

【調査研究】

## 胃腸炎ウイルスの研究（平成14年度）

濱野雅子，藤井理津志，葛谷光隆（微生物科）

### 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（ELISA）法又は逆受身血球凝集（RPHA）法及び電子顕微鏡（EM）法を用いて、2002年度採取の患者糞便（散発140件，集発101件）を検査したところ，EM法でロタウイルス陽性検体20件中1件でヒトCRVが，それ以外の検体でA群ロタウイルスが検出された。②：開発したCRV用中和試験法を用いて，ヒトCRV（OK 118，OK 450，K9304及びG 7株），ブタCRV Cowden株及びウシCRV Shintoku株の交差中和試験を行った結果，全ての株が同一のG血清型に属していたが，ヒトCRV，Cowden株，Shintoku株は異なる亜型に属していた。③：CRV用ELISA法を用いて2002年度採取の糞便（ウシ478件，ブタ145件）を検査したところ，ウシ糞便1件が陽性と判定され，EM法および逆転写PCR（RT-PCR）法により，本ウイルス（T-199株）がCRVであることが確認された。T-199株PCR産物の塩基配列を決定したところ，VP7遺伝子は1,063塩基対で，332個のアミノ酸をコードし，VP4遺伝子は2,259塩基対で，735個のアミノ酸をコードしていた。T-199株を既知のCRV株と塩基配列を比較した結果，遺伝的にウシCRVに近縁であることが強く示唆されたが，既知CRV株抗血清による中和試験では，血清学的にはむしろヒトCRVに近縁であった。④：SRSVのうちNorwalk-virus（NV）について，糞便とカキを用いて，RT-PCR法における増幅領域による陽性率の比較，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）と従来法の陽性率比較・導入効果を検証した。その結果，1）糞便検体陽性率の増幅領域による差は明瞭ではなく，リアルタイム法と従来法の一致率は80%前後と高かった。2）カキからは，リアルタイムPCRが従来法より効率的に検出しうることが示された。3）糞便からの陽性確定に従来法では最短6日程度であったが，リアルタイム法では最短3日と大幅に迅速化可能となった。

[キーワード：C群ロタウイルス，小型球形ウイルス，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。その病原として，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（SRSV），アデノウイルス（ADV）等があげられる。

食品が原因と疑われる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として掲載された。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およびSRSVは培養が困難又は不可能であるため，検査法について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および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

AからF群に分類されるロタウイルスのうち，ヒトARVは毎年冬期に乳幼児を中心に流行することが知られており<sup>1)</sup>，酵素抗体法（ELISA）法，逆受身血球凝集（RPHA）法，ラテックス凝集反応（Lx-Ag）法等の市販試薬により検査が行われている。一方，ヒトCRVについては集団胃腸炎事例が福井県で確認されて以来<sup>2)</sup>，全国各地で本ウイルスを原因とする集団胃腸炎の報告がなされ<sup>3)~9)</sup>，さらに岡山県でも2年続けてヒトCRVによる集団胃腸炎事例が確認されるなど<sup>10),11)</sup>，公衆衛生上問題となっている。ヒトCRVには簡便な検査法がなかったが，岡山県環境保健センターで多数検体を迅

速、正確、簡便に検査することが可能なモノクローナル抗体 (MAb) を用いた検査法 (ELISA 法, RPHA 法および Lx-Ag 法) を開発した<sup>12),13)</sup>。そこで、検査法 (ELISA 法, RPHA 法) の有効性を確認することを主目的として2001年度と同様に2002年4月~2003年3月に散発した感染性胃腸炎患者の糞便について、ヒト ARV およびヒト CRV の検査と電子顕微鏡 (EM) によるウイルス検索を行った。また、食中毒を疑われた集団発生事例12事例についても同様に検査を行った。

### 1.2 ヒト CRV の交差中和試験

CRV は、動物や下痢症患者から各地で検出され、ヒトでは集団発生例の報告も多い。ARV に比べヒト CRV で集団発生が多いのは、ヒト CRV に対する中和抗体保有率が低い<sup>14)</sup>ことも一因と考えられるが、CRV の中和に関する研究は進展しておらず、血清型別もあまり行われていない。

ロタウイルスの中和は2つの外殻蛋白, VP4 および VP7 によって媒介される。VP4 によって担われた中和特異性は P 血清型と呼ばれ、VP7 によって担われた中和特異性は G 血清型と呼ばれる。

ウイルス粒子に対する過免疫血清の中和応答は、主として VP7 への抗体応答であるが、VP4 への抗体応答も複合的に反応する。このため、ARV では、中和抗体価の20倍以上の差に基づいて G 血清型が定義されている<sup>15)</sup>。一方、CRV では、16倍以上の差に基づいて G 血清型が定義されている<sup>16)</sup>。

Tsunemitsu らは、ヒトの株とブタの Cowden 株が同じ G 血清型に属しているが、ウシの Shintoku 株が別の G 血清型に属していると報告している<sup>16)</sup>。この報告では、ヒト CRV に対する中和抗体価は測定されていないため、確定的な血清型別は行われていない。

我々は RPHA 法を用いた CRV の中和抗体測定法について報告した<sup>17)</sup>。この方法を用い、上に述べた基準を適用して G 血清型別を試みた。

### 1.3 動物糞便からの CRV の検出とその性状解析

CRV は仔豚の下痢起因ウイルスとして初めて確認され<sup>18)</sup>、その後の研究により、抗原的に類似したウイルスがヒトからも検出されるに至った<sup>19)</sup>。その他にも、ウシやイヌなどの胃腸炎から本ウイルスが検出されたという報告がなされるなど、CRV が各種動物に感染性を有することがわかっている<sup>20),21)</sup>。一方、CRV に対する抗

体保有状況では、ヒトで約30%程度である<sup>14)</sup>のに対し、ウシで47~56%、ブタで93~97%と報告されており<sup>22)</sup>、CRV がヒトよりもむしろ動物間に広く侵淫しているものと考えられる。

ロタウイルスは分節した2本鎖 RNA をゲノムとして持つため、異なる株が単一の細胞に同時感染した際に、遺伝子分節の組み替え現象 (遺伝子再集合) が起こり、新たな性状を持つウイルスが出現することが知られている<sup>23)</sup>。ARV では、遺伝子分節の一部あるいは多くが、動物ロタウイルスと遺伝的に極めて近縁なヒトロタウイルス株の存在が報告されているが、このことはヒト由来ウイルスと動物由来ウイルスとが遺伝子再集合を起こしたり、動物由来ウイルスがヒトに直接感染した結果であると考えられている<sup>23)</sup>。

我が国では1988年以降、ヒト CRV による集団胃腸炎の発生が公衆衛生上問題となっているが、その感染源については不明な点が多く残されている。そこで感染源究明の一助として、動物由来糞便について CRV 検索を実施するとともに、検出されたウイルスについて詳細な解析を行った。

### 1.4 SRSV の遺伝子学的検出

ウイルス性胃腸炎は毎年冬季に多発する感染症であるが、その原因ウイルスの1つである SRSV は培養細胞・実験動物を使って人工的に増殖させる技術が確立されていないウイルスであり、また、患者糞便中に排出されるウイルス粒子数がロタウイルス等に比べて少ないため、他の胃腸炎ウイルス検出に用いられる迅速簡便な検査法も開発されていなかった。このため、SRSV の検出は EM で主に行われてきた。

近年 SRSV の一種でカリシウイルス科に属する Norwalk-virus (NV) の一部の株の遺伝子配列が解明され<sup>24)</sup>、これに基づいた逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法での検出が可能となり、多くの NV 株について遺伝子情報が蓄積されてきた。この結果、①NV の遺伝子は多様な配列をもち、大きく2つの遺伝子群 (Genogroup I : G I, Genogroup II : G II) にわかれ、さらに少なくとも G I は5、G II は7の遺伝子型に分かれること<sup>25)</sup>、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<sup>26)</sup>が明らかになってきた。

このような遺伝子的多様性のため、すべての NV を

検出できるような RT-PCR 法はまだ確立されていない。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いる。1997年の食品衛生法の一部改正に伴って NV を含む SRSV が食中毒の原因として認められ、検査法についても例示された<sup>27)~29)</sup>が、プライマーの検出能力や確認検査用プローブの特異性、さらには結果確定までに時間がかかる等、改良の必要な点が多々ある。

迅速かつ精度の高い NV の検査法確立のために、今年度は昨年度に引き続き RT-PCR 法による検出における増幅領域の違いによる検出率の比較を行うとともに、機器導入により実施可能となったリアルタイム PCR-ハイブリダイゼーション法 (リアルタイム法) と従来法の陽性率比較・導入効果を検証した。

## 2 材料と方法

### 2.1 ヒト CRV の免疫学的検出

#### 2.1.1 対象

2002年4月~2003年3月に岡山地区 (O病院) 及び玉野地区 (N病院) の感染性胃腸炎患者各々104名および36名、合計140名から糞便を採取した。

また、2002年度内に発生した集団感染性胃腸炎12事例101名から糞便を採取した。

#### 2.1.2 方法

ウイルスの EM による検索は2001年度と同様にネガティブ染色法で行った<sup>30)</sup>。

ヒト ARV の検査は ELISA 法 (ロタクロン, TFB 製) で、添付の説明書に従って行った。

ヒト CRV の検出は当センターで開発したヒト CRV 検出用 ELISA 法又は RPHA 法で2001年度と同様に行った<sup>30)</sup>。RPHA 法は MAb 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。

SRSV の検出は、集団発生事例の一部の検体にデンカ生研(株)製の SRSV 検出用 ELISA 法キットを EM 法と併用した。

### 2.2 ヒト CRV の交差中和試験

#### 2.2.1 ウイルス株

ヒト CRV 株は、1988年~1993年に岡山県で分離された OK 118, OK 450, K9304 および G 7 株を使用し、

その他の動物種の株としてブタ CRV Cowden 株及びウシ CRV Shintoku 株を使用した。

ヒト CRV は、コラーゲンでコートしたローラーボトルで培養した CaCo-2 細胞で増殖させ、Cowden 株と Shintoku 株はローラーボトルで培養した MA 104 細胞で増殖させた。

感染細胞を培養液と共に 2 回凍結融解し、細胞断片を取り除くために、遠心分離し、上清を逆受身赤血球凝集法中和試験 (N-RPHA) に使用した。

#### 2.2.2 抗血清

ヒト CRV, Cowden 株および Shintoku 株に対する過免疫抗血清はマウス又はモルモットで作成した。

また、1988年に発生したヒト CRV を原因とする下痢症患者 1 人の回復期血清 (M198) を抗血清として用いた。

さらに、OK 450 株の VP 7 に対する中和能を持つモノクローナル抗体 (MAb) (42E 9) を作成した。この MAb が VP 7 と反応することは既報<sup>31)</sup>に従って確認した。

#### 2.2.3 交差中和試験

交差中和試験は、以前報告<sup>17)</sup>したように N-RPHA によって実行したので、以下に簡潔に述べる。

回転培養させた 96 穴マイクロプレート内で増殖させた時、培養液が 8 単位の RPHA 価を持つようにウイルスを希釈し、その希釈液と抗血清 (2 倍段階希釈) を 37°C で 90 分間保温した。ヒト CRV では、混合液は CaCo-2 細胞を培養したコラーゲンコート 96 穴マイクロプレートに接種し、Cowden 株又は Shintoku 株では MA 104 細胞を培養した 96 穴マイクロプレートに接種し、37°C で 1 時間保温した。ウェルを洗浄後、1 ml あたりパンクレアチン 100 ug (ヒト CRV) 又は 50 ug (Cowden 株及び Shintoku 株) を含む MEM 200 ul を添加し、マイクロプレートをシール後、37°C、3 日間、回転培養した。培養後、凍結融解を行い、遠心上清の RPHA 価を測定した。

RPHA 価が対照ウイルス液の RPHA 価の 4 分の以下に減少した場合、抗体陽性とし、抗体価は投入ウイルスを中和する抗血清の最も高い希釈の逆数として表した。

## 2.3 動物糞便からの CRV の検出とその性状解析

### 2.3.1 動物由来糞便

2001年4月～2002年3月に採取されたウシ糞便478検体およびブタ糞便145検体の計623検体を本研究に用いた。

### 2.3.2 CRV 検索方法

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<sup>12)</sup>によりスクリーニングを行った。

### 2.3.3 EM 検索

既報<sup>10)</sup>の方法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。

### 2.3.4 RT-PCR 法

表1に示すような4組のプライマーを用い、既報の方法<sup>32)</sup>に準じてCRVの外殻糖蛋白(VP7)および外殻スパイク蛋白(VP4)遺伝子を標的とするRT-PCRを行った。なお、VP7遺伝子を増幅するPCR反応については、熱変性：94℃1分、アニーリング：48℃2分、伸長反応：72℃2分の条件で行い、VP4遺伝子を増幅する場合には、伸長反応を3分間に延長した。

### 2.3.5 遺伝子配列決定法

PCR増幅産物をプラスミド(pT7 Blue, Novagen社)にクローニングした後、2種類のユニバーサルプライマー(U-19およびR-20, Novagen社)およびVP

4遺伝子については表2に示すようなプライマーを追加使用し、オートシーケンサー(Long-Read Tower, アマシヤム バイオサイエンス株式会社)により塩基配列を決定した。なお、塩基配列は少なくとも3つのクローンについて決定し、それらの配列を総合して最終的な配列とした。

### 2.3.6 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. 10, 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、サルARV 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(ブーツストラップ値)でその信頼性を示した。

### 2.3.7 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<sup>30)</sup>に従い分離培養を行った。

### 2.3.8 血清学的性状試験

N-RPHA法<sup>17)</sup>により分離ウイルスの血清学的性状を調べた。なお、試験にはヒトCRV株(OK118, OK450およびK9304)、ブタ由来Cowden株およびウシ由来Shintoku株をそれぞれモルモットに免疫して作製した

表1 RT-PCR法に使用したプライマー

プライマー名	塩基配列 (5'-3')	部位	配列の由来
HCRVP 7 S	GGCATTTAAAAAAGAAGAAGCTGT	1-24	ヒト CRV (OK118株)
HCRVP 7 A	AGCCACATGATCTTGTTTACGC	1,042-1,063	VP 7 遺伝子
BCRVP 7 S	GGCATTTAAAAAAGAAGGAGCTG	1-23	ウシ CRV (Shintoku 株)
BCRVP 7 A	AGCCACATAATCTCGTTTAC	1,044-1,063	VP 7 遺伝子
HCRVP 4 S	GGCTTAAAAAAGTAGAGATCG	1-20	ヒト CRV (Bristol 株)
HCRVP 4 A	AGCCACATTATTGAGATCTC	2,264-2,283	VP 4 遺伝子
BCRVP 4 S	GGCTTAAAAAAGTCAGGATC	1-20	ウシ CRV (Shintoku 株)
BCRVP 4 A	AGCCACATAATAAGTCGATC	2,234-2,253	VP 4 遺伝子

表2 VP4 遺伝子のシーケンスに使用したプライマー

プライマー名	塩基配列 (5'-3')	部位	配列の由来
CBRV 8 A	ATTATTGTTGCTGTAATGC	706-725	Shintoku 株 VP 4 遺伝子
199 VP 4 N 1	GGGAAGAATGGAAACACAATTTTCC	607-631	T-199株 VP 4 遺伝子
199 VP 4 N 2	CTCATAACGTTTGCTGCGAC	1,679-1,658	〃
199 VP 4 N 3	GCATCTATTATGTCAAACCGTCC	1,067-1,045	〃

抗血清を使用した。

## 2.4 SRSV の遺伝子学的検出

### 2.4.1 材 料

2002年度に県内で発生した集団胃腸炎事例の糞便69件（患者糞便56件，調理従事者糞便13件）および県内産カキ46件を使用した。

### 2.4.2 方 法

糞便は0.2gを滅菌PBS(-)で20%乳剤とし，フルオロカーボン（パートレル XF，三井・デュポンフロロケミカル社）で処理したものを前処理材料とした。カキは5個分の中腸腺を滅菌PBS(-)で10%乳剤とし，同様にフルオロカーボン処理して40,000rpm，2時間超遠心後の沈澱物を200μlに浮遊させたものを前処理材料とした。RNA抽出はQIA Viral RNA Mini Kit（QIAGEN社）により行った。

RT-PCRおよびハイブリダイゼーションに使用したプライマーおよびプローブを表3に示す。糞便およびカキについて，厚生労働省より示されたプライマー系であるCOG系（COG1F/COG2F-COG1R/COG2R）とGSK系（G1SKF/G2SKF-G1SKR/G2SKR）の2系統のカプシド領域PCR（C-PCR）<sup>29)</sup>（糞便は1st，カキはsemi-nested PCR），35'-36系（35'-36→NV81-NV82，SM82）およびYuri系（MR3

-MR4→Yuri22F-Yuri22R）の2系統のポリメラーゼ領域PCR（P-PCR）（糞便はinner Primerによる1st，カキはnested PCR）を実施した。RT-PCR，ハイブリダイゼーションによる確認は平成9年5月30日付け衛食第156号厚生省生活衛生局食品保健課長，乳肉衛生課長通知<sup>27)</sup>，平成11年2月10日付け衛食第20号衛乳第28号厚生省生活衛生局食品保健課長，乳肉衛生課長通知<sup>28)</sup>および平成13年11月16日付け食監第267号厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知<sup>29)</sup>に準拠して行った。ただし，Yuri系プライマーによるRT-PCR条件はSaitohらの方法<sup>33)</sup>によった。

COG系はリアルタイム法で，他のプライマー系は従来法で実施した。COG系のリアルタイム法は，LightCyclerシステム3302とLightCycler-FastStart DNAマスタハイブリダイゼーションプローブ（いずれもロシュ・ダイアグノスティックス社）を用いて，KageyamaらがABI Prism 7700で実施した方法<sup>34)</sup>を改変してLightCyclerシステムに最適化した術式で実施した。PCR条件は95℃10分変性，95℃15秒，60℃20秒，72℃4秒で45回（糞便）または55回（カキ）増幅，40℃30秒冷却である。PCRの判定は，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

表3 ノーウォークウイルス検出に使用したプライマー系およびプローブ一覧\*

領域	使用プライマー				対応プローブ						
	系名	プライマー名	塩基配列	位置**	産物	プローブ名***	塩基配列	位置*			
ポリ メ ラ ー ゼ	35'-36	35'	ATAAAAGTTGGCATGAACA	4937 - 4956	470bp	SR 47d	ATGTCAGGGGACAGGTTTGTATGTC	4817 - 4836			
		36	CTTGTGGTTTGAGGCCATA	4487 - 4506		SR 61d	GGGGCCTAGTCCTGT	4817 - 4836			
		NV 81	ACAATCTCATCATCACCATA	4865 - 4884		SR 63d	ACATCAGGAGAGTGCCACT	4817 - 4836			
		NV 82	TCATTTTGATGCAGATTA	4555 - 4572		SR 65d	ACATCAGGTGATAAGCCAGT	4817 - 4836			
		SM 82	CCACTATGATGCAGATTA	4555 - 4572		SR 67d	ACATCTGGTGAGAGACCAGA	4817 - 4836			
	Yuri	MR 4	AGTGGGTTTGAGGCCGTA	4937 - 4954	470bp	SR 69d	ACATCGGGTGATAGGCCCTGT				
		MR 3	CCGTCAGAGTGGGTATGAA	4485 - 4503							
		Yuri 22R	CATCATCCCCGTAGAAAGAG	4585 - 4604							
		Yuri 22F	ATGAATGAGGATGACCCAT	4232 - 4253							
カ ブ シ ド	COG	COG 1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	5354 - 5375	85bp	RING 1	AGATYGGGATCYCTGTCCA	5329 - 5348			
		COG 1F	CGYTGATGCGNTTYCATGA	5291 - 5310							
		COG 2R	TCGACGCCATCTTCATTACACA	5080 - 5100							
		COG 2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	5003 - 5028							
	GSK	G1 SKR	CCAACCCARCCATTRTACA	5653 - 5671	330bp	ISG 1-1	CCAACAAAACATGGATGGCACCAGTG	5382 - 5406			
		G1 SKF	CTGCCGAATTYGTAATGA	5342 - 5365					ISG 1-2	CAGTTGGTACCGGAGGTTAATGCTT	5382 - 5405
									ISG 1-3	CCTCAAAGCGCTGATGGCGCAAGC	5415 - 5439
									ISG 1-4	GCTACACCAAGCGCAGATGGCGCCA	5379 - 5403
G2 SKR	G2 SKR	CCRCNCGCATRHCCRTTRTACAT	5367 - 5389	343bp	ISG 2-1	ATAATTGACCCCTGGATTAGAAA	5223 - 5245				
	G2 SKF	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	5047 - 5065					ISG 2-2	ATAATTGATCCCTGGATTATGAATA	5223 - 5247	
								ISG 2-3	GCCGCTCCATCTAATGATGGTGCA	5105 - 5129	

\*文献29より引用

\*\*プライマーの位置は基本的に Norwalk/68/US に基づく。ただし斜字は Lordsdale/93/UK に基づく。

\*\*\*ISG 1-1～4，ISG 2-1～3は石古博昭他の作成になるプローブ

ンドが認められたものを PCR 陽性とした。

また、カキの PCR 陽性検体については確認検査を行い、プライマー系の評価指標として、①検出率(%) = 確認検査陽性検体数 ÷ 検体数 × 100、②確認率 (%) = 確認検査陽性検体数 ÷ PCR 陽性検体数 × 100を算出した。

### 3 結 果

#### 3.1 ヒト CRV の免疫学的検出

##### 3.1.1 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、平成14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あたり患者数は第48週（11月）に急増し、第51週には2002年度で最多の11.44名に達した。第52週（12月）以後は患者数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10週（3月）には定点あたり患者数はピークの8.94名に達した。

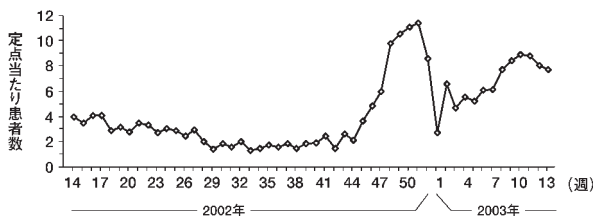


図1 感染性胃腸炎の発生状況

##### 3.1.2 散発患者からのウイルス検出状況

表4に示すとおり、合計140件の散発患者糞便よりヒト ARV 19件 (13.6%)、ヒト CRV 1件 (0.7%)、ADV 2件 (1.4%)、SRSV 19件 (13.6%) 合計41件 (29.3%) のウイルスが検出された。また、EM でロタウイルス様粒子が観察された検体20件からは、1件のみヒト CRV が検出され、その他の検体からはいずれもヒト ARV が検出された。

月別ウイルス検出状況は表4に示すとおり、ヒト ARV は2002年4月、2003年2月、3月に多く検出され、流行が集中していた。SRSV は2002年10月から2003年2月に多く検出された。

##### 3.1.3 集団発生事例患者からのヒト CRV 検出状況

患者101名について、糞便を採取し細菌検査及びウイルス検査を実施した。細菌検査では原因と考えられる食中毒起因菌が検出されなかったため、SRSV 検出用 ELISA 法又は EM 法による検索を行ったところ、ELISA 法では検査した101検体中43件 (42.6%) が陽性となり、EM 法では101検体中50件 (49.5%) で SRSV 様粒子が観察され、その他のウイルス様粒子は観察されなかった。

#### 3.2 ヒト CRV の交差中和試験

表5はヒト、ブタおよびウシの CRV 6株に対する過免疫抗血清、ヒト CRV を原因とする胃腸炎患者1人の回復期血清M198、OK450株に対する中和能を有する MAb42E9での、ヒト、ブタおよびウシからの CRV 6

表4 採取年月別・採取機関別ウイルス検出状況

採取年月	O 病院						N 小児科						合 計
	ARV	CRV	ADV	SRSV	陰性	小計	ARV	CRV	ADV	SRSV	陰性	小計	
H13年4月	4	0	0	1	7	12	3	0	0	1	8	12	24
5月	1	0	0	0	9	10	0	0	0	0	1	1	11
6月	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	1	1	4
7月	0	0	1	0	8	9	—	—	—	—	—	—	9
8月	0	0	0	0	7	7	0	0	0	0	1	1	8
9月	—	—	—	—	—	—	0	0	1	0	2	3	3
10月	0	0	0	3	11	14	—	—	—	—	—	—	14
11月	0	0	0	4	12	16	0	0	0	1	2	3	19
12月	0	0	0	1	8	9	0	0	0	2	2	4	13
H14年1月	1	0	0	2	4	7	—	—	—	—	—	—	7
2月	3	1	0	3	8	15	0	0	0	0	2	2	17
3月	1	0	0	0	1	2	6	0	0	1	2	9	11
計	10	1	1	14	78	104	9	0	1	5	21	36	140

株に対する中和の結果を示す。

ヒト CRV 4 株全てで、双方向にホモとヘテロの中和抗体価の差が 2 倍以内であった。

Cowden 株については、抗 OK118 抗血清及び抗 G7 抗血清で、中和抗体価がホモと比べて 2 倍以内の差で中和されたが、抗 Cowden 抗血清の OK118 株及び G7 株に対する中和抗体価はホモと比べて 16 倍以上の差があった。また、別のヒト CRV 2 株 (OK450, K9304) と Cowden 株間では、中和抗体価が双方向ともホモと比べて 16 倍以上の差があった。

Shintoku 株は、ヒト CRV 3 株 (OK118, OK450 および K9304) および Cowden 株に対して、双方向とも中和抗体価がホモと比べて 16 倍以上の差があった。一方、G7 株は抗 Shintoku 抗血清で中和抗体価がホモと比べて 2 倍以内の差で中和されたが、抗 G7 抗血清の

Shintoku 株に対する中和抗体価はホモと比べて 16 倍以上の差があった。

患者の回復期血清 M198 は検査したヒト CRV 2 株 (OK118 および OK450) 及び Cowden 株を同程度に中和したが、Shintoku 株を中和しなかった。

MAb42E9 は検査したヒト CRV 2 株 (OK450 および G7) を高度に中和したが、Cowden 株および Shintoku 株を中和しなかった。

### 3.3 動物糞便からの CRV の検出とその性状解析

#### 3.3.1 動物由来糞便からの CRV の検出

動物由来糞便 642 検体について ELISA 法によりスクリーニングを行ったところ、平成 12 年 12 月 6 日に岡山県内のと畜場で採取されたウシ糞便 1 検体 (検体番号 T-199) のみが CRV 陽性と判定された。なおウイルスが検出されたウシは、鳥取県内で飼育されていた 7

表 5 中和試験

ウイルス	抗血清に対する中和抗体価							
	抗 OK118	抗 OK450	抗 K9304	抗 G7	抗 Cowden	抗 Shintoku	M198	42E9*
OK 118	512	256	512	512	128	64	2,048	—
OK 450	256	512	512	256	512	<32	1,024	19,200
K9304	256	512	512	256	64	<32	—	—
G7	512	256	512	512	512	512	—	9,600
Cowden	256	<32	<32	512	8,192	64	1,024	<10
Shintoku	<32	<32	<32	<32	128	1,024	<32	<10

\* : 10 µg/ml

— : 未検査

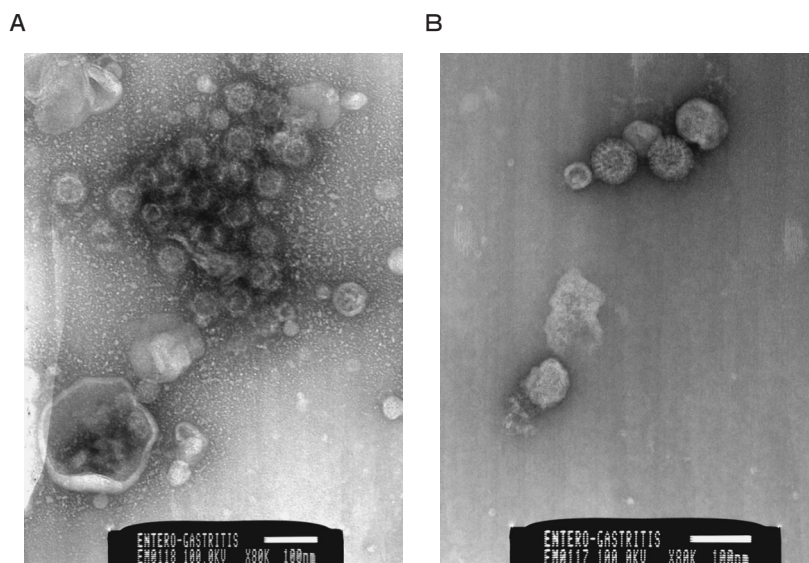


図 2 CRV 陽性ウシ糞便 (パネル A) および T-199 株培養上清 (パネル B) の電子顕微鏡観察像  
バーは 100nm を示す。

歳の黒毛和牛で、便性状に異状は認められなかった。さらに、同検体について EM によるウイルス検索を行ったところ多数のロタウイルス様粒子が観察された(図 2 A)。

次に、陽性検体について RT-PCR 法による検査を実施したところ、VP 7 遺伝子についてはいずれのプライマーにおいても目的産物(約1,000bp)が増幅されたが、VP 4 遺伝子ではウシ CRV を標的としたプライマー(BCRVP 4 S および BCRVP 4 A) のみで増幅産物(約2,200bp)が認められた。以上の成績から、今回検出されたウイルスが CRV であることが確認された。

さらに、陽性検体を CaCo-2 細胞に接種しウイルス分離を試みたところ、盲継代 7 代目で抗 CRV MAb を用いた間接蛍光抗体法により特異蛍光が観察され、培養上清にもロタウイルス様粒子が確認された(図 2 B)。分離されたウイルスはその検体番号から T-199 株と命名した。なお、T-199 株の VP 7 および VP 4 遺伝子の一部について塩基配列を決定し、オリジナルのウイルスと比較したところ、両者の配列は完全に一致した。

### 3.3.2 VP 7 遺伝子解析

RT-PCR 法で増幅された遺伝子産物の塩基配列を決定し解析を行ったところ、T-199 株の VP 7 遺伝子は 1,063 塩基対から成り、332 個のアミノ酸をコードする一つのオープンリーディングフレーム(ORF)が存在するものと考えられた(アミノ酸配列のみ図 3 に示す)。

既知の CRV 株との遺伝子配列相同性はヒト CRV 株と 74.9~75.7%、ブタ CRV 株と 74.6~76.4%、ウシ由来 Shintoku 株と 94.2% であった。また、アミノ

酸配列でも同様にヒト CRV 株と 73.5~73.8%、ブタ CRV 株と 72.9~75.3%、Shintoku 株と 97% であり、T-199 株の VP 7 がウシ CRV のそれに最も類似していることがわかった(表 6)。さらに近隣結合法によるアミノ酸系統解析を行ったところ、T-199 株の VP 7 は Shintoku 株と最も近縁であることがわかった(図 4)。なお、Shintoku 株とのアミノ酸配列の比較では、わずか 10 カ所に置換が認められたのみだったものの、そのうち 7 カ所は N 末端の 60 アミノ酸部分に集中していた(図 3)。

### 3.3.3 VP 4 遺伝子解析

T-199 株の VP 4 遺伝子は 2,259 塩基対から成り、735 個のアミノ酸をコードする一つの ORF を持つことがわかった(アミノ酸配列は図 5 参照)。既知の CRV 株との遺伝子配列相同性はヒト CRV 株と 70.3~71.2%、

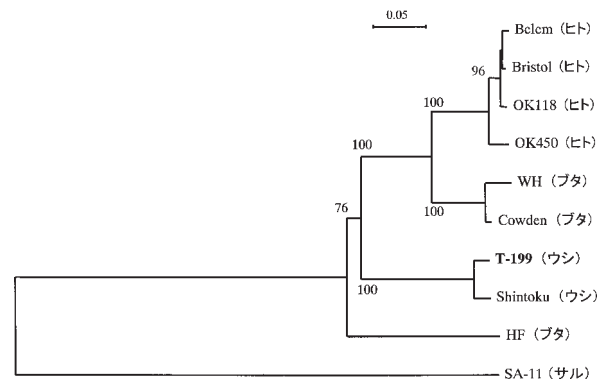


図 4 VP 7 アミノ酸配列の系統解析結果  
A 群ロタウイルス SA-11 株を参照株として近隣結合法により実施した。括弧内は由来動物を、系統樹上の数値はブーツストラップ値をそれぞれ示す。

表 6 VP 7 の遺伝子およびアミノ酸配列相同性

株名 (由来動物)	相同性値(%)*								
	OK118	OK450	Bristol	Belem	Cowden	HF	WH	Shintoku	T-199
OK118 (ヒト)		95.7	98.2	98.1	84.1	75.2	83.3	75.5	<b>75.4</b>
OK450 (ヒト)	96.7		95.6	95.3	83.7	74.3	83.2	74.4	<b>74.9</b>
Bristol (ヒト)	98.8	96.7		97.8	84.1	75.3	83.5	76.1	<b>75.5</b>
Belem (ヒト)	98.5	96.4	99.1		83.6	75.3	83.0	75.7	<b>75.7</b>
Cowden (ブタ)	87.0	87.3	87.7	87.3		75.4	94.1	76.3	<b>76.4</b>
HF (ブタ)	70.5	70.5	70.5	70.2	70.5		74.7	74.2	<b>74.6</b>
WH (ブタ)	84.6	84.9	85.5	84.9	97.0	69.9		75.4	<b>75.8</b>
Shintoku (ウシ)	73.8	73.8	73.8	74.1	74.4	72.9	74.7		<b>94.2</b>
T-199 (ウシ)	<b>73.8</b>	<b>73.8</b>	<b>73.5</b>	<b>73.5</b>	<b>75.0</b>	<b>72.9</b>	<b>75.3</b>	<b>97.0</b>	

\*右上半分の値が遺伝子相同性を、左下半分の値がアミノ酸配列の相同性を示す



T-199 VP7	(ウシ)	1	MVCTTLYTVCVILCILLMYMLLFRKMIHFLLIDMSLVVFISSICIGLSNAQFFANDMLYDGNVEGVINTTNIIFNVESLCIY	80
Shintoku VP7	(ウシ)	1	..... <b>II</b> ..... <b>L</b> . <b>IA</b> ..... <b>R</b> ..... <b>N</b> .....	80
Cowden VP7	(ブタ)	1	.....F <b>I</b> .....F.LIA.ALVITLI.N.W.QG.M.ID.IH.N.TIV.A.DP.D.R.....	80
HF VP7	(ブタ)	1	.....C.....S...V.I.V...F.LIA.TVIITL.Y...KY.D.L...IY...I.T.V.G.S.S.D.D.....	80
OK118 VP7	(ヒト)	1	.....A..F..FI.I.....F.LIT.TLI.I.LL.N.VEW.QG.M.ID.IY.N...TI..S.DP.....	80
81			FPNSAVGQPGPGKSDGLINDNMYAQTLAVLFETKGFPGKSVNFNTYTKISDFINSIEMTCSYNVIVIPETLANSETIEQV	160
81			..... <b>R</b> .....	160
81			..AV..SQ...T..YL..G...I..A.....R..IVLK...V...VD.V.....DSPT...S..RI	160
81			..A.GL.S.Q..A...L..D...SI..T.....I..VRPV..V...D.....L.HDN..D.....	160
81			..AI..SQ.....HL..G...I..T.....IILK...QT.....V.....DRPND...S...I	160
161			AEWVLNVWKCNDNMNVDIYTYEQVGKDNFWAAGFEDCDVAVCPLDPTMNGIGCTPASTETYEVLSDNTQLALIDVVDNVKH	240
161			..... <b>I</b> .....	240
161			...I...R...D...L...T...I...L...S...S...S...S...S...S...LN	240
161			...I...E...L...V...I...N...I...N...IS...SA...I...LD...I...N...EV...LN...R	240
161			...I...R...D...LE...I...IN...L...S...IS...S...S...S...V...N...R	240
241			RIQLNQVTCKLRNCVKGEARLNTAIVRISNSSSFDNSLSPLNNGQKTRSFKINAKKWWKIFYTIIDYINTFIQSMTPRHR	320
241			..... <b>L</b> .....	320
241			..M.TAS...K..I.....LI..T.....D..T.....T.....I..T.....	320
241			..M..A..RIK..M..E.....K.....N.....M..N.....V..V..I...A....	320
241			..M.SAQ...K..I.....LI..T.....T.....T.....T.....IV..A.....	320
321			AIYPEGWMLRYA	332
321			.....	332
321			.....	332
321			.....	332
321			.....	332

図3 T-199株と既知のCRV株とのVP7アミノ酸配列の比較  
同一のアミノ酸はドットで示した。

T-199 VP4	(ウシ)	1	MASSLYRQLISQNYYSTGNEILLDQQTNKTTIDYVDAGNYTQAQLPPTTWGAGSTFESSFSASEITGPHNTNTIINWDLINSNVWVLYQKPTDTIKLFKH	100
Shintoku VP4	(ウシ)	1	.....V.....E..Y..A..P...Y..V..KL..SD.....S.V..L.N	100
Cowden VP4	(ブタ)	1	.....Q.....I.....T.....TE.VV.....K...RG..K.A.NV.N.....E..N.L..G..I...AN.T.....	100
OK118 VP4	(ヒト)	1	.....A.....L.....S.....VIS.....S...ILK.A..TP.....E..N...T.T.L...LNSVR...	100
101			GPESYDVNLAAAFELWYGKANTTVISDYYSNMANKSESVTVNHDSLVLFWNEAGIVLSNKVVNFSWSMGGMLIKPSSSTRVDVCMANMDFN-DS-FNWEE	198
101			.....G.T.....E.D.....GSTA...I...NV..V...L..N..I..I...DN.TS...A....	199
101			..T.NS.....G.S.....SLQ.N..T..ATS...I...GST..A..K...D.....RGN..I.....S.I.....	199
101			..DT.NS.....SG..IA.V..NTIT.QN.THEA.S.C.I...GSTQ.EKQ..T.N.NV..I...IN.N.MRI..SG.EN..N...S	199
199			WKHNFRGANNININMYADYYLASVDPYNQLKALQQPMITTVVEIKMM-KI---KRE--GSINVDEVVSKDSLWQEVRYRVDITLQCKRISEVVKGGGWGY	292
200			..T.....SM---I.T.....S..IR.....I.....M..V..V---I.....	290
200			..E...DV...V...T...E...TE...E...N...F.M...---I.N...LN.....A...E.....	293
200			..N.K...NPG...TE.F...S...TY...N...TVK.IDM...K.MDNSKLG.D.P...SNII...Q.....L..I.....	299
293			DYTSVAFKTIHNTYSYIRAGETVNAHVTVSFNNMKERSYGGSLPTDFKIGRFDIIADATYMYIDYWDSEIFKNMVYVRDLRADMGSFNY--SSNMSYFF	390
291			.....T...A...A...I...L.....G...A...A....	388
294			.....V...T..T...I...I.....V..T.....S.NI.G.F..Y-AE....	391
300			.....T..V...T...N...I...V..A.....T..L.T.S.V.....V...I.G.Q.SY..E....	399
391			RIPVGQYPLHSSGVRFTYERSLLSQFTDQVALNSMRVFRVTSDDGFEMTAGNINARRIASGTGFAYSQGYVTEVTGTVSFISLVSPNPNYQTPASS	490
389			.....A.....I.....	488
392			Q...AH.....V...C.....I...E.N...S...T.....A..HTSQ...NIT...I.....	491
400			Q...S.....RLQLV.D.C.....YA...L..I..V.TS...I.T.D..T..V.....H.AN...I...I.....	499
491			STVRMDLERKINDLRNDFNQLASSVALSDILSLAMSPLTFANLLESVPAIASSVKDVAANVMRKFKTKMFKKAAKPKYKEYIIGDLLEDVTNIPRSTTA	590
489			.....E.....G.....K.....L.....	588
492			.....N...G...T.....K..RN...T.A..S.F.....VA.NSNG	591
500			.....D..A.....S.....T.....S..K..RS...QN.R.F...VA.NNNS	599
591			MDFDDITSAMVSTTNRLQLTDVDTLSEIVARSADDFIPDRTYRMIENGVVHEATPSRVFSYDLATLQQRDFDMEKFMQLASNSPVIASIVDFATLKAMR	690
589			.....E.....N.A...D.M...NG...N.....K.....	688
592			..N...K.....N...S...D.I.Y...K.T...T...E..ID...R...K.....	691
600			LNYS...M.....I...F...S...N..SN.S...NT...I.T.S...IK...N..VD..YK...Q.....I..I	699
691			DTYGVSTDIMYKLVASDAPTILSFINNNPLIRNRIEGLIRQCRI	735
689			.....V.....L.....	733
692			E...G..VI.....D...KS...E.L...L	736
700			...I.D..I.....QD.....TN..N..KL	744

図5 T-199株と既知のCRV株とのVP4アミノ酸配列の比較  
同一のアミノ酸はドットで示し、トリプシン断裂部位を枠で囲んだ。

表7 VP4の遺伝子およびアミノ酸配列相同性

株名 (由来動物)	相同性値(%)*						
	OK118	OK450	Bristol	Belem	Cowden	Shintoku	T-199
OK118 (ヒト)		94.3	97.5	97.1	71.8	69.6	<b>70.8</b>
OK450 (ヒト)	97.3		95.5	95.5	71.1	69.7	<b>70.3</b>
Bristol (ヒト)	97.6	98.7		98.0	71.6	69.8	<b>71.2</b>
Belem (ヒト)	97.6	98.7	99.2		71.5	69.4	<b>71.2</b>
Cowden (ブタ)	73.3	73.1	73.4	73.4		76.1	<b>76.6</b>
Shintoku (ウシ)	71.6	71.6	72.2	71.9	78.7		<b>85.3</b>
T-199 (ウシ)	<b>72.4</b>	<b>72.0</b>	<b>72.7</b>	<b>72.3</b>	<b>80.7</b>	<b>89.7</b>	

\*右上半分の値が遺伝子相同性を、左下半分の値がアミノ酸配列の相同性を示す

表8 中和試験成績

ウイルス株 (由来動物)	抗血清に対する中和抗体価				
	OK118	OK450	K9304	Cowden	Shintoku
OK118 (ヒト)	<u>512</u> *	256	512	128	64
OK450 (ヒト)	256	<u>512</u>	512	512	< 32
K9304 (ヒト)	256	512	<u>512</u>	256	< 32
Cowden (ブタ)	256	< 32	< 32	<u>8,192</u>	64
Shintoku (ウシ)	< 32	< 32	< 32	128	<u>1,024</u>
T-199 (ウシ)	128	256	256	128	128

\*抗血清のホモ価をアンダーラインで示した

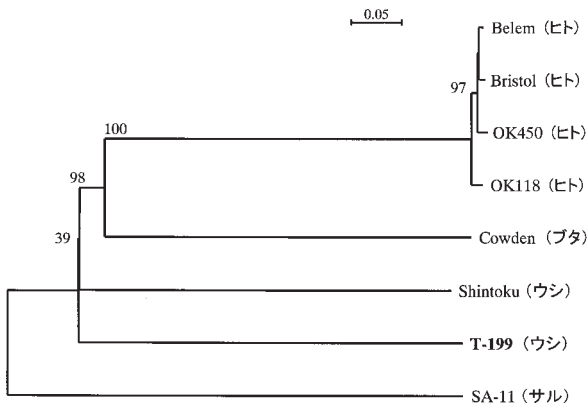


図6 VP4アミノ酸配列の系統解析結果  
A群ロタウイルスSA-11株を参照株として近隣結合法により実施した。括弧内は由来動物を、系統樹上の数値はブーツストラップ値をそれぞれ示す。

ブタ由来 Cowden 株と76.6%、Shintoku 株と85.3%であり、またアミノ酸配列でもヒト CRV 株と72~72.4%、Cowden 株と80.7%、Shintoku 株と89.7%であり、ウシ CRV に若干類似していたものの特に相同性の高い株は認められなかった(表7)。さらにアミノ酸系統解析の結果、T-199株のVP4は既知のCRVとは系統的に大きく異なっていることがわかった(図6)。な

お、類似性が認められた Shintoku 株とのアミノ酸配列の比較では、アミノ酸の追加、欠失および置換が多く認められたが、その大部分はトリプシン解裂部位の上流域(いわゆるVP8領域)に集中しており(図5)、当該部分の相同性については79.2%と低い値であった。

### 3.3.4 中和試験成績

T-199株の免疫学的性状を明らかにするため、N-RPHA法により既知のCRV株に対する抗血清の中和抗体価を測定した(表8)。その結果、T-199株は抗ヒトCRV株血清によりいずれもホモと4倍以内の差で中和されたが、抗Shintoku株血清ではホモと8倍の差で、抗Cowden株血清ではホモと64倍の差でそれぞれ中和された。

## 3.4 SRSVの遺伝子学的検出

### 3.4.1 増幅領域の違いによる比較

2002年度に県内で発生した集団胃腸炎事例の糞便69件、県内産カキ46件についてCOG系とGSK系の2系統のC-PCR、35'-36系とYuri系の2系統のP-PCRを行った。プライマー系別のPCR陽性率を昨年度の陽性率とともに表9に示す。PCR陽性率は、糞便では

35'-36系72.5%, COG系60.9%, GSK系53.6%, Yuri系26.1%, カキでは, GSK系41.3%, COG系6.5%, 35'-36系6.5%, Yuri系4.3%であった。昨年度の陽性率と比較すると, 糞便ではCOG系と35'-36系は上昇し, GSK系とYuri系は大きな変化はみられなかった。カキのPCR陽性率は, 昨年よりCOG系とYuri系で低下し, GSK系と35'-36系で上昇した。

### 3.4.2 リアルタイム法と従来法との比較

前項で使用した各検体について, リアルタイム法と

従来法のPCR結果比較を行った。糞便69件の結果を表10に, カキ46件の結果を表11に示す。

糞便ではリアルタイム法と最も一致率が高かったのはGSK系で81.2%, ついで35'-36系79.7%, Yuri系が最も一致率が低く56.5%であった。リアルタイム法と従来法の不一致例は, GSK系とYuri系では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く, 35'-36系では逆にリアルタイム法陰性・従来法陽性検体がリアルタイム法陽性・従

表9 プライマー系別陽性率の昨年度との比較

増幅領域		カプシド領域PCR		ポリメラーゼ領域PCR	
		リアルタイム法	従来法	35'-36系	Yuri系
方法		COG系	GSK系	35'-36系	Yuri系
糞便	H14年度陽性率 (%)	60.9	53.6	72.5	26.1
	H13年度陽性率 (%)	44.4*	55.6	29.6	25.9
カキ	H14年度陽性率 (%)	6.5	41.3	6.5	4.3
	H13年度陽性率 (%)	20.0*	20.0	2.0	12.0

\*COG系プライマーのH13年度陽性率は, 従来法PCRによる

表10 糞便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		Yuri系	
カプシド領域PCR	GSK系		35'-36系		Yuri系	
COG系	陽性数	陰性数	陽性数	陰性数	陽性数	陰性数
陽性数 (%)	33 (47.8)	9 (13.0)	39 (56.5)	3 (4.3)	15 (21.7)	27 (39.1)
陰性数 (%)	4 (5.8)	23 (33.3)	11 (15.9)	16 (23.2)	3 (4.3)	24 (34.8)
一致率 (%)	81.2		79.7		56.5	

表11 カキ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		Yuri系	
カプシド領域PCR	GSK系		35'-36系		Yuri系	
COG系	陽性数	陰性数	陽性数	陰性数	陽性数	陰性数
陽性数 (%)	2 (4.3)	1 (2.2)	1 (2.2)	2 (4.3)	2 (4.3)	1 (2.2)
陰性数 (%)	17 (37.0)	26 (56.5)	2 (4.3)	41 (89.1)	0 (0.0)	43 (93.5)
一致率 (%)	60.5		91.3		97.8	

表12 カキにおけるリアルタイム法と従来法の検出能力の比較

方 法	リアルタイム法	従 来 法		
プライマー系	カプシド領域PCR	カプシド領域PCR	ポリメラーゼ領域PCR	
検体別	COG系	GSK系	35'-36系	Yuri系
PCR陽性率(%)	6.5	41.3	6.5	4.3
検出率(%)	6.5	4.3	0.0	0.0
確認率(%)	100.0	10.5	0.0	0.0

来法陰性検体より多かった。

カキではリアルタイム法と最も一致率が高かったのは Yuri 系で97.8%，ついで35'-36系91.3%，GSK 系が最も一致率が低く60.9%であった。リアルタイム法と従来法の不一致例は，35'-36系と Yuri 系では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・従来法陽性検体と同数または多く，GSK 系では逆にリアルタイム法陰性・従来法陽性検体がリアルタイム法陽性・従来法陰性検体より多かった。

カキについては従来法 PCR 陽性検体の確認検査を行い，検出率と確認率を算定した(表12)。確認検査陽性となったのはリアルタイム法で3件，従来法ではGSK系の2件のみであり，GSK 系での陽性検体はリアルタイム法ですべて陽性であった。検出率と確認率はそれぞれリアルタイム法で6.5%，100%，GSK 系で4.3%，10.5%であった。

### 3.4.3 リアルタイム法導入による効果

リアルタイム法の導入により，検査の迅速化をはかった。糞便でNV陽性であった場合の検査工程を従来法とリアルタイム法で比較して示す(図7)。従来法では最短でもPCR検査に3日，確認検査に3日の計6日必要であったが，リアルタイム法では最短3日で最終判定が可能であった。

## 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下痢症の発生ピークは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ヒトARVにより，二峰性の発生曲線を持つ傾向が指摘されている<sup>35)</sup>が，2002年度冬期の感染性胃腸炎患者の発生パターンは12月と3月をピークとする発生曲線となり，標準的な発生パターンであった。

このことをウイルス検出状況と比較すると，SRSVは

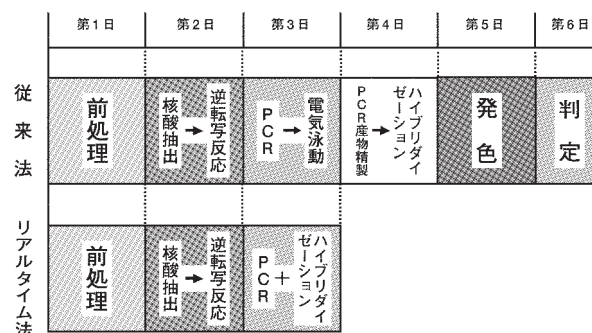


図7 糞便検体における検査所要時間の比較

10月～2月に多く検出され，ヒトARVは2月，3月に多く検出され，患者発生状況と一致していた。また，SRSVが12月以後も多く検出されたことから，2月には両者の流行が重なっていたと考えられる。

EM法でロタウイルス様粒子が観察された検体のうち1件からヒトCRVが検出され，その他の検体からはヒトARVが検出されたことから，Mab13A3との反応性の劣るヒトCRVの出現は認められなかった。当センターで開発したヒトCRV検出用ELISA法およびRPHA試薬は，ヒトCRVの内殻共通抗原に反応するMabを使用しているため，ヒト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で検出できないヒトCRVの出現に注意を払う必要があると思われる。

CRVは抗原的分類ができていないため，Mabとの反応性による分類や，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，ヒトCRVの感染源，感染ルートの究明に役立つと思われる。

### 4.2 ヒト CRV の交差中和試験

16倍以上の中和抗体価の差がホモとヘテロの株の間に生じたとき，2つのCRVが抗原的に異なると考えた<sup>16)</sup>。この基準に従えば，表5に記載されている株のうち，ヒトCRV4株は同一のG血清型と考えられるが，

OK118株およびG7株に対して Cowden 株は、一方にのみ中和がみられた。また、G7株に対して Shintoku 株は、一方にのみ中和がみられた。

亜型 (subtype) の定義は、ポリクローナル抗体による交差中和試験で一方に中和があり、VP 7 に特異的な MAb 抗体による中和試験で識別可能な血清型とされている<sup>36)</sup>。一方、亜型と混同しやすい monotype は、ポリクローナル抗体では双方向に中和があるが、VP 7 に特異的な MAb 抗体で異なる反応性を示す血清型とされている<sup>36)</sup>。

これらのことから、ヒト CRV 4 株、Cowden 株および Shintoku 株は同一の G 血清型内の各々異なる亜型に属すると考えられる。

ARV では、G 血清型別の基準が提唱されている<sup>15)</sup>が、P 血清型別では G 血清型別と基本的に同じ基準が適用されているものの、8～16倍の差で型別される場合もある<sup>15)</sup>。CRV に関しては、G 血清型別のための基準が確定されていないため、今後、さらに検証されていくと考えられる。

また、ARV では VP 4 遺伝子の配列に基づく型別、すなわち P 遺伝子型別も行われており、P 血清型別の結果と P 遺伝子型別の結果が必ずしも一致しないことが知られている。CRV では P 血清型別が行われていないため、P 遺伝子型別の結果と一致するかどうかは不明であるが、ヒトの Bristol 株、Cowden 株及び Shintoku 株間で P 遺伝子型別の結果、これらの P 遺伝子型は異なると報告されている<sup>37)</sup>。このことから、今回使用したヒト CRV 4 株、Cowden 株および Shintoku 株の P 遺伝子型は異なる可能性が高いと考えられる。したがって、VP 4 に媒介される中和により異なる G 血清型間で一方の中和が見られる場合があるため、交差中和試験に対する VP 4 の影響を考慮に入れる必要があると思われるが、今回の試験では VP 4 の影響は少ないと考えられる。

CRV の免疫学的な P 血清型別は行われていないため、CRV の G 血清型別に及ぼす VP 4 に対する抗体の影響を完全に理解するためにはさらなる免疫学的研究が必要であろう。

#### 4.3 動物糞便からの CRV の検出とその性状解析

ヒト CRV 集団胃腸炎の感染源究明の一助として、ウシ糞便478検体およびブタ糞便145検体について CRV

検索を行ったところ、ウシ糞便1検体が陽性となったものの、ブタ糞便から CRV は検出されなかった。CRV に対する抗体保有率がウシで約50%、ブタでは90%以上であった<sup>22)</sup>ことからすると、今回の検出率は低いと思われる。ただし、これまでの CRV 検出報告が主に幼獣の糞便からのものである<sup>20),38)</sup>ことから、検査した検体の多くが成牛や成豚から採取された糞便であったことが、低検出率の要因となった可能性がある。いずれにしても本研究結果から見る限り、成獣の糞便がヒト CRV 感染症の原因となる可能性は低いものと考えられるが、今後仔牛や仔豚から採取した糞便も検査対象に加えつつ、さらに多くの検体について CRV 検索を行う予定である。

今回ウシ糞便から分離された T-199 株は、VP 7 および VP 4 遺伝子の相同性および系統解析結果などから、ウシ CRV に近縁なウイルスであることが示唆された。ウシ CRV に関しては、1990年に恒光ら<sup>20)</sup>が北海道内の下痢を呈する仔牛から世界で初めて本ウイルスを確認したものの、その後まったく検出報告がなく、今回が10年ぶりの検出例となった。さらに、細胞培養で増殖可能なウシ CRV としては T-199 株が Shintoku 株<sup>20)</sup>に次いで世界で2例目であり、本ウイルスは CRV 研究において極めて有用であると考えられる。

T-199 株の VP 7 については、Shintoku 株と遺伝子レベルで94.2%、アミノ酸レベルで97.0%の相同性であり、かつ系統解析でも Shintoku 株と同一の系統樹上に分類されたが、VP 4 については Shintoku 株と比較した場合、アミノ酸レベルでも89.7%の相同性であり、また系統解析でも異なる系統樹に分類された。このように VP 7 と VP 4 の類似性にくい違いが生じた原因として、①Shintoku 株が検出されてから T-199 株の検出されるまでの10年間に、ウイルス粒子の最表面に位置する VP 4 に変異が集中した、②Shintoku 株に極めて類似した株とそうでない株との遺伝子再集合により T-199 株が出現したことなどが考えられる。いずれにしても、他の遺伝子分節について解析を行うことで、T-199 株の由来が明らかになるものと思われる。

ARV では交差中和試験に基づき14の VP 7 血清型 (Gタイプ) および11の VP 4 血清型 (Pタイプ) に分類されているが、それぞれ同一の Gタイプおよび Pタイプの株間では、アミノ酸配列の相同性がそれぞれ

87%以上および89%以上であることが報告されている<sup>23)</sup>。VP7アミノ酸配列相同性から、今回分離されたT-199株はヒトCRV株およびブタCRV株とは異なるGタイプに、Shintoku株とは同一のGタイプに属するものと考えられた。またVP4アミノ酸配列相同性からも同様に、T-199株はヒトCRV株およびブタCRV株とは異なるPタイプの株であり、Shintoku株とは同一のPタイプに属するものと考えられた。しかしながら、Pタイプ特異的のエピトープが存在するVP8領域<sup>23)</sup>の相同性が、T-199株とShintoku株間で79.2%と低い値であり、かつ互いのVP4が系統学的にも異なっていたことなどから、両株が異なるPタイプに属する可能性も考えられる。

T-199株は、抗ヒトCRV血清によりいずれもホモと4倍以内の差で中和されたが、抗Shintoku株血清ではホモと8倍の差で、抗Cowden株血清ではホモと64倍の差でそれぞれ中和されたことから、T-199株は血清学的にウシCRVよりも、むしろヒトCRVに近縁であるという興味深い結果が得られた。しかしながらこの結果は、前述のアミノ酸配列に基づく解析結果とは食い違いがみられる点もあることから、今後T-199株に対する抗血清を作製し、これを用いた交差中和試験を行うことで、ヒトCRV株との血清学的関連性を明らかにする必要がある。

#### 4.4 SRSVの遺伝子学的検出

##### 4.4.1 増幅領域の違いによる比較

糞便では昨年度に続いてC-PCRの2系のPCR陽性率が高かったが、今年度はP-PCRのうち35'-36系がC-PCRを上まわっており、PCR段階ではC-PCRとP-PCRどちらが優れているとはいえなかった。

昨年度との比較でCOG系と35'-36系のPCR陽性率が今年度上昇したが、COG系の場合はリアルタイム法に変わり感度があがったためと考えられる。一方、方法が変わっていない35'-36系については、今年度流行していたNVが昨年度のNVに比べ35'-36系で検出されやすいタイプであった可能性が考えられる。逆にみれば、陽性率があまり変化しなかったGSK系は、NVの流行タイプにあまり左右されずに検出できるといえるかもしれない。今後同じC-PCRであるCOG系についても、リアルタイム法で実施した場合同様な傾向がみられるか、引き続き検討する必要がある。

カキのPCR陽性率はC-PCRのGSK系以外の他の3系は大差はなく、陽性検体数が少ないためはっきりした傾向は認められなかった。

##### 4.4.2 リアルタイム法と従来法との比較

糞便におけるリアルタイム法は、陽性数の少なかったYuri系を除いて従来法とよく一致していた。結果不一致例でもGSK系とYuri系はリアルタイム法陽性・従来法陰性検体が多く、リアルタイム法が従来法と同等以上の検出能力を持つことが示された。

カキにおいても、リアルタイム法はPCR陽性数の多かったGSK系を除いて従来法とよく一致していた。従来法での確認検査後、GSK系のNV検出数はリアルタイム法で陽性であった2件のみで、P-PCRの2系では確認検査はすべて陰性であった。この結果、カキからのNV検出数はリアルタイム法の3件が最も多くなった。このことから、糞便よりも含有ウイルス量が少ないと考えられるカキにおいても、リアルタイム法がNVを効率的かつ特異的に検出することが示された。またP-PCRの2系ではリアルタイム法で陽性であった検体が確認検査で陰性と判定されたが、これは確認検査の検出限界以下のNVがリアルタイム法で検出された可能性があり、リアルタイム法が従来法のnested-PCRと同程度ないしはそれ以上の高感度を有することを示唆するものである。

リアルタイム法が従来法と同等以上の検出能力を有することが明らかとなった。しかし、今回実施したCOG系によるリアルタイム法で検出し得ないNVの報告<sup>39)</sup>もあり、NV遺伝子の多様性からみて、さらに新しいタイプのNVが流行するおそれもあることから、今後も常に検出状況をEM法やELISA法の結果と照合しつつ、必要に応じて従来法の併用、あるいは新しいリアルタイム法用のプライマー構築等を考慮するべきである。

##### 4.4.3 リアルタイム法導入による効果

リアルタイム法の特徴は、PCRによる核酸増幅とハイブリダイゼーションによる確認とを同時進行できる点と蛍光発色測定による高感度測定にある。

糞便からのNV検出陽性の場合、従来法ではPCR検査の後に実施していた確認検査に要する3日が不要となり、リアルタイムPCRでは最短で3日と大幅に迅速化可能となった。これによってNV陽性結果をよ

り早く行政サイドに還元することが可能となる。また、1検査に要する時間短縮により、流行期に同時多発する別個の事件にも迅速に対応可能となり、行政対応に大きく資すると思われる。

なお、今回検出率・迅速性ともに優れていたリアルタイム法で用いた COG 系は、前報<sup>40)</sup>ではカキで検出能力が低かったが、もともとリアルタイム法用に設計されたものであり、リアルタイム法では本来の能力を發揮したと考えられた。

## 謝 辞

ウシ糞便の検体採取にご協力をいただきました岡山県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 — 概論 —, 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) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Ohata, R., Ogura, H. and Yamada, M.: Seroepidemiology of human group C rotavirus in Japan based on a Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, J. Clin. Microbiol., 8(1), 161-165, 2001
- 15) Hoshino, Y. and Kapikian, A.Z.: Classification of rotavirus VP 4 and VP 7 serotypes, Arch. Virol. Suppl., 12, 99-111, 1996
- 16) Tsunemitsu, H., Jiang, B., Yamashita, Y., Oseto, M., Ushijima, H. and Saif, L. J.: Evidence of serologic diversity within group C rotaviruses: J. Clin. Microbiol., 30(11), 3009-3012, 1992

- 17) Fujii, R., Kuzuya, M., Hamano, M., Ogura, H., Yamada, M. and Mori, T. : Neutralization Assay for human group C rotaviruses using a reverse passive hemagglutination test for endpoint determination, *J. Clin. Microbiol.*, 38(1), 50-54, 2000
- 18) Saif, L. J., Bohl, E. H., Theil, K. W., Cross, R. F. and House, J. A. : Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs, *J. Clin. Microbiol.*, 12, 105-111, 1980
- 19) Bridger, J. C., Pedley, S. and McCrae, M. A. : Group C rotaviruses in humans, *J. Clin. Microbiol.*, 23, 760-763, 1986
- 20) Tsunemitsu, H., Saif, L. J., Jiang, B. M., Shimizu, M., Hiro, M., Yamaguchi, H., Ishiyama, T., Hirai, T. : Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA104), *J. Clin. Microbiol.*, 29, 2609-2613, 1991
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 小林宣道, 浦沢正三 : ロタウイルス, ウイルス, 50, 157-172, 2000
- 24) Jiang, X., Wang, M., Wang, K. and Estes, M. K. : Sequence and genomic organization of Norwalk virus, *Virology*, 195, 51-61, 1993
- 25) 染谷雄一, 名取克郎, 武田直和, 宮村達男 : ヒトカリシウイルスの多様性, *臨床とウイルス*, 27, 294-303, 1999
- 26) 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
- 27) 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
- 28) 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
- 29) 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
- 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) Anthony, I. D., Bullivant, S., Dayal, S., Bellamy, A. R. and Berriman, J. A. : Rotavirusspike structure and polypeptide composition, *J. Clin. Microbiol.*, 65(8), 4334-4340, 1991
- 32) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Nakamura, J., Yamada, M., Nii, S. and Mori, T. : Molecular analysis of outer capsid glycoprotein (VP7) genes from two isolates of human group C rotavirus with different genome electropherotypes, *J. Clin. Microbiol.*, 34, 3185-3189, 1996
- 33) 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
- 34) 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
- 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) Browning, G. F., Chalmers, R. M., Fitzgerald, T. A. and Snodgrass, D. R. : Evidence for two serotype G 3 subtypes among equine rotaviruses : *J. Clin. Microbiol.*, 30(2), 485-491, 1992
- 37) Jiang, B. J., Gentsch, R., Tsunemitsu, H. L. J. Saif, L. J. and Glass, R. I. : Sequence analysis of the gene encoding VP 4 of a bovine group C rotavirus : Molecular evidence for a new P genotype : *Virus Genes*, 19, 85-88, 1999
- 38) Saif, L. J., Nongroup A rotaviruses : *Viral diarrhea of man and animals*, p. 73-95, CRC Press, Florida, USA, 1990
- 39) Iritani, N., Seto, Y., Kubo, H., Haruki, K., Ayata, M., Ogura, H. : Prevalence of "Norwalk-like Virus" infections in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis observed during the 1999-2000 season in Osaka City, Japan, *J. Med. Virol.*, 66, 131-138, 2002
- 40) 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13年度), 岡山県環境保健センター年報, 26, 37-47, 2002