

## 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(ロタレ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ーボン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

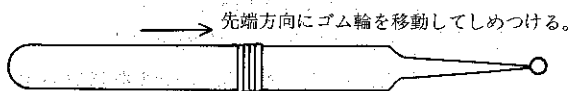
特級燐タングステン酸 ( $\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 24\text{WO}_3 \cdot \text{nH}_2\text{O}$  キシダ化学) 1gr を 50ml のイオン交換水に溶解し、2% 染色原液として褐色ビンに 4°C で保存する。染色液は原液 10ml をガラス棒でかくはんしながら 2N-KOH を滴加し、pH 試験紙で pH7.4 又は pH4.5 に中和して作成する。染色液はフタ付小試験管に移し、アルミはくで遮光して 4°C に保管する。約 3 カ月は保存出来る。遮光なしでは淡紅白色の沈澱の生ずる恐れがあるため。

#### (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先端に移動させメッシュを押し出す。この操作により、ピンセットの先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

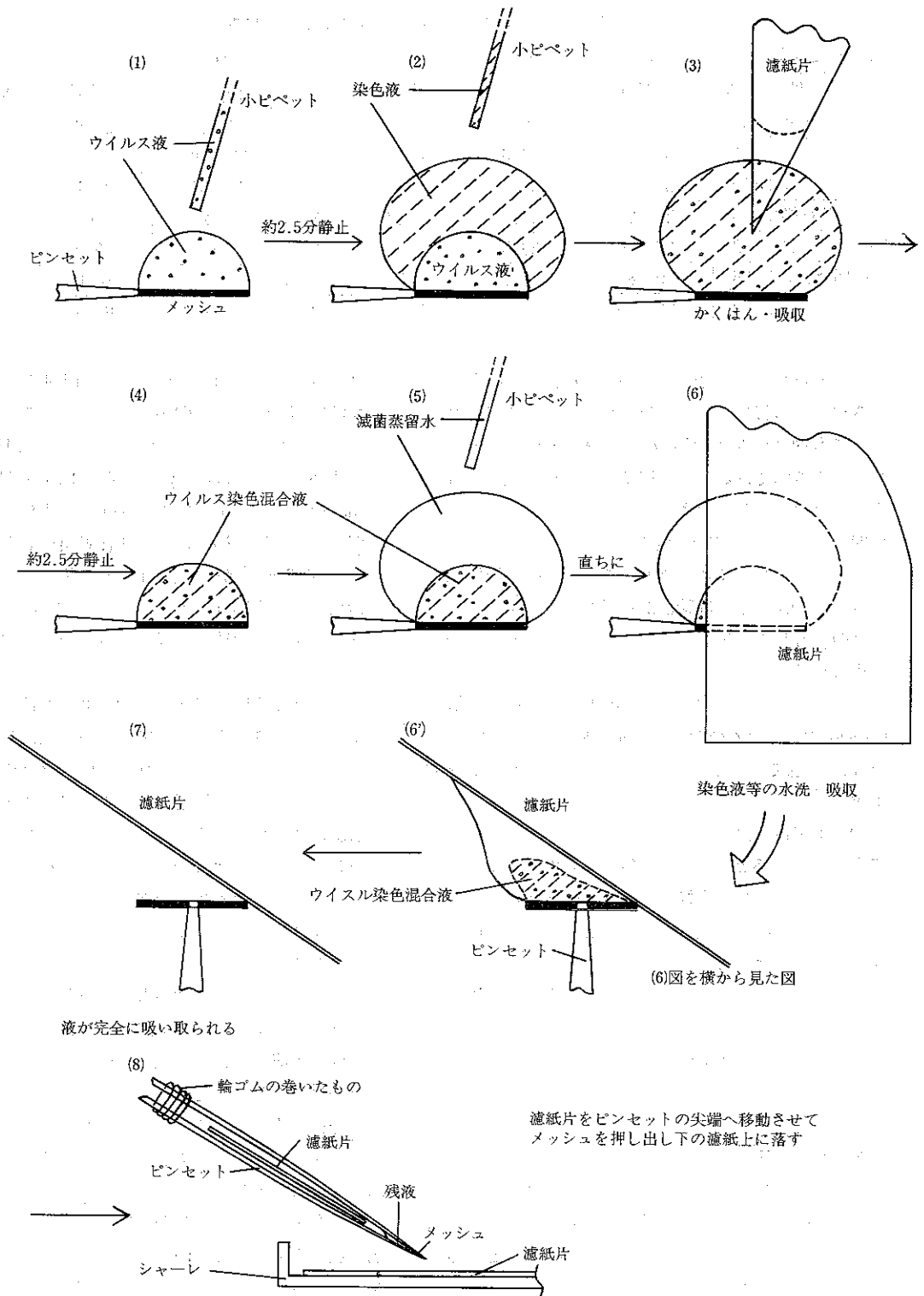


図1-2 染色方法の手順

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。