

# 長崎及び佐保世地区児童間の Coxsackie Virus の潜在感染

長崎大学風土病研究所病理部 (主任: 登倉登教授)

林  
はやし

薫  
かおる

長崎大学風土病研究所病理部 (主任: 登倉 登教授)

長崎大学医学部整形外科教室 (主任: 永井三郎教授)

田  
た

口  
ぐち

厚  
あつし

---

Latent Infection of Children with Coxsackie B Group Viruses in Nagasaki and Sasebo City. Kaoru HAYASHI, Pathological Department, Research Institute of Endemics, Nagasaki University (Director: Prof. Dr. N. TOKURA), Atsushi TAGUCHI, Pathological Department, Research Institute of Endemics, Nagasaki University (Director: Prof. Dr. N. TOKURA), and Department of Orthopedic Surgery, Faculty of Medicine, Nagasaki University (Director: Prof. Dr. S. NAGAI).

---

我国に Coxsackie virus の感染が潜在することは、1952年福見等が健康人血清について Coxsackie A<sub>1</sub>~A<sub>3</sub> 及び B<sub>1</sub> virus に対する抗体分布を検査したことによって初めて知られ、その後、本 virus の感染症が注目されて以来、主としてA群 virus による所謂 herpangina の疫学的調査が行なわれたのであったが、甲野等 (1960) によって四国、中国の瀬戸内海沿岸における Coxsackie B5 virus の流行発生例が経験され、次いで、日沼等 (1961) による四国高知地方での調査が行なわれ、我国における本群 virus による感染症の臨床的並びに疫学的様相も次第に明らかにされつつある現況である。我々はさきに polio 流行に混在して、1 熱性疾患児から一定のMS細胞変性 virus を分離し、それが Coxsackie virus B5 であることを診定し、当長崎地方における児童間の本群 virus による浸淫が予想されたので、たまたま polio 予防対策のため行ないつつあった長崎地区の保育園児の糞便からの enterovirus の検索を行ない、並びに、polio 中和抗体の分布調査のために長崎及び佐保世地区の幼稚園児及び小学児童から採血して血清を分離し、-20°C に保存した血清について先ず Coxsackie B<sub>1</sub>~B<sub>5</sub> virus を抗原として補体結合反応で screening し、その陽性血清について同群 virus の中和抗体によって型別し、感染型の

推定を行なった。検査はなお一部続行中であるが、当地方の児童間にこの種の virus の浸淫が意外に濃厚であることを知ったので、これまでの成績について述べ、また九州地方でのこの種の virus の浸淫は未だ知られていないので一般の注意を喚起せんとする次第である。

## 実験材料及び方法

1. 組織培養: 教室で継代保存中の HeLa, F L, 及びMS細胞を使用し、growth medium には10%牛血清加 Hanks 液を用い、virus の分離、中和試験、補体結合性抗原の作成等には、前日 growth medium をすてて、Puck 液で洗滌した後、10% skim milk 加 Earl 液を maintenance medium とし、それに virus を培養した。

2. Virus の分離: Penicillin 及び Streptomycin を追加した Earl 液 10ml に糞便約 2~3g を混和して、上澄 3000rpm/20分遠心した後、上清の 0.2ml を細胞培養管に接種した。Virus 分離後、同一細胞系で3回継代してから、その力価を測定し、100TCD<sub>50</sub> の virus 量を求めた。

3. 分離 Virus の同定: 分離 virus 液1.0~1.5ml を14日間隔でニワトリの翼静脈から注射し、最後の注射から21日目に採血し、血清を分離し、非働化した後、

その中和抗体価を測定して、1000TCD<sub>50</sub>の分離 virus 量を中和するに要する稀釈濃度を定めた。抗分離 virus ニワトリ免疫血清稀釈液 0.4ml と ECHO virus type 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 及び Coxsackie B1, B2, B3, B4, B5 の各 100TCD<sub>50</sub> virus 液 0.4ml とを混和し、37°C/2 時間中和した後、その混液の 0.2ml を細胞培養管に接種し、9 日間観察した。また、後日入手した Difco 製 Coxsackie B 群 virus 標準株家兎免疫血清を用いて、同様な中和試験によって分離 virus の同定を確認した。

4. 被検血清：Polio 中和抗体測定のため1961年6月13日から7日間及び6月22日にそれぞれ長崎市内及び佐世保市内の幼稚園児（5才児）、小学児童（6～8才児）の採血後血清を分離し、-20°Cに保存したもの、熱性疾患児の血清、及び Sabin 型弱毒生 virus vaccine 服用後の幼児の血清をも併試した。

5. 中和抗体の測定：100TCD<sub>50</sub> の Coxsackie B 群標準 virus 及び分離 virus 液 0.4ml と非働化した被検血清の2倍階段稀釈液 0.4 ml とを混和し、37°C/60分保った後、その 0.2 ml を2本の細胞培養管に接種し、成績は6日目に判定した。

6. 補体結合反応：抗原には MS 細胞で継代した Coxsackie B1～B5 virus 液に凍結融解を反復した後、3000 rpm で30分遠心した上清の virus 量を MS 細胞で測定して（それは毎常  $10^{4.2} \sim 10^{5.6}$  であった）使用した。溶血素血清、乾燥補体は市販の東芝化学製品であって、予め溶血素価、補体価を測定し、抗原の抗補体作用のないことを確かめた後使用した。実験方法は plastic plate による微量法で行ない、抗原の2倍又は4倍稀釈液1滴、(0.02 ml) 血清の10, 20, 40, 80, 160倍各稀釈液1滴 (0.02 ml)、及び30倍補体1滴 (0.02 ml) を平板区劃に滴下し、4°C/18時間保った後、感作血球液を1滴加え、37°C/1時間後判定した。

## 実験成績

1. Polio 流行中に1熱性疾患児から Coxsackie B5 virus を分離したこと：1960年8月長崎市内居住の横川某（当時2年10ヶ月）は38.9°Cの発熱を来し、頭痛を訴え、2日後に解熱し平常のように遊んでいたが、8月12日朝4時頃から再び発熱し（37.9°C）、以来元気なく体は鳥肌立って顔面に油汗を出して甚しい苦悶を呈し、膝蓋腱反射が消失し、polio の疑いが濃厚であったので、担当医師から当大学小児科学教室

へ送院されて来た。当時、嘔吐、下痢はなく、特に運動障害もなく、髄液は水様透明であったが、pleocytosis があって、髄圧は200 Hg mmを示した。髄液の結核菌染色及び後日の培養成績は陰性であった。入院後2日間は38°C前後の発熱あり、3日目に解熱したが、8月12日採便及び採血した検体について検査の依頼があった。MS 細胞を用いて、定法に従い、糞便内 virus の検出を試み、一定の MS 細胞変性 virus を分離し、これを N25 株と仮称した。既述のように、抗 N25 ニワトリ免疫血清で既知の標準株を用いて中和試験を行ない、それによって Coxsackie B5 virus が完全に中和されることを知った。また、Difco 製抗 Coxsackie B 群 virus 家兎免疫血清を用いて分離 N25 株について中和試験を行ない、それが B5 免疫血清で完全に中和されることが判かり、分離 virus を Coxsackie B5 と診定した。患者血清の分離 virus に対する中和抗体は発病当初16倍、20日後には128倍と8倍の抗体上昇が見られた。

2. 保育園児の検便成績：1960年4月から8月にかけて長崎地方としてはかなり大きい polio の流行があったが、(林 薫、長崎大学風土病紀要, 3 (3) : 145—152, 1961), その際、上記の Coxsackie B5 virus の浸淫があることが推定された。また一つには polio 流行の兆を早期に把握するという目的もあって、特に人家の密接した地区にある保育園6ヶ所を指定し、1961年3月、5月、及び7月と隔月に検便を行なって、enterovirus の検出につとめた。成績は第1表に示されるように、園児359名中6名から MS 細胞変性 virus を分離した。これらの分離 virus をそれぞれ N19(友

第1表 保育園児の検便成績

保育園	3 月	5 月	7 月
小ヶ倉	58	34 (1)	30
緑ヶ丘	39 (1)	10	31
愛宕	30 (1)	20 (1)	30
坂本	10	14	
山里	32 (2)	12	
稲佐	9		
合計	178(4)	90(2)	91(0)
	359(6)		

備考：( ) 内は MS 細胞変性 virus を検出した園児数を示す。

川), N23 (椿山), N40 (田中), N101 (一瀬), N202 (坂本) 及び N243 (小宮) と称し, このうち, N19 及び N23 は同一保育園から検出されたものであった。

3. 分離 virus の同定: 成績を一括して第 2 表に示した。分離 virus のうち, N25 (横川) 株と N101 (一瀬) 株のニワトリ免疫血清を作成し, 分離 virus 間相互に, また Coxsackie B 群 virus 標準 5 株及び echo virus (1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 12) 標準 9 株を用いて, それぞれ中和試験を行なったところ, 抗 N25 血清では Coxsackie B 5, N19 (友川) 株及び N23 (椿山) 株が共に完全に中和され, 抗 N101 血清では Coxsackie B 3 及び N243 (小宮) 株が中和されたが, N40 (田中) 株及び N202 (坂本) 株は上記のいずれの血清にも中和されなかった。また, Difco 製品の抗 Coxsackie B 群 virus 各型の家兎免疫血清を用いて分離 virus の中和試験を行ない, N25 (横川), N19 (友川), N23 (椿山) の各 virus は Coxsackie B 5 免疫血清で, また N101 (一瀬), N243 (小宮) の 2 株は Coxsackie B 3 免疫血清でそれぞれ完全に中和されることが確認された。1961年 8 月 10 日, 一過性の両下肢脱力感を伴い, 発熱, 頭痛等を訴えた久留 某 5 才児の糞便から一定の MS 細胞変性 virus を分離し, これを N274 (久留) 株と仮称したが, 本分離 virus は抗 N25 (横川) 並びに抗 101 (一瀬)

ニワトリ免疫血清及び Coxsackie B 群各型家兎免疫血清で中和されず, その同定に関する実験はなお継続中である。

4. 長崎及び佐世保地区児童の血清の Coxsackie virus に対する補体結合反応: 1961年 6 月, polio 中和抗体測定のために採血分離した血清のうち, 長崎地区の幼稚園児 147 件, 小学児童 120 件合計 267 件, 佐世保地区の 240 件, 合計 507 件の血清について Coxsackie B 群各型 virus を抗原とし plastic plate による微量法で補体結合反応を実施した。その成績は第 3 表に示されるように, 一般に各型間に互る類属反応がみられるものが多く, 長崎地区で 24 件, 佐世保地区で 39 件に及び, 1 種の抗原に単独に反応したものは Coxsackie B 1 抗原に長崎地区 4 名, 佐世保地区 1 件, Coxsackie B 3 抗原に長崎地区 1 件佐世保地区 2 件, Coxsackie B 5 抗原に長崎地区 6 件, 佐世保地区 3 件, 合計 17 件であった。これらを総合すると両地区で 80 件 (被検血清件数に対して 15.8%) の補体結合反応陽性血清が得られ, 型特異性は認められないとはいえ, 長崎及び佐世保地区の児童間には Coxsackie virus による比較的新しい感染があったことが推察された。

第 2 表 分離 virus の性状と診定

virus	患者血清 の中和抗 体上昇	C P E 発 現	抗分離株ニワトリ免疫 血清による中和試験		診 定
			血 清		
			抗No. 25 (1: 250)	抗No. 101 (1: 50)	
● N 25 (横川)	16— 128	MS>HeLa>FL	Yes	No	Coxsackie B5
N 101 (一瀬)	?	FL>HeLa>MS	No	Yes	Goxsackie B3
N 202 (坂本)	?	MS, HeLa>FL	No	No	?
N 40 (田中)	?	MS, HeLa>FL	No	No	?
N 19 (反川)	?	MS, HeLa>FL	Yes	No	Coxsackie B5
N 23 (椿山)	?	MS, HeLa>FL	Yes	No	Coxsackie B5
N 243 (小宮)	?	MS, HeLa>FL	No	Yes	Coxsackie B3
● N 274 (久留)	?	MS, HeLa>FL	No	No	?

備 考: (1) 診断は抗分離 virus (No. 25 及び No. 101 を代表) ニワトリ免疫血清を用いて既知標準 virus の中和試験, 及び抗標準 virus 免疫血清を用いて分離 virus の中和試験によった。

(2) ●印は熱性疾患児を示す。

(3) C P E 欄中 > 付号は使用細胞による変性の差違を示した。

第3表 長崎及び佐世保地区児童血清の  
Coxsackie B群 virus に対する  
補体結合反応成績

地区別血清	長	崎	佐	世	保
抗原					
B 1 ~ B 5	18			36	
B 1 ~ B 3	0			2	
B 1 ~ B 2	3			0	
B 2 ~ B 5	0			1	
B 3 ~ B 5	3			0	
小 計	24			39	
B 1	4			1	
B 3	1			2	
B 5	6			3	
小 計	11			6	
合 計	35 (13.1%)			45 (18.6%)	
	80(15.8%)				

備考：(1) 成績欄中の数字は補結反応陽性血清件数であつて、括弧内には被検血清件数に対する補結反応陽性血清件数の百分比を示した。

(2) 検査件数は長崎地区267件、佐世保地区240件、合計507件である。

#### 5. 補体結合反応陽性血清の感染型を推定したこと：

既述のように、Coxsackie B群各型を抗原とする補体結合反応で単一型抗原に反応した被検血清は80件中僅かに17件(3.4%)であつて、ほとんどすべて類属反応を示したので長崎地区の児童血清 267件のうち、Coxsackie B群 virus に対して補体結合反応が陽性を示した35件について、MS 細胞を用いて Coxsackie B群各型 virus による中和試験を試みた。

被検血清のうち、Coxsackie B 1 virus を中和したもの6件(保育園児)、B 3 virus を中和したもの2件(保育園児)、B 5 virus を中和したもの18件(保育園児14件、小学児童4件)であつて、これらの被検血清の補体結合性抗体の存在と考え併せるとき、長崎地区児童間には明らかに上記の Coxsackie virus B 1, B 3, 特に B 5 の浸淫が濃厚に起こつていたことが推察された。補体結合反応陽性血清35件のうち、4件については中和抗体の存在を認めず、感染型を推定することは出来なかつた。また、佐世保地区小学児童血清の中和試験は、なお目下検査を継続実施中である。

第4表 長崎地区児童の Coxsackie virus  
感染型

児童別血清	保育園児	小学児童
virus型		
Coxsackie virus		
B 1型	6/147 (4.1%)	0/120 (0)
B 3型	2/147 (1.3%)	0/120 (0)
B 5型	14/147 (9.5%)	4/120 (3.3%)
合 計	27/147 (18.3%)	4/120 (3.3%)
	31/267 (11.3%)	

備考：(1) 児童血清の Coxsackie B群 Virus に対する補結反応陽性のものについて中和試験を行なつて感染型を推定した。

(2) 補結反応陽性血清中4件について中和試験による感染型を確認出来なかつた。

(3) 佐世保地区の被検血清はなお実験を継続中である。

#### 考察並びに要約

Coxsackie virus は、DAIMDORF によつて、1948年 A群 virus が発見され、1950年 B群 virus が発見されたが、現在、前者は 1~24型に、後者は 1~6型に型別されるに至つてゐる。これらの virus の発見当初は、その病原的意義は明らかではなかつたが、1950年 WEINER等の研究は B群 virus が胸腹痛症(pleurodynia)の原因であることを知る端緒となり、また、1951年 HUEBNER 等によつて A群 virus 感染症の病因解明の先鞭がつけられたが、このほか髄膜炎症状やかせ様疾患の不全型が両群 virus によつて起こることが次第に明らかにされてきた。我国における Coxsackie virus 感染については、1952年福見等が健康人血清について Coxsackie A1~A3 及び B1 virus に対する抗体がかなり広く分布していることを指摘し、その後、内山等(1952)、横田(1955, 1956)、中村等(1957)、北本等(1957)、浜本等(1960)によつて主として A群 virus による所謂 herpangina に関する調査研究が行なわれ、B群 virus に関するものは極めて少なく、1960年東北大学及び大阪大学小児科でそれぞれ1株ずつの Coxsackie B3 virus が分離されたと言われていたが、最近、甲野等(1960)は四国瀬戸内海沿岸に Coxsackie B5 virus の流行発生例を経験し、臨床的及び病原的調査を行ない、その詳細について報告した。

その後、坪崎等 (1960) は四国高知地方における Cocksackie B1 及び B5 virus の感染例について述べ、日沼等 (1960) は東北地方に流行した髄膜炎を主症状とする患者から Cocksackie B5 virus を分離したが、これらの事実は本群 virus が我国でも意外に広い範囲に分布していることを物語るものといえよう。我々は1960年長崎地方についてはかなり大きい polio の流行に遭遇し、その際、1熱性患児から Cocksackie B5 virus を分離し得たので、当地方におけるこの種の virus の児童間における侵淫が予想されたが、たまたま、polio 予防対策の1環として行いつつあった保育園児の糞便から enterovirus の分離と polio 中和抗体測定のため採血した幼稚園児及び小学児童の血清を用いて、Cocksackie B1~B5 virus を抗原とする補体結合反応を行ない、かつ screening した陽性血清について中和試験を実施して、本群 virus による当地方児童間の潜在感染とその型分布を検査した。同一血清についてこのように補体結合反応と中和試験とを重複して検査を行なった理由は、Cocksackie virus 感染症において補体結合性抗体が中和抗体に先行し、かつ前者は非特異的で、後者は型特異的といわれるためであった。

成績は第4表のように、B1 virus に対する補結抗体及び中和抗体を持ったもの4.1%、B3 virus に対して1.3%、B5 virus に対して6.8%(保育園児9.5%、小学児童3.3%)であって、特にB5 virus の侵淫が濃厚に起こっていたことが判明した。また、保育園児の糞便から Cocksackie B5 virus 2株、B3 virus 2株が分離され、血清疫学的検査成績が確認されたが、一方、1961年8月10日下肢脱力感を伴った熱性患児久留某の糞便から一定のMS細胞変性 virus が分離され、本 virus の診断は未確定であるとはいえ、この種の virus の侵淫も調査の要がある。また、1961年7月から全国一斉に Sabin 型生 virus vaccine の服用が実施されたが、既述のように幼児の糞便中に検出される Cocksackie B群 virus 及び同定不能の分離 virus 等が vaccine 株 virus の腸管定着に果たして干渉するものか否か、即ち免疫効果の有無に関する重要な問題を含んでいるが、これらについては将来検討さるべきものと思う。

摺筆に当たり恩師登倉教授の御鞭達と御校閲に深謝し、また終始実験に協力された山口泰世嬢に謝意を表します。

## 参 考 文 献

- 1) Dalldorf, G: The Cocksackie Group of Virus. Science, 110: 594, 1949.
- 2) Dalldorf, G: The Cocksackie Viruses. Bull. N. Y. Acad. Med. 26: 329~335, 1950.
- 3) 福見秀雄, 横田強: Cocksackie virus 病, 病原的研究. 日医新報, 1455: 860~867, 1952.
- 4) Heubner, R. T., Cole, R. M., Beeman, E. A., Bell, T. A. et Peers, T. H.: Herpangina; Etiological Studies of a Specific Infectious Disease. J. A.M.A., 145: 628~633, 1951.
- 5) 日沼頼夫, 宮本勉, 村井良通, 氏家八良, 清水義信, 石田名香雄, 中尾享, 荒川雅男, 大井昌也: 1961年東北地方に流行した Cocksackie B5 virus による無菌性髄膜炎のウイルス学的検索. 第9回日本ウイルス学会総会演説抄録, 34~35, 1961年10月, 東京.
- 6) 北本治, 舘野功, 前田竹磨, 伊藤昭: 茨城県下に流行したヘルプアンギーナについて. 日医新報, 1718: 9~11, 1957.
- 7) 甲野礼作, 芦原義守, 浜田忠弥, 古川元宣: 四国地方に流行中のコクサツキーウイルスB5感染症. 日医新報, 1898: 16~19, 1960.
- 8) 中村兼次, 渡辺悌吉, 増田義一, 石川昭, 福見秀雄, 横田強, 平山雄: 昭和30年夏季東京地方にみられたヘルプアンギーナの流行について. 日医新報, 1733: 38~43, 1957.
- 9) 坪崎治男, 小野義三, 山本幸直: 高知県におけるコクサツキーウイルスB1及びB5の分布に関する研究. 第9回日本ウイルス学会総会抄録, 35, 1961年10月, 東京.
- 10) 内山敬司, 川上定太郎, 酒寄淳見, 小笠原晃, 石神省吾: Cocksackie virus 病 (局地的小流行を見た不明熱性疾患) 疫学的並びに臨床的観察. 日医新報, 1455: 855~860, 1952.
- 11) Weller, T. H., Enders, T. F., Buckingham, M. et Finn, T. T.: The Etiology of Eepidemie Pleurodynia: A study of two viruses isolated from a typical outbreak. J. Immunol., 65: 337~346, 1950.
- 12) 横田強: 日本におけるA群コクサツキーウイルスの型分布. ウイルス, 6: 461~471, 1956.

### Summary

One strain of Coxsackie B 5 virus was isolated from the feces of a patient suffering from poliomyelitis like disease in an epidemic of poliomyelitis which broke up in Nagasaki prefecture in 1960. This fact seemed to suggest that some children should be contaminated with such a virus in this city. Feces samples collected from 359 healthy children (5 years old) were examined for enteroviruses with tissue culture from April to July in 1961. Three of them were identified as Coxsackie virus type B 5, and two of them as Coxsackie B 3 by means of neutralization test. The last one was unidentified.

As far as 507 sera collected from children in Nagasaki and Sasebo city were concerned, it was found that 35 of 240 sera in Nagasaki city (13.1%) and 45 of 259 sera in Sasebo city (18.6%) indicated a positive complement fixing antibody response against Coxsackie viruses from type B 1 to B 5. But there were group reactions for the most part. For further estimation of the infecting type of Coxsackie B group viruses, 35 sera above described were brought into the neutralizing test therewith, and a result was obtained that six of them neutralized Coxsackie B 1 virus, two of them Coxsackie B 3, and 18 of them Coxsackie B 5. Four of them were unidentified. It was first found that these Coxsackie viruses were distributing among children in Kyushu district.

(HAYASHI, K.)

---

Received for publication May 16, 1962.