秋田県衛生科学研究所報　No.26. 61～65（1982）

眼球運動失調症（脳性麻痺とてんかんを合併）の乳児患者から分離されたパラインフルエンザ４Ｂ型様ウイルスについて

原田誠三郎*　佐藤宏康*　後藤良一*
高山和子*　森田盛大*　天野保二**

Ⅰ　はじめに

現在，パラインフルエンザウイルス（以下，パラと略す）には，１，２，３，４型の４種類があり，さらに，４型はサブタイプＡ，Ｂ型に区別されているが，この両型に関する内外の報告例[1)2)3)]は少ない。

我々は，1980年10月に眼球運動失調症に脳性麻痺とてんかんを合併し，秋田市内のＡ総合病院小児科へ入院した乳児患者の髄液からパラインフルエンザ様ウイルスを分離し，そのウイルス学的，血清学的及び血清疫学的検討を行なったので，その結果を報告する。

Ⅱ　材料と方法

Ａ．材料

1.　ウイルス分離材料

ウイルス分離には，表1.に示した患児から採取した髄液を用いた。

2.　被検血清

血清学的検査には，同患者から21病日（25931）と48病日（25949）に採取したペア血清を用いた。また，血清疫学的調査には，当所で実施している微生物定点観測時の患者（０－15歳）と一般健康住民（16―60歳）の計100名から採取した血清を用いた。

なお，被検血清は，いずれも使用時まで－20℃に保存した。

Ｂ．

1.　ウイルス分離方法

表1.

1.	患者名	浦○芳○　男　５Ｍ
2.	入　院	昭和55年９月26日
3.	検体採取	昭和55年10月15日（髄液，血液）
4.	臨床診断	Opsoclonus
5.	主症状	眼球運動失調症，首の安定性不良及び脳性麻ひとてんかんを合併

１％胎児コウシ血清（ＦＣＳ）加維持ＭＥＭ液1 mlで液交換したHEp-2細胞培養チューブに分離材料を0.2 mlずつ接種し，37℃の回転培養で分離した。

2.　分離ウイルス（10382株）の細胞感受性と増殖能試験

10382株の細胞感受性と増殖能試験は，ウイルス感染価と赤血球凝集（ＨＡ）能を指標として以下のごとく行なった。

すなわち，トリプシン添加（Difco, 1：250, 1 μg/ml添加）ＭＥＭ液とトリプシン未添加１％ウシ血清（ＣＳ）加ＭＥＭ液を用いて，同ウイルスの10倍階段希釈（$10^{-1.0}$－$10^{-9.0}$）を行ない，この各希釈液１mlをあらかじめ，Hanks液で２回洗ったHEp-2細胞，アカゲザル腎細胞（LLC-MK_2），HeLa細胞，Vero細胞の各培養ガラスシャーレ（3.3 cm）に接種後，37℃の５％CO_2インキュベーターで培養し，ＣＰＥの出現を指標として感染価[4)]を求めるとともに，経日的に上清のＨＡ価をも測定[5)]した。また，トリプシン未添加の１％ＦＣＳ加維持ＭＥＭ液１mlで液交換したカニクイザル初代腎細胞（ＭＫ），ヒト胎児繊維芽細胞（ＨＥ）及びＨＥＡＪ細胞に，10382株を0.2 mlずつ接種し，同様にＣＰＥとＨＡの出現を指標として37℃で７日間，回転培養を行なった。

3.　10382株のＨＡ能試験[5)]

10382株のニワトリ，モルモット，ミドリザル及びヒトＯ型血球などに対するＨＡ能を４℃，室温，37℃の温度条件でテストした。

4.　交叉ＨＩ試験[5)]

交叉ＨＩ試験に供した抗原は，予研から分与されたパラ１，２，３，４Ａ，４Ｂ型の標準株及びHEp-2細胞とLLC-MK_2細胞で２回継代した10382株の６種，また，抗血清は市販のパラ１，２，３，４Ａ型の各抗血清と自家製のパラ４Ｂ型と10382株の両抗血清（いずれも鶏免疫血清）及び患者のペア血清である。

なお，これらの各抗血清と患者ペア血清は，いずれも使用時にＲＤＥ処理と使用血球（モルモット）による吸収処理を行なった後，同試験に供した。

5.　10382株のウイルス学的一般性状試験[6)]

*　秋田県衛生科学研究所　**秋田大学医学部研究機器センター

10382 株についてウイルス核酸，リピド溶剤感受性，酸（pH 3.0）感受性，溶血現象[7]，ノイラミニダーゼ活性[8]のウイルス学的一般性状をテストした。

6. 中和抗体測定方法

中和抗体の測定は，モルモット赤血球吸着抑制（HAdI）試験[9]によって以下のごとく行なった。定点観測時の患者と一般健康住民から採取した被検血清をMEM培養液で4倍に希釈し，56℃30分間の非働化をした後，100 $TCID_{50}$／mlの10382株を等量混合した。次いで，37℃，1時間中和反応後，1％FCS加維持MEM液で液交換した2本（1被検血清につき）の HEp−2細胞培養チューブに0.2 mlずつ接種し，37℃で7日間回転培養した。ウイルス対照が100 HAd を示すことを確認後，全チューブに0.5％モルモット血球を添加し，HAd 陰性のものを中和抗体陽性と判定した。

Ⅲ 成　　績

1. 10382 株の細胞感受性と増殖能およびHA能

表1.に示した患児の髄液からHEp−2細胞を用いてウイルス分離を行なった結果，モルモット血球にHAを示す10382株が分離された。しかし，この分離株は，インフルエンザ（AH_0，AH_2，AH_3，B），ムンプス及びパラインフルエンザ（1−3型）のいずれの抗血清でも同定されなかったことから，このウイルスの性状を以下のごとく調べた。先ず，最初に行なったのは，10382株がGMK細胞にも感受性を示したことから，各種細胞に対する感受性と増殖能及び各種血球に対するHA能などについてである。その結果，表2.に示すごとく，各種細胞に対する感受性については，感受性の低かった HeLa 細胞以外，ほぼ HEp−2 細胞と同様な感受性がみられた。また，ウイルスの増殖能については，いずれの細胞もトリプシン添加培養液を用いた方が，未添加培養液の場合より高い感染価を示す傾向があり，特に，HeLa 細胞では，未添加液の感染価が10^3 $TCID_{50}$／mlのとき添加液の感染価は10^7 $TCID_{50}$／mlを示した。また，HA価についても，未添加LLC−MK_2 細胞でHA価が8倍であるのに対して，添加した方は128倍のHA価を示すなど，感染価と同様の傾向を示した。次に，各種血球に対するHA能についてテストした結果，ヒトO型血球以外，各血球ともそれぞれの温度条件下で16倍から128倍のHA価を示した。ただし，4℃ではニワトリ血球，室温と37℃ではモルモット血球が最も高い128倍のHA価を示した。

2. 交叉HI試験成績

表3.に示した抗原と患者ペア血清を含む抗血清を用いて同試験を行なった結果，パラ1，2，3，4A型の各抗原は，患者血清を除くと，いずれもホモ抗血清によってのみ抑制された。これに対して，4B型抗原と10382株は両者の抗血清で弱いながらも相互に抑制される傾向を示したが，他の抗血清では全く抑制されなかった。

一方，患者血清は，3型に対して32倍の抗体価を示したものの，4B型および他型に対する抗体価を示さなかった。

表2. 10382株の細胞感受性と増殖能

細胞		HEp−2	LLC−MK2[1]	MK[2]	HE[3]	HEAJ[4]	HeLa	Vero
組織培養での増殖能	トリプシン添加（1 μg／ml）	+	+	NT*	NT	NT	+	+
	トリプシン未添加	+	+	+	+	+	+	+

1）アカゲザル腎細胞　2）カニクイザル初代細胞　3）ヒト胎児細胞　4）ヒト胎児株化細胞　* Not Test

10382 株の赤血球凝集能

	H			A			価					
血球	0.5％ ミドリザル			0.5％ ニワトリ			0.5％ モルモット			0.5％ ヒト（O）		
温度	4℃	室温	37℃	4℃	室温	37℃	4℃	室温	37℃	4℃	室温	37℃
10382株	16	32	64	128	64	＜8	32	128	128	8	8	NT*

* Not Test

3. ウイルス学的一般性状

10382 株のウイルス学的一般性状試験成績と電子顕微鏡写真を表4.と図1.に示した。すなわち，核酸型はRNAであり，また，エーテル感受性で，酸（pH 3.0）不

表3. 交 叉 H I 試 験

ウ イ ル ス	抗 血 清							
	Parainf. −1	Parainf. −2	Parainf. −3	Parainf. −4A	Parainf. −4B	10382	25931 (21)	25949 (48)
Parainf. −1	512	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32
Parainf. −2	<32	512	<32	<32	<32	<32	<32	<32
Parainf. −3	<32	<32	1024	<32	<32	<32	32	32
Parainf. −4A	<32	<32	<32	512	<32	<32	<32	<32
Parainf. −4B	<32	<32	<32	<32	≦32	≦32	<32	<32
10382株	<32	<32	<32	<32	32	1024	<32	<32

( ) は採取病日

安定であった。また，モルモット血球で溶血現象がみられるとともにノイラミニダーゼ活性も認められた。

4. 血清疫学的調査

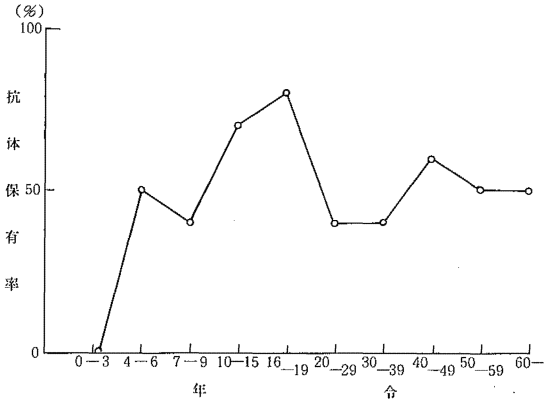
図2.は，県内住民の10382株に対する中和抗体（HAdI）保有率を各年令群別にプロットしたものである。すなわち，乳幼児の0—3歳群では中和抗体は検出されないが，4—6歳群からは50%前後の抗体保有率を示し，就中，16—19歳群が80%の最も高い抗体保有率を示した。

表4. 10382株の一般性状

IUDR感受性（核酸型）	エーテル感受性	pH3.0安定試験	溶血現象	赤血球凝集能	ノイラミニダーゼ活性
RNA	感受性	不安定	+	+	+

図1.

図2. 10382株に対する年令別中和抗体保有率パターン（秋田県：1980年，被検血清〔100〕）



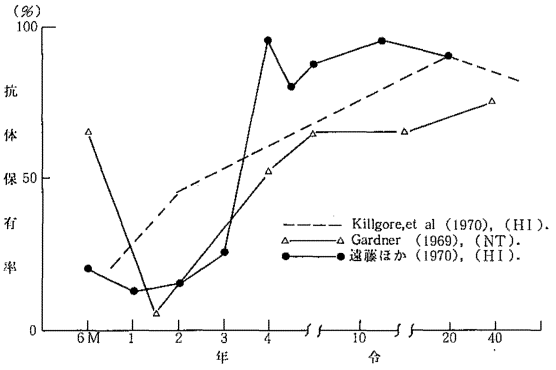
Ⅳ 考 察

1980年10月，表1.に示した乳児患者の髄液からHEp−2細胞を用いて分離した10382株は，優劣はあるものの，用いた細胞の全てに感受性を示し，特に，トリプシン添加によりウイルス増殖能が高くなる傾向が観察された。また，各種血球に対するHA能については，ヒトO型血球を除く他の血球では，温度条件により異なるものの，16倍から128倍のHA価を示し，特に，モルモット血球などに対しては高いHA活性を示した。これらの結果およびインフルエンザ抗血清やムンプス抗血清で抑制されなかったことから，パラインフルエンザウイルスと想定し，次の交叉HI試験を行なった。その結果，10382株はパラ1，2，3，4A型の各抗血清では全く抑制され

なかったが，抗4B型血清でわずかに抑制されるとともに，パラ4B型抗原も抗10382血清でわずかに抑制されるような傾向を示した。しかし，用いたパラ4B型の抗原及びホモ抗血清の力価がいずれも低かったこと，および患者ペア血清がパラ4B型に対する有意抗体価上昇を示さなかったことから，10382株をパラ4B型ウイルスであると最終決定するまでに至らなかった。

なお，3型に対する抗体は，篠崎たち[10]が述べているように，出生直後より高率にみられ，生後7－8カ月までに低下する母体由来の受動抗体と思われた。このように，交叉HI試験では，10382ウイルスがパラ4B型らしいことが分ったが，最終決定することができなかったことから，10382株がパラインフルエンザウイルスの性状を有しているか否かについて，形態学的観察も含めて，検討を行なった。表4.に示した成績は，パラインフルエンザウイルスと同様の性状を示し，また，電子顕微鏡による観察でもパラミキソウイルス科に属すると考えられる形態像を示した。このような成績から，眼球運動失調症から分離されたウイルスがパラ4B型ウイルスらしいことがほぼ判明したので，次のステップとして，同4B型ウイルスの疫学に関する文献調査と10382株の血清疫学的調査を試みた。先ず，パラ4B型に関する内外の疫学調査成績の報告数は，パラ1，2，3型と異なり，少なかったが，分離例としては，Gardnerたち[1]が咽頭炎，熱性けいれん，気管支炎などから，また，西川たち[3]が急性熱性疾患などの患者から分離したことを報告している。一方，血清疫学的調査については，Killgoreたち，Gardner，遠藤たちが報告しているが，図3.に示したのは予研の西川が臨床とウイルスに報告[11]したものをアレンジしたものである。この図からみると，3歳を過ぎた頃から抗体保有率が高くなる。すなわち，3歳前後から4B型ウイルスの感染機会が高くなる傾向がみられた。

図3. パラインフルエンザ4Bの年令別抗体保有率パターン



一方，我々は，10382株を用いて県内住民の中和抗体保有状況を調査した。その結果，0－3歳群に抗体保有がみられないが，4－6歳群から50%の抗体保有率を示し，先ほどのGardnerたちの中和抗体成績と類以した傾向がみられた。このようにして分離された10382株が，パラインフルエンザ4B型ウイルスであるとほぼ決定することができた。

V 総　括

1980年10月，眼球運動失調症罹患乳児（脳性麻痺とてんかんを合併）から分離されたパラインフルエンザ様ウイルス（10382株）についてウイルス学的，血清学的及び血清疫学的検討を行なった結果，以下の成績を得た。

1）既知の抗インフルエンザウイルス（AH_0，AH_1，AH_2，AH_3，B），抗ムンプスなどの抗血清で抑制されなかったが，GMKやHEp−2細胞などでよく増殖した。

2）パラインフルエンザ1，2，3，4A，4B型との交叉HI試験を行なった結果，4B型との間に弱い交叉抑制がみられたが，4B型と最終同定することができなかった。

3）しかし，10382株のウイルス学的性状と形態学的性状をしらべた結果，核酸型はRNAであり，また，エーテル感受性で，酸（pH 3.0）不安定などの外に，溶血現象やノイラミニダーゼ活性なども認められ，パラインフルエンザウイルスの性状を示した。

4）また，10382株に対する県内住民の中和抗体保有状況では，4－6歳群で約50%，16—19歳群で80%の保有率を示し，この年令別保有分布はGardnerたち（1969年）が行なったパラインフルエンザ4B型中和抗体保有成績と類以した傾向がみられた。

5）これらの成績を総合することによって，分離された10382株が，パラインフルエンザ4B型ウイルスであるとほぼ決定することができた。

稿を終えるに当たり，御指導いただきました山形大学医学部細菌学教室の本間守男教授，田代真人先生ならびに御協力下さいました秋田赤十字病院小児科の加賀谷禎子先生に深謝いたします。

なお，本文の要旨は昭和56年9月第35回日本細菌学会東北支部総会（秋田市）で発表した。

文　献

1）Gardner, S. D. : The isolation of parainfluenza 4 subtypes A and B in England and

serological studies of their prevalence.J. Hyg., Camb, 67, 545－550, (1969)
2）Killgore, G. E. et al : ANTIGENIC CHARACTERIZATION OF PARAINFLUENZA 4A AND 4B BY THE HEMAGGLUTINATION-INHIBITION TEST AND DISTRIBUTION OF HI ANTIBODY IN HUMAN SERA, Am. J. Epidemiol,. 91, 308—316, (1970)
3）西川文雄たち：パラインフルエンザウイルス感染症のウイルス学的ならびに疫学的考察—1959年から1968年までのまとめ—。ウイルス，20，1，1—10，(1970)
4）石田名香雄たち：微生物学血清学実験コード，南山堂，東京，183—184，(1966)
5）国立予防衛生研究所学友会編：ウイルス実験学総論，改訂二版，丸善，東京，214—225，(1973)
6）国立予防衛生研究所学友会編：ウイルス実験学総論，改訂二版，丸善，東京，472—478，(1973)
7）東京大学医科学研究所学友会編：細菌学実習提要，改訂5版，丸善，東京，449—450 (1976)
8）厚生省監修微生物検査必携：ウイルス・リケッチア検査，第2版，財団法人日本公衆衛生協会，東京，190—192 (1978)
9）武内安恵：インフルエンザウイルス，臨床検査，19，11，61—65，(1975)
10）篠崎立彦たち：パラインフルエンザの血清疫学，臨床とウイルス，8，2，113—118，(1980)
11）西川文雄：パラインフルエンザの疫学。臨床とウイルス，3，2，17—23，(1975)