

エンテロウイルスの分離について

—CaCo-2, Vero, RD18S, HeLa 細胞, 乳のみマウスを用いて—

小川 知子, 山中 隆也, 篠崎 邦子, 時枝 正吉, 水口 康雄
岸本 圭司¹⁾, 小林みちこ²⁾

Isolates of Enteroviruses

—Using CaCo-2, Vero, RD18S, HeLa Cells and Suckling mice.—

Tomoko OGAWA, Takaya YAMANAKA, Kuniko SHINOZAKI, Masayoshi TOKIEDA,
Yasuo MIZUGUCHI, Keiji KISHIMOTO and Michiko KOBAYASHI.

1. はじめに

エンテロウイルスは極めて多くのウイルス型を有し、その臨床症状や病型は多彩である。今回我々は、手足口病、ヘルパンギーナ等のいわゆる夏風邪様疾患患者の咽頭ぬぐい液について、数種類の細胞と乳のみマウスを組み合わせてウイルス分離を実施したところ、高率にウイルスを分離同定することができた。このなかで、特にCaCo-2細胞の有用性を確認することができたので報告する。

2. 材料および方法

1) 咽頭ぬぐい液

1994年4月から12月、1995年6月から8月に県内の結核・感染症サーベイランス定点の2医院より集められた、手足口病、ヘルパンギーナ、発疹症、上気道炎および熱性疾患（インフルエンザを除く）患者の咽頭ぬぐい液88検体を用いた。

2) ウイルス分離と同定

ウイルス分離は、CaCo-2細胞（ヒト結腸癌由来）、Vero細胞（ミドリザル腎由来）、RD18S細胞（ヒト横紋筋由来）、HeLa細胞（ヒト子宮頸癌由来）と、生後48時間以内のddY乳のみマウスを用いて行った。

細胞は、5% FCS（ウシ胎児血清）添加イーグルMEMで約 8×10^5 個/mlの細胞浮遊液とし、24wellのプレートに1mlずつ分注、37°C、5% CO₂ふ卵器で単層培養し、各wellに0.2mlの咽頭ぬぐい液を接種した。それぞれに2% FCS添加イーグルMEMを1ml加え、34°C、5% CO₂ふ卵器で1週間観察した。CPEの認められた検体は中和試験により同定した。中和には、国立予防衛生研究所分与および(株)デンカ生研製の抗血清を用いた。

乳のみマウス接種試験は、1検体について3～4匹を用い、皮下に0.1mlずつ接種した。7日～10日観察し、発症した乳のみマウスは-80°Cに保存した。同定は、20%乳剤を作製し抗原とし、予研より分与されたCoxsackie A群ウイルス（以下CA）のCA1, CA2, CA3, CA4, CA5, CA6, CA7, CA8,

CA10, CA16に対する抗血清と、デンカ生研製Coxsackie B群ウイルス（以下CB）のCB1, CB2, CB3, CB4, CB5, CB6を用いて、補体結合反応試験により行った。

3. 成績

1) 流行状況

結核・感染症サーベイランス情報によると、1994年度の手足口病の流行は小さく、7月に3検体、10月から12月に10検体を得た。7月の検体よりエコーウイルス11型（以下E-11）を3株、10月から12月の検体より、CA16を10株分離した。手足口病患者から分離報告のないE-11を分離したことは注目したい（図1-1）。また同年のヘルパンギーナの流行は、1990年以降最も大きく、その他の発疹症、上気道炎および熱性疾患（インフルエンザを除く）を含めた患者からの検体は、4月から11月まで23検体が得られた。4月の検体からCA9を1株、5、6月にCA4を2株、流行のピークであった7月に、CA2を1株、CA4を3株、CA5を3株、アデノウイルス3型（以下Ad3）を1株、E-6を1株、E-9を6株分離し、8月に入り、CB3を4株、Ad2を1株、ヘルペスウイルス1型（以下Herpes 1）を2株分離し終息した（図1-2）。

1995年の手足口病の流行は、1982年のサーベイランス開始以来最大のものであった。検体は7月上旬から8月上旬にかけて、38検体を得られた。7月上旬と8月上旬にCB3をそれぞれ5株と1株分離した。その他、CA16が29株、未同定が2株であった（図1-3）。同年のヘルパンギーナの流行は小さく、検体は6月中旬から7月中旬にかけて5検体を得られただけであった。これらの検体からCA6を3株、CA4を1株分離した（図1-4）。

2) 疾患別ウイルス分離成績

疾患別ウイルス分離成績を表1に示した。手足口病患者から、CA16を39株、CB3を6株、E-11を3株、未同定2株の計50株を分離した。ヘルパンギーナ患者から、CA4を6株、CA5を1株、CA6を3株、CB3を4株、Herpes 1を2株、またCB3を分離した同一の1検体から、Ad2を1株分離し、計17株分離した。発疹症患者からは、CA9を1株、E-9を2株、計3株を分離した。上気道炎患者からは、CA2を1株、CA5を2株、E-6を1株、E-9を4株、またCA5を分離した同一検体からAd3を1株を同時に分離し、計9株分離した。

千葉県衛生研究所

1) 岸本医院

2) 小林内科小児科医院

(1996年11月15日受理)

結核・感染症サーベイランスによる流行状況と分離ウイルス

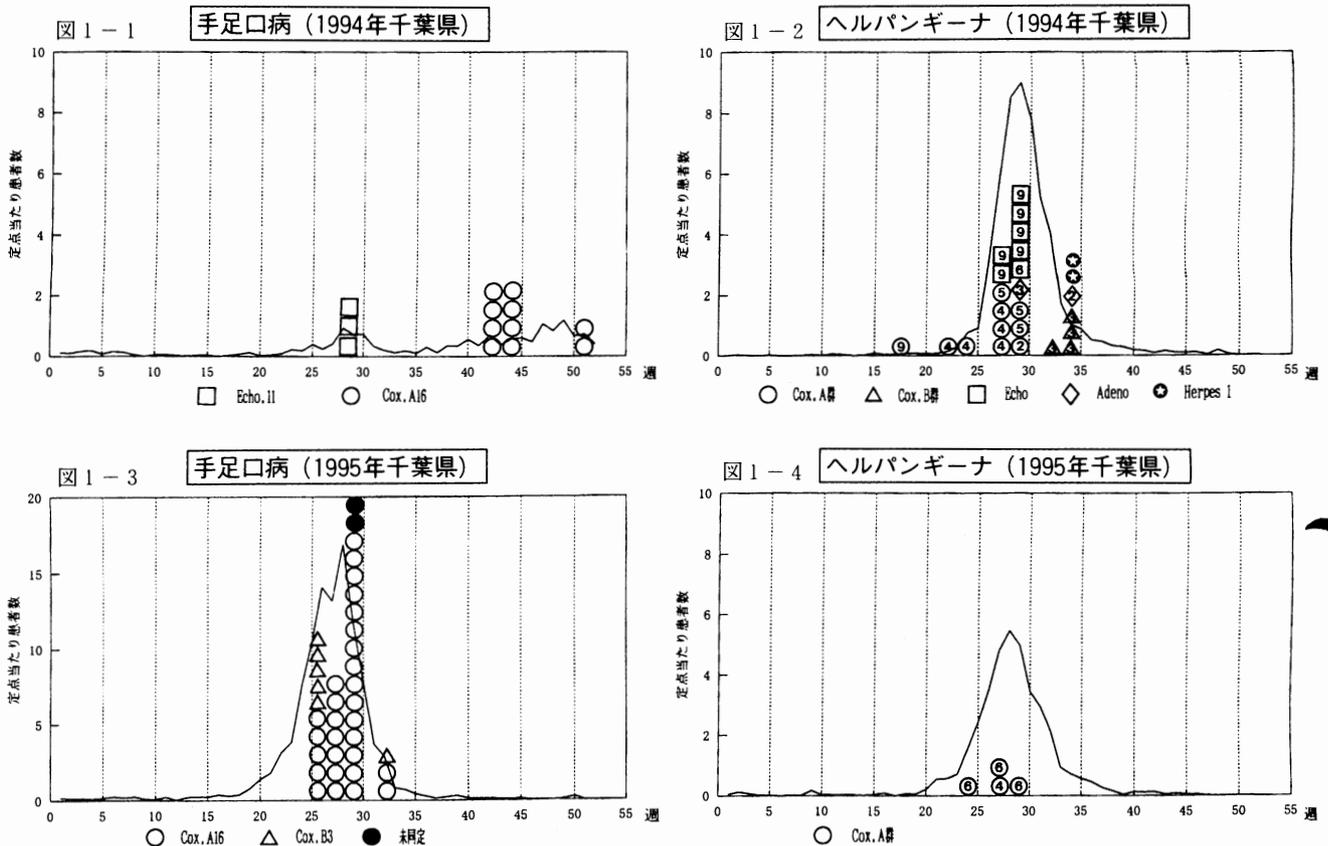


表1 疾患別ウイルス分離成績

ウイルス疾患名	CA 2	CA 4	CA 5	CA 6	CA 9	CA16	CB 3	E-6	E-9	E-11	Ad 2	Ad 3	Herpes 1	未同定	分離数
手足口病						39	6			3				2	50
ヘルパンギーナ		6	1	3			4*				1		2		17
発疹症					1				2						3
上気道炎	1		2**					1	4			1			9
分離数	1	6	3	3	1	39	10	1	6	3	1	1	2	2	79

* : うち一株は、同一検体よりAd 2 も分離
 ** : うち一株は、同一検体よりAd 3 も分離

検体数 88

3) 分離方法別ウイルス分離状況

用いた細胞および乳のみマウス別にその分離状況について検討した。総検体数は88であるが、検体量の関係で一部については5種類の方法全てには接種していない。

乳のみマウスでは、CA 2を1株、CA 4を6株、CA 5を3株、CA 6を3株、CA 16を36株、CB 3を6株の計55株を分離した。CaCo-2細胞では、CA 9を1株、CA 16を32株、CB 3を6株、

E-6を1株、E-9を6株、E-11を3株、またAd 2とAd 3を、それぞれ1株の計51株を分離した。Vero細胞では、CA 16を22株、CB 3を5株、Herpes 1型を1株、未同定2株の計30株を分離した。

RD18S細胞では、CA 9、CA 16、CB 3、E-6をそれぞれ1株ずつ、E-9を4株の計8株を分離した。HeLa細胞では、CA 16を1株、CB 3を5株、E-6を1株、E-9を2株、Herpes 1型を2株の計11株を分離した(表-2)。

表2 乳のみマウスおよび各種細胞に対する感受性の比較

ウイルス方法	CA 2	CA 4	CA 5	CA 6	CA 9	CA16	CB 3	E-6	E-9	E-11	Ad 2	Ad 3	Herpes 1	未同定	分離数
マウス (84)	1	6	3	3		36	6								55
CaCo-2 (88)					1	32	6	1	6	3	1	1			51
Vero (84)						22	5						1	2	30
RD18S (85)					1	1	1	1	4						8
HeLa (88)						1	5	1	2				2		11
分離数	1	6	3	3	1	39	10	1	6	3	1	1	2	2	79

(): 検体数

4) 分離ウイルス別の感受性の比較

さらに分離したウイルス別に感受性を比較した。CA群は、マウスで最も分離率が優れた。CA2, CA4, CA5, CA6は、マウスのみで分離できた。CA9は、CaCo-2細胞, RD18S細胞でのみ分離できた。CA16は、マウスで36株分離したところ、CaCo-2細胞では32株の分離であるが、CaCo-2細胞で分離できなかった4株は、マウスの発症も弱く4匹接種のうち2匹のみ発症、または2代継代の後に同定が可能となった。この結果から、CaCo-2細胞はCA16に関しては、マウスに匹敵する感受性を有していると考えられた。CB3は、マウス, CaCo-2細胞

が最も感受性が良く、分離検体も全て一致していた。また、HeLa細胞, Vero細胞とも、ほぼ同様の感受性を示したが、RD18S細胞は若干劣った。また、マウス脳乳剤からのCB群に対する補体結合反応での同定は、反応性が弱く苦慮した。最終的にマウス脳乳剤をCaCo-2細胞に感染させ、中和試験で同定した。Echo群は、CaCo-2細胞で最も良く分離され、RD18S細胞, HeLa細胞と続き、マウス, Vero細胞では分離できなかった。また、アデノウイルスはCaCo-2細胞でのみ、ヘルペスウイルスは、HeLa細胞, Vero細胞に感受性を示した(表3)。

表3 分離ウイルス別の感受性の比較

ウイルス	総分離数	分離数による感受性
CA2, CA4, CA5, CA6	1,6,3,3	マウスのみ
CA9	1	CaCo-2, RD18S
CA16	39	マウス>CaCo-2>Vero>RD18S, HeLa
CB3	10	マウス, CaCo-2>Vero, HeLa>RD18S
E-6	1	CaCo-2, RD18S, HeLa
E-9	6	CaCo-2>RD18S>HeLa
E-11	3	CaCo-2のみ
Ad, Ad3	1,1	CaCo-2のみ
Herpes1	2	HeLa>Vero

4. 考 察

エンテロウイルスのうちCA群およびCB群、特にCA群のウイルス分離には従来より生後48時間以内の乳のみマウス接種試験が繁用され、いわゆる夏風邪様疾患の患者からのウイルス分離には欠かすことができないものとなっている。しかしながら、生後48時間以内の乳のみマウスの準備、発症したマウスの同定のためのCF試験用乳剤の作製等複雑なことが多く、細胞培養によるウイルス分離が可能となることが望まれる。

我々は、1994年にはヘルパンギーナの流行を、1995年には手足口病の大流行を経験し、13種類のウイルス株と、2株の未同定の株を分離し、このなかでCaCo-2細胞の有用性を確認する事ができた。

CaCo-2細胞については、Willcocksら¹⁾がアストロウイルスの分離においてその有用性を、Shinozaki²⁾らがヒトC群ロタウイルスの分離にトリプシン添加のCaCo-2細胞が有用であると報告している。今回の我々の調査では、エンテロウイルスに対しても、幅広い感受性を持ち、その感受性も高いこと、アデノウイルスに対しても感受性を有していることが確認された。従ってこれらの疾患のウイルス分離にCaCo-2細胞を用いることは有用であると思われる。

また、榮ら³⁾はコクサッキーA群とエコーウイルスに対するRD18S細胞の有用性を報告しているが、今回の結果ではCaCo-

2細胞の方が感受性が高かった。

動物実験については、その是非が議論されているところではあるが、現在のところCA群に関しては、乳のみマウスの感受性が最も優れており、接種試験の必要性を否定することはできなかった。

5. 参考文献

- 1) M. M. Willcock, M. J. Carter, F. R. Laidler, and C. R. Madeley., (1990) : Growth and characterization of human fecal astrovirus in a continuous cell line., Archives of Virology 113, 73-81.
- 2) Kuniko Shinozaki, Takaya Yamanaka, Masayoshi Tokieda, Hiroshi Shirasawa, and Bunshichi Shimizu., (1996) : Isolation and Serial Propagation of Human Group C Rotaviruses in a Cell Line (CaCo-2) ., Journal of Medical Virology 48, 48-52.
- 3) 榮賢司, 石原佑式, 森下高行, 西尾治, 鷲見順子, 井上裕正 (1985) : RD細胞からのクローン株, RD-18SのコクサッキーA群とエコーウイルスに対する感受性および各種材料からのウイルス分離, 感染症学雑誌, 59-7, 664-669.