

感染性胃腸炎患者における小型球形ウイルスの消長

長島真美*, 吉田靖子*, 田部井由紀子*, 長谷川道弥*,
林志直*, 森功次*, 佐々木由紀子*, 野口やよい*,
平田一郎*, 関根大正**, 小久保彌太郎**, 諸角聖**

Detection of Small Round-Structured Viruses from Gastroenteritis Patients

MAMI NAGASHIMA*, YASUKO YOSHIDA*, YUKIKO TABELI*, MICHIIYA HASEGAWA*,
YUKINAO HAYASHI*, KOHJI MORI*, YUKIKO SASAKI*, YAYOI NOGUCHI*,
ICHIRO HIRATA*, HIROMASA SEKINE**, YATARO KOKUBO** and SATOSHI MOROZUMI**

Keywords : 小型球形ウイルス small round-structured virus (SRSV), 急性胃腸炎 acute gastroenteritis

はじめに

小型球形ウイルス (Small Round-Structured Virus : SRSV) はヒトに嘔吐, 下痢を主訴とする急性胃腸炎を引き起こすウイルスである。食品や水を介して経口感染し, 冬期に発生する食中毒や急性胃腸炎の主要な病原体として注目されている。

厚生省は1997年5月に食品衛生法の一部を改定し, 食中毒の起因物質として新たにSRSVを追加した。これを受けて, 当研究科では1997年11月より食中毒発生時におけるSRSV検査を開始し, これまでに食中毒及び有症苦情事例のSRSV検出成績を報告してきた¹⁻⁴⁾。また当研究科では, 感染症発生動向調査における感染性胃腸炎患者のSRSV検査も実施している。著者らはこの感染症発生動向調査において, 1999年11月下旬から2000年1月中旬にかけて都内の病院で発生したSRSV胃腸炎の集団感染事例を経験した。現在この事例について, 検出されたSRSVの詳細な遺伝子解析をはじめ, 感染源や感染経路等の疫学的検討を行っているところである。今回は, 本事例においてSRSV感染患者を3週間から1ヶ月半という長期間にわたり追跡調査を行う機会を得て, 継続的にSRSV検査を実施することができた。その結果, SRSVの消長に関する若干の知見を得たので, その成績を報告する。

なお, 現在国際レベルで小型球形ウイルスの新規分類と名称の統一作業が進められており, 暫定的な名称とし

てNorwalk-like Viruses (NLVs) が提唱されているが, 本文では従来から使用されているSRSVの名称を用いた。

検査材料及び方法

1. 検査材料

供試した材料は, 1999年11月29日に都内の病院で集団発生した感染性胃腸炎患者のうち, 2000年1月19日までの間に追跡調査できた患者5名のふん便18件である。その内訳は患者Aのふん便が6件, 患者B~Eのふん便がそれぞれ3件ずつである。5名の患者は, 新生児4名と1歳児1名である。

2. 遺伝子検査

ふん便からのSRSV検査は以下の手順に従って行った。

1) ふん便からのウイルスRNA抽出

ふん便材料0.5gをリン酸緩衝液 (PBS) で10.0%のふん便乳剤にし, 3,000rpm, 15分遠心した。沈渣を除き, 6,000 rpm, 30分遠心した後, 上清をさらに27,000rpm, 3時間遠心した。沈渣を滅菌蒸留水 (ddw) 200.0 µlに溶解し, ふん便試料とした。

タンパク質凝集剤による凝集分配法によりふん便試料20.0 µlからRNAを抽出し, ddw10.0 µlに再溶解した (RNA抽出液)。

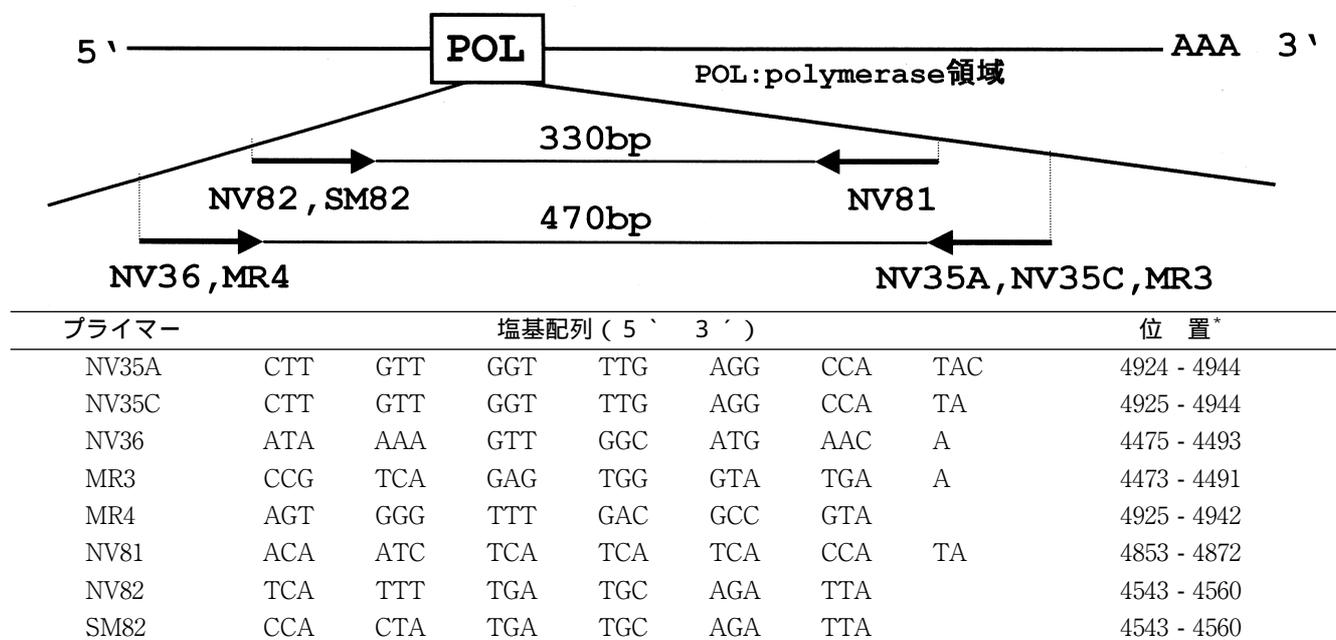
2) Reverse Transcription-nested-Polymerase Chain Reaction (RT-nested-PCR) 法

RNA抽出液5.0 µlに50.0 µMのプライマー-NV35A,

* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

** 同微生物部



* : Norwalk virusの塩基配列に相当する位置

図1. RT-nested-PCRに使用したプライマーの塩基配列及び位置

NV35C, MR4プライマー^{5,6)}を各0.2 μ l加え(図1.), 70 10分処理し, 氷冷した. 逆転写反応試薬9.4 μ l (10 \times Reaction buffer 1.5 μ l, 2.5mM dNTPs 4.0 μ l, 40.0 U/ μ l RNase Inhibitor 0.5 μ l, 33.0U/ μ l AMV RTase XL 0.15 μ l, ddw 3.25 μ l)を加え, 41 1分, 60分逆転写反応をさせ, cDNAを合成した. 次にcDNAに1st PCR試薬85.0 μ l (10 \times PCR buffer 8.5 μ l, 2.5mM dNTPs 4.0 μ l, 5.0U/ μ l Taq polymerase 0.4 μ l, ddw 71.7 μ l, 50.0 μ M NV36およびMR3プライマー^{5,6)}各0.2 μ l)を加え, 94 1分, 50 2分, 72 2分の反応を35回行った. さらに2nd PCR試薬47.0 μ l (10 \times PCR buffer 5.0 μ l, 2.5mM dNTPs 4.0 μ l, 5.0U/ μ l Taq polymerase 0.2 μ l, ddw 37.2 μ l, 50.0 μ M NV81, NV82およびSM82プライマー⁶⁾各0.2 μ l)に1st PCR産物3.0 μ lを加え, 94 1分, 50 2分, 72 2分の反応を35回行った.

2nd PCR産物をエチジウムブロマイドを添加した2.0%アガロースゲルにて電気泳動し, 紫外線照射下で特異的バンドの確認を行った.

2. ドットハイブリダイゼーション法による確認試験

検出されたSRSV遺伝子の確認試験として, ドットハイブリダイゼーション法を行った. すなわち, ナイロン膜に2nd PCR産物4.0 μ lをプロットし, UVクロスリンカーでDNAをナイロン膜上に固定した. プレハイブリダイゼーション後, 蛍光標識したG およびG プローブ²⁾と50 で一晩反応させた. その後, X線フィルムに感光させてプローブによる型別を行った.

3. 電子顕微鏡によるSRSV粒子の確認

ふん便試料4.0 μ lを2.0%リンタングステン酸ナトリウム4.0 μ lと混和し, ホルムバールコートされた400メッシュの銅グリッド上に載せ, 風乾させた. その後, 40万倍の倍率で観察し, ウイルス粒子の確認を行った.

4. 塩基配列の決定

各患者において, RT-nested-PCR法で最初にSRSV遺伝子が検出された検体と最後に検出された検体の2nd PCR産物90.0 μ lを3.0%低融点アガロースゲルで電気泳動し, 特異的バンド部分を切り出した後, フェノール抽出によりゲルからDNA断片を回収した. エタノール沈殿による精製後, DNAシーケンサーによる塩基配列の決定を行った. さらに得られた配列の分子系統樹解析を行った.

5. 10倍段階希釈法によるふん便中に存在するSRSV RNA量の定量

10⁰から10⁻⁵の範囲で10倍段階希釈したRNA抽出液5.0 μ lを用いて, RT-nested-PCR法を行い, 特異的バンドの有無によりふん便中に存在するSRSVのRNA量を定量した.

結 果

1. 患者ふん便からのSRSV遺伝子検出成績

1999年12月3日~2000年1月19日の期間に採取された患者5名のふん便試料からのSRSV遺伝子検出成績を表1に示した. 患者A(11月29日発症)については, 発症後5日目(12/3:A1), 10日目(12/8:A2), 16日目

表1. 患者ふん便からのSRSV遺伝子検出成績

患者	発症年月日	ふん便からのSRSV遺伝子検出成績 (採取日別)					
		12/3	12/8	12/14	12/21	12/28	1/19
A	1999.11.29.	+	+	+	+	+	-
B	12.14.	NT	NT	+	NT	+	-
C	12.21.	NT	NT	-	+	+	NT
D	12.14.	NT	NT	+	+	+	NT
E	12.14.	NT	NT	+	+	+	NT

NT: 検査未実施

表2. 10倍段階希釈法によるSRSV遺伝子の検出成績

患者	ふん便採取日	RNA希釈倍数					
		10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
A	12/ 3	+	+	+	+	+	-
	12/ 8	+	+	+	+	-	-
	12/14	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	12/21	+	+	+	-	-	-
	12/28	+	+	+	-	-	-
	1/19	-	-	-	-	-	-
B	12/14	+	+	+	-	-	-
	12/28	+	-	-	-	-	-
	1/19	-	-	-	-	-	-

NT: 検査未実施

(12/14:A3), 23日目(12/21:A4), 30日目(12/28:A5) 及び発症から約1ヶ月半後(1/19:A6)のふん便を対象にRT-nested-PCR法によるSRSV検査を行ったところ, 5日目から30日目までの5検体からSRSV遺伝子が検出されたが, 1ヶ月半後のふん便からはSRSV遺伝子は検出されなかった. 患者B(発症12月14日)では, 発症当

日(B1)及び15日目(B2)のふん便はSRSV遺伝子陽性で, 35日目(B3)のふん便はSRSV遺伝子陰性であった. 患者Bと同日に発症した患者DとEでは, 発症日(それぞれD1,E1), 8日目(D2,E2)及び15日目(D3,E3)のいずれもSRSV遺伝子陽性であった. また, 患者Cについても発症日(C2), 8日目(C3)のふん便からSRSV遺伝子が検出された.

患者A及びBのふん便については, SRSVのRNA量を定量したので, その結果を表2に示した. 患者Aのふん便は, 5日目では10⁴, 10日目では10³, 30日目では10²希釈まで検出でき, しいにRNA量が減少した. 患者Bのふん便では発症日が10²希釈まで, 15日目ではRNA抽出液の原液でのみ検出可能であった. したがって, 患者Aではふん便試料10.0µl中のウイルスRNA量が26日間で100分の1になり, 患者Bでは15日間で100分の1になった.

また, 今回検出されたSRSV遺伝子をドットハイブリダイゼーション法確認したところ, すべてのSRSV遺伝

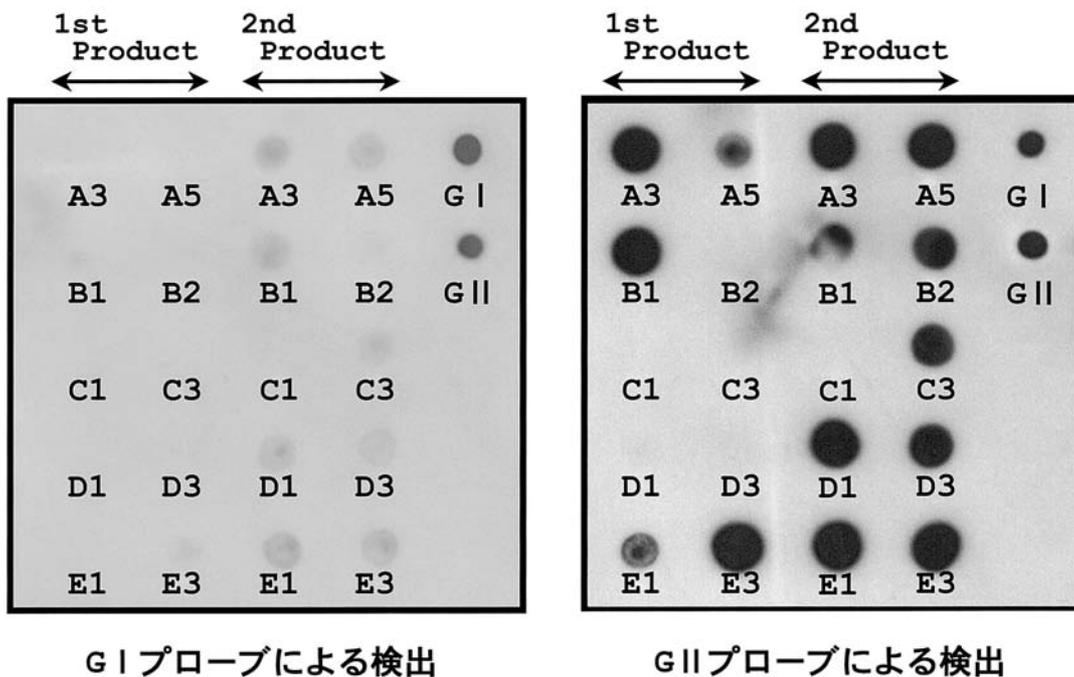


図2. ドットハイブリダイゼーション法によるSRSV遺伝子の検出

検体名	アミノ酸配列 (ポリメラーゼ領域)				
OTH	HYDADYSRWD	STQQRVLAA	ALEIMVRFSA	EPQLAQIVAE	DLLAPSVVDV
A1	*****	*****	*****	*****	*****
A5	*****	*****	*****	*****	*****
B1	*****	*****	*****	*****	*****
B3	*****	*****	*****	*****	*****
C2	*****	*****	*****	*****	*****
C3	*****	*****	*****	*****	*****
D1	*****	*****	*****	*****	*****
D3	*****	*****	*****	*****	*****
E1	*****	*****	*****	*****	*****
E3	*****	*****	*****	*****	*****

OTH	GDPKITINEG	LPSGVFCTSQ	WNSIAHWLLT	LCALSEVTGL	GPDI IQANS
A1	*****	*****	*****	*****	*****
A5	*****	*****	*****	*****	*****
B1	*****	*****	*****	*****	*****
B3	*****	*****	*****	*****	*****
C2	*****	*****	*****	*****	*****
C3	*****	*****	*****	*****	*****
D1	*****	*****	*****	*****	*****
D3	*****	*****	*****	*****	*****
E1	*****	*****	*****	*****	*****
E3	*****	*****	*****	*****	*****

OTH: OTH-25/89/J

図3. 患者A~Eのアミノ酸配列

子がG タイプであった (図2).

2. 電子顕微鏡によるSRSV粒子の確認

SRSV遺伝子は5名の患者すべてのふん便から検出されたが、電子顕微鏡によるSRSV粒子の観察ではすべて陰性で、いずれの患者ふん便からもSRSV粒子は検出できなかった。

3. 塩基配列の決定

各患者のふん便について、最初に検出されたSRSV遺伝子と最後に確認されたSRSV遺伝子が同一であるか否かを確認する目的で、それぞれのPCR産物の塩基配列を決定した。その遺伝子配列の相同性を比較した結果、すべての遺伝子配列およびアミノ酸配列が一致した (図3)。さらにNeighbour-Joining法 (N-J法) によりSRSV代表株13株と比較したところ、今回検出したSRSVの遺伝子型はG タイプのOTH-25/89/J株⁵⁾に近い株であった (図4)。

考 察

SRSVはヒトの腸管でのみ増殖する。現在のところヒト以外の動物や細胞での増殖系がないため、各種の実験ができず、SRSVはあらゆる面で不明な点が多い。

SRSVによる胃腸炎症状は、多くの場合治療をしなくとも3~5日で自然に治癒し、予後は良好であることから、病原ウイルスの検索は通常1回であり、SRSV感染患者のふん便を長期にわたって検査した例はほとんどない。しかし今回、著者らは3週間から1ヶ月半という長期間にわたり、SRSV感染患者5人について追跡調査を行うことができた。RT-nested-PCR法で継続的にふん便中のSRSVを検査したところ、短くとも15日、長ければ30日以上長期にわたってSRSVが排泄されることが明らかとなった。Jiangらは、ボランティアにSRSVを摂食させ、RT-PCR法によりSRSVの排泄期間を追ったところ、最長で15日までSRSVが排泄されていたと報告⁷⁾している。Jiangらの成績はPCR反応が一段階のRT-PCR

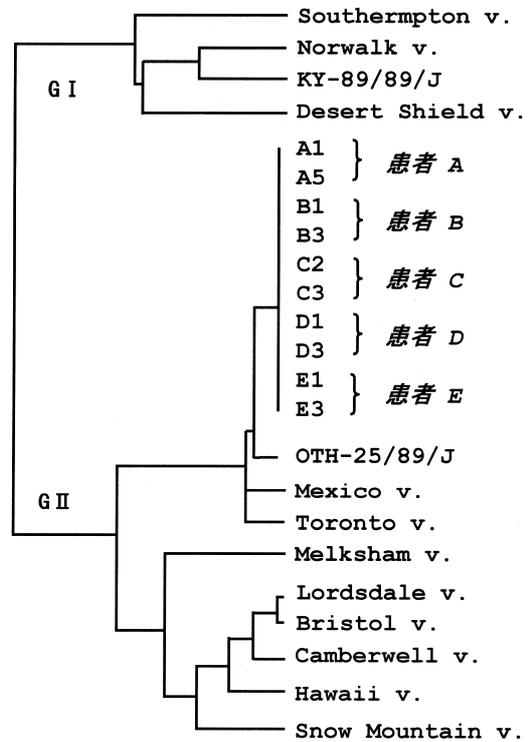


図4. Neighbour-Joining法による塩基配列の系統樹
Accession Number: Hawaii v.(U07611), OTH25/89/J (L23830), Mexico v. (U22498), Toronto v. (U02030) Southernmpton v. (L07418), Norwalk v. (M87611), KY-89/89/J (L23828), Desert Shield v. (U04469) Melksham v. (X81879), Snow Mountain v. (L23831), Lordsdale v. (X86553), v. (X76716), Camberwell v. (U46500)

法であるのに対し、今回は二段階のRT-nested-PCR法であることを考慮しなければならないが、著者らの成績は、Jiangらの成績をはるかに上回るものであった。通常SRSVは症状消失からせいぜい一週間程度しかふん便中に出現せず、感染性も4日程度と考えられていたが、今回得られた結果から考えると、SRSV感染患者は症状が消失した後でも、病後ウイルス保有者として、長期にわたり感染源となりうる可能性が示唆された。ただし、今回の患者5名は、新生児及び1歳児であることを念頭に置く必要がある。

SRSVの感染経路はSRSVに汚染された貝類の喫食によるものが圧倒的に多い。その他の感染経路としては、かち割り氷や井戸水、湧き水を感染源とする水による感染^{8,10)}、患者の嘔吐物を介してのヒトからヒトへの感染¹¹⁾、感染した食品従事者が調理した食品を介しての感染¹²⁻¹⁵⁾等が報告されている。感染した食品従事者を介しての感染事例では、すべての従事者が発症していたわけではなく、不顕性感染の従事者から二次感染していたことが報告されている。このことから、長期にわたってふん便中にウイルスを排泄する病後のSRSV保有者も二次感染源にな

る可能性が高く、今後十分注意を払っていく必要がある。

また最近、小学校や保育園等を中心に原因不明のSRSV胃腸炎の集団発生事例が多発している⁴⁾。これらの事例のうち、長期間にわたって患者発生をしているような事例においては、感染源に病後ウイルス保有者の存在も念頭に入れて疫学調査をしていく必要があると思われる。

ま と め

1) 3週間から1ヶ月半という期間にわたり、SRSV感染患者5名(新生児4名及び1歳児1名)のふん便を対象にRT-nested-PCR法によりSRSVの検査を行ったところ、短くとも15日以上、長ければ30日以上SRSVが排泄されていたことが確認された。

2) SRSV感染者は症状が消失した後も感染源となりうる可能性が示唆された。

文 献

- 1) 佐々木由紀子, 中村敦子, 門間公夫, 他: 東京衛研年報, 49, 12-16, 1998.
- 2) 森功次, 林志直, 佐々木由紀子, 他: 東京衛研年報, 50, 9-11, 1999.
- 3) 平田一郎: 月刊フードケミカル, (6), 38-42, 2000.

- 4) 平田一郎: 月刊HACCP, (8), 86-90, 2000.
- 5) Wang, J., Jiang, X., Madore, H.P., *et al.*: *J Virol.*, 68, 5982-5990, 1994.
- 6) Saito, H., Saito, S., Kamada, K., *et al.*: *Microbiol. Immunol.*, 42, 439-446, 1998.
- 7) Jiang, X., Wang, J., Graham, D.Y., *et al.*: *J Clin Microbiol.*, 30, 2529-2534, 1992.
- 8) Cannon, R.O., Poliner, J.R., *et al.*: *J Infect Dis.*, 164, 860-863, 1991.
- 9) Koopwan, J.S., Eckert, E.A., *et al.*: *Am. J. Epidemiol.*, 115, 173-177, 1982.
- 10) Jenkins, S., Horman, J.T., *et al.*: *Am. J. Dis. Child.*, 139, 787-789, 1985.
- 11) Gary, J.J., Green, J., *et al.*: *J. Med. Virol.*, 52, 425-429, 1997.
- 12) Parashar, U.D., Dow, L., *et al.*: *Epidemiol. Infect.*, 121, 615-621, 1998.
- 13) Kilgore, P.E., Belay, E.D., *et al.*: *J. Infect. Dis.*, 173, 787-793, 1996.
- 14) Chandler, B., *et al.*: *MMWR*, 49, 207-211, 2000.
- 15) Daniels, N., *et al.*: *J. Infect. Dis.*, 181, 1467-1470, 2000.