単純ヘルペスの血清疫学的研究

第 2 報 中和抗体の分布型ならびにこれと CF 抗体との関係

Serological-epidemiological Studies of Herpes Simplex

II. On the Frequency Distributions of Virus-neutralizing Antibody and on the Relations between the Virus-neutralizing and Complement-fixing Antibodies

札幌医科大学衛生学教室 (主任 金光正次教授)

山 口 晋 吾

Shingo Yamaguchi

Department of Hygiene Sapporo Medical College

(Director: Prof. M. Kanamitsu)

まえがき

前報¹⁾で私は都市在住の各種年齢集団について、単純ヘルペスウィルス (HSV) に対する補体結合抗体 (CF 抗体) を集団的に測定し、年齢ならびに居住環境と CF 抗体の分布型との関係、平均抗体価の推移、および同一集団における CF 抗体の 1 年間の変動などを観察してきた。本報ではこれについて HSV に対する中和抗体を各種の年齢集団について定量的に測定し、年齢と抗体分布の型の関係、同一集団における抗体の集団変動、および CF 抗体と中和抗体との関係などを観察し、前報の成績とを総合して、単純ヘルペスの免疫生成機序に関して血清疫学的な見地から考察しようとした。

実験材料および実験方法

1) 対象集団

昭和32年11月から昭和33年5月に至る間に、札幌市内の某小学校児童 (7~10歳) 57名、同市内某病院看護婦 (20~29歳) 72名、同市内および小樽市在住の鉄道職員 (40~55歳) と札幌市某養老院に収容されている老年者 (55~75歳) 56名の計 185名から採血した。なお、抗体の集団変動をみるために、市内小学学童56名から1年間の間隔で組血清をとった。血清は56°C30分加熱したのち4°Cに保存された。

2) 使用ウィルス

本実験に使用したウィルスは1956年国立予防衛生研究所の吉野博士から分与を受けた HF 401株を、当研究室において HeLa 細胞に17代継代したものである。

3) 組織培養法

中和抗体の測定はすべて HeLa 細胞を用いておこなった。HeLa 細胞は伝研の遠藤博士から分与された牛血清馴化株を使用し、細胞の培養法ならびに抗体測定術式は金光ら²⁾ がポリオの研究に用いた方法に準じておこなった。すなわち細胞の増殖用培養液としては次の処方を用いた。

Hanks 液	79.4%
非働化牛血清	20.0%
Yeast extract(Difco)	0.1%
Lactalbumin hydrolysate (N.B.C.)	0.5%

またウィルスを感染させたのちの細胞維持用としては、次の培養液を使用した。

Earle 液	94.4%
非働化馬血清	5.0%
Yeast extract(Difco)	0.1%
Lactalbumin hydrolysate(N.B.C.)	0.5%

HeLa 細胞は Scherer ら³⁾の方法に準じ Trypsin 処理をおこなった細胞を 5~10万/cc の割合に上述の増殖用培養液に浮遊し、各試験管に 1 cc ずつ分注して、いずれも静置法により 37°C の孵卵器の中で培養した。

4) 血清中和抗体の測定法

56°C30分加熱非働化した被検血清を細胞維持用培養液で 2 倍階段希釈し、これに HeLa 細胞で培養した HSV の培養液を、およそ 100 TCID₅₀ に希釈したものを等量加えて 1 時間室温に放置したのち、その混合液 0.1 cc ずつを各々 3 本の HeLa 細胞培養管に接種し、ついでこ

第 1 図 都市在住の各年齢集団別単純ヘルペス中和抗体の分布

れに維持用培養液 1 ml を注加した。判定は培養後 6 ~ 7 日目におこない、Reed and Muench の方法でその感染価を測定した。中和抗体の価は 100 TCID₅₀ のウィルスに対し 50% 中和を示す被検血清の初期稀釈増数 (initial dilution) をもって表わした。なお、細胞変性の基準は H S V の感染によって生じる特異な巨細胞が、全視野の 30% 以上にあらわれた場合を陽性とした。

実験成績

1) 各年齢集団におけるヘルペス中和抗体の分布

都市在住の各年齢集団における H S V の中和抗体の分布状況をみるために、札幌市の小学児童 (7 ~ 9 歳)、医大看護婦集団 (20 ~ 29 歳)、および都市在住の 40 歳以上の壮老年の 3 年齢集団について中和抗体を定量的に測定した。第 1 図はその成績を示したものである。すなわち小学児童群では 50% が抗体陰性で、残りの大半は 32 ~ 64 倍に集積し定型的な 2 峰型の分布をなしている。しかも 4 ~ 16 倍という中間値を示す者が少なく、Burnet⁴⁾ のいわゆる “all or none” の法則に従った分布型を示す。看護婦群でも同じく 2 峰型の分布を示すが、抗体陰性者は 20% に減少し、残りの大部分は 16 ~ 64 倍に集積し、第 2 峰は前群に比し著しく高い。壮老年群では抗体陰性者はわずかに 5% で、残りの 95% は 8 ~ 128 倍の抗体を保有し、特に 32 ~ 64 倍付近に強く集積する傾向があり、前 2 群とは異なり単峰型の分布である。しかし抗体分布のモードは各年齢集団を通じほとんど一定で 32 ~ 64 倍の値を示している。また学童群・看護婦群・壮老年群の各中和抗体の分布型は前報に示したそれぞれ就学前、10 ~ 19 歳、30 ~ 39 歳の各 C F 抗体の分布型ときわめて類似していることは興味がある。

2) 中和抗体と C F 抗体との関係

都市在住の各年齢集団についてそれぞれ中和抗体と C F 抗体とを同時に測定し、両者の関係をみると第 2 図のごとくなる。すなわち小学児童群においては C F 抗体陰

第 2 図 各年齢集団における CF・中和両抗体の相互関係

性者は中和抗体もまた認められない。またCF抗体を保有する者でも42例中21例(50%)は中和抗体が陰性である。これに対し4倍以上の中和抗体を保有する者はすべて8倍以上のCF抗体を保有し、かつ両抗体の価にはかなり密接な順相関が認められる。これと同様の関係は看護婦集団においても認められるが、40歳以上の壮老年者では両抗体ともに陰性の者がきわめて少なく、両抗体とも16~64倍の価を示す者が大多数なために、両者の間にはかなり緊密な順相関関係がある。以上の成績から各年齢集団を通じて共通なことは、CF抗体を欠く者は中和抗体もまた認められないこと、また8倍以上の中和抗体を保有する者については、両抗体間に緊密な順相関関係が認められることである。しかし学童群においては16~32倍という比較的高いCF抗体価を示す者でも、かなりの数に中和抗体を欠き、両者間には相関関係が認められなかった。なお、中和抗体陰性者群に対し、感染ウィルスの量を40~80 TCID₅₀に減じて抗体を再測定したが、抗体は依然として検出しえなかった。

3) 同一集団における中和抗体の変動状況

同一の集団において、一定の時日を経過したのち、H S Vに対する中和抗体がどのように変動するかを観察した。札幌市内某小学学童(1~4年生)56名を選び、1年間の間隔で採血して得た組血清について中和抗体を定量

第3図 都市小学学童(7~10歳)の1年後における中和抗体の変動 N=56

的に測定し、抗体の集団変動状況をみると第3図のごとくである。すなわち初めに4倍以上の抗体を保有していた者では、大部分において抗体の上昇を示している。ところが初めに64倍という高い抗体を保有していた者の中には、逆に抗体価が低下した者も数例認められた。しか

し初めに抗体を欠如した者は、1年後においてもほとんど変化がなく、わずかに1例のみ64倍まで上昇したものがあつた。前報¹⁾で観察したごとくCF抗体においては初期に抗体を欠く者に抗体上昇した者が多いことと比べきわめて対照的である。すなわち中和抗体が1年後においても依然陰性でありながら、CF抗体の明らかな上昇を示した者も少なくない。しかしいつたん出現した中和抗体は1年後において再び消失した者は1例もない。

4) 中和抗体とCF抗体の変動の関係

前述のごとく、同じ個体について同時期に測定した中和抗体とCF抗体の価は必ずしも比例しない。よつて次に同じ個体における1年間の両抗体の上昇および低下にどのような関係があるかを観察した。まず初期に中和抗体が4倍以上の価を保有していた者について、その後1年間における両抗体の変動をみると第1表(a)のごとくである。すなわちこの間に中和抗体が2倍以上上昇した

抗体陽性者におけるCF・中和両抗体の変動の関係 (小学学童)

第1表(a)

第1表(b)

	CF抗体	2倍以上の変動		中和抗体	2倍以上の変動
中和抗体上昇群 19	上 昇 不 変 低 下	9 8 2	CF抗体上昇群 13	上 昇 不 変 低 下	9 3 1
不変群 4	上 昇 不 変 低 下	2 2 0	不変群 15	上 昇 不 変 低 下	8 7 0
低下群 1	上 昇 不 変	1 0	低下群 5	上 昇 不 変	3 2

19名のうち、CF抗体が同様に2倍以上の上昇を示した者が9名、不変8名、2倍以上低下した者が2名である。また中和抗体に変動のみられなかった4名のうち、2名においてCF抗体の明らかな上昇が認められる。またこの間に中和抗体の低下した者は1名のみであるが、CF抗体は反対に上昇している。すなわちCF抗体の変動が中和抗体のそれと同じ傾向を示した者は約半数にすぎない。第1表(b)は初期に4倍以上のCF抗体を保有している者について、その後1年間の変動傾向を基準として中和抗体の変動を観察した成績である。表にみるように、CF抗体が2倍以上上昇した13名中9名はCF抗体も同様に上昇しており、両者の変動傾向はかなりよく一致する。しかしCF抗体不変群および低下群では、中和抗体がこ

れと同じ変動傾向を示す者はいずれも半数にすぎず、この場合にも両抗体の変動はあまり緊密とはいえない。

第2表(a)は初期に中和抗体が証明されず、その後も陰性であった20名について、1年間におけるCF抗体の変動状況を観察した成績である。この場合にも、CF抗体に変動のなかった者は12名にすぎず、他の6名では明ら

抗体陰性者におけるCF・中和両抗体の変動の関係

第2表(a)

第2表(b)

	CF抗体	2倍以上 の変動		中和抗体	2倍以上 の変動	
中和抗体不 変群 20	上 昇	6	CF抗体 上昇群 5	上 昇	0	
	不 変	12		不 変	5	
	低 下	2		低 下	0	
			不変群 7	上 昇	0	
				不 変	7	
				低 下	0	

かな上昇が、また2名には低下を認めた。なお初期に中和抗体陰性で、その後に本抗体が上昇した者は1名のみで、そのCF抗体は低下を示した。第2表(b)はCF抗体陰性者について、その後の本抗体と中和抗体の変動傾向を比較した成績である。表に明らかなようにCF抗体の上昇に伴って中和抗体も上昇した者は1名もなく、両抗体の変動はまったく平行しない。しかしCF抗体に変化のなかった7名では全例が中和抗体も変動せず、この場合にはきわめてよく一致している。以上の成績から中和・CF両抗体の変動の相互関係は、初期における各抗体の保有状況および比較の際の条件によって異なりきわめて複雑である。しかし総括的にみて両抗体の変動傾向はあまり緊密なものでないことがうかがわれる。

考 按

単純ヘルペスのごとく、顕性患者に比べて不顕性感染者が著しく多く、かつ大きな流行をみることのきわめて稀な疾患の疫学を研究するには、臨床的観察は勿論であるが、血清疫学的な見地から本ウィルスに対する血清抗体の分布を究明し、この方面からの検討が重要なことはいうまでもない。過去におけるHSVに対する中和抗体の測定には種々の実験動物または孵化鶏卵が使われた⁵⁾⁻⁸⁾。しかし最近の組織培養法の著しい進歩は、各種のウィルス病の研究に飛躍的な進歩をもたらした。すなわち1953年 Scherer ら³⁾はポリオウィルスがHeLa細胞に増殖すると同時に特有な細胞病理学的変化を与えることを報告したが、翌年彼ら⁹⁾はまたHSVについても

同様な成績を報告した。HSVはHeLa細胞ばかりでなく、マウスのfibroblastic cell(L strain)¹⁰⁾や、人胎児の肺組織¹¹⁾、兎の腎細胞¹²⁾などにも増殖し、かつこれらの細胞の破壊変性を起すことが知られている。本報ではHeLa細胞を用いて中和抗体を定量的に測定した。細胞変性はGray ら¹³⁾の成績に基づき巨細胞の出現の有無をもつて判定基準とした。HeLa細胞に継代した初期の頃にはこの巨細胞はまったく認められなかったが、継代を重ねるにしたがつて出現するようになった。

種々の条件下におけるHSVの保存については二、三の報告¹¹⁾⁻¹⁵⁾がある。Kjellén ら¹¹⁾によれば無菌的な脱脂粉乳で2倍に稀釈し、密封したアンプルに入れアイスボックスに貯蔵されたHSVは少なくとも3カ月間はその感染価を保つという。本報の中和試験に用いたウィルスは-15°Cに保存したが、この場合、ウィルスの感染価が時日の経過とともにどのように変化するかをみると、貯蔵前の感染価が-6.4であったものが、8日目には-5.5に低下し、22日目にはさらに-4.6に低下した。しかしその後1カ月以上は同じ値を維持した。したがってKjellén らのごとき方法を用いてより低い温度で保存するならば、HSVは相当長期間その感染価を維持するものと思う。

人血清中における中和抗体の分布については多くの研究報告^{5)-8), 16)-20)}があるが、そのほとんどは種々の実験動物または孵化鶏卵を用いたものであつて、組織培養法によつて抗体を定量的に測定した報告はきわめて少ない。Anderson ら¹⁶⁾によれば母親から得た抗体は生後3カ月から15カ月の間に消失し、生後7カ月~14カ月に至ればほとんどが本ウィルスに対する抗体を失うという。またWeyer⁷⁾によれば5~10歳の中和抗体保有率は38~50%、20~30歳は70~90%であり、Buddingh ら²⁰⁾は成人の抗体保有率は90~96%で、これらの成績は本報の成績とよく一致する。最近、館野ら²¹⁾は人胎児組織培養法を用いて中和抗体を測定したが、その保有率は10歳以下20%、20~30歳80%で、HeLa細胞による本報の成績と近似している。

抗体分布の型について、Burnet ら⁴⁾は初め人血清中の中和抗体はどの年齢においても“all or none”の法則に従うと提唱した。すなわち人間は本抗体をまったくもたないか、あるいは高い値を保有する2群に分れるという。この説については賛成する者¹⁷⁾⁻¹⁹⁾と、これに異議をとなえる者¹⁸⁾⁻²⁰⁾⁻²²⁾とがあるが、本報の成績によれば7~10歳および20~29歳の年齢群では明らかに抗体のある者となない者が判然とし、中間値を示すものが少なく、“all

or none” の法則に従った抗体分布を示している。しかし40歳以上では抗体陰性者がほとんどなく単峰型の分布である。すなわち Burnet の法則は若年齢集団には適用されるが、40歳以上の成人群ではまったく通用しないことを知った。これは Rose²⁹⁾ が指摘しているように、Burnet らが用いた抗体測定法の欠陥のほか、集団の居住環境・年齢的因子なども影響するものと思う。

H S V に対する C F 抗体と中和抗体との関係については、両者は密接に関連するという者^{17) 19) 24)} と、両者間の完全な相関関係を否定する者^{12) 25)} とがある。後者は中和指数の高いものは C F 抗体価も高く、両者の間に関連があるが、中和指数のきわめて低いものは C F 抗体がまったく認められないという。本報では 7~10 歳、20~29 歳および40歳以上の 3 群について両抗体の関係を観察した。その結果どの集団においても、C F 抗体のないものは中和抗体もまたまったく認められなかったが、その逆は必ずしも成立しないことを知った。しかし 8 倍以上の中和抗体をもっている者では、両抗体間に明らかな順相関関係を認めた。ただし 4~32 倍の C F 抗体をもっているにも拘らず、中和抗体陰性の者がどの年齢集団にも若干例認められたが、特に学童群ではこの関係が顕著であった。

このことはまた両抗体の 1 年間の変動の相互関係においても認められた。すなわち両抗体の変動は初期においていずれかの抗体を保有しているか否かによつて著しく影響され、また変動を比較する際の基準となる抗体の種類によつても異なり、その相互関係はきわめて複雑である。現在、中和・C F 両抗体の出現消長の機序については多くの説^{19) 20) 26) 27)} があるが、本報の成績によれば少なくとも両抗体の出現（測定可能な価までの上昇）には、かなりの時間的差異があるように思われる。しかし、これが単に中和抗体の出現が C F 抗体より遅いという時間的ズレであるか、その出現機序に本質的な差異があるのかは不明である。本報で注目されたもう 1 つの点は、中和抗体の分布の第 2 峰のモードが集団のいかに拘らずほとんど一定の値を示したことで、これは前報に述べた C F 抗体の分布の性状とも類似している。すなわち単純ヘルペスでは中和・C F 両抗体ともに特有の分布の性状を有することはきわめて注目すべきことで、このことは H S V の存在様式、本ウィルスによる感染発病ならびに免疫産生の機序を研究するうえに新たな端緒をなす事実と思う。

結 論

1) 都市に在住する各年齢集団について、H S V に対する中和抗体を定量的に測定し、本抗体の分布型、1 年間におけるその集団の変動ならびに中和抗体と C F 抗体との静的および動的相における相互関係を観察した。

2) 小学学童群について中和抗体の 1 年間の変動を観察した結果、抗体陰性者はほとんど本抗体の上昇をみなかったが、抗体陽性者では大部分が上昇を示した。

3) 同じ時期に測定した C F と中和両抗体の関係を各年齢集団について観察し、中和抗体陽性者については両抗体の順相関を認めたが、中和抗体陰性者では両者の間にかかる関係は認められなかった。

4) 小学学童について 1 年間における中和・C F 両抗体の変動の相互関係を観察した結果、両者の変動傾向は必ずしも一致しないことを知った。

5) 前報および本報の成績から、単純ヘルペスの免疫成立機序を考察した。

摺筆に当り、終始御懇篤な御指導・御援助ならびに御校閱を賜つた金光教授に深謝するとともに、血清採取に御援助・御協力をいただいた北光小学校教官各位、札幌医大看護婦各位、札幌・小樽各機関区職員、札幌市養老院院長、および被検者各位にお礼申しあげ、また教室員各位の御協力を感謝する。なお、中和試験に際し特に御助力をいただいた教室の河原林・橋本両先生に感謝致します。

本研究の要旨は第 12 回日本公衆衛生学会、ならびに第 6 回日本ウィルス学会の席上において発表した。

文 献

- 1) 山口：日本衛生学雑誌 13, 842, 1959.
- 2) 金光他：日本衛生学雑誌 13, 406, 1958.
- 3) Scherer, W. F. et al.: J. Exp. Med. 97, 695, 1953.
- 4) Burnet, F. M. & Williams, S. W.: Med. J. Austral. 1, 637, 1939.
- 5) Zinsser, H. & Tang, F.: J. Immunol. 17, 343, 1929.
- 6) Andrewes, G. H. & Carmichael, E. A.: Lancet 1, 857, 1930.
- 7) Weyer, E. R.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 30, 309, 1932.
- 8) Burnet, F. M. & Lush, D.: Lancet 1, 629, 1939.
- 9) Scherer, W. F. & Syverton, J. T.: Am. J. Path. 30, 1057, 1954.
- 10) Scherer, W. F.: Am. J. Path. 29, 113, 1953.

- 11) Kjellén, L. & Svedmyr, A. : Arch. ges. Virusfor. 5, 373, 1954.
- 12) José Sosa-Martinetz et al. : J. Bact. 70, 391, 1955.
- 13) Gray, A. et al. : Arch. ges. Virusfor. 8, 59, 1958.
- 14) Speck, R. S. et al. : J. Bact. 61, 253, 1951.
- 15) Allen, E. G. et al. : J. Bact. 63, 369, 1952.
- 16) Anderson, S. G. & Hamilton, J. : Med. J. Austral. 1, 308, 1949.
- 17) Hayward, M. E. : Lancet 1, 856, 1950.
- 18) Jawetz, E. & Coleman, V. R. : J. Immunol. 68, 645, 1952.
- 19) Dudgeon, J. A. : J. Clin. Path. 3, 239, 1950.
- 20) Buddingh, G. H. et al. : Pediatrics 11, 595, 1953.
- 21) 館野他 : 東京医事新誌 75, 11, 1958.
- 22) Kilbourne, E. D. & Harsfall, F. L. : Arch. Int. Med. 88, 495, 1951.
- 23) Rose, H. M. : J. Immunol. 68, 687, 1952.
- 24) Dascomb, H. E. et al. : J. Lab. Clin. Med. 46, 1, 1955.
- 25) Gajdusek, D. C. : J. Am. Med. Ass. 149, 235, 1952.
- 26) Jawetz, E. : Fed. Proc. 11, 472, 1952.
- 27) Brain, R. T. : Brit. Med. J. 2, 1064, 1937.

(受付 : 1958 年 11 月 26 日, 特別掲載)