

胃腸炎起因ウイルス検索に関する研究

柏原尚子 北川和寛 五十嵐郁美 門馬直太 金成篤子¹⁾ 廣瀬昌子²⁾ 平澤恭子 三川正秀
³⁾大竹俊秀

微生物課, ¹⁾県北保健福祉事務所, ²⁾試験検査課, ³⁾前衛生研究所

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 RT-PCR 法により実施した。2009 年に発生した集団胃腸炎事例でノロウイルス及び食中毒起因菌が検出されなかった 1 事例からは、いずれのウイルスも検出されなかった。2009 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散発事例 99 検体について検索を行った結果、サポウイルスが 6 検体から、アストロウイルスが 4 検体から検出された。

また、サポウイルスについて、調査研究を開始した 2007 年からの検体を対象に Okada ら¹⁾のプライマーを用いて追加検索を行った結果、これまで検出されなかった Genogroup IV のサポウイルスが新たに 17 検体から検出された。

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、Genogroup

はじめに

ノロウイルスは集団食中毒、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注目されている。厚生労働省の調査によると、近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。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）による集団胃腸炎事例^{2)~9)}が報告されている。当所では、調査研究事業として 2007 年度から SV, AiV, AstV のウイルス検索を実施しており、2009 年も胃腸炎の集団および散発事例について検索したので報告する。また、SV については新たな検索方法により、過去の陰性検体の追加検索も行ったので併せて報告する。

材 料

胃腸炎の集団発生事例として 2009 年にノロウイルスの検査依頼があったもののうち、ノロウイルスや細菌などの病因物質が検出されなかった 1 事例（2009 年 12 月 8 日に依頼があった糞便 8 検体）、さらに散発事例として 2009 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 99 検体（表 1）、合計 107 検体について検索を行った。

また、SV の追加検索については 2007 年から 2009 年までに集団発生事例で病因物質が検出されなかった 8 事例の糞便計 75 検体、感染症発生動向調査事業で搬入された 385 検体の合計 460 検体について検討を行った。

方 法

RNA の抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を使用した。DNase 処理後、RT

表 1 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	14	12	8	14	10	12	8	4	7	3	3	4	99

反応を Super Script II RT (Invitrogen), または High-Capacity cDNA RT Kits (Applied Biosystems) により行い, cDNA を作成した.

PCR 反応は, 原田らの RT-multiplex PCR 法¹⁰⁾ により SV, AiV, AstV について実施した. SV については国立感染症研究所のウイルス性下痢症診断マニュアル(第3版)の方法も併用した.

アガロースゲル電気泳動後, 目的のバンド部分を切り出し, PCR 産物の抽出・精製を行い, Big Dye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) でサイクルシーケンス反応を行い, ABIPRISM 3100-Avant, 3130-Avant (Applied Biosystems) を使用して塩基配列を決定し, BLAST (DDBJ) により相同性検索を行った.

ウイルスが検出された検体は, PCR による型別も行った. SV の型別には Okada らの遺伝子型別 RT-PCR¹⁾ を, AstV の型別にはウイルス性下痢症診断マニュアルの血清型別 RT-PCR を行った.

また, SV については Okada らのプライマーを用いた RT-PCR 法による追加検索を行った.

結果及び考察

1 集団発生事例

2009 年の集団発生事例の検体からは, SV, AiV, AstV のいずれも検出されなかった. また, 2007 年, 2008 年に発生した 7 事例について, Okada らの方法で SV の追加検索を行ったが, SV は検出されなかった.

2 散発事例

1) SV

(1)multiplex PCR 法による検出

2009 年の散発事例 99 検体のうち, SV が 6 検体から検出された(表 2). Genogroup では, G I が 3 検体, G II が 3 検体であった. 年齢は 6 検体中 4 検体が 2 歳以下であり, 男児 4 名, 女児 2 名からの検出であった. 症状は嘔吐が 5 名, 下痢が 4 名, 発熱が 3 名, 嘔気, 腹痛がそれぞれ 2 名であった. また, 3 検体は上気道炎を伴っていた. これら 6 検体について系統樹解析を行った結果を図 1 に示した. G I に分類された No.2, 3, 6 の 3 検体は, Potsdam (AF294739) 近縁株であった. No.2, 3 は, 採取時期及び採取地区も同一であり, 相双地区において同株に近縁な SV による地域流行があったものと推測される. G II に分類された 3 検体のうち, No.1 は Bristol (AJ249939) 近縁株であった. このタイプの株は 2007, 2008 年にも 1 株ずつ検出されている. No.4, 5 は Chiba/990763 (AJ606690) 近縁株であった. 採取時期はほぼ同時期, 採取地区は同一であり, 相双地区において同株に近縁な SV による地域流行があったものと推測される.

(2)RT-PCR による遺伝子型別

2009 年の散発事例で SV が検出された 6 検体について RT-PCR による型別を行った. 1 検体を除く 5 検体がシーケンスの結果と同じ Genogroup に分類された. さらに 2007, 2008 年に検出された SV10 検体¹¹⁾¹²⁾についても同様に型別を行ったところ, 1 検体を除く 9 検体が系統樹解析の結果と同じ Genogroup に分類された. 今後, シーケンスをしなくても遺伝子型別 RT-PCR を行うことにより Genogroup の特定が容易にできるものと考えられる.

(3)Okada らの RT-PCR 法による追加検索

表 2 散発事例における SV 検出症例 (2009 年)

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	II	2009年2月20日	男	2歳	胃腸炎				○		相双
2	I	2009年4月20日	女	13歳	大腸炎	○	○	○	○	○	相双
3	I	2009年5月1日	男	1歳	扁桃炎、胃腸炎	○	○		○		相双
4	II	2009年5月26日	男	5歳	扁桃炎、胃腸炎	○				○	相双
5	II	2009年6月29日	男	2歳	胃腸炎		○	○	○		相双
6	I	2009年7月19日	女	2歳	感染性胃腸炎		○		○		郡山市

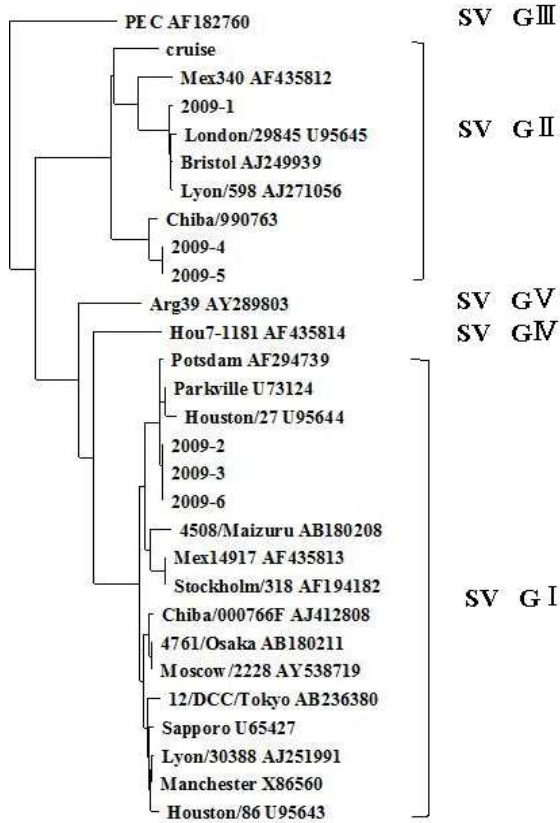


図 1 SVの分子系統樹

調査研究を開始した 2007 年から 2009 年の間に multiplex PCR 法で検出された SV は合計 16 検体で、G I、G II の 2 つの Genogroup であった。国内で検出される SV は G I が最も多く、次いで G II が多いが、2007 年に他県において G IV による集団発生^{3) -5)}が報告されている。原田らの RT-multiplex PCR 法、ウイルス性下痢症診断マニュアルのプライマーでは G IV、G V が検出されにくい¹³⁾ため、G I ~ G V を幅広く検出できる Okada らのプライマーを使用して、2007 年から 2009 年の集団発生事例、散発事例について追加検索を行った。その結果、2007 年から 2008 年の計 17 検体から新たに SV が検出された(表 3)。これらの検体について系統樹解析を行った結果、17 検体全てが G IV に分類された。G IV は当所で初めての検出となった。全国の病原微生物検出情報によると 2007 年 9 月から 12 月までに検出された SV で、Genogroup が特定できた 90 例のうち 88 例が G IV と報告されている^{3) -5)}。当所で同時期に検出された SV は 15 検体で、14 検体が G IV、1 検体が G II と全国と同様な検出状況となった。また、2007 年に横浜、京都、大阪、愛媛、熊本で検出された G IV と当所で検出された G IV は高い相同性を示していた。このタイプ

表 3 散発事例における SVGIV 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	
1	IV	2007年9月26日	女	1歳	熱性けいれん		○	○		相双
2	IV	2007年10月18日	女	7歳	大腸炎		○		○	相双
3	IV	2007年10月18日	男	11歳	大腸炎		○		○	相双
4	IV	2007年10月17日	男	10歳	感染性胃腸炎		○	○	○	郡山市
5	IV	2007年10月29日	女	5歳	感染性胃腸炎	○	○			いわき市
6	IV	2007年11月8日	男	4歳	胃腸炎		○	○	○	相双
7	IV	2007年11月3日	男	1歳	感染性胃腸炎	○	○		○	郡山市
8	IV	2007年11月20日	女	9歳	急性胃腸炎					郡山市
9	IV	2007年12月5日	女	4歳	胃腸炎		○	○	○	相双
10	IV	2007年12月17日	女	10ヶ月	喘息様気管支炎 胃腸炎		○			相双
11	IV	2007年11月20日	女	40歳	感染性胃腸炎	○		○	○	郡山市
12	IV	2007年11月30日	女	1歳	感染性胃腸炎		○		○	郡山市
13	IV	2007年12月22日	女	33歳	感染性胃腸炎	○	○		○	郡山市
14	IV	2007年12月24日	男	7歳	感染性胃腸炎	○	○		○	郡山市
15	IV	2008年1月3日	女	34歳	感染性胃腸炎	○	○	○		郡山市
16	IV	2008年1月5日	男	4歳	感染性胃腸炎	○	○		○	郡山市
17	IV	2008年8月12日	女	2歳	急性胃腸炎	○	○	○		郡山市

の SV が全国的に広く流行していたものと推測される。また、これらの検体について RT-PCR による型別を行った結果、17 検体全てが系統樹解析の結果と同様、G IV に分類された。

今回初めて検出された G IV は追加検索で使用した Okada らのプライマーからのみ検出されている。今後、Okada らのプライマーを使用することにより、SV を幅広く検出できるものと考えられる。

SV は保育園や福祉施設などでの集団発生や食中毒事例の報告がされている。今後、ノロウイルスと同様に集団胃腸炎の原因として SV も検索対象としていく必要があると考えられる。

2) AstV

AstV は 4 検体から検出された (表 4)。年齢は 3 検体が 4 歳以下であり、男児 1 名、女児 3 名からの検出であった。症状は、下痢が 4 名、発熱、嘔気、嘔吐、腹痛がそれぞれ 2 名であった。1 検体は上気道炎を伴っていた。

検出された AstV について、ウイルス性下痢症診断マニュアルの血清型別 RT-PCR による型別を行った。No.1, 2, 4 の 3 検体が 1 型に分類された。これらの検体は採取時期は異なるが採取地区はすべて郡山地区であり、同地区での散発的な発生があったと推測される。No.3 は目的の位置にバンドが確認されず型別できなかった。ウイルス量が少なかったため 1stPCR のみで行った血清型別では検出されなかったものと考えられる。また、2008 年に検出された AstV4 検体¹²⁾について同様に血清型別を行ったところ、1 型、2 型がそれぞれ 1 検体で、他の 2 検体は型別できなかった。

AstV は主に乳幼児に急性胃腸炎を起こす

とされている。2007 年 9 月の調査開始から AstV は 8 検体検出されたが、6 検体が 4 歳以下の乳幼児からの検出であった。病原微生物検出情報によると AstV は例年 30 数件検出され、主な血清型は 1 型の報告である¹⁴⁾。当所でも血清型について同様の傾向が見られた。当所で検出した 8 検体はすべて散発事例からの検出であるが、年間を通じて検出があり、また、他県において集団発生事例の報告があることから、集団胃腸炎の原因として SV と同様に AstV も検索対象としていく必要があると考えられる。

3) AiV

AiV については、集団発生事例、散発事例のいずれからも検出されなかった。全国での検出状況も少ない。しかし、過去に集団発生、また食中毒事例の報告がされているため、ウイルスが検出されない胃腸炎事例には AiV の検索を継続していく必要があると思われる。

引用文献

- 1) Okada M, et al. The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers. Archives of Virology. 2006 ; 151 : 2503-2509.
- 2) 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. 2009 ; 30 : 13.
- 3) 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.

表 4 散発事例における AstV 検出症例 (2009 年)

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	2008年12月4日	女	2歳	急性胃腸炎		○				郡山市
2	2009年2月9日	女	4歳	急性胃腸炎	○	○	○		○	郡山市
3	2009年3月3日	女	12歳	胃腸炎 大腸炎		○	○	○	○	相双
4	2009年8月3日	男	1歳	髄膜炎疑い、急性胃腸炎疑い	○	○		○		郡山市

- 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. 病原微生物検出情報. 2008 ; 29 : 48-49.
- 5) 宇根秀三, 熊崎真琴, 野口有三, 他. 修学旅行時に発生したサポウイルスによる集団食中毒事例—横浜市. 病原微生物検出情報. 2007 ; 28 : 294-295.
- 6) 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 (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.
- 7) 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.
- 8) Oishi I, et al. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. J Infect Dis. 1994 ; 170 : 439-443.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 金成篤子, 五十嵐郁美, 柏原尚子, 他. 胃腸炎起因ウイルスに関する研究. 福島県衛生研究所年報. 2007 : 39-42.
- 12) 柏原尚子, 五十嵐郁美, 門馬直太, 他. 胃腸炎起因ウイルスに関する研究. 福島県衛生研究所年報. 2008 : 37-40.
- 13) 野田衛. ウイルス性食中毒の検査. 臨床と微生物. 2008 ; Vol. 35. 10:585-591.
- 14) 国立感染症研究所, 病原微生物検出情報, 年別 ウイルス検出状況, 由来ヒト:胃腸炎ウイルス, 2007～2011年.
<https://hasseidoko.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data64j.pdf> 2011/1/21.