

下痢症に関するウイルス学的研究 (第5報)

佐藤 宏 康* 高山 和 子* 原 田 誠 三 郎*
後藤 良 一* 斉 藤 志 保 子* 森 田 盛 大*

I 諸 言

昭和51年度より下痢症患者糞便中の病原検索を行い、その成績について報告^{1), 2), 3), 4)}してきた。56年度は、新たにCampylobacter jejuniの分離を併用すると共に、MA-104細胞にTrypsin添加と回転培養法の組み合わせで、下痢症患者糞便からのHuman Rotavirusの検出を試みた。本報では、これらの成績も含めて、本年度の成績を報告する。

II 材料と方法

A. 被検材料

1. 56年度採取の糞便材料

量の多少にかかわらず56年度病原微生物定点観測調査で採取された糞便材料は、56年4月から57年3月まで総数97検体である。臨床診断名は、下痢症、感冒性下痢症、流行性下痢症、大腸炎、乳児下痢症、嘔吐下痢症、ウイルス性下痢症であるが、下痢症に咽頭炎または扁桃炎をともなった症例も一部入っている。97検体中、MA-104細胞によるHuman Rotavirusの分離対象としたのは56年9月から57年3月までに採取した55検体の糞便材料である。検体は採取後使用時まで-70℃に保存した。

2. 54, 55年採取の糞便材料

54年11月保育所で発生した乳児下痢症便1検体 (No.8754)、及び56年1月から3月までに採取した9検体の合計10検体で、前報⁴⁾のR-PHAでいずれもRotavirus陽性と判定された糞便材料である。これらの検体は採取後8カ月以上-20℃に保存されていた。

3. SA-11ウイルスと抗SA-11血清

免疫血清の抗体価測定にはMA-104細胞に馴化したSA-11ウイルスを用いた。同株は予研、腸内ウイルス部の原博士より分与を受けた。抗SA-11血清は前報⁴⁾と同じものである。

4. 免疫血清の作製

54年、55年に採取され、Human Rotavirus陽性と判定された10検体中7検体の糞便からBishopら⁵⁾の方法で精製されたウイルス粒子をインコンプリートアジュバントとともにモルモットに免疫して作製した⁴⁾。

B. 実験方法

1. ウイルス分離同定

MA-104細胞を用いたHuman Rotavirusの分離方法はSatoら⁶⁾の方法に準じた。概略は図1に示した。同定には前述した糞便中の粒子を免疫して得た抗15288血清を用いた。その他のウイルス分離同定は初代サル腎細胞、HEA J (人由来)、HE (人由来)細胞を用いて既報⁷⁾に準じて行なった。

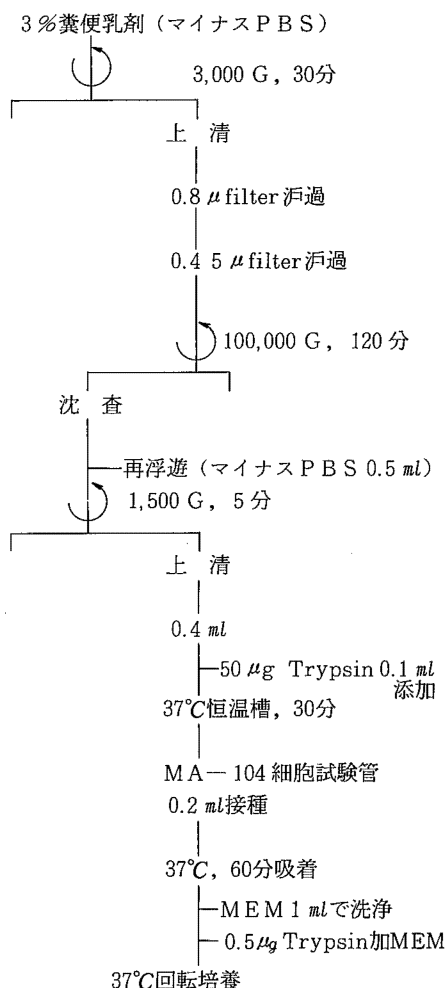


図1. 人ロタウイルス分離法

* 秋田県衛生科学研究所

2. 病原細菌の分離、同定
既報¹⁾に準じて行なった。C. jejuniの分離はSkirrowの培地を用い、輸送、保存にはCary-Blairの培地を用いた⁷⁾。

3. 中和交叉試験

培養4日目のMA-104細胞をマイナスPBSで2回、MEMで1回合計3回洗浄後、Trypsin (Sigma社 type IX) 0.5 μ g/mlを添加したMEM⁸⁾を維持液として1.0 ml分注した。中和反応は免疫血清の4倍段階希釈液と各ウイルスの100 TCID₅₀/0.1 mlを等量混合し、37°Cの恒温槽内で60分間反応させたのち、各段階希釈液当り2本の細胞培養試験管に0.2 mlずつ接種し、37°Cで回転培養を行なった。判定はウイルス対照が30~300 TCID₅₀/0.1 mlの力価を示したとき行なった。

4. 交叉吸収試験

MA-104細胞にて増殖させた15288株と15491株の培養上清を100,000 G90分間遠心後、このペレットを更に45% Sucrose cushionにかけて、150,000 G90分間遠心したペレットを吸収抗原とした。抗体は糞便粒子抗原で免疫した抗15288 (homo抗体価2048倍)、抗15491 (homo抗体価4096倍)の0.3 ml (1:4希釈、56°C30分間不活化)と吸収抗原0.3 mlを37°Cの恒温槽中で120分間反応させてから、4°Cで一夜放置後、45% Sucrose cushion 4 mlにのせ150,000 G90分間遠心した上清 (5 C Nチューブの上部1/3)の中和抗体価を測定した。

5. I・D・D法

前報⁴⁾に準じ、抗SA-11モルモット血清を用いて行なった。

Ⅲ 成 績

A. 下痢症便からの病原分離成績

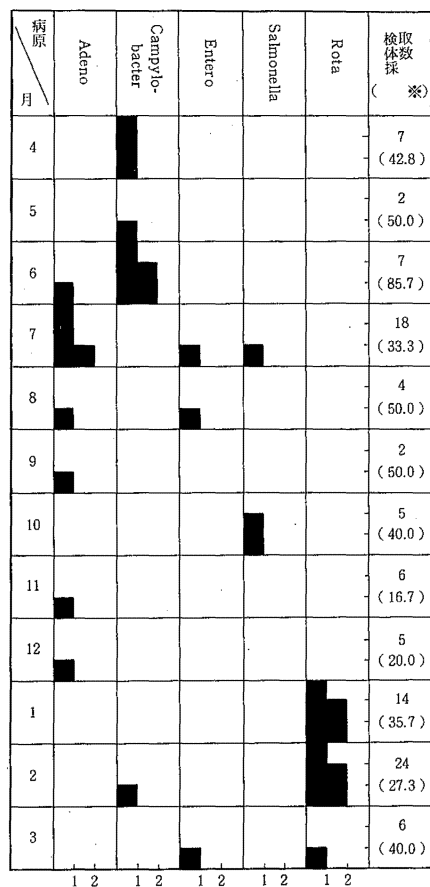
糞便97検体からの下痢症病原体の分離成績を月別、病原別に図2に示した。すなわち、組織培養で分離されたAdenovirusは7月が多く6~12月にかけては散発的に分離された。C. jejuniは4~6月が多く、この時期における下痢症の主なる病原体と推定された。一方分離されたEnterovirusは7月Echo-14、8月Cox.B-2、3月はPolioⅢであった。Salmonellaは7月S. litchfield、10月はS. typhimurumであった。Rotavirusは1~3月の冬期にのみ分離された。各月の病原分離率は6月が85.7%と最高で、C. jejuniとAdenovirusが検出された。しかし11月は16.7%、12月は20%と、一般に11月から2月にかけて低率であった。すなわち、春から夏にかけてC. jejuni、夏期はEnterovirusとSalmonella、冬期はRotavirusが分離されたのに対して、Adenovirusは通年分離される傾向にあった。一方56年9月

(5才児)採取の糞便からAdenovirusとC. jejuniの2種類の病原が分離された。また、57年1月(11才児)の糞便からはRotavirus、咽頭ぬぐい液からInfluenza B型が分離された。このような症例では血清学的検査も併用するなど病原診断に慎重をきした。

B. Human Rotavirusの分離成績

R-PHAでRotavirus陽性と判定された糞便について、MA-104細胞での分離成績は表1の通りであった。すなわち、54年の検体No.8754の患者のペア血清はHuman Rotavirusを抗原としたCF反応及びSA-11を抗原とした中和反応で有意抗体上昇を示し、またI・D・Dでも陽性であったが、その糞便からはMA-104細胞でCPE agentが分離されなかった。一方、55年採取の9検体中4検体からCPE agentが分離され、抗SA-11血清と抗15288血清との反応態度からRotavirusと同定された。CPEは3~6代の盲継代で出現した。分離された患者の年齢は生後2月、8月、1才、2才であった。

図2. 月別病原別分離率



※ 分離陽性率

56年度に採取された55検体中11検体が Rotavirus 陽性で、そのうち3検体が I・D・D で陽性を示した(表2)。MA-104細胞で分離された7株は2~10代の盲継代でCPEを示した。9~10代で初めてCPEを示した検体の患者年齢は12才, 11才であった。多くは2~5代の継代で Rotavirus が分離され, 年齢も生後8月から3才までであった。9月から Rotavirus の分離を実

施したが, 分離陽性時期は1~3月に限定された。

一方, Trypsin添加条件で分離された Human Rotavirus を Trypsin未添加培地で培養すると, 2~3代後にCPEは出現しなくなる傾向があった。しかし一度分離された Rotavirus は $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の Trypsin 処理を施さなくとも, $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ の Trypsin を添加した維持液で継代可能であった。

表1. MA-104細胞による Human Rotavirus の検出 (54・55年度)

検体番号	氏名	年齢	性	地域	採取年月日	CPE	R-PHA**	I・D・D
8754	O・H*	3	女	秋田	54. 11. 26	—	+	+
15232	H・S	10	"	"	56. 1. 26	—	+	+
15287	U・T	10M	"	"	56. 2. 9	—	+	+
15288	M・U	8M	男	"	"	+	+	+
15290	M・S	6M	"	"	"	—	+	—
15296	H・Y	1	"	大館	"	+	+	+
15343	T・T	4	"	秋田	56. 2. 23	—	+	+
15468	K・K	7M	女	"	56. 3. 9	—	+	+
15490	H・K	2	"	大館	"	+	+	+
15491	T・S	2M	男	"	"	+	+	+

* Human Rotavirus によるCF及びSA-11による中和で有意の拮抗上昇を示した。

** 大阪目黒研からの試供品 (NCDVを用いている)

表2. MA-104細胞による Human Rotavirus の検出 (56年度)

検体番号	氏名	年齢	性	地域	採取年月日	CPE	I・D・D
16763	H・K	9M	男	秋田	57. 1. 11.	—	+
16800	K・R	8M	"	"	57. 1. 18	—	+
16803	K・T	1	"	"	"	—	+
16823	W・R	11	女	"	57. 1. 25	10代*	n・t**
16833	K・D	8M	男	大館	"	3 "	n・t
16862	U・K	1	"	秋田	57. 2. 1	5 "	n・t
16867	M・Y	3	"	"	"	2 "	n・t
16926	H・M	12	女	"	57. 2. 8	9 "	n・t
16973	N・T	1	男	"	57. 2. 15	3 "	n・t
16987	S・S	8M	"	"	"	4 "	n・t
17098	F・S	2	"	"	57. 3. 1	4 "	n・t

* MA-104細胞でCPEが出現した継代数

** not tested

表3. Rotavirus の交叉中和試験

ウイルス	抗 血 清 (モルモット)							
	8754	15288	15490	15491	15232	15343	15287	SA-11
SA-11	<4* 64*	<4 1024	<4 2048	<4 1024	<4 <4	<4 <4	<4 <4	<4 >400,000
15288	1024	2048	2048	512	n.t**	n.t	n.t	4096
15490	2048	>4096	4096	512	n.t	n.t	n.t	n.t
15491	4096	>4096	>4096	4096	n.t	n.t	n.t	4096
15296	512	1024	1024	512	n.t	n.t	n.t	n.t
16867	>4096	>4096	>4096	512	n.t	n.t	n.t	n.t
16833	2048	512	2048	512	n.t	n.t	n.t	n.t

* 上段は免疫前, 下段は免疫後

** not tested

C. 交叉中和試験と交叉吸収試験成績

SA-11株, 55年度分離株, 56年度分離株の一部と, R-PHAで陽性を示したNo 8754, 15288, 15490, 15491, 15232, 15343, 15287の各免疫血清との交叉中和試験成績は表3.に示したとおりであった。すなわち, 作成された免疫血清のSA-11株に対する中和抗体価を測定した結果, 抗8754, 抗15288, 抗15490, 抗15491には中和抗体が検出されたが, 抗15232, 抗15343, 抗15287には検出されなかった。抗SA-11血清はhomoで40万倍以上の抗体価を示したが, 上述の分離株に対しては1/100の4,000倍程度の抗体価であった。次に, 分離株と抗血清との反応をみると, 抗15491血清のみがhomoで4096倍, heteroで512倍と1/8の差を示し, 他の分離株との間に差が存在するような成績が得られたので, 抗15288血清と抗15491血清の各々に対し, 超遠心処理した吸収抗原15288と15491で吸収後, 15288株と15491株で抗体価

を測定した成績を表4.に示した。すなわち, 15288抗原による吸収ではhomoで256倍から8倍と1/32に, またhetero(15491血清)では64倍から8倍の1/8にそれぞれ減少した。このときの吸収抗原の抗原価は $10^{8.5}$ TCID₅₀/0.1 mlであった。一方, 15491抗原で吸収した場合は著明な吸収効果は認められなかった。これは吸収抗原の力価が $10^{7.5}$ TCID₅₀/0.1 mlとone log低地であったことに原因するのかも知れないと考えられた。したがってこの成績から, 15288株と15491株の間に抗原構造上の差があり, 異なるSerotypeである, という結論は得られなかった。

IV 考 察

下痢症の病原として細菌性ではSalmonella菌や病原大腸菌が分離されてきた¹⁻⁴⁾が, 春から夏に発生する下痢症の多くは不明であった。しかし, 今回の調査によって, C. jejuniがこの時期の主要な病原体であることがわかった。一方, 11~2月にかけての病原検出率は低かった。県内で下痢症から検出された小形粒子は50年12月大曲市の例⁵⁾, 55年2月大館市の例⁶⁾であり, さらに51~52年度の調査成績⁷⁾でも小形粒子は12~1月に検出された。このことから, この時期の検体については電顕を用いたウイルス検索が必要と考えられた。

また, R-PHA及びI・D・Dで陽性であった糞便材料No8754はMA-104細胞にCPEを示さなかったが, これは約2年間の-20℃保存でウイルスが不活化されたか, あるいはMA-104細胞にCPEを出現させないRotavirusのいずれかと考えられた。一方, 55年度に採取し, 8ヶ月間-20℃に凍結保存した9検体中4検体のみ

表4. 交叉吸収試験

吸収抗原	Ag* Ab**		15288		15491	
	15288	15491	15288	15491	15288	15491
15288 (8.5)***	8	8	8	8		
15491 (7.5)	256	64	64	32		
対 照	256	64	256	64		

* 中和抗原

** 免疫血液

*** 吸収抗原の感染価 TCID_{0.5}/0.1 ml

がRotavirus分離陽性であったが、この9検体すべてがR-PHA陽性の材料であったことから、MA-104細胞に感受性を示さないHuman Rotavirusの存在が示唆される。

一方、Trypsin添加はRotavirusの分離に微妙に影響している。各研究者によりTrypsinの添加濃度はまちまちであるが、著者らはSigma社のTrypsin typeIXを用い、糞便抽出液処理には最終濃度 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、また維持MEM[®]には $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に添加した。こうしたTrypsin処理添加で分離されたHuman RotavirusはTrypsin未添加培地ではCPEを指標とした長い継代は不可能であったが、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のTrypsin添加培地では容易に継代が可能であった。

また盲継代数とウイルス分離陽性者の年齢との関係を見ると、3才以下では6代までに明瞭なCPEを示すが、年齢が11才、12才児では9～10代の継代が必要であった。この傾向はUrasawaら¹⁰の分離例でも認められているが、傾向として一般的なのか、あるいは使用しているTrypsin濃度などに左右されているのか、Trypsinの作用機序ともあわせ、興味ある現象と考えられた。

Human RotavirusはIAHA、ELISAでSubgroup type 1とtype 2¹⁰に分けられ、また中和で3つに分けられており、また佐藤ら¹¹は人由来株間の交差中和試験から少なくとも、4つ以上の血清型又は亜型の存在を示唆している。

交叉吸収試験によってSerotypingが可能と考え、実施したが吸収に用いた一方の吸収抗原のtiterがone log低かったことから、関連抗体を吸収しきれなかったと考えられる。20倍以上の抗体価の差をもって異なるSerotypeとすべきだとする研究者もあり、現時点では、我々が分離同定したHuman Rotavirusは血清学的に同一なSero typeではないかと推定している。人をはじめ、動物間に侵襲するRotavirusも相互にかなりの交差がみられており、Human Rotavirusが分離培養されるまでは、牛Rotavirus (NC DV)を用いHuman Rotavirusの研究が行われてきたが、今後人型Rotavirusを用いることによって疫学あるいは臨床診断で詳細かつ適確な調査研究が行われるものと考えられる。

IV 結 論

1. Campylobacter jejuniは春から夏にかけて発生する下痢症病原体として重要である。

2. MA-104細胞で感受性を示さないHuman Rotavirusの存在が示唆された。

3. 患者の年齢が長ずるにつれウイルス分離陽性まで

の継代歴が増す傾向にあった。

4. Trypsin添加で分離されたHuman Rotavirusは $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理をせずとも $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ のTrypsin添加培地で継代可能である。

5. 15288抗原による吸収ではhomoで1/32, heteroで1/8にそれぞれ抗体価は減少した。

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) 佐藤宏康たち：下痢症に関するウイルス学的研究（第4報），秋田県衛生科学研究所報，25，79—82（1981）
- 5) 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）
- 6) Sato K., et al: Isolation of Human Rotavirus in Cell cultures, Arch. of Virology, 69, 155—160（1981）
- 7) 仲西寿男たち：キャンピロバクター腸炎—下痢症における意義と検索法—，食品衛生研究，31（6），459—471（1981）
- 8) 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，5，70—72（1977）
- 9) 佐藤宏康たち：昭和55年2月大館市内を中心に発生した嘔吐下痢症，秋田県衛生科学研究所報，24，91—93（1980）
- 10) Kapikian A. Z., et al: antigenic characterization of Human and Animal Rotavirus by Immune Adherence Hemagglutination Assay (IAHA): Evidence for Distinctness of IAHA and neutralization, Infection and Immunity, 33（2），415—425（1981）
- 11) 佐藤邦彦たち：各種動物由来のロタウイルスの血清学的関係，第29回日本ウイルス学会総会抄録，1981（東京）