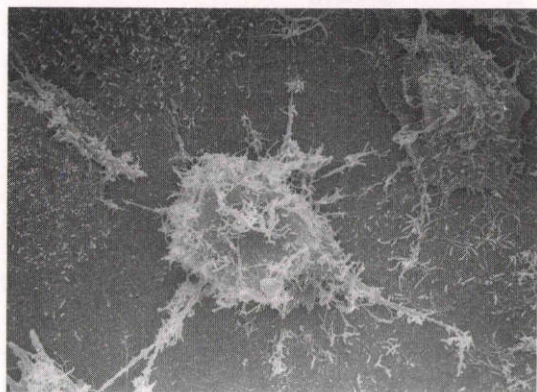


Fig. 4 HSV-I 感染 RLE 細胞の走査型電顕像 (2,000×)

2. ウイルス分離 (Table 2, Fig. 3, 4)

RLE または vero 細胞への検体の接種による CPE 出現の有無からみたウイルスの分離率は、Table 2 に示したように、40 症例中 RLE 細胞では 25 症例 (62.5%)、vero 細胞では 23 症例 (57.5%) であった。vero 細胞での陽性 23 症例は RLE 細胞でもすべて陽性を示していた。

検体接種から CPE 出現までの平均日数は、RLE 細胞で 2.5 日、vero 細胞では 3.1 日であった。また、CPE が出現してから試験管の全面に拡大するまでの日数は、RLE 細胞で 2.2 日、vero 細胞で 3.3 日であった。

RLE 細胞で分離された 25 株は、BudR 感受性、クロロホルム感受性および酸感受性の生化学的性状の検索ですべてに感受性があり、HSV であることが同定された。

HSV に感染した RLE 細胞の透過型電子顕微鏡像

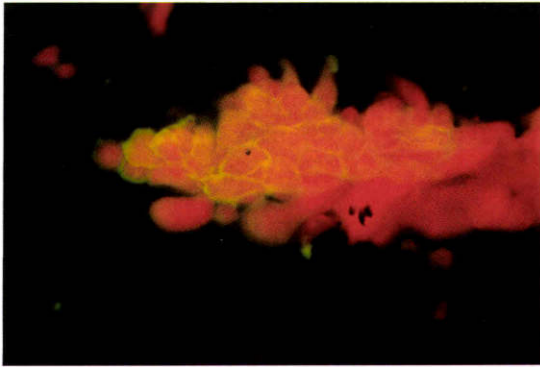


Fig. 5 蛍光抗体法陽性の角膜擦過標本 (200×)

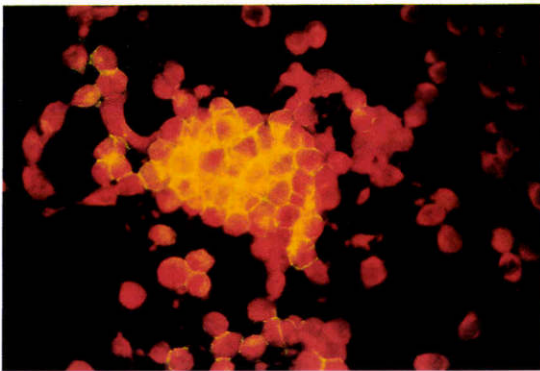


Fig. 6 蛍光抗体法陽性のRLE細胞 (100×)

(Fig. 3)は、細胞の核および細胞質内にエンベロープをもつウイルス粒子が多数存在し、budding像も認められた。しかし、明瞭な管状構造はみられなかった。走査型電顕像(Fig. 4)では、細胞の円形化が観察されたがウイルス粒子の確認は出来なかった。

3. 蛍光抗体法 (Fig. 5, 6)

検体を直接塗抹した標本についての蛍光抗体法では、40症例中20症例(50.0%)が抗 HSV-I モノクローナル抗体に対して陽性所見を呈した。Fig. 5にその1例を示した。抗 HSV-II モノクローナル抗体に対してはすべて陰性であった。抗 HSV-I に陽性であった20症例中、前項での RLE 細胞への培養によって HSV が分離されたものは19例(95.0%)であった。また、RLE 細胞で CPE が確認された25症例は、蛍光抗体法ではすべて抗 HSV-I モノクローナル抗体に対して陽性所見(Fig. 6)を示した。なお、検体採取からこの蛍光抗体法による判定までの所要時間は約1.5時間であった。



Fig. 7 RLE細胞を用いたHSVのブラックアッセイ、左：HSV-Iのブラック、右：HSV-IIのブラック

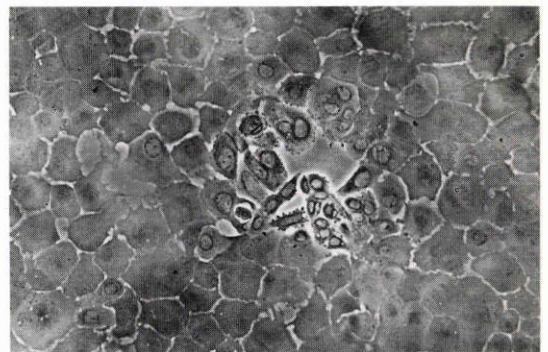


Fig. 8 HSV-I感染RLE細胞のCPE (100×)

4. 分離株の型決定

1) RLE細胞を用いたブラックアッセイ (Table 3, Fig. 7, 8, 9)

今回眼科領域から分離された25株はすべて小型円形のブラックを、陰部ヘルペスから分離された4株と UW-268株は大型円形のブラックを形成した(Fig. 7). 小型ブラックの直径は0.6~1.0mm, 平均 0.76 ± 0.10 mmであり、大型ブラックは1.6~2.3mm, 平均 1.94 ± 0.27 mmであった (Table 3). 小型ブラックを形成した株による RLE の CPE は、Fig. 8に示したように細胞が円形化し、細胞質が濃縮していたが、vero細胞に HSV を接種した際に認められる細胞の盛りあがり、明瞭ではなかった。一方、大型ブラックを形成し

Table 3 HSV の型決定

No.	Origin	Typing			size of plaque (mm)
		FA test	Cleavage pattern of HSV DNA	Plaque assay using RLE cell	
1	cornea	I	I	I	0.7
2	cornea	I	I	I	0.7
3	cornea	I	I	I	0.8
4	cornea	—	I	I	0.8
5	cornea	I	I	I	0.7
6	cornea	—	I	I	0.8
7	cornea	I	I	I	0.6
8	lid	I	I	I	0.9
9	cornea	I	I	I	0.7
10	cornea	I	I	I	0.7
11	cornea	—	I	I	0.8
12	cornea	I	I	I	0.8
13	cornea	—	I	I	0.9
14	cornea	I	I	I	0.9
15	cornea	I	I	I	0.6
16	cornea	I	I	I	0.7
17	cornea	I	I	I	0.7
18	cornea	I	I	I	1.0
19	lid	I	I	I	0.8
20	cornea	—	I	I	0.7
21	cornea	—	I	I	0.8
22	cornea	I	I	I	0.8
23	cornea	I	I	I	0.6
24	cornea	I	I	I	0.8
25	cornea	I	I	I	0.7
UW-268	Skin		II	II	2.3
1'	Genital	II	II	II	1.9
2'	Genital		II	II	2.1
3'	Genital		II	II	1.8
4'	Genital		II	II	1.6

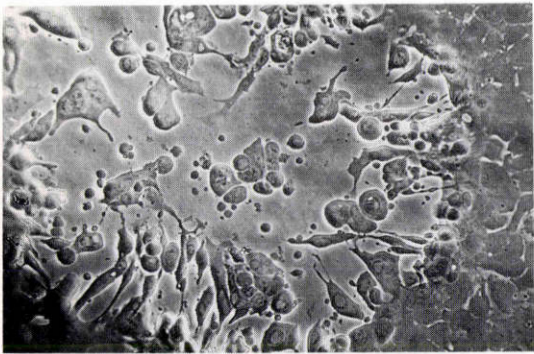


Fig. 9 HSV-II 感染 RLE 細胞の CPE (100×)

た株の CPE は、Fig. 9 に示したように、細胞の融合や線維芽細胞化の像が認められた。また、培養容器壁面

からの剝離も大型株の方が小型株より著明であった。

2) 制限酵素による HSV DNA の切断 (Fig. 10, 11)

Fig. 10 には 50V, 1.5 時間の泳動による DNA の切断像を示した。KpnI および BamHI の制限酵素による切断の結果、眼科領域より分離された 25 株は HSV-I の切断像を、陰部ヘルペスより分離された 4 株は HSV-II の切断像を示した。また、35V, 36 時間の泳動による眼科分離株の Bgl II による切断像 (Fig. 11) では、通常の HSV-I の DNA は 16 個に切断されるが、今回の 25 株のうち 2 株には 17 個の切断片が認められた。図中に矢印で余分な断片を示した。これによって同一血清型の HSV-I であっても、その中に異株が存在することが示された。

以上の蛍光抗体法、RLE 細胞を用いたブラックアッ

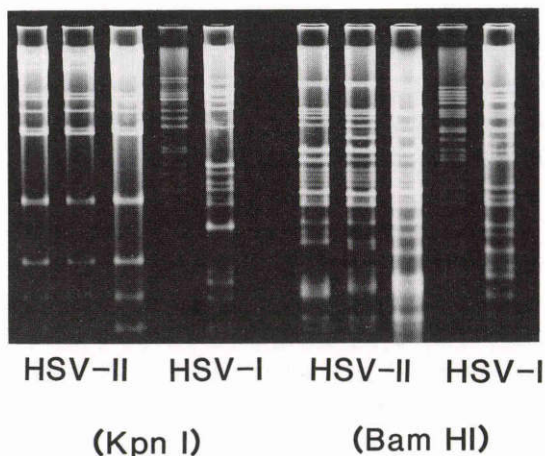
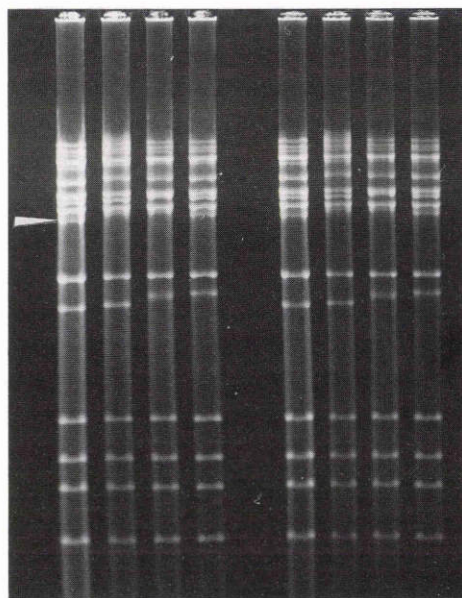


Fig. 10 HSV-I, II 分離株 DNA の切断像 (50V, 1.5 時間)



HSV-I (Bgl II)

Fig. 11 HSV-I 分離株 DNA の切断像 (35V, 36時間). 矢印は通常認められない切断片を示す.

セイ法および制限酵素による HSV DNA の切断像による分離株の型決定の結果を Table 3 にまとめて示した。RLE 細胞を用いたブラックアッセイ法で、ブラック直径 1.0mm 以下を HSV-I, 直径 1.6mm 以上を HSV-II とする基準を設けて、今回の検体を分類すると、その結果は、蛍光抗体法、制限酵素による HSV DNA の切断像による型同定と一致した。

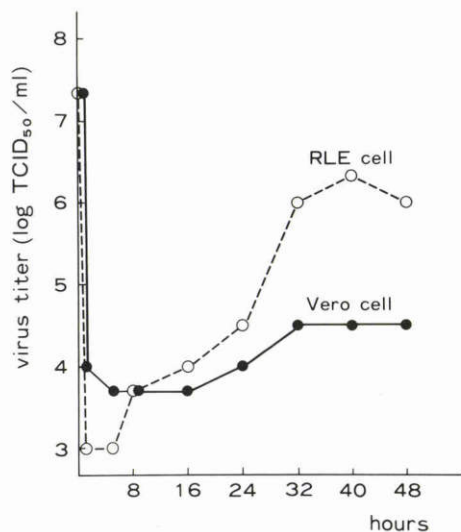


Fig. 12 RLE 細胞および vero 細胞における HSV-I 感染価の経時的変化

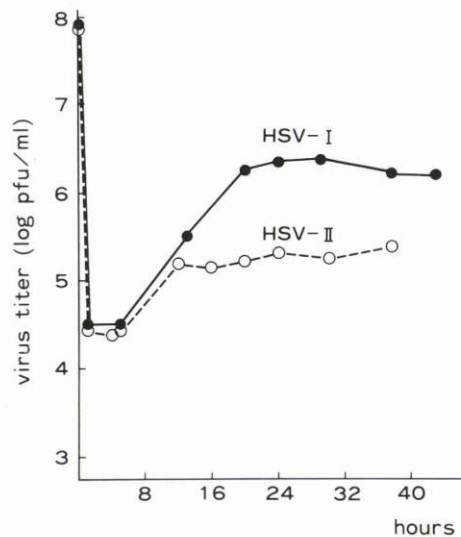


Fig. 13 RLE 細胞における HSV-I および HSV-II の感染価の経時的変化

5. RLE 細胞および vero 細胞における HSV-I の増殖 (Fig. 12)

検体からのウイルス分離の際に、RLE 細胞と vero 細胞とでは、その陽性率に差があったため、それぞれの細胞における HSV-I の増殖を、その感染価を求めることによって比較した。両細胞の感染価 (Fig. 12) はいずれもウイルス接種 6 時間で一旦最小となった後に増大し始め、約 40 時間でピークとなった。RLE 細胞の

ピーク時の感染価は $5 \times 10^{6.3}$ TCID₅₀/mlであり, vero細胞のそれ($5 \times 10^{4.5}$ TCID₅₀/ml)に比較して約100倍高かった。

6. RLE細胞におけるHSV-IおよびHSV-IIの増殖 (Fig. 13)

RLE細胞を用いたブラック法で, HSV-IとHSV-IIとでブラックサイズの違いが確認されたので, HSV-IおよびHSV-IIのRLE細胞における増殖を, 感染価で比較した(Fig. 13). 両者ともに接種後6時間で最小の値を示し, その後に増大し, 約24時間でピークに達した。しかし, HSV-IIの感染価は, HSV-Iの約10分の1であった。

IV 考 按

近年, HSV感染症は成人初感染症例, sexually transmitted disease (STD)としての症例¹⁵⁾, 分娩時感染あるいは新生児室での院内感染による全身ヘルペス感染症の発症例^{16)~18)}など, その臨床像も多様化してきている。眼科領域においても, HSVによる角膜感染症が増加し, 重篤な視力障害を残す複雑型の症例も増え, 本症の視力予後に関与する因子としてのHSVの潜伏・再発が重要な研究テーマとなっている。これに対してはHillら¹⁹⁾, Dunkelら²⁰⁾, Openshaw²¹⁾の潜伏・再活性化の実験モデルの開発と, Gerdesら⁸⁾の株の種類によるウサギ角膜での再発の頻度に関する報告に代表されるウイルス側の再発に関連した因子の追及との2方面から解明がなされつつある。

HSV感染症の再発の本態を明らかにするためには, HSV株を臨床例から分離・同定して, 分離株のウイルス学的検索を行うことも必要である。今回, HSVの分離・同定に用いた家兎水晶体上皮の継代培養細胞は, 谷藤ら²²⁾²³⁾, 金生²⁴⁾が用いたものと同様に, 透明性の強い多角形の上皮様細胞であり, 敷石状に発育する。継代もvero細胞やHeLa細胞と同様に容易であり, 現在まで100代を越えても, 細胞の形態に変化なくほぼ株化した細胞として維持が可能である。

RLE細胞のウイルス感受性に関連した研究としては, アデノウイルスにVan der Veenら²⁵⁾, 風疹ウイルスに関する谷藤²³⁾, HSVについての佐藤²⁶⁾, 石川²⁷⁾, 金生²⁴⁾などがあり, RLE細胞はHSVに感受性があることが既に報告されている。

今回の実験で, 分離率は, RLE細胞(62.5%)による場合の方が, vero細胞(57.5%)より上回っており, また感染価もRLE細胞がvero細胞よりも約100倍の

高値を示した。またRLE細胞での検体接種からCPE出現までの日数は, vero細胞とほとんど差はないが, CPEが試験管全面に拡大するまでの日数は, vero細胞よりも平均1.1日短かった。このような結果から, RLE細胞はHSVの増殖に有利であることが再確認された。

一般に, 生体病巣から分離したウイルスは, 継代を重ねると変異株が出現し, それ以後のCPEの形態が異なってくることが多い²⁸⁾ことから, ウイルスの研究においては, より少ない継代でより多くウイルスを得る必要があるが, RLE細胞はこの点についても目的に適った有用な細胞であるといえる。

従来, ウイルスの分離・同定には1週間以上の日数を要するため, 診断が治療と結びつかない場合が少なからず存在した。今回のHSV診断用モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法は, 検体採取から判定まで1.5時間を要するのみであった。また蛍光抗体法とRLE細胞を用いた分離・同定法の陽性率は, それぞれ50.0%と62.5%で, 前者が低値ではあったが, 蛍光陽性例の20症例中19症例(95.0%)の高い率でHSVが分離された。また型同定においても蛍光抗体法の結果は他の方法による型と一致していた。以上より蛍光抗体法は迅速かつ確実な診断法として意義があると考えられた。

HSVの型決定には, ニワトリ胎児細胞を用いたブラック法²⁹⁾³⁰⁾, 中和反応を用いた方法^{30)~32)}, モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法^{34)~36)}, 制限酵素によるHSV DNAの切断像による方法^{37)~41)}, thymidin kinaseの熱安定性の違いによる方法⁴²⁾などがあるが, それぞれ一長一短がある。現在最も信頼性が高いとされている型同定法は, 制限酵素によるHSV DNAの切断像による方法である。この方法は1970年にSmithら⁴³⁾により, DNA上の特定の塩基配列を認識してその部位を切断する制限酵素がヘモフィルス菌から分離精製され, 1975年にHaywardら⁴⁴⁾によって, 制限酵素による消化産物の電気泳動像を分析するいわゆるDNAフィンガープリント法が, ウイルスの型決定や同型異株の認識を可能にすることが示されたことにより, 用いられるようになった。これを契機として, ウイルス感染症の分子レベルでの疫学的解析が可能となった。

HSVの型決定は, HSV-IとHSV-IIとがそれぞれ特有な切断像を呈することから判定出来る。今回のRLE細胞を用いたブラックアッセイ法とHSV DNAの切断像とによる型決定は, その結果がすべて一致し

た。金生²⁴⁾もヘルペスウイルスの型同定において、RLE細胞を用いたブラック法と、補体要求性中和試験の結果が一致していると報告しているが、RLE細胞を用いたブラック法は、DNAの切断法よりその手技が簡便であり、臨床分離株の型決定には有用である。しかし、ブラック法がHSV-IとHSV-IIのCPEの性状に差があることを用いて成立していることを考えると、CPEが変化する変異株の出現の可能性がある継代歴の多い株については、他の方法との併用が必要である。

実際の切断像を得るために今回は、短時間泳動(50V, 1.5時間)と長時間泳動(35V, 36時間)とを実施した。短時間泳動によっても型決定に必要な切断像を得ることが十分に可能であった。しかし、同じ型内での異株の識別には、より明確な切断像を得ることが必要であり、長時間泳動による切断像の分析が不可欠であった。診断には短時間泳動、分子疫学の目的には長時間泳動と使い分けが必要であると思われる。

今回、HSVの分離株をBgl IIで切断して長時間泳動を実施した際に、通常は切断片が16個であるのに、17個に切断される株が2株検出された。HSVには同一血清型内で異株が存在することは、各制限酵素の各切断点の有無を分離株ごとに(+)、(-)で表示してその組み合わせによって識別したChaneyら⁴¹⁾⁴⁵⁾によって、あるいは制限酵素の切断断片のサイズの違いで識別した柳¹⁷⁾によって報告されている。今回は切断断片数による異株の確認であるため、他の報告の異株とは比較出来なかった。また、異株による眼感染症の臨床症状は、他の株による場合と比較して差異は見出されず、再発もなかった。この異株の実験的角膜接種による感染形態の検討は今後の課題である。

今回用いたDNA試料は、精製ウイルス粒子から得られたDNAではなく、ウイルス感染細胞を材料としたため、試料中にはウイルスDNAの他に感染していない細胞のDNAも混入していると思われる。そのためウイルス感染細胞DNAの精製には、ウイルスDNAの複製が良好な感受性細胞の使用が必要となる。実際の泳動においては、RLE細胞を感染細胞とした場合の細胞DNAによる背景染色は、きわめて僅かであった。したがって、RLE細胞はDNA精製の目的にも適っているといえる。

稿を終えるにあたり、終始ご懇切なるご指導とご校閲を頂きました田澤 豊教授、川名林治教授に深謝いたします。またご指導、ご助力を頂きました細菌学教室各位のご協

力に感謝いたします。尚、本論文の要旨は第90回日本眼科学会総会において発表した。

文 献

- 1) 川名林治, 横田 健編: 標準微生物学. 東京, 医学書院, 324—326, 1981.
- 2) 川名林治, 佐藤成大, 牧野正人他: 単純ヘルペスウイルス感染の最近の話題, 感染・炎症・免疫 12: 133—141, 1982.
- 3) 川名林治, 白井淳一, 張簡俊義他: 単純ヘルペスウイルス感染症の臨床ウイルス学. 臨床とウイルス 13: S1—S10, 1985.
- 4) Grayson M: Disease of the cornea. ST. Louis Mosby, 150—176, 1983.
- 5) 山西政昭: 角膜ヘルペスが原発である角膜穿孔例について, 眼科 21: 167—172, 1979.
- 6) Nesburn AB, Cook ML, Stevens JG: Latent herpes simplex virus; isolation from rabbit trigeminal ganglia between episodes of recurrent ocular infection. Arch Ophthalmol 88: 412—417, 1972.
- 7) Nesburn AB, Dickinson R, Radnoti M: The effect of trigeminal nerve and ganglion manipulation of recurrent of ocular herpes simplex in rabbit. Invest Ophthalmol Vis Sci 15: 726—731, 1976.
- 8) Gerdes JC, Smith DS: Recurrence phenotype and establishment of latency following rabbit keratitis produced by multiple Herpes simplex virus strains. J Gen Virol 64: 2441—2454, 1983.
- 9) Tullo AB, Easty DL, Shimeld C, et al: Isolation of Herpes simplex virus from corneal discs of patients with chronic stromal keratitis. Trans Ophthalmol Soc UK 104: 159—165, 1985.
- 10) 内田幸男: 角膜ヘルペス—主として診断学的立場から, 日眼 76: 1391—1413, 1972.
- 11) 塩田 洋: 角膜ヘルペス. 内田幸男編: 眼科 Mook 7, 眼感染症とその治療. 東京, 金原出版, 53—65, 1979.
- 12) 茂田士郎: ヘルペスウイルス群, 化学療法の展望. Therapeutic Research 2: 609—614, 1985.
- 13) Fujinaga K, Sawada Y, Uemizu Y: A rapid screening for the specific DNA segments in adenovirus-transformed cells. Gann 70: 239—243, 1979.
- 14) Ueno T, Suzuki N, Sakaoka H: A simple and practical method for typing and strain differentiation of Herpes simplex virus using infected cell DNAs. Microbiol Immunol 26: 1159—1170, 1982.
- 15) 安田利顕: STDとしての単純性疱疹. 臨床医 9: 74—77, 1983.
- 16) Committee on Fetus and Newborn: Committee on infectious disease: Perinatal herpes simplex virus infections. Pediatrics 66: 147—149, 1980.
- 17) 佐藤成大, 牧野正人, 前川裕子他: 出生時および新

- 生児の感染。臨床とウイルス 11: 338—340, 1983.
- 18) 川名林治, 佐藤成大, 金生英雄: 新生児単純ヘルペスの水平感染。周産期医学 13: 1369—1373, 1983.
 - 19) Hill JM, Kwon BS, Shimomura Y, et al: Herpes simplex virus recovery in neural tissues after ocular HSV shedding induced by epinephrine iontophoresis to the rabbit cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 243—247, 1983.
 - 20) Dunkel EC, Green MT, Rosborough JP: Suppression of HSV-I infection in trigeminal ganglion cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 525—533, 1984.
 - 21) Openshaw H: Latency of herpes simplex virus in ocular tissue of mice. Infect Immun 39: 960—962, 1983.
 - 22) 谷藤泰寛, 佐藤泰司, 石川靖彦: 水晶体上皮長期継代培養細胞の形態。眼紀 22: 942—944, 1973.
 - 23) 谷藤泰寛: 家兎水晶体上皮細胞における風疹ウイルスの増殖。日眼 75: 1676—1683, 1971.
 - 24) 金生英雄: 家兎水晶体上皮細胞の培養および Herpes simplex virus の型決定への応用についての研究。岩手医誌 36: 341—353, 1984.
 - 25) Van der Veen J, Heyen CFA: Lens cell of calf in continuous culture. Nature 183: 1137—1138, 1959.
 - 26) 佐藤泰司: 人眼ヘルペスウイルスの家兎水晶体培養細胞に及ぼす影響。臨眼 26: 525—534, 1972.
 - 27) 石川靖彦: ヘルペスウイルスを感染させた家兎水晶体培養細胞の電顕的研究。日眼 76: 1213—1226, 1972.
 - 28) 新居志郎: ヘルペスウイルスと培養細胞の関係。臨床とウイルス 2: 14—22, 1974.
 - 29) Taniguchi S, Yoshino K: An analysis of the plaque assay of herpes simplex virus in chick embryo monolayers. Arch Ges Virustorsch 14: 537—552, 1964.
 - 30) 国立予防衛生研究所学友会編: ウイルス実験学各論。東京, 丸善, 65—78, 1982.
 - 31) Yoshino K, Taniguchi S: Studies on the neutralization of herpes simplex virus. I. Appearance of neutralizing antibodies having different grades of complement requirement. Virology 26: 44—53, 1965.
 - 32) Tada A, Yoshino K: A new microplate neutralization test for typing of herpes simplex virus. Microbiol Immunol 22: 415—426, 1978.
 - 33) Hayashi Y, Hidano A, Yoshino K, et al: Rapid identification and typing of herpes simplex virus in clinical specimens by a direct microneutralization test. Microbiol Immunol 26: 541—546, 1982.
 - 34) Goldstein LC, Corey L, McDougall JK, et al: Monoclonal antibodies to herpes simplex viruses. Use in antigenic typing and rapid diagnosis. J Infect Dis 147: 829—837, 1983.
 - 35) Peterson E, Schmidt OW, Goldstein LC, et al: Typing of clinical herpes simplex virus isolates with mouse monoclonal antibodies to herpes simplex virus type 1 and 2: Comparison with typespecific rabbit antisera and restriction endonuclease analysis of viral DNA. J Clin Microbiol 17: 92—96, 1983.
 - 36) Zimmerman PH, Mundon FK, Croson SE: Identification and typing of herpes simplex virus types 1 and 2 by monoclonal antibodies, sensitivity to the drug (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-Deoxy uridine, and restriction endonuclease analysis of viral DNA. J Med Virol 15: 215—222, 1985.
 - 37) 柳 壺夫: 単純ヘルペスウイルスの分子疫学の基礎。臨床とウイルス 12: 379—386, 1984.
 - 38) 坂岡 博, 川名 尚, 藤永 薫: 単純ヘルペスウイルスの分子疫学とその応用。臨床とウイルス 12: 387—390, 1984.
 - 39) 坂岡 博, 上野哲治, 鈴木信敬他: 制限酵素によるウイルス株同定法とその molecular epidemiology への応用。医学のあゆみ 125: 867—877, 1983.
 - 40) Arens MQ, Swierkosz E: Simplified method for typing herpes simplex virus restriction endonuclease analysis. J Clin Microbiol 17: 548—551, 1983.
 - 41) Chaney SMJ, Warren KG, Kettys J: A comparative analysis of restriction enzyme digests of the DNA of herpes simplex virus isolated from genital and facial lesions. J Gen Virol 64: 357—371, 1983.
 - 42) Plummer G, Goodheart CR, Miyagi M: Herpes simplex viruses: Discrimination of types and correlation between different characteristics. Virology 60: 206—216, 1974.
 - 43) Smith HO, Wilcox KW: A restriction enzyme from hemophilus influenzae. J Mol Biol 51: 379—391, 1970.
 - 44) Hayward GS, Frenkel N, Roizman B: Anatomy of herpes simplex virus DNA: Strain differences and heterogeneity in locations of restriction endonuclease cleavage sites. Proc Natl Acad Sci 72: 1768—1772, 1975.
 - 45) Chaney MJ, Warren KG, Subak-Sharpe JH, et al: Variable restriction endonuclease sites of herpes simplex virus type 1 isolates from encephalitic, facial and genital lesions and ganglia. J Gen Virol 64: 2717—2733, 1983.

(第90回日眼総会原著)