

## 昭和62年度微生物感染症定点観測調査

### —病原検出調査成績について—

佐藤 宏 康\*    山 脇 徳 美\*    原 田 誠三郎\*  
笹 嶋      肇\*    和 田 恵理子\*    安 部 真理子\*  
斉 藤 志保子\*    茂 木 武 雄\*    森 田 盛 大\*

### I はじめに

昭和51年度から秋田県において微生物感染症の定点観測調査を開始以来12年を経過した。この間8000余名について検査を実施してきた。時代とともに病原体の検出法も改善されてきた。例えば、マイクロプレートを用いたウイルス分離法<sup>1)</sup>, ELISA (酵素抗体法) による抗原<sup>2)</sup>, 抗体の検出<sup>3)</sup>, 電気泳動法<sup>4)</sup>, 核酸ハイブリダイゼーション<sup>5)</sup>を用いた抗原の検出同定などである。一方, 検査をする側からみれば多くの疾患を対象に種々の病原体を迅速, 正確に分離同定することを要求される。また, 試薬が高価でも検査にかなりの制約を受ける。

本報では昭和62年度の病原検出成績にもとづいて, 今後の問題点について述べる。

### II 材料及び方法

#### 1. 被検材料

昭和62年4月から63年3月までの間に800名より採取した。すなわちウイルス分離用咽頭ぬぐい液633, 溶連菌検出用ぬぐい液328, 糞便120, 水痘27, リコール13, 眼結膜ぬぐい液7, マイコプラズマ検出用ぬぐい液4, 尿3, 血液1の合計1136検体を用いた。

#### 2. 検体採取法

検体採取は定点観測指定病院に出張し, ウイルス検出用咽頭ぬぐい液はボバインアルブミンと抗生物質を含むアールの液, 溶連菌検出用咽頭ぬぐい液はキノリン培地に採取した。その他の検体は必要に応じて採取した。

#### 3. 病原体検出法

厚生省監修, 微生物検査必携, 第3版に準じて, 細菌学的, ウイルス学的, 血清学的検査を行なった。

#### 4. 組織培養細胞, 哺乳マウス及びロタウイルス検出

RD細胞は5%牛胎児血清(FCS)を含むハンクスMEM, HEAJ細胞は牛血清を10%に含むイーグルMEMを用い96穴のマイクロプレート上に培養した。両

細胞とも通年使用した。MDCK細胞は牛血清を10%に含むMEMを用いて培養し, チューブを用いた回転培養によりウイルス分離を実施した。62年4~5月及び62年10月から63年3月まで行なった。風疹ウイルスの分離もGMK細胞を用い同様に行なった。哺乳マウス(SM)によるウイルス分離は62年4月から62年11月まで実施した。ロタウイルス抗原の検出はELISA法<sup>6)</sup>により62年4~5月, 62年11月から63年3月まで実施した。

### III 結果及び考察

昭和62年度の被検者数800名のうち何らかの病原体が検出又は証明された者は, 267名(33.4%)であった。疾患別に表1に示した。

呼吸器系疾患の検体から検出された病原を図1に示した。

上気道炎, 気管支炎, 肺炎での検出率は15%以下と低かった。分離に使用したRD, HEAJ細胞がパラインフルエンザウイルスに感受性をもたないためと考えられた。

また, 流行性感冒でのインフルエンザウイルスの検出率も低く, 検出ウイルスもB群のみであった。しかし, 集団かぜの調査<sup>7)</sup>からA香港型の流行も血清学的に確認されていることから, ふ化鶏卵あるいは初代サル腎細胞の併用が必要と考えられた。咽頭炎, 扁桃炎はアデノウイルス及びエコーウイルスの分離数が多く, 次いでA群溶連菌であった。いずれにしても呼吸器系疾患での検体数は全検体数の61.1%(489名)を占める。したがって, 全体の分離率を上昇させるためには呼吸器系疾患での分離率を上げる必要がある。このため, 年に2回初代サル腎細胞を自家調整するのがよいと考えている。すなわち, 1回目は11月頃, 4月から採取した検体のうちで病原検出が陰性のものを選んで接種しアデノ, パラインフルエンザウイルスを中心に検索する。2回目は1月上旬頃インフルエンザが流行をはじめる頃である。初代のサル腎細胞のみでもインフルエンザウイルスB型, A香港型,

\* 秋田県衛生科学研究所

表1 疾患別被検患者数

	疾 患 名	被検患者数	確定又は推定(%)
呼吸器疾患	上気道炎	62	9 (14.5)
	流行性感冒	91	13 (14.3)
	咽頭炎	179	50 (27.9)
	扁桃炎	77	20 (26.0)
	アングリーナ	8	3 (37.5)
	ヘルパンギーナ	39	22 (56.4)
	気管支炎	19	2 (10.5)
	肺炎	14	2 (14.3)
消化器疾患	口内炎	35	24 (68.6)
	急性胃腸炎	5	0 (0.0)
	大腸炎	14	4 (28.6)
	下痢症	64	21 (32.8)
	感冒性消化不良	5	2 (40.0)
発疹性疾患	風 疹	23	11 (47.8)
	麻疹	1	0 (0.0)
	水 痘	12	0 (0.0)
	手足口病	25	21 (84.0)
	伝 染 性 紅 斑	8	0 (0.0)
	突 発 性 発 疹	2	0 (0.0)
	猩 紅 熱	46	44 (95.6)
	溶連菌感染症	10	6 (60.0)
脳神経系疾患	その他の発疹症	7	2 (28.6)
	髄 膜 炎	14	2 (14.3)
	脳 炎	2	1 (50.0)
その他の疾患	流行性耳下腺炎	17	6 (35.3)
	咽頭結膜熱	3	0 (0.0)
	急性出血性結膜炎	5	0 (0.0)
	出血性膀胱炎	2	0 (0.0)
	その他の疾患	11	2 (18.2)

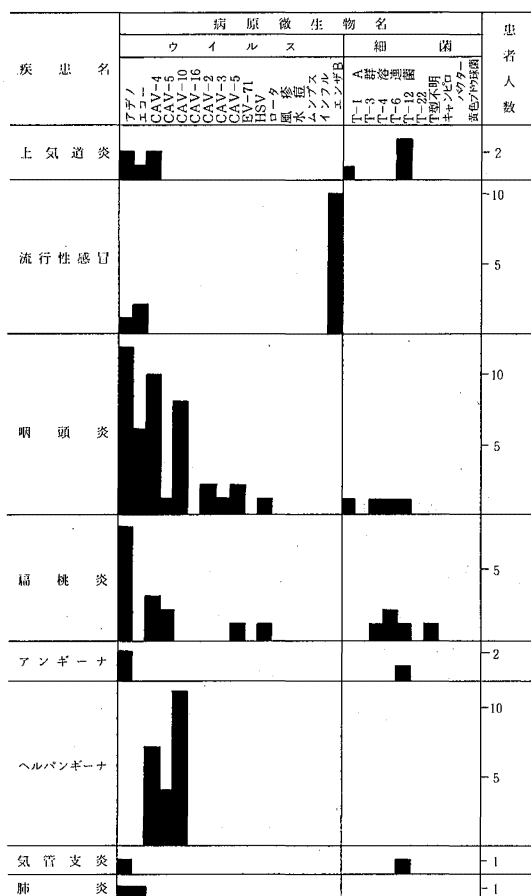


図1. 呼吸器系疾患からの病原検出成績

Aソ連型を分離可能である。一度調整したサル腎細胞は33℃で回転培養すれば1カ月以上使用可能である。しかし、この方法では4月採取の検体の成績が一部12月になるので迅速性に欠ける点が指摘される。一方、ヘルパンギーナからの分離ウイルスはコクサッキーA群ウイルス(CAV)のみであった。いずれもSMでのみ分離された。しかしコクサッキーB群ウイルス(CBV)も病原として検出されるので細胞の併用が必要と考えられる。分離ウイルスの同定は著者ら<sup>8)</sup>が開発したELISA法とSMによる中和試験を併用したが、分離ウイルスの多くはCAV-2, 4, 5, 6, 10型が多いのでELISA法による同定のみでよいのではないかと考えている。

消化器系疾患からの病原検出成績を図2に示した。すなわち、口内炎では単純ヘルペスウイルスとCAVとCBVが検出され、細菌性の病原は検出されなかった。大腸炎ではカンピロバクター・ジエジュニイとロタウイルスが検出された。下痢症では冬期間におけるロタウイルスの検出が多かった。しかし、C群ロタウイルスは従来のR-PHA法、ELISA法で検出できないので今後対策を

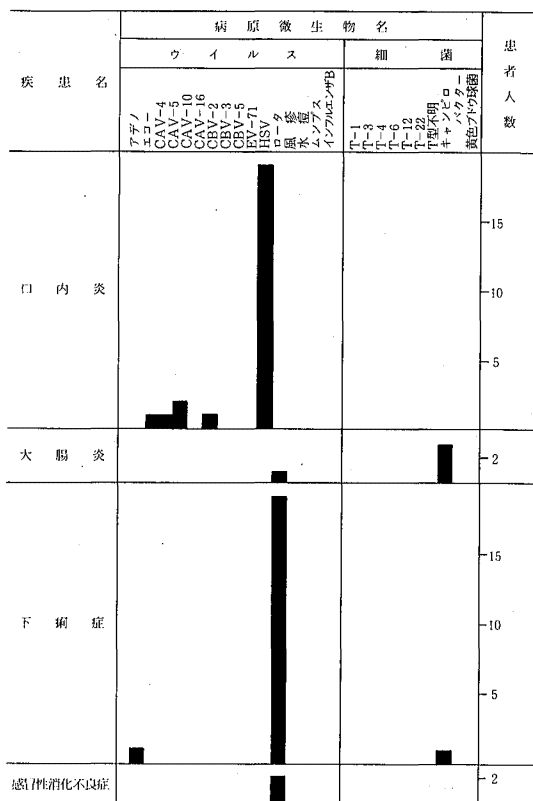


図2. 消化器疾患からの病原検出成績

要する。

感冒性消化不良症からロタウイルスが分離されたが、冬期間、とくにインフルエンザ流行期には咽頭ぬぐい液と糞便の採取が必要であると考えられた。急性胃腸炎患者からは病原が検出されなかったが、腸管アデノウイルスの検査体制が必要と考えられた。

発疹性疾患からの病原検出成績を図3に示した。風疹ウイルスの分離はGMK細胞とECHO-11型ウイルスの干渉による分離法で実施したが、成績が得られるまでに日数がかかりすぎる。水痘ウイルスが分離されなかったのは感受性細胞の供給がつかない理由による。このような意味からも、風疹、麻疹、水痘、突発性発疹症、リンゴ病など1疾患1病原と考えられる病原体の検索では培養によらず抗原粒子を直接検出する方法がよいのではないかと考えられる。手足口病はCAV-16型が主流であった。病原ウイルスの多病原化傾向と抗原変異<sup>9)</sup>が認められている。一方、猩紅熱はA群溶連菌T-4型、T-6型を中心に7種類のタイプが分離同定された。1疾患多病原の場合には分離された個々の病原をタイピングするのに分離と同等かそれ以上に労力を必要とする。とくにマイクロ法でウイルスが分離された場合には確認、及び同定に必要なウイルス量を得るため、再度チューブに継

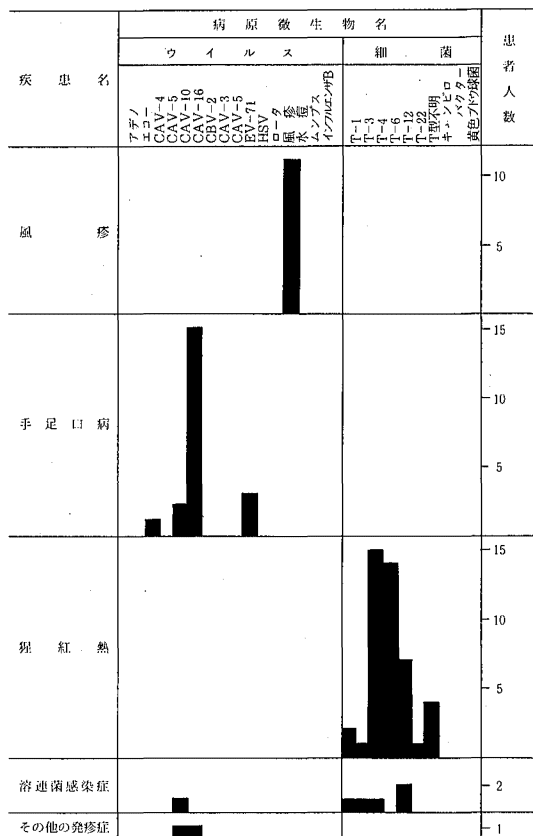


図3. 発疹性疾患からの病原検出成績

代する必要がある。また、CAV-10型による発疹症にも注目していく必要があると考えられた。

脳神経系疾患からの病原検出成績を図4に示した。無菌性髄膜炎ではECHO-7型によるものが1例確認された。

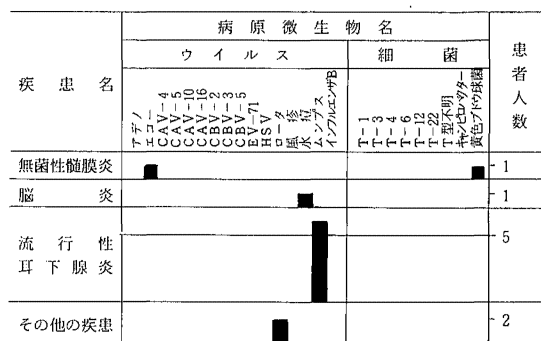


図4. 脳神経系、その他の疾患からの病原検出成績

また、黄色ブドウ球菌コマグラゼI型が髄液より分離され病原と推定された。無菌性髄膜炎患者は毎年発生する。しかし、散発例では分離材料の採取時期が適切でない場合が多く、病原検出が陰性に終る場合が多い。ま

た、ベア血清が採取された場合でも、病原ウイルスが検出されていない場合、血清学的検索のみでの病原診断は大変困難である。流行性耳下腺炎ではムンプスウイルスがHEAJ細胞で分離された。その他の疾患のうち、咽頭結膜熱、急性出血性結膜炎からはウイルスが分離されなかった。

一般細菌検査は病院の検査室で対処できるので、定点観測調査で病原検索及び型別する細菌はキャンピロバクター及び溶連菌が多い。しかし、ウイルス検査では血清学的検査を除き分離同定は定点観測調査で取り扱われるのが現状である。ウイルス分離に使用する細胞の種類は少ない方が理想で、ウイルスに対する感受性領域が広く、維持継代にFCSを必要としない細胞が望まれる。最近、FCSなしでも細胞培養可能なGITなどの無血清培地が販売されている。しかし、現在の価格ではイーグルMEMと5%FCSの系より高い単価となる。SMを使用している場合はエコーウイルスはRD細胞、CBV、ムンプスウイルス、単純ヘルペスウイルス、CAV-16、エンテロウイルス71型、アデノウイルスはHEAJ細胞で分離することを目的としている。また、水痘ウイルス、サイトメガロウイルスはHE（人由来）細胞でのみ検出可能である。したがって、常時使用細胞としてはRD、HEAJ、HEがよいと考えられる。インフルエンザ流行期にはMDCK細胞を使用する。パラインフルエンザウイルスとアデノウイルスの一部は定期的に初代サル腎細胞による分離がよいと考えている。いずれにしても限られた予

算の枠内で多くのウイルスを対象にしていかなければならず、今後ますます迅速性と正確性が要求され、かつ一方では簡便な検査法の開発が必要と考えられた。

## 文 献

- 1) 沼崎義夫：かぜの診断—病原体の分離—，臨床と微生物，14(6)，630—638（1987）
- 2) 萩原敏旦：酵素抗体法（ELISA）による抗原検出法，臨床とウイルス，15増刊，S26—S29（1988）
- 3) 宮沢博たち：酵素抗体法（ELISA）による抗体検出法，臨床とウイルス，15増刊，S30—S35（1988）
- 4) 牛島廣治たち：ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による糞便中のアデノウイルスの検出，臨床とウイルス，15(4)，527—529（1987）
- 5) 金崎巧たち：DNAハイブリダイゼーション法によるサイトメガロウイルス感染症の迅速診断の試み，臨床とウイルス，15(4)，553—558（1987）
- 6) 佐藤宏康たち：ヒトロタウイルス免疫抗体を用いたELISA法によるロタウイルスの検出について，秋田県衛生科学研究年報，29，59—62（1985）
- 7) 安部真理子たち：本誌上
- 8) 佐藤宏康たち：Enzyme-Linked Immunosorbent Assay によるコクサッキーA群ウイルスの同定，第36回日本ウイルス学会総会抄録（1989）
- 9) 佐藤宏康たち：本誌上