

をPBSで再浮遊させた。それをRNAの抽出およびウイルス分離に用いた。糞便材料はそのままあるいは10%乳剤を用いた。

ウイルスRNAの抽出はSV Total RNA isolation system (Promega, USA)を用いて行った。

NLVsのcDNAの作製には {Oligo (dT)(12-18)}、3' のプライマーを用いM-MLV RTで作製した。用いたプライマーについては表1に示した。

表1. 使用プライマー

35' : 5'-CTT gTT ggT TTg Agg CCA TA-3'(位置4,944)
36 : 5'-ATA AAA gTT ggC ATg AAC A-3'(4,475)
NV81 : 5'-ACA ATC TCA TCA TCA CCA TA-3'(4,872)
NV82 : 5'-TCA TTT TgA TgC AgA TTA-37(4,543)
SM82 : 5'-CCA CTA TgA TgC AgA TTA-3'(4543)
Yuri22F : 5'-ATg AAT gAg gAT ggA CCC AT-3'(4495)
Yuri22R : 5'-CAT CAT CCC CgT AgA AAg Ag-3' (4865)

Nested PCR : NV81/82/SM82, Yuri22R/F, の2組を用い、PCR反応は1st PCRと同じ条件で行ったが、サイクル数は35回とした。

PCR産物は電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色しバンドの確認を行った。

PCR陽性のもはダイターミネーター法で遺伝子配列の決定を行った。

全国の各地から得られたNLVsのポリメラーゼ領域 (positin 4,561~4,861) の301bp

をUPGMA法による解析を行った。

### C. 研究結果

1995年から1999年に全国の各地から得られたNLVsの成績を表2に示した。全国から検出されたNLVs 97株のうち、GIは22株(23%)、GIが75株(77%)で、GIがおよそGIの3倍であった。

表2. 1995年から1999年の地区別GI,G1の分布状況

地区	NLVs	GI	G1
北海道・東北	13	4	9
関東・甲信	23	0	23
近畿・東海・北陸	9	0	9
中国・四国	30	13	17
九州	22	5	17
計	97	22	75

GIの系統樹から、大きく5つに分けられた(図1)。すなわち上からNorwalk (NV)に近いもの、Southampton (Sou), DesertShield (Des) とそれらに属さないその他が2つ見られている。

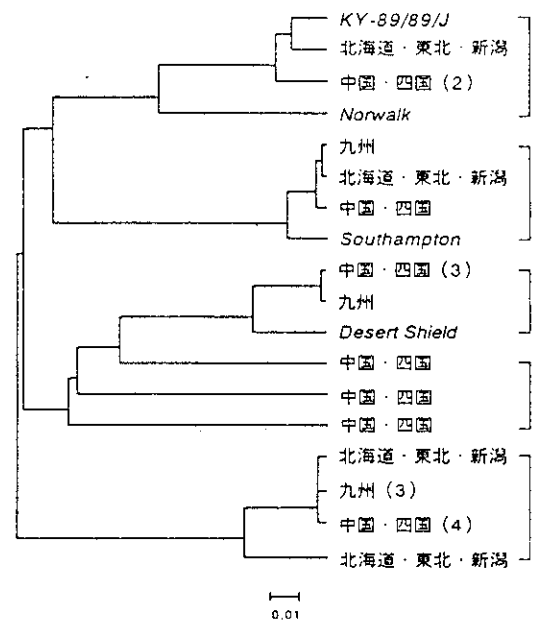


図1. 1995-1999年の地区別NLVs GI系統樹

G2ではCamberwell (Cam), HAawaii (HA), Mexico (MX)、Melksham (Mel), その他が3つで計9つに分けられた (図2, 3)。

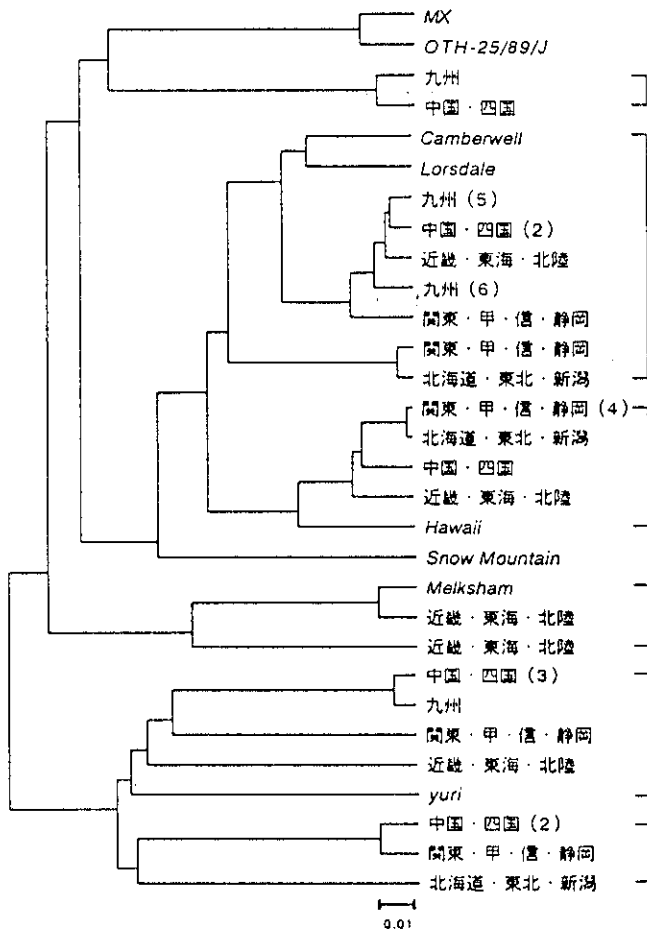


図2. 1995-1999年の地区別NLVs  
GII 系統樹

以上の成績を踏まえ確認用プローブは今回見られたクラスターの全て、すなわちG1は5種類、G1は9種類作製した (図4,5)。これらプローブを用いてNLVsの39件についてハイブリダイゼーションを行ったところ、38件 (97%) で陽性となった。

NLVsのG1の地区別分布状況を示した。G1は中国、四国が多く、関東・甲信、近畿・東海・北陸はG1が検出されなかった (表2)。

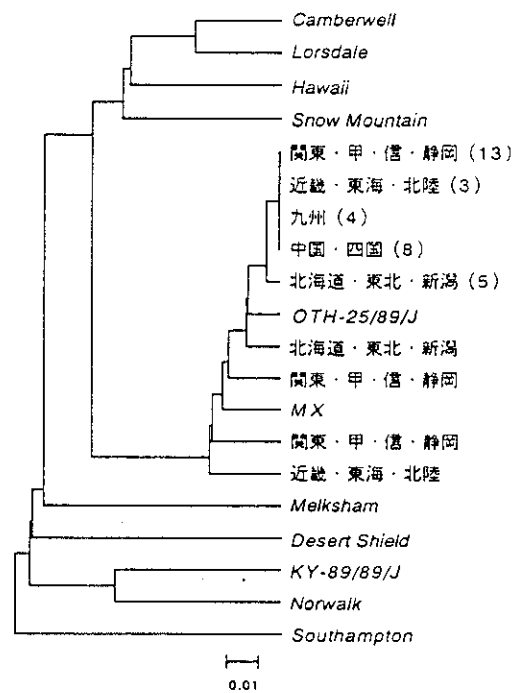


図3. 1995-1999年の地区別NLVs  
MX 系統樹

表3. 1999年から1999年の地区別G1の分布状況

地区	NLVs	G1	NV	Sou	Des	Oth
北海道・東北	13	4	1	1	0	2
関東・甲信	23	0	0	0	0	0
近畿・東海・北陸	9	0	0	0	0	0
中国・四国	30	13	2	1	3	7
九州	22	5	0	1	1	3
計	97	22	3	3	4	12

NV: Norwalk. Sou: Southampton. Des: Desert Shield. Oth: その他

G1の遺伝子型ではNVとSouが各3株、Desが4株で、これらに属さないものが12株で最も多く見られた (表3)。

G2ではMXが最も多く37株で、次いでCamが17株、その他12株、HAが7株、Melが2株であった。地区別では九州ではCamが、その他の地域ではMXが最も多く見られた。な

お近年はCamが多く検出されている(表4)。

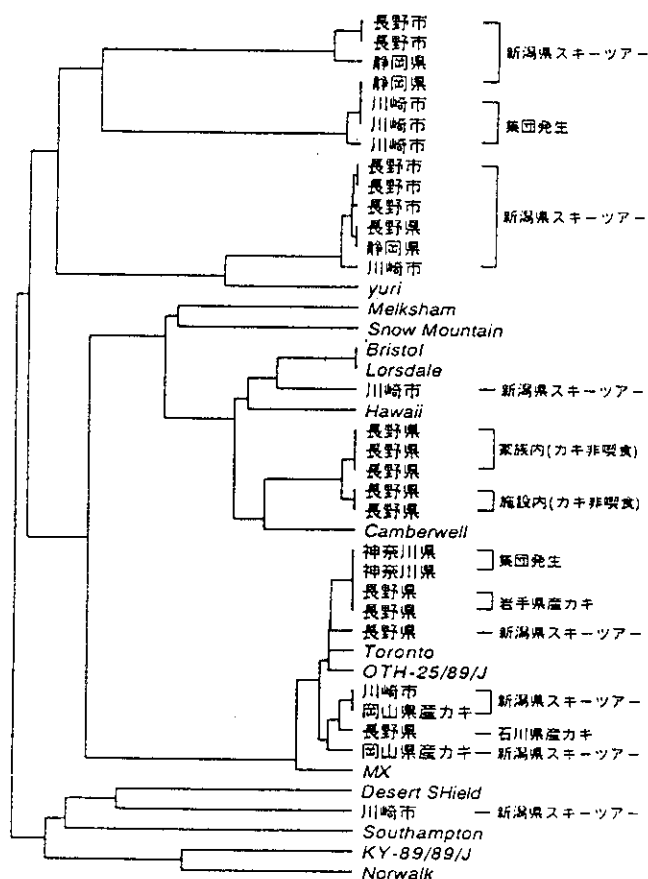


図4.NLVsの2000年の系統樹

表4. 1995年から1999年の地区別GIの分布状況

地 区	NLVs	G1	MX	HA	Mel	Cam	Oth
北海道・東北	13	9	6	1	0	1	1
関東・甲信	23	23	15	4	0	2	2
近畿・東海・北陸	9	9	4	1	2	1	1
中国・四国	30	17	8	1	0	2	6
九州	22	17	4	0	0	11	2
計	97	75	37	7	2	17	12

MX:Mexco, HA:Hawaii, Mel:Melksham, Cam:

Camberwell,Sou: Southampton, Oth:その他

2000年に検出されたものはG1が1件(川崎市No.2, Sou)で、G1は29件でヒトおよ

びカキから検出された。G1ではYuriに近いものが長野市で、Yuriと少し異なっているものが長野市、静岡県、川崎市で見られている。MXに類似は石川県産カキ、岡山県産カキ、川崎市、長野県、神奈川県在住の患者から検出されている。

なお、図で新潟県スキーツアーと記載してあるのは岡山県産カキによる集団発生事例である。カキと患者の遺伝子型が一致したのは川崎市に在住する1人のみであった。またこの事例からは5つの遺伝子型が検出された。

#### D. 考察

NLVsには多くの遺伝子型が存在することが知られており、現在日本での流行型および存在している型を明らかにすることは感染経路解明の分子疫学的解析に重要である。

そこで1995年から1999年の乳幼児および食品関連下痢症から得られたNLVsの遺伝子配列を調べたところ、G2が多く、G1の約3倍を占めていた。遺伝子型はG1が5つ、G2が9つの型が検出され、わが国では多くの異なった遺伝子型が存在していることが明らかとなった。また1999年以前はMXが、1999年は九州地区を中心にCamが、2000年はYuriが多くなっており、その年により主流となる遺伝子型が異なる傾向が見られ、さらに新たな型の出現が認められた。過去に報告されている代表的な株に異となるものも検出され、これらが日本の地域特異的な株であるかさらに詳細に検討を要する。

以上のことから確認診断用プローブは各遺伝子型の代表的なもの15種類のプローブを用い、ハイブリダイゼーション法を行ったところ、97%が陽性となった。このことから、本年度作製し全国に配布したプロー

ブは確認試験に用いられると判断された。しかし上述の如くNLVsは多くの遺伝子型が存在し、新しい遺伝子型の出現も認められた。従って今後も日本におけるNLVsの遺伝子配列を継続して調査研究することが必要であり、それに対応しプローブも新たに加えることが不可欠である。

2000年の新潟県に発生したスキーツアー事件例では原因食品が生カキと推定された事例である。カキと患者の遺伝子型が一致したのは川崎市に在住する1人のみである。その他の14名は異なった遺伝子型が検出された。このことは恐らくカキは複数のウイルスに汚染されており、喫食した人の体内で最も増殖し易いウイルスが検出され、カキでは最も多く含まれたものが検出された結果と考えられる。

## E. 結論

わが国ではG1が5種類、G2が9種類存在している。またカキの集団発生事例では原因食品が多くのウイルスに汚染されていたと推察された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yumei ZHOU, Miyuki NAKAYAMA, Ayako HASEGAWA, Bosu KIM, Shuichi NISHIMURA, Shuzo CHIBA, Shuji NAKATA, Kumiko KANESHI, Yuichi UEDA, Shigekazu NAKAYA, Osamu NISHIO, Hiroshi USHIJIMA. Serotypes of human rotaviruses in 7 regions of Japan from 1984 to 1996, J.J.A.Inf.D., 73(1) 35-42, 1999.

2. 原 みゆき、古屋由美子、片山 丘、今井光信、長谷川斐子、西尾 治、A群ロタウイルスが検出された食中毒様胃腸炎の集団発生事例について、病原微生物検出情報、Vol20(7)170(1999)

### 2. 学会発表

1. 川本尋義、沢田晴美、西尾 治、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、大阪、1999.5、13-14

2. 鈴木 博、加藤由美子、南部みほ、西尾 治、二枚貝におけるウイルス汚染指標、第58回日本公衆衛生学会総会、大分、1999、10、221-22、頁720

3. 原みゆき、古屋由美子、片山 丘、吉田芳哉、今井光信、長谷川斐子、西尾 治、食中毒様の集団下痢症から検出されたA群ロタウイルスについて、第47回日本ウイルス学会総会、横浜、1999、11、7-9 P179

4. 西川 真、渡邊香奈子、新井礼子、篠川 且、加藤由美子、鈴木 宏、短期間に発生した6集団の急性ウイルス性胃腸炎事例におけるノーウオーク様ウイルスの分子疫学的研究、第47回日本ウイルス学会総会、横浜、1999、11、7-9 P176

5. 加藤由美子、南部美穂、西尾 治、西村浩一、全国各地で検出されたヒトカリシウイルスの遺伝子配列、第47回日本ウイルス学会総会、横浜、1999、11、7-9 P197

6. 西尾 治、加藤由美子、鈴木 博、牛島廣治、秋山美穂、輸入食品のウイルス学的安全性について、第47回日本ウイルス学会総会、横浜、1999、11、7-9 P199

ノーウォーク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 国立感染症研究所主任研究官

研究要旨 組換えバキュロウイルスを用いてノーウォークウイルス構造蛋白の発現を試み、Genogroup Iの4株、Genogroup IIの7株の計11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、これらのノーウォークウイルス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ノーウォークウイルスの血清疫学、および患者の血清学的診断が可能になった。

1. 研究目的

ノーウォークウイルス (Norwalk Virus : NV) 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NVは Genogroup I (GI) とGenogroup II (GII) 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NV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中空粒子 (Virus-like particles : 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NVの血清疫学的解析を行う。

2. 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塩基を増幅し、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Tn5細胞に組換えバキュロウイルスを感染し、5~6日間培養した上清をSDS-PAGEで解析して58K蛋白を確認し、さらに電子顕微鏡でVLPsを観察することによって確認した。培養上清からCsCl平衡密度勾配遠心法でVLPsを精製濃縮した。これを免疫原として高力価血清を作製し、VLPsを抗原に用いたELISA法による交叉反応試験を行った。また同VLPsを抗原として患者および健常人の血清中の抗体価を測定した。

3. 研究成果

ORF2の5'末端から約300bpの塩基配列で比較すると、GIとGII間のホモロジーは約50%、同グループ間では約70%であるが、わが国ではこれまでに少なくともGIの6種とGIIの7種、計13種類の遺伝子型の存在が確認された。各々の遺伝子型について1.6kbの構造蛋白(ORF2)のみを含む領域、あるいは構造蛋白(ORF2)、機能未同定蛋白(ORF3)、3'NC領域およびポリAを含む2.3kbの領域について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72時間以降の宿主昆虫細胞内あるいは培養上清に58kDa (530アミノ酸)の構造蛋白が大量に産生され、これらはウエスタンブロット法でそれぞれの株の回復期血清と強く反応した。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、GIの4株、GIIの7株でVLPs作出に成功した。これらの株間の交叉反応を調べた結果、GIとGII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NVに対する抗体応答はカキ関連食中毒では同一集団でGI、GIIに反応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NV抗体は2歳代ですでに高い陽性率を示した。特にGIIに対し高率であった。

4. 考察

ポリメラーゼ領域の解析からNVはGI (Norwalk-like)、GII (Snow Mountain-like)の2種の遺伝子型に分類されている。これ

らはは全塩基配列から典型的なカリシウイルスの遺伝子構造をもつことが確認されている。現在データベースに登録されているNV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GI, GIIにはそれぞれ少なくとも6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NV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、原因食品と考えられるカキが既に複数のNV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、NV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GIとGII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NV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GIIの遺伝子型が検出されていることがわかっている。今後GIIを注目する必要があるそうである。

VLPsの発現によって大量のNV抗原が使用可能となった。NV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NVは広く浸淫しており、特に近年はGIIに属すNVが多いことが明らかとなった。

## 5. まとめ

血清学的に異なる11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NV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NV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。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 武田直和、名取克郎、宮村達男：ヒトカリシウ

イルス感染による急性胃腸炎。モダンメディア、45:169-179、1999.

2. 武田直和、染谷雄一、名取克郎、宮村達男：ヒトカリシウイルスによるウイルス性急性胃腸炎。臨床栄養、94:768-774、1999.

3. 武田直和、名取克郎：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、1999.

4. Kobayashi, S., K. Sakae, K. Natori, N. Takeda, T. Miyamura, and Y. Suzuki. 2000. A serotype-specific antigen ELISA in the detection of Chiba viruses in stool specimens. *J. Med. Virol.* in press.

### 2. 学会発表

#### 1. 国際学会

1. Kobayashi S, Yamashita T, Sakae K, Kamata K, Satoh T, Natori K, Takeda N, Miyamura T, Suzuki Y. Detection of Norwalk-like viruses by a serotype-specific ELISA based on seven antigenically distinct recombinant capsid proteins. Thirty-third Joint Working Conference on Viral Diseases. June 28-30, 1999, Washington, DC, USA.

2. Tamura M, Natori K, Kobayashi S, Sakae K, Shinozaki K, Sakurai N, Miyamura T, Takeda N. Characterization of recombinant Norwalk-like virus particle-binding protein: a candidate cellular receptor molecule for the virus. Thirty-third Joint Working Conference on Viral Diseases. June 28-30, 1999, Washington, DC, USA.

3. Takeda N, Natori K, Kobayashi S, Sakae K, Suzuki K, Shinozaki K, Hashimoto O, Ishiko H, Miyamura T. FORMATION AND UTILIZATION OF EMPTY VIRUS-LIKE PARTICLES OF NORWALK-LIKE VIRUSES (NLVs). International Workshop on Human Caliciviruses. March 29-31, 1999, Atlanta, GA, USA.

#### 2. 国内学会

1. 秋山和夫、野池道子、有田有和、沖村容子、白石廣行、名取克郎、武田直和. 1999. かきが原因と推定された集団食中毒事例の血清学的・遺伝学的解析. 第47回日本ウイルス学会総会, 横浜.

2. 小林慎一、柴賢司、鈴木康元、鎌田公仁夫、佐藤俊則、名取克郎、武田直和. 1999. ELISA法によるノーウォーク様ウイルスの検出. 第47回日本ウイルス学

会総会, 横浜.

3. 田村克, 名取克郎, 武田直和, 宮村達男. 1999. ノーウォーク様ウイルスレセプターの解析. 第47回日本ウイルス学会総会, 横浜.

4. 武田直和, 名取克郎, and 宮村達男. 1999. 日本で検出されたNLVs(SRSVs)の遺伝子解析. 衛生微生物技術協議会第20回研究会, 名古屋.

チバウイルスゲノムのクローニングと全塩基配列の決定

分担研究者 染谷 雄一 国立感染症研究所 研究員

研究要旨

千葉県で発生した集団食中毒の患者より採取した糞便より、ノーウォーク様ウイルス（チバウイルスと命名）を分離した。チバウイルスのRNAゲノムを抽出し、RT-PCR法および5' RACE法により全塩基配列を決定した。3つのORFが推定され、それらのアミノ酸配列はノーウォークウイルス、サザンプトンウイルス由来のものに類似し、チバウイルスがgenogroup Iに属することを示している。

A. 研究目的

現在、ノーウォーク様ウイルス遺伝子の検出には、RNAポリメラーゼ領域を増幅するプライマを用いたRT-PCR法が広く行われている。それにより部分的にはあるが、様々なウイルスの遺伝情報が明らかにされ、ノーウォーク様ウイルスが遺伝的に多様であることが明らかになってきた。遺伝的多様性はキャプシド遺伝子の単離によっても明らかである。より確実な検出には、PCRに用いるプライマの精度を上昇させること以外に、他のウイルス遺伝子の検出を併せて行うことでも実現されると考えられる。しかしながら、全遺伝子が解明されたノーウォーク様ウイルスはまだ少数であり、RNAヘリカーゼやプロテアーゼ領域の情報が少ない。そこで、本研究ではチバウイルスゲノムの全塩基配列を解明し、既知のウイルスゲノムと比較する。

B. 研究方法

ヒト便材料よりウイルス粒子を分離し、それらからRNAゲノムを抽出した。オリゴdTプライマあるいはランダムプライマを用いて逆転写反応を行った後、全塩基配列既知のノーウォークウイルス、サザンプトンウイルス、BS5株、ローズデールウイルスをもとに作成されたプライマを用いてPCR反応を行い、遺伝子断片を増幅した。増幅した遺伝子断片をプラスミドベクターに組み込み、塩基配列を決定した。また、ゲノムの5'末端の塩基配列の決定には、5' RACE法を用いた。

C. 研究結果

チバウイルスゲノムは3'末端のポリAを除いて、7,697塩基から構成される。3つのORFが推定され、ORF1は1,785アミノ酸から成るポリプロテインを、ORF2は544アミノ酸から成るキャプシドを、ORF3は208アミノ酸から成る塩基性タンパク質をそれぞれコードする。ORF1ポリプロテインはそのプロテアー

ゼ活性により、RNAヘリカーゼ、プロテアーゼ、RNAポリメラーゼといったウイルス遺伝子の複製に重要な酵素のほか、N末端領域、3A様領域、VPgに切断される。酵素活性に重要なアミノ酸配列モチーフも認められた。

D. 考察と結論

チバウイルスの3つのORF産物は、genogroup Iに属するノーウォークウイルス、サザンプトンウイルス、BS5株由来のもの70%以上のアミノ酸同一性が認められたが、genogroup IIに属するローズデールウイルス由来のものとは45%前後であった。また塩基配列の比較においてもgenogroup Iに属するウイルスにより相同性が高かった。従って、チバウイルスはgenogroup Iに属すると結論できる。

RNAヘリカーゼ、プロテアーゼ、RNAポリメラーゼに見られるアミノ酸配列モチーフに基づいたプライマのデザインが可能と思われるが、今後更に多くのノーウォーク様ウイルスゲノムの全塩基配列の解明が望まれる。

E. 研究発表

1. 論文発表

(1) 武田直和、染谷雄一、名取克郎、宮村達男 「ヒトカリシウイルスによるウイルス性急性胃腸炎」 臨床栄養 Vol. 94 No. 7 pp. 768-774 1999年

(2) 染谷雄一、武田直和、名取克郎、宮村達男 「ヒトカリシウイルスの多様性」 臨床とウイルス Vol. 27 No. 4 pp. 294-303 1999年



# ウイルス性下痢症 診断マニュアル

平成11年9月

## はじめに

ウイルス性下痢症は近年先進国において公衆衛生上重要な感染症として認識されてきた疾患である。原因ウイルスは1970年以降、正確には1972年にノーウオークウイルスが免疫電子顕微鏡下に捕らえられた以後に同定されたものばかりであるから、全て新興感染症の範疇に含まれている疾患といえる。また、本マニュアルで取り上げたウイルス性下痢症は、感染性胃腸炎として本年4月に施行された感染症新法において、4類感染症の小児科定点把握疾患として病原体サーベイランスの対象疾患に位置づけられている。本マニュアルはまさに時宜を得て作成されたといえる。電子顕微鏡、ELISA、PCR等、実験者が常に実験台の脇において参照しながら進めていけるように記述されている。本マニュアルが関係諸機関の研究者に十分に活用され、ウイルス性下痢症の迅速診断に寄与してゆくことを期待したい。

本マニュアルは国立感染症研究所感染症情報センター主任研究官、長谷川斐子（検査法の概要、A群ロタウイルスの抗原検出、ロタウイルスRNAの検出、ウイルスの分離培養）、同、松野重夫（ロタウイルスRT-PCR法）、国立公衆衛生院微生物学部ウイルス室長、西尾治（酵素抗体法によるA群ロタウイルスのG血清型別、カリシウイルスのRT-PCR法とハイブリダイゼーション）ならびに愛媛県立衛生環境研究所ウイルス科長、大瀬戸光明（下痢症ウイルスの電子顕微鏡による検出、免疫電顕法）の諸氏によって執筆されたものである。厚く御礼申し上げるとともに、より良いマニュアル作成に今後ともご協力いただきたい。適宜バージョンアップしてゆく予定である。そしてとりまとめは国立感染症研究所ウイルス第二部腸管感染ウイルス第一室が行なった。意見、感想等をお寄せいただければ幸いである。

国立感染症研究所  
ウイルス第二部部長

宮村達夫

## 検査法の概要

### 下痢症ウイルス

急性感染性下痢症は世界各地において、いわゆる“かぜ”に次ぐ高頻度で発生する感染症である。わが国でも毎年40万から60万人の急性胃腸炎の発生が推定されている。その中でウイルス性下痢症は大部分が乳幼児下痢症であり、その発生ピークは冬期である。

原因ウイルスは、ロタウイルス、カリシウイルス (SRSV)、アデノウイルス、アストロウイルス、パルボウイルス、コロナウイルス、エンテロウイルス、インフルエンザウイルスなどが検出されている。ロタウイルスやインフルエンザに伴う胃腸炎、カリシウイルス（カキ関連の食中毒）は冬期に多く、エンテロウイルスは主として夏期に、アデノウイルス、散発例のカリシウイルス等は年間を通じて下痢患者の便から検出される。

### 検査材料の採取

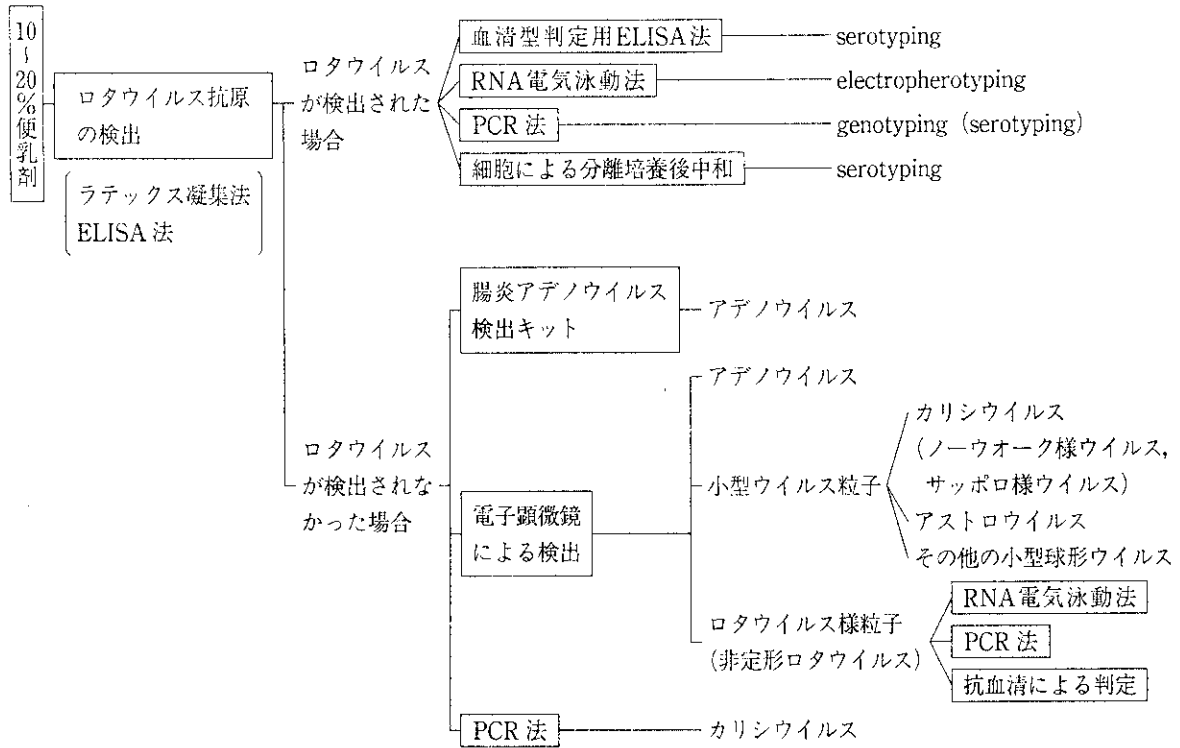
ウイルス性下痢症と疑われた患者から、なるべく多くの下痢便を早期に採取する。発症後2～3日位までの検体は検出率がよい。プラスチック製などの適切な容器に下痢便を採取し、密閉する。送付する場合は $-20^{\circ}\text{C}$ 以下（ドライアイス保存）で、1日位であるならば $4^{\circ}\text{C}$ （氷中）で行う。長期保存の場合は $-80^{\circ}\text{C}$ が望ましい。凍結融解を繰り返すとウイルス粒子が破壊される。

急性期および回復期の血液を採り、血清に分離して $-20^{\circ}\text{C}$ 以下に凍結保存する。

### 検査の進め方

ウイルス性下痢症の疫学的背景を考慮にいれて検査を行うようにする。冬期に乳幼児に発生した散発的な下痢症はロタウイルスの可能性が高い。現在ロタウイルスはA群からG群に分類され、群間の血清免疫学的共通抗原性はなく、ヒトではA～C群が報告されている。A群ロタウイルスが乳幼児下痢症の重要な原因で、いろいろな検出用キットが販売されているので、それらを使用してロタウイルス抗原の有無を確認してから、次の検査へ進んだ方がよい。

下痢症ウイルスの検出手順の一例を示す。



患者の便材料から10~20%乳剤を作り、低速遠心して上清を検査材料とする。A群ロタウイルス検出用キットを使用してロタウイルスの有無を確認する。

ロタウイルスが検出された場合は、ELISA法によるG血清型別(VP7)、電気泳動法によるRNAパターンの確認、RT-PCR法によるG血清型およびP血清型(VP4)別、また培養細胞を使用してウイルスの分離培養などを必要に応じて行う。

ロタウイルスが検出されなかった場合は、アデノウイルス検出キットを用いてアデノウイルスの検出や、電子顕微鏡による観察を行いウイルス粒子の検出を行う。粒子が検出された検体は免疫電顕法で鑑別同定を行う。カリシウイルス感染が疑われる検体は、直接にRT-PCR法で特異的遺伝子の検出も行われている。

下痢症をおこすウイルスはレベル2に属し、P2施設での作業である。実験室内感染には十分に注意を払い、検査に用いた試料、器具等は終了後に必ず滅菌する。

## A 群ロタウイルス抗原検出

現在わが国で市販されているキットの一例を示す。

I. ラテックス凝集法	
Rotalex ドライ	ORION DIAGNOSTICA (第一化学薬品)
ロタ-アデノドライ	” ”
ロタ・チェック	三菱化成工業
セロダイレクト栄研ロタ	栄研化学
ロタスクリーン	メルシアダイアグノスティックス (デンカ生研)
II. 酵素免疫法 (ELISA)	
ロタエンザイム IDL	International Diagnostic (東進ケミカル)
ロタザイム II	Abbott Laboratories
ロタクローン	Cambridge BioScience
ロタウイルス抗原テスト	ヘキストジャパン

A 群ロタウイルス抗原検出用キット

検査方法は各キットに添付されている使用説明書に従って行う。

### I. ラテックス凝集法

すべての器材がキット内に添付されているので、フィールドでの検査も可能である。検体は採取した便をそのまま使用できる。簡便かつ迅速性（数分）に優れた検査法であるが、検出感度は他の方法より低い。

### II. ELISA 法

検出感度は良い。検出時間は 1～2 日必要である。

#### 1. 器具および試薬

マイクロピペット, マイクロチップ

(連続分注ピペットとシリンジ)

試験管, 遠心管

ELISA 洗浄器

ELISA リーダー

(ホモジナイザー)

ELISA キット

PBS

精製水

## 2. 検査試料の調整

- 1) 急性期に採取した患者下痢便を, PBS または蒸留水を用いて10~20%乳剤を作る  
(ホモジナイザーがあれば使用した方がよい)。
- 2) 3,000rpm で15分間遠心し, その上清を検査試料とする。

## 酵素抗体法によるヒト A 群ロタウイルスの G 血清型別

ヒト A 群ロタウイルスは 1 から 4 型, 8 型, 9 型および 12 型が知られているものの, 下痢症患者から検出されるのは殆どが 1 から 4 型である。ラテックス凝集法あるいは ELISA 法で A 群ロタウイルス陽性の検体について, A 群ロタウイルス, 血清型別キット, ロタ-MA は 1 から 4 の G 血清型別 (外殻蛋白 VP7 の型別) が行える<sup>1,2)</sup>。

### 1. 器具および試薬

ELISA 用マイクロプレートリーダー, マイクロプレートミキサー, 恒温槽, マイクロピペット (20, 200, 1,000 $\mu$ l), ELISA 用マイクロトレイ, 試験管 (5ml, 10ml, 50ml) (連続分注ピペットとシリンジー 25 $\mu$ l, 50 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 250 $\mu$ l 用)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl, ロタ-MA (株式会社セロテック, 500 回分), Tween 20, スキムミルク, ウシ血清アルブミン, 抗ヒトロタウイルス過度免疫血清, ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ血清, クエン酸, 精製水, o-phenyldiamine 2HCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, プレートシール

### 2. 検査方法

基本的には添付されている使用説明書に従って行う。ここではわれわれが使っている方法について記す。

- 1) PBS<sup>#1</sup> (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.21g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.495g, NaCl 8.766g を pH7.5 にして蒸留水で 1 l とする) でロタウイルスに対するモノクローナル抗体 (ロタ-MA, 乾燥品) {血清型 1, 2, 3, 4 および抗 A 群 (A 群共通)} を希釈し, 各タイムプレート<sup>#2</sup> の各ウェルに (例えば A 群特異抗体は 2-B, 2-C と, 1 型特異抗体は 3-B, 3-C) 100 $\mu$ l ずつを入れる (1 検体当たり 5 ウェルを用いる)。

モノクローナル抗体\*            A    1    2    3    4

検 体		1	2	3	4	5	6
A	○	○	○	○	○	○	○
1型ウイルス	B	○	○	○	○	○	○
2型ウイルス	C	○	○	○	○	○	○
3型ウイルス	D	○	○	○	○	○	○
4型ウイルス	E	○	○	○	○	○	○
検体 No.1	F	○	○	○	○	○	○
検体 No.2	G	○	○	○	○	○	○

\* A：抗 A 群ロタウイルスモノクローナル抗体  
 1：血清型 1 ロタウイルスモノクローナル抗体  
 2：血清型 2 ロタウイルスモノクローナル抗体  
 3：血清型 3 ロタウイルスモノクローナル抗体  
 4：血清型 4 ロタウイルスモノクローナル抗体

#### トレイのレイアウト

↓ 4℃に 1 夜静置。

2) ウェルを PBS<sup>#3</sup>で 2 回洗浄後、各ウェルに 1%BSA 加 PBS-T(0.05%Tween20 加 PBS) を 250 $\mu$ l ずつ加える。

↓ 4℃に 1 夜置く<sup>#4</sup>。

3) PBS で 2 回洗浄後、50 $\mu$ l の 10~20%糞便遠心上清あるいは感染細胞培養上清<sup>#5</sup> (2 から 3 回凍結融解後遠心上清)を加える(B-2, 3, 4, 5, 6, C-2, 3, 4, 5, 6等)。

↓ 4℃に 1 夜置く。

4) PBS で 3 回洗浄後2.5%スキムミルク加 PBS-T で適宜希釈した抗ヒトロタウイルス過度免疫血清 (2,500から20,000倍希釈) を各ウェルに50 $\mu$ l ずつ入れる。

↓ 37℃に 1 時間置く<sup>#6</sup>。

5) PBS で 3 回洗浄後、PBS-T で適宜希釈(1,000から10,000倍)したペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ血清を各ウェルに50 $\mu$ l ずつ加える。

↓ 37℃に 1 時間置く。

6) PBS で 4 回洗浄後、基質溶液 (25ml の 0.1M citrate-phosphate buffer (0.1M クエン酸6.1ml, 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.4ml, 精製水12.5ml, pH5.0)に使用直前に 10mg の o-phenyldiamine 2HCl と 10 $\mu$ l の 30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えたもの) を各ウェルに 100 $\mu$ l ずつ加える。

↓ 遮光して 30 分間置く。

7) 各ウェルに 20%H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を 25 $\mu$ l ずつ加え、プレートミキサーで軽く攪拌。



8) 波長492nm で吸光度を測定

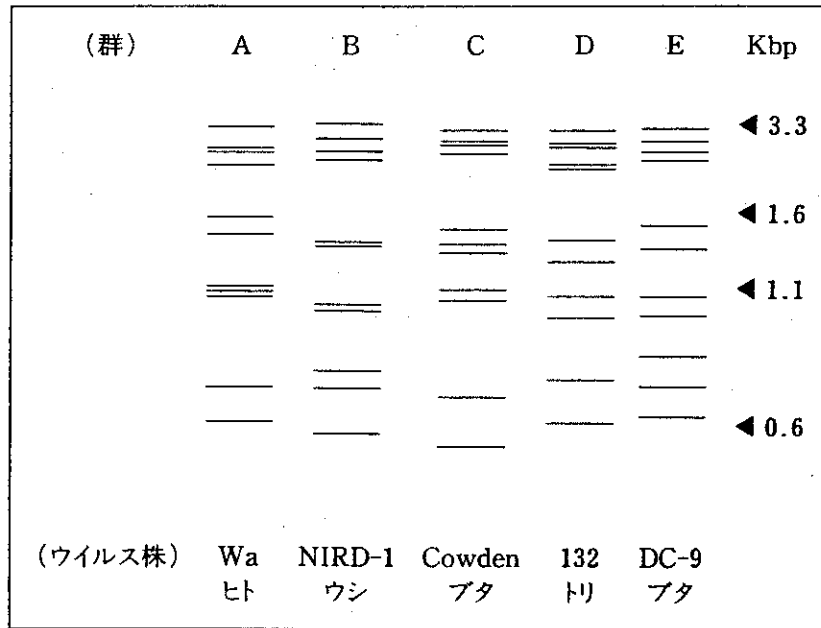
9) 判定 特定の血清型特異抗体をコーティングしたウエルの吸光度が0.2以上であり、かつ他のどの血清型特異抗体をコーティングしたウエルの吸光度よりも2倍以上高い時にその血清型とする<sup>#7</sup>。なお、抗A群抗体は検体中のヒトA群ロタウイルスを再確認するもので、吸光度0.2/ウエルが陽性限界とする。

### 3. 注意

- <sup>#1</sup>モノクローナル抗体を固相化する時にはPBSの方が炭酸緩衝液(pH9.6)よりも感度が高い。
- <sup>#2</sup>用いるプレートは高結合タイプのGreinerのイミュロン600, LINBROのCode NO.76-341-05等がよい。
- <sup>#3</sup>ウエルの洗浄はPBSで行う。PBS-Tはよりバックグラウンドが高くなる。
- <sup>#4</sup>1%BSAのインキュベーションは4℃一夜のかわりに、4℃4時間に短縮できるが、吸光度が若干低下することがある。
- <sup>#5</sup>糞便遠心上清あるいは感染細胞培養上清を10%スキムミルク加PBS-Tと3:1の割合で混合したもの。
- <sup>#6</sup>37℃でのインキュベーションは、プレートを恒温槽に浮かべるか、フラン器内にあらかじめ37℃に保たれている水槽に浮かべる等の方法がより効果的である。
- <sup>#7</sup>このキットに用いられている血清型3モノクローナル抗体は一部の3型ウイルスとは反応しないことがある。

## ロタウイルス RNA の検出 (SDS-PAGE)

ロタウイルスの核酸は11分節の2本鎖RNAから成り、ポリアクリルアミド電気泳動法<sup>3)</sup>により分析できる。泳動パターンにより群別に分類でき、現在群別分類ができる唯一の方法である。ヒトの下痢症から日本ではA群とC群が検出されている。



各群別ロタウイルス RNA 電気泳動パターン (模式図)

### 1. 器具および試薬

PAGE 用装置一式

定電流定電圧装置

紫外線イルミネーター

微量高速遠心機

マイクロチューブ

試験管

ミキサー

マイクロピペット

マイクロチップ

アスピレーター

ゲル染色用容器

(ゲル乾燥器, ゲル乾燥用ろ紙またはセロファン)

(マイクロシリンジ)

アクリルアミド・ビスアクリルアミド溶液

(アクリルアミド30g, ビスアクリルアミド0.8g に蒸留水を加えて100mlにする。)

3M トリス-塩酸 (pH8.8)

0.5M トリス-塩酸 (pH6.8)

フェノール溶液

クロロホルム

10%SDS, TEMED, 10%過硫酸アンモニウム, BPB

泳動用緩衝液 (Trizma Base 1.5g, Glycine 7.2g, 10%SDS 5ml, 蒸留水495ml)

## 2. RNA の抽出

RNA の抽出には多くの方法があり、いろいろの RNA 抽出キットが販売されているので、どの方法でも良い。ここではわれわれが使用している非常に簡単な方法を記す。

- 1) マイクロチューブに便50 $\mu$ l を採り試料希釈液<sup>#1</sup>300 $\mu$ l を加える (または10~20% 便乳剤300 $\mu$ l に10倍濃度の試料希釈液25 $\mu$ l を加える)。
- 2) フェノール150 $\mu$ l を加え、ミキサーで1分間攪拌する。
- 3) クロロホルム 150 $\mu$ l を加え、ミキサーで1分間攪拌する(フェノール:クロロホルム=1:1の溶液を使用してもよい)。
- 4) 5,000rpm で1分間遠心し、その上清をフェノール抽出 RNA 試料とする。

<sup>#1</sup> 試料希釈液 (Trizma Base 0.32g, EDTA 0.28g, SDS 0.13g, NaCl 0.4g, 2ME 0.13ml, 蒸留水で100mlにする)

## 3. 検査方法

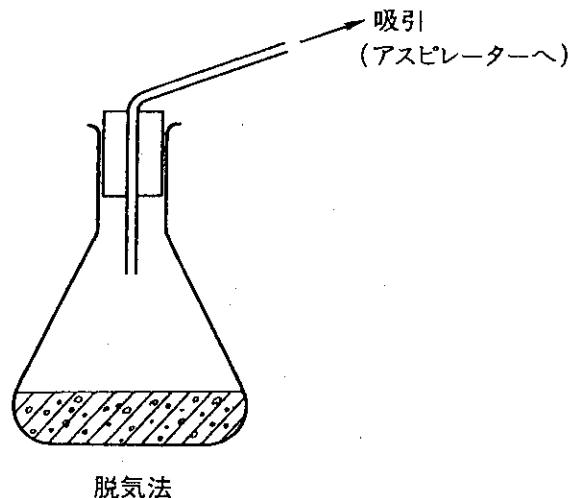
### (a) SDS-PAGE

10%分離用ゲルと3%濃縮用ゲルを使用する。ゲルの組成を下の表に示す (市販されている既製のゲルを使用してもよい)。

SDS-PAGE用ゲルの組成

試 薬	分離用 (10%)	濃縮 (3%)
蒸留水	5.25ml	6.3ml
3M トリス-塩酸	1.25	—
0.5M トリス-塩酸	—	2.5
アクリルアミド・ビスアクリルアミド (30 : 0.8)	3.33	1.0
	混和後脱気	
10% SDS	0.1	0.1
TEMED	0.005	0.005
10% 過硫酸アンモニウム	0.07	0.07
計	≒10ml	≒10ml

- 1) 電気泳動装置を組み立てる (多数市販されていて装置が多少異なるので、添付されている説明書に従う)。ガラス板のゲルが作られる側を無水アルコールでよく拭いておく。試料孔用コウムを所定の位置まで挿入し、その下端に当たる位置をガラス板上に印を付けたのちコウムを抜いておく。
- 2) 分離用ゲルを調製する。量は装置により異なるので比例計算で算出し、少しの余分を見込む。蒸留水、3M トリス-塩酸、アクリルアミド混液を加え十分に混和したのち、アスピレーター等を使って脱気する (2~3分でよい)。簡単な脱気法を下図に示す。10% SDS、10% 過硫酸アンモニウム、TEMED を加えて軽く混和する。



- 3) 直ちにガラス板内に流し込む。ゲル液高はコウムの印から3~4mm下までとする。*n*-ブタノールを液高1mm位に静かに重層し、空気との接触を断つ (ブタノー