

【調査研究】

胃腸炎ウイルスの研究（平成16年度）

Study of Viruses Causing Non-Bacterial Gastroenteritis in Okayama (2004-2005)

濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 西島倫子, 国富泰二*, 濃野 信**, 金谷誠久*** (ウイルス科)

Masako Hamano, Ritsushi Fujii, Mitsutaka Kuzuya, Michiko Nishijima,

Taiji Kunitomi, Shin Nouno and Tomohisa Kanadani

*岡山赤十字病院小児科

**のうの小児科

***国立病院岡山医療センター小児科

要 旨

ウイルス性胃腸炎及びウイルス性食中毒の主要な原因ウイルスのうち、ヒトC群ロタウイルス（ヒトCRV）及び小型球形ウイルス（SRSV）の検査法改良のための研究を行い、以下の結果を得た。①：開発したヒトCRV検出用の酵素抗体法又は逆受身血球凝集法及び電子顕微鏡法（EM法）を用いて、2004年度採取の患者糞便（散発245検体、集発124検体）を検査したところ、EM法でロタウイルス様粒子が検出された53検体中1検体でヒトCRVが、それ以外の検体でA群ロタウイルスが検出された。以上より検査法に用いたモノクローナル抗体13A3との反応性が低いCRVの出現は認められなかった。②：ヒトCRV胃腸炎の感染源究明の一助として、2003年11月～2004年10月に採取されたブタ盲腸便656検体について、モノクローナル抗体を用いたELISA法および外殻糖蛋白（VP7）遺伝子を標的とした逆転写PCR法によりCRVを検索した。その結果10検体（1.5%）が陽性と判定され、検出率は夏～秋季（0.5%）よりも冬～春季（2.0%）が高かった。検査対象8農場のうち、昨年度も比較的検出率が高かった3農場からCRVが検出され、特定の農場の継続的汚染が明らかになった。VP7遺伝子増幅産物10検体の解析の結果、検出されたVP7遺伝子の半数以上が、昨年度はほとんど検出されなかったブタCRVのCowden株やWH株に近縁であった。農場ごとの遺伝子タイプは、1農場では昨年度とほぼ同様のタイプであったが、2農場では大部分が昨年度とは全く異なるタイプであった。以上より遺伝的に多様なCRVがブタの間で継続的に流行しており、ブタがCRVのリザーバーとなっていることが強く示唆された。③：SRSVのうち、ノロウイルス（NV）について、糞便を用いて、リアルタイムPCR-ハイブリダイゼーション法（リアルタイム法）と従来法（カプシド領域を増幅するC-PCRとポリメラーゼ領域を増幅するP-PCR）の検出能力の検証およびTranscription reverse-transcription concerted reaction（TRC）法を応用した新しいNV検出（NV-TRC）法の評価を行った。その結果、i）2004年度の集団胃腸炎事例の糞便155検体のリアルタイム法陽性率は、昨年度と同程度で、従来法との一致率も高かった。ii）リアルタイム法では、一部の検体でc-DNAの希釈により増幅効率の上昇が見られ、検体中にリアルタイム法を阻害する物質の存在が示唆された。iii）NV-TRC法はRT-PCR法とほぼ同等の検出能力を有することを確認した。

[キーワード：C群ロタウイルス、ノロウイルス、モノクローナル抗体、分子疫学、PCR法]

1. はじめに

ウイルス性胃腸炎は全国的に毎年頻発しており、今後も流行と感染の拡大が懸念されているが、その病原体は多様で、ヒトA群ロタウイルス（ヒトARV）、ヒトC群ロタウイルス（ヒトCRV）、小型球形ウイルス

（Small Round Structured Virus 以下SRSVと略）、アデノウイルス（ADV）等があげられる。このうち、SRSVは形態に基づく名称で、分類学的にはカリシウイルス科のノロウイルス（NV）、サポウイルス、アストロウイルス科のアストロウイルス等複数種のウイルスが含

まれる。

食品が原因と疑われるウイルス性集団胃腸炎の多発により、1997年に食品衛生法が改正され、これらのウイルスが食中毒の原因物質として記載された。これらのうちヒト ARV, ADV については培養が比較的効率良く行えるため、早くから開発された酵素抗体 (ELISA) 法、逆受身赤血球凝集反応 (RPHA) 法、ラテックス凝集反応 (Lx-Ag) 法等の市販試薬による迅速な検査が可能となっている。しかし、ヒト CRV 及び SRSV は培養が困難又は不可能であるため、迅速・簡便な検査法の研究が十分進展していない状況である。

我々は、胃腸炎ウイルスのうちヒト CRV 及び SRSV について下記のように研究を行っているので報告する。

1. 1 ヒト CRV の免疫学的検出

ヒト ARV が毎年冬期に乳幼児を中心に流行する¹⁾のに対して、ヒト CRV は集団胃腸炎事例が多く、福井県での国内初の事例²⁾以後、日本各地で報告がなされ^{3)~9)}、本県でも2年続けて集団胃腸炎事例が確認されるなど^{10),11)}、公衆衛生上の問題となっているが、簡便な検査法がなかった。我々は多数検体を迅速、正確、簡便に検査可能なモノクローナル抗体 (MAb) を用いた検査法 (ELISA 法, RPHA 法 及び Lx-Ag 法) を開発し^{12),13)}、これらのうち RPHA 法は全国の衛生研究所で実施されている。

開発した CRV 検出法 (ELISA 法, RPHA 法) の有効性を確認することを主目的として2003年度と同様に2004年4月~2005年3月に散発した感染性胃腸炎患者の糞便について、ARV 及び CRV の検索と電子顕微鏡 (EM) 法によるウイルス検査を行った。また、食中毒又は感染性胃腸炎を疑われた集団発生事例についても同様に検査を行った。

1. 2 ブタにおける CRV の流行状況と遺伝子解析

ロタウイルスは分節した11本の2本鎖 RNA をゲノムとして持ち、異なる由来のウイルスが同一の細胞に感染した際に、遺伝子再集合 (リアソートメント: 遺伝子分節同士の組み替え現象) を起こすことが知られている¹⁴⁾。これにより出現したウイルスは、親株とは異なるゲノム性状を有するようになることから、遺伝子再集合は新型ウイルス出現の重要なメカニズムと考

えられている¹⁴⁾。

CRV はヒト以外にも各種動物に感染することが知られているが^{15),16)}、特にブタの間で広く蔓延しているものと推察される^{17),18)}。さらに、VP7 遺伝子の比較結果¹⁹⁾、および交差中和試験の結果²⁰⁾などから、ヒトとブタの CRV が遺伝的および血清学的に密接に関連していることが示された。これらのことから、ヒト CRV 胃腸炎の感染源としてブタが何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

我々は昨年度の本研究²¹⁾で、ヒト CRV 胃腸炎の感染源究明の一助として、健康なブタの盲腸便について CRV 検索を行い、2.3%のブタがウイルスを保有し、多様な遺伝子性状の CRV が流行している実態を明らかにした。このことから、ブタがリザーバーとなって多様な CRV を保有し、それらがヒト由来ウイルスと遺伝子再集合を起こすことで、新たな性状を持つヒト CRV が出現する可能性が危惧された。そこで、ブタにおける CRV の流行状況をより詳細に解析するため、今年度も引き続きブタ盲腸便について CRV 検索を行うとともに、陽性例について遺伝子解析を実施した。

1. 3 NV の遺伝子学的検出

SRSV のうち、NV の検出は、明らかになった一部の株の遺伝子配列²²⁾に基づいた逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (以下 RT-PCR) 法により行われている。この結果、①NV は多様な遺伝子配列を持ち、2つの遺伝子群 (Genogroup I : GI, Genogroup II : GII) にわかれ、少なくとも GI は5、GII は10の遺伝子型が含まれる²³⁾こと、②同一検体中に複数の遺伝子型の NV が存在する場合があること^{24),25)}が明らかになってきた。

公衆衛生行政では感染症対策と食品衛生対策の両面からより精度の高い NV の検査法が求められており、検査法についても年々改良が加えられて示された^{26)~29)}。平成14年度および15年度の検討^{20),21)}により、最近開発されたリアルタイム PCR-ハイブリダイゼーション法 (capsid 領域を増幅する COG 系プライマーによる 1stC-PCR と RING プローブによるハイブリダイゼーションを同時進行して検出。以下リアルタイム法と略) の従来の RT-PCR 法 (capsid 領域を増幅する GSK 系プライマーによる C-PCR と polymerase 領域を

増幅する35'-36系および Yuri 系プライマーによる P-PCR) と同等あるいはそれ以上の検出能力が確認され、本法の導入により検査に要する時間を大幅に短縮できた。しかし、NV の遺伝子配列がきわめて多様であるのに対し、リアルタイム法は単一のプライマー系であり、標的領域に変異が起こった場合検出不能となる可能性があり、確実な行政対応のために継続的検証を要する点がある。また、効果的な NV 感染対策のためには、病院等医療機関でも NV 検索が可能であることが重要であり、より簡便で迅速な検査法の開発が必要である。

2004年(平成16年)度は、2004年度に搬入された集団胃腸炎事例の糞便について、昨年に引き続き従来の RT-PCR 法とリアルタイム法の検出能力比較を行うとともに、PCR 法とは異なる検出法として民間で開発された Transcription reverse-transcription concerted reaction (TRC) 法を応用した新しい NV 検出 (NV-TRC) 法について、開発者である東ソー株式会社と共同して評価を行った。

2. 材料と方法

2.1 ヒト CRV の免疫学的検出

(1) 対象

2004年4月～2005年3月に岡山地区(岡山赤十字病院、国立病院岡山医療センター)及び玉野地区(のうの小児科)の感染性胃腸炎患者各々62名、162名及び21名、合計245名から糞便を採取した。

また、2004年度内に発生した集団胃腸炎26事例の患者124名から糞便を採取した。

(2) ウイルス検査方法

ロタウイルス、ADV 及び SRSV の EM 法による検索は既報と同様にネガティブ染色法で行った³⁰⁾。

EM 法によりロタウイルス様粒子が観察された場合、次のように ARV と CRV を識別するための検査を行った。

ARV の検出はイムノクロマト法(ラピッドテスト ロタアデノ、第一化学薬品製)で、添付の説明書に従って行った。

CRV の検出は当センターで開発した CRV 検出用 ELISA 法又は RPHA 法で2000年度と同様に行った³⁰⁾。RPHA 法は MA b 13A 3 を用いた試薬で、当センターと共同研究を行っているデンカ生研(株)製造のものを使用し、検査法は概ね添付の使用説明書に従った。

CRV が検出された場合、既報と同様に CaCo-2 細胞により培養を行い、増殖の確認は間接蛍光抗体法で行った³⁰⁾。

表1 ブタ盲腸便の CRV 検索結果

季節	検体採取年月	生産農場								合計
		A	B	C	D	E	F	G	H	
冬季 春季	H15年11月	—	—	—	—	—	0/18*	0/18	1/14	1/50
	12月	—	—	—	—	—	2/21	—	0/29	2/50
	H16年1月	—	—	—	—	—	—	0/36	2/24	2/60
	2月	0/28	—	—	—	0/11	0/5	—	0/16	0/60
	3月	0/20	—	—	—	0/15	—	—	1/21	1/56
	4月	0/1	—	0/19	—	—	0/20	—	0/20	0/60
	5月	0/16	—	—	—	—	2/25	—	0/19	2/60
6月	0/15	0/2	—	—	0/13	1/14	—	0/16	1/60	
	小計	0/80	0/2	0/19	—	0/39	5/103 (4.9%)	0/54	4/159 (2.5%)	9/456 (2.0%)
夏季 秋季	H16年7月	—	—	—	0/16	—	0/22	—	0/12	0/50
	8月	0/6	—	—	—	—	0/13	1/31	—	1/50
	9月	—	—	—	—	—	0/21	—	0/29	0/50
	10月	—	—	—	—	—	0/10	0/26	0/14	0/50
	小計	0/6	—	—	0/16	—	0/66	1/57 (1.8%)	0/55	1/200 (0.5%)
	合計	0/86	0/2	0/19	0/16	0/39	5/169 (3.0%)	1/111 (0.9%)	4/214 (1.9%)	10/656 (1.5%)

*陽性数/検体数

2. 2 ブタにおける CRV の流行状況と遺伝子解析

(1) 糞便検体

2003年11月～2004年10月に岡山市内のと畜場で採取されたブタ盲腸便656検体を本研究に用いた。検体の由来（検体採取月およびブタの生産農場）は表1に示すとおりである。なお調査した農場については、昨年度と全く同一である。

(2) CRV 検索方法

採取した盲腸便の20%乳剤について、抗ヒト CRV モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法¹²⁾によりスクリーニング検査を実施した。吸光度 0.4以上を示した検体について、確認のため CRV の外殻糖蛋白 (VP 7) に設定したプライマーを用いた RT-PCR 法を昨年度の方法²¹⁾に準じて行い、特異バンドが観察された場合を最終的に CRV 陽性と判定した。

(3) EM 検索

既報³⁰⁾に従って糞便検体を処理し、2%酢酸ウラニルでネガティブ染色を行い観察を行った。

(4) CRV の分離培養

ヒト結腸癌由来 CaCo-2 細胞を用い既報の方法³⁰⁾に従い分離培養を行った。

(5) 遺伝子配列決定法

PCR 産物をアガロース電気泳動後、目的のバンド部分を切り出し、DNA gel extraction kit (Millipore 社製)により抽出を行った。得られた DNA について、オートシーケンサー (Long-Read Tower, アマシャム バイオサイエンス株式会社製)により塩基配列を決定した。

(6) 塩基配列データの解析

塩基配列の解析は市販ソフトウェア (Genetyx MAC ver. 11, ソフトウェア開発株式会社)を用いて実施した。また、遺伝子系統解析は Clustal W (フリーソフト)を用い、A 群ロタウイルス SA-11株を参照株とした近隣結合法により実施した。なお系統解析については、同様の解析を1,000回繰り返した場合に、同一結果が得られる回数 (ブートストラップ値)でその信頼性を示した。

2. 3 NV の遺伝子学的検出

(1) 材料

2004年度に県内で発生した集団胃腸炎26事例 (高齢

者福祉施設等14事例、食中毒・有症苦情等12事例)の糞便155件 (患者糞便130件、調理従事者糞便25件)および2000～2003年度採取糞便から抽出された保存 RNA100件 (リアルタイム法または従来法で陽性65件、陰性35件)を使用した。

(2) 方法

糞便は、既報³⁰⁾と同様に前処理、RNA 抽出を行った。保存 RNA は、糞便から同様に前処理、抽出されたのち-70℃に保存されていたものを用いた。

RT-PCR 法は、前報同様、平成15年 (2003年) 11月 5日付け食安監第1105001号厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知²⁹⁾に準拠して行った。ただし、Yuri 系プライマーによる RT-PCR 法の条件は斉藤らの方法³¹⁾によった。COG 系は LightCycler システム3302と LightCycler-FastStart DNA マスターハイブリダイゼーションプローブ (いずれもロシュ・ダイアグノスティクス社)を用いたリアルタイム法³²⁾で、他のプライマー系は従来法で実施した。リアルタイム法では経時的に蛍光輝度の増強がみられたものを、従来法では目的とする分子量あるいはその近傍に PCR 産物のバンドが認められたものを PCR 陽性とした。また、P-PCR では、プライマー系による Genogroup 検出の偏り³³⁾をなくすため、35'-36系または Yuri 系で陽性となった検体を P-PCR 陽性検体として、陽性率・一致率を算出した。

TRC は、逆転写反応と転写反応を組み合わせる一定温度で RNA を増幅する反応で、蛍光色素標識されたプローブにより増幅 RNA をリアルタイムに検出する³⁴⁾。元来は細菌の迅速検出法として開発されたが、NV-TRC 法は、この方法を RNA ウイルスである NV に応用したものである。RNA 5 μl を用いて、NV-TRC 試薬と専用リアルタイム蛍光モニター TRC Rapid-160 (いずれも東ソー株式会社)により、マニュアルどおりに反応測定を実施した。実際には、基質試薬とプライマー試薬を混合して分注したマイクロチューブに RNA 5 μl を添加して43℃に設定したリアルタイム蛍光モニターにセットし、酵素試薬を添加後60分間蛍光強度の増加をモニタリングして判定した。

3. 結 果

3. 1 ヒト CRV の免疫学的検出

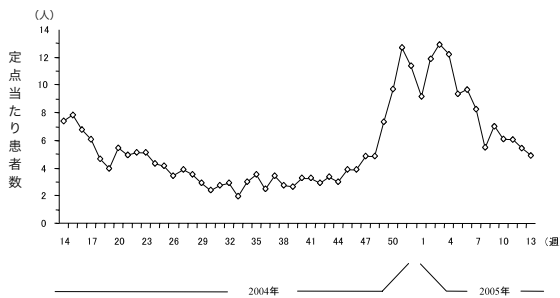


図1 感染性胃腸炎の発生状況

(1) 患者発生状況

岡山県結核・感染症発生動向調査事業に基づく、2004年度における岡山県の感染性胃腸炎の週別発生状況は図1に示すとおりであった。感染性胃腸炎の定点当たり患者数は第49週（12月）に急増し、第51週にはピークの12.67名に達した。第52週（12月）以後は一旦減少傾向に転じたものの、第2週（1月）には再び上昇に転じ、第3週（1月）には2004年度で最多の12.91名に達し、その後は漸減傾向となっている。

(2) 散発患者からのウイルス検出状況

表2に示すとおり、合計245件の散発患者糞便よりARV52件（21.2%）、ADV5件（2.0%）、SRSV48件（19.6%）合計105件（42.9%）のウイルスが検出された。また、EM法でロタウイルス様粒子が観察された検体52件からは、いずれもARVが検出された。

月別ウイルス検出状況は表2に示すとおり、ARVは2004年4月、5月、2005年2月、3月に多く検出された。SRSVは2004年10月から2005年3月に多く検出された。

(3) 集団発生事例患者からのヒトCRV検出状況

合計124名の患者から採取した糞便についてEM法によるウイルス検索を実施したところ、ロタウイルス様粒子1件、SRSV54件が観察された。ロタウイルス様粒子が観察された糞便1件（検体番号AE053）からELISA法及びRPHA法でCRVが検出され、CaCo-2細胞でヒトCRVが培養できた。

3. 2 ブタにおけるCRVの流行状況と遺伝子解析

(1) ブタ盲腸便からのCRVの検出

ブタ盲腸便599検体についてELISA法によるスクリーニングを行ったところ、吸光度0.4以上を示したのは18検体であったが、そのうちRT-PCR法で最終的に陽性と確認されたのは10検体（1.5%）であった。RT-PCR法陽性例の内訳は、1st PCR陽性が1検体のみで（検体番号OS999：2004年6月24日採取、F農場由来）、残りは全て2nd PCRで陽性と判定された。

検体採取時期および生産農場別のCRV検出状況を表1に示す。検体採取時期を夏季～秋季（7月～10月）および冬季～春季（11月～6月）の季節に分け、それぞれにおける陽性率をみた場合、冬季～春季の検出率（2.0%）が夏季～秋季の検出率（0.5%）よりも高いことがわかった。

次に、農場別の検出状況を見ると、検査した8農場中3農場でCRVが検出された。また検出率では、昨年度と同様にF農場が3%と最も高く、次いでH農場（1.9%）、G農場（0.9%）の順であった。なお、これら3農場についてはいずれも、昨年度の調査においてCRVが検出されていたことから、CRVの継続的な汚染をうけているものと思われる。

(2) CaCo-2細胞による分離培養

表2 採取年月別・採取機関別ウイルス検出状況

採取年月	岡山赤十字病院						国立病院岡山医療センター						のうの小児科						合計
	ARV	CRV	ADV	SRSV	陰性	小計	ARV	CRV	ADV	SRSV	陰性	小計	ARV	CRV	ADV	SRSV	陰性	小計	
H16年4月	1	0	0	0	1	2	8	0	1	3	13	25	2	0	0	2	3	7	34
5月	0	0	0	0	1	1	7	0	1	1	7	16	1	0	0	0	1	2	19
6月	0	0	0	0	5	5	1	0	0	1	5	7	0	0	0	0	2	2	14
7月	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	1	1	—	—	—	—	—	—	4
8月	0	0	0	0	2	2	1	0	0	0	5	6	—	—	—	—	—	—	8
9月	0	0	0	1	2	3	0	0	0	0	5	5	—	—	—	—	—	—	8
10月	0	0	0	3	1	4	0	0	1	0	3	4	0	0	0	0	1	1	9
11月	0	0	0	1	3	4	0	0	0	1	4	5	—	—	—	—	—	—	9
12月	0	0	0	2	6	8	0	0	1	3	12	16	0	0	0	1	0	1	25
H17年1月	1	0	0	2	4	7	0	0	0	7	20	27	0	0	1	2	0	3	37
2月	5	0	0	5	4	14	8	0	0	6	8	22	0	0	0	2	0	2	38
3月	1	0	0	3	5	9	15	0	0	2	11	28	1	0	0	0	2	3	40
計	8	0	0	17	37	62	40	0	4	24	94	162	4	0	1	7	9	21	245

CRV 陽性と判定された盲腸便10検体を CaCo-2 細胞に接種し CRV の分離培養を試みたところ、1 st PCR 陽性で陽性と判定された1検体 (OS999) のみが、盲継代7代目で抗 CRV モノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法により特異蛍光が観察され、EM 法により培養上清にもロタウイルス様粒子が確認された (データを示さず)。なお、分離されたウイルスはその検体番号から OS999株と命名した。

(3) VP7 遺伝子相同性解析

まず最初に、VP7 遺伝子全長が増幅された OS999 株について塩基配列決定し解析を行ったところ、1,063 塩基対 (bp) から成り、332個のアミノ酸 (aa) を

コードする一つのオープンリーディングフレームが存在することがわかった。これは、昨年度の調査で VP7 遺伝子全長が増幅された OS53および OS419株に比べ、遺伝子 (nt) で12bp分、また aa で4残基分短かったものの、既知の CRV とは同一鎖長であった (aa 配列を図2に示す)。

次に、2nd PCR で陽性となった9検体についても同様に塩基配列を決定したところ、昨年度の調査と同様に、産物には940bp (予測アミノ酸313個) と952bp (予測アミノ酸317個) の2種類が存在していた (表3, 4)。なお、検体番号 OS951 (2004年5月27日採取, F農場由来) についてはシーケンス結果から、

```

OK118 (ヒト) 1 MCVTFLYTCVCAILFILFIYVILLFRKMFHLITDITLIVLILSNVCVSEQGQFIDDIYNGVETIINSTDPFNVESLCIYFPNAIVGSGPGKSDGLHNDNGNAQTIATLFFETKGFPGKS 120
Cowden (ブタ) 1 .....A.A.VIT..I..IG.....H.....V.A.....D.R.....V.....T.Y.....A.....R..... 120
Shintoku (ウシ) 1 .....V.C..LM..I.....I.FLI.LSLIAFVI.S.IRL.NA.F.AN.ML.....GV..T.NI.....SA..RP.....LI..N.....L.V..... 120
OS999 (F) 1 .....C.....M.....M.A..ITI..I..IG.....D.....VV..A.....D.R.....V.....T.Y.....A.....R..... 120
OS828 (H) 1 ----..VV.C.....M.....MA.V.VITIVI..IG..K.....V.....V.T..H..D.K.....V.....T.Y.....A.....R..... 116
OS702 (H) 1 ----..V.C.....M.F.....A..M..M.I..IG.AH.....E..H.E.....V.....QTN.Y.....A..... 116
OS661 (F) 1 ----..C..L..T..FL.....L.....V.TYAG.VN..L.TN..S.D..I.GV..V.....AI..P..A..L..N.....L..... 116
OS1123(G) 1 ----..V.C..LM.T.FL.....L..A.V.V.VI.T.AG.TN..L.TN..S.D..GVV..V.....AI..P..A..L..N.....L..... 116

121 IILKTYTQTSDFINSVEMTCSYNVIVIPDRINDESEIEQIAEWILNVRCDDMNLEIYTYEQIGINNLAFAFGSDCDISVCLDITTSNGIGCSPASTETEVVSNDTQLALINVVDNVRH 240
121 .....KV.....VD.....S.TN.....R.....D.....T.....V.....M.....L.....L.....K..... 240
121 VNFN.....KI.....I.....ETLAN..T..V..V..K..N..VD.....KD.F..E..VA.....M..T.....D.....K..... 240
121 .....KV.....VD..I.....SSAN..A..R.....K.....D.....T..D.....N..V.....M.....L.....L.....IK..... 240
117 .....KV.....D.....SLTN..A..R.....D.....T.VD.....I.....V.....M.....L.....L..... 236
117 VM.....KA.....D.....KL.A..TI.....A.....D.N.....T.....D.....M.....L.....N.E.T.V.....K..... 236
117 V.F.....K.....D.....L.....E.DN..A.....V.....Q.....VNKD.....E.....M.....M.....D.....D.....KY..... 236
117 V.F.....R.....S.....A..L..E..N..A.....Q.....VNED.....E.....M.....M.....D.....D.....N..K..... 236

241 RIQMNSA----QCKLKNCKIGEARLNTALIRISTSSFDNSLSPLNNGQTTRSFKINAKKWWTIFVTIIDYINTIVQAMTPRHRAIYPEGWMRLRYA 332
241 .....T----S.....D.....I..T..... 332
241 ..L.QV---T..R..V..IV..N.....K.....K.....FI.S..... 332
241 ..V..T---N.....P.....D.....T.....V.....I..T..... 332
237 .....T---S.....A.....D.....T.....L.....I.TW..... 313
237 .....TG---H.....V..V..PN.....R.....R.....T.A..... 313
237 ..V..S.TVNQL.....S.....I.....M.....K.....V.....FI.T..... 317
237 .....S.TVNQL.....S.....I.....M.....R.....K.....V.....LI.T..... 317

```

図2 CRV 株の VP7 アミノ酸配列の比較

括弧内は由来動物または由来農場を示す。ヒト CRV の OK118株と同一アミノ酸はドットで示し、欠損部分はハイフンで示した。また、糖鎖付加部位を枠で囲んだ。

表3 VP7 遺伝子配列相同性*

株名(由来**)	鎖長 (塩基対)	各種動物由来株						ブタ盲腸便由来株								
		OK118	OK450	Cowden	WH	HF	Shintoku	OS629	OS651	OS720	OS956	OS999	OS828	OS702	OS661	OS1123
OK118(ヒト)	940	100	95.5	82.6	82.0	72.8	73.6	81.7	80.8	81.3	81.3	81.3	79.9	79.2	77.6	76.8
OK450(ヒト)	940		100	82.2	81.8	71.7	72.5	80.5	80.0	80.7	80.7	80.7	79.2	79.1	76.9	76.4
Cowden(ブタ)	940			100	93.7	72.7	74.3	90.2	89.9	89.4	89.4	89.4	88.7	78.5	74.7	74.7
WH(ブタ)	940				100	72.0	73.7	88.0	87.6	87.4	87.4	87.4	88.8	78.0	73.7	73.5
HF(ブタ)	940					100	71.9	72.0	72.6	72.0	72.0	71.7	69.8	72.1	72.2	
Shintoku(ウシ)	940						100	73.0	72.4	71.6	71.7	71.9	69.8	74.5	75.0	
OS629(H)	940							100	97.4	97.0	97.1	97.1	86.2	78.0	75.1	74.6
OS651(F)	940								100	98.3	98.4	98.4	86.0	77.5	74.9	74.2
OS720(H)	940									100	99.9	99.9	85.7	77.6	75.1	74.1
OS956(F)	940										100	100	85.7	77.7	75.1	74.1
OS999(F)	940											100	85.7	77.7	75.1	74.1
OS828(H)	940												100	78.1	72.5	73.4
OS702(H)	940													100	74.0	72.8
OS661(F)	952														100	90.0
OS1123(G)	952															100

* 相同性値90%以上を太字で示し、99%以上を枠で囲む
** 既知の株については由来動物を、供試検体については由来農場を示す

表4 VP7 アミノ酸配列相同性*

株名(由来**)	鎖長 (アミノ酸)	各種動物由来株						ブタ盲腸便由来株								
		OK118	OK450	Cowden	WH	HF	Shintoku	OS629	OS651	OS720	OS956	OS999	OS828	OS702	OS661	OS1123
OK118(ヒト)	313	100	96.5	86.3	83.7	68.7	72.2	84.0	83.1	83.1	83.4	83.4	82.4	82.7	79.5	77.6
OK450(ヒト)	313		100	86.6	84.0	68.7	72.2	84.3	83.4	83.4	83.7	83.7	82.4	83.1	78.9	77.0
Cowden(ブタ)	313			100	96.8	68.7	72.8	93.9	93.0	93.0	93.3	93.3	93.3	83.4	75.4	75.7
WH(ブタ)	313				100	68.1	73.2	91.4	90.4	90.4	90.7	90.7	93.3	81.8	73.5	75.4
HF(ブタ)	313					100	71.2	68.1	69.0	68.4	68.7	68.7	67.4	65.5	67.8	67.8
Shintoku(ウシ)	313						100	71.9	71.6	71.6	71.9	71.9	72.5	68.4	75.1	73.8
OS629(H)	313							100	99.0	99.0	99.4	99.4	91.1	80.5	75.4	74.4
OS651(F)	313								100	99.4	99.7	99.7	90.1	79.9	76.3	75.4
OS720(H)	313									100	99.7	99.7	90.1	79.9	75.7	74.8
OS956(F)	313										100	100	90.4	80.2	76.0	75.1
OS999(F)	313											100	90.4	80.2	76.0	75.1
OS828(H)	313												100	79.6	73.2	74.4
OS702(H)	313													100	74.8	74.8
OS661(F)	317														100	92.1
OS1123(G)	317															100

* 相同性値90%以上を太字で示し、99%以上を枠で囲む
 ** 既知の株については由来動物を、供試検体については由来農場を示す

異なる配列の遺伝子が混合しているものと思われたため、今回の解析からは除外した。2nd PCR増幅部分について、先に決定したOS999株の配列も加えて既知のCRV株との比較を行ったところ(表3, 4), ブタ盲腸便由来株のVP7は①既知のCRVと同一鎖長で、ブタCRVのCowden株およびWH株に極めて近縁(nt相同性87.4~90.2%, aa相同性90.4~93.9%)なもの(F農場およびH農場由来の6株), ②既知のCRVと同一鎖長で、ヒトCRVおよびブタCRVと同程度に近縁(nt相同性70%台後半, aa相同性80%台前半)なもの(H農場由来OS702株), ③既知のCRV株より12塩基, 4アミノ酸長く、配列に類似性がみられない(ntおよびaa相同性とも60~70%台)もの大きく3種類にグループ分けされた。

昨年度調査との比較では、グループ①および③については昨年度に引き続き検出されていたが、グループ②については今回初めて確認された。その一方で、昨年度検出されたブタCRVのHF株に近縁なものは、今回確認できなかった。また、グループ別検出数の比較では、昨年度最も多く検出されていたグループ③の株は今回の調査ではわずか2検体の検出にとどまり、その一方で昨年度は1検体しか検出されなかったグループ①が、今回は6検体と陽性例の半数以上を占めていた。

(4) VP7アミノ酸系統解析

今回新たに同定された9株のCRVに、昨年度検出された11株を加えた20株について、既知のCRV株と

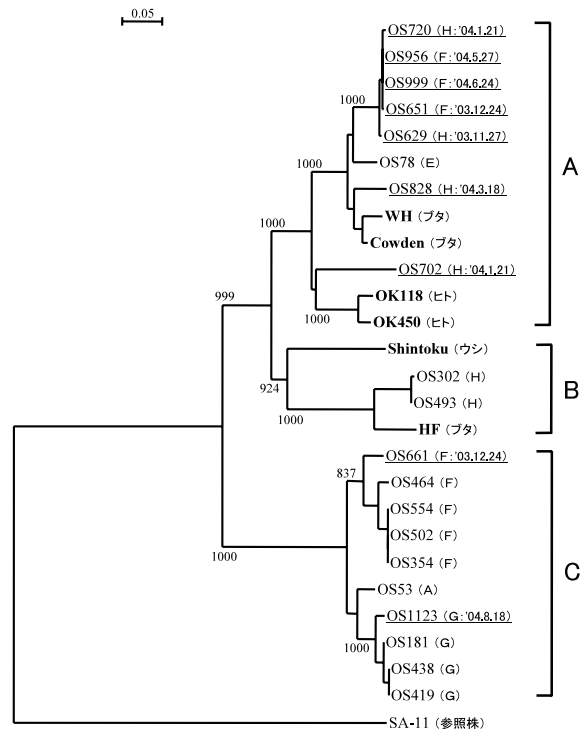


図3 VP7アミノ酸配列の系統解析結果

ロタウイルスSA-11株を参照株として近隣結合法により実施した。既知のCRV株を太字で表した(括弧内は由来動物を示す)。今回検出された株はアンダーラインで示し、括弧内に由来農場と採取年月日を記した。それ以外は昨年度検出株を示す(括弧内に由来農場を記す)。系統樹上の数値はブートストラップ値を示す。

ともに近隣結合法によるVP7アミノ酸配列系統解析を実施したところ、昨年度の解析結果や相同性解析におけるグループ分けの結果と良く一致して、20株のブタ盲腸便由来CRVが大きく3つのクラスター(A,

BおよびC)に分類されることがわかった(図3)。

クラスターごとにさらに詳しくみると、クラスターAに属する株については今回検出された株も含め、ブタ CRV の Cowden 株または WH 株に極めて近縁な株がほとんどであった。また、今回新たに検出された OS702株は、相同性解析で得られた結果とよく一致して、系統樹上においてヒト CRV とブタ CRV のちょうど中間に位置していた。一方クラスターCに属する株については、検出された時期にかかわらず、同一農場由来株同士は遺伝的に極めて近縁であることがわかった。

農場ごとに CRV 株の属するクラスターについて比較した場合、F農場では昨年度においてはクラスターCに属する株のみが検出されていたのに対し、今年度では検出された4株のうちクラスターCに属する株は1株のみで、残りはすべてクラスターAに属する株であった。H農場についても同様に、今年度検出された株はいずれも、昨年度は全く検出されなかったクラスターAに属する株であった。その一方で、G農場については年度を問わずクラスターCに属する株のみが検出されていた。なお、昨年度調査では、由来農場ごとにサブクラスターを形成していたが、今回の調査ではH農場およびF農場由来の5株については、極めて高いブートストラップ値(1,000)をもって、同一のサブクラスターに分類された。

(5) VP7アミノ酸配列アライメント

由来農場ごとの代表株と既知の CRV 株との aa 配列アライメントを行った結果を図2に示す。クラスターCに属する2株(F農場由来 OS661株およびG農場

由来 OS1123株)については、アミノ酸追加位置(248 aa部分)および追加配列(バリン・アスパラギン・グルタミン・ロイシン)とも昨年度のクラスターCに属する株と全く同一であった。次に糖鎖付加部位についてみると、既知の CRV に共通して認められる2カ所の付加部位(67~69aa, 225~227aa)については、すべての株で保存されていた。昨年度の調査で、ヒト CRV のみで確認されている152~154 aaの付加部位が、クラスターCに属する株にも認められることを報告したが、今回検出されたクラスターCの株のうち OS661株については当該付加部位が欠失していた。

3. 3 NVの遺伝子学的検出

(1) 糞便におけるリアルタイム法と従来法との比較

2004年度に県内で発生した集団胃腸炎26事例の糞便155件についてリアルタイム法と GSK 系の C-PCR, 35'-36系と Yuri 系の2系統の P-PCR を行った。各プライマー系の陽性率は、リアルタイム法42.6% (66/155), Yuri 系40.6% (63/155), 35'-36系34.8% (54/155), GSK 系33.5% (52/155)であった。35'-36系と Yuri 系の2系統を総合判定した場合、すなわち P-PCR としての陽性率は46.5% (72/155)であった。

プライマー系別の PCR 結果比較を表5に、リアルタイム法と従来法の一致率を過去2年の一致率とともに表6に示す。リアルタイム法との一致率は、GSK 系で91.0%, Yuri 系で89.0%, 35'-36系が最も低く84.5%であった。P-PCR との一致率は91.0%であった。リアルタイム法と従来法の不一致例は、P-PCR でリアルタイム法陰性・従来法陽性検体(10検体)がリアルタイム法陽性・従来法陰性検体(4検体)より

表5 糞便の PCR におけるリアルタイム法と従来法の結果比較

リアルタイム法		従 来 法					
		カプシド領域 PCR		ポリメラーゼ領域 PCR			
カプシド領域 PCR		GSK 系		35'-36系		Yuri 系	
C	O G 系	陽性数	陰性数	陽性数	陰性数	陽性数	陰性数
陽	性 数 (%)	52 (33.5)	14 (9.0)	48 (31.0)	18 (11.6)	56 (36.1)	10 (6.5)
陰	性 数 (%)	0 (0.0)	89 (57.5)	6 (3.9)	83 (53.5)	7 (4.5)	82 (52.9)
一 致 率 (%)		91.0		84.5		89.0	
		91.0					

多かったが、他の系ではいずれもリアルタイム法陽性・従来法陰性検体がリアルタイム法陰性・従来法陽性検体より多かった。リアルタイム法と従来法各プライマー系の一致率を過去2年と比較した場合、35'-36系とP-PCRは大きな変化はみられなかったが、GSK系とYuri系では一致率が上昇する傾向が見られた。

3検体で、従来法が強陽性であるにもかかわらずリアルタイム法が陰性ないしは増幅効率の悪いケースが見られた。こうした現象の原因として①リアルタイム法における標的領域のプライマー対応部分の遺伝子配列に変異が起こっている②検体中にリアルタイム法反応阻害物質が存在するの2つ可能性が考えられたので、①については標的領域の遺伝子配列決定、②については3検体のRNAから作成したc-DNAを希釈してのリアルタイム法を実施した。その結果、標的領域プライマー対応部分の遺伝子配列に変異はみられなかったが、c-DNAを希釈して実施したリアルタイム法では3検体すべてで陽性化あるいは増幅効率の改善がみられた。

(2) 糞便におけるEM法とNVのPCRとの比較

前項で使用した検体について、EM法とNVのPCR(リアルタイム法、GSK系、35'-36系及びYuri系)

を比較した。その結果を表7に示す。各プライマー系の77.4~81.3%の検体でEM法とPCRの結果が一致したが、EM法陽性PCR陰性検体が18.7~22.6%みられた。図4にNVが検出された集団胃腸炎の月別事例数と各月の全検体に対するEM法陽性リアルタイム法陰性検体の割合を示す。EM法陽性リアルタイム法陰性検体は4~6月と翌年3月にみられ、その月別割合は5.6~28.6%であったが、4~6月と翌年3月に高い傾向であったのに対して2月は5.6%と低かった。

(3) NV-TRC法のRT-PCR法との比較評価

糞便由来の保存RNA100件において、NV-TRC法は陽性検体65件中63件(96.7%)で陽性、また、陰性検体35件中33件(94.3%)で陰性となり、リアルタイム法を含むRT-PCR法との結果一致率は96.0%であった。また、NV-TRC法で陽性となった63件中55件(87.3%)が反応開始後30分以内に「陽性」と判定可能であった。(図5)

(4) 2004年度の集団胃腸炎事例

集団胃腸炎事例26事例中19事例でNVが検出された。Genogroup II(GII)のみが検出されたのが18事例、Genogroup I(GI)のみが検出されたのが1事例

表6 リアルタイム法と従来法のプライマー系別一致率の年度別比較

リアルタイムPCR	従 来 法			
	カプシド領域PCR	ポリメラーゼ領域PCR		
COG系	GSK系	P-PCR	35'-36系	Yuri系
2004年度一致率(%)	91.0	91.0	84.5	89.0
2003年度一致率(%)	86.7	92.3	86.7	69.3
2002年度陽性率(%)	77.6	88.9	88.4	58.0

表7 糞便の電子顕微鏡検索とNVのPCRとの結果比較

電子顕微鏡検索	N V の P C R							
	リアルタイム法		従 来 法					
	COG系		GSK系		35'-36系		Yuri系	
	陽性数	陰性数	陽性数	陰性数	陽性数	陰性数	陽性数	陰性数
陽 性 数 (%)	44 (28.4)	13 (8.4)	37 (23.9)	20 (12.9)	41 (26.5)	16 (10.3)	41 (26.5)	16 (10.3)
陰 性 数 (%)	22 (14.2)	76 (49.0)	15 (9.7)	83 (53.5)	13 (8.4)	85 (54.8)	22 (14.2)	76 (49.0)
一 致 率 (%)	77.4		77.4		81.3		75.5	
	77.4							

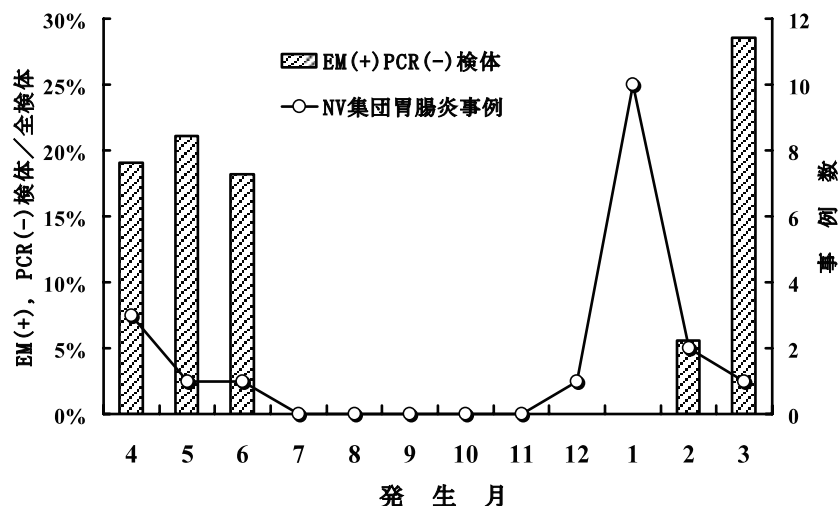


図4 月別のNVによる集団胃腸炎発生事例数とEM陽性PCR陰性検体の割合

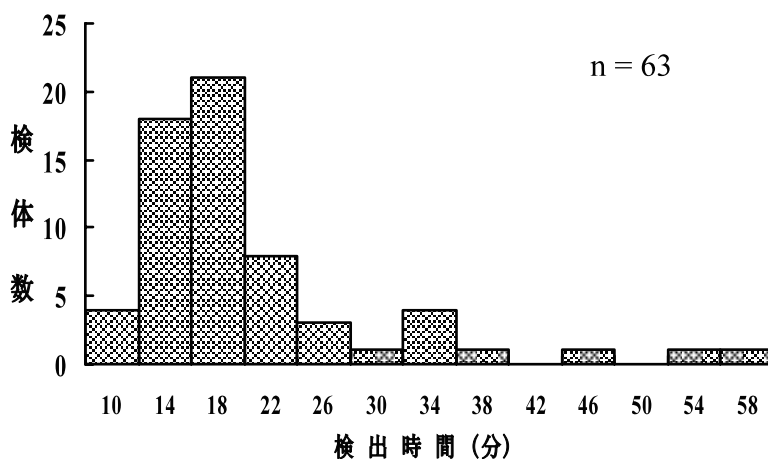


図5 NV-TRCの陽性検出所要時間

例で、GIとGIIが検出された事例はなかった。

4. 考 察

4.1 ヒトCRVの免疫学的検出

冬期を中心とするウイルス性胃腸炎の発生ピークは12月をピークとするSRSVと2、3月をピークとして発生するARVにより、2峰性の発生曲線を持つ傾向が指摘されている³⁵⁾が、2004年度冬期の感染性胃腸炎患者の発生パターンは、医療機関の年末年始休業日を考慮すると1月をピークとする1峰性の発生曲線となり、標準的な発生パターンとはならなかった。

また、2003年度ピーク時の定点当たり患者数は20.39名(第50週)及び12.06名(第11週)であったが、2004年度ピーク時には12.91名(第3週)となり、2004年度ピーク時の患者数が大幅に減少したことが示された。

このことをウイルス検出状況と比較すると、SRSVが多く検出された10月～翌年3月の中でも1、2月に特に多く検出され、ARVは4～5月及び翌年2月～3月に多く検出されていたので、患者発生状況と同様の傾向となっていた。SRSVが12月～2月に流行し、発生ピークが幅広くなったことが、2004年度冬期の感染性胃腸炎の流行パターンが1峰性の発生曲線となった一因と考えられる。

EM法でロタウイルス様粒子が観察された検体53件のうち1件からCRVが検出され、その他の検体からはARVが検出された。群を同定できないロタウイルス陽性検体はなかったため、MAb 13A3との反応性が劣るCRVの出現は認められなかった。当センターで開発したCRV検出用ELISA法及びRPHA試薬は、CRVの内殻共通抗原に反応するMAbを使用しているため、CRVの抗原変異により検出ができなくな

る可能性は少ないと思われるが、今後も、この MAb で検出できない CRV の出現に注意を払う必要があると思われる。

また、2002年11月～2003年5月及び2003年11月～2004年10月に採取されたブタ盲腸便1255検体から検出されたブタ CRV24件²¹⁾のうち17件を CaCo-2 細胞を用いて分離培養を試みたところ、1株 (OS999株)のみが培養可能となった。この分離株と集団胃腸炎患者から培養可能となった1株 (AE053株)について中和法による分類を検討中であるが、今後、抗原的分類が可能になれば、CRV の感染源、感染ルートの究明に役立つと思われる。

4. 2 ブタにおける CRV の流行状況と遺伝子解析

昨年度に引き続きヒト CRV 胃腸炎の感染源究明の一助として、ブタ盲腸便656検体について CRV 検索を実施したところ、10検体 (1.5%) が陽性であった。季節ごとの陽性率をみると、夏季～秋季の検出率 (0.5%) よりも、冬季～春季の検出率 (2.0%) が高く、ヒトの場合と同様に^{2)~11),36)}ブタの間でも当該時期に CRV が流行しやすいのではないかと考えられた。また冬季～春季の検出率は、昨年度の当該時期の値 (2.3%) とほぼ同じであることから、CRV 流行期には健康な成豚のおよそ2%が継続的に CRV を保有している実態が明らかになった。一方、農場ごとの検出率をみると、今回検査した8農場うち3農場については、昨年度に引き続き CRV が検出されていたことから、特定農場が継続的な CRV 汚染をうけている実態が明らかになった。いずれにしても2シーズンの調査結果から、岡山県北中部～広島県東部地域におけるブタの間で CRV が広く蔓延している実態があらためて確認された。

F農場由来のブタから2004年6月24日に採取した盲腸便から、今回初めて CRV を分離培養することができた。世界的にみても培養可能なブタ由来 CRV 株はわずか数株にとどまっております¹⁵⁾、さらに我が国において分離培養された例はこれが初めてである。分離株 (OS999株) の詳細については今後の解析を待たなければならないが、いずれにしても本株は貴重な存在であり、CRV 研究にとって新たな知見を提供することが大いに期待される。

今回の調査で検出された9株について遺伝子解析を

行った結果、昨年度の調査で確認された3つのクラスターの内、2つのクラスター (クラスターAおよびC) に属する株であることがわかった。しかしながら、昨年度ではわずか1例の検出にとどまったクラスターAに属する株が、今年度では過半数を占めるなど、シーズンにより CRV 株の属するクラスターに大きな違いが認められたが、この違いは2シーズンを通して検出率の高かったF農場およびH農場に由来する CRV 株のクラスター変遷を反映したものと考えられた。すなわち農場ごとの優占株が、F農場ではクラスターCからクラスターAへと、またH農場ではクラスターBからクラスターAへと移り変わっていた。クラスター間の抗原性の差異については調べてはいないものの、異なるクラスター間のアミノ酸相同性が70%程度であることから推測して、互いに血清型が異なる可能性も十分に考えられる。したがって、ヒトにおけるA群ロタウイルス流行で確認されていると同様に³⁷⁾、CRV においてもシーズン毎に優占株を変化させながら、同一農場内で継続的な流行を起こしているものと推察された。

今回、H農場由来の OS702株についてはクラスターAに属するものの、同一クラスターの他の株とはやや異なり、系統的にヒト CRV とブタ CRV のちょうど中間に位置する株であることが明らかになった。これまでの報告などから、ヒト CRV がブタ CRV を起源とすることが強く疑われることから、OS702株の他の遺伝子分節についても詳細な解析を行うことで、ヒト CRV の起源に関して新たな知見を加えることができるかもしれない。

昨年度の調査²¹⁾によって、ブタガリザーバーとなって様々なウイルスを保有し、それらのウイルスがヒト由来株との間でリアソートメントを起こすことで、新型ウイルスが出現する可能性を指摘した。今年度の調査結果は、この知見を支持するのみならず、ブタにおいて CRV が継続的な流行を起こしていること、流行には季節性が認められることなどを明らかにし、リザーバーとしてのブタの重要性を改めて確認する結果となった。今後、新型 CRV の出現を監視するうえでも、ブタにおける CRV 流行実態について継続的調査が必要であるが、それと同時にブタで流行している CRV が、どの程度の頻度でリアソートメントを起こ

しているのかを明らかにするため、VP 7 以外の遺伝子についても解析を進める必要があると思われる。

4. 3 NV の遺伝子学的検出

(1) 糞便におけるリアルタイム法と従来法との比較

PCR 陽性率は、単一プライマー系ではリアルタイム法が最も高く、従来法との一致率も高かったこと、および、不一致例においても、P-PCR と比較した場合を除き、リアルタイム法陽性・従来法陰性検体がリアルタイム法陰性・従来法陽性検体より多かったことから、現時点での糞便からの NV 検出系として特に問題点はないと考えられた。リアルタイム法と各プライマー系の一致率を過去 2 年と比較すると、35'-36 系は大きな変化がなかったが、GSK 系及び Yuri 系は年々上昇する傾向が見られた。これは COG 系及び GSK 系に 2003 年度シーズンから、G II に属するが他とはやや違う Alphatoron 株³⁸⁾を検出するプライマーが追加されたことによる可能性があると考えられた。

リアルタイム法と従来法の不一致例の一部で、c-DNA を希釈してリアルタイム法を実施した場合陽性化あるいは増幅効率の改善がみられたことから、一部の糞便検体では、検体中に含まれる反応阻害物質が前処理・RNA 抽出の段階を経ても残存し、リアルタイム法における増幅効率を低下させている可能性が示唆された。

(2) 糞便における EM 法と NV の PCR との比較

EM 法と NV の PCR の結果比較で、EM 法で SRSV 陽性でありながら NV の PCR 陰性である検体が 18.7～22.6% みられ、この割合は昨年度報告した 15.4～30.0%²¹⁾ とほぼ同等であった。前報²¹⁾でも述べたとおり EM 法は形態学的観察であり、NV を特異的に検出しているわけではなく、これらの検体で観察された SRSV は、①NV 以外の SRSV、たとえばサポウイルスやアストロウイルス ②現行の RT-PCR 法で検出し得ない Genotype の NV の 2 つの可能性がある。今年度リアルタイム法陰性 EM 法陽性検体が高率にみられたのは、昨年度と同様 NV 非流行期といわれる 4～6 月と NV 流行期後半 3 月であったことから、①の可能性が疑われた。ただし、今年度の特徴として、EM 法とリアルタイム法の一致率が高い時期に搬入された検体は、ほとんどすべて高齢者等福祉施設での集団胃腸炎事例由来のものであり、リアルタイム法陰性 EM 法

陽性検体が多い時期の食中毒・有症苦情等由来検体とは、事例発生形態でも異なっていた。従って、リアルタイム法陰性 EM 法陽性検体の出現率に事例発生形態自体が何らかの影響を及ぼした可能性も否定できなかった。

(3) NV-TRC 法の RT-PCR 法との比較評価

NV-TRC 法は、東ソー株式会社が自社開発した Transcription-Reverse transcription-Concerted reaction (TRC) 法³⁹⁾を NV 検出に応用したシステムであり、RNA を一定温度で増幅するのが特徴である。当所で保存されていた RNA 100 件を用いた評価では、従来法と TRC 法の結果は 96.0% 一致しており、特異性はリアルタイム法を含む従来の RT-PCR 法とほぼ同等と考えられた。また、RT-PCR 法が RNA を逆転写して得られた c-DNA を増幅するため、RNA 抽出後結果判明まで約 3 時間を要するのに対し、TRC 法は直接 RNA を増幅するため逆転写反応が不要であり、RNA 抽出後約 90 分で結果が判明する。今回の評価試験で TRC 法陽性検体の 87.3% は反応開始後 30 分以内に判定可能であり、陽性検体の大部分は RNA 抽出後約 60 分以内に結果が判明することとなり、迅速性では RT-PCR 法よりすぐれていた。また、逆転写反応が不要であることは、迅速性に加えて簡便性にも優れており、一般検査室等での多数検体処理に有用と考えられた。問題点としては、専用の機器・試薬を必要とすること、食品等含有ウイルス量の少ないものへの応用および反応後の産物を用いての遺伝子解析が未知数であること等があり、今後さらなる改良の余地があると考えられた。

謝 辞

ブタ盲腸便の採取に多大なるご協力をいただきました岡山市食肉衛生検査所の関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 浦沢正三, 谷口孝喜: ロタウイルスー概論一, 臨床と微生物, 13(4), 53-60, 1986
- 2) Matsumoto, K., Hatano, M., Kobayashi, K., Hasegawa, A., Yamazaki, S., Nakata S., Chiba, S., Kimura, Y.: An outbreak of gastroenteritis associated

- with acute rotaviral infection in schoolchildren, *J. Infect. Dis.*, 160, 611–615, 1989
- 3) Otsu, R.: A mass outbreak of gastroenteritis associated with group C rotaviral infection in schoolchildren, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 21, 75–80, 1998
 - 4) Oishi, I., Yamazaki, K., Minekawa, Y.: An occurrence of diarrheal cases associated with group C rotavirus in adults, *Microbiol. Immunol.*, 37, 505–509, 1993
 - 5) 篠崎邦子, 海保郁男, 時枝正吉, 實川 浩: 千葉県で発生したC群ロタウイルスによる集団下痢症, 病原微生物検出情報, 14, 160, 1993
 - 6) 篠崎邦子, 山中隆也, 小川知子, 時枝正吉, 高橋 亮, 太田洋子, 酒井利郎, 常包正俊: C群ロタウイルスによる集団下痢症, 病原微生物検出情報, 17, 202, 1996
 - 7) 長谷川澄代, 松浦久美子, 中山 喬, 石倉康宏, 北村 敬, 安井良夫, 金子望博: 小学校で発生したC群ロタウイルスによる急性胃腸炎の集団発生, 病原微生物検出情報, 18, 302–304, 1997
 - 8) 沢田春美, 吉澄志磨, 玉手直人, 荒田吉彦, 勝山真吉, 古屋孝子, 堀田智仙, 平木雅久: 小学校でみられたC群ロタウイルスによる急性胃腸炎の集団発生, 病原微生物検出情報, 19, 252–253, 1998
 - 9) 江頭康子, 吉森清史, 船津丸貞幸, 松浦元幹: C群ロタウイルスによる急性胃腸炎集団発生事例, 病原微生物検出情報, 22, 32–33, 2001
 - 10) 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉 肇, 中山俣槻, 結縁栄次, 片山健一, 光信泰昇, 井上康二郎: 岡山県内で初めて確認されたヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例, 岡山県環境保健センター年報, 24, 55–59, 2000
 - 11) 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉 肇: 教育研修施設において発生したヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例, 病原微生物検出情報, 21, 169–170, 2000
 - 12) Fujii, R., Kuzuya, M., Hamano, M., Yamada, M., Yamazaki, S.: Detection of human group C rotaviruses by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies, *J. Clin. Microbiol.*, 31 (5), 1307–1311, 1992
 - 13) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Nagabayashi, T., Tsunemitsu, H., Yamada, M., Nii, S., Mori, T.: Rapid detection of human group C rotaviruses by reverse passive hemagglutination and latex agglutination tests using monoclonal antibodies, *J. Clin. Microbiol.*, 31 (5), 1308–1311, 1993
 - 14) 小林宣道, 浦沢正三: ロタウイルス, ウイルス, 50, 157–172, 2000
 - 15) Saif, L. J., Nongroup A rotaviruses: Viral diarrhea of man and animals, p. 73–95, CRC Press, Florida, USA, 1990
 - 16) Otto, P., Schulze, P., Herbst, W.: Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs in Germany, *Arch. Virol.*, 144, 2467–2473, 1999
 - 17) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Ohata, R., Ogura, H., Yamada, M.: Seroepidemiology of human group C rotavirus in Japan based on a blocking enzyme-linked immunosorbent assay, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8, 161–165, 2001
 - 18) Tsunemitsu, H., Jiang, B., Saif, L. J.: Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by enzyme-linked immunosorbent assays, *J. Clin. Microbiol.*, 30, 2129–2134, 1992
 - 19) Tsunemitsu, H., Jiang, B., Saif, L. J.: Sequence comparison of the VP7 gene encoding the outer capsid glycoprotein among animal and human group C rotaviruses, *Arch. Virol.*, 141, 705–713, 1996
 - 20) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆: 胃腸炎ウイルスの研究 (平成14年度), 岡山県環境七年報, 27, 45–61, 2003
 - 21) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 西島倫子, 国富泰二, 濃野信, 金谷誠久: 胃腸炎ウイルスの研究 (平成15年度), 岡山県環境七年報, 28, 79–92, 2004
 - 22) Jiang, X., Wang, M., Wang, K. and Estes, M. K.: Sequence and genomic organization of Norwalk virus, *Virology*, 195, 51–61, 1993
 - 23) Ando T, Noel JS, Fankhauser RL.: Genetic classification of “Norwalk-like viruses”, *J. Infect. Dis.*, 181 (Suppl 2), S336–348, 2000

- 24) Sugieda, M., Nakajima, K., Nakajima, S.: Outbreak of Norwalk-like virus associated gastroenteritis traced to shellfish, Coexistence of two genotypes in one specimen, *Epidemiol.Infect.*, 116, 339–346, 1996
- 25) Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, Katayama K.: Coexistence of plural genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan, *J Clin Microbiol*, 42, 2988–2995, 2004.
- 26) 厚生省生活衛生局食品保健課長，乳肉衛生課長通知：食品衛生法施行規則の一部改正等について，衛食第156号，平成9年5月30日
- 27) 厚生省生活衛生局食品保健課長，乳肉衛生課長通知：ヒトカリシウイルスの検査法について，衛食第20号，衛乳第28号，平成11年2月10日
- 28) 厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知：ノーウォーク様ウイルス（NLV）のRT-PCR法について，食監発第267号，平成13年11月16日
- 29) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知：ノロウイルスの検出法について，食安監発第1105001号，平成15年11月5日
- 30) 藤井理津志，葛谷光隆，濱野雅子，小倉肇：C群ロタウイルスの免疫学的検査法による検出，岡山県環境保健センター年報，24，42–45，2000
- 31) Saitoh, H., Saitoh, S., Kamada, K., Harata, S., Sato, H., Morita, M., Miyajima, Y.: Application of RT-PCR designed from the sequence of local SRSV strain to the screening in viral gastroenteritis outbreaks, *Microbiol. Immunol.*, 42, 439–446, 1998
- 32) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., Katayama, K.: Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR, *J. Clin. Microbiol.*, 41, 1548–1557, 2003
- 33) 濱野雅子，藤井理津志，葛谷光隆，小倉肇：小型球形ウイルスの遺伝子学的検出，岡山環境七周年報，25，58–62，2001
- 34) Ishiguro T, Saitoh J, Horie R, Hayashi T, Ishizuka T, Tsuchiya S, Yasukawa K, Kido T, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Ueda K.: Intercalation activating fluorescence DNA probe and its application to homogeneous quantification of a target sequence by isothermal sequence amplification in a closed vessel, *Analytical Biochemistry*, 314, 77–86, 2003.
- 35) 上羽 修，藤井理津志，谷本浩一：ウイルス下痢症に関する研究 第2報 1988/87年冬期の検出ウイルスについて，岡山県環境保健センター年報，11，132–135，1987
- 36) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Yamada, M., Shinozaki, K., Sasagawa, A., Hasegawa, S., Kawamoto, H., Matsumoto, K., Kawamoto, A., Itagaki, A., Funatsumaru, S. and Urasawa, S.: Survey of human group C rotaviruses in Japan during the winter of 1992 to 1993, *J. Clin. Microbiol.*, 36, 6–10, 1998
- 37) Urasawa, S., Urasawa, T., Taniguchi, K., Wakasugi, F., Kobayashi, N., Chiba, S., Sakurada, N., Morita, M., Morita, O., Tokieda, M., Kawamoto, H., Minekawa, Y., Oseto, M.: Survey of human rotavirus serotypes in different locales in Japan by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies, *J. Infect. Dis.*, 160, 44–51, 1989
- 38) Vinje, J., Koopmans, MP.: Simultaneous detection and genotyping of “Norwalk-like-viruses” by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format, *J. Clin. Microbiol.*, 38, 2595–2601, 2000
- 39) 保川清：TRC反応によるRNAの増幅とリアルタイム検出，医学のあゆみ，206(8)，479–483，2003.