シンポジウム I : 気道ウイルス感染症

3. 気道ウイルス感染症の実験室内診断

*川 名 林 治

Symposium I : Respiratory Virus Infection

3. Laboratory Diagnosis of the Respiratory Viral Infections

Rinji Kawana, M.D.

Department of Bacteriology, Iwate Medical University School of Medicine, Morioka

The respiratory viral infection is the most frequent and common group of illnesses affecting mankind in all age groups. Since it is virtually impossible to estimate the etiologic agent in a given case by clinical diagnosis, laboratory diagnosis should be carried out.

A printed punch-card is used at the author's department for each case to record clinical and laboratory data from clinical virological examinations of respiratory viral infections.

The clinical specimen collected by means of sterile cotton swabs, e.g. throat swabs and nasal discharge, is placed in several small test tubes containing 2-4 ml of veal infusion broth with added 0.5 % bovine albumine, one containing antibiotics and other no antibiotics. The former is used for virologic examination while the latter is submitted for detection of mycoplasma and bacteria. Various suitable media may be employed for these microbiologic examinations.

In case virologic examination cannot be immediately started, the specimen should be quickly frozen in a dry-ice ethanol or dry-ice acetone mixture and stored in a Revco ultradeep-freezer at -70°C until the time of inoculation.

The specimen is inoculated in 0.2-ml aliquots onto monolayer cultures of various cell cultures, e.g. HEK, HEL, MK, Vero, HEp. 2, HeLa and L 132.

Embryonated chicken eggs and suckling mice may also be used when necessary, for the purpose of isolation of influenza virus or Coxsackie virus.

If the inoculated cultures have developed a CPE or hemadsorption, then biochemically and serologically typed.

For rapid diagnosis fluorescent antibody techniques, ELISA techniques and electron microscopic examination should be used.

Serological examination should be used for antibody arising detection.

We have been carrying out various isolation from clinical specimens and serologic diagnosis steadily in cooperation with clinicians over these past 20 years.

Clinicovirological investigation of respiratory viral infections is considered to have profound importance in basic and clinical medicine as well as in preventive medicine.

Key words : 気道感染症, ウイルスの実験室診断

*岩手医科大学医学部細菌学教室

はじめに

日常診断において気道感染症（かぜ症候群）は、小児においても、また成人においても最も頻度が高く普遍的なものである。またこれによる損失は、乳幼児においては致命的な場合もあり、また発育などに及ぼす影響は少なくない。また合併症を招来することもしばしばみられる。学童ではインフルエンザ様疾患の流行は、学級閉鎖ときには休校などと、カリキュラムに変更を余儀なくさせられることもある。また老人で基礎疾患を有するものでは予後に少なからず影響を与える。個人的にも社会的にも重要な疾患である。

その病原として、細菌によるものは化学療法が可能であるが、しばしば opportunistic pathogens などのため難治感染症となることもある。現在、病原として主役を演ずるものはウイルスによることが多い。予防法としてインフルエンザワクチンが実用化されているのみで、他の多くのウイルスワクチンは未だ開発研究の段階にある。治療法としては、抗ウイルス剤はインフルエンザに Amantadine などがあるくらいで、特効薬はない。

その実験室診断としての病原検査、ことにウイルス検査や血清診断の普及がのぞまれる。

一般に細菌検査は、日常検査として応用されているが、果して本当の病原を確認しているのか疑わしいこともあり、咽頭常在菌の検出と、その薬剤感受性から、誤った化学療法を行い、かえって菌交代症を招来している場合が少なくない。真の原因はウイルスであることが多い。

ウイルス感染症の場合、その確診のため、またその流行を予測し、これを防疫するための対策を疫学的にたてるためにも、労力を惜しまず、常にウイルス検査を実施する必要がある。また、臨床的にたとえ、病原ウイルスの型まで決定しなくとも、細菌性かあるいはウイルス性かを区別することでも、化学療法剤の選択や適応ができ、その乱用を防ぎ、副作用を防止できる。一方、異型肺炎でも *Mycoplasma pneumoniae* 肺炎と、インフルエンザやアデノウイルス肺炎などを鑑別することによって、適切な化学療法剤の投与に有力な資料情報を得ることにもなる。その上血清疫学的に、種々の気道感染

の病原の浸淫を把握しておくことは、疫学的にも臨床診断にも役立つことが多い。

気道感染症の病原検査には、従来からの細菌検査に加えて、とくにウイルス検査を加えて実施することは、車の両輪のごとく不可欠である。またウイルス感染につづく細菌の感染もきわめて多い。

そこで、日常診療において、気道感染症の場合、いかなる検査をすすめてゆくべきかに関し¹¹⁻¹³⁾、主として細菌およびウイルスの面から、私たちの経験^{11) 9) 10) 11)}をもとに解説してみたい。

I. 気道感染症の臨床とその病原

かぜの臨床像はさまざまで、①普通感冒、②咽頭炎、③喉頭炎、④咽頭結膜熱、⑤気管支炎、⑥細気管支炎、⑦肺炎、⑧原発性異型肺炎、⑨その他に大別されるが、上気道または下気道感染と大別する場合もある。いずれにせよ小児、ことに乳幼児では経過も早く、また全身症状の一つとしてあらわれる場合もあるので、慎重かつ迅速な臨床診断がまず望まれる。

病原としては、種々のウイルスによるものが多いが、細菌としてはレンサ球菌、肺炎球菌、ブドウ球菌、また、インフルエンザ菌、クレブシエラその他のグラム陰性桿菌、さらにマイコプラズマなどに注目する。おうむ症クラミジアも念頭におく。なお上気道の常在細菌叢の問題を忘れてはならない(表1)。

1) インフルエンザは特有な臨床症状を示し、また流行も特有なパターンを示すので、一般に診断は容易であるが、A型は香港型(H₃N₂)とソ連型(H₂N₁)が流行している。B型もしばしば流行を示す。C型はまれである。インフルエンザの二次感染は、老人や小児、ことに基礎疾患を有するものでは、しばしば二次感染をおこし、致命的となる場合もあるので、ウイルスとともに化学療法の適応となり、細菌学的な追跡が必要である。

2) パラミキソウイルス(paramyxovirus)によるものとしては、parainfluenza virus および respiratory syncytial virus (RS virus) によるものが代表的なものである。Parainfluenza virus は4つの型がある。1, 2型はしばしば地域的

表 1 気道ウイルス感染症とその病原

臨 床 診 断		しばしばみられるもの	時としてみられるもの
インフルエンザ 原発性異型(非定型)肺炎 咽頭結膜熱		Influenzavirus A, B (Mycoplasma pneumoniae) Adenovirus types 3, 7, 14	Influenzavirus C Adenovirus Adenovirus types 1, 2, 5
成 人 ・ 小 児	上気道感染 { 鼻炎, 咽頭炎 気管支炎	Rhinovirus Coronavirus Adenovirus	Parainfluenza virus Respiratory syncytial virus Coxsackie virus (Mycoplasma pneumoniae) Adenovirus type 4, 7
	下気道感染 { 肺炎 気管支炎	Influenzavirus A, B (Mycoplasma pneumoniae) (Chlamydia psittaci)	(Legionella pneumophilla)
	上気道感染 { 鼻炎 口 峡 炎 (アングルナ) 咽頭炎 気管支炎	Rhinovirus Coronavirus Coxsackie virus A,B Parainfluenza virus Adenovirus Coevirus	Echovirus Poliovirus Respiratory syncytial virus (Mycoplasma pneumoniae)
	ク ル ー プ	Parainfluenza virus Respiratory syncytial virus	Adenovirus
	下気道感染 { 細気管支炎 肺炎	Respiratory syncytial virus Parainfluenza virus	Adenovirus Coxsackie virus A, B (Mycoplasma pneumoniae)

- 註 1) いわゆる夏かぜの多くは Enterovirus によることが多い。
 2) Influenzavirus 感染後の細菌 (Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Hemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa) などの二次感染に注意。
 3) 最近, 百日咳が増加しつつあるので, これを留意する。
 4) ウイルスの重感染も時としてみられるので, ウイルス分離にこの点の配慮が必要である。
 5) レジオネラ症 (在郷軍人病) もウイルス感染と区別する必要がある。

に流行するもので, 2年ごとぐらいに, 3型は毎年冬季にしばしば流行するが, 他の季節には少ない。4型は散発的にみられる。1, 2, 3型は乳幼児の感染では, 重い肺炎, 細気管支炎の臨床像を示し, 小児でも, 気管支炎症状などを示す。

RS virus は, 秋から冬にかけて, 乳幼児および小児に初感染し, しばしば流行もみられ, ことに乳幼児は細気管支炎や肺炎などをおこし, 重症の経過をとることが少なくない。再感染をみることも多く, この場合は普通感冒の型をとる。青年期では parainfluenza virus や RS virus に対しほとんど 100% 抗体を保有するようになる。

なお麻疹の場合 measles virus によって, ときとして麻疹肺炎などが, 流行性耳下腺炎の場合, mumps virus によって, かぜ様症状を示すことも知られている。

3) Adenovirus は, 36の型があり, 急性熱性咽頭炎, 咽頭結膜熱, 気管支肺炎, 流行性角結膜炎などの気道感染症をおこし, その他, 無菌性髄膜炎, 発疹症, 出血性膀胱炎などの病原ともなる。咽頭炎は 1, 2, 3, 4, 5型などが多く, 気管支肺炎は, 3, 3a, 3-7 中間型, 咽頭結膜熱は, 3, 7型, まれに14型などによっておこる。プール熱ともよばれ, 学校の泳プールなどで増幅されしばしば大流行をおこす。流行性結膜炎は, 学童の検眼などで流行することもある。8型が多い。

4) Enterovirus は polioviruses, Coxsackie viruses および echoviruses に分類され, coxsackie-virus は A 群および B 群に大別され, 呼吸器感染のほか, 無菌性髄膜炎, 発疹症, 心筋炎その他多彩な臨床像と流行もしばしば大流行をおこす。Echovirus もまた気道感染その他多様な臨床像を示し流行する。これらはとくに夏かぜの

病因となることが多い。Poliovirus も麻痺をおこす前に、かぜ様症状を示すことが知られている。Coxsackie A21型は coevirus としてかぜの原因となる。

5) Herpes simplex virus は単純性疱疹などの発疹症、角結膜炎、脳炎、口腔、口唇あるいは性器感染をおこすなど多彩な病像を示すが、かぜの病原としても注意すべきである。

6) Rhinovirus は現在 113 の型に分けられているが、さらに candidate virus があげられて型数は増すと考えられ、かぜ症候群の主要な病原である。とくに春と秋に多い。流行期にはいくつかの型が入り混じって侵襲する。型によって侵襲の程度に差があり、流行型として、たとえば30型、14型などがある。小児では下気道感染型を示すことが稀でない。

7) Coronavirus は rhinovirus とともに普通感冒の主要な病原である。組織培養で分離された代表株として229E株、器官培養によるOC—43、OC—44その他が知られている。

8) おうむ病の病原として Chlamydia psittaci がある。鳥類飼育などペットブームから、異型肺炎などのときは配慮を要する。症状も軽重さまざまである。

9) Mycoplasma pneumoniae も原発性異型肺炎をおこし、近年検査法の普及とともに小児における流行が確認されることが多い。症状は普通感冒から肺炎までさまざま、また合併症を示すことがある。

10) 細菌としては、従来、Streptococcus hemolyticus, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus などが注目されてきた。しかし、近年、化学療法の進歩に伴う感染症の変貌から宿主の感受性変化などによる日和見感染症の増加がおり、H. influenza, Klebsiella pneumoniae その他のグラム陰性桿菌が主流をしめてきた。なお百日咳など、また Legionella pneumophilla など、特殊なものも念頭におく必要がある。

II. 実験室診断法 (表2)

1. 検体採取

臨床症状を参照しつつ必要な検体を採取する。咽頭ぬぐい液、鼻粘膜ぬぐい液などを、滅菌小綿棒で採取する。うがい液や喀痰でもよい。その他、広く病原を考えて結膜擦過、直腸ぬぐい液、または糞便、髄液などや、発疹部の水疱などを採取することもある。

表2 気道ウイルス感染症の実験室診断のすすめかた

一般細菌検査の場合は、ただちに日常使用の培地に培養するとともに、塗抹標本をつくりグラム染色などをおこなう。必要に応じ血清学的検査もおこなう。

ウイルス検査のためには、検体を2～4 mlの0.5% bovine albumin 加 veal infusion brothあるいは0.5% gelatin 加 Hanks' BSSに採取する。ペニシリン、ストマイその他の抗生物質を少量加える。検体採取の時期と、その部位などは分離率に大きい影響を与える。ただちに接種することが望ましいが、ウイルスは超低温におかないとすみやかに不活化されるものが多いので、検査まで密栓をした小試の検体をドライアイス・アルコール、またはアセトンで急速凍結し、 -70°C 以下に保存する。接種前に融解、冷却遠心し、その上清を接種する。

なお、可及的血清を急性期と回復期のペアで採取することが望ましい。

2. 病原の分離、同定など

1) ウイルスの場合

ウイルスは、生きた細胞がなければ増殖しないので次の手技による。組織培養を主とし、これに発育ふ化鶏卵、実験動物への接種などがおこなわれる。

(1) 組織培養：サル腎(MK)、ヒト胎児腎(HEK)などの初代培養細胞、ヒト胎児肺(HEL)、WI-38などの半連続培養細胞、さらに、HeLa, HEp. 2, Vero, L-132, MDCKなどの樹立細胞を用いる。各細胞の感受性がことなるので、2, 3種以上の併用がのぞましい。細胞を2% 仔牛血清加 Eagle's MEMで維持し、検体を0.2 ml ぐらいずつ数本のチューブに接種し、 33°C で回転培養する(必要あれば器官培養もおこなう)。毎日細胞変性効果(CPE)の有無を観察し、もしCPEが出現すれば、これを次に継代し、種々の性状を検査し、同定し、また血清学的に型別をすすめる。

たとえばinfluenzavirusでは、ふ化鶏卵が一般に用いられるが最近ではMDCK細胞も併用されている。HEK細胞やMK細胞ではA型では著明なCPEが認められないので0.5%ニワトリ赤血球(またはモルモット血球)を用いての赤血球吸着試験(hemadsorption test, HAd)または赤血球凝集試験(hemagglutination test,

HA)をおこない、ウイルスの増殖を確認する。もしウイルスが分離されれば、さらにインフルエンザウイルスの免疫血清を用い赤血球凝集抑制試験(hemagglutination inhibition test, HAI)をおこなって同定する。Parainfluenza virusの分離には、MK細胞やHEK細胞が用いられる。感染細胞では、HAdが陽性になる。中和試験(neutralization test)などで同定する。

RS virusの分離にはHEp. 2細胞が最も感受性が高く、特有なCPE、すなわち合胞体(cyncytium)を形成する。

Adenovirusの分離にはHEK細胞が最も感受性が高いが、HeLa, KB, HEp. 2細胞も用いられる。血清型とウイルス量により多少異なるが、細胞のCPEは特徴的で、cell sheet 周辺より細胞が球形化し、凝塊をつくる。Adenovirus 8型などではCPEの出現まで長日時を要することが多い。同定はHA, NTなどですめる。

Enterovirusの分離、ことにCoxsackie virus B群、およびA群の一部、echovirus, poliovirusなどでは、MK, HEK, HeLa, Vero細胞などが用いられ、CPEはfocusを形成し、きらきら光る円形化細胞出現で始まり、次第に全面に広がる。同定、型別はenterovirusの抗血清を組合せたSchmidt poolによってすすめられる。

Rhinovirusはヒト由来細胞のみで増殖するH型とサル由来細胞でも増殖するM型がある。分離にはHEL細胞を 33°C で回転培養してすすめる(他のウイルスでは 37°C でもよいが、rhinovirusでは 33°C が最もよい)。至適pHは6.8～7.0で、pHが低下すると不活化されるので維持培養液のpHには十分留意する。CPEはenterovirusと酷似している。しかし、CPEの進歩速度はややおそい。Enterovirusとの鑑別は、pH 3.0の酸の中でrhinovirusが速やかに不活化するacid lability testによって大別する。

Coronavirusは組織培養ではL-132細胞を用いるが、器官培養によらなければ不可能なことが多い。

Reovirus, herpes simplex virus(大円形化細

胞や巨細胞の出現) その他も enterovirus に準ずる。

(2) 发育ふ化鶏卵: Influenzavirus A型 (H_3N_2 , H_1N_1 など)の場合には, 8~11日卵の羊膜腔内および漿尿膜腔内接種が用いられ, 接種後 $33\sim 36^\circ\text{C}$ に培養し, 数日後羊水や漿尿液の HA をしらべ, ウイルスの同定は HI による。

その他, mumps virus もこれに準ずる。Herpes simplex virus は, ふ化鶏卵漿尿膜上接種による pock 形成法がよく用いられる。

Chlamydia psittaci の分離にはヒトの場合, 血液, 喀痰, 吐物など, トリの場合は肝, 脾, 糞便が用いられ, マウス脳または腹腔内, またはふ化鶏卵卵黄嚢内接種法による。

(3) 動物: Coxsackie virus A群の大部分の場合は, 生後24時間以内の哺乳(乳のみ)マウスの脳内, または腹腔内に接種する。毎日, 发育, 立毛, けいれん, 麻痺症状を観察する。A群では弛緩性麻痺を生じ, 呼吸麻痺で死亡する。B群も病原性を示し座性麻痺をおこす。病理組織学的変化も特徴的である。夏かぜ, とくにヘルパンギーナなどは Coxsackie virus A群, ついでB群によることが多い。

2) 細菌の場合

咽頭ぬぐい液, 喀痰, 鼻汁, その他を, まず性状を肉眼的に観察し, また臭気の有無をかく。直接塗抹標本を作り, 単染色, グラム染色, または特殊染色をする。検体を, 血液寒天培地, マッコンキー, または SS 培地, チョコレート寒天培地, NAC 寒天培地, SF 培地, ブドウ球菌 No 110培地, カンディダ GS または Sabouraud 培地などに培養する。

嫌気性菌の疑われるときは GAM 寒天培地を用い, Gaspak 法などにより, 百日咳菌では Bordet Gengou 培地, 結核の疑いのある場合は, 3%小川培地などを用いて培養し, 生じた集落について生物化学的性状を検査し同定をすすめる。

Legionella pneumophilla などにも必要に応じ検査する。Mycoplasma pneumoniae は PPLO 寒天培地を用いて分離する。

細菌などは, 化学療法によって生ずる集落の動態が変わり, また正常咽頭細菌叢などの関連に留意するなどの注意が必要で, かぜ症候群の

表 3 小児気道ウイルス感染症よりのウイルス分離 (岩手医大細菌)

Rh: ライノウイルス

RS: RS ウイルス

Inf: インフルエンザウイルス

Ent: エンテロウイルス

Ad: アデノウイルス

Para: パラインフルエンザウイルス

HSV: 単純ヘルペスウイルス

Mix: 重感染

場合, 菌の動きに注目し, 菌交代症などの起こらぬよう配慮する。

なお分離細菌については, 各種抗生物質などに対して感受性を測定し, 化学療法剤選択の参考にする。

3. 血清診断

急性期および回復期(数日後の採血でもよい)のベア血清について, 疑われるウイルスを用いて, 補体結合試験 (complement fixation test, CF), NT, HI などを用いて4倍またはそれ以上の有意の抗体上昇の出現を観察する。

近年 microtiter 法が用いられ, 容易に多種の抗原と, 多数の血清の検査が容易におこなわれるようになった。

また, 酵素抗体法として enzyme-linked immuno sarbent assay (ELISA 法) や蛍光抗体法なども応用できるようになりつつある。

4. 迅速診断

ウイルス分離や血清診断には、数日の日数を要し、生化学的検査などに比し、難点があった。

このため迅速診断法として、蛍光抗体法は、感染組織培養細胞中のウイルス抗原の検出、鼻粘膜上皮細胞塗抹標本による抗原の検出、鼻咽頭分泌物中の細胞における抗原の検出などの方法によって、influenzavirus, RS virus, parainfluenza virus その他の感染症の診断に用いられるようになった。

また電子顕微鏡も influenzavirus, parainfluenza virus, mumps virus, RS virus, coronavirus など比較的大型の特徴的形態を示す。ウイルスなどに試みられつつある。また、多くの乳児や学童の rotavirus や Norwalk agent などの糞便よりの検出に、電顕または免疫電顕法が応用されているのは周知のとおりである。

私たちの小児におけるかぜ症候群よりのウイルス分離成績を示す(表3)。

なお、共同研究者の小川博士は咽頭所見をカラー写真にとり、その治療や臨床経過を追跡し、私たちが病原検査をすすめているが、きわめて有用な成績がえられ、ことにウイルスと細菌感染に著差のあることなどをみとめつつある。

おわりに

かぜ症候群などの気道感染症の病原診断は、現在は“influenza 様疾患の流行の場合には influenzavirus を”というように、特定の病原のみを検査する傾向がある。しかし小児のかぜの病原が、その少なくとも70~90%がまずウイルスによるという現状からは不十分であり、また influenza 様疾患は、ただちに influenzavirus によるという考えとともにあやまりである。またしばしば、ウイルスの重感染もみられる。ことに本邦では、ウイルスと呼吸器感染を総合的に検索している機関が少ない。とくに rhinovirus などにはその傾向があり、欧米のそれに比し遅れているといわざるをえない。

また細菌の一次、または二次感染としての役割も少なくない。したがって、かぜ症候群の病原診断は、必ずウイルス学および細菌学の検査の併行が必要であり、これなくしては万全を

期しえない。私たちは長年月にわたり、この方面の臨床微生物学的研究をすすめてきたが、まずウイルス分離として組織培養、必要に応じふ化鶏卵、哺乳マウスなどを加え、幅広く病原検索をおこなうことがよいと思う。また血清診断を同時にすすめ、また迅速診断も必要に応じ用いたい。もちろん細菌学的検査を実施すべきことはいうまでもない。

気道感染症は、最もしばしばみられ、臨床上重要でありながら、その検査態勢は必ずしも十分とはいえない。したがって、今後のさらに進歩がのぞまれ、その成績を速やかに提供することにより、臨床の診断、予防、治療にいささかでも役立ちたいものと念願している。

文 献

- 1) Kawana, R.: Clinicovirological studies of the cold syndrome, with primary reference to rhinoviruses and coronaviruses. *Asian Medical J.*, 21: 631-661, 1978.
- 2) Matumoto, M.: Newer respiratory disease viruses in Japan and some far eastern countries. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 88: 46-54, 1963.
- 3) Jackson, G. G. and Muldon, R. L.: Viruses causing common respiratory infections in man. Univ. Chicago Press, 1973.
- 4) Tyrrell, D. A. J.: Common colds and related disease. Edward Arnold, London, 1965.
- 5) Rose, N. R. and Friedman, H.: Manual of clinical immunology, Second Ed., Amer. Soc. for Microbiol., Washington, D.C., 1980.
- 6) Lennette, E. H., ed.: Manual of clinical microbiology. Amer. Soc. for Microbiol., Washington, D.C., 1980.
- 7) Kurstak, E. and Kurstak, C., ed.: Comparative diagnosis of viral diseases I. & II., Academic Press, New York, 1977.
- 8) Evans, A. S., ed.: Viral infections of Humans, Plenum Med. Book Co., New York, 1976.
- 9) 川名材治: 日常診療における気道感染症(かぜ症候群)の病原検査, *臨床小児医学*, 27: 349-357, 1979.
- 10) 川名林治: 鼻かぜの基礎的問題, *耳鼻と臨床*, 25: 501-518, 1979.
- 11) 川名林治: かぜの疫学, *からだの科学*, 98: 40-46, 1981.

別刷請求: 〒020 盛岡市内丸19-1
岩手医科大学医学部細菌学教室
川名 林治