

秋田県に於けるヘルペスウイルス群の血清疫学的観察

特に都市及びその近郊部と山村に於ける
ウイルス伝播の相異を中心として

秋田県立中央病院中央検査部微生物検査科

秋田県衛生科学研究所

須 藤 恒 久

秋田県立中央病院中央検査部微生物検査科

森 田 盛 大

東北大学歯学部微生物学教室

日 沼 頼 夫

東北大学医学部細菌学教室

石 田 名 香 雄

緒 言

病気そのものとしては比較的単純であるか又は、不顕性感染の形が多いためにさほど重要視されなかつたヘルペス群ウイルスは、潜伏感染・垂直伝染と言う本質的問題で漸く重要視されて来つた。所が最近に至り、ガン或は、白血病の原因に関連して更に重要なウイルス群として注目されるようになって来た。即ち、アフリカに風土病的に存在するBurkitt 淋巴腫から見出されたEBウイルスはその形態がヘルペス群ウイルスの特色に一致することが判り、しかもそのEBウイルスは、所謂伝染性単核症の病原ウイルスでもあろうと^{3~5)}考えられるようになって来たのである。

又、一方ではヒト白血病細胞を培養し、電子顕微鏡的観察の結果、同じような形態のウイルスが認められ、更には正常人の末梢白血球の培養細胞

の中にもそのようなウイルス様粒子が認められるようになった。⁸⁾

このように未知のヘルペス様ウイルスが人の造血臓器の腫瘍と密接に関係しているらしいことが形態学的に判つて来たのである。この未知のヘルペス群ウイルスの一種であるEBウイルスと従来から知られている三種のヒトのヘルペス群ウイルス即ち、Herpes Simplex Virus(H. S. V), 水痘帯状疱疹ウイルスVaricella Zoster(V. Z. V)及び、Cytomegalovirus(C. M. V)の血清抗体が人々の間にどのように分布しているかを知っておくことは、これら三種のウイルスの疫学的実態を知る上にも、又ガン及び白血病の研究にとつても必要なことであらうと考えて、今回のような調査を試みたわけである。

調査対象及び方法

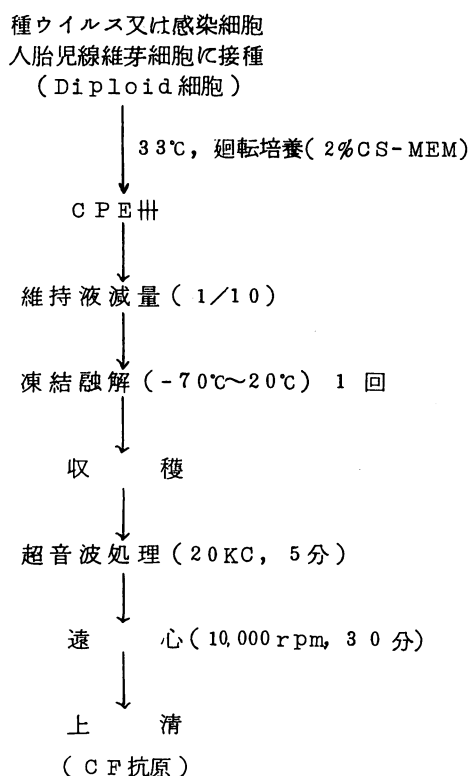
秋田県内在住の健康人390名からPolio, 日本脳炎或は, インフルエンザの疫学調査の目的で採取して, -20°C に保存しておいた血清をこの各種ヘルペス群ウイルスの抗体調査の対象とした。これを居住地区別に分けると, 都市部及び, その近郊在住者284名と極めて交通不便な山村(東成瀬村)在住者106名となる。

使用したウイルス抗原の内, H. S. V, V. Z. V は我々の処で分離した代表株を用いたが, EBVirus (EBV)は著者の一人日沼が確立した⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾ P₃HR-1細胞株を用いた

抗体の測定方法は図1に示した如くであり, EB以外の各ウイルスをヒト線維芽細胞に増殖させ

図1

C F 抗原作製法



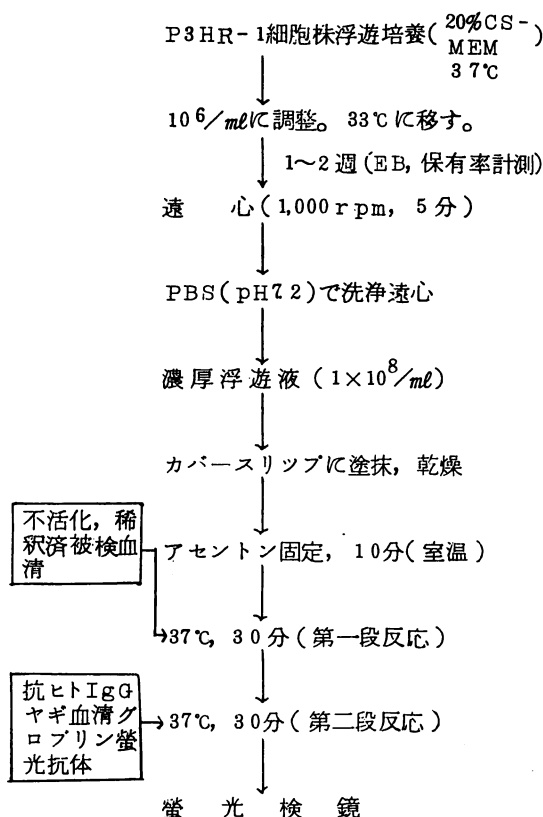
十分CPEが現われた後培養液の量を少なくしてから凍結融解して収穫した後, 超音波処理を行なった抗原を補体結合抗原(CF抗原)として使用した。CF抗体価測定は, マイクロタイターを用いた血清希釈8倍以上を示したものを抗体陽性とし, 各年令群毎に抗体保有率を算出した。尚, 使用抗原は, 全て成人血清又は, 恢復期血清とBoxtiationを行なった際の至適濃度の抗原を用いた。

EBVに対する抗体は, 螢光抗体間接法によって測定し, 10倍希釈血清で螢光陽性を示したものを抗体陽性とした。

螢光抗体法の術式の概要は図2に示したようなものである。即ち, パキットリンパ腫樹立細胞系

図2

抗E・Bウイルス螢光抗体測定方法



からのクローンによつて得られたP3HR-1細胞株を20%牛血清を加えた1-グルのMEM培地を用い37℃で培養する。これを1ml当り100万箇に調整してから33℃に1-2週間培養するとEBV保有細胞即ち、蛍光陽性細胞が50%位になるのでこの時期に遠心して細胞を磷酸緩衝液(PBS)に1ml当り一億位の濃度に浮遊させ、これをカバースリップに塗株して乾燥してから室温で10分間アセトンに入れて固定し抗原の標本とする。こうして出来た抗原標本に被検血清をのせ37℃に30分反応させてからPBSで洗い次

に抗ヒトIgGヤギ血清グロブリン蛍光抗体(Highland社製)で再び37℃30分反応させる。そして中等度400倍の倍率で蛍光顕微鏡で観察するがこの方法の詳細については既に日沼¹³⁾が医時新報誌上に発表している通りである。

上記方法により測定した各種ヘルペス群抗体の年齢別保有率を県内地区別にも分けて算出して表1, 2, 及び図3, 4に示した。

表1 秋田県内都市部及び近郊在住者の各種ヘルペス群ウイルスに対する年齢別抗体保有率

ウイルス 及 方法	年令	0~1	2~3	4~5	6~9	10~ 12	13~ 15	16~ 19	20~ 29	30~ 39	40~ 49	50~
H. S. V (CF)	被 検 数	12	20	15	37	35	20	24	45	42	19	15
	陽 性 数 (≥8)	0	7	4	21	19	12	18	35	34	18	15
	陽 性 率 %	0	35.0	26.7	56.8	54.4	60.0	75.0	77.9	81.0	94.6	100.0
V. Z. V (CF)	被 検 数	12	20	15	37	35	20	24	45	42	19	15
	陽 性 数 (≥8)	0	2	4	10	9	5	4	10	10	8	4
	陽 性 率 %	0	10.0	26.7	27.1	25.7	25.0	16.7	22.2	23.8	42.1	26.7
C. M. V (CF)	被 検 数	12	20	15	37	35	20	24	45	42	19	15
	陽 性 数 (≥8)	4	17	9	25	24	15	20	42	39	15	13
	陽 性 率 %	33.3	85.0	60.0	67.6	68.6	75.0	83.4	93.4	93.0	79.0	86.7
E. B. V (FI)	被 検 数	13	21	17	38	36	21	24	11	12		
	陽 性 数 (>10)	4	18	15	37	32	16	19	10	11		
	陽 性 率 %	30.8	85.6	87.2	97.4	89.0	76.2	79.2	91.0	91.7		

表2 東成瀬村在住者の各種ヘルペス群ウイルス
に対する抗体保有率

ウイルス (方法)	年令	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	20--
H.S.V (CF)	被 検 数	18	19	18	19	9	10
	陽 性 数 (≥ 8)	11	12	13	12	6	7
	陽 性 率 %	61.2	63.3	72.2	63.2	66.7	70.0
V.Z.V (CF)	被 検 数	18	19	18	19	9	10
	陽 性 数 (≥ 8)	3	10	6	5	2	1
	陽 性 率 %	16.7	52.6	33.3	26.3	22.2	10.0
C.M.V (CF)	被 検 数	17	18	16	14	8	5
	陽 性 数 (≥ 8)	0	0	0	0	0	0
	陽 性 率 %	0	0	0	0	0	0
E.B.V (FI)	被 検 数	15	22	11			2
	陽 性 数 (>10)	15	22	11			2
	陽 性 率 %	100.0	100.0	100.0			100.0

図3

秋田県内都市部及び近郊在住者の各種ヘルペス群
ウイルスに対する年令別抗体保有率

(但し、本図は4種類全ての検査をされた人員について集計した)

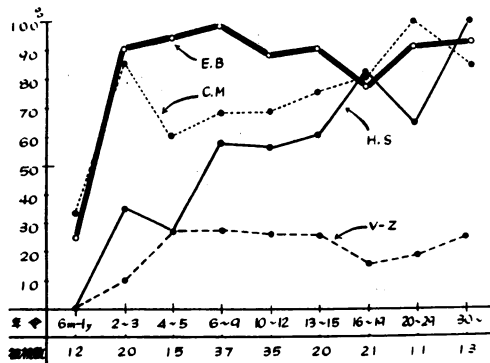
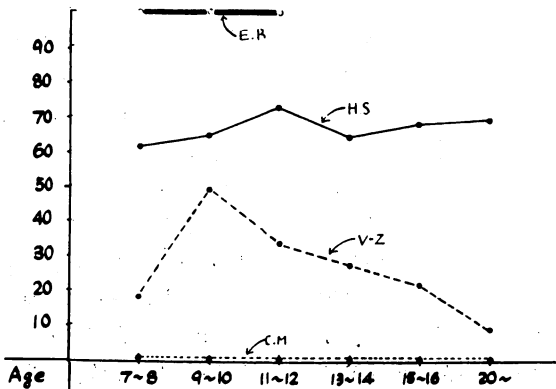


図4 東成瀬村在住者の各種ヘルペス群ウイルス
に対する抗体保有率



先ずHSVについてみると都市部では6ヶ月～1年児では陽性者がなく2～3才頃から抗体陽性者があらわれ出して年令の増加と共に保有率が増加して居り、20才迄に80%程度の陽性率に達し、50才以上では100%を示して居る。一方、交通不便な山村での状態は年少者の血清がないので正しい比較は出来ないが、小学生から20才以上迄でみると、殆んど都市部と同じ程度の保有率であつた。このHSVに対する抗体保有率は、一般に社会環境の悪い、即ち、衛生状態の悪い或は、人口稠密な処程高いとされている。英国のSmith¹⁴⁾らは彼らの1,000余名に及び調査に於てそれ迄の他の成績と比較して述べて居る。

今回の我々の調査で得られた結果からは、人口の密度とか、交通の便、不便と言うものは少なくともHSVの伝播に関しては全く影響がないと言えると思われ、吉野らの1962年東京の住民についての報告¹⁵⁾と大差がない。尚、このHSVのCF抗体は、顔面皮膚などに発疹がみられるくりかえし罹患の例で調べても発病時と恢復期との間には

全く差がみられないのである。即ち、CF抗体の測定では病原診断は行ない得ないのである。従つて皮膚の発疹が带状疱疹か、単純疱疹か、又は、他の原因による水泡かの診断に迷うような症例を臨床家が正しく診断したいと希望する場合、我々は、直接病原ウイルスの分離を行なつて居る。もし発疹がHSVによるものであると新しい水泡であれば、Verob細胞を用いて分離の翌日にも判定することが出来る。

同一症例で長期にわたつて追求した例がないので一概には言い切れないのが、CF抗体は、各人殆んど一定のレベルを長期にわたつて保持するものではなからうかと考えられPaul Gerber¹⁷⁾によれば10年間差がなかつたと言う。ただし、徳丸¹⁸⁾によれば、IgAはくりかえしの発症期と潜伏期間中では差があると述べて居り、IgAの減少がくりかえし罹患の原因であるとしている。

次にVZV抗体であるが、これは現在の処、中和抗体の測定は一般的には殆んど出来ないののでCFが殆んど唯一の抗体測定法である。然し乍ら、

以前は患者の水疱内容を抗原として行なわれていたのであるが、最近ヒト胎児線維芽細胞によつてウイルスを増殖させ、抗原とする方法が開発されたので容易に抗体測定が出来るようになった。

このVZV抗体保有率をみると図3) 4)の如くであり60%~50%の保有率である。この低い陽性率は殆んど一生に一度は、水痘に罹患すると言う臨床疫学的事実と、更に水痘又は、帯状疱疹症例のペア血清によるCF抗体の推移を考えあわせると、このウイルスの抗体価は最初の水痘発病によつて、無から有に変わるが、年月と共に低下して遂には大部分の人が認め得ない迄に低下してしまう。然し乍ら、成人になつてから何らかの原因で帯状疱疹として発病した際、再びCF抗体価を認め得るようになるものと考えられる。従つて成人にみられる10-20%の抗体陽性率は最近帯状疱疹に患罹したものと少数の水痘発病時の抗体を保有しているものが加算されているものと想われる。VZVとHSVの間には共通抗原性があるとされているがそのためにみかけ上VZVの抗体が陽性を示しているものではないであろう。Rossらは、水痘及び、帯状疱疹患者についてHSV及び、VZVについて抗体を調べ、水疱で48%、帯状疱疹で26%にHSV抗体の有意上昇を認めたことからHSVとVZV間に共通抗原性があるとして居る。しかしHSV罹患例についての調査は行なつて居らず、HSV罹患でVZV抗体が変動するか否かはみていない。

我々が仙台通信病院皮膚科の症例について、両ウイルスの抗体を調べた際には、CFでの共通抗原性をみとめなかつた。然し乍ら、一方白血病患者の皮膚に発生した巨大な水疱から、ウイルス分離以前に水疱内容細胞をHSV免疫家兎血清ラベル蛍光抗体で直接染色を行ない、明らかな特異蛍光を認めたことからHSV感染症と考えたところVero細胞でHSVは分離されず、VZVがDiploid Cellで分離されたと言う経験をもつて居る。こうした帯状疱疹の発病原因については、免疫低下時の再感染であるとするものと潜伏感染ウイルスの何らかの誘因による再活動であるとするものがあるがまだ何れとも決つていないのが現

状である。

次にCMVについてみると、図3、4に示した如く、都市近郊の6ヶ月~1年児に於ては30%の抗体保有率であり、しかも、急速に上昇して2~3才ですでに85%の保有率に達し、4~5才に於てやや低下して居るが、小学生から成人迄70~90%の保有率であつた。然し乍ら、きわめて交通不便なこの一山村では、小・中学生及び5名の教職員の全員に8倍以上の抗体価保有者がなかつた。このことは後で、EBウイルスの処で述べる如く100%の保有率と全く対照的である。この都市部と山村での抗体保有状況の相異はCMVの伝染形式を考える上からきわめて興味ある点である。即ち、沼崎らの考えによれば一垂直感染により母体から胎児に入つたCMVは、出生後の或る時期、即ち唾液腺の発達する5~6ヶ月以後体内で急速に増殖する。そのため抗体も産生される。従つて外からの感染を受けないような環境の乳児でも抗体を保有するようになるので、非常に高率な保有率となる。少数の母体内での感染を受けなかつたもののみが後で水平感染を受けるので、結局は、成人にいたる迄に100%に達するのであると言うわけである。然し乍ら、東成瀬村でCMV抗体保有率0%と言うことは如何説明すべきか、更に検討を要する処である。

次に問題のEBVの抗体保有率であるが、図3、4に示した如く、その保有率がCMVの場合みられたように乳幼児にすでに80%の保有率に達して居り、年齢群毎に多少の変動はあるが、80~100%の保有率であつた。山村の小・中学生でみると実に100%保有率を示して居た。このことはきわめて重要である。即ち、生後2~3才迄の間に罹る明らかなウイルス病でこのように高度の伝染性を示すウイルスが他にあるか。もしあつたとすればどのような病気として現われて来るかと言うことである。この点について我々は、このような山村に対して一般のウイルスはどのように伝播しているであろうかを以前に調査し、昭和43年第16回ウイルス学会で発表した。即ち、明らかに周期的な流行を示すものの中には永年にわたつてこのような山村には侵入せず、又、一度侵入

すると感受性のある個体はすべて罹患すると言う事実があるのである。その例として先に同じ対象について調べた風疹と麻疹の抗体保有率を考えてみると風疹ウイルスは、過去15年間この村に入^{25,26)}っていないことが明らかにされたが、より伝播力の強い麻疹ウイルスには殆んど全員罹患歴のあることが血清学的に証明された。又、この山村では極めて激烈なインフルエンザが流行したことがある。即ち、1967年4月、部落²⁷⁾の全戸に患者が出るというひどい流行であつた。しかもその年に秋田県内でA2型が流行したのはこの村だけであり、他には全く波及しなかつたのである。このように一般には潜伏感染がなく、明らかな水平感染が主流をなすウイルスでは都市部と山村での抗体の分布が全く異なることがあるのである。EBVに対する抗体の保有率が麻疹と同じ保有率100%に近く、しかも乳幼児でも80%を示すことからみるとこのウイルスには、垂直伝染があると考えざるを得ない。最近Paul Gerber¹⁷⁾も同じことを述べている。当然問題としてEBVと他のヘルペス群ウイルスとの共通抗原性がとりあげられるのであるが、現在の処共通抗原性はないとされて居り、我々のみとめた抗体は、EBVのみに対する抗体であると考えてよからう。この高い陽性率と最近Evans²⁸⁾らによつて発表されたアメリカ大学生は、入学時26%のみが抗体陽性を示し74%の陰性者の内14.9%が在学4年間の間に伝染性単核症になつたと言う報告やHenle²⁹⁾等の80%陽性になるのは青年期であると言うことなどを比較すれば、我国でのこのEBVの伝播は極めて高度であることが判るのである。我国では殆んど伝染性単核症をみないことと高度のEBV抗体保有率との間には当然、因果関係があると考えられるが、何故外国と我国との間にこのような差異があるのか又、我国では果して不顕性や潜伏感染の以外に何か別の形の病気があるのか更にはこのウイルスと白血病やガンとの関係などについて究明されて行くことを期待するものである。

結 論

秋田県内在住健康者390名につきヒトのヘルペス群ウイルスに対する保有状況を調査した。

即ち、HSV、VZV及びCMVについてはCFを用い、EBVについては蛍光抗体法によつて測定し年令別及び、居住地区別に比較した。HSV及びVZVについては、過去に於て我国及び諸外国に於て得られた成績と大差がなく、交通の便、不便、人口の稠密度は関係ない如くであつた。しかし、CMVについては、都市部では高率の保有率を示したのに対して一山村では保有者がなく極めて対照的であつた。EBVについては都市部、山村部共極めて高率な保有率を示し、本ウイルスの我国に於ける本態究明について若干の考察を加えた。

本稿の概要は第43回日本伝染病学会シンポジウム「ヘルペス群ウイルス感染症」に於て発表された。

尚、本研究の一部は秋田県立中央病院医学研究費によつた。

文 献

- 1) M. A. Epstein & Y. M. Barr, Lancet: 1, 252, 1964.
- 2) M. A. Epstein et al., Lancet: 1, 702, 1964
- 3) G. Henle, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, : 59, 94, 1968
- 4) J. C. Niederman et al., J. A. M. A.: 203, 139, 1968.
- 5) Volker Diehl et al., J. Virology: 2, 663, 1968.
- 6) H. L. Moses et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.: 60, 489, 1968
- 7) M. V. Viola et al., New Engl J. Med.: 277, 503, 1967.
- 8) 大里他 医学のあゆみ, 68, 504, 1969.

- 9) Y. Hinuma et al., J. Virology: 1, 1045, 1967.
- 10) Y. Hinuma et al., Cancer: 22, 1089, 1968.
- 11) 日沼, 医学のあゆみ 66, 19, 1968
- 12) J. L. Sever, J. Immunology.: 88, 320, 1962.
- 13) 日沼他, 日本医事新報 2312, 27, 昭43
- 14) I. W. Smith et al., J. Hygiene: 65, 395, 1967.
- 15) K. Yoshino et al., Jap. J. Med. Sci. Biol.: 15, 235, 1962.
- 16) 須藤他, 秋県医誌, 5, 20, 昭43.
- 17) P. Gerber & E. N. Posenblum, Proc. Soc. Exp. Biol. Med.: 128, 541, 1968.
- 18) T. Tokumaru, J. Immunology: 97, 248, 1966.
- 19) C. A. Ross et al., Lancet.: 2, 708, 1965.
- 20) 熊坂他, 第 回日本皮膚科学会東北地方会
- 21) 須藤他, 未発表データ.
- 22) G. Plummer, Prog. Med. Virol.: 9, 302, 1967.
- 23) 沼崎他, 日児誌 72, 1591, 昭43
- 24) 須藤他, ウイルス 18, 408, 昭43
- 25) 須藤他, 医学のあゆみ 64, 225, 昭43
- 26) 須藤他, 秋田衛研所報 12, 90, 昭43
- 27) 須藤他, 秋田衛研所報 12, 85, 昭43
- 28) A. S. Evans et al., New Engl. J. Med.: 279, 1121, 1968.