

Varicella-Zoster Virus (VZV) の増殖に関する研究

II. 凍結融解に安定な Varicella-Zoster Virus (VZV) 株の分離

川崎医科大学 微生物学教室

別 所 徹 子

(昭和55年5月13日受付)

Studies on the growth of Varicella-Zoster Virus (VZV)

II. Isolation of Varicella-Zoster Virus (VZV) Strain Stable against Freezing-thawing Treatment

Hiroko Bessho

Department of Microbiology, Kawasaki Medical School

(Accepted on May 13, 1980)

無細胞ウイルス浮遊液で安定な **varicella-zoster virus (VZV)** 株を得るために凍結融解処理によって分離実験を行ない、次の結果を得た。

1. **VZV-M** 株の増殖したヒト胎児線維芽細胞を継代に際して凍結融解 (-75°C , 2回) し、これを接種材料とした。この方法で連続8回植継ぎをくりかえし、凍結融解に安定なウイルス株を得た。そのウイルスの最高感染価は $6 \times 10^3 \text{FFU/ml}$ であった。このウイルス (**MF** ウイルス) は典型的な細胞変性、特徴的核内封入体の形態、蛍光抗体法によるテストおよび中和試験によって **VZV** であることが確認された。

2. 凍結融解に対して **MF** ウイルスの感染性を安定化する因子が発見された。この因子はトリプシンに感受性で、感染細胞で産生され、培地中に遊離されるものと思われる。

以上の結果から凍結融解に対して **VZV** が安定であるためには2つの条件、ウイルス自体の安定性 (**MF** ウイルス株) および培地中の因子が必要なことが判明した。

Experiments were carried out to isolate a varicella-zoster virus (VZV) strain stable in a cell-free suspension using freezing-thawing treatment. The results obtained were as follows;

1) Human embryo fibroblasts, in which VZV of M strain was propagated, were frozen-thawed at -75°C twice and used as the inoculum. In this way, successive 8 time-passages were repeated and consequently a virus strain stable against freezing-thawing treatment was obtained. Maximum infectivity of the virus was $6 \times 10^3 \text{FFU/ml}$. This virus strain, termed MF strain, was confirmed as VZV by examinations of its typical cytopathogenicity, characteristic morphology of the intranuclear inclusions and serological tests, such as fluorescent antibody staining and neutralization tests.

2) A factor stabilizing the infectivity of MF virus against freezing-thawing treatment was newly discovered. This factor, sensitive to trypsin, seemed to

be produced in VZV infected cells and released into the culture medium.

These results strongly suggested that two factors, stability of MF virus itself and the factor from the infected cells, were required for maintenance of virus infectivity in the suspension.

はじめに

Varicella-zoster virus (VZV) はヘルペス群に属すウイルスである。この群のウイルスはヒトを宿主とするものから魚を宿主とするものまで、多くの脊椎動物を宿主として40種にのぼる種類が知られている。そのうちヒトを宿主とするものは単純性ヘルペス (herpes simplex virus), ヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalo virus), EBウイルス (Epstein Barr virus) および VZV の4種である。

ヘルペスウイルスは162ケのキャプソメアからなる正20面体のカプシド (100 nm) の中にDNA (二重鎖DNA, $90\sim 100\times 10^6$ ダルトン) を有する。カプシドはエンベロープで被われ、エンベロープを含めた全体の大きさは150~350 nm である。ヘルペスウイルスは他のウイルスと異なり個体に終生潜伏感染し、また中には造腫瘍性を有するものもあることから注目されている。

VZV は臨床的に異なる疾患、すなわち伝染性の強い小児の水痘 (水ぼうそう, varicella) あるいは chickenpox) および成人の帯状疱疹 (herpes zoster) の病原体である。白血病などの基礎疾患のある小児が水痘に罹患すると重症となり、死亡率も高いことから最近特に関心を集めている。

Melnick ら¹⁾ はヘルペスウイルス群を細胞培養における増殖態度によって、遊離の感染性ウイルスが容易に産生されるA群およびウイルスの感染性が感染細胞に強固に結合しているB群の2つの亜群に分けた。VZV はB群に属し、その細胞変性効果 (CPE) の発現は focus 形成として認められる。focus 形成細胞の増加があるにもかかわらず、この時期の培養液中にウイルス力価は認められない。また水痘や帯状疱疹

患者の水疱液からは感染性ウイルス浮遊液が得られるにもかかわらず *in vitro* 実験系では細胞内から感染性を有するウイルスをとり出すことも困難とされている²⁾³⁾。VZV はヒトおよびサルに感染を起こすが、他の実験動物には感染しないので、*in vivo* 実験系からウイルス液を得ることは必ずしも容易でない。VZV はこのような性質を保有するため無細胞ウイルス浮遊液を得ることが難かしく、従ってこのウイルスの一段増殖曲線に基づく詳細な感染増殖の超微形態学的研究はなされていない。一段増殖にもとづく経時的な増殖形態の研究のためには無細胞状態で感染性を保持し、かつ定量的に取扱えるようなウイルス浮遊液を得る方策をたてなければならない。

初期の VZV 研究において Taylor-Robinson⁴⁾ は中和試験用の “cell free virus” として患者水疱液そのものを用いた。しかしながら患者材料をそのまま実験材料とする場合には分離株によってその性状に著しい差があるので一定の結果を期待できない。例えばウイルス増殖の指標に用いる CPE の出現は細胞に接種後1日 (Meurisse)⁵⁾ から21日 (Gold)⁶⁾ まで大きな時間的ずれを示す。また Nii ら⁷⁾ は大きな focus を形成する株と小さい focus しか形成しない増殖性の異なる2株を分離した。高橋⁸⁾ は感染性ウイルスの分離率は発病後の経過日数によって異なることを報告している。

細胞培養系でウイルス液を得た最初の報告は Caunt ら⁹⁾ による。彼らは VZV 感染ヒト甲状腺由来培養細胞から超音波処理により分離に成功した。同様な方法で Brunell¹⁰⁾ はヒト胎児肺由来感染細胞 (HEL) を用いて、Takahashi ら¹¹⁾ はウサギ腎細胞を用いてそれぞれ成功している。しかしウサギ腎細胞には herpes virus の潜伏感染の可能性があり¹²⁾、この細胞を宿主と

して使用するの望ましくないとされる。Takahashi ら¹³⁾ はモルモット 胎児感染細胞から超音波処理法でウイルスを分離し、これから弱毒生ワクチンを試作した。一方、Caunt ら⁹⁾ は感染ヒト羊膜細胞から超音波法では VZV を分離できないことを報告した。同様に著者は VZV 感染 HEL やヒト胎児皮膚筋由来繊維芽細胞の超音波処理法による分離を試みたが成功しなかった。超音波法による分離の可否は用いる装置や材料作成に用いた接種材料の感染価に依存する可能性が強いと報告されている¹⁴⁾。

Hondo ら¹⁵⁾ はウイルス液を得るために凍結乾燥法を用いたが得られた材料のウイルス感染価は低い。

著者はウイルス液を得るための手段として超音波処理や凍結乾燥法に代えて凍結融解処理を試みた。一般に *in vitro* で増殖した VZV の力価は宿主細胞を完全に死滅させるような激しい凍結融解処理には不安定であるといわれているが、^{3), 16)} その原因は明らかにされていない。今回凍結融解に安定なウイルスの分離に成功し、同時にこの分離ウイルスの感染性の保持に有効な培地中の因子を見出したので報告する。

材料と方法

細胞: 長期維持培養法で維持したヒト胎児皮膚筋由来繊維芽細胞 (HEF)¹⁷⁾ を用いた。HEF を 50 ml 角型培養瓶 (以下小角と略す) 使用の場合は 4×10^5 cells/ml を 4 ml, レイトン管使用の場合は 1 ml 分注して、植継ぎ後 2 日目の細胞シートを実験に用いた。

ウイルス: 带状疱疹患者水疱液から HEL にて分離¹⁸⁾、3 代継代後 10% 仔ウシ血清 (CS) 及び 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) を添加した Eagle MEM (MEM) に全感染細胞を浮遊後、凍結保存したものである。なおこの凍結法は一般的なウイルス凍結保存法と異なり、細胞の凍結保存法に準じた方法である。感染に際して 37°C 恒温槽に浸して融解し、160 × 8 10 分遠心の後、その沈渣を 10% CS を加えた MEM に浮遊して、ウイルス接種材料として用

いた。この一連の方法によって増殖して得られたウイルスを便宜上 Mウイルスと呼ぶ。HS-1 株ウイルスは東京大学医科学研究所本藤良博士によって水痘患者より HEL にて分離継代され、同博士より分与いただいたウイルス株である。HS-1 ウイルスの保存並びに感染実験に際しての処理は Mウイルスにおけると同様に行なった。

中和試験法: VZV の血清学的同定法には一般に補体結合反応が用いられるが、患者血清を用いてウイルス同定を行なう場合には単純性疱疹ウイルス (HSV) との共通抗原^{19), 20)} による可能性を避けるために中和反応を用いる方が望ましい。Schmidt ら²¹⁾ は水痘、带状疱疹患者血清の補体結合抗体 (CF) 力価は中和抗体とほぼ一致することを報告した。これにもとづいて中和用抗血清として CF 抗体価 128~512 倍の VZV 患者プール血清を 2% CS-MEM で 20 倍に希釈して用いた。中和反応は 0.5 ml のウイルス液と 0.5 ml の希釈抗血清を混合し、37°C 1 時間反応させた後、レイトン管に培養した単層 HEF に 0.2 ml ずつ接種した。37°C 2 時間吸着させた後、2 回 PBS(+) [Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ を含む Dulbecco and Vogt のリン酸緩衝生理食塩水] で洗浄し、10% CS-MEM を加えて 37°C で培養した。感染 9 日目に出現した focus 数を算定した。

蛍光抗体法: 市販の Fluorescein 標識抗 VZV 血清 (Flow Laboratories, McLean, U. S. A.) を PBS(-) [PBS(+) から Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ を除去] で 10 倍に希釈して用い、次の手順で直接法を実施した。すなわちカバーガラス上の VZV 感染細胞を PBS(+) で 2 回洗浄の後、自然乾燥し、冷アセトンで 10 分間固定後、冷蔵庫に保存した。蛍光染色に際して PBS(-) で 2 回洗浄後、蛍光標識抗体液を試料に滴与して湿箱内に静置し 37°C、45 分間反応させた。次いで PBS(-) で 2 回洗浄して反応を停止し、乾燥後油浸用油にて封入、観察した。

感染細胞のトリプシン処理: PBS(-) に 0.25% トリプシンおよび 0.02% EDTA-3Na を溶解し、トリプシン液として用いた。培養液

を抜きとった感染細胞上にトリプシン液を層積し、1分間静置したのち、トリプシン液を除去した。4分放置して細胞がガラス壁から剝離しはじめたら10% CS-MEM 4 mlを加えピペティングで均一な感染細胞浮遊液を作成した。

VZV 感染力価測定法: VZV ウイルス液を HEF 単層に2時間吸着後、PBS(+)で2回洗浄し、10% CS-MEM を加えて37°Cで培養した。培養5日後に0.5% ニグロシンで15分間染色して focus 数を計測し、これから FFU (focus forming unit)/ml を算定した〔第32回日本細菌学会中国四国支部総会発表 昭和54年〕。接種材料として感染細胞液を用いた場合も1個の感染細胞は1個の focus を形成するので、感染力価の算定はウイルス液と同様に行なった。

結 果

Mウイルス (10^4 FFU/ml) を0.5 ml ずつ小角単層 HEF に接種してシート全面に強い CPE を示した感染細胞(感染後4~6日目)を培地と共にそのまま -75°C フリーザー中で1時間凍結した。次いで37°C 水槽中で激しく振りながら融解した。この凍結融解操作を2回くり返

した感染細胞分画を接種材料として新たな細胞シートに接種した。凍結融解2回行なった接種材料は全細胞がトリパンブルーで染色された。

このような凍結融解処理と増殖培養を8代にわたってくりかえして得たウイルスを便宜上 MF ウイルスと呼ぶ。著者らはすでに *in vitro* 実験系で -20°C 凍結処理によって感染性ウイルスが得られることを報告した(第29回日本細菌学会中国四国支部総会、昭和51年)が、-20°C 1時間では -75°C 1時間に比べ凍結が不完全で、融解後の細胞の剝離が十分でない場合があった。また感染細胞をポリスマンプラッシュで剝離のち凍結融解処理を行なった場合は細胞が凝集し均一な浮遊液になりにくかった。

Mウイルス同様に HS-1 ウイルスについても2代の過程を経て HS-1F ウイルスを得た。

MF ウイルス接種細胞シートには感染3日後から、細胞が円形化する CPE が出現した。この CPE は focus 状に認められ、個々の focus は以後7日にわたり経時的に拡大した。感染3日以後の focus 形成細胞にはギムザ染色によって halo を示す特異な封入体が多数観察された。

Fig. 1 に感染4日後の focus 形成細胞を示

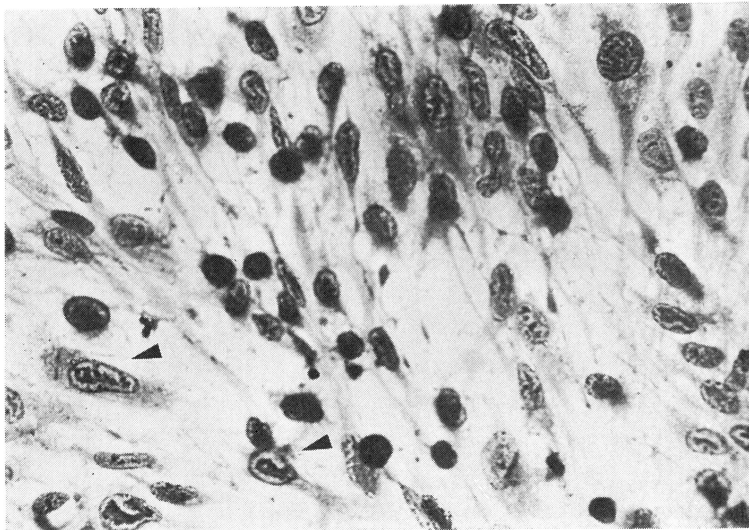


Fig. 1. Human embryo fibroblasts (HEF) infected with MF strain of varicella-zoster virus at 96 hr. (Giemsa staining). Characteristic intranuclear inclusions are seen in many cells (arrows).



Fig. 2. Human embryo fibroblasts infected with MF strain of varicella-zoster virus at 72 hr (Fluorescent antibody staining). The specific fluorescence is visible in many cells forming foci.

す. 中和試験によると対照群からは 60 FFU/ml のウイルスが検出されたが, VZV 患者血清処理群では 9 日間観察しても focus は全く検出されず, ウイルスは完全に中和される結果を得た. また蛍光抗体法によって focus 形成細胞(感染後 3 日)に特異蛍光が観察された (**Fig. 2**).

以上の結果から MF ウイルスは VZV であることが確認された. HS-1F ウイルス接種細胞にもウイルス接種 3 日後に HS-1 ウイルスや MF ウイルスにおいて認められたと類似の focus 状の CPE および 核内封入体が観察された. これらの所見から HS-1F ウイルスも VZV と推察される.

MF ウイルスおよび HS-1F ウイルスが実際に凍結処理に対してそれぞれの親株ウイルスより安定であるか否かを調べるために次の実験を行なった. M と MF ウイルス および HS-1 と HS-1F ウイルスの感染価をそろえて接種し, それによって得られた感染細胞をそれぞれ 2 群に分けた. 1 群はトリプシン処理で細胞を分散し, 他群は凍結融解処理のみを施した. それぞれのウイルス液を新しい細胞シートに接種して出現した focus 数から感染力価を測定した.

結果を **Table 1** に示す. トリプシン処理群の M ウイルスと MF ウイルスの感染価から明らかなように両ウイルス感染細胞数はほぼ等しかったにもかかわらず, 凍結融解した M と MF ウイルスの感染価には有意の差が認められた. すなわち M は 541 FFU/ml を示したのに対

Table 1. Effects of freezing-thawing on the titer of varicella-zoster virus strains

virus strain	treatment	virus titer (FFU/ml)	ratio freezing/trypsinization
M	trypsinization	83250	0.0065
	freezing	541	
MF	trypsinization	94550	0.0649
	freezing	6140	
HS-1	trypsinization	55625	0.0007
	freezing	38	
HS-1F	trypsinization	47875	0.0015
	freezing	72	

し, MF は 1 log 高い 6140 FFU/ml の感染価を示した. 凍結融解処理群の感染価をトリプシン処理群の感染価に対する比で比較すると, MF ウイルスの値は M ウイルスの 10 倍であっ

た. HS-1 および HS-1F ウイルス感染細胞の凍結融解処理群の感染価は M および MF ウイルスのそれに比べて低いが, ここにおいても HS-1 より HS-1F が凍結融解処理に対してやや高い傾向を示した. M と HS-1 をトリプシン処理感染価に対する凍結処理感染価の比で比較すると M が HS-1 より明らかに高い. これらの結果から凍結融解処理に対して次の三点, すなわち (i) MF ウイルスは M ウイルスより安定である. (ii) HS-1 より M ウイルスが安定である. (iii) HS-1F ウイルスより MF ウイルスは安定であることが判明した. HS-1F の凍結融解処理で十分な感染価を得ることができなかったのは凍結融解処理によるウイルス継代を2代しか経ておらず, そのため凍結融解に安定なウイルスの選択分離が十分でないことに起因するものと思われる. 以上のように MF は HS-1F よりも凍結融解に対して安定性が高いので以後の実験には MF ウイルスを使用した.

凍結融解の回数と感染価の間の関係について検討を加えた. 凍結融解の回数を増すと, MF ウイルスでは感染価は漸次低下するが5回の凍結融解後でも感染価は測定可能であった (Table 2). これに反し M ウイルスは3回の凍

Table 2. Effects of freezing-thawing on MF virus titer

frequency of freezing-thawing	virus strain	virus titer (FFU/ml)
2 times	M	80
	MF	790
3 times	M	0
	MF	450
4 times	M	0
	MF	24
5 times	M	0
	MF	6

結融解によってもはや感染価は認められなかった. なお MF ウイルスを1回凍結融解の後 -75°C に2年9カ月間保存しても有意に感染性ウイルスを回収することができた.

凍結融解処理条件を求めるために, 同一系列

の感染細胞培養 (感染後5日) から培地を除去して次の種々の培地を添加した. すなわち, ① VZV 感染細胞培養から感染5日後に採取し 4°C に保存した培地 (VZV conditioned medium とする), ② 未感染細胞を感染細胞と同一条件下で培養した (Mock infection) 培地 (HEF conditioned medium とする), ③ 未使用の新鮮培地, をそれぞれ添加した. 今1つの条件として, ④ トリプシン処理によって培養瓶から感染細胞を剥離し, これを①の VZV conditioned medium に浮遊させた. これら4種の処理を加えた感染細胞を直ちに凍結融解処理 (2回) し, それぞれを新たな細胞に接種して, 生じる focus 数から感染価を測定した. その結果を Table 3 に示す. トリプシン処理

Table 3. Medium effects on the titer of MF strain

treatment	virus titer (FFU/ml)	relative infectivity after freezing-thawing (%)
1. VZV conditioned medium	1258	100
2. HEF conditioned medium	170	13.5
3. 10% CS-MEM	92	7.3
4. VZV conditioned medium after trypsinization	0	0

後, 凍結融解した④群では感染価は全く認められなかった. 最も高い感染価が得られたのは VZV conditioned medium ①を用いた場合で, HEF conditioned medium ②では①の13.5%, 新鮮培地ではさらに低く①の7%であった. トリプシン処理後 VZV conditioned medium で1回洗浄して, VZV conditioned medium に再浮遊した場合にも感染価が消失したので④の効果が残留トリプシンによる影響ではないと考えられる.

VZV conditioned medium 中で MF ウイルスは感染性を保持することがわかったので, VZV conditioned medium ①の遠心上清 (105,000×g, 1時間) について検討した. ①無処理 VZV conditioned medium ①の超遠心

上清, ② HEF conditioned medium の超遠心上清, および ③ 新鮮培地, を HEF 感染細胞に加えたときの感染価を上記の方法で比較したところ, **Table 4** に示す結果を得た. VZV

Table 4. Infectivity of MF strain under various medium conditions

medium	virus titer (FFU/ml)	relative infectivity (%)
original VZV conditioned medium	557	100
supernatant of VZV conditioned medium	432	75
supernatant of HEF conditioned medium	18	3
10% CS-MEM	5	1

conditioned medium 遠心上清では VZV conditioned medium そのものより感染価はやや低下するが HEF conditioned medium ② の遠心上清や新鮮培地 ③ に比べて有意に高い値を示した. これらの結果は感染細胞培養液中に凍結融解処理に対してウイルスを安定化する因子が含まれていることを強く示唆している.

凍結融解した感染細胞浮遊液を $1,400 \times g$ (3,000回転)20分遠心すると感染価はいずれの場合もその沈渣に検出され, 上清には殆んど認められなかった. したがって感染性ウイルスは凍結融解後も低速遠心で容易に沈殿するような大きな細胞成分に付着しているものと考えられる.

考 察

細胞培養系で増殖した VZV は凍結融解に極めて不安定であるため, このウイルスの凍結保存は一般に DMSO を加えて宿主細胞の損傷を抑制した条件下で行なわれている^{31,16)}. 著者は今回, 凍結融解に比較的安定な M ウイルスを用いて, さらに安定なウイルスを分離するため接種材料を凍結融解処理して感染させる方法を 8 代にわたってくりかえし MF ウイルスを得た. M と MF ウイルス感染細胞をそれぞれトリプシン処理で分散させ感染価即ち接種材料中の感染細胞数を測定すると両ウイルスがほぼ同じ値を示すにもかかわらず, これらを凍結融解

処理してウイルス力価を測定した場合には M と MF の間に著るしい差が認められ, 明らかに MF が高い値を示した. さらに M ウイルスが 3 回の凍結融解処理で完全に失活したのに対し MF ウイルスは 5 回の凍結融解でもなお感染性を保持していた. これらの結果から MF ウイルスが凍結融解に対してかなり安定なウイルスであることが示唆された. また 1 回の凍結融解後長期 (2 年 9 カ月) 保存しても感染性が維持されていたことは, この簡単な凍結法が MF ウイルスの保存法としても適用できることを示している.

MF ウイルス感染細胞を破壊することなくトリプシンで分散し, 新たな細胞シートに播くと focus が形成されウイルスの増殖が確認できた. ところがこの分散細胞を接種に先立って凍結融解するともはやウイルス増殖は認められなかった. 従って凍結融解に安定な MF ウイルスであっても凍結融解処理に安定であるためにはトリプシン処理は避けなければならない. トリプシン処理後の凍結融解処理でウイルスが失活する現象について 2 つの可能性が考えられる. 1 つは感染細胞のトリプシン分散時点で感染性ウイルスはすべて失活し, トリプシン処理のみを施した接種材料においては新しい細胞に接種後もとの感染細胞内で成熟したウイルスが感染性を有するようになるという考えである. 他の可能性はトリプシン処理によってウイルス粒子から安定化に働く因子が除去されるがその状態ではなお感染性が保持されている. しかしこの状態のウイルス粒子に凍結融解を施すともはや感染性を維持できなくなるような致命的変化を受けるという考えである.

前者に関しては *in vitro* の VZV の感染性が宿主の生存に依存しているという従来の報告^{21,3)} にあてはまる. VZV 感染細胞表面には既報²²⁾ のごとく多数のウイルス粒子が付着しており, トリプシン処理によって, これらが全て失活してしまう. しかし感染細胞が細胞シートに播かれた時点からその内部で新たに感染性ウイルスが産生され, これによって cell to cell の感染が起こって focus が形成される. 凍結

融解による宿主の破壊でウイルスの成熟ははばまれるので MF ウイルスといえども感染性が消失するものと考えられる。

この可能性の場合には今回見いだされた安定性因子は存在してもしなくても同一結果となる。しかし今回得られた実験成績に基づけば VZV の増殖時に凍結融解処理に際してウイルス感染性の安定化に何らかの機序で働く因子が感染細胞で産生され、その因子は培養液中にも放出されるものと考えられる。得られた実験結果からは後者が主体的に起こるのか、あるいは両方の現象が共に起こっているのか判然としない。今後の検討を要する。

MF ウイルス感染細胞の凍結融解処理によって 6×10^3 FFU/ml のウイルス液が得られた。この値は Caunt ら⁹⁾ により報告された超音波処理による力価 10^6 PFU/ml にはおよばないが、Hondo ら¹⁵⁾ の凍結乾燥法による力価 6×10^2 PFU/ml より高い。Caunt らや Hondo らの方法はいずれも濃縮した感染細胞を出発材料としている。これらの結果やここで得られたウイルス力価は VZV がウイルス浮遊液状態でいかに不安定であるかを示している。今回用いた方法では生細胞は含まれていない。しかし調整したウイルス浮遊液を 3,000 回転 20 分遠心すると VZV の感染性は全て沈渣に認められ、2 回の凍結融解処理では感染性ウイルスを細胞成分から分離できないことが判明した。これまで“cell free virus”として報告されているもののうち VZV ビリオン浮遊液として得られた例はきわめて少ない。Brunell¹⁰⁾ は超音波処理で得たウイルスが 0.45μ のフィルターを通過し得ることを報告している。Grose ら²³⁾ は密度

勾配遠心によって精製したウイルス浮遊液を電子顕微鏡下に検索してエンベロープをもった完全ビリオンおよびエンベロープを欠損した裸粒子を観察しているが、その浮遊液の感染性は 50 PFU/ml と著しく低い。一般的には 2,000 回転 10~20 分の遠心上清が“cell free virus”として取扱われている。感染性を保持した状態で MF ウイルスを細胞成分から遊離させる方法は VZV 増殖の今後の研究、特にこのウイルスの吸着侵入段階の詳細な解析にはさらに高いウイルス力価 $10^5 \sim 10^6$ FFU/ml を有し、かつ細胞成分 free の状態のウイルスを用いることが必要でさらに検討を要する。

Weller ら²⁴⁾ は感染細胞を用いて中和試験を行なったが、感染細胞内のウイルスまで中和することはできないので、彼らの中和反応は完全でなかった。MF ウイルスに関して中和反応を行ない、対照からはウイルスが検出されたにもかかわらず抗 VZV 血清によって完全に中和される結果を得た。このことは MF ウイルスを中和試験の抗原として使用できることを強く示唆している。

この研究に対して御懇切な御指導と本論文の御校閲賜った東昇教授に心から感謝いたします。

御討論、御校閲頂きました松本明助教授にお礼申し上げます。

実験材料を御提供いただきました皮膚科学教室三好薫助教授並びに東京大学医科学研究所本藤良博士に感謝します。高知学園短大小野義三教授からは本研究遂行に御便宜を与えられた。記して謝意を表します。

討論に参加された美禰弘子講師並びに山田作夫助手、実験を行なうにあたり御協力いただきました丸川始子、大森幸代両研究補助員並びに組織培養センター三好昭子技術員に併せてお礼申し上げます。

文 献

- 1) Melnick, J. L., Midulla, M., Wimberly, I., Barrera-Oro, I. and Levy, B. M.: A new member of the herpesvirus group isolated from South American marmosets. *J. Immunol.* 92: 596—601, 1964
- 2) Weller, T. H., Witton, H. M. and Bell, E. J.: The etiologic agents of varicella and herpes

- zoster. Isolation, propagation, and cultural characteristics in vitro. J. exp. Med. 108: 843—868, 1958
- 3) Rapp, F. and Beryesh-Melnick, M.: Plaque assay for measurement of cells infected with zoster virus. Science 141: 433—434, 1963
 - 4) Taylor-Robinson, D.: Chickenpox and herpes zoster. III. Tissue culture studies. Brit. J. exp. Path. 40: 521—532, 1959
 - 5) Meurisse, E. V.: Laboratory studies on the varicella-zoster virus. J. med. Microbiol. 2: 317—325, 1969
 - 6) Gold, E.: Characteristics of herpes zoster and varicella viruses propagated *in vitro*. J. Immunol. 95: 683—691, 1965
 - 7) Nii, S. and Maeda, Y.: Studies of herpes zoster in vitro. I. Isolation of two variants. Biken J. 12: 219—230, 1969
 - 8) 高橋理明: 水痘ウイルスの実験室内取り扱い. 臨床とウイルス 1: 52—61, 1973
 - 9) Caunt, A. E. and Taylor-Robinson, D.: Cell-free varicella-zoster virus in tissue culture. J. Hyg. 62: 413—424, 1964
 - 10) Brunell, P. A.: Separation of infectious Varicella-zoster virus from human embryonic lung fibroblasts. Virology 31: 732—734, 1967
 - 11) Takahashi, M. and Osame, J.: Serial propagation of varicella virus in primary rabbit kidney cells. Biken J. 16: 81—84, 1973
 - 12) Nesburn, A. B.: Isolation and characterization of a herpeslike virus from New Zealand albino rabbit kidney cell cultures: a probable reisolation of virus III of Rivers. J. Virol. 3: 59—69, 1969
 - 13) Takahashi, M., Okuno, Y., Otuka, T., Osame, J., Takamizawa, A., Sasada, T. and Kubo, T.: Development of a live attenuated varicella vaccine. Biken J. 18: 25—33, 1975
 - 14) Taylor-Robinson, D. and Caunt, A. E.: Varicella Virus. Virology Monograph. Berlin, Springer Verlag. P. 15, 1972
 - 15) Hondo, R., Shibuta, H. and Matumoto, M.: Lyophilization of varicella virus. Arch. Virusfor. 40: 397—399, 1973
 - 16) Rasanoff, E. I. and Hegarty, C. P.: Preservation of tissue cultured varicella virus in the frozen state. Virology 22: 284, 1964
 - 17) 別所敏子: Varicella-zoster virus の増殖に関する研究 I. ヒト胎児線維芽細胞培養の長期維持法. 川崎医学会誌 6: 1—12, 1980
 - 18) 別所敏子, 小野義三, 三好 薫: ネガティブ染色を応用した ウイルス性 皮膚疾患の 診断. 皮膚科の臨床 20: 255—260, 1978
 - 19) 吉野亀三郎: ヘルペス. 講談社 p. 25, 1977
 - 20) Harbour, D. A. and Caunt, A. E.: The serological relationship of varicella-zoster virus to other primate herpesviruses. J. gen. Virol. 45: 469—477, 1979
 - 21) Schmidt, N. J., Lennette, E. H. and Magoffin, R. L.: Immunological relationship between herpes simplex and varicella-zoster virus demonstrated by complement-fixation, neutralization and fluorescent antibody tests. J gen. Virol. 4: 321—328, 1969
 - 22) Bessho, H. and Ono, Y.: Scanning electron microscopic observation on the surface of cells infected with varicella-zoster virus. Kawasaki med. J. 3: 243—247, 1977

- 23) Grose, C., Perrotta, D. M., Brunell, P. A. and Smith, G. C.: Cell-free varicella-zoster virus in cultured human melanoma cells. *J. gen. Virol.* 43:15—27, 1979
- 24) Weller, T. H. and Witton, H. M.: The etiologic agents of varicella and herpes zoster. Serologic studies with the viruses are propagated in vitro. *J. exp. Med.* 108:869—890, 1958