

C. 研究結果

1、河川水中及び汚泥中からのNLV遺伝子の月別検出：

(1) 東京都の場合：平成11年11月に多摩川の各流域で採取された検体について各プライマーを用いたRT-PCR法によりNLV共通遺伝子の検出を試みた。11月に全ての場所で採取されたサンプル中にNLV遺伝子が1st PCRで検出できた。

一方、同年12月に上記と同じ場所で採取された河川水及び汚泥からはNLV遺伝子は全く検出されなかった。

平成12年2月のサンプルでは、12月と同様全く検出できなかった。

(2) 静岡県の場合：使用したいずれのプライマー対でも1st PCRではまったく検出されなかったが、Nested PCRでNV81/NV82, SMV82の系で8月には未処理下水も処理下水からも産物が得られた。更に、9月10月の両月には未処理下水が陽性であった。同時に使用した他のプライマーでは全く検出されなかった。

2、増幅されたPCR産物のシーケンスによる遺伝子型別：

(1) 東京都の場合：平成11年11月に多摩川の各流域で採取された検体から検出されたPCR産物はダイレクトシーケンス法により塩基配列を確定した。全ての場所において増幅された遺伝子はNLV-GII型に属し、Hawaii-Virusと近い遺伝子配列を示した。

(2) 静岡県の場合：全ての陽性検体はダイレクトシーケンス法によりNV-GII型に属し、MX、TV24に近似していた。

D. 考察

我が国で発生した嘔吐下痢症患者から得られたSRSV175株のうちORF1が増幅できた163株の塩基配列比較からNLV遺伝子型GI、GIIに共通するプライマーを試作した(分担研究者；大山、山崎)。この共通プライマーは全国レベルでの検証の結果、従来のプライマー対と同等以上の検出率を示し汎用性が高いことが証明されている。そこで、われわれは、このプライマー対を用いて環境中におけるウイルス循環を検討することを目的に、東京近郊の多摩川の河川水及び静岡県内の処理下水、未処理下水を経時的に採取してウイルス性食中毒に關与する可能性が最も強いと考えられるNLV遺伝子の環境中の実態調査を行った。東京都および静岡県から収集した検体は従来の検査用プライマーと今回新規に試作されたプライマーの両方を使用して検討した。東京都の場合、試験した27検体中1st PCRで陽性を示した数は9検体で採取時期は11月の検体だけであった。これ以降の時期に採取された検体は全て陰性であった。一方静岡県の検体はすべて1st PCRで陰性であったがNV81/NV83、SMV82のNested PCR系でのみ陽性の検体があり、採取期間は8月、9月10月、11月でいずれも未処理下水から検出されている。また、処理下水であっても8月の検体からは遺伝子が検出された。これらの陽性検体のうち8月分(未処理下水、処理下水)9月、11月の未処理下水の4件についてダイレクトシーケンス法により遺伝子型別を行った結果、これら全ての陽性検体はメキシコ(MX、Tront)タイプと近似していた。

E. 結論

我々が構築したプライマーは患者便で従来使用されてきたプライマーと同程度にNV遺伝子を検出できることを以前示したが、

環境水中のNV遺伝子の検出にも効力を発揮した。これらNV陽性検体を調べた結果、東京都と静岡県では同じNV遺伝子型GIIに属してはいるが異なるウイルス遺伝子が検出された。東京の検体は全てHawaiiウイルスに近似であり、一方静岡の検体からはMXウイルスに近い遺伝子が検出された。以上の結果から、検出された遺伝子型からの推測ではSRSVの分布には地域特異性の可能性があることが示唆された。また、陽性検出時期としてはいずれの県でも人に流行が発生する前（東京都の場合は11月、静岡県の場合は8月、9月）に河川水、処理済下水、未処理下水の夫々から遺伝子が検出されている。即ち、小型球形ウイルスは人に流行する時期の前から環境中とくに河川水等に存在する可能性があきらかとなったので、今後は河川水等からの除去法等を含め更に検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Detection and Nucleotide Sequence Analysis of Human Caliciviruses (HuCVs) from Samples in Non-bacterial Gastroenteritis Outbreaks in Hokkaido, Japan. : Tohru Oyama, Shima Yoshizumi, Harumi Sawada, Yasuhiro Uchiyama, Yoshinobu Katoh, Naohiro Hamaoka and Etsuko Utagawa. *Microbiol. Immunol.*, 43 (6), 543-550, 1999

(2) Expression of recombinant Norwalk-like Virus Capsid Proteins Using a Bacterial System, and the Development of Its Immunological Detection.: Tomoko Yoda, Yoshitake Terano, Akira Shimada, Sadahiko Suzuki, Kenji Yamazaki, Naomi Sakon, Isao Oishi, Etsuko Utagawa, Yosinobu Okuno and Tadayosi Shibata. *Journal of Medical Virology*.

2. 学会発表

1) Oishi I, Yamazaki K, Sakon N, Oseto M, Seto Y, Utagawa ET and Okuno Y. : Genotypic distributions of Norwalk-like viruses (NLVs) in Japan, 1982-1995. International Workshop on Human Caliciviruses, Atlanta, USA, March 29-31, 1999.

2) Utagawa ET, Kojima T and Oseto M. : Detection of Serotypes 1-4 Human Astroviruses in Clinical Specimens by A new Latex Agglutination Methods. : X1th International Congress of Virology, Sydney, Australia, August 9-13, 1999.

3) Kawamoto H, Ohyama T, Yamazaki K, Seto S, Saito H and Utagawa ET : Sequence diversity of human caliciviruses (HuCVs) from samples in non-bacterial gastroenteritis outbreaks in Japan, 1989 to 1998. X1th International Congress of Virology, Sydney, Australia, August 9-13, 1999.

4) Yoda T., Terano Y., Suzuki Y., Yamazaki K., Sakon N., Oishi I., Utagawa E., Okuno Y., and Shibata T.: Expression of Norwalk-like Virus (NLV) capsid proteins in a bacterial system and development of immunological detection for NLV antigen. X1th International Congress of Virology, Sydney, Australia, August 9-13, 1999.

5) Sanekata T., Taniguchi K., and Utagawa E.; Isolation of group B porcine rotavirus and its pathogenicity for piglets. X1th International Congress of Virology, Sydney, Australia, August 9-13, 1999.

(1) 川本尋義、沢田春美、大山徹、斎藤博之、三上稔之、秋山和夫、篠川旦、関根大正、野口有三、杉枝正明、柴田伸一郎、山下照夫、松本和男、春木孝介、山崎謙治、大石功、池田義文、大瀬戸光明、大津隆一、大野淳、宇田川悦子、西尾：ウイルス性食中毒遺伝子検出検査指針確立と行政対応に関する研究。第40回日本臨床ウイルス学会、1999年5月、大阪市。

(2) 依田智子、寺尾由剛、山崎謙治、左近直美、大石功、宇田川悦子、奥野良信、柴田忠良：小型球形ウイルスの免疫学的方法による検出システム。第40回日本臨床ウイルス学会、1999年5月、大阪市。

3. 講演

(1) 宇田川悦子：小型球形ウイルス感染症について、日立製作所研究会、1999年9月、日立市。

平成11年度厚生科学特別研究事業分担研究報告

ウイルス性食中毒の原因究明のために試作したSRSV遺伝子（GI及びGII型）
検出用共通プライマーと同一検体を用いた全国10個所の研究機関でのSRSV
検査法の検討及びフィールド調査への応用

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 (NLV) ORF1が増幅された163株を比較検討し、NLV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。このプライマーの有用性と各地方衛生研究所の検査技術の標準化、検査方法の確立および遺伝子検出効率を検討するために、ブラインド番号法による同一サンプルの検査を全国9個所の衛生研究所と共同で行った。検査に使用したサンプルはS県の一小児科外来で散発的に発生した嘔吐下痢症患児の便材料で、このサンプルを分注後夫々の研究所へ送付し、試作した共通プライマーを用いて各研究所夫々独自の検査方法に従ってNLV遺伝子検出検査を行った。結果は、どの検査機関、どの検査方法によっても殆ど結果に差はなかった。今回の検体はNLV-GII遺伝子型に属するSRSVが殆どであった為にGIIの結果だけであったが、各地の研究所独自の検査結果を見るとGI型遺伝子も検出できている。また、Sapro-like Virus (SLV) に対しては全く反応しなかった。以上、今回試作したプライマーは何処のNLV検査方法でも効率良く検出出来ることが判明した。さらに、1997年から1999年にかけてS県で発生した嘔吐下痢症の散発事例から電頭法でSRSVが検出できた63検体を用いた検査では、従来使用してきた1st-PCR (NV35/36)、Nested-PCR (NV81/NV82, SM82)より高い陽性検出率であった。

O県で検出されたSRSVのPCR産物は、公衆衛生院で分与されたプローブを用いたハイブリダイゼーション法では遺伝子型の確定が出来なかった。そこで、当研究所においてダイレクトシークエンス法により塩基配列を確定した結果、この産物の遺伝子型があきらかとなった。

分担研究者 宇田川悦子
国立感染症研究所 主任研究員

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。

今回、全国各地で分離された175株のSRSVの遺伝子配列を比較してG1、G2型に共通したプライマーを試作した(大山、山崎)。このプライマーの有用性を調べるために、ブラインド番号を付した同一検体を夫々の研究所へ送付し、各地の研究所独自の検査方法を用いて試作プライマーによる遺伝子検出の比較を行った。また、各地の研究所で検出されたSRSV遺伝子のシーケンス及び塩基配列の解読、遺伝子型決定も分担している。

B. 研究方法

1、患者便材料：電子顕微鏡検索によりSRSV陽性となった非細菌性嘔吐下痢症患者便材料を使用した。これらの検体のうちNLVのGII型およびSLVが検出された10検体を選定し、それぞれの生便材料を全国9個所の地方衛生研究所へ分与した。この検体を用いて夫々の研究所の検査方法に則りNLV遺伝子の検出を試みた。

2、共通プライマーの作成：

昨年の本研究会で集積したSRSVの遺伝子配列180株を元に共通性の高い個所を選定しNLV GI、GII型に共通するプライマー(P1/P2/P3；分担者-大山)、Y1/Y2；分担者-山崎)を作製し、以下の実験に使用した。

3、検査方法：

<3-1、RNA抽出法>

患者10%乳剤から市販のISOGEN-LSを用いてRNAを抽出した。

<3-2、RT-PCR法>

今回試作した共通プライマーと従来から使用されてきているプライマーとの反応性の比較を各地の研究所独自の検査方法で検討した。

(a) 従来より使用されているプライマー
1st RT-PCR；

NV35/36 PCR産物は470bp

Nested PCR用；

NV81/NV82, SM82 PCR産物は330bp

(b) 今回試作した共通プライマー

1st RT-PCR；

P1/P2 PCR産物は325bp

P1/P3 PCR産物は237bp

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直接シーケンス法により塩基配列を解析した。

また、各地の衛生研究所においてPCR法で検出されたが従来指導されているマイクロプレート使用ハイブリダイゼーション法で遺伝子型別の同定が出来なかったPCR産物について、ダイレクトシーケンス解析を行い塩基配列を同定し遺伝子型を確定した。その後、各地の衛生研究所へデーターを還元した。

<3-4、遺伝子配列解析>

Gene Worksを用いてUPGMA-tree法により比較検討した。

C. 研究結果

1、昨年の本研究班において全国各地の衛生研究所との共同研究で各地で検出された175株のSRSSV遺伝子のうちORF1が増幅できた163株について塩基配列を比較し大山班員、山崎班員がポリメラーゼ領域の遺伝子を増幅するSRSSV; NLV(GI型及びGII型)に共通するプライマー(5種類)を夫々設計した。そこで、プラインド番号をつけた嘔吐下痢症患者の同一検体を各地の研究所で夫々の検査方法に則り検査することでこのプライマーの有用性、検出効率、夫々の検査方法の差異等の検討を行った。今回検査に供した検体は残念ながらNLV-GI型は含まれていないが、NLV-GII(8株)またはSLV(2株)のSRSSVが既に検出されている10検体である。各地の結果を見ると、SLVのSRSSVはいずれの研究機関でもこれらの共通プライマーでは遺伝子が増幅されず陰性であった。一方、NLV-GII型に関してはMR3/4で陽性の検体でも検査機関によっては陰性となってしまった機関があった。

2、1997年10月から1999年4月までに収集したS県の一小児科外来を受診した嘔吐下痢症患者便材料中のSRSSV検出を従来のプライマーと今回試作したプライマーの両方で検査し、検出率を比較検討した。今回検査した検体は、97年11月から99年4月までの143検体で、電顕法でSRSSV陽性は63検体(陽性率44%)であった。バキュロ発現抗原感作ウサギ血清を使用したEIA法で、NLV-GI型に属する遺伝子型を見るとNLV-GI-2型が2株、NLV-GI-4型が1株、一方、NLV-GII型では、NLV-GII-1株(2株)、NLV-GII-5型(1株)、NLV-GII-7型(1株)であった。また、従来使用している1st-PCRがNV35/36およびNested-PCR法がNV81/SM82, NV82での陽性率は35%であった。これと比較して、今回

試作したP1/P2, P3およびY1/Y2のプライマーでの1st-PCRの検出率は40%とやや高かった。

3、今回検査した代表的な株を用いてRT-PCR法により各遺伝子を検出しダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。その結果、バキュロウイルス発現蛋白により高度免疫ウサギ抗血清を用いたEIAによる血清型とORF2遺伝子による塩基配列の分類の結果は良く一致した。

4、〇県から依頼されたPCR産物についてダイレクトシーケンス法により遺伝子解析を試みた。この産物は、従来のプライマー(1st-PCR NV35/36, Nested-PCR NV81/NV82.SM82)を用いて検出されたものであるが、公衆衛生院から分与されたプローブを用いたハイブリダイゼーション法では反応せずこの産物の遺伝子型を決定できなかった。そこで、当研究所に送られてきた産物についてダイレクトシーケンス法によりその遺伝子の塩基配列を決定後、標準株と比較した結果、NLV-GII型であった。

D. 考察

我が国で発生した嘔吐下痢症患者から得られたSRSSV175株のうちORF1が増幅できた163株の塩基配列比較からNLV遺伝子型GI, GIIに共通するプライマーを試作した(分担研究者; 大山、山崎)。この共通プライマーの有用性を検討するために、各地の衛生研究所と共同でNLV-GII型のとSLVのSRSSV合計10株について夫々の研究所の検査法を用いて検査した。検査した結果は、SLVに関してはこのNLV-GI型及びNLV-GII型共通プライマーは全く反応せずこの結果は全ての研究所で一致していた。一方、NLV-GII型については陽性例であっても研究所によりSRSSV陽性の検体であるにもかかわらず

陰性を示す結果となった研究所もあった。そこで各研究所の検査方法を比較したところSRSSV-RNA遺伝子からDNAを転写する際（逆転写反応する時点）で使用するプライマーの違いが浮き彫りとなった。陰性となった研究所ではランダムプライマーを使用する傾向があった（同一検体を一度に複数のプライマーで増幅するには理論上有効な手段と考えられているし、現実的な検査方法であろうと考えられてきている）。しかし、特異性等の点でみると、各検査チューブ毎にプライマーを変えて検査する方法がランダムプライマー法よりも陽性率は高かった。手間を考えると煩雑なような気がするが再検査するよりも簡単であろう。また、今回試作した共通プライマーを使用することで従来法と比較して同一検体からの検査本数を軽減することが可能であり、しかもSRSSV検出率も高いことから今後の臨床レベルでのSRSSV検査に大いに有用と考えられる。

今までに使用を進められているマイクロプレート使用ハイブリ法による遺伝子型の確定は遺伝子の変化に対応しきれていないのが現状のようである。即ち、塩基配列の一部に変異が挿入あるいは削除された場合、ハイブリ法では同定が出来ない事例が散見された。一方、ハイブリ法で確立できなかった遺伝子型はシークエンス法で確定できた。これらの結果から、今後ともマイクロプレート使用ハイブリダイゼーション法とシークエンス法を併用して検討することが望ましい。また、もし今後とも確定診断法としてハイブリ法を使用する必要があるならば、どの遺伝子型にも対応できるような共通プローブの開発や遺伝子の変異に対応できるようなハイブリ法用プローブの検討が急務であろう。

E. 結論

厚生行政に対応できるSRSSV検出法の開発が急務とされているが、今回簡便で再現性のよいNLV遺伝子検出用共通プライマーの試作を行い実際の検体について全国各地の研究所との共同研究として検査した。従来法での結果と比較しても検出率が高く、かなり効率よくSRSSV遺伝子が検出できた。わが国で発生する食中毒事件のうちSRSSV関連の事件については、共通プライマーによるRT-PCR法を用いることで近い将来全国各地の地方衛生研究所や他の検査機関等においても簡単に原因究明が可能となるであろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Detection and Nucleotide Sequence Analysis of Human Caliciviruses (HuCVs) from Samples in Non-bacterial Gastroenteritis Outbreaks in Hokkaido, Japan. : Tohru Oyama, Shima Yoshizumi, Harumi Sawada, Yasuhiro Uchiyama, Yoshinobu Katoh, Naohiro Hamaoka and Etsuko Utagawa. *Microbiol. Immunol.*, 43 (6), 543-550, 1999

(2) Expression of recombinant Norwalk-like Virus Capsid Proteins Using a Bacterial System, and the Development of Its Immunological Detection.: Tomoko Yoda, Yoshitake Terano, Akira Shimada, Sadahiko Suzuki, Kenji Yamazaki, Naomi Sakon, Isao Oishi, Etsuko Utagawa, Yosinobu Okuno and Tadayosi Shibata. *Journal of Medical Virology*.

2. 学会発表

1) Oishi I, Yamazaki K, Sakon N, Oseto M, Seto Y, Utagawa ET and Okuno Y. : Genotypic distributions of Norwalk-like viruses (NLVs) in Japan, 1982-1995. International Workshop on Human Caliciviruses, Atlanta, USA, March 29-31, 1999.

3. 講演

2) Utagawa ET, Kojima T and Oseto M. :
Detection of Serotypes 1-4 Human
Astroviruses in Clinical Specimens by A new
Latex Agglutination Methods.
: X1th International Congress of Virology ,
Sydney, Australia, August 9-13, 1999.

3) Kawamoto H, Ohyama T, Yamazaki K,
Seto S, Saito H and Utagawa ET :
Sequence diversity of human caliciviruses
(HuCVs) from samples in non-bacterial
gastroenteritis outbreaks in Japan, 1989 to
1998. X1th International Congress of
Virology , Sydney, Australia, August 9-13,
1999.

4) Yoda T., Terano Y., Suzuki Y., Yamazaki
K., Sakon N., Oishi I., Utagawa E.,
Okuno Y., and Shibata T.: Expression of
Norwalk-like Virus (NLV) capsid proteins
in a bacterial system and development of
immunological detection for NLV antigen.
X1th International Congress of Virology ,
Sydney, Australia, August 9-13, 1999.

5) Sanekata T., Taniguchi K., and Utagawa
E.; Isolation of group B porcine rotavirus
and its pathogenicity for piglets. X1th
International Congress of Virology , Sydney,
Australia, August 9-13, 1999.

(1) 川本尋義、沢田春美、大山徹、斎藤博
之、三上稔之、秋山和夫、篠川旦、関根大
正、野口有三、杉枝正明、柴田伸一郎、山
下照夫、松本和男、春木孝介、山崎謙治、
大石功、池田義文、大瀬戸光明、大津隆
一、大野淳、宇田川悦子、西尾：ウイルス
性食中毒遺伝子検出検査指針確立と行政対
応に関する研究。

第40回日本臨床ウイルス学会、1999
年5月、大阪市。

(2) 依田智子、寺尾由剛、山崎謙治、左
近直美、大石功、宇田川悦子、奥野良信、
柴田忠良：小型球形ウイルスの免疫学的方法
による検出システム。第40回日本臨床
ウイルス学会、1999年5月、大阪市。

(1) 宇田川悦子：小型球形ウイルス感染
症について、日立製作所研究会、1999
年9月、日立市。

全国 NLVs (SRSV) 遺伝子解析および Consensus プライマー (P/Y 系) の検出効率

東京農大 生物産業学部 大山 徹

まとめ

1989 年から 1998 年の間、日本全国から提供された Norwalk-like viruses (NLVs) 合計 177 株の RNA polymerase 領域の塩基配列を解析した。塩基配列は各株間で 60-100% identity が見られ、多様性が示された。Homology 解析の結果、塩基配列の約 90% はいわゆる Genogroup II に属し、残り 10% は Genogroup I に分類された。Genogroup II に属する株はさらに 70% 以上の identity を持つ 3 群の cluster、即ち、SMA/Bristol cluster、TV/MX cluster および新たに日本に特有な JP cluster に分類することが出来た。また、multiple alignment の解析から、現在日本で流行している NLVs を幅広く検出するための新規 Consensus プライマーセット、P1/P2、P1/P3 および Y1/Y3 を設計した。これらプライマーセットの検出効率を評価するため、国立感染研より、検定用の 10 糞便試料が全国の 9 カ所の地方衛生研究所のウイルス試験室に送付された。その結果、良好な結果が得られ、日常

の NLVs 検査業務に使用可能であり、食品や環境試料から NLVs の直接検出に有用であると考えられた。

緒言

日本では、別々にこれまでに多くの種類のプライマーセットが NLVs 検査に使用されている。しかしながら、日本での NLVs はかなりの変異が見出されており(1,2)、従来のプライマーでは NLVs の検出範囲は比較的狭いように思われる。実際、Kawamoto ら(3)は北海道から沖縄から全国から集められた 902 試料の調査結果から、RT-PCR による検出率を 58% と報告している。Green ら(4)は 1995 年に UK 特異的プライマーの設計により、90% 以上の検出率を示し、このことは、地域に特異的な Consensus プライマーを用いることにより、検出率を大幅に改善出来ることを示した。今回、我々は日本で分離された 177 株の NLVs の塩基配列を基に、Consensus プライマーの設計

し、各地研によるその検出効率の評価について報告する。

方法

Sequence の収集および解析

1989年から1998年の間に全国の集団あるいは散発事例より分離された NLVs の中から、16カ所（北海道、青森県、宮城県、新潟県、東京都、横浜市、静岡県、愛知県、名古屋市、岐阜県、大阪府、大阪市、広島県、愛媛県、福岡県および国立感染研）の衛生研究所において塩基配列が決定された190株の塩基配列が集められた。このうち、177株が ORF-1 の領域で、残りは ORF-2 および ORF-3 の領域であった。塩基配列の長さは各試験室で用いられるプライマーの種類により、430-bp (MR-3/4) および N36/N35、330-bp (Yuri-22F/R) 290-bp (SM82/NV81)、80-bp (SR45/SR33) と異なっていた。

多くの塩基配列は PCR 産物から直接得られ、いくつかはクローニングにより決定された。塩基配列の解析

は GeneWorks (帝人)、MacVector (Oxford Molecular) を用いて行い、Dendrogram は UPGMA 法を用いて作成した。

Consensus プライマーおよび検出率の評価

塩基配列の長さが290-bp以上の141株について multiple alignment を行った。P1 および Y1 は 340-bp、P2 および Y2 は 290-bp、P3 は 430-bp の塩基配列を基に consensus 領域から設計した。例として P2 および P3 プライマーについての設計を表 1 に示す。各プライマーは広範囲に検出できるように、塩基が一部重複する mixed タイプとした。プライマーの配列、prototype の Norwalk virus (NV) の配列に対応した位置および各 prototype strain (TV, SMA, Toronto virus, Yuri strain) に対する identity を表 2 に示す。

表 2 Consensus プライマーの配列および Prototype strain との Identity 比較

Primer	Sequence	Identity with prototype strains, and corresponding nucleotide numbers*							
		Polarity	NV	SMA	TV	Yuri			
P1	5'-gct gat tac tct (c/g)g(c/g) tgg ga-3'	+	68% (4408-4427)	90% (60-79)	90% (58-77)	90% (62-81)			
P2	5'-aca cag agt gag (c/g)a(a/g) cca gtg-3'	-	71% (4714-4733)	83% (276-296)	95% (274-294)	70% (278-298)			
P3	5'-gt(a/g) (c/g)tc aca at(c/t) tca tca tc-3'	-	76% (4624-4644)	90% (366-385)	96% (364-383)	90% (368-387)			
Y1	5'-tgg gac tea aca ca(a/g) cag ag-3'	+	81% (4423-4443)	95% (75-94)	85% (73-92)	95% (77-96)			
Y2	5'-tca ga(a/c) ag(g/t) gca ca(c/g) aga gt-3'	-	100% (4635-4655)	90% (288-307)	100% (286-305)	85% (290-309)			

プライマーセット P1/P2、P1/P3 および Y1/Y2 によって各々 326-bp、

プライマーセット P1/P2、P1/P3 および Y1/Y2 によって各々 326-bp、237-bp および 233-bp の PCR 産物が得られる。また、これらのプライマーおよび従来用いられたプライマーの相対的位置と NV の塩基配列に対応する番号を図 1 に示す。

国立感染研により Consensus プライマーが合成され、全国 9 カ所のウイルス試験室に 10 検体の試料（糞便）とともに検定のために送付された。RT-PCR 法による NLV 検出は各々の試験室で通常用いられている方法に従って行われた。大部分の試験室では、RT 反応のプライマーに P3 あるいは Y2 が使用されたが、一部では Random あるいは Oligo(dT)プライマーが使用された。RT 用の酵素には M-MLV RTase (Toyobo)、AMV-Rtase (Behringer, TaKaRa)、SuperScrip II (Gibco)、MuLV-Rtase (PE)などが使用されていた。また、PCR の Taq DNA polymerase には Toyobo、PE、TaKaRa、Nippon Gene、Boheringer などが使用されていた。また、One tube RT-PCR system (Titan)を使用した試験室もあった。

送付 10 試料のうち、2 番と 4 番は Sapporo-like viruses (SLVs)であり、残りは NLV に属する。NLVs の遺伝子的分類は国立感染研により行われ、その内訳は表 3 に示す通りである。

結果および考察

遺伝子解析および *Cluster* 分類

RNA polymerase 領域の塩基配列長が各地研により違いがあったので、alignment を 4 つのグループ、430-bp (35 株)、330-bp (66 株)、290-bp (141 株) および 80-bp (177 株) に分けて行った。いずれの alignment も株間において 60 から 100% の identity を示し、日本における NLVs に大きな多様性が認められた。また、明らかに地理的に離れた場所での事例からの塩基配列が完全に同一の例（北海道、大阪市、福岡県）もいくつか見られた。また、広島県の 3 株は Bristol virus と同じであった。NLVs による食中毒事例の多くが汚染された生カキに由来し、それから人から人へと拡がって起こると考えれば、日本における NLVs の strain は食品（主として生カキ）の流通機構によって拡がっていると考えられる。

141 株の 290-bp の塩基配列および代表的な NLVs の塩基配列を基に UPGMA 法を用いて Dendrogram を作成した。図 2 に示すように、70%以上の identity を有する集団を cluster として 4 つに分類された。即ち、一つは NV cluster (13.6%) であり、いわゆる Genogroup I に該当するものであ

り、二つは SMA/Bristol cluster (31.6%) および、TV/MX cluster (39.5%) であり、いずれも古典的には Genogroup II に属するものであった。このことは日本で最近見出される NLVs の大部分が Genogroup II に属しているとする報告(6)と一致する。しかし、もう一つの JP cluster (16.3%) は Genogroup II に属すると考えられるが、Blast Search による検索から 90% の identity を有していたのは、米国および UK で各 2 株、ドイツ、カナダ、オランダ、ノールウェイで各 1 株と非常に少なかった。従って JP cluster は日本固有と考えられた。また、Yuri strain (5) はこれらの cluster には分類されず、新たな cluster が必要かもしれない。

Consensus プライマーの設計および検出率

多くの場合、RT-PCR や nested PCR を用いて NLV を検出する場合、その正否は用いるプライマーセットに依存する。これまでに日本において NLVs の検出に NV、SMA、TV あるいは Yuri strain の配列を基にしたプライマーが使用されてきた。しかしながら年々日本で見出される NLVs の塩基配列の多様性が知られるようになり(6)、従来のプライマーの有用性には限界があり、新たな幅広い反応

性、感度を持つプライマーの開発が必要と考えられた。そのために、これまで塩基配列の決定された NLVs の遺伝子解析により、Consensus プライマーの開発を試みた。

塩基配列の Multiple alignment の結果から、P1 および Y1 は保存されたアミノ酸配列モチーフ ADYSRW 上に設計され、これらは一部が SM82 と重複していた。P2 および Y2 は HWIITLC モチーフ上に設計され、SR45 の直ぐ上流に位置していた。P3 は DDEIVST モチーフ上にあり、SR33 と非常に近い位置にあった。表 4 に示すように、これらプライマーは prototype の NV、SMA、TV および Yuri に対して 68-100% の identity を示した。さらに、プライマーの 3'側の 5 ないし 6 塩基は全ての NLVs の塩基配列に対して一致するように設計されている (表 1)。

送付された試料についてプライマーの検出効率を各地研によって調べられた結果を表 3 に示す。2 番と 4 番は SLVs であり、当然 Consensus プライマーでは検出されず、多くの試験室での NLV の検出は比較的良好な結果であった。しかしながら、いくつかの試験室では、検出されなかったが、恐らく少量のウイルスからの RNA 抽出あるいは最初の RT 反応のプライマーを Random あるいは

oligo(dT)プライマーを使用した結果かもしれない。いずれにしても、RNA抽出法、RT 反応などの標準化の確立がこの Consensus プライマーを使用し、て完全な NLVs の検出のために必要であると考えられる。

平成 11 年度厚生科学ウイルス性食中毒研究班のいくつかの報告の検出比較結果から、3 組のプライマーセットの内、P1/P3 のセットが幾分効果的であるように思われる。このセットでは 326-bp と比較的長い配列のため、今後の NLVs 遺伝子の変異を追跡するのに有利であり、将来の再度

Consensus プライマーの設計に必要な情報が得られると考えられる。

謝辞

この報告のため、全国の地方衛生研究所（北海道、青森県、宮城県、新潟県、東京都、横浜市、静岡県、愛知県、名古屋市、岐阜県、大阪府、大阪市、広島県、愛媛県、福岡県）および国立感染研から貴重な塩基配列データの提供があり、また、新規プライマーの評価をしていただいた各地研の班員に感謝いたします。

文 献

(1) Matsuno S, Sawada R, Kimura K, Suzuki H, Yamanishi S, Shinozaki K, Sugieda M, Hasegawa A. 1997. Sequence Analysis of SRSV in Fecal Specimens from an Epidemic of Infantile Gastroenteritis, October to December 1995, Japan. *J. Med Virol* **52**:377-380

(2) Ohya T, Yoshizumi S, Sawada H, Uchiyama Y, Katoh Y, Hamaoka N, Utagawa E. 1999. Detection and Nucleotide Sequence Analysis of Human Caliciviruses (HuCVs) from Samples in Non-Bacterial Gastroenteritis Outbreaks in Hokkaido, Japan. *Microbiol Immunol* **43**:543-550

(3) Kawamoto H, Sawada H, Sekine H, Shibata S, Haruki T, Akiyama K, Ikeda Y, Otsu R. 1999. A Nation-Wide Survey of Food-Borne Viral Gastroenteritis for Human Caliciviruses (HuCVs; Small Round Structured Viruses; SRSVs, Norwalk-Like Viruses; NLVs) in Japan. XIth International

Conference of Virologists Societies, Sydney, Australia, 9-13 August.

(4) Green J, Gallimore CI, Norcott JP, Lewis D, Brown DWG. 1995. Broadly Reactive Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of SRSV-Associated Gastroenteritis. *J Med Virol* **47**:392-398

(5) Saito H, Saito S, Kamada K, Harata S, Sato H, Morita M, Miyajima Y. 1998. Application of RT-PCR Designed from the Sequence of the Local SRSV Strain to the Screening in Viral Gastroenteritis Outbreaks. *Microbiol Immunol* **42**:439-446

(6) Yamazaki K, Oseto M, Seto Y, Utagawa E, Kimoto T, Minekawa Y, Inouye S, Yamazaki S, Okuno Y, Oishi I. 1996. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Detection and Sequence Analysis of Small Round-Structured Viruses in Japan. *Arch Virol Suppl* **12**:271-276

表1 ConsensusプライマーP2およびP3の設計

3'-P2 Primer sequence (Reverse)-5'

Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	Mismatch	Cluster
P2 Primer sequence	C	A	C	T	G	G	(CT)	T	(GC)	C	T	C	A	C	T	C	T	G	T	G	T		
Amino acid sequence	H		W			I		I		T		L		C									
OSK45,FUK03,04	C	A	C	T	G	G	A	T	A	A	T	C	A	C	C	C	T	T	T	G	T	5	NV
Norwalk	C	A	C	T	G	G	A	T	A	A	T	T	A	C	T	C	T	C	T	G	T	4	
HKD17	C	A	T	T	G	G	T	T	A	A	T	A	A	C	T	C	T	G	T	G	T	4	
HKD13	C	A	C	T	G	G	C	T	A	A	T	C	A	C	T	C	T	C	T	G	T	2	
HKD16	C	A	C	T	G	G	A	T	C	C	T	T	A	C	T	C	T	G	T	G	T	2	
HKD01	C	A	C	T	G	G	A	T	C	C	T	A	A	C	T	C	T	A	T	G	T	3	
FUK01,OSK53,MX,Toronto	C	A	C	T	G	G	T	T	G	C	T	T	A	C	T	C	T	G	T	G	T	2	TV/MX
HKD03,15,19,EHM01,10	C	A	C	T	G	G	T	T	G	C	T	T	A	C	T	T	T	G	T	G	T	2	
HRS23	C	A	C	T	G	G	T	T	G	C	T	C	A	C	T	T	T	G	T	G	T	0	
NGY01,02	C	A	C	T	G	G	A	T	T	T	T	G	A	C	C	T	T	G	A	G	T	5	JP
HKD06	C	A	C	T	G	G	A	T	C	T	T	G	A	C	T	T	T	G	A	G	T	3	
HKD02,08,10,14	C	A	C	T	G	G	A	T	T	C	T	A	A	C	T	C	T	G	A	G	T	3	
OSK39,44,FUK02,HRS12	C	A	C	T	G	G	A	T	C	C	T	G	A	C	C	C	T	C	A	G	T	3	
HKD09,12,11	C	A	C	T	G	G	C	T	A	C	T	C	A	C	A	C	T	G	T	G	T	2	
SMA	C	A	C	T	G	G	C	T	C	C	T	C	A	C	A	C	T	C	T	G	T	1	
HKD18,EHM02,Bristol	C	A	C	T	G	G	C	T	C	C	T	C	A	C	T	C	T	C	T	G	T	0	
HKD04	C	A	C	T	G	G	C	T	C	C	T	C	A	C	C	C	T	C	T	G	T	1	
HRS09,10,11,18,HKD05	C	A	C	T	G	G	C	T	T	C	T	C	A	C	T	C	T	C	T	G	T	1	
OSK36,41,51	C	A	C	T	G	G	C	T	C	C	T	C	A	C	C	C	T	T	T	G	T	2	
HKD07,20	C	A	C	T	G	G	C	T	C	C	T	C	A	C	C	C	T	T	T	G	T	2	
HRS13	C	A	C	T	G	G	C	T	C	C	T	C	A	C	A	C	T	C	T	G	T	1	
	C	A	C	T	G	G	C	T	A	A	T	A	A	C	A	C	T	G	T	G	T	4	

3'-P3 Primer sequence (Reverse)-5'

Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Mismatch	Genotype
P3 Primer sequence	G	A	T	G	A	T	G	A	(AG)	A	T	T	G	T	G	A	(CG)	(C/T)	A	C		
Amino acid sequence	D		D			E			I			V			S		T					
OSK45,FYK04,FUK03	G	A	T	G	A	T	G	A	G	A	T	C	G	T	A	T	C	A	A	C	4	NV
Norwalk	G	A	T	G	A	T	G	A	G	A	T	T	G	T	G	T	C	A	A	C	2	
HKD17	G	A	T	G	A	T	G	A	A	A	T	A	G	T	G	T	C	A	A	C	3	
HRS21,HKD13	G	A	T	G	A	C	G	A	G	A	T	A	G	T	A	T	C	A	A	C	5	
HKD01	G	A	T	G	A	T	G	A	A	A	T	A	G	T	C	T	C	A	A	C	4	
HKD16	G	A	T	G	A	T	G	A	G	A	T	A	G	T	C	T	C	C	A	C	3	
NGY01,NGY02,HKD06	G	A	T	G	A	T	G	A	G	A	T	T	G	T	G	A	G	C	A	C	0	JP
HKD10,HKD08,HKD02	G	A	T	G	A	T	G	A	G	A	T	C	G	T	T	A	G	C	A	C	2	
OSKs9,FUK02,OSK44	G	A	T	G	A	T	G	A	A	A	T	A	G	T	C	A	G	C	A	C	2	
HKD11,HKD12,HKD09	G	A	T	G	A	T	G	A	A	A	T	T	G	T	G	A	G	C	A	C	0	
HKD05	G	A	T	G	A	T	G	A	A	A	T	T	G	T	T	A	G	T	A	C	1	SMA/BV
Bristol	G	A	T	G	A	T	G	A	A	A	T	T	G	T	C	A	G	T	A	C	1	
HKD04	G	A	T	G	A	T	G	A	A	A	T	T	G	T	G	A	G	C	A	C	0	
OSK41,06,51,HKD07,20	G	A	T	G	A	T	G	A	G	A	T	T	G	T	G	A	G	C	A	C	0	
SMA	G	A	T	G	A	T	G	A	A	A	T	C	G	T	A	A	G	T	A	C	2	
HRS16,20;HKD15,19,OSK53;FUK Toronto	G	A	T	G	A	T	G	A	G	A	T	T	G	T	G	A	G	C	A	C	0	TV/MX
Mexico	G	A	T	G	A	T	G	A	G	A	T	A	G	T	G	A	G	T	A	C	1	
	G	A	T	G	A	T	G	A	A	A	T	A	G	T	C	A	G	C	A	C	2	

表 3 検定用試料に対する Consensus プライマーの検出率

Primer pair	Laboratory										Clustering	
	Sample No.	NIH/JP	HKD	AOM	AKT	AIC	NGY	GIF	OSK-P	OSK-C		EHM
P1/P2	1	+	+	+	-	+	+	(+)	+	+	+	NLV (SMA cluster)
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SLV (Manchester)
	3	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	NLV (SMA cluster)
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SLV (Parkvill)
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	NLV (SMA cluster)
	6	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	NLV (SMA cluster)
	7	+	+	+	+	+	-	-	+	(+)	+	NLV (SMA cluster)
	8	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	NLV (TV cluster)
	9	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	NLV (SMA cluster)
	10	+	+	(+)	-	-	-	-	+	-	-	NLV (TV cluster)
P1/P3	1	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	NLV (SMA cluster)
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SLV (Manchester)
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	NLV (SMA cluster)
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SLV (Parkvill)
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	NLV (SMA cluster)
	6	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	NLV (SMA cluster)
	7	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	NLV (SMA cluster)
	8	+	+	+	+	+	-	(+)	+	+	+	NLV (TV cluster)
	9	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	NLV (SMA cluster)
	10	+	+	(+)	+	-	-	-	+	-	-	NLV (TV cluster)
Y1/Y2	1	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	NLV (SMA cluster)
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SLV (Manchester)
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NLV (SMA cluster)
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SLV (Parkvill)
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NLV (SMA cluster)
	6	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	NLV (SMA cluster)
	7	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	NLV (SMA cluster)
	8	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	NLV (SMA cluster)
	9	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	NLV (TV cluster)
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NLV (SMA cluster)

(+); weak signal

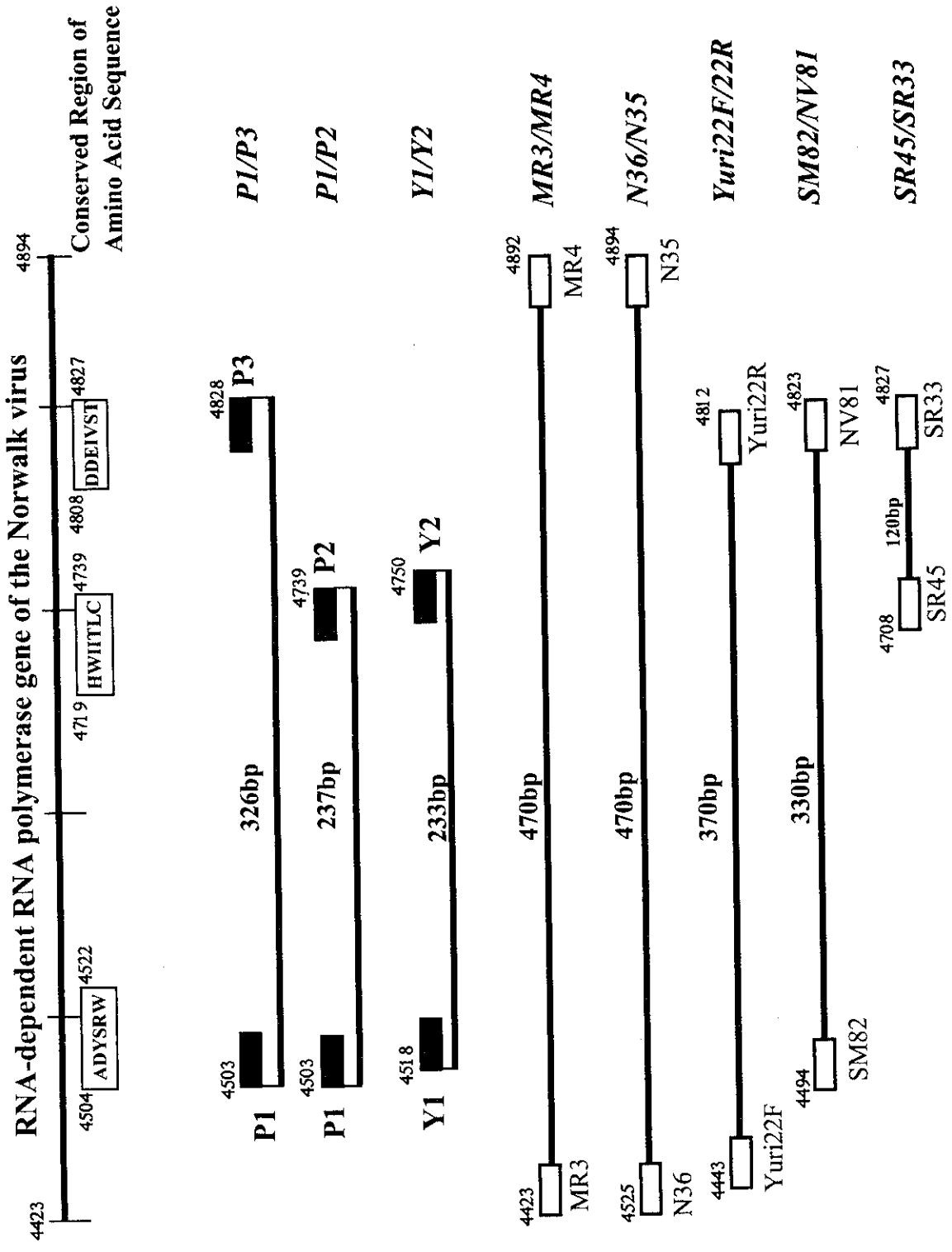


図1 Consensusプライマーおよび従来型プライマーの位置

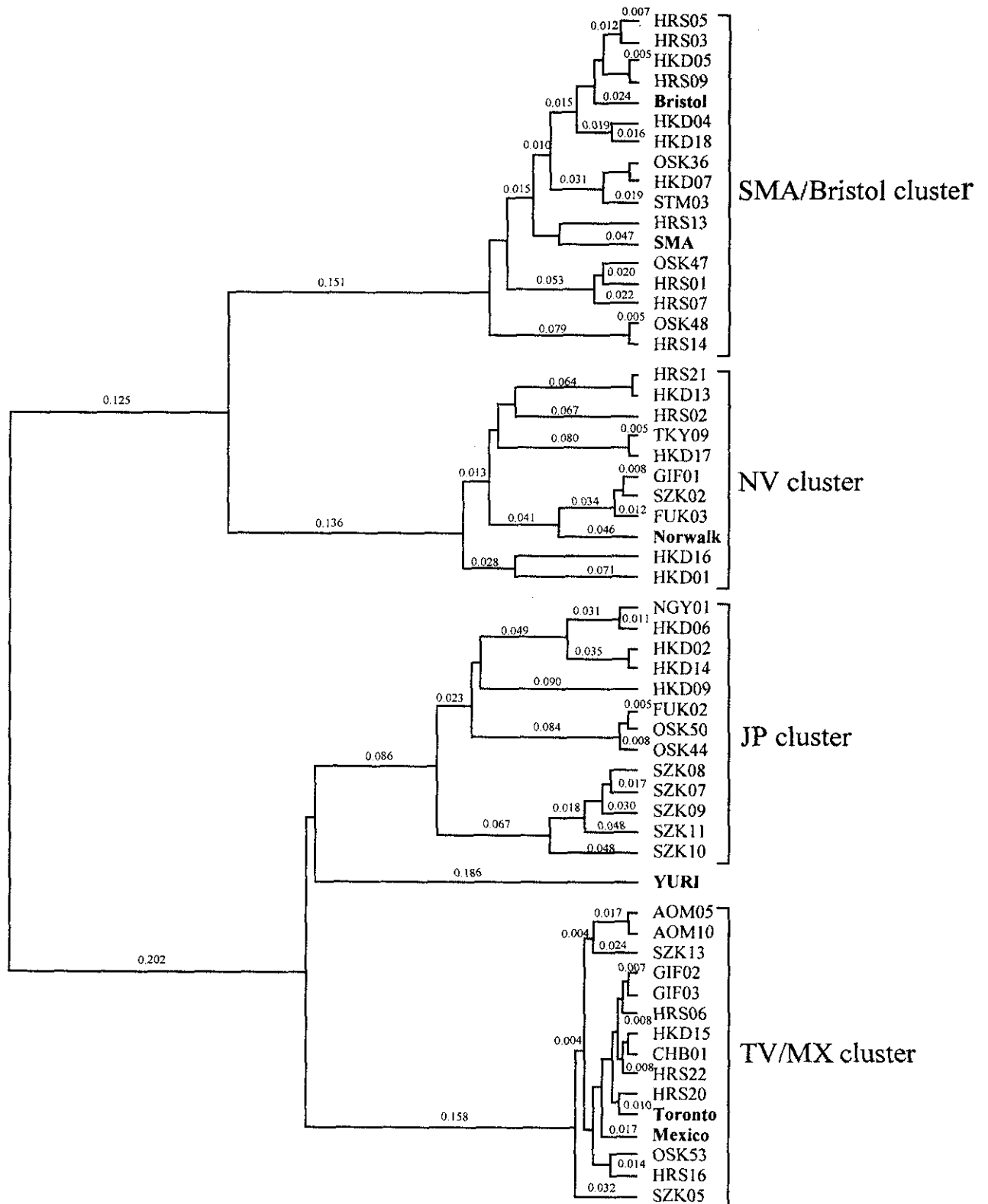


図2 UPGMA法によるDendrogram

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
——全国の下水处理施設における大腸菌群および大腸菌ファージの調査——

分担研究者 大垣眞一郎 東京大学大学院工学系研究科教授
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

全国 6 個所の下水処理場の流入水および塩素消毒前の下水処理水、および下水処理水の流入地点の上流および下流の河川水を調査対象として、1999 年 8 月から 2000 年 2 月までの期間に月一度の割合で大腸菌群および F 特異大腸菌ファージの濃度を測定し、地域特性および季節変動を調べた。塩素処理を含まない下水処理工程における F 特異大腸菌ファージの除去率は概して 99.9%を示した。

目的

腸管系ウイルスは、ヒトの糞便から下水処理場を経て自然環境中に排出され、そこで主にカキなどの水中の生物内に蓄積してから、再びヒトに摂取されるという感染サイクルを持つ。この感染経路を断つためには、下水処理場におけるウイルスの制御は極めて重要であるが、その知見は十分とは言いがたい。本研究では、全国 6 個所の下水処理場の流入水および塩素消毒前の下水処理水、および下水処理水の流入地点の上流および下流の河川水を調査対象として大腸菌群、F 特異大腸菌ファージの存在状況を調査し、それら指標微生物の地域特性および季節変動に関する知見を得ることを目的とする。

材料と方法

試料水：北海道、秋田、静岡、岐阜、那覇および宜野湾の下水処理場の流入水、塩素未添加の処理水を用いた。また、大阪の下水処理水の流入地点の上流および下流の河川水を試料として用いた。北海

道、岐阜は雨水を含む合流式下水道であり、静岡、那覇、宜野湾は雨水を含まない分流式下水道である。

大腸菌群数：デソキシコレート培地（栄研社製）を用いて測定を行った（上水試験方法、1993）。供試液量は、10ml もしくは 1ml とした。

F 特異大腸菌ファージ：宿主菌としては *Salmonella typhimurium* WG49 を用いた。河川水は試料 100ml を 2 倍濃度の寒天培地を用いた単層寒天法で、その他の試料は 1ml を単層寒天法でそれぞれ測定した。河川水は得られた溶菌斑数の合計を 100ml 中のファージ数とした。

なお、*salmonella* ファージを測定する際に宿主に用いるものに *salmonella typhimurium* WG45 がある。WG49 はこの WG45 に大腸菌の F 絨毛を組み込んだ宿主菌である。WG49 は、F 特異大腸菌ファージに感受性を持つが、体表面吸着大腸菌ファージには感受性を持たず、*salmonella* ファージには感受性を持つという特徴を有している。環境水中

に *salmonella* フェージはほとんど存在しないので、この WG49 は環境水中から主に F 特異大腸菌フェージを検出することができる。実験条件の詳細は ISO²⁾ に従った。

結果

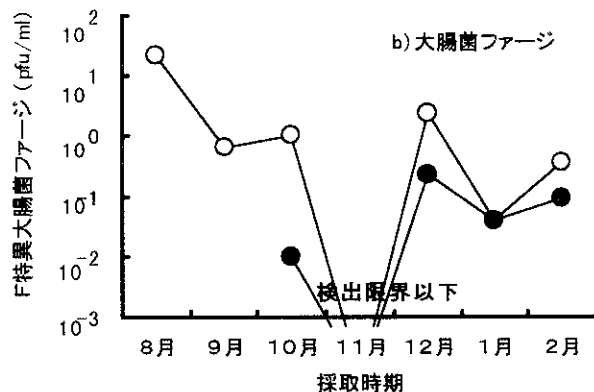
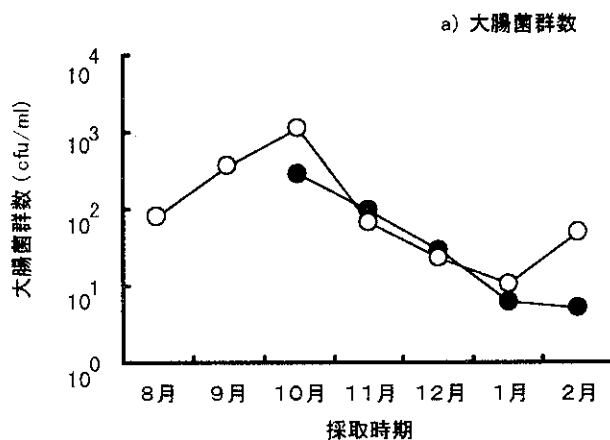
河川水中の大腸菌群および F 特異大腸菌フェージの濃度を Fig.1 に示した。大腸菌群の方が F 特異大腸菌フェージより高い濃度で検出されている。大腸菌フェージに関しては、下流側において高濃度になる傾向が見られ、下水処理水の流入によってフェージの流入があることが示唆されている。

下水処理場における大腸菌群および F 特異大腸菌フェージの消長を Fig.2、Fig.3 にそれぞれ示した。流入水の大腸菌群数(Fig.2a)は、北海道および静岡の処理場において他の処理場に比べて小さい値を示すことが多かった。なお、流入水において北海道の試料と冬季の試料の大腸菌群数が低くなる傾向が見られ、気温が低いと大腸菌群数が小さくなる可能性が考えられる。ただし、北海道の下水流入水は雨水を含む合流式であるため、他の処理場と単純な比較はできない。処理水においては、塩素消毒前の段階でおおむね 3000cfu/ml 以下の値を示していた(Fig.2b)が、大きくばらついていた。塩素消毒前の下水処理水と流入水の大腸菌群数の比を大腸菌群の下水処理工程における残存率として Fig.2c に示した。ほとんどの試料では 10^{-4} から 10^{-2} の間を示しているが、秋田および静岡の試料において 10^{-4} より低い残存率を示す場合があった。

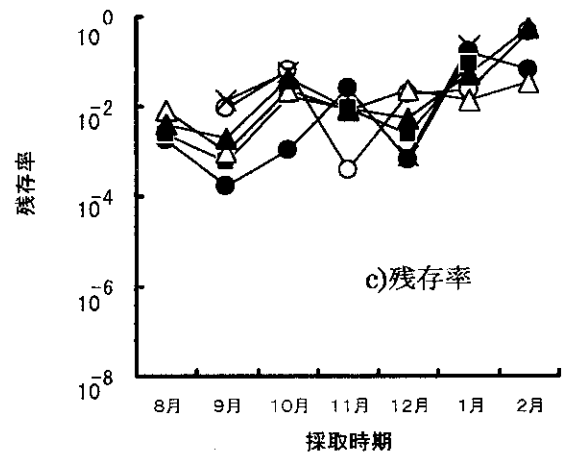
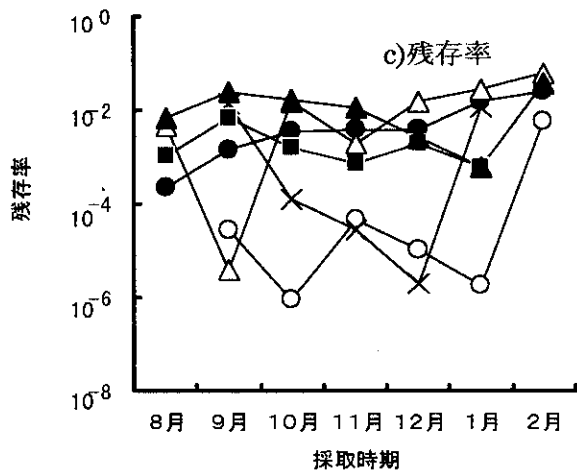
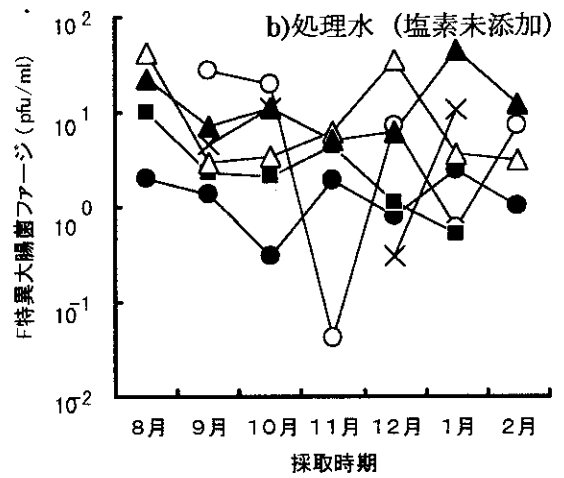
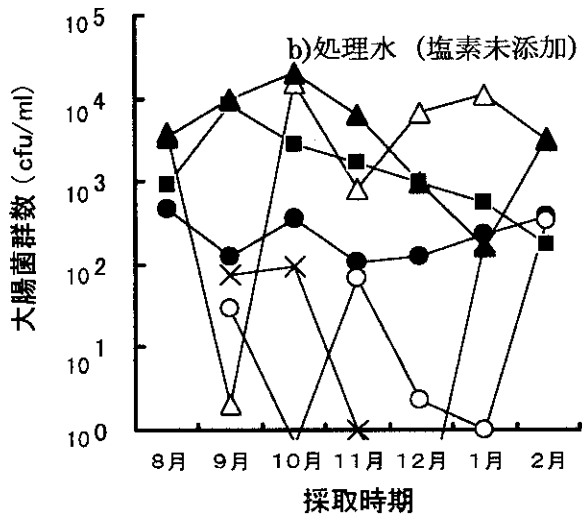
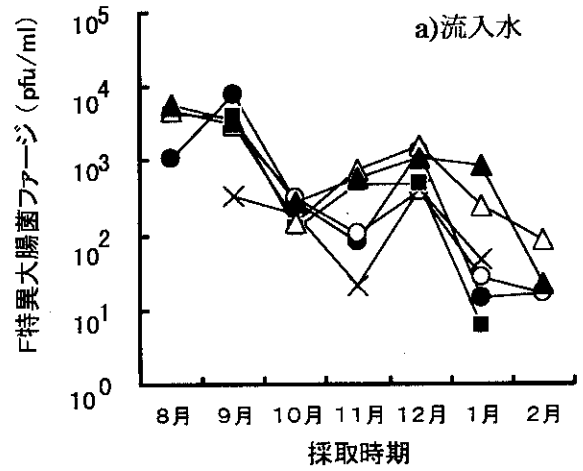
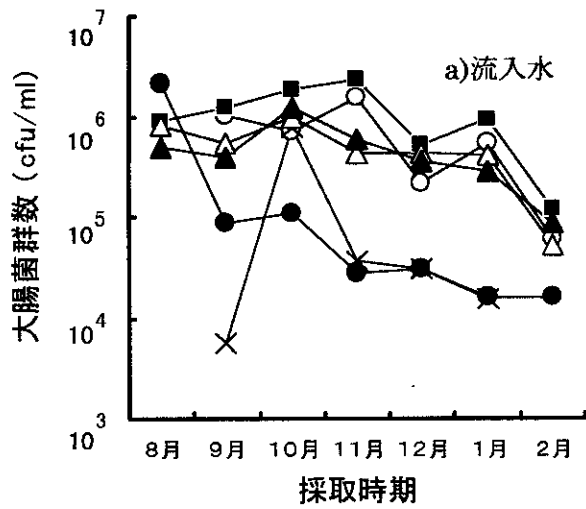
Fig.3a に大腸菌フェージの流入水中

の濃度を示した。大腸菌群より小さい値を示している。また、夏から冬にかけて濃度が減少する傾向が見られた。塩素添加前の処理水では、おおむね 100pfu/ml 以下の値を示している(Fig.3b)。また、残存率が 10^{-2} よりも大きい場合もある(Fig.3c)ことから、下水処理工程での安定した除去は達成されない場合もあるといえる。

流入水、塩素添加前処理水、および残存率における大腸菌群数および F 特異大腸菌フェージの相関を Fig.4、Fig.5、Fig.6 にそれぞれ示した。流入水では大腸菌群数が F 特異大腸菌フェージよりも大きい、両者の相関は高くないといえる。



○—上流側 Fig.1 河川水中の大腸菌群および
●—下流側 大腸菌フェージの濃度



- 北海道
- 秋田
- × 静岡
- 岐阜
- △ 那覇
- ▲ 宜野湾

Fig.2 下水処理場における大腸菌群の消長

- 北海道
- 秋田
- × 静岡
- 岐阜
- △ 那覇
- ▲ 宜野湾

Fig.3 下水処理場における F⁺ 特異大腸菌ファージの消長