

(1) 報 文

- 1) シークエンスによるA群コクサッキーウイルスの同定……………21
- 2) 2003-2004に流行したノロウイルスについて……………23

シーケンスによるA群コクサッキーウイルスの同定

小河正雄

Identification of Coxsackie A Virus by Sequencing

Masao Ogawa

Key words : シーケンス Sequence、A群コクサッキーウイルス coxsackie A virus

要旨

A群コクサッキーウイルスの同定に遺伝子学的方法を用い、従来の補体結合法（以下、CF法）による同定結果と比較した。標準株については正しく同定できたが、分離株については13株中5株が一致し、2株が不一致、6株がシーケンスできず型別不能であった。

はじめに

A群コクサッキーウイルスは、小児のヘルパンギーナや手足口病の原因ウイルスである。血清型は24型あり、ヘルパンギーナはコクサッキーウイルスA（以下、CA_o）4やCA10、CA6、CA2、CA5が多く、手足口病はCA16が多い。なお、手足口病はエンテロウイルス71によっても起きる。これらの疾病の原因ウイルスは毎年変わるので、患者からウイルス分離を行い、ウイルスの各血清型の流行状況を知ることが、疾病の流行予測や予防には重要である。ウイルス分離は細胞では困難で、乳のみマウスを用いる。ウイルスの同定は、CF法を用いるが、手技が煩雑で、ウイルスの抗原性の変異で同定困難な例も多い。

厚生労働省科学研究補助事業「地方衛生研究所の地域における健康危機の在り方に関する研究」、「手足口病の病原体を中心としたエンテロウイルスの同定支援」におけるシーケンスによる同定法の普及に関する研究¹⁾に参加し、遺伝子検査によるA群コクサッキーウイルスの同定法について検討したので報告する。

材料及び方法

検査材料は、CA3、CA4、CA5、CA6、CA10、CA16の標準株、及び当センターで1998年と1999年に分離

したA群コクサッキーウイルス13株を用いた。

ウイルスRNAの抽出には、QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) を用いた。逆転写反応は、Super Script II 逆転写酵素（インビトロジェン）を用い、42°C30分、99°C5分反応させた。PCRは、Ex-Taq (Takara) を用い、94°C3分を1サイクル、94°C30秒、55°C30秒、72°C1分を40サイクル、72°C5分を1サイクルの反応条件で行った。プライマーは、エンテロウイルスのVP0領域の444 - 1197を増幅する、MD91 (5'-cctccggcccctgaatgcgcta-3') と 0L68 (5'-ggtaayttccaccaccanc-3') を用いた。サーマルサイクラーは、GeneAmp PCR System 2400R (日本ロッシュ) を用いた。PCR産物は、MiniElute PCR Purification kit (QIAGEN) を用いて精製した。シーケンス反応は、蒸留水9μl、Bigdye (ABI) 4μl、×5 Sequencing Buffer 2μl、プライマー3μl、PCR産物2μlを反応液とし、96°C15秒を1サイクル、96°C10秒、50°C5秒、60°C4分を25サイクル反応させた。シーケンス反応産物の精製は、セントリセップスピンカラム (ABI) を用い、シーケンサー (ABI PRISM 310NT) でPCR産物の遺伝子配列を決定した。

シーケンスデータは、5'側からATGGGの部分を探し、それより前の部分をカットした。また、ATGGGから399base取り、それ以降をカットした。Clustal Xを用いてPCR産物のシーケンスデータ及びA群コクサッキーウイルスデータベースのアラインメントを行い、Tree Viewを用いて分子系統樹を作成し、ウ

イルスの同定を行った。

結 果

CA 3、CA 4、CA 5、CA 6、CA10、CA16の標準株は、全てPCRで目的遺伝子が増幅され(図1)、系統樹解析による血清型と一致した(図2)。分離株では、CF法でCA 3とされた3株中1株はシーケンスによる血清型別(以下、遺伝子型別)でCA 3と同定された。他の1株はCA16と同定され、もう一株はシーケンスできなかつた。CF法でCA 4と同定された4株中1株が遺伝子型別でCA 4、もう1株がCA16と同定され、他の2株はシーケンスできなかつた。CF法でCA 5と同定された1株は、遺伝子型別でCA 5と同定された。CF法でCA 6と同定された3株中2株は遺伝子型別でCA 6と同定され、他の1株はシーケンスできなかつた。CF法でCA10と同定された2株は、シーケンスできなかつた(表1)。

考 察

標準株でCF法による血清型と遺伝子型別による血清型が一致したので、VP0領域を対象としたRT-PCR法及びシーケンスと系統樹による血清型別法は妥当なものと考えられる。一方、分離株については13株中5株がCF法と遺伝子型別による血清型が一致し、2株が不一致、6株がシーケンスできず型別不能であった。型別不一致となった2株は、いずれも遺伝子型別でCA16と同定された。ヘルパンギーナの患者から分離されたウイルスの同定に用いるCF法の抗血清として、通常CA 2、CA 3、CA 4、CA 5、CA 6、CA 8、CA10を用い、分離頻度の低いCA 7やCA16の抗血清は入れていない。そのため、CA16がCF法で交差反応の強かった血清型に同定されてしまったと推定される。シーケンスできなかつた6株は、いずれもPCRで遺伝子が充分増幅されていなかったため、もとのウイルス量が少なかったか、RT-PCR法の条件が不十分であった可能性がある。今後、VP 1領域のプライマーを用いた同定も検討し、より正確な同定を実施したい。

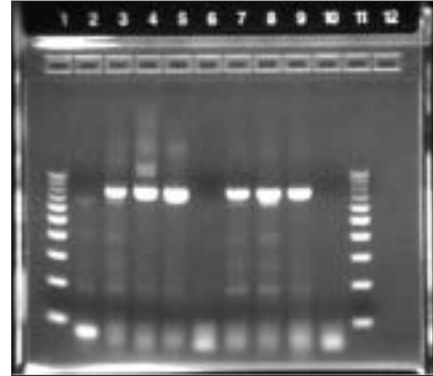
謝 辞

稿を終えるに当たり、同定方法及びA群コクサッキーウイルスデータベースファイル、解析用のプロ

グラムについて御教示を頂いた愛知県衛生研究所の榮賢司先生に深謝します。

参 考 文 献

- 1) 加藤一夫 他：地方衛生研究所の地域における健康危機管理の在り方に関する研究 平成13年度総括・分担研究報告書, 80-83 (2002), 厚生科学研究費補助金 健康科学総合研究事業



1. マーカー
3. CA 3
4. CA 4
5. CA 5
7. CA 6
8. CA10
9. CA16
11. マーカー

図1 標準株のPCR産物電気泳動

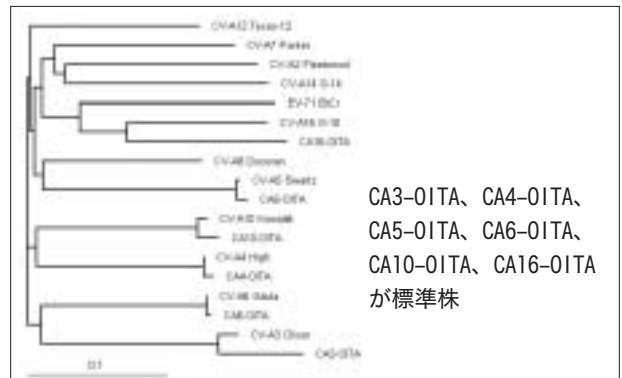


図2 標準株の分子系統樹

表1 分離株のCF法と遺伝子型別による血清型

No	検体 No	CF法	遺伝子血清型
1	980765	CA 3	—
2	981048	CA 3	CA16
3	981099	CA 3	CA 3
4	980943	CA 4	—
5	980828	CA 4	CA16
6	990543	CA 4	CA 4
7	990570	CA 4	—
8	980818	CA 5	CA 5
9	981153	CA 6	CA 6
10	990425	CA 6	CA 6
11	990601	CA 6	—
12	981113	CA10	—
13	981107	CA10	—

2003—2004に流行したノロウイルスについて

小河正雄、田代潔子、吉用省三

Norovirus disease in Oita, 2003–2004

Masao Ogawa, Kiyoko Tashiro, Shozo Yoshimochi

Key words : ノロウイルス norovirus、胃腸炎 gastroenteritis

要旨

2003年度に、大分県で発生した集団胃腸炎、散発性のウイルス性感染性胃腸炎及びカキ等の2枚貝から検出したノロウイルスの遺伝子型を調査した。遺伝子群はGIよりもGIIが多く、遺伝子型ではGII/4が最も多く検出され、次いでGII/3、GII/2、GI/1であった。

はじめに

ノロウイルスは、1968年アメリカ合衆国のオハイオ州ノーウォークの小学校で発生した集団胃腸炎の患者から検出されたウイルスで、当時はノーウォークウイルスと呼ばれていた。その後、非細菌性胃腸炎からノーウォークウイルスと類似した小型球形ウイルスが多く発見され、小型球形ウイルス又はノーウォーク様ウイルスと呼ばれた。ウイルスの遺伝子を調べると大きく2種類に分類されることが明らかとなり、ウイルス性胃腸炎の大部分がノーウォーク様ウイルスと呼ばれていたウイルスが起因ウイルスであることが判明した。2002年8月に開かれた国際ウイルス命名委員会がこのウイルスはノロウイルスと命名され、他方のウイルスはサポウイルスと命名された。現在では、ノロウイルスは、Genogroup I (GI) と Genogroup II (GII) の2つの遺伝子群に分類され、さらにそれぞれI4とI7の遺伝子型に分類される¹⁾。

集団胃腸炎から検出されたノロウイルスについては、以前からGIとGIIの分類を行っており、GIIが多く分離されることが明らかとなってきた。しかし、遺伝子型については不明であった。我々は、2003年度に発生した集団胃腸炎及び、感染症発生動向調査で依頼された感染症胃腸炎から検出されたノロウイルスについて、その流行状況を知るため遺伝子型を調査したので報告する。

材料及び方法

検査材料は、2003年4月から2004年3月の間に発生した食中毒や感染症の集団胃腸炎20事例に関連した便137件、吐物4件、食品43件、及びウイルス性の感染性胃腸炎として感染症発生動向調査で検査依頼のあった便38検体を用いた。また、2003年5月、12月と2004年1月に収去したカキ等の二枚貝31検体を用いた。

ノロウイルスの検出は、平成15年11月5日付け食安監発第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「ノロウイルスの検出法について」に基づいて、RT-PCR法でウイルス遺伝子を検出し、シークエンスによる遺伝子配列で確定した。さらに、遺伝子配列はClustal Xでアラインメントを行い、TreeViewで系統樹を作成し、遺伝子型を決定した。

結 果

1. 集団事例

20事例中14事例からノロウイルスを検出した。ノロウイルスが検出されなかった6事例中5事例から病原性細菌が検出され、残りの1事例からは病原体は検出されなかった(表1)。患者からノロウイルスGIIが検出されたのは12事例で、検出事例の85.7%を

占めた。GIIの遺伝子型は、GII/4が最も多く7事例から検出され、GII/2が3事例、GII/3が3事例、GII/12が1事例から検出された。患者からノロウイルスGIが検出されたのは3事例で、検出事例の21.4%を占めた。GIの遺伝子型は、GI/1が2事例、GI/8が1事例、不明が1事例から検出された。

患者から複数の遺伝子型が検出された事例は、3事例あった。事例5は、福祉施設で起きた事例であり、患者5人中2人からGII/2が検出され、1人からGII/2及びGI/3が、1人からGII/4が検出された。ま

た、調理従事者7人中5人からGII/4が検出され、1人からGII/2が検出された。患者と調理従事者から検出されたノロウイルスの遺伝子型は一部が重複するのみであり、感染経路は不明であった。事例13は、患者5人中4人からGII/3が検出され、1人からGII/3及びGI/8が検出された。原因食品は、カキであった。事例19は、患者からGII/3が1件、GII/12が1件、GI/1が1件検出された。食品からはGII/4が2件検出された。この事例は、カキやハマグリ、アワビ等海産物のバーベキューが共通食品であった。カ

表1 ノロウイルス感染症集団発生事例

事例番号	発生月	検体数			検出されたノロウイルスの遺伝子型 (検出数)			
		便	と物	食品	合計	患者	従業員	食品
事例1	4	1			1	GI		
事例2	5	19			19			
事例3	5	6			6	GII/2(1)		
事例4	7	2			2	GII/2(2)		
事例5	7	14		6	20	GII/2(3), GII/4(1), GI/3(1)	GII/4(5), GII/2(1)	
事例6	8	2			2			
事例7	10	2	1		3			
事例8	11	4			4	GII/4(4)		
事例9	11	2			2			
事例10	11	3			3			
事例11	11	22		2	24	GII/4(8)	GII/4(6)	
事例12	12	10		17	27	GII/4(8)		GII/4(1)
事例13	12	5			5	GII/3(5), GI/8(1)		
事例14	12	3	2		5	GII/4(4)	GII/3(1)	
事例15	1	6	1		7	GII/3(6)		
事例16	1	2			2	GI/1(1)		
事例17	1	11		9	20	GII/4(4)	GII/4(2)	
事例18	1	4			4	GII/4(2)		
事例19	2	12		9	21	GII/3(1), GII/12(1), GI/1(1)		GII/4(2)
事例20	2	7		0	7			
合計		137	4	43	184			

表2 ノロウイルス感染症散発事例

No.	検体採取月	遺伝子型
1	12	GII/3
2	12	GII/4
3	12	GII/4
4	12	GII/3
5	12	GII/4
6	12	GII/4
7	12	GII/3
8	12	GII/4
9	1	GII/4

表4 集団事例、散発事例、食品におけるノロウイルスの検出状況

遺伝子型	集団事例	散発事例	食品
GI/不明	1		
GI/1	2		1
GI/3			2
GI/8	1		
GII/2	3		
GII/3	3	3	
GII/4	7	6	5
GII/12	1		

表3 2枚貝のノロウイルス検出状況

No.	検体採取月	検体数	検出ウイルス (検出数)	備考
1	4	3	GI/3(1)	カキ
2	12	17	GII/4(2)	カキ、ヒオウギガイ
3	1	11	GII/4(3), GI/1(1), GI/3(1)	カキ、ヒオウギガイ
		31		

キ等の2枚貝が原因の胃腸炎は、複数の遺伝子型のノロウイルスが検出される傾向にある。

ウイルスの検出状況を月別に見ると、GIではGI/8が12月に1件、GI/1が2月と3月に1件ずつ検出された(図1)。GIIでは、GII/2が5月と7月に検出され、GII/4が7月及び11月、12月、1月に検出された。GII/3は、12月、1月、2月に検出され、GII/12は2月に検出された(図2)。流行時期により、検出されるノロウイルスの遺伝子型が変化している。

2. 散発事例

GIは検出されず、GIIのみが9件検出された。遺伝子型はGII/4が6件、GII/3が3件であり、GII/4が主流であった。月別では、1月にGII/4が5件、GII/3が3件検出され、2月はGII/4が1件検出された(表2)。

3. 食品検査

5月に取去したカキからGI/3を1件検出した。12月に取去したカキ及びヒオウギガイからGII/4を1件ずつ検出した。1月に取去したカキ及びヒオウギガイからGII/4を3件、GI/1を1件、GI/2を1件検出した(表3)。

考 察

従来は、ノロウイルスはGIとGIIの遺伝子群までしか分類されていなかった。そして、検出されるウイルスの大部分がGIIであった。このため、集団発生事例では患者と、従業員、食品からノロウイルスGIIが検出されても正確な感染経路の推定は困難であった。2004年3月に、片山らは欧米の研究者と協議のうえ遺伝子型番号を決定した¹⁾。この遺伝子型番号に基づき、2003年度からノロウイルスの遺伝子型別を実施したところ、事例により患者や施設従業員、

食品から様々な遺伝子型のノロウイルスが検出され、より正確な感染経路の推定が可能となった。集団発生事例では、事例11や事例12、事例17では、患者と施設従事者又は、原因食品から同一遺伝子型のノロウイルスが検出され、食品を通じての胃腸炎の可能性が高いことが推定された。また、事例13、事例19のようにカキが原因食品と推定される事例では、複数の遺伝子型のノロウイルスが検出され、2枚貝による食中毒であることを間接的に証明する結果となった。事例5では、患者と施設従事者のノロウイルスの遺伝子が1部重複するものの、大多数が異なっていた。これは、食品を通じてではなく、ヒト-ヒト感染で広がった可能性が高いと推定された。

検出された遺伝子型で最も多いのがGII/4であり、次いでGII/3、GII/2、GI/1であった(表4)。GIとGIIの遺伝子型が現在合わせて31型あるが、今回検出されたのは7型であった。年によりどのような遺伝子型のノロウイルスが流行しているのか現在不明であるが、今後、データを積み重ねて明らかにしていきたい。イギリス北部では、Bristol(GII/4)型とHawaii(GII/1)型が、流行の中心となる遺伝子型であったとの報告がある²⁾。このように、他地域で検出されたノロウイルスの遺伝子型に関する情報が集まれば、地域的な流行の様子が明らかとなり、ノロウイルスによる胃腸炎の予防対策に役立つと思われる。

文 献

- 1) IDWR 2004年第11週 第6巻 第11号 14-19
感染症の話 ノロウイルス感染症
- 2) Gallimore CI, Green J, Lewis D, Richards AF, Lopman BA, Hale AD, Eglin R, Gray JJ, Brown DW: Diversity of noroviruses cocirculating in the north of England from 1998 to 2001., J. Clin. Microbiol., 42, 1396-1401, 2004

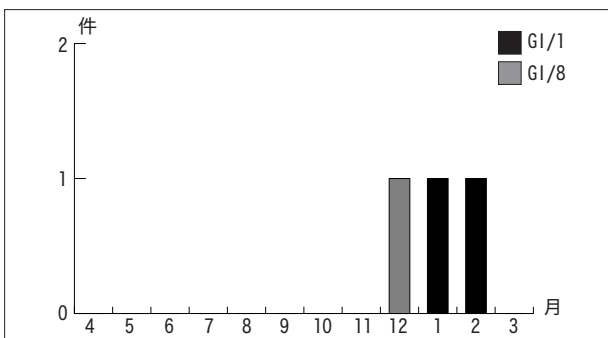


図1 ノロウイルスGIの流行状況(集団事例)

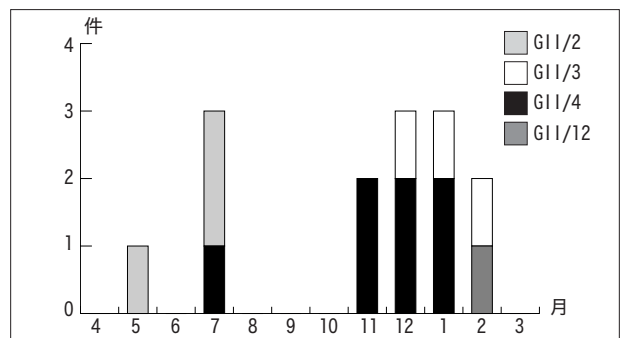


図2 ノロウイルスGIIの流行状況(集団事例)

