



兵 庫 県

衛研レポート



「衛研レポート」の発行再開によせて

震災後、約8か月が経過し、被災地の倒壊した建物の解体も進み、空き地が目立つようになり、街並みの景観が一変しました。

神戸市の兵庫区と中央区の境界線上に近い兵庫県立衛生研究所は、幸いにも震度7の激震地区を免れたため、建物には大きな被害はありませんでしたが、検査機器は壊滅的な損壊を受けました。また、幸いにも当衛生研究所では、昭和53年の宮城沖地震後薬品棚の倒壊防止対策を講じていたため、化学薬品による火災を免れることができました。

震災直後、ライフラインの破壊により約1か月余り上水と都市ガスの供給が止まり検査も一部を除いて不可能な状態になりました。特に損壊機器の更新と修理のため、高度な検査機能はしばらくの間中断せざるを得ませんでした。このため、他府県の研究機関の援助を仰ぎましたが、6月末までには検査機器の修理を終え、また、損壊した機器も購入され検査体制は復旧しました。

一方、今年全国的に大流行となったインフルエンザは、兵庫県では震災の翌週が最大の流行時と重なったため、劣悪な環境にある避難所

を中心に患者の急増が懸念されましたが大きな流行とならずに終息したようです。また、夏季が近づくにつれて下痢症などの集団発生が心配されましたが、現在のところ心配はなさそうです。これは、医療ボランティアを始めとする医療チームの活躍と劣悪な環境の中でも一定の衛生環境がボランティアや住民の協力で維持できたことによると思われ、日本の衛生思想が徹底されているものと考えます。

今回の震災を教訓に、災害に強い研究所を目指した動きが始まっています。また、震災を受けた都市の復興は、長期ビジョンをもとに始まっていますが、十分な防災対策がなされた美しい新しい街並みの完成を願ってやみません。

当衛生研究所もようやく落ち着きを取り戻し、調査研究を始めるようになり、「衛研レポート」の発行を再開する運びとなりました。この間、ご援助をいただきました県当局、近隣府県の地方衛生研究所を始めとする研究機関に対し厚くお礼申し上げます。

(「衛研レポート」編集部)

エンテロウイルスの流行

エンテロウイルスは、一般に夏期を中心として流行し、夏かぜ、無菌性髄膜炎、手足口病および発疹症などさまざまな疾患をひきおこします。現在知られているヒトエンテロウイルスは中和試験という方法により 68 種類に分類され、毎年流行する型（血清型）と臨床像が変化するためウイルスの分離同定が必要です。たとえば兵庫県でエコーウイルス 9 型による無菌性髄膜炎が大規模に流行しているということが判明していれば、臨床医が診断する上での参考になり、行政的にも流行防止のための施策を実行する資料となります。流行株の型を予測することは、その種類の多さから難しいのが現状です。しかし、分離状況から大まかな傾向は把握できますので、エンテロウイルスを、コクサッキーウイルス A 群、B 群、エコーウイルスおよびエンテロウイルス 71 型に分けてその分離状況と予想される流行型について書いてみます。

当研究所では、93 年より患者および下水からエンテロウイルスの分離同定を行っていますが、93 年は患者検体からエコーの 3 型、11 型、コクサッキー B 群の 5 型が分離され、下水からこれら 3 種類に加えてエコー 7 型が分離されました。西脇保健所管内ではエコー 9 型が髄膜炎患者から多数分離されました。94 年は、患者検体からコクサッキー A 群の 6、10、16 型、B 群の 1、2 型、エコーの 7、9、11 型、エンテロ 71 型の計 9 種類のエンテロウイルスが分離され、下水からはコクサッキー B 群の 2 型が分離されました。

コクサッキー B 群は 6 種類あり、年ごとに流行型が変わる傾向があります。過去 2 年に 5、1、2 型と流行し、今年も、1 月に下水、6 月に無菌性髄膜炎患者（7 歳男子）の髄液と咽頭ぬぐい液から 3 型を分離しました。流行の始まる前に下水からウイルスが分離されるのは前駆波と呼ばれ、コクサッキー B 群で報告されています。それ故、95 年は 3 型の分離状況が注目されま

す。コクサッキー A 群は 94 年に 10 型がヘルパンギーナ等の患者から分離され、全国的にも 10 型の分離が最多でした。95 年は、手足口病が大規模な流行を起こしていますが、我々は、7 月はじめの段階で手足口病患者 2 名と感染性胃腸炎患者 1 名から 16 型を分離しています。今回の流行が、このウイルスによるものかどうか現在も分離同定を継続中です。

エコーウイルスの流行は、コクサッキーウイルスと比べて全国的なものになりやすい傾向にあります。病原微生物検出情報で過去 2 年間に分離件数が多かった型は、93 年が 11 型、9 型、7 型で、94 年が 9 型、3 型、25 型でした。これは、94 年に 25 型が分離されていないことを除けば、兵庫県での分離結果とよく一致していました。9 型は、90 年以降全国的な分離報告が毎年続いている、93 年に 200 件をやや下回ったものの、毎年 400 件程度分離されています。5 年にわたって全国的な分離が続いていたのは、局地的な流行をしているためと考えられ、94 年に兵庫県の阪神地区で 9 型が分離されなかったことから、この地区で流行する可能性があります。エコーウイルスは血清型によって無菌性髄膜炎を引き起こしやすい型があり、4、6、7、9、30 型などは特に注意が必要です。

エンテロウイルス 71 型は、1973 年から日本で分離されるようになり、手足口病の病原ウイルスとされています。94 年には阪神地区、西播地区から多数分離されました。

エンテロウイルス感染症は、生後 1 年以内に中枢神経系感染をおこした場合の続発症が報告されています。細菌感染における抗生物質のような特効薬がエンテロウイルス感染症にはありませんので、乳幼児への感染には特に注意が必要です。乳幼児の生活環境を清潔に保つことが重要です。

（微生物部：藤本 嗣人）

PCR 法による病原微生物の検出（その 3）

【増幅 DNA の検出】

PCR で増幅された DNA は、単にその増幅の成否を確認するだけにとどまらず、これを加工すると色々な情報を得ることもできます。

・電気泳動法

PCR で増幅した目的遺伝子をアガロース・ゲルを用いて電気泳動した後、エチジウムブロマイドでゲル全体を染色します。この色素は二本鎖 DNA に取り込まれ、染色後のゲルは紫外線をあてると、色素がオレンジ色に輝き DNA の位置が明らかになります。アガロースで電気泳動を行うと、短い DNA ほど陰極から陽極へと大きく移動することから、移動距離で DNA の大きさを測定できます（図 1）。さらに、増幅した DNA の大きさを比較することで、DNA の部分的な欠失などの変異も調べることができます。

・制限酵素による切断

特定の塩基の並びを確認して、これを切断することができる様々な制限酵素がありますが（例えば Bam H I 酵素は G / GATCC の配列だけを認識し “ / ” の部分で DNA を

切断します）増幅 DNA にこれらの酵素の切断サイトが存在する場合、この酵素を作用させると増幅 DNA は 2 本あるいはそれ以上に切断されます。もし、この切断サイトが変化した時には酵素が働かないことから、変異を確認できます（図 2）。

・オリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーション

増幅に用いたプライマーとは別の、しかも両プライマーでは含まれた領域に含まれる同じ配列のオリゴヌクレオチド（これを放射性物質で標識したものをプローブと呼んでいます）を増幅 DNA と反応させると、これを検出することができます。このためには、DNA をナイロン膜に結合させなくてはなりませんが、増幅 DNA をそのまま膜にスポット（ドットプロット法）したり、電気泳動したゲルから移す（サザンプロット法）方法があります。

また、ハイブリダイゼーションの反応条件を厳しくすると、プローブの標的 DNA に 1 塩基でも違いがあると、反応しなくなることを利用して（ASO）突然変異を検出できます。

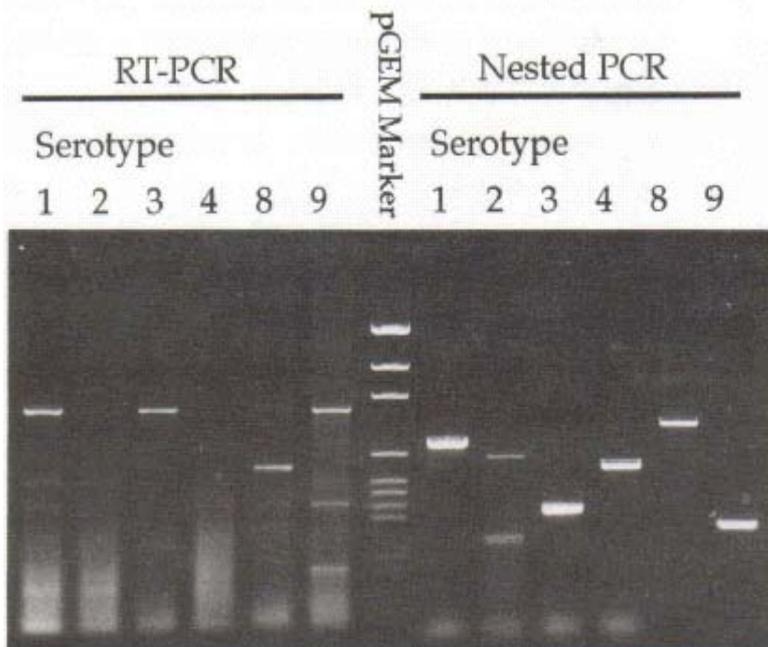


図 1

乳児に下痢をおこすロタウイルスの PCR このウイルスの遺伝子は RNA であるから、RNA を一旦 DNA に造り直してから PCR を行った（RT-PCR）。また、この写真、では、ロタウイルスを分類するために、1 回増幅した DNA を、分類用にデザインしたプライマーで、再度 PCR を行っている（Nested PCR）。2 回目の PCR で増幅された DNA はウイルスのタイプによってサイズが異なるため、電気泳動での移動距離をもとにウイルスを分類できる。

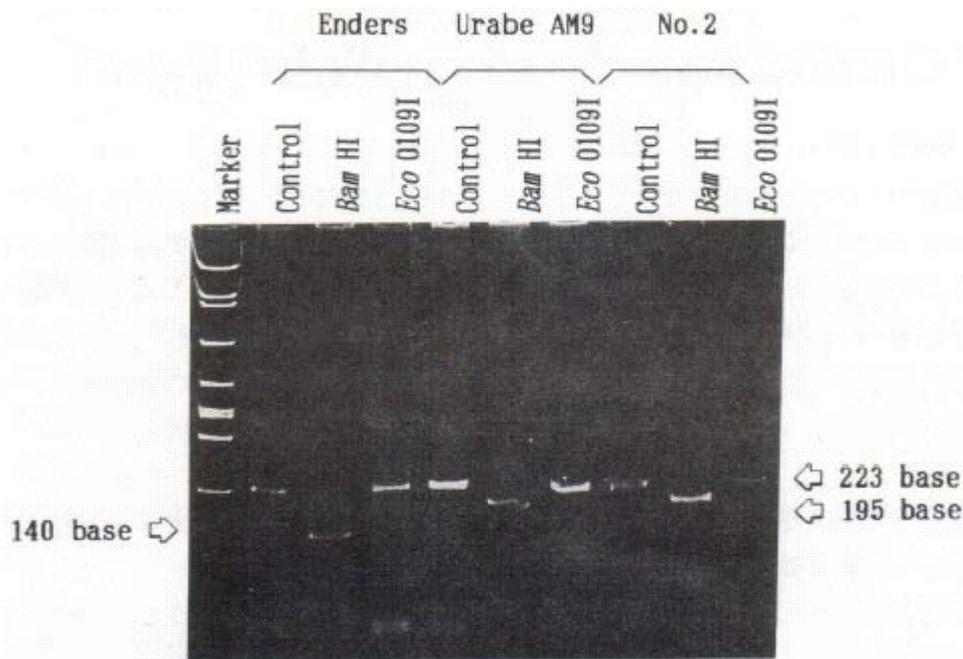


図 2

ムンプスウイルスの、ワクチン株の同定。ムンプスの予防接種をすると、ワクチンに用いたウイルスがまれに無菌性髄膜炎を起こすことがある。ワクチン接種後に髄膜炎を発症した患者の髄液から分離したウイルスがワクチン由来であるか、あるいは自然感染によるかを判断するために、分離したウイルスの核酸をもとに RT - PCR を行い、223 塩基の DNA を増幅する。ワクチン株 (Urabe AM9) は Bam HI の切断サイト (G / GATCC) を持つため 195 と 28 塩基に切断されるが、Eco 01091 のサイトを持たないため、もとの 223 塩基のままである。サンプル No.2 はこれと同じ切断パターンを示すことから、ワクチン株と推定される。

<p>・塩基配列を調べる</p> <p>増幅した DNA の塩基配列を直接決定すると、すべての塩基情報を知ることができます。</p> <p>その外にも、増幅 DNA は SSCP (1 本鎖 DNA 高次構造多型) DGGE (濃度勾配変性ゲル電気泳動) による解析あるいはクローニング等に利用できます。</p> <p>【まとめ】</p> <p>PCR は、細菌ではコレラ菌の毒素産生性や結核菌の検出に、ウイルスでは AIDS の早期診断、オタフク風邪のワクチン株の同定 C 型肝炎ウイルス (HCV) 成人 T 細胞白血病ウイルス (ATL) パピローマウイルス、B 型肝炎ウイルス (HBV) など色々な利用法が考案されています。</p>	<p>PCR が実用化されている微生物は、いずれも従来から行われてきた培養・血清診断が困難な場合や (AIDS、パピローマウイルス) PCR を利用することでさらに有用な情報が得られる場合 (HCV、ムンプス) です。</p> <p>PCR 法が考案されて 10 年が経過しましたが、これまでに様々な分野への利用が試みられた結果、現在ではその限界も明らかとなってきており、感染症診断に限れば、従来法の補完的役割を担う重要な方法となっています。そして、その高感度、高特異性、迅速性ゆえに、今後も様々な感染症診断に利用されると考えられます。</p> <p>(微生物部 : 近平 雅嗣)</p>
---	--

本誌に関するお問い合わせは下記をお願いします。

編集発行 兵庫県立衛生研究所 (078) 511 - 6581 (代)
〒652 神戸市兵庫区荒田町 2 丁目 1 番 29 号