

【調査研究】

## 胃腸炎ウイルスの研究（平成15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\*\*\*（微生物科）

\*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

### 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であるヒト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，以下のような結果を得た。：開発したCRV検出用酵素抗体（ELISA）法又は逆受身血球凝集法，及び電子顕微鏡（EM）法により2003年度採取の胃腸炎患者糞便347件を検査した結果，EM法でロタウイルス様粒子陽性の46件中1件でヒトCRVが，45件でA群ロタウイルスが検出され，ELISA法に用いたモノクローナル抗体13A3との反応性が低いヒトCRVの出現は認められなかった。：ヒトCRV胃腸炎の感染源究明のため，2002年～2003年採取のブタ盲腸便599検体について，ELISA法及び外殻糖蛋白（VP7）遺伝子を増幅する逆転写PCR（RT-PCR）法によりCRV検索を行ったところ，14検体（2.3%）が陽性となった。RT-PCR法でその全長が増幅された2検体のVP7遺伝子は，両者とも1,075塩基対（bp）から成り，336個のアミノ酸（aa）をコードする一つのオープンリーディングフレームが存在した。これは，既知のCRVより12bp，4aa分長かった。また，2ndPCR陽性の12検体中9検体の増幅産物は，940bp（予測aa313個）と952bp（予測aa317個）の2種類が存在した。2ndPCR部分の相同性及び系統解析により，ブタCRVのVP7遺伝子には大きく3種類あることが初めて明らかになり，ブタが保有する多様なCRVがヒト由来ウイルスと遺伝子再集合を起こすことで，新たな性状のヒトCRVが出現する可能性も考えられた。：小型球形ウイルス（SRSV）のうちNorovirus（NV）について，糞便とカキを用いてリアルタイムPCR・ハイブリダイゼーション法（リアルタイム法）と従来法（カプシド領域及びポリメラーゼ領域を増幅するPCR）の陽性率比較・導入効果を検証した。その結果，i）1997～2002年度搬入のカキ48件の保存RNAのリアルタイム法陽性率は従来法と差はなく，結果一致率も高かった。ii）リアルタイム法導入により，食品からの陽性確定は最短7日程度 最短3～4日と大幅に迅速化可能となった。iii）2003年度の集団胃腸炎事例糞便143件のリアルタイム法陽性率は昨年度と同程度で，従来法との結果一致率も高かった。iv）リアルタイム法とEM法・従来法の結果不一致例の存在から，NV以外のSRSVや現行リアルタイム法で検出困難なNVの流行の可能性も考えられた。

[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]

### 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（Small Round Structured Virus 以下SRSVと略），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<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地方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 2002 年度と同様に 2003 年 4 月～2004 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 ブタ糞便からの CRV の検出とその性状解析

ロタウイルスはレオウイルス科に属する 11 本に分節した 2 本鎖 RNA をゲノムとして持つウイルスである。分節した RNA の末端配列は非常に良く保存されているため、異なる由来のウイルスが同一の細胞に感染した際に、遺伝子再集合 (リアソートメント) と呼ばれる遺伝子分節の組み替え現象を起こすことが知られている<sup>14)</sup>。リアソートメントにより出現したウイルスは、親株とは全く異なったゲノム性状を有することから、新型ウイルス出現の重要なメカニズムであると考えられている<sup>14)</sup>。

CRV はヒトをはじめ、ブタ、ウシおよびイヌなどの各種動物に感染することが知られているが<sup>15),16)</sup>、抗体保有調査の結果などから<sup>17),18)</sup> 特にブタの間で広く蔓延しているものと推察される。さらに、恒光ら<sup>19)</sup> はヒトおよび動物由来 CRV の VP7 遺伝子の比較から、ヒト CRV がブタ CRV Cowden 株および WH 株と密接に関連しており、これらのウイルスが同じ血清型に属する可能性があることを報告している。その後、我々

が行った交差中和試験の結果から、ヒト CRV と Cowden 株が同一血清型内の異なるサブタイプに属することが明らかとなり<sup>20)</sup>、ヒト CRV とブタ CRV とが比較的近い関係にあることがわかってきた。これらのことは、ヒト CRV 胃腸炎の感染源としてブタが重要な役割を果たしている可能性を示唆するものである。

昨年度の本研究において、ヒト CRV による集団胃腸炎の感染源究明の一助として、動物由来糞便 (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のみで、ブタ糞便からは CRV は検出されなかった<sup>20)</sup>。そこで、今年度はブタ糞便を中心に CRV 検索を行った。

### 1.3 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まだ確立されていないウイルスである。このため、純粋な抗原を大量に得ることが困難であり、他の胃腸炎ウイルス検出に用いられる迅速簡便な免疫学的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査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 Norovirus 属 (以下 NV) の一部の株の遺伝子配列が解明され<sup>21)</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 NV 株について遺伝子情報が蓄積されてきた。この結果、NV 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こと<sup>22)</sup>、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>23)</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、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、1997 年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、検査法についても年々改良が加えられてきた<sup>24)-27)</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等、いまだ改

良の必要な点が多々ある。糞便検体に関しては、昨年度の検討<sup>20)</sup>により、最近開発されたリアルタイムPCR - ハイブリダイゼーション法（カプシド領域を増幅するCOG系プライマーによる1stC-PCRとRINGプローブによるハイブリダイゼーションを同時進行して検出。以下リアルタイム法と略）が従来のRT-PCR法（カプシド領域を増幅するGSK系プライマーによるC-PCRとポリメラーゼ領域を増幅する35'-36系およびYuri系プライマーによるP-PCR）と同等あるいはそれ以上の検出能力を持つことが確認され、本法の導入によって確認検査に要する時間を省略することが可能となり迅速化できた。また、2002年度単年度のカキについての検討で、従来nested PCRで検出を行っているカキ等の食品についてもリアルタイム法が導入できると予想されたが、陽性検体が少数であるため、過去の保存陽性検体により導入の可能性を検討する必要がある。また、リアルタイム法は単一のプライマー系であり、標的領域に変異が起こった場合検出不能となる可能性がある等、行政対応のために改良を要する点が残されている。

2003年度は、1997～2002年度に搬入された県内産カキから抽出したRNAについてリアルタイム法導入の可否を検討するとともに、2003年度に搬入された集団胃腸炎事例の糞便について、昨年に引き続き従来のRT-PCR法とリアルタイム法の検出能力比較を行った。

## 2 材料と方法

### 2.1 ヒトCRVの免疫学的検出

#### (1) 対象

2003年4月～2004年3月に岡山地区（岡山赤十字病院，国立病院岡山医療センター）及び玉野地区（この小児科）の感染性胃腸炎患者各々99名，116名及び18名，合計233名から糞便を採取した。また，2003年度内に発生した集団胃腸炎19事例の患者114名から糞便を採取した。

#### (2) ウイルス検査方法

ロタウイルス，ADV及びSRSVのEM法による検索は既報と同様にネガティブ染色法で行った<sup>28)</sup>。

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

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法で既報と同様に行った<sup>28)</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 ブタ糞便からのCRVの検出とその性状解析

#### (1) 糞便検体

2002年11月～2003年5月に岡山市内のと畜場で採取されたブタ盲腸便599検体を本研究に用いた。検体の由来（検体採取月およびブタの生産地区）は表1に示すとおりである。なお生産地区は，いずれも岡山県北中部～広島県東部に位置していた。

表1 CRV 検索結果

生産地区	検体採取年月							合計 (陽性率)
	H14年11月	12月	H15年1月	2月	3月	4月	5月	
A	-	1/21*	-	0/14	0/20	0/3	0/24	1/82 (1.2)
B	-	-	-	-	-	-	0/3	0/3
C	-	-	-	0/19	-	-	-	0/19
D	-	-	0/15	-	-	-	-	0/15
E	-	1/29	-	-	-	-	0/11	1/40 (2.5)
F	1/19	-	-	0/27	1/10	1/28	3/28	6/112 (5.4)
G	-	-	1/30	-	0/40	2/31	-	3/101 (3.0)
H	0/30	-	1/55	0/40	1/30	1/38	0/34	3/227 (1.3)
合計	1/49	2/50	2/100	0/100	2/100	4/100	3/100	14/599 (2.3)

\*陽性数/検体数

(2) CRV 検索方法

採取した盲腸便の20%乳剤について、抗ヒトCRVモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法<sup>12)28)</sup>によりスクリーニング検査を実施した。吸光度0.4以上を示した検体について、確認のためCRVの外殻糖蛋白(VP7)に設定したプライマー(表2)を用いた逆転写PCR(RT-PCR)法を既報の方法<sup>29)</sup>に準じて行い、特異バンドが観察された場合を最終的にCRV陽性と判定した。なお、RT-PCR法はnested法(1st PCR:PCRVP7SおよびPCRVP7A, 2nd PCR:PCRVP7NSおよびPCRVP7NA)により実施した。

(3) 電子顕微鏡(EM)検索

既報<sup>28)</sup>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した。

(4) CRVの分離培養

ヒト結腸癌由来CaCo-2細胞を用い既報の方法<sup>28)</sup>に従い分離培養を行った。

(5) 遺伝子配列決定法

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

(6) 塩基配列データの解析

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

2.3 SRSVの遺伝子学的検出

(1) 材料

1997~2002年度県内産カキ48件(従来のRT-PCR法のいずれかでPCR陽性かつ確認検査陽性検体21件、従来のRT-PCR法でPCR判定保留かつ確認検査陰性検体27件)の保存RNAおよび2003年度に県内で発生した集団胃腸炎19事例の糞便143件(患者糞便114件、調理従事者糞便29件)を使用した。

(2) 方法

糞便は、既報<sup>20)</sup>と同様に前処理、RNA抽出を行った。カキRNAは、中腸腺から既報<sup>20)</sup>と同様に前処理、抽出されたのち-70℃に保存されていたRNAを用いた。

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+ALPF-COG1R/COG2R)とGSK系(G1SKF/G2SKF-G1SKR/G2SKR+G2ALSKR)の2系統のカプシド領域PCR(C-PCR)<sup>27)</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は平成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既報<sup>27)</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>30)</sup>によった。

COG系はLightCyclerシステム3302とLightCycler-FastStart DNAマスターハイブリダイゼーションプローブ(いずれもロシュ・ダイアグノスティクス社)を用いたリアルタイム法<sup>31)</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

表2 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
PCRVP7S	GGCATTTAAAAAAGAAGAAGCTGT	1-24	ブタCRV(Cowden株)
PCRVP7A	AGCCACATGATCTTGTTTACGC	1,042-1,063	VP7遺伝子
PCRVP7NS	TCTTTTTAAATGGTTTGTAC	40-59	CRV(OS53株)
PCRVP7NA	GGATATATGGCCCGATGTCT	1,012-1,031	VP7遺伝子

表3 ノロ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 330bp			
		36	CTTGTGGTTTGGAGGCCATA	4487 - 4506				
NV81	ACAATCTCATCATCACCATA	4865 - 4884						
NV82	TCATTTTGATGCAGATTA	4555 - 4572						
SM82	CCACTATGATGCAGATTA	4555 - 4572						
Yuri	MR4	AGTGGGTTTGGAGCCGTA	4937 - 4954	470bp 373bp				
	MR3	CCGTCAGAGTGGGTATGAA	4485 - 4503					
	Yuri22R	CATCATCCCCGTAGAAAGAG	4585 - 4604					
	Yuri22F	ATGAATGAGGATGGACCCAT	4232 - 4253					
カプシド	COG	COG1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	5354 - 5375	85bp 98bp	RING1-TP (a) RING2AL-TP	AGATYGCATCYCCTGTCCA TGGGAGGGGATCGCRATCT	5329 - 5348 5048 - 5067
		COG1F	CGYTGATGCGNNTTYCATGA	5291 - 5310				
		COG2R	TCGACGCCATCTTCATTACACA	5080 - 5100				
		COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	5003 - 5028				
	GSK	ALPF	TTTGAGTCCATGTACAAGTGGATGCG	5003 - 5028	330bp 343bp			
		G1SKR	CCAACCCARCCATRTTACA	5653 - 5671				
		G1SKF	CTGCCGAATTYGTAAATGA	5342 - 5365				
		G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTTRACAT	5367 - 5389				
		G2ALSKR	CCACCAGCATATGAATTGTACAT	5367 - 5389				
		G2SKF	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	5047 - 5065				

\* 文献27)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。

る分子量あるいはその近傍に PCR 産物のバンドが認められたものを PCR 陽性とした。また、P-PCR では、プライマー系による Genogroup 検出の偏り<sup>32)</sup>をなくすため、35'-36系または Yuri 系で陽性となった検体を P-PCR 陽性検体として、陽性率・一致率を算出した。

### 3 結果

#### 3.1 ヒト CRV 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、2003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48週(11月)に急増し、第50週には2003年度で最多の20.39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11週(3月)には定点当たり患者数はピークの12.06名に達した。

##### (2) 散発患者からのウイルス検出状況

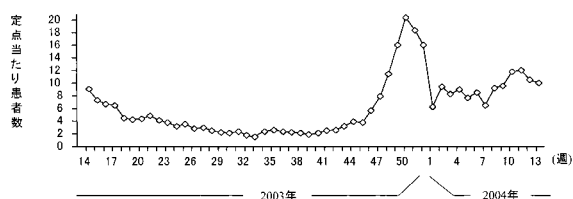


図1 感染性胃腸炎の発生状況

表4に示すとおり、合計233件の散発患者糞便より ARV45件(19.3%)、CRV1件(0.4%)、ADV4件(1.7%)、SRSV43件(18.5%)合計93件(39.9%)のウイルスが検出された。また、EM法でロタウイルス様粒子が観察された検体46件からは、1件のみCRVが検出され、その他の検体からはいずれもARVが検出された。

月別ウイルス検出状況は表4に示すとおり、ARVは2003年4月、2004年2月、3月に多く検出された。SRSVは2003年11月から2004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114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、59件からSRSVのみが検出され、ロタウイルス様粒子やADVは検出されなかった。

#### 3.2 ブタ糞便からのCRVの検出とその性状解析

##### (1) ブタ盲腸便からのCRVの検出

ブタ盲腸便599検体についてELISA法によるスクリーニングを行ったところ、吸光度0.4以上を示したのは24検体で、そのうちブタ由来Cowden株のVP7遺伝子両端に相補的なプライマー(PCRVP7SおよびPCRVP7A)によるRT-PCR法で陽性となったのは2検体のみ(検体番号OS53およびOS419)であった。そこで、OS53について塩基配列を決定し、その

配列を基に新たなプライマー（PCRVP7NSおよびPCRVP7NA）を設定し（表2）2nd PCRを行ったところ、さらに12検体で特異バンドが観察され、最終的に14検体（23%）がCRV陽性と判定された。

検体採取時期および生産地区別のCRV検出状況は表1に示すとおりで、2003年2月を除くすべての月でCRVが検出されており、また月ごとの検出率にも大きな違いは認められなかった。採取地区別の検出状況をみると、検査した8地区中5地区でCRVが検出されていた。また検出率では、F地区の陽性率が5.4%と、他の地区に比べ約2～4倍高かった。

なお、RT-PCRの結果からウイルス量が比較的多いと思われたOS53およびOS419についてEMによる観察を行ったが、ウイルス粒子を確認することはできなかった。また、CRV陽性と判定された盲腸便のうち12検体をCaCo-2細胞に接種し培養を試みたものの、ウイルスを分離することはできなかった。

(2) VP7遺伝子相同性解析

まず最初に、VP7遺伝子全長が増幅された2株（検体番号からOS53およびOS419株と命名）について、その塩基配列決定し解析を行ったところ、両株とも1,075塩基対（bp）から成り、336個のアミノ酸

（aa）をコードする一つのオープンリーディングフレームが存在することがわかった。これは、既知のCRVに比べて遺伝子（nt）で12bp分、またaaで4残基分長かった（aa配列を図2に示す）。OS53およびOS419株のVP7遺伝子を相互に比較したところntで90.5%、aaで94%と比較的高い相同性であった。一方、既知のCRV株との比較では（表5）、OS53およびOS419株ともntレベルでヒト、ブタおよびウシCRV株の何れとも60～70%台の相同性であり、aaレベルにおいてもほぼ同様の値であったが、OS53についてはヒトCRV株との相同性が80.4～81%と、他に比べ若干高い値を示した。

次に、2nd PCRで陽性となった12検体のうち、比較的PCR産物量の多かった9検体について塩基配列を決定したところ、産物には940bp（予測アミノ酸313個）と952bp（予測アミノ酸317個）の2種類が存在していた（表6、7）。2nd PCR増幅部分について、先に決定したOS53およびOS419株の配列も加え、既知のCRV株との比較を行ったところ、ブタ盲腸便由来株のVP7には既知のCRVと同一塩基長（940bp）で、ブタCRVのCowden株およびWH株に近縁（nt相同性87.2～89.5%、aa相同性92.3～93.3%）なも

表4 採取年月別・採取機関別ウイルス検出状況

採取年月	岡山赤十字病院						国立病院岡山医療センター						のうの小児科						合計
	ARV	CRV	ADV	SRSV	陰性	小計	ARV	CRV	ADV	SRSV	陰性	小計	ARV	CRV	ADV	SRSV	陰性	小計	
H15年4月	-	-	-	-	-	-	11	0	1	0	13	25	2	0	0	0	0	2	27
5月	2	0	0	1	12	15	1	1	2	0	2	6	-	-	-	-	-	21	
6月	0	0	0	2	17	19	0	0	0	0	4	4	-	-	-	-	-	23	
7月	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	1	9	
8月	0	0	0	0	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	
9月	0	0	0	1	4	5	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	8	
10月	0	0	0	2	1	3	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	2	5	
11月	0	0	0	4	4	8	0	0	0	2	3	5	0	0	0	1	1	15	
12月	0	0	0	4	2	6	0	0	0	8	6	14	0	0	0	1	0	21	
H16年1月	0	0	0	2	4	6	0	0	0	5	5	10	0	0	0	1	2	19	
2月	1	0	1	2	9	13	4	0	0	0	6	10	0	0	0	1	1	25	
3月	3	0	0	5	8	16	21	0	0	0	16	37	0	0	0	1	2	56	
計	6	0	1	23	69	99	37	1	3	15	60	116	2	0	0	5	11	18	233

表5 ブタ盲腸便由来CRVのVP7遺伝子配列相同性

株名	VP7遺伝子配列の相同性値（%）			
	ヒトCRV	ブタCRV	ウシCRV	
OS53	遺伝子	77.8～78.7	74.2～76.7	77.0～78.3
	アミノ酸	80.4～81.0	72.0～78.3	77.7～78.6
OS419	遺伝子	78.0～78.6	74.1～77.1	76.3～78.3
	アミノ酸	77.4～78.0	68.8～76.5	75.3～77.4

の (E 地区由来 OS78株), 既知の CRV と同一塩基長で, プタ CRV の HF 株に近縁 (nt 相同性85.7%, aa 相同性89.8~90.1%) なもの (H 地区由来 OS302および OS493株), 既知の CRV 株より12塩基, 4アミノ酸長く, 配列にも類似性がみられない (nt および aa 相同性とも60~70%台) もの (前記以外のブタ盲腸便由来8株) の大きく3つのグループに分類しうることがわかった。さらに3番目のグループについては, 由来地区の異なる株間では nt および aa とも89.2~93.4%の相同性であったのに対し, 同一地区では nt および aa とも98.9%以上という極めて高い相同性を

示した (表6, 7)。

(3) VP7アミノ酸系統解析

相同性解析を行った17株の CRV について, 近隣結合法による VP7アミノ酸配列系統解析を実施したところ, 相同性解析で得られた知見を良く反映するかたちで, 大まかに3つのクラスター (A, B および C) に分けられることがわかった (図3)。さらに同一クラスター内においても, 高いブートストラップ値 (970以上) をもって, 由来動物種もしくは由来地区ごとにサブクラスターを形成した。さらに同一地区由来株では, その採取時期に関わらず VP7が高度に保存され

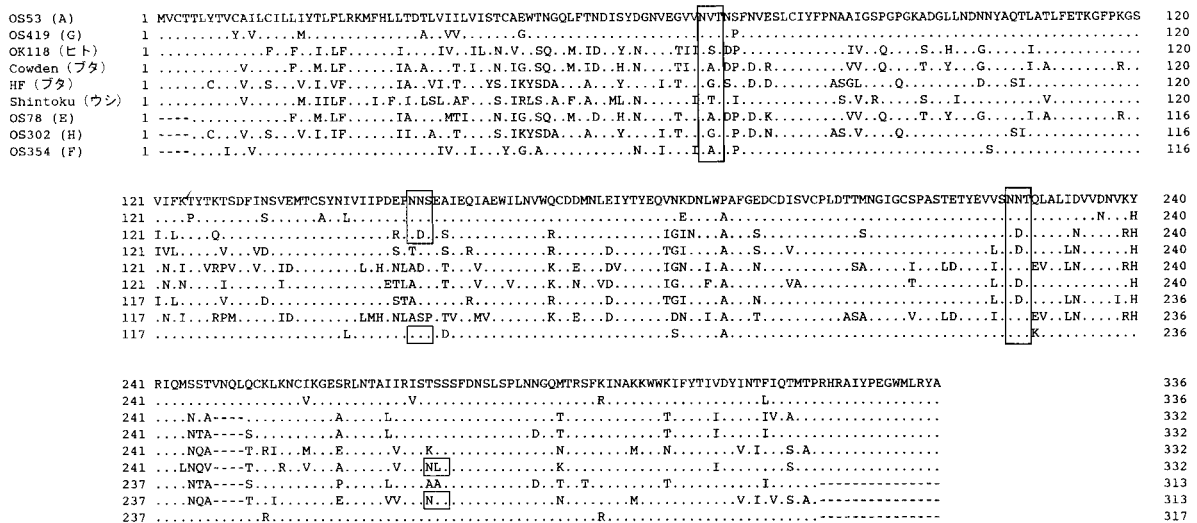


図2 CRV 株の VP7 アミノ酸配列の比較

括弧内は由来地区または由来動物を示す。OS53株と同一のアミノ酸はドットで示し, 欠損部分はハイフンで示した。また, 糖鎖付加部位を枠で囲んだ。

表6 VP7 遺伝子配列相同性\*

株名 (由来**)	鎖長 (塩基対)	各種動物由来株						ブタ盲腸便由来株										
		OK118	OK450	Cowden	WH	HF	Shintoku	OS78	OS302	OS493	OS53	OS354	OS464	OS502	OS554	OS181	OS419	OS438
OK118(ヒト)	940	100	<b>95.5</b>	82.6	82.0	72.8	73.6	80.8	72.0	72.0	76.8	77.8	77.7	77.8	77.8	76.9	76.9	76.8
OK450(ヒト)	940		<b>100</b>	82.2	81.8	71.7	72.5	80.0	71.0	71.0	76.0	76.6	76.5	76.6	76.6	76.4	76.2	76.3
Cowden(ブタ)	940			<b>100</b>	<b>93.7</b>	72.7	74.3	89.5	71.4	71.6	74.1	74.7	74.8	74.9	74.9	74.7	74.7	74.6
WH(ブタ)	940				<b>100</b>	72.0	73.7	87.2	70.5	70.7	72.9	73.4	73.5	73.8	73.8	73.5	73.3	73.4
HF(ブタ)	940					<b>100</b>	71.9	72.2	85.7	85.7	71.5	71.4	71.4	71.4	71.6	71.5	71.4	
Shintoku(ウシ)	940						<b>100</b>	72.8	72.1	72.3	75.1	73.9	73.8	73.8	73.8	74.9	74.8	74.8
OS78(E)	940							<b>100</b>	70.8	70.8	74.5	74.9	74.8	74.8	74.8	75.2	74.9	74.8
OS302(H)	940								<b>100</b>	<b>99.8</b>	71.8	71.1	71.0	70.9	71.0	71.1	71.1	71.0
OS493(H)	940									<b>100</b>	71.8	71.0	71.0	71.0	71.0	71.1	71.1	71.0
OS53(A)	952										<b>100</b>	<b>90.2</b>	<b>90.3</b>	<b>90.1</b>	<b>90.1</b>	89.8	89.6	89.5
OS354(F)	952											<b>100</b>	<b>99.7</b>	<b>99.3</b>	<b>99.3</b>	89.7	89.5	89.4
OS464(F)	952												<b>100</b>	98.9	98.9	89.8	89.6	89.5
OS502(F)	952													<b>100</b>	<b>100</b>	89.5	89.3	89.2
OS554(F)	952														<b>100</b>	89.5	89.3	89.2
OS181(G)	952															<b>100</b>	<b>99.5</b>	<b>99.6</b>
OS419(G)	952																<b>100</b>	<b>99.9</b>
OS438(G)	952																	<b>100</b>

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

表7 VP7アミノ酸配列相同性\*

株名 (由来**)	鎖長 (アミノ酸)	各種動物由来株						ブタ盲腸便由来株										
		OK118	OK450	Cowden	WH	HF	Shintoku	OS78	OS302	OS493	OS53	OS354	OS464	OS502	OS554	OS181	OS419	OS438
OK118(ヒト)	313	100	96.5	86.3	83.7	68.7	72.2	83.7	68.7	69.0	79.8	78.9	78.5	78.9	78.9	77.3	76.7	76.7
OK450(ヒト)	313		100	86.6	84.0	68.7	72.2	84.0	68.4	68.7	79.2	78.2	77.9	78.2	78.2	76.7	76.0	76.0
Cowden(ブタ)	313			100	96.8	68.7	72.8	93.3	68.4	68.7	77.0	75.1	75.1	75.1	75.1	75.7	75.1	75.1
WH(ブタ)	313				100	68.1	73.2	92.3	68.4	68.7	75.7	73.8	73.8	73.8	73.8	75.4	74.8	74.8
HF(ブタ)	313					100	71.2	68.7	89.8	90.1	70.3	68.1	67.8	68.1	68.1	67.5	66.9	66.9
Shintoku(ウシ)	313						100	71.9	71.9	72.2	76.3	73.8	73.5	73.8	73.8	74.4	73.8	73.8
OS78(E)	313							100	68.7	69.0	77.9	75.4	75.4	75.4	75.4	76.3	75.7	75.7
OS302(H)	313								100	99.7	71.6	68.8	68.5	68.8	68.8	69.1	68.5	68.5
OS493(H)	313									100	71.9	69.1	68.8	69.1	69.1	69.4	68.8	68.8
OS53(A)	317										100	93.4	93.4	93.4	93.4	94.3	93.7	93.7
OS354(F)	317											100	99.4	100	100	92.1	91.5	91.5
OS464(F)	317												100	99.4	99.4	92.1	91.5	91.5
OS502(F)	317													100	100	92.1	91.5	91.5
OS554(F)	317														100	92.1	91.5	91.5
OS181(G)	317															100	99.4	99.4
OS419(G)	317																100	100
OS438(G)	317																	100

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

ていた。

### 3.2.4 VP7アミノ酸配列アライメント

由来地区ごとの代表株と既知のCRV株とのaa配列アライメントを行った結果を図2に示した。全体を比較するとN末端側に置換部位が多く認められ、特に

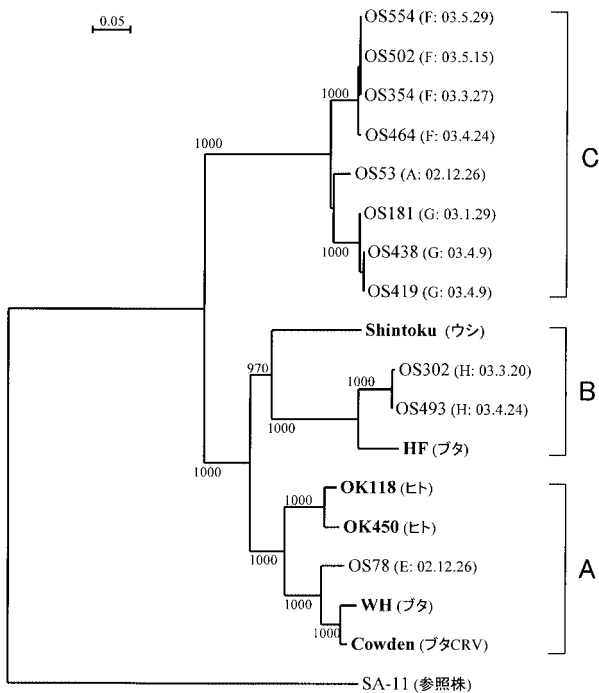


図3 VP7アミノ酸配列の系統解析結果

A部口ウイルスSA-11株を参照株として近隣結合法により実施した。既知のCRV株を太字で表した。括弧内は検体の由来(由来動物もしくは地区別:採取年月日)を, 系統樹上の数値はブートストラップ値をそれぞれ示す。

30~75aa部分には置換が集中していた。また, クラスタCに属するOS53, OS419およびOS354株ではアミノ酸追加位置(248aa部分)および追加配列(バリン・アスパラギン・グルタミン・ロイシン)とも全く同一であった。

CRVのVP7には2~3カ所の糖鎖付加部位の存在が確認されている<sup>19)</sup>が, これらの位置を調べたところ, 今回検出された株は何れも3カ所に付加部位が認められ, そのうち2カ所(67~69aa, 225~227aa)については既知の株との間で良く保存されていた。なお, これまでヒトCRVのみで確認されていた152~154aa部分の付加部位が, クラスタCに属する株にも認められたが, このことはヒトCRVとの関連性を考えるうえで大変興味深い知見であった。さらに, ウシCRVのみに存在していた付加部位(270~272aa)がクラスタBの株(OS302株)にも観察された。

### 3.3 SRSVの遺伝子学的検出

#### (1) カキ保存RNAにおけるリアルタイム法と従来法の比較

1997~2002年度県内産カキ48件(従来のRT-PCR法のいずれかでPCR陽性かつ確認検査陽性検体21件, 従来のRT-PCR法でPCR判定保留かつ確認検査陰性検体27件)の保存RNAについてリアルタイム法を実施し, 陽性率及び一致率を表8に示す。陽性率



は、リアルタイム法、従来法とも43.8%で差はなく、結果一致率も79.2%と高かった。

(2) カキ等食品におけるリアルタイム法導入の効果

リアルタイム法の導入により、検査の迅速化をはかった。食品で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4)。食品の場合 nested PCR を実施するため、従来法では最短でもPCR検査に4日、確認検査に3日の計7日必要であったが、リアルタイム法では最短3.5日で最終判定が可能であった。

表8 カキ保存RNAのPCRにおけるリアルタイム法と従来法の結果比較

リアルタイム法	従来法		
	陽性数	陰性数	計
陽性数 (%)	16 (33.3)	5 (10.4)	1 (2.2)
陰性数 (%)	5 (10.4)	22 (45.8)	27 (56.2)
計 (%)	21 (43.8)	27 (56.2)	48 (100.0)
一致率 (%)	79.2		

(3) 糞便におけるリアルタイム法と従来法との比較

2003年度に県内で発生した集団胃腸炎19事例の糞便143件についてリアルタイム法とGSK系のC-PCR、35'-36系とYuri系の2系統のP-PCRを行った。プライマー系別のPCR陽性率を過去2年度の陽性率とともに表9に、リアルタイム法と従来法のPCR結果比較を表10に示す。

各プライマー系の陽性率は、リアルタイム法58.0%(83/143)、35'-36系51.7%(74/143)、GSK系50.3%(72/143)、Yuri系28.7%(41/143)であった。35'-36系とYuri系の2系統を総合判定した場合、すなわちP-PCRとしての陽性率は57.3%(82/143)であった。リアルタイム法との一致率は、GSK系と35'-36系で86.7%、Yuri系が最も低く69.3%であった。P-PCRの一致率は92.3%であった。リアルタイム法と従来法の不一致例は、いずれの系もリアルタイム法陽性・従来法陰性検体がリアルタイム法陰性・従来法陽性検体より多かった。各プライマー系の陽性率を過去と比較した場合、リアルタイム法、GSK系とYuri系は大きな変化はみられなかったが、35'-36系

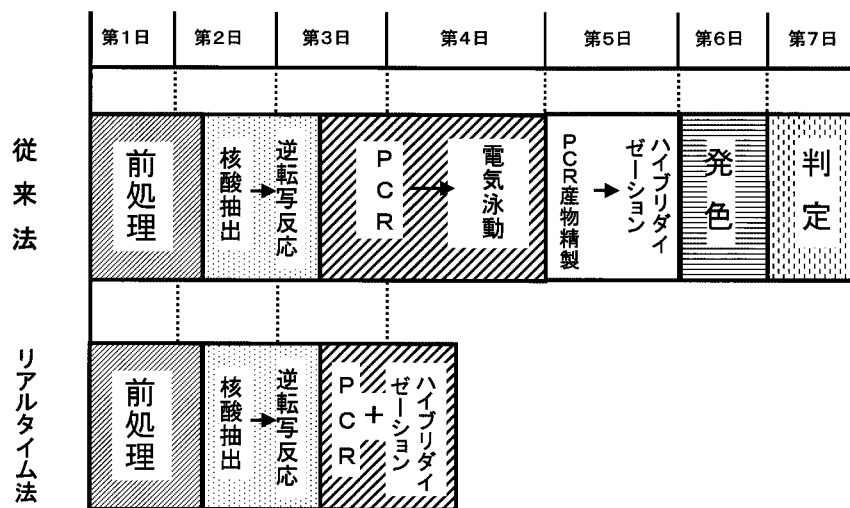


図4 カキ検体におけるPCR検査所要時間の比較

表9 プライマー系別陽性率の年度別比較

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		
	COG系	GSK系	35'-36系	Yuri系	
糞便	2003年度陽性率 (%)	58.0	50.3	51.7	28.7
	2002年度陽性率 (%)	60.9	53.6	72.5	26.1
	2001年度陽性率 (%)	44.4*	55.6	29.6	25.9

\*COG系プライマーの2001年度陽性率は、従来法PCRによる

は約 2 / 3 に低下した。

集団胃腸炎19事例中13事例で NV が検出された。G のみが検出されたのが11事例，G と G が検出されたのが2事例で，G のみが検出された事例はなかった。

(4) 糞便における電子顕微鏡検索と NV の PCR との比較  
前項で使用した143検体について，電子顕微鏡検索

(EM) と NV の PCR (リアルタイム法，GSK 系，35'-36系及び Yuri 系) を比較した。その結果を表11 に示す。各プライマー系の56.6～62.2%の検体で EM と PCR の結果が一致したが，EM 陽性 PCR 陰性検体が15.4～30.0%みられた。EM 陽性リアルタイム法陰性検体が月別検体数に占める割合を図5 に示す。EM 陽性リアルタイム法陰性検体の割合は18.1～40.0%で6月と翌年2月に最も高く，11月～翌年2月にかけて

表10 糞便の PCR におけるリアルタイム法と従来法の結果比較

リアルタイム法 カプシド領域 PCR	従 来 法					
	カプシド領域 PCR		ポリメラーゼ領域 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 (%)	68 (47.5)	15 (10.5)	69 (48.2)	14 (9.8)	40 (28.0)	43 (30.0)
陰性数 (%)	4 (2.8)	56 (39.2)	5 (3.5)	55 (38.5)	1 (0.7)	59 (41.3)
一致率 (%)	86.7		86.7		69.3	
			92.3			

表11 糞便の電子顕微鏡検索と NV の PCR との結果比較

電子顕微鏡検索	NV の PCR							
	リアルタイム法		従来法					
	COG 系		GSK 系		35'-36系		Yuri 系	
	陽性数	陰性数	陽性数	陰性数	陽性数	陰性数	陽性数	陰性数
陽性数 (%)	48 (33.5)	22 (15.4)	40 (28.0)	30 (21.0)	45 (31.4)	25 (17.5)	27 (18.9)	43 (30.0)
陰性数 (%)	35 (24.5)	38 (26.6)	32 (22.4)	41 (28.6)	29 (20.3)	44 (30.8)	14 (9.8)	59 (41.3)
一致率 (%)	60.1		56.6		62.2		60.1	
					60.8			

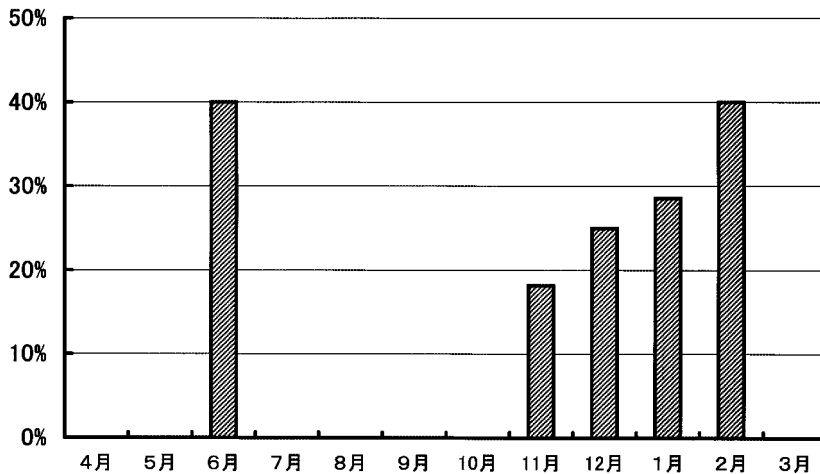


図5 月別 EM 陽性リアルタイム法陰性検体の割合

増加傾向であった。

## 4 考 察

### 4.1 ヒト CRV 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>33)</sup>が、2003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。

また、2002年度のピーク時の定点当たり患者数は11.44名(第51週)及び8.94名(第10週)であったが、2003年度のピーク時には20.39名(第50週)及び12.06名(第11週)となり、2003年度の患者数が大幅に増加したことが示された。

このことをウイルス検出状況と比較すると、SRSV は11月～翌年3月に多く検出され、ARV は4月及び翌年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月以降3月まで多く検出され、2003年度冬期の流行が2002年度に比べ患者数が大幅に増加した一因と考えられる。

EM 法でロタウイルス様粒子が観察された検体46件のうち1件から CRV が検出され、その他の検体からは ARV が検出された。群を同定できないロタウイルス陽性検体はなかったため、Mab13A3 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 MAAb 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 MAAb 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。

CRV は抗原的分類ができていないため、MAAb 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、CRV の感染源、感染ルートの究明に役立つと思われる。

### 4.2 ブタ糞便からの CRV の検出とその性状解析

今回ヒト CRV 胃腸炎の感染源究明の一助として、ブタ盲腸便599検体について CRV 検索を行ったところ、14検体(2.3%)から CRV の遺伝子が検出された。これまでに、胃腸炎を発症した仔豚等の糞便から

CRV が検出されたという報告は多いものの<sup>15)34)</sup>、健康な成豚から検出されたというのは今回が初めてである。ただし、CRV 陽性例のうち比較的ウイルス量が多いと考えられた2検体について EM による観察を行ったものの、ウイルス粒子を確認することができず、また CaCo-2 細胞による分離培養も陰性であった。したがって、検体に含まれるウイルス量はあまり多くないものと思われ、健康なブタが直ちにヒトへの感染源となる可能性は低いものと考えられた。

ヒト CRV の全国的な流行が認められた1992～93年シーズンに、胃腸炎患者糞便に限って CRV 検索を行った場合でも、その検出率は6.8%であった<sup>35)</sup>ことから考えて、健康なブタの2.3%が CRV を保有していたということは、ブタにおける本ウイルスの侵淫度がヒトに比べてかなり高いことを示唆している。また、検査した8地区中5地区で CRV が検出されたことから、岡山県北中部～広島県東部地域におけるブタの間で CRV が広く蔓延しているものと思われた。

ヒト CRV による集団胃腸炎のほとんどが3～6月に発生し、また散発性胃腸炎患者から CRV が検出されるのも同時期に多いことなどから、ヒト CRV が冬季よりむしろ春季に流行しやすいことがわかっている<sup>2)・11)・35)</sup>。今回の結果から、ブタ盲腸便からの CRV 検出が特定時期に集中するという傾向は認められなかったことから、ヒトとブタでは CRV の流行時期に違いがあるのかもしれない。何れにしても今回は1シーズンのみの成績であり、本調査をさらに継続することで、ブタにおける CRV 流行の実態を明らかにできるものと思われる。

VP7 遺伝子の相同性およびアミノ酸系統解析の結果から、ブタ盲腸便中にヒト CRV に極めて近縁なウイルスは発見されなかったものの、既知の CRV 株に近縁なものから全く異なるものまで、多様なウイルスが存在していることが今回初めて明らかになった。インフルエンザウイルスでは、カモなどの水禽類がリザーバーとして多種類のウイルスを保有し、それらがヒト由来ウイルスとリアソートメントを起こすことで新型ウイルスが出現し、大規模なインフルエンザ流行を引き起こすことが知られている<sup>36)</sup>。したがって CRV の場合も同様に、ブタがリザーバーとなって様々なウイルスを保有し、それらのウイルスがヒト由来株との

間でリアソートメントを起こすことで、新型コロナウイルスが出現する可能性も十分考えられる。今後、新たな性状を持つウイルスの出現を監視するうえでも、ブタ盲腸便の CRV 検査を継続していく必要があると思われる。

ブタが多様な CRV を保有する一方で、同一地区に由来するウイルスでは、その採取時期に関わらず VP7 が高度に保存されていたことから、各地区に特定のウイルスが定着し、しかもそれぞれが独自に進化していることがうかがわれた。さらに調査を進める必要があるものの、もしこれが事実とすれば、地区を越えたウイルス伝搬はあまり起こっていないものと思われるため、各地区ごとに消毒等の対策を施すことで、CRV の清浄化が図られるのではないかと考えられる。

CRV 陽性例10検体について CaCo - 2 細胞による分離を試みたものの、ウイルスを培養することはできなかった。しかしながら VP7 アミノ酸配列アライメント結果から、ヒト CRV に特徴的な糖鎖結合部位がクラスター C に属する株にも存在するなど、両者の配列に類似した部分も認められることから、今後異なる細胞を用いるなどの工夫によりブタ盲腸便由来株を培養し、その抗原性や血清学的性状を詳しく解析する必要がある。

#### 4.3 SRSV の遺伝子学的検出

##### (1) カキ保存 RNA におけるリアルタイム法と従来法の比較

陽性率がリアルタイム法と従来法ともに差がなく、両方の一致率も高かったことから、リアルタイム法は、1st PCR ではあるがカキ等食品検査における nested PCR とほぼ同等の検出能力を持つことが確認された。なお、従来法確認検査で陽性でありながらリアルタイム法陰性となった5検体は2002年度の検体で、うち4検体は Yuri 系のみで検出されていた。2002年度は糞便においても Yuri 系とリアルタイム法との一致率が他のプライマー系より低く<sup>20)</sup>、リアルタイム法で検出効率の低い Genotype が流行していた可能性がある。

##### (2) カキ等食品における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。昨年検討した糞便の場合は核酸増幅と確認検査の同時進行による迅速化効果が大きかった。カキ等食品においては、それに加えて、前項で示されたように一段階の PCR でありながら従来法の nested PCR に匹敵するという蛍光測定の高感度性が効果を発揮している。この結果、従来法で nested PCR に要する約半日とその後実施する確認検査に要する3日が不要となり、リアルタイム法では最短で3.5日と大幅に迅速化可能となった。リアルタイム法導入による NV 陽性結果の迅速還元と検査時間短縮による事件対応能力の向上は、集団胃腸炎発生時の感染源調査のみならず、カキ等食品 NV 汚染の常時監視により事件発生自体を未然防止するためにも有用と考えられる。

##### (3) 糞便におけるリアルタイム法と従来法との比較

PCR 陽性率は、リアルタイム法が最も高く、従来法のプライマー系を上まわっており、かつ従来法との一致率も高かったことから、現行の糞便からの NV 検出系では最も優れていると考えられた。各プライマー系の陽性率を過去と比較すると、COG 系（従来法であった2001年度を除く）と GSK 系及び Yuri 系は大きな変化がなかったが、35'-36系は29.6~72.5%と大きく変動しており、NV の流行 Genotype によって陽性率が変動する可能性があると考えられた。一方、COG 系と GSK 系は、陽性率の変動が少なく、NV の流行 Genotype に左右されにくい検出系と考えられた。従って COG 系を使用するリアルタイム法はこの点でも有用な方法といえる。厚生労働省の示す NV の RT-PCR 法は、今年度改良が加えられ<sup>27)</sup>、従来のプライマー系では検出できなかった Alphanon タイプの NV<sup>37)</sup>も検出可能になった。しかし、少数ながら、依然リアルタイム法陰性従来法陽性の検体が見られることから、現行のリアルタイム法で検出困難な NV が存在する可能性も否定できなかった。

##### (4) 糞便における電子顕微鏡検索(EM)と NV の PCR との比較

EM と NV の PCR の結果比較で、EM で SRSV 陽性でありながら NV の PCR 陰性である検体が15.4~30.0%みられた。EM は形態学的観察であり、NV を特異的に検出しているわけではない。従って、これらの検体で観察された SRSV は、NV 以外の SRSV、

たとえばサポウイルスやアストロウイルス 現行の RT-PCR で検出し得ない Genotype の NV の 2 つの可能性がある。EM 陽性検体のうち、最も NV を効率に検出するリアルタイム法陰性の検体が、NV 非流行期の 6 月と NV 流行期後半に高率にみられたことから、PCR 陽性となる NV とは異なる流行形態を持つ SRSV の存在が疑われたが、非流行期や流行期後半は検体数自体が少なく、このために検出割合が高率になった可能性もある。EM で観察された NV の PCR 陰性の SRSV について、今後サポウイルス及びアストロウイルスの RT-PCR 等を実施し、その実態を明らかにしていく必要があると思われる。

## 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 - 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, 舩津丸貞幸, 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: 教育研修施設で発生したヒト C 群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例, 感染症学雑誌, 77, 53 - 59, 2003
- 12) Fujii, R., Kuzuya, M., Hamano, M., Yamada, M., Yamazaki, S. : Detection of human group C rotaviruses by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies, J.Clin. Microbiol., 31 (5), 1307-1311, 1992
- 13) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Nagabayashi, T., Tsunemitsu, H., Yamada, M., Nii, S., Mori, T. : Rapid detection of human group C rotaviruses by reverse passive hemagglutination and latex agglutination tests using monoclonal antibodies, J. Clin. Microbiol., 31 (5), 1308-1311, 1993
- 14) 小林宣道, 浦沢正三: ロタウイルス, ウイルス, 50, 157 - 172, 2000
- 15) Saif, L. J., Nongroup A rotaviruses : Viral diarrhea of man and animals, p. 73-95, CRC Press, Florida, USA, 1990
- 16) Otto, P., Schulze, P., Herbst, W. : Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs in Germany, Arch. Virol., 144, 2467-2473, 1999
- 17) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Ohata, R., Ogura,

- H., Yamada, M. : Seroepidemiology of human group C rotavirus in Japan based on a blocking enzyme-linked immunosorbent assay, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8, 161-165, 2001
- 18) Tsunemitsu, H., Jiang, B., Saif, L. J. : Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by enzyme-linked immunosorbent assays, *J. Clin. Microbiol.*, 30, 2129-2134, 1992
- 19) Tsunemitsu, H., Jiang, B., Saif, L. J. : Sequence comparison of the VP7 gene encoding the outer capsid glycoprotein among animal and human group C rotaviruses, *Arch. Virol.*, 141, 705-713, 1996
- 20) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆 : 胃腸炎ウイルスの研究 (2002年度), 岡山県環境保健年報, 27, 45 - 61, 2003
- 21) Jiang, X., Wang, M., Wang, K. and Estes, M. K. : Sequence and genomic organization of Norwalk virus, *Virology*, 195, 51-61, 1993
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 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
- 28) 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
- 29) 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
- 30) 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
- 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) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 小倉肇 : 小型球形ウイルスの遺伝子学的検出, 岡山環境保健年報, 25, 58 - 62, 2001
- 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) 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
- 35) 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
- 36) 豊田哲也, 石浜明, オルソミクソウイルス : ウィルス学, p 230 - 243, 朝倉書店, 東京, 1997
- 37) Vinje, J., Koopmans, MP. : Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like-viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format, *J. Clin. Microbiol.*, 38, 2595-2601, 2000