

## 電子顕微鏡による札幌市の小児下痢症の 小型球形ウイルス等の検出と染色方法

横田 秀幸 菊地由生子 宇加江 進\* 中田 修二\*

### 要 旨

札幌医科大学小児科が平成元年11月から2年11月までに市内の医療機関で下痢を主訴に受診した0歳から13歳までの小児から集められた糞便のうち、ロタウイルス陰性の308検体について電子顕微鏡により小型球ウイルスなどの形態学的同定検査を行った。

その結果、ウイルスの検出率は30.8%で、その内訳はオトフケ様因子41.7%、カリシウイルス9.7%、アストロウイルス9.7%、エンテロ様ウイルス7.8%、アデノウイルス18.4%及びその他粒子12.6%であった。

小児下痢症患者の臨床症状として発熱、下痢、嘔吐の内ウイルス検出者とくにオトフケ様因子に嘔吐症状を呈するものが有意に多かった。

フアージの検出者にはウイルスの検出又は発熱症状を呈する率が有意に高かった。又、ウイルス検出方法につき、2～3の検討を加えた。

### 緒 言

厚生省サーベランス事業における下痢症患者は昭和62年より「乳児嘔吐下痢症」と「感染性胃腸炎」として集計されている。0歳から4歳までを1歳きざみで集計し、4歳以上はすべて感染性胃腸炎に分類している。

この二疾病は全国的に毎年冬期に流行をくりかえし、その病因としてロタウイルス<sup>1)</sup>が大きなウエイトを占めているといわれているが、その他に小型ウイルス<sup>2,3)</sup>によることも無視できないとしている。

当衛生研究所では平成元年度より、食中毒菌によらないと考えられる下痢症患者の原因ウイルスの検査の一部を開始した<sup>4,5)</sup>。

札幌医科大学小児科学教室(以下医大)では昭和61年より札幌市におけるウイルス性下痢症の実態を把握する目的で、小児の急性胃腸炎のウイルス学的疫学的検討を行っているが<sup>6,7,8,9)</sup>、当所においても、平成元年11月より医大で集められた小児の糞便検体のうち、ロタウイルス陰性検体について原因ウイルス(主として小型球形ウイルス)の電顕による形態的同定観察を行った。今回の報告はそれらの結果をまとめたものである。

### 第1部 ウイルス検出法

#### 1. 材料及び方法

1-1 対象は平成元年11月より2年11月までに、札幌市内10カ所の医療機関で下痢を主訴に受診した0歳～13歳までの小児308名である。

1-2 検査材料は患者の通院期間の初期に1回採便した糞便で、そのうち当所に分与された検体は糞便のダイフロン処理と低速遠沈(3,000rpm, 10分間)を終えた上清液について(濁りが残るときはさらに8,000rpm 30分)ロタウイルスのスクリーニング検査(ロタテックス凝集反応又はELISA法)陰性となった上清液検査体で4℃に保管のもの約2mlである。

1-3 電顕用試料は上清液検体1mlを超遠心用チューブに移し、0.01M-PBS(pH7.4)の約3mlを加え、40,000rpm, 15℃, 60分間の超遠心(日立RPS-65Tロータ)の後、沈渣を無菌蒸留水50mlに再浮遊したものを染色用試料とし4℃に保存した。

1-4 電顕・日立H-800型で加速電圧100kVを用い、主に5万倍の倍率及び拡大鏡(7.5倍)にて粒子の観察を行った。メッシュはDN400又はHi-グリット400で、これにコロジオン膜張りとかarbonコーティング処理をしたものである。粒子の観察にはメッシュ2枚を使用し、各メッシュについて3～4個の角穴の

\*札幌医科大学小児科

全面積 (32 $\mu\text{m}^2$ ) を走査して、粒子の形態と濃度 (粒子数/1角穴) 及び写真撮影を行った。

1-5 ネガティブ染色法は既報<sup>10)</sup>の食中毒菌の染色方法をウイルス染色用に改良したものである。他方、医大の pH4.5 染色法<sup>11)</sup> をとり入れ、pH4.5 に調整した染色液を検査の中期には用い比較検討した。

#### (1) 2% 燐タングステン染色液

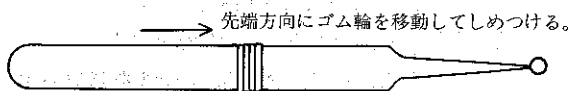
特級燐タングステン酸 ( $\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 24\text{WO}_3 \cdot \text{nH}_2\text{O}$  キシダ化学) 1gr を 50ml のイオン交換水に溶解し、2% 染色原液として褐色ビンに 4°C で保存する。染色液は原液 10ml をガラス棒でかくはんしながら 2N-KOH を滴加し、pH 試験紙で pH7.4 又は pH4.5 に中和して作成する。染色液はフタ付小試験管に移し、アルミはくで遮光して 4°C に保管する。約 3 カ月は保存出来る。遮光なしでは淡紅白色の沈澱の生ずる恐れがあるため。

#### (2) 染色の手順

##### ① メッシュをピンセットに固定

はじめに 5 型ピンセット (ピガー S) の柄に輪ゴムを数回巻きつけたものを準備しておく。イオンコーターで親水化処理したメッシュの一端をそのピンセットではさみ図 1-1 のように輪ゴムを尖端部に移動させてしめつけて固定する。メッシュを固定したピンセットは pH7.4 染色用に 2 本、pH4.5 染色用に 2 本をそれぞれ適当な置台の上に並べておく。

##### ② 試料液をメッシュの上に置く



5 型ピンセット (ピガー S)

図 1-1 メッシュの固定

① のピンセットで固定した各 4 枚のメッシュの上にパスツールピペット (以下小ピペットという) で 1 滴ずつ置く。液量は No.5 の円形濾紙片を 12 割して三角形に切りとった先端で吸い取り、適量としてから 2.5 分間放置する (1)。 (図 1-2)

##### ③ 染色液の滴加

最初に試料液をのせた 2 枚のメッシュ上に小ピペットで pH4.5 染色液を各々 1 滴ずつ置き、次に

残りの 2 枚のメッシュに pH7.4 染色液を各々 1 滴ずつ置く (2)。次に上記 4 枚のメッシュ上の液をそれぞれの三角形の濾紙片の先端で軽く 5~6 回かくはんしながら染色する。pH4.5 染色のかくはんが終わってから約 2.5 分間経過後次の操作に移す (3)。

##### ④ 染色後のメッシュの水洗

染色の終わったメッシュの液を三角形濾紙片で吸い取り適量とする (4)。メッシュの液の上に小ピペットで滅菌蒸留水の 1 滴を置く (5)。直ちに、約 3×6cm 角の濾紙片の一端をメッシュの手前の端に接触させると同時にメッシュの上の液に触れ、かぶせるようにして傾け、液が完全に濾紙片の方に移動吸収されるまでそのままの状態を待つ (1~3 秒間) (6)、(6)。メッシュの表面は斜めにみて僅かにぬれている状態から直ちに乾燥状態に移る (7)。この操作は 1 メッシュごとにおこなう。

##### ⑤ 水洗後のメッシュの乾燥

シャーレに濾紙を敷き、その上にメッシュを移す。すなわち、図 1-2 の (8) のように、ピンセットの柄のすきまに濾紙片をはさみ、その濾紙片をピンセットの尖端に移動させメッシュを押し出す。この操作により、ピンセットの尖端に残液があれば濾紙片に吸い取られ、メッシュはピンセットの端に附着することなくシャーレの濾紙上に置かれる (8)。各々のメッシュを移し終えたシャーレは約 40°C の乾燥器に 30~40 分間入れ、乾燥してからメッシュケースに移し、シリカゲル乾燥デシケターに保管する。

## 2. 結果

### 2-1 検出ウイルスの形態

当所染色法によって検出されたウイルスの形態を図 2 の写真に示した。検出されたウイルスは 7 種で、このうちロタウイルスについてはテスト用として医大のロタウイルス陽性 3 検体から分離染色した。表 1 に検出したウイルス種とサイズを示した。

(1) オトフケ様因子の形態について特に pH7.4 染色において粒子の周辺に等間隔に 10 個の粒状の突起が観察された (図 2-1)。これもすべての粒子に観察できたわけではなく一部消失しているもの、ほとんどみられないものが大半であった。オトフケ様因子の形態については谷口、浦沢ら<sup>12)</sup>が Markam Rotation

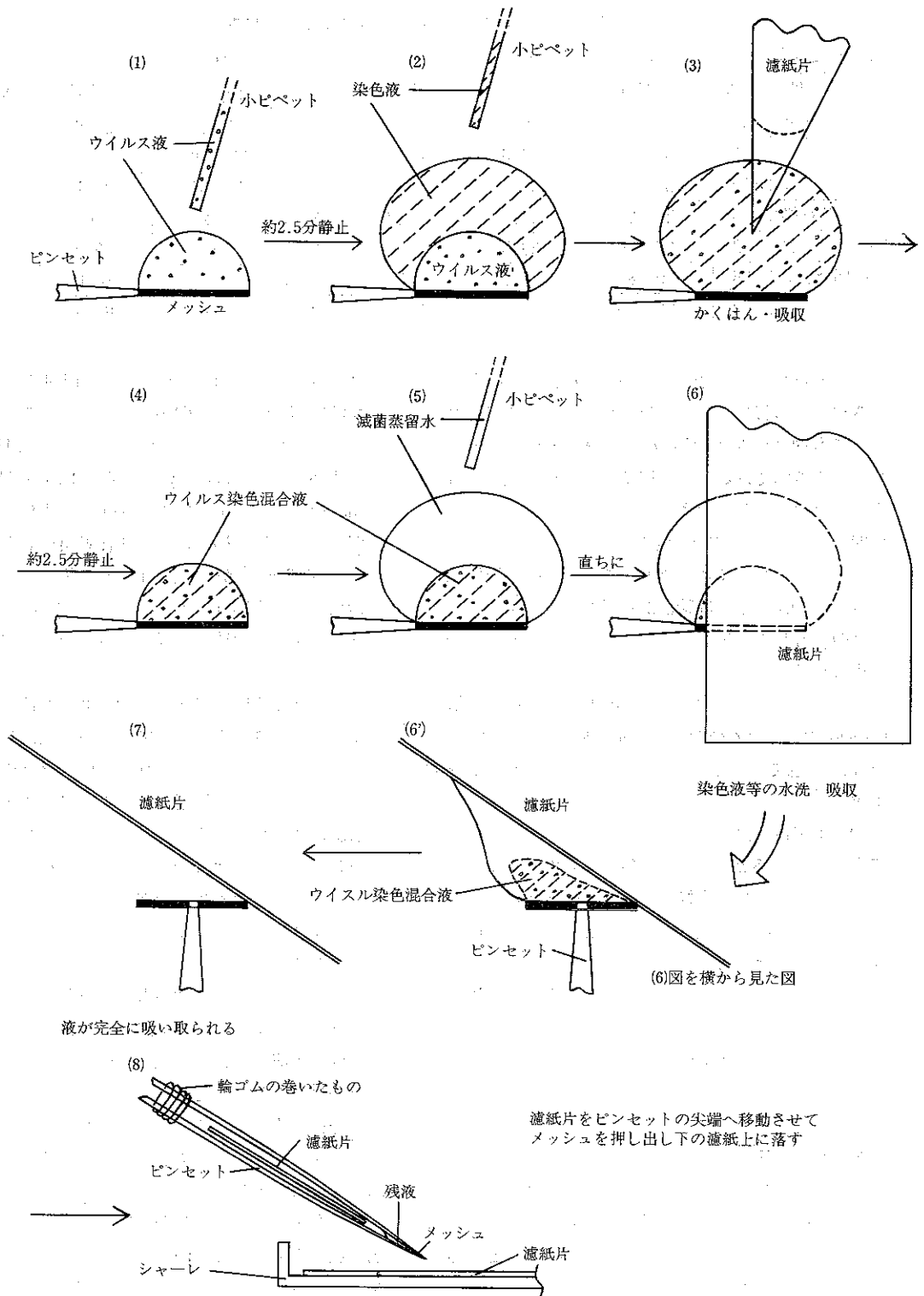


図1-2 染色方法の手順

表1 検出されたウイルス種のサイズ(pH値別)

(nm)

ウイルス種	染色 粒子径 (nm)	pH7.4 染色				pH4.5 染色			
		例数	測定範囲	平均値	標準偏差	例数	測定範囲	平均値	標準偏差
オトフケ様		42	37~42	38.7	1.2	7	36~40	37.6	1.4
カリシ		10	37~39	38.6	0.7	6	38~40	38.2	1.7
アストロ		10	31~32	31.1	0.3	7	30~31	30.7	0.45
エンテロ様		8	26~27	26.3	0.43	3	26~27	2.67	0.47
ロタ		3	66~70	68.7	1.89	2	—	80.0	—
不明粒子		6	70~80	79.7	0.8	6	—	80.0	—
アデノ		19	80~90	82.3	3.3	9	80~90	85.3	4.42

Techniqueによって突起状のCapsomerを見出しているが、この報告とほぼ一致した。カリシウイルスについても同様に粒子の周辺に10個の突起状物のあるものが少数例ではあったが観察されたが(図2-3), オトフケ様のそれとは多少異っている。同様な構造は佐熊<sup>13)</sup>, 中田<sup>14)</sup>の文献でも見出されている。

(2) アストロウイルスのサイズではpHの影響はなかったが、pH7.4では特徴的な星状模様は検体により不鮮明、もしくは消失しているのが多く、判定に困難な場合が多かった。

(3) ロタウイルスについてpH4.5の染色が二層のCapsidでからなる径80nmの完全形粒子が観察され、pH7.4染色では内層のみの径68.7nmの不完全形粒子が観察された。

(4) 不明粒子については平成2年9月から6件ほど観察されているが、粒子の形状もロタウイルスとは少々異なり網目状の模様がある。pH4.5の染色では二層のCapsidが観察されず、粒子径は80nmでpH値の違いによる差はみられなかった。

(5) ファージについては主としてpH7.4の染色のものを示した。観察されたファージの中には単独で散在しているもの、尾部が長くその末端部を結合しあって集団を形成しているものが観察された(図2-15~18)。

### 3. 考 察

3-1 染色pH値の違いのウイルスサイズにおよぼす効果はロタウイルス以外にはみられなかった。このことについてはすでに中田らの報告<sup>12)</sup>に述べられているが、今回も同様な結果であった。

3-2 ウイルス濃度はpH4.5の染色の方がpH7.4のそれよりも一般に高かった。図3にpH7.4の染

色によるウイルス濃度(Log y)とpH4.5によるウイルス濃度(Log x)の相関関係を示している。その相関係数は $r=0.834$ と高度に有意であった。pH7.4の染色によるウイルス濃度yの推定の回帰式は $\log y=0.735 \log x+0.245$ となり、pH4.5の染色のウイルス濃度はpH7.4のそれよりも対数変換値として約1.4倍(=1/0.735)高かった。pH4.5の染色によるウイルス検出率がpH7.4のそれよりも一般に高いのは染色されたウイルスの壊れを遅らせる安定効果があるためとされている<sup>11)</sup>。

このような説明のほかに、染色液が酸性であれば、ウイルス粒子等のカーボン膜への附着又は吸着が良くなることも考えられる。これについては水中ウイルス(ロタウイルス)の濃縮用にミリポアフィルターによる吸着法が知られている。すなわち、ウイルスの吸着には塩化アルミ又はマグネシウムの存在のもとに一旦pH3.5に下げ、ウイルスの溶出にはパイオン類を加えてpH10に上げる<sup>15)</sup>、又は超音波処理で溶出させる<sup>16)</sup>などの方法がある。

3-3 ウイルスの表面構造はpH4.5の染色で比較的鮮明に観察され、又構造もよく保存されている。これは染色液が酸性側で粒子表面の洗滌効果や表面の固定効果があると考えられるが、同時に表面の溶解変形も考慮に入れる必要があると思われる。

3-4 検出粒子の染色時間を一定時間(約2.5分間)に定め、染色むらの少ないようにした。従来は染色時間を染色液の攪拌時間内にとどめていたので、染色状態のよくないものがでていた。しかし、ロタウイルスの染色については、pH7.4の染色はもとよりpH4.5の染色であっても出来るだけ短時間に染色水洗を済すようにした方がよい結果であった。

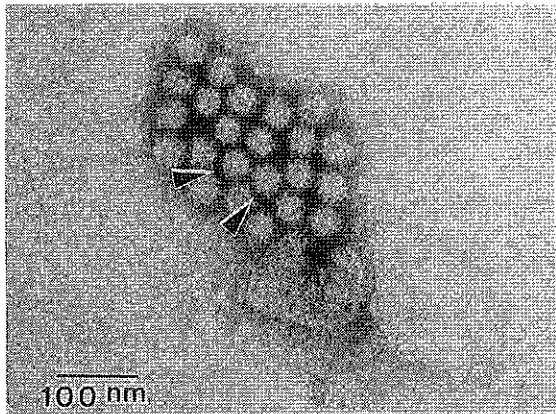


図2-1 オトフケ様(MI161)  
矢印は突起の部分  
pH7.4 染色 (×100,000)

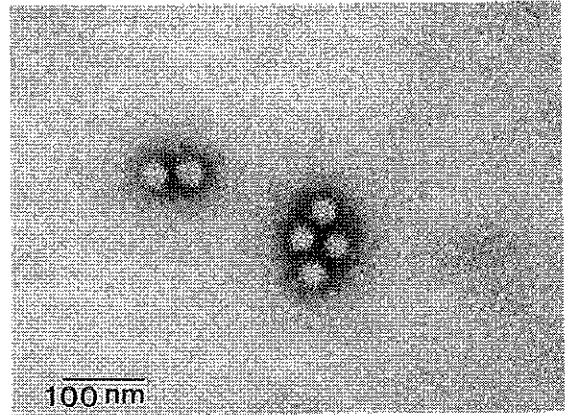


図2-2 オトフケ様(MI161)  
pH4.5 染色 (×100,000)

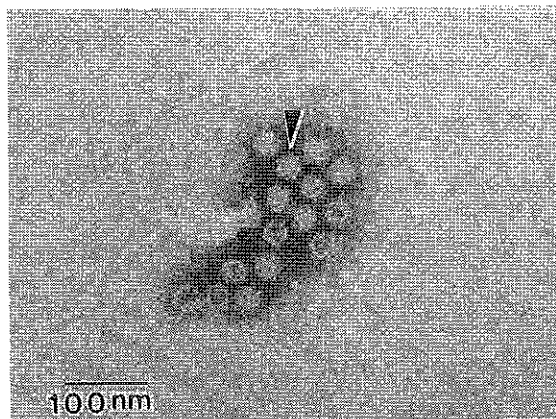


図2-3 カリシウイルス(TA560)  
矢印は突起の部分  
pH7.4 染色 (×100,000)

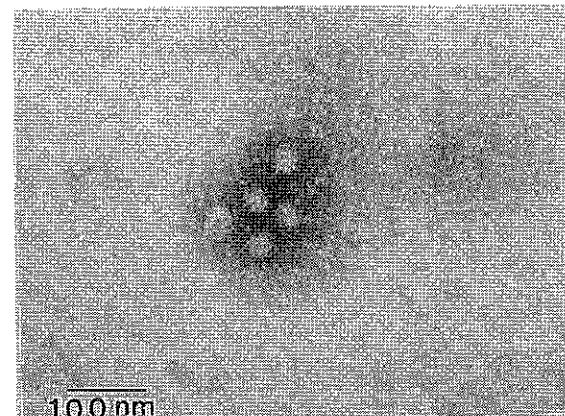


図2-4 カリシウイルス(TA526)  
pH4.5 染色 (×100,000)

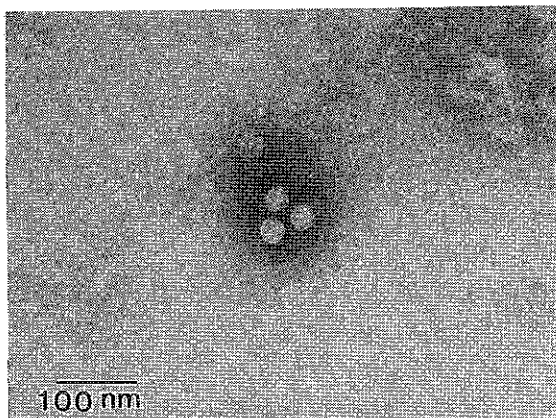


図2-5 アストロウイルス(TA578)  
pH7.4 染色 (×100,000)

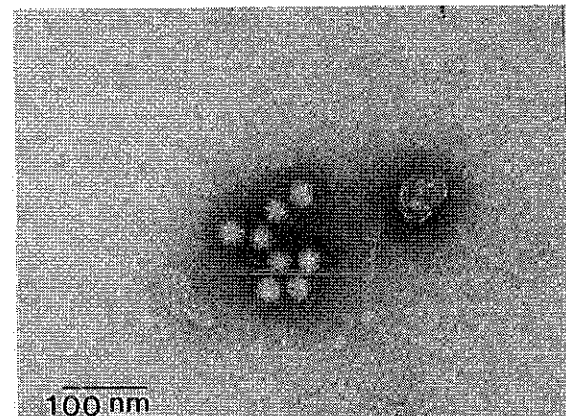


図2-6 アストロウイルス(TA578)  
pH4.5 染色 (×100,000)

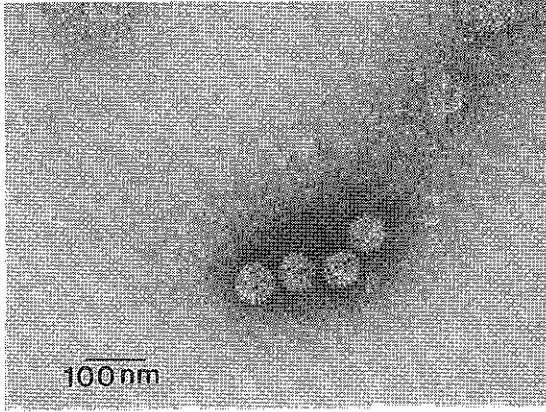


図2-7 ロタウイルス(TO73)  
pH7.4 染色 (×75,000)

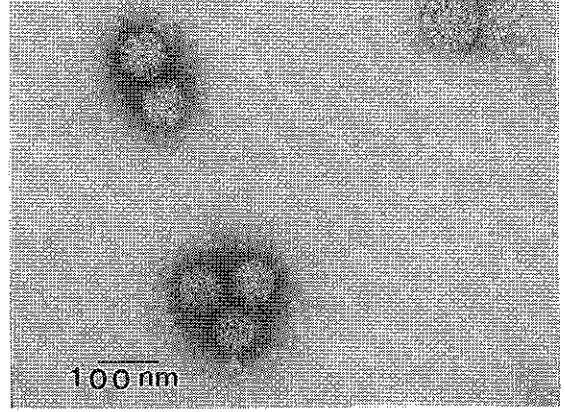


図2-8 ロタウイルス(TO73)  
pH4.5 染色 (×75,000)

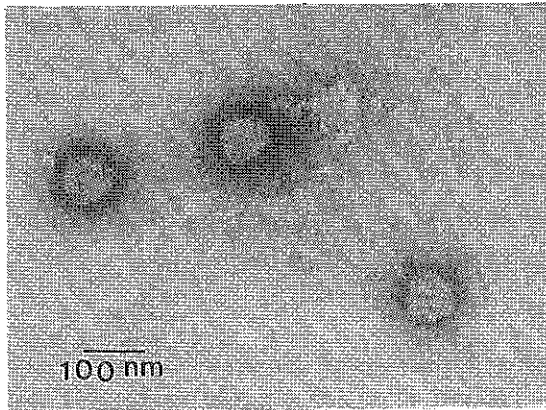


図2-9 アデノウイルス(TA465)  
pH7.4 染色 (×75,000)

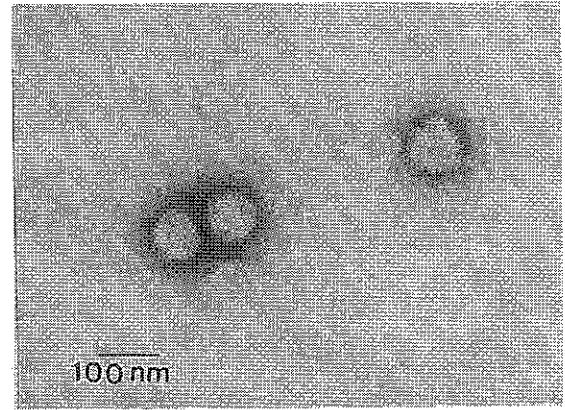


図2-10 アデノウイルス(TA532)  
pH4.5 染色 (×75,000)

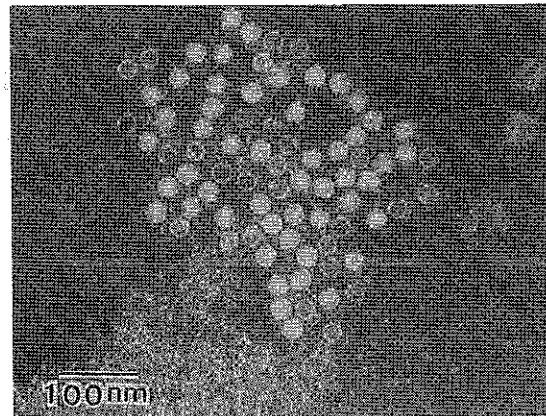


図2-11 エンテロ様ウイルス(AK100)  
pH7.4 染色 (×100,000)

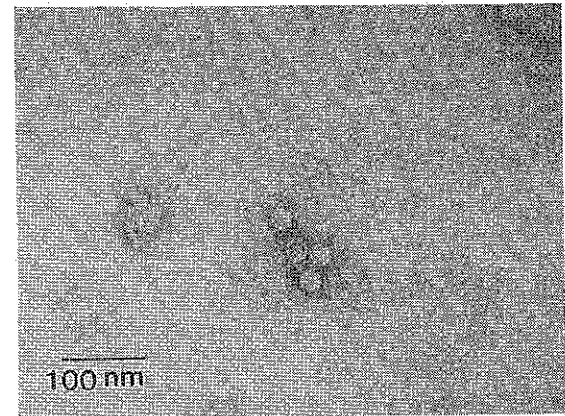


図2-12 エンテロ様ウイルス(TA639)  
pH4.5 染色 (×100,000)

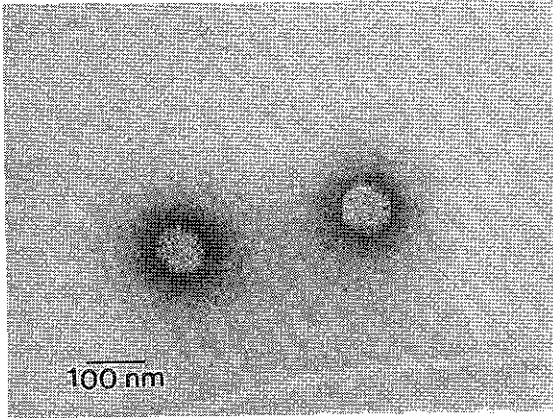


図2-13 不明粒子(TA606)  
pH7.4 染色 (×75,000)

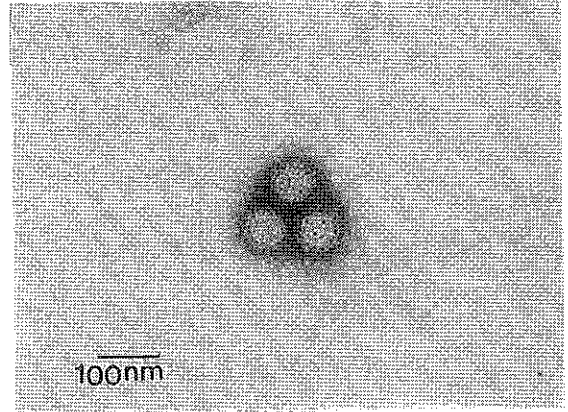


図2-14 不明粒子(TA606)  
pH4.5 染色 (×75,000)

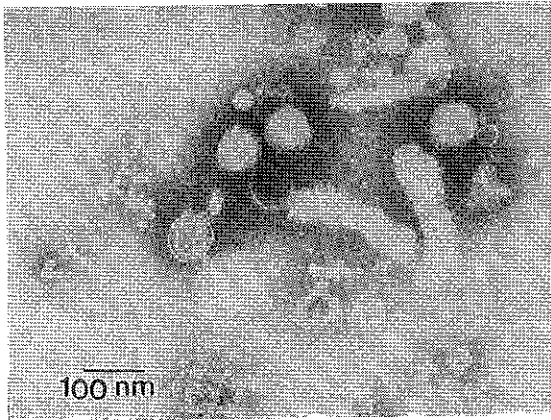


図2-15 ファージ(TA512)  
pH7.4 染色 (×75,000)

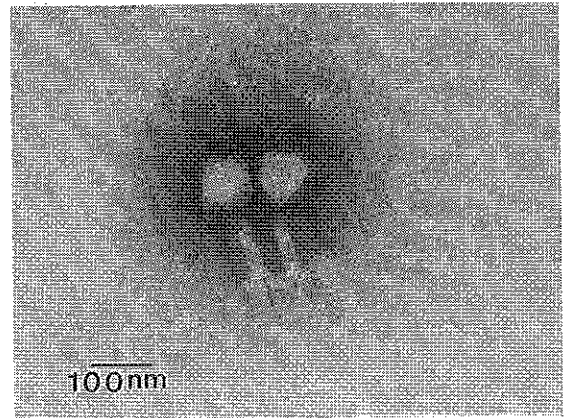


図2-16 ファージ(TA658)  
pH7.4 染色 (×75,000)

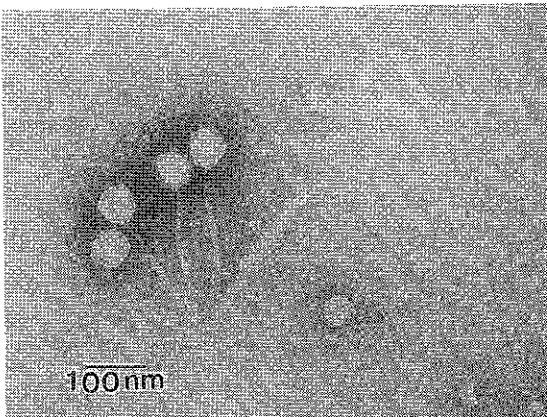


図2-17 ファージ(MI161)  
pH7.4 染色 (×75,000)

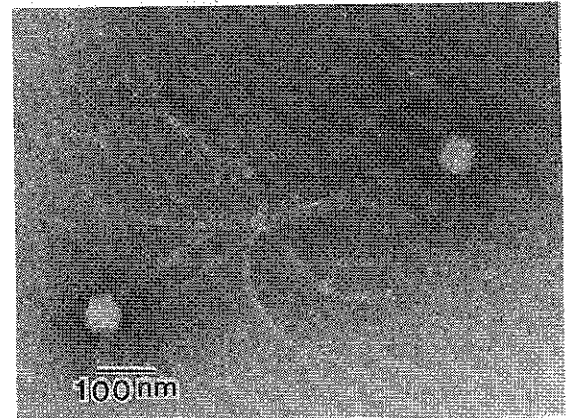


図2-18 ファージ(TA492)  
pH7.4 染色 (×75,000)

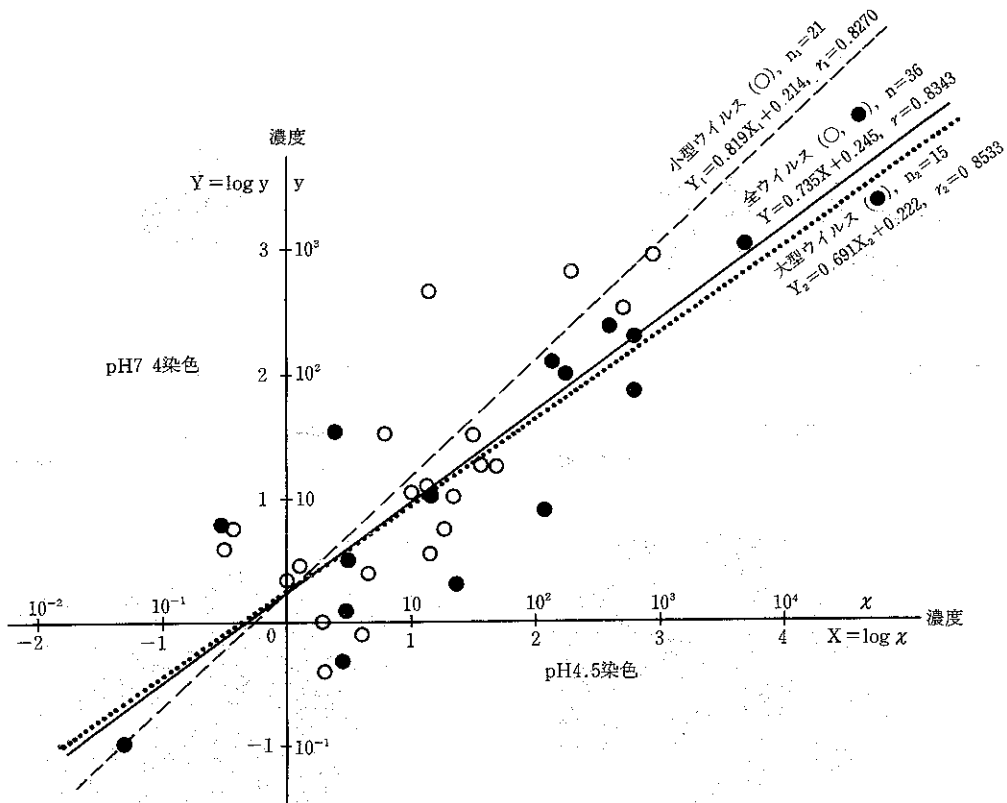


図3 pH4.5染色によるウイルス濃度 (X) と pH7.4染色によるウイルス濃度 (Y) の相関関係

3-5 ウイルスの染色のための検液に混濁が多少残っていても、その影響が軽微になる利点があると考えられる。これは染色の最終段階で染色液の水洗処理があるためである。しかし、この操作は同時に染色粒子が吸着膜からはがれ濾紙の方に移行し除去される恐れがある。それは大型ウイルス (アデノ、ロタ、不明粒子) についてはとくに高濃度領域にその影響が大きいと思われる。試みに検出したウイルスを大型及び小型に分け回帰係数を比較したところ  $0.691 < 0.819$  となり、大型ウイルスの方に、より濃度差が大きいことを示した (図3)。

## 第2部 検査成績

### 1. 材料と方法

#### 第1部参照

### 2. 結果

#### 2-1 小児の被検状況とウイルス検出率

検査対象 (ロタウイルス検出者を除く) は0歳から

13歳までの308名 (男子156名、女子148名、不明4名) であった (表2)。被検者の70%は0歳から1歳までの乳幼児で占め、0歳が43.2%と最も多く、次いで1歳の27.9%で、10~14歳は2.3%と最少で男女差はほとんどなかった。

ウイルスの検出数は0歳~13歳の95検体で30.8%の検出率であった。年齢区分別では0歳は21.8%、1歳が45.3%、2歳が46.2%と高率であった。この0歳の検出率は1歳及び2歳の検出率よりも低いので、表2のカイ二乗検定の結果、0歳と1歳から  $\chi^2 = 13.52 (P < 0.1\%)$  及び0歳と2歳から  $\chi^2 = 6.74 (P < 2\%)$  が得られ、年齢別ウイルス検出率は0歳が低く、1歳~2歳が有意に高くなることが知れた。

#### 2-2 各種ウイルスの検出率

平成元年11月から2年11月までのほぼ1年間 (12月分は医大で電顕検査を行い依頼のない月) のウイルス種の検出数と検出率を図4に示した。

月別ウイルス検出率は図4に示すように11月~5



表2 年齢別, 男女別被検者数とウイルス検出及び不検出者数

年齢(歳)	ウイルス検出者数			ウイルス不検出者数			全被検者数			ウイルス検出率 b/a(%)
	男(%)	女(%)	a 全(%)	男(%)	女(%)	b 全(%)	男(%)	女(%)	全(%)	
0	13(27.1)	15(32.6)	29(30.5)	54(50.0)	47(46.1)	104(48.8)	67(42.9)	62(41.9)	133(43.2)	(21.8)
1	18(37.5)	21(45.7)	39(41.5)	25(23.1)	22(21.6)	47(22.1)	43(27.6)	43(29.1)	86(27.9)	(45.8)
2	6(12.5)	6(13.0)	12(12.6)	7( 6.5)	7( 6.9)	14( 6.6)	13( 8.3)	13( 8.8)	26( 8.4)	(46.2)
3~4	6(12.5)	4( 8.7)	10(10.5)	7( 6.5)	9( 8.8)	9( 4.2)	13( 8.3)	13( 8.8)	26( 8.4)	(38.5)
5~9	4( 8.3)	0( - )	4( 4.2)	13(12.0)	13(12.7)	13( 6.1)	17(10.9)	13( 8.8)	30( 9.7)	(13.3)
10~13	1( 2.1)	0( - )	1( 1.1)	2( 1.9)	4( 3.9)	4( 1.9)	3( 1.9)	4( 2.7)	7( 2.3)	(14.3)
計	48(100)	46(100)	95(100)	108(100)	102(100)	213(100)	156(100)	148(100)	308(100)	(30.8)

\* 不明者含む

0歳 1歳		0歳 2歳	
ウイルス +	29	39	12
ウイルス -	104	47	14

$\chi^2=13.52, p<0.1\%$        $\chi^2=6.74, p<2\%$

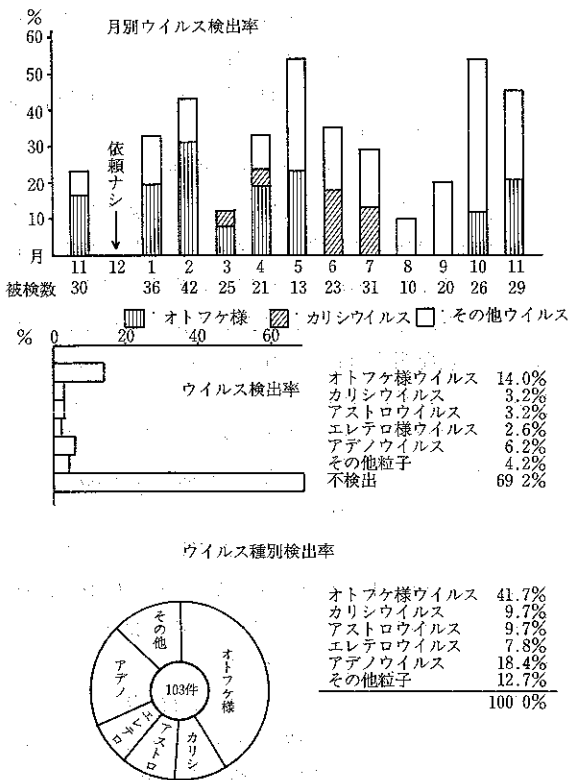


図4 乳児下痢症のウイルスの検出率

月に高い検出率をみ、夏は低く、再び10~11月に上昇の傾向がみられた。

ウイルス種の内訳は被検数308検体のうち、オトフ

ケ様因子43件(41.7%), カリシウイルス10件(9.7%), アストロウイルス10件(9.7%), エンテロ様ウイルス8件(7.8%), アデノウイルス19件(18.4%), その他粒子13件(12.6%)計103件であった。このうち同一検体で二種のウイルスが検出された8検体が含まれている。それはエンテロ様とオトフケ様とが4件、アデノウイルスとが1件で、オトフケ様、カリシウイルス及びアデノウイルスとその他粒子とが同時に検出されたものはそれぞれ1件であった。

2-3 採便日数と各種ウイルス濃度

採便は各患者について1回とした。又、患者の発症日から採便日までの経過日数を採便日数とした。なお、発症当日採便を0日目とはせず1日目とし、以下同様に1日ずらした日付で表した。各採便日数の級心の値はその採便日数から0.5日差引いた値で表すことにした。図5の採便日数の分布は対数変換した数値で表した分布図である。

(1) 採便日数の分布 (図5)

全被検者(308名)の採便日数の分布は歪度 $g_1$ 及び尖度 $g_2$ の正規分布検定 $u_1=2.06, u_2=0.80$ よりほぼ対数正規分布である。この分布より採便者の89%(273名)は発症日より6日以内で、長期のものは61日のものもあった。採便日数の平均値は対数値の換算により2.02日で採便日数6日までの無変換値の平均2.12日にほぼ一致する。

ウイルス検出者(不明粒子を含む、95名)の採

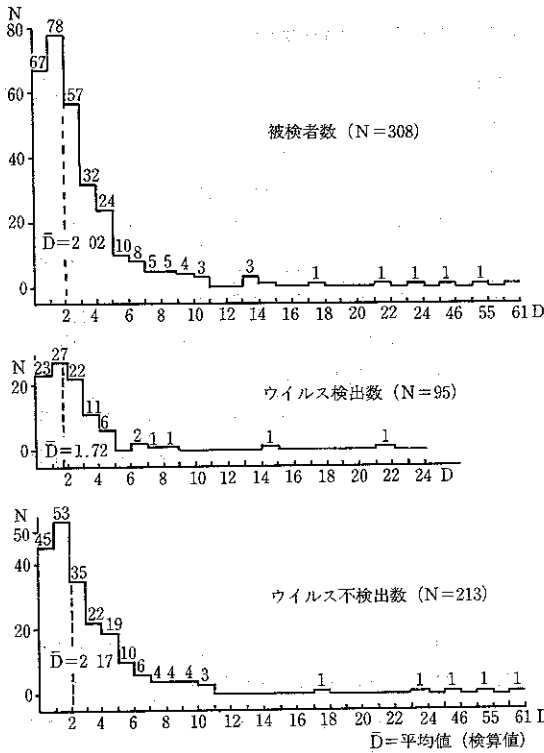


図5 採便日数(D)別のウイルス検出数及び不検出数(N)

便日数の分布は同様に  $u_1 = 0.3193$ ,  $u_2 = -0.2721$  より対数正規分布である。この分布より採便者の87% (83名) は4日目以内で、長期のものでは22日のものもあった。採便日数の平均値は同様に1.72日で、採便日数4日までの無変換値の平

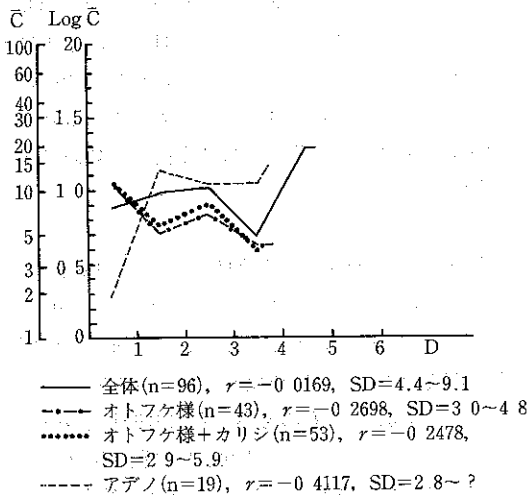


図6 採便日数(D)別の各種ウイルス濃度の平均値(C̄)

均1.75日とほぼ等しい。

ウイルス不検出者(213名)の採便日数の分布は同様に  $u_1 = 1.722$ ,  $u_2 = 0.5692$  より対数正規分布である。この分布より採便者の89% (190名) は7日以内で、長期のものは最長61日であった。採便日数の平均値は同様に2.17日で採便日数7日までの無変換値の平均2.35日とほぼ等しい。

ウイルス検出者と不検出者の採便日数の平均値の差のt-検定は  $t_0 = 1.95$  ( $P < 4\%$ ) となり有意とはならなかった。

(2) 採便日数とウイルス濃度との関係

図6にオトフケ様及びアデノウイルスの採便日数とウイルス濃度の平均値との関係を示した。いずれのウイルスについても各採便日数と濃度平均値との間に有意の差はなかった。

オトフケ様についてはカリシウイルスを加えた集団でも同様な減少傾向を示した。又、相関係数、平均値においても有意の差はみられなかった。アデノウイルスでは2日目に極大となり、以降停滞する傾向を示した。

2-4 ウイルスの検出と臨床症状

小児患者のウイルスの検出、不検出と臨床症状(発熱、下痢、嘔吐)を性別、年齢別に集計し、表2に示した。ウイルスの検出、不検出と各症状の陽性、陰性との関連をみるために、カイ二乗検定の結果からウイルスと有意な関連のあった症状は嘔吐のみであった。表3-1から男女全体では  $\chi^2 = 11.36$  ( $P < 0.1\%$ ) で高度に有意であった。表3-2から性別では女が  $\chi^2 = 10.19$  ( $P < 1\%$ ) で有意、年齢別では0歳が  $\chi^2 = 6.41$  ( $P < 2\%$ ) で有意であった。

ウイルス種別では表3-2から例数の多いオトフケ様について  $\chi^2 = 14.60$  ( $P < 0.1\%$ ) で高度に有意、性別では男子が  $\chi^2 = 4.71$  ( $P < 5\%$ )、女子は  $\chi^2 = 8.38$  ( $P < 1\%$ ) で、それぞれ男女共有意であった。

2-5 ファージとウイルス検出及び症状

ファージの検出率は全体で19%であった。このうちファージとウイルスが同時に検出された例では30%と高い検出率であったので、表4よりカイ二乗検定の結果は高度に有意であった。

ファージと症状との関連では発熱が有意となった。但し、ウイルス不検出の場合ファージと発熱との関連では有意とはならなかったが例数が少ないためと思わ

表3-1 ウイルスの検出、不検出と臨床症状(全体)

検出別	年齢	被検数	発熱			下痢			嘔吐		
			+	-	*	+	-	*	+	-	*
検出	0	29	13	14	2	27	0	2	17	11	1
	1	38	15	21	2	37	0	1	21	14	3
	2	11	5	6	0	11	0	0	6	4	1
	3~4	12	6	5	1	12	0	0	10	2	0
	5~9	4	2	1	1	4	0	0	3	1	0
	10~13	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
	(計)	(95)	(42)	(47)	(6)	(92)	(0)	(3)	(57)	(33)	(5)
不検出	0	104	58	40	6	99	1	4	37	56	11
	1	47	20	26	1	47	0	0	15	30	2
	2	14	6	8	0	14	0	0	7	7	0
	3~4	16	9	5	2	14	0	2	7	7	2
	5~9	26	13	13	0	25	1	0	13	13	0
	10~13	6	2	4	0	6	0	0	4	2	0
	(計)	(213)	(108)	(96)	(9)	(205)	(2)	(6)	(83)	(115)	(15)
合計	308	150	143	15	297	2	9	140	148	20	

全 吐+ 吐-      1歳 吐+ 吐-      \* 無回答

ウイルス +	57	33
ウイルス -	83	115

$x^2=11.36, p<0.1\%$        $x^2=5.66, p<2\%$

表4 ファージとウイルスの検出、不検出と臨床症状

ファージ	ウイルス	被検数	発熱			下痢			嘔吐		
			+	-	*	+	-	*	+	-	*
検出	検出	30	16	11	3	29	0	1	18	9	3
	不検出	29	19	9	1	28	0	1	13	13	3
	(計)	(59)	(35)	(20)	(4)	(57)	(0)	(2)	(31)	(22)	(6)
不検出	検出	65	26	36	3	63	0	2	39	24	2
	不検出	184	89	87	8	177	2	5	70	102	12
	(計)	(249)	(115)	(123)	(11)	(240)	(2)	(7)	(109)	(126)	(14)
合計		308	150	143	15	297	2	9	140	148	20

ウイルス      発熱      \* 無回答

ファージ +	30	29
ファージ -	65	184

$x^2=13.69, p<0.1\%$        $x^2=4.19, p<5\%$

表3-2 ウイルス検出、不検出と臨床症状

検出別	性別	年齢	被検数	発熱			下痢			おう吐		
				+	-	*	+	-	*	+	-	*
検出	男	0	13	6	7	0	13	0	0	7	6	0
		1	18	9	9	0	18	0	0	12	6	0
		2	5	3	2	0	5	0	0	2	2	1
		3~4	7	3	3	1	7	0	0	6	1	0
		5~9	4	2	1	1	4	0	0	3	1	0
		10~13	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
		(計)	(48)	(24)	(22)	(2)	(48)	(0)	(0)	(30)	(17)	(1)
	女	0	15	7	7	1	14	0	1	10	5	0
		1	20	6	12	2	19	0	1	9	8	3
		2	6	2	4	0	6	0	0	4	2	0
		3~4	5	3	2	0	5	0	0	4	1	0
		(計)	(46)	(18)	(25)	(3)	(44)	(0)	(2)	(27)	(16)	(3)
	合計	94	42	47	5	92	0	2	57	33	4	
不検出	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	
不検出	男	0	54	34	17	3	52	1	1	25	21	8
		1	25	13	11	1	25	0	0	9	15	1
		2	7	3	4	0	7	0	0	3	4	0
		3~4	7	3	2	2	5	0	2	2	3	2
		5~9	13	6	7	0	13	0	0	8	5	0
		10~13	2	1	1	0	2	0	0	2	0	0
		(計)	(108)	(60)	(42)	(6)	(104)	(1)	(3)	(49)	(48)	(11)
	女	0	47	24	22	1	46	0	1	12	34	1
		1	22	7	15	0	22	0	0	6	15	1
		2	7	3	4	0	7	0	0	4	3	0
		3~4	9	6	3	0	9	0	0	5	4	0
		5~9	13	7	6	0	12	1	0	5	8	0
		10~13	4	1	3	0	4	0	0	2	2	0
(計)		(102)	(48)	(53)	(1)	(100)	(1)	(1)	(34)	(66)	(2)	
合計	210	108	95	7	204	2	4	83	114	13		
不検出	0	3	0	1	2	1	0	2	0	1	2	
合計	308	150	143	15	297	2	9	140	148	20		

嘔吐

女	+	-
ウイルス+	27	16
ウイルス-	34	66

$x^2=10.19, p<1\%$

女(0歳)

女	+	-
ウイルス+	10	5
ウイルス-	12	34

$x^2=6.41, p<2\%$   
(イエーツ補正)

全

全	+	-
オトフケ+	30	10
ウイルス-	83	115

$x^2=14.60, p<0.1\%$

男

男	+	-
オトフケ+	14	3
ウイルス-	49	48

$x^2=4.71, p<5\%$   
(イエーツ補正)

女

女	+	-
オトフケ+	16	7
ウイルス-	34	66

$x^2=8.38, p<1\%$   
(イエーツ補正)

オトフケ 検出	男	0~5	17	9	8	0	17	0	0	14	3	0
	女	0~4	26	9	14	3	24	0	2	16	7	3
	合計	43	18	22	3	41	0	2	30	10	3	
カリシ 検出	男	1~9	8	3	5	0	8	0	0	5	3	0
	女	1~3	2	1	1	0	2	0	0	2	0	0
	合計	10	4	6	0	10	0	0	7	3	0	

\* 無回答、不 不明者

れ今後検討を要すると考える。

### 3. 考 察

ロタウイルス以外の小児のウイルス性急性胃腸炎の病原体として平成元年11月からほぼ1年間に小型球形ウイルスやその他の大型ウイルスの検出検査を行ってきたが、今回の調査からはウイルスの季節的消長について明らかな特徴を示すものは得られなかった。しかし、オトフケ様因子は冬期のロタウイルスの流行期をばさんで11月から翌年5月にかけて出現した後一旦終息し、10月から再び出現する傾向をみせた。年平均の検出率は14.0%と中田ら<sup>18)</sup>の冬期の報告より概算した22.0%よりも低いが、カリシウイルスは春から夏期にかけて出現し、6月、7月に集中的に検出された(年平均3.2%)。カリシウイルスの流行については札幌市の乳児病、保育園などの集団発生などから特定の流行期は指摘できないとしているが<sup>18)</sup>、大瀬戸ら<sup>19)</sup>は松山市内での小児の急性胃腸炎のウイルス検査から地域において常在的な流行(10~12月)を繰返していることを示唆している。アデノウイルスは年間を通じて検出され(年平均6.2%)、季節的な変動はみられなかった。これらウイルスの流行が周期をもつかどうかについては今後の継続調査により明らかになると考えられる。

乳幼児のウイルスの検出状況については0歳の被検率が43.2%と高率にもかかわらず、ウイルス陽性率が21.8%で1歳又は2歳の検出率(45.8%と46.2%)に比し有意に低かったが、これは被検率が高いために逆に検出率が低くなったのか、0歳児のウイルスに対する抵抗力(免疫力)の違いによるのか、採便時期によるのか不明である。岡田<sup>21)</sup>によると、年齢が2歳以下と3歳以上の患者に分けてウイルスの検出、不検出を比較したが、当所の検出率はそれぞれ32.7%、23.8%で、カイ二乗検定では有意な差は認められなかった。

採便日数の分布とウイルスの検出期間についてはウイルス不検出者の約90%の採便が7日目までに終り、ウイルス検出者では4日目であったが、検出者のウイルス最小濃度が4日目であったことから当然予想される結果と思われる。オトフケ様因子による小児の急性胃腸炎の有症期間が2時間から数日におよび平均1~2日であるといわれている<sup>18)</sup>又成人のボランティアによるノルウォークウイルスによる発症例から、ウイルスの排泄時間は3日目までで、そのピークが30時

間という報告<sup>20)</sup>がある。当所で求めたウイルス陽性者の検出期間から排泄期間を推測することはむずかしいが、再感染や他の原因によって排泄を続けているケースが含まれている可能性があるため、実際は4日というこの期間よりも短くなると思われる。

ウイルスの検出と臨床症状では、ウイルス検出者としてオトフケ様因子で嘔吐症状が有意となった。このことは下痢症状がウイルスの検出不検出にかかわらずほとんど患者にあったことから、嘔吐の有無が患者の病因の判定に意義のあることと考える。

### 4. 結 語

- (1) 平成元年11月から2年11月までの札幌市における308例の小児下痢症のウイルス等の検出状況を調査した。検出率は0歳から13歳までは、30.8%であった。年齢別では0歳は21.8%、1歳は45.3%で有意に高率であった。
- (2) ウイルス種別の検出件数の全検出率は33.4%で、そのうちオトフケ様因子が14.0%、カリシウイルスが3.2%、アストロウイルスが3.2%、その他エンテロ様ウイルス、不明粒子、アデノウイルスなど数%が検出された。
- (3) 月別変動についてオトフケ様因子については冬期に集中し夏期に終息の傾向がみられ、逆にカリシウイルスは春先から夏期にかけて検出され、ウイルス種によって季節的特長がみられた。
- (4) 採便日数とウイルス検出期間から、多くの例はオトフケ様因子の排泄期間は4日目までであると推測される。
- (5) ウイルスの検出と臨床症状(発熱、下痢、嘔吐)の関係については、嘔吐症状のみがウイルス検出者に有意となり、とくに例数の多かったオトフケ様の検出者に高度であった。
- (6) ファージ検出例はウイルスの同時検出例、又は発熱症状を示すものが有意に多かった。
- (7) ウイルスの染色液のpH4.5の方がpH7.4よりもウイルスの検出濃度が有意に高かった。

### 謝 辞

本報告にあたり、試料検体、資料等の御提供並びに適切な御助言、御指導を頂きました札幌医科大学小児科の諸先生方に対し心から感謝いたします。

## 5. 文 献

- 1) 国立予衛研, 厚生省保健医療局: 病原微生物検出情報, 9, 81, 1988.
- 2) 国立予衛研, 厚生省保健医療局: 同上, 10, 69, 88, 1989.
- 3) 国立予衛研, 厚生省保健医療局: 同上, 12, 95, 116, 1991.
- 4) 大森茂, 横田秀幸, 鈴木欣也, 他: 第22回日本小児感染症学会(東京), 86, 1990.
- 5) 中村キミエ, 大森茂, 横田秀幸, 他: 北海道公衆衛生学雑誌, 15, 87, 1991.
- 6) 千葉峻三, 中田修二, 他: 昭和63年度ヤクルト研究報告集, 1989.
- 7) 中田修二, 古川圭子, 他: 小児感染症学会, 1989.
- 8) 宇加江進, 中田修二, 他: 同上, 161, 1990.
- 9) 宇加江進, 中田修二, 他: 同上, 1991.
- 10) 横田秀幸, 他: 札幌市衛生研究所年報, 15, 83-98, 1987.
- 11) Nakata, S., et al: J. Clin. Microbiol. 25, 1902-1906, 1987.
- 12) Taniguchi, K., Urasawa, S., et al: ibid., 10, 730-736, 1979.
- 13) 佐熊泰彦: 札幌医誌, 50, 225-237, 1981.
- 14) 中田修二: 同上, 55, 497-512, 1986.
- 15) Smith, E. M., Gerba, C. P.: Appl. Environ. Microbiol., 43, 1440-1450, 1982.
- 16) 谷直人, 井上風己, 他: 奈良県衛生研究所年報, 19, 132-137, 1984.
- 17) Rodgers, F. G., Hufton, P.: The Pathological Society of Great Britain and England, 20, 123-130, 1985.
- 18) 中田修二, 千葉峻三: 臨床消化器内科, 6, 1078-1087, 1991.
- 19) 大瀬戸光明, 他: 愛媛衛研年報, 43, 11-16, 1982.
- 20) Thornhill, T. S., et al: J. Infect. Dis. 132, 28-34, 1975.
- 21) 岡田正次郎: 食品と微生物, 4, 93-102, 1987.

Electron Microscope Detection of Small Round Viruses etc.  
of Infantile Diarrhea in Sapporo,  
and the Virus Staining Method (Precursory Report)

Hideyuki Yokota, Yuko Kikuchi, Susumu Ukae\*  
and Syuji Nakata\*

**ABSTRACT**

We were requested by the Department of Pediatrics, Sapporo Medical College, to conduct a morpho-identification analysis of small round viruses etc. on 308 samples, with negative reaction to rotavirus, by using electron microscopy. The samples were extracted from feces of children aged 0 to 13, who had undergone medical examinations at Sapporo medical facilities mainly because of diarrhea complaints.

The total detection rate of all viruses was 30.8%. Of those detected, they can be broken down into the following: otofukelike factor, 14.0%; calicivirus, 3.2%; astrovirus, 3.2%; enterovirus, 2.6%; rotalikevirus, 1.9%; adenovirus, 6.2%; and other particles, 2.3%.

Although there are some clinical symptoms of infantile diarrhea such as fever, diarrhea, and vomiting, the most significant symptom for those with detected viruses—especially otofukelike factor, was vomiting.

The rate of virus detection and the incidence of fever were both significantly high in those with detected bacteriophage.

The process of virus staining techniques by using 2% phosphorus tungstic acid was presented.

---

\* Department of Pediatrics Sapporo Medical College