

小型球形ウイルスデータベースの構築と遺伝子増幅用プライマーの検討

分担研究者 巽 正志 国立感染症研究所獣医科学部主任研究官

研究要旨 小型球形ウイルス（SRSV）非構造蛋白領域ORF1のRNA依存性RNAポリメラーゼ領域、および構造蛋白領域ORF2の塩基配列データを収集・解析し、独自のSRSVデータベースを構築した。本年度は新たにGenogroup IIIを加えた。PCR産物の塩基配列を解読することにより、小型球形ウイルスの迅速な系統解析と分類が可能になった。構造蛋白領域のアラインメントからGenogroup I、Genogroup IIおよびGenogroup IIIに特異的と思われる領域を同定し、SRSV遺伝子増幅用プライマーを設計した。

A. 研究目的

近年、非細菌性胃腸炎の疫学調査から、その大部分が小型球形ウイルスによるものであることが明らかになってきた。また、本邦における非細菌性集団食中毒の大部分をしめる小型球形ウイルス（SRSV）はカキをはじめとする二枚貝で濃縮され、疾病の新たな感染源となっていることも明らかになってきた。貝に捕捉されるウイルス量は極めて微量であること、また現在においてもSRSVを増殖させるための培養細胞系や実験動物系が全くないことから、本ウイルスの検出は困難な状況にある。PCR法による小型球形ウイルス遺伝子検出急速が進展し、原因食品から小型球形ウイルスの検出も可能になってきているが、その効率は極めて低い。本研究では、新規の塩基配列が得られた場合、迅速に系統解析するためSRSVデータベースを構築することを目的とする。また、データベースから抽出した構造蛋白領域の配列を比較し、そのアラインメントからGenogroup I、Genogroup IIおよびGenogroup IIIに特異的領域を同定して遺伝子増幅用プライマーを作製する。

B. 研究方法

以下のデータベースを参照した。GenBank Release 110.0 (12/1998)、EMBL Release 56.0 (9/1998)、PIR-Protein Release 58.0 (9/1998)、SWISS-PROT Release 36.0 (7/1998)。遺伝子解析ソフトウェアパッケージGCG version 9.1によって上記データベースに登録されているSRSV遺伝子を検索し、ORF1のRNA依存性RNAポリメラーゼ領域および構造蛋白領域ORF2のSRSV

塩基配列を抽出した。これらの領域のアラインメントを行い、構造蛋白領域を増幅するプライマーを設計した。このプライマーを用いて増幅した領域の塩基配列を解読した。さらに系統解析を行い、Genogroup I、Genogroup IIおよびGenogroup IIIに分類した。

C. 研究結果

国立感染症研究所のGCG遺伝子解析パッケージを用い、SRSVのポリメラーゼと構造蛋白領域のデータベースを構築した。はじめにNorwalk virus、Southampton virus、Desert Shield virus、Mexico virus、Bristol virus、Snow mountain virus、Hawaii virusについて35/36プライマーで増幅される430塩基を用いfastaでホモロジー検索した。抽出された配列を相互に比較してSRSVと関連のない配列を除き、ポリメラーゼ領域のデータベースとした。同様にポリメラーゼ領域についてNV82(SM82)/NV81プライマーで増幅される310塩基、P69/P39プライマーで増幅される118塩基のデータベースを構築した。これらを前年度構築したものに統合した。Genogroup Iに分類されるNorwalk virus、Chiba virus、Southampton virus、Desert Shield virus等6株のSRSVから構造蛋白領域約1,600塩基を抽出した。Pileupでアラインメントをおこない、Prettyでコンセンサス配列を抽出した。セミネステッドPCR用プライマーG1-F1、G1-F2、およびG1-R1の他に可能性のある領域を一ヶ所同定した。同様に、Genogroup IIに分類される、Mexico virus、Bristol virus、

Snow mountain virus、Hawaii virus等10株から構造蛋白領域約1,600塩基を抽出した。アライメントからセミネステッドPCR用プライマーG2-F1、G2-F3、およびG2-R1の他に可能性のある領域を一ヶ所同定した。ポリメラーゼ領域を増幅する従来のプライマーと検出効率を比較している。

D. 考察

既に解かっているポリメラーゼ領域の塩基配列からでも、SRSVには15を越える血清型が存在することが予想される。また我々が設計した構造蛋白領域のプライマーで増幅されてきた塩基配列の中にもこれまでに報告されていないSRSVの配列が見つかった。今後何種類のSRSVがでてくるのか予測出来ない状況にある。SRSVをPCRで検出するのが困難である所以である。現在決定的に不足しているのはプライマーを評価しより良いものを設計する上での塩基配列データである。したがって目的を達成するためにまず可能な限りのSRSVの塩基配列を、我々のプライマーで決定することにつぎ。本研究で構築したデータベースは迅速に既存の塩基配列と比較し、血清型を予想する上で有用と思われる。

E. 発表論文

- 1) Yabe, M., Matsuura, Y. and Tatsumi, M.: Molecular cloning and expression of cynomolgus monkey interleukin-2 cDNA by the recombinant baculovirus system. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 113, 417 - 423 (1997)
- 2) Tatsumi, M. and Sata, T.: Molecular cloning and expression of cynomolgus monkey interferon-g cDNA. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 114, 229 - 236 (1997)
- 3) Totsuka, K., Takakura, H., Hashimoto, O. and Tatsumi, M.: Molecular cloning and expression of cynomolgus monkey interleukin-1b. *Int. Arch. Allergy Immunol.* in press
- 4) Li, T-C, Yamakawa, Y., Suzuki, K., Tatsumi, M., Razak, M.A., Uchida, T., Takeda, N., and Miyamura, T.: Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 71, 7207 - 7213 (1997)

5) Takakura, H., Mori, Y. and Tatsumi, M. Molecular cloning and expression of caprine IL-6 cDNA in insect cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 113:409 - 416 (1997)

6) Takahashi, H., Tatsumi, M., Nagashima, K., Kurata, T., and Hall, W.W. The role of topoisomerase I in HIV-1 replication. *Leukemia* 11 Suppl 3: 26 - 28 (1997)

厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
分担研究報告書

小型球形ウイルスの組換え中空粒子の作製と血清学的解析への応用

分担研究者 名取 克郎 国立感染症研究所ウイルス第二部主任研究官

研究要旨 組換えバキュロウイルスを用いてSRSV構造蛋白の発現を試み、Genogroup Iの3株、Genogroup IIの5株の計8株でウイルス様中空粒子を作製した。各々の中空粒子に対する高力価免疫血清を作製し、これらのSRSV間の血清学的近縁関係を明らかにした。さらに中空粒子を抗原としてSRSVの血清疫学、および患者の血清学的診断が可能になった。

A. 研究目的

小型球形ウイルス(Small Round Structured Virus : SRSV)は、その増殖においていまだ培養細胞系も感染動物系も確立されておらず、ヒトが唯一の感受性動物である。遺伝子の解析から SRSV は Genogroup-I (G-I) と Genogroup-II (G-II) に分類され、さらに塩基配列のホモロジーから同グループの中にも多くの血清型の存在が予測されている。日本国内で流行しているSRSVからバキュロウイルス発現系を用いて形態的にも抗原的にもネイティブなウイルスと変わらないSRSV中空粒子 (VLPs) を作製し、血清学的関係を明らかにするとともに、日本におけるSRSVの血清疫学的解析を行う。

B. 研究方法

ウイルス性下痢症あるいは急性胃腸炎患者の便材料からRT-PCR法で構造蛋白領域 (ORF2) の5'末端から約300 bpを増幅し、その塩基配列を解析して遺伝子型を決定した。アミノ酸配列のホモロジーから血清型が異なると予想された株について発現を試みた。便材料からORF2全長を含む領域をPCRで増幅しクローニング後、常法通りバキュロウイルストランスファーベクターに組み込み、組換えバキュロウイルスを作出した。発現は Tn-5 細胞に組換えバキュロウイルスを感染し、5～6日間培養した上清からSDS-PAGEと電子顕微鏡で58K蛋白およびVLPsの観察で確認した。培養上清からCsCl平衡密度勾配遠心法で精製したVLPsを免疫原および抗原として抗血清の作製とELISA法による交叉反応試験を行った。また同VLPsを抗原として患者血清中、健常人血清中のSRSV抗体価

を測定した。また発現蛋白はCNBr活性化セファロースを用いて選択的にN末端ペプチドを単離し、タンデム質量分析法によって解析した。

C. 研究結果

ORF2の5'末端から約300bpの塩基配列で比較すると、G-IとG-II間のホモロジーは約50%、同グループ間では約70%であり、G-I, IIには各々5種と7種の血清型が存在することが予想された。1.6kbの構造蛋白(ORF2)のみを含むもの、構造蛋白(ORF2)、機能未同定蛋白(ORF3)、3'NC領域およびポリAを含む2.3kbの長さのものについて、それぞれ組換えバキュロウイルスを作製し発現に用いた。ともに感染後72h以降に58KDa(530aa)の構造蛋白が大量に産生され、これらはそれぞれの株の回復期血清と反応した。発現蛋白の大部分は感染細胞内に留まるが、凍結融解で容易に遊離し、電子顕微鏡下に直径30nmのウイルス様中空粒子が多数認められた。また 10^8 個のTn5細胞から1mgの精製中空粒子が得られた。ORF3の機能は不明であるが、構造蛋白発現と中空ウイルスの産生にはORF2のみで十分であることが明らかになった。

血清型が異なると思われる株を選出して構造蛋白の発現を試み、G-Iの3株、G-IIの5株でVLPsの作出に成功した。これらの株間の交叉反応を調べた結果、G-IとG-II間では数%以下、同グループ内では強い交叉反応を示した。下痢症患者のSRSVに対する抗体応答はカキ関連食中毒では同一集団でG-I, IIに应答する患者が混在した。しかし施設内食中毒例では単一な株に最も強い抗体上昇が見られた。健常人血清中のSRSV抗体は2歳代ですでに高

い陽性率を示した。特にG-II に対し高率であった。

D. 考察

ポリメラーゼ領域の解析からSRSVはGenogroup I (Norwalk-like)、Genogroup II (Snowmountain-like)、Classical human calicivirus (Sapporo-like) の3種の遺伝子型に分類されている。Genogroup I、IIは全塩基配列から典型的なCalicivirusの遺伝子構造をもつことが確認され、一方Classical human calicivirusの遺伝子構造はGenogroup I、IIとは異なり、ORF1とORF2が一つの連続したORFを構成するRabbit haemorrhagic disease virusの構造に似ていることが明らかにされた。現在データベースに登録されているSRSV構造蛋白の塩基配列を解析すると、塩基のホモロジーはGenogroup IとIIの間で約50%、同グループ間でも70%程度であり、RT-PCRでの遺伝子検出には困難が伴う。

また塩基配列からGenogroup I、IIにはそれぞれ少なくとも5種類と7種類の血清型が存在すると予想されたが、これらすべての配列が僅か2年間の流行期で検出されたことは、わが国では遺伝学的に異なるSRSVが同時に流行していることが示唆される。一つの糞便材料から複数の遺伝子型が増幅されてくることは、すでにカキが複数のSRSVで汚染されていることを意味している。今後は塩基配列を勢力的に解析し、SRSVの流行状況をより詳細に解析する必要がある。またその過程で遺伝学的にあるいは血清学的に新種のウイルスが同定されてくる可能性が多分に考えられる。さらにそれらに基づいたデータベースの作製と提供、そしてより有効なプライマーの開発を進めより多くの中空粒子を作製してゆく必要がある。今回は食中毒に関与するGenogroup IとGenogroup IIの構造蛋白の発現を試みた。国内の食中毒で検出された約50株のSRSVのRNA依存性RNAポリメラーゼ遺伝子の塩基配列からは、1997-1998年冬季は全てGenogroup IIの遺伝子型が検出されていることがわかっている。今後Genogroup IIを注目する必要があるようである。

VLPsの発現によって大量のSRSV抗原が使用可能となった。SRSVは遺伝的分類と同様に血清学的にも分類され多くの血清型が存在することが示唆された。またSRSVは広く

浸淫しており、特に近年はG-IIに属すSRSVが多いことが明らかとなった。

E. 結論

血清学的に異なる8種類のウイルス様中空粒子が発現でき、ウイルス性胃腸炎あるいは非最近性食中毒の原因を血清学的に診断することが可能になった。また血清疫学も可能になった。しかしながらSRSVは遺伝学的にも血清学的にも多様であり、わが国ではすでに多くの血清型のSRSVが広く浸潤し、全ての血清型が同時に流行しているように思われた。したがってさらに多くの構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現してゆくことが必要である。発現できた中空粒子の供給体制を整えた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Katsuro Natori, Kenji Suzuki, Yoshio Yamakawa, Masashi Tatsumi, Kenji Sakae, Shinichi Kobayashi, Kuniko Shinozaki, Hiroaki Ishiko, Tatsuo Miyamura and Naokazu Takeda. Expression and self-assembly of capsid proteins of the Chiba virus, a genetically distinct Norwalk-like virus. 1998 submitted
2. 武田直和、名取克郎. 1998. 小型球形ウイルス. 食品衛生研究. 48:65-75.
3. 武田直和、名取克郎. 1998. 食中毒原因物質としての小型球形ウイルスの検出法. 食品衛生学雑誌. 39: 444-450.

2. 学会発表

国際学会

1. N. Takeda, K. Natori, S. Kobayashi, K. Sakae, Y. Suzuki, K. Shinozaki, O. Hashimoto, H. Ishiko and Tatsuo Miyamura: FORMATION AND UTILIZATION OF EMPTY VIRUS-LIKE PARTICLES OF NORWALK-LIKE VIRUSES (NLVs). International Workshop on Human Caliciviruses. March 29-31, 1999, Atlanta, USA
2. N. Takeda, K. Natori, S. Kobayashi, K. Sakae, Y. Suzuki, O. Hashimoto, H. Ishiko and T. Miyamura: Formation and utilization of empty virus-like particles of small round structured viruses. Thirty-second Joint

Working Conference on Viral Diseases.
September 2-4, 1998, Kyoto, Japan

国内学会

1. 名取克郎、武田直和、小林慎一、栄賢司、
篠崎邦子、宮村達男：小型球形ウイルスの組換え中空粒子の作製と血清学的解析への応用。第46回日本ウイルス学会、1998.10.12 東京
2. 小林慎一、都築秀明、山下照夫、栄賢司、鈴木康元、名取克郎、武田直和：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、1998.10.12 東京

分担研究報告書

SRSV抗原のELISAによる検出

愛知県衛生研究所

栄 賢司、小林慎一、鈴木康元

研究要旨 7種類のSRSV抗原を型別できるELISAを用いて集団食中毒患者の糞便検体について抗原検出を行い、併行して実施した電子顕微鏡法およびPCR法による検出率と比較検討した。ELISA法では集団食中毒8事例の46検体中、7事例の26検体(56.5%)が陽性となった。電顕法では7事例の14検体(30.4%)からSRSVが検出されたのみであり、ELISA法は電顕法と比べて高率にSRSVを検出することができた。またSRSVの抗原型と遺伝子型が一致していた事例では、PCR法と同等な感度が得られたことから、ELISA法がSRSV検査の迅速診断法として有用であることが示唆された。

A. 研究目的

小型球形ウイルス(SRSV)は冬季に流行する小児の散発性下痢症および非細菌性食中毒の集団発生における主要な原因ウイルスの一つである。わが国ではSRSVに起因する食中毒としては、カキが推定原因とされる事例が最も多く発生しているが、平成9年5月30日の食品衛生法改正によりウイルスが食中毒原因物質として追加されたのに伴い、ウイルス検査の迅速化が行政課題となっている。しかし、SRSVの培養系は未だ確立されておらず、その検査法としては患者糞便中のウイルス粒子を電子顕微鏡で検出する方法が主流となっている。これに対し、SRSVの遺伝子構造解明の進展に伴い、その遺伝子を検出するPCR法および組換えバキュロウイルスにより産生されるウイルス様中空粒子(Virus Like Particles, VLPs)を利用したELISA法が電顕法に代わる迅速診断法として近年検討されてきている。本研究では、抗原性の異なる7種類のSRSV抗原を検出できるELISA系で集団食中毒患者の糞便材料について抗原検出を行い、その有用性を検討した。

B. 研究方法

検査材料として、1986年度から98年度に愛知県で発生した集団食中毒8事例の46名から採取された糞便を用いた。

SRSV抗原検出ELISAは、組換えバキュロウイルスで発現された7種類のVLPsに対するウサギ免疫血清を捕獲抗体とし、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗SRSV抗体(7種)を検出抗体とするサンド

イッチ型ELISAである。7種類のVLPsの内訳は、Genogroup I (GI)でr124(Norwalk-like virus)、r258 (Southampton-like virus) および rCV16(Chiba virus)の3種、Genogroup II (GII)でr104(Bristol-like virus)、r76(Hawaii-like virus)、それにr47とr7の4種の合わせて7種である。

C. 研究結果

集団食中毒8事例の46名の糞便材料について抗原検出を行ない、その結果を表1に示した。7事例(87.5%)の26検体(56.5%)がELISA陽性となった。GIグループの抗原が陽性であったものは6事例からの44検体中21検体(47.7%)、GIIグループの抗原が陽性であったものは5事例の30検体中9検体(30.0%)であった。また、3事例の4検体は両グループの抗原が陽性であった。GIグループのウイルスがGIIグループのウイルスと比べて高率に検出された。

表2に集団食中毒8事例について、併行して実施した電子顕微鏡検査およびPCRの結果をELISAの成績と合わせて示した。電顕法では7事例の14検体(30.4%)からSRSVが検出されたのみであり、ELISA法は電顕法と比べて高率にSRSVを検出することができた。また事例1、3および5のように抗原型と遺伝子型が一致していた場合にはELISA法はPCR法と同等な感度が得られた。しかし、事例7および8のようにPCRの検出率が優っていた事例では、今回のELISA系でメキシコタイプのウイルスを検出することができないことがELISAの検出率

を低下させた要因と考えられた。

D. 結論および考察

今回検討したELISA法は迅速・簡便であり、かつ、抗原型が一致していればPCR法とほぼ同等な検出率が得られることから、SRSVの検出検査において電顕法に代わる迅速診断法として有用であることが示唆された。しかし、最近の集団食中毒事例ではメキシコウイルスに類似の遺伝子型を持つSRSVが関与する事例が多く発生しているが、今回のELISA系でこのタイプのウイルスを検出することができなかった。従って、今後メキシコタイプの抗原検出系を新たに追加することが必要である。本ELISA法は抗原性の異なるSRSVを型別して検出できることから、SRSV感染症の疫学的解析にも応用可能であると考えられた。

E. 研究発表

1. 学会発表

小林慎一、都築秀明、山下照夫、栄賢司、鈴木康元、名取克郎、武田直和：

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).

分担研究報告書

下痢症ウイルスの検出法、予防法、汚染指標および疫学に関する研究

分担研究者 齋藤博之 秋田県衛生科学研究所主任

研究要旨：昨年度までにプライマー設計も含めた RT-PCR 法の条件検討を行い一定の成果をあげたが、検体の処理方法(RNA 抽出法)に関しては十分な検討がなされていない。今年度は市販キットも含めた 8 種類の抽出法に関して、検査成績に及ぼす影響や試薬コストについて比較した。糞便検体に関しては方法間で大きな差は無く、手間とコストを基準に選んでよいことがわかった。一方、カキ検体に関しては Hot Phenol 法が最も抽出効率において優れていた。

A. 研究目的

SRSV 検出のための RT-PCR 法においては、プライマー選定の他に検体からの RNA 抽出法が大きな意味を持ってくる。抽出法において最終的な検査成績に及ぼす要素は「RNA の回収効率」と「酵素阻害物質の除去効率」の 2 つである。また、糞便の他に、最近検査依頼が増えつつある生カキに対しても同様に比較検討を行った。

B. 研究方法

比較検討のためには十分量の共通検体が必要であるが、あらかじめ定量したコクサッキー A16 を糞便及びカキ検体に加えることで解決した。すなわち、 10^5 TCID₅₀/ml のコクサッキー A16 培養上清を原液とし、次の 3 種類の希釈液で段階希釈した。

1. 蒸留水
2. 10%糞便乳剤をフルオロカーボン処理したもの
3. 生カキ中腸腺の凍結融解抽出液をフルオロカーボン処理したもの

蒸留水を加えたのは、純粋な「回収効率」を比較するためである。糞便とカキに関してはあらかじめコクサッキー A16 が陰性であることを確認してある。

このようにして調製した共通試料に対して表 1 に示す 8 種類の抽出法で RNA を回収して RT-PCR を行い、どの程度の希釈まで増幅バンドが検出できるかを比較した。処理量は各希釈試料ごとに 0.1ml

である。なお、市販キットの使用条件は添付説明書に従うが、それ以外の方法については以下のとおりである。

CTAB 法

J. Clin. Microbiol., 30, 2529-2534, 1992 参照

Glassmilk 法

6M チオシアン酸グアニジン 0.3ml と Glassmilk (Glass Powder を蒸留水でスラリーとする) 10 μ l を加えて室温で 10 分放置する。遠心して上清を除き、沈澱を 1ml の NEW buffer (50mM NaCl - 50% Ethanol - 5mM Tris·HCl - 0.5mM EDTA, pH7.5) で 1 回、純エタノールで 1 回洗滌する。沈澱を乾燥させてから蒸留水 50 μ l を加えて 65°C で 10 分処理して RNA を溶出させる。最後に遠心して上清を回収する。

Hot Phenol 法

酸性 GTC 溶液 (5.5M チオシアン酸グアニジン - 25mM クエン酸 Na - 0.5% ラウロイルサルコシ酸 Na - 0.1M 2-メルカプトエタノール - 0.4M 酢酸 Na / 酢酸で pH4~5 に合わせる) を調製する。これを試料に 0.3ml 加えて 65°C に加温する。フェノール/クロロホルム 0.4ml を加えて加温したまま 10 分間放置する (5 分後にチューブを良く振って混ぜる)。氷上で冷やした後、遠心して水層を回収し、再度クロロホルム/イソアミルアルコールで抽出する。水層を回収して

エタノール沈澱する(酢酸 Na はすでに加えられているのでこの段階では不要)。

PCR に用いたプライマーはエンテロウイルス共通で 5' ノンコーディング領域の配列を用いた(J. Clin. Microbiol., 28, 438-442, 1990 参照)。なお、全ての反応において DNase I 処理を加えた^{1,2}。

本研究では、検査にかかるコストも体制整備のための重要なファクターとして位置付けているため、表 1 と 2 に試薬類の価格を示した。

C. 研究結果

図 1 に方法別、検体別の RNA 抽出効率を比較した成績を示した。糞便検体に対する抽出効率では Dr.GenTLE の成績が低かったがそれ以外はその方法を用いても差がなかった。カキ検体では Hot Phenol 法の抽出効率が最も高く他の方法とは明らかな差が認められた。

D. 考察

糞便の場合は方法ごとの効率の差は無いため、コストと手間を選んでもかまわないことになる。図 2 にコストの比較を示したが、Catrimox-14 と Glassmilk 法が最も安く済む。より手間のかからない方は前者だが、糞便の性状(脂質の多い便やキャリーブレア入りの便など)によって影響を受けやすいので、ここでは安定した検査精度を得られる Glassmilk 法を推奨したい。

カキ検体では Hot Phenol 法の抽出効率が極めて高いので、通常はこれを選択すべきであろう。コストも安く済み、手間も ISOGEN-LS と同程度と考えられる。

阻害物質を含まない対照として蒸留水で希釈した試料についてもテストしたが、意外なことに糞便検体より成績が低い場合が多かった。これは不純物が逆にキャリアの役目を果たしたものと考えられる。そのため単純な煮沸のみの処理では損失が少なくなっている。この結果は、環境水に対してモニタリ

ング調査を行う場合、あらかじめ適当なキャリアを添加する必要性を示唆している。

E. 結論

これまでの研究では、RNA 抽出法に関する十分な比較検討がなされていなかった。これは、SRSV 陽性の糞便検体を研究材料にした場合、量に限りがあるため同一条件下の比較が困難であったことが理由である。今回は、あえて SRSV の PCR を用いずに培養可能なエンテロウイルスを健状人の糞便、及びカキ凍結融解物に添加することで RNA 抽出過程を再現した。Glassmilk 法はこれまでキット製品しか市販されていなかったためコスト的に不利であったが、「Glass Powder」を購入してスラリーにすればこの問題は解決できる。一方、カキ検体に関しては、Hot Phenol 法が最も良い結果となった。簡便さにおいては、必要試薬を可能な限りプレミックスしておけば、ISOGEN-LS と同じくらいになるし、CTAB 法よりはるかに迅速である。

F. 研究発表

1) Hiroyuki Saito, *et. al.*, Application of RT-PCR designed from the sequence of the local SRSV strain to the screening in viral gastroenteritis outbreak. Microbiol. Immunol., 42, 439-446 (1998)

2) 斎藤博之、他、SRSV に起因する食中毒における易学指標としての SSCP 解析の検討、第 46 回日本ウイルス学会、東京 (1998)

【昨年度からの継続データ】

昨年度示した SSCP 解析による汚染経路の調査は、新たに 7 事例(非カキ)をデータに加えた。それにより、カキが原因でない SRSV 食中毒は同一事例内の全ての患者で SSCP パターンが一致するという結果が再確認された。

図1 RNAの抽出効率比較

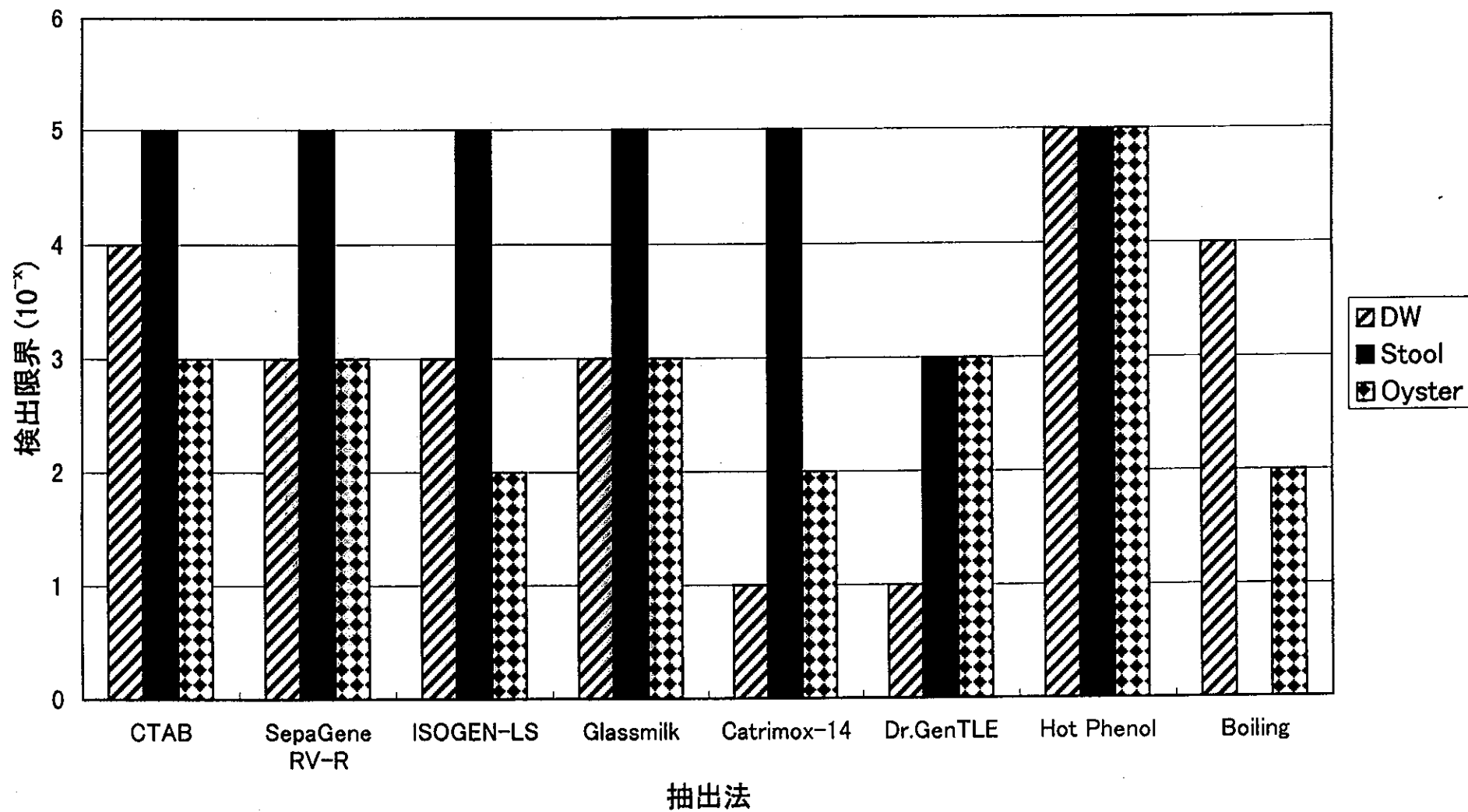


図2 抽出法別コスト比較

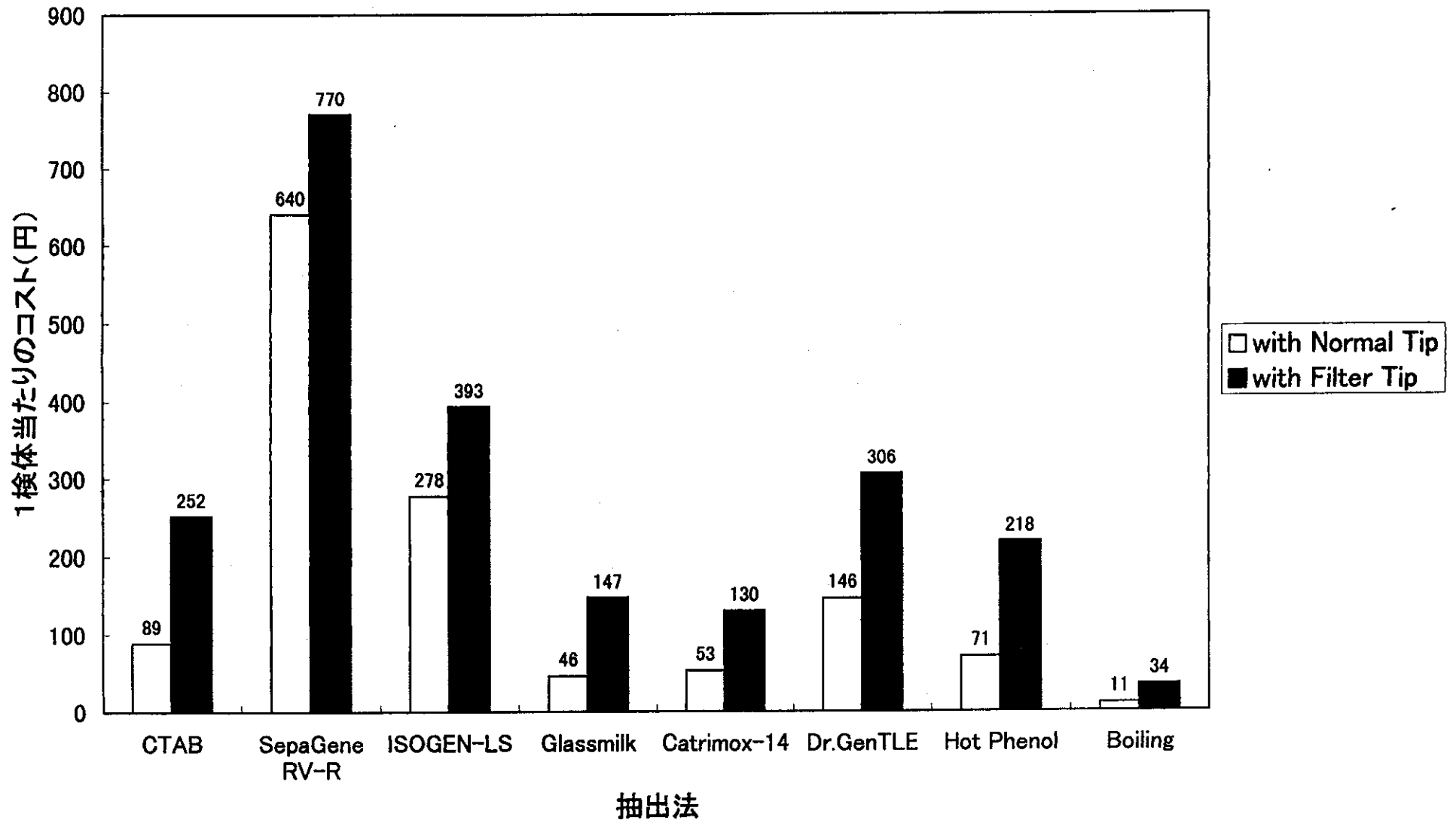


表1-1 抽出法別コスト比較(Normal Tipを使用した場合)

抽出法	キット価格(円)	処理数	1検体当たりの 試薬コスト(円)	必要チューブ数	必要チップ数 (大)	必要チップ数 (小)	1検体当たりの 容器コスト(円)	1検体当たりの 合計コスト(円)
CTAB			33.1	3	5	11	55.4	89
SepaGene RV-R	60000	100	603.0	2	7	3	36.8	640
ISOGEN-LS	32000	133	244.0	2	6	3	34.0	278
Glassmilk			12.6	2	4	5	33.2	46
Catrimox-14	16000	500	32.0	1	4	2	21.0	53
Dr.GenTLE	20000	200	103.0	2	9	3	42.4	146
Hot Phenol			22.4	3	6	7	48.6	71
Boiling			0.0	1	1	1	10.2	11

表1-2 抽出法別コスト比較(Filter Tipを使用した場合)

抽出法	キット価格(円)	処理数	1検体当たりの 試薬コスト(円)	必要チューブ数	必要チップ数 (大)	必要チップ数 (小)	1検体当たりの 容器コスト(円)	1検体当たりの 合計コスト(円)
CTAB			33.1	3	5	11	218.3	252
SepaGene RV-R	60000	100	603.0	2	7	3	166.9	770
ISOGEN-LS	32000	133	244.0	2	6	3	148.9	393
Glassmilk			12.6	2	4	5	133.5	147
Catrimox-14	16000	500	32.0	1	4	2	97.6	130
Dr.GenTLE	20000	200	103.0	2	9	3	202.9	306
Hot Phenol			22.4	3	6	7	195.1	218
Boiling			0.0	1	1	1	33.3	34

* SepaGen RV-R、ISOGEN-LS、及びDr.GenTLEの1検体当たりの試薬コストには、2-プロパノールとエタノールのコスト3円が加算されている。

** CTAB、Glassmilk、及びHot Phenol法のコストは表2の価格表から計算した。

*** 合計コストは1円未満を切り上げ表示した。

図2-1 コスト計算に用いた試薬類の価格(1998年12月現在)

品名	メーカー	形状	内容量	価格(円)
チオシアン酸グアニジン	和光純薬	粉末	500g	18000
ラウロイルサルコシン酸Na	和光純薬	30%溶液	500ml	11400
クエン酸Na	和光純薬	粉末	500g	1750
酢酸Na	和光純薬	粉末	500g	1100
トリス	和光純薬	粉末	500g	5600
SDS	和光純薬	粉末	500g	3500
EDTA	和光純薬	粉末	500g	3300
NaCl	和光純薬	粉末	500g	700
2-メルカプトエタノール	和光純薬	液体	500ml	3600
2-プロパノール	和光純薬	液体	500ml	1600
エタノール	和光純薬	液体	500ml	2000
フェノール	和光純薬	結晶	500g	1360
クロロホルム	和光純薬	液体	3l	5600
CTAB	Sigma	粉末	500g	10000
Proteinase K	ニッポンジーン	20mg/ml溶液	5ml	14700
Glass Powder	ニッポンジーン	粉末	200mg	3100
グリコーゲン	ベーリンガー	20mg/ml溶液	1ml	15700

図2-2 コスト計算に用いたキット類の価格(1998年12月現在)

品名	メーカー	処理検体数	価格(円)
SepaGene RV-R	三光純薬	100	60000
ISOGEN-LS	ニッポンジーン	133	32000
Catrimox-14	ニッポンジーン	500	16000
Dr. GenTLE	宝酒造	200	20000

図2-3 コスト計算に用いた容器類の価格(1998年12月現在)

品名	メーカー	包装(本)	価格(円)	単価(円)
エッペンチューブ(相当品)	フナコシ	1000	5000	5.0
フィルターチップ 1000	フナコシ	800	14400	18.0
フィルターチップ 200	サワディー	960	9900	10.3
フィルターチップ 20	サワディー	960	9900	10.3
ノーマルチップ 1000	フナコシ	1000	2800	2.8
ノーマルチップ 200/20	フナコシ	1000	2400	2.4

分担研究報告書

保育園における集団嘔吐下痢症事例の患者糞便、食品、 食材からのヒトカリシウイルス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研究員

研究要旨

非細菌性食中毒は、冬期に発生が多く見られ、その起因物質としてヒトカリシウイルスの関与が示唆されている。平成 9 年以降厚生省通達により非細菌性食中毒起因物質の検査が始められるようになった。その結果、非細菌性食中毒事件の患者糞便の検査が行われ、ヒトカリシウイルスが多くの割合を占めていることが明らかになってくると同時に、感染経路を特定する必要に迫られるようになった。従来非細菌性食中毒の多くは、カキの生食によるものが多いと思われていたが、カキを食していない事例も多々見られた。今回このカキが関与していない保育園における非細菌性食中毒事件を体験し、検査の結果、患者糞便、調理人糞便、保母糞便からヒトカリシウイルス遺伝子を検出することができた。さらに保存食を検査したところ、保存食のうち、素材であるレンコン、さらに調理品であるレンコンの炒め物からもヒトカリシウイルスの遺伝子を検出することができた。以上の結果から今回の保育園における非細菌性食中毒事件は、ヒトカリシウイルスが食品を介して感染した可能性を示唆するものであった。

A. 研究目的

以前から、冬場に非細菌性の集団食中毒事件が起きていた。ここ数年の調査で冬季の食中毒様事件の多くはヒトカリシウイルスが関与していることがわかってきた。また、非細菌性食中毒事件は、カキの生食によることが多いと思われてきたが、私が経験する事例の半分は、カキに関係しない事例であることも解った。また、カキからヒトカリシウイルス遺伝子を検出した報告は、しばしば見られるが、細菌性の食中毒のようにカキ以外の原因食品を特定した事例はほとんどない。今回我々は、O157 事件以来生物は、ほとんど提供しない保育園給食が疫学的原因と思われる食中毒様事件で、患者糞便、調理人糞便からヒトカリシウイルス遺伝子を検出した。さらに保存食の調査を行い、

保存食からもヒトカリシウイルス遺伝子を検出することができたので報告する。

B. 研究方法

1997 年 11 月中旬名古屋市内の某保育園で集団嘔吐下痢症が発生した。管轄保健所は、食中毒事件と判断し、患者糞便 8 検体(調理人 1 件、保母 2 件、園児 5 件)が、また、保存食 61 検体を搬入した。搬入された糞便は、PBS で 10%乳剤とし、ダイフロン処理を行いベイラー医大の変法によりウイルス RNA を抽出した。食品からのウイルス RNA 抽出は、食品を PBS 中でスマッカーにかけ 10%乳剤とし、粗遠心後の上清をダイフロン処理し、30%ショ糖クッションに載せ $1.20 \times 10^{11} \text{rad}^2/\text{sec}$ で超遠後、ペレットを 100 μl に溶かし、ベイラー医大の変法によりウ

ウイルス RNA を抽出した。抽出した RNA は、Super Script II Rnase H⁻ で逆転写後、G1/G2 系のプライマーにより PCR を行った (45 回本学会にて発表)。PCR 増幅産物は、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit を使用して、ABI373S DNA シーケンサにより塩基配列を決定し、遺伝子解析を行った。

C. 研究結果

今回の保育園の集団嘔吐下痢症は、食中毒事件として処理された。症状は、吐気 98%、嘔吐 94%、下痢 43%、発熱 40%、腹痛 23%、であった。患者糞便のヒトカリシウイルス RT-PCR 検査の結果、8 検体中6検体 (調理人 1/1、保母 1/2、園児 4/5) が陽性であった。PCR 産物の遺伝子解析を行い、データベースと比較検討した結果 Hawaii 株に近似の genotype 2 のウイルスであることがわかった。保存食の検査については 1st PCR では検出することができなかったが、2nd PCR を行うことにより、レンコンの炒め物、さらに食材のレンコンからも患者糞便と同様 Hawaii 株に近似の genotype 2 のヒトカリシウイルス遺伝子を検出したが、遺伝子解析の結果患者糞便、調理人糞便から検出された遺伝子と全く同一のものではなかった。園児から検出されたヒトカリシウイルス遺伝子と調理人、保母から検出された遺伝子は、ほぼ同一であった。食品であるレンコンの炒め物から検出された遺伝子と食材のレンコンから検出された遺伝子もほぼ同一であった。しかし、食品由来の遺伝子と患者調理人由来の遺伝子の間には、Hawaii タイプとして共通点があるが、塩基配列のホモロジーは 90%であった。

D. 考察

今回我々は、2 枚貝とは違った一般食品

とその食材からヒトカリシウイルス遺伝子を検出することに成功した。これら食品由来の遺伝子群と患者由来の遺伝子群共に Hawaii ウイルス系に近いものであるが、両群の遺伝子のホモロジーが一致しないことから、ただたんに食品にもヒトカリシウイルスが付着していただけで、今回の食中毒事件とは何ら関係がないのかもしれない。しかしながら、食品やその食材にウイルスが付着していることは、その食品の衛生管理に問題があるということを示しており、問題である。ここで、RT-PCR 法の問題点として、いくつかの増幅される遺伝子が存在した場合に、それら遺伝子を全て同じ比率で増幅するわけではなく、特定の遺伝子のみを特異的に増幅してしまうことが考えられる。また、ヒトの体内で増殖する時も、抗体などさまざまなファクターによりウイルスにセレクションがかかることも考えられるので、今回の事件の場合も、何らかの原因で食材が汚染され、その食材を用いた食品を介して調理人、保母、園児共に感染したと推測されたが、完全に決定するには問題も残る。

E. 結論

今回の事件の場合、食材が汚染され、食品も汚染し、それを食べたヒトが発症したと考えることができるが、疫学的な情報などを考慮すると感染経路を特定するには問題点もある。感染経路について議論するには今後、幾つかの事例を調査する必要があると思われた。

E. 研究発表

学会発表

第 46 回日本ウイルス学会学術集会にて発表 (1998 年 10 月 12 日東京)

分担研究報告書

下痢症ウイルスの検出法、予防法、汚染指標および疫学に関する研究

分担研究者 篠崎邦子 千葉県衛生研究所研究員

研究要旨：平成10年度千葉県内で発生した集団下痢症10事例についてSRSV検査を実施した。EMまたはPCRにより全事例からSRSVを検出した。プライマーは、構造蛋白領域の Genogroup 特異的プライマーの反応が良好であった。検出ウイルスは、Genogroup2 トロント株類似の株が最も多かったが、さまざまな株の流行がみられた。2事例について保存してあった検食のPCRの結果、それぞれの事例2品目ずつからSRSV遺伝子を検出し、遺伝子解析の結果患者由来の株と塩基配列がほぼ一致した。また、健康人と考えられる給食従事者に52名について、平成10年4月～9月まで2～4週ごとに採取したのべ274検体のSRSVのPCRを実施し、2.9%に陽性がみられた。

A. 研究目的

平成9年5月食品衛生法の改正により、SRSVは食中毒の原因物質に位置づけられ行政措置の対象となった。SRSVの流行実態を明らかにする目的で、平成10年度に千葉県内で発生した集団下痢症についてSRSRV検査を実施し、検出ウイルスの遺伝子解析を試みた。また、健康人(胃腸炎症状を呈していない人)の潜在的SRSV感染状況を知る目的で、給食従事者についてSRSV遺伝子の検出を試みた。

B. 研究方法

平成10年度千葉県内で発生した集団下痢症10事例の患者便、検食を検査材料とした。また、健康人として平成10年4～9月まで2～4週ごとに採取された給食従事者11施設52名のべ274検体を検査材料とした。ウイルス検査は、電子顕微鏡法(EM)とRT-PCRにより行った。核酸の抽出は、CTAB法またはISOGEN-LS(ニッポンジーン)で行い、プライマーはポリメラーゼ領域のNV35/36、NV81/82 SM82と構造蛋白領域 Genogroup 特異プライ

マーを用いた。PCR陽性検体についてダイレクトシーケンスにより塩基配列の決定を行った。

C. 研究結果

平成10年4月から平成11年3月上旬までに千葉県内で10事例の集団下痢症が発生した。これらの集団発生は、4～6月に2例、11月下旬から12月末に6例、2月下旬から3月初旬に2例で、11月下旬から12月に集中していた。小学校での発生が1例、民宿での発生が1例あったが、残り8例は飲食店を介しての発生であった。生カキを喫食していた事例が1例、アサリスパゲッテイーが原因食として推定された事例が1例あった。発病率は30～70%と幅があった。臨床症状は、下痢が主の事例と嘔吐・嘔気が主の事例があった。潜伏時間は、ほとんどの事例は1～2日であったが、平均潜伏時間12時間と短い事例が1例あった。

ウイルス検査の結果、全ての事例でEMまたはPCRによりSRSVを確認した。EMでは、10例中8例からSRSVを検出し、陽性率49/100(49%)であった。P

PCRでは、ポリメラーゼ領域のプライマーで8例中6例陽性、陽性率35/78(44.9%)、構造蛋白プライマーで10例全例陽性、陽性率61/100(61%)であった。これら検出したSRSVの遺伝子解析の結果、Genogroup1が3例(サザンプトン株類似2例、デザートシールド株類似1例)、Genogroup2が6例(トロント株類似4例、スノーマウンテン株類似1例、キャンパーウエル株類似1例)であった。残り1例は、Genogroup1を3株Genogroup2を3株検出し、これらは全て異なる株であった。この事例はあさりスパゲッティが原因食と推定された。この事例以外にも、主になる株以外の株が検出された事例が3例みられた。

今回の事例のうち3例について、保存されていた検食についてSRSV遺伝子の検出を試みた。3事例とも1~2品の陽性検体がみられた。これら陽性検体の遺伝子解析の結果いずれもSRSVと確認され、2事例の食品では患者由来株とほぼ塩基配列の一致がみられた。患者由来株と一致のみられた食品は、1例はあさり・わかめとサラダ、1例は魚甘酢あんかけとオープンフルーツタルトであった。

給食従事者274検体についてPCRを行ったところ、8検体からSRSV遺伝子が検出され陽性率2.9%であった。陽性は、4月に2検体、6月に3検体、7月に1検体、9月に2検体検出された。これらの陽性検体の遺伝子解析の結果、6月の2検体はGenogroup1・サザンプトン株類似、残り6検体はGenogroup2・トロント株類似であった。

D. 考察

平成10年度千葉県内で集団下痢症は10例発生し、11月下旬から12月に集中して

いた。ほとんどが飲食店を介しての事例であったがカキ関連は1例のみであった。PCRでは11月以降の事例でポリメラーゼ領域のプライマーの反応性が良くなく、構造蛋白領域のプライマーの反応性が良好であった。遺伝子解析の結果、トロント株類似のウイルスが最も多かったが、さまざまな株の流行がみられた。また、一つの事例でいくつかの株の混在が多くみられ、アサリを原因食として推定した事例では6種類の株を確認した。

今回の事例のうち3例について行った検食の検査から、それぞれの事例で1~2品のSRSV陽性の検体がみられた。遺伝子解析の結果、患者由来株とほぼ塩基配列の一致がみられた。しかし、今回食品のPCRはその産物量がいずれも少なく、一回のシーケンスでは塩基配列を十分解析することができず、更に産物量を増やして解析することが必要と思われたが、時間的制約からそれ以上の検査が行えなかった。このため、原因食品を特定するには問題があると思われた。今後食品からのSRSV遺伝子を感度良く検出する方法の確立が必要と思われる。

健康人と考えられる給食従事者の平成10年4~9月の検便について、SRSVのPCRを実施し、2.9%に陽性がみられた。検出したウイルスは、集団発生でよくみられるトロント株類似、サザンプトン株類似のものであった。これらのことから、健康人の間で症状は示さないもののSRSV感染を起こしている可能性が示唆された。

E. 結論

平成10年度千葉県内で発生した集団下痢症10事例全例から、EMまたはPCRによりSRSVを検出した。検出ウイルスは、トロント株類似のウイルスが最も多かったが、

さまざまな株の流行がみられた。2事例について実施した検食のPCRより、それぞれの事例2品目ずつからSRSV遺伝子を検出し、遺伝子解析のより患者由来の株とほぼ一致が見られた。

健康人と考えられる給食従事者の検便についてSRSVのPCRを実施し2.9%に陽性がみられた。検出されたウイルスは集団発生でよくみられる株であり、健康人の間でSRSV感染を起こしている可能性が示唆された。

分担研究報告書

食品媒介性及び散発性の急性胃腸炎におけるカリシウイルスのプローブ型の分布

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

研究要旨：下痢をおこすカリシウイルスの検出法である RT-PCR の確認法として、ジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドプローブを用いたハイブリダイゼーションを検討してきた。食中毒事例からのカリシウイルスと、散発事例からのカリシウイルスのプローブ型別を行い、プローブ型別検出頻度を比較した。最近 2 シーズンでは散発例からは P2B、P2A、P1B 型の順に検出数が多く、P1A 型は検出されなかった。一方食中毒事例からは P1A、P1B、P2B 型が検出され、散発例でみられたプローブ型分布と異なる分布を示した。

A. 研究目的

カリシウイルス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、カリシウイルスの地域での流行が環境を汚染し、食品特にカキ等の貝類を介する食中毒が発生すると考えられている。また、カキ等の一次的に汚染されている食品が関与しない食中毒も多く報告されており、その様な場合は汚染食品あるいは調理従業員からの調理中の二次汚染が主要な伝播経路であると考えられている。

そのため地域流行のカリシウイルスと食中毒事例からのカリシウイルスとを比較することにより、カリシウイルスの動向を把握し、ウイルス性食中毒の対策に必要な知見を得ることを目的とした。今回は散発性のカリシウイルスと食中毒事例のプローブ型の分布を調査した。

カリシウイルスの検査法については、その遺伝子学的及び抗原性の変異の多様性から、いまだ方法が確立しているとは言い難い状態である。現在最もよく用いられている RT-PCR 法は意図的にその特異性を低くしているため、増幅された PCR 産物は、適当なプローブを用いたハイブリダイゼーションによる確認または塩基配列解析による確認が必要とされている。今回我々は、Ando らが報告したジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドプローブを用い、迅速性を高めるため、ドットプロットハイブリダイゼーションをおこなった。

B. 研究方法

1997 年 11 月から 1998 年 12 月の約 2 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 によるカリシウイルスの検索を行った。RT-PCR は MR3/4 を 1st PCR に用い、斎藤らの設定した Yuri 22F/R プライマーを nested PCR に用いた (Yuri 系プライマー)。また、食中毒あるいは食中毒疑い事例の糞便材料については Yuri 系プライマー、NV 系プライマー (35/36 プライマーを 1st PCR、NV81/82, SM82 を nested PCR に用いる) 及び Ando らの SR プライマーを用いた方法を併用した。ハイブリダイゼーションは Ando らのジゴキシゲニン標識プローブを用い、ドットプロットハイブリダイゼーションにより PCR の確認試験とプローブ型別を行った。

C. 研究結果

散発性の急性胃腸炎患者からの電子顕微鏡法及び RT-PCR による病原体の検出状況を表 1 に示した。487 例の糞便から電子顕微鏡法でロタウイルスが 29 例、カリシウイルスが 24 例、アデノウイルス、アストロウイルスがそれぞれ 7 例、6 例検出された。当地域ではカリシウイルスは通常 11 月から 12 月にかけて流行するが、1997/98 年シーズンには 1 月に流行がみられた。同様に通常 1 月 2 月に流行するロタウイルスは

3月から5月にかけて多く検出された。

Yuri系プライマーを用いたPCRでは、カリシウイルスの好発時期を中心に200例実施したが、そのうち49例が陽性であった。電子顕微鏡法と比べ少なくとも2倍以上の検出率を示した。

表2にPCR陽性の49例について行ったドットプロットハイブリダイゼーション法の結果を示した。49例のPCR産物は2例を除きすべていずれかのプローブと特異的に反応した。P2B型はほとんど全期間を通じて検出され主流型型の位置を占めていた。P2A型は1998年1月2月にのみ出現し、P1B型は1998年12月に多くみられた。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、地域におけるカリシウイルスの流行はシーズン毎に流行株が変遷していることが伺われた。P1A型は調査期間を通じて全く検出されず、散発例への関与は低いようであった。

また、プローブと反応せず判定不能とされた2例については塩基配列の解析を行い、新たなプローブを設定する必要があると思われる。

次に集団発生事例において検出されたカリシウイルスのプローブ型別を表3に示した。事例2はウイルス性食中毒が食品衛生法上に認知されて以後、県内で最初のカリシウイルスによる食中毒として認められた事例。原因食品は赤貝とヌタのミソアエであると目されたが、食していない患者もあり、伝播経路として調理中の二次汚染も含まれていると考えられた。この事例ではPCR陽性の6例すべてP1B型であった。事例3は典型的な生カキによる食中毒で、地ガキを酢ガキにして食しており、プローブ型はP2B型とP1B型が混在していた。事例4は寿司が原因食品とされた事例で、プローブ型はP1A型であった。事例1は食中毒事例としては扱われなかったが、後程カキフライが共通食と判明した例で、P1Aと型別不能が5例であった。

D. 考察

カリシウイルスのPCR結果は適当なプローブを用いてハイブリダイゼーションによる確認が必要とされている。今回用いたAndoらのプローブは、サザンプロットハイブリダイゼーションによりカリシウイルス遺伝子の確認と同時に、免疫電子顕微鏡法によって分けられたカリシウ

イルスの抗原性に基づいた4型のプローブ型に分類することができるという優位性を持っている。しかし、サザンプロットでは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、ドットプ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。ドットプ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。今後、さらに迅速性を高めるため、耐熱性アルカリフォスファターゼ標識プローブを応用してみたい。

地域に流行するカリシウイルスには、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。われわれの急性胃腸炎の継続的病原検索の対象が小児であるため、ヒト-ヒト感染で伝播しているカリシウイルスの地域流行の動向をよく把握できていると考えられる。プローブ型別によって地域でのカリシウイルスの流行が、シーズン毎にその主流型型を変えている実態が認められた。

散発例と食中毒事例とのプローブ型の分布の比較は興味深い。散発例では全く検出されなかったP1A型が、食中毒に比較的多く検出されたことは、プローブ型によって流行形態が異なる可能性を示唆させる。また、事例2、事例3の例は、地ガキや地物の二枚貝を使った郷土料理が原因食品で、散発例からほぼ同時期に検出されたP1BやP2B型と同じプローブ型が検出された。このことは、地域の流行と海との間の関係を推測させる。今後、カキやその他の二枚貝からのカリシウイルス遺伝子と散発例のカリシウイルスとの塩基配列解析を行い、両者の関連性を明らかにしたい。

E. 結論

ジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドプローブによるドットプロットハイブリダイゼーション法により、迅速にカリシウイルスのRT-PCRの確認及びプローブ型別が可能であった。

散発例からはP2B、P2A、P1B型が、食中毒事例からはP1A、P1B、P2B型がそれぞれ検出され、由来によりプローブ型の分布が異なっていることが示唆された。