

単純ヘルペスウイルス 1 型潜伏感染 の研究における弱毒株の有用性

岡山大学医学部ウイルス学教室 (指導: 新居志郎教授)

荒 尾 雄 二 郎

(平成 2 年 8 月 22 日受稿)

Key words : herpes simplex virus type 1, latent infection,
reactivation, neurovirulence

緒 言

単純ヘルペスウイルス (HSV) の潜伏感染¹⁾²⁾の機構については, *in vivo* ならびに *in vitro* の実験を通じ, 著しい数の報告がなされているが, 依然として多くの謎に包まれたままである。また, 現在に至っても, 生体でみられる潜伏感染と同様の機構に基づく現象を, *in vitro* で再現することは不可能であり, 従って, 潜伏感染機構の解明には動物実験は不可欠なものとなっている。しかしながら, ヒトから分離直後の HSV は一般に神経毒力が強く, ウイルス接種後動物が感染死する恐れが多分にある。感染の急性期における動物の死亡は, 以後の実験の続行を不可能なものとしてしまう。

他方, 長期間 *in vitro* で継代された研究室株の神経毒力の程度については, 強弱多様なものがある³⁾⁴⁾。従って, *in vitro* でのウイルス定量に基づいて, 実験動物への接種感染価をほぼ一定に揃えても, 強毒株による動物死は避けることができず, このために本来各ウイルス株が有している筈の固有の潜伏能について, ウイルス株間で比較考察することは至難のことである。

本研究では, 上記の問題点を克服するために, 実験動物を死亡させる危険性が少ない弱毒株を用いて, 単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) の潜伏感染を樹立する実験系について検討した。また, 実験動物に接種するウイルスの感染価を一定にして, 弱毒株間の再活性化可能な潜伏感染能の比較を行い, 株間で明らかな差異がある

ことを見いだした。さらに, この株間の差異の原因について検討を加えたので併せて報告する。

材 料 と 方 法

1. 細胞とウイルス

宿主細胞として, Vero 細胞を用いた。Vero 細胞の増殖には, 5% の新生仔牛血清 (NCS) を含む最低必須栄養培地 (MEM) を用い, その維持には, 2% の NCS を含む MEM を用いた。この細胞の増殖と維持は 37℃ で行った。

ウイルスは, HSV-1 の F⁵⁾, SKO-1 B⁶⁾ および深山・-GCr⁷⁾ の各株を用いた。マウスの腹腔内および鼻腔内に接種した場合, F 株はマウスに対して強毒であり, SKO-1 B, 深山・-GCr 両株はともに弱毒である⁸⁾⁹⁾ (F, SKO-1 B および深山・-GCr の各株を ICR マウスに鼻腔内接種した際の LD₅₀ は, それぞれ, 10^{3.3}PFU/マウス, >10^{6.8}PFU/マウス, >10^{8.2}PFU/マウスである⁶⁾)。

ウイルス接種材料は, 先に記述した方法で準備した⁶⁾。

ウイルス接種材料の感染価測定は, 抗体含有維持培地を用いたブラック法によって行った¹⁰⁾。

2. マウスへのウイルス接種, 接種マウスの生存率の測定および潜伏ウイルスの *in vitro* 再活性化の検出

実験動物には, 雄, 5 週齢の非近交系 ICR マウス (チャールズリバー社から購入) を使用した。マウス鼻腔内へのウイルス接種とウイルス接種マウスの生存率測定は, 以前に記述した方

法で行った⁹⁾。

潜伏ウイルスの *in vitro* 再活性化の検出には、以前に記述された方法⁸⁾に従い、ウイルスを接種したマウスの両側の三叉神経節 (TG) を単層培養 Vero 細胞と共生培養することによって行った。共生培養に使用した単層培養 Vero 細胞に細胞変性効果が認められた TG を陽性の TG とした。潜伏ウイルスの *in vitro* 再活性化の有無について検討した全 TG 数に対する陽性 TG 数の割合 (再活性化ウイルスの検出率) によって各 HSV-1 株の再活性化可能な潜伏感染能を評価した。

潜伏ウイルスの再活性化の人為的な促進には、上述の共生培養を行う際に、共生培養開始直後から 5 日間だけ、維持培地中に 2 mM のノルマル酪酸ナトリウム (シグマ社から購入) を添加することによって行った。

3. Acyclovir に対する感受性試験

Acyclovir (ACV) (シグマ社から購入) に対する感受性試験でのウイルス感染価測定は、2 %メチルセルロース含有維持培地を用いたブラック法によって行った¹¹⁾。同一感染価を接種して、ACV 非存在下、1 μ M の ACV 存在下および 20 μ M の ACV 存在下で形成されたブラック数を測定し、ACV 非存在下で形成されたブラック数に対する各濃度の ACV 存在下で形成されたブラック数の百分率によって、各 HSV-1 株の ACV に対する感受性を評価した。

結 果

1. 潜伏感染 TG 作製における強毒株と弱毒株の比較

最初に、強毒 F 株を接種されたマウスの生存率と、生存したマウスの TG からの再活性化ウイルス検出率について検討した。ウイルス接種後 4 週間以上生存したマウスの割合は、接種ウイルスの感染価を増加させるにつれて減少し、 $10^{4.5}$ PFU/マウス以上の感染価のウイルスを接種した場合、19%以下に低下した (表 1 A)。一方、少なくとも 10%以上の TG にウイルスの潜伏感染を生じさせるには、 $10^{4.5}$ PFU/マウス以上の感染価のウイルスを接種する必要があった (表 1 B)。従って、例えば、通常の共生培養で再活性

化が可能な HSV-1 潜伏感染が成立した TG を 10個作製しようと企画すれば、最も効率が良い $10^{5.5}$ PFU/マウスの感染価のウイルス接種条件下でも、27匹以上のマウスが必要ということになる。

次に、弱毒 SKO-1 B 株を接種されたマウスを用いて同様の検討を行った。SKO-1 B 株を接種したマウスの生存率は $10^{2.5}$ 、 $10^{3.5}$ 、 $10^{4.5}$ 、 $10^{5.5}$ 、 $10^{6.5}$ PFU/マウスのいずれの感染価のウイルスを接種した場合でも、84%以上と高率であった (表 2 A)。再活性化ウイルスの検出率は、接種するウイルス感染価を増加させるにつれて上昇し、 $10^{6.5}$ PFU/マウスの感染価のウイルス接種時には、56%に達した (表 2 B)。従って、通常の共生培養で再活性化可能な潜伏ウイルスを含む TG を 10個作製するためには、 $10^{6.5}$ PFU/マウスの感染価のウイルス接種条件下で、11匹のマウスを使用すればよい計算になる。

以上の結果より、弱毒株を用いれば潜伏ウイルスを宿す TG を効率良く作製できることが判明した。

2. 弱毒株間で認められた再活性化ウイルス検出率の差異

潜伏感染の研究を行うためには、再活性化ウ

表 1 F株を接種されたマウスの生存率と生存したマウスの TG からの再活性化ウイルス検出率

A: F株を接種されたマウスの生存率

接種ウイルス感染価 (PFU/マウス)	生存マウス数 /全マウス数	マウスの 生存率 (%) a)
$10^{2.5}$	10/10	100
$10^{3.5}$	10/15	67
$10^{4.5}$	2/15	13
$10^{5.5}$	3/16	19
$10^{6.5}$	0/10	0

B: F株接種後 4 週間以上生存したマウスの TG からの再活性化ウイルス検出率。

接種ウイルス感染価 (PFU/マウス)	ウイルス再活性化 の認められた TG 数/全 TG 数	再活性化 ウイルスの 検出率 (%) b)
$10^{2.5}$	0/10	0
$10^{3.5}$	1/20	5
$10^{4.5}$	1/4	25
$10^{5.5}$	6/6	100
$10^{6.5}$	—	—

a) : [(生存マウス数)/(全マウス数)] $\times$ 100.

b) : [(ウイルス再活性化の認められた TG 数)/(全 TG 数)] $\times$ 100.

表2 SKO-1B 株を接種されたマウスの生存率と生存したマウスの TG からの再活性化ウイルス検出率

A: SKO-1B 株を接種されたマウスの生存率.

接種ウイルス感染価 (PFU/マウス)	生存マウス数 /全マウス数	マウスの 生存率 (%) ^{a)}
10 ^{2.5}	10/10	100
10 ^{3.5}	10/10	100
10 ^{4.5}	17/20	85
10 ^{5.5}	13/15	87
10 ^{6.5}	21/25	84

B: SKO-1B 株接種後 4 週間以上生存したマウスの TG からの再活性化ウイルス検出率.

接種ウイルス感染価 (PFU/マウス)	ウイルス再活性化 の認められた TG 数/全 TG 数	再活性化 ウイルスの 検出率 (%) ^{b)}
10 ^{2.5}	0 / 19	0
10 ^{3.5}	1 / 19	5
10 ^{4.5}	7 / 30	23
10 ^{5.5}	3 / 10	30
10 ^{6.5}	18/32	56

a) : [(生存マウス数) / (全マウス数)] × 100.

b) : [(ウイルス再活性化の認められた TG 数) / (全 TG 数)] × 100.

ウイルスの検出率に差のある複数の株を選抜し、それらの株間で相違の認められる諸性状について検討することが必要である. そこで, SKO-1 B 株とは別の弱毒株である深山・-GCr 株について、再活性化ウイルスの検出率を測定した. 深山・-GCr 株を接種したマウスの生存率は、10^{4.5}, 10^{5.5}, 10^{6.5}, 10^{7.5} PFU/マウスのいずれの感染価のウイルスを接種した場合でも、85%以上と高率であり(表3 A), 再活性化可能な潜伏感染能を調べるのに必要な TG, すなわち、急性感染期を過ぎても生き残ったマウスの TG を容易に得ることができた. また, SKO-1 B, 深山・-GCr 両株は共にマウスに対する致死率が低いために、同じウイルス感染価を接種した場合の再活性化ウイルス検出率は、接種するウイルス感染価の多少にかかわらず、0 から 9%と低率であり、変化が少なかった(表3 B). また、10^{6.5} PFU/マウスのウイルスを接種した場合に、SKO-1 B 株の再活性化ウイルス検出率は56%と比較的高率であったのに対して、深山・-GCr 株のそれは9%と低率であり、両弱毒株の再活性化ウイルス検出率は有意に異なっていた.

表3 深山・-GCr 株を接種されたマウスの生存率と生存したマウスの TG からの再活性化ウイルス検出率

A: 深山・-GCr 株を接種されたマウスの生存率.

接種ウイルス感染価 (PFU/マウス)	生存マウス数 /全マウス数	マウスの 生存率 (%) ^{a)}
10 ^{4.5}	20/20	100
10 ^{5.5}	9/10	90
10 ^{6.5}	17/20	85
10 ^{7.5}	9/10	90

B: 深山・-GCr 株接種後 4 週間以上生存したマウスの TG からの再活性化ウイルス検出率.

接種ウイルス感染価 (PFU/マウス)	ウイルス再活性化 の認められた TG 数/全 TG 数	再活性化 ウイルスの 検出率 (%) ^{b)}
10 ^{4.5}	0/34	0
10 ^{5.5}	1/16	6
10 ^{6.5}	3/32	9
10 ^{7.5}	1/18	6

a) : [(生存マウス数) / (全マウス数)] × 100.

b) : [(ウイルス再活性化の認められた TG 数) / (全 TG 数)] × 100.

表4 抗ウイルス剤に対する各ウイルス株の感受性

株名	抗ウイルス剤に対する感受性 ^{a)}	
	ACV (1 μM)	ACV (20 μM)
SKO-1B	81	0.24
深山・-GCr	89	0.21
F	74	0.20

a) : [(抗ウイルス剤存在下での 1 ml 当りのウイルス感染価) / (抗ウイルス剤非存在下での 1 ml 当りのウイルス感染価)] × 100.

弱毒株の抗ウイルス剤に対する感受性

HSV-1 の再活性化可能な潜伏感染能が低下する原因として、HSV-1 の持つリボヌクレオチド還元酵素やチミジンリン酸化酵素の活性の欠損が報告されている¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾. これらの酵素の活性が欠損した突然変異株は、ACV に対する感受性が変化していることが報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾. そこで、両弱毒株について、ACV に対する感受性を調べ、両酵素活性の変化の有無について検討した(表4). リボヌクレオチド還元酵素活性の欠損した突然変異株は 1 μM の ACV に対して超感受性であり¹⁵⁾, またチミジンリン酸化酵素活性の欠損した突然変異株は 20 μM の ACV に対して

表5 潜伏感染状態にある深山・-GCr株の再活性化に対するノルマル酪酸ナトリウムの作用

実験	ノルマル酪酸 ナトリウム による処理	ウイルス再活性化 の認められた TG数/全TG数	再活性化 ウイルスの 検出率(%) ^{a)}
1	—	1/16	6
	+	7/16	44
2	—	2/16	13
	+	9/16	56

a) : [(ウイルス再活性化の認められたTG数)/(全TG数)]×100.

抵抗性と報告されている¹⁶⁾. 両弱毒株は標準とした強毒F株と比較して, ACVに対して同等な感受性を示し, 超感受性でも抵抗性でもなかった. 従って, 両弱毒株の両酵素活性は欠損していないと判定された.

4. 潜伏感染状態にある深山・-GCr株の再活性化に対するノルマル酪酸ナトリウムの作用

HSV-1の再活性化可能な潜伏感染能が低下する原因として, 上記の酵素活性の欠損以外に, HSV-1の前初期遺伝子群, すなわち, 感染の最も早い時期に発現される遺伝子群の機能低下が報告されている¹⁸⁾. この前初期遺伝子群の発現を高め, HSV-1感染に対して非許容性である神経芽腫細胞におけるHSV-1の増殖を増大させる薬剤としてノルマル酪酸ナトリウムが知られている¹⁹⁾²⁰⁾. また, この薬剤による処理がTGからの潜伏ウイルスの再活性化を増大させることも報告されている²¹⁾. そこで, $10^{6.5}$ PFU/マウスの深山・-GCr株を接種したマウスのTGからのウイルス再活性化に対するノルマル酪酸ナトリウムの効果を調べた(表5).

再活性化した深山・-GCr株の検出率は, ノルマル酪酸ナトリウム処理を行うことによって, 約10%から約50%へと増加した. この値は同一感染価のSKO-1B株を接種したマウスのTGからの通常の再活性化ウイルス検出率(56%)(表2)と同等な値であった.

考 察

通常の(再活性化誘導のための薬剤処理を行わない)共生培養で再活性化が可能なHSV-1潜伏感染が成立したTGの作製効率は, 強毒F株より弱毒SKO-1B株の方が2.5倍高かった.

また, 本研究で検討した接種ウイルス感染価の範囲内では弱毒株を接種したマウスの死亡率が常に低率であったので, 接種するウイルス感染価を一定にして弱毒株間の再活性化可能な潜伏感染能を比較することは容易であった. 以上の結果より, 適度に弱毒化したHSV-1株の利用は潜伏感染の研究に大いに役立つものと思われる.

SKO-1B, 深山・-GCr両弱毒株の間に再活性化可能な潜伏感染能について有為な差が認められた. 両株はACVに対して超感受性でも抵抗性でもなかった. 従って, 両株間に認められた再活性化可能な潜伏感染能の差は, 両株のいずれかにリボヌクレオチド還元酵素やチミジン燐酸化酵素の活性の欠損が生じたことによるのではない¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾.

深山・-GCr株の再活性化ウイルス検出率は, ノルマル酪酸ナトリウム処理によってSKO-1B株と同等な高いレベルにまで上昇せしめることができた. ノルマル酪酸ナトリウムは, HSV-1前初期遺伝子の発現を高めることによって, 神経芽腫細胞におけるHSV-1の増殖を助けることが報告されている¹⁹⁾. 従って, 深山・-GCr株の再活性化ウイルス検出率がSKO-1B株のそれよりも低いことの原因の一端は, この株の前初期遺伝子が, HSV-1が潜伏感染するといわれている神経細胞で, 十分に発現していないことによるのかもしれない.

結 論

単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)の潜伏感染の研究に対する弱毒株の有用性について検討した結果, 以下の事柄が明らかになった.

1. 弱毒株(SKO-1B)を使用することによって, 強毒株(F)の場合よりも効率的に, また大量のマウスを犠牲とすることなく, 潜伏感染した三叉神経節を用意することができた.

2. 2種の弱毒株(SKO-1B, 深山・-GCr)を使用し, ブラック法による定量によって同一感染価のウイルスをそれぞれマウスに接種した後, 再活性化可能な潜伏感染(reactivatable latency; RL)の比率を相互に比較したところ, 両株のRL値に有意の差のあることが認められ

た。この RL 値の差について検討した結果、以下の事が示された。

1) 両株は、acyclovir に対して超感受性でも抵抗性でもなかった。従って、両株の RL の差は、リボヌクレオチド還元酵素やチミジン磷酸化酵素の欠損のためではないと判定された。

2) 共生培養時に三叉神経節をノルマル酪酸ナトリウムで処理することによって、RL のより

低い株（深山・-GCr）の再活性化ウイルス検出率を、RL のより高い株（SKO-1 B）の再活性化ウイルス検出率と同様なレベルまで引き上げることができた。従って、神経細胞における両株の前初期遺伝子の発現量の差が、両株の RL の差を生じさせる原因の一つであることが示唆された。

文 献

- 1) Mims CA and White DO : Persistent infection ; in *Viral Pathogenesis and Immunology*, Mims and White eds, Blackwell, Oxford (1984) pp 200—253.
- 2) Roizman B and Sears AE : An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Ann Rev Microbiol* (1987) **41**, 543—571.
- 3) Richards JT, Kern ER, Overall JC Jr and Glasgow LA : Differences in neurovirulence among isolates of herpes simplex virus types 1 and 2 in mice using four routes of infection. *J Infect Dis* (1981) **144**, 464—471.
- 4) Dix RD, Mckendall RR and Baringer JR : Comparative neurovirulence of herpes simplex virus type 1 strains after peripheral or intracerebral inoculation of BALB/c mice. *Infect Immun* (1983) **40**, 103—112.
- 5) Ejercito PM, Kieff ED and Roizman B : Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviour of infected cells. *J Gen Virol* (1968) **2**, 357—364.
- 6) 波多野篤 : 単純ヘルペスウイルス 1 型の鼻腔内接種によるマウスに対する病原性. *日耳鼻会報* (1989) **92**, 579—587.
- 7) Nii S and Kamahora J : Studies on the growth of a newly isolated herpes simplex virus *in vitro*. *Biken J* (1961) **4**, 75—96.
- 8) Yamada M, Arao Y, Hatano A, Uno F and Nii S : Effect of recombinant mouse interferon- β on acute and latent herpes simplex infection in mice. *Arch Virol* (1988) **99**, 101—109.
- 9) Yamada M, Uno F and Nii S : *In vitro* cytopathology and pathogenicity to inbred mice shown by five variants of a laboratory strain of type 1 herpes simplex virus. *Arch Virol* (1986) **90**, 183—196.
- 10) Nii S : Plaque formation by three variants of the Miyama strain of herpes simplex virus. *Biken J* (1969) **12**, 251—255.
- 11) Schaffer PA, Tevethia MJ and Benyesh-Melnick M : Recombination between temperature-sensitive mutants of herpes simplex virus type 1. *Virology* (1974) **58**, 219—228.
- 12) Jacobson JG, Leib DA, Goldstein DJ, Bogard CL, Schaffer PA, Weller SK and Coen DM : A herpes simplex virus ribonucleotide reductase deletion mutant is defective for productive acute and reactivatable latent infections of mice and for replication in mouse cells. *Virology* (1989) **173**, 276—283.
- 13) Tenser RB, Hay KA and Edris WA : Latency-associated transcript but not reactivatable virus is present in sensory ganglion neurons after inoculation of thymidine kinase-negative mutants of herpes simplex virus type 1. *J Virol* (1989) **63**, 2861—2865.
- 14) Leist TP, Sandri-Goldin RM and Stevens JG : Latent infections in spinal ganglia with thymidine

- kinase-deficient herpes simplex virus. J Virol (1989) **63**, 4976—4978.
- 15) Coen DM, Goldstein DJ and Weller SK : Herpes simplex virus ribonucleotide reductase mutants are hypersensitive to acyclovir. Antimicrob Agents Chemother (1989) **33**, 1395—1399.
 - 16) Coen DM and Schaffer PA : Two distinct loci confer resistance to acycloguanosine in herpes simplex virus type 1. Proc Natl Acad Sci USA (1980) **77**, 2265—2269.
 - 17) Schnipper LE and Crumpacker CS : Resistance of herpes simplex virus to acycloguanosine : Role of viral thymidine kinase and DNA polymerase loci. Proc Natl Acad Sci USA (1980) **77**, 2270—2273.
 - 18) Leib DA, Coen DM, Bogard CL, Hicks KA, Yager DR, Knipe DM, Tyler KL and Schaffer PA : Immediate-early regulatory gene mutants define different stages in the establishment and reactivation of herpes simplex virus latency. J Virol (1989) **63**, 759—768.
 - 19) Ash RJ : Butyrate-induced reversal of herpes simplex virus restriction in neuroblastoma cells. Virology (1986) **155**, 584—592.
 - 20) Kemp LM and Latchman DS : Regulated transcription of herpes simplex virus immediate-early genes in neuroblastoma cells. Virology (1989) **171**, 607—610.
 - 21) 檜野正俊, 関沢 剛 : n-butyrate による herpes simplex virus の *in vitro* 再活動化の亢進. 医学のあゆみ (1986) **136**, 617—618.

Usefulness of avirulent strains in investigation of latent infection of herpes simplex virus type 1

Yujiro ARAO

Department of Virology,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan
(Director : Prof. S. Nii)

The usefulness of avirulent strains of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) in investigations of latency was examined. Trigeminal ganglia (TG) latently infected with HSV-1 were obtained more efficiently from mice inoculated with an avirulent strain, SKO-1B, than from those inoculated with a virulent strain, F. Moreover, utilization of two avirulent strains, SKO-1B and -GCr Miyama, allowed us to compare the rate of reactivatable latency (RL) in these strains. Cultivation of explants of TG recovered from mice inoculated with the same dose of either infectious virus revealed a significant difference in the rate of RL between the two strains. Both strains were revealed to be neither hypersensitive nor resistant to acyclovir, indicating that the difference in the rate of RL between the two strains was not due to any deficient activity of viral ribonucleotide reductase and/or thymidine kinase. The recovery rate of the -GCr virus from explants of TG latently infected with this virus was greatly enhanced by treatment of the explants with sodium n-butyrate during *in vitro* cultivation. As such, at least one of the mechanisms responsible for causing a very low rate of RL in TG infected with -GCr Miyama may be reduced expression of immediate-early genes of this virus in latently infected cells *in vitro*.