

# 水痘より Vero 細胞でウイルスが分離された

## Hand-Foot and Mouth Disease

秋田県衛生科学研究所細菌病理科

秋田県立中央病院 微生物検査科

須 藤 恒 久

秋田県立中央病院 微生物検査科

森 田 盛 大・藤 原 登美子

秋田県衛生科学研究所細菌病理科

坂 本 昭 男

### Hand-Foot & Mouth Disease

(HFMD)は乳児から幼児が罹患し、口内及び手足などの水疱形成を主徴とする軽い病気である。これが主としてCoxsackie A-16 (CoxA-16)によるものであることは1957年CanadaのToronto周辺で流行した時 Robinson<sup>1)</sup>らによつて初めて明らかにされたものである。その後、米国<sup>2-4)</sup>や、英国<sup>5)</sup>の流行が度々報告されている。

我国では、昭和42年夏に関西地方で本症とみられる疾患の流行中に、水疱内容から、CoxA16が分離されている<sup>6)</sup>以外まだあまり報告されていないが、昭和42~3年中に我国で若干のCoxA16の分離がWHOに報告されている<sup>7)</sup>ので、我国でも最近流行していることは確かであろう。我々は昭和44年夏から秋にかけて秋田県内で臨床的に本症とみられる疾患の流行を認め、6例の患者の水疱からVero細胞を用い、全例からウイルスを分離し、同定の結果、現在迄の処、2例はCoxA16であることを確認した。更に血清学的検査によりCoxA16に中和抗体、CF抗

体の有意上昇を認めた症例もあり、HFMDが昭和44年夏~秋に本県内で流行したことを確めた。本症はCoxA16の他にCoxA5、又はA10も原因となると言われて居るので、これ迄の報告の多くは分離に哺乳マウス(SM)を使用し、血清抗体の検索もSMで行なわれている。我々は分離はSMによらず、Vero細胞を用い、高率に分離し得た。

然し乍ら、Vero細胞のみで継代した株は標準株と、性状に於て相当な差異のあることを知りつつあるが、本報では分離及び血清診断結果を主として報告したい。

### 被 検 症 例

我々がウイルスを分離した症例は昭和44年6月から11月迄の間に発症し、秋田県立中央病院皮膚科、或は小児科を受診した5例と、秋田市中通病院小児科の受診患者1例で、これらの症例の臨床像の概要及び、ウイルス分離結果を表1に示した。尚、症例671と、72は同胞例である。

表1 Hand-Foot & Mouth Disease 症例

症例番号	年齢・性	発病月日	臨床像	ウイルス分離 (VerO細胞)	分離株No	備考
52	6-4 ♂	6-17-69	口内, 手掌, 足底 前膝部水疱性発疹 37~38℃	6-20(4) 足底部水疱(+)	(1320)	白血球8800 (6-20)
71	0-8 ♀	8-25-69	軟硬口蓋, 口内疹 手指, 足趾 手掌, 足底, 下腿 水疱性発疹 38℃(1日間)	8-28(+) 手背, 水疱(+) 足底水疱(+) 下腿水疱(+)	(1349) (1347) (1348)	白血球6550 (8-28)  同 胞
72	4-4 ♂ (71の兄)	8-31-69	軟口蓋, 舌先端 手指, 足趾 水疱性発疹 平熱	9-1(2) 咽頭拭液(+) 手掌水疱(+) 足底水疱(+)	(1351) (1352) (1353)	発病間隔6日
74	0-11 ♂	9-7-69	上腿, 下肢 手指, 足趾 水疱性発疹 37℃	9-11(5) 咽頭拭液(+) 手掌水疱(+)	(1356) (1355)	
80	0-10 ♂	11-8-69	両手掌, 拇指 左足趾水疱性発疹	11-11(4) 手掌水疱(+) 咽頭拭液(+)	(1379) (1378)	
408	0-10 ♂	9-28-69	手掌, 手指 足趾, 下肢背側 水疱性発疹 口内疹, 発熱	9-80(3) 咽頭拭液(-) 手掌水疱(+) 糞 便 (-)	(1364)	同胞発病せず

検査方法

ウイルス分離にはVerO細胞を用いた。細胞増殖用培養液(GM)はEagleのMEMに10%の牛血清を加えたものであり、細胞維持液(MS)には、MEMに2%仔牛血清を加えたものを用い、検体接種後33℃で回転培養を行ない、途中5日毎に液を交換し、2週間観察した。検体は主として水疱内容を0.5%牛血清アルブミン加、SLE液2~3ml中にとり、その0.2mlを1本の細胞チューブに接種した。咽頭拭い液及び糞便抽出液については、これ迄に記した常法に従った。

免疫血清

同定に用いた血清は次の通りである。

- ① 予研より分与されたSchmidt Pool血清抗CoxA群各単味免疫家兔血清。
- ② 我々の分離株のVerO細胞培養液をDiffr-cn S-2で処理し、FreundのComplete Adjuvantと共にモルモットの筋肉内に、3及至5回注射し、3週後再接種してから1週後に採血した血清。

血清診断のためのウイルス

- 1) 予研より分与されたCoxA16標準株をSM

表2 水痘よりウイルスが分離されたHFMD症例の血清抗体価

症例 採血 50%中和抗体価 C F 抗体価

番号	病日	COX A16SMV	1352-V	COX A16SM	1352-VSM	1320-VSM
52	4	32	nt	8	< 8	< 8
	21	32		16	8	16
71	4	< 8	< 2	< 8	< 8	< 8
	19	16	< 2	8	≤ 8	≤ 8
72	2	< 8	< 2	16	< 8	8
	13	32	< 2	32	16	16
74	5	16	< 2	nt	8	< 8
	21	32	< 2		16	16
80	3	16	nt	8	< 8	< 8
	17	16		16	8	≤ 8
408	3	32	nt	8	< 8	< 8
	17	16		16	16	8

及びVero細胞で継代したもの。

2) 我々の分離代表株をVero細胞のみで或は、Vero-SM-Veroの順で継代したもの。

### 血清学的検査方法

#### ① 中和試験

ウイルス及び血清の等量混合液を室温に1時間おき、その0.1mlをVero細胞のチューブに接種し、33℃に廻転培養した。中和抗体の検査は、Hanks液にて稀釈した血清につき同様、中和試験を行ない、50%中和抗体価を算出した。

#### ② 補体結合反応(CF)

標準株及びVero細胞分離株をSMの腹腔内に接種し、発症したSMのホモジネートを、Difronで処理したものをCF抗原として使用し、マイクロタイターを用いて行なった。

### ウイルス分離の結果

ウイルス分離の結果は表1に示す通りであり、全例の水から少なくとも1株のウイルスが分離された。67.1例の如く、3ヶ所の水疱につき分離を行ない、全てからウイルスが分離された如く、水からのウイルス分離は高率であった。咽頭拭液では4例中3例から分離された。1例の糞更からのウイルス分離は不成功に終わった。

Vero細胞に見られた本ウイルスのCPEは殆んどECHO或はCoxsackieB群の示すものと類似していたが、分離の除初めてのCPEが認められたのは少なくとも接種後1週間を至てからであり、以後の液交換によりCPEは更に進行した。

分離株の同定にはやや困難があつた。即ち、分離代表株の1352株のVero細胞継代株(1352-V株)はShmidt Pool血清では中和されなかつた。又、予研で作製されたCOXA群16型の抗血清でも中和されなかつた。しかし、抗1352-V株モルモット血清は標準COXA

16のSM-Vero継代株を中和した。次に抗1352-V株モルモット血清は標準COXA16のSM継代株と1352-V株をSMに接種後の発症SMによつて作製したCF抗原に同じ価のCF抗体価を示した。

以上のことから、1352株はCOXA16と同等した。

### 血清診断結果

患者ベア血清についての血清学的検査結果は表2に示す如くである。注目すべきことは分離代表株の1352-V株を抗原とし、Vero細胞を用いた中和抗体価の検索では全例の回復期血清で、抗体の存在を確認することが出来なかつたことである。これに対して標準COXA16のVero細胞継代株を用いて同様に行なつた中和抗体価の検索では症例71と72は、明らかに抗体の有意上昇を確認出来たし、他の症例でも、抗体の存在を確認得た。

一方、CFではCOXA16-SM株1352-V-SM株及び1320-V-SM株を抗原として全例にベア血清間で抗体の上昇を認めた。従つてCFでやつた限りではこれら6例は少なくともCOXA群の感染を受けたと言える成績を得た。

### 考 察

臨床的にHFMDと思われる6例についてウイルス学的な検索を行なつた結果、種々の興味ある知見が得られた。先ず第一に、我々は症例のウイルス分離を行なう際に、手、足の水疱を主訴としたものが多かつたために、初めはHFMDと考えず、临床上、Herpes Simplex(HSV)による水疱と疑つたのであつた。それで、我々の常法によつてVero細胞に水内容を接種した。もしこの水疱がHSVによるものであるならば、今迄の我々の経験では接種から1日、おそくとも3日以内に分離の判定をなし得たからである。処が、今回の症例は、何れも3日以内にはCPEが起らなかつた。従つて我々は本症は臨床的にHSVに似ているけれどもHSVによる水疱ではない

と判断した。その後、Ver o細胞のMSを交換していた処、CPEらしい像、しかも、Enter o Virus様のそれが認められたのであつた。疑問に思つてこれを継代した処、明らかなCPEが認められ、感染価も $10^{5.5}$ あることが認められたことから、同定以前に恐らく、HFMDと診断したのであつた。継代後は、接種から、2-3日で100%近くCPEが起つた。もし我々が本症を最初からHFMDと考えたならば、分離材料は当然、哺乳マウスに先ず接種したであろうが、これ程高率には分離し得なかつたかも知れない。

Magoffin<sup>2)</sup>らはCaliforniaの流行に於て哺乳マウスを用いた他に初代猿腎細胞(MK)を用いて分離している。又、分離材料は水疱ではなくて、糞便を用いている。Freoschle<sup>3)</sup>らはAtlantaの流行では種々の材料をSMやMKに接種して居り、Alsop<sup>4)</sup>らは英国のBirminghamの流行で、組織培養では全く分離出来なかつたとしている。Cherry<sup>5)</sup>らはWisconsinで多くの種類の細胞やSMを用いて分離を行なつている。

高安<sup>6)</sup>らは水疱及び糞便をSMに接種して居り、今迄の処、Ver o細胞を用いた報告はない。我々は水疱内容の他に咽頭拭い液や糞便についてもVer o細胞によつて分離を試みたが、水疱からは全例分離に成功していながら、咽頭や、糞便からは必ずしも高率な分離には成功しなかつた。このようなことからHFMDでは原因ウイルスが明らかに皮膚に於て増殖して居り、水疱内容は高い感染価のウイルスでみだされていることが推定された。一方、ウイルスが水疱中に存在した時点の急性期血清中には既に中和抗体もCF抗体も認められたものが多く、この点は免疫学的に興味深い問題として更に追求中である。

次に我々が直面した問題は分離株の同定であつた。Ver o細胞継代株はSchmidt Pool血清抗CoxA16血清の何れでも、又、Homoのモルモット抗血清でも中和されず、しかも、Homo患者のベア血清でさえも抗体価を認めなかつた。然し乍ら、Ver o細胞継代株を哺乳マウスに接種するとマウスは発症し、その発症マウスの

ホモジネート上清を抗原とし、Ver o細胞継代株で免疫したモルモット血清とで、OP反応を行なうと陽性を呈し、更に同抗原でベア血清間の抗体上昇を確認した。

今回我々がウイルスを分離した症例の臨床像については別に報告の予定であるが、今迄、本県内に於ては、このような症例は少なくとも過去5年以内には認められなかつたようであり、昭和44年に突然CoxA16が何処からか浸淫して来たものと思われる。我々の観察した以外でも同様の臨床像を呈した乳児の症例が県内及び他の東北各県にもみられたことが他の皮膚科医及び小児科医の間からもたらされている。又、他に本邦では東京地区でもHFMDの流行が報告され、CoxA16の分離もWHOに報告されていることから昭和42~44年中には或は全国的にCoxA16が撒布されたものとも考えられる。

#### 総 括

昭和44年度から秋にかけて、秋田県内に発生したHond-Foot&Mouth Diseaseと考えられる6例につきウイルス学的に検索を行ない、次の知見を得た。

- 1) 水疱内容を分離検体とし、Ver o細胞に種した処、6例の全例からEnter o Virus様のCPEを呈するウイルスが分離され、現在迄に2例のものはCoxA16と同定された。又、咽頭拭い液よりは、3株分離された。
- 2) Ver o細胞継代ウイルスは $10^{5.5}$ の感染価を有し、CPEも強度であるが、抗血清によつて中和されないが分離株でのモルモット免疫血清は標準株のCoxA16を中和したので分離株は或る種の変異株と思われ追求中である。
- 3) 水疱内にウイルスが存在している時期に既に中和抗体は上昇して居ることが認められ免疫学的に注目すべき問題であると考えられる。
- 4) 血清中和抗体はVer o細胞継代ウイルスでは指摘出来ず標準株ウイルスによつて始めて測定し得た。

一方、CF抗体はVerro-哺乳マウスの継代ウイルスによつて認め得た。

稿を終るに当り、標準株及び抗血清を分与された予研、多ヶ谷部長、並びに種々御協力いただいた秋田県立中央病院、皮膚科、稲葉堅博士に感謝の意を表します。

- 1) Gilbert Dalldorf & Joseph L. Melnick : Viral and Rickettsial Infections Of Man (Editor, Horsfall & Tamm) 5th, Ed, P. 497, , Phila 1965
- 2) Robert L. Magoffin, et al J, A, M, A, 175, 441, 1961
- 3) James E. Eroeschle, et al, Amer, J, Dis, Child, 114, 278, 1967
- 4) James D. Cherry & Charles L. Jahn, Pediatrics, 37, 637, 1966,
- 5) J. Alsop, et al, Brit, Med, J 2 1708, 1960,
- 6) 高安進, 川津友子, 臨床皮膚科 23, 43, 1966,
- 7) WHO地域エンテロウイルスレファレンスセンター医学のあゆみ65, 196, 1968,
- 8) WHO地域エンテロウイルスレファレンスセンター医学のあゆみ67, 539, 1968,
- 9) 須藤恒久, 他, 秋田衛研所報 10, 31, 1966,
- 10) 須藤恒久, 他, 秋田県立中央病院雑誌 5, 20, 1968,
- 11) 石井慶蔵, 昭和45年防疫関係技術職員講習会