

べた結果、T-152 株は他の P[9]株とは最も関連が小さかった (表3)。

#### 4) 考察

1990 年に初めてフィリピンで検出された G12 型の L26 株は PIB[4]特異性を有している。しかしながら、タイで検出された T-152 株は P[9]特異性を示した。P[9]は、ヒトとネコにのみ検出されており、その頻度もきわめて低く、0.2%~3.8%と報告されている。P[9]を有するロタウイルスはこれまで、G3 あるいは G1 のみであるので、本研究で検出した T-152 株は自然界でのリアソータントであることが判明した。さらに、VP7 遺伝子も VP4 遺伝子もこれまでの株との相同性は必ずしも高いとは言えない。1990 年以来まったく検出の報告はないが、G12 型のロタウイルスはかなり変異を遂げており、この結果は、G12 特異性を有するロタウイルスの分布は決して低くないものと思われる。VP4 および VP7 遺伝子以外の遺伝子がどのようなウイルスと関連があるのかを、ノーザンブロットングにより検討する必要がある。

タイにおいては、これまでさまざまな非定型のロタウイルス株がヒトおよび動物に検出されており、今後とも、継続してロタウイルス株の調査を進める必要がある。現在 G12 型特異的なモノクローナル抗体を作成しており、ロタウイルスの生態を探るとともに、ワクチン開発に向けた基礎的データを提供する意味でも、大規模、長期的な調査の必要があると思われる。

#### 5) 研究発表

##### 論文発表

Pongsuwanna Y., Guntapong R., Chiwakul M., Tacharoenuang R., Onvimala N., Wakuda M., Kobayashi N., and Taniguchi K. : Detection of a human rotavirus with G12 and P[9] specificity in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2002 (in press)

Adah M. I. Abel W., Oseto M., Kuzuya K., and Taniguchi K. : First detection of human group C rotaviruses in Nigeria and sequence analysis of their genes encoding VP4, VP6 and VP7 proteins. *J. Med. Virol.*, 66:269-275, 2002

Takahashi K, Ohashi K, Abe Y, Mori S, Taniguchi K, Ebina T, Nakagomi O, Terada M, and Shigeta S. : Protective Efficacy of a Sulfated Sialyl Lipid (NMSO3) against Human Rotavirus-Induced Diarrhea in a Mouse Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:420-424, 2002

Adah MI, Wade A, and Taniguchi K. : Molecular epidemiology of rotaviruses in Nigeria: detection of unusual strains with G2P[6] and G8P[1]

specificities. *J. Clin. Microbiol.* 39:3969-3975, 2001

Takahashi K., Matsuda M., Ohashi K., Taniguchi K., Nakagomi O., Abe Y., Mori S., Sato N., Okutani K., and Shigeta S.: Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral Res.*, 49:15-24, 2001

Kobayashi N., Naik TN, Kusuhara Y. Krishnan T., Sen A., Bhattacharya SK, Taniguchi K, Alan MM, Urasawa T, and Urasawa S. : Sequence analysis of structural and non structural proteins of a human group B rotavirus detected in Calcutta, India. *J. Med. Virol.*, 64:583-588, 2001

表1 代表的ロタウイルス株と T152株のVP7遺伝子の塩基配列およびVP7のアミノ酸配列の比較

G serotype	Strain	Homology (%)	
		Nucleotide	Amino acid
G1	KU	76.2	79.5
G2	S2	73.5	76.4
G3	YO	76.3	81.9
G4	VA70	73.7	74.8
G5	OSU	76.9	80.7
G6	NCDV	75.5	79.5
G7	Ty1	65.3	59.9
G8	69M	73.8	79.5
G9	WI61	77.6	81.9
G10	A44	74.4	77.9
G11	YM	75.2	81.3
G12	L26	91.0	94.2
G13	L338*	74.4	78.8
G14	CH3	75.4	77.9

\*L338株のVP7遺伝子の全塩基配列は決定されていないので、No.3～1,038の領域について比較した。

表2 代表的ロタウイルス株とT152株のVP4遺伝子の塩基配列と  
VP4のアミノ酸配列の比較

VP4 genotype	Strain	Homology (%)	
		Nucleotide	Amino acid
1	NCDV	69.4	70.7
2	SA11	69.3	70.6
3	CU1	69.2	69.5
4	DS1	66.9	65.0
5	UK	48.1	67.1
6	M37	67.6	65.9
7	OSU	48.4	69.4
8	KU	67.4	63.8
9	K8	90.0	95.5
	AU1	90.3	95.6
	02/92	89.4	93.9
	Cat2	89.3	94.3
	FRV-1	90.6	95.4
10	69M	69.8	69.7
11	B223	62.9	55.1
12	FI14	69.5	68.7
13	MDR13	68.3	66.2
14	Mc35	77.7	86.7
15	Lp14	68.7	67.9
16	EB	65.1	63.4
17	993/83	64.5	58.9
18	L338	68.5	68.3
19	Mc323	67.4	66.5
20	EHP	35.0	67.4
21	Hg18	37.7	66.0

T152 L26	MYGIEYTTILTFILISIVLLNYILKSITNIMDFIYRFLLIWVWMLPFIIKAQNYGINLPIT I SM VF IV	60 60
T152 L26	GSDMTAYTNSTQQENFMTSTLCLYYPSSVTFEITDPDWTNTLSQLFLTKGWPTNSVYFKS V S N H	120 120
T152 L26	YADIASFSVDPQLYCDYNIVLVQYQNSLALDVSELADLILNEWLCNPMVDVTLYYYQQTDE N	180 180
T152 L26	ANKWISMGESCTVKVCPLNTQLGIGCITTDVTFEEEVANA[EKLVITDVVDGVDVNHKINIT D M A	240 240
T152 L26	VNTCTIRNCKKLGPRENVAIIQVGGSDVIDITADPTTIPQTERMRINWKKWQVFTW L Q I I	300 300
T152 L26	DYINQIVQVMSKRSRSLNSAAFYRI I I	326 326

図 2 G12 血清型を有する L26 株と T-152 株のアミノ酸配列の比較

T-152 のアミノ酸については、L26 株と異なるアミノ酸のみを示した。3 箇所的主要な抗原領域をボックスで囲んだ。

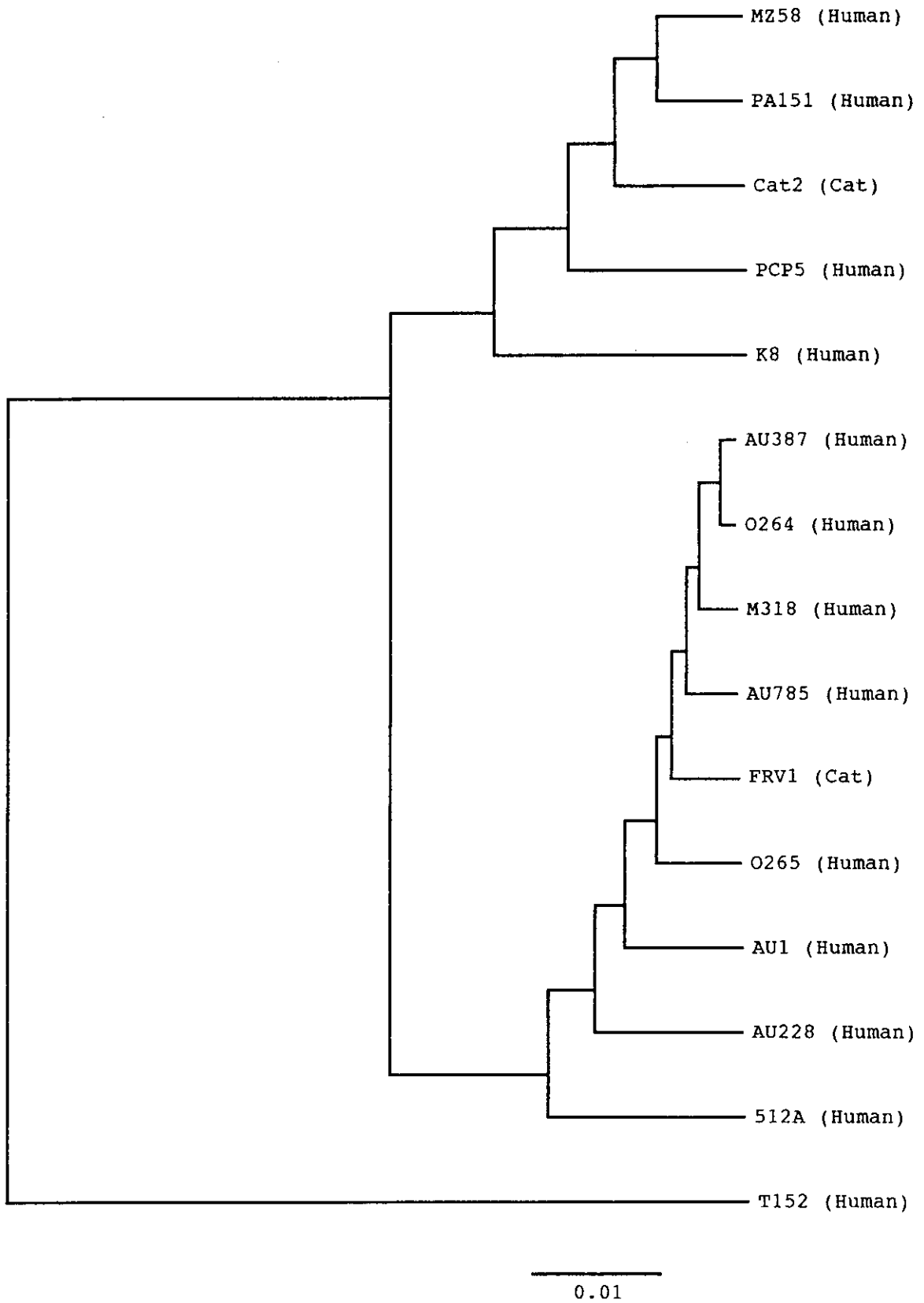


図3 P[9] 特異性を有するT-152 株をを含めたヒトおよび動物ロタウイルスのVP8\* コード領域の系統図

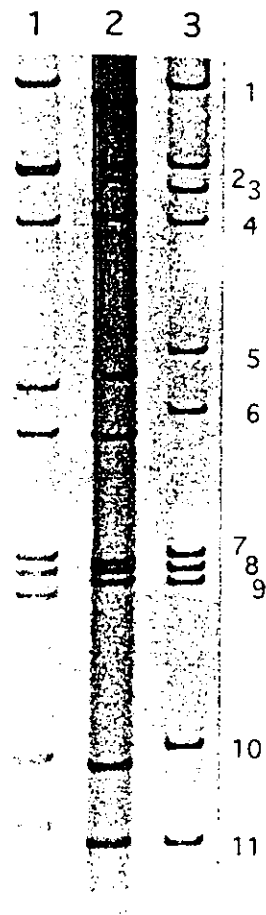


図1 T-152株由来 RNA のポリアクリルアミド電気泳動における RNA パターン

レーン 1 : KU 株 ; 2 : L26 株 ; 3 : T152 株

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

Immunocapture RT-PCR 法による食中毒推定原因食品からの  
ノーウォークウイルスの検出

分担研究者 榮 賢司 愛知県衛生研究所 微生物部部长  
協力研究者 小林慎一 愛知県衛生研究所 微生物部主任研究員

研究要旨 ノーウォークウイルス(NV)は未だ培養不能なことから、食中毒の推定原因食品から NV を検出するためには、多量の食品から NV を濃縮して回収する必要があるなど、その検出には困難な点が多いのが現状である。そこで、食中毒患者の糞便検体に対する RT-PCR と抗原検出 ELISA の検査成績から、Chiba 型 NV(遺伝子グループ I の NV)の関与が推定された食中毒事件において、Chiba 株の抗体を結合した磁気ビーズを用いて推定原因食品から NV を回収した後に、RT-PCR を実施し、NV の検出を試みた。その結果、残品食品 9 品目のうち、2 品目から NV 遺伝子を検出することができた。また、PCR 産物の遺伝子解析の結果、食中毒患者糞便及び食品に由来する NV は互いに相同性の高い Chiba 株に近縁な NV であることが確認された。以上のことから、今回我々が検討した磁気ビーズを利用した Immunocapture RT-PCR 法は、多数の検体の迅速処理可能な簡便な NV の検出法として、食中毒検査には有用な方法であると考えられた。

A. 研究目的

平成9年5月の食品衛生法施行規則の改正により、ウイルスが食中毒の病因物質として新たに追加指定された。これに伴い、ウイルス感染が疑われる食中毒事例及び食中毒症状を有する苦情事例については、行政的ウイルス検査が実施されることとなった。平成12年の食中毒統計によると、全国で240件のウイルス性食中毒が発生し、その内の238件(99.2%)がノーウォーク

ウイルス(NV)に起因する食中毒事件であったことが報告されているように、NVは食中毒の主要な病因物質の1つである。食中毒の感染源および感染経路を解明するためには、食中毒患者、調理人および推定原因食品からの病原体の検出が必須である。

NVは未だ分離培養ができないウイルスであるので、NVの検出検査にはRT-PCR法が実施されている。RT-PCR法を用いることで、患者や調理人の糞

便検体から NV 遺伝子を検出することは可能となっている。しかしながら食品等からの NV の検出に関しては、NV が調理食品や食材の中では増殖しないことから含まれるウイルス量は低いと考えられるものの効率的な回収法がないため、多量の食品を処理しても検出不可能な現状である。

近年、遺伝子型の異なる NV からバキュロウイルス発現系を用いてウイルス様中空粒子 (Virus-like Particles : VLPs) の作製が可能となったことに伴い、VLPs に対する抗体も得ることができるようになった。そこで、食品から迅速、簡便に、かつ選択的に NV を回収することを目的として抗 NV 抗体を結合した磁気ビーズを用い、特定一食中毒事例における推定原因食品からの NV 遺伝子検出を試み、**Immunocapture RT-PCR** 法を用いた NV 検出法の可能性について検討を加えた。

## B. 研究方法

### 1 材料

愛知県内の一弁当屋が提供した給食弁当を平成 13 年 2 月 27 日に喫食した互いに関連の無い 11 か所の事業所 736 名の従業員うち、52 名 (7.1%) が 2 月 28 日から 3 月 2 日にかけて、腹痛、下痢、発熱、嘔吐などの食中毒症状を訴えた集団食中毒事例で、胃腸炎患者 9 名から採取された糞便 9 検体と弁当の残品 9 品目を使用した。

### 2 糞便検体からの NV 検出検査

NV の検出には RT-PCR 法と抗原検出 ELISA を用いた。

#### ① NV 遺伝子検出法 (PCR 法)

糞便検体を滅菌精製水で 10% 乳剤とし、10,000rpm、20 分遠心分離後、その上清から Trizol LS Reagent (Gibco BRL) を用いて RNA を抽出した。抽出 RNA は Oligo(dt)15 プライマー (Promega)、Random プライマー (Takara) と Moloney murine leukemia virus 由来の逆転写酵素 (Gibco BRL) を用い、37°C、1 時間の反応で cDNA に変換した。PCR 反応は、NV の構造タンパク領域を増幅するプライマーを使用し、反応条件は 94°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 1 分の 40 サイクルとした。PCR 産物の検出は、1.5% アガロース電気泳動で分離後、エチジウムブロマイド染色にて 320bp のバンドの有無を確認した。また、PCR 産物を pGEM-T Vector に組み込むことでクローニングを行なった後、オートシーケンサー (LI-COR, model 4000) で塩基配列を決定した。

#### ② 抗原検出 ELISA

NV 検出のための ELISA 系は、組換えバキュロウイルスで発現された 7 種類の VLPs に対するウサギ抗血清を捕獲抗体とし、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗 NV 抗体 (7 種) を検出抗体とするサンドイッチ型 ELISA である。7 種類の VLPs の内訳は遺伝子グループ I (Genogroup I (GI)) は、rSeto virus (Norwalk-like virus)、rFunabashi virus (Southampton-like virus)、および rChiba virus の 3 種、遺伝子グループ II (Genogroup II (GII)) は、rNarita virus (Grimsby-like virus)、



rChitta virus (Hawaii-like virus)、それに r47 と r7 の 4 種の合わせて 7 種である。

### 3 抗 Chiba 型 NV 抗体結合磁気ビーズの調製法

組換えバキュロウイルスで発現された Chiba 株 (GI の NV) の VLPs をウサギに皮下投与することで抗体を作製した。Dynabeads M-280 Sheep Anti-Rabbit IgG (ダイナル社) 約 1mg に対して精製抗 Chiba 株抗体 50  $\mu$ g を室温で 1 時間反応後、0.1%BSA を含む PBS (PBS/BSA) で 1mg/ml に調製した。

### 4 磁気ビーズを用いた RT-PCR による食品からの NV 検出法

食品 (10 ~ 15g) の表面を精製水 2.5ml で食品に付着するウイルスを洗い流した後、8000rpm で 20 分間冷却遠心後、上清を回収した。ダイフロン 1ml を遠心上清に添加・混和した後、8000rpm で 10 分冷却遠心した。上清を回収し、50  $\mu$ g の抗 Chiba 株抗体結合磁気ビーズを 37°C で 1 時間反応させた後、PBS/BSA で洗浄した。回収した磁気ビーズを精製水 100  $\mu$ l に懸濁させた後、Trizol 試薬 300  $\mu$ l で RNA を抽出した。以下、糞便検査と同様の方法で RT-PCR を実施した。

## C. 研究結果

### 1 糞便検体からの NV 検出

食中毒患者の糞便検体からの PCR および ELISA による NV の検査成績を表 1 に示した。遺伝子グループ I (GI) とグループ II (GII) の NV を分けて検出可能なプライマーを用いて PCR を実

施した結果、糞便 9 検体のうち 6 検体 (66.7%) が GI 検出用プライマーで陽性となった。得られた PCR 産物を遺伝子解析したところ、6 検体ともに GI の Chiba 株に近縁な NV であった。また、7 種類の抗原型を検出可能な ELISA で検査した結果、PCR 陽性の 6 検体が全て Chiba 株に陽性として検出され、遺伝子型の分類と完全に一致する結果が得られた。

### 2 推定原因食品からの NV 検出

食中毒の原因施設で収去された弁当の残品 9 品目について、抗 Chiba 株抗体を結合した磁気ビーズを利用して NV を濃縮・回収した後、RT-PCR を実施した。結果を図 1 に示したが、2 品目 (ロールキャベツとカレーマカロニ) から NV 遺伝子が検出された。そこで、患者由来の NV 遺伝子を基にして作製したプローブを用いてサザンブロットングを行なったところ、プローブは食品由来の PCR 陽性産物 2 検体と特異的に反応することが確認された。

食品由来の PCR 産物をクローニング後、その塩基配列を決定し、食中毒患者由来の NV 遺伝子との系統樹解析を行なった結果を図 2 に示した。食品由来の NV と患者由来の NV とも互いに相同性が高いウイルスであり、また、いずれの NV も Chiba 株に近縁な NV であることが明らかとなった。

## D. 考察および結論

今回、我々は NV に対する抗体を結合した磁気ビーズを用いることで、食

中毒の原因と推定された残品食品から迅速、かつ簡便に NV を検出することができた。このことから、バキュロウイルス発現系を利用した抗体の作成、及びその抗体を用いた抗 NV 抗体結合磁気ビーズを利用することによって、ウイルス量の少ない食品からも多量な NV の回収が可能となり、RT-PCR 法による NV の検出が可能となることが明らかとなった。しかしながら、NV は抗原的多様性の大きいウイルスであることから、すべての型の NV 検出に必要な抗体の数やその組み合わせについて、今後更なる検討を加える必要があるものと考えられる。また、現時点においては食品からの定性的な検出結果であるので、今後は食品中の NV 汚染量を把握するために NV の定量的検出法の検討が必要と考えられる。

#### E. 研究発表

##### 学会発表

- 1) 小林慎一、榮 賢司：食品中のノーフォークウイルスの検出—磁気ビーズを用いた Immunocapture RT-PCR 法の試み—、第 42 回日本臨床ウイルス学会、名古屋、2001
- 2) 小林慎一、榮 賢司、鎌田公仁夫、佐藤俊則、名取克郎、武田直和、磁気ビーズを利用した RT-PCR による食品からのノーフォークウイルスの検出、第 49 回日本ウイルス学会総会、大阪、2001

表1 RT-PCR および ELISA による糞便検体からの NV の検出成績

検体	PCR			ELISA		
	GI	F/R	GII F/R 遺伝子型	GI	GII	抗原型
患者 1	—	—		—	—	
患者 2	+	—	Chiba	+	—	Chiba
患者 3	+	—	Chiba	+	—	Chiba
患者 4	—	—		—	—	
患者 5	+	—	Chiba	+	—	Chiba
患者 6	+	—	Chiba	+	—	Chiba
患者 7	+	—	Chiba	+	—	Chiba
患者 8	—	—		—	—	
患者 9	+	—	Chiba	+	—	Chiba

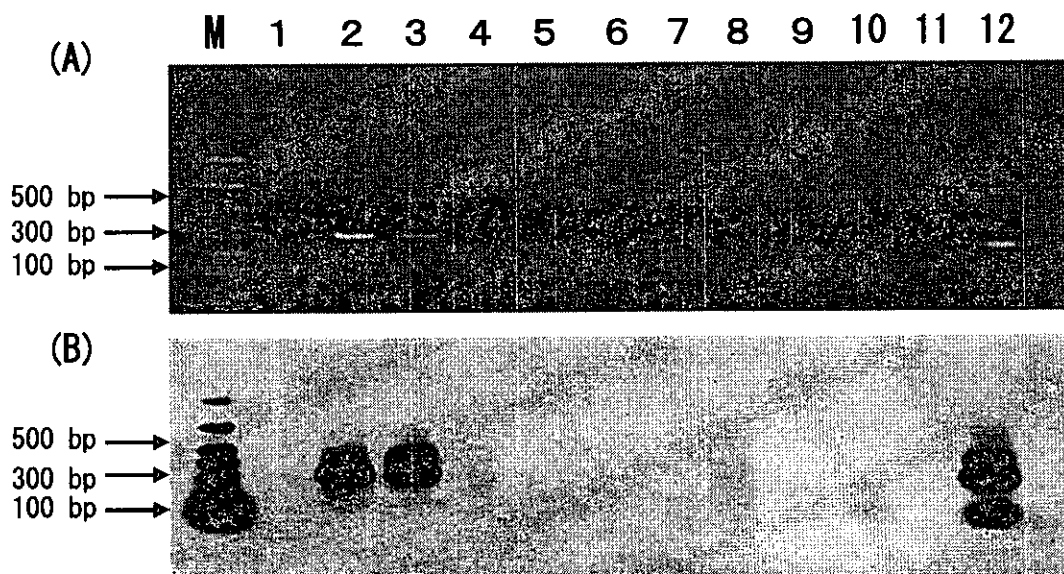


図1 抗Chiba抗体結合磁気ビーズを利用したRT-PCRによる食中毒原因食品からのNV検出(A)とサザンブロッティングによる確認(B)

- M. 分子量マーカー 1. がんもどき 2. ロールキャベツ 3. カレーマカロニ  
 4. 糸こんにゃく 5. 焼豆腐 6. キャベツ 7. たけのこ煮物  
 8. きゅうり 9. 切干し大根 10, 11. NC 12. PC

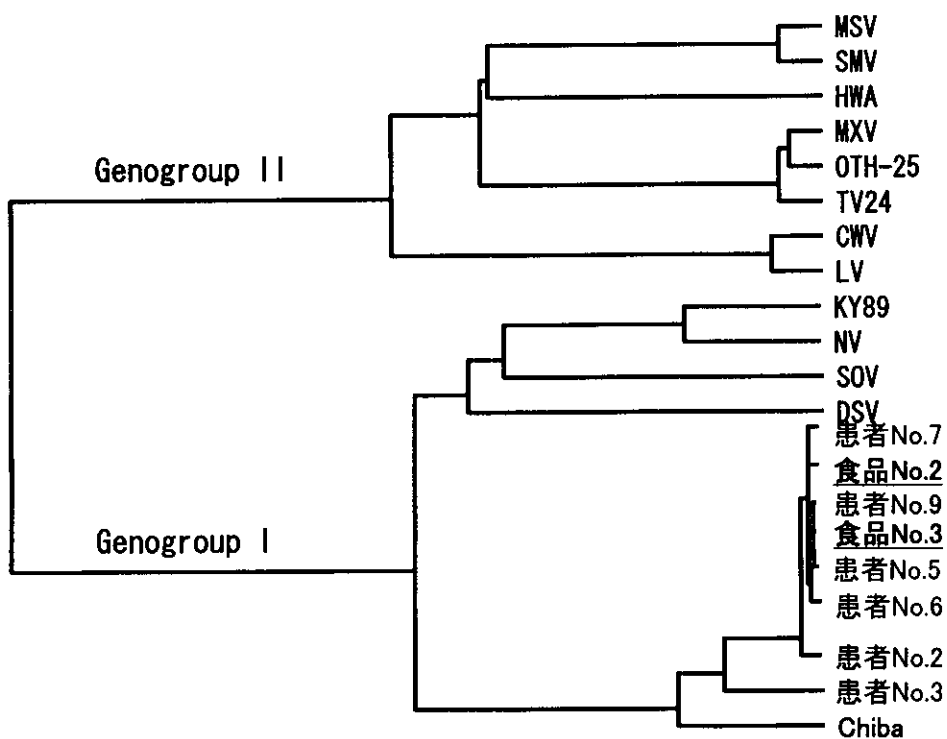


図2 患者および食品から検出されたNVの系統樹解析

## 食品媒介性胃腸炎集団発生の背景としての地域における

### 下痢症ウイルス流行状況に関する研究

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（同上）

**研究要旨：**ウイルス性食中毒やウイルスによる胃腸炎集団発生の背景には、地域社会における種々なウイルスの流行が考えられ、地域の下痢症ウイルスの流行状況を把握しておくことは重要である。1999年から2001年の散発性下痢症について電子顕微鏡法とRT-PCRを用いて、継続的病原検索を行った。その結果、患者数が多い冬季を中心に、Norwalk virus、Sapporo virusのカリシウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、腸管アデノウイルスが混在して流行していることが示された。特に、Sapporo virusがカリシウイルスの25%を占めていたことは注目され、今後のSapporo virus検査法の普及が課題として提起された。

#### A. 研究目的

近年、ウイルスによる食中毒や施設内での胃腸炎集団発生の報告が増加傾向にある。ヒトに急性胃腸炎をおこすウイルスは、カリシウイルス（Norwalk virus (NV)、Sapporo virus(SV)）、ロタウイルス、腸管アデノウイルス、アストロウイルス等がよく知られているが、ウイルス性食中毒の9割以上はNVが原因であるとされており、衛生行政上はNVが最も重要視されている。また、それらの下痢症ウイルスは、全国的規模で主に冬季に流行しており、晩秋から初春にかけて感染症発生動向調査の感染性胃腸炎患者の莫大な報告数として把握されている。特に、NVは晩秋に流行がみられる年長小児や成人の胃腸炎の原因として重要で、主に乳幼児、幼若小児の嘔吐下痢症の原因であるロタウイルスとともに公衆衛生上注目されている。これらの下痢症ウイルスは、地域での流行の

結果、河川や海域に流入し、魚介類に濃縮される。その魚介類を消費する地域社会へ食中毒という形で還ってくる。魚介類は時には、遠隔地まで運ばれウイルスの拡散、流行の拡大の役割を担っていると考えられている。下痢症ウイルスの地域での流行は、飲料水のウイルス汚染や調理食品の2次汚染機会の増大をもたらし、急性胃腸炎の集団発生を助長する要因となる。食品媒介性ウイルスによる胃腸炎集団発生の制御には、地域における下痢症ウイルスの流行動向を把握しておくことが重要である。そこで、1999年以降愛媛県における急性胃腸炎患者の原因ウイルス検索を行ったので、その結果を報告する。

本報告は特に、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きたSVの流行について重点的に報告する。

## B. 研究方法

材料：糞便材料は、1999年1月から2001年12月の間に、感染症発生動向調査病原体検査定点で主に小児の感染性胃腸炎患者から採取した988検体を用いた。

方法：糞便からのウイルス検索は、電子顕微鏡法(EM)及びRT-PCRで行った。EMは常法により疎精製した糞便材料を、2%PTA染色後4万倍で観察し、下痢症ウイルスの検索を行った。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、カプシド領域を増幅するG1/G2系によるnested PCRを用いた。2001年1月以降は、COGF/R系またはCOGF/GSKR系プライマーセットによる1st PCRを行った。SVの検出はカプシド領域を標的としたSV系(千葉県衛生研究所 岡田らの設計)によるnested PCRを用いた。NVのPCR増幅産物については、片山らのRINGプローブを用いて、ドットプロットハイブリダイゼーションで確認を行った。プローブのジゴキシゲニン標識には、DIG Oligonucleotide 3'-end Labeling Kit(Roche)を用いた。SVの遺伝子解析は、千葉県衛生研究所(岡田峰幸)に依頼し、ABI Genetic analyzer 310によるPCR産物のダイレクトシーケンス法でSV遺伝子塩基配列を決定した。そのうち420塩基長のカプシド領域部分の塩基配列およびアミノ酸配列についてNJ法により系統樹解析を行った。

## C. 研究結果

1999年1月から2001年12月までの愛媛県感染症発生動向調査における感染性胃腸炎の患者発生報告数(定点あたり/週)の消長を図1に示した。感染性胃腸炎患者発生は毎年、冬季に2峰性のピークを示し、11月下旬から12月にかけての急峻な患者発生ピークと、1月から3月までの比較的なだらかなピークが観察された。この3年間のEMによる急性胃腸炎病原検索結果について表1及び図2に示した。3年間を通じ、ロタウイルス

は103例(検出率10.4%)検出され最も多かった。次いでSRSVが多く86例(8.7%)検出された。その他にアストロウイルスが26例、アデノウイルスが22例検出された(表1)。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。そのうちC群ロタウイルスは2000年の4月と6月に各1例確認された。SRSVは調査期間を通じて、11月から12月の間と3月から6月の間に検出される2峰性のパターンを示し、明らかにロタウイルスとは異なる季節的消長を示した。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。

1999年と2000年にEMで検出されたSRSV陽性糞便46例について、NVのRT-PCRを行ったが、NV陽性率は50%未満で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、最近岡田らが新たに設定したSV検出用のプライマーを用いてRT-PCRを行った。その結果46例中16例(35%)がSV陽性であった。NVの検出数に対してSVの検出頻度が予想以上に高く、SVの散発性胃腸炎の原因としての役割を明らかにする必要がある。そのため、2000年、2001年は、病原細菌が陰性の検体で材料が残っているものについて、EMと並行してNVとSVのRT-PCRを行った。その結果を図3に示した。3年間を通じて計141例がEMあるいはRT-PCRでカリシウイルス陽性であった。そのうちNVが91例(65%)、SVが36例(25%)、型別不明が14例(10%)であった。このことは最近SVが増加していることを示唆しており、カリシウイルスの検査にはNVとともにSVをターゲットにした検査を併用する必要があることを示している。

NVとSVの月別検出数をみると、NVが12月、1月の寒冷期に多かったのに比べ、SVは3月から6月までと11月に多く検出されている。NVとSVは明らかに流行時期が異

なっており、両者の流行様式が異なることが示唆された。

SV 陽性例と NV 陽性例の年齢分布に差異はみられなかった。また、SV による急性胃腸炎の発熱、下痢、腹痛、嘔吐の主要臨床症状の出現頻度を NV と比較したところ、発熱、下痢、腹痛の出現頻度に差異は認められなかったが、嘔吐は NV が有意に多かった。

小児の散発性急性胃腸炎から検出された SV31 株、および 2000 年 5 月の成人における急性胃腸炎集団発生から検出された SV4 株、計 35 株の SV について、RT-PCR 産物からダイレクトシーケンスを行った。420 塩基対を ClustalX を用いてアライメントし、近隣結合法による解析で得られた SV の系統樹を図 4 に示した。London 株タイプが 2 株、Sapporo 株タイプが 13 株、Sapporo 株と Parkville 株との中間タイプが 12 株、Parkville 株、Stockholm 株に近縁のタイプが 2 株、に分けられたが、これらの既知のタイプに属しないものも 3 タイプ、6 株検出された。このように限られた地域内で 3 年間に検出された SV に塩基配列の多様性が認められた。

これらの検出された株を岡田らの便宜的なクラスター分類に準じて、遺伝子型別した。この分類では、SV の代表株である Sapporo/82 を遺伝子型 1 (G1) とし、London/92 を遺伝子型 2 (G2) とし、最近報告された PEC を遺伝子型 3 (G3) に分類している。各型はさらにサブクラスターに分けられ、G1 では Sapporo/82 や Manchester などが G1a、Houston/90 や Parkville が G1b、Stockholm が G1c に分類され、G2 では London/92 が G2a に分類される。これらの既知のクラスターに分けられない株は、便宜的に新たに遺伝子型名を G4、G5 と割り付け、サブクラスターについても順次 a、b、c、d、のクラスター名をつけた。図 5 に示したように、SV の遺伝子型は検出時期によって同一型が集中している傾向がみられ、G1e 型は 2000 年 2 月から 5 月のみに検出された。さ

らに、同時期に発生した成人の集団発生例から検出された 4 株も G1e であり、地域で流行していた株が集団発生の原因になったことが示唆された。また、2001 年 10 月から 12 月には G1a が集中しており、G1a はその他の時期には 2000 年 5、6 月に 1 株ずつ検出されたのみであった。このような流行の状況から SV は地域に土着しているウイルスではなく、他の地域から浸入した株が流行をおこし、次の流行期には新しい別の株が浸入し流行するという SV の流行形態が考えられた。

NV 検出 RT-PCR は、2000 年には G1/G2 系のプライマーを用いた semi-nested PCR で行ったが、2001 年は厚生労働省からの通知により新たに推奨されたプライマー (COGF/COGR または COGF/SKGR) を用いた 1st PCR に変更した。そこで両年の RT-PCR と EM の結果を比較した (表 2、表 3)。RT-PCR と EM の検査を併用したのは 2000 年は 154 検体で、2001 年は 192 検体であった。2000 年は EM で SRSV 陽性は 24 例であったが、RT-PCR では NV が 29 例、SV が 13 例、計 42 例検出された。2001 年は EM で SRSV 陽性例が 39 例であったのに比し、RT-PCR では NV が 51 例、SV が 15 例、計 66 例検出された。EM との比較において、新たに推奨されたプライマーを用いる方法は 1st PCR にもかかわらず、nested PCR の G1/G2 系とほぼ同等の検出感度を持つと推測された。しかし、両年とも EM で SRSV 陽性であっても RT-PCR 陰性例が、それぞれ 5 例、6 例みられた。今後これらの陰性例について、その理由を詳細に検討する必要がある。

#### D. 考 察

感染性胃腸炎は毎年冬季を中心に流行し、感染症発生動向調査においてもインフルエンザに次いで或いはインフルエンザを凌ぐ患者数が報告されており、我が国においても他の先進諸国と同様その患者数の多さから公衆衛生上重要な疾患として注目されている。冬季の感染性胃腸炎の主要原因はウイルスで、ロ

タウイルス、NV、アストロウイルス、腸管アデノウイルス等の多彩なウイルスが関与している。これらの原因ウイルス、特にNVは、しばしば食中毒を引き起こし、また、学校や施設において胃腸炎集団発生の原因としても衛生行政上の課題となっている。食中毒や集団発生の制御のためには、地域におけるこれらのウイルスの流行動向を把握しておくことが重要である。われわれは、長期継続的に小児急性胃腸炎病原検索を行ってきたが、基本的にすべての検体について細菌検査とEM検査を並行して実施し、NV 検出のためにRT-PCRを併用している。そのためEMでSRSVが検出されてもRT-PCRでNVが検出されない例の割合が年により異なることを経験していた。今回、岡田らの設定したSVプライマーを導入したところ、3年間を通じて、検出されたカリシウイルスの約25%はSVであったことが示された。このSVの増加傾向が今回だけのものか、それともSVの流行形態に変化が現れたのか、今後積極的に監視する必要がある。

従来、SVは乳児院や保育園等での乳幼児の急性胃腸炎集団発生における重要性が述べられ、年長小児や成人を含む散发例における関与は重要視されてなかった。しかし、今回の観察から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しうる可能性があることを示された。

急性胃腸炎の主要臨床症状である発熱、下痢、腹痛、嘔吐の出現頻度について、NVとSV陽性患者に違いがみられるか比較したところ、SVはNVに比べ嘔吐が少ない点にのみ有意差が認められた。また、従来からの知見に反して、NVとSV陽性患者の年齢分布に差異がみられず、SVもNV同様比較的年長小児が多かったことは注目された。

NVのRT-PCRでは数種の優れたプライマーが広く普及しているが、特に最近厚生労働省からの通知で推奨されたプライマーは、ORF1とORF2の境界領域に設定されており、極めて高い検出率を報告している。今回のわ

れわれの成績においても、このプライマーが1st PCRで従来のプライマーによるnested PCRとほぼ同等の検出感度を有すると推測された。

SVについては、ORF1のポリメラーゼ領域に設定されたプライマーが数種の報告されている。しかし、一般にSVは検出数が少ないため、これらのプライマーの評価が十分に確定しているとは言い難い。今回使用した岡田らのSVプライマーは検出感度および検出スペクトルの点でも良好な反応を示したので、SV検出用プライマーとして標準化を図る有力な候補であると思われる。今後さらに多くの現場で評価、検討をされることを期待する。しかし、今回これらの優秀なNV、SV用のプライマーを用いても、EM陽性例の一部にRT-PCRで検出されない例が残された。今後、それらの不検出例について原因を詳細に検討する必要がある。

SVにおいても遺伝子の多様性が認められ、3または4の系統樹クラスターに分かれると報告されている。今回、限局された地域内で3年間という短期間に検出されたSVが、少なくとも5つのクラスターに分かれ、既知のクラスターに属しない株も見られた。これらのことから、SVもNVと同様、多種類の遺伝子型のウイルス株が混ざり合って流行を繰り返していることが推察された。全国的な規模でSVの遺伝子型の流行状況を調査できれば、複雑なNVの流行実態を解明するためのモデルとして、有用な知見が得られるものと考えられた。

この調査を通じてEMをRT-PCRと併用することの重要性が認められた。EMではウイルス検出感度は低いですが、検出できるウイルスの種類は多い。急性胃腸炎のように多種類のウイルスが原因となる疾病の病原検索には、特に有用である。EMでSRSV陽性かつRT-PCR陰性の事例について、原因を追求した結果SVが検出された。EMではロタウイルスやアストロウイルス等他のウイルスの流行状況も同時に把握することができ、また、

それらのウイルスとの重複感染例もしばしば検出される。このような総合的な診断能力は EM の特徴であり、今後も EM の利点を活用すべきであると思われる。

## G. 知的財産権の出願、登録状況

なし

## E. まとめ

- 1)1999年1月から2001年12月に小児の散发性急性胃腸炎からEMおよびRT-PCRでロタウイルスが75例(11.3%)、SRSVが141例(14.3%)検出された。アストロウイルス、アデノウイルスもそれぞれ26例(2.6%)、22例(2.2%)検出された。
- 2)検出されたSRSVの内訳は、NVが91例(65%)、SVが36例(25%)、型別不明が14例(10%)で、SVの多さが注目された。
- 3)SVの検出時期は3月から6月の間と11月で、NVの好発期と異なっていた。
- 4)SV 散发例の系統樹解析は、Sapporo株タイプ、London株タイプ、Sapporo株とParkville株の中間タイプ、さらにそれらのどれにも属さないタイプ等が認められ、多様な遺伝子型の株が流行していることが示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Adah M. I, Wade A, Oseto M, Kuzuya M and Taniguchi K. Detection of Human Group C Rotaviruses in Nigeria and Sequence Analysis of Their Genes Encoding VP4, VP6, VP7 Proteins. J. Med. Virol. 2002; 66: 269-275

### 2. 学会発表

1) 大瀬戸光明、山下育孝、吉田紀美、近藤玲子、岡田峰幸、篠崎邦子：急性胃腸炎の集団発生例及び散发例における Sapporo virus の役割。第 49 回日本ウイルス学会、大阪市、2001、11 月。

2) 左近直美、大瀬戸光明、山崎謙治、大石功、奥野良信：Human astrovirus (HastV) のエピソード解析。第 49 回日本ウイルス学会、大阪市、2001、11 月。



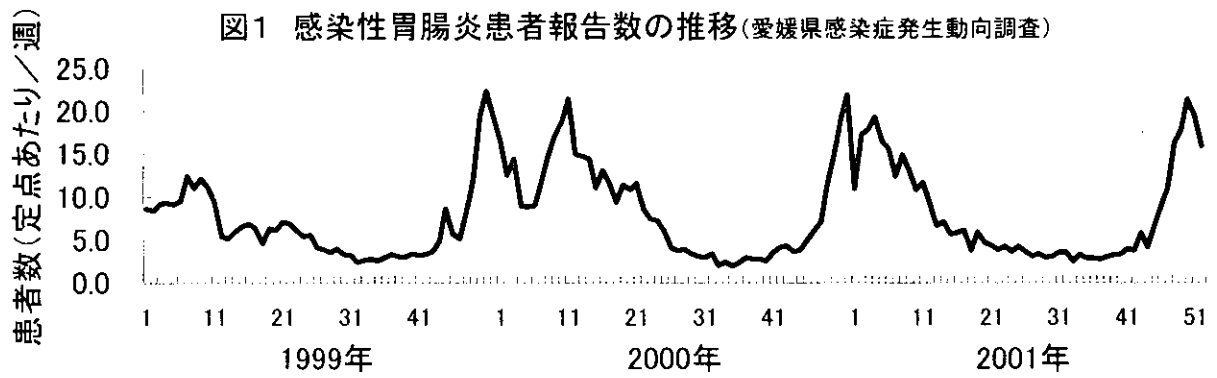


表1 電子顕微鏡法による散発性胃腸炎の病原検索(1999年-2001年)

ウイルス名	1999年		2000年		2001年		計	
	検出数	(%)	検出数	(%)	検出数	(%)	検出数	(%)
SRSV	21	5.9	25	8.0	40	12.3	86	8.7
ロタウイルス	41	11.6	34	10.9	28	8.6	103	10.4
アデノウイルス	8	2.3	4	1.3	10	3.1	22	2.2
アストロウイルス	11	3.1	11	3.5	4	1.2	26	2.6
検査数	353	100.0	311	100.0	324	100.0	988	100.0

図2 電子顕微鏡法による感染性胃腸炎の病原体検索結果

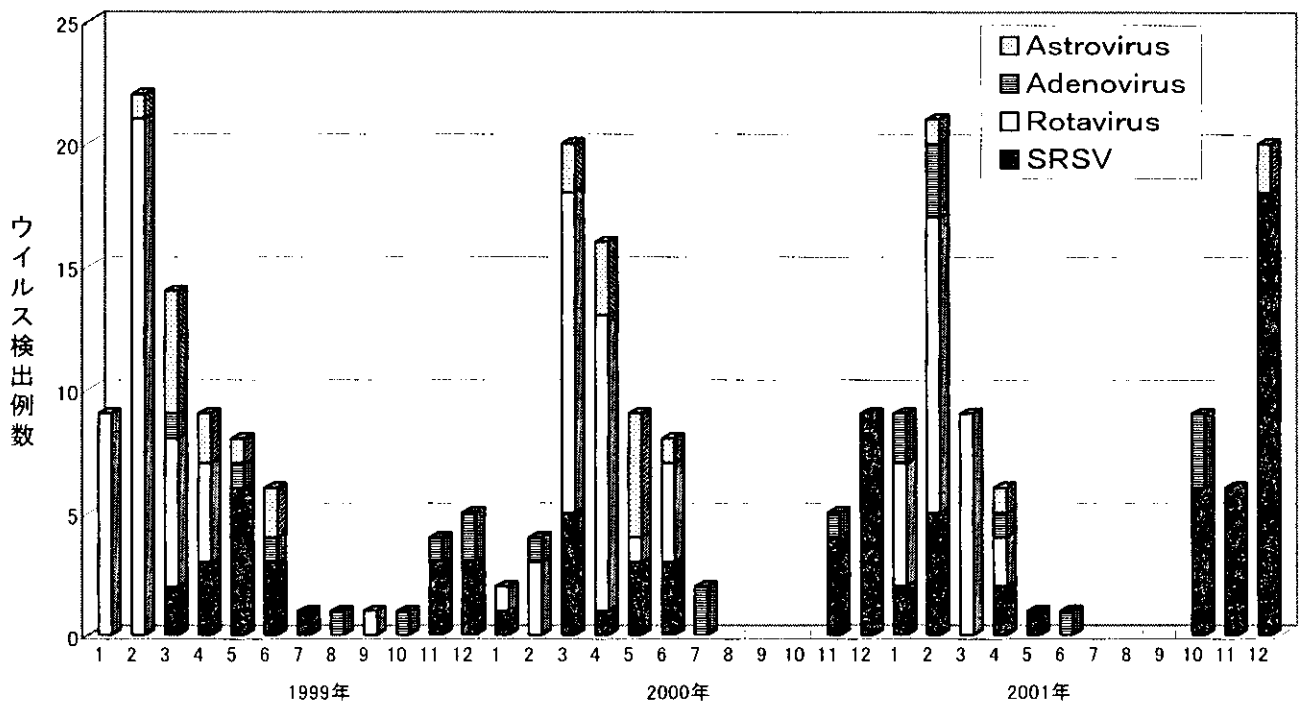


図3 SVおよびNVの検出数の月別推移

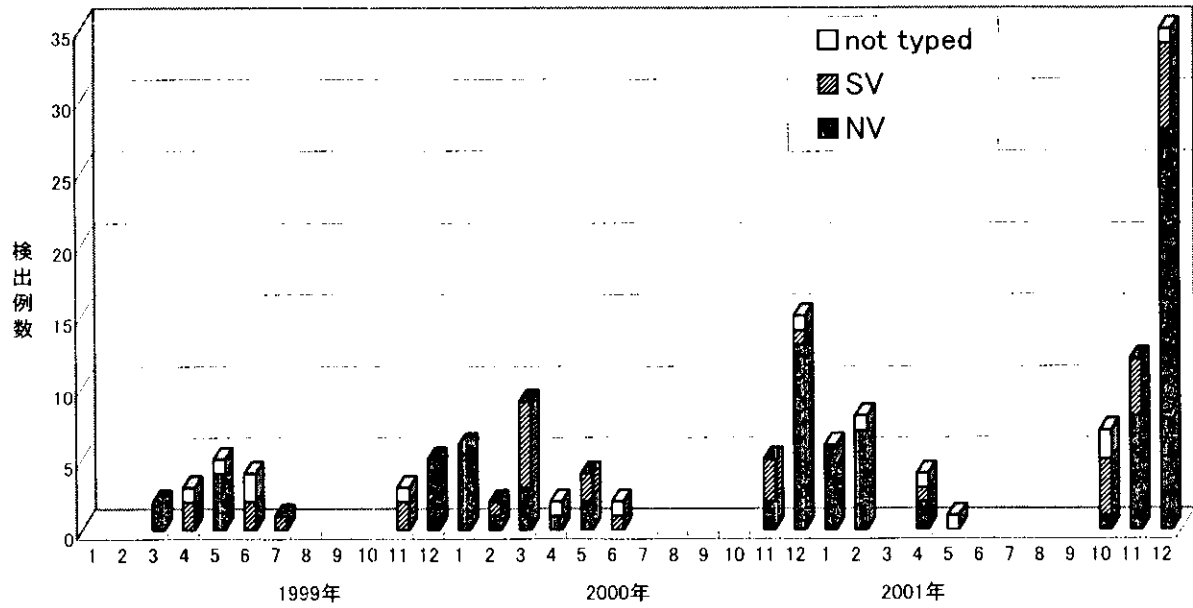
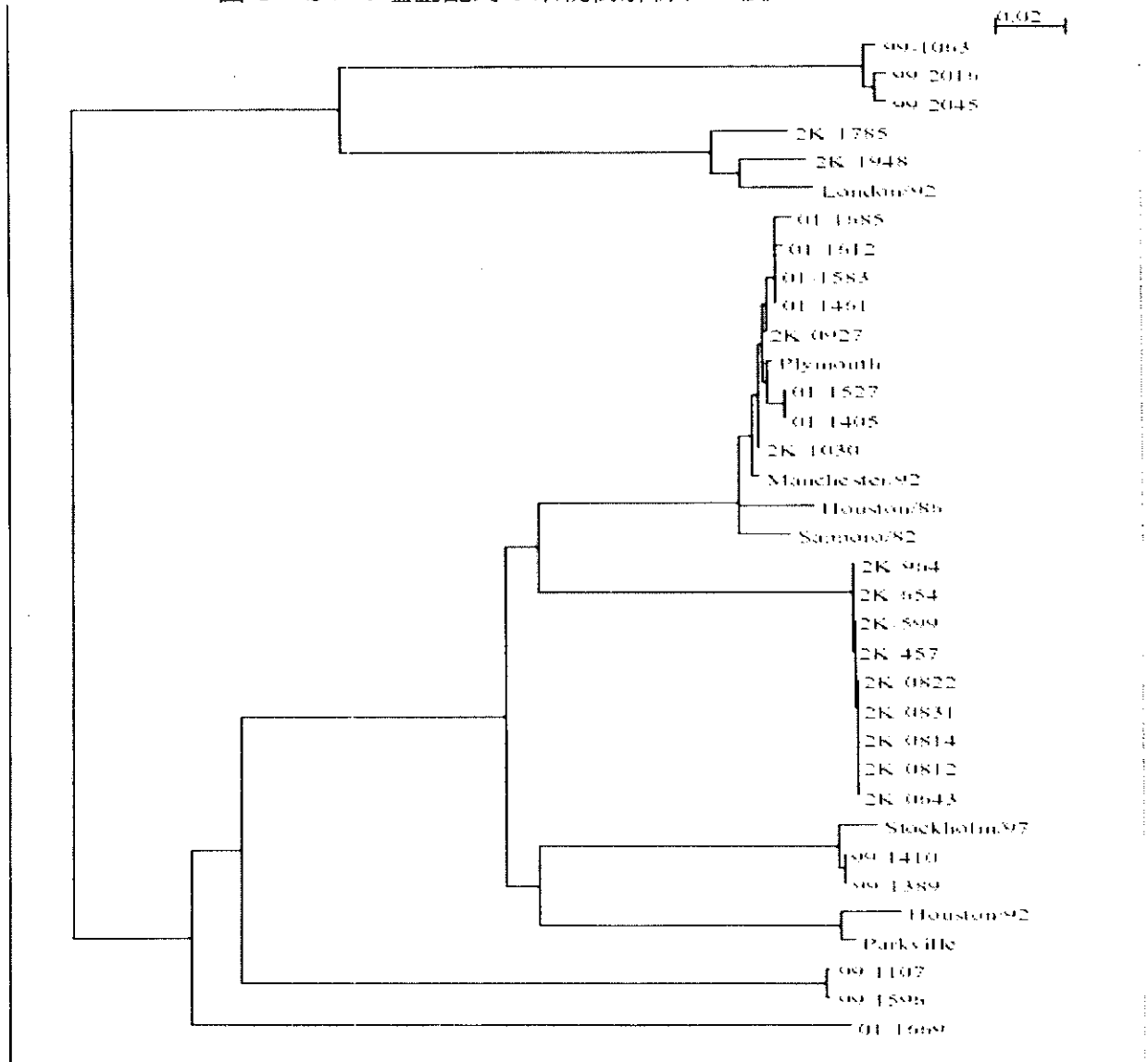


図4 SVの塩基配列の系統樹解析(NJ法)



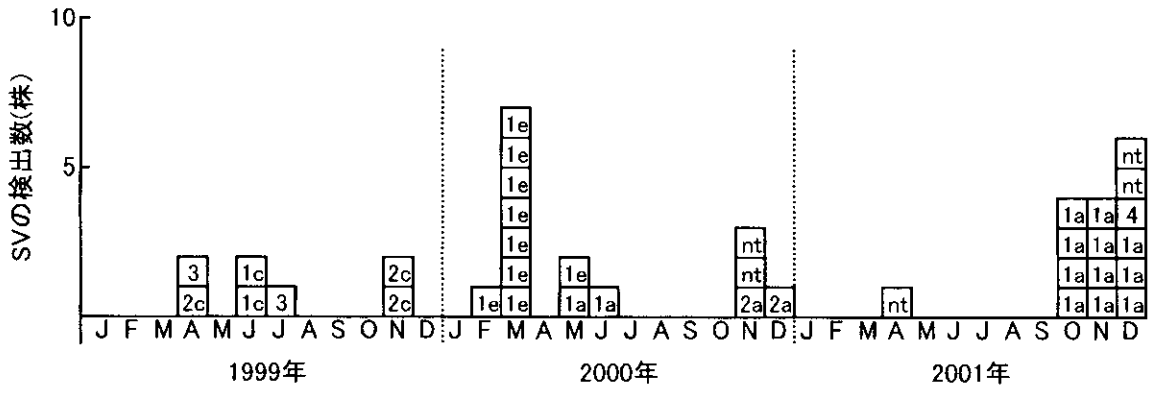


図5 SVの遺伝子型の月別分布

表2 散発性胃腸炎におけるEMとRT-PCR結果(2000年)

EM	RT-PCR			
	NV	SV	-	計
(+)	10	9	5	24
(-)	19	4	107	130
計	29	13	112	154

表3 散発性胃腸炎におけるEMとRT-PCR結果(2001年)

EM	RT-PCR			
	NV	SV	-	計
(+)	25	8	6	39
(-)	26	7	120	153
計	51	15	126	192

分 担 研 究 報 告 書

小児急性胃腸炎患者における下痢症ウイルスの検討

分担研究者 篠崎邦子 千葉県衛生研究所主席研究員

協力研究者 岡田峰幸 千葉県衛生研究所研究員

研究要旨：小児急性胃腸炎患者について下痢症ウイルスの検索を行った。3年間で491名中376名（76.6%）からウイルスを検出した。また、これらウイルス検出者376名中61名（16.2%）からは複数のウイルスを検出した。ウイルス別の検出率は、各シーズンともNLVが45～49%と最も高く、次いでRVが40%と高かった。3番目に高い検出率は、98-99年がAd、99-00年と00-01年がSLVで、共に7～8%であった。NLVは11～5月に検出され、ピークは12月であった。RVは1～5月に検出され、2、3月にピークがみられた。SLVは、4～6月にピークがみられた。Astは2～6月に検出され、Adは通年的に検出された。年齢別のウイルス検出状況をみると、RV、Ad、Astは主に乳幼児から検出され、NLV、SLVは0才から7才以上の学令期まで各年齢から検出された。NLVとSLVについては系統解析を行った。NLVの遺伝子型は3シーズンともGIIのLV型が最も多く、NLV検出数の60%以上を占めた。SLVの遺伝子型はSapporo型が最も多く検出された。

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 (RV) の他に Adenovirus (Ad)、Astrovirus (Ast)、Norwalk-like virus (NLV)、Sapporo-like virus (SLV) 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NLVは、RV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が、国内の報告はまだ少ない。SLVについては検査法が確立していないため、その感染状況もまだよくわ

かっていない。そこで、過去3年間の小児急性胃腸炎患者の下痢症ウイルスの検索を試みた。

B. 研究方法

1998年11月から2001年8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、ウイルス性急性胃腸炎が疑われる患者491名の糞便を検査材料とした。

RVとAdの検出は市販のEIAキットを用いた。NLV、SLV、Ast検出はRT-PCR法で行った。NLVのプライマーは武田らが構造蛋白領域に設定した