

表4 環境水中(下水処理場)からのNLVs遺伝子の検出

検体採取月	由来	NLVs遺伝子の検出*					Genogroup 型別	
		35/36系		Yuri系		Y系	I	II
		(1st Nest)	(1st Nest)	(1st Nest)	(1st Nest)	(1st)		
1999, 8	未処理下水	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	1/2
	処理下水	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	1/2
1999, 9	未処理下水	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	1/2
	処理下水	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	1/2
1999, 10	未処理下水	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	1/2
	処理下水	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	1/2
1999, 11	未処理下水	0/2	2/2	0/2	2/2	0/2	2/2	2/2
	処理下水	0/2	2/2	0/2	2/2	0/2	2/2	2/2
1999, 12	未処理下水	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	1/2
	処理下水	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	1/2
2000, 1	未処理下水	0/2	2/2	0/2	2/2	0/2	2/2	2/2
	処理下水	0/2	2/2	0/2	2/2	0/2	2/2	2/2
2000, 2	未処理下水	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	1/1	1/1
	処理下水	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	1/1	1/1
計	未処理下水	0/13	5/13 (38.5%)	0/13	9/13 (69.2%)	0/13	5/13 (38.5%)	9/13 (69.2%)
	処理下水	0/13	5/13 (38.5%)	0/13	9/13 (69.2%)	0/13	5/13 (38.5%)	9/13 (69.3%)

\* : 陽性数/供試数

表1 ウイルス性食中毒患者糞便からのNLVs遺伝子の検出

発生年月日	原因食品	検査数	NLVs遺伝子の検出*					Genogroup 型別	
			35/36系		Yuri系		Y系	I	II
			(1st Nest)	(1st Nest)	(1st Nest)	(1st)			
1999, 12, 24	会食料理	11	0/11	2/11	2/11	9/11	4/11	0/11	9/11
2000, 1, 19	会食料理	18	2/18	13/18	0/18	13/18	0/18	13/18	8/13
2000, 2, 17	仕出し弁当	12	7/12	9/12	0/12	10/12	0/12	1/12	11/12
2000, 2, 17	会食料理	8	1/8	3/8	0/8	7/8	0/8	0/8	7/8
2000, 2, 21	会食料理	8	0/8	3/8	0/8	5/8	0/8	0/8	5/8
2000, 2, 25	会食料理	17	0/17	1/17	0/17	2/17	0/17	1/17	9/17
計		74	10/74 (13.5%)	31/74 (41.9%)	2/74 (2.7%)	37/74 (50.0%)	4/74 (5.7%)	15/74 (20.3%)	49/74 (66.2%)

\* : 陽性数/供試数

表2 ウイルス性食中毒事例における原因施設の調理従事者糞便からのNLVs遺伝子の検出

発生年月日	原因食品	検査数	NLVs遺伝子の検出*					Genogroup 型別	
			35/36系		Yuri系		Y系	I	II
			(1st Nest)	(1st Nest)	(1st Nest)	(1st)			
2000, 1, 19	飲食店	4	0/4	3/4	1/4	3/4	1/4	0/4	3/4
2000, 1, 20	飲食店	8	0/8	4/8	0/8	0/8	0/8	0/8	4/8
2000, 2, 17	仕出し弁当	9	1/9	2/9	0/9	2/9	0/9	0/9	2/9
2000, 2, 17	飲食店	1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1
2000, 2, 21	飲食店	1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	1/1
2000, 2, 25	飲食店	2	0/2	1/2	0/2	1/2	0/2	0/2	2/2
計		25	1/25 (4.0%)	10/25 (40.0%)	1/25 (4.0%)	8/25 (32.0%)	1/25 (4.0%)	1/25 (4.0%)	13/25 (52.0%)

\* : 陽性数/供試数

表3 ウイルス性食中毒事例における患者、非発症者および調理従事者糞便中のNLVs遺伝子の検出

糞便の由来	検査数	NLVs遺伝子の検出						
		1	2	7	14	21	28	30
患者	10	0	10	10	10	5	0	0
非発症者	2	0	2	2	1	0	0	0
調理従事者	7	7	0	5	5	1	0	0

平成11年度厚生特別研究事業分担研究報告

ウイルス性食中毒原因の遺伝子検査標準法確立と  
全国行政対応整備に関する研究

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

- 1.1988～2000年に福井県内で発生した急性胃腸炎患者（非細菌性食中毒事例などの集団発生事例あるいは感染症サーベイランスでの散発例）の糞便材料からRT-PCR法によるNLVsの遺伝子検出をこころみた。検出された遺伝子はサザンハイブリダイゼーション法により型別を行い、一部についてはダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。その結果、年度にともなう流行株の変遷がうかがわれた。
- 2.急性胃腸炎患者糞便45検体を対象とした1st PCRの系で、研究班設計の新プライマー(P1/P2・Y1/Y2) および従来プライマー(Yuri22F/Yuri22R'・NV81/NV82/SM82)の検出率を比較したが、今回実施条件では従来プライマーの方が検出率が高かった。
- 3.福井県内の汚水処理場から定期的にサンプリングした汚水から、RT-PCR法でNLVs遺伝子を検出した。2定点のうち1定点ではNLVs陽性率が高く、ウイルスが常時潜んでいる可能性も示唆された。

A. 研究目的

- 1.急性胃腸炎病因ウイルスの1つであるNLVsの福井県内での流行状況を、集団発生および散発発生患者糞便を対象とする遺伝子検出で解析・把握する。
- 2.NLVs検出感度・検出効率の向上をはかるために設計された新プライマーの福井県内流行NLVsに対する検出率をテストする。
- 3.NLVsの水系環境ウイルスとしての生態系を調査する。

B. 研究方法

- 1.集団事例としては1991～2000年に福井県内で発生した急性胃腸炎症状をとともなう、非細菌性集団食中毒事例あるいは集団不明感染症疑い事例15集団の患者糞便76検体を、散発例としては感染症サーベイランス事業における病原体検査依頼検体のうち、1988～1999年に感染性胃腸炎(またはその疑い)で福井県衛生研究所に搬入された患者糞便46検体を対象とした。

表1.福井県の集団急性胃腸炎患者糞便からのNLVs検出状況

発生年月	発生場所の種別	生ガキの喫食	検査件数	RT-PCR法陽性	サザンハイブリダイゼーションによる型別	シーケンスとの対応
1991/03	不明	不明	1	1	P2A(1)	203101
1992/12	飲食店	有	6	3	P2A(1),P2B(1),P2A・P2B mix(1)	
1994/04	小学校	無	7	7	P2A(7)	206206
1994/12	飲食店	有	12	11	P2A(9),P2B(2)	206308
1996/12	飲食店	有	3	3	P2A(2),P2B(1)	208201,03
1997/01	飲食店	有	2	1	P2A(1)	
1997/02	不明	不明	5	2	P2A(2)	
1997/10	施設	無	12	7	P2A(7)	209309
1997/12	飲食店	有	6	3	P2A(3)	
1998/02	飲食店	有	3	1	P2A・P2B mix(1)	
1999/01	飲食店	無	11	8	P2A(2),P2B(4),P2A・P2B mix(2)	
2000/01	施設	無	32	15	P2A(15)	
2000/02	飲食店	有	2	1	P2B(1)	
2000/03	飲食店	無	16	7	P2B(7)	
2000/03	中学校の寮	無	8	6	P2B(6)	212407

患者糞便材料からはTRIZOL-LS(Gibco BRL)でRNAを抽出し、DNase I (ニッポンジーン)処理をほどこしたのち、M-MLV(Gibco BRL)で逆転写してcDNAを得た。PCRは最終的に、Yuri22F/Yuri22R'、またはNV81/NV82/SM82プライマーを用いた。1988～1998年の検体は、random nonamerとoligo d(T)<sub>15</sub>で逆転写を行い、Scouting Setプライマーを用いた1st PCRのあと、前述のプライマーでnested PCRをおこなった(Saitoらの方法に準ずる)。1999年以降の検体は、逆転写プライマーに特異的anti-senseプライマーを用い、1st PCRのみで判断した。PCR産物については、Andoらの方法を基にサザンハイブリダイゼーション法により遺伝子型別をこころみた。型別プローブにはAndoら設定の4種(P1A・P1B・P2A・P2B)に入谷ら設定のSOV・96065dプローブを加えた6種を用いた。塩基配列の決定は、アガロースゲル電気泳動後切り出して精製したPCR産物を直接鋳型として、サイクルシーケンス反応をBig Dye Terminator(PE)を用いて行い、PRIZM377(ABI)で解析した。

2. 1.で検査対象とした急性胃腸炎患者糞便から遺伝子型別結果を参考に偏りがないうランダムに選んだ45検体について、1999年以降の患者糞便検体と同様にRT-PCRを行った。逆転写プライマーとして、従来プライマー用にはNV35'、新プライマー用にはP3を用いた。新プライマーのPCR反応は、94℃3分処理に

続き、94℃1分・55℃1分・72℃1分を35サイクル繰り返し、72℃15分処理、とした。

3. 福井県内のK川浄化センター(合流式污水处理場)の2定点において、9月下旬から月2回または1回汚水をサンプリングした。汚水はPEG沈殿によって100倍濃縮し、proK処理、CTAB処理ののち1999年以降の患者糞便検体と同様にRT-PCR反応を行ったが、outerプライマーにMR3/MR4、innerプライマーにYuri22F/Yuri22R'を用いるnested PCRとした。

### C. 研究結果と考察

1. RT-PCR法によりNLVs陽性となったのは、集団事例では15集団72検体、散発例では31検体であった(表1、表2)。さらにサザンハイブリダイゼーション法により6種の遺伝子型別プローブとの反応をみたところ、集団事例はP2A・P2Bの2種、散発例はP1B・P2A・P2B・96065の4種と反応するグループに分類された。

集団事例では、同一集団からP2A・P2B両方のタイプが検出される事例が5事例あったが、一人の患者糞便から増幅されたPCR産物がP2A・P2B両方に反応する例もあり、複数の種類のNLVsに同時感染していたと推測される。そのうち4事例では生ガキの喫食が確認されており、生ガキに多種類のNLVsが蓄積されていることが示唆された。その他の、同一集団が1種類のみのタイプに分類され

表2. 福井県の散発急性胃腸炎患者糞便からのNLVs検出状況

年	陽性患者数	検査可能検体数	RT-PCR法陽性	サザンハイブリダイゼーションによる型別	シーケンスとの対応
1988	3	3	2	P2A(2)	
1989	1	1	1	P2A(1)	
1990	12	12	9	P2A(6), P1B(2), 96065(1)	202S09,10
1991	15	7	7	P2A(3), P1B(1), 96065(2), P2B(1)	203S01,03,04,05,07
1992	3	0	-	-	
1993	9	7	1	P2A(1)	205S11
1994	3	2	0	-	
1995	11	4	4	P2B(4)	
1996	7	0	-	-	
1997	2	0	-	-	
1998	2	2	0	-	
1999	8	8	7	P2B(3)	211S05,07,08

表3.プライマー系列別検出状況

使用プライマー	Yuri22F/Yuri22R'	NV81/NV82/SM82	P1/P2	Y1/Y2
糞便45検体中陽性数	39	24	18	13
陽性率 (%)	86.7	53.3	40.0	28.9

表4.汚水からのNLVs検出状況

採水日	1999							2000				
	9.16	10.7	10.20	11.4	11.17	12.1	12.15	1.5	1.19	2.2	2.16	3.1
処理場内	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
処理場外	NT	-	NT	-	NT	-	NT	+	NT	+	NT	+

る事例については、2000年1月の事例以前はP2Aばかりであったのに、2000年2月以降はP2Bの事例が続けて起こった。

散発例で検出された株の型別状況は、P2AとP2Bで7割近くに達し、P1B・96065はわずかであった。P2A・P2Bに集中した集団事例と比較すると、散発例では多様な株が流行していることがうかがわれる。採取時期別に見ると、1990/1991年冬季にP1B・96065の検出が集中していること、1988～1993年はP2Aが多いが1995年以降はP2Bが検出されていること、など流行の主流となるタイプの変遷が見られた。

G1に分類されるP1A・SOVタイプは検出されていない。G2に検出率が高く偏りがちといわれるYuri22F/Yuri22R'だけでなく、G1も検出可能なNV81/NV82/SM82を併用しているので、G2の流行そのものが少ないと思われる。

ダイレクトシークエンスにより決定したPCR産物の塩基配列(373bp)を比較した(図1)。全体的に検体採取時期・流行地域の近いものが相同性も高くなっていた。

2.糞便45検体を対象とした、各プライマー使用時のNLVs検出結果は表3のとおりで、検出率の高い順に、Yuri22F/Yuri22R'、NV81/NV82/SM82、P1/P2、Y1/Y2となった。ただし、新プライマーによるPCR産物はエクストラバンドが多かった。反応温度などの条件検討でかなり改善した結果だったが、いっそうの検討が必要かもしれない。

3.広域の汚水が集まる処理場内(月2回)、比較的限られた地域の汚水をいったんまとめる処理場外(月1回)の2定点から採取した汚水においても、NLVsが長期にわたり検出された(表4)。処理場内では、11月の2回と3月上旬をのぞく、9回のサンプリングでNLVsが検出されているし、処理場外でも1月以降の3回がNLVs陽性となった。これまでも汚水にNLVsが存在するだろうとの推測はあったが、実際にその存在が確認された意義は大きい。今後は検出された遺伝子配列を検討し、胃腸炎患者で流行しているタイプとの関連の有無などを調べていく予定である。

#### D. 結論

1.1988～2000年に福井県内で発生した急性胃腸炎患者の糞便から検出されたNLVsは、サザンハイブリダイゼーション法で少なくとも4種類のプローブと反応するタイプに分類され、ダイレクトシークエンス法により解読した検出遺伝子塩基配列の相同性を比較しての分類結果ともよく一致した。また流行には主流となるタイプの変遷があるように思われた。

2.福井県内流行NLVsの検出では、新プライマーP1/P2・Y1/Y2より、従来のプライマーYuri22F/Yuri22R'・NV81/NV82/SM82の方が検出率が高かった。

3.福井県内の汚水処理場でサンプリングした汚水から、nested PCR法により、高率にNLVsを検出した。

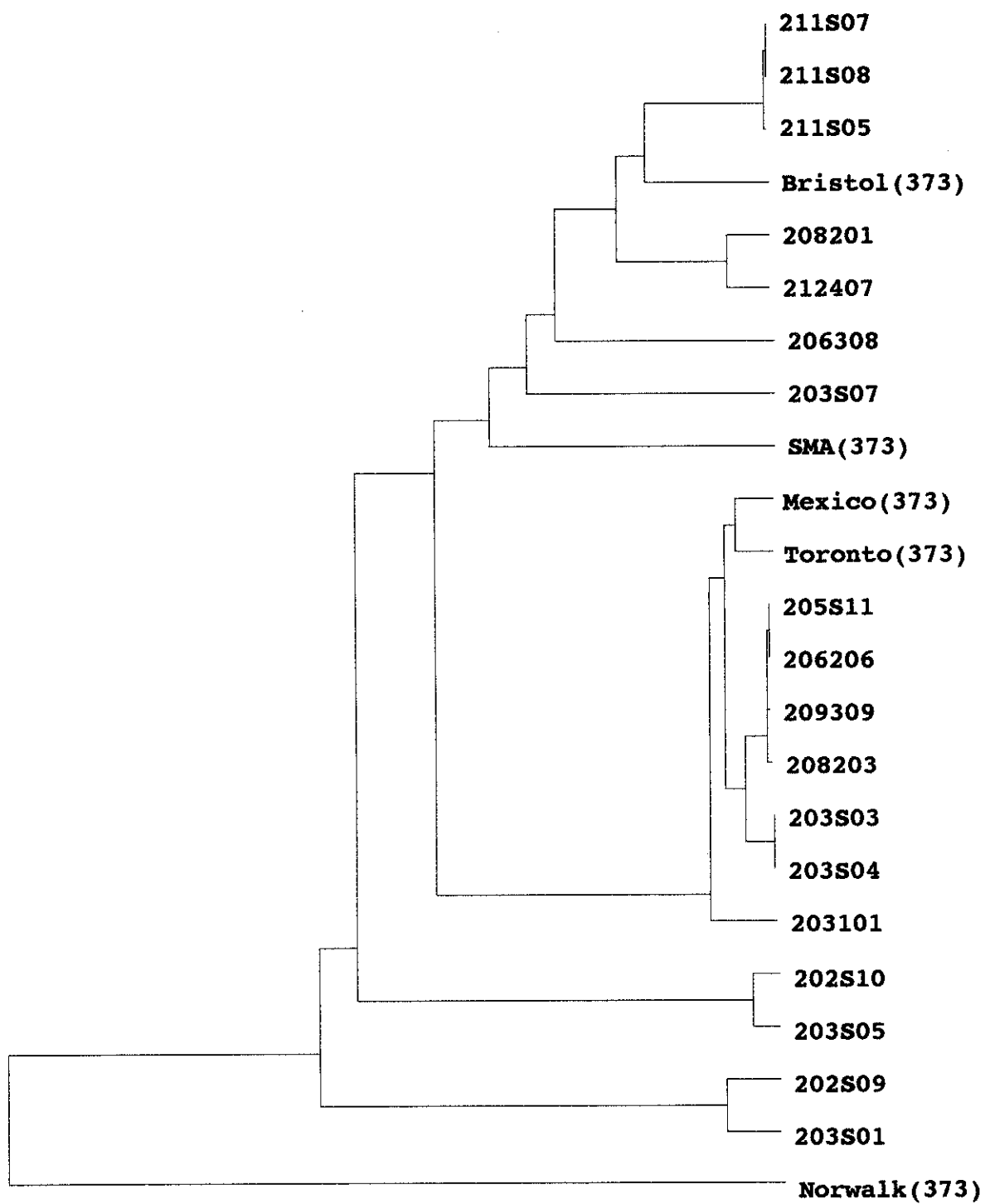


図1.RNAポリメラーゼ領域373bpの塩基配列比較に基づく系統樹

## 平成11年度厚生科学特別研究事業分担研究報告

### ウイルス性食中毒原因の遺伝子検査標準法確立と全国行政対応整備に関する研究 - 大阪府下における急性胃腸炎患者および水系環境からの NLVsの検出ならびにプライマーの比較検討 -

分担研究者 山崎謙治 (大阪府立公衆衛生研究所)  
協力研究者 左近直美、依田知子 (大阪府立公衆衛生研究所)  
主任研究者 川本尋義 (岐阜県生物産業技術研究所)

**研究概要** 1999年度の研究事業として、集団食中毒事例、小児の急性胃腸炎散発事例および水系環境を材料として、従来法のプライマーおよび統一プライマーを用いたRT-PCR法によりNLVsの検出を行った。

#### 【目的】

1998年度の当研究班で集計された177株のNorwalk-like viruses (NLVs)の塩基配列の解析から、国内で流行しているNLVsの遺伝子型は多様であり、それはGIおよびGII (2A,2B,2C,2D,2E)のサブグループに区別され、また日本に特有であると思われるNLVsの存在も明らかになってきた。そのためこれまで用いてきたNLVs検出用プライマーでは捕捉されない株が存在することも考えられることから、研究班では国内流行株の解析に基づく3セットの新しいプライマーを設計した。本年度はこれらのプライマーを用いて急性胃腸炎患者からNLVsの検出を行ない、従来との比較検討を行うことを目的とした。またNLVsの制御という観点から環境中のNLVsの挙動についても調査を行った。

#### 【材料および方法】

**NLVs検出材料** 1999年度に大阪府下で発生した非細菌性食中毒事例から得た患者糞便185検体および小児の急性胃腸炎散発事例の患者糞便197検体を用いた。また水系環境材料として大阪府枚方市の淀川において、本流河川水および下水二次処理放流水29検体を採取

して用いた。参考材料として同所においてタンポン法 (25gの脱脂綿を河川に一夜浸せき後、採水する) で採取した材料を用いた。

**RT-PCR** RT-PCRは1998年度当報告書に記載した方法で行った。すなわち10%糞便乳剤または河川水の250ulからISOGEN-LSでRNAを抽出した後、逆転写は42℃で30分行ない、プライマーNV81-NV (SM) 82およびY1/Y2は94℃ 1分、45℃ 1分20秒、72℃ 1分を40サイクル、またプライマーYURI22R/22F, P1/P2およびP1/P3は94℃ 30秒、51℃ 1分、72℃ 1分を35サイクル行うSingle stepのPCRでNLVsの検出を行った。河川水のみPCR陽性と思われる検体についてY1/Y2プライマーを用いたnested PCRでバンドの確認を行った。検出されたNLVsについてはPCR産物の塩基配列を調べ、系統樹の解析からgenogroupを決定した。

#### 【結果および考察】

**NLVsの検出状況** 1999年度の大阪府下における非細菌性の食中毒事例は表1のように35事例発生し、うち25事例からNLVsが検出された。特徴的であったのは5月から8月の間に発生した4事例すべてからNLVsが検出されたことであり、

またこれらを含め保育園、小学校などにおける集団発生4事例は5月から11月の間に集中していた。これら冬季以外の発生例の感染経路の特定は困難であった。第2の特徴として冬季に特養老人ホームで3事例の集団発生が認められ、いずれもNLVsが検出されたが、発生状況からみて糞便を介した二次感染によって患者が拡大したと考えられた。検出されたNLVsのgenogroupはG I からG2A,B,Eまで多彩であった。5月に発生したG2E (YURI 型)による事例は大阪府では初の事例であった。また1月に検出されたG IのNLVsはSouthampton virusとアミノ酸配列の相同性が95.5%であった。散发事例からは表2の様に47株のNLVsが検出され、12月をピークとした初冬流行型のパターンが認められた。そのうち塩基配列が明らかになった20株すべてがG2B (Snow mountain virus型)であり、集団事例とは明らかに流行の型が異なっており、これは地域における流行株と食材等を介して持ち込まれるNLVsとの相違によるものと考えられる。河川水における調査では本流水からは検出されず、下水二次処理水から5株のNLVs (3株はG2B) が検出された (表3)。検出されたのは1~2月であり、散发事例のピークより少し遅れていた。

NLVs検出用プライマーの比較 表4に5種類のプライマーを用いて行った食中毒事例全検体からのNLVs検出成績およびそのgenogroupを示した。35事例のうちG2Bが8事例と最も多く、次いでG2A (Mexico virus型) の4事例であった。その他G I, G2EおよびG2A・B混合型が各1事例ずつ認められた。表5にプライマー別の検出成績を示したが、5セットのプライマーのうちいずれかでNLVsが陽性になったのは25事例であった。すべてのプライマーで陽性となったのは12事例であり、これにはG I, G2A, G2B, G2Eが含まれた。

プライマー間で一致しなかったのが12事例あり、これは複数回テストを行っても同様の結果であったことから、サブグループG2BのNLVsの遺伝的多様性を反映しているものと考えられた。単一セットではY1/Y2を除いて陽性事例が19~21とほぼ同等の成績であった。G Iの検出において今回の流行株(S99140)は5セットすべてで陽性となったが、予備的に行った実験ではNV型の株(KY89)はP1/P2,およびYURI22では増幅されず、NV81-NV(SM)82が混合プライマーであることを考慮すればP1/P3がややすぐれているといえるであろう。従来のプライマー(NV81-82, YURI22)および新プライマー(P1/P2, P1/P3, Y1/Y2)のグループ間を検討すれば、いずれのグループでも検出されたのが21事例あったが、従来プライマーグループのみ、または新プライマーグループのみで検出されたのが各々2事例ずつあった(表5 塗りつぶし)ことから、今回の成績のみで使用すべきプライマーを選択することは困難であった。結論として、いま少しの期間多くの事例についてプライマーを併用しつつ検討を加えることが必要であると考えられた。

#### 【研究発表】

##### 誌上発表

大石 功; カリシウイルス胃腸炎の疫学—特にNorwalk-like viruses (NLVs) 胃腸炎について、臨床とウイルス、27, 114-126 (1999)

依田知子、寺野由剛、島田 彰、鈴木定彦、山崎謙治、左近直美、大石 功、宇田川悦子、奥野良信、柴田忠良; Expression of Recombinant Norwalk-Like Virus Capsid Proteins Using a Bacterial System, and the Development of its Immunological Detection. Journal of Medical Virology, 60, 475-481 (2000)



左近直美、山崎謙治、宇田川悦子、奥野良信、大石功；Genomic characterization of human astrovirus type 6 Katano virus and the establishment of a rapid and effective reverse transcription-polymerase chain reaction to detect all serotypes of human astrovirus. *Journal of Medical Virology* (in press)

山崎謙治、大山 徹、宇田川悦子、川本尋義；1989年～1998年に日本国内で検出されたNorwalk-like viruses (NLVs)の遺伝的特徴および統一プライマーの検討、*感染症学雑誌*、74 (5) (2000) に掲載予定

#### 学会発表

左近直美、山崎謙治、大瀬戸光明、勢戸祥介、宇田川悦子、奥野良信、大石功；Genotypic distributions of Norwalk-like viruses (NLVs) in Japan, 1982-1998  
International Workshop on Human Caliciviruses, Atlanta (USA), 1999

依田知子、山崎謙治、左近直美、奥野良信、柴田忠良；カキからのNLVs (SRSV)の検出、第20回 衛生微生物協議会、名古屋、1999

依田知子、寺野由剛、鈴木定彦、山崎謙治、左近直美、大石 功、宇田

川悦子、奥野良信、柴田忠良；Development of Norwalk-like virus immunological detection using recombinant capsid proteins expressed in a bacterial system. 第11回国際ウイルス学会、Sydney (Australia), 1999

大石功、山崎謙治、左近直美、奥野良信、宇田川悦子、勢戸祥介、大瀬戸光明；1982年より本邦で検出したNLVsの遺伝子タイプの分布、第47回日本ウイルス学会学術集会、横浜、1999

山崎謙治、大山 徹、川本尋義、勢戸祥介、池田義文、大瀬戸光明、斎藤博之、宇田川悦子；最近10年間(1989～1998年)に日本国内で検出されたNLVsの遺伝的特性とその疫学的背景、第47回日本ウイルス学会、横浜、1999

依田知子、寺野由剛、鈴木定彦、島田 彰、中島理晴、山崎謙治、左近直美、大石 功、宇田川悦子、奥野良信、柴田忠良；Development of Norwalk-like virus immunological detection using recombinant capsid proteins expressed in a bacterial system. 第2回アジア・オセアニア免疫アレルギー学会、Bangkok (Thailand), 2000

表1 1999年度大阪府下におけるウイルス性食中毒発生状況

No.	発生日	発生状況	患者数	NLVs*	Genotype
1	1999.5.20	小学校学童保育	30	+	G2E
2	1999.5.24	社会福祉施設	26	+	G2B
3	1999.6.28	企業研修生	17	+	G2A
4	1999.8.30	夏祭り屋台		+	G2B
5	1999.9.28	飲食店、生カキ		-	
6	1999.10.22	保育園	30	-	
7	1999.11.12	小学校	21	+	G2B
8	1999.11.23	焼き肉屋	7	+	G2A
9	1999.11.26	ステーキ	2	+	G2B
10	1999.11.26	自宅、カキ鍋	3	+	G2A
11	1999.12.1	自宅、カキフライ	3	+	
12	1999.12.9	ホテル客	51	-	
13	1999.12.14	スペイン料理	2	-	
14	1999.12.15	寿司店、魚	16	+	
15	1999.12.16	飲食店、ちゃんこ鍋	9	+	G2B
16	1999.12.29	特別養護老人ホーム	10	+	G2B
17	2000.1.7	韓国旅行		-	
18	2000.1.8	特別養護老人ホーム		+	G2B
19	2000.1.13	旅館宿泊客	13	+	G2A, B
20	2000.1.14	焼きとうもろこし	1	-	
21	2000.1.14	自宅、焼き肉	1	-	
22	2000.1.17	旅館宿泊客	1	+	
23	2000.1.17	旅館宿泊客	15	+	
24	2000.1.18	旅館宿泊客	1	+	
25	2000.1.18	コンビニ弁当	1	+	G2A
26	2000.1.24	特別養護老人ホーム	30	+	G2B
27	2000.1.25	寿司店、生カキ	3	+	G1
28	2000.1.27	旅館宿泊客、カキ		+	
29	2000.1.27	自宅、カキ	2	+	
30	2000.2.3	ホテル、ホタテ貝		+	
31	2000.3.7	生カキ	3	-	
32	2000.3.17	ミネラルウォーター		-	
33	2000.3.21	自宅、生カキ		+	
34	2000.3.22	合宿所	13	+	
35	2000.3.23	ハンバーガー店		-	

\*; NV81-82およびYURI22による成績

表3 環境からのウイルス検出成績

Date	Sample	Primer pair			Date	Sample	Primer pair		
		P1/P2	P1/P3	Y1/Y2			P1/P2	P1/P3	Y1/Y2
1999.6.22	U	-	-	-	1999.12.7	U	-	-	-
	UT	-	-	-		D	-	-	-
1999.7.14	U	-	-	-		DT	-	-	-
	UT	-	-	-	1999.12.21	U	-	-	-
1999.7.27	U	-	-	-		D	-	-	-
	UT	-	-	-		DT	-	-	-
1999.8.3	U	-	-	-	2000.1.14	U	-	-	-
	UT	-	-	-		D	-	+	-
1999.8.26	U	-	-	-		DT	-	+	-
	UT	-	-	-	2000.1.21	U	-	-	-
1999.9.7	U	-	-	-		D	-	-	-
	UT	-	-	-		DT	-	+	-
1999.9.21	U	-	-	-	2000.2.8	U	-	-	-
	UT	-	-	-		D	-	-	-
1999.10.1	U	-	-	-		DT	-	-	-
	D	-	-	-	2000.2.22	U	-	-	-
	DT	-	-	-		D	-	+	-
1999.10.21	U	-	-	-		DT	-	+	-
	D	-	-	-	2000.3.8	U	-	-	-
	DT	-	-	-		D	-	-	-
1999.11.2	U	-	-	-		DT	-	-	-
	D	-	-	-	1999.11.17	U	-	-	-
	DT	-	-	-		D	-	-	-
DT	-	-	-	DT		-	-	-	

U; 河川水 D; 下水二次処理水  
 UT; 河川水、タンポン法による採水  
 DT; 下水二次処理水、タンポン法による採水

表4 1999年食中毒事例からのNLVs検出-プライマーの比較-

No.	81-82	YURI	P1/P2	P1/P3	Y1/Y2	type	No.	81-82	YURI	P1/P2	P1/P3	Y1/Y2	type
1	-	+	+	+	-	G2E	40	-	-	-	-	-	G2A
2	-	+	+	+	-		41	+	+	+	+	+	
3	+	+	+	+	+	G2E	42	+	+	+	-	+	G2A
4	-	+	+	+	+		43	+	+	+	+	+	
5	-	+	+	+	-	G2E	44	+	+	+	+	+	G2A
6	-	+	+	+	+		45	+	+	-	-	-	
7	+	+	+	+	-	G2E	46	+	+	+	+	+	G2A
8	+	+	+	+	-		47	+	+	+	+	+	
9	+	+	+	+	-	G2E	48	-	-	-	-	-	G2A
10	-	-	+	+	-		49	-	+	+	+	+	
11	-	-	-	-	-	G2E	50	-	-	-	-	-	G2A
12	+	+	-	-	+		51	+	-	+	+	+	
13	-	-	+	+	-	G2E	52	-	-	-	-	-	G2B
14	+	+	+	+	+		53	+	-	+	+	+	
15	-	+	+	+	+	G2E	54	-	-	-	-	-	G2A
16	-	-	-	-	-		55	-	-	-	-	-	
17	-	-	-	-	-	G2B	56	-	-	-	-	-	G2A
18	-	-	-	-	-		57	-	-	-	-	-	
19	-	-	-	-	-	G2B	58	-	-	-	-	-	G2A
20	+	+	+	+	+		59	-	-	-	-	-	
21	-	+	+	-	-	G2B	60	-	-	-	-	-	G2A
22	-	-	-	-	-		61	-	-	-	-	-	
23	-	-	-	-	-	G2B	62	-	-	+	-	-	G2A
24	-	-	-	-	-		63	+	+	+	+	+	
25	+	+	+	+	+	G2B	64	+	+	+	+	+	G2A
26	+	+	+	+	+		65	-	-	-	-	-	
27	+	+	+	+	+	G2B	66	+	+	+	+	+	G2A
28	-	-	-	-	-		67	-	-	-	-	-	
29	-	-	-	-	-	G2B	68	-	+	-	-	-	G2A
30	-	-	-	-	-		69	+	+	+	+	+	
31	-	+	+	+	+	G2B	70	+	+	+	+	+	G2A
32	-	-	-	-	-		71	+	+	+	+	+	
33	+	+	+	+	+	G2A	72	+	+	+	+	+	G2A
34	+	+	+	+	+		73	+	+	-	+	-	
35	+	+	+	+	-	G2A	74	+	+	+	+	+	G2A
36	+	+	+	+	+		75	-	+	+	+	-	
37	+	+	+	+	+	G2A	76	+	+	+	+	+	G2A
38	+	+	+	+	+		77	-	-	-	-	-	
39	-	-	-	-	-	G2A	78	-	-	-	-	-	G2A

表4 続き

No.	81-82	YURI	P1/P2	P1/P3	Y1/Y2	type	No.	81-82	YURI	P1/P2	P1/P3	Y1/Y2	type
79	+	-	+	+	-		119	+	-	+	+	+	
80	+	+	+	+	+		120	+	-	+	+	+	
81	-	-	-	+	-		121	+	-	+	+	+	
82	+	+	+	+	+		122	+	-	+	+	-	
83	+	+	+	+	+	G2B	123	+	-	+	+	-	
84	-	-	-	-	-		124	+	-	+	+	+	
85	+	+	+	+	+	G2B	125	-	-	-	-	-	
86	-	-	-	-	-		126	-	-	-	-	-	
87	+	+	+	+	+	G2B	127	+	-	+	+	-	
88	+	+	+	+	+	G2B	128	+	-	+	+	+	
89	-	-	-	-	-		129	+	-	+	+	+	
90	-	+	+	+	+	G2B	130	-	-	-	-	-	
91	-	-	-	-	-		131	-	-	-	-	-	
92	-	-	-	-	-		132	-	-	-	-	-	
93	-	-	-	-	-		133	-	-	-	-	-	
94	-	-	-	-	-		134	+	-	-	+	+	
95	-	-	-	-	-		135	-	-	-	-	-	
96	-	-	+	+	+		136	-	-	-	-	-	
97	-	-	-	-	-		137	-	-	-	-	-	
98	-	+	+	+	+	G2B	138	-	-	+	-	-	
99	-	-	-	-	-		139	-	-	-	-	-	
100	-	+	+	+	-	G2A	140	+	+	+	+	+	G1
101	+	+	+	+	-	G2B	141	-	+	+	+	-	
102	-	-	-	-	-		142	-	-	-	-	-	
103	-	-	-	-	-		143	-	-	ND	ND	ND	
104	-	+	-	-	-		144	-	-	ND	ND	ND	
105	+	+	+	+	+		145	-	-	ND	ND	ND	
106	+	-	-	+	-		146	-	-	ND	ND	ND	
107	+	+	-	-	-	G2A	147	-	-	ND	ND	ND	
108	+	+	+	+	-		148	-	-	ND	ND	ND	
109	+	+	+	+	+		149	-	-	ND	ND	ND	
110	+	+	+	+	+	G2B	150	-	-	ND	ND	ND	
111	+	-	+	+	+	G2B	151	-	-	ND	ND	ND	
112	-	-	-	-	-		152	-	-	ND	ND	ND	
113	-	-	-	-	-		153	+	+	+	-	-	
114	+	-	+	+	+		154	+	+	+	+	-	
115	+	-	+	+	+		155	+	+	-	-	+	
116	+	-	+	+	+		156	-	-	-	+	-	
117	+	-	+	+	+		157	-	-	-	+	-	
118	+	-	+	+	+		158	-	-	-	+	-	

表2 散発例からのNLVsの検出

月	NLVs+	検体数
1999.3	1	3
4	0	9
5	0	11
6	0	11
7	2	12
8	0	9
9	1	7
10	0	7
11	6	20
12	27	50
2000.1	9	29
2	1	29
3	0	22

NV81-82, YURI22による成績

表5 プライマーの比較成績

	Primer pair					事例数	Type
	81-82	YURI	P1/P2	P1/P3	Y1/Y2		
	+	+	+	+	+	12	G1, G2A,B,E
	+	+	+	+	-	2	G2B
	+	-	+	+	+	1	G2B
	-	+	+	+	+	1	G2B
	+	+	+	-	-	1	
	+	+	-	+	-	1	G2B
	+	-	+	+	-	1	
	+	+	-	-	+	1	
	+	+	-	-	-	1	G2A
	+	-	-	+	-	1	
	-	+	-	-	-	1	
	-	-	+	-	-	1	
	-	-	-	+	-	1	
	-	-	-	-	-	6	
陽性事例数	21	20	19	20	15	25/31	
陽性検体数	69	65	81	83	61	94/148	

## 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

### 研究要旨

1998年4月～1999年3月に大阪市内で発生した非細菌性集団胃腸炎事件患者材料からRT-PCR法によるNLVの検出を行い、検出されたNLVについて分子疫学的解析を行なった。

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 (Norwalk-like virus: NLV) は非細菌性集団胃腸炎の主要な病原因子である。我々はRT-PCRを用いたNLVの検査法の改良を行い、非細菌性集団胃腸炎の病原検索に応用してきた。昨年度に引き続き、NLV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集団胃腸炎事件についてNLVの検出を行い、検出したNLVについてプローブ型別および遺伝子解析を行った。

### B. 研究方法

1998年4月～1999年3月に大阪市内で発生した非細菌性集団胃腸炎事件15事例から採取した患者糞便材料55検体を用いてNLVの検出を行なった。NLV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ブ型別を行なった。

NLV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NLV遺伝子の塩基配列を決定した。

### C. 研究結果

非細菌性集団胃腸炎15事例中8事例(67.3%)、37検体(53.3%)からNLV

が検出された。NLVが検出されなかった事例の中で他のウイルスが検出された事例はなかった。また1事例についてはG1, G2 primer setsを用いたRT-PCRでは検出されず、SR33/SM82のPrimer pairを用いたRT-PCRでNLVを検出することができた。

NLVが検出された集団胃腸炎事件は11月から3月であり、1月に最も多く検出された。しかし平成10年度に発生した非細菌性集団胃腸炎事件は過去2年間と比較して少なかった。検出されたNLVのプローブ型はP1A型が1事例、P1B型が4事例、P2B型が1事例、複数のプローブ型が混在していた事例が2事例であった。複数のプローブ型が混在していた2事例にはすべてP1B型のNLVが含まれており、平成10年度には6事例(75.0%)からNLVが検出された。

さらに8事例から検出された10株のNLV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2種類、P1B型は3種類、P2A型は1種類、P2B型は1種類であった。

### D. 考察

大阪市内では平成8年度はP2-B型、9年度はP2-A型のNLVが主流であったが、10年度はP1-B型のNLVが主流となり、主流となるNLVのプローブ型が年によって変化

していることが示唆された。また検出したNLVの遺伝子解析から、P1-B型のNLV 5株の中で4株の遺伝子は非常に近縁であり、10年度は遺伝子が近縁であるP1-B型のNLVが流行していたことが明らかとなった。平成8年度から行ってきた集団事例における3年間のNLV流行の監視から主流となるNLVが存在すること、また同時に少数であるが多種類のNLVが流行していることが示された。

我々がRT-PCR法によるNLVの検出を実施してから、今回初めてG1, G2 primer setsで検出できないNLVが出現した。本NLV株の遺伝子解析からPrimer SR46のアニーリング領域で5個所の塩基の違いが認められた。NLV遺伝子は多様であるため、NLVの検査には複数のPrimerを用いたRT-PCR法やEM法の併用が必要であると考えられた。

## E. 結論

1996年4月からの大阪市における集団事例から検出したNLVの分子疫学的解析より、NLVのプロープ型が3年間で毎年変化したことが明らかになった。このようなNLVの流行の変化を捉えることができたNLVのプロープ型別法は、簡便な疫学的解析法として有用であると考えられた。さらにNLVの流行実態を正確に把握するためには今後の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)

入谷展弘 他、第40回日本臨床ウイルス学会1999 (大阪)

Seto Y. et al, International workshop on human Caliciviruses, Atlanta USA (1999. 3.29-31)

入谷展弘 他、第47回日本ウイルス学会、1999 (横浜)



## 2- Nucleotide sequence alignment of the 295 bp polymerase region of the P1B strains

LD/sr33-sm82	C..TC.G... ..T..A..A. .A.....GGC .G.GT.AG.A ..A..CC.A.	50
SR46	-----	
98248	C..CA.A... ..T..C..A. .G.....ATG .A.CT.AT.T ..T..CA.G.	50
99288	T..TA.A... ..T..A..C. .G.....GAG .A.TC.TT.T ..C..TA.G.	50
99293	T..TA.A... ..T..A..C. .G.....GAG .A.TC.TT.T ..C..TA.G.	50
00019	T..TA.A... ..T..A..C. .G.....GAG .A.TC.TT.T ..C..TA.G.	50
00028	C..TA.A... ..T..A..C. .G.....GAG .A.TC.TT.T ..C..TA.G.	50
00018	C..TA.G... ..C..A..T. .A.....AAG .A.CT.GT.C ..C..CA.G.	50
Consensus	YTCYMGRTGG GAYTCMACHC ARCAAAGRDS CRTBYTDKCH GCHGCYMRG	50

LD/sr33-sm82	.AA.C..... TAAA.....C C.A..A..GC .T.....C.. GA.A..T..A	100
SR46	-----	
98248	.AG.T..... AAAG.....A G.T..G..GG .A.....A.. AG.G..T..T	100
99288	.GG.G..... GCGG.....T G.T..A..AG .A.....G.. AG.G..C..A	100
99293	.GG.G..... GCGG.....T G.T..A..AG .A.....G.. AG.G..C..A	100
00019	.GG.G..... GCGG.....T G.T..A..AG .A.....G.. AG.G..C..A	100
00028	.GG.G..... GCGG.....C G.T..A..AG .A.....A.. AG.G..C..A	100
00018	.AG.G..... GCGG.....T G.G..A..AG .A.....A.. AG.A..T..A	100
Consensus	ARRTBATGGT DMRRTTCTCH SCDGARCCRS AWTGGCVCA RRTRGTGVCW	100

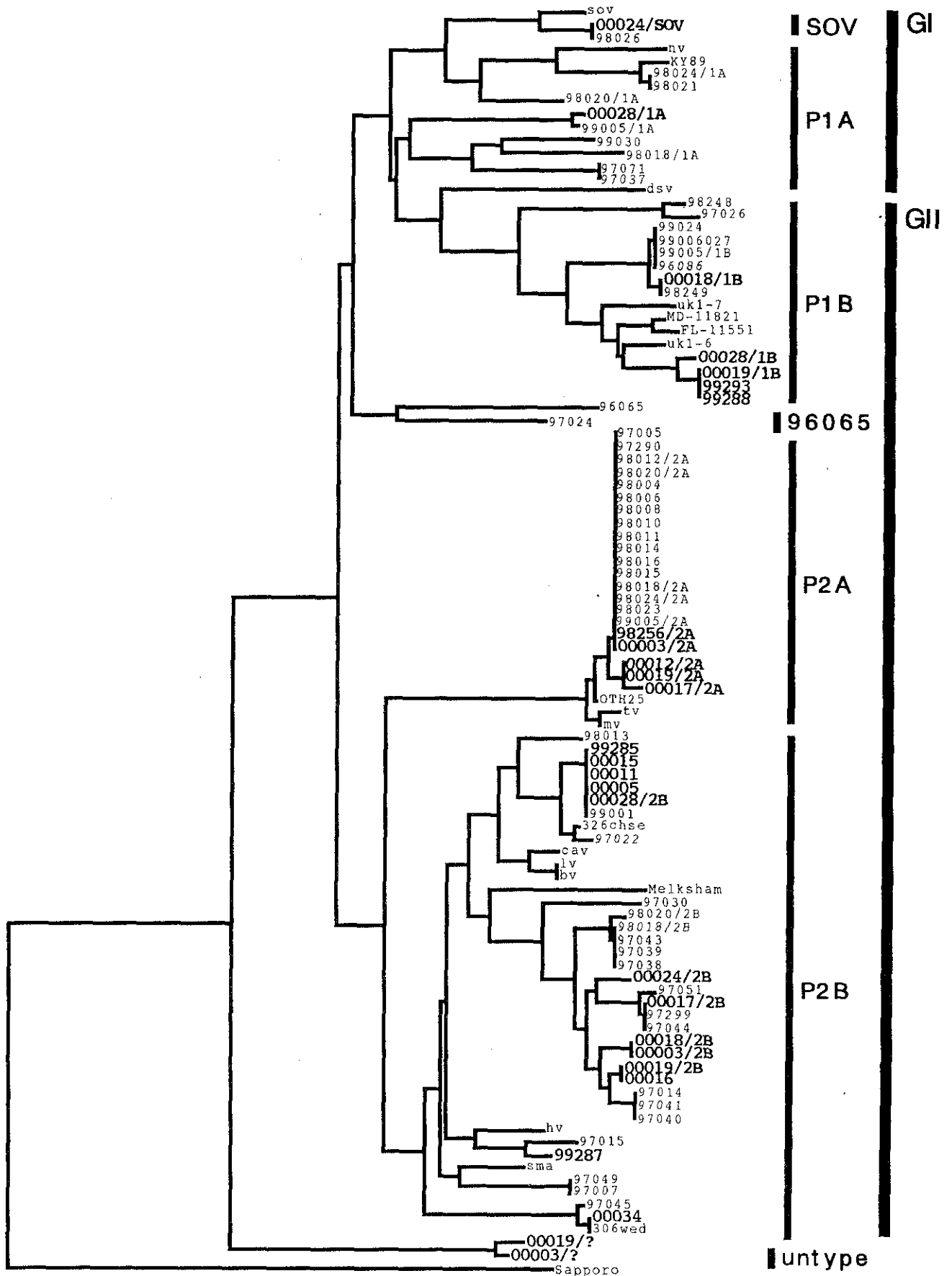
LD/sr33-sm82	G.A...C.TC .AT.T..T.. TGTGA.G..T ..G..T..C. .CAAAA.A..	150
SR46	-----	
98248	G.A...T.AC .CG.C..G.. CCAAC.C..C ..G..C..T. .TGTGG.G..	150
99288	G.G...C.TT .GG.A..T.. CCAGC.A..T ..T..C..T. .TGTCA.C..	150
99293	G.G...C.TT .GG.A..T.. CCAGC.A..T ..T..C..T. .TGTCA.C..	150
00019	A.G...C.TT .GG.A..T.. CCAGC.A..T ..T..C..T. .TGTCA.C..	150
00028	G.G...C.TT .GG.A..T.. CCAGC.A..T ..T..C..T. .TGTCA.C..	150
00018	G.G...C.CT .GG.A..C.. CCAGC.G..C ..T..C..C. .TGTCA.C..	150
Consensus	RARGACYTHY TVKCHCCBAG YSWRMTVGAY GTRGGYGAYT TYRWVWTVTC	150

LD/sr33-sm82	.A.CA.T..G ..C.TT..C. .T..T..G.. C..C..C..T ..A.....T	200
SR46	-----	7
98248	.G.CC.A..A ..C.TC..T. .A..T..C.. A..T..C..C ..G.....C	200
99288	.G.TC.G..G ..T.TG..A. .A..A..C.. A..T..A..A ..A.....T	200
99293	.G.TC.G..G ..T.TG..A. .A..A..C.. A..T..A..A ..A.....T	200
00019	.G.TC.G..G ..T.TG..A. .A..A..C.. A..T..A..A ..A.....T	200
00028	.G.TC.G..G ..T.TG..A. .A..A..C.. A..T..A..A ..A.....T	200
00018	.G.TC.G..A ..C.TG..A. .A..A..C.. A..T..G..A ..A.....T	200
Consensus	ARTYMADGAR GGYCWBCCHT CWGGWGTSCC MTGYACVTCH CARTEGGAYT	200

LD/sr33-sm82	C..C..C..C ..C.CC.C ..TC.CT.T. ..C.CT.T.. ..TA.AAAC	250
SR46	-----	21
98248	T..A..A..T ..A.CA.T ..CC.TA.T. ..A.GG.A.. ..CT.TGGT	250
99288	A..A..A..C ..A.TC.A ..TC.GA.C. ..A.GG.A.. ..AT.AGGT	250
99293	A..A..A..C ..A.TC.A ..TC.GA.C. ..A.GG.A.. ..AT.AGGT	250
00019	A..A..A..C ..A.TC.A ..TC.GA.C. ..A.GG.A.. ..AT.AGGT	250
00028	A..A..A..T ..A.TC.A ..TC.GA.C. ..A.GG.A.. ..AT.AGGT	250
00018	A..A..C..C ..A.CT.G ..CT.GA.T. ..A.GG.A.. ..GT.AGGC	250
Consensus	CHATMGCMCA YTGGMTYHTN ACYYTBWGYG CAMTSKCWGA AGTNWCWRRY	250

LD/sr33-sm82	..G..C..T. .CA.CA.A.. G..TA.T..C CTC..T..C. .C..T	295
SR46	-----	21
98248	..C..C..A. .TG.GA.C.. A..CC.C..A TGT..C..T. .T..C	295
99288	..C..A..A. .TG.TG.T.. A..CC.C..C TGT..T..A. .T..T	295
99293	..C..A..A. .TG.TG.T.. A..CC.C..C TGT..T..A. .T..T	295
00019	..C..A..A. .TG.TG.T.. A..CC.C..C TGT..T..A. .T..T	295
00028	..T..A..A. .TG.TG.T.. A..CC.C..C TGC..T..A. .T..T	295
00018	..C..G..A. .TG.TG.G.. A..CC.T..C TGT..C..T. .C..T	295
Consensus	CTBTCVCCWG AYRTBRTNCA RGCYMAITCM YKYTTYTCHT TYTAY	295

**Phylogram of NLV strains based on 81 bp of RNA polymerase region constructed by Neighbor-Joining method**



## 厚生科学研究費補助金（特別研究事業）分担研究報告書

### ウイルス性食中毒原因の遺伝子検査標準法確立と全国行政対応整備に関する研究

主任研究者 川本尋義（岐阜県生物産業技術研究所）

－広島市におけるNLV感染症の分子疫学的研究－

分担研究者 池田義文（広島市衛生研究所生物科学部）

協力研究者 阿部勝彦（広島市衛生研究所生物科学部）

#### 研究要旨

1992年12月から1999年12月までに広島市内で検出された86株のNLVの塩基配列を決定し、ポリメラーゼ領域285bpの系統樹解析をした。その結果、15のクラスターに区分され、その多くはGⅡに属する株であった。年により流行するクラスターは変化しており、1998年～1999年にはこれまで検出されなかった新たなクラスターが4種類検出された。

#### A. 研究目的

広島市内で発生した有症苦情、食中毒等のウイルス性胃腸炎集団発生例および感染症発生動向調査事業の感染性胃腸炎散发事例について、ノーウォーク様ウイルス(NLV)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NLV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。また、当研究班設定のP/Y系プライマーの検出効率についても検討した。

#### B. 研究方法

1992年12月から1999年12月までに発生した有症苦情を含む食中毒様胃腸炎集団発生(集発)36事例および感染症発生動向調査の胃腸炎患者24例を対象にした。

なお、1995年以前の事例はEMで陽性と確認された保存検体を用いた。

検査の前処理は前回と同様に図1に示した方法で行なった。かきは中腸腺10個程度(10g)をプールし1検体とした。検査は逆転写遺伝子増幅法(RT-PCR)で行い、糞便は電子顕微鏡法(EM)を併用した。RNAの抽出はSV Total RNA Isolation system(Promega)、

RT-PCRにはReady-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech)の各キットを用いた。2nd PCRについて、緊急を要する場合もしくはシーケンス前に増幅産物を再度増やすときにはKOD Dash(Toyobo)を用い、その他の条件は前回と同様に行った。RT-PCRの試薬組成の1例と反応条件を図2および図3に示した。プライマーはNV35'/36[1st]: NV81/82/SM82[2nd](81/82系)およびMR3/4[1st]:Yuri22F/R[2nd](YuriF/R系)を使用した。

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、系統樹解析を行った。

本研究班の設定したP/Y系プライマーの検出効率の検討には、既に塩基配列が判明している株のRNA抽出物を用いて行った。

#### C. 研究結果および考察

1992年12月から1999年12月までの期間に、合計86株の塩基配列が決定された。表1に疫学事項、発病日または検体採取日、EMの結果および遺伝子型を示した。なお、感染症発生動向調査のうち家族内、施設内で他に患者発

生のみられた事例は集発とした。その結果、発生施設別では飲食店18、家族内10、小学校4の順に多く、高校、保育園、事業所、および福祉施設各1、その他4であった。

参照株15株を加えてポリメラーゼ領域285bpの遺伝子系統樹解析を行い、86株はA～0の15クラスターに分けられた(図4)。なお、系統樹では検体採取の最も早い株で示し、同じ配列の株は省略した。各クラスター別の検出状況を、集発は一事例を一カウントとして年ごとに表中にプロットした(図4)。

1992～1995年のEM陽性保存検体では、年により検出されるタイプは異なり、種類も少数であった。法改正に伴い、検査数の増加した1997年以降は種類、株数とも増加し、特に食品媒介感染の疑われた事例ではDタイプが多数検出され、現在も検出されている。1999年には更に新たなタイプも検出され、ヒト-ヒト感染の疑われる事例が多発した。今後の動向に注目する必要がある。感染経路別に分けて検討したが、検出株数に比べてNLV系統樹のばらつきは大きく、また、同じ配列の株が検出される事例も少ないことから、有為な傾

向は認められなかった。しかし、CAV、BV、LVの属するCタイプは散発、TV、MVの属するDタイプは食品媒介感染の疑われる事例から多く検出された。

本研究班の設定したP/Y系プライマーと既に塩基配列が判明している株のミスマッチ数とプライマー別のPCR結果を表2に示した。

81/82系またはYuriF/R系の2nd PCRで陽性の13株中、P/Y系では2～5株のみが陽性で、1st PCRでの結果ではあるが、全てのクラスターを増幅できない可能性が示唆された。

#### D. 結論

1992年12月から1999年12月までの7年間に広島市において検出された38株のNLVの塩基配列を決定し、系統樹解析の結果から15種類のクラスターに分けられた。

遺伝子解析法はNLVの確認検査として有用な方法であるが、NLV感染症の詳細な疫学解析には遺伝子情報データベースの全国的なネットワークを構築する必要があるものと思われる。