

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

III. ニグロシン染色法による VZV の簡単な力価測定法

川崎医科大学 微生物学教室

別 所 徹 子

(昭和55年6月18日受付)

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

III. Simple Titration Method of VZV Infectivity by Means of Nigrosin Staining Technique

Hiroko Bessho

Department of Microbiology, Kawasaki Medical School

(Accepted on June 18, 1980)

Varicella-zoster virus (VZV) の簡単な力価測定法の確立のためにニグロシン染剤を利用した **VZV** フォーカス特異染色法を試み以下の結果を得た。

1. **VZV** の感染によってフォーカス形成が認められた細胞シートを 0.5 % ニグロシン-PBS(+) で 15 分間染色を行なった。フォーカスは特異的に黒色に染まり、感染 5 日後肉眼的に計測可能となった。この染色法によるフォーカス数は光学顕微鏡下で計測したフォーカス数と一致した。

2. 接種に使用する **VZV** 保有細胞を倍数的に希釈して新たな細胞に接種すると接種細胞数とそれによって出現したフォーカス数の間には明らかに比例関係が認められた。

3. 本法により計測されたフォーカス数は少なくとも 9 日間を必要とするブラック法で得られた値とよく一致した。

以上の結果よりニグロシン液によるフォーカス染色法が **VZV** の感染価測定法として簡便で、きわめて有用であることが判明した。

この方法を応用して経時的に感染細胞数の増加を調べた結果について述べた。

To establish a simple method for assay of VZV infectivity, a focus-specific staining technique using nigrosin was examined. The results obtained were as follows;

1) A cell culture in which foci were formed by the infection of VZV was overlaid with 0.5 % nigrosin in PBS(+) for 15 min. The foci were specifically stained in black and readily observed by the naked eye. The number of foci at 5 days after infection agreed well with that counted in the light microscope without staining.

2) When infected cells diluted multicultatively were seeded onto monolayered cell cultures, a linear relation between the number of cells seeded and that of foci formed was clearly observed.

3) The focus number assayed with this technique also agreed with the number of plaques obtained with ordinary plaque titration technique which took at least 9 days.

From these results, it was indicated that this simple nigrosin staining technique was very suitable for the titration of this virus. An application of this method into the time-sequential analysis of infected cell number was described.

はじめに

水痘-帯状疱疹ウイルス (Varicella-zoster virus, VZV) の研究は水痘ウイルスが Weller¹⁾ によって 1953 年培養細胞を使用して分離され、また 1958 年同じく Weller ら²⁾ によって水痘と帯状疱疹が同一のウイルスで起こることが明らかにされて以来活発に行なわれるようになった。

VZV の増殖に関する形態学的研究も数多く報告されている^{3)~9)}。Tournier ら³⁾ は VZV が単純性疱疹ウイルス (herpes simplex virus, HSV) 同様、核内でヌクレオカプシドが形成され、核膜あるいは細胞質内の膜構造からエンベロープを獲得し、成熟粒子になることを報告した。VZV のビリオンは遺伝子 (DNA) を含むヌクレオカプシドをエンベロープが包み、ヌクレオカプシドとエンベロープの間には tegument¹⁰⁾ と呼ばれる無構造物質で満たされた直径 250 nm の形態を有している。このウイルスの増殖における特徴の 1 つは tegument のみを含む粒子が多数形成されることである。

VZV の感染の結果生じる細胞変性効果 (CPE) はある細胞から隣接細胞へとフォーカス状に拡大するが、培養液中にウイルスの感染性は検出できない。この現象に関連して Cook ら⁵⁾ は細胞外に tegument のみを含む多数の粒子を電子顕微鏡的に観察し、これらの異常粒子はウイルス粒子のエンベロープが脆弱なため破れて内部のヌクレオカプシドが放出された残渣であり、培養液中に感染性ウイルスが検出できないのは細胞外でのこのエンベロープの脆弱性に起因すると推論した。

Gershon⁶⁾ は培養細胞内でエンベロープを獲得し成熟したウイルス粒子は細胞外に遊出する以前に宿主細胞のライソゾーム酵素によって不

活化されると報告した。著者ら¹¹⁾ は感染細胞表面に時間的経過に伴ってウイルス粒子が蓄積してくることを電子顕微鏡的に観察し、細胞外へ出たウイルス粒子は宿主細胞との結合性が強く、容易に細胞膜から遊離しないことを推測させる所見を得た。VZV が感染性を有して、どのような形で cell to cell 感染に関与しているかを形態学的に解明するためには一段増殖に基づいた経時的観察が必要である。VZV の一段増殖曲線の作製には解決されなければならない問題点が 2 つある。第 1 には無細胞ウイルスを得ることであり、これについては既に報告した¹²⁾。もう 1 つはこのウイルスの簡単な感染力価測定法の確立である。

培養細胞を用いて測定されるウイルス感染力価測定には TCID₅₀ (50 % tissue culture infectious doses) 定量法とブラック定量法が主として用いられている。前者では同一条件下で培養細胞に希釈材料を接種して、CPE 出現の有無を指標にして感染性を判定し、50 % の確率で CPE を表わす希釈濃度からウイルス力価を算定する。ブラック法は細胞にウイルスを接種後、培養液を含んだ寒天を感染細胞上に重層して固めるため、新たに増殖したウイルス粒子の自由な拡散がさまたげられ、そのためウイルスは最初に感染した細胞を中心に、隣接した細胞に逐次感染増殖して行くので CPE は限局された細胞集団で起こる。この集団をブラックと言い、十分に希釈されたウイルス液の接種によって最初に感染した細胞数に一致した数のブラックが生じる。この数は感染ウイルス数を表わすことになるので接種に用いたウイルス希釈倍数とブラック数からもとのウイルス感染力価が正確に求められる。したがって、ブラック形成が可能なウイルスの感染力価測定にはプラッ

ク法が通常用いられる。VZV のブラック法は 1964 年すでに Rapp ら¹³⁾ によって報告されている。しかし手技が煩雑で結果に再現性が乏しいためかこれによる VZV の定量的記述は少なく、特に形態学的研究ではわずかに Gershon の報告⁶⁾ に使用されたウイルス力価の記載をみるにすぎない。

先に述べたように VZV の増殖では培養液中に感染性ウイルスは遊離されず、感染細胞の CPE はフォーカス状に広がる。このウイルスの感染力価を TCID₅₀ 法により測定するとウイルス限界希釈度近辺での 1 個のフォーカスの有無で値は大きく異なる。顕微鏡下でフォーカス形成の有無を確実に判定することは必ずしも容易でなく、そのため測定誤差も生じやすいので有利な方法とは言えない。もしフォーカスを肉眼で容易に識別できればその計測によって、感染価はブラック法と同程度の精度で簡単に測定できるはずである。Taylor-Robinson の報告¹⁴⁾ によればヒト羊膜細胞に接種した VZV のフォーカスは感染後 15 日でようやく肉眼で算定可能であるという。しかし実際にフォーカスを肉眼で算定することは容易でなく、また判定までに 2 週間以上を要することは実験遂行上有利でない。VZV のフォーカスを肉眼で正確に、かつ短時日で算定するためにフォーカスを特異的に染色できる染色剤を検討し、Kaltenbach ら¹⁵⁾ および Tagaya ら¹⁶⁾ によるニグロシン染色法が VZV のフォーカス特異染色に極めて有効であることが判明した。VZV のフォーカス特異染色法の詳細を報告する。さらにこの方法を応用して *in vitro* 細胞系における VZV の cell to cell 感染速度を測定した結果について報告する。

材 料 と 方 法

細胞: 著者の長期維持培養法¹⁷⁾ によって維持したヒト胎児線維芽細胞 (HEF) を 10 % ウシ胎児血清 (FCS) を加えた Eagle MEM (MEM) で新たに植継いで実験に供した。800 ml ルー培養瓶あるいは 200 ml 培養瓶 (中

角) に培養した細胞シートからトリプシン処理により、ルー瓶からは 35 ml の細胞浮遊液を、中角からは 10 ml の細胞浮遊液をそれぞれ作成し、50 ml 角型培養瓶 (小角) には 4 ml 宛、レイトン管には 1 ml 宛分注して 37°C で密栓静置培養した。2 日後には密な細胞シートが形成され、これをウイルス感染実験に使用した。

ウイルス: 東京大学医科学研究所本藤良博士より分与された HS-1 株ウイルスを使用した。-75°C に細胞の凍結保存法に準じて保存したウイルス感染細胞を 37°C 恒温槽に浸して融解後遠心 (300×g, 10 分) し、その沈渣を 10 % 仔ウシ血清 (CS) を加えた MEM (10 % CS-MEM) に浮遊して細胞シートに感染、その結果新たに増殖したウイルス感染細胞を接種材料として用いた。トリプシン処理して維持培地に均等に浮遊した感染細胞浮遊液を小角当り 0.5 ml, レイトン管当り 0.2 ml 宛接種した。

2 時間吸着後 PBS (+) (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ を含む Dulbecco and Vogt のリン酸緩衝生理食塩水) で 2 回洗浄して維持培地 (10 % CS-MEM) を加えて培養した。

ニグロシン染色法: 乳鉢でよく摩砕したニグロシンを PBS (+) に溶解して 1 % 溶液を作成した。VZV 接種後経時的に採取した小角あるいはレイトン管細胞シートにニグロシン染色液を前者では 4 ml, 後者では 1 ml 宛層積して染色の後、PBS (+) で 1 回洗浄して直ちにフォーカスを肉眼で算定した。染色されたフォーカス数は FFU (focus forming units)/ml で表わした。

無染色フォーカス数の算定: 無染色のフォーカスの測定には、感染細胞シートを 1 mm² の方眼スライドガラスに重ねて、単位面積当りのフォーカス数を倒立顕微鏡下で計測した。無差別に選択した 50 mm², 2 カ所のフォーカス数を実測し、その値を感染細胞シート全体の面積に換算して培養瓶当りのフォーカス数とした。

ブラック法: (i) ブラック用一次重層寒天培地—MEM に 10 % CS, 100 μg/ml DEAE dextran, 0.8 % 寒天, 100 units/ml Penicillin G, 100 μg/ml Streptomycin および 2 μg/

ml Fungizone を加えて用いた。

(ii) ブラック用二次重層寒天培地——CS を 2% にして, 0.02% 中性赤を加えた。その他の組成は一次重層寒天培地と同一であった。

(iii) 実施法——Hondo ら¹⁸⁾ の方法に準じた。小角に培養して細胞シート(植継ぎ後 2 日)に VZV 感染細胞を 0.5 ml 接種し, 37°C 2 時間吸着後 PBS (+) で 2 回洗浄の後, 一次寒天培地を注入し静置する。寒天層が凝固したら, 細胞層を上面にして 37°C の炭酸ガスフラン器で培養した。二次重層寒天培地を重層した翌日ブラック数を算定した。出現したブラック数は PFU (plaque forming units)/ml で表わす。なおこのブラック法で得られたウイルス力価と比較するためのニグロシン染色用細胞も炭酸ガスフラン器内で培養を行なったが, 一回の維持培地の添加のみで, 培地の二次重層は行なわなかった。

VZV 増殖実験: VZV の感染細胞数の測定によってフォーカス形成細胞の推移を調べた。MF ウイルスに関する著者による先の報告¹²⁾に従って MF ウイルス浮遊液を調整し, 小角細胞シートに接種し, 37°C で吸着を行なった。2 時間後, PBS (+) で 2 回洗浄し, 維持培地を添加して 37°C で培養した(これを 1 次接種と呼ぶ)。ウイルス液を接種した時間を 0 時間として, 経時的に培養瓶をとり出して, 細胞をトリプシンで分散して, これを再び新しい細胞に接種して(これを 2 次接種と称す), 培養 5 日目にニグロシン染色を施してそこに出現するフォーカス数を測定することによって, 1 次接種の各時間の感染細胞数を算定した。

使用試薬: DEAE dextran は Pharmacia Fine Chemical (生化学工業), 寒天は Special agar-noble, Difco (Difco Laboratories, Detroit, U. S. A.), 中性赤は Merck (E. Merck, Darmstadt, Germany), nigrosin は半井化学製, Fungizone は GIBCO 社製 (Grand Island Biological Company, New York, U. S. A.), Streptomycin sulfate は武田製薬製, Penicillin G は明治製薬製を用いた。

成 績

(1) ニグロシン染色の条件の検討

VZV の感染によって生じたフォーカスがニグロシン染色法によって特異的に染色されるか否かを単層感染細胞を用いて光学顕微鏡下に観察した。ニグロシン液で染色された感染 5 日のフォーカス 1 個を Fig. 1 に示す。CPE を来し

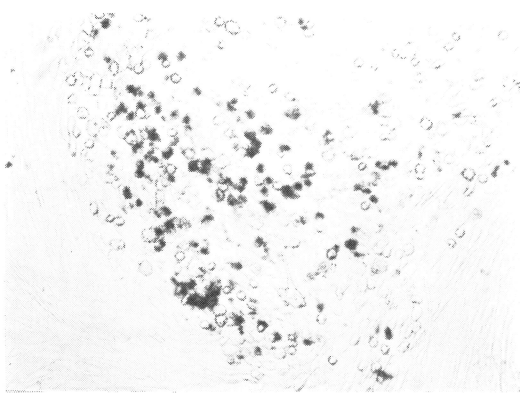


Fig. 1. Optical micrograph of human embryo fibroblasts infected with varicella-zoster virus on 5 days. (Nigrosin staining.)

た細胞は円形化し, ニグロシンで染色された細胞は黒く観察された。トリパンブルーで染色した場合にも円形化フォーカス形成細胞の中に陽性のものが観察された。従ってフォーカスを形成している細胞のうち変性死細胞がニグロシンによって染色される。なおトリパンブルー染色では青く染まり, ニグロシン染色の方が黒色でコントラストが強く, 肉眼での観察には適していた。

ニグロシンの至適濃度と染色時間を検討するために, 感染後 5 日の細胞シートをニグロシン濃度 0.1%, 0.2%, 0.5% および 1% で染色した。各濃度について 5 分, 10 分, 15 分, 30 分, 2 時間後 PBS (+) で 1 回洗浄してフォーカスの染色状態を肉眼で判定した結果, VZV のフォーカスの識別には濃度 0.5%, 染色時間 15 分(室温)で十分なことが判った。なお 0.5% のニグロシン濃度 2 時間染色してもフォーカスを形成していない細胞が染色されること

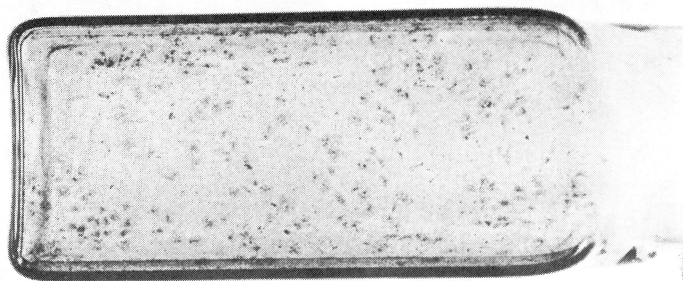


Fig. 2. Nigrosin stained-foci after incubation at 37°C for 5 days.

はなかった。染色液の洗浄は PBS (+) 1 回で十分であったが、PBS (+) に 1 夜放置した後算定してもフォーカス数が減少することはないので、一度染色された細胞が容易に脱色されることはない。従って染色時間を厳守する必要はないが、以後染色条件をニグロシン濃度 0.5%，染色時間 15 分とした。ニグロシンで染色されるフォーカス形成細胞は感染 3 日目から認められるが微小なために肉眼的測定はやや難しい。4 日目以降には個々のフォーカスのサイズが大きくなり、またニグロシン染色でよく染色される。5 日目にはニグロシン染色フォーカスはさらに大きくなり明瞭に計測できた。

Fig. 2 にニグロシン染色した感染 5 日のレイトン管を示す。黒点 1 個が Fig. 1 に示したフォーカス 1 個に相当し、このレイトン管には合計 187 個のフォーカスが計測できる。またニグロシン染色を施した後中性赤で染色すると細胞シートは赤く、フォーカスが黒く染まる二重染色ができた。

(2) ニグロシン染色によるフォーカス数の検討

(i) 接種ウイルス量と出現フォーカス数の関係ならびにフォーカス数の経時的変化: 接種ウイルス量と出現フォーカス数の関係をしらべるために接種に用いる感染細胞液を倍数的に希釈し、出現フォーカス数を測定した。Table 1 にその結果を示す。価はいずれも培養瓶 5 個の価の平均値である。10 倍に希釈された時のフォーカス数はほぼ 1/10 に減少し、

感染細胞希釈倍数とフォーカス数の間には反比例関係が認められた。フォーカス数の経時的変動をみると感染後 3 日より 4 日では増加するが、4 日以降にはほぼ一致した値を示した。ニグロシン染色が死細胞の染色であるところから 3 日では未染色フォーカスや肉眼で識別できない程度の微小なフォーカスがあり、これらが 4 日以降に識別可能な

大きさになるものと思われる。以上の結果より以後フォーカス算定は原則として 5 日目に行なった。

Table 1. Focus number assayed by nigrosin staining technique at various times after infection.

dilution of infected cells	days after infection			
	3	4	5	6
Exp. 1 {	50	201	420	
	500	32	51	40
	5000		5	4
Exp. 2 {	1000	50	52	54
	10000	8	5	4

(ii) 無染色フォーカス数とニグロシン染色法によるフォーカス数の比較: 光学顕微鏡でレイトン管内に形成された一部のフォーカス数を実測して、計算により全体のフォーカス数を求めた後、そのレイトン管にニグロシン染色を施して、染色された全フォーカス数を算定して、両者の値を比較した。結果を Fig. 3 に示す。縦軸に光顕下で一部を測定し、計算で得た全フォーカス数、横軸にニグロシン染色法による値を同一スケールでプロットする。両者の値が完全に一致すれば、各々の値は 45 度実線上に分布するはずである。破線は $\pm 10\%$ の誤差範囲を示したものである。実測値の分布はレイトン管あたり 50 個以下でこの破線領域からややはずれたものもあるがほぼ $\pm 10\%$ の範囲内に分布

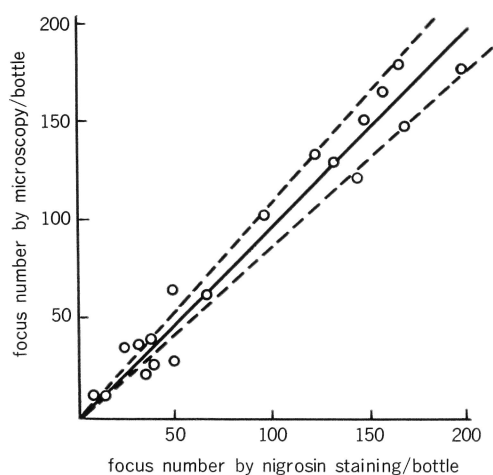


Fig. 3. Comparison between focus number by nigrosin staining and light microscopy

し、よい一致を示している。この結果は $\pm 10\%$ の誤差で顕微鏡下に計測されたフォーカス数とニグロシン染色によって実測されたフォーカス数は一致することを示しているが、無染色の光顕下測定法は計測誤差の入り込む可能性が大有り、培養瓶全体のフォーカス数を測定できるニグロシン染色法がより高い信頼性をもつものと思われる。

(iii) ブラック法とニグロシン染色法の比較: ブラック法とニグロシン染色法による感染価を比較するため同一量の感染細胞浮遊液を接種した小角瓶を2分して、一方はブラック法、他方はニグロシン染色を行なった。それぞれ5瓶の値を実測し、平均値を結果として **Table 2** に示した。ブラック法とニグロシン染色法によって算定された値は実験2ではニグロシン染色法でやや多く算定されたが実験1, 3ではその差は10%以内でよく合致した。しかしニグロシン染色法は感染後5日で、ごく簡単に実施で

きるが、ブラック法では少なくとも9日以降でなければブラック数を算定できなかった。従ってニグロシン染色法はブラック法より簡便かつ迅速に判定できる有利な方法であることがわかった。

(3) VZV の感染速度の観察

VZV の cell to cell 感染速度は VZV 感染細胞数 (材料と方法の増殖実験の項を参照) の経時的推移を調べることによって解析した。MF ウイルス感染細胞を2回凍結融解して接種材料 (100~400 FFU/ml) とした。これを新たに用意した HEF 細胞に接種し、8時間後より経時的に細胞を採取し、これをトリプシン処理で分散後再度新たな HEF 細胞に接種して生じるフォーカス数を測定し、各時間における培養瓶当りの感染細胞数を算定した結果を **Fig. 4**

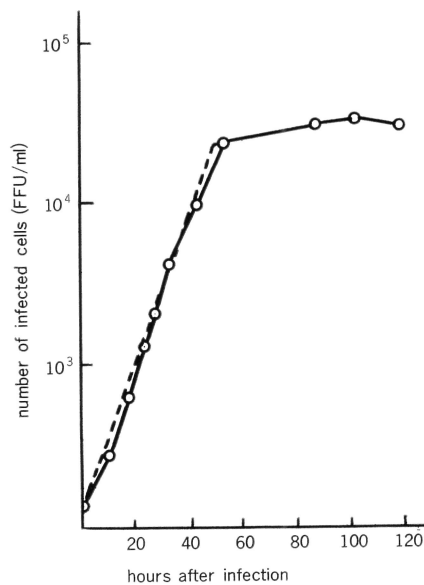


Fig. 4. Time course of infected cell number after infection

Table 2. Comparison between plaque and nigrosin stained-focus number

	number of plaques (PFU/ml)	incubation time	number of foci (FFU/ml)	incubation time
Exp. 1	100	13 days	93	10 days
Exp. 2	119	9 days	147	8 days
Exp. 3	52	10 days	53	7 days

に示した。ほぼ 50 時間までは直線状に増加し、以後プラトーに達した。直線部分は規則正しく対数的増加を示しているの、倍数的増加、すなわち n 時間毎に a 倍に増加するときの t 時間後の増加倍数 M は $M = a^{\frac{t}{n}}$ で表わされる。0 時間と 53 時間後に 151 倍を示した 2 つの実測値を式に代入して 2 倍 ($a=2$) になる時間を求めると $151 = 2^{\frac{53}{n}}$ より $n=7.2$ 即ち 7.2 時間で感染細胞数が 2 倍になるような増加を示していることが判明した。Fig. 4 の破線は 7.2 時間で 2 倍になる倍数増加率の計算値を示しており、実測値と計算値はよく一致している。

感染細胞数は図のごとく 50 時間以後プラトーに達し、その最高感染は 7×10^4 個/ml に達したが、この値は全細胞数の約 25 % にすぎず、残りの 75 % は未感染のままであった。

考 察

VZV の培養液中には感染性遊離ウイルスが検出されず、CPE はフォーカス状に広がるので TCID₅₀ 法による感染力価測定は有利でなく、フォーカスが肉眼で識別できれば、そのフォーカスを測定することによってブラック法と同じ精度で感染力価は測定できるはずである。フォーカス染色法として時にギムザ染色やクリスタル紫による染色も行なわれるが、これらの方法はフォーカスのみを特異的に染色するものでない。著者は今回ニグロシン染色法により VZV の感染によって出現したフォーカスを特異的に染色する方法を検討した。ニグロシン染色法についてはすでに Kaltenbach ら¹⁵⁾ が腹水細胞の生死の鑑別に非常に優れていることを報告した。彼らの研究によれば 50 種以上の染色剤を調べてニグロシンが最もコントラストがよく目的にかなっていたと述べている。Tagaya ら¹⁶⁾ はワクシニアウイルスの L 細胞に対する細胞毒性効果の定量にニグロシン染色法を利用した。Kaltenbach らおよび Tagaya らは細胞浮遊液を染色して、顕微鏡下に死細胞あるいは障害を受けた細胞を判別した。著者は VZV の増殖した単層細胞にこの染色法を実施

して VZV のフォーカス数を肉眼的に算定することができた。この場合染色される細胞はフォーカス形成細胞のうち変性死細胞であった。この染色法は染色時間を厳守する必要はなく、一度染色されると洗浄によって脱色されることもなく非常に簡便な染色法である。さらにニグロシン染色の後中性赤染色を行なうと、生細胞と死細胞の二重染色を行なうことも可能であった。このことはニグロシン染色により CPE を来していない細胞は障害を受けないことを示しており、CPE による死細胞のみを染色する特異性の高い染色法であることが判明した。

感染 5 日のニグロシン染色されたフォーカス数を光顕下に測定した無染色フォーカス数と比較したところ、レイトン管当り 50 個以下では両測定値の間に光顕下での測定誤差と思われる差が認められたが、50 個以上では両測定値はよく一致した。このことは感染 5 日には光顕下に観察されるフォーカスはすべてニグロシン染色により肉眼で算定可能になっていることを示唆する。

Asano ら¹⁹⁾ は VZV 接種後の培養維持液として寒天を重層した場合と液体培地を重層した場合の 7 日および 14 日目のフォーカス数を光顕下に算定し、両者のフォーカス数に差がなかったと報告した。今回の実験でブラック法による感染価とニグロシン染色法によるそれがよく一致したことは VZV の感染性ウイルスは培地中に遊出しないことを示すと同時に、ニグロシン染色法がブラック法に代りうることを示したものである。ブラック法では Rapp ら¹³⁾ および Hondo ら¹⁸⁾ の 9 日、Asano ら¹⁹⁾ の 11 日そして今回の 9 日間と測定までには比較的に長い時間を要する。ニグロシン染色法による 5 日間の短い所要時間とブラック法には望めない極めて簡単な染色法によるフォーカス測定はニグロシン染色法が VZV の力価測定法として優れた方法であることを示すものであろう。さらにブラック法では操作が煩雑なため、小さな器具で定量することは困難であるが、ニグロシン染色法による測定は小角に限らずレイトン管を用いることができ、一度に多数の力価測定が可能で

ある。

VZV の増殖を感染細胞数の推移で調べ、接種量 100~400 FFU/ml の VZV (MF strain) を接種した場合、ほぼ 50 時間まで 7.2 時間で倍加するという対数的増加を示し、以後プラトーに達することがわかった。感染細胞数の増加速度に関して Schmidt²⁰⁾ は 6 時間で感染細胞数が 4.3 倍に増加したことを報告しており、VZV の感染速度に関して一致した知見は得られていない。さらに詳細な検討を要する。

Smith ら²¹⁾ は WI-38 細胞を用いて HSV と human cytomegalovirus (CMV) をそれぞれ 10^3 PFU/ml および 10^2 PFU/ml で感染した場合、子孫ウイルスの放出は HSV で 8 時間、CMV では 4 日を要し、遊離ウイルス量がプラトーに達するまでに HSV で 14 時間、CMV で 5 日かかり、プラトーの感染価はいずれも 10^7 PFU/ml であったと報告した。この結果を今回の VZV に関する実験結果と比較すると、子孫 VZV の出現に要する時間は HSV と大差ないと思われるが、VZV 感染細胞数の倍加速率は 7.2 時間を要し、VZV の感染速度はきわめて遅いことが判明した。子孫ウイルスの産生

には長時間を必要としないにもかかわらず、感染速度が遅いことから VZV の増殖においては感染性ウイルス粒子が培地中に遊離しないばかりでなく、ウイルスの伝播すなわちウイルス粒子の放出とそのウイルス粒子の隣接細胞への吸着は宿主細胞表面のごく限られた領域でおけると推測される。

感染細胞数の最大値 7×10^4 FFU/ml から全細胞に対する割合を計算すると VZV 感染細胞数は全細胞数の僅か 25 % にすぎず、残りの 75 % は未感染細胞であることが判明した。この値は斉藤充司ら (第 27 回日本ウイルス学会抄録, 1979.) が VZV-vero 細胞系について報告した全細胞数に対する感染細胞の割合 28~30 % に極めてよく一致している。この現象は VZV 感染細胞が何らかの感染阻止因子を産生する可能性を示唆している。

謝辞: 稿を終わるにあたり御指導、御鞭撻、御校閲を賜りました東昇教授に謹んで深謝いたします。御助言、御校閲いただきました松本明助教授に感謝いたします。御意見ならびに研究に御協力いただいた教室の諸先生並びに研究補助員の方々に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Weller, T. H.: Serial propagation *in vitro* of agents producing inclusion bodies derived from varicella and herpes zoster. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 83: 340—346, 1953
- 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) Tournier, P. P., Cathala, F. et Bernhard, W.: Ultrastructure, et développement intracellulaire du virus de la varicelle observé au microscope électronique. Presse méd. 65: 1229—1234, 1957
- 4) Becker, P., Melnick, J. L. and Mayor, H. D.: A morphologic comparison between the developmental stages of herpes zoster and human cytomegalovirus. Exp. mol. Pathol. 4: 11—23, 1965
- 5) Cook, M. L. and Stevens, J. G.: Labile coat: reason for noninfectious cell-free varicella-zoster virus in culture. J. Virol. 2: 1458—1964, 1968
- 6) Gershon, A., Cosio, L. and Brunell, P. A.: Observations on the growth of varicella-zoster virus in human diploid cells. J. gen. Virol. 18: 21—31, 1973
- 7) Achong, B. G. and Meurisse, E. V.: Observations on the fine structure and replication of varicella virus in cultivated human amnion cells. J. gen. Virol. 3: 305—308, 1968

- 8) Cook, M. L. and Stevens, J. G.: Replication of varicella-zoster virus in cell culture: an ultrastructural study. *J. ultrastruct. Res.* 32: 334—350, 1970
- 9) Tawara, J. and Ogiwara, H.: Electron microscopic observations of the cells infected with varicella-zoster virus. *Jap. J. Microbiol.* 13: 37—50, 1969
- 10) Roizman, B. and Furlong, D.: The replication of herpes viruses. *In Comprehensive Virology*, ed. by Frankel-Conrat, H. and Wagner, R. R. New York, Plenum Publishing Corporation. pp. 240, 1974
- 11) 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
- 12) 別所敏子: 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 株の分離. *川崎医学会誌* 6: 82—90, 1980
- 13) Rapp, F. and Benyesh-Melnick, M.: Plaque assay for measurement of cells infected with zoster virus. *Science* 141: 433—434, 1963
- 14) Taylor-Robinson, D. and Caunt, A. E.: Varicella Virus. *Virology Monograph*. Wien, Springer Verlag. pp. 29, 1972
- 15) Kaltenbach, J. P., Kaltenbach, M. H. and Lyons, W. B.: Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Exp. Cell Res.* 15: 112—117, 1958
- 16) Tagaya, I., Kitamura, T. and Sano, Y.: Cytotoxic effect of active and inactivated dermovaccinia virus. *Jap. J. med. Sci. Biol.* 16: 277—294, 1963
- 17) 別所敏子: Varicella-zoster virus (VZV) 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) Hondo, R., Shibuta, H. and Matumoto, M.: An improved plaque assay for varicella virus. *Arch. Virol.* 51: 355—359, 1976
- 19) Asano, Y. and Takahashi, M.: Studies on neutralization of varicella-zoster virus and serological follow-up of cases of varicella and zoster. *Biken J.* 21: 15—23, 1978
- 20) Schmidt, N. J. and Lennette, E. H.: Improved yields of cell-free varicella-zoster virus. *Infect. Immun.* 14: 709—715, 1976
- 21) Smith, J. D. and Harven, E.: Herpes simplex virus and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. I. Sequence of viral replication. *J. Virol.* 12: 919—930, 1973