

【調査研究】

## 胃腸炎ウイルスの研究（平成13年度）

濱野雅子，藤井理津志，葛谷光隆（微生物科）

### 要 旨

冬季に多発する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（CHRV）及び小型球形ウイルス（SRSV）の検査法について次のような研究を行っている。：CHRVを検出する方法として開発した酵素抗体法又は逆受身赤血球凝集法及び電子顕微鏡法（EM法）を用いて、2001年度に採取した感染性胃腸炎患者（散発）糞便146件及び集団発生患者（10事例）糞便64件からCHRVの検出を行ったところ、EM法でロタウイルス様粒子が観察された検体全てからAHRVのみが検出され、検査法に用いた用いたモノクローナル抗体13A3との反応性が低いCHRVの出現は認められなかった。：我が国で検出されたCHRV株間の遺伝的関連性について明らかにするため、1984～2000年に全国各地で分離された集団胃腸炎由来8株、および散発性胃腸炎由来13株について、外殻スパイク蛋白（VP8）をコードする遺伝子の比較・解析を行った。その結果、21株のVP8相同性は93.1～100%であり、由来の異なる株でも遺伝的に密接に関連していることが明らかになった。また、アミノ酸配列の相同性解析でも同様の傾向が認められた。さらに近隣結合法による系統解析の結果、21株は遺伝子およびアミノ酸レベルで大きく3つのクラスターに分類しうることがわかった。この結果と既報のRNA型別およびVP7解析結果とを組み合わせると分類を行ったところ、分離株は4グループに分類可能であった。：SRSVのうちNorwalk-like-virus（NLV）について、集団・散発胃腸炎患者等の糞便と県内産カキを用いて、逆転写PCR法におけるプライマー系（ポリメラーゼ領域の国内検出株由来共通プライマー系と従来のプライマー系）および増幅領域（ポリメラーゼ領域とカプシド領域）による比較を行ったところ、1）使用プライマー系によるNLV検出率に差は見られなかった。2）増幅領域による検出率は、糞便ではカプシド領域PCR＞ポリメラーゼ領域PCR、カキではポリメラーゼ領域PCR＞カプシド領域PCRであった。

【キーワード：ヒト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，逆転写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（AHRV）、ヒトC群ロタウイルス（CHRV）、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登載された。これらのうちAHRV、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、CHRV及び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CHRV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. CHRV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、AHRV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）、逆受身赤血球凝集反応法（RPHA法）、ラテックス凝集反応法（Lx-Ag法）等の市販試薬により検査が行われている。一方、CHRV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CHRV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。CHRVには簡便な検査法がなく、流行実態については不明な点が多く、防疫対策上の障害となっていたが、岡山県環境保健センターは多数検体を迅速、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>。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2000年度と同様に2001年4月～2002年3月に散発した感染性胃腸炎患者の糞便について、AHRV及びCHRVの検査と電子顕微鏡によるウイルス検査を行った。また、食中毒を疑われた集団発生事例についても同様に検索を行った。

#### 1-2. CHRV株の外殻スパイク蛋白(VP8)遺伝子の解析

AHRVの外殻スパイク蛋白(VP4)は、細胞表面のレセプターとの結合および細胞への進入に重要な役割を担っており、さらにウイルスの病原性や組織向性にも関与していると考えられている<sup>14)</sup>。またVP4が、トリプシン等の蛋白質分解酵素によりVP5とVP8に解裂することで、ウイルスの感染性が増強する<sup>14)</sup>。VP4上にはウイルス中和抗原の存在が確認されており、交差中和試験または遺伝子解析等により、これまでに11種類のVP4血清型(P血清型)が同定されている<sup>15)</sup>。異なるP血清型の株をアミノ酸レベルで比較すると、VP8部分に相当するアミノ酸No.71～203が最も変化に富んでいることから、この部分に血清型特異的な中和エピトープが存在すると考えられている。一方、CHRVのVP4に関しては数株についてその塩基配列が調べられており、AHRVと同様の構造を持つことが明らかにされている<sup>16)</sup>。しかしながら、株間で塩基配列等にどのような違いが認められるのかについては、ほとんど調べられていない。

一般にAHRVについては、外殻糖蛋白(VP7)の抗原性(G血清型)とP血清型との組み合わせにより、詳細な分類が行われている<sup>15)</sup>。我々は、CHRVのVP7遺伝子およびアミノ酸配列の系統解析結果から、過去17年間に我が国で分離されたCHRV株が遺伝子レベルで3つの、アミノ酸レベルで4つのクラスターに分類しうることを明らかにした。そこで今回は、これらの株についてP血清型と関連性が深いVP8部分の塩基配列を比較するとともに、VP7およびVP8遺伝子に基づくCHRVの詳細な分類により、我が国における本ウイルスの流行実態を明らかにすることを試みた。

#### 1-3. SRSVの遺伝子学的検出

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の検出は電子顕微鏡検索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-like-virus(以下NLV)の一部の株の遺伝子配列が解明され<sup>17)</sup>、これ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、多くのNLV株について遺伝子情報が蓄積されてきた。この結果、NLVの遺伝子は多様な配列をもち、大きく2つの遺伝子群(Genogroup : G<sub>1</sub>, Genogroup : G<sub>2</sub>)にわかれ、さらに少なくともG<sub>1</sub>は5、G<sub>2</sub>は7の遺伝子型に分かれる<sup>18)</sup>こと、同一検体中に複数の遺伝子型のNLVが存在する場合があること<sup>19)</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NLV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NLVの検査法が求められている。1997年食品衛生法の一部改正に伴ってNLV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>20),21),22)</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に課題があり、改良の必要な点が多々ある。精度の高いNLVの検査法確立のために、今年度はRT-PCR法による検出における使用プライマーおよび増幅領域の違いによる検出率の比較を行った。

## 2. 材料と方法

### 2-1. CHRVの免疫学的検出

#### (1) 対象

2001年4月～2002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99名及び47名、合計146名から採取した糞便を使用した。

また、平成13年度内に発生した集団感染性胃腸炎10事例から採取した糞便64検体を使用した。

#### (2) 方法

ウイルスの電子顕微鏡による検索は平成12年度と同様にネガティブ染色法で行った<sup>23)</sup>。

AHRV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。

CHRVの検出は当センターで開発したCHRV検出用ELISA法又はRPHA法で2000年度と同様に行った<sup>23)</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。

SRSVのうち、NLVの検出には、集団発生事例の一部

の61検体でデンカ生研併製のNLV検出用ELISA法キットを電子顕微鏡法（EM法）と併用した。

## 2-2. CHR V株の外殻スパイク蛋白(VP8)遺伝子の解析

### (1) ウイルス株

1984～2000年の17年間に岡山県をはじめ、愛媛県、福井県、大阪府、千葉県、富山県、北海道などで分離された集団胃腸炎（集団）由来8株、および散发性胃腸炎（散发）由来13株の計21株のCHR Vを本研究に用いた（表1）。なお、分離株の電気泳動におけるRNA分節パターン（RNA型）は、既報の方法<sup>24)</sup>に準じて決定されたものである。

表1 供試ウイルス株の由来

検体No.	分離年月日	年齢	分離地	RNA型	由来
E503	1984/4/25	8	愛媛県	I	散发
E352	1985/2/27	12	〃	II	〃
E489	1986/4/ 1	4	〃	II	〃
OK118	1988/2/ 6	6	岡山県	I	〃
OK450	1989/2/ 8	1	〃	II	〃
OK459	1989/2/13	1	〃	I	〃
OK595	1989/8/12	1	〃	II	〃
I-57	1990/6/13	6	〃	II	〃
G-7	1992/12/3	4	〃	I	〃
K9304	1993/4/22	4	岡山県	III	〃
KC48	1995/5/21	9	〃	III	〃
KW290	1996/5/89	4	〃	I	〃
KW408	1998/3/19	4	〃	I	〃
FI-1	1988/4/13	11	福井県	I	集団(2)*
S-2	1991/3/ 3	21	大阪府	I	〃 (4)
C293	1993/4/15	UN	千葉県	III	〃 (5)
C295	1996/4/-	UN	〃	III	〃 (6)
TO-6	1997/5/17	6	富山県	I	〃 (7)
TA-2	1998/5/19	UN	北海道	I	〃 (8)
OT99	1999/5/24	11	岡山県	I	〃 (10)
KU166	2000/5/31	11	〃	I	〃 (11)

UN: 不明

\*括弧内は文献番号を示す。

### (2) VP8遺伝子配列決定法

まず最初に、既報の方法<sup>25)</sup>に準じてCHR VのVP4遺伝子を増幅するRT-PCR法を行った。すなわち、供試ウイルス株よりRNAIDキット（BIO 101）を用いて抽出・精製したウイルスRNAに、CHR VのVP4遺伝子の両端に相補的なプライマー（5'-GGC TTA AAA AGT AGA GAT CG-3' および5'-AGC CAC ATT ATT GAG ATC TC-3'）を添加した後、逆転写反応により相補的DNA（cDNA）を合成した。スピカラム（Suprec-02, 宝酒造）によりcDNAを精製・回収した後、PCR反応（熱変性：94 1分，アニーリング：48 2分，伸長反応：72 3分，30サイクル，最終伸長反応：72 7分）を行いVP4遺伝子全長を増幅した。得られた増幅産物をアガロース泳動後、

目的部分を切り出すことにより精製した。精製産物についてVP8部分（約715塩基対）をカバーする2種類のプライマー（5'-GGC TTA AAA AGT AGA GAT CG-3' および5'-TAA CTG TTG GCT GTT GTA AA-3'）を使用し、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）により塩基配列を決定した。

### (3) VP7遺伝子配列決定法および系統解析法

供試したCHR VのうちOK595, S-2およびKW290の3株については、既報の方法<sup>26)</sup>に従い今回新たにVP7遺伝子配列の決定および系統解析を実施し、クラスター分類を行った。

### (4) 塩基配列データの解析

塩基配列の相同性値の算出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、ブタ由来Cowden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. SRSVの遺伝子学的検出

### (1) 材料

ポリメラーゼ領域PCR（P-PCR）における使用プライマー系の比較を行うため、2000年度に県内で発生した集団胃腸炎事例1事例の糞便14件を使用した。

増幅領域の違いによる比較を行うため、1996～1999年に35'・36系またはYuri系P-PCR（nested）でNLVが検出された糞便41件（集発18事例37件，散发4件，うちYuri系は集発10事例27件，散发2件のみ実施）および2001年度に県内で発生した集団胃腸炎事例の糞便27件，県内産カキ50件を使用した。

### (2) RT-PCR及びハイブリダイゼーション

糞便0.1～0.3gまたはカキ5個分の中腸腺を滅菌PBS（・）で10%乳剤とし、HCFC処理して40,000rpm2時間超遠心後の沈澱物を100 μlに浮遊させたものを前処理材料とし、セパジーンRVR（三光純薬社）またはQIA Viral RNA Mini Kit（Qiagen社）によりRNAを抽出した。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>20)</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>21)</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>22)</sup> に準拠して行った。ただし, Yuri系プライマーによるRT-PCR条件は斉藤らの方法<sup>27)</sup> , によった。使用したプライマーおよびプローブを表2に, PCRの増幅位置を図1に示す。

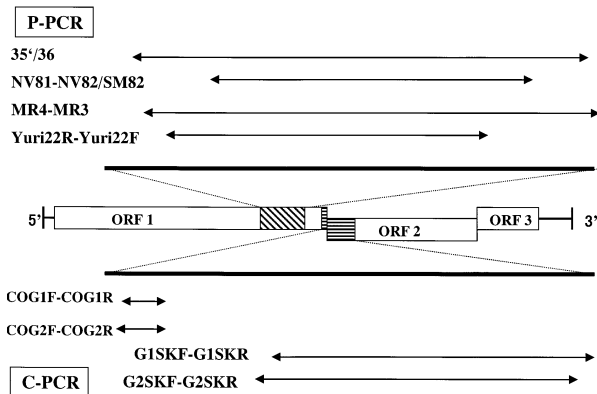


図1 P-PCR・C-PCRの増幅位置

### (3) P-PCRにおける使用プライマー系の比較

従来から使用している35'-36系(1st PCR: NV81-NV82/SM82)と国内検出株の遺伝子情報を元に設計された共通プライマーのP1-P2系<sup>28)</sup> およびP1-P3系<sup>28)</sup> の3系統で1st PCRを行い, 目的サイズあるいはその近傍の

バンドが認められた検体をPCR陽性とした。

### (4) P-PCRにおける増幅領域の違いによる比較

増幅領域の違いによる比較を次のように行った。はじめに35'-36系またはYuri系プライマーによるP-PCR(nested)でNLVが検出された糞便41件についてカプシド領域を増幅するGFRプライマー系(G1F1/G2F1-G1R1/G2R1)によるRT-PCR(C-PCR, 1st)<sup>29)</sup>を実施した。ついで2001年度に県内で発生した集団胃腸炎事例の糞便27件, 県内産カキ50件について, 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)増幅部位は前述のGFR系C-PCRとほぼ同じ)の2系統のC-PCR<sup>22)</sup>(糞便は1st, カキはsemi-nested PCR), 35'-36系およびYuri系P-PCR(糞便はinner Primerによる1st, カキはnested PCR)を実施し, PCR陽性検体について確認検査を行った。またプライマー系の評価指標として 検出率(%) = 確認検査陽性検体数 ÷ 検体数 × 100, 確認率(%) = 確認検査陽性検体数 ÷ PCR陽性検体数 × 100を算出した。

表2 使用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	SR47d	ATGTCAGGGGACAGGTTTGTATGTC	4817-4836
		36	CTTGTGGTTTGAGGCCATA	4487-4506		SR61d	GGGGCCTAGTCCTGT	4817-4836
		NV81	ACAATCTCATCACCATA	4865-4884		SR63d	ACATCAGGAGAGTGCCCACT	4817-4836
		NV82	TCATTTGATGCAGATTA	4555-4572	330bp	SR65d	ACATCAGGTGATAAGCCAGT	4817-4836
	SM82	CCACTATGATGCAGATTA	4555-4572		SR67d	ACATCTGGTGAGAGACCAGA	4817-4836	
		SR69d	ACATCGGTGATAGGCTGT					
Yuri	MR4	AGTGGGTTTGAGGCCGTA	4937-4954	470bp				
	MR3	CCGTGAGAGTGGGTATGAA	4485-4503					
	Yuri22R	CATCATCCCCGAGAAAGAG	4585-4604	373bp				
Yuri22F	ATGAATGAGGATGGACCCAT	4232-4253						
P1-P2 P1-P3	P2	ACACAGAGTGAGSARCCAGTG	4781-4801	237bp				
	P3	GTRSTCACAATYTCATCATC	4871-4890	326bp				
	P1	GCTGATTACTCTSGSTGGGA	4565-4584					
カプシド	COG	COG1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	5354-5375	85bp	RING1	AGATYGGCATCYCCTGTCCA	5329-5348
		COG1F	CGYTGGATGCGNNTTYCATGA	5291-5310				
		COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	5080-5100	98bp	RING2	TGGGACGGCGATCGCAATCT	5048-5067
	COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	5003-5028					
	GSK	G1SKR	CCAACCCARCCATTRTACA	5653-5671	330bp	ISG1-1	CCAACAACATGGATGGCACCAGTG	5382-5406
		G1SKF	CTGCCCGAATTYGTAAATGA	5342-5365		ISG1-2	CAGTTGGTACCGGAGGTTAATGCTT	5382-5405
						ISG1-3	CCTCAAAGCGCTGATGGCGCAAGC	5415-5439
						ISG1-4	GCTACACCAAGCGCAGATGGCGCCA	5379-5403
	G2SKR G2SKF	G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	5367-5389	343bp	ISG2-1	ATAATTGACCCTGGATTAGAAA	5223-5245
		G2SKF	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	5047-5065		ISG2-2	ATAATTGATCCCTGGATTATGAATA	5223-5247
						ISG2-3	CGCCGCTCCATCTAATGATGGTGCA	5105-5129
	GFR	G1R1	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	5649-5671	329bp			
G1F1		CGYTGGATGCGNNTTYCATGA	5343-5362					
G2R1		TCGACGCCATCTTCATTCACA	5364-5382	335bp				
G2F1		CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	5048-5067					

\* GFRは文献29、それ以外は文献22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。  
 \*\*\* ISG1-1 ~ 4, ISG2-1 ~ 3 は石古博昭他の作成になるプローブ

### 3. 結果

#### 3-1. CHR.V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、2001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2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50週には2001年度で最多の10.15名に達した。第1週(1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8週(2月)には定点当たり患者数は9.39名に達した。

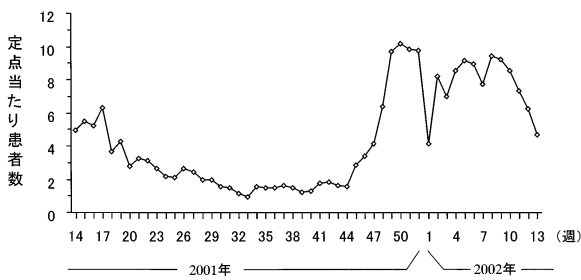


図2 感染性胃腸炎の発生状況

##### (2) 散発患者からのウイルス検出状況

表3に示すとおり、合計146件の散発患者糞便よりAHRV 45件(30.8%), ADV 6件(4.1%), SRSV 18件(12.3%), 合計69件(47.3%)のウイルスが検出されたが、CHR.Vは検出されなかった。また、電子顕微鏡で口ウイルス様粒子が観察された検体からは、いずれもELISA法でAHRVが検出された。

月別ウイルス検出状況は表3に示すとおり、AHRVは

2001年4月、5月、2002年2月、3月に多く検出され、流行が集中していた。SRSVは2001年10月以降に多く検出された。

##### (3) 集団発生患者からのウイルス検出状況

感染性胃腸炎集団発生の10事例から、患者64名について糞便を採取し、食中毒検査及びウイルス検査を実施した。食中毒検査では原因と考えられる食中毒菌が検出されなかったため、EM法による検索を行ったところ、64検体中48件(75.0%)から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。また、NLV検出用ELISA法では検査した61検体中28件(45.9%)が陽性、8件(13.1%)が判定保留となった。

#### 3-2. CHR.V株の外殻スパイク蛋白(VP8)遺伝子の解析

##### (1) VP8遺伝子およびアミノ酸配列相同性解析

VP4遺伝子を標的としたRT-PCR法により、21株すべてで約2.2K bpの遺伝子が増幅された。得られた増幅産物を精製後、VP8部分の塩基配列を決定したところ、いずれも715塩基対から成り、既知のCHR.V株<sup>16)</sup>と95.1~98%の相同性であったことから、VP8遺伝子であることが確認された。また、オープンリーディングフレーム解析によりVP8は231個のアミノ酸から構成されているものと考えられた。

供試21株の由来別VP8遺伝子相同性値を表4に示した。分離株の遺伝子相同性は93.1~100%と比較的高い値であった。株の由来別にみると、同一由来の株どうしの相同性値のみが特に高いというわけではなく、由来の異なる株も遺伝的に密接に関連していることが明らかになった。また、遺伝子配列から予測されたアミノ酸配列の相

表3 採取年月別・採取機関別ウイルス検出状況

採取年月	○病院						N小児科						合計
	AHRV	CHR.V	ADV	SRSV	陰性	小計	AHRV	CHR.V	ADV	SRSV	陰性	小計	
2001年 4月	10	0	0	0	5	15	9	0	0	0	3	12	27
5月	2	0	0	0	7	9	4	0	0	0	3	7	16
6月	—	—	—	—	—	—	0	0	0	0	1	1	1
7月	1	0	0	0	7	8	0	0	1	1	0	2	10
8月	—	—	—	—	—	—	0	0	0	0	1	1	1
9月	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	1	3
10月	0	0	1	6	9	16	0	0	0	0	2	2	18
11月	0	0	0	3	0	3	0	0	1	0	0	1	4
12月	0	0	1	1	5	7	0	0	1	1	0	2	9
2002年 1月	0	0	0	2	9	11	0	0	0	0	3	3	14
2月	5	0	0	2	4	11	3	0	1	1	1	6	17
3月	7	0	0	0	10	17	4	0	0	1	4	9	26
計	25	0	2	14	58	99	20	0	4	4	19	47	146

表4 由来別のVP8遺伝子配列相同性

株名	散发性胃腸炎由来株													集団胃腸炎由来株							
	E352	E489	OK450	OK595	I-57	E503	OK118	OK459	K9304	KC48	G-7	KW290	KW408	FI-1	S-1	C295	C293	TO-6	TA-2	OT99	KU166
E352	100	99.7	99.7	99.9	100	95.1	93.4	94.0	93.6	94.0	95.0	95.1	94.7	94.8	94.1	93.8	93.7	94.8	95.0	94.5	94.8
E489		100	99.4	99.6	99.7	95.1	93.4	94.0	93.6	94.0	95.0	95.1	94.7	94.8	94.1	93.8	93.7	94.8	95.8	94.5	94.8
OK450			100	99.9	99.7	94.8	93.1	93.7	93.3	93.7	94.7	94.8	94.4	94.5	93.8	93.6	93.4	94.5	94.7	94.3	94.5
OK595				100	99.9	95.0	93.3	93.8	93.4	93.8	94.8	95.0	94.5	94.7	94.0	93.7	93.6	94.7	94.8	94.4	94.7
I-57					100	95.1	93.4	94.0	93.6	94.0	95.0	95.1	94.7	94.8	94.1	93.8	93.7	94.8	95.0	94.5	94.8
E503						100	98.0	98.6	98.2	98.6	98.3	98.0	97.6	98.6	97.9	98.5	98.3	97.5	97.6	97.5	98.0
OK118							100	99.4	99.4	99.4	96.4	96.4	95.9	96.6	95.9	99.3	99.0	95.8	95.9	95.8	96.4
OK459								100	99.6	100	96.9	96.9	96.5	97.2	96.5	99.9	99.6	96.4	96.5	96.4	96.9
K9304									100	99.6	96.5	96.5	96.1	96.8	96.1	99.7	99.2	95.9	96.1	95.9	96.8
KC48										100	96.9	96.9	96.5	97.2	96.5	99.9	99.6	96.4	96.5	96.4	96.9
G-7											100	98.0	97.6	99.2	98.2	96.8	96.6	97.6	97.6	97.5	98.0
KW290												100	97.6	98.3	97.6	96.8	96.6	97.5	97.9	97.5	99.4
KW408													100	97.9	97.2	96.4	96.2	99.6	99.7	99.9	97.6
FI-1														100	98.7	97.1	96.9	97.8	97.9	97.8	98.3
S-2															100	96.4	96.2	97.1	97.2	97.3	97.6
C293																100	99.4	96.2	96.4	96.2	97.1
C295																	100	96.1	96.2	96.1	96.6
TO-6																		100	99.3	99.4	97.5
TA-2																			100	99.6	97.6
OT99																				100	97.5
KU166																					100

注) 相同性値98.5%以上を枠で囲み、99%以上を太字で示す。

表5 由来別のVP8アミノ酸配列相同性

株名	散发性胃腸炎由来株													集団胃腸炎由来株									
	E352	E489	OK450	OK595	I-57	E503	OK118	OK459	K9304	KC48	G-7	KW290	KW408	FI-1	S-1	C295	C293	TO-6	TA-2	OT99	KU166		
E352	100	99.6	99.6	100	100	99.1	97.0	97.8	97.0	97.8	98.3	98.3	98.7	98.7	98.7	97.8	97.8	98.7	98.7	98.7	98.7	98.3	
E489		100	99.1	99.6	99.6	98.7	96.5	97.4	96.5	97.4	97.8	97.8	98.3	98.3	98.3	97.4	97.4	98.3	98.3	98.3	98.3	97.8	
OK450			100	99.6	99.6	98.7	96.5	97.4	96.5	97.4	97.8	97.8	98.3	98.3	98.3	97.4	97.4	98.3	98.3	98.3	98.3	97.8	
OK595				100	100	99.1	97.0	97.8	97.0	97.8	98.3	98.3	98.7	98.7	98.7	97.8	97.8	98.7	98.7	98.7	98.7	98.3	
I-57					100	99.1	97.0	97.8	97.0	97.8	98.3	98.3	98.7	98.7	98.7	97.8	97.8	98.7	98.7	98.7	98.7	98.3	
E503						100	97.8	98.7	97.8	98.7	99.1	99.1	99.6	99.6	99.6	98.7	98.7	99.6	99.6	99.6	99.6	99.1	
OK118							100	99.1	99.1	99.1	97.0	97.0	97.4	97.4	97.4	99.1	99.1	97.4	97.4	97.4	97.4	97.0	
OK459								100	99.1	100	97.8	97.8	98.3	98.3	98.3	100	100	98.3	98.3	98.3	97.8	97.8	
K9304									100	99.1	97.0	97.0	97.4	97.4	97.4	99.1	99.1	97.4	97.4	97.4	97.4	97.0	97.0
KC48										100	97.8	97.8	98.3	98.3	98.3	100	100	98.3	98.3	98.3	97.8	97.8	
G-7											100	98.3	98.7	98.7	98.7	97.8	97.8	98.7	98.7	98.7	98.7	98.3	
KW290												100	98.7	98.7	97.8	97.8	98.7	98.7	98.7	98.7	100	100	
KW408													100	99.1	99.1	98.3	98.3	100	100	100	98.7	98.7	
FI-1														100	99.1	98.3	98.3	99.1	99.1	99.1	98.7	98.7	
S-2															100	98.3	98.3	99.1	99.1	99.1	98.7	98.7	
C293																100	100	98.3	98.3	98.3	97.8	97.8	
C295																	100	98.3	98.3	98.3	97.8	97.8	
TO-6																		100	100	100	98.7	98.7	
TA-2																			100	100	100	98.7	
OT99																				100	98.7	98.7	
KU166																					100	100	

注) 相同性値98.5%以上を枠で囲み、99%以上を太字で示す。

同性解析でも同様の傾向が認められた(表5)。

(2) VP8遺伝子およびアミノ酸配列の系統解析

CHRV 21株のVP8遺伝子について、ブタ由来Cowden株を参照株とし近隣結合法により系統解析を実施した(図3)。その結果、21株は大きく3つのクラスターに分類され、各々をVP7遺伝子における分類に準じて、クラスターa, bおよびcと命名した。クラスター内の比較では、分離地域よりも分離時期の近い株が系統的に関連性の強い傾向が認められた。また、集団由来株が特定のクラスターだけに集中するというようなことは確認されなかった。

次にアミノ酸配列に基づき系統解析を行ったところ、遺伝子系統解析の場合と同様のクラスターに分類することがわかった(図4)。ただし、遺伝子レベルでクラスターbに分類されたE503株が、アミノ酸レベルではクラスターcに分類された。

(3) 株の分離年とVP8およびVP7クラスターとの関連性

遺伝子およびアミノ酸系統解析結果から、株の分離年とクラスターが密接に関連していることが示唆されたため、分離年順にみた各株のVP8遺伝子およびアミノ酸クラスター別一覧に、昨年度および今回明らかにしたVP7遺伝子のクラスター分類も付け加えて表6を作成した。

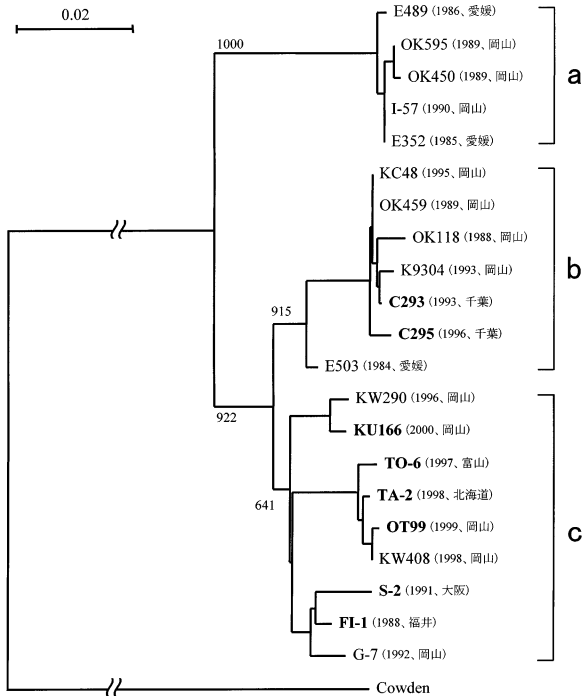


図3 VP8遺伝子の系統解析結果

ブタ由来Cowden株を参照株として近隣結合法により実施した。括弧内は分離年および分離地を示し、系統樹木の数値はブーツストラップ値を示す。なお集団胃腸炎由来株を太字で示した。

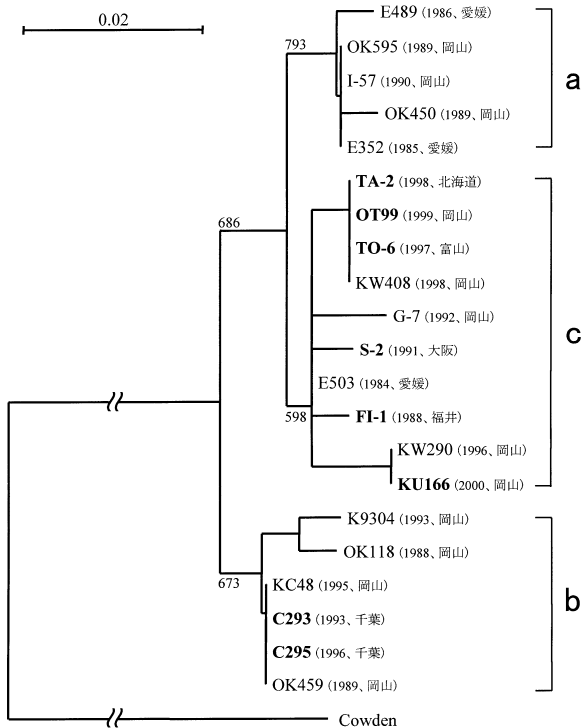


図4 VP8アミノ酸配列の系統解析結果

ブタ由来Cowden株を参照株として近隣結合法により実施した。括弧内は分離年および分離地を示し、系統樹木の数値はブーツストラップ値を示す。なお集団胃腸炎由来株を太字で示した。

表6 分離年とクラスターの関連性

株名	分離地	分離年	RNA型	クラスター分類	
				VP8	VP7
E503	愛媛	1984	I	b*(c**)	B(B)
E352	〃	1985	II	a(a)	A(A)
E489	〃	1986	II	a(a)	A(A)
OK118	岡山	1988	I	b(b)	B(B)
FI-1 <sup>§</sup>	福井	〃	I	c(c)	C(C1)
OK459	岡山	1989	I	b(b)	B(B)
OK450	〃	〃	II	a(a)	A(A)
OK595	〃	〃	II	a(a)	B(B)
I-57	〃	1990	II	a(a)	A(A)
S-2	大阪	1991	I	c(c)	C(C1)
G-7	岡山	1992	I	c(c)	C(C1)
K9304	岡山	1993	III	b(b)	B(B)
C293	千葉	〃	III	b(b)	B(B)
KC48	岡山	1995	III	b(b)	B(B)
C295	千葉	1996	III	b(b)	B(B)
KW290	岡山	〃	I	c(c)	C(C1)
TO-6	富山	1997	I	c(c)	C(C2)
KW408	岡山	1998	I	c(c)	C(C2)
TA-2	北海道	〃	I	c(c)	C(C2)
OT99	岡山	1999	I	c(c)	C(C2)
KU166	〃	2000	I	c(c)	?(C1)

\*遺伝子クラスター分類、\*\*アミノ酸クラスター分類

<sup>§</sup> 集団胃腸炎由来株を太字で示す

その結果、VP8についてもVP7の場合と同様に、分離株の属するクラスターが2~4年ごとに入れ替わり、また株の分離地域に関わらず、ある一定の期間内に分離された株は何れも同一のクラスターに属する傾向が認められた。次に、分離株ごとにVP8とVP7の属するクラスターについてみてみると、ほとんどの株においてVP7クラスターが同じ場合、VP8も同一のクラスターに属していた。

VP8およびVP7の遺伝子クラスター分類に、RNA型を加えて分類を行った場合、分離株は RNA 型；VP7がA；VP8がa， RNA 型；VP7がB；VP8がb， RNA 型；VP7がC；VP8がcの計4種類に分類可能であった。唯一の例外として、1989年に岡山県で分離されたOK595株はRNA 型でVP7クラスターがBであるのに対し、VP8クラスターがaに属していた。

### 3-3. SRSVの遺伝子学的検出

#### (1) P-PCRにおける使用プライマー系の比較

集団胃腸炎事例1事例関連糞便14件について、35<sup>†</sup>36系(1st PCR: NV81-NV82/SM82)、P1-P2系およびP1-P3系の3系統で1st PCRを実施した結果を表7に示す。陽性件数は35<sup>†</sup>36系とP1-P3系で8件(57.1%)、P1-P2系で5件(35.7%)であった。P1-P2系とP1-P3系は35<sup>†</sup>36系より非特異バンドが出やすい傾向があり、目的とするバ

ンドのDNA量が相対的に少なくなって判定が困難であった。

表7 ポリメラーゼ領域PCRにおける使用プライマー系の比較

プライマー系 検体番号	35'-36系	P1-P2系	P1-P3系
FP257	+	-	+
FP258	-	-	-
FP259	+	-	+
FP260	-	-	+
FP261	+	-	-
FP262	-	+	-
FP263	+	+	-
FP265	+	-	+
FP267	+	+	+
FP268	-	-	+
FP269	+	-	-
FP270	-	+	-
FP271	-	+	+
FP272	+	-	+
陽性数 (陽性率)	8/14 (57.1%)	5/14 (35.7%)	8/14 (57.1%)

(2) 増幅領域の違いによる比較

35'-36系またはYuri系P-PCR (nested) でNLVが検出された糞便41件についてGFR系C-PCR (1st) を実施した結果、37件 (90.2%) が陽性となった。

2001年度に県内で発生した集団胃腸炎事例の糞便27件、県内産カキ50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および確認検査を行った。その結果を表8に示す。PCR陽性となったのは、糞便ではCOG系12件 (44.4%)、GSK系15件 (55.6%)、35'-36系8件 (29.6%)、Yuri系7件 (25.9%)、カキでは、COG系10件 (20.0%)、GSK系10件 (20.0%)、35'-36系1件 (2.0%)、Yuri系6件 (12.0%) であった。PCR陽性検体の確認検査で陽性となったのは、糞便ではCOG系10件 (検出率37.0%、確認率83.3%)、GSK系10件 (検出率37.0%、確認率66.7%)、35'-36系5件 (検出率18.5%、確認率62.5%)、Yuri系6件 (検出率25.9%、確認率85.7%)、カキでは、COG系0件 (検出率0.0%、確認率0.0%)、GSK系0件 (検出率0.0%、確認率0.0%)、35'-36系1件 (検出率2.0%、確認率100.0%)、Yuri系4件 (8.0%、確認率66.7%) であった。

表8 カプシド領域PCRとポリメラーゼ領域PCRにおけるプライマー系の検出能力の比較

検体別	プライマー系	カプシド領域PCR		ポリメラーゼ領域PCR	
		COG系	GSK系	35'-36系	Yuri系
糞便	PCR陽性率	44.4	55.6	29.6	25.9
	検出率	37.0	37.0	18.5	22.2
	確認率	83.3	66.7	62.5	85.7
カキ	PCR陽性率	20.0	20.0	2.0	12.0
	検出率	0.0	0.0	2.0	8.0
	確認率	0.0	0.0	100.0	66.7

4. 考察

4-1. CHR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1~2月をピークとして発生するAHRVにより、2峰性の発生曲線を持つ傾向が指摘されている<sup>30)</sup>が、2001年度冬期の感染性胃腸炎患者の発生パターンは12月と2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、10月以降に多く検出されたが、患者発生状況では、11月以降に患者が多く発生しており、10月は検出状況と患者発生状況が一致しなかった。AHRVは4月と翌年の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月以後も検出されたことから、2月、3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の観察された検体からは、ELISA法で全てAHRVが検出され、MAb 13A3との反応性の劣るCHRの出現は認められなかった。当センターで開発したCHR検出用ELISA法及びRPHA法試薬は、CHRの内殻共通抗原に反応するMAbを使用しているため、CHR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CHRの出現に注意を払う必要があると思われる。

また、CHRに対するMAbを作製し、抗原的分類を検討中であるが、今後、抗原的分類が可能になれば、CHRの感染源、感染ルートの究明に役立つと思われる。

さらに、2000年度に採取したウシの糞便からウシC群ロタウイルスを1件検出したので、この株とCHRの関係を検討し、動物由来のC群ロタウイルス株のヒトでの流行に対する関与を検討する必要があると思われる。

4-2. CHR株の外殻スパイク蛋白(VP8)遺伝子の解析

過去17年間に全国各地で分離された集団および散発由来CHR株のVP8遺伝子について比較・解析を行った結果、株間の遺伝子およびアミノ酸相同性は93.1~100%とVP7遺伝子の場合と同様に全体として比較的高度に保存されていることが明らかになった。A群ロタウイルスの場合、同じP血清型に属する株間のVP4アミノ酸配列の相同性が、いずれも89%以上であることから<sup>31)</sup>、今回の供試した21株のCHRは同一のP血清型に属することが強く示唆された。

VP8遺伝子の相同性解析結果から、CHR株がその由



来に関わらず密接に関連しており、さらに遺伝子系統解析でも、集団由来株のみが特に遺伝的関連性が強いということは認められなかった。昨年度のVP7遺伝子の解析結果でも同様の成績が得られていることから、ある特定ウイルスのみが集団胃腸炎を起こすわけではないことが改めて確認された。したがってCHRVIによる集団胃腸炎の対策上、散発性胃腸炎のウイルス検索が不可欠であると考えられる。

VP8遺伝子およびアミノ酸配列の系統解析結果から、21株のCHRVIは大きく3つのクラスターに分類しうることが明らかになった。この結果にVP7の解析結果とRNA型別を組み合わせると分類を行った場合、分離株は4つのグループに分けることができたことから、少なくとも4種類のCHRVIが我が国で流行していたことが明らかになった。また、流行形態としてはこれら4種類のウイルスによる流行が同時進行しつつ、数年ごとに特定グループのウイルスが全国規模で流行を引き起こすものと考えられた。

1989年に検出されたOK595株はVP8がクラスターaに、VP7がクラスターBに分類されるという、他の株では認められない遺伝子の組み合わせであった。1989年にはRNA型；VP7がB；VP8がbのOK459株と、RNA型；VP7がA；VP8がaのOK450株が岡山県内で同時に検出されていたことから、OK595株が2種類の異なるウイルス間での遺伝子再集合により出現したことが強く示唆された。今後さらに詳細な解析が必要であるものの、CHRVIにおいてもA群ロタウイルス<sup>14)</sup>やインフルエンザウイルス<sup>32)</sup>などと同様に、遺伝子再集合によって新たな性状を持つ新型ウイルスが出現する可能性が考えられる。

#### 4-3. SRSVの遺伝子学的検出

国内検出株の遺伝子情報を元に設計された共通プライマー2系統の陽性率は、35'・36系に比べて同等(P1・P3系)あるいはやや低く(P1・P2系)、特に優れているとはいえなかった。1st PCRで判定する場合、非特異バンドの出現は判定を困難にするが、P1・P2系とP1・P3系は混合塩基を多く含むためか35'・36系よりその傾向が強く、判定の容易さでも共通プライマー系が優れているとはいえなかった。感度向上のためにnested・PCRを試みたが、増幅位置が従来使用している35'・36系等のnested・PCR産物の内側にあるため、コンタミネーションの危険性が高く、実際の検査には使用できなかった。

P・PCRでNLV陽性であった検体におけるGFR系C・PCRは、1st PCRのみでP・PCR (nested) にほぼ匹敵する陽性率であり、コンタミネーションの防止と検査の迅速化の観点から有用と考えられた。

集団事例の糞便では、C・PCRがP・PCRに比べて検出率が高く確認率も同等であることから、C・PCRがより有用であると考えられた。C・PCRのCOG系とGSK系を比較すると、GSK系が確認率がやや低かった。これは確認検査に使用するプローブの塩基配列が必ずしも一致しない可能性が考えられ、確認率向上のためにハイブリダイゼーション条件の検討が必要と考えられた。

一方カキではPCR陽性率はC・PCRがP・PCRより高いにも関わらず確認検査はP・PCRのみで陽性となり、結果的にはC・PCRでの検出率が0.0%となって、P・PCRの方が有用であった。これは、糞便の場合と同様GSK系における確認検査条件の問題に加えて、カキのC・PCRがsemi-nested PCRでありnested PCRであるP・PCRより増幅効率が低いおそれがあること、COG系のPCR産物は90bp前後と短い場合ウイルス量の少ないカキ等ではバンドの目視判定が困難であること等によると考えられた。

NLVの検査には時間と手間がかかるにもかかわらず検査ニーズは増加する一方である。精度を保つための検査の迅速化と作業量の軽減のためには、単にPCR陽性率が高いプライマー系ではなく、検出率が高く、かつ確認率が高いプライマー系を選択する必要がある。前述した結果より、現状では糞便検査にはC・PCR (1st)、カキ検査にはP・PCR (nested) を実施するのが現実的であると思われる。ただ、前報<sup>33)</sup>でも述べたとおり1系統ですべてを検出できるプライマー系はないので、C・PCR、P・PCRとも複数のプライマー系を併用するのが望ましいと考える。

#### 謝 辞

貴重なCHRVI株を分与していただきました愛媛県立衛生環境研究所の大瀬戸光明先生、千葉県衛生研究所の篠崎邦子先生、福井県衛生研究所の松本和男先生、富山県衛生研究所の長谷川澄代先生および北海道立衛生研究所の沢田春美先生に深謝いたします。

#### 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. and 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. and 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) 江頭泰子, 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, 濱野雅子, 藤井理津志, 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) R.Fujii, M.Kuzuya, M.Hamano, M.Yamada, and S.Yamazaki: Detection of human group C rotaviruses by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies: J.Clin.Microbiol., 31 (5), 1307 ~ 1311, 1992
  - 13) M.Kuzuya, R.Fujii, M.Hamano, T.Nagabayashi, H.Tsunemitsu, M.Yamada, S.Nii, and T.Mori: 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) 谷口孝喜 : ロタウイルスの遺伝子とタンパク質, ウィルス, 48, 137 ~ 151, 1998
  - 15) 小林宣道, 浦沢正三 : ロタウイルス, ウィルス, 50, 157 ~ 172, 2000
  - 16) Fielding, P. A., Lambden, P. R., Caul, E. O., Clarke, I. N. : Molecular characterization of the outer capsid spike protein (VP4) gene from human group C rotavirus, Virology, 204, 442 ~ 446, 1994
  - 17) Jiang, X., Wang, M., Wang, K. and Estes, M. K. : Sequence and genomic organization of Norwalkvirus, Virology, 195, 51 ~ 61, 1993
  - 18) 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, 臨床とウィルス, 27, 294 ~ 303, 1999
  - 19) 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
  - 20) 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
  - 21) 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
  - 22) 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
  - 23) 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, 1999

- 24) 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
- 25) 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, 199
- 26) 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉 肇 : 集団および散发性胃腸炎由来ヒトC群ロタウイルス株の遺伝子解析, *岡山県環境保健センター年報*, 25, 53 ~ 57, 2001
- 27) 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
- 28) 山崎謙治, 大山徹, 宇田川悦子, 川本尋義 : 1989年 ~ 1998年に日本国内で検出されたNorwalk-like virus (NLVs) の遺伝的特徴および統一プライマーの検討, *感染症誌*, 74, 470 ~ 475, 2000
- 29) Kobayashi, K., Sakae, K., Natori, K., Takeda, N., Miyamura, T., Suzuki, Y. : Serotype-specific antigen ELISA for detection of Chiba virus in stools, *J. Med. Virol.*, 62, 233-238, 2000
- 30) 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
- 31) Gorziglia, M., Larralde, G., Kapikian, A. Z., Chanock, R. M. : Antigenic relationships among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 87, 7155 ~ 7159, 1990
- 32) 豊田哲也, 石浜 明 : オルソミクソウイルス, 「ウイルス学」(畑中正一 編), 230 ~ 241, 朝倉書店, 東京, 1997
- 33) 濱野雅子, 葛谷光隆, 藤井理津志, 小倉肇 : 小型球形ウイルスの遺伝子学的検出, *岡山県環境保健センター年報*, 25, 58 ~ 62, 2001