

## 下痢症に関するウイルス学的研究 (第4報)

佐藤 宏 康\*    原田 誠三郎\*    高山 和 子\*  
庄 司 キ ク\*    後 藤 良 一\*    山 脇 徳 美\*  
斉 藤 志保子\*    森 田 盛 大\*

### I 緒 言

前報<sup>1)2)3)</sup>につづき下痢症患者糞便中の病原検索を行ったので、その成績について報告する。

また、人糞便中からのRotavirusの検出方法について、SA-11抗血清を用いたI・D・D (Immuno double diffusion test) 法とNCDV抗血清を用いたR-PHA (Reversed passive haemagglutination test) 法を比較検討する機会を得たので、その成績についてもあわせて報告する。

### II 材料及び方法

#### A. 糞便材料

昭和55年4月から同56年3月までの1年間、感染症病原微生物定点観測調査で、15才未満の小児から採取された53検体の糞便を用いた。

#### B. I・D・D法

1% Special noble agar を用い行なった<sup>4)</sup>。中心穴に以下のSA-11抗血清(1:2又は1:4希釈)を約8 $\mu$ l入れ、周囲の6穴には供試検体と以下のSA-11陽性抗原を相互に注入し、湿潤容器に入れ室温48時間放置後、沈降帯の形成有無を測定した。

##### 1. SA-11抗血清

サルRotavirus SA-11感染MK細胞の上清を30,000rpm, 80分超遠心にて濃縮後、ペレットを10~50% Sucrose 密度勾配にて精製したSA-11抗原1mlをインコンプリートアジュバントと共にモルモットに筋注1カ月後、1週間間隔で腹腔に2回追加免疫後7日目で採取した免疫血清であるが、これはホモ中和抗体価が15万倍以上で、ヒトRotavirusを抗原としたCFでは1024倍を示した。I・D・DではMK細胞抗原と健康小児糞抽出液に対し沈降帯を形成しない。電頭でRotavirusが確認された糞便抽出液及び、ヒトRotavirusのCFで有意上昇を示した患者の糞便抽出液に対しては明瞭な沈降帯を形成する。

##### 2. 陽性対照抗原

SA-11感染MK細胞上清を30,000rpm, 80分超遠心濃縮後、ペレットの再浮遊液を3,000rpm, 10分粗遠心した上清を用いた。

#### 3. 糞便抽出液の調製

マイナスPBSで20%乳剤としたのち、トリフロトリフルオールエタンで1回処理、その上清3.0mlを20% Sucrose 2.0mlにのせ、35,000rpm, 90分目立RPS65Tロータにて遠心し、そのペレットを0.2mlのマイナスPBSにて再浮遊したものをI・D・Dに供した。

#### C. R-PHA法

大阪目黒研究所より分与された供試用のHuman Rotavirus 検出用R-PHAキットを用いた。

#### D. 組織培養によるウイルス分離及び、腸内細菌分離 同定

前報<sup>1)</sup>に準じて行なった。

### III 成 績

#### A. 下痢症患者からの病原検索成績

糞便から検出された病原は表1に示したごとく、Rotavirus 27名、Salmonella typhimurium 2名、Polio III型ウイルス1名であった。Rotavirus感染者の多くは2才以下の小児であった。症例38では糞便からRotavirus、咽頭ぬぐい液からA(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>)型インフルエンザウイルスが分離され、インフルエンザウイルスによる下痢も考えられなくはないが、糞便からRotavirusが検出されたことから、Rotavirusによる下痢症と推定された。また、症例46では糞便からRotavirusとPolio III型ウイルスが分離された。この症例では生ワクチン歴は不明であったが、年令的にみてRotavirusに起因する下痢症と推定された。

#### B. I・D・D法とR-PHA法の比較

39検体の糞便について両法を比較した成績は表2のとおりであった。すなわち、R-PHA法では18検体(46.2%)、I・D・D法では17検体(43.6%)が陽性であった。両方法で一致したのは30検体の76.9%であった。R-PHA法の5検体(12.8%)、I・D・D法の4検体(

\* 秋田県衛生科学研究所

表1 下痢症患者からの病原検査成績

症例 No.	氏名	性	年令	検体採 取月日	病日	糞便よりの病原検出				咽頭よりの 病原検出	病原診断
						I・D・D	R-PHA	細菌	組織 培養		
1	F・M	f	13	4・14	3	-	-	-	-	-	
2	S・K	f	9M	"	2	-	-	-	-	n・t	
3	H・M	m	9	5・12	3	n・t	n・t	+	-	-	S. typhimurium
4	S・T	m	3	"	3	-	-	-	-	n・t	
5	I・M	m	14	8・18	2	-	-	-	-	n・t	
6	I・N	f	11	8・22	2	-	-	-	-	n・t	
7	A・K	f	2	9・1	2	-	-	+	-	n・t	S. typhimurium
8	F・H	m	12	9・19	8	-	-	-	-	n・t	
9	K・M	m	7M	9・29	2	-	-	-	-	-	
10	I・M	f	7	10・13	2	-	-	-	-	n・t	
11	K・M	m	10M	10・27	2	-	-	-	-	-	
12	Y・T	m	2	11・17	5	+	-	-	-	n・t	Rotavirus
13	O・M	f	2	"	4	+	-	-	-	n・t	"
14	F・H	m	2	12・1	3	-	-	-	-	n・t	
15	O・T	m	4	"	2	-	-	-	-	n・t	
16	M・N	m	6M	"	7	+	n・t	-	-	n・t	Rotavirus
17	S・M	m	4M	1・12	5	-	n・t	-	-	n・t	
18	O・H	m	5M	"	3	+	n・t	-	-	n・t	Rotavirus
19	K・U	f	1	"	3	+	n・t	-	-	n・t	"
20	H・M	f	6M	"	2	+	n・t	-	-	n・t	"
21	H・S	f	10	1・26	3	-	+	-	-	-	"
22	Y・H	m	8M	"	3	-	-	-	-	n・t	
23	S・S	f	1	"	2	-	n・t	-	-	n・t	
24	I・M	m	9M	2・9	1	-	-	-	-	n・t	
25	U・T	f	10M	"	3	+	+	-	-	n・t	Rotavirus
26	M・U	m	8M	"	2	+	+	-	-	n・t	"
27	K・U	m	1	"	3	+	+	-	-	n・t	"
28	M・S	m	2	"	3	-	+	-	-	n・t	"
29	M・D	m	5	"	3	-	-	-	-	n・t	
30	H・T	m	1	"	4	+	+	-	-	n・t	Rotavirus
31	K・M	m	8M	"	12	+	+	-	-	n・t	"
32	I・T	m	1	2・16	3	+	+	-	-	n・t	"
33	M・H	m	2	"	3	-	+	-	-	n・t	"
34	T・Y	f	1	"	3	+	-	-	-	n・t	"
35	M・S	m	9M	"	3	+	+	-	-	n・t	"
36	S・S	m	11M	"	1	+	+	-	-	n・t	"
37	T・D	m	3M	"	2	+	-	-	-	n・t	"
38	T・O	m	4	2・23	3	+	+	-	-	+	" , AH <sub>1</sub> インフル
39	S・T	f	1	3・2	2	+	n・t	-	-	n・t	"

症例 No.	氏名	性	年齢	検体採 取月日	病日	糞便よりの病原検出				咽頭よりの 病原検出	病原診断
						I・D・D	R-PHA	細菌	組織 培養		
40	K・M	f	2	3・2	3	—	+	—	—	n・t	Rotavirus
41	F・T	f	1	"	1	—	n・t	—	—	—	
42	K・K	f	7M	3・9	3	+	+	—	—	n・t	Rotavirus
43	H・K	f	6M	"	4	+	+	—	—	n・t	"
44	T・S	m	2M	"	5	+	+	—	—	n・t	"
45	K・T	m	7M	3・16	7	+	+	—	—	—	"
46	I・R	f	1	3・23	6	—	+	—	+	n・t	" , Polio III
47	Y・T	m	4	"	5	—	—	—	—	—	
48	N・S	m	13	"	4	—	—	—	—	—	
49	K・Y	m	11M	"	3	n・t	n・t	—	—	n・t	
50	N・S	m	1	"	1	n・t	n・t	—	—	n・t	
51	H・S	m	5	"	2	n・t	n・t	—	—	n・t	
52	I・M	f	2	10・20	3	n・t	n・t	—	—	—	
53	I・T	f	1	"	3	—	n・t	—	—	—	

n・t : not tested.

表2 I・D・D法とR-PHA法の比較

		I・D・D法		Total
		+	—	
※ R-PHA法	+	13	5	18
	—	4	17	21
Total		17	22	39

※大阪目黒研究所より分与された供試品

10.3%) は一致しなかった。

#### IV 考 察

これまでの調査<sup>1)2)3)</sup>では、Rotavirusが11月頃から侵襲し、1、2月と流行し、3月に終息するパターンを示し、また春から初秋にかけて病原大腸菌やサルモネラ菌による細菌性の下痢も2~6%程度認められてきた。本年度もほぼ同様の成績が得られたが、例年検出される病原性大腸菌やアデノウイルスは全く検出されなかった。このように検出される病原の多くはウイルスであるが、我々がまだ検査していないキャンピロバクターが近年各地で、下痢症患者から分離されていることから、<sup>5)6)</sup>病原未検出の検体中には本菌に起因する下痢症がかなり存在したと推定される。次年度から本菌の検出も試みる予定であるが、それによって病原診断率の向上が期待され、

また細菌性下痢症のウエイトもかなり明確になると考えられる。

I・D・D法は手軽に実施できるが、感度の低いことが一般に指摘されている。しかし、調製された抗血清の特異性が高いこと、さらに糞便中の非特異反応物質を除去し、ウイルス粒子が少量の場合いかに濃縮した試料を得るかが問題となる。このような意味で糞便抽出液を溶媒にて処理し、Sucrose クッションにのせ、超遠心にて濃縮する方法は適当であると思われる。事実、木村ら<sup>7)</sup>は電顕観察用に調製された被検材料をI・D・D法の試料とすれば電顕法と同程度の成績が得られると報告している。また、SANEKATAら<sup>8)</sup>はNCDVを用いたR-PHA法は電顕法に勝るとも劣らないと報告している。今回、この両検出法を比較検討する機会を得たが、R-PHA法では18例中5例、I・D・D法では17例中4例と予想外に不一致例が多かった。これは、我々のI・D・D法ではSA-11の抗血清を用いているのに対して、供試のR-PHAではウシRotavirus NCDVの抗血清が用いられていることが第1に起因していると考えられる。また、第2にはヒトRotavirusはSA-11によく反応する種類と、NCDVによりよく反応する種類が存在するのかも知れない。いずれにしても今後、SA-11あるいはNCDVを抗原として免疫血清を作製する場合でも、Human Rotavirusのserotypeの問題を含めて検討されるべきでないかと考えられる。

## V ま と め

1. 糞便53検体よりRotavirus 27検体 (50.9%), サルモネラ菌2検体 (3.8%), ポリオⅢ型ウイルス1検体 (1.9%) を検出した。

2. 抗SA-11血清を用いたI・D・D法と抗NCDV血清を用いたR-PHA法では, Rotavirus の検出率はそれぞれ43.6%, 46.2%とほぼ同定度であったが, 相互の不一致例が10%程度存在した。

## 文 献

- 1) 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)
- 2) 佐藤宏康たち：下痢症に関するウイルス学的研究 (第2報), 秋田県衛生科学研究所報, 23, 77—81 (1979)
- 3) 佐藤宏康たち：下痢症に関するウイルス学的研究 (

第3報), 秋田県衛生科学研究所報, 24, 81—84 (1980)

4) 森田盛大たち：Immuno-double-diffusion test によるA型インフルエンザの血清学的病原診断 (第1報), 秋田県衛生科学研究所報, 24, 121—123 (1980)

5) 今石秀則たち：Campylobacter jejuni による小児の急性腸炎, 感染症学雑誌, 55, 329—330 (1981)

6) 伊藤武たち：東京都内の保育園で発生したCampylobacter, fetus subsp. jejuni による集団下痢症, 東京衛研年報 (30—1), 1—6 (1979)

7) 木村輝男たち：ゲル二次拡散法によるふん便中のロタウイルス抗原の検出, ウイルス, 29, 75—76 (1979)

8) SANEKATA T. et al: Detction of rotavirus from faeces by reversed passive haemagglutination method, J. Clini. Path., 32, 963 (1979)

稿を終えるに当り, Human Rotavirs 検出用R-PHA キットを分与下された大阪目黒研究所に深謝します。