

小児より分離された単純ヘルペスウイルス 1 型に 関する疫学的調査研究

小澤 茂 三木 康 佐藤 譲
金子通治 日野原正幸*

Epidemiological Studies on Herpes Simplex Virus
Type 1 Isolated from Children

Shigeru Ozawa, Yasushi Miki, Yuzuru Satoh,
Michiharu Kaneko and Masayuki Hinohara

単純ヘルペスウイルス (以下, HSV) は広く人間を侵襲する DNA ウイルスのひとつで, 口唇の水疱よりよく分離される 1 型 (HSV-1) と陰部より分離される 2 型 (HSV-2) がある。ヘルペス感染症は歯肉口内炎 (アフタ性口内炎), 口唇ヘルペス, など比較的軽症の疾患とされてきたが, 近年, ヘルペス脳炎, 性器ヘルペス症, カボジ水痘様発疹症, 新生児ヘルペス感染症など重篤になるものもあり注目されてきている。一方 HSV の初感染の時期が幼児ないし小児期から成人期にずれていく傾向が認められてきた¹⁾。著者らも, 山梨県における調査で 20 歳代の女性に約 40% の抗体陰性者が存在し, これら抗体をもたない者から生まれる新生児が HSV に初感染を受けると致命的の全身感染症を起こす危険性があることを報告した²⁾。このような状況の中で, 近年の小児の HSV 感染症の病態がどのように変容しているのかを知る目的で, 1974~85 年の 12 年間に山梨県内の病院に受診した患児より分離した HSV について, 臨床疫学的調査研究を行なったので報告する。

材料および方法

1. ウイルス分離材料

1974 年 1 月から 85 年 12 月の 12 年間に国立病院, 県立中央病院などの小児科に受診した患児から採取した咽頭ぬぐい液をウイルス分離材料とした。

2. ウイルス分離同定

ウイルス分離には Vero 細胞, CMK 細胞を用いた。細胞の増殖培地としては 5% 非働化牛新生児血清添加イーグル MEM 培地 (日水製薬), 維持培地としては牛新

生児血清のかわりに牛アルブミン, フラクション V を最終濃度 0.1% になるよう添加したイーグル培地を用いた。同定は Tada ら³⁾ の方法, および制限酵素による DNA 切断法により行なった。HSV-1, HSV-2 の抗血清は吉野亀三郎博士より分与を受けた。

3. DNA 抽出

ウイルスを Vero 細胞に感染させ, 37°C で培養した。低速遠心で細胞成分を除去した後, 高速遠心分離を行ない, ペレットを得た。これをリン酸緩衝液 0.2 ml に懸濁し, これに等量の 0.1 M Tris-HCl (pH 7.9), 0.05 M EDTA, 0.5% SDS を含有する溶液を加え, 37°C, 30 分で可溶化した。フェノール抽出で除タンパクを行なった後, エタノールで DNA を沈澱させた。沈澱は減圧乾燥後, 少量の TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.8) で溶解し, ウイルス DNA 液とした。

4. 制限酵素とアガロース電気泳動

約 1 μg のウイルス DNA 液に制限酵素 (日本ジーン社製) と酵素反応液を加え, 総量 20 μg とし, 37°C 2 時間で完全消化させた。制限酵素はメーカーの仕様書に記載されている適正量の 2~10 倍の量を用いた。また, 酵素反応液はメーカーの仕様書に記載されている組成のものを使用した。アガロース電気泳動は, アガロース (宝酒造製) 濃度 0.6%, 泳動緩衝液には 50 mM Tris-HCl, 20 mM CH₃COONa, 2 mM EDTA (pH 7.8) の組成のものを用いたサブマリン法で行なった。泳動後, エチジウムブロマイドで染色し, 紫外線下で観察した。

* 国立甲府病院

結 果

1. ウイルス分離

1974~85の12年間に山梨県内の小児科に受診した患児から採取された検体から86株のHSV-1を分離した。HSV-2は分離されなかった。一方、同一検体からHSV-1以外のウイルスも同時に分離された重感染例が2例認められ、そのウイルスはコクサッキーA10型ウイルス、インフルエンザA(H3N2)ウイルスであった。

HSV-1が分離された検査材料の種類は皮膚の病巣の水疱ぬぐい液から3株、他は咽頭ぬぐい液からであった。

2. 分離ウイルスと臨床病型

HSV-1が検出された患児の臨床診断名を図1に示した。臨床診断名の明らかな84株のうち、歯肉口内炎が36株、43%と一番多かった。咽頭炎が26%、インフルエンザが12%、ヘルパンギーナが10%、下気道炎、感冒が各1%で、これら呼吸器疾患が84株中42株、50%を占めていた。

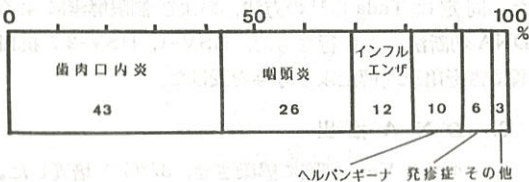


図1 HSV-1分離株と臨床病型

臨床病型別HSV-1分離率(検体数に対する分離株数の割合)を表1に示した。歯肉口内炎と診断された患児からHSV-1が39.1%(36株)分離され、一番高率であった。歯肉口内炎に次いで分離率が高かったのはヘルパンギーナ2.8%であった。咽頭炎からの分離率は1.7%、呼吸器疾患でまとめてみると1.5%の分離率であった。

HSV-1が分離された患児の臨床症状を図2に示した。臨床症状の明らかな78名のうち発熱が69名(87%)、咽

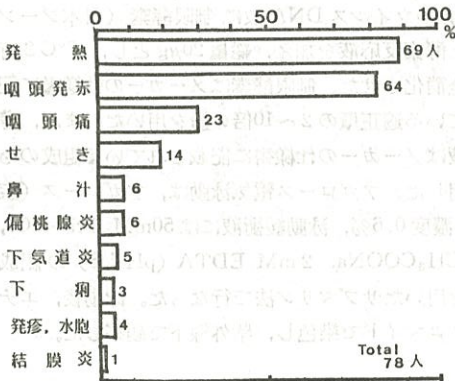


図2 HSV-1が分離されたものの臨床症状

表1 臨床病型別 HSV-1 分離率

臨床診断名	検体数	分離株数	分離率%
感冒	245	1	0.4
咽頭炎	1,269	22	1.7
ヘルパンギーナ	288	8	2.8
下気道炎	244	1	0.4
インフルエンザ	719	10	1.4
歯肉口内炎	92	36	39.1
手足口病	106	1	0.9
麻疹・風疹	354	0	0
上記以外の発疹症	183	4	2.2
ムンプス	322	1	0.3
その他の症状	324	0	0
症状不詳	51	2	—
計	4,146	86	2.1

頭発赤が64名(82%)に認められた。発熱者のうち、64%が39°C以上の最高体温を示し、平均最高体温は39.0°Cであった(図3)。

3. 分離ウイルスと年齢

年齢の明らかな患児84名の年齢層別HSV-1分離状況を図4で示した。84株中38株(45%)が1~2歳児に集中していた。その内訳は1歳児21株、25%、2歳児17株、20%であった。3~10歳児では10%前後であった。0歳児から8株分離され、それを月齢で見ると、0カ月1株、2カ月1株、9~11カ月6株であった。

臨床病型と年齢の関連性をみると、歯肉口内炎患児から分離された36株のうち22株、61%が1~2歳児に集中していた。他の年齢層では6~8%と少なく、1~2歳児との差が大きかった。呼吸器疾患から分離された40株のうち、咽頭炎7株、ヘルパンギーナ5株、インフルエンザ2株の計14株、30%が1~2歳児に見出され、他

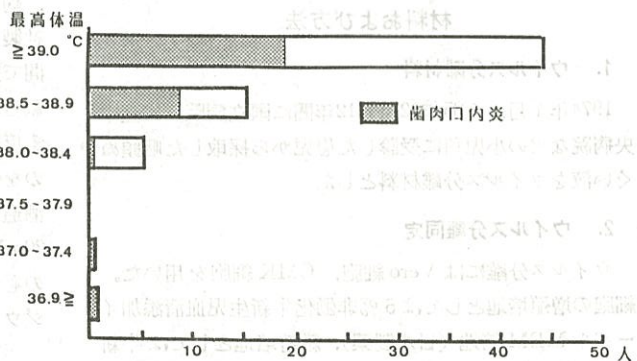


図3 最高体温の分布

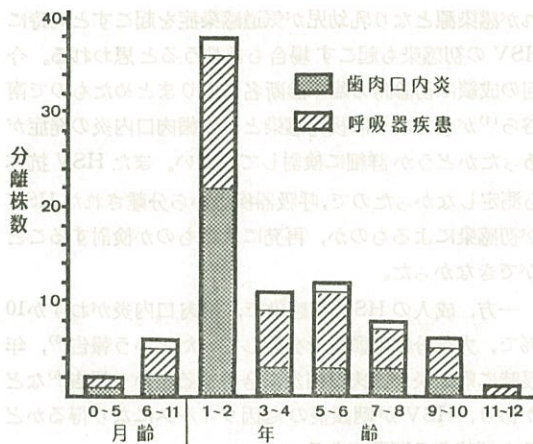


図4 年齢層別 HSV-1 分離状況

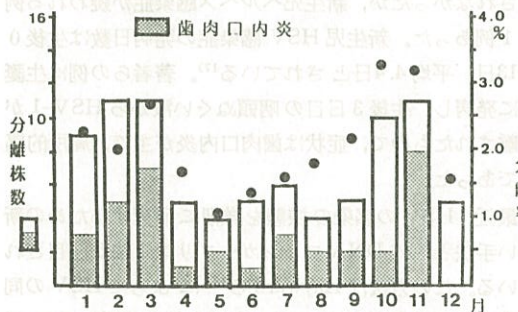


図5 月別 HSV-1 分離状況

の年齢層では9~17%を占めていた。

4. 分離ウイルスと季節

95株の月別分離状況を図5に示した。10~3月の冬期に多く分離された。月別分離率でも同様な傾向が認められた。

5. 兄弟間から分離された HSV-1 株の DNA フィンガープリント法による解析

同じ日に咽頭炎を発病した6歳と9歳の兄弟からそれぞれ HSV-1 (弟:A株, 兄:B株) を分離した。それらの分離株の DNA を制限酵素 Hpa I, Kpn I, Bgl II で切断した。また, 兄弟と同じ地域に住み, 兄弟とは疫学的関連性のないと思われる株で咽頭炎患児より分離した株 (C株) を Hpa I と Bgl II で切断した。これらの株の電気泳動像を図6に示した。兄弟から分離された A, B株とC株とでは Bgl II の K断片, Hpa I の H断片のサイズが異なっていた。それに対し, AとB株はまったく同一の電気泳動像を示した。以上の結果から兄弟から分離された HSV-1 はまったく同じ株で, 共通の感染源から感染を受けていたものと推定された。一方, C株はA, B株とはまったく疫学的関連性のない株であっ

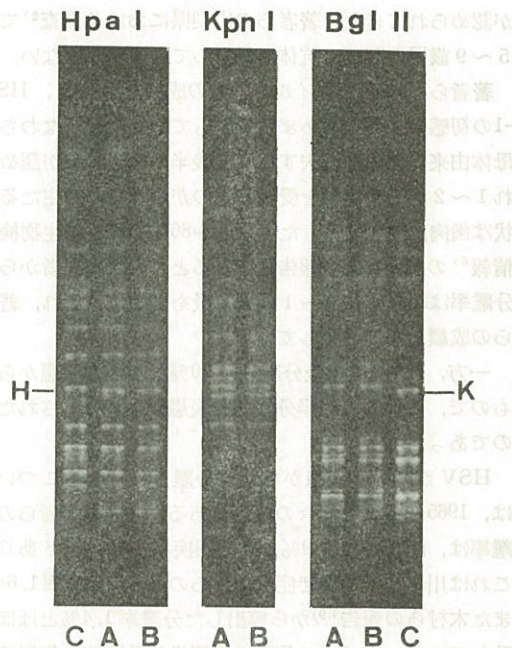


図6 兄弟より分離された HSV-1 株の制限酵素による切断像
A: 弟, 77-838株 B: 兄, 77-839株
C: 79-98株

た。

考 察

HSV 感染症は極めて多彩な臨床像を呈するので, 多くの専門領域に患者が分散されてしまう。従って, この感染症の全貌を疫学的に把握することは容易ではない。著者らは小児のウイルス感染症の流行を把握する目的で長い間, 患児からウイルス分離を行ってきた。この過程で分離された HSV-1 について, 疫学的検討を行なったが今回の著者らの成績は小児の HSV 感染症の中でも極めて内科領域に限局されたものになってしまった。眼科, 皮膚科, 泌尿器科における小児の HSV 感染症については, 新たに疫学調査を行なわなくてはならないと考えている。

HSV 感染症は古くから知られていたが, 1920年以前は, 単純疱疹を起こす成人の病気と考えられていたようである⁴⁾。1920~60年代に小児の歯肉口内炎が HSV 感染により起こることが明らかとなり⁵⁾, また種々の HSV 感染が相次いで報告された。この時代の概念でいくと, 人口の70~90%が小児期に HSV の初感染を受け, その90%以上が不顕性感染で耐過し, 発症しても軽症の歯肉口内炎が主で, まれに角膜炎, 脳炎を起こすものとされていた¹⁾。近年の HSV の抗体調査の結果, 初感染の時期が, 幼児, 小児期から成人期にずれていく傾向¹⁾

が認められてきた。著者らの山梨県における調査²⁾でも5～9歳児の23%に抗体を保有しているにすぎない。

著者らの今回のウイルス分離の成績をみると、HSV-1の初感染は従来とあまり変わっていない。すなわち、母体由来の抗体が消失する0歳後半から初感染が認められ1～2歳で初感染を受けるものが最も多く、主たる症状は歯肉口内炎であった。1980～86年の病原微生物検出情報⁶⁾のHSV-1の報告数でみると、口内炎患者からの分離率は26%で、0～1歳児で最も多く分離され、著者らの成績とほぼ一致している。

一方、HSV-1の全分離株の50%が呼吸器疾患からのもので、その内、約半分が咽頭炎患児より分離されたものであった。

HSVが呼吸器疾患からよく分離されることについては、1965年頃より種々の報告がある。今回の著者らの分離率は、咽頭炎で1.9%、呼吸器疾患で1.5%であり、これは川名ら⁷⁾のかぜ症候群からのHSV分離率1.6%、また木村らの報告^{8,9)}から算出した分離率1.4%とほぼ一致している。ウイルス分離に血清学的診断法を併用すると、呼吸器疾患のうちHSV感染とみなされる率はさらに高くなり、武内ら¹⁰⁾は9%、鈴木ら¹¹⁾は5%と報告し、さらにYamazaki¹²⁾はHSV補体要求性中和抗体から急性気道疾患患児の5～7%がHSV感染であったのではないかと推定している。

気道感染症起因ウイルスとHSV-1との重感染例も報告されている。前述の武内ら¹⁰⁾はRSウイルス3例、アデノウイルス2例との、大瀬戸ら¹³⁾はRSウイルス、アデノウイルス5型との重感染例を報告し、著者らの今回の成績の中にも2例の重感染を認めている。また、南谷ら¹⁴⁾は溶連菌感染症の後発感染として歯肉口内炎が認められた2例を報告している。

上述したこれらの報告ではいずれもHSVが呼吸器疾患の発現の主要な役割をなし得たと明確な結論には至っていない。それはHSVが初感染後に三叉神経節に潜伏感染し、熱性疾患などの種々の誘因で、HSVが活性化され、再発性の病変を起こすためである。また、初感染後、無症状の状態、唾液の中にHSVを放出している持続感染者も存在するためである。

著者らの今回の成績でも呼吸器疾患から多くのHSVが分離されたが、この中には潜伏ウイルスが呼吸器疾患で活性化されたもの、また、持続感染しているHSVがかなり含まれているものと考えられる。ただ、0～2歳児から分離されたHSV-1の39%が呼吸器疾患患児からのもので、この年齢層ではこれがすべて再発によるものとは考えにくい。HSV潜伏感染を受けている母親、同胞がかぜ起因ウイルスの感染を受けると、HSVが再活性化され、かぜ起因ウイルスと共に唾液に放出される。こ

れが感染源となり乳幼児が気道感染症を起こすと同時にHSVの初感染も起こす場合もありうると思われる。今回の成績は初診時の臨床診断名によりまとめたもので南谷ら¹⁴⁾が示すように後発感染として歯肉口内炎の発症があったかどうか詳細に検討していない。またHSV抗体も測定しなかったため、呼吸器疾患から分離されたHSVが初感染によるものか、再発によるものか検討することができなかった。

一方、成人のHSV初感染で、歯肉口内炎がわずか10%で、大部分は咽頭炎を発症していたという報告¹⁵⁾、年長時に咽頭炎が歯肉口内炎に合併するという報告¹⁶⁾などがあり、HSVが咽頭炎の起因ウイルスになり得るかどうか興味ある問題である。

この12年間に脳炎などの重篤な感染例からHSVは分離されなかったが、新生児ヘルペス感染症が疑われる例が1例あった。新生児HSV感染症の発病日数は生後0～13日、平均4.4日とされている¹⁷⁾。著者らの例は生誕時に発病し、生後3日目の咽頭ぬぐい液からHSV-1が分離されたもので、症状は歯肉口内炎が主で、局所的感染であった。

最近、HSVの感染の様態を詳細に研究するための新しい手法としてDNAフィンガープリント法が注目されている。この方法はHaywardら¹⁸⁾によってHSVの同型内の変異株の検出に有効な方法として報告されて以来、院内感染の起因HSVの決定¹⁹⁾などの疫学的事例の解析に利用されてきた。Roizmanら²⁰⁾は多数のHSVのDNAを解析し、疫学的無関係の2株は3種類の制限酵素を用いれば必ず判別できると報告している。著者らも3種類の制限酵素を使用して、兄弟がまったく同一のHSV株に感染を受けていたことを明らかにした。日本でSakaokaら²¹⁾もHSV-1の兄弟間の伝播の解析例を報告しており、著者らもこの方法がHSVの感染源や伝染経路の推定に有効な手法であると考えている。現在、著者らは、ここに報告したHSV-1分離株について、DNAフィンガープリント法による解析を試みている。その結果については別の機会に報告したいと考えている。

ま と め

1974～85年の12年間にわたり、山梨県内の病院に受診した患児から単純ヘルペスウイルス(HSV)を分離し、以下の知見を得た。

1. 分離されたHSVは86株で、すべてHSV-1型であった。このうち、36株が歯肉口内炎患児より、42株が呼吸器疾患患児より分離されたものであった。
2. HSV-1の初感染は0歳児後半から見られ、1～2歳児で最も多く認められ、この年齢層の主症状は歯肉

口内炎であった。

3. 歯肉口内炎と診断された患児から HSV-1 が分離される割合(分離率)は39%であり, 呼吸器疾患患児からの分離率は1.5%であった。

4. 兄弟からそれぞれ分離した HSV-1 を DNA フィンガープリント法で解析した結果, 2株はまったく同一のウイルスで, 同一感染源から感染を受けていたことが推定された。

稿を終るにあたり, DNA フィンガープリント法について, ご指導を賜った 元山梨県衛生公害研究所長 吉野亀三郎博士, 国立予防衛生研究所 柳 壹夫博士に感謝いたします。

文 献

- 1) 吉野亀三郎: 医学のあゆみ **111**, 804~808 (1979)
- 2) 渡辺由香里, 三木 康, 小澤 茂, 佐藤 譲, 吉野亀三郎: 山梨衛公研年報 **27**, 4~6 (1983)
- 3) Tada, A. and Yoshino, K. : Microbiol. Immunol. **22**, 415~426 (1978)
- 4) 浦野 隆: 臨床とウイルス **2**, 187~194 (1974)
- 5) Burnet, F.M., Lush, D. and Jackson, A. V. : Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. **17**, 41 (1939)
- 6) 厚生省, 国立予防衛生研究所: 病原微生物検出情報(月報) **8**, 69~88 (1987)
- 7) 川名林治, 佐藤成大: 小児科診療 **41**, 1255~1259 (1978)
- 8) 木村晋亮, 梶 哲夫, 尾西 一, 中村英夫: 石川衛公研年報 **22**, 187~195 (1985)

9) 木村晋亮, 梶 哲夫, 尾西 一, 中村英夫: 石川衛公研年報 **23**, 245~255 (1986)

10) 武内可尚, 原 宏, 浦野 隆: 小児科臨床 **23**, 1205~1210 (1972)

11) 鈴木 仁, 都 通彦, 紺野謙治, 南 一守: 小児科臨床 **22**, 1449~1454 (1969)

12) Yazaki, S. : Japan. J. Microbiol **10**, 239~246 (1966)

13) 大瀬戸光明, 高見俊才, 矢野 朱, 小笠原光憲, 古茂田智恵子, 森 正俊, 山岡邦夫, 曾田研二, 石丸啓郎: 愛媛衛研年報 **40**, 33~36 (1979)

14) 南谷幹夫, 中沢秀夫, 八森 啓, 友利典子: 臨床とウイルス **7**, 143~151 (1979)

15) Glezen, W.P., Fernald, G.W. and Lohr, J. A. : Am. J. Epidemiol. **101**, 111~121 (1975)

16) Moffet, H.L., Siegel, A.C. and Doyle, H.K. : J. Pediatr. **73**, 51 (1968)

17) 川名林治: 臨床とウイルス **12**, 364~368 (1979)

18) Hayward, G. S., Frenkel, N. and Roizman, B. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 1768~1772 (1975)

19) Buchman, T.G., Roizman, B., Adams, G. and Stover, B.H. : J. Inf. Dis. **138**, 488~498 (1978)

20) Roizman, B. and Buchman, T. G. : Hospital Practice **14**, 95~104 (1979)

21) Sakaoka, H., Aomori, T., Ozaki, I., Ishida, S. and Fujinaga, K. : Infect. Immun. **43**, 771~774 (1984)

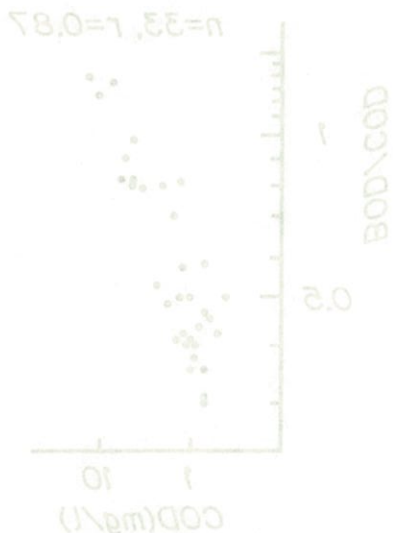


図2 川内川CODとBODの相関(平均値)の関係

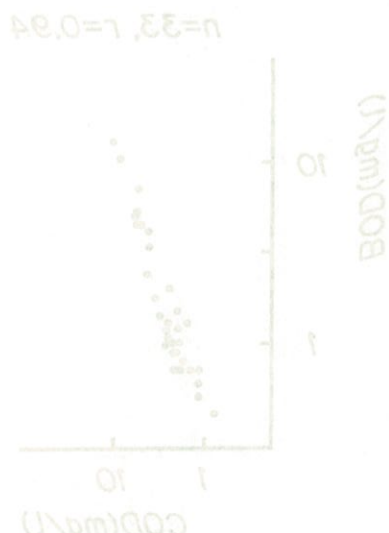


図1 川内川CODとBODの相関(平均値)の関係