

和：SRSV の抗原検出 ELISA。衛生微生物技術協議会第 21 回研究会、郡山、2000
2) 小林慎一、鈴木康元、柴 賢司、名取克郎、武田直和：食中毒患者から検出されたノーウォークウイルスの遺伝子解析。第 48 回日本ウイルス学会総会、津、2000

急性胃腸炎の散発例及び集団発生例における Sapporo Virus の役割

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 (同上)

研究要旨：Norwalk virus(NV)は、毎年冬季に、年長小児や成人の間で流行する嘔吐を主徴とした急性胃腸炎や食中毒の主要原因として知られている。一方、同じカリシウイルス科に属している Sapporo virus(SV)は、主に乳幼児に感染し、乳児院や保育園等の施設内で集団感染を起こすと考えられていた。最近、散発性胃腸炎の継続的病原検索において、NVを検出する検査法で診断できない症例の増加傾向がみられ、その中に多くの SV が含まれていたことがわかった。また、成人に多発した急性胃腸炎からも SV が高率に検出された。これらの現象は従来の SV の流行様態とは異なっており、今後 SV に対する対応の必要性が高まることが示唆された。

A. 研究目的

NV はウイルス性食中毒や晩秋の嘔吐を主徴とする胃腸炎の主要原因として公衆衛生上の課題であるが、その検査法の開発は著しく進展し、患者の病原診断に関してはすでにほぼ十分な段階に達しているといえる。RT-PCR では、数種の優れたプライマーが広く普及しており、また、NV 抗原検出 ELISA キットは、抗原補足抗体として Genogroup 1 と Genogroup 2 それぞれの group 内の多くの株と広く反応するモノクローナル抗体を導入したことにより、十分実用段階に来ていると考えられる。

しかし、近年、散発性の急性胃腸炎患者から、電子顕微鏡法(EM)で SRSV が検出されても、NV に対する RT-PCR で標的遺伝子の増幅ができない例が、多く見られるようになった。また、2000 年には成人に多発した急性胃腸炎で、EM 陽性、NV 陰性と診断された事例があった。これらの例では EM で典型的カリシウイルスの形態を呈するものが多く、SV の可能性が示唆されたので、急性胃腸炎における SV の役割を再評価するために、ウイルス学的調査を行った。

B. 研究方法

1.材料：ウイルス性食中毒及び急性胃腸炎集団発生に関連した患者、調理従事者、食品等の材料は、2000 年 1 月以降に発生した

6 事例から採取された。また、地域における成人の急性胃腸炎多発事例に関連した患者糞便も供試した。散発性胃腸炎の糞便材料は、1999 年 1 月から 2000 年 12 月の間に、松山市の小児科医院外来患者から採取したものをを用いた。

2.方法：糞便からのウイルス検索は、EM 及び RT-PCR で行った。RT-PCR は NV を標的としたプライマーと SV を標的としたプライマーを用いた。NV 検出用としては、ポリメラーゼ遺伝子領域を増幅する NV 系、Yuri 系、P1/P3 系とカプシド領域を増幅する G1/G2 系を用いた。SV 検出用はポリメラーゼ領域の Sapporo 系(札幌医科大学 辰巳らの設計)、カプシド領域の SV 系(千葉県衛生研究所 岡田らの設計による)を用いた。NV のポリメラーゼ領域の PCR 増幅産物については、Ando らのジゴキシゲニン標識プローブを用いたドットプロットハイブリダイゼーションで確認試験、プローブ型別を行った。

C. 研究結果

表 1 に散発性急性胃腸炎の EM による継続的病原検索の結果を示した。EM ではロタウイルスに次いで SRSV が多く検出され、その他にアストロウイルスが約 3%、アデノウイルスが 1-

2%検出された。ロタウイルスは例年と同様、主に1月から4月に多く検出された。SRSVが両年とも3月から6月の間と11月-12月の2峰性のパターンを示したことは注目される。アストロウイルスが春に多く検出されたことやアデノウイルスでは季節的消長がみられなかったことは、それぞれ例年の動向と同じであった。

EMで検出されたSRSVのうち糞便材料が供試できたものについて、NV遺伝子を標的としたRT-PCRを行ったが、NV検出率が例年にくらべ低かった。特に、春から初夏に検出されたSRSVに占めるNVの割合は、両年とも30%前後で著しく低率であった。そこで、最近新たに設定されたSV検出用のプライマーを用いてRT-PCRを行った。Sapporo系については現在PCR条件の調整中で結果は得られていないが、岡田らのSVプライマーでは30例中9例がSV陽性であった(図1)。NVの少ない時期にSVの検出頻度が高くなっていることは非常に注目された。なお、図1でUNKNOWNの17例中には、残検体がなくRT-PCRができなかったため種別されていない8例も含まれている。

また、SV陽性例の年齢分布は1歳から10歳以上で、NV陽性例の年齢分布との間に差異はみられなかった。

2000年1月以降に実施した、5事例の食中毒と1事例の原因不明集団発生例の病原検索結果を表2に示した。全例でEM、RT-PCRともに陽性で、NVによる集団発生であったことが明らかになった。G1、G2プライマーの成績は、Yuri系、NV系のプライマーと比べて同等の検出率を示した。今後ウイルスの血清型あるいは抗原性等と関連した解析を行うには、カブシド領域を標的としたG1、G2プライマーが有利であると考えられた。

表3は成人の急性胃腸炎多発事例のウイルス検索結果を示した。EMでは6例が陽性で、そのうち典型的カリシウイルス像を呈したものが3例と、いわゆるSRSV像を呈したものが3例あった。しかし、RT-PCRではG1、G2プライマーを含め用いた5種類のNV検出用プライマーでは全く反応がみられなかった。この例でも岡田らのSVプライマーで標的遺伝子の強い増幅がみられた。EMで陽性の6例は観察された

形態に関わらず、全てSVプライマーで陽性であった。このことは、原因食品等の媒介物はふめであったが、成人の間にSVが流行したことを示唆している。今後陽性例について遺伝子塩基配列解析を行い、原因ウイルスについて詳細な検討をする必要がある。

D. 考 察

今回、散発性のSRSVに比較的高頻度にSVが含まれていたことがわかり、また、成人に多発した急性胃腸炎の原因としてSVが考えられる事例がみられた。従来、SVについては乳幼児の急性胃腸炎における重要性が述べられてきたが、今回の観察はSVが必ずしも幼若小児だけの問題ではなく、年長小児や成人間にも流行を起こしうる恐れがあることが示された。このような傾向が、1999年と2000年の2年間だけのものか、それとも地域におけるSVの流行形態に変化が現れたのか、今後継続的に監視する必要がある。

NVについては、RT-PCRが患者の診断に関してはほぼ十分な方法として確立している。また、ELISAによるNV抗原検出キットは、モノクローナル抗体を導入したことにより、検出感度と検出スペクトルが向上し、ほぼ実用段階にきていると考えられる。しかし、SVについてはまだ十分に評価を受けたプライマーがないため、早急にSV診断用のプライマーの設定が必要である。今回使用した岡田らのSVプライマーは良好な反応を示した。今後さらに多くの現場で検出感度や検出スペクトルの評価、検討をされることを期待する。

E. 結 論

- 1.1999年、2000年に散発性急性胃腸炎からNVプライマーで検出できないSRSVが多くみられるようになった。
- 2.これらのSRSVから比較的高頻度にSVが検出された。また、成人のSRSV多発例の原因としてSVが検出された。
- 3.SVの今後の動向を監視し、SVによる集団発生に対応するため、SVに対する高感度なプライマーの設定と評価が急務であると思われた。

表1 電子顕微鏡法による散発性急性胃腸炎の病原検索(1999-2000年)

検出ウイルス	1999												計	(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
SRSV	1		2	3	6	3	1				3	3	21	5.9
Rotavirus	9	21	6	4					1				41	11.6
Adenovirus			1		1	1		1		1	1	2	8	2.3
Astrovirus		1	5	2	1	2							11	3.1
検査数	30	47	42	27	31	34	26	30	19	20	28	19	353	100.0

検出ウイルス	2000												計	(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
SRSV	1		5	1	3	3					4	9	26	8.4
Rotavirus	1	3	12	12	1	4							33	10.6
Adenovirus		1					2				1		4	1.3
Astrovirus			2	3	5	1							11	3.5
検査数	30	28	35	42	33	27	26	23	15	16	16	20	311	100.0

図1 EMで検出されたSRSVにおけるNVとSVの月別分布

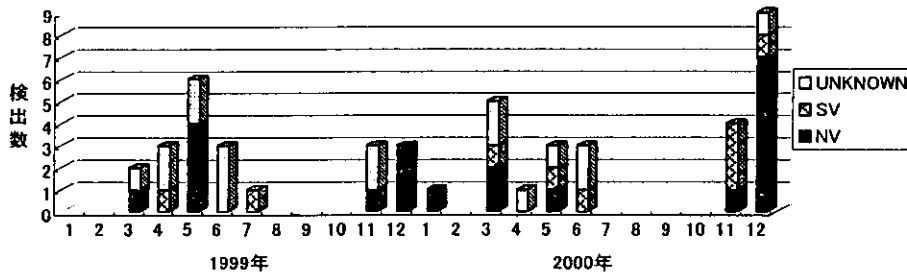


表2 食中毒及び胃腸炎集団発生事例のウイルス検査結果

事例	発生場所	原因食品	検体種別	検査数	電子顕微鏡 陽性数	RT-PCR陽性数				プローブ型
						Yuri	NV	G1	G2	
1	中学校	不明	患者	17	12	14	13	0	15	P2B
			調理従事者	25	0	0	0	nt	nt	
			食品	4	nt	0	0	nt	nt	
2	家庭	仕出し料	患者	16	10	14	8	0	15	P2B, ?
			調理従事者	8	2	3	3	0	3	
3	小学校	ケーキ	患者	13	9	4	0	0	2	?
4	飲食店	会席料理	患者	4	0	0	2	2	1	P2A
			調理従事者	3	0	0	0	1	0	
			カキ	1	nt	0	0	nt	nt	
5	民宿	会席料理	患者	7	0	5	5	0	5	P2A
			調理従事者	7	0	2	1	0	2	
			カキ	1	nt	0	0	0	0	
6	飲食店	会席料理	患者	11	7	7	7	9	9	P2A, P1A, P2B, P1B
			調理従事者	3	1	0	1	2	2	
			カキ	1	nt	1	1	1	1	
合計			患者	79	44	44	35	11	47	
			調理従事者	46	3	5	5	3	7	
			食品	7	nt	1	1	1	1	

表3 成人の急性胃腸炎多発事例のウイルス検索結果

No.	電顕法	RT-PCR					
		NV primer				SV primer	
		Yuri	NV	P1/P3	G1	G2	SV
00-812	-	-	-	-	-	-	-
00-814	Calici	-	-	-	-	-	+
00-822	SRSV	-	-	-	-	-	+
00-823	-	-	-	-	-	-	-
00-829	Calici	-	-	-	-	-	+
00-830	SRSV	-	-	-	-	-	+
00-831	Calici	-	-	-	-	-	+
00-833	SRSV	-	-	-	-	-	+
00-835	-	-	-	-	-	-	-
00-836	-	-	-	-	-	-	-
00-839	-	-	-	-	-	-	-

分担研究報告書

愛媛県におけるアストロウイルス中和抗体保有状況

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 (同上)

研究要旨：アストロウイルスは小児の散発性胃腸炎の原因としてのみでなく、集団食中毒の原因としても重要なウイルスの一つであるが、その検査法は一般に普及しているとはいえない。今回はアストロウイルスの中和抗体測定法の検討を行い、地域住民の血清型別中和抗体保有状況を調査した。1型から7型までの各血清型株に対するウサギ抗血清では、中和抗体は血清型特異性を示した。また、住民のアストロウイルス中和抗体では、血清型による保有状況の著しい差異がみられた。全年齢の陽性率は1型が最も高く61%、次いで4型が49%、3型が39%であった。2型、5型、7型は5%から10%の低い陽性率を示し、6型は中間的な21%という陽性率であった。この血清疫学結果は同地域における血清型別アストロウイルス検出状況と良い一致を示した。

A.研究目的

アストロウイルスはヒトの急性胃腸炎の原因ウイルスの一つで、小児の患者からはロタウイルス、カリシウイルスに次いで腸管アデノウイルスと同程度の頻度で検出される。また、時に大規模な集団発生¹⁾を起こしたり、食中毒の原因として報告されており公衆衛生上無視できないウイルスである。アストロウイルスの検出法としてはRT-PCRやELISA法が開発されているが、国内ではまだ一般に普及しておらず、アストロウイルスの全国的な流行実態はまだ把握されているとはいえない。また、アストロウイルスは1型から8型までの8種類の血清型が報告されており、血清型別の流行状況等不明なまま残されていた。

しかし、アストロウイルスはカリシウイルスと違って培養細胞で増殖が可能であり、ウイルス診断用抗体の作製も比較的容易にできる。我々はアストロウイルスの全ての血清型株と反応するモノクローナル抗体を作製し、アストロウイルス検出ELISA法²⁾を開発するとともに、1型から7型までの各血清型に対するウサギ免疫血清を用いたアストロウイルス血清型別法を開発し、地域における散発性アストロウイルスの血清型の分布を明らかにしてきた^{3,4)}。

本研究では、アストロウイルスの中和抗体測

定法を検討して血清学的診断法を確立し、さらに地域の血清疫学調査を行うことにより、アストロウイルスの血清型別の流行状況を明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

ウイルス：アストロウイルス標準株1型から7型は米国CDCから分与された。

年齢区分別血清：1998年6月から11月の間に、松山市及びその周辺地域の一般住民から採取した感染症流行予測事業用血清126検体を用いた。

アストロウイルスの培養法：Willcockら⁵⁾のCaCo-2細胞によるアストロウイルス培養法に準じて行った。すなわち培養7日目のCaCo-2細胞に1:5-1:10希釈したウイルス液を接種し、ふらん器内で2時間吸着した。その後Hanks BSSで2回洗浄し、5ug/mlトリプシン、100unit/mlペニシリン及び100ug/mlストレプトマイシンを添加したEagles MEM培地を細胞維持液として加えて、37℃炭酸ガスふらん器で3-5日間培養した。

抗アストロウイルス抗体の作製：アストロウイルス3型を免疫したBalb/cマウス脾臓細胞と、マウスミエローマSP2/0細胞を融合し、3回の限界希釈法でアストロウイルス群抗原特異

モノクローナル抗体(MAb-3A3)を作製した。また、1型から7型までの各血清型株に対するウサギ免疫血清を作製した。免疫源にはCaCo-2細胞で増殖させたウイルスをCsCl密度平衡遠心で精製したものをを用いた。

アストロウイルスの定量：アストロウイルス抗原検出ELISAを用いて行った。ウイルスの定量は、アストロウイルス感染CaCo-2細胞培養のLysateを階段希釈して、ELISAにより直接Lysate中の抗原量を測定する方法と、ウイルス感染細胞培養のLysateを10倍階段希釈したものを96ウェルマイクロプレートの培養細胞に接種、培養後各ウェルのウイルスの増殖の有無をELISAにより調べ、感染価を求める方法で行った。

アストロウイルス中和抗体価測定：トランスファープレート上で作製した25ulの血清希釈列に等量の100TCID₅₀/25ulのウイルス液を加え、振とう後37℃で2時間、4℃で一夜中和後、96ウェルの細胞に接種した。4時間の吸着後、8連マニホールダスピレーターを用いてHanks BSSで2回洗浄し、5ug/mlトリプシン添加MEMを細胞維持液として加え、37℃で5日間培養した。各ウェルの培養上清はアストロウイルス抗原検出ELISAでウイルスの増殖の有無を調べた。100TCID₅₀のウイルス対照ウェルの吸光度を基準とし、その20%以下に抑制したウェルを中和反応陽性と判定した。同一希釈のウェルの50%以上が中和される最大血清希釈倍数の逆数を中和抗体価とした。

中和抗体の測定には、LLC-MK2細胞へ馴化できたアストロウイルス1型、2型、3型、6型の各株はLLC-MK2細胞を用い、4型、5型、7型は馴化できなかったのでCaCo-2細胞を用いて中和試験を行った。

C. 研究結果

アストロウイルス各血清型標準株に対するウサギ抗血清を用いて行った各血清型間の交差中和試験の結果を、表1に示した。全般的に非常に高い血清型特異性が示され1型株は抗1型血清とのみ反応し、2型から7型までの抗血清とは全く交差反応はみられなかった。同様に他の血清型株についてもそれぞれホモの抗血清と特異的に反応し、その他の型の抗血清とはほとん

ど反応はみられなかった。この成績はアストロウイルス中和試験が血清型特異的反応であることを示している。3型株は抗7型血清で20倍、6型株は抗3型と抗4型血清と10倍の低い片側交差がみられた。しかし、これが中和抗体の交差によるものかどうかは今後検討する必要がある。

次に、住民のアストロウイルス中和抗体保有状況を図1に示した。各年齢区分の検査数は、13から18検体で、合計126検体を供試した。アストロウイルスに対する住民の中和抗体保有率は、血清型によって著しい差異を示した。全年齢の陽性率は1型が最も高く61%、次いで4型が49%、3型が39%であった。2型、5型、7型は5%から10%の低い陽性率を示し、6型は中間的な21%という陽性率であった。

年齢区分別の抗体保有率は1型、4型では2-3歳層の陽性率が40%になり、抗体獲得の早い立ち上がりが見られた。このことは、これら2つの型が最近も高頻度に流行していることを示唆している。次いで3型の陽性率がほぼ全年齢層で高く、この型の浸淫が比較的高かったことが推測された。一方、2型、7型は幼小児年齢層で0%から18%と低い陽性率で、20歳代、30歳以上群でも10%前後の抗体陽性率を示し、2型と7型はほとんど流行していなかったことが推察された。

6型は15歳以上の年齢層で、40%前後の陽性率を示しており、10年以上前に流行があったのかも知れない。

1型と2型については、中和抗体価の測定をした(表2、表3)。1型の抗体価の分布は0-1歳、2-3歳層では320倍程度の高レベルであるが、年齢の上昇と共に緩やかな低下傾向を示した。30歳以上群でも約40倍程度の抗体価を示し、中和抗体価は比較的長期間持続すると推測された。2型抗体は陽性例が8例で全て40倍以下の低い抗体価であった。

D. 考察

アストロウイルスの増殖には、CaCo-2細胞あるいはLLC-MK2細胞を用いても細胞維持液に5-10ug/mlのトリプシンの添加が必要である。この濃度のトリプシンは細胞をかなり強く変形させ、培養器からの細胞剥離を進行させる。そ

のため細胞変性を指標にした中和判定は困難であった。そこで、アストロウイルス群特異モノクローナル抗体 3A3 を用いたアストロウイルス抗原検出 ELISA により、中和を判定する方法を検討した。ウイルス対照の吸光度を5分の一以下に抑制したウェルを中和陽性とする判定基準を設けたが、ELISA による中和の判定は明瞭で、目視で十分判定可能であった。

散発性の急性胃腸炎の10%はアストロウイルスが原因とされているが、アストロウイルスの流行実態に関する研究は多くない。我々は松山市の1小児科医院を中心に、長期間継続的小児急性胃腸炎の病原検索を行い、アストロウイルス血清型別流行状況を解明してきた³⁴⁾。当該地域内で7型を除き1型から6型までの血清型株が検出され、多様な血清型が混合して流行していることがわかった。1981年から1999年の調査期間を通じてアストロウイルス1型が最も多く検出され、次いで、4型、3型が多く検出された。5型は全期間を通じると頻度は高くないが1997年、1998年には連続して流行がみられた。2型、6型は十数年来希にしか検出されなかった。これらの結果を、血清型別の中和抗体保有状況と比較すると、非常に良く一致しており、血清疫学的にもアストロウイルスの血清型別流行状況が把握出来た。すなわち、1型は最も普遍的に流行しており小児期の早い時期に多くが感染し、抗体を獲得していることが示され、4型、3型が次いで多く常在的に流行していたことが明らかになった。一方、2型と6型は当地区ではほとんど流行しておらず、時に散発的に出現していることがわかった。このことは、2型、6型に対する感受性者が蓄積していることを意味し、食中毒等の集団発生の危険性があることを示唆している。

アストロウイルスの血清疫学的研究は少なく、十分な検体数を扱ったものとしては、ロンドン⁶⁾での蛍光抗体法を用いた調査とオランダ⁷⁾における中和試験を用いた調査がある。共に血清型により抗体保有状況が異なり、浸淫状況に差異があることを示した。ロンドンの成績では1型抗体保有率は乳幼児期に急速に上昇し1歳で50%、5歳までに90%に上昇した。6型の抗体保有状況は10%-30%で、1型と比較すると浸淫度が著しく低かったと報告されてい

る。オランダの成績では、1型91%、3型69%、4型56%、5型36%、2型31%、6型16%、7型10%であった。全体的には両者とも今回の我々の成績とほぼ一致していた。なお、種々の血清型株に感染既往のあるヒト血清では、中和試験においても血清型間交差性が現れる可能性があるため、アストロウイルス胃腸炎の患者血清を収集し、ヒト血清における中和抗体の血清型特異性を検討する必要がある。

E. 結 論

- 1.LLC-MK2 細胞、CaCo-2 細胞を用い、アストロウイルス抗原検出 ELISA を援用することにより、アストロウイルス中和抗体を測定することが可能になった。
- 2.アストロウイルス各血清型標準株に対するウサギ抗血清では、中和抗体の血清型特異性が示された。
- 3.住民の中和抗体保有状況は、血清型により著しい差異を示した。1型の抗体保有率が最も高く、4型、3型が続き、これらの型の比較的高い浸淫が推測された。
- 4.この結果は同地域で検出された血清型別アストロウイルスの分布と一致していた。

文 献

- 1)Oishi, I. et al: J.Infect.Dis.32:439-442(1994)
- 2)大瀬戸光明他：愛媛衛研年報，57:7-11(1996)
- 3)大瀬戸光明他：愛媛衛研年報，58:14-18(1997)
- 4)Oseto, M., et al.: Jpn.J.Infect.Dis., 52: 134-135 (1999)
- 5)Willcocks, M.M. et al: Arch.Virol., 113: 73-81 (1990)
- 6)Kriston, S. et al: Epidemiol.Infect., 117: 159-164 (1996)
- 7)Koopmans, M.P.G. et al: Clin.Diagn.Lab. Immunol., 5: 33-37 (1998)

F.研究業績

1.学会発表

大瀬戸光明、山下育孝、吉田紀美、近藤玲子、井上博雄、石丸啓郎、中野省三：血清型別アストロウイルス中和抗体保有状況と血清型別ウイルス検出頻度の比較．第41回日本臨床ウイルス学会、2000．広島

表1 アストロウイルスの血清型間の交差中和試験

ウイルス	アストロウイルス標準株に対するウサギ抗血清						
	抗1型	抗2型	抗3型	抗4型	抗5型	抗6型	抗7型
アストロウイルス1型	25,600	<10	<10	<10	<10	<10	<10
アストロウイルス2型	<10	25,600	<10	<10	<10	<10	<10
アストロウイルス3型	<10	<10	12,800	<10	<10	<10	20
アストロウイルス4型	<10	<10	<10	3,200	<10	<10	<10
アストロウイルス5型	<10	<10	<10	<10	3,200	<10	<10
アストロウイルス6型	<10	<10	10	10	<10	6,400	<10
アストロウイルス7型	<10	<10	<10	<10	<10	<10	25,600

表2 アストロウイルス1型中和抗体価の分布

年齢区分	検査数	アストロウイルス1型中和抗体価								陽性率(%)
		<10	10	20	40	80	160	320	640	
0~1	17	15	0	0	0	0	1	0	1	11.8
2~3	16	9	0	0	0	0	2	4	1	43.8
4~6	17	11	0	0	0	1	2	2	1	35.3
7~9	18	6	0	0	2	5	3	2	0	66.7
10~14	13	1	0	2	3	3	3	1	0	92.3
15~19	13	0	0	0	1	5	0	5	2	100.0
20~	15	3	2	2	3	4	1	0	0	80.0
30~	17	4	5	2	1	3	2	0	0	76.5
計	126	49	7	6	10	21	14	14	5	61.1

表3 アストロウイルス2型中和抗体価の分布

年齢区分	検査数	アストロウイルス2型中和抗体価								陽性率(%)
		<10	10	20	40	80	160	320	640	
0~1	17	0	0	1	0	0	0	0	0	5.9
2~3	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
4~6	17	0	0	2	1	0	0	0	0	17.6
7~9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
10~14	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
15~19	13	0	0	1	0	0	0	0	0	7.7
20~	15	0	1	0	0	0	0	0	0	6.7
30~	17	0	0	2	0	0	0	0	0	11.8
計	126	0	1	6	1	0	0	0	0	6.3

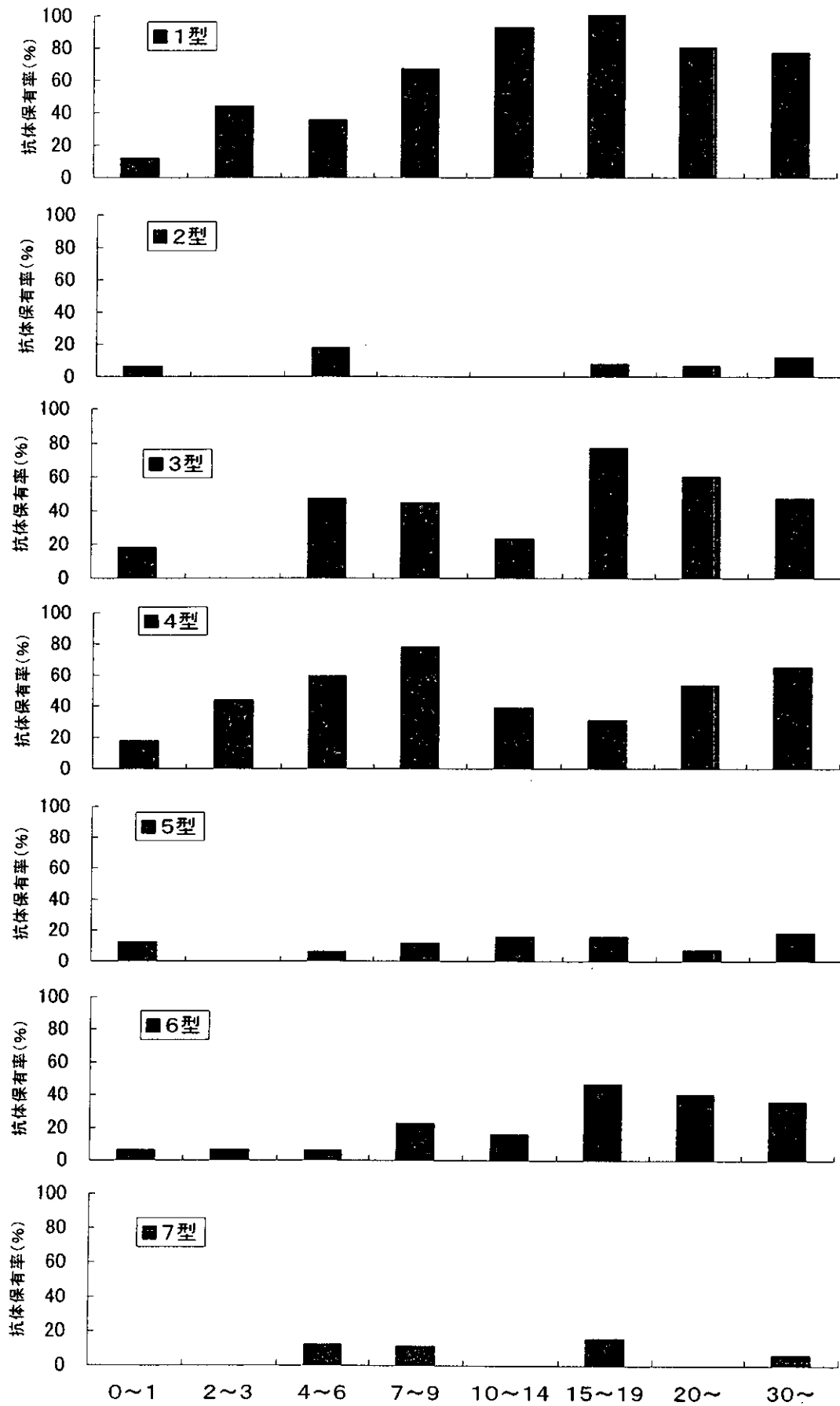


図1 血清型別アストロウイルスの年齢区別中和抗体保有状況

分 担 研 究 報 告 書

小児急性胃腸炎患者の起因ウイルスについて

分担研究者 篠崎邦子 千葉県衛生研究所主席研究員

研究要旨：小児急性胃腸炎患者について起因ウイルスの検索を行った。184名中152名(82.6%)からウイルスを検出した。これらのうち26名は複数のウイルスが検出された。検出ウイルスはNVが82名(44.6%)と最も多く、次いでRVが76名(41.3%)と多かった。その他はAdが11名、SVが8名、Astが1名であった。NVは11月から4月に検出され、ピークは12月であった。RVの検出は1月から4月に集中していたが夏季にもみられた。Adは11月から4月に、SVは3月から6月に主に検出された。年齢別のウイルス検出状況をみると、RV、Ad、SV、Astは主に乳幼児から検出され、NVは年齢に関係なく検出された。小児急性胃腸炎のなかでNVはRVと同様高頻度に検出され、小児急性胃腸炎の起因ウイルスとしての重要性が確認された。

A. 研究目的

冬季に多発する小児急性胃腸炎の原因として Rotavirus の他に Adenovirus、Astrovirus、Norwalk virus、Sapporovirus など様々なウイルスが関与していることがわかってきている。特に Norwalkvirus は、Rotavirus と同様に高頻度に検出され、小児において重要な病原体であることが明らかになってきている。今回、小児急性胃腸炎患者の検体についてその起因ウイルスの検索を試みた。

B. 研究方法

1998年4月から2000年4月までに千葉県内の感染症発生動向調査事業の小児科定点から搬入された小児急性胃腸炎患者184名の糞便を検査材料として用いた。

Rotavirus (RV)、Adenovirus (Ad)、Astrovirus (Ast) の検出は EIA で行った。Norwalkvirus (NV)、Sapporovirus (SV) の検出は、RT-PCR 法で行った。NV のプライマーは武田らの構造蛋白領域で Genogroup I、Genogroup II に特異的なものを用いた。SV のプライマーは構造蛋白領域に新たに設定したのものを用いた。PCR 産物は、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、系統解析を行った。また、同じ検査材料について、電子顕微鏡法 (EM) もあわせて行った。

C. 研究結果

184名中152名(82.6%)からウイルスを検出した。これらウイルス検出者152名中26名からは複数のウイルスを検出した。表1にウイルス別の検出

状況を示した。検出ウイルスは、NV が 82 名 (44.6%) と最も多く、次いで RV が 72 名 (41.3%) と多かった。NV を検出した 82 名のうち 24 名は他のウイルス (RV15 名、Ad6 名、SV3 名) も同時に検出した。これら混合感染の場合の NV は RT-PCR のみの検出で、微量のウイルスを検出したものであった。Ad は 11 名から検出され、そのうち 2 名は RV も検出した。SV は 8 名から、Ast は 1 名から検出された。

それぞれのウイルスの月別の検出状況を図 1 に示した。NV は 11 月から 4 月に検出された。1999 年 12 月には大きなピークがあり、小児で NV の流行があったと思われた。Genogroup は GII が圧倒的に多かった。GI は、流行の始めと終わりに検出する傾向がみられた。RV は、1 月から 4 月に検出されたが、夏季にもみられた。Gtype は、1999 年は 1 型のみであったが、2000 年は 2 型 3 型も検出した。Ad は 11 月から 4 月に、SV は 3 月から 6 月に主に検出された。

年令別のウイルス検出状況を見ると、RV は 0 才から 4 才までに検出され、ピークは 1 才であった。Ad は 2 才以下から SV は 5 才以下から検出された。一方 NV は 0 才から 6 才以上までの各年令から検出された。

NV の遺伝子型別の検出状況を表 2 に示した。969、328 は近似の株がなかったためサンプル番号で示した。754 は、Hillington/90/UK に近似の株である。それぞれの遺伝子型の系統樹の位置を図 2 に示した。Genogroup は GII

が 80%以上を占めた。GII のなかでは Lordsdale virus (LV) 型が最も多く 67.6% (全体の 56.8%) を占めた。次いで 969 が多かった。この株は 1999 年秋に始めて検出したもので、1999/2000 シーズンの食中毒事例から多く検出した。GI では Chiba virus (CV) 型が最も多かった。

RT-PCR で検出した SV8 株の系統樹を図 3 に示した。8 株はそれぞれのサンプル番号で示した。Sapporo 型が 5 株と多く、1998 年と 2000 年の検体から検出した。London 型は 3 株で、いずれも 1999 年の検体であり、年によって株の変動がみられた。

D. 考察

小児急性胃腸炎患者のウイルス検索の結果、184 名中 152 名 (82.6%) からウイルスを検出した。検出ウイルスは、NV が 82 名と最も多く、RV の 76 名より多く検出された。NV 検出者のうち 24 名は他のウイルスを検出しており、NV は他の胃腸炎ウイルスと混合感染している割合が高いのではないかと思われた。

NV の遺伝子型は、調査期間中 LV が最も優位に検出された。同時期の食中毒事例では様々な遺伝子型が検出され、小児散発例と食中毒事例とは異なる流行状況がみられた。

これまで、SV については適当なプライマーがないため国内での報告がほとんどなかった。今回新たに設定したプライマーによって、少数であるが SV を検出することができた。SV の Sapporo 型、London92 型を検出したが

Parkville 型は陽性例がなかった。今回作成したプライマーについて、今後さらに検討を加えていきたいと思う。

E. 結論

小児急性胃腸炎のなかで、NV は RV と同様高頻度に検出され小児急性胃腸炎の起因ウイルスとしての重要性が確認された。

F. 研究発表

学会発表

第 32 回日本小児感染症学会(2000)
にて発表

表 1 ウイルスの検出状況

ウイルス	検出数	(%)		
Norwalk virus	82	44.6	総検体数	: 184 検体
Rotavirus	76	41.3	陽性検体数	: 152 検体
Adenovirus	11	6.0	複数ウイルス検出	
Sapporo virus	8	4.3	検体数	: 26 検体
Astrovirus	1	0.5		

図1 月別ウイルス別検出状況

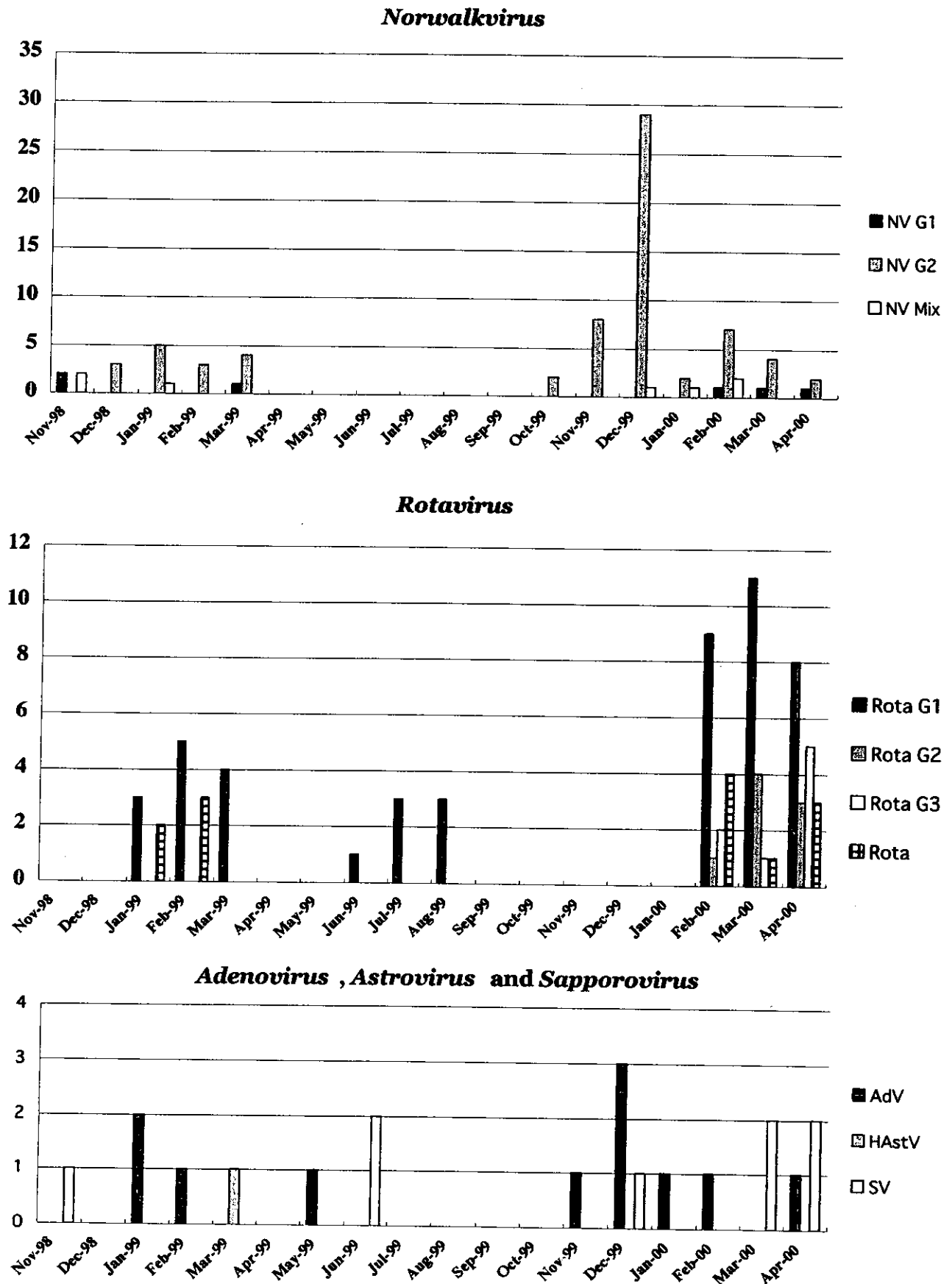
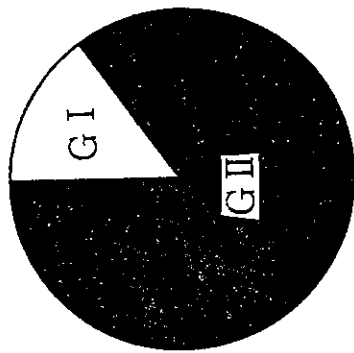
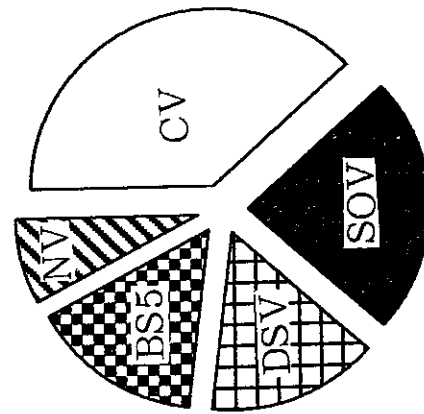


表2 NVの遺伝子型別検出状況

遺伝子型	検出数
GI CV	5
SOV	3
DSV	2
BS-5/G	2
NV	1
<hr/>	
GII LV	50
969	11
TV	8
328	2
HW	1
CH	1
754	1



GIとGII



GI

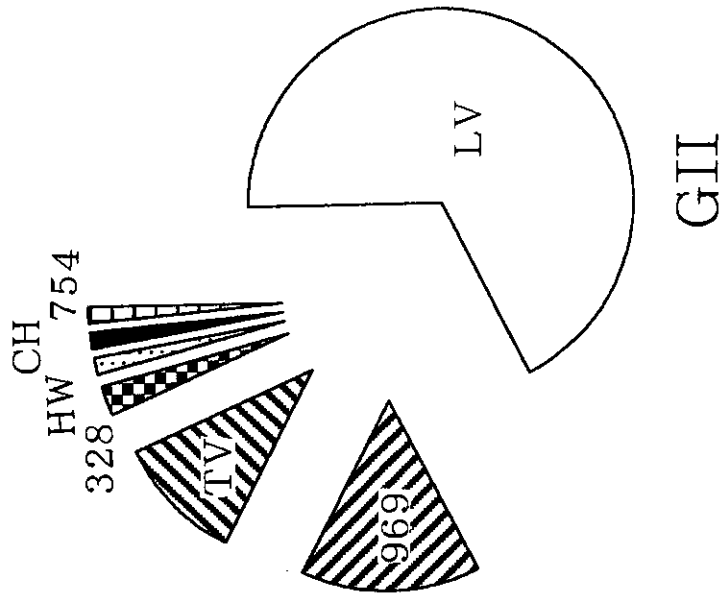


図2 *Norwalkvirus* phylogenetic tree

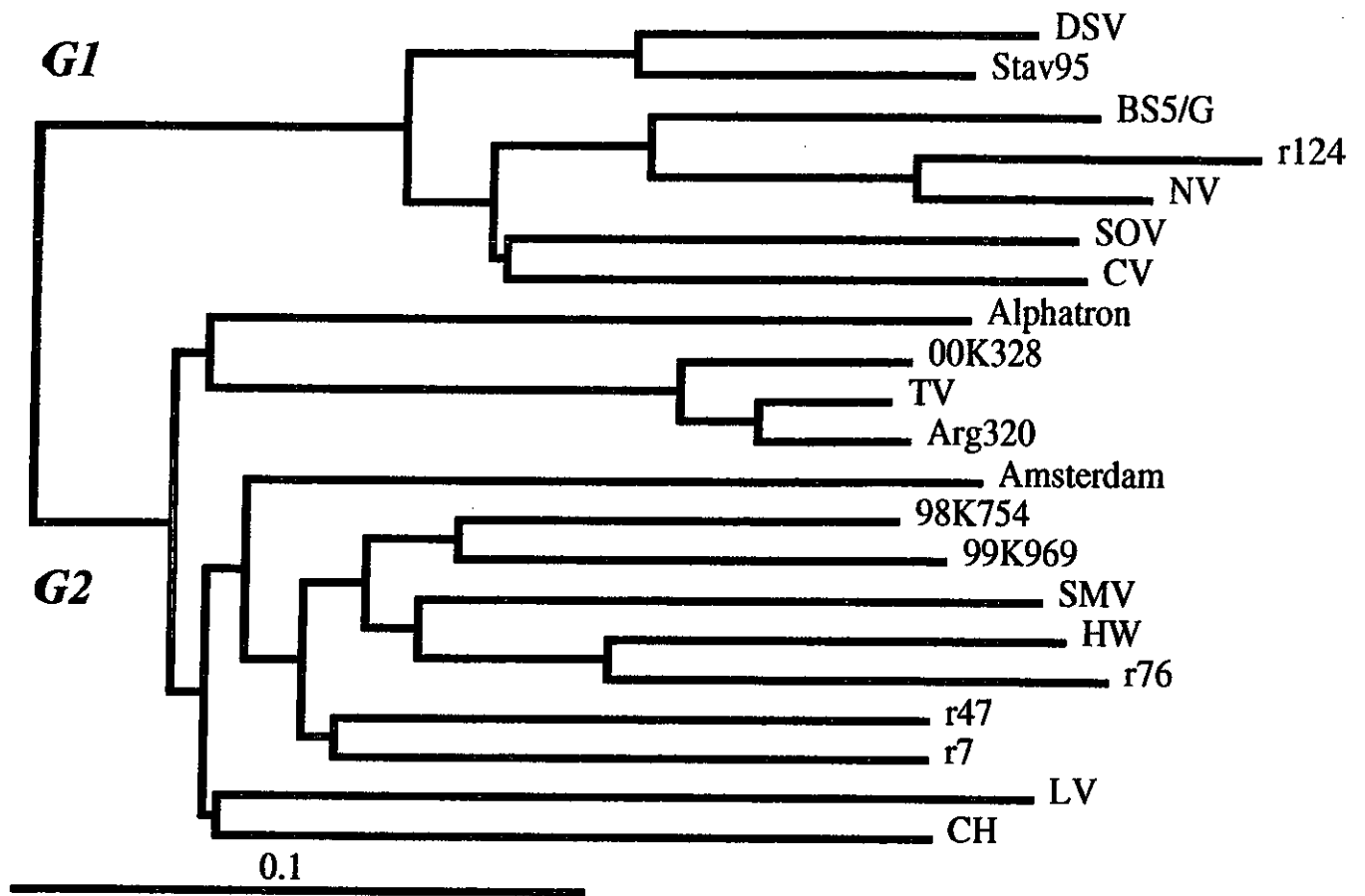
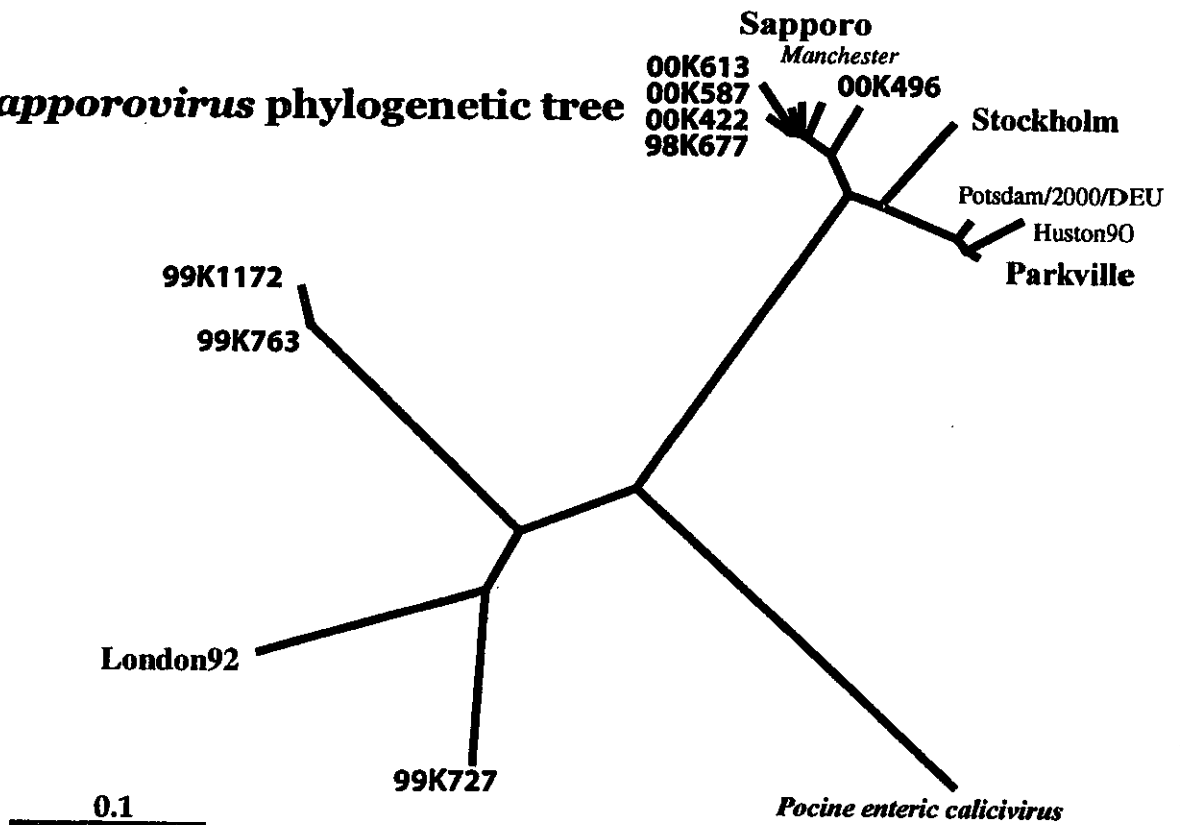


図3 *Sapporovirus* phylogenetic tree



輸入食品のウイルス学的安全性に関する研究

分担研究者 西尾 治 国立公衆衛生院 衛生微生物学部 ウイルス室長

研究協力者 杉枝 正明 静岡県環境衛生科学研究所 主幹

研究要旨

輸入食品、主に東南アジアから輸入されている貝類57件およびエビ（商品名：ブラックタイガー）23件についてウイルス学的安全性を明らかにする目的からPCR法でNorwalk-like Viruses (NLVs)、A型肝炎ウイルスの検出を行った。その結果二枚貝57検体中2検体（韓国産赤貝2件）からNLVsが検出された。遺伝子配列から2月に検出されたものはここ2,3年韓国に常在しているウイルスであったが、1月のものは従来日本等で報告されているものとは異なっていたので、今後このウイルスについて、国内のNLVsによる食品媒介胃腸炎患者からのものを調べなければならないと考えている。

エビ類はNLVsおよびA型肝炎ウイルスは全て陰性であった。

貝類にはウイルスに汚染されているものが存在したことから、今後は食品の衛生確保のために、規模を拡大し監視する必要がある。またこれら食品についての衛生管理の教育が望まれる。

A. 研究目的

発展途上国、特にアジア地域では依然として衛生環境が悪く、A型肝炎ウイルス等の危険度の高い病原体の濃厚汚染地域が存在している。これらの病原体は患者の糞便から大量に排泄され、それらは河川水・海岸付近の海水を汚染している可能性が高いと推測される。そのような地域で採取された貝類はウイルスに汚染されている危険性が高いと予測される。二枚貝によるA型肝炎ウイルスの集団発生は中国、欧米でしばしば発生している。わが国においても過去に見られている(1)。

NLVsによる食中毒様の下痢症の集団発生はわが国においても冬期に多発し、同様に欧米を初めとして世界中で起きている。NLVsおよびA型肝炎ウイルスおよび共にその

原因食品として二枚貝によることが多い。

二枚貝のウイルス学的安全性は輸出国および輸入国であるわが国でも殆ど検査されない。

従って、輸入食品のウイルス学的安全性を確保することは国民の健康維持および食品の衛生確保と観点から極めて重要であると言える。

以上のことから、主として東南アジアからの貝類およびエビ類についてウイルス検査を行い、ウイルス汚染の実態を明らかにした。

B. 研究方法

検査材料：輸入魚介類は愛知県北部市場に2,000年4月から2001年2月の間に搬入された貝類で、原則的に毎月5検体を採取した。

貝類は韓国産の赤貝28件、ハマグリ12件、とり貝3件、北朝鮮産の平貝9件、ハマグリ1件および中国産のハマグリ3件、アサリ1件計57件を用いた。エビ類は7月と8月に採取し、全てブラックタイガーで、インド産8件、フィリピン産6件、インドネシア産5件、タイ産2件、スリナムおよびベトナム各1件、計23件を用いた。

PCR法：二枚貝は中腸腺を、エビ類は腸管を摘出し、PBSで10から20%乳剤とした10,000rpm、20min遠心し、その上清を30%シュウクロースに重層後、35,000rpm、180min遠心し、そのペレットをPBSで再浮遊させ、それをRNAの抽出用いた。

ウイルスRNAの抽出：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)}、35'のプライマーを用いM-MLV RTで作製した。

1st PCRでは35'/36のプライマー、CDC AndoらのSRプライマーを、Nested PCRは1st PCRの35'・35の産物を用い、NV81/82/SM82並びにYuri22R/Fを用いた。また、ORF2領域のプライマーをも用いた(G1-SKF, G1F2, G1SKR, G2KR, G2-F3, G2-SKR)。

A型肝炎ウイルスでは1st P17, N18, Nested P15, N16プライマーを用いて行った。

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陽性のものはダイターミネーター法で遺伝子配列の決定を行い、NLVsのポリメ

ラーゼ領域、あるいはカプシド領域のUPGMA法による解析を行った。

C: 研究成績

4月から12月の間に採取した輸入二枚貝は検査した項目全て陰性であった。しかし、2000年1月および2月の韓国産赤貝各1件からNLVsが検出された。1月に検出されたものはプライマーNV81/82/SM82とSRで検出された。1月のものはORF2のプライマーのGenotype 1と、SRのGenotype 1のプライマーで(00-SF-46)、2月はプライマーNV81/82/SM82とSRで検出された(00-SF-55)。

NLVsの遺伝子解析を行った結果1月のものはGenotype 1であったが、従来報告されているものと異なっており、さらに1コドンが挿入されていた。

A型肝炎ウイルスは全て陰性であった。またエビ類はウイルスが全て陰性であった。

D: 研究考察

わが国には、平成9年度の検疫所統計によると、二枚貝は138,034万トン、エビ類は182,905万トンと言う膨大な量の食品が輸入されている。これらのウイルス学的安全性は全くといってよいほど調べられていない。

食品によるウイルス感染症としては、二枚貝によるNLVsによる食中毒様下痢症が世界的に最も多い。その原因食品として生牡蠣によることが多い。わが国でも毎年冬期に牡蠣関連集団発生事例が多発し、健康被害が多発している。

今回の調査・研究において、韓国産赤貝の1月と2月からの各1例から検出された。日

本と同様に4月から12月の間の輸入例からは検出されなかったが、日本におけるNLVsの流行期と一致する韓国産赤貝の1月と2月からの各1例から検出された。このことから日本にはウイルスに汚染された二枚貝が入ってきていることが示された。

遺伝子配列から、2月の韓国産赤貝から検出されたウイルスは過去2、3年の間韓国産からの二枚貝から検出されたものとほぼ同一のもので、このタイプのウイルスは韓国に常在していると推測された(図1)。しかし、1月に検出されたものは従来報告されているものと若干遺伝子型が異なっており、さらに1コドンの挿入が認められた。今後このウイルスがわが国の食品媒介下痢症患者から検出されるか否かについて監視する必要があると考えている。

また赤貝は生食することから、中腸腺を完全に除去し、良く洗う事、廃棄する中腸腺の取り扱いにも注意すべきであり、この点に関しての衛生教育が必要とされる。

今年度は二枚貝、エビ類からA型肝炎ウイルスおよびアストロウイルスが検出されなかった。エビ類は7月、8月に採取したことから、NLVsの流行期でなかったことから陰性であり、さらに過去にエビ類はコレラの汚染が問題となったこともあって、浄化が恐らく良く行われているのではと思われる成績であった。またエビ類の消化管は貝類に比べ極めて単純な構造で、ウイルスが吸着しても、容易に浄化され、ウイルスが検出されなかったと考えられる。

わが国の患者情報によると、A型肝炎ウイルスは常在していない国であると考えられていた。ところが新たに肝炎になったもの

のうち、A型肝炎ウイルスはその患者数の半分を占め、このうちの少数例は同性愛者、海外旅行者が含まれているが、多くは原因不明で、食品媒介が強く示唆されている。われわれは平成9年度厚生科学特別研究で輸入二枚貝にはA型肝炎ウイルスに汚染されているものも存在することを報告しており、今後輸入二枚貝におけるA型肝炎ウイルスの監視を強めなければならないと考えている。

E. 研究まとめ

輸入食品のウイルス安全性を確保することを目的として、主にアジアからの二枚貝類およびエビ類のウイルス学的安全性について調査・研究を行った。その結果、韓国の赤貝2件からNLVsが検出された。このことからウイルスに汚染された食品が輸入されている。今後食品の衛生確保の観点からウイルス学的安全性の監視を強める必要性がある。

F. 参考文献

1) Konno T. et al., Oyster associated hepatitis A, Hokkaido Igaku zasshi, 58, 553-555, 1983.

2) Holzer et al., Incidence of hepatitis virus infections and diseases in travelers returning from the tropics. Schweiz Med Wochenschr., 110, 1514-21, 1980.

3) 国立感染症研究所感染症情報センター：病原微生物検出月報

G. 研究発表

1. 論文

Hideki Kohno, Shiho Akihara, Osamu Nishio, Hiroshi Ushijima. Development of a simple and rapid latex test for rotavirus in stool samples. *Pediatrics International*. 42(4), 395-400, 2000

Osamu Nishio, Kiyohiko Matsui, Doan Thi Phoung Lan, Hiroshi Ushojima, Sin Isomura. Rotavirus infection among infants with diarrhea in Veitnam. *Pediatrics International* 42(4) 422-424, 2000

Osamu Nishio, Kiyohiko Matsui, Tomohitro Oka, Hiroshi Ushijima Agboatwalla Mubina, Akran Dure-Samin, Shin Isomura. Rotavirus infection among infants with diarrhea in Pakistan *Pediatrics International* 42(4), 425-427, 2000.

山上隆也、町田篤彦、浅川洋美、小澤 茂、西尾 治、井上利男：1999/2000年冬季に山梨県で発生したウイルス性胃腸炎について、山梨県衛生公害研究所年報, 43 : 38-41, 2000

2. 学会発表

那須美行、阿部 浩、敦賀俊彦、西尾 治、当院における感染性下痢症の病因病原体、第49回日本臨床衛生検査学会、5, 11-12, 2000、 那覇市 P608

川本 歩、西尾 治、Norwalk-like viruses を起因とした5例の集団食中毒発生例、第

41回 日本臨床ウイルス学会、5, 25-26, 2000 広島市、2000

加藤由美子、鈴木 博、西川 真、小野論子、杉枝正明、川本 歩、西尾 治、各地で検出されたノーウオクウイルスの遺伝子型別について、第40回日本ウイルス学会、10, 12-14, 2000、津、P317

濱野雅子、葛谷光隆、藤井理津志、小倉 肇、西尾 治、西川 真、生カキによるNV集団下痢事例における患者由来株とカキ由来株の分子疫学、第48回日本ウイルス学会総会、10, 12-14, 2000、津、P327

西尾 治、加藤由美子、マイクロプレートハイブリダイゼーションによるノーウオクウイルス(NV)の遺伝子型別について、第40回日本ウイルス学会、10, 12-14, 2000、津、P236

西川 真、渡邊香奈子、新井礼子、篠川 旦、加藤由美子、西尾 治、鈴木 宏、冬期に流行したノーウオク様ウイルスの遺伝子解析、第40回日本ウイルス学会、10, 12-14, 2000、津、P324

H. Ushijima, S. Akihara, S. Y. Zhou, M. Hotta, S. Okitsu, O. Nishio, J. K. Seto, N. ManeeKan, Z. Y. Fang, C. H. Tsai. Trend of rotavirus gastroenteritis in Asia. The Japan-United States Cooperative Medical Science Program Thirty-fourth joint working conference on viral

diseases 7, 20-22, 2000 、 Inuyama, Japan.

3. 著書

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、ウイルス性下痢症診断マニュアル、国立感染症研究所ウイルス第二部 衛生微生物技術協議会レファレンス委員会発行第 2 版、昭和情報プロセス K K, 13-15、, 2000

2000 年 7 月

西尾 治、カリシウイルスの PR-PCR 法とハイブリダイゼーション、ウイルス性下痢症診断マニュアル、国立感染症研究所ウイルス第二部 衛生微生物技術協議会レファレンス委員会発行第 2 版、昭和情報プロセス K K, 44-54, 2000

西尾 治、アデノウイルス、ウイルス性下痢症診断マニュアル、国立感染症研究所ウイルス第二部 衛生微生物技術協議会レファレンス委員会発行第 2 版、昭和情報プロセス K K, 56-70, 2000