

胃腸炎起因ウイルス検索に関する研究

柏原尚子 五十嵐郁美 門馬直太 廣瀬昌子 三川正秀 大竹俊秀 金成篤子¹⁾
微生物課, ¹⁾ 県北保健福祉事務所

要 旨

胃腸炎患者の糞便検体でノロウイルスが検出されなかったものについて、サポウイルス、アイチウイルス、アストロウイルスの検索を昨年に引き続き RT-PCR 法により実施した。2008 年における集団発生の 5 事例 54 検体については、いずれも検出されず、2008 年 1 月から 12 月受付の散発事例 227 検体については、9 検体からサポウイルスが、4 検体からアストロウイルスが検出された。

キーワード：サポウイルス、アイチウイルス、アストロウイルス、RT-PCR 法

はじめに

近年、集団食中毒の病因物質としてノロウイルスが注目されている。厚生労働省の調査によると、2007 年の食中毒の病因物質としてノロウイルスが事例数で第 2 位、患者数で第 1 位を占めている。また、冬季に発生する感染性の集団胃腸炎の起因ウイルスとしても注目されている。しかし、集団胃腸炎の中にはノロウイルスが検出されない事例もしばしば見られ、他県においては、サポウイルス（以下“SV”とする）、アイチウイルス（以下“AiV”とする）、アストロウイルス（以下“AstV”とする）による集団胃腸炎発生が報告^{1)~8)}されている。当所では、調査研究事業として昨年より SV, AiV, AstV のウイルス検索を実施しており、昨年に引き続き、集団胃腸炎発生事例と感染症発生動向調査事業検体について調査したので報告する。

材 料

2008 年に発生した集団胃腸炎事件でノロウイルスの検査依頼があり、ノロウイルスが検出されなかった 5 事例の糞便計 54 検体（集団発生事例）（表 1）、さらに、2008 年 1 月から 12 月に感染症発生動向調査事業で搬

入された検体のうち、胃腸炎等の診断名でノロウイルスが検出されなかった糞便計 227 検体（散発事例）（表 2）、合計 281 検体について検索を行った。

表 1 検討した集団発生事例

検査依頼年月日	管轄保健所	検体数
2008年 5月24日	会津	10
2008年 6月17日	県北	6
2008年 9月18日	会津	6
2008年10月17日	会津	17
2008年10月30日	会津	15
計		54

方 法

採取液に採られた直腸拭い液等の場合はそのまま、生の糞便検体の場合は、PBS で 10%乳剤を作成し、それぞれ激しく攪拌した後、11,000rpm, 20 分間冷却遠心し RNA の抽出を行った。RNA の抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を使用した。DNase 処理後、RT 反応を Super Script II RT(Invitrogen), または High-Capacity cDNA RT Kits(Applied Biosystems)により行い、cDNA

表 2 検討した散発事例

受付月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計
検体数	35	17	25	25	22	12	26	9	11	17	14	14	227

を作成した。作成後、原田らの構築した RT-multiplex PCR 法⁹⁾により SV, AiV, AstV について PCR 反応を実施した。これは、3 種類のウイルスを 1 本のチューブで同時に検出可能な方法で、労力と時間及び経費の削減を図ることができる。1st PCR で遺伝子増幅産物が認められた場合には、2nd PCR で確認検査を行った。使用したプライマー(表 3)、および反応条件は下記のとおりである。

PCR 産物は、3%Nusieve3:1Agarose を使用して電気泳動後、エチジウムブロマイド染色

表 3 使用したプライマーとPCR産物のバンドのサイズと反応条件
バンドのサイズ

		プライマー	サイズ(bp)
SV	1st	SR80/JV33	320
	2nd	SR80/Sapo-rev4534	189
AiV	1st	C6261/C6779	519
	2nd	C94b/C264k	266
AstV	1st	Mon269/Mon270	449
	2nd	Mon244/82b	410

反応条件

94 °C	3 分	} 40 サイクル (2nd は 30 サイクル)
94 °C	30 秒	
50 °C	30 秒	
72 °C	60 秒	
72 °C	7 分	
4 °C	保存	

液で染色して UV 照射で写真撮影し、バンドの確認を行った。それぞれのウイルスに該当する位置にバンドが確認された場合は、バンドを切り出し、MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN)にて精製した。精製した PCR 産物は Big Dye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)でサイクルシーケンシング反応を行った。その産物を BigDye XTerminator 精製キット(Applied Biosystems)で精製後、ABIPRISM 3100-Avant(Applied Biosystems)を使用して塩基配列を決定し、さらに BLAST(DDBJ)を用いて相同性検索を行った。SV については、表 3 のプライマーを使用しての相同性検索では、genogroup の特定ができなかった検体があったため、相同性検索には「ウイルス性下痢症診断マニュアル」(第 3 版)(平成 15 年 7 月国立感染症研究所)に準じて、1st PCR は SV-F11/SV-R1 (780bp)、2ndPCR は SV-F2/SV-R2 (430bp) のプライマーを使用した。

結果及び考察

1 集団発生事例

集団発生事例 5 事例の検体からは、SV, AiV, AstV はいずれも検出されなかった。

2 散発事例

1) SV

散発事例 227 検体のうち、SV が 9 検体から検出された(表 4)。genogroup では、G I が 8 検体、G II が 1 検体であった。年齢は 9

表 4 散発事例におけるSV検出症例

No.	Genogroup	検体採取月日	性別	年齢	診断名	症状					管轄保健所
						発熱	下痢	嘔気	嘔吐	腹痛	
1	G I	1月20日	女	4歳	感染性胃腸炎			○	○	○	郡山市
2	G II	6月2日	男	3歳	急性胃腸炎		○		○		郡山市
3	G I	6月5日	男	6歳	急性胃腸炎		○	○	○		郡山市
4	G I	7月25日	男	1歳	胃腸炎	○	○	○	○		相双
5	G I	7月28日	男	10ヶ月	大腸炎		○				相双
6	G I	7月31日	男	3歳	胃腸炎			○	○	○	相双
7	G I	11月4日	男	2歳	感染性胃腸炎		○	○	○		いわき市
8	G I	11月14日	男	4歳	感染性胃腸炎		○		○		郡山市
9	G I	11月12日	男	2歳	感染性胃腸炎		○				いわき市

検体中 8 検体が 4 歳以下であり、1 検体を除き男児からの検出であった。症状は下痢と嘔吐がそれぞれ 7 名、嘔気が 5 名、腹痛が 2 名、発熱が 1 名であった。また、3 検体は上気道炎を伴っていた。採取月による季節性は見られなかった。昨年検出された SV (G II) 1 検体を含めた 10 検体について、系統樹解析の結果を図 1 に示した。G I に分類された 8 検体のうち、No.1, 3, 7 の 3 検体は、SLV/Mex14917 (AF435813) 近縁株であった。これらは、採取時期及び地区が異なっており、散発的な発生であった。また、No.4, 5, 6 の 3 検体は、SLV/Lyon/30388 (AJ251991) 近縁株であった。これらは、採取時期及び地区も同一であり、この時期、相双地区において、SLV/Lyon/30388 株に近縁な SV による地域流行があったものと推測される。また、No.8, 9 の 2 検体は、Manchester/93 (X86560) 近縁株であった。これらは、採取時期及び地区が異なっており、それぞれの地域での散発的な発生であったことが推測される。No.2 は G II に分類され、SLV/Bristol/98/UK (AJ249939) 近縁株であった。昨年検出された 1 検体もこのタイプの株であり、越年で検出されている。採取時期及び地区は異なっており、散発的な発生であった。

今回、検出された SV は、G I、G II の 2 つの genogroup であったが、最近では、G IV による集団発生が報告されている。SV もノロウイルスと同様に集団胃腸炎の原因として注意する必要がある、引き続き検索を実施していくとともに、検出感度のよい検索方法を検討していきたい。

2) AstV

AstV は 4 検体から検出された (表 5)。年齢は 3 検体が 3 歳以下であり、性別も 3 検体が女児であった。症状は、下痢が 4 名、発熱、嘔吐がそれぞれ 3 名、腹痛が 1 名であった。1 検体は上気道炎を伴っていた。今回、血清型別までは検討していないため型別発生状況は不明であるが、4 検体は、全て郡山地区からの検出であり、同地区における AstV の地域流行が推測された。今後、血清型別の検索を実施してより詳細な検討を加えたいと考える。

3) AiV

AiV は散発事例からも検出されなかった。

引用文献

- 1)入谷展弘, 改田厚, 阿部仁一郎, 他. 2008 年 11 月に保育所で認められたサポウイルスによる集団胃腸炎事例—大阪市. 病原微生物検出情報. 2008 ; 30 : 13.
- 2)大塚有加, 近藤玲子, 市川高子, 他. 結婚式場におけるサポウイルスを原因とする食中毒—愛媛県. 病原微生物検出情報. 2008 ; 29 : 198-200.
- 3)吉田徹也, 粕尾しず子, 畔田由佳, 他. 長野県内で発生したサポウイルスによる集団感染性胃腸炎の 2 事例. 病原微生物検出情報. 2008 ; 29 : 129-132.
- 4)藪内益郎, 金澤祐子, 廣岡貴之, 他. 身体障害者療護施設におけるサポウイルスによる集団嘔吐下痢症事例—和歌山市. 2008 ; 29 : 48-49.
- 5)山下照夫, 都築秀明, 小林慎一, 他. 胃腸炎患者から分離された新型ピコルナウイルス

表 5 散発事例におけるAstV検出症例

No.	検体採取月日	性別	年齢	診断名	症状					管轄保健所
					発熱	下痢	嘔気	嘔吐	腹痛	
1	5月6日	女	3歳	感染性胃腸炎		○		○	○	郡山市
2	6月11日	女	3歳	感染性胃腸炎	○	○		○		郡山市
3	6月25日	男	8歳	急性胃腸炎	○	○				郡山市
4	10月20日	女	8ヶ月	感染性胃腸炎	○	○		○		郡山市

(アイチウイルス)のRT-PCR法による検出。臨床とウイルス。1999；27：127-132。

6)小河正雄，田代潔子，吉用省三，他。アイチウイルスが検出された食中毒事例—大分県。病原微生物検出情報。2006；27：13。

7)Oishi I, et al. A largr outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. J Infect Dis. 1994；170：439-443。

8)森功次。アデノウイルス感染症・アストロウイルス感染症。公衆衛生。2007；12：994-997。

9)原田誠也，濱洲大輔，荒平雄二，他。サポウイルス，アストロウイルス及びアイチウイルス同時検出RT-multiplex PCR法の構築と下痢症起因ウイルスの検査成績。熊本県保健環境科学研究所報。2004；34：31-36。

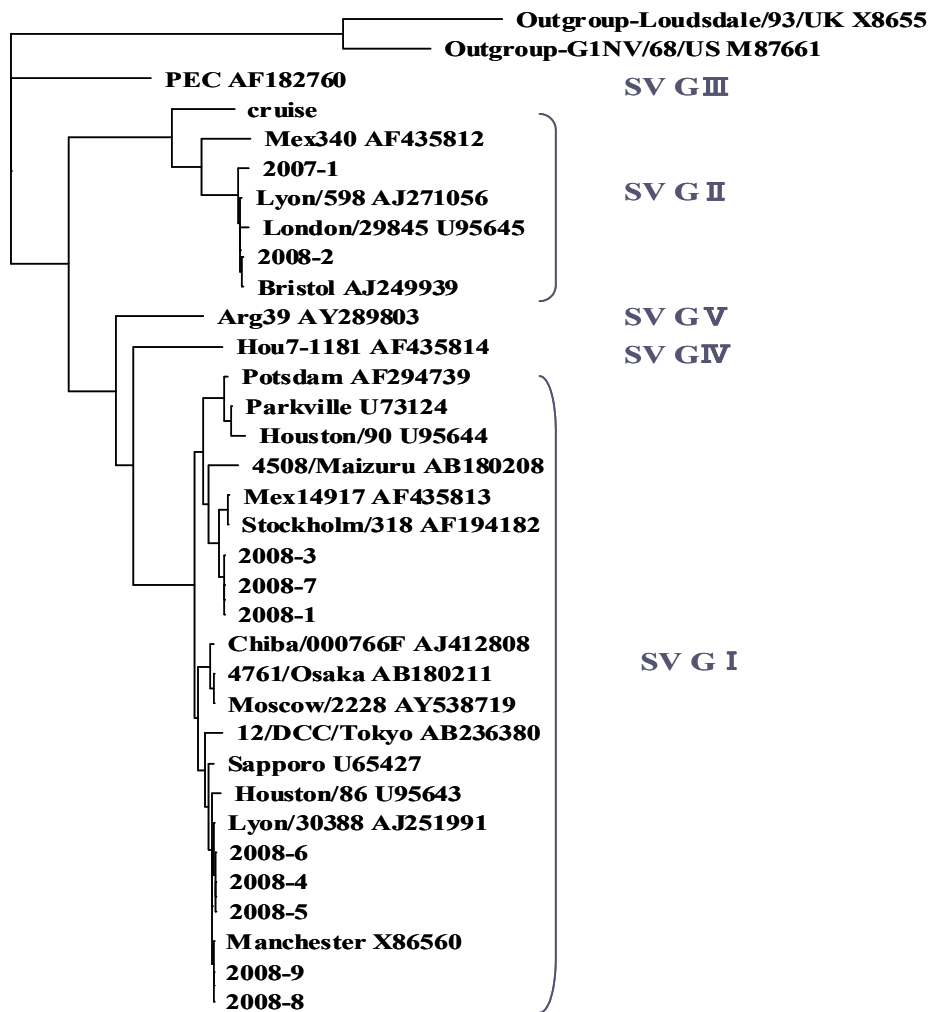


図1 SVの分子系統樹