

下痢症に関するウイルス学的研究 (第2報)

佐藤宏康*	原田誠三郎*	庄司キク*
高山和子*	斉藤清津子*	金鉄三郎*
後藤良一*	山脇徳美*	森田盛大*
天野保二**	岡村敏弘***	長沼雄峰****
鈴木敬謙*****		

I 緒言

非細菌性急性胃腸炎の病原として、Rotavirus, ¹⁾ Norwalk agent ²⁾などが明らかとなった。この分野における新しい病原粒子の報告は、最近とくに著しく、Calicivirus, ³⁾ Coronavirus ⁴⁾などもその原因ウイルスとして登場してきた。

本報では前報⁵⁾にひき続き、県内で発生した下痢症患者糞便について、病原検索を行ったので、その検査成績に若干の考察を加え報告する。

II 材料及び方法

A. 材料

1. 糞便

昭和53年度定点観測調査で対象となった下痢症患者45名中40名の急性期糞便、および雄勝郡稲川町で発生した集団嘔吐下痢症患者9名中5名の急性期糞便で、ウイルス検査ではいずれも採取後検査時まで-70℃に保存した。

2. 被検血清

定点観測調査では45名中6名、また集団嘔吐下痢症では9名中6名よりベア血清を採取した。血清は使用時まで-20℃に保存した。

B. 方法

1. 細菌学的検査

糞便は採取後凍結せず、直ちにSS寒天培地、及びMacConkey寒天培地に塗抹し、37℃で18~24時間培養した。Yersinia検索のため、SS寒天培地の一部は20℃で24時間培養した。いずれも疑わしいcolonyを鈎菌し形の如く同定した。⁶⁾嫌気性培養は実施しなかった。

2. ウイルス学的検査

糞便は凍結融解後、SabinのLEにて10%乳剤としたのち、初代カニクイ猿腎、HEp # 2, HE細胞、及び生後48時間以内の哺乳マウスを用いて型の如くウイルス分

離を行った。分離ウイルスの同定は予研から被分与のSchmidt pool 血清とAdeno 1~7型血清を用いて行った。また電顕によるウイルス検出は既報⁵⁾に準じて実施した。

3. 血清学的検査

Adeno 補体結合 (CF) 反応抗原は数種の型を混合した自家製で森田⁷⁾の方法に準じて調整したものである。また、RotaのCF反応抗原はBishop¹⁾の方法に準じ、患者の糞便より調整した。検査方法はいずれもMicro法⁷⁾により行った。

III 検査成績

定点観測調査で検索された下痢症患者45名の細菌学的、ウイルス学的、血清学的検査成績は表1の如くであった。すなわち、ウイルス、及びウイルス様粒子が検出されたのは10名で、図1に示した如くRotavirusが検出されたのは4名であった。Polio ウイルス2名(図2)、アデノウイルスは3名でいずれも組織培養で分離された。アデノウイルスの2株は3型と同定された。このうち電顕で検出されたアデノウイルス3型粒子は図3の如く、直径約70nmでCapsomerの規則的配列が観察された。本症例ではアデノCF抗体価も8倍から128倍と上昇し、アデノウイルス3型による下痢症と診断された。

一方、症例10の如く組織培養でPolio II型が分離された糞便中に電顕で検出された、直径約27nmのEnterovirus様粒子は、多分Polio II型と推定された。しかし図4に示した如く電顕的にはEnterovirus様粒子が観察されるにもかかわらず、組織培養でウイルスが分離されない例もあった(症例12)

また、病原大腸菌K70: O 125が1株分離同定され、本疾患の起因菌と推定された。

血清学的検査成績についてみると、ベア血清が入手できたのは45名中6名13.3%であった。このうち確定診

* 秋田県衛生科学研究所, 微生物部 ** 秋田大学医学部, 研究機器センター

* 由利組合総合病院, 小児科 **** 秋田組合総合病院, 小児科 ***** 山本組合総合病院, 小児科

表 1. 下痢症患者からの病原検査成績

No	氏名	性	年齢	検体採取月日	病日	糞便よりの病原検出				補体結合反応				備 考
						細胞	SM ¹⁾	電顕	細菌	Adeno		Rota		
										A	C	A	C	
1	S・M	f	2	4・17	2	-	-	-	-					
2	S・M	m	1	4・17	3	-	-	-	-					
3	S・K	m	2	4・17	3	-	-	+	-					Rota 図 1
4	I・M	f	1	4・7	5	n・t	n・t	n・t	n・t	<8	<8	<8	32	Rota
5	I・J	m	1	4・7	5	n・t	n・t	n・t	n・t	<8	<8	8	64	Rota
6	S・T	m	1	5・8	1	-	-	-	-	64	32	32	32	
7	Y・I	m	10M	5・8	8	-	-	-	-					
8	H・E	f	3M	5・15	6	-	-	-	-					
9	K・S	m	7	6・5	6	n・t	n・t	n・t	n・t	<8		8		
10	G・T	m	3	6・5	2	+	-	+	-					Polio II, 図 2
11	S・M	f	11M	6・5	3	-	-	-	-					
12	K・K	m	7M	6・5	2	-	-	+	-					Enterolike 図 4.
13	U・T	m	5	6・12	3	-	-	-	-					
14	K・M	f	9M	7・3	1	-	-	-	+					K70 : 0125
15	W・A	m	1	7・3	4	-	-	-	-					
16	K・J	f	7	8・21	5	+	-	n・t	-	<8		16		Adeno 3 型
17	Y・M	f	13	9・4	2	n・t	.	n・t	n・t	16	16	32	64	
18	S・K	m	11	9・5	3	+	-	+	-	8	128	16	16	Adeno 3 型 図 3.
19	S・J	m	3	10・2	3	-	-	-	-					
20	T・N	m	10	10・2	4	-	-	-	-	64	64	16	16	
21	K・U	f	5	10・16	2	-	-	-	-					
22	S・M	f	4	11・6	3	-	-	-	-					
23	S・O	m	10	11・6	3	-	-	-	-	<8		32		
24	S・R	m	1	11・6	4					<8		16		
25	Y・T	m	13	11・20	4	-	-	-	-	<8		64		
26	I・K	f	13	11・20	2	-	-	-	-	16		32		
27	Y・T	m	13	11・20	2	-	-	+	-	<8		32		
28	H・K	m	14	11・29	3	-	-	-	-					
29	N・R	f	6	12・4	2	-	n・t	-	-	<8		8		
30	A・K	m	7	12・4	2	-	n・t	+	-	<8		8		Rota
31	U・S	m	9	12・7	2	-	n・t	-	-					
32	T・T	m	1	12・11	2	-	n・t	-	-					
33	N・K	m	1	12・11	6	-	n・t	+	-					Rota
34	W・H	m	1	12・11	4	-	n・t	+	-	<8		8		Rota

35	O・U	f	9M	1・8	3	-	n・t	n・t	-					
36	N・S	f	6M	1・8	2	-	n・t	n・t	-					
37	N・T	m	11M	1・8	9	+	n・t	n・t	-					Polio III, 53.11生ワク①
38	S・K	m	1	1・22	4	-	n・t	n・t	-					
39	S・Y	f	1	1・29	2	-	n・t	n・t	-					
40	N・H	m	8M	1・29	1	-	n・t	n・t	-					
41	K・T	m	9M	2・5	4	-	n・t	n・t	-					
42	Y・H	f	2	2・5	4	-	n・t	n・t	-					
43	S・D	m	2	2・5	4	+	n・t	n・t	-					Adeno
44	K・M	m	14	2・5	1	-	n・t	n・t	-					
45	A・M	f	13	3・5	1	-	n・t	n・t	-	< 8		8		

1) SM: 哺乳マウス

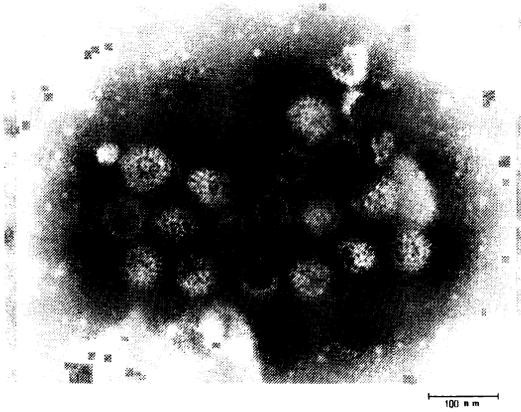


図1. IEMで検出された Rotavirus

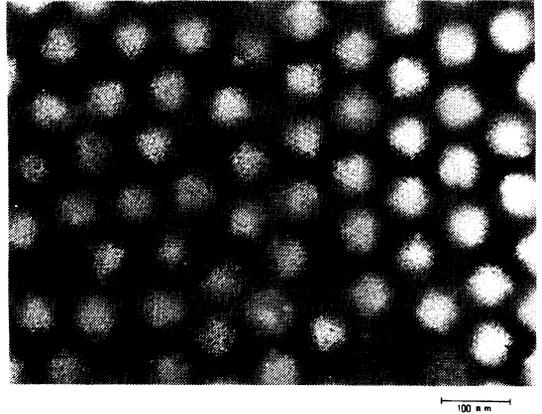


図3. 下痢症患者糞便中より検出された
Adenovirus 3型粒子

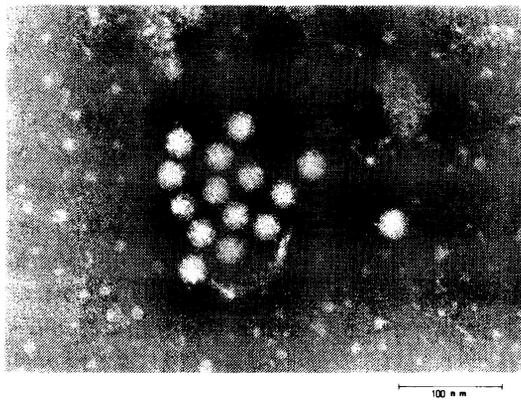


図2. Polio II型分離陽性糞便中より検出された
Enterovirus 様粒子

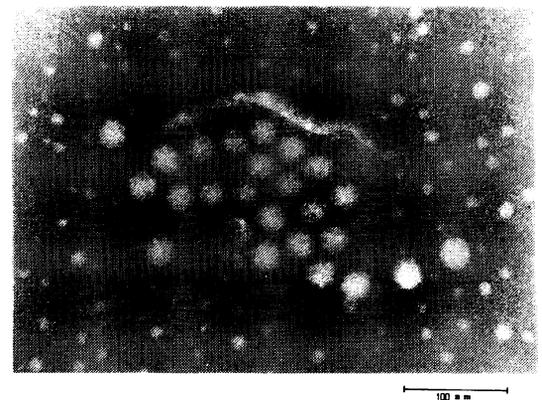


図4. 下痢症患者糞便中より検出された
Enterovirus 様粒子

表2. 集団下痢症の検査成績及び臨床症状

No	氏名	性	年齢	病原検出検査				補体結合反応 (病日)				臨床症状			
				MK*	SM**	細菌	電顕	Adeno		Rota		最高体温(°C)	下痢回数	嘔吐	腹痛
								Acute	Conv.	Acute	Conv.				
1	F・T	f	32	—	—	—	—	8(6)	8(26)	16(6)	16(26)	39.0	5~6	+	+
2	G・U	f	32	—	—	—	—	8(3)	8(23)	8(3)	8(23)	38.9	4	—	+
3	T・H	f	53	—	—	—	—	8(6)	8(26)	64(6)	64(26)	36.0	2~3	—	+
4	K・K	m	24	—	—	—	—	8(5)	8(25)	16(5)	16(25)	39.3	2	—	+
5	S・U	f	62	—	—	—	+	8(6)	8(26)	8(6)	8(26)	40.0	3~4	—	+
6	S・Y	f	74	n・t	n・t	n・t	n・t	8(12)	8(32)	8(12)	8(32)	39.0	4~5	+	+
7	S・G	m	12	n・t	n・t	n・t	n・t	<8(7)	n・t	<8(7)	n・t	40.0	5~6	—	+
8	S・I	f	10	n・t	n・t	n・t	n・t	<8(7)	n・t	16(7)	n・t	41.0	5~6	—	+
9	S・K	m	51	n・t	n・t	n・t	n・t	<8(4)	<8(24)	8(4)	8(24)	40.0	5~6	—	+

* MK: 初代サル腎細胞 ** SM: 哺乳マウス

断されたのは前述のアデノ患者(症例18), 及びRotavirus 感染が考えられた症例4, 5の2名の計3名であった。また, Rotavirus 感染が考えられた2名は同時に百日咳とも臨床診断され, 新株に対する凝集素抗体価は有意の上昇を示し百日咳とも血清学的に診断された。

次いで集団発生した嘔吐下痢症について検索した成績について述べる。症状は表2に示した如く, 下痢, 腹痛発熱が主であった。細菌およびウイルス分離検査はすべて陰性であった。また, Adeno, Rota ウイルスに対する血清学検査でも有意上昇を認めなかった。また, 電顕法による検索には患者No5の回復期血清を用いて, 本人又は他の患者の糞便について, 免疫電顕法を実施したところ患者No5の糞便中より図5に示した如き球形粒子が検出されたが, 本粒子が病因と推定することはできなかった。

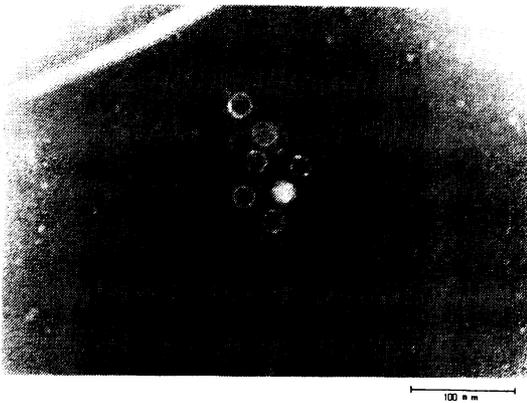


図5. 嘔吐下痢症患者糞便中よりIEMで検出された粒子

IV 考 察

冬期乳幼児下痢症については, その主なる病原はRotavirus であり, 検査方法もほぼ確立されたといっても過言ではない。診断のため乳幼児からの採血は非常な困難と苦勞が付きまとうが, 採便は比較的容易である。したがって, 糞便中より検出されたウイルスによって診断が確定すれば, 患者にとっても検査する側にとっても都合である。

現在まで糞便中より検出され, 下痢症との因果関係が明確なものに, Rotavirusのほか, Adenovirus, Norwalk agentなどがある。Rotavirusでは糞便中の粒子数が $10^6/g$ あれば容易に電顕で検出するが, $10^5/g$ ではかろうじて検出できる程度であるという⁸⁾。Rotavirusとほぼ同じ粒子の大きさのAdenovirusについても同じことが考えられる。もしそうだとすれば, $10^5/g$ 以下のAdenovirus量では(細胞内で増殖可能なものに限るが)組織培養では分離されるが, 電顕法では直接糞便から検出され難いということが考えられる。下痢症患者の糞便中から検出されるAdenovirusは組織培養では分離されない種類があることが報告されている⁹⁾。また下痢便よりHEP#2で検出されたAdenovirus like agentは継代が困難であるともいわれている¹⁰⁾。しかしこのような場合でもCoronavirus¹¹⁾の検出に既に用いられているように, 一度組織培養や気管培養でウイルスを増殖させ, 電顕で観察するという方法が考えられる。下痢症を惹起する未知のAdenovirus検索のために, 気管培養は試みしてみるべき一つの方法であると考えられる。

一方, 電顕でEnterovirus様粒子が検出され, 組織培養でCPEが出現しない症例が認められたが, これは上

述のAdenovirusの例から類推して、組織培養でCPEは認められないが、電顕でのみ確認されうる、新しい下痢病因のエンテロウイルス様粒子が存在する可能性を示唆していると考えられる。

豚伝染性胃腸炎¹²⁾はCoronavirusであることが知られている。近年、Coronavirusが人下痢症の病原として注目されつつあるが、Caulら¹³⁾は糞便中よりCoronavirusを検出している。またCaulらは組織培養と気管培養を併用し、気管培養の上清とその組織内から電顕的にCoronavirusを観察している。本邦で齊藤ら¹⁴⁾によって下痢症患者便からCoronavirusが検出されたことが報告されている。

著者らが現在まで実施してきたBishopら¹⁾の方法を基調にしたトリフロルトリクロルエタン処理による、ウイルス検索方法ではエーテル感受性のCoronavirusが検出される可能性はない。したがって今後、Flewettら¹⁵⁾の方法、すなわち、便乳剤を低速遠心から超遠心によって処理を行い、その後電顕観察を行う方法がよいと考えられる。いずれにしてもCoronavirusあるいは未知のAdeno, Enteroを含め下痢症病原の検索に気管培養の導入が積極的に努力されるべきであると思われる。今後、この方面での研究を推進していきたいと考えている。

V 結 論

1. 下痢症患者45名について病原を検索した結果、Rotavirus 4名, Adenovirus 3名, Poliovirus 2名, さらに病原大腸菌K70: 0125 が1株分離された。
2. 組織培養で検出できない、下痢症起因のEnterovirus様粒子存在の可能性が示唆された。
3. 集団咽吐下痢症9名について病原を検索したが、その原因を推定できなかった。

文 献

1) Bishop, R. F., et al : Detection of a new-

- virus by electron microscopy of faecal extract from children with gastroenteritis, *Lancet*, 1, 149 - 151 (1974)
- 2) Adler, J. L., et al : Winter vomiting disease, *J. Inf. Dis.*, 119, 668 - 673 (1969)
 - 3) Madeley, C. R. et al : Calicivirus in man, *Lancet*, 1, 199 - 200 (1976)
 - 4) Caul, E. O., et al : Coronavirus propagated from patient with Non-bacterial gastroenteritis, *Lancet*, 2, 953 - 954 (1975)
 - 5) 佐藤宏康たち：下痢症に関するウイルス学的研究, 秋田県衛生科学研究所報, 22, 107 - 113 (1978)
 - 6) 日本公衆衛生協会：微生物検査心携, 細菌, 真菌検査, 第2版 (1978)
 - 7) 森田盛大：臨床ウイルス学 (甲野礼作たち編集), 手技編, 講談社, 1978
 - 8) 鈴木宏たち：ロタウイルス, その他の電顕的検索法, 臨床病理, 臨時増刊特集第35号, 54-63 (1978)
 - 9) Flewett, T. H., et al : Epidemic viral enteritis in a longstay children's ward, *Lancet*, 1, 4 - 5 (1975)
 - 10) 千葉俊三：第20回臨床ウイルス談話会発表(仙台市)
 - 11) Caul, E. O., et al : Further studies on human enteric coronavirus, *Arch. Virol.*, 54, 107 - 117 (1977)
 - 12) 態谷哲夫：ブタ伝染性胃腸炎ワクチン, 臨床とウイルス, 3 (2), 68-74 (1975)
 - 13) Caul, E. O., et al : Coronavirus particles in faeces from patients with gastroenteritis, *Lancet*, 2, 1192 (1975)
 - 14) 齊藤怜たち：小児急性胃腸炎より電顕的に検出した Human Enteric Coronavirus について, 臨床とウイルス, 6 (3), 113 - 114 (1978)
 - 15) 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)