

1987年千葉県内で発生した急性胃腸炎から検出されたSRVについて

春日 邦子¹⁾, 酒井 利郎¹⁾, 海保 郁男¹⁾, 小川 知子¹⁾
 時枝 正吉¹⁾, 太田原美作雄²⁾, 宇田川悦子³⁾

Small Round Viruses Associated with Acute Gastroenteritis Outbreaks in Chiba Prefecture in 1987

Kuniko KASUGA, Toshiro SAKAI, Ikuo KAIHO, Tomoko OGAWA,
 Masayoshi TOKIEDA, Misao OHOTAWARA
 and Etsuko UDAGAWA

I はじめに

1972年Norwalk virusの報告¹⁾以来、糞便中のウイルス粒子を直接電子顕微鏡下に観察する方法によって、急性胃腸炎患者から多数の小型球形ウイルス (SRV) を検出するようになった。Norwalk virusの他に、calicivirus²⁾, astrovirus³⁾, Hawaii因子⁴⁾, Snow mountain 因子⁵⁾, 音更因子⁶⁾など多くの報告がされている。しかし、これらSRVは、ほとんどが培養細胞での増殖が困難なため、分類学上の位置や性状は明らかにされていない。

今回、著者らは、1987年千葉県内で発生した急性胃腸炎の集団発生例2事例から、特徴的な形態を有するSRV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 材料および方法

1. 材料

1987年10月下旬から11月にかけて養護学校で発生した事例 (A事例とする) と、12月中旬に飲食店を介して発生した事例 (B事例とする) の急性胃腸炎患者34名から糞便およびベア血清を採取した。糞便は、発病後、A事例では5~7病日に、B事例では3~5病日に採取した。また、血清は、糞便採取時を急性期とし、その2週間後を回復期として採取した。

2. 電顕観察

糞便材料は、PBSで10%乳剤とし、等量のフロロカーボンを加えホモジナイズ後、3,000r.p.m.20分間遠心した。その上清を30%蔗糖に重層し、35,000r.p.m.150分間遠心し、その沈渣に少量の蒸留水を加え再浮遊させ試料とした。この試料に、2%リンタングステン酸によるネガティブ染色を施し、ウイルス検索を行った。

3. 免疫電顕 (IEM) 法

被検血清は、PBSで20倍に希釈し、56°C30分間非働化した。この血清と電顕試料を等量混合し、37°C1時間反応させ、4°C1晩放置後、電顕観察と同様に染色した。IEM法の判定は、Kapikianらの方法¹⁾に準じ、ウイルス粒子に付着している抗体量を0~+4の5段階に設定し、1段階以上の抗体付着量の上昇のあったものをIEM陽性とした。

4. 浮上密度

塩化セシウムの30~60%の直線性の密度勾配液4mlを作成し、その上に上記の電顕試料1mlを重層し、40,000 r.p.m.4時間遠心後20分画採取し、各分画について電顕観察によりウイルス粒子を確認した。

5. Western Blot (WB) 法

部分精製したウイルス粒子を含む材料を4~20%のポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、幅2mmのストリップを作成した。このストリップを100倍に希釈した血清と一晩室温で振とう反応させ、アビジン・ビオチン法のアルカリフォスファターゼで染色した。ベア血清で、回復期に急性期より強い染色バンドが認められたものを陽性とした。

6. 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HeLa細胞、RD細胞に接種し、2代継代を試みた。また、患者糞便について細菌

1) 千葉県衛生研究所

2) 千葉県衛生研究所現財団法人千葉県結核予防会

3) 国立予防衛生研究所

(1989年9月30日受理)

学的検査を実施した。

III 結果

1. 発生状況

1987年秋から冬にかけて、県内2施設で急性胃腸炎の集団発生をみた。

A事例は、肥満、喘息などの8~12才までの虚弱児を対象とした養護学校で発生したものである。患者の発生は、図1に示したように10月30日から11月1日まで3日間にわたってみられ、その分布は、10月31日の22~24時をピークとする一峰性を示した。患者は、児童、職員ともにみられ、発病率は、児童では、42名中37名、88.1%、職員では、29名中12名、41.4%と高いものであった。同施設では、10月30日に児童を帰省させており、その日の昼食のサンドイッチが共通食としてあげられ、発病率におけるX²検定で5%の危険率で有意差が認められた。このサンドイッチを原因食と推定すると、患者発生状況から、潜伏時間は約30~40時間と推定された。

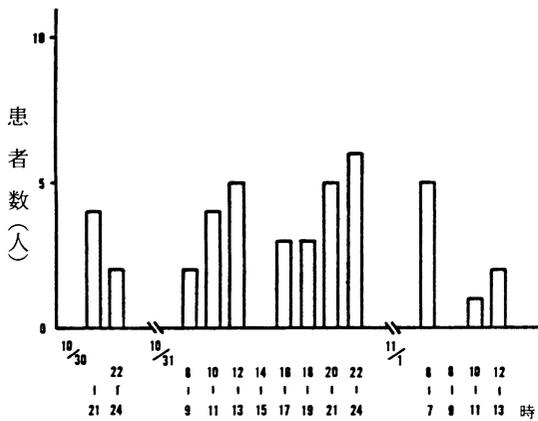


図1 A事例患者発生状況

B事例は、12月18日および19日に同一の飲食店を利用した成人の2グループで発生したものである。発病率は、12月18日に利用したグループ(B-1とする)では、27名中10名、37.0%、12月19日に利用したグループ(B-2とする)では、30名中18名、60.0%で、特にB-2の発病率が高かった。2グループとも、生ガキや刺身を喫食していたが、発病率におけるX²検定で有意差の認められた食品はなかった。図2に、喫食から5時間おきの患者発生状況を示した。潜伏時間は、2時間から54時間まで幅広くみられた。B-2では、0~4時間と35~44時間の2つのピークがみられたが、2グループを合わせ

と、35~44時間に11名と全体の約40%を占める患者数を示した。また、2グループを合わせた平均潜伏時間は、約30時間であった。

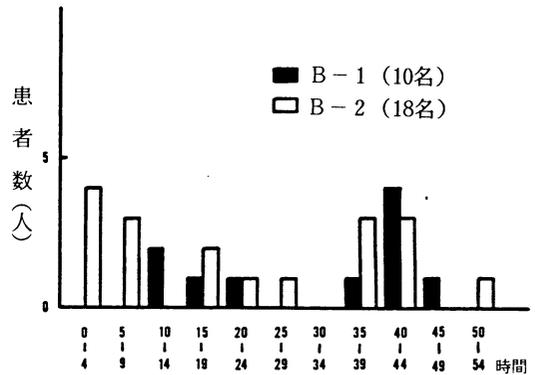


図2 B事例患者発生状況

2. 臨床症状

表1に2事例の主な臨床症状を示した。

A事例では、嘔気、嘔吐が70~80%と高頻度に認められた。下痢は、児童では24.3%と少なく、職員では50%に認められたが、ほとんどが1日数回の軽いものであった。発熱は、児童で32.4%認められ、その半数は38~39℃であった。

B事例では、嘔気が、B-1で90%、B-2で83.3%と最も高頻度に認められ、嘔吐は、2グループとも約30%であった。下痢は、B-1で90%と高頻度であったが、大部分が軟便で回数も少なかった。また、37~38℃の発熱が、若干認められた。

2事例とも、症状は全体的に軽く、2~3日で回復した。

表1 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					
児童	37.8	83.8	24.3	29.7	32.4
職員	75.0	75.0	50.0	33.3	16.7
B					
B-1	90.0	30.0	90.0	80.0	40.0
B-2	83.3	33.3	44.4	61.1	27.8

3. ウイルス粒子の検出および性状

糞便材料について、電顕観察を行った結果を表2に示した。A事例では、児童4名中1名、職員11名中5名から、B事例では、B-1で2名中1名、B-2で12名中5名からSRVを検出した。A、B事例から検出したSRVは、いずれも直径30~35nmの粒子で、辺縁が凸凹しており、表面に無定形の構造物が認められた(図3、図4)。とくに、B事例のSRVの表面構造は、比較的明瞭であった。B事例のSRVについて、塩化セシウムによる浮上密度の測定を行ったところ1.36~1.37g/mlであった。

表2 ウイルス検索結果

事例	EM		IEM*	
	糞便数	SRV陽性数	血清数	陽性数
A 児童	4	1	3	1
職員	11	5	11	4
B				
B-1	2	1	7	5
B-2	12	5	12	7

*EM観察でウイルス粒子が多く検出された、A事例は30才女性の第5病日の材料を、B事例は48才女性の第3病日の材料を抗原とした。

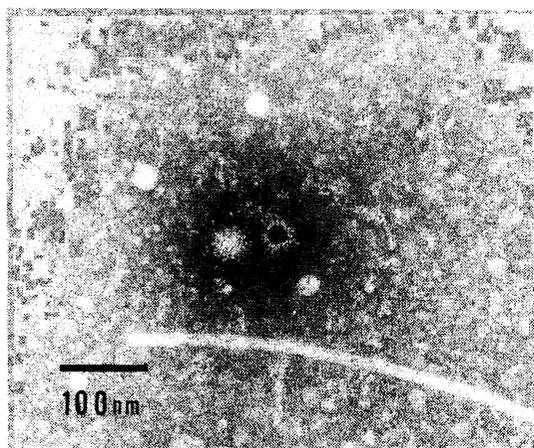


図3 A事例から検出したSRV

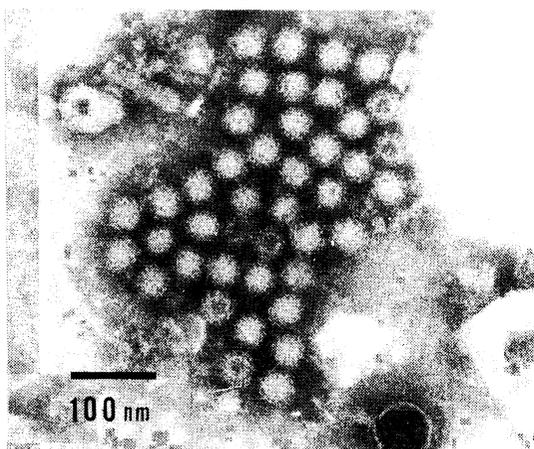


図4 B事例から検出したSRV

4. IEM法による血清反応

それぞれの事例の中で、糞便中のウイルス粒子の多い試料を抗原として、患者ペア血清とIEM法を行った(表2)。A事例では、児童3名中1名、職員11名中4名に抗体上昇が確認された。B事例では、B-1で7名中5名、B-2で12名中7名、合わせて19名中12名に抗体上昇が確認された。

また、A、B事例から検出したSRVの抗原性をIEM法で比較したところ、交差反応は認められなかった。

5. B事例から検出したSRVの抗原性の検討

B事例から検出したSRVについて、既知のSRV患者ペア血清とのWB法による反応をみた。表3に示したように、1979年音更で検出された音更因子に3例中3例、Hawaii関連因子に9例中6例と高い抗体陽性率が認められた。しかし、1978年音更、1979年美唄で検出された音更因子と大阪因子にはほとんど反応せず、ヒトカリシウイルスとは全く反応しなかった。

表3 B事例から検出したSRVのWB法による抗原性の比較

患者血清	陽性率
音更因子	
1978年音更	2/10
1979年美唄	0/2
1979年音更	3/3
大阪因子	1/10
Hawaii関連因子	6/9
ヒトカリシウイルス	0/5

6. 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、細菌学的検査からも、既知病原細菌は検出されなかった。

IV 考察

近年、電顕によるウイルス検索の普及とともに、食品や飲料水を介して発生したと思われる急性胃腸炎の集団発生例からSRVが検出される報告^{7,8)}が各国でなされ、その病原性が問題となっている。特に、カキが関与している事例⁹⁾は多く、Murphyら¹⁰⁾は、数千人の大規模な集団発生例からNorwalk virusを検出している。

今回、県内の2施設で急性胃腸炎の集団発生がみられた。疫学調査から、2事例とも飲食物による感染が疑われたが、患者糞便から既知病原細菌は検出されなかった。また、電顕観察では、A事例15名中6名から、B事例14名中6名からSRVを検出した。患者ペア血清のIEM法では、検出したSRVに有意の抗体上昇が高率に認められた。一方、2事例の主な臨床症状は、嘔気、嘔吐、下痢で、潜伏時間は、およそ30~40時間と推定され、従来のSRV感染の報告に一致していた。これらの結果から、今回検出したSRVは、本症の病因である可能性が高いと考えられる。

今までに、急性胃腸炎患者からさまざまな形能の特徴

のSRVが報告されている。今回2事例から検出したSRVは、直径が30~35nmで、辺縁が平滑でなく、粒子表面に無定形の構造物がみられた。しかし、この表面構造は、カリシウイルスのダビデの星やアストロウイルスの星状構造とは異なっていた。Caulら¹¹⁾は、形態的特徴に基づくSRVの分類を提案しており、この分類によれば、今回検出したSRVは、Norwalk因子、Hawaii因子などを含むSRSV (small round structured virus) に入っていると思われる。

IEM法は、ウイルス粒子表面の反応であるため、型特異性株特異性が高く、SRVの抗原性の比較では、多くの血清型に分類されると報告されている¹²⁾。近年、ウイルスの粒子構造を壊して共通抗原エピトープを発現させるWB法による抗体測定法が開発された^{13,14)}。このWB法を用いて、今回B事例から検出したSRVについて抗原性の検討を行った。既知SRVの患者ペア血清との反応では、ヒトカリシウイルスとは反応せず、1979年音更で検出した音更因子とHawaii関連因子に高率に抗体上昇が確認された。これらのことから、B事例のSRVは、血清学的にHawaii因子と一部の音更因子に共通抗原性を有する可能性が示唆された。

V まとめ

1987年秋から冬にかけて、県内2施設で急性胃腸炎の集団発生がみられた。患者糞便の電顕観察より、A事例は15名中6名、B事例は14名中6名からSRVを検出した。IEM法による血清反応では、患者ペア血清に検出したSRVに対する有意の抗体上昇が高率に認められた。検出したSRVは、直径30~35nmで粒子表面に無定形の構造物がみられた。B事例のSRVの抗原性について、WB法を用いて検討したところ、Hawaii因子と1979年に検出された音更因子に共通抗原性を有する可能性が示唆された。

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、木更津保健所、市原保健所の関係各位に深謝します。

参考文献

1) Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R. and Chanock,

R.M. (1972): Visualization by immune electron microscopy of a 27nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis, *J.Virol.*, 10, 1075-1081.

- 2) Madeley, C.R. and Cosgrove, B.P. (1976): Calicivirus in man, *Lancet*, 1, 199-200.
- 3) Madeley, C.R., and Cosgrove, B.P. (1975): Viruses in infantile gastroenteritis, *Lancet*, 2, 124.
- 4) Wyatt, R.G., Dolin, R., Blacklow, N.R., Dupont H.L., Busho, R.F., Thornhill, T.S., Kapikian, A.Z. and Chanock, R.M. (1974): Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers, *J.Inf. Dis.*, 129, 709-714.
- 5) Dolin, R., Reichman, R.C., Roessner, K.D., Tralka, T.S., Schoosey, R.T., Gary, W. and Morens, D. (1982): Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis, *J.Inf. Dis.*, 146, 184-189.
- 6) 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.
- 7) Kaplan, J.E., Godman, R.A., Schonberger, L.B., Lippy, E.C. and Gary, G.W. (1982): Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a Municipal water system, *J.Inf.Dis.*, 146, 190-197.
- 8) Brondum, J., Spitalny, K.C., Vogt, R.L., Godlewski, K., Madore, H.P. and Dolin, R. (1985): Snow Mountain agent associated with an outbreak of gastroenteritis in Vermont, *J.Inf.Dis.*, 152, 834-837.
- 9) 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, *感染症学会*, 60-5, 453-459.
- 10) Murphy, A.M., Grahmann, G.R., Christgopher, P.J., Lopez, W.A., Davey, G.R. and Millsom, R.H. (1979): An Australia-wide outbreak of gastroenteritis from oyster cas-

- ed by Norwalk virus, *Med.J.Aust.*, 2, 329-333.
- 11) Caul, E.O. and Appleton, H. (1982): The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification, *J.Med. Virol.*, 9, 257-265.
- 12) 安東民衛, 関根整治, 林 志直, 寺山 武, 大橋 誠, 岡田正次郎 (1987): 東京都における集団発生状況とその成績, *食品と微生物*, 4-2, 103-114.
- 13) 宇田川悦子, 山崎修道, 安東民衛, 林 志直, 関根 整治, 岡田正次郎 (1989): ウエスタンブロット法による小型球形ウイルス (SRV) の血清疫学, *臨床とウイルス*, 17-2, 154-158.
- 14) Hayashi, Y., Ando, T., Udagawa, E., Sekine, S., Okada, S., Yabuuchi, K., Miki, T. and Ohashi, M. (1989): Western blot (immunoblot) assay of small round - structured virus associated with an acute gastroenteritis outbreak in Tokyo, *J. clin. Microbiol.*, 27, 1728-1733.