

下痢症に関するウイルス学的研究

佐藤 宏 康* 原田 誠三郎* 庄 司 キ ク*
 金 鉄三郎* 後 藤 良 一* 山 脇 徳 美*
 斉 藤 清津子* 森 田 盛 大*
 佐々木 仁 倫** 加賀谷 弘 美** 天 野 保 二**
 長 沼 雄 峰*** 柿 崎 善 明****

I はじめに

ウイルス性下痢症の病原は、第1に Bishopら¹⁾によって報告された大形(70nm)粒子、即ち rotavirusがあげられる。これは乳幼児の急性胃腸炎の主なる病原ウイルスであり、現在では乳幼児のみならず学童間の流行例も報告されている³⁾。次いで Normalk agent⁴⁾をはじめとする小型(27nm)粒子である。Norwalk agent は parvovirus と考えられ、学童、成人に急性胃腸炎を起すことが知られている。著者らは秋田県大曲市内の保育園で発生した嘔吐下痢症患者の糞便中から IEM (Immuno electron microscopy) によって Norwalk agent と極めて類似の直径約30nmのウイルス様粒子を検出し、すでに報告した⁵⁾。本報では昭和51年12月より秋田市内で発生した小児及び成人の下痢症患者糞便について病原検索を行い検討を加えたので報告する。

II 材料及び方法

A. 材 料

1. 糞 便

昭和51年12月から52年3月、及び52年12月から53年3月までの間に秋田組合総合病院小児科外来で採取した小児下痢症便44検体。並びに昭和52年6~11月、秋田市立秋田総合病院第2内科外来で採取した成人の下痢症便11検体。

2. IEM抗原(糞便抽出液)

下痢症を乳鉢で摩砕し、PBS(-)で乳剤としたのち日立RPR-20ロータで5,000 rpm 30分遠心し、その上清を0.8 μの millipore filter で濾過したものを IEM 抗原とした(図1)。

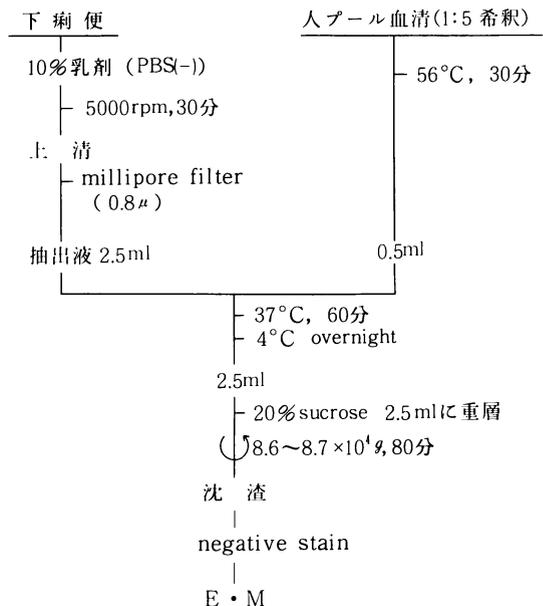


図1. IEMによるウイルス検出法

3. IEM用抗体

小児下痢便からのウイルス検索のための IEM 抗体は年令22~27才までの成人10名の血清をプールし PBS (-) で 1 : 5 に希釈した後56°C30分間加温したものをを用いた。本血清の rotavirus に対する補体結合抗体価は40単位である。一方大人下痢便のウイルス検索には3名の成人下痢患者の回復期血清をプールし同様に用いた。

B. 方 法

1. IEM法によるウイルス検出法

図1に示した如く糞便抽出液 2.5 ml と IEM 用抗体 0.5 ml を 37°C で 60 分間 incubate したのち、4°C で overnight, この試料 2.5 ml を等量の 20% sucrose の上に重層し日立超遠心機 (65P) を用い、RPS-65Tロータで 35,000 rpm 80 分間遠心した。更に pellet を

* 衛生科学研究所微生物部

** 秋田大学医学部研究機器センター

*** 秋田組合総合病院小児科

**** 秋田市立秋田総合病院第二内科

negative stain したのち日本電子 I B-100型を用いてウイルス粒子の有無を検索し、Kapikian ら⁶⁾の方法に準じグリッド 5 区画の総和ウイルス粒子数 1~9 個 1+, 10~99 個 2+, 100~999 個 3+, 1,000 個以上 4+ とし示した。

2. IEM によらない小形粒子の検出法

Bishop らの方法²⁾に準じて行った。即ち糞便抽出液をトリフルオロトリクロロエタン (TF TCE) とポリエチレングライコール (PEG) 6,000 で処理後、遠心沈渣を蒸留水で浮遊した。更に 40% sucrose に重層し 200,000 g 180 分間遠心した。遠心沈渣を少量の PBS (-) に再浮遊し negative stain し I B-100 型で観察した (図 2)。

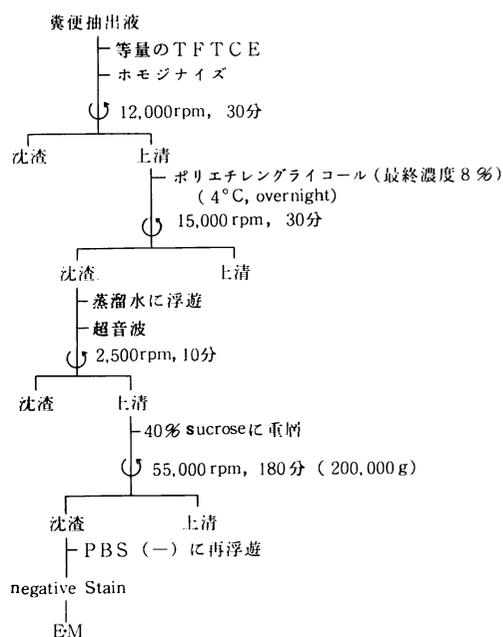


図 2. IEM によらない小形粒子の検出法

3. ウイルス分離, 同定方法

下痢症便を SLEK (抗生物質, ポバイナルブミンを含む LE 培養液) で 10% 乳剤としたのち 10,000rpm 30 分間遠心した。その遠心上清の 0.2 ml を初代カニクイ猿腎細胞に接種し, 37°C で回転培養した。分離されたウイルスの同定は型の如くブル血清と単独の型特異抗血清を用いて行った⁷⁾。

4. 細菌学的検査方法

下痢症便を S S 寒天培地, マッコンキー培地, DHL 寒天培地に塗抹後 37°C で 24 時間培養した。また S S 寒天

培地のみは 20°C 48 時間培養も併用した。培養の結果出現した疑わしいコロニーの同定は順序に従って型の如く行った⁸⁾。

III 結 果

小児下痢症便についての病原検索結果は表 1 に示したとおりであった。即ち病原性が疑われる細菌としては

表 1. 小児下痢症便からの病原検索結果

患者 No.	年令	性	採取年月日	分離成績		I M E 法成績	
				細菌	ウイルス	70nm	40nm
5450	1	男	51.12.20	—	—	2+	—
5451	"	"	"	—	—	3+	—
5452	"	"	"	—	—	—	—
5453	8 M	"	"	—	Polio. II	3+	—
5454	1	女	51.12.21	—	—	1+	—
5455	"	"	"	—	—	—	3+
5456	5 M	男	51.12.23	—	—	2+	—
5457	1	"	"	—	—	1+	—
5458	11 M	女	52. 1. 4	n. t	—	2+	—
5459	"	男	"	n. t	—	—	—
5460	"	"	52. 1.10	—	—	—	1+
5461	1	"	52. 1.11	—	—	—	—
5462	5 M	"	52. 1.14	—	—	—	—
5463	1	女	"	—	—	2+	—
5494	11 M	男	52. 1.31	—	—	—	—
5495	1	"	"	—	—	3+	—
5496	11 M	"	"	—	—	2+	—
5526	4 M	"	52. 2. 3	—	—	—	—
5527	11 M	"	52. 2.18	—	—	—	—
5528	2 M	女	"	—	—	1+	—
5529	1	男	"	—	Polio. III	2+	—
5530	"	"	52. 2.22	—	—	4+	—
5531	"	女	52. 3. 4	—	—	2+	—
5532	11 M	男女	52. 3. 8	—	—	—	—
5533	1	女	"	—	—	—	—
5534	4 M	男	"	—	—	4+	—
5535	7 M	"	"	—	Polio. III	—	—
5536	10 M	"	52. 3.28	—	—	—	—
5537	11 M	"	"	—	—	—	—
5538	1	女	"	—	—	—	—
6874	13	"	52.12. 5	—	—	1+	—
6891	4	"	52.12.12	—	—	—	—
6897	3	"	53. 1. 9	—	—	3+	—
6899	2	男	"	—	—	—	—
6919	1	"	53. 1.30	—	—	—	—
6920	"	"	"	—	—	—	—
6921	3 M	"	"	—	—	2+	—
6922	1	"	"	—	—	—	—
6969	9	"	53. 2.20	—	Salmo	—	2+
6971	5	"	"	—	—	—	—
6973	13	女	"	—	—	—	—
6999	5	男	53. 2.27	—	—	—	—
7000	1	"	"	—	Polio. II	1+	—
7037	1	"	53. 3.13	—	—	—	—

Salmonella が 1 株分離された。また初代猿腎細胞を用いたウイルス分離では 4/44 検体 (9.0%) に poliovirus が分離された。これらはワクチン由来株と考えられる。II 型 2 株, III 型 2 株であった。このうち 3 例からは 70 n

mの rotavirus も同時に検出された。したがって poliovirus は単なる passenger virus と考えられる。上記3例を含めた rotavirus の検出率は19/44検体(43.2%)であった。

図1の方法で検出された rotavirus の電顕像は図3.Aの如く、凝集を示さなかった像と、図3.Bの如くウイルスが凝集し架橋形成が著明な像が認められた。直径はいずれも70nmであった。一方小形粒子は3/44検体(6.8%)に検出された。患者No.5460の糞便中の小形粒子は40

nmで、粒子表面は抗体で覆われているのが電顕的に観察された(図4)。一方、患者No.6969の糞便中から検出された小形粒子もほぼ同大の40nmであった(図5)。また患者No.5455の糞便中に見出された小形粒子も40nmであったが抗体による凝集塊の形成が観察された(図6)。

rotavirus 検出陽性率と年齢との関係は図7に示した。即ち、1才未満7/17検体(41.2%)、1才児10/19検体(52.6%)と1才以下の乳幼児での検出率は17/36(47.2%)を示した。

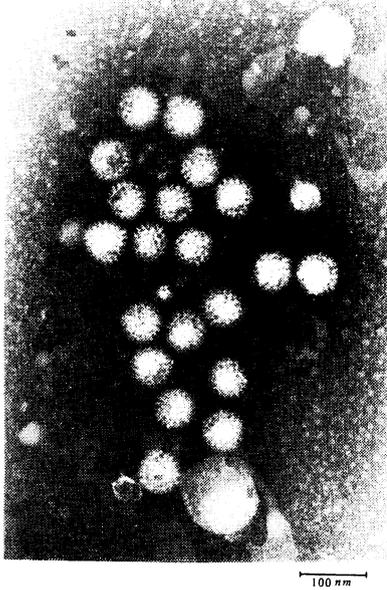


図3.A IEMで検出された rotavirus (No. 5534)

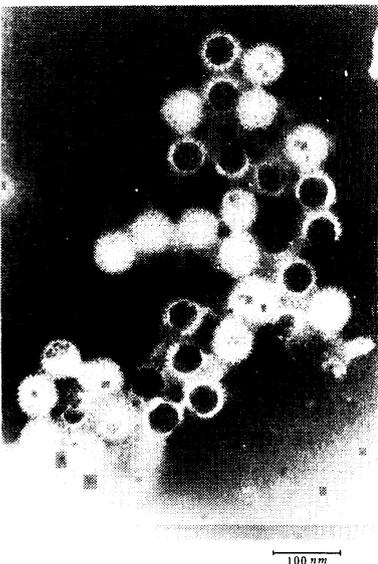


図3.B IEMで検出された rotavirus (No. 5451)



図4. IEMで検出された小形粒子 (No. 5460)

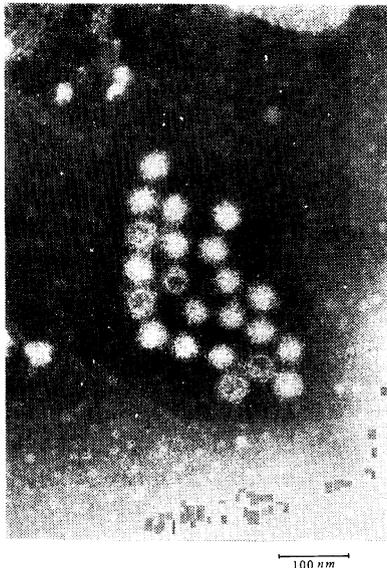


図5. IEMで検出された小形粒子 (No. 6969)

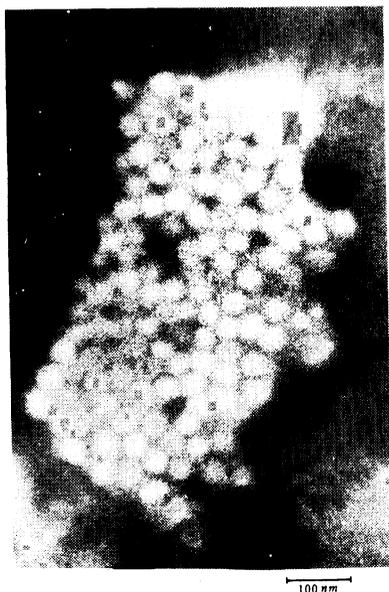


図6. IEMで観察された凝集像
(No. 5455)

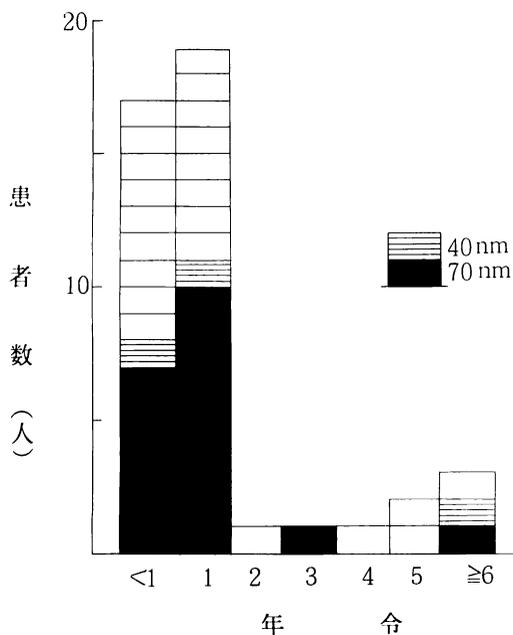
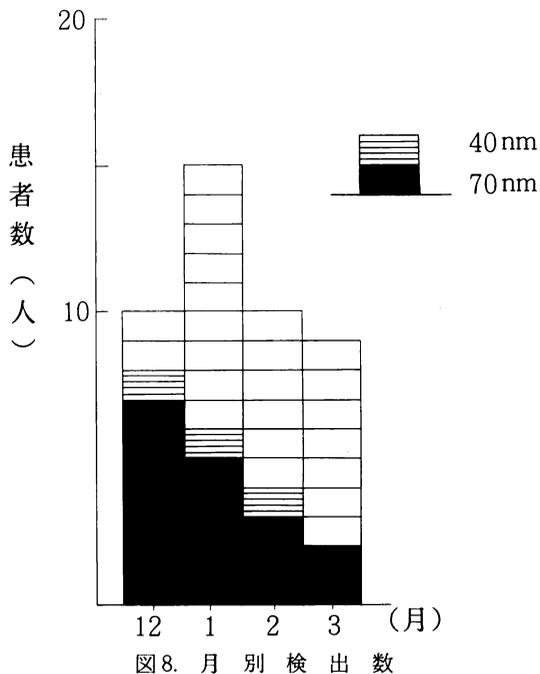


図7. 年齢別ウイルス検出率

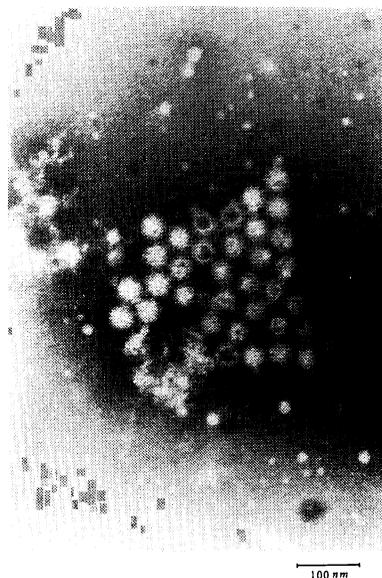


図9. 小形粒子
(No. 5455)

月別検出率は図8.に示した如く、12月7/10検体(70.0%)、1月5/15検体(33.3%)、2月3/10検体(30.0%)、3月2/9検体(22.2%)の順であった。

一方、小形粒子は1~3月に各1検体ずつ検出された。小形粒子 rotavirusが同時に検出された例は認められなかった。小形粒子も含めた検出率は22/44(50.0%)であった。

成人の下痢症便についての検査成績は初代猿腎細胞によるウイルス分離、細菌学的検査及び患者3名の回復期血清をプールし図1.の方法によるIEMを行ったがすべて陰性であった。

また回復期血清が採取できた上記3名について rotavirus に対する補体結合試験を行ったが、抗体価の有意上昇は認められなかった。主なる臨床症状は表2.に示した。

表2.

成人下痢症患者の臨床症状

患者 No.	年令	性別	臨床診断名	発病月日	臨床症状					
					発熱	下痢回数	嘔吐	腹痛	全身倦怠	頭痛
5552	32	男	急性腸炎	52. 7. 14	38.8	10以上	-	+	+	-
5554	29	男	"	52. 7. 19	37.1	3~5	-	+	+	-
5555	45	男	"	52. 7. 17	38.5	10	-	+	+	-
5556	25	男	"	52. 7. 22	36.0	5	-	+	-	-
5557	18	女	"	52. 7. 25	37.5	13	-	+	+	+
5609	31	男	"	52. 9. 13	37.3	7	+	-	-	-
5610	33	女	"	52. 9. 15	38.5	20以上	-	+	+	-
5613	27	男	"	52. 9. 23	38.0	8	-	+	+	-
5620	53	女	"	52. 9. 5	37.2	10	-	+	-	-
5548	29	男	"	52. 7. 7	39.0	4~5	-	+	+	-
5626	42	男	"	52. 11. 2	39.5	10以上	-	-	-	-

即ち全症例下痢は必発で、次いで腹痛、全身倦怠であった。下痢回数は多い者で1日20回以上、少ない者で3~5回であった。38℃以上の発熱は6名54.5%に認められた。患者No5610では家族内感染が観察された。

B. IEMによらない小形粒子の検出成績

図1に基づいたIEMで小形粒子が検出された3検体、即ち患者No5460, 6969, 5455のうち5455の糞便のみについてであるが、図2の方法を用い粒子の検出を試みた。検出された小形粒子の電顕像は図9に示したとおりであった。即ち直径は約40nmと測定されたがIEMで観察された凝集塊は認められず、粒子全体が散在性で且つ平面的配列であった。

IV 考 察

rotavirus が乳幼児の急性胃腸炎、感冒性消化不良症などの病原であることは今日ほとんど疑う余地がないであろう⁹⁾。また最近では冬期乳幼児腸重積の病原としても注目されつつある¹⁰⁾。乳幼児の rotavirus 感染は生後6カ月から18カ月の年令に好発するといわれている¹¹⁾。このことは森田らが rotavirus に対して行った疫学的調査成績¹²⁾、即ちこの年令群での抗体保有率は21.4%と最も低いことから推定することができる。本報での rotavirus 陽性最小月令は生後2カ月の乳児であったが、生後3日の新生児糞便からの検出例も報告されている¹³⁾。検出陽性の最年長児は13才であったが、原ら³⁾が報告しているように小学生、中学生における流行も観察されており、この年令群での罹患もまれでないようである。

今野ら⁴⁾によれば人血清中の補体結合抗体価が16~32単位あればIEMで陽性を示すという。このことから著者らがIEM抗体として用いた人プール血清中の rota-

virus に対する補体結合抗体価は40単位であったことから、rotavirus を凝集するに十分な抗体量が存在したものと考えられる。rotavirus の検出はIEMによらずとも図1.左側の行程でも可能であることを自験している。従って、図3.Aに示したように凝集が認められない rotavirus は抗体が作用していないのではないかと考えられる。一方凝集反応が観察された像(図3.B)はウイルスの周囲に抗体が付着し架橋形成が認められている。この相違はIEM用抗体として使用した人血清に起因するのか、あるいは抗原抗体反応の適比に依存するのか、あるいは形態学的には同一に観察される rotavirus も poliovirus のように異なる血清型が存在することを示唆しているか非常に興味ある問題である。しかしこれらの問題点を解明することはできなかった。いずれにせよ rotavirus の血清型については石田¹⁵⁾が述べているように慎重に検討されるべき今後の問題であると考えられる。

一方小形粒子による下痢症(急性胃腸炎)の病原ウイルスが最初に確認されたのは1968年10月のオハイオ州 Norwalk での流行であった⁴⁾。学童や成人に急性の嘔吐下痢症を起させる Norwalk agent は直径27nmの parvovirus と考えられている。同様のウイルス粒子に Hawaii agent Montgomery County agent¹⁶⁾がある。これら三者間に抗原性の相違が指摘されている¹⁷⁾。他の parvovirus としては Paver らが報告した¹⁸⁾22nmのウイルス粒子がある。27~30nmの小形粒子としては他に Madaeley ら¹⁹⁾の28±0.5nmの Astrovirus, Apleton ら²⁰⁾の29~30nmの粒子の存在が報告されている。本邦における小形粒子の報告例は極めて少ない。秋田県大曲市で発生した parvovirus 様粒子による嘔吐下痢症の流行例についてはすでに報告した⁵⁾が、宮城県においても下痢症患者糞便中から parvovirus 様粒子が検出されて

いる²¹⁾。著者らが今回検出した40 nmのウイルス粒子と同 sizeのウイルス粒子が下痢症例から検出されたという国内での報告は、著者らの知る限りでは見あたらない。国外では Flewett ら²²⁾によって報告されているが検出された粒子と疾病との関係は明らかでないとしている。しかし下痢症便から検出された3例の小形粒子の大きさがほぼ同じ size であること、No.5455は糞便中より直接粒子の検出が可能で免疫反応が確認されること、更には細菌学的検査、猿腎細胞によるウイルス検索でも既知の病原が検出されず、且つ rotavirus も陰性であったことから、今回検出された3例の粒子は病原の可能性が高いと推定される。しかし本粒子がウイルスとしての諸性状を有するのか否か、下痢症の他の agent との位置づけについて今後明らかにされなければならない。

一方成人の下痢症便についても小児下痢症と同様の病原検索を実施したが、既知の病原は勿論何らのウイルス様粒子も検出されなかった。parvovirus 様 agent による感染例では潜伏期間が24~48時間でウイルス粒子の排泄は発病後急速に消失すること、また IEM で調べると抗体産生が不十分であるといわれている²³⁾ことから、小形粒子(特に parvovirus)による下痢症では採便時期、感染防禦としての免疫産生能力及びその持続性などを踏えたウイルス学的、血清学的、免疫学的解析が今後必要であると考えられる。

V ま と め

小児下痢症便44検体、及び成人下痢症便11検体について病原検索を行い、以下の如き結論を得た。

1. 小児下痢症便から検出された病原は salmonella 2.2%, 小形粒子 6.8%, poliovirus 9.0%, rotavirus 43.2%であった。このうち3検体6.8%から poliovirus + rotavirus が同時に検出された。
2. IEMによって検出された3例の小形粒子の直径は40 nmであった。このうち1例はポリエチレングラコールと超遠心により糞便中から直接粒子を検出することができた。直径は40 nmであった。
3. 成人下痢症便からは既知の病原、及びウイルス様粒子は検出されなかった。

文 献

- 1) Bishop, R. F. et al: Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with nonbacterial gastroenteritis, *Lancet*, 2, 1281—1283 (1973)
- 2) Bishop, R. F. et al: Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extract from children with acute gastroenteritis, *Lancet*, 1, 149—151 (1974)
- 3) 原稔たち: 小学生を中心に流行した急性嘔吐下痢症と duovirus, *臨床とウイルス*, 5(1), 51—57(1977)
- 4) Adler, J. L., et al: Winter vomiting disease, *J. Inf. Dis.*, 119, 668—673 (1969)
- 5) 佐藤宏康たち: 1975年12月中旬, 秋田県大曲市内の保育園に多発した嘔吐下痢症, *臨床とウイルス*, 5(1), 70—72 (1977)
- 6) Kapikian, A. Z., et al: Visualization by immune electron microscopy of a 27nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis, *J. virol.*, 10, 1075—1081 (1972)
- 7) 原稔: ウイルス疾患の検査法, *臨床検査*, 19(11), 1255—1263 (1975)
- 8) 日本公衆衛生協会: 微生物検査心構, 細菌, 真菌検査, 第2版 (1978)
- 9) 石井慶蔵たち: ウイルス性下痢症, *モダンメディア*, 23(11), 29—42 (1978)
- 10) 杓沢とよ子たち: 乳幼児腸重積症における Rotavirus 感染, 第25回日本ウイルス学会総会(大阪)1977
- 11) 甲野礼作たち: 臨床ウイルス学, 講談社, 1978
- 12) 森田盛大たち: 大曲市内の幼稚園に発生した嘔吐下痢症の病因と R V L A の血清疫学に関する研究, 秋田県衛生科学研究所報, 21, 57—64 (1977)
- 13) Chrystie, I. L., et al: *Lancet*, 2, 79 (1975)
- 14) 今野多助たち: 乳児腸炎ウイルス(レオウイルス様因子)感染症, *小児科*, 17, 9—16 (1976)
- 15) 石田名香雄: 第17回臨床ウイルス談話会, *臨床とウイルス*, 5, 73 (1977)
- 16) Schreiber, D. S., et al: The small intestinal lesion induced by Hawaii agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis, *J. Inf. Dis.*, 129, 705—708 (1974)
- 17) Thornhill, T. S., et al: Detection by immune electron microscopy of 26- to 27-nm viruslike particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis, *J. Inf. Dis.*, 135, 20—27(1977)
- 18) Paver, W. K., et al: A small virus in human faeces, *Lancet*, 1, 237—239 (1973)
- 19) Madeley, C. R., et al: 28nm particles in faeces in infantile gastroenteritis, *Lancet*, 2, 451—452 (1975)
- 20) Appleton, H., et al: Viruses and gastroenteritis in infants, *Lancet*, 1, 1297 (1975)
- 21) 鈴木宏たち: 糞便ウイルス 2, 3 の知見, *臨床とウイルス*, 5, 40—44 (1977)

22) Flewett, T. H., et al: Diagnostic electron microscopy of faeces 1. The viral flora of the faeces as seen by electron microscopy, J. clin.

Path., 27, 603—608 (1974)

23) 今野多助: 腸炎ウイルス, 日本医事新報2721, 125 (1976)