

感染症サーベイランスにおけるウイルス分離(2001年度)

平野 学・石飛 栄二・原 健志・野口 英太郎・平山 文俊

Virus Isolation on Surveillance of Infection Disease (2001)

Manabu HIRANO, Eiji ISHITOBI, Kenshi HARA, Hidetaro NOGUCHI
and Fumitoshi HIRAYAMA

key word : Surveillance, Virus isolation and identification

キーワード: サーベイランス、ウイルス分離及び同定

はじめに

感染症サーベイランスの目的は、医療機関の協力を得て、細菌及びウイルス等による感染症の患者発生状況、病原体検索結果等の流行実態を早期且つ的確に把握することにより、必要な情報を速やかに各地域に還元するとともに、予防接種、衛生教育等の適切な予防処置を講ずることにある。

小児におけるウイルス感染症は主にエンテロウイルスに起因するものが多く、毎年夏季を中心に幾つかのウイルスが同時に流行する。しかもその流行となるウイルスは年毎に異なる型が出現して様々な流行を引き起こし、その規模や消長はウイルスあるいは宿主側の要因に左右される。

1984年度より小児を中心としたウイルス感染症の実態究明を目的として、エンテロウイルスを中心とした原因ウイルスの検索を実施してきたが、感染症発生動向調査事業の一環として今年度も引き続き調査を実施したのでその概要を報告する。

調査方法

1. 感染症発生動向調査事業定点及び検査材料

長崎県における感染症発生動向調査事業定点は、長崎市、佐世保市、西彼、県南、県央、県北及び離島地区の7地区に分けられ、これら7地区に設置された患者定点医療機関から患者発生状況を収集し、同7地区の検査定点及び基幹定点の医療機関で採取された検体(咽頭ぬぐい液、髄液、糞便及び眼ぬぐい液他等)について病原体検索を当所で実施している。

今年度は、長崎市1定点、県南地区4定点、県央地区4定点、佐世保市3定点の各検査定点、患者定点及び基幹定点の医療機関で採取され、検査依頼のあった患者367

名分の延べ423検体についてウイルス検索を実施した。

2. ウイルス分離法

ウイルス分離は、RD-18S、HEp-2、Vero、MDC K、及びCaCO₂の5種類の細胞を用い、マイクロプレート法¹⁾により実施した。細胞の増殖及び維持のための基礎培地としては、RD-18SはDulbecco製のEagles' MEMを用い、HEp-2、Vero、MDCK及びCaCO₂についてはGIBUCO製Eagles' MEMを用いた。

それぞれに適量の牛胎児血清または牛血清アルブミン、ペニシリン、ストレプトマイシン及びファンギゾン等を添加して使用した。

分離用細胞シートは、前記4種(MDCKを除く)の細胞を増殖培地に浮遊させて24wellマイクロプレート横2列に1mlずつ分注し、37°C CO₂培養器で3日間静置培養し準備した。

検査材料は常法²⁾により前処理後、次の①~③の操作を行った。

- ①前記細胞シートの増殖培養液を捨てPBS(-)で洗浄後、前処理された検査材料の上清を横2列それぞれの各ウエルに100 μ lずつ接種した。
- ②細胞への接着効果を高めるために接種後、37°CのCO₂培養器に1時間静置。
- ③各ウエルに維持培養液900 μ lを加え、7~10日間培養した。

細胞変性効果(以下、「CPE」と略す)の観察は、顕微鏡下で毎日あるいは隔日に行い、CPEが認められたものはHarvest(滅菌スポイトで培養液と一緒に全細胞を吸い上げ)を行い、中和試験等に使用するため凍結保存した。

CPEが認められなかった検体についても、培養7日後に凍結融解を数回繰り返して、さらに2代目へ旨継代を実施した。

インフルエンザウイルス分離を目的としたMDCK³⁾⁴⁾⁵⁾については、検査材料は常法²⁾により前処理後、①の操作を行い、30分間室温に静置後、5%維持培養液(培養液 25mlに対し 1mg/mlトリプシン 0.1ml、10%アルブミン 0.25ml添加)900 μ lを加え、7~ 10日間培養した。Harvest後に、HA試験を実施し、HA活性があれば引き続きHI試験を行ってウイルス同定を実施した。CPEが認められなかった検体については、さらに2代目へ盲継代を実施してウイルス分離を試み、総ての検体についてウイルスの有無を確認するためにHA試験を行った。

3. 分離ウイルスの同定

分離されたエンテロウイルス、アデノウイルス等の同定は、トランスファープレートを使用し標準株を抗原として作られた型特異抗血清を用いた中和反応により同定を行なった。

- ① あらかじめ使用する細胞でウイルス感染価を測定する。
 - ② 100TCID₅₀のウイルス力価に調整した分離ウイルス液の25 μ lと20(アデノウイルスの場合は5単位)または50単位の抗血清を25 μ lずつトランスファープレートに、等量混合する。
 - ③ 37°C CO₂培養器で2時間静置し、中和する。
 - ④ 準備しておいた96wellの細胞シートに接種する。
- 攻撃ウイルス対照をおいてCPEの現れ方を比較しながら、7日間観察する。MDCKで分離されたHA活性が認めら

れたウイルス分離株については、HA及びHI試験を実施してインフルエンザウイルスの同定を行った。

また、感染性胃腸炎(乳児嘔吐下痢症を含む)患者由来便における小型球形ウイルス(以下、SRSV)の検出については、RT-PCR法を用いて実施した。

調査結果及び考察

1. 月別サーベイランス患者数

表1に4類定点把握対象疾病におけるウイルス検査対象疾病別による月別検査患者数を示す。検査のために検体が搬入された患者総数は計367名であった。疾病別検査患者数が最も多かった疾病は、インフルエンザ様疾患の118名で、全検査患者数の約1/3を占め、そのほとんどが12月~ 翌年3月の冬季に採取搬入されたが、特に3月に入ってから検体数が増加した。昨シーズンと同様、今シーズンも流行規模が過去に比べ小さく、それほど大きな流行とはならなかった。次に患者数の多かったのが無菌性髄膜炎(以下、「髄膜炎」と略す)の68名で、昨年の43名よりも増加してはいるが、1998年のエコーウイルス30型(以下E-30)の流行時と比べると約1/3と少なく、その年以降の検査患者数はほぼ横這い状態が続いている。発生状況については、例年春先から夏場にかけて多いが、今年度は年間を通じて検体の搬入があった。

3番目に患者数が多かったのは、咽頭結膜熱の33名、感染性胃腸炎の17名であった。咽頭結膜熱及び感染性胃腸炎では、昨年度と同じく春先から冬場まで検体搬入があった。

手足口病は、昨年と比べて検体搬入の患者数が減少した。

ヘルパンギーナも、昨年同様に検体搬入の患者数が少なく、両疾患ともに例年は春先に流行がみられるが、今年度は散発的な流行にとどまったことが推測された。

表2に疾病別・血清型別ウイルス分離成績を示す。

全検査患者数367名中144名からウイルスが分離され、分離率は39.2%であった。疾病別で最も多かった疾患名はインフルエンザ様疾患であり、18名のうち半数以上の72名からウイルスが分離され、分離率

表1 疾病別月別検査患者数

疾病コード	疾患名	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
501	インフルエンザ様疾患	18	2							3	36	12	47	118
601	咽頭結膜熱(←咽頭結膜炎)	3		1	2	6	1	2	1	14	3			33
603	感染性胃腸炎(←乳児嘔吐下痢症)			1		1		4	7	2	1	1		17
604	水痘(←水ぼうそう)							1						1
605	手足口病(HFMD)		4	2	1	3								10
606	伝染性紅斑(EI)										1			1
607	突発性発疹			1							1			2
609	風疹(←三日はしか)		1	1			1							3
610	ヘルパンギーナ	1		1	3									5
611	麻疹(←はしか)	1	1											2
612	流行性耳下腺炎	1	1								5			7
702	流行性角結膜炎(EKC)				5									5
901	急性脳症(日本脳炎を除く)	1		1	2	1			1					6
903	無菌性髄膜炎(AM)	1	4	10	23	8	4	7	3	3	3	1	1	68
904	マイコプラズマ肺炎	1									1			2
	その他疾病	7	3	5	21	1	3	6	1	3	31	5	1	87
	総合計	34	16	23	57	20	9	20	13	25	82	19	49	367

表2 疾病別・血清型別ウイルス分離成績

疾患名	検査	分離	Inf-A	Inf-A	Inf-B				ECHO	ECHO	ECHO	ECHO									
	患者数	患者数	ソ連型	香港型	B型	Ad1	Ad2	Ad3	11	16	18	25	CA9	CA16	CB3	CB4	CB5	MV	NLV	型別不明	
インフルエンザ様疾患	118	72	31	15	23																3
ヘルパンギーナ	5	0																			
咽頭結膜炎	33	4		1				2								1					
感染性胃腸炎	17	12																			12
気管支炎	5	1														1					
急性脳症	6	1													1						
手足口病	10	6											2	4							
上気道炎	25	4								3							1				
水痘	1	1								1											
脳炎	1	1												1							
発疹症	4	3								1			1		1						
不明熱	2	1									1										
無菌性髄膜炎	68	22							5	3		1	2		1		8	2			
流行性角結膜炎	5	2					1	1													
その他	67	14				1		10								2					1
総計	367	144	31	16	23	1	1	13	5	8	1	1	5	5	3	4	9	2	12	4	

Inf-A ソ連型:インフルエンザAソ連型 Inf-A 香港型:インフルエンザA香港型 Inf-B 型:インフルエンザB型 Ad:アデノウイルス ECHO:エコーウイルス
 CA:コクサッキーA群ウイルス CB:コクサッキーB群ウイルス MV:ムプスウイルス NLV:ノーウォークウイルス(SRSV)

表3 ウイルスの血清型別・月別ウイルス分離数

血清型	月別分離数													合計
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3		
アデノウイルス1型											1			1
アデノウイルス2型				1										1
アデノウイルス3型				1							11	1		13
アデノウイルス4型														
アデノウイルス5型														
エコーウイルス9型				1	2									3
エコーウイルス11型			1	2	1			1						5
エコーウイルス16型			1	3	2		2							8
エコーウイルス18型								1						1
エコーウイルス25型	1													1
エンテロウイルス71型														
コクサッキーA群ウイルス9型			1			1								2
コクサッキーA群ウイルス10型														
コクサッキーA群ウイルス16型		2	1	2										5
コクサッキーB群ウイルス3型			1	1			1							3
コクサッキーB群ウイルス4型						2		2						4
コクサッキーB群ウイルス5型		1		5	1		2							9
ムプスウイルス			1										1	2
SRSV							2	7	2	1				12
インフルエンザ Aソ連型	3									24	4			31
インフルエンザ A香港型	3									5	1	7		16
インフルエンザ B型	3										2	18		23
型別不明										2		2		4
総合計	10	3	6	16	6	3	7	9	4	44	8	28		144

は61%であった。

インフルエンザ様疾患で分離されたインフルエンザウイルス株の血清型別で最も多かった血清型は、ソ連型(H1N1)31株であり、次にB型23株、そしてA香港型(H3N2)15株であった。それぞれの分離率は、43%、31.9%、20.8%であった。特にB型については、2月より分離され始め、3月入り増加した。次いで多かったのが、髄膜炎であり65名中22名から分離され、分離率は33.8%であった。

髄膜炎で分離されたウイルスは、エコーウイルス-11、16、25型(以下、E-11、16、25)の9株及びコクサッキーA群9型(以下、CA-9)、コクサッキーB群3、5型(以下、CB-3、5)

の11株とムンプスウイルス2株であり、その中では特にE-11の5株、同じくCA-16の3株、CB-5の8株と3種類のウイルスが多く分離されている。このようにエンテロウイルスが多岐にわたり分離されているのは、同時期にこれらの血清型が同時に流行していたと考えられ、様々な臨床症状については、個体差に見られる発症経過のステージの違いと思われた。

その他の疾患では、アデノウイルス 3型(以下、Ad-3)がアデノウイルスによる感染症を疑う症例で10株、他に咽頭結膜炎2株、流行性角結膜炎1株分離されている。感染性胃腸炎では、SRSVが17名中12名から検出され、検出率 70.6%であった。手足口病では、CA-9、16が10名中6名から分離され、分離率 60.0%であったが、前年度に分離されたE-71については、今年度は分離されなかった。

表3に血清型別月別分離数を示す。

インフルエンザの流行については、ウイルス分離状況からAソ連型から香港型へ、そしてB型への推移がみられ、3月から4月にかけてB型の流行が持続していた。

また、Ad-3は特に冬場のインフルエンザの流行時に重なるように多数分離された。

参 考 文 献

- 1) 沼崎義夫 : ウイルス分離の簡便法、小児科診療、54、127-132、1991
- 2) 北村敬 : ウイルスのための組織培養技術、第4版、164-165、近代出版、1983
- 3) 国立予防衛生研究所学会編 : ウイルス実験学各論、180-189、丸善、1967
- 4) 財団法人日本公衆衛生協会 : 厚生省監修微生物検査必携ウイルス・クラミジア・リケッチア検査、第3版、11-19、1987
- 5) 原 健志、他 : 長崎県衛生公害研究所所報、46、110-114、2000
- 6) 上田竜生、他 : 長崎県衛生公害研究所所報、46、104-106、2000

SRSVも秋から冬にかけて検出された。

E-9、11、16及びコクサッキーA群とコクサッキーB群はそれぞれ夏場にかけて分離された。

以上のことから今年度のサーベイランスにおけるウイルスの検索結果としては、小児における“夏かぜ”症候群は、様々な種と血清型のエンテロウイルスによって引き起こされており、症例によっては髄膜炎を併発したものと推定される。しかし、その流行規模は、検体数及びウイルス分離数の状況から、小規模で散発的なものであったことが推定された。

また、手足口病患者からは、CA-9、16は分離されたがE-71は分離されず、流行規模は、昨年⁶⁾とは異なり小規模にとどまったと思われる。

これまでの経年的な本調査の結果、小児ウイルス感染症の起因ウイルスは、年毎に変化しており、様々なエンテロウイルスがウイルス感染症の原因ウイルスとして分離されていることから、感染症発生動向調査によるウイルスの流行状況を継続して調査・解析することは、困難な流行予測の一助となる。

今後も小児ウイルス感染症に対する監視及び予防対策の一環として本調査を継続し、その役割の一端を担っていきたいと考えている。