

胃腸炎ウイルスの研究（平成17年度）

Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama (2005-2006)

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

【調査研究】

胃腸炎ウイルスの研究（平成17年度）

Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama (2005-2006)

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：電子顕微鏡法（EM）法と我々が開発した抗CRVモノクローナル抗体を用いたヒトCRV検出用酵素抗体（ELISA）法又は逆受身血球凝集法を用いて、2005年度採取の患者糞便（散発530件、集発58件）を検査した。EM法でロタウイルス様粒子が検出された検体117件中7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、検査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。②：2004年11月～2005年6月に採取されたブタ盲腸便466検体についてELISA法及び外殻糖蛋白（VP7）遺伝子を標的としたRT-PCR法によりCRVを検索し、6検体（1.3%）が陽性であった。8生産農場中3農場でCRVが検出されたが、うち2農場は3シーズンにわたりCRVが検出されており、特定の農場においてCRVが長期間流行していた。CRV陽性検体のVP7遺伝子産物のうち、塩基配列が決定できた4検体を解析したところ、いずれも940 bpからなり、313個のアミノ酸をコードしていた。過去2シーズンの検出株を加えた相同性解析及び系統解析の結果、今回検出されたCRVのうち1株は昨シーズン最も多く検出されたクラスターに、残り3株はいずれも昨シーズンはまったく検出されなかったクラスターに属していた。これまでの3シーズンの調査結果を総合すると、ブタにおいては、多様なCRVがシーズン毎に優先株を変化させながら継続的に流行していると考えられた。③：2004/2005年冬季に多発したノロウイルス（NV）胃腸炎の詳細な流行像解明のため、検出されたNVのcapsid領域及びpolymerase領域の遺伝子解析を行った。その結果、2004年4月～2005年4月の集団胃腸炎18事例の糞便等98件中15事例の61件から検出されたNVは、capsid領域の解析の結果すべて遺伝子型GII/4（Lordsdale型）であったが、polymerase領域の解析によりSaitama U1型とLordsdale2004変異型の2種類に分かれた。散発胃腸炎患者41件中6件から検出されたGII/4株でもSaitama U1型とLordsdale2004変異型、Lordsdale2002変異型の3種類が存在した。2004/2005シーズンの岡山県では3種類のGII/4株の混在流行が確認され、NVの正確な流行状況把握や感染経路究明のためには、capsid領域のみならずpolymerase領域の解析も重要であると考えられた。

[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]

[Keyword：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、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

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¹⁾、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²⁾、日本各地で集団胃腸炎の報告がなされ^{3)~9)}、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^{10),11)}、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^{12),13)}。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2004年度と同様に2005年4月～2006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 ブタにおけるCRVの流行状況と遺伝子解析

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^{14),15)}、特にヒトでは食中毒様の集団発生を引き起こすため^{2)~11)}、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¹⁶⁾、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¹⁷⁾が行った外殻糖蛋白（VP7）遺伝子の比較結果、及び我々が行った交差中和試験の結果¹⁸⁾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る。

我々は昨年度及び一昨年度の本研究^{19),20)}において、ヒトCRV胃腸炎の感染源究明の一助として、健康な成豚の盲腸便計1,255検体についてCRV検索を行い、1.5～2.3%のブタがCRVを保有すること、冬季～春季の検出率が高いこと、特定農場がCRVの継続的汚染をうけていることなどを明らかにした。さらに遺伝子解析の結果から、多様な遺伝子性状を持つCRVがブタの間で流行しているのみならず、それらが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に流行している可能性も明らかになった。これらの結果から、ブタがいわゆるリザーバーとなって保有する多様なCRV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る。そこで、今年度について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 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、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Calicivirus科に属するNorovirus属のNorovirus（以下NV）の一部の株について遺伝子配列が解明され²¹⁾、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、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、G I，G IIともに10以上の遺伝子型に分かれる²²⁾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^{23)~25)}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、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示された^{26)~29)}。糞便検体に関しては、平成14年度及び15年度の検討^{18),20)}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系プライマーによるC-PCRとpolymerase領域を増幅する35'-36系及び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。しかし、①NVは遺伝子配列がきわめて多様であり、単一のプライマー系であるリアルタイム法は、標的領域の配列が一致しないNVや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る②リアルタイム法で増幅される領域はNVの各遺伝子群に共通な部分であり、感染源究明や流行状況の解析に必要な疫学マーカーとして使用することは出来ない等、行政対応のために改良を要する点が残されている。

2005年（平成17年）度は、2004年度に老人保健施設等で多発したNV集団胃腸炎の感染経路を究明すると同時に県内でのNVの流行状況を明らかにするため、集団胃腸炎事例から検出されたNVの遺伝子解析を行い、同シーズンの散発胃腸炎事例の患者から検出されたNVと比較した。

2 材料と方法

2.1 ヒトCRVの免疫学的検出

(1) 対象

2005年4月～2006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（この小児科）の感染性胃腸炎患者各々195名、310名及び25名、合計530名から糞便を採取した。

また、2005年度内に発生した集団胃腸炎15事例の患者58名から糞便を採取した。

(2) 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、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³⁰⁾。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。

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⁾。

2.2 ブタにおけるC群ロタウイルスの流行状況と遺伝子解析

(1) 対象

2004年11月～2005年6月に岡山市内のと畜場で採取されたブタ盲腸便466検体を本研究に供試した。検体の採取状況及び生産農場内訳は表1に示すとおりである。なお調査農場については、これまでと全く同じである。

(2) 方法

1) 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VP7に設定したプライマーを用いた逆転写PCR（RT-PCR）法を既報方法⁶⁾に準じて行

表1 CRV検索結果

| 生産 農場 | 検体採取年月 | | | | | | | | | 合計（陽性率） |
|----------|----------|------|---------|------|------|------|------|------|------|------------|
| | '04年 11月 | 12月 | '05年 1月 | 2月 | 3月 | 4月 | 5月 | 6月 | | |
| A | — | — | 0/13* | 0/4 | 1/9 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/11 | 1/57(1.8) |
| B | — | — | — | 0/4 | — | — | — | 0/4 | 0/3 | 0/11 |
| C | — | — | 0/19 | — | — | — | — | — | — | 0/19 |
| D | — | — | — | — | — | 0/14 | — | — | — | 0/14 |
| E | — | — | — | 0/16 | — | — | — | 0/10 | 0/11 | 0/37 |
| F | 0/19 | 0/31 | 0/14 | 0/5 | 0/11 | — | — | — | — | 0/80 |
| G | 0/21 | 0/5 | — | — | 1/27 | 0/18 | 1/29 | 0/18 | 0/18 | 2/118(1.7) |
| H | 0/20 | 0/24 | 0/14 | 1/27 | 1/13 | 1/18 | 0/4 | 0/10 | 0/10 | 3/130(2.3) |
| 合計 | 0/60 | 0/60 | 0/60 | 1/56 | 3/60 | 1/60 | 1/57 | 0/53 | 0/53 | 6/466(1.3) |

*陽性数/検体数

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。CRVの分離培養は、既報の方法³⁰⁾に従い、ヒト結腸癌由来CaCo-2細胞を用いて分離培養を行った。

2) 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・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。

3) 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 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

2004年4月～2005年4月に県内で発生した集団胃腸炎18事例(高齢者福祉施設10事例, 社会福祉施設3事例, 食中毒・有症苦情等5事例)の糞便等98件(患者糞便84件, 患者吐物4件, 調理従事者糞便10件)及び2004年12月～2005年3月に県南部の3医療機関で採取され

た散発胃腸炎患者の糞便41件, 計139件を使用した。

(2) 方法

糞便は、既報¹⁸⁾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部監視安全課長通知²⁹⁾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³¹⁾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。P-PCRは、集団胃腸炎事例由来検体の場合のみ実施した。

陽性検体は、集団事例検体については各事例の検体の1部、散発事例検体のすべてについて、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。

3 結果

3.1 ヒトCRV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、2005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49週(12

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 | CRV+SRSV | 陰性 | 小計 | ARV | CRV | ADV | SRSV | ARV+SRSV | 陰性 | 小計 | ARV | CRV | ADV | SRSV | 陰性 | 小計 | |
| 2005年 4月 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 9 | 14 | 0 | 0 | 2 | 0 | 8 | 24 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 37 |
| 5月 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 | 26 | 12 | 0 | 1 | 5 | 0 | 30 | 48 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 76 |
| 6月 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 16 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 23 |
| 7月 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 16 | — | — | — | — | — | — | 20 |
| 8月 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 8 | — | — | — | — | — | — | 16 |
| 9月 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 4 | 5 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 10 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 24 |
| 10月 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 6 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 25 |
| 11月 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 19 | 27 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 29 | 37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 66 |
| 12月 | 0 | 0 | 2 | 5 | 0 | 7 | 14 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 9 | 13 | 0 | 0 | 0 | 3 | 5 | 8 | 35 |
| 2006年 1月 | 3 | 0 | 1 | 2 | 0 | 10 | 16 | 2 | 1 | 0 | 2 | 0 | 17 | 22 | — | — | — | — | — | — | 38 |
| 2月 | 19 | 3 | 1 | 3 | 1 | 21 | 48 | 18 | 0 | 0 | 3 | 1 | 24 | 46 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 96 |
| 3月 | 2 | 1 | 0 | 5 | 0 | 15 | 23 | 29 | 0 | 1 | 4 | 0 | 15 | 49 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 74 |
| 計 | 28 | 4 | 4 | 30 | 1 | 128 | 195 | 77 | 2 | 2 | 35 | 1 | 193 | 310 | 3 | 0 | 0 | 5 | 17 | 25 | 530 |

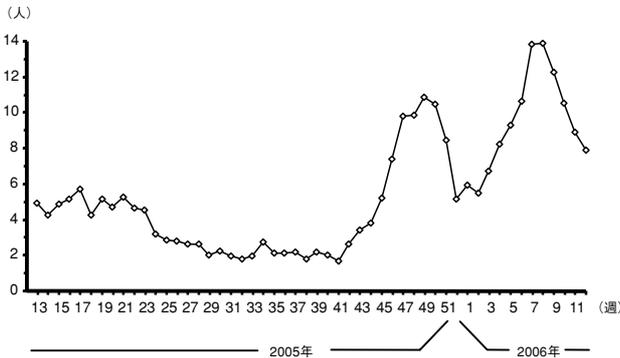


図1 感染性胃腸炎の発生状況

月)にはピークの10.87名に達した。第50週(12月)以後は一旦減少傾向に転じたものの、第3週(1月)には再び上昇に転じ、第8週(2月)には2005年度で最多の13.91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530件の散発患者糞便よりロタウイルス様粒子114件(21.5%)、ADV 6件(1.1%)、SRSV 70件(13.2%)、ロタウイルス様粒子及びSRSV 2件(0.3%)合計192件(36.2%)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116件(重複分を含む)のうち109件からはARV、7件からはCRV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2005年4月、5月、2006年2月、3月に多く検出された。CRVは2005年12月～2006年2月に、ADVは2005年12月～2006年3月に検出された。SRSVは2005年9月～2006

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58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、SRSV29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件からELISA法でARVが検出されたが、CRVは検出されなかった。

3.2 ブタにおけるC群ロタウイルス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466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1検体のみであった。そこで、カットオフ吸光度を0.12まで下げたところ12検体が陽性となり、そのうちRT-PCR法で最終的にCRV陽性と確認されたのは6検体(1.3%)であった(表1及び表3)。RT-PCR法の結果については、吸光度が1.161と比較的高かった1検体(OS1504)は1st PCRで、その他の検体についてははず

表3 CRV陽性検体の検査成績

| 検体番号 | 採取年月日 | 採取地区 | ELISA吸光度 | RT-PCR結果* |
|--------|------------|------|----------|-----------|
| OS1454 | 2005. 2.24 | H | 0.165 | + |
| OS1504 | 2005. 3.24 | H | 1.161 | ++ |
| OS1539 | 2005. 3.24 | G | 0.168 | + |
| OS1543 | 2005. 3.24 | A | 0.195 | + |
| OS1568 | 2005. 4.21 | H | 0.123 | +w |
| OS1616 | 2005. 5.26 | G | 0.181 | + |

***: 1stPCR陽性、+: 2ndPCR陽性、+w: 2ndPCR弱陽性

れも2nd PCRで陽性と判定された(表3)。なお、1st PCR陽性のOS1504をCaCo-2細胞に接種し培養を試みたが、CRVを分離することはできなかった。

検体採取月別及び生産農場別のCRV検出状況を表1に示す。検体採取月別の検出状況では、3月をピークとして、2~5月にかけて陽性例が検出されていた。次に、農場別の検出状況をみると、検査した8農場中3農場でCRVが検出されていた。検出率ではH農場が2.3%と最も高く、次いでA農場(1.8%)、G農場(1.7%)の順であった。これまでの調査結果から、G農場及びH農場については3シーズンにわたりCRVが検出されていた。なお、これまで4~5%と比較的陽性率の高かったF農場からは、今回CRVは検出されなかった。

(2) VP7遺伝子相同性解析

陽性6検体のうち、シーケンス解読に十分なDNA量が得られた5検体について、2nd PCR増幅部分の塩基配列決定した。その結果、4検体で配列を決定することができたが、1検体(OS1543)については複数の配列が混合した結果が得られたため決定できなかった。4検体の塩基鎖長はいずれも980塩基対(bp)であり、予測されるVP7遺伝子全長は1,063 bpであると考えられた。得られた配列情報のうち、プライマー部分を除外した940 bp部分の塩基(nt)配列と、そこから予測されるアミノ酸(aa)配列(313個)について、各種動物由来CRV株と比較を行った(表4)。その結果、OS1454株についてはブタ由来CRVのCowden株及び

WH株に比較的高い相同性(nt相同性89.1~89.3%、aa相同性94.2%)がみられ、またOS1504株はブタCRV HF株とやや高い相同性(nt相同性85.7%、aa相同性89.5%)が認められた。しかしながらG農場由来の2検体については、互いに極めて高い相同性(nt相同性99.6%、aa相同性99.7%)を有するものの、他の株とはいずれも60~70%程度の相同性であった。さらに、これまでの調査で得られたブタ盲腸便由来株との比較では、OS1454株(H農場由来)は同一農場から昨年検出されたOS828株に極めて高い相同性(nt相同性98.7%、aa相同性99%)を有し、またOS1504株(H農場由来)は、やはり一昨年度に同一農場から検出されたOS302株に極めて高い相同性(nt相同性98.4%、aa相同性99%)を有していた。しかしながら、G農場由来の2検体については、これまでに同一農場から検出された株との比較においても、いずれも60~70%程度の相同性であった。

(3) VP7アミノ酸配列アライメント解析

さらに詳細な解析を行うため、今回検出された4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。VP7の構造上の類似性をみるため、糖鎖付加部位について調べたところ、OS1454株については既知のブタCRV株と同様に、付加部位が2カ所のみ(67~69 aa, 225~227 aa)存在していた。それに対しOS1504株、OS1539株及びOS1616株については前記2カ所に加え、ウシCRV株にのみ確認されている3カ所目の付加部位(270~272 aa)が存在していることが

表4 VP7 遺伝子およびアミノ酸配列相同性*

| 株名(由来**) | 種各動物由来株 | | | | | | ブタ盲腸便由来株 | | | |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|----------|----------|--------|-------------|-------------|
| | OK118 | OK450 | Cowden | WH | HF | Shintoku | OS1454 | OS1504 | OS1539 | OS1616 |
| OK118(ヒト) | | 95.5 | 82.6 | 82.0 | 72.8 | 73.6 | 80.4 | 72.0 | 71.6 | 71.4 |
| OK450(ヒト) | 96.5 | | 82.2 | 81.8 | 71.7 | 72.5 | 79.7 | 71.0 | 71.3 | 71.1 |
| Cowden(ブタ) | 86.3 | 86.6 | | 93.7 | 72.7 | 74.3 | 89.1 | 71.4 | 72.1 | 71.8 |
| WH(ブタ) | 83.7 | 84.0 | 96.8 | | 72.0 | 73.7 | 89.3 | 70.5 | 71.0 | 70.7 |
| HF(ブタ) | 68.7 | 68.7 | 68.7 | 68.1 | | 71.9 | 72.0 | 85.7 | 75.3 | 75.0 |
| Shintoku(ウシ) | 72.2 | 72.2 | 72.8 | 73.2 | 71.2 | | 72.3 | 72.7 | 71.3 | 71.4 |
| OS1454(H) | 83.1 | 83.1 | 94.2 | 94.2 | 67.7 | 72.8 | | 71.8 | 71.3 | 71.1 |
| OS1504(H) | 68.7 | 68.4 | 68.4 | 68.4 | 89.5 | 71.6 | 68.4 | | 75.0 | 74.9 |
| OS1539(G) | 70.3 | 69.0 | 68.7 | 67.7 | 77.6 | 69.6 | 66.5 | 77.6 | | 99.6 |
| OS1616(G) | 70.3 | 68.7 | 68.7 | 67.7 | 77.3 | 69.6 | 66.5 | 77.6 | 99.7 | |

*右上が遺伝子相同性値を、左下がアミノ酸相同性値をそれぞれ示す(90%以上を太字で表示)

**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

さらに、これまでの調査で検出された25株の系統解析結果に基づき、各農場由来株の相互関係をみてみると、H農場とF農場由来株についてはクラスターA及びBに属する株を比較すると、相互に関連性が認められたのに対し、G農場由来株では高いブートストラップ値（1,000回）をもって、各クラスター内で独自のサブクラスターを形成していることがわかった。その他の農場については、各々1株の検出のためはっきりしたことはわからないが、少なくとも他農場由来株との密接な関連性は認められなかった。

(5) 農場別のVP7クラスター推移

これまでの調査で、複数シーズンにわたりCRVが検出された3農場について、シーズンごとのVP7クラスター分布について調べたところ（図4）、F農場ではクラスターCからAへと、G農場ではクラスターCからBへと、H農場ではクラスターBからAへと、それぞれシーズンごとに優勢なクラスターの推移が認められた。

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) 集団事例

18事例中16事例の患者材料67検体（糞便65，吐物2），

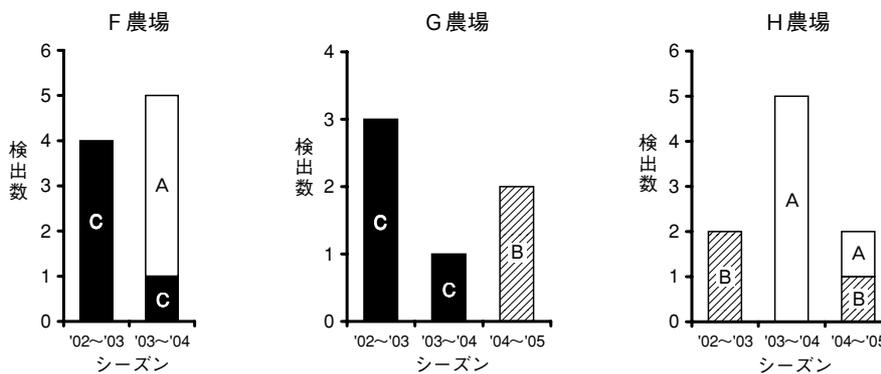


図4 農場別のVP7クラスター推移
カラム中のアルファベットが各クラスター名を示す。

表5 2004—2005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 | 2004.04 | 5 | 4 | G II/4 | 2 | 4 | S-U1 |
| B | 2004.12 | 2 | 2 | G II/4 | 1 | 2 | S-U1 |
| C | 2004.12 | 2 | 0 | — | 0 | 0 | — |
| D | 2005.01 | 7 | 7 | G II/4 | 2 | 7 | S-U1 |
| E | 2005.01 | 6 | 6 | G II/4 | 6 | 6 | L-04v |
| F | 2005.01 | 6 | 4 | G II/4 | 4* | 4 | S-U1 |
| G | 2005.01 | 3 | 3 | G II/4 | 2 | 3 | S-U1 |
| H | 2005.01 | 3 | 1 | G II/4 | 1* | 1 | S-U1 |
| I | 2005.01 | 3 | 2 | G II/4 | 1 | 2 | S-U1 |
| J | 2005.01 | 3 | 3 | G II/4 | 3 | 3 | L-04v |
| K | 2005.01 | 5 | 5 | G II/4 | 1 | 5 | S-U1 |
| L | 2005.01 | 6 | 6 | G II/4 | 6 | 6 | L-04v |
| M | 2005.01 | 3 | 3 | G II/4 | 1 | 3 | S-U1 |
| N | 2005.01 | 6 | 0 | — | 0 | 0 | — |
| O | 2005.02 | 4 | 4 | G II/4 | 4 | 4 | L-04v |
| P | 2005.02 | 14 | 8 | G I/3 | 3 | 1 | G I/3 |
| Q | 2005.03 | 14 | 8 | G II/4 | 3 | 8 | S-U1 |
| R | 2005.04 | 6 | 3 | G II/4 | 2 | 3 | S-U1 |

*: PCR 弱陽性

S-U1: Saitama U1 タイプ、

L-04v: Lordsdale2004variant タイプ

調理従事者糞便2検体、計69検体からNVが検出された(表5)。遺伝子解析の結果、2005年2月発生の1事例8検体から検出されたNVがGIに属するGI/3(Desertshield型)であったが、他の15事例由来の61株はすべてGIIに属するGII/4(Lordsdale型)であった。polymerase領域PCRにおいて、61株のGII/4はすべてYuri系で効率よく増幅されたが、NV81系では、Yuri系と同等以上に増幅されるもの19株と、Yuri系より増幅効率が低い、あるいは検出されないもの42株に分かれ、polymerase領域において遺伝子配列の異なる株が存在することが予想された。

同一事例内での増幅傾向がほぼ同じであったため、GII/4株が検出された事例の代表株15株について、polymerase領域からcapsid領域にわたる約1,100塩基の

配列を決定し、系統解析を行った。その結果、capsid領域は15株すべてGII/4(Lordsdale株:Acc No.X86557)類似(図5)であったのに対して、polymerase領域の塩基配列は、大別すればLordsdale株類似であったが、11株はSaitama U1株(Acc No.AB039775, polymerase領域がLordsdale株類似のrecombinant株)と最も相同性が高く(S-U1タイプ:クラスターA)、4株はLordsdale-2004variant株³²⁾と最も相同性が高い(L-04vタイプ:クラスターB)2つのクラスターに分かれた(図6)。S-U1タイプは2004年4月~2005年4月に発生した事例から、L-04vタイプは2005年1月~2月に発生した事例から、それぞれ検出された。

(2) 散発事例

41検体中9検体からNVが検出され、遺伝子型は

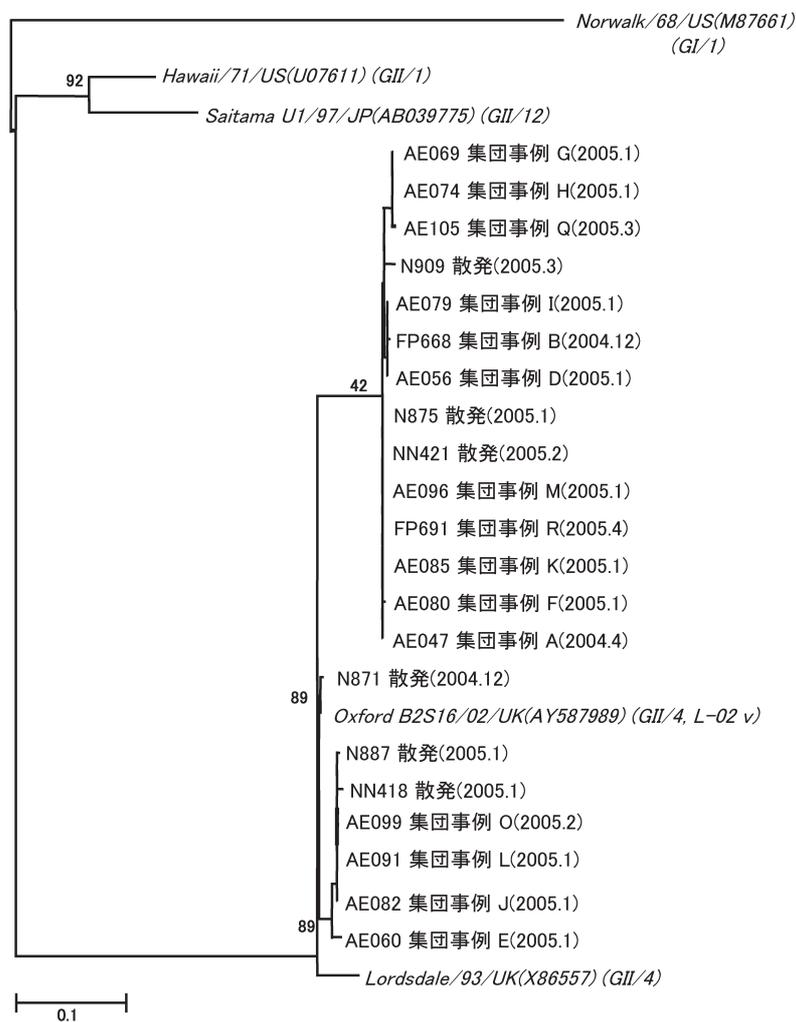


図5 検出NV (GII/4) の capsid 領域の系統樹
Lordsdale 株 の 5102-5366 相当部分265bp、N J 法、Bootstrap 1000回

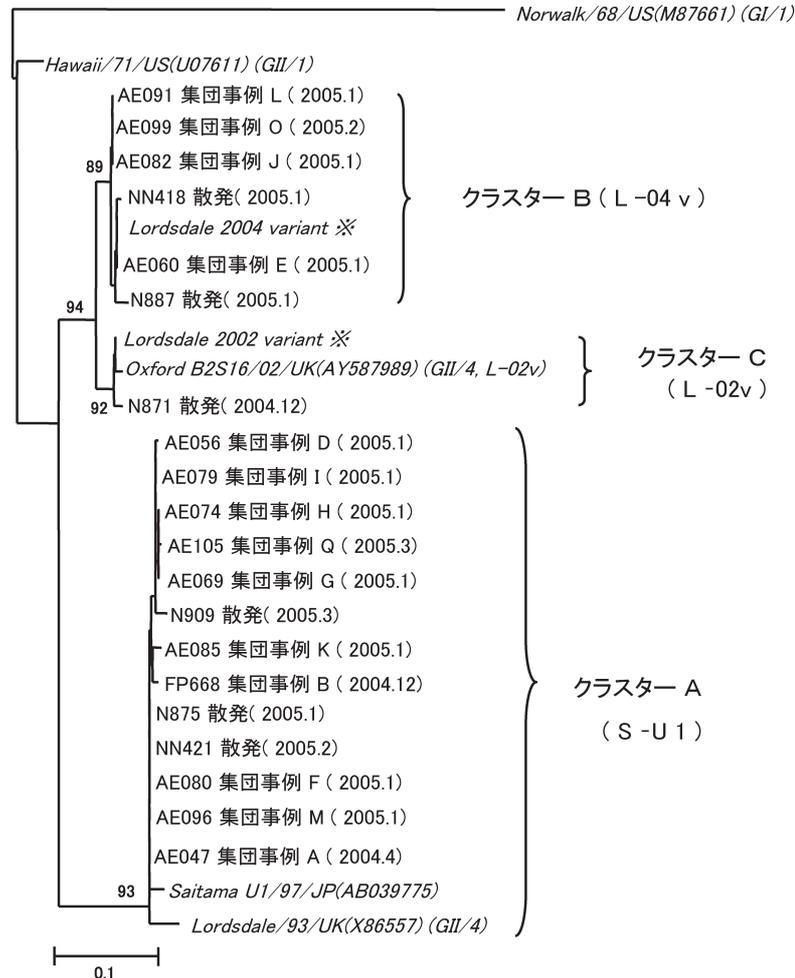


図6 検出NV (GII/4) のpolymerase 領域の系統樹
Lordsdale株の4341-4580 相当部分240bp、N J 法、Bootstrap 1000回

※Lordsdale2004variant および 2002variant の塩基配列は Kroneman A.et.al (Eurosurveillance Vol.8,52,2004) から引用

GII/4-6株, GII/6-2株, GII/2-1株であった。集団事例との比較のため, GII/4の6株について集団事例の場合と同様にpolymerase領域からcapsid 領域の塩基配列を決定し, 系統解析を行った。その結果, polymerase領域の塩基配列は, 3株がS-U1タイプ, 2株がL-04vタイプ, 1株がLordsdale-2002variant株³²⁾ (Acc No. AY587989)類似 (L-02vタイプ: クラスターC)であった (図6)。それぞれの検出時期は, S-U1タイプ2004年12月~2005年2月, L-04vタイプ2005年1月~2月, L-02vタイプ2004年12月であった。

(3) GII/4の各タイプの比較

集団事例及び散発事例から検出されたGII/4株は, S-U1, L-04v両タイプともにそれぞれ97%以上の相同性で, 集団事例株と散発事例株の差は見られなかった。S-U1, L-04v, L-02vの3タイプの代表株のpolymerase領域240塩基(Lordsdale株の4341-4580相当)の塩基配列

をLordsdale株と比較したところ, クラスター内の株に共通な塩基置換は, S-U1タイプ, L-02vタイプ, L-04vタイプでそれぞれ23, 19, 20であった。このうち, アミノ酸変異をとともなう塩基置換は, S-U1タイプ, L-02vタイプ, L-04vタイプでそれぞれ1, 3, 4カ所であったが, S-U1タイプでは5'端よりのL-02vタイプ, L-04vタイプと共通の1カ所のみ (Lordsdale株の4392-4394相当)であった。3'端の1カ所 (Lordsdale株の4563-4565相当)はS-U1タイプ, L-04vタイプで塩基置換が見られたが, アミノ酸変異はL-04vタイプのみで見られた。

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

生ずる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³³⁾が、2005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なった(図1)。

また、2003年度の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、2004年度のピーク時には12.67名(第51週)及び12.91名(第3週)となり、一峰目の方が高いピークであったか、一峰目と二峰目でほとんど差がなかったが、2005年度では二峰目の方がかなり高いピークを示した。

このことをウイルス検出状況と比較すると、SRSVは多く検出された9月～翌年3月の中でも11、12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、患者発生状況とウイルス検出状況が同様の傾向となっていた。

また、11、12月のSRSV検出数に比べて、2、3月のARV検出数がかなり多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117件のうち7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、検出されたCRV 7件のうち2件をCaCo-2細胞を用いて分離培養を試みたところ、1株(OH1131株)が培養可能となった。この分離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C群ロタウイルスの流行状況と遺伝子解析

昨年度及び一昨年度に引き続き、ヒトCRV胃腸炎の感染源究明の一助としてブタ盲腸便466検体についてCRV検索を実施したところ、6検体(1.3%)が陽性であった。この値は、一昨年度(2.3%)及び昨年度の冬期シーズン(2.0%)に比べ約半分に低下しているが、

これは、これまでの調査で3～5%と最も陽性率の高かったF農場から、今回はCRVが一例も検出されなかったことが大きく影響していると考えられる。なお、これまでの調査結果に基づき、CRV汚染農場について消毒等の衛生指導を行ったが、今回F農場からCRVが検出されなかったこと、及び陽性例の吸光度がこれまでに比べ低かったことなどにその効果が現れたのかもしれない。しかしながら、同様な指導を行ったG農場及びH農場については、3シーズンにわたりCRVが継続的に検出されていることから、CRVの清浄化はそれほど容易ではないことを示している。

今回の調査で検出された4株について遺伝子解析を行った結果、これまでの調査で確認された3つのVP7クラスターのうち、2つのクラスター(クラスターA及びB)に属する株であることがわかった。このうち、クラスターAのOS1454株及びクラスターBの1株(OS1504株)については、これまでに検出されたブタ盲腸便由来株に対し98%以上の極めて高い相同性を有していた。しかしながら、G農場から検出された2株については、系統解析結果や糖鎖付加部位の位置などからクラスターBに属すると考えられるものの、既知の株のみならず、これまでに検出されたブタ盲腸便由来株に対してもアミノ酸レベルで60～70%程度の相同性しか有しないことから、血清型の異なる新奇な株である可能性が強く示唆された。今後、これらの株の血清学的性状について、交差中和試験等により明らかにする必要がある。

ブタ盲腸便由来25株のVP7の遺伝子解析結果に基づいて、複数シーズンにわたりCRVが検出された3農場由来株の相互関係についてみると、G農場由来株については農場独自のサブクラスターを形成していたのに対し、F農場及びH農場由来株では、クラスターA及びCに属する株において、相互に密接な関連が認められた。3農場の位置関係をみると、G農場は広島県東部という他の農場から比較的離れた地域に位置しているのに対し、F農場及びH農場は同一地域内に存在していた。したがって、同一地域間で農場を越えた相互汚染が起こった可能性がある。

昨年の本研究¹⁹⁾で、F農場及びH農場において、シーズンによって優占株のVP7クラスターが変化していることが明らかになったが、今回の調査結果から、G

農場においても同様の現象が観察された。異なるVP7クラスター間のアミノ酸相配列同性が70%程度であることから推測すると、クラスターの違いが血清型の違いをともなう可能性も十分に考えられる。したがって、農場内に血清型の異なる複数タイプのCRVが存在し、それらがシーズンごとに優占株を変化させていることが、同一農場内でCRVの継続的な流行が起こる要因ではないかと思われる。いずれにしても、このことを裏付けるためには、異なるクラスターに属する株を用いた交差中和試験等を行う必要がある。

これまでに得られた3シーズンの調査結果を総合すると、成豚が遺伝的に多様なCRVを保有することから、ブタがCRVのリザーバーとなっている可能性が考えられること、及び特定農場においては、継続的にCRV流行が起こっていることが明らかになった。ロタウイルスにおいては、同一個体に由来の異なるウイルスが混合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³⁴⁾。昨年度及び今回の調査において、複数のVP7遺伝子配列が混合していると思われる検体があわせて3例認められたことから、ブタにおいても混合感染の発生頻度がそれほど低くないものと考えられる。したがって、ブタが保有する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、ヒトに感染性を有する新型CRVが出現することが危惧される。今後、VP7遺伝子以外の遺伝子分節についても解析を行うことで、ブタが保有するCRVにおける遺伝子再集合の発生頻度を明らかにする必要があると考えられる。

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

2004/2005シーズンの岡山県内では、集団事例、散发事例ともにcapsid領域で見るとGII/4が最も多く検出されたが、polymerase領域の解析の結果、同じGII/4株の中にS-U1、L-04v、L-02vの3タイプが混在していた。従って、2004/2005シーズンにみられた高齢者福祉施設を中心とするNV集団胃腸炎事例の多発は、単一のタイプのGII/4が県内に侵入して流行したものではなく、複数タイプのGII/4の流行の結果と考えられた。このうち、S-U1タイプは、集団事例・散发事例とも

に検出割合が高く検出期間も長かったことから主流であったと考えられ、2004年4月の事例でも検出されていることから前シーズンから継続して流行していたことが伺われた。L-02v、L-04vはいずれも2002年、2004年に欧米で急速に広がり多数の集団胃腸炎事例を引き起こして問題になったGII/4変異株³²⁾であり、今回、岡山県内にも侵入していることが確認された。しかしながら、欧米の場合とは異なり、少なくとも県内においては、これらの変異株が今回の集団胃腸炎事例多発の主要な原因となった可能性は低いと考えられた。このような複数タイプのGII/4の混在流行は、北海道における調査³⁵⁾をはじめ、関東から九州にかけての複数地域にわたる調査³⁶⁾でも確認されており、全国的な傾向ではないかと考えられたが、polymerase領域の解析が必ずしも広く実施されていないので、詳細は不明であった。

今回解析した株は、capsid領域とpolymerase領域ともに基本的にはGII/4であるLordsdale株に近縁な株であり、2つの領域のgenotypeが異なるいわゆるrecombinant株（遺伝子組み替え体）は見られなかったが、polymerase領域の解析によって異なる3タイプのGII/4の混在流行が明らかになった。これまでのNVの系統解析は、ウイルス表面蛋白をコードし抗原性に関連があると考えられるcapsid領域の塩基配列に基づいて行われてきた²²⁾が、近年、国内外でrecombinant株^{37),38)}や変異株³²⁾の検出・流行の報告が多くなっていることから、詳細な感染経路解明や正確な流行状況の解析には、capsid領域のみならずpolymerase領域についての解析も重要であると考えられた。また、GII/4は長期にわたって流行しているgenotypeであるが、それらがすべて同一タイプのpolymerase領域をもつウイルスであったかは明らかでない。過去の検出株についてcapsid領域及びpolymerase領域のretrospectiveな解析により流行状況を再検証することで、NVの流行におけるcapsid領域及びpolymerase領域の変異の影響が解明できるのではないかと考えられた。

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ー, 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) 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 diarrheic 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), 岡山県環境保健センター年報, 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16年度), 岡山県環境保健センター年報, 29, 89-102, 2005
- 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15年度), 岡山県環境保健センター年報, 28, 79-92, 2004
- 21) Jiang, X., Wang, M., Wang, K. and Estes, M. K.: Sequence and genomic organization of Norwalk virus, *Virology*, 195, 51-61, 1993

- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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
- 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，24，42-45，1999
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 小林宣道，浦沢正三：ロタウイルス，ウイルス，50，157-172，2000
- 35) 吉澄志磨，石田勢津子，奥井登代：胃腸炎集団発生事例から検出されたノロウイルスの分子疫学的検討，日本ウイルス学会第53回学術集会抄録集，309，2005
- 36) 愛木智香子，秋山美穂，岡部信彦，西尾治，杉枝正明，山下育孝，福田伸治，吉澄志磨，西田知子，田中俊光，岩切章，田村勉：欧米で流行しているノロウイルスGII/4変異型の国内での検出状況，病原微生物検出情報，26（12），325-327，2005
- 37) 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. Viol.*, 76, 598-607, 2005
- 38) 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