

C群ロタウイルスの検出された集団胃腸炎事例の検討

野 口 やよい*, 森 功 次*, 佐々木 由紀子*, 林 志 直*,
村 田 以和夫*, 諸 角 聖**

Investigation on the Outbreak of Gastroenteritis due to Group C Rotavirus in Tokyo

Yayoi NOGUCHI*, Koji MORI*, Yukiko SASAKI*, Yukinao HAYASHI*,
Iwao MURATA* and Satoshi MOROZUMI**

Keywords: C群ロタウイルスgroup C rotavirus, 胃腸炎gastroenteritis, 集団発生outbreak

はじめに

ロタウイルスは、乳幼児下痢症の病因ウイルスとして最も重要なものである。本ウイルスの主要な感染部位は腸管であり、ほ乳類および鳥類に顕性、不顕性の感染をおこす。本ウイルスは、ウイルス粒子内殻タンパクの抗原性、遺伝学的違いによりA群からF群に分類されている。このうち、ヒトへの感染が報告されているのはA, B, C群で、家畜や鳥類からD, E, F群が検出されている¹⁾。

ヒトのロタウイルス感染症においてはA群ロタウイルスの検出頻度が最も高く、冬季乳幼児下痢症の主要な原因ウイルスとなっている。一方、C群ロタウイルスによる報告事例は、国立感染症研究所感染症情報センターの病原微生物検出情報(<http://idsc.nih.go.jp>)によってもA群に比べて極めて少ない。

2001年3月、東京都内で発生したC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例は、既に報告した1991年4月の事例²⁾以来である。この10年ぶりに発生した希少事例について、概要を述べるとともに検出ウイルスの遺伝子型について検討したので報告する。

材料および方法

1. 検査対象

患者が発生した小学校の児童56名、教員2名、学校給食の調理従事者7名のふん便65例と学校給食の検食材料12検体を、検査材料とした。検索対象ウイルスとしては、ノーウォークウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、腸管アデノウイルスにしぼって、電子顕微鏡法、酵素抗体法(ELISA法)、逆受身赤血球凝集反応(R-PHA法)、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法(RT-PCR法)、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE法)の5種の方法でウイルス検索を行った(図1)。

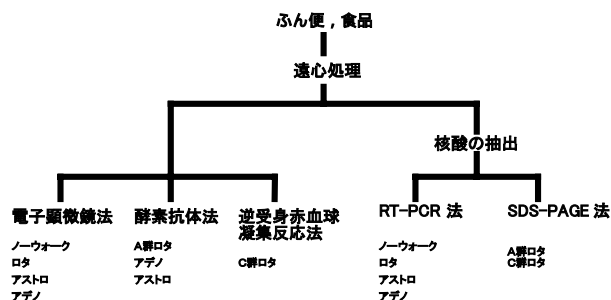


図1. ウイルス検索法

また、検出されたロタウイルスについては、モノクローナル抗体を用いた血清型別、およびPCR産物について遺伝子型別を実施した。

2. ふん便材料の調整

リン酸緩衝液(pH7.3ダルベッコ日水)を用いてふん便材料の10%乳剤を調製し、等量のHCF-141b(ダイキン工業)を混合した後、1,500×g,10分間冷却遠心(日立工機)により上層部水相を取り、さらに3,000×g,30分間の冷却遠心(日立工機)を行い、再び水相を回収した。次いで、100,000×g,3時間超遠心(日立工機)により沈さを得て、TN緩衝液(0.01mol/Lトリス-塩酸,0.15mol/LNaCl,pH7.5)400μLに浮遊し検査材料とした。

3. 食品材料の調製

食品材料は1gにつき、上記リン酸緩衝液10mL加え、ストマッカー(ELMEX)で1分間圧出することにより10%乳剤とし、以後の処理はふん便と同様に行い検査材料とした。

4. 核酸の抽出

ウイルス核酸の抽出はJiangらの方法³⁾に準じたCTAB法で行った。既報⁴⁾のようにプロテイナーゼK消化、CTAB処理、フェノール抽出、エタノール沈殿によりRNA試料を得た。

* 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, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都立衛生研究所微生物部

5. 電子顕微鏡法

コロジオン膜を張った200グリッドの銅製メッシュ(応研商事)に遠心処理した試料を載せ,3%リンタングステン酸でネガティブ染色を行い,透過型電子顕微鏡(H7100,日立製作所)35,000倍の倍率で鏡検した。

6. 酵素抗体法

遠心処理をした試料を対象に, A群ロタウイルスはロタクロンTM(TFB社), 腸管アデノウイルスはアデノクローンETM(TFB社), アストロウイルスはIDEIA AstrovirusTM(ダコ社)の各キットを用いて, 添付書の術式にしたがって検出を試みた。

7. 逆受身赤血球凝集反応法

遠心処理した試料を対象に, C群ロタウイルス検出試薬(デンカ生研)を用いて, 添付書の方法により検査を行った。

8. RT-PCR法

遠心処理した試料から抽出した核酸(RNA)を対象に, ノーウォークウイルスのポリメラーゼ領域と, A群およびC群ロタウイルスのVP7領域, すなわち, 各ウイルスの特異性が高い領域についてRT-PCR法で検索を行った。

A群ロタウイルスVP7(1062bp)検出用のプライマーはGouveaらのプライマー⁶⁾でBeg9:5'-GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGCTGG-3'とEnd9:5'-GGTCACATCATACAATCTAATCTAAG-3'を, C群ロタウイルスVP7(1063bp)検出用のプライマーはJiangらのプライマー⁷⁾のBeg:5'-GGCATTTAAAAAGAAGAAGCTGT-3'とEnd:5'-AGCCACATGATCTTGTTCACG-3'を用いた。

RNAの逆転写はAMV由来の逆転写酵素を用い142 60分間行った。cDNAの増幅は, 増幅装置(PC700, アステック)で94 5分間を1回行った後, 94 1分間・42 3分間・72 3分間を1サイクルとし35回行い, 次いで72 10分間・25 5分間を1回行った。検出は2%アガロースゲルを支持体とした電気泳動を行った後, エチジウムブロマイド染色を施しUV照射(λ=302nm)により観察した。

9. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

遠心試料から抽出したウイルス核酸(RNA)を対象に, SDS-PAGE法により, ロタウイルスの検索を行った。すなわち, ウイルス核酸(RNA)の電気泳動は, 5-10%勾配濃度のポリアクリルアミドゲル(日京テクノス), トリス-グリシン緩衝液を用いて, Laemmliの方法⁵⁾に従った。銀染色は市販キット(Silver stain kitTM, 和光純薬)を用いて常法どおり使用説明書に従い, 泳動像を判定した。なお, A群ロタウイルスNCDV株およびWa株を標準株として用いた。

10. ロタウイルスの型別

1) モノクローナル抗体による血清型別法

検出されたA群ロタウイルスのVP7血清型別には, ロタMATM(セロテック社)のモノクローナル抗体を捕捉抗体, ロタクロンTMの酵素標識抗体を検出抗体として使用した。血清型別法はキットに添付された術式に従った。

2) 遺伝子型の解析

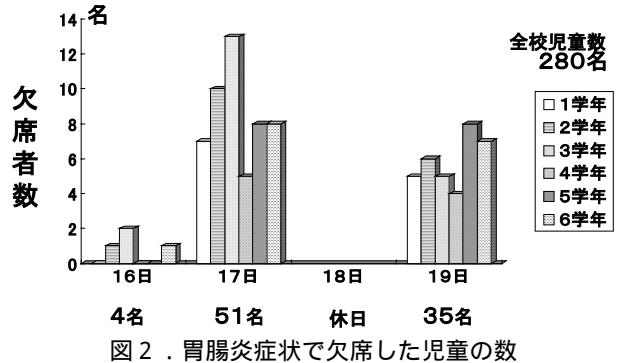
A群ロタウイルスとC群ロタウイルスのVP7領域のPCR産物についてダイターミネーター法(PRISM310, ABI社)による

塩基配列分析を行った。

成 績

1. 疫学的調査

保健所の調査によると, 集団胃腸炎は, 2001年3月16日児童数280名の都内の小学校で発生した。発生状況は, 図2に示すように, 胃腸炎症状で欠席した児童数が3月16日4名, 17日51名, 18日は日曜で休日ながら19日にもなお35名であった。欠席者は1学年から6学年まで学校全体におよんでいた。児童の発症者は3月19日の時点で90名であった。



調理従事者に発症者はいなかったが, 教職員1名に発症が認められた。

発症状況が判明した患者39名の発症日時を図3に示す。

12時間ごとにわけて患者数をグラフにすると, ピークは3月16日の午後で, 一峰性の分布を示した。

患者の主な症状は発熱(90%), 吐き気(84%), おう吐(84%), 下痢(80%), 腹痛(74%)で, 発熱は平均38.2 であった。

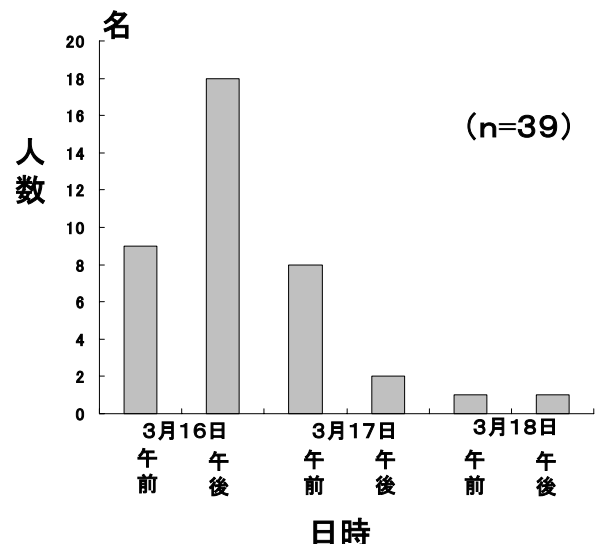


図3. 発症日時

2. 検査結果

1) 電子顕微鏡法

C群ロタウイルスは写真1に示すとおり, 電子顕微鏡による検索で, 患者ふん便3例中2例から直径約70nmのロタウイ

ルス粒子が観察された。その他のウイルス粒子は、観察されなかった。

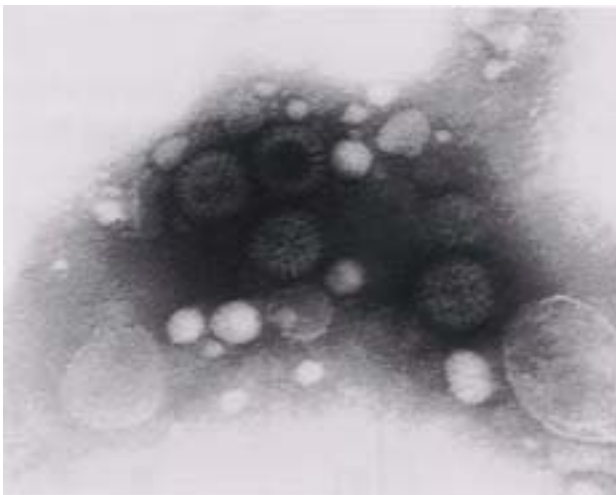


写真1. C群ロタウイルス粒子の透過型電子顕微鏡像

2) 酵素抗体法

ロタクロンTM、アデノクロンTM、IDEIA AstrovirusTMの各キットを用いてふん便材料の検査を行ったところ、65例中5例からA群ロタウイルスが検出された。A群ロタウイルス陽性者はすべて児童であり、兄弟2名からの検出例も認められた。アデノウイルス、アストロウイルスはいずれも陰性であった(表1)。

3) R-PHA法

ふん便材料65例についてC群ロタウイルスの検査を行い、31例から同ウイルスに特異的な抗原を検出した。C群ロタウイルス陽性者は児童29名のほか、教職員1名、調理従事者1名であった。ウイルスが陽性となった調理従事者は検査当日発症しておらず、7日後の再検査時にはウイルスは陰性であった。なお、A群とC群ロタウイルスの同時検出例は認められなかった(表1)。

表1. ロタウイルス検査結果

	検体数	A群ロタELISA 陽性数	C群ロタR-PHA 陽性数
児童ふん便	56 (56)	5 (5)	29 (29)
教員ふん便	2 (1)	0	1 (1)
調理従事者 ふん便	7 (0)	0	1 (0)
総数	65	5	31

()は発症者数

4) RT-PCR法

ノーウォークウイルスは、ふん便65例および検食材料12検体からはまったく検出されなかった。

ふん便65例のうち、5例からA群、34例からC群のロタウイルスVP7領域のPCR産物が得られた。

検食材料検体からはA群、C群ロタウイルス遺伝子は検出されなかった。

5) SDS-PAGE法

36例にロタウイルスRNA特有の11分節の泳動パターンが認められた。SDS-PAGEパターンを図4で示す。A群ロタウイルスRNAとC群ロタウイルスRNAの泳動パターンは、円で囲んだ5,6,7番目の分節の位置が異なる。本事例においても、A群は5,6番目の2分節が離れた位置にあり、C群は5,6,7番目の分節3本が近接位置にある泳動像パターンが確認された。A群ロタウイルスRNAの泳動パターン5例は、すべてロングパターンのWa株(レーン2)と比べて分節10,11の移動度が小さいショートパターンを示した。

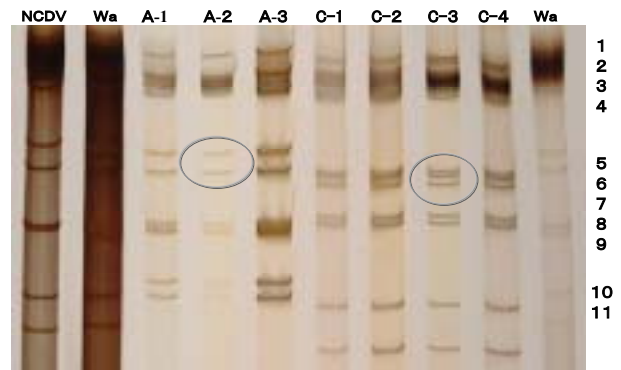


図4. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動像

N C D V, W a 標準株
A - 1, 2, 3 A群ロタウイルス
C - 1, 2, 3, 4 C群ロタウイルス

6) モノクローナル抗体による血清型別

ロタクロンTMで検出したA群ロタウイルス陽性5例を型別した結果、すべて2型であった。

7) 遺伝子解析

C群ロタウイルスVP7の系統樹を図5に、塩基配列を図6に示す。RT-PCR法で得られたC群ロタウイルスPCR産物の塩基配列から、患者由来のC群ロタウイルス01-3366株および01-3349株、そして調理従事者由来の01-3341株はアメリカ合衆国由来のBH株に97.3%近似した株であった。これら調理従事者から検出された1株と患者から検出された2株の塩基配列を比較した結果、99.8%の一致が認められた。なお、A群ロタウイルスは台湾由来のTW951245株に近似した株であった。

考 察

1991年4月、東京都八丈町の小学校における胃腸炎集団発生事例²⁾から10年を経て、今回、東京都区部の小学校における事例からC群ロタウイルスが検出された。C群ロタウイルス検出例は2月から4月に多い⁸⁾といわれているように、都内における2集団事例はいずれも同時期に発生している。年少者に多発するA群に比べC群ロタウイルスは比較的年長者に患者が多い⁸⁾といわれているが、今回のC群ロタウ

イルスの集団発生事例でも小学校高学年の児童と教職員に発症者がみられた。

保存してあった給食の検食材料からロタウイルスは検出されなかったが、患者の発症パターンが一峰性であり、調理従事者にもC群ロタウイルス陽性者が見出されたことから、食事を介したC群ロタウイルス感染が疑われた。しかし、ウイルスが検出された調理従事者は、未発症で経過し、7日後の再検査時ではウイルスは検出されなかった。

一方、A群ロタウイルスの陽性者は5例のみで3学年以下の低学年児童に限られたことから、本事例のA群ロタウイルス例は、食事を介した感染の可能性が低く、ヒト-ヒト感染が主な感染経路と考えられた。今回の事例では、A群とC群が同一検体から同時に検出された例はなかった。

本事例における感染源や感染経路解明のために、検出されたC群ロタウイルス調理従事者由来株と患者由来株の塩基配列を解析比較した結果、調理従事者由来株と患者由来株は、かなり類似した塩基配列であることが判明した。

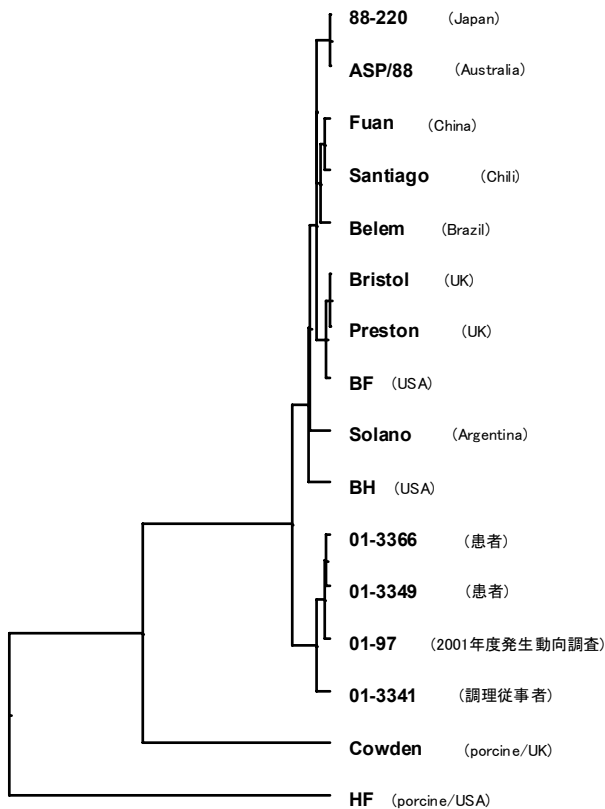


図5 . C群ロタウイルスVP7系統樹

しかしながら、児童と同じ給食を喫食して感染した可能性を否定できないことから、調理従事者に起因した発生とは確定できなかった。食中毒事例を決定する要素である、食品材料からもウイルスが検出できる感度の高い検出法の開発が急がれる。

ロタウイルスによる胃腸炎の報告のうち、A群によるものが多いのは、各種A群ロタウイルス市販キットで容易に検査が実施できることとも関連していると推定される。一方、R-PHA法によるC群ロタウイルス検査キットは、注文生産であるため、供給量が非常に少なく検査の実施は限定されている。また、本法は非特異凝集を除く前処理が必要であり、操作が煩雑であるうえ、結果の判定に経験を要するため、本検査の普及が遅れているものと思われる。

今回の事例は、集団食中毒の疑いで検査材料が当研究科に搬入されたもので、慎重に検査を進め、電子顕微鏡による鏡検および核酸の電気泳動等複数の並行した検査によって、C群ロタウイルスの集団例を10年ぶりに検出し得た。今後更に簡便な検査法が開発されれば、本症に対する取り組みがより一層強化されるものと思われる。

例年、冬から春にかけて、ノーウォークウイルスによる集団胃腸炎が多発する。今回の事例のように、ロタウイルスによる集団事例も少なからず認められることから、ノーウォークウイルス以外のウイルスによる胃腸炎も視野に入れ、原因不明の下痢症の解明に向けて積極的な検査を実施していく必要がある。

文 献

- 1) 小林宣道, 浦澤正三: ウイルス, 50, 157-172, 2000.
- 2) 関根整治, 林志直, 安藤民衛, 他: 感染症学雑誌, 67, 110-115, 1993.
- 3) Jiang, X., Graham, D.Y., Wang, K., *et al.*: *Science*, 250, 1580-1583, 1990.
- 4) 林志直, 森功次, 野口やよい, 他: 東京衛研年報, 51, 8-13, 2000.
- 5) Laemmler, U.K.: *Nature*, 227, 680-685, 1970.
- 6) Gouvea V., Glass R.I., Woods P., *et al.*: *J.Clin. Microbiol.*, 28, 276-282, 1990.
- 7) Alejandro A.Castello, Marcelo H.Argüelles, Guillermo A.Villegas, *et al.*: *J.Med.Virol.*, 62, 199-207, 2000.
- 8) 大瀬戸光明: 感染症雑誌, 64, 1264-1273, 1990.

01-3366	1:CTGACAAACTGGTCTTCTTTTAAATGGTTGTACAACATTGTACACTGTTTGCGCCATTCTCTTCTTTTTCATTATATATTACTATTTAGAAAA	100
01-3349	1:--CTGC.....	98
01-3341	1:--CGGC.....C.....C.....G.....G.....	98
01-97	1:--CGGC.....	98
BH	1:.....G.....T.....	100

01-3366	101:TGTTCCACCTAATAACTGATACTTTAATAGTGATTCTATTTTATCTAATTGTGTAGAGTGGTCACAATGTCAAATGTTCAATGATATATATTATA	200
01-3349	99:.....	198
01-3341	99:.....	198
01-97	99:.....	198
BH	101:.....A.....T.....G.....	200

01-3366	201:TGGTAATGTTGAGACGATCGTAAATCTACTGATCCTTTTAAATGTTGAATCTTATGTATTATTTTCCAAATGCAGTTGATAGGCACAAGGACCAGGT	300
01-3349	199:.....	298
01-3341	199:.....	298
01-97	199:.....	298
BH	201:.....A.....	300

01-3366	301:AAATCTGATGGACATTTGAATGATGGTAATTGCTCAGACTATCGCCACTTGTGTTGAAACAAAAGGATTCCAAAAGTTCAATAACTTAAAAACAT	400
01-3349	299:.....	398
01-3341	299:.....	398
01-97	299:.....	398
BH	301:.....C.....	400

01-3366	401:ATACACAGACATCAGATTTTCATAAATTCAGTAGAAATGACATGCTCTTATAACATAGTTATCATTCTGACAGCCCAAGTTCAGAATCTATTGAACA	500
01-3349	399:.....	498
01-3341	399:.....	498
01-97	399:.....	498
BH	401:.....G.....C.....T.....T.....A.....	500

01-3366	501:GATAGCAGAATGGATTTTAAATGTTGGAGATGTGATGACATGAATTTGAAATTTTACTTATGAACAAATGGGATAAACAATTTATGGGTCATTT	600
01-3349	499:.....	598
01-3341	499:.....	598
01-97	499:.....	598
BH	501:.....T.....	600

01-3366	601:GGTAGTGACTGCGATATATCTGTTGTCATTAGATACTACAAGTAATGGAATCGGATGCTCACCAGCTAGTACAGAACTTATGAAGTTGATCAAATG	700
01-3349	599:.....	698
01-3341	599:.....C.....	698
01-97	599:.....	698
BH	601:.....C.....T.....	700

01-3366	701:ACACCAATTGGCATTAAATTAATGTTGGATAATGTCAGACATAGGATACAGATGAACACTGCTCAATGCAAAATTAATAAATTTGATTAAGGGTGAGGC	800
01-3349	699:.....	798
01-3341	699:.....	798
01-97	699:.....	798
BH	701:T.....T.....A.....T.....	800

01-3366	801:TAGGCTGAATACTGCATTAATAAGGATTTCAACATCATCAAGTTTTGATAATTCGTTATCACCATTGATAATGCGCAAACTACAAGATCGTTTAAATA	900
01-3349	799:.....	898
01-3341	799:.....	898
01-97	799:.....	898
BH	801:C.....C.....A.....A.....C.....	900

01-3366	901:AATGCAAAAGAAATGGTGGACTATATTTATACGATAATTGATTACATTAATACAATGTCACAAGCAATGACTCCAGACATCGGGCAATTTTCCAGAAG	1000
01-3349	899:.....	998
01-3341	899:.....T.GC.....	998
01-97	899:.....	998
BH	901:.....A.....T.....	1000

01-3366	1001:GGTGGATGTGAGGT---	1014
01-3349	999:.....G.....	1011
01-3341	999:..G.TG..A.G.T----	1011
01-97	999:..A.....AG.T----	1011
BH	1001:.....TGA.GTAT	1017

01-3366,01-3349 : 患者、01-3341 : 調理従事者
01-97 : 2001年度発生動向調査
BH : 標準株 (accession number:U20988)

図6. C群ロタウイルスVP7塩基配列