

は69% (57/83)であった。AiVは生カキが原因と推定された事例でのみ検出され、NLVsと同時に検出された患者が半数以上(7名)存在した。

15事例のNLVs遺伝子陽性者57名中G1遺伝子が検出されたものが10事例の22名、G2が14事例の47名であった。9事例からはG1およびG2両方の遺伝子が検出されており、8事例が生カキが原因食品と推定されたものであった。

事例1から6の32名については、35/36プライマーも併用して調べたところ、2事例の3名からNLVs遺伝子が検出されたのみであった。これに対しG1/B2プライマーでは全6事例の14名から目的とする遺伝子が検出された。

D、考察

AiV遺伝子の検出された患者は15事例中5事例の12名と比較的少ない値であった。しかしながら、5名はNLVs遺伝子が検出されていない。また、事例1においては、NLVs遺伝子の検出が8名中3名にとどまったのに対し、AiV遺伝子は5名(63%)から検出されている。これらのことは、AiVが胃腸炎を引き起こす可能性を示唆する。胃腸炎の集団発生の原因検査にAiVを検討する必要があると考える。

1997-98年の2年間に非細菌性胃腸炎の集団発生にNLVsのG2グループが大きく関わっていることが明らかである。この傾向が今後も続くのか、一定以上の抗体保有率を獲得した後、

別のタイプのウイルスが流行するのかが監視が必要である。G2グループについては、細菌性食中毒事例の材料からも検出されており(未公開)、健康者からの検出状況も調べる必要がある。

1997年の愛知県の検査材料については35/36プライマーを用いた場合、G1/G2プライマーより検出感度が劣ったことは明らかである。逆転写反応時のプライマーにoligo(dT)15とランダムプライマーを用いたため、比較的5'に近い領域を増幅する35/36プライマーの反応が悪かったものと思われる。これを用いる場合、逆転写反応にも特異プライマーが必要となり、複数のウイルス検査を目的とする場合、経済的負担を少なくする検討が必要である。

E、結論

1997-98年に愛知県で検査した非細菌性食中毒15事例全てからウイルスが検出された。特に生カキが原因の場合複数の種類のウイルスが検出されることが多かった。

F、研究発表

2.学会発表

山下ら：RT-PCR法による愛知ウイルスの検出、第39回日本臨床ウイルス学会(1998)

小林ら：ヒトおよびカキから検出されたSRSVの遺伝子解析、第46回日本ウイルス学会総会(1998)

表1、RT-PCR法によるアイチウイルス(AiV)と小型球型ウイルス(NLVs)の検出

事例番号	発生年月	検体数	RT-PCR陽性数	
			AiV	NLVs(G1/G2)
1	1997/1/20	8	5	3 (1/2)
2	2/18	5	0	3 (0/3)
3	2/27	3	0	1 (0/1)
4	2/28	4	0	2 (0/2)
5	3/ 3	5	0	3 (2/1)
6	3/ 5	7	2	3 (2/2)
7	1998/1/21	6	0	5 (5/0)
8	1/25	4	2	4 (1/4)
9	1/29	6	2	5 (5/5)
10	1/30	1	0	1 (0/1)
11	1/31	5	0	5 (2/5)
12	1/31	4	1	2 (1/2)
13	2/25	5	0	2 (1/1)
14	2/26	13	0	12 (0/12)
15	5/12	7	0	6 (2/6)

表2、逆転写にランダムプライマーを用いた時のPCR法によるNLVs遺伝子検出用プライマーの比較

事例番号	検体数	RT-PCR陽性数	
		35-36	G1/G2
1	8	1	2
2	5	0	3
3	3	0	1
4	4	0	2
5	5	0	3
6	7	2	3
合計	32	3	14

分担研究報告書

食中毒事例の食品・患者糞便からの SRSV 遺伝子検出に関する研究

分担研究者 柴田 伸一郎 名古屋市衛生研究所微生物部ウイルス室

研究要旨

名古屋市内で発生した、飲食店が関係した食中毒事例の詳細を検討し、検査を行った結果、保健所による疫学的調査により、原因食事の絞り込みがなされた。また、飲食店従業員に対し聞き取り調査を行った結果、調理人がこの事例の 2 日前よりお腹の調子がわるいことが解った。また、同時に実施された RT-PCR 法を用いた検査により、患者糞便のみならず、調理人糞便、さらには食品からも SRSV 遺伝子を検出することに成功した。また、検出した遺伝子の塩基配列を決定し、患者、調理人、食品とそれぞれ比較したところ同一のものであることが示された。そしてその塩基配列を DDBJ, EMBL, Genbank データベースで調べたところに極めて近い genogroup 2 であることが解った。以上のことからこの事例は、調理人から食品を介して感染した可能性があること示唆する。

A. 研究目的

現在行われている RNA 抽出法、逆転写法、さらには PCR 法で食品から SRSV 遺伝子を検出できるかどうか可能性を探ること。さらに、食品から検出できたとして、患者、調理人との関係を調査することを目的とした。

B. 研究方法

昨年の数多くの事例から、カキ以外の食品を摂食している事例、更には調理人が関係していると疑われる事例を数例の中から、調理人に何らかのウイルス性胃腸炎を疑わせる症状が聞き取り調査で判明している事例を選び、厚生省通達の方法を用いて CTAB 法による RNA 抽出、逆転写反応、PCR を行った。プライマーは、#35'、を逆転写プライマーに、#35'/#36 を 1st PCR プライマーに、NV81/NV82/SM82 プライマー

を nested PCR に用いた。#35 プライマーには問題があるので、公衆衛生院の研修で使用した #35' プライマーに変更した。PCR で検出された遺伝子は、ダイターミネータ法で塩基配列を決定し、Genetyx 解析ソフトを用いて改正を行い、DDBJ 等のデータベースと比較した。

C. 研究結果

この事例間では、患者 7 人のうち 6 人の糞便、調理人 1 名の糞便が採取された。このときの飲食店での共通食事の中で原因食と思われるイカのむき身、ほたて貝の貝柱を検査した。患者糞便、調理人糞便、食品のいずれからも 1st PCR では、目的とする遺伝子を検出することができなかった。さらに 1st PCR 産物に対して nested PCR を実施することにより患者糞便 6 件中 4 件、調理人糞便 1 件中 1 件、イカむき

身、ホタテ貝柱から、目的とする大きさの遺伝子の増幅が見られた。これらの増幅された遺伝子をアガロースゲル電気泳動し、そのゲルから溶出し精製した遺伝子をダイターミネーター法で塩基配列を決定した。これら塩基配列は、Genetyx 遺伝子解析ソフトを用いてアライメントを取ったところ、この食中毒事例の、患者糞便 4 件、調理人糞便 1 件とも 100% のホモロジーを示した。このことから調理人と患者の遺伝子は同一のものであることが判明した。また、この塩基配列を DDBJ などのデータベースで検索したところ SRSV の genogroup2 に属する accession number L25114 にもっとも近いことが解った。この L25114 とのホモロジーは、95% であった。また、食品から PCR 法で増幅された遺伝子は、染色したときの濃度が薄く、増幅量が少なかったため、さらに増幅を行い塩基配列を決定した。この塩基配列を患者、調理人由来の遺伝子の塩基配列と比較したところ、100% のホモロジーで同一であることが示された。

D. 考察

得られた結果から、患者、調理人、食品と同一の SRSV 遺伝子が検出されたこと。さらに聞き取り調査で調理人が 2 日前よりお腹の調子が良くなかったことなどを考慮すると、調理人が、SRSV に何らかの感染経路で感染し、調理人が、ほたての貝柱、イカのむき身を汚染させ、それを生で食したヒトがウイルス性胃腸炎を発症した可能性が考えられる。

ここで、問題になるのは、検査中にコンタミネーションを起こしている可能性をどう考えるかである。糞便と食品は、同じ日

には扱わず、実験台も違うところで操作を行った。試薬も区別して使用した。フィルター付きのチップを使用し、手にはラテックスグローブをはめ、汚染した可能性が考えられるときには交換し、注意を払って検査を行った。また、陰性コントロールを 1 回の PCR につきランダムに 5 本ずつ入れて操作を行ったが陰性コントロールが陽転したことはなかった。このことから、コンタミネーションの可能性は極めて低いものとする。

E. 結論

考察でも検討したようにコンタミネーションの可能性が極めて低いと思われるので、今回の調理人糞便、患者糞便、イカのむき身、ホタテ貝柱からの同一の SRSV 遺伝子検出は、ヒト→食品→ヒトへの食品媒介の感染経路が疑われる。

F. 研究発表

学会発表

1999 年 3 月 29-31 日アメリカジョージア州アトランタ市で開催される International Workshop on Human Caliciviruses にて発表予定。

RT-PCR法によるSRSVの検出に関する研究

分担研究者 松本 和男 協力研究者 東方 美保 福井県衛生研究所

研究要旨 過去に福井県内で発生した、SRSV関与が疑われる急性胃腸炎集団発生事例（電顕法により検査済み）について、RT-PCR法およびサザンハイブリダイゼーション法によってSRSV遺伝子の検出を行った。その結果Yuriプライマーで検出しやすいG2タイプの株が流行の主流であった。

A. 研究目的

非細菌性食中毒の主要な病原因子とされるSRSVの検出法として、RT-PCR法にもとづいた微量遺伝子検出系が開発・改良されつつある。これらの検出系を、過去にSRSV関与が疑われた実際の急性胃腸炎集団発生事例に適用し、検出率の比較および流行株の傾向分析を行う。

マーを用いて行い、Yuri22F/Yuri22RまたはNV81/NV82/SM82でnested PCRを行う系、Capsid領域に設計されたプライマーG1F1/G1R1およびG2F1/G2R1で1st PCR、G1F2/G1R1およびG2F2/G2R1で2nd PCRを行う系、について検討した。またnested PCR産物については、Andoらのプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。

B. 研究方法

1991年から1998年の間に、福井県内で発生した急性胃腸炎集団発生事例のうち、SRSV関与が疑われる10事例・53名の患者糞便についてウイルス検査を行った。すなわち、患者糞便をCTAB処理してからTrizol-LS(GIBCO BRL)でRNA抽出し、DNase I (ニッポンジーン)処理を行ったあと、M-MLV(GIBCO BRL)を用いてcDNAを合成した。PCRの条件としては、1st PCRをScouting Setプライ

C. 研究結果

今回検査対象とした急性胃腸炎集団発生事例10事例のうち、PCR産物を電気泳動しバンドの存在を確認する段階で、9事例においてSRSV遺伝子が検出された。比較した系では、Yuri22F/Yuri22Rでnested PCRを行ったときの検出率ももっとも高く、66.0%(35/53)であった。それに対しNV81/NV82/SM82をnested PCRに用いたときには30.2%

発生年-事例No.	検体数	電顕法	Yuri22F/ Yuri22R	NV81/ NV82/ SM82	Capsid G1:G2	サザンハイブリ ダイゼーション
91-1	1	1	1	1	0: 1	1
94-1	2	0	0	0	0: 0	1
94-2	7	7	7	2	1: 2	7
94-3	12	0	10	5	3: 5	10
96-1	3	3	3	3	1: 1	3
97-1	2	0	1	0	0: 0	1
97-2	5	1	1	1	1: 0	1
97-3	12	0	7	2	0: 1	5
97-4	6	2	3	1	1: 0	3
98-1	3	0	2	1	0: 1	2
計	53	14	35	16	7:11	34

福井県内で発生した急性胃腸炎集団発生事例

(16/53)、Capsid領域でのG1・G2別PCRでは34.0%(18/53)という検出率であったが、それぞれYuri22F/Yuri22Rによってでは増幅されない検体を1検体、4検体含んでいた。

また、さらにサザンハイブリダイゼーションを行うことで新たに4検体が陽性を示し、10事例すべてが陽性となった。プローブの種類としては、P2Aが9事例で反応しており、P1BやP2Bも反応するmixタイプの事例がそのうち8事例をしめた。

D. 考察

電顕法でSRSV粒子を確認できたのは、10事例中5事例、14検体(検出率26.4%)であったことと比較すると、RT-PCR

法の適用により検出率が大幅に上がったといえる。プライマーについては、Yuri22F/Yuri22Rの検出率が高く、今回のPCR陽性検体39検体のうち35検体(89.7%)をカバーした。サザンハイブリダイゼーション法によると、G2タイプのプローブとの反応が圧倒的多数を占め、福井県でも流行の主流は、G2タイプであると推定された。

E. 結論

福井県で過去に発生した急性胃腸炎集団発生事例は、Yuri22F/Yuri22Rプライマーで高率に検出できるG2タイプのSRSVが主原因となっていた可能性が大きい。

ウイルス性食中毒に関する研究 - 遺伝子解析からみた流行の特徴 -

分担研究者 山崎謙治 大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨 1982以降に大阪府下で検出されたヒトカリシウイルスの遺伝子型は多様であったが、Genogroup2に属するものが主流であり、1998年の流行株はすべて2型のカリシウイルスであった。

A. 研究目的

ヒトカリシウイルスは多くの遺伝子型を持つことが知られているので、これまで大阪府下で分離されたウイルスの遺伝子解析を進め、カリシウイルス流行についての疫学的知見を得ることを目的とした。

B. 研究方法

82年から95年度の期間ではCTAB法により抽出しNV35,36または独自に作成したキャプシド領域のS9,10プライマーでSingle step PCRによりカリシウイルスを検出し、クローニングしたあと塩基配列を調べた。また97年度の集団事例についてはISOGEN-LSによる簡便な抽出を行ない、NV81-NV(SM)82またはYuri22R-Fプライマーを用いたSingle step PCRによりを検出し、PCR産物をSUPREC-02(TaKaRa)で精製しAuto-sequencer Core Kit (TOYOBO)を用いたダイレクトシーケンシングにより塩基配列の決定を行なった。系統樹は近隣結合法で作成した。

C. 研究結果

1997年4月から1998年3月の間に大阪府下で発生した集団食中毒事例は27例あり、21例からカリシウイルスが、1例(5月)からC群ロタウイルスが検出された。喫食から発生までの潜伏時間は28~41時間で、主な症状は吐き気、嘔吐、下痢、腹痛であったが、患者年齢が低いほど嘔吐の比率が高く、また逆に年齢が高いほど下痢症状の比率が高いという傾向が認められた。カリシウイルスが初めて検出されたのは11月で、その後3月まで検出されたが、1月以降の発生事例の大部分は牡蠣との関連が疑われた。検査を行なった27事例128名中、81,82では20事例、59名がカリシウイルス陽性で、Yuri22では21事例、69名が陽性であった。21事例の遺伝子解析(162bp)の結果、17事例はCDCの分類のPⅡa (Mexico V, Toronto V)であり、4事例がPⅡb(SMV, Hawaii V)であった。

PⅡaの14株間のホモロジーは96~100% (NA), 96~100% (AA)であり、PⅡbの4株間では68~79% (NA), 75~92% (AA)であった。Genogroup I型(NV, SOV)は検出されなかった。また同じ集団内で複数例検出し、シーケンズを行った5事例のうち、牡蠣が原因とされた1事例では3株がP2aで、1株がP2bであったが、推定原因が給食弁当、牡蠣の4事例ではそれぞれが同じ配列を持ったウイルスが検出された。

また82年以降に大阪府で検出されたカリシウイルスのポリメラーゼ領域で作成した系統樹では、1例がGenogroup1で他は2型であった。2型の中でも96年度までは大半はP2bに属するものであったが、流行株の年度ごとの一定の傾向は認めなかった。Snow mountainやHawaii virusに類似する株も検出されたが、多くは海外のレファレンス株に類似しないクラスターに属していた。同様にキャプシド領域の系統樹では、9株中2株は1型で、他は2型であり、1型の1株はSouthampton virusと100%同じアミノ酸配列を持つ株であった。

D. 考察

糞便からのカリシウイルス検出はRNAの簡便抽出および1st PCRで充分対応できるものと考えられた。プライマーは斎藤らが示したYuriプライマーの優位性が確認された。CDCのNoelらはキャプシド領域で9個のクラスターに分類される株を検出しているが、大阪府ではその中で5つのクラスターに属する株が検出された。ポリメラーゼ領域で分類が不明であった株はSMVに近いWRというクラスターと同類のものと思われた。クラスター内のアミノ酸ホモロジーは97~100%を示し、また同じGenogroup内ではクラスター間のホモロジーは1型が84%、2型は75~90%であった。Genogroup間のホモロジーは53~60%であり明らかに抗原性が異なると推定された。

これらのことから、クラスター内の相同性は高く同一の抗原性を示すものと考えられたが、75~90%というクラスター間のホモロジーが抗原性とどのように相関するかをさらに調べる必要があると思われた。

E. 結論

カリシウイルスの検出は適切なプライマーの設定が必須であり、それによりSingle step PCRで検出を行うことが可能であった。冬季の急性胃腸炎の大半はSRSVによるものであり、疫学的な観点から、牡蛎の喫食と深く相関していた。1982年以降に大阪府で検出されたカリシウイルスの大半はGenogroup2型であり、96年度まではSnow mountain,Hawaii virusに近いタイプが優勢であったが、97年度はMexico,Tronto virusに近縁のものが流行の主流であった。

F. 研究発表

1) 山崎謙治、奥野良信：ウイルス性胃腸炎, 薬局, 49, 22~29, 1998

2) 山崎謙治、左近直美 他：迅速,高感度なRT-PCR法によるSRSVの検出, 第39回日本臨床ウイルス学会, 1998年4月, 札幌

3) 大石 功、左近直美、山崎謙治、宇田川悦子 他：アストロウイルス6型分離株

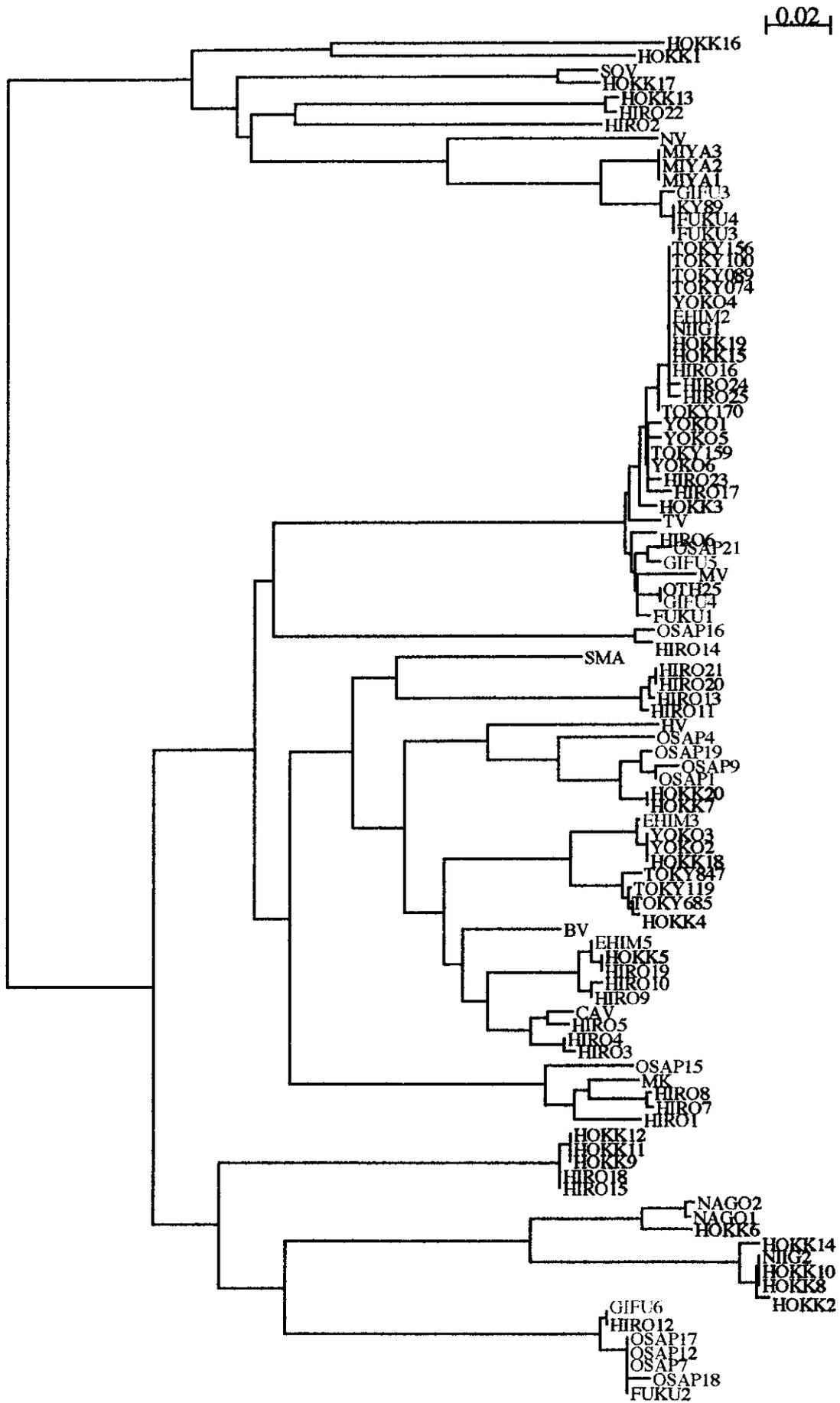
(K23)カプシッド翻訳領域(ORF2)の全塩基配列の解析とセロタイプ間の比較, 第39回日本臨床ウイルス学会, 1998年4月, 札幌

4) Naomi Sakon, Isao Oishi, Kenji Yamazaki, Etsuko Utagawa et.al : Sequence characterization of capsid protein-coded region of human astrovirus type 6, Katano-23 strain Isolated from a gastroenteritis outbreak, Japan, Thirty-Second Joint Working Conference on Viral Disease, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Sep 1998, Kyoto

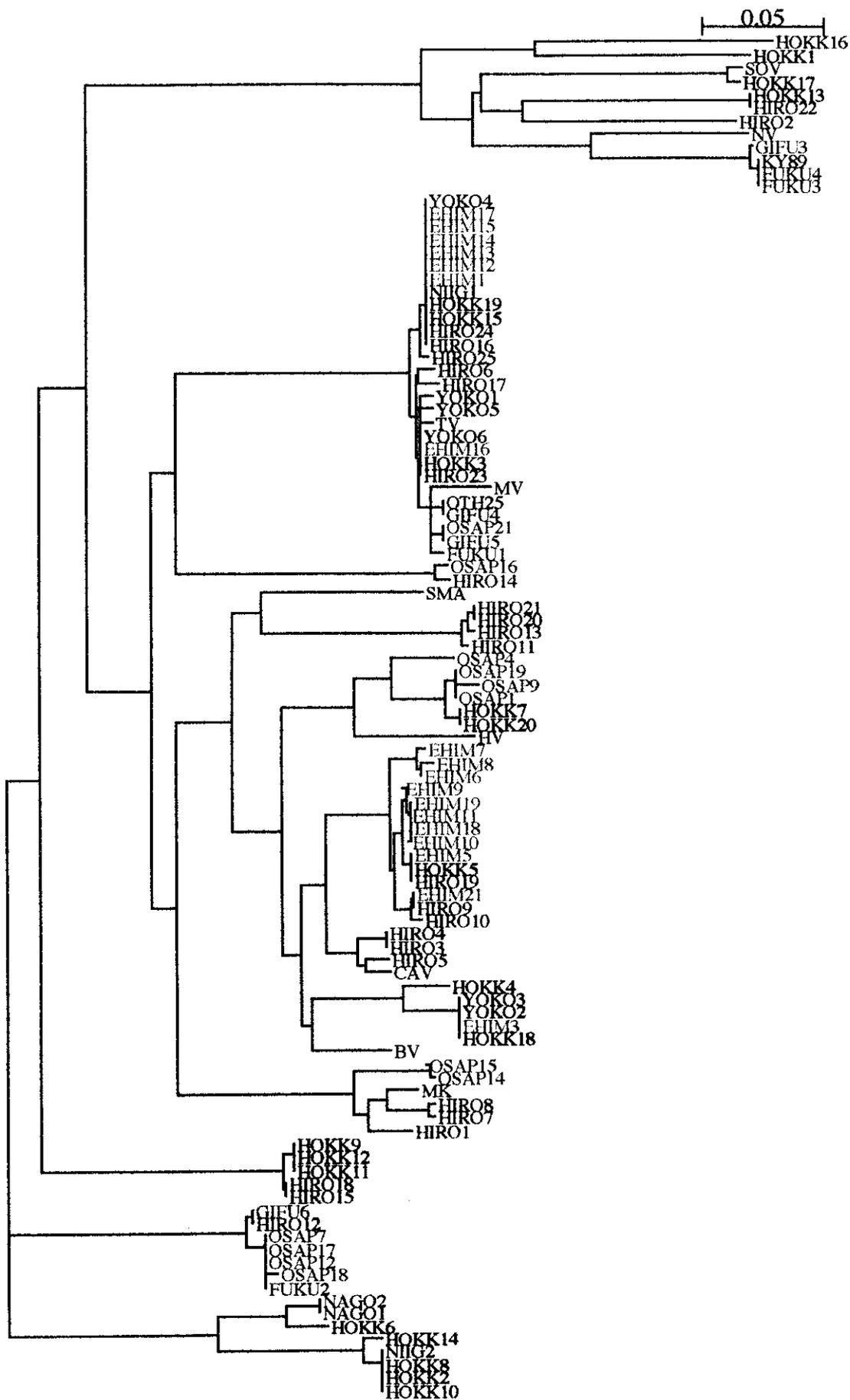
5) 山崎謙治、左近直美、依田知子 他：SRSVの迅速診断と遺伝子解析からみた流行の特徴, 第46回日本ウイルス学会総会, 1998年, 10月, 東京

6) 依田知子、山崎謙治、左近直美 他：市販生食用牡蛎からのSRSVの検出法の簡便化, 第46回日本ウイルス学会総会, 1998年10月, 東京

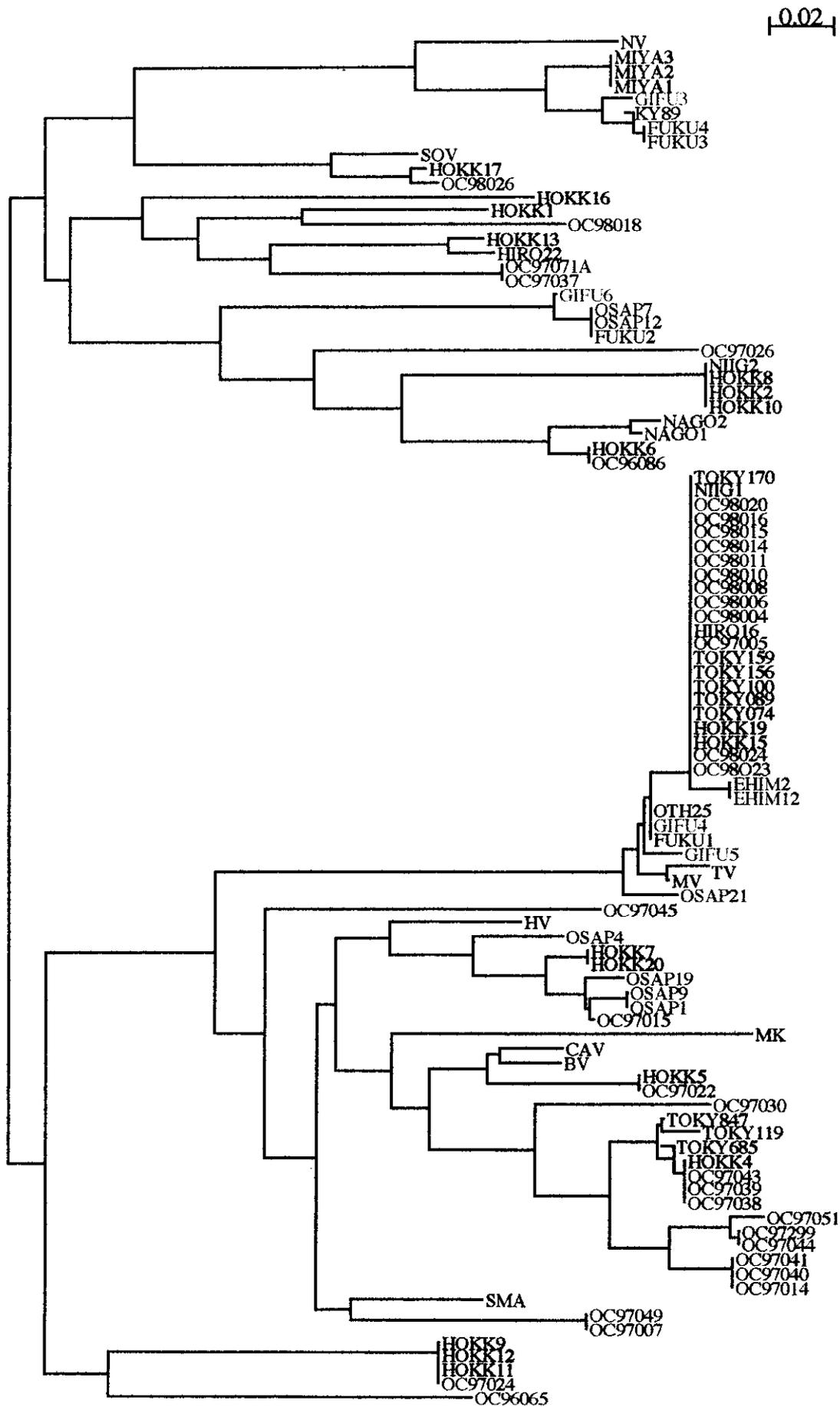
7) 左近直美、宇田川悦子、山崎謙治、大石 功 他：アストロウイルス6型分離株交野23(K23)のORF2領域における塩基配列の分析, 第46回日本ウイルス学会総会, 1998年10月, 東京



SQ275bp



SQ200bp



SQ80bp

大阪市内で検出した小型球形ウイルスの分子疫学的解析に関する検討

研究要旨

1996年4月～1998年3月に大阪市内で発生した非細菌性食中毒事件患者材料からRT-PCR法によるSRSVの検出を行い、検出されたSRSVについて分子疫学的解析を行った。

分担研究者 春木孝祐、大阪市立環境科学研究所 保健疫学課長

協力研究者 勢戸祥介 大阪市立環境科学研究所 研究主任

協力研究者 入谷展弘 大阪市立環境科学研究所 研究員

A. 研究目的

小型球形ウイルスあるいはNorwalk-like virusと呼ばれる一群のウイルス（SRSV）は非細菌性食中毒の主要な病原因子である。我々はSRSVを高率に検出できるようにRT-PCRを用いた検査法の改良を行い、非細菌性食中毒の病原検索に応用してきた。今回、SRSVの流行実態を明らかにするために、大阪市内で発生した非細菌性食中毒事件から検出されたSRSVのプロープ型および塩基配列を決定し、分子疫学的解析を行った。

B. 研究方法

1996年4月～1998年3月に大阪市内で発生した非細菌性食中毒事件49事例から採取した患者糞便材料を用いてSRSVの検出を行なった。SRSVの検出は先に報告した方法（入谷他、臨床とウイルス 1998）に従ってRT-PCR法により遺伝子を検出し、検出された遺伝子のプロープ型別を行なった。

SRSVの検出された事件から1あるいは2検体を選び、検出されたSRSV遺伝子の塩基配列を決定した。

C. 研究結果

非細菌性食中毒49事例中39事例（79.6%）からSRSVが検出された。SRSV性食中毒事件は1-3月に多発（34事例、87.2%）していた。検出されたSRSVのプロープ型はP1A型3事例、P1B型2事例、P2A型10事例、P2B型16事例、P2A型と他のプロープ型の混合5事例、既存のプロープと反応しないSRSVによるもの3事例であった。97年1月-3月ではSRSV性食中毒事件18事例中P2B型14事例（77.8%）、98年1月-3月では16事例中P2A型を含む事件が13事例（81.3%：P2A型8事例とP2A型と他のプロープ型の混合5事例）発生していた。

37事例から検出された40株のSRSVについて塩基配列を決定した。塩基配列の解析からP1A型は3種類、P1B型は2種類、P2A型は1種類、P2B型は10種類、プロープと反応しない3株のSRSVはそれぞれ異なった塩基配列を有しており、Southamptonタイプ（1株）と新しいタイプ（2株）であった。

D. 考察

非細菌性食中毒事件は主に1月-3月に集中しており（79.6%）、この時期に高率（87.2%）にSRSVが検出されており冬期

に多発する非細菌性食中毒事件のほとんどがSRSV性食中毒であった。

カキ関連事件20事例中18事例(90.0%)からSRSVが検出されており、カキとSRSVの親和性の高さが示された。混合型5事例中4事例はカキ喫食に伴う事例であり、市販のカキから複数のSRSVが検出された報告もあり、原因となったカキに複数種類のSRSVが濃縮されていたものと考えられた。

この期間に検出されたSRSVはGI型が優勢であり、そのプローブ型は97年の流行期はP2B型が主流であったが98年の流行期はP2A型が主流となった。主流となるSRSVのプローブ型が変化することが示された。しかしながら同時期に他のプローブ型のSRSVも検出されており、複数の種類のSRSVが同時に流行していることが明らかになった。97年の流行期に検出されたP2B型SRSV14株は少なくとも8種類の異なる遺伝子を有していた。また、これらのSRSVは遺伝子の相同性から少なくとも5つの遺伝学的クラスターに分類することができた。このことから、この時期に同じP2B型ながら複数株のSRSVが流行していたことが明らかになった。しかしながら、97年、98年に検出されたP2A型SRSVの塩基配列はすべて同じであった。98年の流行期に同じ塩基配列を有するSRSVが他府県からも検出されており流行様式が前年とは明らかに異なっていた。異なる遺伝子を有するSRSVが同時期に検出されたこと、同じ遺伝子を有する遺伝子が異なる時期に検出されたこと、年を越えて同じ遺伝子を有するSRSVが検出されたことなどSRSVの流行の多様性が示された。また、同時に数種類のSRSVが流行しているが、その中から何らかの理由で主流となる株が出現する事が示された。

E. 結論

1996年4月～1998年3月に大阪市内で発生した非細菌性食中毒事件から検出したSRSVの分子疫学的解析からその流行の多様性が示された。SRSVの流行実態を正確に把握するためには研究の継続が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

入谷展弘、勢戸祥介、春木孝祐：RT-PCR法を用いた小型球形ウイルスの検査法に関する研究. 臨床とウイルス 26 : 362-370, 1998

2. 学会発表

入谷展弘他、第45回日本ウイルス学会、1997(京都)

入谷展弘他、第46回日本ウイルス学会、1998(東京)

SRSV による散発性ウイルス性急性胃腸炎の流行実態把握に関する研究

分担研究者 大瀬戸光明 愛媛県立衛生研究所
研究協力者 近藤玲子、高橋一博、吉田紀美

研究要旨：我々は松山市の1小児科医院を定点とし、地域における散発性急性胃腸炎の病原検索を継続的に実施してきた。今回は電子顕微鏡法あるいは RT-PCR で検出された SRSV のプローブ型別を行い、時期別のプローブ型別検出頻度を調査した。その結果 P2B 型が最も多く検出され、次いで P2A, P1B, P1A 型の順に検出数が多かった。また、調査年次により異なるプローブ型が集積する傾向がみられ、毎シーズン流行する SRSV であるが流行株はシーズン毎に変遷していることが伺えた。

A. 研究目的

ウイルス性食中毒の主要な原因である SRSV は、毎年冬季に小児および成人に流行する嘔吐下痢症の原因ウイルスでもある。SRSV の地域での流行が環境を汚染するため、食品特にカキ等の貝類を介する食中毒が多く発生すると考えられている。そのため SRSV の地域流行の実態解明を試み、ウイルス性食中毒対策に必要な知見を得ることを目的とした。今回は調査地域で検出された SRSV の流行シーズン毎のプローブ型の分布を明らかにすることを目的とした。なお、一部の SRSV 株については遺伝子塩基配列の解析を行った。

B. 研究方法

1994 年 1 月から 1998 年 2 月の約 5 シーズンの間、松山市の 1 小児科医院外来で散発性の急性胃腸炎患者から糞便を採取し、電子顕微鏡法 (EM) と RT-PCR による SRSV の検索を行った。PCR は斎藤らの設定した Yuri プライマーを用いた nested PCR 及び Ando らの SR プライマーを用いた方法を併用した。また、Ando らのジゴキシゲニン標識プローブを用い、サザンブロットハイブリダイゼーションまたはドットブロットハイブリダイゼーションによりプローブ型別を行った。SRSV 遺伝子の塩基配列については国立感染症研究所 宇田川先生、大阪府公衆衛生研究所 左近先生に解析を依頼した。

C. 研究結果

調査期間内に検出された SRSV128 例の酵素抗

体法による抗原検出検査、EM、SR プライマーと YURI プライマーを用いた RT-PCR、及びプローブ型別の各検査結果を表 1 に示した。当地域では SRSV の流行は通常 11 月から 12 月にかけてであるが、1998 年には 1 月に流行した。

SR 系プライマーを用いた PCR では G1 プライマーで遺伝子増幅がみられたものを genogroup-1、G2 プライマーで増幅されたものを genogroup-2 として便宜的に genogroup 型別ができる。今回の調査では genogroup-1 が 6 株に対して genogroup-2 は 55 株であった。しかし、プローブ型 P1B は genogroup は 1 型であるが、G2 プライマーで増幅される。今回の 10 例の P1B 型はすべて G2 プライマーで増幅された。

表 2 にハイブリダイゼーション法によるプローブ型の流行シーズン別分布を示した。P2B 型は 1994/95 年シーズン以降毎年ほとんど主流型の位置を占めているが、P1B 型は 1994 年 1-2 月シーズンに多く、P2A 型は 1997/98 年シーズンに著しく増加がみられた。P1A 型は調査期間を通じて 3 例しか検出されず、近年、流行の主流を担うことはなかった。このようにプローブ型の時期的な集積性がみられることから、地域における SRSV の流行はシーズン毎に流行株がドラステックに変遷していることが伺われた。

YURI22F/R プライマーで増幅されたポリメラーゼ領域の遺伝子塩基配列データは 22 株の SRSV について得られた (表 3)。7 株は P2A 型で 15 株は P2B 型であった。P2A 型の 7 株のシーケンスは互いに相同性が高く 98% 以上であった。P2B 型もほとんどの株は互いに 97% 以上の

相同性を示したが、1 株(98-41)だけ約 90%の相同性を示す特異な株が認められた。P2B 型に属する株は採取日が 1995 年から 1998 年におよんでいたにもかかわらず、ほとんどの株が非常に高い均一性を示していた。

D. 考察

地域に流行する SRSV には、遺伝学的にも抗原的にも多様なウイルス株が存在することが明らかにされている。今回用いた Ando らのプローブは 4 型のプローブ型に分類することができるため、地域での SRSV の流行では、シーズン毎にその主流行型を変えている実態が認められた。

検査の対象が小児であるためカキの生食等による食品を介する伝播ルートよりは、地域でヒト-ヒト感染で伝播している SRSV の動向をよく把握できていると考えられる。1998 年 1 月に

流行がみられた P2A 型は遺伝子塩基配列解析の結果すべて非常に高い相同性を示し、ほとんど同一株の流行であったと考えられた。同様 P2B 型においても互いに高い相同性を示したことから、シーズン中にある地域で流行する株は比較的少数ではないかと思われた。今後多くの株の塩基配列解析を進める必要がある。

今回用いたプローブは、プローブ型別と同時に PCR 産物の SRSV 遺伝子であることの確認に使われ、本法ではサザンブロットハイブリダイゼーションを行うこととされている。しかし、サザンブロットでは 4 つの型のプローブで反応させるのに数日の時間を要するので、ドットブロットハイブリダイゼーションを試みたところ、特異的な結果が得られた。ドットブロットは多検体処理に適し、4 型のプローブと一度に反応させることができ、また、各反応時間の短縮も可能であるため、非常に有用な方法である。

表1. 散発性SRSVの検出状況(1994-1998.2)

Sample No.	Age	Sex	Date Sample	Chiba EIA	MX EIA	EM	PCR/SR	PCR/yuri	Probe-type
94-24	2	M	1994.1	-		+	-	-	
94-94	0.3	F	94.1	-		+	G2	+	P1B
94-114	5	M	94.2	-	-	+	-	-	
94-188	3	F	94.2	-		+	G2	+	P1B
94-192	3	F	94.2	-	-	+	G2	+	P1B
94-229	1	F	94.2	-	-	+	G2	+	P1B
94-319	2	M	94.2	-		+	G2		P1B
94-322	4	F	94.3	-	-	+	G2	+	P1B
94-336	5	M	94.3	-	-	+	G2	+	P1B
94-437	8	F	94.3	-	-	+	G2	-	ND
94-575	2	F	94.5	-		+	G2	+	P1B
94-642	7	F	94.6	-	-	++Ca	-	-	
94-680	4	M	94.6	-	-	++Ca	G2?	-	ND
94-1024	2	M	94.9	-		+	G2?	-	ND
94-1102	0.1	M	94.11	-		+	-	-	
94-1293	6	F	94.11	-	-	+	-	-	
94-1299	1	F	94.11	-		+Ca	-	-	
94-1319	2	M	94.12	-	-	++Ca	-	-	
94-1327	0.7	M	94.12	-		+	-	-	
94-1336	6	M	94.12	-		++	G1?	-	ND
94-1389	2	F	94.12	-		++	G2	+	nt
94-1395	1	M	94.12	-		+	G2		ND
94-1400	1	F	94.12	+	-	+	G1	+	ND
94-1402	7	M	94.12	-	-	+	G1	+	nt
94-1412	0.8	F	94.12	-		+	G2		P2B
94-1414	3	M	94.12	-		+Ca	-	-	
94-1427	1	M	94.12	-	-	+	G2	+	ND
94-1437	0.4	M	94.12	-		++	G2	+	ND
95-7	0.8	M	1995.1	-		+	-	+	nt
95-79	0.9	F	95.1	-		+	G2		P2B
95-277	3	M	95.1	-	-	+Ca	G2	-	P2B
95-396	1	F	95.2	-		+	G2	+	P2A
95-402	2	M	95.2	-	-	+	-	+	nt
95-410	0.1	F	95.2	-	-	++	G2	+	P2B
95-411	0.7	F	95.2	-		+	G2		P2B
95-547	3	F	95.2	-		++	-	-	
95-641	0.6	M	95.3	-	-	+	G2	+	P2B
95-696	1	M	95.3	-	-	+	-	-	
95-776	0.1	F	95.4	-		+	G2		P2A
95-1445	1	M	95.10	-		+Ca	-	-	
95-1474	3	F	95.10	-		+	G2	+	P2B
95-1484	5	F	95.11	-		+	G2	-	ND
95-1487	1	F	95.11	-		+	G2		P2B
95-1490	4	M	95.11	-		-	G1		ND
95-1505	1	F	95.11	-		-	G2	-	ND
95-1506	3	M	95.11	-		+	G2		P2B
95-1512	2	F	95.11	-		+	G2	+	P2B
95-1518	2	M	95.11	-	-	++Ca	-	-	
95-1524	1	M	95.11	-		-	G2		P2B
95-1526	2	F	95.11	-		+	G2		P2B
95-1539	1	F	95.11	-	-	+Ca	-	+	nt
95-1546	3	F	95.11	-	-	+	-	-	
95-1555	0.11	M	95.11	-	-	+	G2	+	nt
95-1564	2	M	95.11	-	-	++Ca	G2	+	nt
95-1568	5	F	95.11	-	-	++	G2	+	P2B
95-1615	5	M	95.12	-		-	G2		P2B
95-1642	4	M	95.12	-	-	+	-	+	nt
95-1679	2	M	95.12	-		-	G2	+	P1B
95-1705	7	F	95.12	-		-	G2	+	P2B
95-1716	6	M	95.12	-		-	G2	+	P2B
95-1748	5	M	95.12	-		-	G2		ND
96-18	2	M	1996.1	-		-	-	+	nt
96-195	6	M	96.1	-		-	-	+	nt
96-265	7	M	96.2	-		-	G1		ND
96-586	0.7	F	96.3	-		+	G2		P2B
96-844	0.3	M	96.5	+		+Ca	G1	+	P1A
96-904	3	M	96.5	-		++	-	+	ND
96-908	7	M	96.5	-		++	G1	-	P1A
96-1538	1	M	96.11	-		-	-	+	P2B
96-1574	2	F	96.11	-		+	G2	+	P1B
96-1602	2	M	96.11	-		+	G2	+	P2B
96-1603	1	F	96.11	-		+	G2	+	P2B
96-1612	1	M	96.11	-		-	-	+	P2B
96-1621	3	F	96.12	-		+	-	+	P2B

表1-2. 散発性SRSVの検出状況(1994-1998.2)

Sample No.	Age	Sex	Date Sample	Chiba EIA	MX EIA	EM	PCR/SR	PCR/yuri	Probe-type
96-1626	2	F	96.12			-		+	P2B
96-1647	1	M	96.12	-		+	G2	+	P2B
96-1660	1	M	96.12	-		+	G2	+	P2B
96-1661	1	M	96.12	-		+	G2	+	P2B
96-1680	1	F	96.12			-		+	P2B
96-1697	3	F	96.12			-		+	P2B
96-1737	10	M	96.12			-		+	P2B
97-163	1	F	1997.1	-		++	G2	+	P2B
97-172	3	F	97.1	-		+	G2	+	P2B
97-173	0.7	F	97.1	-		++	G2	+	P2B+P2A
97-212	8	M	97.2			-		+	P2B
97-328	7	M	97.2	-		+Ca	-	-	P2B
97-352	7	F	97.2			-		+	ND
97-365	6	M	97.3			-		+	ND
97-405	6	M	97.3			-		+	ND
97-426	2	F	97.3			-		+	ND
97-441	4	F	97.3	-		+	-	-	
97-619	4	M	97.4	-		+	-	+	P2A
97-665	6	M	97.5	-		+	-	-	
97-713	1	M	97.5	-		+	G2	+	ND
97-730	8	F	97.5	-		+	-	-	
97-767	0.4	M	97.5			-		+	ND
97-790	5	F	97.5	-		+	-	-	
97-845	2	M	97.6	-		+	-	-	ND
97-870		M	97.6			-		+	P1A
97-913	4	M	97.6			-		+	P2B
97-1503	3	M	97.11			-		+	P2B
97-1555	5	F	97.12			-		+	P2B
97-1571	0.11	M	97.12			-		+	ND
97-1572	1	F	97.12			-		+	P2B
97-1615	2	M	97.12			-		+	P2B
98-15	3	M	98.1			-	G2	+	P2A
98-16	1	M	98.1			-	G2	+	P2B
98-25	2	M	98.1			-	G2	+	P2A
98-26	6	M	98.1			-	G2	+	P2A
98-34	0.9	F	98.1			+	G2	+	P2A
98-41	5	M	98.1			+	G2	+	P2B
98-48	5	M	98.1			-		+	P2A
98-49	8	F	98.1			-		+	P2A
98-50	6	M	98.1			-		+	P2A
98-51			98.1			-		+	P2A
98-55	4	M	98.1			-		+	P2A
98-57	4	M	98.1			-		+	P2A
98-58	3	M	98.1			-		+	P2B
98-77	4	M	98.1			+		+	P2A
98-78	3	F	98.1			+		+	P2B
98-81	2	M	98.1			+		+	P2B
98-124	10	M	98.1			-		+	P2A
98-175	2	M	98.1			+		+	P2A
98-176	5	M	98.1			-		+	ND
98-249	10	F	98.1			+		+	P2A
98-277	0.8	M	98.1			+		+	P2B
98-349	2	F	98.2			-		+	P2A
98-358	0.5	M	98.2			+		+	P2A

表2 散発性SRSVのプロープ型別

調査時期	P1A	P1B	P2A	P2B	ND	未検査	計
1994		8			2		10
1994/95			2	6	4	4	16
1995/96	2	1		11	6	6	26
1996/97	1	1	2*	17*	6		27
1997/98			16	10	1		27
計	3	10	20	44	19	10	106

* : P2A と P2B の両方のプロープに反応する 1 例を含む

Table 3. Nucleotide sequences of SRSV from sporadic diarrhea

		*	20	*	40	*																		
SQ01 :	tc	ca	gc	ag	cag	cg	ggc	agt	gt	ggc	agc	agc	act	t	g	aa	at	cat	ggt	a	g	50		
SQ02 :	tc	ca	gc	ag	cag	cg	ggc	agt	gt	ggc	agc	agc	act	t	g	aa	at	cat	ggt	g	a	g	50	
SQ04 :	tc	ca	gc	ag	cag	cg	ggc	agt	gt	ggc	agc	agc	act	t	g	aa	at	cat	ggt	g	a	g	50	
SQ15 :	tc	ca	gc	ag	cag	cg	ggc	agt	gt	ggc	agc	agc	act	t	g	aa	at	cat	ggt	g	a	g	50	
SQ16 :	tc	ca	gc	ag	cag	cg	ggc	agt	gt	ggc	agc	agc	act	t	g	aa	at	cat	ggt	g	a	g	50	
SQ18 :	tc	ca	gc	ag	cag	cg	ggc	agt	gt	ggc	agc	agc	act	t	g	aa	at	cat	ggt	g	a	g	50	
SQ17 :	tc	ca	gc	ag	cag	cg	ggc	agt	gt	ggc	agc	agc	act	t	g	aa	at	cat	ggt	g	a	g	50	
SQ03 :	tc	aca	ca	ca	gag	gag	gc	gt	gt	g	gc	agc	agc	ctt	a	g	aa	at	cat	ggt	t	a	a	50
SQ06 :	tc	aca	ca	ca	gag	gag	gc	gt	gt	g	gc	agc	agc	ctt	a	g	aa	at	cat	ggt	t	a	a	50
SQ14 :	tc	aca	ca	ca	gag	gag	gc	gt	gt	g	gc	agc	agc	ctt	a	g	aa	at	cat	ggt	t	a	a	50
SQ11 :	tc	aca	ca	ca	gag	gag	gc	gt	gt	g	gc	agc	agc	ctt	a	g	aa	at	cat	ggt	t	a	a	50
SQ12 :	tc	aca	ca	ca	gag	gag	gc	gt	gt	g	gc	agc	agc	ctt	a	g	aa	at	cat	ggt	t	a	a	50
SQ20 :	tc	aca	ca	ca	gag	gag	gc	gt	gt	g	gc	agc	agc	ctt	a	g	aa	at	cat	ggt	t	a	a	50
SQ07 :	tc	aca	ca	ca	gag	gag	gc	gt	gt	g	gc	agc	agc	ctt	a	g	aa	at	cat	ggt	t	a	a	50
SQ08 :	tc	aca	ca	ca	gag	gag	gc	gt	gt	g	gc	agc	agc	ctt	a	g	aa	at	cat	ggt	t	a	a	50
SQ09 :	tc	aca	ca	ca	gag	gag	gc	gt	gt	g	gc	agc	agc	ctt	a	g	aa	at	cat	ggt	t	a	a	50
SQ10 :	tc	aca	ca	ca	gag	gag	gc	gt	gt	g	gc	agc	agc	ctt	a	g	aa	at	cat	ggt	t	a	a	50
SQ13 :	tc	aca	ca	ca	gag	gag	gc	gt	gt	g	gc	agc	agc	ctt	a	g	aa	at	cat	ggt	t	a	a	50
SQ19 :	tc	aca	ca	ca	gag	gag	gc	gt	gt	g	gc	agc	agc	ctt	a	g	aa	at	cat	ggt	t	a	a	50
SQ21 :	tc	aca	ca	ca	gag	gag	gc	gt	gt	g	gc	agc	agc	ctt	a	g	aa	at	cat	ggt	t	a	a	50
SQ22 :	tc	aca	ca	ca	gag	gag	gc	gt	gt	g	gc	agc	agc	ctt	a	g	aa	at	cat	ggt	t	a	a	50
	TC	AC	CA	CA	G	G	C	GT	GT	T	G	GC	AGC	AGC	c	T	GAA	AT	CAT	G	GT	A		

		60	*	80	*	100																																							
SQ01 :	gt	t	c	t	c	t	g	c	t	g	a	a	c	a	a	c	t	a	g	c	a	a	a	t	a	g	t	a	g	c	t	g	a	a	c	c	t	g	c	t	a	g	100		
SQ02 :	gt	t	c	t	c	t	g	c	t	g	a	a	c	a	a	c	t	a	g	c	a	a	a	t	a	g	t	a	g	c	t	g	a	a	c	c	t	g	c	t	a	g	100		
SQ04 :	gt	t	c	t	c	t	g	c	t	g	a	a	c	a	a	c	t	a	g	c	a	a	a	t	a	g	t	a	g	c	t	g	a	a	c	c	t	g	c	t	a	g	100		
SQ15 :	gt	t	c	t	c	t	g	c	t	g	a	a	c	a	a	c	t	a	g	c	a	a	a	t	a	g	t	a	g	c	t	g	a	a	c	c	t	g	c	t	a	g	100		
SQ16 :	gt	t	c	t	c	t	g	c	t	g	a	a	c	a	a	c	t	a	g	c	a	a	a	t	a	g	t	a	g	c	t	g	a	a	c	c	t	g	c	t	a	g	100		
SQ18 :	gt	t	c	t	c	t	g	c	t	g	a	a	c	a	a	c	t	a	g	c	a	a	a	t	a	g	t	a	g	c	t	g	a	a	c	c	t	g	c	t	a	g	100		
SQ17 :	gt	t	c	t	c	t	g	c	t	g	a	a	c	a	a	c	g	c	t	a	g	c	a	a	a	t	a	g	t	a	g	c	t	g	a	a	c	c	t	g	c	t	a	g	100
SQ03 :	gt	t	c	t	c	t	c	a	g	a	a	c	c	g	e	a	c	t	g	c	c	a	a	a	g	g	t	t	g	c	a	a	g	a	c	c	t	t	c	t	c	t	100		
SQ06 :	a	t	t	c	t	c	t	c	a	g	a	a	c	a	c	a	t	t	g	g	c	a	a	a	g	g	t	g	c	a	a	g	a	c	c	t	t	c	t	t	t	t	100		
SQ14 :	a	t	t	c	t	c	t	c	a	g	a	a	c	a	c	a	t	t	g	g	c	a	a	a	g	g	t	g	c	a	a	g	a	c	c	t	t	c	t	t	t	t	100		
SQ11 :	a	t	t	c	t	c	t	c	a	g	a	a	c	a	c	a	t	t	g	g	c	a	a	a	g	g	t	g	c	a	a	g	a	c	c	t	t	c	t	t	t	t	100		
SQ12 :	a	t	t	c	t	c	t	c	a	g	a	a	c	a	c	a	t	t	g	g	c	a	a	a	g	g	t	g	c	a	a	g	a	c	c	t	t	c	t	t	t	t	100		
SQ20 :	a	t	t	c	t	c	t	c	a	g	a	a	c	a	c	a	t	t	g	g	c	a	a	a	g	g	t	g	c	a	a	g	a	c	c	t	t	c	t	t	t	t	100		
SQ07 :	a	t	t	c	t	c	t	c	a	g	a	a	c	a	c	a	t	t	g	g	c	a	a	a	g	g	t	g	c	a	a	g	a	c	c	t	t	c	t	t	t	t	100		
SQ08 :	a	t	t	c	t	c	t	c	a	g	a	a	c	a	c	a	t	t	g	g	c	a	a	a	g	g	t	g	c	a	a	g	a	c	c	t	t	c	t	t	t	t	100		
SQ09 :	a	t	t	c	t	c	t	c	a	g	a	a	c	a	c	a	t	t	g	g	c	a	a	a	g	g	t	g	c	a	a	g	a	c	c	t	t	c	t	t	t	t	100		
SQ10 :	a	t	t	c	t	c	t	c	a	g	a	a	c	a	c	a	t	t	g	g	c	a	a	a	g	g	t	g	c	a	a	g	a	c	c	t	t	c	t	t	t	t	100		
SQ13 :	a	t	t	c	t	c	t	c	a	g	a	a	c	a	c	a	t	t	g	g	c	a	a	a	g	g	t	g	c	a	a	g	a	c	c	t	t	c	t	t	t	t	100		
SQ19 :	a	t	t	c	t	c	t	c	a	g	a	a	c	a	c	a	t	t	g	g	c	a	a	a	g	g	t	g	c	a	a	g	a	c	c	t	t	c	t	t	t	t	100		
SQ21 :	a	t	t	c	t	c	t	c	a	g	a	a	c	a	c	a	t	t	g	g	c	a	a	a	g	g	t	g	c	a	a	g	a	c	c	t	t	c	t	t	t	t	100		
SQ22 :	a	t	t	c	t	c	t	c	a	g	a	a	c	a	c	a	t	t	g	g	c	a	a	a	g	g	t	g	c	a	a	g	a	c	c	t	t	c	t	t	t	t	100		
	TT	T	C	C	C	A	C	A	T	G	C	C	A	T	G	T	G	C	G	A	A	G	A	C	C	T	G	C	G	A	A	G	A	C	C	T	C	T							

Table 3. Nucleotide sequences of SRSV from sporadic diarrhea

	*	120	*	140	*														
SQ01 :	ca	caa	agt	gt	ggt	gat	gt	ggg	gact	tca	aaa	atc	acc	att	aat	ga	agg	c	: 150
SQ02 :	ca	caa	agt	gt	ggt	gat	gt	ggg	gact	tca	aaa	atc	acc	att	aat	ga	agg	c	: 150
SQ04 :	ca	caa	agt	gt	ggt	gat	gt	ggg	gact	tca	aaa	atc	acc	att	aat	ga	agg	c	: 150
SQ15 :	ca	caa	agt	gt	ggt	gat	gt	ggg	gact	tca	aaa	atc	acc	att	aat	ga	agg	c	: 150
SQ16 :	ca	caa	agt	gt	ggt	gat	gt	ggg	gact	tca	aaa	atc	acc	att	aat	ga	agg	c	: 150
SQ18 :	ca	caa	agt	gt	ggt	gat	gt	ggg	gact	tca	aaa	atc	acc	att	aat	ga	agg	c	: 150
SQ17 :	ca	caa	agt	gt	ggt	gat	gt	ggg	gact	tca	ag	atc	acc	att	aat	ga	agg	c	: 150
SQ03 :	ct	ccc	ag	gt	gat	gac	gt	agg	gact	tca	aaa	atc	aat	caat	ga	agg	g	c	: 150
SQ06 :	ct	cct	ag	gt	ggt	gat	gt	ggg	gact	tca	aaa	atc	aat	caat	ga	agg	g	c	: 150
SQ14 :	ct	cct	ag	gt	ggt	gat	gt	ggg	gact	tca	aaa	atc	aat	caat	ga	agg	g	c	: 150
SQ11 :	ct	cct	ag	gt	ggt	gat	gt	ggg	gact	tca	aaa	atc	aat	caat	ga	agg	g	c	: 150
SQ12 :	ct	cct	ag	gt	ggt	gat	gt	ggg	gact	tca	aaa	atc	aat	caat	ga	agg	g	c	: 150
SQ20 :	ct	cct	ag	gt	ggt	gat	gt	ggg	gact	tca	aaa	atc	aat	caat	ga	agg	g	c	: 150
SQ07 :	ct	cct	ag	gt	ggt	gat	gt	ggg	gat	tca	aaa	atc	aat	caat	ga	agg	g	c	: 150
SQ08 :	ct	cct	ag	gt	ggt	gat	gt	ggg	gat	tca	aaa	atc	aat	caat	ga	agg	g	c	: 150
SQ09 :	ct	cct	ag	gt	ggt	gat	gt	ggg	gat	tca	aaa	atc	aat	caat	ga	agg	g	c	: 150
SQ10 :	ct	cct	ag	gt	ggt	gat	gt	ggg	gact	tca	aaa	atc	aat	caat	ga	agg	g	c	: 150
SQ13 :	ct	cct	ag	gt	ggt	gat	gt	ggg	gact	tca	aaa	atc	aat	caat	ga	agg	g	c	: 150
SQ19 :	ct	cct	ag	gt	ggt	gat	gt	ggg	gact	tca	aaa	atc	aat	caat	ga	agg	g	c	: 150
SQ21 :	ct	cct	ag	gt	ggt	gat	gt	ggg	gact	tca	aaa	atc	aat	caat	ga	agg	g	c	: 150
SQ22 :	ct	ccc	ag	gt	ggt	gat	gt	ggg	gact	tca	aaa	atc	aat	caat	ga	agg	g	c	: 150

C Cc AG GTGgT GAtGTgGGTGAcTTCAAaAT C AT AATGA GG

	160	*	180	*	200																
SQ01 :	ct	acc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	ca	ag	t	gga	act	cc	att	g	ccc	act	g	: 200
SQ02 :	ct	acc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	ca	ag	t	gga	act	cc	att	g	ccc	act	g	: 200
SQ04 :	ct	acc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	ca	ag	t	gga	act	cc	att	g	ccc	act	g	: 200
SQ15 :	ct	acc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	ca	ag	t	gga	act	cc	att	g	ccc	act	g	: 200
SQ16 :	ct	acc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	ca	ag	t	gga	act	cc	att	g	ccc	act	g	: 200
SQ18 :	ct	acc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	ca	ag	t	gga	act	cc	att	g	ccc	act	g	: 200
SQ17 :	ct	acc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	ca	ag	t	gga	act	cc	att	g	ccc	act	g	: 200
SQ03 :	ct	ccc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	cca	at	gga	act	cc	at	g	ccc	act	g	: 200	
SQ06 :	ct	ccc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	cca	at	gga	act	cc	at	g	ccc	act	g	: 200	
SQ14 :	ct	ccc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	cca	at	gga	act	cc	at	g	ccc	act	g	: 200	
SQ11 :	ct	ccc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	cca	at	gga	act	cc	at	g	ccc	act	g	: 200	
SQ12 :	ct	ccc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	cca	at	gga	act	cc	at	g	ccc	act	g	: 200	
SQ20 :	ct	ccc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	cca	at	gga	act	cc	at	g	ccc	act	g	: 200	
SQ07 :	ct	ccc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	cca	at	gga	act	cc	at	g	ccc	act	g	: 200	
SQ08 :	ct	ccc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	cca	at	gga	act	cc	at	g	ccc	act	g	: 200	
SQ09 :	ct	ccc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	cca	at	gga	act	cc	at	g	ccc	act	g	: 200	
SQ10 :	ct	ccc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	cca	at	gga	act	cc	at	g	ccc	act	g	: 199	
SQ13 :	ct	ccc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	cca	at	gga	act	cc	at	g	ccc	act	g	: 200	
SQ19 :	ct	ccc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	cca	at	gga	act	cc	at	g	ccc	act	g	: 199	
SQ21 :	ct	ccc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	cca	at	gga	act	cc	at	g	ccc	act	g	: 199	
SQ22 :	ct	ccc	tct	ggg	gt	g	cct	tgc	acct	cca	at	gga	act	cc	at	g	ccc	act	g	: 200	

CT CC TctGG gTGCC TGCACCTC Ca TGGAActCCAT GCCCActG

分担研究者 池田義文 広島市衛生研究所生物科学部

研究要旨

1992年12月から1998年2月に広島市内で検出された38株のヒトカリシウイルスの遺伝子型は10種類に分けられたが、G IIに属するものが主流であった。ヒトカリシウイルスの遺伝子は変異を繰り返し、毎年異なる複数の遺伝子型のウイルスが流行していることが示唆された。

研究協力者 阿部勝彦 (広島市衛生研究所 生物科学部)

A. 研究目的

広島市内で発生した食中毒様胃腸炎集団例および小児のウイルス性胃腸炎散発例について、ヒトカリシウイルスの発生状況を調査し、ウイルスの遺伝子解析により広島市におけるカリシウイルス感染症の実態を分子疫学的に明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1992年12月から1998年2月までに発生した有症苦情を含む集団発生16事例および散発15例を対象にした。

検体材料は図1に示した方法で処理した。かきは中腸腺10個程度をプールし1検体とした。検査は電子顕微鏡法(EM)と逆転写遺伝子増幅法(RT-PCR)で行った。RT-PCRの試薬組成の1例と反応条件を図2に示した。プライマーはNV35/36[1st]:NV81/82/SM82[2nd]およびNV35/36[1st]:NV81/82/SM82[2nd](81/82系)を一部の検体に、MR3/4[1st]:Yuri22F/R[2nd](YuriF/R系)を全検体で使用し、逆転写反応と1st PCRは汚染防止のためシングルチューブで行った。

塩基配列は2nd PCR増幅産物をダイレクトシーケンス法で決定し、遺伝子解析はGENETIX-MAC(ソフトウェア開発)を用いて、GenBankに登録された塩基配列と比較し、ホ

ジー解析、アミノ酸への翻訳、系統樹作製を行った。PCR陽性と判定された一部の検体については、西尾の方法(厚生省主催、SRSV技術研修会、平成9年11月開催)によるマイクロプレートハイブリダイゼーション法でも確認した。

C. 研究結果および考察

1. ウイルス検出状況

1992年12月から1998年2月までの期間にPCR陽性と判定した47検体中38検体で塩基配列が決定された。その内訳は集団発生16事例、散発15例であった(表1)。集団例の発生場所は家庭内2例、飲食店9例、保育園1例、小学校3例、高等学校1例で、事例番号97-5では残品のかき(加熱調理用)1検体から検出された。月別では11月から3月までの冬季に集中していたが、1995年5月の小学校は修学旅行後に発生した事例で、旅行中に感染したものと思われた。

2. 遺伝子解析結果

遺伝子解析は2nd PCRのNV-81/82で増幅されたポリメラーゼ領域(285bp)について行った。GenBankに登録された塩基配列とのホモロジーは74.7~98.6%ですべてカリシウイルスであることが確認された。参照株を含めたアミノ酸翻訳後の配列を図3に示した(塩基配列のホモロジーが100%の株は省略)。中央付近にカリシウイルスに共通のアミノ酸モ