

[かき中腸腺のウイルス濃縮]

- ① 中腸腺10個程度をストマッカー用滅菌ポリ袋に入れ、秤量する。
- ② 9倍量のPBS(-)および四分の一量のダイフロンを加える。
- ③ ストマッカーに約3分間かける。
- ④ 3,000rpm、15分、冷却遠心。
- ⑤ 遠心上清にPEG 6,000(最終濃度8%) NaCl(最終濃度0.5M)を添加。
- ⑥ 十分に攪拌後、4℃に一夜放置する。
- ⑦ 10,000rpm 60分、冷却遠心。
- ⑧ 上清を捨て、沈渣にPBS(-)10ml、ダイフロン5mlを加え再浮遊する。
- ⑨ ストマッカー用滅菌ポリ袋に移し、ストマッカーに約3分間かける。
- ⑩ 3,000rpm、15分、冷却遠心。
- ⑪ 上清を40%蔗糖液1.5mlに重層し、40,000rpm 90分超高速冷却遠心。
- ⑫ 沈渣に蒸留水 400 $\mu$ l、ダイフロン 400 $\mu$ lを加え再浮遊する。
- ⑬ 微量遠心管に移し、9,000rpm、5分、冷却遠心。
- ⑭ 上清を新しい微量遠心管に移し、濃縮材料とする。

↓

RNA抽出

[糞便のウイルス濃縮]

- ① 滅菌蒸留水にて糞便を10%乳剤にする(乳鉢、海砂)。
- ② 10%乳剤を高速遠心管に移し、四分の一量のダイフロンを加える。
- ③ 蓋をして、十分に攪拌する。
- ④ 10,000rpm 30分冷却遠心。
- ⑤ 上清を40%蔗糖液1.5mlに重層し、40,000rpm 90分超高速冷却遠心。
- ⑥ 上清を捨て、沈渣を蒸留水300 $\mu$ lに再浮遊する。

↓

RNA抽出、電子顕微鏡試料

図1 検体の前処理法

図 2

NLVのRT-PCR

date ( )

RT-1st PCR 反応液の調製 (50 $\mu$ l系)

	1検体	n検体	1検体	n検体	備考
Premix液	33.4		38.4		
dNTPs mix(2.5mM each)	4		4		
NV-35' (20 $\mu$ M)	1		1		
NV-36 (20 $\mu$ M)	1		1		
Oligo(dT) (0.5 $\mu$ g)	1		1		
DEPC-DW	26.4		31.4		
$\times$ 5Ampdirect	10				
または $\times$ 10 EX Tag Buffer			5		
RNasin(40unit/ $\mu$ l)	1		1		
ExTaq (5U/ $\mu$ l)	0.5		0.5		
MMLV Rtase (200U/ $\mu$ l)	0.1		0.1		

0.5ml microtube にミネラルオイル 1 滴滴下後、反応液 45 $\mu$ l ずつ分注、spindown



抽出 RNA を 5 $\mu$ l 分注 → RT-1st PCR 反応

nested PCR 反応液の調製 (50 $\mu$ l系)

	1検体	n検体	備考
Premix液	43.5		
dNTPs mix(2.5mM each)	4		
NV81 (20 $\mu$ M)	1		
NV82 (20 $\mu$ M)	0.5		
SM82 (20 $\mu$ M)	0.5		
DEPC-DW	37.5		
$\times$ 10 EX Tag buffer	5		
ExTaq (5U/ $\mu$ l)	0.5		

0.5ml microtube にミネラルオイル 1 滴滴下後、反応液 49 $\mu$ l ずつ分注、spindown



1st PCR 産物を 1 $\mu$ l 分注 → nested PCR 反応

PCR 反応条件

EX Taq RT-1st PCR ( )		EX Taq 2nd PCR ( )	
37 $^{\circ}$ C	60min	94 $^{\circ}$ C	3min
94 $^{\circ}$ C	3min	94 $^{\circ}$ C	1min
94 $^{\circ}$ C	1min	50 $^{\circ}$ C	1min
45 $^{\circ}$ C	1min	72 $^{\circ}$ C	1min
72 $^{\circ}$ C	1min	72 $^{\circ}$ C	15min
72 $^{\circ}$ C	15min	4 $^{\circ}$ C	forever
4 $^{\circ}$ C	forever		

Ready to Go RT-1st PCR ( )		Kod Dash 2nd PCR ( )	
42 $^{\circ}$ C	30min	94 $^{\circ}$ C	10sec
95 $^{\circ}$ C	5min	94 $^{\circ}$ C	30sec
95 $^{\circ}$ C	30sec	50 $^{\circ}$ C	2sec
45 $^{\circ}$ C	30sec	72 $^{\circ}$ C	30sec
72 $^{\circ}$ C	1min	72 $^{\circ}$ C	5min
72 $^{\circ}$ C	5min	4 $^{\circ}$ C	forever
4 $^{\circ}$ C	forever		

検体
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

図 3

NLVのRT-PCR date ( )

**RT-1st PCR** 反応液の調製 (50 $\mu$ l系)

Ready to Go for RT 用			
	1検体	n検体	備考
Premix液	45		
NV-35' (20 $\mu$ M)	1		
NV-36 (20 $\mu$ M)	1		
Oligo(dT) (0.5 $\mu$ g)	1		
DEPC-DW	42		

0.5ml microtube に反応液 45 $\mu$ l ずつ分注後、ミネラルオイル 1 滴滴下



抽出 RNA を 5 $\mu$ l 分注 → RT-1st PCR 反応

**nested PCR** 反応液の調製 (50 $\mu$ l系)

KOD Dash 用			
	1検体	n検体	備考
Premix液	43		
dNTPs mix(2.5mM each)	4		
NV81 (20 $\mu$ M)	1		
NV82 (20 $\mu$ M)	0.5		
SM82 (20 $\mu$ M)	0.5		
DEPC-DW	37		
× 10 KOD buffer	5		
KOD Dash (5U/ $\mu$ l)	1		

0.2ml microtube に反応液 49 $\mu$ l ずつ分注、spindown



1st PCR 産物を 1 $\mu$ l 分注 → nested PCR 反応(Perkin Elmer 使用)

PCR 反応条件

EX Taq	EX Taq
RT-1st PCR ( )	2nd PCR ( )
37°C 60min	
94°C 3min	94°C 3min
94°C 1min	94°C 1min
45°C 1min	50°C 1min
72°C 1min	72°C 1min
72°C 15min	72°C 15min
4°C forever	4°C forever

Ready to Go	Kod Dash
RT-1st PCR ( )	2nd PCR ( )
42°C 30min	
95°C 5min	94°C 10sec
95°C 30sec	94°C 30sec
45°C 30sec	50°C 2sec
72°C 1min	72°C 30sec
72°C 5min	72°C 5min
4°C forever	4°C forever

検体	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	

表1

年	疫学事項	事例番号	受付番号	発病日/採取日		EM	遺伝子型	
				F	1			
92	散発		930002	F	1	92/12/15	+ A	
	集発(飲食店)	9305	93-36029	F	1	93/02/01	+ A	
	集発(飲食店)	9305	93-36030	F	1	93/02/01	+ B1	
	散発		930076	F	1	93/02/08	+ C1	
	散発		930477	F	1	93/11/13	+ C2	
	散発		930479	F	1	93/11/22	+ C3	
	94	集発(飲食店)	9402	94-31002	F	1	94/01/27	+ D1
	95	集発(小学校)	9509	95-31080	F	1	95/05/20	+ B2
		集発(小学校)	9509	95-31070	F	1	95/05/23	+ B2
		集発(小学校)	9509	95-31076	F	1	95/05/23	+ B3
		集発(保育園)	9510	95-36090	F	1	95/10/25	+ C4
		散発		950778	F	1	95/11/04	+ C4
	散発		950772	F	1	95/11/06	+ C4	
	散発		950787	F	1	95/11/07	+ C4	
	散発		950799	F	1	95/11/12	+ C5	
	96	苦情(その他)		96-P-34	oy	1	96/01/17	NT M1
		集発(飲食店)	9603	96-34011	F	1	96/03/08	+ E
	97	集発(小学校)		961083	F	1	96/12/11	+ F1
		集発(小学校)	9605	96-320020	F	1	96/12/18	+ F2
		集発(小学校)	9605	96-320023	F	1	96/12/21	+ F2
		散発		970074	F	1	97/01/11	+ C6
		集発(事業所)		970082	F	1	97/01/12	+ G
	集発(飲食店)	9701	97-310004	F	1	97/02/04	- H	
集発(その他)	9707	97-330030	oy	1	97/02/04	NT D2		
散発		970249	F	1	97/02/19	+ D3		
集発(家族内)		970317	F	1	97/03/05	+ I1		
集発(飲食店)	9711	97-350080	F	1	97/03/07	- H		
集発(小学校)	9713	97-320084	F	1	97/11/19	- D4		
集発(飲食店)	9714	97-300088	F	1	97/12/01	+ J		
集発(飲食店)	9714	97-300087	oy	1	97/12/03	NT D4		
集発(飲食店)	9716	97-300091	oy	1	97/12/01	NT D4		
集発(飲食店)	9716	97-300095	oy	1	97/12/01	NT D4		
集発(飲食店)	9715	97-300089	oy	1	97/12/03	NT D4		
集発(飲食店)	9718	97-300097	oy	1	97/12/08	NT D4		
集発(飲食店)	9719	97-300100	F	1	97/12/14	+ D4		
集発(飲食店)	9719	97-300099	oy	1	97/12/15	NT D4		
集発(飲食店)	9719	97-300104	oy	1	97/12/15	NT D4		
集発(飲食店)	9719	97-300123	F	1	97/12/18	+ D4		
集発(飲食店)	9720	97-300117	oy	1	97/12/15	NT D4		
集発(飲食店)	9720	97-300121	F	1	97/12/15	+ D4		
集発(飲食店)	9720	97-300118	oy	1	97/12/16	NT D4		
散発		971505	F	1	97/12/16	+ D5		
集発(家族内)		9721	97-300125	oy	1	97/12/16	NT D4	
集発(家族内)		9804	9804-01	oy	1	97/12/26	NT D4	
98	集発(高校)	9801	9801-02	F	1	98/01/04	- D4	
	集発(家族内)	9805	9805-01	oy	1	98/01/09	NT D6	
	集発(家族内)	9806	9806-02	oy	1	98/01/09	NT D4	
	集発(飲食店)	9807	9807-01	oy	1	98/01/10	NT D4	
	集発(家族内)	9808	9808-02	oy	1	98/01/11	NT D4	
	集発(家族内)	9809	9809-03	F	1	98/01/13	+ D4	
	集発(家族内)	9810	9810-01	oy	1	98/01/18	NT D4	
	集発(家族内)	9810	9810-02	oy	1	98/01/19	NT D4	
	集発(家族内)	9810	9810-03	oy	1	98/01/19	NT D4	
	集発(家族内)	9810	9810-04	oy	1	98/01/26	NT D4	
	集発(家族内)	9810	9810-05	oy	1	98/01/26	NT D4	
	散発		980125	F	1	98/01/20	+ D7	
	集発(飲食店)	9818	9818-03	oy	1	98/02/03	NT D4	
	集発(飲食店)	9822	9822-01	F	1	98/02/15	- D4	
	集発(飲食店)	9823	9823-01	F	1	98/02/22	- D4	
	集発(飲食店)	9823	9823-03	F	1	98/02/22	- D4	
	苦情(その他)		98-004	oy	11	98/11/09	NT C7	
	散発		981853	F	1	98/12/12	+ K1	
	集発(家族内)		981824	F	1	98/12/13	+ K2	
	散発		981877	F	1	98/12/22	+ K2	
	99	散発		990088	F	1	99/01/05	+ K3
		集発(家族内)		990077	F	1	99/01/05	+ C8
		散発		990122	F	1	99/01/16	+ C9
集発(飲食店)		9904	9904-11	F	1	99/01/25	- D7	
集発(飲食店)		9904	9904-12	F	1	99/01/25	+ D4	
集発(飲食店)		9904	9904-19	F	1	99/01/29	- D4	
集発(飲食店)		9904	9904-21	F	1	99/01/29	+ L	
苦情(その他)			99-003	oy	2	99/02/08	NT M2	
集発(飲食店)		9907	9907-01	oy	2	99/02/15	NT D4	
集発(飲食店)		9910	9910-01	F	1	99/04/13	+ I2	
散発			990828	F	1	99/06/23	+ D4	
散発			990835	F	1	99/06/25	+ C10	
集発(その他)			9912	9912-01	F	1	99/10/28	- N
集発(その他)			9912	9912-02	F	1	99/10/29	+ N
散発			991205	F	1	99/11/08	+ D8	
集発(福祉養護施設)		9913	9913-02	F	1	99/11/28	+ C11	
集発(福祉養護施設)		9913	9913-04	F	1	99/11/29	+ O	
集発(福祉養護施設)		9913	9913-07	F	1	99/11/29	- C11	
集発(福祉養護施設)		9913	9913-10	F	1	99/11/29	- C11	
集発(福祉養護施設)		9913	9913-14	F	1	99/11/29	- C11	
集発(飲食店)		9915	9915-01	F	1	99/12/13	- D9	
集発(飲食店)		9915	9915-02	F	1	99/12/13	+ D9	

Date : 2000.03.13  
Method: UPGMA

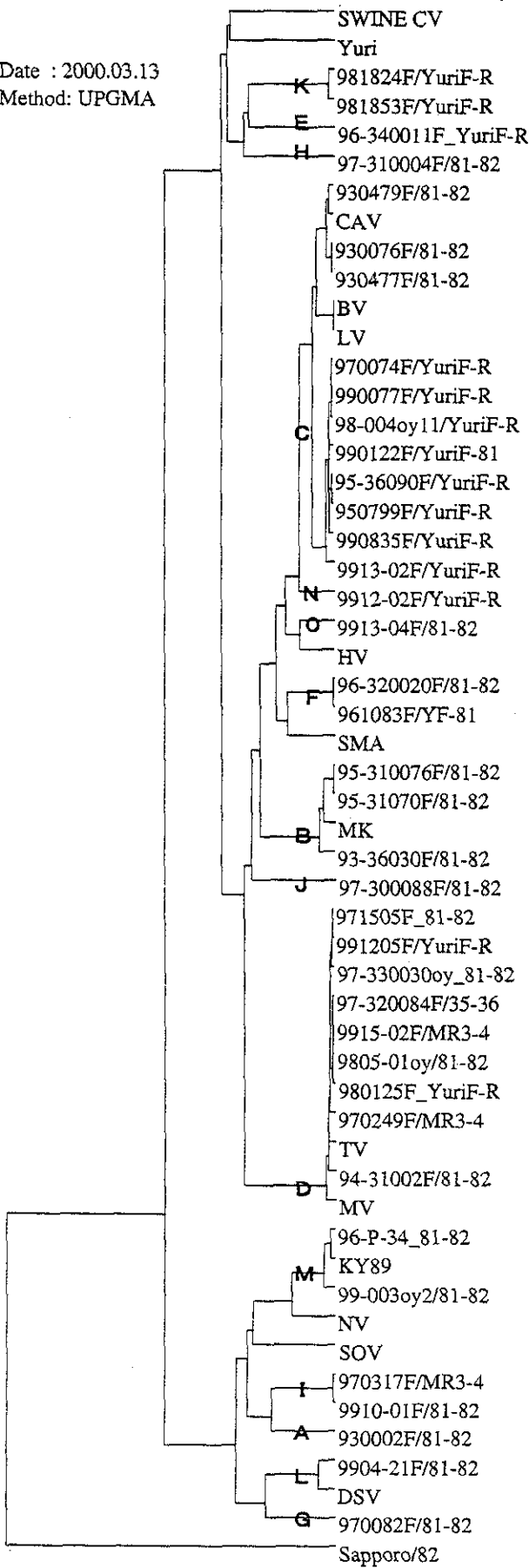


図4

	92年	93年	94年	95年	96年	97年	98年	99年
SWINE CV								
Yuri								
K 981824F/YuriF-R							PS	S
E 981853F/YuriF-R							S	
H 96-340011F_YuriF-R					F			
97-310004F/81-82						FF		
930479F/81-82		S						
CAV								
930076F/81-82		S						
930477F/81-82		S						
BV								
LV								
970074F/YuriF-R						S		
990077F/YuriF-R								P
C 98-004oy11/YuriF-R							o	
990122F/YuriF-81								S
95-36090F/YuriF-R				PSSS				
950799F/YuriF-R				S				
990835F/YuriF-R								S
9913-02F/YuriF-R								P
N 9912-02F/YuriF-R								P
O 9913-04F/81-82								P
HV								
F 96-320020F/81-82					P			
961083F/YF-81					P			
SMA								
95-310076F/81-82				P				
95-31070F/81-82				P				
B MK								
93-36030F/81-82		F						
J 97-300088F/81-82						F		
971505F_81-82						S		
991205F/YuriF-R								S
97-330030oy_81-82						o		
97-320084F/35-36						PFF000000	PFF000000	SFo
9915-02F/MR3-4								P
9805-01oy/81-82							o	
980125F_YuriF-R							S	F
970249F/MR3-4						S		
TV								
D 94-31002F/81-82			F					
MV								
M 96-P-34_81-82					o			
KY89								
99-003oy2/81-82								o
NV								
SOV								
I 970317F/MR3-4						P		
9910-01F/81-82								P
A 930002F/81-82	S	F						
L 9904-21F/81-82								F
DSV								
G 970082F/81-82						P		
Sapporo/82								

S, 散発性胃腸炎, P, ヒトヒト感染を疑う, F 食中毒, o, カキ

表2

SITE	MISSMACHI				使用株	プライマー別結果							遺伝子型名	
	P1	P2	P3	Y1		Y2	1ST		2ND		1ST			
							35'/36	MR3/4	81/82	YuriF/R	P1/P2	P1/P3		Y1/Y2
981824F	Y	2	5	2	5	981824F			-	+	+	+	+	K
981853F	Y	2	7	2	6									
96-340011F	Y	1	5	0	3	96-340011F			-	+	-	-	-	E
97-310004F	8	2	2	2	2	97-310004F			+	+	-	-	-	H
U02030		1	1											
97-330030oy	8	2	3	3	1									
971505F	8	2	3	3	1									
97-320084F	3	1	2	0	3	9904-12F			+	+	(+)	+	+	D
99-005oy2	Y-8	1	2	3	1									
9805-01oy	8	2	2	3	1									
99-005oy1	Y	2	2	3	1									
980125F	Y	1	1	3	1									
970249F	M	2	2	0	3									
94-31002F	8	1	3	0										
HCU22498		1	1											
97-300088F	8	4	2	0		97-300088F			+	-	+	(+)	+	J
930076F	8	1	1	1										
930477F	8	1	1	1		930477F	-	+	+	+	+	+	-	C
930479F	8	1	1	1										
HCU46500		1	1											
95-36090F	Y	0	2	1	2									
950799F	Y	0	2	1	2									
990122F	8	2	0	2										C
970074F	Y	1	2	1	2									
98-004oy11	Y	1	2	1	2									
CRNAORFS		1	1											
HCUD7611		1	0											
96-320020F	8	3	1	2										
961083F	Y-8	3	3	1	2	961083F			+	+	(+)	-	-	F
NOR76US		2	2											
95-310076F	8	3	1	3		95-310076F			+	+	-	+	-	B
95-31070F	8	3	1	3										
93-36030F	8	2	1	3										
CVORFS		2	0											
930002F	8	3	5	3		930002F	-	-	+	+	-	-	-	A
970317F	M	1	2	5	3	970317F			-	+	+	-	-	I
99-003oy2	8	4	3	2		99-003oy2			+	-	-	-	-	M
NOR89JB		5	4											
CVXRNA		5	2											
SOUCAPPRO		5	3											
970082F	8	4	2	2		970082F			+	-	-	-	-	G
9904-21F	8	3	5	3		9904-21F			+	-	+	(+)	-	L
DSU04469		3	3											
									成績	10	9	5	4	2

## 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 大瀬戸光明 愛媛県立衛生環境研究所

協力研究者 近藤玲子、山下育孝、吉田紀美 愛媛県立衛生環境研究所

主任研究者 川本尋義 岐阜県生物産業技術研究所

**研究要旨：**カリシウイルスの遺伝子検査標準法確立の一つの候補として設計された新しいプライマーの実用性を検討するため、散発性及び集団発生事例の患者材料を用いて、NV系、Yuri系プライマーとの比較を行った。その結果、新しいプライマー P1/P3 による 1st PCR が他の nested PCR とほぼ同等の検出感度を示した。また、下水からのカリシウイルス検出法を検討し、下水中のウイルスの動向を監視することにより、地域のウイルス流行状況を把握できる可能性があることが示唆された。

### A. 研究目的

ヒトの急性胃腸炎を起こすカリシウイルスの遺伝子検査標準法確立の一つの候補として、本研究班で提案された新しいプライマーの実用性の検討を行った。また、下水からのカリシウイルス検出を検討し、散発性胃腸炎患者からのウイルス検出状況と比較することにより、地域におけるカリシウイルスの流行状況を監視する方法としての有効性を検討した。

### B. 研究方法

材料：1999 年 1 月から 2000 年 2 月の間、小児科医院外来の散発性胃腸炎患者の糞便材料及び 1999 年度中に発生したウイルス性胃腸炎の集団発生事例の患者からの糞便材料を用いた。

下水は 1999 年 8 月以降月 1 回乃至 2 回、雨水合流式下水処理場の流入口で採取した。

方法：糞便からのウイルスの検出は電子顕微鏡法及び RT-PCR で行った。RT-PCR に用いたプライマーは NV 系、Yuri 系、と新しく設計された P1/P3 系を併用した。糞便材料からの RNA 抽出には ISOGENE-LS を、下水濃縮材料からの RNA 抽出には High Pure Viral RNA Kit (ペーリンガー・マンハイム) を使用した。

### C. 研究結果及び考察

1. 散発性及び集団発生事例からの病原ウイルス検出状況：定点小児科医院外来における感染性胃腸炎患者からの電子顕微鏡病原体検査の結果を表 1 に示した。1999 年 1 月から 3 月にかけてはロタウイルスが多く、3 月から 6 月にはカリシウイルスとアストロウイルスが散発的に流行していたことがわかった。1999 年 11 月以降の感染性胃腸炎の患者の増加時期については、検査材料があるかぎり RT-PCR を並行して実施した。感染症発生動向調査では 1999/2000 年シーズンの感染性胃腸炎は最近数年来最も規模の大きい流行であった。11 月には EM でカリシウイルスが 1 例検出されたが、PCR ではすべて陰性であった。12 月および 2000 年 1 月は PCR でカリシウイルスがそれぞれ 5 例検出された。一方、ロタウイルスは同時期にほとんど検出されておらず、2000 年 1 月に 1 例検出されたのみであった。その他にもこの時期に多く検出された病原体はみられないため、今シーズンの感染性胃腸炎流行の主要原因はカリシウイルスであったと考えられた。

1999 年度のウイルスによる集団発生事例は 4 事例あり、すべてカリシウイルスが原因物質であった (表 2)。事例 3、事例 4 は小学校、中学校で発生した嘔吐、下痢を主症状とする急性胃腸炎の集団発生として報告され

た。両事例とも食中毒様の患者発生を示したが、疫学調査で学校給食が原因食品から除外されたため食中毒とはされなかった。患者発生状況からは何らかの一斉暴露が示唆されており、食中毒なのかその他の感染経路による感染なのか判断しがたい事例であった。今後このような事例の対応についても検討する必要がある。

2. プライマー別の検出率の比較：新プライマーは当初より 1st PCR で用いるべく設計されている。また、P1/P3 系は Ando らのプローブ部位を含んでおり、ハイブリダイゼーションによる確認試験ができる理由から、今回は P1/P3 系の 1st PCR と NV 系、Yuri 系の nested PCR との比較を行った。

表 3 に示した散発事例の患者糞便からのプライマー別検出率の比較では、P1/P3 プライマーは他の NV 系、Yuri 系と同等の検出率を示した。同時に行った Titan One Tube RT-PCR Kit でもほとんど同じ検出率を示した。この方法では RT-PCR 混合液に抽出 RNA を加える時にキャップを開けるだけでよく、コンタミネーションの可能性が非常に少なくなる。

同様に前述した集団発生事例（表 2）においても、P1/P3 系を併用した事例 2、事例 3 では高い検出率を示しており、患者糞便の検査には非常に適しているプライマーであると思われる。

3. 下水からのカリシウイルス検出法の検討：下水からカリシウイルスを検出することにより、地域のカリシウイルスの流行を監視することが可能であるかを予備的に検討した。下水中にはフロック状の浮遊物が多いが、これを除くことなく RNA 抽出用の試水とした。図 1 に下水からの RNA 抽出法のプロトコルを示した。この方法でのカリシウイルス検出状況を表 4 に示した。カリシウイルスは 11 月の下旬に始めて検出され、その後は継続して全例陽性であった。電子顕微鏡法と RT-PCR による散発性患者の病原体監視においても、今シーズンは 11 月下旬にカリシウ

イルスが検出されており、下水からの検出時期と一致した。このことから下水からのウイルス検出が地域のカリシウイルスの流行監視に有望な方法であると考えられた。今後散発性患者の病原体監視とともに、下水からの検出がいつまで続くか、検討を継続したい。

プライマー別では NV 系、Yuri 系で陽性になっても、P1/P3 系では検出できなかった。これは下水に含まれるウイルス量が、糞便と比べると少ないためと考えられた。下水からの検出に P1/P3 系を用いるには、P2 プライマーや Y1, Y2 プライマーを用いた nested PCR を行う必要があると思われた。

今後、下水と散発患者のウイルスについてホモロジー比較、Genotype の地理的時系列的分布の解析、等により流行株の多様性の把握を行いたい。また、下水の試料水量を段階的に希釈して RT-PCR を行い、半定量的に当該地域の流行規模の推定が出来ないかの検討を行いたい。

#### D. 結論

1. 1st-PCR でカリシウイルスを検出する新しいプライマー P1/P3 系と nested PCR の NV 系及び Yuri 系プライマーの患者糞便からのウイルス検出率を比較し、P1/P3 系プライマーが NV 系、Yuri 系とほぼ同程度の感度を有する結果を得た。

2. 下水中のカリシウイルス検出法を検討し、下水中のウイルスを監視することにより地域の流行状況を把握できる可能性があることが示唆された。

#### E. 研究発表

学会発表

大瀬戸光明、山下育孝、吉田紀美、近藤玲子、浅井忠男、井上博雄、鎌田公仁夫、武田直和：ウイルス性食中毒及び散発性下痢症から検出されるカリシウイルスのプローブ型と血清型の分布。第 47 回日本ウイルス学会、1999、11、横浜市



表1 散発性胃腸炎患者からの月別ウイルス検出数

ウイルス別	1999年												2000年		計
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	
ロウイルス	9	21	6	4					1				1	1	43
アデノウイルス			1		1	1		1		1	1	2		1	9
アストロウイルス		1	6	2	1	2									12
カリシウイルス(計)			2	3	6	3	1				1	5	5		26
" EM 検出			2	3	6	3	1				1				16
" PCR 検出			1		4							5	5		15
EM 検査数	30	47	42	28	31	34	26	31	20	20	28	19	27	24	407

表2 集団発生からのカリシウイルス検出状況 (1999年度)

事例	発生年月日	発生場所	喫食者 (在籍者)	発症者	検査数	NV 陽性	Yuri 陽性	P1/P3 陽性
1	1999年4月7日	飲食店	41	27	10	0	8	-
2	1999年12月15日	家庭	109	62	16	6	7	8
3	1999年12月25日	小学校	(428)	295	25	0	24	24
4	2000年3月15日	中学校	(816)	210	17	13	14	-
計			1,394	594	68	19/68	53/68	32/41

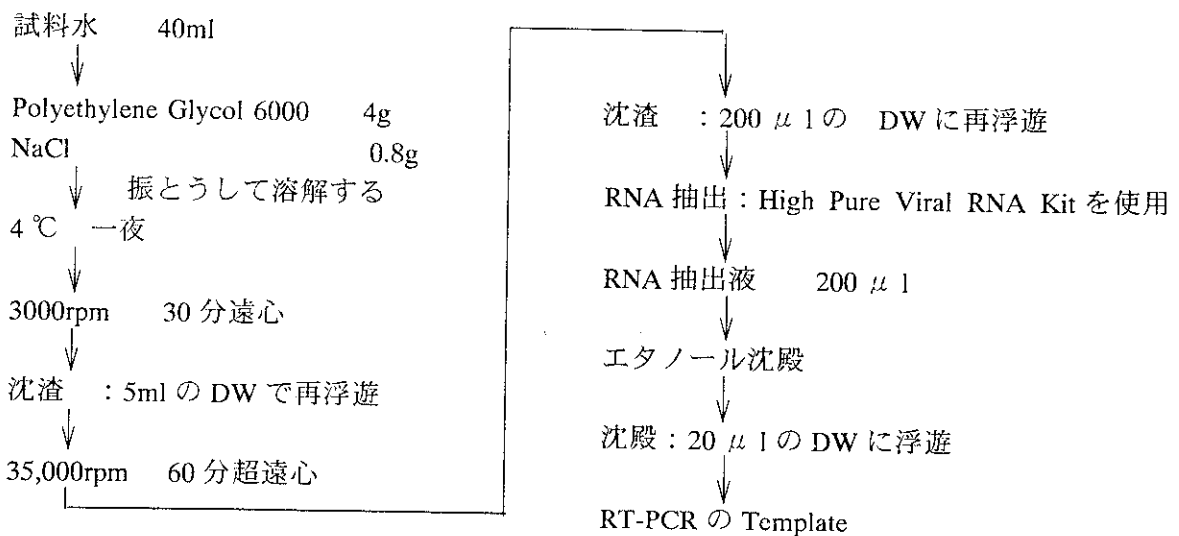
表3 散発性患者からのプライマー別カリシウイルス検出数

	NV系 nested	Yuri系 nested	P1/P3 1st	P1/P3 (1 tube 法) 1st
検査数	50	50	47	47
陽性数	9	8	9	8

表4 RT-PCRによる下水からのカリシウイルス検出状況 (陽性数/検査数)

プライマー	8月-1	8月-2	9月	10月	11月-1	11月-2	12月-1	12月-2	1月-1	1月-2
NV系	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	4/4	4/4	4/4
Yuri系	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	3/4	4/4	4/4
P1/P3	0/2	0/2						0/2	0/2	0/2

図1 下水試料の濃縮法



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 大野 惇 沖縄県衛生環境研究所

研究要旨:沖縄県の平成 11 年度における食中毒事例 30 件のうちはじめ  
て N L V s を原因とする食中毒が 3 件確認された。また、N L V s の浸  
淫状況と実態を把握するために、生活排水を処理する下水処理場の未処  
理下水 44 件からの N L V s 遺伝子の検出を新プライマー (P1/P2、  
Y1/Y2) および従来プライマー (35/36、Yuri52F/Yuri52R、  
NV81/NV82:SM82、Yuri22F/Yuri22R) で行った。その結果、すべての  
検体から N L V s 遺伝子が検出され、新プライマーでも高率に検出され  
た。

研究協力者 糸数清正 沖縄県衛生環境研究所  
中村正治 沖縄県衛生環境研究所

A. 研究目的

沖縄県におけるウイルス性胃腸炎の浸淫状況と実態を把握するために、県内で発生した食中毒のうち非細菌性食中毒事例からウイルスの病原体検索を行った。また、生活環境水における N L V s の浸淫状況と実態を把握するために生活排水を処理する下水処理場における未処理下水について調査した。さらに、研究班設計の新プライマー (P1/P2、Y1/Y2) と従来プライマー (35/36、Yuri52F/Yuri52R、NV81/NV82:SM82、Yuri22F/Yuri22R) での N L V s 遺伝子の検出感度の違いについても調査した。

B. 研究方法

1. 非細菌性食中毒事例からのウイルスの病原体検索

平成 11 年 12 月から平成 12 年 1 月に起こった非細菌性食中毒 3 事例の患者便からのウイルスの病原体検索を行った。

ウイルス抗原検出には、市販のキット、ロタスクリーン (A 群ロタ) と C 群ロタウイルス検出キットを使用した。

N L V s 検査は、RT-PCR 法で行い RNA

抽出には、SepaGene RV-R (三光純薬) キットを用い、プライマーは 1ST PCR では、35/36 と Yuri52F/Yuri52R、Nested PCR では、NV81/NV82:SM82 と Yuri22F/Yuri22R を用い、Gene Amp PCR System 9600-R (PERKINELMER) で増幅し、PCR 産物は、2%アガロース、TAE バッファーで泳動後、紫外線照射により検出した。RT-PCR により得られた増幅産物の特異性確認は、マイクロプレートハイブリダイゼーション法で行った。ゲルからの DNA 抽出は、QIAquick PCR Purification Kit を用い、プローブは、国立公衆衛生院より 99 年度に分与された G1 型 (G1P99-A、G199-B)、G2 型 (G299-A、G299-B、G299-C) を用いた。

2. 未処理下水からの N L V s 遺伝子検出

検体は、沖縄県流域下水道の 3 終末処理場 (A 処理場: 南部地区 B 処理場: 中部地区西 C 処理場: 中部地区東) から平成 11 年 7 月から平成 12 年 3 月までに下水処理場に流入する未処理下水 44 件を供試した。検体の前処理は、図 1 に示す様に未処理下水 50ml を 6,000rpm で粗遠心して上清を取り、PEG6000 を 4g (濃度 8%)、NaCl 1.05g を加え 4℃、一晩放置した後、8,000rpm で遠心し

その沈渣に 200ul の DDW を加え浮遊させたものを RNA の抽出に用いた。

N L V s 遺伝子の検出は、糞便と同様な方法で行い、新たに研究班の設計した新プライマー (P1/P2、Y1/Y2) を加えて図 2 の条件設定で RT-PCR を行なった。また、逆転写反応には、P3 プライマーを用いて One tube 法で行った。

### C. 研究結果

非細菌性食中毒事例からウイルスの病原体検索については、平成 11 年 12 月から平成 12 年 1 月の期間に発生した非細菌性食中毒事例 3 事例のウイルスの病原体検索結果を表 1 に示した。

事例 1 は、飲食店で発生し、有症者は 9 名で生カキを喫食しており、糞便が回収できた 5 名中 2 名から、N L V s 遺伝子が検出された。

事例 2 も飲食店で発生し、有症者は 10 名で、生カキは喫食してはいなかったが、糞便が回収できた 9 名中 4 名から N L V s 遺伝子が検出された。その後の調査でこの飲食店では、生カキを扱っていたことが判明した。

事例 3 は、家庭内発生で親戚 6 名で生カキを喫食し 5 名に下痢等の症状があり、その内 4 名中 3 名から N L V s 遺伝子が検出された。なお、症状がなかった一人は、幼児で熱を通したカキを喫食していた。また、この 3 事例で検出された 9 検体の N L V s 遺伝子は、ハイブリッド化法ですべて G II 型と確認された。

下水処理場の未処理下水からの N L V s 遺伝子の検出については、表 2 (A 処理場：南部地区)、表 3 (B 処理場：中部地区西)、表 4 (C 処理場：中部地区東) にそれぞれの下処理場におけるプライマー別 N L V s 遺伝子検出成績を示した。

3 カ所の下水処理場から採取された未処理下水 44 検体は、すべていずれかのプライマーにより N L V s 遺伝子が検出された。

3 地区の N L V s 遺伝子検出率には地域差はないが、しかし、プライマーによる検出率には地域差があり、特に C 処理場では Y1/Y2 プライマーで 1 検体も N L V s 遺伝子が検出されなかった。

各プライマーによる N L V s 遺伝子検出率を表 5 および図 3 に示した。1 S T P C R で使用したプライマー 35/36 と Yuri52F/Yuri52R では検出されなかったが、新プライマー P1/P2 で 43%、Y1/Y2 で 32% の検出率であった。また、Nested P C R で使用したプライマー NV81/NV82:SM82 で 57%、Yuri22F /Yuri22R では 86% でもっとも高い検出率であった。

単独検出数 (そのプライマーでのみで検出された数) は、NV81/NV82:SM82 で 4 検体、Yuri22F/Yuri22R で 5 検体、Y1/Y2 で 1 検体で合計 10 検体であった。

### D. 考察

我々は、前回の調査で沖縄県内にも N L V s に汚染された食品が流通販売されていることを明らかにし、本県においても N L V s における集団ウイルス性食中毒の発生の可能性が示唆されたことを報告した。

今回、非細菌性食中毒 3 事例の患者下痢便からのウイルスの病原体検索を行ったところ、3 事例 18 検体中 9 検体 (50%) から N L V s が検出され、本県ではじめて N L V s による食中毒事例を確認した。また、3 事例中 2 事例は生カキを喫食していたが、しかし、他の 1 事例は生カキを喫食していなかったが、飲食店において生カキを調理しており、飲食店の厨房における汚染食品からの二次汚染による可能性が示唆された。

生活環境水における N L V s の実態を把握するため、本県の 3 カ所の下水処理場に流入する未処理下水 44 件を調査した結果すべての未処理下水より N L V s 遺伝子が検出された。3 カ所の下水処理場の流入水は、家庭排

水や事業所排水のみの分流式（雨水は含まない）であり、検体採取時間帯の10時から11時頃は、下水処理場に入る到達時間を考慮に入れると人間の朝の活動時間に排出される家庭排水が主であると考えられる。このことから、検出されたNLVs遺伝子は家庭排水由来であろうと推測される。それに、採取月日に関係なくNLVs遺伝子が検出されたことは、たえずヒト-ヒト間の感染サイクルが確立されているのではないかと推測される。また、プライマーによって地区別にNLVs遺伝子検出数に大きな差があることは、NLVsの種類が多様であり、地区別で流行するNLVsの種類が違うことが示唆される。

新プライマーと従来のプライマーの検出感度を比較するために、各プライマーによる検出率をみると1st PCRで使用した従来のプライマー35/36、Yuri52F/Yuri52Rでは、検出されないが新プライマーP1/P2、Y1/Y2で43、32%の検出率があり、従来のプライマーより感度は高かった。また、より感度をあげるNested PCRでは、従来のプライマーNV81/NV82:SM82、Yuri22F/Yuri22Rで、57、86%と新プライマーより高い検出率であった。しかし、Nested PCRを行う時間やコンタミを考慮すると、新プライマーによるOne TubeでのRT-PCR法が実用的であろうと思われた。しかし、未処理下水の各プライマーにおける単独検出数は、3種類のプライマーで10検体もあることから、今後も、数種類のプライマーを組み合わせることで検出感度を高める必要性はあると思われた。

#### E. 結論

今回、調査した非細菌性食中毒患者下痢便からのウイルスの病原体検索によって、本県ではじめてNLVsによる食中毒が確認された。これは、本県でも食品の流通機構によりNLVsに感染する土壌は本土と変わらなことが示唆された。

また、下水処理場に流入する、未処理下水から月日を問わずすべての検体からNLVs遺伝子が検出されたことは、たえず下水に大量なNLVsが排出されていることが示唆でき、ヒト-ヒト間の感染サイクルが確立されていることが推測される。これは、ヒトからヒトへの感染や、ヒトの便により二次汚染された食品からの感染が推測され、カキの喫食や季節にかかわらずNLVsによる食中毒発生の可能性が示唆される。

なお、今回、使用した研究班設計新プライマーは、従来のプライマーより検出感度は高かったが、NLVsの多種多様性から今後も数種類のプライマーを組み合わせる使用することが必要であろう。

最後に、今回、下水処理場の未処理下水の検査にあたり、RT-PCRでNLVs遺伝子を検出したただけであるので、今後さらにハイブリダイゼーション法や塩基配列決定解析法により型別や食中毒で検出されたNLVsと下水から検出されたNLVsの遺伝子解析を行なう必要があると思われる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 2. 学会発表

- 1) 大野惇、糸数清正、中村正治、久高潤、安里龍二、宇田川悦子。  
沖縄県における食品媒介ウイルス性胃腸炎の実態調査。  
第30回沖縄県獣医学会.1999
- 2) 大野惇、糸数清正、中村正治、久高潤、安里龍二、宇田川悦子。  
沖縄県における食品媒介ウイルス性胃腸炎の実態調査。  
第30回沖縄県監視員研究発表会  
1999
- 3) 大野惇、糸数清正、中村正治、久高潤、安里龍二、宇田川悦子。  
沖縄県における小型球形ウイルス

(SRSV)の浸淫状況調査

平成 11 年度日本獣医公衆衛生学会 (九州). 1999

- 4) 大野惇、系数清正、中村正治、久高潤、安里龍二、宇田川悦子、川本尋義、  
沖縄県における食品媒介ウイルス性胃腸炎の実態調査。  
沖縄県公衆衛生学会. 2000

3. その他の発表

- 1) 系数清正、大野惇、中村正治、久高潤、安里龍二、宇田川悦子、  
沖縄県における食品媒介ウイルス性胃腸炎の実態調査。  
第 33 号沖縄県衛生環境研究所所報  
Vol.32 pp (1999)

- 2) 系数清正、大野惇、中村正治、久高潤、安里龍二、宇田川悦子、川本尋義、

沖縄県における食品媒介ウイルス性胃腸炎の実態調査。

平成 11 年度沖縄県獣医師会年報、第 23 号、(1999)

- 3) 大野惇、系数清正、中村正治、久高潤、安里龍二、宇田川悦子、川本尋義、

沖縄県における食品媒介ウイルス性胃腸炎の実態調査。

沖縄県公衆衛生学会誌、第 31 号、(1999)

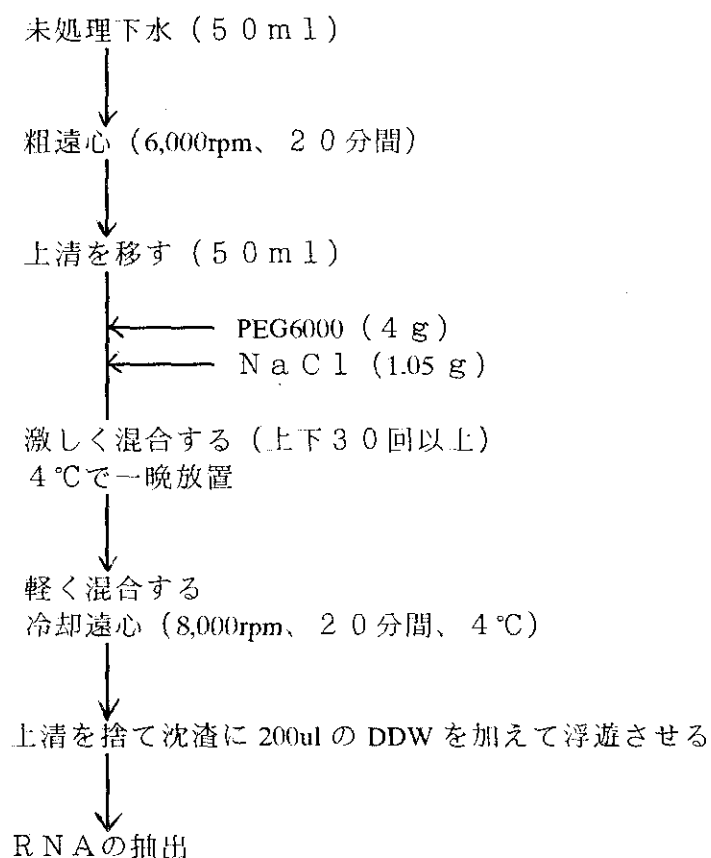


図1. 未処理下水の前処理

表1 平成11年度の非細菌性食中毒事例(1999.12～2000.1)

事例	発生年月	発生場所	生カキの喫食	有症者数	検査件数	RT-PCR陽性数	ハイブリダイゼーションによる型別
1	1999/12	飲食店	有り	9	5	2	G II
2	2000/1	飲食店	無し	10	9	4	G II
3	2000/1	家庭内	有り	5	4	3	G II
計				24	18	9	

## < R T >

DW	1.4 $\mu$ l
5 $\times$ R T buffer	3.0 $\mu$ l
0.1M D T T	0.7 $\mu$ l
2.5mM dNTP	3.0 $\mu$ l
RNase inhibitor (38unit/ $\mu$ l)	0.7 $\mu$ l
M-MLV RT (200unit/ $\mu$ l)	0.7 $\mu$ l
P 3 Primer (100 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
<hr/>	
R N A 抽出物	10.0 $\mu$ l <input type="checkbox"/>
	5.0 $\mu$ l <input type="checkbox"/>

R T 混合液と R N A 抽出物を混合して 4 2  $^{\circ}$ C で 6 0 分反応させる。

## < P C R >

DW	24.75 $\mu$ l
10 $\times$ Ex Taq buffer	5.0 $\mu$ l
2.5mM dNTP $\mu$ l	4.0 $\mu$ l
* P 1 Primer (100 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
* P 2 Primer (100 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
E X Taq	0.25 $\mu$ l
<hr/>	
R T Sample	35.0 $\mu$ l <input type="checkbox"/>
	15.0 $\mu$ l <input type="checkbox"/>

\*別チューブで Primer を Y 1 / Y 2 にかえて行う。

## P C R 反応

9 4 $^{\circ}$ C	5 分		1 回
9 4 $^{\circ}$ C	1 分	┌──────────┐	5 サイクル
4 5 $^{\circ}$ C	2 分		
6 0 $^{\circ}$ C	4 分		
9 4 $^{\circ}$ C	1 分	┌──────────┐	3 5 サイクル
5 0 $^{\circ}$ C	1 分 2 0 秒		
7 2 $^{\circ}$ C	1 分		
7 2 $^{\circ}$ C	1 5 分		1 回
4 $^{\circ}$ C	hold		

図 2 R T ( P 3 ) - P C R の条件設定

表 2 A 処理場（南部地区）のプライマー別 N L V s 遺伝子検出成績

検体採取 年月日	採取時間	1 S T P C R				Nested P C R	
		35'/36	Yuri52F/R	P1/P2	Y1/Y2	NV81/NV82:SM82	Yuri22F/R
1999/8/30	10:40	-	-	-	-	+	+
1999/9/9	10:30	-	-	-	-	+	+
1999/9/27	10:30	-	-	-	-	+	-
1999/10/14	10:15	-	-	-	-	+	+
1999/10/26	10:20	-	-	-	-	+	-
1999/11/11	10:15	-	-	-	+	-	+
1999/11/22	10:20	-	-	+	-	-	+
1999/12/6	10:20	-	-	-	-	-	+
1999/12/20	10:50	-	-	+	-	+	+
2000/1/6	10:30	-	-	+	+	-	+
2000/1/25	10:20	-	-	+	+	+	+
2000/2/3	10:15	-	-	+	-	-	+
2000/2/16	10:15	-	-	+	+	+	+
2000/3/9	10:40	-	-	-	+	-	+
合計（検出数）		0	0	6	5	8	12

表 3 B 処理場（中部地区西）のプライマー別 N L V s 遺伝子検出成績

検体採取 年月日	採取時間	1 S T P C R				Nested P C R	
		35'/36	Yuri52F/R	P1/P2	Y1/Y2	NV81/NV82:SM82	Yuri22F/R
1999/7/30	9:30	-	-	-	-	+	+
1999/8/18	14:00	-	-	-	-	+	+
1999/8/30	10:40	-	-	-	-	+	+
1999/9/9	10:30	-	-	-	-	+	+
1999/9/27	10:30	-	-	-	-	+	-
1999/10/14	10:15	-	-	-	-	+	+
1999/10/26	10:20	-	-	-	-	+	+
1999/11/11	10:15	-	-	-	+	-	-
1999/11/22	10:20	-	-	+	+	-	+
1999/12/6	10:20	-	-	-	+	-	+
1999/12/20	10:50	-	-	+	+	-	+
2000/1/6	10:30	-	-	+	+	+	+
2000/1/25	10:20	-	-	+	+	-	+
2000/2/3	10:15	-	-	+	+	+	+
2000/2/16	10:15	-	-	+	+	+	+
2000/3/9	10:40	-	-	-	+	-	+
合計（検出数）		0	0	6	9	10	14



表4 C処理場（中部地区東）のプライマー別NLVs遺伝子検出成績

検体採取 年月日	採取時間	I S T P C R				Nested P C R	
		35/36	Yuri52F/R	P1/P2	Y1/Y2	NV81/NV82:SM82	Yuri22F/R
1999/8/30	10:40	-	-	-	-	+	+
1999/9/9	10:30	-	-	+	-	+	-
1999/9/27	10:30	-	-	-	-	+	-
1999/10/14	10:15	-	-	-	-	+	+
1999/10/26	10:20	-	-	-	-	-	+
1999/11/11	10:15	-	-	+	-	-	+
1999/11/22	10:20	-	-	+	-	-	+
1999/12/6	10:20	-	-	-	-	-	+
1999/12/20	10:50	-	-	-	-	-	+
2000/1/6	10:30	-	-	+	-	+	+
2000/1/25	10:20	-	-	+	-	+	+
2000/2/3	10:15	-	-	+	-	-	+
2000/2/16	10:15	-	-	-	-	+	+
2000/3/9	10:40	-	-	+	-	-	+
合計（検出数）		0	0	7	0	7	12

表5 プライマー別NLVs遺伝子検出率

検体数：44件

プライマー	遺伝子検出数（単独検出数）*	検出率（%）
全体	44（10）	100%
35' / 36	0	0%
Yuri52F/Yuri52R	0	0%
P1 / P2	19（0）	43%
Y1 / Y2	14（1）	32%
NV81/NV82:SM82	25（4）	57%
Yuri22F/Yuri22R	38（5）	86%

\*単独検出数：そのプライマーのみで検出された数

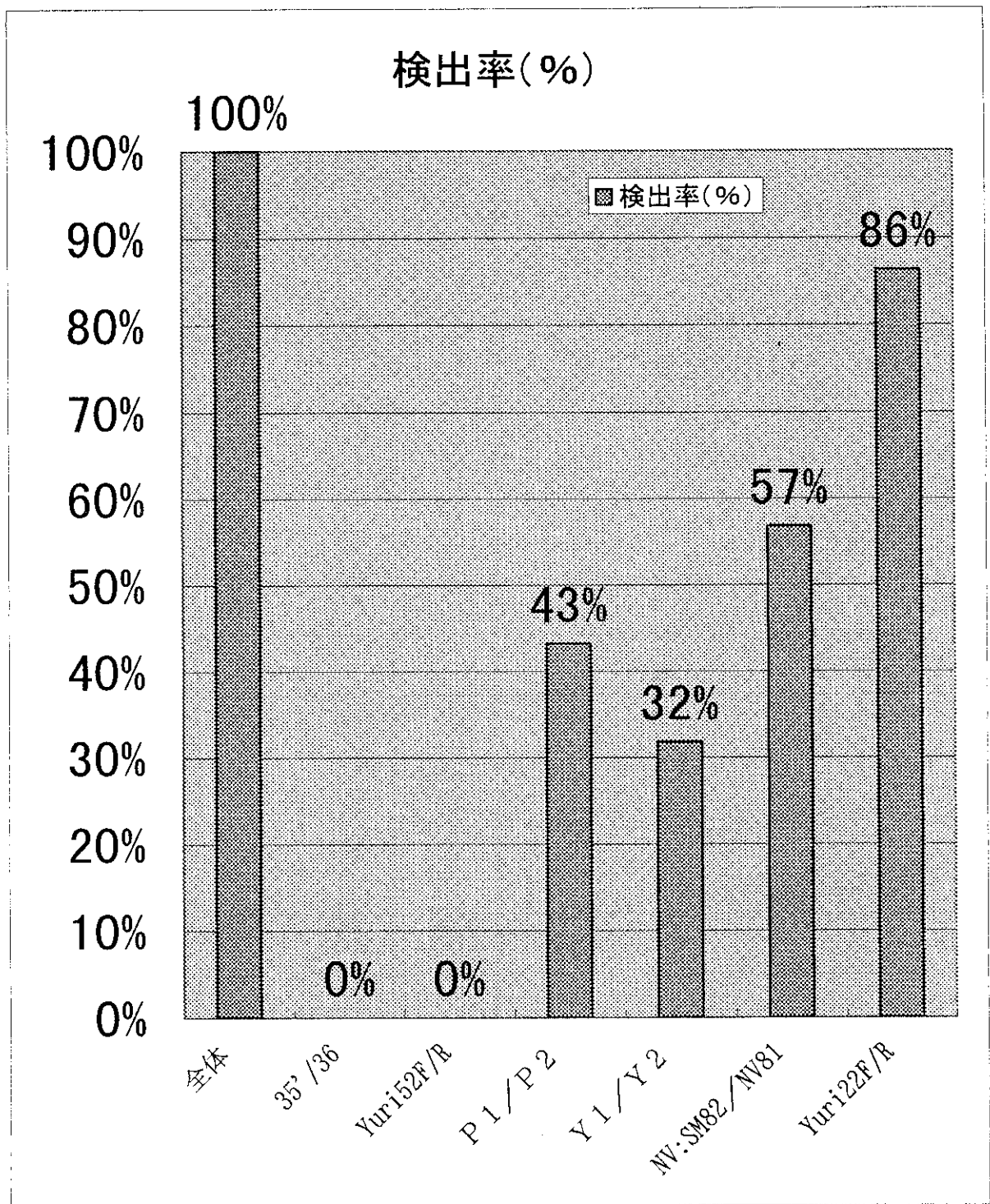


図3 プライマー別NLVs遺伝子検出率

## 平成11年度厚生科学特別研究事業分担研究報告

### 環境実態調査としての河川水及び下水処理場由来下水、汚泥検体からの SRSV (NV遺伝子) 検査報告

研究者 宇田川 悦子 国立感染症研究所 主任研究員

#### 研究要旨

昨年の本研究班で各地から検出された175株の小型球形ウイルス(SRSV)遺伝子配列のうちNorwalk-like Virus (NV) ORF1が増幅された163株を比較検討し、NV遺伝子型GI及びGIIに共通するPCRプライマー(P1/P2、P3およびY1/Y2; 分担研究者、大山、山崎)を試作した。今回、このプライマーを用いた東京都近郊の河川水及び一下水処理場から得られた汚泥及び従来のプライマーを使用してウイルス性食中毒に最も関与が指摘されているNLV遺伝子の実態調査を行った。検出されたPCR産物はダイレクトシーケンス法により解析を行い遺伝子型別を行った。

今回使用した河川水検体は、東京都の場合、多摩川の上流から下流まで8定点を設定し、ウイルス性食中毒が発生していない時期(平成11年11月、同年12月)及びウイルス性食中毒が多発している時期(平成12年2月)に夫々の個所でサンプルを収集したものである。これ以外に、一下水処理場の汚泥を上記と同一期間に収集し検体とした。合計27検体が採取され、これを用いて我々が構築したプライマーでNLV遺伝子の検出を行った。静岡県の場合は同様に8月から11月の期間の処理下水及び未処理下水を14検体を採取し従来のプライマーとの比較検討検査を行った。

分担研究者 宇田川悦子  
国立感染症研究所 主任研究員

分担研究者 矢野一好  
東京都立衛生研究所 水質主任研究員

分担研究者 杉枝正明  
静岡県環境衛生科学研究所 主幹

#### A. 研究目的

ウイルスが原因と考えられる食品媒介性食中毒は毎年世界各国で報告がなされてきている。わが国では平成7年終結したわれわれの研究班の報告書に記載した通り、

毎年原因不明として処理されてきた食中毒事件の原因の大多数が小型球形ウイルス(SRSV)であることを報告した。これらの結果を踏まえて、平成9年5月30日付けで厚生省は食品衛生法の改正を行い、食中毒の中へウイルスが起因するものも含めて報告するよう法律改正を行った。このようにウイルス性食中毒という今までのカテゴリーの中に入らなかった領域が食中毒の概念のなかへ入れられることになった。しかしながら、現状ではこれらのSRSVを簡便で再現性よく検出できる検査法及び確認試験法が無いということが大きな問題として浮上してきた。即ち、今回の食品衛生法改正で食中毒事件が発生した場合起因ウイルスの検出報告が義務づけられている。がしかし、前述の通り、簡便で再現性

のよいSRSV検査方法はいまのところ全く無いと言わざるを得ない現状にある。このため、各地の衛生研究所、保健所等の検査機関は簡便でしかも再現性よくSRSVを検出する検査法の開発研究を待ち望んでいる。

現在までのところウイルス性食中毒における原因食とウイルスとの因果関係、流行状況、更には環境中のウイルスの循環等についての研究は殆ど為されてきていなかった。

我々は昨年構築した共通プライマーを用いたPCR法を全国レベルで調査し従来のプライマーと同等以上の結果が得られることを示したが、今回このプライマーを用いてウイルス性食中毒が発生しない時期及び多発時期の環境におけるウイルスの検索、特に河川水中及び汚泥中のSRSVの検出を行いウイルスがどのような経過を取って環境中に循環しているのかを解明しようと試みた。

## B. 研究方法

### 1. 河川水及び汚泥：

東京都の検体：多摩川流域に8個所の河川水採取場所を設定し平成11年11月、12月(ウイルス性食中毒流行期前)及び平成12年2月(ウイルス性食中毒流行期)に河川水を採取した。また、これと同時期に下水道処理場より汚泥の提供を受けたのでこれも検査の対象とした。合計27検体について以下の方法で濃縮を行いRNAを抽出して検査した。

静岡県の検体：平成11年8月、9月、10月、11月に採取した未処理下水と処理下水を対象に上記検査を行った。

2. 河川水及び汚泥の濃縮方法：各場所で収集した河川水200をセルロース吸着・凝集法で水中ウイルス粒子を10ml(1/2000 vol.)に濃縮した。汚泥は4.5mlのビーフエクストラクトで抽出後以下の方

法で濃縮した。サンプル5mlを30%シュークロース上に重層し35,000rpm 2.5時間超遠心後沈渣を回収した。この沈渣は250 $\mu$ l(final; 1/40,000 vol)に再浮遊させISOGEN-LSでRNAを抽出し以下の実験に使用した。

### 3. 検査方法:

#### <3-1、RNA抽出法>

再浮遊させたサンプルから市販のISOGEN-LSを用いて常法によりRNAを抽出した。

#### <3-2、RT-PCR法>

東京都の場合：共通プライマーで1st RT-PCRのみ検査；

P1/P2 PCR産物は325bp

P1/P3 PCR産物は237bp

Y1/Y2 PCR産物は233bp

NV35/36 PCR産物は470bp

MR3/4 PCR産物は470bp

静岡県の場合：上記以外に

Nested PCR;

NV81/NV82,SMV82 PCR産物は330bp

yuri22 F/R PCR産物は370bp

Y1/Y2 PCR産物は233bp

各プライマーともORF2 Polymerase regionをターゲットとしており、従来各地で使用されているMR3/4と共通した部分を増幅できる。

#### <3-3、ダイレクトシーケンス法>

検体から検出されたPCR産物をアガロースゲル電気泳動法により各サンプルから切りだしダイレクトシーケンス法により塩基配列を解読した。

#### <3-4、遺伝子配列解析>

解読された塩基配列はGene Worksを用いてUPGMA-tree法により遺伝子型を比較検討した。