

## 胃腸炎ウイルスの研究 (2006年度)

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)

\*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

【調査研究】

## 胃腸炎ウイルスの研究 (2006年度)

Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama (2006-2007)

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

\*\*\* (独) 国立病院機構 岡山医療センター小児科

### 要 旨

ウイルス性胃腸炎の主要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) 法による2006年度採取の患者糞便 (散発412件, 集発91件) の検索で、EM法でロタウイルス様粒子が観察された49件中CRVが2件, A群ロタウイルスが46件検出された。1件は免疫学的検出法では同定不能であったが、その他の48件については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。②CRVにおける遺伝子再集合の発生頻度解明のため、過去の調査で外殻糖蛋白 (VP7) の遺伝子配列が明らかなブタCRV 26株について内殻蛋白 (VP6) の遺伝子の検出・同定を試み、両者の関係を比較・解析した。その結果、23株でVP6遺伝子が増幅され、それらはすべて1,302塩基対からなり、385個のアミノ酸をコードしていた。アミノ酸配列系統解析の結果、23株のCRVは、ブタ由来株と比較的近縁な3つのクラスターといずれの動物由来株とも類似性がみられないクラスターに分類された。VP6とVP7クラスターの関係では、一方が同じクラスターに属する株でも他方が多様なクラスターに属するケースが認められ、これらは遺伝子再集合により生じた可能性が高いと思われた。したがって、CRVでもある程度の頻度で遺伝子再集合が起き、それにより新たな流行株が出現している可能性が強く示唆された。③2004年度～2006年度の小児胃腸炎散発事例由来35株および2006年度の集団事例由来12株の遺伝子解析を行った。その結果、散発事例株の遺伝子型は、GII/4が24, GII/3が9, GII/1とGII/13が各1, 集団事例株12株はすべてGII/4であった。2006年度に検出されたGII/4株は、2006年春から欧州の広範な地域で主流型の一つとなっているNV GII/4 2006b型に最も類似していた。また2006年度秋以後のGII/4株のpolymerase領域の塩基配列は株間で大きな差異はみられず、2006/2007シーズンの県内のNVの流行は、ほぼ同じ塩基配列を持つ株によるものと推察された。散発事例株で3シーズンを通じて検出されたGII/4は、polymerase領域の塩基配列の比較の結果、流行するウイルスタイプが経時的に変化していた。

[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]

[Key words : Group C Rotavirus, Norovirus, Monoclonal antibody, Molecular epidemiology, Polymerase chain reaction]

## 1 はじめに

ウイルス性胃腸炎は、乳幼児から高齢者まで広い年齢層にわたって毎年全国的に多発しており、公衆衛生上の大きな問題の一つとなっているが、その病原体としては、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）等多様なウイルスがあげられる。

一方、食品媒介と疑われるウイルス性胃腸炎集団事例の多発により、1997年に食品衛生法が改正され、これらの胃腸炎起因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、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C群ロタウイルスの免疫学的検出

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（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>、日本各地で集団胃腸炎の報告がなされ<sup>3)~9)</sup>、さらに本県でも2年続けて集団胃腸炎事例が確認されるなど<sup>10), 11)</sup>、公衆衛生上の問題点となっている。ヒトCRVには簡便な検査法がなかったが、我々は多数検体を迅速、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法及びLx-Ag法）を開発した<sup>12), 13)</sup>。これらの方法のうちRPHA法による検査は全国の衛生研究所でも行われつつある。

岡山県でも毎年、秋期から冬期を中心に感染性胃腸炎の流行がみられ、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2005年度と同様に2006年4月～2007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の検査と電子顕微鏡（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 ブタ盲腸便由来C群ロタウイルス株のVP6遺伝子解析

CRVはヒトをはじめ、ブタ、ウシ、イヌなどに感染し胃腸炎を起こすことが知られているが<sup>14), 15)</sup>、特にヒトでは食中毒様の集団発生を引き起こすため<sup>2)~11)</sup>、公衆衛生上問題となっている。これまでの抗体保有調査から<sup>16)</sup>、ブタの9割以上がCRVに対する抗体を保有しており、ブタの間で同ウイルスが広く蔓延しているものと思われる。さらに、恒光ら<sup>17)</sup>が行った外殻糖蛋白（VP7）遺伝子の比較結果、および我々が行った交差中和試験の結果<sup>18)</sup>などから、ヒトCRV株とブタCRV株が同一血清型に属する可能性が示されるなど、両ウイルスが比較的近い関係にあることがわかってきた。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。そこで我々は、ヒトCRV胃腸炎の感染源究明の一助として、2002～2005年の3シーズンにわたって、ブタにおけるCRVの侵淫調査およびブタ由来CRVの遺伝子解析を行ってきた<sup>19)~21)</sup>。その結果、①中国地方の農場で飼育されているブタの間でCRVが継続的に流行していること、②ブタ由来CRVが様々なタイプの外殻糖蛋白（VP7）を保有していること、③CRV汚染農場においては、シーズンにより流行株のVP7タイプが異なっていることなどをこれまでに明らかにした。

ARVでは、同一個体由来の異なるウイルスが同時感染を起こすことで、ウイルス間で遺伝子再集合（リアソートメント）と呼ばれる遺伝子分節の組み替え現象を起こし、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>22)</sup>。CRVもARVと類似したゲノム構造を持つため<sup>22)</sup>、CRVにおいてもリアソートメントが起きる可能性も十分考えられるものの、本ウイルスのリアソートメントに関する報告がまったく無いため、その詳細については不明である。仮に、CRVが比較的高頻度にリアソートメントを起こすとすれば、ブタが保有する多様なウイルスとヒトCRV株とがブタの体内において組み替えを起こし、ヒトに感染性を有する新たなタイプのウイルスが出現する危険性が高まると考えられる。そこで、ブタCRVにおけるリアソートメントの発生頻度を明らかにするため、外殻糖蛋白（VP7）の遺伝子配列が既に明らかになっている株について、内殻蛋白（VP6）をコードする遺伝子についても検出・同定を試み、両者の関係を比較・解析した。

### 1.3 小型球形ウイルスの遺伝子学的検出—ノロウイルス診断法の確立と分子疫学

ウイルス性胃腸炎の原因ウイルスの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、その検出は主に電子顕微鏡検索で行われてきた。近年SRSVの一種でCalicivirus科に属するNorovirus属のNorwalkvirus（以下NV）の遺伝子情報<sup>23)</sup>に基づいた逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（以下RT-PCR）法での検出が可能となり、①NVの遺伝子の多様性（大きく2つの遺伝子群 Genogroup I：GIとGenogroup II：GIIに分かれ、ウイルス表面蛋白をコードするcapsid領域の遺伝子配列により、GI、GIIともに10以上の遺伝子型に分かれる<sup>24)</sup>）や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>25)~27)</sup>が明らかになってきた。このような遺伝子の多様性のため、単独ですべての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おり、検査法についても年々改良が加えられてきた<sup>28)~31)</sup>。糞便検体に関しては、2002年度および2003年度の検討<sup>18), 19)</sup>により、Real-Time 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1st C-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）が従来のRT-PCR法（capsid領域を増幅するGSK系プライマーとpolymerase領域を増幅するNV81系およびYuri系プライマーによるPCR。以下従来法と略）と同等あるいはそれ以上の検出能力を持つことが確認され、本法の導入によって検査所要時間を大幅に短縮できた。こうした検査法の改良とNVによる感染性胃腸炎に対する認識の高まりによって、報告事例数も増加してきた。さらに近年は報告数の増加に伴ってNVの流行状況が社会的注目を集める場合も多くなってきた。

2006年度は11月初めよりNVによる集団胃腸炎が、県内はもとより全国的にも多発し、社会的問題となった。県内では2004年度に続く集団事例の多発であり、この流行の背景を探るため、2004年度～2006年度の小児の胃腸炎散発事例および今年度多発した集団発生事例から検出されたNVについて遺伝子解析を行った。

## 2 材料と方法

### 2.1 ヒトC群ロタウイルスの免疫学的検出

#### (1)対象

2006年4月～2007年3月に岡山地区（岡山赤十字病院、国立病院機構岡山医療センター）及び玉野地区（のうの小児科）の感染性胃腸炎患者各々101名、292名及び19名、合計412名から糞便を採取した。

また、2006年度内に発生した集団胃腸炎17事例の患者91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、アデノウイルス（ADV）及び小型球形ウイルス（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<sup>32)</sup>。

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

ARVの検出はELISA法（ロタクロン、TFB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<sup>32)</sup>。RPHA法はMAb 13A3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。

### 2.2 ブタ盲腸便由来C群ロタウイルス株のVP6遺伝子解析

#### (1)糞便検体

これまでの調査で採取されたブタ盲腸便のうち、CRVのVP7遺伝子が増幅され、かつその塩基配列が決定できた26検体（2002/03シーズン：13検体、2003/04シーズン：9検体、2004/05シーズン：4検体<sup>19)~21)</sup>を本研究に用いた。

#### (2)VP6遺伝子増幅方法

検体から抽出したRNAを鋳型として、CRVのVP6遺伝子の両端およびその内側に設定した2組のプライマー（表1）を用いて逆転写PCR（RT-PCR）法を実施した。

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
PCRVP6S	GCATTTAAAATCTCATTCAC	1-20	
PCRVP6A	AGCCACATAGTTCACATTTTC	1,352-1,333	ブタCRV (Cowden株)
PCRVP6NS	CTTTTTTCCATTGCGAAAAC	31-40	VP6遺伝子
PCRVP6NA	ATCCTCCTGGGGATCATC	1,332-1,315	

なお、PCRの条件等は既報の方法<sup>19)</sup>に準じて行った。なお、外側のプライマー（PCRVP6S及びPCRVP6A）で遺伝子の増幅（1st PCR）を行った後、特異バンドが確認されなかった場合には、その内側のプライマー（PCRVP6NS及びPCRVP6NA）で2回目の増幅（2nd PCR）を実施した。

### (3) 遺伝子配列決定法

増幅された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・精製を行った。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。

### (4) 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、ARV SA-11株を参照株とした近隣接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 小型球形ウイルスの遺伝子学的検出—ノロウイルス診断法の確立と分子疫学

### (1) 対象

散発事例として、2004年4月～2007年2月に岡山市内の（独）国立病院機構 岡山医療センターで採取された散発性胃腸炎患者糞便のうち、電子顕微鏡検索で小型球形ウイルス様粒子が観察された112検体（患者年齢0～81歳）および2006年10月～11月に県内の感染症発生動向調査事業検査定点医療機関で採取された散発性胃腸炎患者糞便15検体（患者年齢0～7歳）を使用した。また集団事例として、2006年4月～2007年3月に県内で発生した集団胃腸炎17事例（高齢者福祉施設4事例，社会福祉施設1事例，食中毒8事例，有症苦情2事例）の糞便等128検体（患者糞便94件，患者吐物2件，調理従事者糞便32件），計255検体を使用した。

### (2) 方法

糞便は、既報<sup>18)</sup>と同様に前処理、RNA抽出を行った。RT-PCR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全部監視安全課長通知<sup>31)</sup>に準拠して行った。COG系は

LightCycler システム 3302（ロシュ・ダイアグノスティックス社）とQuantiTect Probe PCR（キアゲン社）を用いたリアルタイム法<sup>33)</sup>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。陽性検体は、従来法のGSK系で陽性となったもののうち、散発事例検体のすべて、集団事例については各事例を代表する1検体について polymerase/capsid junction 領域約300塩基の配列を決定し、遺伝子型を決定するとともに近隣接合法により系統解析を行った。さらに、これらの一部については、NV81系またはYuri系プライマーで増幅される polymerase 領域の塩基配列も決定・解析した。

## 3 結果

### 3.1 ヒトC群ロタウイルスの免疫学的検出

#### (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、2006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45週（11月）に急増し、第46週（11月）にはピークの25.54名に達し、2006年度で最多となった。第47週（11月）以後は減少傾向に転じたものの、第9週（3月）には再び上昇に転じ、第11週（3月）には二番目のピークの8.85名に達し、その後は漸減傾向となっている。

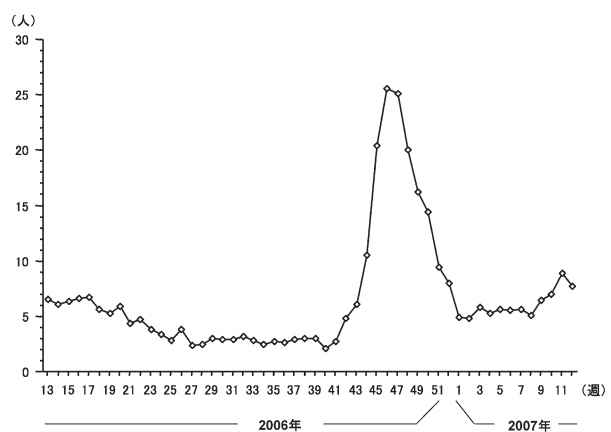


図1 感染性胃腸炎の発生状況

#### (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412件の散発患者糞便よりロタウイルス様粒子48件（11.7%），ADV 2件（0.5%），SRSV 89件（21.6%），ロタウイルス様粒子及びSRSV 1

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	SRSV	陰性	小計	ARV	CRV	ADV	SRSV	ARV+SRSV	ロタ (同定不能)	陰性	小計	ADV	SRSV	陰性	小計	
2006年4月	2	1	2	7	12	12	1	0	1	0	0	21	35	0	0	1	1	48
5月	2	0	1	5	8	7	0	0	5	1	0	31	44	-	-	-	-	52
6月	0	0	2	5	7	0	0	0	0	0	0	29	29	0	1	0	1	37
7月	0	0	1	2	3	0	0	0	3	0	0	10	13	1	0	1	2	18
8月	0	0	4	4	8	0	0	0	2	0	0	1	3	0	0	2	2	13
9月	0	0	3	7	10	0	0	0	5	0	0	1	6	0	0	3	3	19
10月	0	0	3	5	8	0	0	0	6	0	0	2	8	0	0	1	1	17
11月	0	0	7	4	11	0	0	0	21	0	0	30	51	0	1	2	3	65
12月	0	0	1	8	9	0	0	0	6	0	0	20	26	0	0	1	1	36
2007年1月	0	0	0	7	7	0	0	0	3	0	0	15	18	-	-	-	-	25
2月	2	0	1	7	10	3	0	0	3	0	0	6	12	0	2	2	4	26
3月	1	0	0	7	8	16	0	1	5	0	1	24	47	0	0	1	1	56
計	7	1	25	68	101	38	1	1	60	1	1	190	292	1	4	14	19	412

件 (0.2%) (合計140件 (34.0%)) のウイルスがEM法により観察され、EM法でロタウイルス様粒子が観察された検体49件 (重複分を含む) のうち46件からはARV、2件からはCRVが検出され、残り1件は同定不能であった。

月別ウイルス検出状況は表2に示すとおり、ARVは2006年4、5月、2007年2、3月に多く検出された。CRVは2006年4月に、ADVは2006年7月、2007年3月に検出された。SRSVは年度を通じて検出されたが、特に2006年10～12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91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が、ロタウイルス様粒子は観察されなかった。

## 3.2 ブタ盲腸便由来C群ロタウイルス株のVP6遺伝子解析

### (1) VP6遺伝子の増幅と解析

RT-PCRの結果、26検体中23検体 (2002/03シーズン: 12検体、2003/04シーズン: 8検体、2004/05シーズン: 3検体) でVP6遺伝子の増幅が確認された。なお10検体が1st PCRで、残りの13検体が2nd PCRでそれぞれ特異バンドが確認された。次に、増幅されたVP6遺伝子 (2nd PCR部分) について塩基配列を決定したところ、いずれも1,302塩基対からなり、385個のアミノ酸をコードしていると考えられた。相同性解析の結果、VP6遺伝子の塩基配列相同性は80.6%～100%、アミノ酸配列相同性は85.7%～100%であった。さらに、既知のCRV株の配列を加えてVP6アミノ酸配列に基づく系統解析を実施したところ (図2)、ヒト由来株もしくはウシ由来株に類似した配列は認められなかったものの、大きくみると

ブタ由来株と同系統に属すると考えられる株と、いずれの動物由来株とも類似性がみられない株 (クラスターⅢ) の2種類が存在することがわかった。さらに、ブタ由来株と同系統の株について詳しくみると、Cowden株に近縁な株 (クラスターⅠ) と、そうでない株 (クラスターⅡ) の大きく2グループに分けられ、さらにクラスターⅡについては高いブートストラップ値をもってⅡa及びⅡbに分類可能であった。さらにクラスター内を詳しくみると、クラスターⅡaに属する株については、分離年もしくは由来農場に関わらず相互に密接に関連していた (アミノ酸相同性97.4%以上)。その一方で、クラスターⅡbに属する株については、相互のアミノ酸相同性は90.1%以上とクラスターⅡaに比べやや低く、分離年もしくは由来農場ごとに個別のグループを形成した。

### (2) 分離シーズンとVP6クラスターとの関係

分離シーズンとVP6クラスターの関係について農場別にまとめたものを表3に示した。特に、複数シーズンにわたりCRVが検出されたF、GおよびHの3カ所の農場に着目すると、F農場では8株のうち、2002/03シーズンの4株と2003/04シーズンの4株中3株がクラスターⅡaに、残りの1株がクラスターⅡbに属していた。またG農場では5株のうち、2002/03シーズンの3株と2003/04シーズンの1株はいずれもクラスターⅡbに属しており、2004/05シーズンの1株のみがクラスターⅠに属するなど、これらの農場については農場ごとに優勢なクラスターが存在していた。一方、H農場では2002/03シーズンの3株中2株がクラスターⅡbに、1株がクラスターⅢに属し、また2003/04シーズンの3株中2株がクラスターⅡbに、1株がクラスターⅡaに属していた。

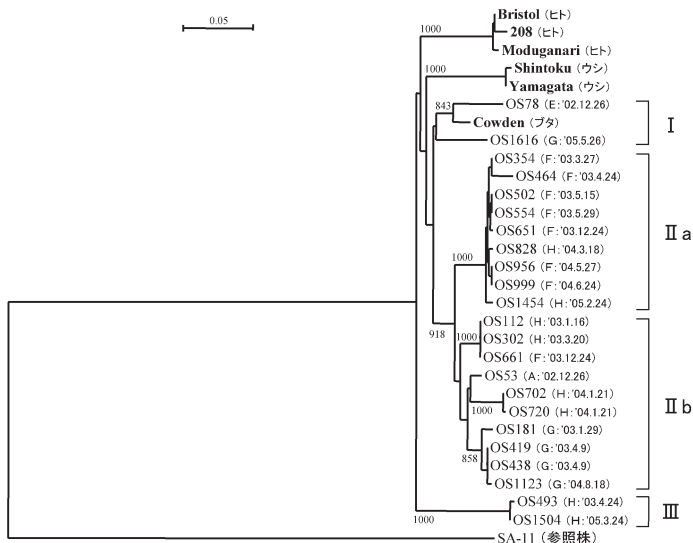


図2 VP6 アミノ酸配列の系統解析結果

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（系統樹上の数値はブートストラップ値を示す）。既知のCRV株を太字で示す。既知の株については由来動物を、ブタ盲腸便由来株については由来農場と採取年月日をそれぞれ括弧内に示した。

さらに2004/05シーズンの2株についても、それぞれクラスターII a及びIIIに属するなど、シーズンごとの優勢なクラスターは特に認められず、VP6に多様性が認められた。

### (3)VP6クラスターとVP7クラスターの関係

次に、同一株におけるVP6クラスターとVP7クラスター関係についてみると（表3）、VP7クラスターがAの株については8株中7株の、VP7クラスターがCの株についてはすべてのVP6クラスターがII aまたはII bに属していることがわかった。その一方で、VP7クラスターがBの4株については、VP6クラスターがIおよびII bが各1株で、残り2株はIIIとVP6に多様性が認められた。次に、複数シーズンにわたりCRV株が検出されたF、GおよびHの3カ所の農場について、流行シーズンとVP6及びVP7クラスターの関係を見ると、F農場では、2002/03シーズンの4株はすべてVP6クラスターがII aでVP7クラスターがC（以下〔VP6(II a) : VP7(C)〕と略）であったのに対し、次シーズンの4株中3株はいずれもVP6クラスターがII aのままVP7クラスターがAに変化し、残りの1株は逆に、VP7クラスターがCのままVP6クラスターがII bに変化していた。G農場では、2002/03シーズン及び2003/04シーズンとも、すべての株が〔VP6(II b) : VP7(C)〕であったが、2004/05シーズンには〔VP6(I) : VP7(B)〕のみが検出された。H

表3 農場別にみた流行シーズンとVP6及びVP7クラスターの関係

由来農場	流行シーズン	検体番号 (検体採取日)	クラスター分類	
			VP6	VP7
A	2002~03	OS53 ('02.12.26)	II b	C
		OS78 ('02.12.26)	I	A
		OS354 ('03.3.27)	II a	C
		OS464 ('03.4.24)	II a	C
	2002~03	OS502 ('03.5.15)	II a	C
		OS651 ('03.12.24)	II a	C
		OS828 ('04.3.18)	II a	C
		OS956 ('04.5.27)	II a	C
	2003~04	OS999 ('04.6.24)	II a	C
		OS1454 ('05.2.24)	II a	C
		OS651 ('03.12.24)	II a	A
		OS661 ('03.12.24)	II b	C
2002~03	OS956 ('04.5.27)	II a	A	
	OS999 ('04.6.24)	II a	A	
	OS181 ('03.1.29)	II b	C	
	OS419 ('03.4.9)	II b	C	
G	2002~03	OS438 ('03.4.9)	II b	C
		OS1123 ('04.8.18)	II b	C
	2003~04	OS1123 ('04.8.18)	II b	C
		OS1616 ('05.5.26)	I	B
H	2002~03	OS112 ('03.1.16)	II b	C
		OS302 ('03.3.20)	II b	B
		OS493 ('03.4.24)	III	B
		OS702 ('04.1.21)	II b	A
	2003~04	OS720 ('04.1.21)	II b	A
		OS828 ('04.3.18)	II a	A
		OS1454 ('05.2.24)	II a	A
		OS1504 ('05.3.24)	III	B

農場では、2002/03シーズンの3株についてはVP6とVP7クラスターの関係がすべて異なっていた。また2003/04シーズンの株は、VP7クラスターすべてAであった一方で、VP6クラスターは前シーズンにも認められたII bと新たなII aの2種類が存在した。さらに、2004/05シーズンには、前シーズンに引き続いて検出された〔VP6(II a) : VP7(A)〕の株に加え、2シーズン前に認められた〔VP6(III) : VP7(B)〕の株が再び検出された。

### 3.3 小型球形ウイルスの遺伝子学的検出—ノロウイルス診断法の確立と分子疫学

#### (1)散発事例

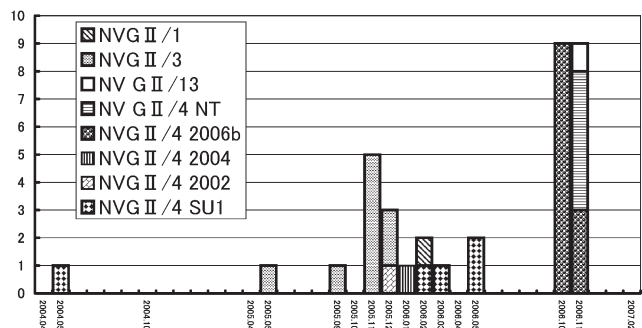


図3 散発事例由来NVの月別一遺伝子型別検出状況 (2004.4~2006.02)

127検体中66検体からNVが検出され、うちGSK系のプライマーで増幅されるcapsid領域の塩基配列により型別可能であった35株の遺伝子型は、GII/4-24株、GII/3-9株、GII/1-1株、GII/13-1株、であった。(図3, 4)。年度ごとの遺伝子型の分布は、2004年度は、GII/4-1株、2005年度は、GII/3-9株、GII/4-4株、GII/1-1株で、9～12月はGII/3、12～3月はGII/4が継続的に検出された。また、2006年度はGII/4-19株、GII/13-1株が検出され、GII/4は5月と10、11月に集中して検出された。(図3)

(2) 集団事例

17事例中16事例の患者材料90検体(糞便88, 吐物2), 調理従事者糞便8検体, 計98検体からGIIに属するNVが検出された(表4)。これらの株はpolymerase領域PCRにおいて、NV81系でもYuri系でもほぼ同等に増幅された。同一事例内での増幅傾向がほぼ同じであったため、16事例中12事例の代表株12株について、capsid領域の塩基配列を決定し、系統解析を行った。遺伝子解析の結果、12事例由来の株はすべてGII/4であり(図4)、1株を除いて1つのクラスターを形成した。データベース上の既知の株と比較したところ、2005年にスペインで初めて検出されたNV GII/4 2006b<sup>34)</sup>株と最も相同性が高かった。

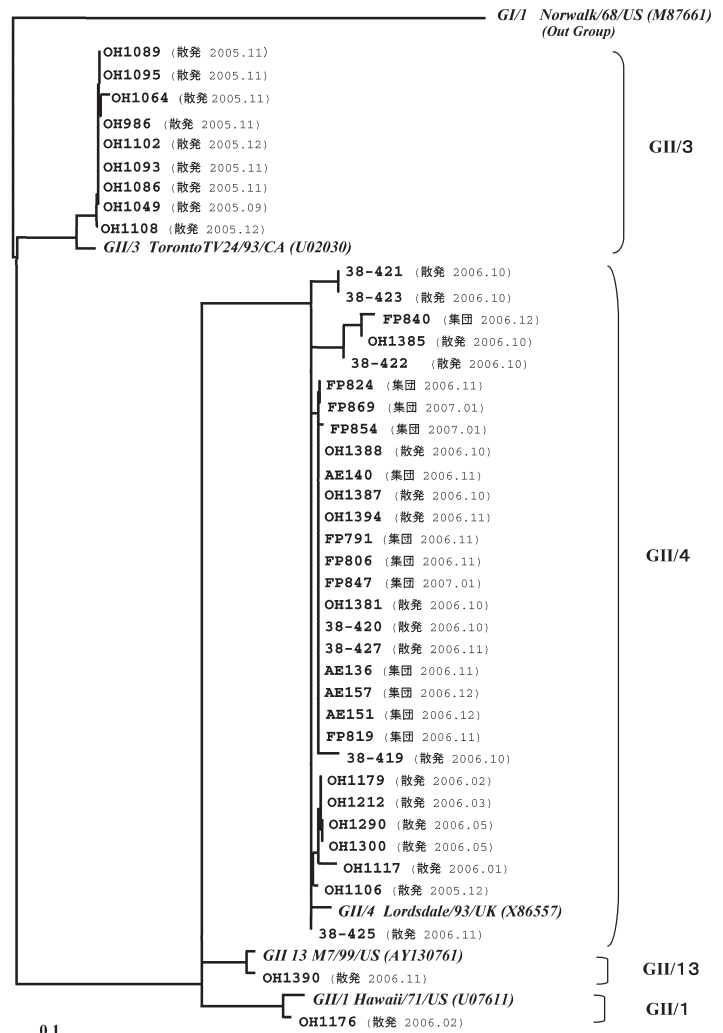


図4 検出NVのcapsid領域の系統樹

Lordsdale株の5136-5375相当部分240bp N/J法、Bootstrap 100回 斜字はReference株

表4 2006-2007年 岡山県における集団胃腸炎事例からのNV検出状況

事例	発生年月	検査数	NV 陽性数	Genotype (capsid 領域)	polymerase 領域PCR		polymerase 領域のタイプ
					NV81系	Yuri系	
A	2006.05	22	8	G II / NT	6	8	-
B	2006.11	7	7	G II / 4	7	6	NT
C	2006.11	6	5	G II / 4	5	5	NT
D	2006.11	4	4	G II / 4	4	4	NT
E	2006.11	14	13	G II / 4	11	10	NT
F	2006.11	3	3	G II / 4	3	3	NT
G	2006.11	20	13	G II / 4	12	10	NT
H	2006.12	5	5	G II / NT	4	4	-
I	2006.12	4	4	G II / NT	4	4	-
J	2006.12	6	6	G II / 4	6	6	NV GII/4 2006b
K	2006.12	4	2	G II / 4	2	2	NT
L	2006.12	7	6	G II / 4	5	5	NT
M	2006.12	4	4	G II / 4	4	4	NT
N	2007.01	1	0	-	-	-	-
O	2007.01	13	11	G II / 4	10	10	NT
P	2007.01	6	6	G II / 4	6	5	NT
Q	2007.03	2	2	G II / NT	2	2	-

NT：型別未実施



### (3) 散発事例由来および集団事例由来の GII/4 の解析

散発事例由来の GII/4 のうち 13 株について、NV81 または Yuri のプライマーで増幅される polymerase 領域の塩基配列を決定し、系統解析を行った。その結果、NV GII/4 2006b 類似 (2006b タイプ) 7 株、Saitama U1 株 (Acc No. AB039775, polymerase 領域が Lordsdale 株類似の recombinant 株) 類似 (S-U1 タイプ)<sup>21)</sup> 4 株、Lordsdale-2002variant 株<sup>35)</sup> (Acc No. AY587989) 類似 (NV GII/4 2002 タイプ; 以下 2002 タイプ) 1 株、Lordsdale-2004variant 株<sup>35)</sup> 類似 (NV GII/4 2004 タイプ; 以下 2004 タイプ) 1 株であった (図 5)。それぞれの検出時期は、2006b タイプが 2006 年 10, 11 月、S-U1 タイプが 2004 年 5 月、2006 年 2, 3, 5 月、2002 タイプが 2005 年 12 月、2004 タイプが 2006 年 1 月であった (図 3)。すなわち、GII/4 は 3 シーズンともに検出されているが、polymerase 領域による詳細な分類では、2004 年度は S-U1 タイプ、2005 年度は S-U1 タイプに 2002 タイプと 2004 タイプが混合、2006 年度は春季に S-U1 タイプ、秋季以降は 2006b タイプと、流行するウイルスのタイプが経時的に変化していた。

集団事例由来の GII/4 は、capsid 領域の解析と polymerase 領域 PCR (NV81 系, Yuri 系) の増幅パターンからほぼ類似したウイルスと考えられたため、1 株について同様に polymerase 領域の塩基配列を決定し、既知の株と比較したところ 2006b タイプであった。

## 4 考察

### 4.1 ヒト C 群ロタウイルスの免疫学的検出

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、二峰性の発生曲線を持つ傾向が指摘されている<sup>36)</sup> が、2006 年度冬期の感染性胃腸炎患者の発生パターンは、標準的な二峰性の発生パターンとは少し異なり、一峰目で高いピークを示したが、二峰目では明瞭なピークを示さなかった (図 1)。

また、2005 年度のピーク時定点当たり患者数は 10.87 名 (一峰目: 第 49 週) 及び 13.91 名 (二峰目: 第 8 週)

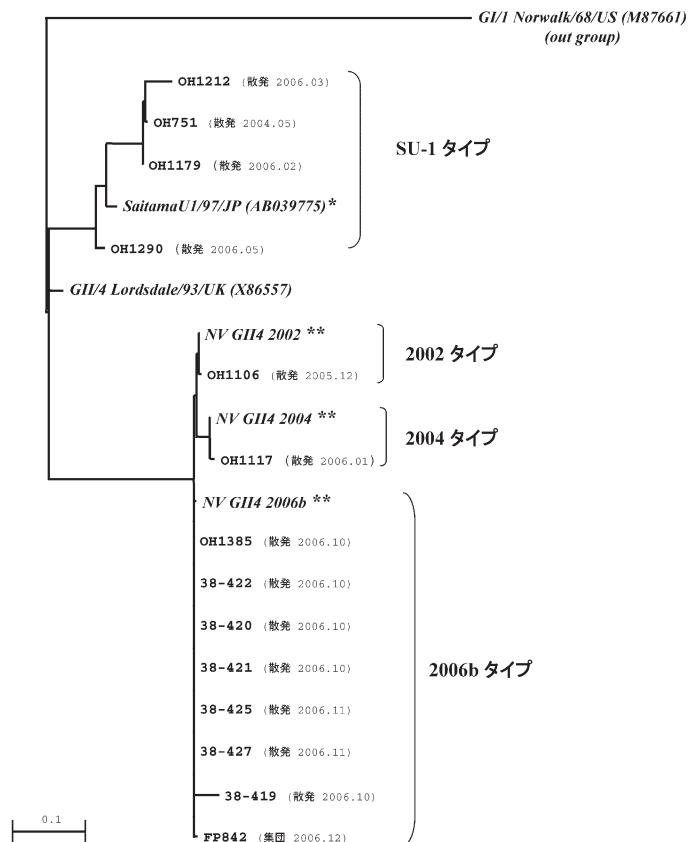


図 5 検出 GII/4 の polymerase 領域の系統樹

Lordsdale 株の 4343-4567 相当部分 225 bp N J 法、Bootstrap 1,000 回  
 斜字は Reference 株 \* : capsid 領域 GII/12, polymerase 領域 GII/4 の recombinant 株  
 \* \* : FBVE Network Quick Typing of NoV sequences Data Base より引用

で、二峰目の方がかなり高いピークを示した<sup>21)</sup>。これに対して 2006 年度では一峰目のみが明瞭なピークを示していた。

このことをウイルス検出状況と比較すると、SRSV は年度を通して検出されたものの、10~12 月に特に多く検出され、ARV は 4, 5 月及び翌年 2, 3 月に検出されていたものの、ARV の検出数は 2005 年度と比較して少なく、患者発生状況とウイルス検出状況が同様の傾向となっていた。

また、10~12 月の SRSV 検出数に比べて、2, 3 月の ARV 検出数が少なかったことも患者発生状況と同様の傾向となっていた。

EM 法でロタウイルス様粒子が観察された検体 49 件のうち 2 件から CRV が検出され、46 件の検体からは 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が 1 件あったものの、この検体については電子顕微鏡観察で夾雑物がロタウイルス様粒子表面に厚い層を形成していることが確認され、このため、免疫学的検査法で反

応が劣っていたと考えられた。この検体を除けばMAB 13A3との反応性が劣るCRVの出現は認められなかった。免疫学的検査法のためのウイルス抽出法に改良の余地があると思われるが、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。

#### 4.2 ブタ盲腸便由来C群ロタウイルス株のVP6遺伝子解析

今回、これまでの研究においてVP7遺伝子の配列が既に明らかにされている26株について、そのVP6遺伝子の検出・同定を試みたところ、23株について塩基配列まで決定することができた。23株のVP6は、遺伝子相同性が80.6%~100%、アミノ酸相同性が85.7%~100%であり、これまでに明らかにしたVP7相同性（遺伝子レベルで70.8%~100%、アミノ酸レベルで68.5%~100%）に比べて保存性は高かった。しかしながら、これまでに報告されている同一動物種由来株間のVP6相同性（ヒト由来株間で96.7%以上、ウシ由来株間で98.1%以上）に比較すると値は低く、VP6に比較的多様性が認められた。さらに、アミノ酸配列に基づく系統解析の結果、23株のVP6は少なくとも4つのクラスターに分類されることがわかった。これまで、ブタ由来株のVP6遺伝子はCowden株についてのみ調べられているだけであったため、ブタ由来CRVのVP6がクラスターに分類されるという今回の知見は、世界で初めてのことである。

VP6及びVP7クラスターがともに同定された23株について、同一株における両者の関係をみたところ、VP7クラスターがAもしくはCの株については、そのほとんどのVP6がクラスターがII aまたはII bに属し、相互のVP6に類似性が認められた。ところが、VP7クラスターがBの株については、そのVP6クラスターがI、II b、IIIに属するなど、極めて多様性に富んでいた。ロタウイルスの場合、一般にウイルス粒子の内側に存在するVP6に比べて、外側に存在するVP7の方がより多様性に富むことが知られている<sup>22)</sup>。したがって、VP6が様々に異なる株が、ほぼ類似したVP7を保有していたという今回の結果は、VP6のみに変異が蓄積したためと考えるよりはむしろ、VP6の異なる株がリアソートメントにより、特定のVP7遺伝子を共有したためではないかと思われた。

一方、複数シーズンにわたりCRVが検出されていた3農場のうち、2農場については1シーズンの間にVP7遺伝子に大きな変化が生じているにも関わらず、VP6遺伝

子は保存されたままであるというケースが認められた。特にF農場については、2002/03シーズンから2003/04シーズンにかけて、優占株が〔VP6(II a) : VP7(C)〕から〔VP6(II a) : VP7(A)〕へと、VP7のみにクラスターの変化が認められた。さらに、これらの株のVP6遺伝子相同性が97.6%以上であるのに対し、VP7遺伝子の相同性は約74%と、両者の相同性に大きな違いが認められた。したがって、このようにごく短期間にVP7遺伝子のみに変化が認められたのは、同一株のVP7遺伝子に大幅な変異が生じたためというよりは、リアソートメントによりVP7のみが別のものに置き換えられたためである可能性が高いと思われた。このように、CRVについてもARVと同様に、ある程度の頻度でリアソートメントが起き、それにより新たな流行株が出現している可能性が強く示唆された。

これまで3シーズンの調査において<sup>19)~21)</sup>、ブタ盲腸便からヒトCRVに極めて類似した株は検出されなかったことから、ヒトCRVがブタに感染する可能性は極めて低いかもしれない。しかしながらTeodoroffら<sup>37)</sup>は、ブタにおけるARV侵淫調査において、ヒトARVに極めて類似した遺伝子を持つ株を検出し、これらが種の壁を越えてヒトからブタへと伝播した結果である可能性が高いと結論づけている。したがって、CRVにおいても同様の現象が生じた場合には、リアソートメントにより新たな性状を持つヒトCRVが出現する危険性がある。このような危険性を少しでも低減するためには、豚舎等の清浄化によりブタCRVの汚染率を低下させることが有効ではないかと思われる。

#### 4.3 小型球形ウイルスの遺伝子学的検出—ノロウイルス診断法の確立と分子疫学

2004年度~2006年度の散発事例におけるNVの遺伝子型の推移をみると、2005/2006シーズンはGII/3とGII/4、2006/2007シーズンはGII/4単独というように、秋から冬の各シーズンごとに流行している遺伝子型がすこしずつ変化していることが明らかになった。また、最も多く検出されたGII/4では、polymerase領域の解析に基づくさらに詳細なタイピングの結果、GII/4の型内でもSU-1タイプ→SU-1タイプ+2002タイプ+2004タイプ→2006bタイプというように、経時的にウイルスのタイプが変化していることが明らかになった。GII/4は、2004年度<sup>38)</sup>後半と2006年度後半に集団事例の多発を引き起こしてい

るが、2004年度がSU-1タイプ、2002タイプ、2004タイプの3タイプの混合流行であったのに対し、2006年度の集団事例は2006年春季からヨーロッパでの広範な流行が報告されている<sup>34), 38), 39)</sup>新しいタイプのGII/4 2006b単独による流行と考えられた。すなわち、散发事例由来株のタイピング結果から明らかのように、2006年5月までは主にS-U1タイプが検出されていたものが、2006年6月以降10月までの間のいずれかの時点でGII/4 2006bタイプが県内に侵入し、急速に広がって散发事例や集団事例の多発を招いたものと推察された。

GII/4は長期にわたって流行している遺伝子型であるが、今回の結果より、長期流行を可能にしている要因の一つに、こうしたウイルスの遺伝子型内での変化が関わっている可能性が示唆された。したがってGII/4を含めて、NVの詳細な感染経路解明や正確な流行状況の解析には、capsid領域の解析による遺伝子型のみならず capsid領域・polymerase領域の解析をあわせた遺伝子型内のさらに詳細な分類が有効であると考えられた。

NVは、培養系が見いだされていないために、生体への感染、免疫機構との関係等はほとんど解明されていない。GII/4に見られるような限定的な領域の塩基配列の変化が直ちにウイルスの抗原性の変化に直結するかは不明であるが、ここ数年、recombinant株<sup>40), 41)</sup>や「同一遺伝子型内変異株」<sup>21)</sup>による広範な流行が相次いで報告されている。したがって、現実に流行を引き起こし、かつ、部分的変異が確認されている株については、遺伝子全長にわたる解析を実施し過去の株と比較することで、抗原性の変化に関連するサイトを明らかにする必要があると考える。

## 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, 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 agglu-

- ination tests using monoclonal antibodies, *J.Clin.Microbiol.*, 31 (5), 1308-1311, 1993
- 14) Saif, L. J., Nongroup A rotaviruses : Viral diarrhea of man and animals, p.73-95, CRC Press, Florida, USA, 1990
  - 15) Otto, P., Schulze, P., Herbst, W. : Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrhetic dogs in Germany, *Arch. Virol.*, 144, 2467-2473, 1999
  - 16) 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
  - 17) 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
  - 18) 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), 岡山県環境七報, 27, 45-61, 2003
  - 19) 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), 岡山県環境七報, 28, 79-92, 2004
  - 20) 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16年度), 岡山県環境七報, 29, 89-102, 2005
  - 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17年度), 岡山県環境七報, 30, 101-114, 2006
  - 22) 小林宣道, 浦沢正三 : ロタウイルス, ウイルス, 50, 157-172, 2000
  - 23) Jiang,X.,Wang,M.,Wang,K.and Estes,M.K.:Sequence and genomic organization of Norwalk virus, *Virology*, 195, 51-61, 1993
  - 24) 片山和彦 : 胃腸炎関連カリシウイルス (ノロウイルス, サポウイルス) 総論, 病原微生物検出情報 (IASR), 24, 312-314, 2003
  - 25) Hamano,M., Kuzuya,M., Fujii,R., Ogura, H.,Yamada, M.:Epidemiology of acute gastroenteritis outbreaks caused by Noroviruses in Okayama, Japan, *J. Med. Virol.*, 282-289, 2005
  - 26) Sugieda,M., Nakajima,K., Nakajima,S.:Outbreak of Norwalk-like virus associated gastroenteritis traced to shellfish, Coexistence of two ge-notypes in one specimen, *Epidemiol.Infect.*, 116, 339-346, 1996
  - 27) 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.
  - 28) 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
  - 29) 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
  - 30) 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
  - 31) 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
  - 32) 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
  - 33) 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
  - 34) Koopmans,M., Harris,J., Verhoef,L., Depoortere,E., Takkinen,J., Coulombier,D.:European investigation into recent norovirus outbreaks on cruise ships:update *Eurosurveillance Weekly*, 11, 7, E060706.5, 2006
  - 35) Kroneman,A., Vennema,H., Duijnhoven,Y.V., Duizer,E., Koopmans,M.: High number of Norovirus

- outbreaks associated with a GGII.4 variant in the Netherlands and elsewhere: Dose this herald a worldwide increase? *Eurosurveillance Weekly*, 8, 52, 51-52, 2004
- 36) 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
- 37) Teodoroff, T. A., Tsunemitsu, H., Okamoto, K., Katsuda, K., Kohmoto, M., Kawashima, K., Nakagomi, T., Nakagomi, O.: Predominance of porcine rotavirus G9 in Japanese piglets with diarrhea: close relationship of their VP7 genes with those of recent human G9 strains, *J. Clin. Microbiol.*, 43, 1377-1384, 2005
- 38) Kroneman, A., Vennema, H., Harris, J., Reuter, G., Bonsdorff, C-H von, Hedlund, K-O., Vainio, K., Jackson, V., Pothier, P., Koch, J., Schreier, E., Bottiger, B., Koopmans, M.: Increase in norovirus activity reported in Europe *Eurosurveillance Weekly*, 11, 12, 2006
- 39) Krisztalovics, K., Reuter, G., Szucs, G., Csohan, A., Borocz, K.: Increase in norovirus circulation in Hungary in October-November *Eurosurveillance Weekly*, 11, 12, 2006
- 40) Reuter, G., Krisztalovics, K., Vennema, H., Koopmans, M., Szucs, G.: Evidence of the etiological predominance of Norovirus in gastroenteritis outbreaks-Emerging new-variant and recombinant Noroviruses in Hungary, *J. Med. Virol.*, 76, 598-607, 2005
- 41) Bull, R.A., Tu, E.T.V., McIver, C.J., Rawlinson, W.D., White, P.A.: Emergence of a new Norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis, *J. Clin. Microbiol.*, 327-333, 2006