

川崎病患者からのウイルス分離の試み (分担研究：川崎病の病因ウイルスの探求)

櫻井 實, 伊藤正寛¹⁾, 神谷 齊, 庵原俊昭²⁾
桜井悠郎³⁾

要約 昭和57年4月から昭和63年3月までの間に三重県における70名の川崎病患者を対象に初代サル腎細胞を用いてウイルス分離を行なった。その結果咽頭ぬぐい液, 便, 尿, 血液, 髄液の計144検体中21検体からウイルスが分離された。分離されたウイルスのうち同定されたのはポリオウイルス, アデノウイルスがそれぞれのうち1株であった。それ以外のウイルスのうち7株について検討したところ大きさが30nm-45nmの2種類のRNAウイルスが確認された。患者血清と分離ウイルスとで免疫電顕法を行なったところ一部の血清で陽性反応を認めた。川崎病との関係については結論は出せないが現在さらに検討中である。

見出し語：川崎病, ウイルス分離

初代サル腎細胞, 免疫電顕法

目的 川崎病の病因ウイルスの手がかりを得ることを目的として三重大学小児科では三重県衛生研究所, 各関連病院・医院, サーベイフランス定点の協力を得て川崎病患者からウイルス分離を試みた。

対象と方法 昭和57年4月から63年3月までの間で川崎病の診断基準を満たし川崎病と診断された患者を対象として咽頭ぬぐい液, 便, 尿, 血液, 髄液からウイルス分離を行なった。ウイルス分離の検体は三重県衛生研究所へ送付され分離が行なわれた。培養細胞は三重県衛生研究所で作製

した初代サル腎細胞を用いた。分離材料を表1に示す方法で処理した後接種し少なくとも5代まで blind passage を行なってCPEを観察した。分離されたウイルスについてはIUdRを用いたウイルスDNA阻止法を用いてウイルス核酸を同定した。sucrose gradient 法によりウイルス粒子を精製し電顕によって観察した。一部の患者血清を用いて免疫電顕法と蛍光抗体法を行なった。免疫電顕法の方法は表1に示す。蛍光抗体は分離ウイルスをサル腎細胞に接種しCPEが出現した時点でアセトン固定後, 患者血清とで反応後, 蛍光標識した抗ヒトIgGを用いて蛍光を観察した。

1) 三重大学小児科

2) 三重病院小児科

3) 三重県衛生研究所

表1 ウイルス分離方法

1. 細胞：初代サル腎細胞	3) 電子顕微鏡支持膜はフオルムパールを用い、 カーボンにて強化
2. 接種材料	4) 3% 隣タングステン酸水溶液を1滴加え、 日立製H600S型電子顕微鏡で観察
1) 便：10% 乳剤とし 3,000 回転 30 分間遠 心後上清 0.2 ml を接種	〔免疫電子顕微鏡法〕
2) 咽頭：咽頭ぬぐい液 1ml 3,000 回転 30 分遠心後接種	1) 患者血清を PBS で 10 倍希釈し 56℃ 30 分 間非動化後 4,000 回転 1 時間遠心しその上 清を使用する。
3) 尿：尿を 3,000 回転 15 分間遠心後 0.2 ml を接種	2) ウイルス粒子 0.3 ml と 50 又は 100 倍希釈し た血清 0.3 ml を混和し 37℃ 1 時間反応
4) 髄液：0.2 ml 接種	3) 6,000 回転、30 分遠心した沈渣を免疫顕試 料とした。
5) 血液：ヘパリン加血を 0.2 ml 接種	〔蛍光抗体法〕
3. 吸着	1) 初代サル腎細胞を 12 well tissue culture glassware (Falcon) で培養
便、尿、血液は 1 時間吸着後 Maintenance Medium を加える。	2) 分離ウイルスを培養し CPE 出現後アセトン 固定
4. 培養	3) 患者血清 (10-360 倍希釈) を加えて 37℃ 30 分間培養
37℃ で 2 週間培養、5 代まで Blind Passage をする。	4) FITC 抗ヒト IgG を反応させ蛍光顕微鏡で 観察
〔ウイルス核酸の決定〕	
IUDR による阻止法を用いた。	
〔電子顕微鏡法〕	
1) 培養上清を 3,000 回転 10 分間遠沈し 30% Sucrose に重層し 40,000 回転 3 時間遠沈	
2) 沈渣を数滴の蒸留水に溶解し電顕の材料と した。	

結果 昭和57年4月から昭和63年3月までの間に川崎病と診断され、ウイルス分離が行われた症例数は計70例であった。分離材料は便が63検体、咽頭ぬぐい液68検体、尿9検体、血液2検体、髄液2検体の計144検体であった。そのウイルス分離の結果を表2に示す。CPEが観察されウイルスが陽性と判定された検体は計21検体であった。便からは12検体、咽頭からは7検体、尿からは1検体、血液からは1検体がウイルス陽性であった。全体のウイルス分離率は144検体中21検体、14.6%であった。分離された21

表2 ウイルス分離結果

分離材料	検体数	ウイルス 分離陽性	同 定	電顕観察
便	63	12(19.0%)	1a)	4
咽頭	68	7(10.3%)	1b)	3
尿	9	1(11.1%)	—	—
血液	2	1(50%)	—	—
髄液	2	0(0%)	—	—
計	144	21(14.6%)	2	7

a) ポリオウイルス
b) アデノウイルス

株中便からポリオウイルスと咽頭からアデノウイルスが同定された。それ以外のウイルスは既知のウイルスとして同定できなかったため便から分離された4株、咽頭から分離された3株についてさらに電子顕微鏡によって観察した。

7株についての電子顕微鏡所見を示す。(表3)

表3 電子顕微鏡による観察

症例	年齢	性	分離部位	ウイルス核 酸	大きさ
S.N.	3 y	男	便	RNA	30nm
S.I.	2 y	男	咽頭	RNA	45nm
Y.M.	5 m	男	便	RNA	45nm
D.A.	7 m	男	便	RNA	45nm
K.D.	9 m	男	便	RNA	45nm
H.M.	1 y	男	咽頭	RNA	45nm
J.N.	5 y	女	咽頭	RNA	30nm

ウイルス核酸はすべてRNAであった。ウイルス粒子の大きさは30nmと45nmの2種類が確認された。一部のウイルスについて患者血清を用いて、免疫電顕法を行なった。用いた血清はウイルスが分離された患者自身または他の患者の急性期または回復期血清である。同一の患者5例では5例全例が免疫電顕で陽性と判定された。3例の異なる患者では1例のみが陽性であった(表4)。

表4 免疫電顕法

ウイルス	血清	採血病日	判定
S.N.	S.N.	29	+
S.I.	S.I.	8	+
Y.M.	Y.M.	5	+
D.A.	D.A.	18	+
K.D.	K.D.	3	+

S.I.	R.T.	7	-
K.D.	S.B.	25	-
S.N.	S.B.	25	+

蛍光抗体法は2株のウイルスを用いてそれぞれについて同一患者の血清を含む4人の血清を用いて蛍光抗体法を行なったが、1例のみが蛍光抗体法で陽性であった。

考察 川崎病はその疫学的特徴からなんらかの感染症の可能性が考えられ、ウイルス学的な検討がなされている。これまで病因ウイルスとしてRSウイルス、EBウイルス、¹⁾レトロウイルス²⁾³⁾等が考えられたがこれらは現在のところ否定的である。今回我々は川崎病の患者から主として便、咽頭ぬぐい液からサル腎初代細胞を用いてウイルス分離を行なった。その中で既知のエンテロウイルスとは考えにくい2種類のウイルスが分離され、一部の患者血清で分離ウイルスとで免疫電顕で陽性反応が認められた。しかし今回のデータからは分離されたウイルスと川崎病との関係について明確な結論は出し得ない。今回は急性期と回復期の血清が得られた症例は少なかったため今後は分離されたウイルスに対する抗体反応をベア血清を用いて免疫電顕と蛍光抗体法で確認する予定である。

文 献

- 1) Iwanaga, M. et al. Kawasaki disease and Epstein-Barr virus: *Lancet*. I: 938, 1981.
- 2) Stanford T., et al. Does Kawasaki disease have a retroviral aetiology? : *Lancet* I: 545, 1986.
- 3) Burns J.C., et al. Polymerase activity in lymphocyte culture supernatants from patients with Kawasaki disease: *Nature*. 323: 814, 1986.

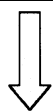
Abstract

M.Sakurai, M.Ito, H.Kamiya, T.Ito, Y.Sakurai

The etiology of Kawasaki disease is still unknown. Viral isolations from seventy patients with Kawasaki disease were done from April 1982 to March 1988 in Mie prefecture. Totally 144 specimens including 63 of stool, 68 of throat swab, 9 of urine, 2 of blood, 2 of CSF were inoculated to primary monkey kidney cells. 21 viruses were isolated. Among them, one poliovirus and one adenovirus were identified but 19 were unknown virus.

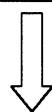
We investigated 7 unknown viruses by electron microscope, immunoelectron method and immunofluorescence method. Nucleic acid of viral particle was RNA and viral particles were 30 and 45 nm in diameter. Sera from seven patient at convalescent phase were examined by immunoelectromicroscopy. Six sera were positively reacted to isolated viral particles. However only one serum was positive by immunofluorescence test.

We cannot conclude that these unknown viral particles are related with Kawasaki disease. Further investigation should be done.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約 昭和 57 年 4 月から昭和 63 年 3 月までの間に三重県における 70 名の川崎病患者を対象に初代サル腎細胞を用いてウイルス分離を行なった。その結果咽頭ぬぐい液, 便, 尿, 血液, 髄液の計 144 検体中 21 検体からウイルスが分離された。分離されたウイルスのうち同定されたのはポリオウイルス, アデノウイルスがそれぞれのうち 1 株であった。それ以外のウイルスのうち 7 株について検討したところ大きさが 30nm45nm の 2 種類の RNA ウイルスが確認された。患者血清と分離ウイルスとで免疫電顕法を行なったところ一部の血清で陽性反応を認めた。川崎病との関係については結論は出せないが現在さらに検討中である。