

急性胃腸炎の集団発生から検出された ウイルス様粒子の検討

春日 邦子¹⁾ 酒井 利郎¹⁾ 海保 郁男¹⁾ 十川 知子¹⁾ 時枝 正吉¹⁾
市村 博¹⁾ 太田原美作雄¹⁾ 大瀬戸光明²⁾ 山下 育孝²⁾

Small Round Virus-Like Particles associated with Acute Gastroenteritis

Kuniko KASUGA, Toshirou SAKAI, Ikuo KAIHO, Tomoko TOGAWA
Masayoshi TOKIEDA, Hiroshi ICHIMURA, Misao OHTAWARA
Mituaki OHSETO and Ikutaka YAMASHITA

Summary

From early-March to early-April, 1985, four outbreaks of acute gastroenteritis occurred in four lodges in the Kujukuri shore in Chiba Prefecture. Three of them were university students of the various exercise clubs, and the attack rate was more than 50%. Another occurrence was among the people who had eaten raw fishes and shells in lunch or dinner, and the attack rate was 28.5%. The epidemic curve of the outbreaks showed rapid increase after the onset, and had one peak. The incubation period was in the range of 24 to 48 hours probably. The main clinical symptoms were nausea, vomiting and slight fever, and recovery was generally rapid. Small round virus-like particles were observed by electron microscopy in 5 to 31 stool specimens derived from the outbreaks. The particles appeared to be a spiky surface, and had a buoyant density of 1.35 g/ml to 1.37 g/ml in cesium chloride. These particles were antigenically dissimilar to the Otofuke agent.

I はじめに

急性胃腸炎の病因としてのウイルスは、長い間確認することができないでいたが、近年、電子顕微鏡を用いて糞便中のウイルス粒子を観察する方法によって、多数のウイルスが検出されるようになった。その中でロタウイルス¹⁾は、乳幼児下痢症の主たる病原体としてその病原性が確立され、ウイルス学的性状も判明している。^{2),3)} その他の病因ウイルスとして Norwalkvirus,⁴⁾ calicivirus,⁵⁾ astrovirus,⁶⁾ adenovirus⁷⁾そして音更因子⁸⁾をはじめとする多くの小球型ウイルスなどが報告されている。しかし、これらのウイルスの多くは、培養細胞での増殖が困難であるため、分類学上の位置や血清学的性状などが明確にされていない。

今回、著者らは、1985年初春に県内4か所の民宿で起

きた急性胃腸炎の集団発生例から、小球形ウイルス様粒子を検出したので、その発生状況およびウイルス学的検索結果について報告する。

II 検査材料と検査方法

1. 検査材料

1) 糞便 1985年3月初旬から4月にかけて県内4施設で発生した急性胃腸炎患者から採取した。

2) 血清 今回の集団発生では、患者血清はいずれの事例からも得られなかった。そこで、1979年愛媛県で音更因子に対して有意の抗体上昇のみられたペア血清、および同県で1982年直径30~35nmのウイルス様粒子を検出した集団発生で得られたペア血清を免疫電子顕微鏡用の供試血清とした。

3) 食品 原因食の推定できた1事例について、喫食した残品は入手できなかったが同じ仕入れの食品を採取した。

1) 千葉県衛生研究所

2) 愛媛県衛生研究所

(1986年9月30日受理)

2. 検査方法

免疫電子顕微鏡法（以下IEM法）を含む電子顕微鏡観察（以下電顕観察）を中心とするウイルス学的検査、ならびに細菌学的検査を実施した。

1) 電顕観察 糞便材料はPBSで10%乳剤とし、等量のプロロカーボン（ダイフロンS3）を加えホモジナイズ後、3,000 r.p.m20分間遠心した。その上清に30%蔗糖（w/v）を重層し、35,000 r.p.m150分間遠心後、得られた沈渣に少量の蒸留水を加え再浮遊させ試料とした。さらに、この試料に2%酢酸ウランによるネガティブ染色を施し、ウイルス検索を行った。検出したウイルス粒子は、塩化セシウムによる平衡密度勾配遠心法により20分画し、各分画についてウイルス粒子を確認し浮上密度を求めた。

2) IEM法 供試血清はPBSで100倍希釈し、37°C30分間非働化後、40,000 r.p.m1時間遠心した。この上清とウイルス粒子を検出した電顕試料を等量混合し、37°C1時間反応させ、さらに4°C1夜放置した。この試料を2%リンタングステン酸でネガティブ染色し、ウイルス粒子と患者血清の抗原抗体反応を観察した。

3) ウイルス分離および細菌学的検査 10%糞便乳剤の遠心上清をGMK細胞、HEK細胞、およびHeLa細胞に接種し、3代継代培養を行ないウイルス分離を試みた。

また、患者便および推定原因食と同じ仕入れの食品について細菌学的検査を実施した。

III 結果

1. 発生状況

1985年3月初旬から4月にかけて、県内4か所の民宿において急性胃腸炎の集団発生をみた。表1中A、B、C、D事例は、いずれも大学運動部の合宿中の例で、生ものは喫食しておらず原因食は判明しなかった。

表1. 急性胃腸炎の集団発生例 (1985)

事例	発生年月日	発病率(%)
A	3月8日～3月9日	82/135 (60.7)
B	3月15日～3月16日	77/151 (50.1)
C	3月23日～3月26日	47/165 (28.5)
D	4月3日～4月5日	15/29 (51.7)

A事例は、3月8、9日の宿泊客に発生した例である。患者は、3月3日から宿泊したグループ、3月5日からの1グループ、3月6日からの3グループ、計5グループ135名中の82名60.7%に発生し、3月7日から宿泊し

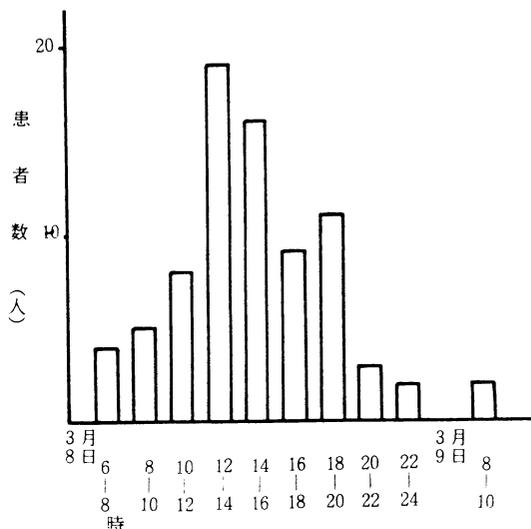


図1. A事例患者発生状況

た1グループには全くみられなかった。患者の日別、時刻別発生状況は図1のとおりで、患者82名中77名93.9%が3月8日に集中しており、時刻的にも3月8日12～14時の19名をピークとした一峰性を示し、一斉暴露を思わせた。以上から、この事例は3月6日の昼食～7日昼食の間に何らかの暴露を受けたと考えられ潜伏時間は24～48時間と推定された。

B事例は、3月12日から宿泊していた2グループで、3月15日朝から16日までの短期間に患者がみられ、151名中77名50.1%が発病した。

C事例は、3月23日に昼食をとった3グループ（昼食喫食群）97名中35名36.1%と、同日夕食をとった6グループ（夕食喫食群）68名中12名17.6%に発生した例である。昼食喫食群と夕食喫食群の発病率に2倍の差があったが昼食と夕食はほぼ同一の献立であり、推定原因食は酢ガキと目された。マスターテーブルによる酢ガキのX²値は、昼食喫食群で16.97、夕食喫食群で2.91と献立中最も高く、昼食喫食群では1%未満の危険率で有意差が認められた。喫食から4時間おきの患者発生状況を図2に示した。潜伏時間は4～72時間までと幅が広く、個人差がみられた。昼食喫食群では32～40時間をピークとする一峰性を示し、平均は34.3時間であった。夕食喫食群は、32～36時間をピークとし、平均は33.2時間であった。

D事例は、4月1日から宿泊していた1グループだけで、29名中15名50.7%が発病した。患者発生は、4月3日から始まり、4日が8名と最も多く5日まで続いた。

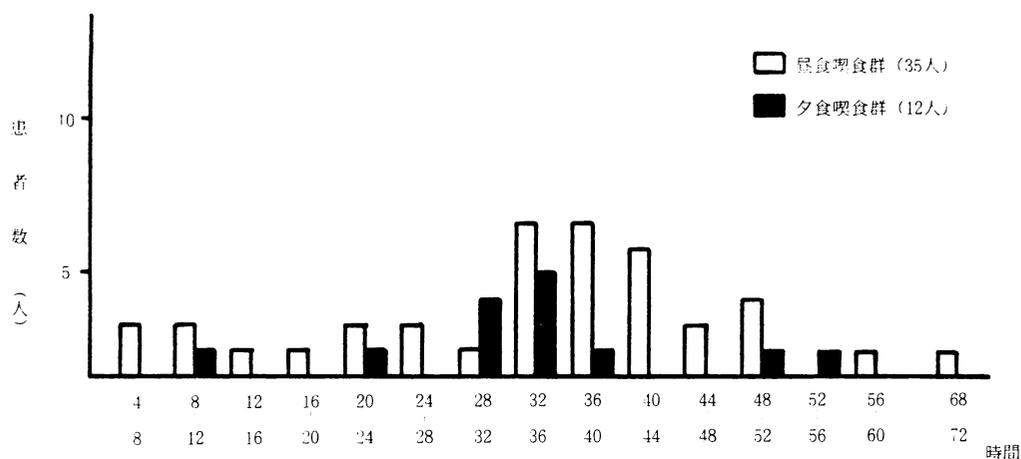


図2. C事例患者発生状況

2. 臨床症状

4事例の主な臨床症状を表2に示した。

A事例は、嘔気82.9%、嘔吐58.5%、発熱76.8%が高頻度に認められたが、下痢25.6%、腹痛30.4%と少なかった。

B事例は、A事例と同様に、嘔気67.5%、発熱63.6%と多かったが嘔吐は23.4%と少なかった。

C事例は、下痢80.9%、腹痛57.1%と腹部症状が多く、嘔気、嘔吐は51.1%、46.8%と半数近くにみられたが発熱は25.5%と少なかった。

D事例は、嘔気73.3%、下痢80.0%が高頻度にみられ発熱も60.0%と多かった。

いずれの事例も、嘔吐、下痢の回数は少なく、発熱も37~38℃程度で予後は良好であった。

表2. 臨床症状の出現頻度

事例	臨床症状 (%)				
	嘔気	嘔吐	下痢	腹痛	発熱
A	82.9	58.5	25.6	30.4	76.8
B	67.5	23.4	23.4	29.9	63.6
C	51.1	46.8	80.9	57.4	25.5
D	73.3	46.7	80.0	60.0	60.0

3. ウイルス粒子の検出

電顕観察を行った4事例31名中A、C、Dの3事例5名から、直径30~35nmのウイルス様粒子を検出した。検出した粒子の表面は、明瞭ではないが規則正しく配列された突起状のものが観察された。(図3) 塩化セシウムを用いた浮上密度の測定では1.35~1.37g/mlであった。

表3. 電顕観察によるウイルス検索

事例	検体数	陽性数*
A	5	2
B	12	0
C	5	1
D	9	2
計	31	5

* 直径30~35nmのウイルス様粒子

4. IEM法による抗原性の検討

粒子を検出した5検体のうちC、D事例の2検体について、他の流行で見出された粒子との抗原性の比較を行った。

先に述べた供試血清を用いてIEM反応を行った結果、音更因子の患者血清に対しては有意の抗体上昇はなく、30~35nmの球形粒子の患者血清に対して明らかな抗体上昇を示した。このことから、C、D事例で検出された粒子は、1982年愛媛県の集団発生例から検出された粒子と血清学的類似性が認められた。

5. ウイルス分離および細菌学的検査

患者糞便からの組織培養によるウイルス分離は全て陰性であった。また、細菌学的検査でも急性胃腸炎の病原菌は検出されなかった。

食品については、原因食が推定されたC事例の酢ガキについて細菌学的検査を行ったが、既知病原菌は検出されなかった。

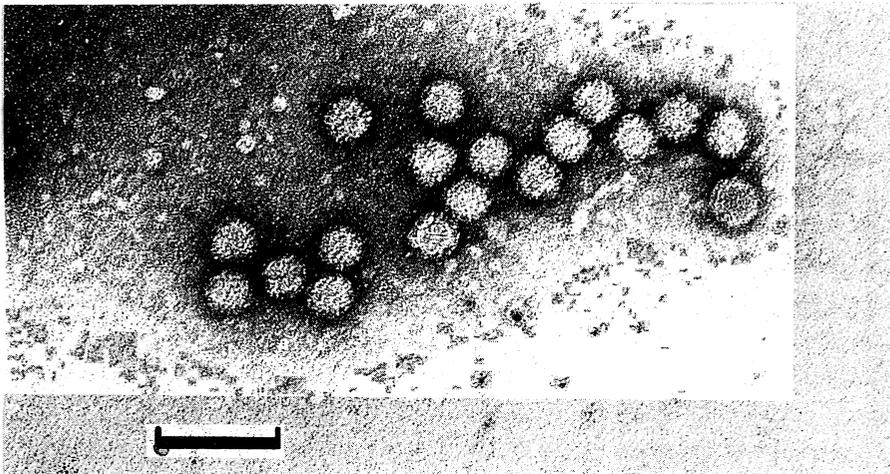


図3. 急性胃腸炎患者から検出されたウイルス様粒子
(染色液は酢酸ウラン、図中の横線は100nmを示す)

IV 考察

ロタウイルス以外の急性胃腸炎をひきおこすウイルスとして、その病原性の確認されているものに Norwalk virus, astrovirus, calicivirus, enteric adenovirus などがある。また、電顕観察により検出され、患者血清と反応が認められることから、病因性の可能性の強いウイルス様粒子として音更因子、札幌因子⁹⁾大阪因子¹⁰⁾など多数の報告がなされている。^{11),12)}

今回県内4施設で急性胃腸炎の流行がみられ、これら4事例中A, C, Dの3事例から、いずれも形態学的に類似した30~35nmのウイルス様粒子を検出した。本粒子と他の粒子との抗原性の比較を行ったところ、音更因子との類似性は認められなかったが、1982年愛媛県の集団発生から検出された小球形粒子と血清学的交差反応がみられた。今回いずれの事例も患者血清が得られなかったため、本粒子と疾病との相関を確認できなかった。しかし異なる流行で検出した粒子と類似性が認められたことは、本粒子の病原性を示唆するものと思われる。

今回4事例は施設は異なるが、いずれも一峰性の患者発生を示し、それぞれ一斉暴露を思わせたが、感染源および感染経路を明らかにすることはできなかった。しかし、これらのうち1事例は生ガキとの関連性が示唆された。近年、生ガキによる急性胃腸炎患者から電顕観察によりウイルス様粒子が検出されている。Murphyら¹³⁾は、1978年オーストラリアで発生した生ガキ喫食による大規模な集団発生例からNorwalk virusを検出し、関根ら¹⁴⁾

は、カキが原因食と推定される急性胃腸炎の多くの事例から、30nmのウイルス様粒子を検出している。今回IEM法に用いた1982年愛媛県で得られた血清も29名が生ガキを喫食し、その内24名82.8%が発症した集団発生由来であった。

これらのことから、今回検出した粒子も生ガキを介した急性胃腸炎の病原因子の一つである可能性が高い。

V まとめ

1985年3月初旬から4月にかけて県内4施設において急性胃腸炎の集団発生がみられ、以下のような結果を得た。

1. 4事例中3事例は、大学運動部員合宿中に発生したもので、発病率はいずれも50%以上と高かった。1事例は、法事や会食に利用した人たちの間で発生し、発病率は28.5%であった。

2. 患者発生状況はいずれも一峰性を示した。臨床症状は、嘔気、嘔吐の割合が高く、発熱もみられたが、症状は軽く数日で快復した。

3. 患者糞便の電顕観察の結果、4事例31名中3事例5名から、直径30~35nmのウイルス様粒子を検出した。浮上密度1.35~1.37g/mlで、血清学的には音更因子と異なるものでいった。

急性胃腸炎の集団発生例の中には、病原細菌が検出されず原因不明に終る例が数多くみられる。これら非細菌性の急性胃腸炎の多くはウイルスが関与していると思われるが、ウイルスを対象とする調査はこれまで充分に行

れていないのが実状である。この原因は、事件発生当初の疫学的調査が充分でなく細菌学的検査が先行し、ウイルス学的検査に必要な初期の糞便材料およびペア血清を入手することが困難な場合が多いことにあると考えられる。今回もその例外でなく、充分なウイルス学的検査ができなかった。今後、他機関に働きかけ、急性胃腸炎の原因究明をすすめていきたい。

謝辞

本調査にご協力いただいた県保健予防課、県衛生指導課、茂原保健所、東金保健所、松尾保健所の関係各位に敬意を表します。

参考文献

- 1) Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H. and Ruck, B.J. (1973) : Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis, *Lancet*, 2, 1281-1283.
- 2) Holmes, I.H. (1979) : Viral gastroenteritis, *Prog. med. Virol.*, 25, 1-36.
- 3) 今野多助 (1985) : 下痢症ウイルスについて, *ウイルス*, 35(2), 123-134.
- 4) Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R. and Chanock, R.M., (1972) : *J. Virol.*, 10, 1075-1081.
- 5) Maddeley, C.R., Cosgrove, B.P. (1976) : Calicivirus in man, *Lancet*, 1, 199-200.
- 6) Madeley, C.R., Cosgrove, B.P. (1975) : Viruses in infantile gastroenteritis, *Lancet*, 2, 124.
- 7) Flewett, T.H., Bryden, A.S., Davies, H. and Morris, C.A. (1975) : Epidemic viral enteritis in a long stay children ward, *Lancet*, 1, 4-5.
- 8) Taniguchi, K., Urasawa, S. and Urasawa, T. (1979) : Virus-like particle, 35 to 40nm associated with an institutional outbreak of acute gastroenteritis in adults, *J. Clin. Microbiol.*, 10, 730-736.
- 9) Kogasaka, R., Nakamura, S., Chiba, S., Sakuma, Y., Terashima, H., Yokoyama, T. and Nakao, T. (1981) : The 33 to 99nm virus-like particles, tentatively designated as Sapporo agent, associated with an outbreak of acute gastroenteritis, *J. Med. Virol.*, 8, 187-193.
- 10) Oishi, I., Yamazaki, K. and Minekawa, Y. (1985) : Three-year survey of the epidemiology of rotavirus, enteric adenovirus, and some small spherical virus including Osaka-Agent associated with infantile diarrhea, *Biken J.*, 28, 9-19.
- 11) 大瀬戸光明, 田中健, 奥山正明, 近藤玲子, 高見俊才, 園田俊郎, 石丸啓郎 (1982) : 小児の急性胃腸炎に関連して検出される種々のウイルス粒子について, *愛媛衛研年報*, 43, 11-16.
- 12) 岡田正次郎, 村尾美代子, 戸谷和男, 手嶋力男, 梶島和子, 白石久明 (1982) : 28-32nmウイルスによる冬期嘔吐症の集団発生と浦和市におけるウイルス性胃腸炎の流行, *埼玉衛生研究所報告*, 16, 39-47.
- 13) Murphy, A.M., Grahmann, G.S., Christopher, P.J., Lopez, W.A., Davey, G.R. and Millsom, R.H. (1979) : An Australia-wide outbreak of gastroenteritis from oyster caused by Norwalk virus, *Med. J. Aust.*, 2, 329-333.
- 14) 関根整治, 林志直, 安東民衛, 藪内清, 大橋誠, 岡田正次郎 (1986) : 都内において冬季に発生した非細菌性胃腸炎のウイルス学的検索, *感染症学雑誌*, 60-5, 453-459.