

胃腸炎ウイルスの研究（2007年度）

Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama (2007-2008)

濱野雅子，藤井理津志，葛谷光隆，西島倫子，榎原幸二*，濃野 信**，金谷誠久***（ウイルス科）

Masako Hamano, Ritsushi Fujii, Mitsutaka Kuzuya, Michiko Nishijima,

Kouji Narahara, Shin Nouno and Tomohisa Kanadani

*岡山赤十字病院小児科

**のうの小児科

***国立病院岡山医療センター小児科

【調査研究】

胃腸炎ウイルスの研究 (2007年度)

Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama (2007-2008)

濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 西島倫子, 榎原幸二*, 濃野 信**, 金谷誠久*** (ウイルス科)

Masako Hamano, Ritsushi Fujii, Mitsutaka Kuzuya, Michiko Nishijima,

Kouji Narahara, Shin Nouno and Tomohisa Kanadani

*岡山赤十字病院小児科

**のうの小児科

***国立病院岡山医療センター小児科

要 旨

胃腸炎起因ウイルスのうち、C群ロタウイルス (CRV)、A群ロタウイルス (ARV) およびSRSVについての研究を行い、以下の結果を得た。①：開発したヒトCRV検出用の酵素抗体法又は逆受身血球凝集法及び電子顕微鏡法 (EM) 法で2007年度採取の患者糞便 (散発428件, 集発75件) を検査し、EM法でロタウイルス様粒子が観察された検体82件中2件でCRVが、78件でARVが検出された。2件については、免疫学的検出法では同定不能であったが、その他の80件については検査法に用いたモノクローナル抗体13A3との反応性が低いCRVの出現は認められなかった。②：ヒトに身近な愛玩動物であるイヌについて、CRVおよびARVの保有状況を調査した。2005年11月～2006年6月に採取されたイヌ (子犬47頭, 成犬136頭) 糞便について、ELISA法によるスクリーニング検査後、逆転写PCR法により確認検査を実施した。その結果、CRVについては全例陰性であったが、ARVについては14検体 (7.7%) が陽性であった。ARV陽性例の内訳は、子犬の検出率が14.9%と成犬 (5.1%) の約3倍であり、また便性状に特に異常がないにもかかわらず、多量のウイルスが存在している例が認められた。遺伝子解析の結果、検出されたARVはいずれも、外殻糖蛋白 (VP7) 血清型がG3型で外殻スパイク蛋白 (VP4) 遺伝子型がP[3]型、非構造蛋白質 (NSP4) の遺伝子型がCであった。さらに、検出ウイルスを相互に比較したところ、DA59株に代表されるものとDA172株に代表されるものの大きく2種類に分かれることがわかった。アミノ酸配列の系統解析の結果、DA59株は近年イタリアにおいて小児胃腸炎から検出されたP260/97株と密接な関連性がみられた一方で、DA172株は反芻獣由来ARVもしくはヒト由来ARVとの関連が示唆された。以上から、ヒトに対して潜在的な感染源となりうるARVが、県内のイヌの間で流行している実態が初めて明らかになった。③：2007年度の小児胃腸炎散発事例32検体、集団胃腸炎事例95検体のNV検索を行い、検出NVの遺伝子解析を行った。その結果、GI/8, GI/14, GII/4, GII/13が検出された。GII/4は昨年度と同じ2006b型類似で2007年12月までの検出頻度が高く、前シーズンの流行が継続していたものと推察された。2008年1月以降は多様な遺伝子型が検出された。また、SVおよびAstVについて2004年度～2006年度の散発事例検体164検体の検索を行い、それぞれ19.5%, 9.8%で陽性であった。検出されたウイルスの遺伝子群あるいは血清型は全国の検出傾向とほぼ一致していた。散発事例由来株の検出時期を検討した結果、3年間を通じての両ウイルスの検出ピーク月は、SVが2月、AstVが5月で、11月をピーク月とするNVとは流行のピークがずれており、三種類のウイルスがそれぞれ少しずつ異なる時期に流行していることが推察された。

[キーワード：C群ロタウイルス、A群ロタウイルス、ノロウイルス、モノクローナル抗体、分子疫学]

[Key words : Group C Rotavirus, Group A rotavirus, Norovirus, Monoclonal antibody, Molecular epidemiology]

1 はじめに

1.1 ヒトC群ロタウイルスの免疫学的検出

AからF群に分類されるロタウイルスのうち、ヒトA群ロタウイルス（ARV）は毎年冬期に乳幼児を中心に流行することが知られており¹⁾、酵素抗体（ELISA）法、逆受身赤血球凝集反応（RPHA）法、ラテックス凝集反応（Lx-Ag）法等の市販試薬により検査が行われている。一方、ヒトC群ロタウイルス（CRV）については集団胃腸炎事例が福井県で確認されて以来²⁾、日本各地で集団胃腸炎の報告がなされ^{3)~9)}、さらに本県でも2年続けて集団胃腸炎事例が確認されるなど^{10),11)}、公衆衛生上の問題点となっている。ヒトCRVには簡便な検査法がなかったが、我々は多数検体を迅速、正確、簡便に検査することが可能なモノクローナル抗体（MAb）を用いた検査法（ELISA法、RPHA法及びLx-Ag法）を開発した^{12),13)}。これらの方法のうちRPHA法による検査は全国の衛生研究所でも行われつつある。

岡山県でも毎年、秋期から冬期を中心に感染性胃腸炎の流行がみられ、開発したCRV検出法（ELISA法、RPHA法）の有効性を確認することを主目的として2006年度と同様に2007年4月～2008年3月に散發で発生した感染性胃腸炎患者の糞便について、ARV及びCRVの検査と電子顕微鏡（EM）法によるウイルス検査を行った。また、食中毒又は感染性胃腸炎を疑われた集団発生事例についても同様に検査を行った。

1.2 岡山県のイヌにおけるC群及びA群ロタウイルス保有調査

ヒト及び動物の重要な胃腸炎起因ウイルスとして知られているロタウイルスは、ウイルス内殻蛋白の抗原性やウイルス遺伝子の違いによりA～Gの7群に分類されている。これらのうち、ヒトに病原性を有することがわかっているのはA、B及びC群である¹⁾。A群ロタウイルス（ARV）は小児胃腸炎の主要な病原体であり、我が国における患者数は年間約80万人に及ぶと推定されている¹⁴⁾。B群ロタウイルスは、1982～87年に中国で発生した集団胃腸炎の病原体として確認された後、インドやバングラディッシュにおける胃腸炎例からも散發的に検出されたものの、それ以外の地域における検出例はない¹⁾。C群ロタウイルス（CRV）は主に年長児～成人に胃腸炎を起し、日本をはじめ世界

各地に広く分布していることがわかっている¹⁾。本ウイルスの検出頻度はさほど高くないものの、しばしば食中毒様の集団胃腸炎を引き起すため^{2)~11)}公衆衛生上問題となっている。

現在までのところ、CRVについては血清型分類が未だ確立されていないが、ARVについては外殻糖蛋白（VP7）及び外殻スパイク蛋白（VP4）の抗原性に基づいて、それぞれ14種類及び11種類の血清型に分類されることがわかっている¹⁾。なお、VP7及びVP4による血清型を互いに区別するため前者をG血清型（G型）、後者をP血清型（P型）と呼んでいる。なお、P型の同定が非常に煩雑であるため、VP4遺伝子配列の違いに基づいた簡易的型別法が導入されており、これを遺伝子型と呼び型番号を角括弧（[]）内に表示することで、通常のP血清型と区別している¹⁾。ヒトARVに多く認められる血清型の組み合わせとしては、G型が1型でP遺伝子型が[8]型（通常G1P[8]と表示）の他、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]、G9P[8]等が知られているが、低頻度ながらこれら以外の組み合わせが検出される場合もある¹⁾。

CRVについては、ヒト以外ではブタ、ウシ、及びイヌから検出されたという報告があるものの^{15),16)}、明らかに動物由来ウイルスが人に感染したと思われる事例はこれまでに確認されていない。一方ARVでは、動物由来ウイルスと極めて近縁なウイルスがヒトから検出されたという例が数多く報告されており¹⁾、詳しい解析の結果、種間伝播により動物ウイルスがヒトに直接に感染したことが証明されている^{17)~19)}。したがって、動物が保有するロタウイルスは、ヒトへの感染源として無視できないものと思われる。

これまで我々は、ウシ及びブタにおけるC群ロタウイルス（CRV）の保有調査を行い、これらの動物が胃腸炎症状を示していなくてもCRVを保有すること、さらにブタにおいては、多様な遺伝子性状を持つCRVが継続的に侵淫していることを明らかにしてきた^{20)~23)}。しかしながらこれらの動物は、ヒトの住環境から比較的離れた場所で飼育される場合が多いため、保有するCRVが直接ヒトに触れる機会はさほど多くないものと思われる。そこで、ヒトに身近な環境で飼育される愛玩動物であるイヌについて、CRVの保有状況を調査するとともに、ARVについても同時に調査を行った。

1.3 小型球形ウイルスの遺伝子学的検出と分子疫学

ウイルス性胃腸炎の主要な原因の1つである小型球形ウイルス(SRSV)は、培養細胞・実験動物により人工的に増殖させる技術が確立されていないウイルス群であるが、近年、このうち、Calicivirus科に属するNorovirus属のNorwalkvirus(以下NV)、Sapovirus属のSapporovirus(以下SV)、Astrovirus科のAstorovirus(以下AstV)についてはその遺伝子情報²⁴⁾に基づいた逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(以下RT-PCR)法での検出が可能となった。これに伴い、感染症対策と食品衛生対策の両面で最も行政ニーズの高いNVについては、①ヒト由来のNVは、大きく2つの遺伝子群Genogroup I : GIとGenogroup II : GIIに分かれ、ウイルス表面蛋白をコードするcapsid領域の遺伝子配列により、GI、GIIともに10以上の遺伝子型: genotypeに分かれる²⁵⁾ことや②同一検体中に複数の遺伝子型のNVが存在する場合があること^{26)~28)}、③異なる2つのgenotypeの遺伝子が部分的に組みかわったと考えられる「リコンビナント株」^{29),30)}や、同一の遺伝子型内で遺伝子が部分的に大きく変異した「同一遺伝子型内変異株」³¹⁾が存在すること等が明らかになってきた。このようにNVはきわめて多様であるため、その流行状況を予測して対策をとるためには、継続的な監視と事例解析が不可欠である。また、NV以外のSRSVであるSV、AstVについても、SVは5つの遺伝子群GI(以下SV-GI)~GV(SV-GV)32)、AstVは8血清型(以下AstV-1~AstV-8)に分かれる³³⁾等NV同様多様なウイルスの存在が明らかになっているが、その流行疫学については不明な点が多く、解明していく必要がある。

2007年度は、NVによる胃腸炎の流行状況を明らかにするため、今年度小児の胃腸炎散発事例および集団発生事例から検出されたNVについて遺伝子解析を行うとともに、SRSVによるウイルス性胃腸炎流行の全体像を探るべく、過去に遡って、散発事例検体からのSVとAstVの検出状況を明らかにし、既報のNV検出状況とともに総合的に解析した。

2 材料と方法

2.1 ヒトC群ロタウイルスの免疫学的検出

(1) 対象

2007年4月~2008年3月に岡山地区(岡山赤十字病院、

国立病院機構岡山医療センター)及び玉野地区(この小児科)の感染性胃腸炎患者各々98名、302名及び28名、合計428名から糞便を採取した。

また、2007年度内に発生した集団胃腸炎11事例の患者75名から糞便を採取した。

(2) ウイルス検査方法

ロタウイルス、アデノウイルス(ADV)及びSRSVのEM法による検索は既報と同様にネガティブ染色法で行った³⁴⁾。

EM法によりロタウイルス様粒子が観察された場合、ARVとCRVを識別するための検査を次のように行った。

ARVの検出はELISA法(ロタクロン、TFB製)で、添付の説明書に従って行った。

CRVの検出は当センターで開発したCRV検出用ELISA法又はRPHA法で2000年度と同様に行った³⁴⁾。RPHA法はMAb 13A3を用いた試薬で、当センターと共同研究を行っているデンカ生研(株)製造のものを使用し、検査法は概ね添付の使用説明書に従った。

2.2 岡山県のイヌにおけるC群及びA群ロタウイルス保有調査

(1) 糞便検体

2005年11月~2006年6月に岡山県動物愛護センターに搬入された捕獲犬または飼育放棄犬183頭(子犬47頭、成犬136頭)より採取した糞便を検査対象とした。なお便性状は、水様または泥状便10検体、軟便16検体、及び正常便157検体であった。糞便の20%乳剤を調整後、8,000rpm15分間の遠心分離を行った上清を分取し、以下の試験に用いた。

(2) CRV及びARV検査方法

CRVについては我々が開発した特異モノクローナル抗体を用いたELISA法¹²⁾により、ARVについては市販のELISAキット(ロタクロン、TFB社製)によりそれぞれスクリーニング検査を実施した。ELISA法の吸光度が0.15以上を示した検体について、市販のキット(QIAamp Viral RNA mini kit、株式会社キアゲン)を用いてRNAを抽出し、CRV及びARVの外殻糖蛋白(VP7)遺伝子を標的としたプライマー(表1)を用いて逆転写PCR(RT-PCR)法を行い、特異バンドが観察された場合を最終的に陽性と判定した。なお、PCRの条件等は既報の方法³⁵⁾に準じて行った。

表1 逆転写PCR法に使用したプライマー

プライマー名	塩基配列 (5'-3')	部位	配列の由来
HCRVP7S HCRVP7A	GGCATTAAAAAAGAAGAAGCTGT AGCCACATGATCTTGTTCACGC	1-24 1,042-1,063	CRV (OK118株) VP7遺伝子
Beg 9M End 9M	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCC GGTCACATCATACAATTCTAATC	1-22 1,062-1,040	ARV(Wa株) VP7遺伝子
CAVP8S CAVP8A	TGGCTTCGTCATTATAGACA CTAAAAGCTTGAGAATCATCCCA	11-32 1,075-1,097	ARV (K9株) VP4遺伝子
CANSP4S CANSP4A	GGCTTTAAAAGTTCTGTTCCG GGTCACATTAAGACCATTCTTCC	1-22 750-727	ARV (CU-1株) NSP4遺伝子

(3) 遺伝子配列決定法

表1に示したARVのVP7, VP8* (VP4遺伝子のN末端側1,087塩基部分)及び非構造蛋白(NSP4)遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCRにより各遺伝子を増幅後、アガロース電気泳動を行って目的のバンド部分を切り出し、DNA gel extraction kit (Millipore社製)によりPCR産物の抽出・精製を行った。得られたDNAについて、PCRに用いたプライマーを使用し、オートシーケンサー (Long-Read Tower, 株式会社ベリタス)により塩基配列を決定した。

(4) 塩基配列データの解析

塩基配列の解析は市販ソフトウェア (Genetyx MAC ver.11, ソフトウェア開発株式会社)を用いて実施した。また、遺伝子系統解析はClustal W (フリーソフト)を用い、ロタウイルス標準株を参照株として近隣結合法により実施した。なお系統解析については、同様の解析を1,000回繰り返した場合に、同一結果が得られる回数 (ブートストラップ値)でその信頼性を示した。

2.3 小型球形ウイルスの遺伝子学的検出と分子疫学

(1) 対象

NV解析用として、2007年4月～2008年3月に県内の感染症発生動向調査事業検査定点医療機関から搬入された散発性胃腸炎患者糞便32検体(患者年齢0～9歳)、同時期に県内で発生した集団胃腸炎13事例(高齢者福祉施設1事例, 食中毒7事例, 有症苦情5事例)の糞便95検体 (患者糞便60件, 調理従事者糞便35件), 計 127検体を使用した。また、SVおよびAstV解析用として、2004年4月～2007年3月に県内の3医療機関で採取された散発性胃腸炎患者糞便のうち、電子顕微鏡検索で

SRSV様粒子が観察された149検体(患者年齢0～81歳)と、同時期に感染症発生動向調査事業検査定点医療機関で採取された散発性胃腸炎患者糞便15検体(患者年齢0～4歳), 計164検体を使用した。

(2) 方法

糞便は、既報²⁰⁾と同様に前処理, RNA抽出を行った。

NVの検出は、前報同様、平成15年(2003年)11月5日付け食安監第1105001号厚生労働省医薬食品局食品安全全部監視安全課長通知³⁶⁾に準拠して行った。COG系はLightCyclerシステム3302 (ロシュ・ダイアグノスティックス社)とQuantiTect Probe PCR (キアゲン社)を用いたリアルタイム法³⁷⁾で、他のプライマー系は従来法で実施した。リアルタイム法では経時的に蛍光輝度の増強がみられたものを、従来法では目的とする分子量あるいはその近傍にPCR産物のバンドが認められたものをPCR陽性とした。陽性検体は、従来法のGSK系で陽性となったもののうち、散発事例検体の大部分と、集団事例については各事例を代表する1検体についてpolymerase/capsid junction領域約300塩基の配列を決定し、遺伝子型を決定した。さらに、これらの一部については、NV81系またはYuri系プライマーで増幅されるpolymerase領域の塩基配列も決定・解析した。

SVは、岡らのリアルタイム法³⁸⁾で検出を実施し、陽性となった検体について、岡田らのRT-PCR法³⁹⁾により得られたcapsid領域約300塩基の配列を決定して遺伝子群別を行った。

AstVは、左近らのRT-PCR法³³⁾で検出を実施し、陽性検体については得られた領域約200塩基の配列を決定して型別を行った。

3 結果

3.1 ヒトC群ロタウイルスの免疫学的検出

(1) 患者発生状況

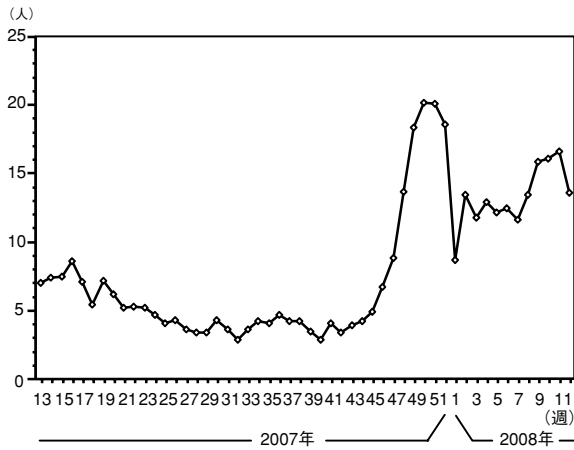


図1 感染性胃腸炎の発生状況

岡山県結核・感染症発生動向調査事業に基づく、2007年度における岡山県の感染性胃腸炎の週別発生状況は図1に示すとおりであった。感染性胃腸炎の定点当たり患者数は第48週（12月）に急増し、第50週（12月）にはピークの20.19名に達し、2007年度で最多となった。第51週（12月）以後は減少傾向に転じたものの、第8週（2月）には再び上昇に転じ、第11週（3月）には二番目のピークの16.59名に達し、その後は漸減傾向となっている。

(2) 散発患者からのウイルス検出状況

表2に示すとおり、合計428件の散発患者糞便よりロタウイルス様粒子78件（18.2%）、ADV 6件（1.4%）、SRSV 50件（11.7%）、ロタウイルス様粒子及びSRSV 4件（0.9%）、合計138件（32.2%）のウイルスがEM法により観察され、EM法でロタウイルス様粒子が観察された検体82件（重複分を含む）のうち78件からは

ARV、2件からはCRVが検出され、残り2件は同定不能であった。

月別ウイルス検出状況は表2に示すとおり、ARVは2007年4、5月、2008年2、3月に多く検出された。CRVは2007年4月に、ADVは2007年4～6月、2008年3月に検出された。SRSVは年度を通じて検出されたが、特に2007年11～12月に多く検出された。

(3) 集団発生事例患者からのヒトCRV検出状況

合計75名の患者から採取した糞便についてEM法によるウイルス検索を実施したが、ロタウイルス様粒子は観察されなかった。

3.2 岡山県のイヌにおけるC群及びA群ロタウイルス保有調査

(1) ロタウイルス検出状況

検査の結果、CRVについては全例陰性であったが、ARVについては183検体中14検体（7.7%）が陽性と判定された（表3）。ARV陽性例の内訳をみると、子犬の検出率が14.9%と、成犬の値（5.1%）の約3倍であった。月別の検出状況では、4月をピークとして1月～6月に検出されており、ヒトでのARV流行時期とほぼ一致していた。なお、陽性犬の捕獲または飼育地域に特に偏りはみられなかった（データを示さず）。

表3 ARV検査結果

検体採取月	子犬	成犬	合計
2005 11月	0/ 9 *	0/ 4	0/13
12月	0/ 6	0/27	0/33
2006 1月	2/ 5 (40.0)	1/20 (5.0)	3/25 (12.0)
2月	1/ 3 (33.3)	0/17	1/20 (5.0)
3月	0/ 4	0/21	0/25
4月	1/ 3 (33.3)	3/18 (16.7)	4/21 (19.0)
5月	1/ 5 (20.0)	1/14 (7.1)	2/19 (10.5)
6月	2/12 (16.7)	2/15 (13.3)	4/27 (14.8)
合計	7/47 (14.9)	7/136(5.1)	14/183(7.7)

*陽性数/検査数 (%)

表2 採取年月別・採取機関別ウイルス検出状況

採取年月	岡山赤十字病院						国立病院岡山医療センター						のうの小児科						合計			
	ARV	CRV	ADV	SRSV	ロタ (NT)	陰性	小計	ARV	CRV	ADV	SRSV	ARV +SRSV	陰性	小計	ARV	ADV	SRSV	ARV +SRSV		ロタ (NT)	陰性	小計
2007年 4月	4	1	0	1	0	5	11	25	1	1	2	2	30	61	0	0	0	1	0	0	1	73
5月	1	0	0	0	0	2	3	15	0	2	1	0	32	50	1	0	0	0	0	1	2	55
6月	0	0	0	0	0	13	13	1	0	1	0	0	10	12	—	—	—	—	—	—	—	25
7月	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	6	6	—	—	—	—	—	—	—	11
8月	0	0	1	0	0	5	6	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	2	2	10
9月	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	2	2	—	—	—	—	—	—	—	4
10月	0	0	0	0	0	10	10	0	0	0	2	0	2	4	0	0	0	0	0	1	1	15
11月	0	0	0	2	0	5	7	0	0	0	10	0	21	31	0	0	1	0	0	1	2	40
12月	0	0	0	3	0	13	16	0	0	0	8	0	33	41	0	0	4	0	0	5	9	66
2008年 1月	0	0	0	2	0	5	7	1	0	0	6	0	16	23	0	0	0	0	0	1	1	31
2月	1	0	0	5	1	2	9	12	0	0	0	0	29	41	0	0	0	0	0	2	2	52
3月	1	0	0	2	0	6	9	12	0	0	1	0	16	29	0	1	0	1	1	5	8	46
計	7	1	1	15	1	73	98	66	1	4	30	2	199	302	1	1	5	2	1	18	28	428

NT：同定不能

表4 ARV陽性検体の由来および遺伝子解析結果

検体番号	採取年月 (月/年)	大きさ	犬種	便性状	ELISA 吸光度	アミノ酸相同性値 (%)								
						遺伝子型別結果			DA59株			DA172株		
						VP7	VP4	NSP4	VP7	VP8	NSP4	VP7	VP8	NSP4
DA59	1/2006	子犬	雑種	正常便	3.102	G3	P[3]	C	100	100	100	97.5	88.8	95.4
DA60	1/2006	子犬	雑種	水様便	2.828	G3	P[3]	C	100	100	100	97.5	88.8	95.4
DA87	2/2006	子犬	雑種	軟便	0.194	G3	P[3]	C	100	100	100	97.5	88.8	95.4
DA117	4/2006	子犬	雑種	正常便	0.192	G3	ND	ND	—	—	—	—	—	—
DA143	5/2006	子犬	不明	正常便	0.164	G3	ND	ND	—	—	—	—	—	—
DA160	6/2006	子犬	不明	正常便	0.187	G3	ND	ND	—	—	—	—	—	—
DA183	6/2006	子犬	不明	軟便	0.152	G3	P[3]	C	97.5	88.8	95.4	100	100	100
DA66	1/2006	成犬	雑種	軟便	1.521	G3	P[3]	C	100	100	100	97.5	88.8	95.4
DA125	4/2006	成犬	土佐犬	軟便	2.625	G3	P[3]	C	100	99.7	100	97.5	88.5	95.4
DA128	4/2006	成犬	バグ	正常便	0.283	G3	P[3]	C	100	100	100	97.5	88.8	95.4
DA136	4/2006	成犬	四国犬	正常便	0.297	G3	ND	ND	100	—	—	97.5	—	—
DA151	5/2006	成犬	不明	正常便	3.732	G3	P[3]	C	100	100	100	97.5	88.8	95.4
DA172	6/2006	成犬	雑種	軟便	3.405	G3	P[3]	C	97.5	88.8	95.4	100	100	100
DA181	6/2006	成犬	ビーグル	軟便	0.196	G3	P[3]	ND	97.5	88.8	—	100	100	—

ND：同定できず

ARV 陽性14検体の由来等を表4に示した。便性状とウイルス検出との関係を見ると、明らかな下痢便は1検体のみであり、残りは軟便または正常便であった。また、ELISA法のOD値から糞便中のウイルス量を推測すると、便性状に特に異常がないにもかかわらず多量のウイルスが存在する検体（検体番号DA59、DA151など）が認められた。

(2) 検出ARVの遺伝子性状

確認検査において増幅されたVP7遺伝子について、オートシーケンサーにより塩基配列を決定し、データベース上の既知の配列と比較を行った結果、14検体すべてがG3型であることが明らかになった（表4）。さらに、VP8*遺伝子及びNSP4遺伝子についても特異プライマーを用いて増幅を行い、各遺伝子の塩基配列の決定を試みたところ、10検体でVP8*遺伝子配列を、9検体でNSP4遺伝子配列をそれぞれ決定することができた。これらの配列についても同様に、データベース上の配列と比較を行ったところ、いずれもVP4遺伝子型がP[3]型、NSP4遺伝子型がC(AU-1株様)であることが明らかになった（表4）。

(3) アミノ酸配列相同性解析

得られた塩基配列情報から予測されるVP7、VP8*、及びNSP4のアミノ酸配列（VP7：326アミノ酸、VP8*：275アミノ酸、NSP4：175アミノ酸）について、その相同性を相互に比較した。その結果、今回検出されたARV株にはVP7、VP8*、及びNSP4ともDA59株と全く同一か極めて相同性の高い（相同性99.7%以上）

ものと、DA172株と全く同一なもの大きく2種類存在することがわかった（表4）。なお検出数では、DA59株類似が8株と、DA172株類似のもの（3株）よりも多かった。次に、DA59株とDA172株とを相互に比較したところ、VP7及びNSP4については、それぞれ97.5%及び95.4%と比較的高い相同性であったのに対し、VP8*の相同性は88.8%と低い値であった。

(4) VP7アミノ酸配列系統解析

DA59及びDA172株のVP7アミノ酸配列について、既知のG3型株の配列とともに系統解析を行ったところ、両株ともイヌARVの代表株であるK9株とは系統的に異なっていることがわかった（図2）。その一方でDA59株は、最近イタリアにおいてイヌ及びヒトの胃腸炎から検出されたRV52/96株⁴⁰⁾及びP260/97株¹⁹⁾と密接に関連しており（相同性100%及び99.6%）、またヒト由来CMH222株及びサル由来RRV株とも関連性が認められた（相同性97.5%及び96%）。一方DA172株は、ヤギ由来GRV株⁴¹⁾及びウシ由来J63株⁴²⁾など草食獣由来ウイルスと同系統に属することがわかった（相同性97.9%及び97.2%）。

(5) VP8*アミノ酸系統解析

DA59株、DA125株及びDA172株のVP8*アミノ酸配列について、既知のP[3]型株の配列とともに系統解析を実施した（図3）。その結果、DA59及びDA125株はVP7の場合と同様に、RV52/96株及びP260/97株と密接な関連性が認められた（相同性98.9%及び97.4%）。さらに、DA59及びDA125株はこれまで報告されてい

るイヌARVのK9株やCU-1株などP型がP5Aである株と同じ系統樹上に分類された。一方DA172株はこれらとは異なり、ヤギ由来GRV株及びヒト由来CMH222株⁴³⁾と関連性が認められた(相同性97.5%及び96.7%)ほか、P型がP5Bであるサル由来RRV株とも比較的高い相同性(92.2%)を示した。

(6) NSP4アミノ酸系統解析

DA59株及びDA172株のNSP4アミノ酸配列を、NSP4遺伝子型がCに属するARV株と比較したところ(図4)、DA59株はRV52/96株及びP260/97株と密接な関連性が認められ(相同性100%及び98.6%)、大きくみるとイヌやネコなどの愛玩動物由来ウイルスと同じ系統樹上に位置していた。一方DA172株は、愛玩動物由来株とは異なる系統樹上に分類され、GRV株、ウサギ由来R2株、及びRRV株などと同系統に属する(相同性98.9%、97.7%及び97.1%)ことがわかった。

3.3 小型球形ウイルスの遺伝子学的検出と分子疫学

(1) 散発事例におけるNVの検出状況

散発事例検体32検体中12検体(37.5%)からNV(G I : 2株, G II : 10株)が検出され、うち8株の遺伝子型は、G I /14 : 2株, G II /4 : 6株であった。G II /4株は、2007年10月~12月に検出されたのに対し、G I /14株は2008年1月に検出された(表5、図5)。G II /4株のpolymerase領域の塩基配列解析の結果、すべてNV G II /4 2006b⁴⁴⁾株類似株であった。

(2) 集団事例におけるNVの検出状況

13事例中8事例の患者糞便38検体、調理従事者糞便4検体、計44検体からNV(G I : 18株, G II : 26株)が検出された(表5)。同一事例内での増幅傾向がほぼ同じであったため、各事例の代表株9株について、capsid領域の塩基配列を決定し、系統解析を行った。遺伝子解析の結果、G I /8 : 3株, G I /14 : 2株, G II /4 : 3株, G II /13 : 1株であった(図5)。G I /8検出事例は2008年1月と3月に、G I /14検出事例は2007年5月と2008年3月に、また、G II /4検出事例は2007年11月、12月および2008年2月に、G II /13検出事例は2008年

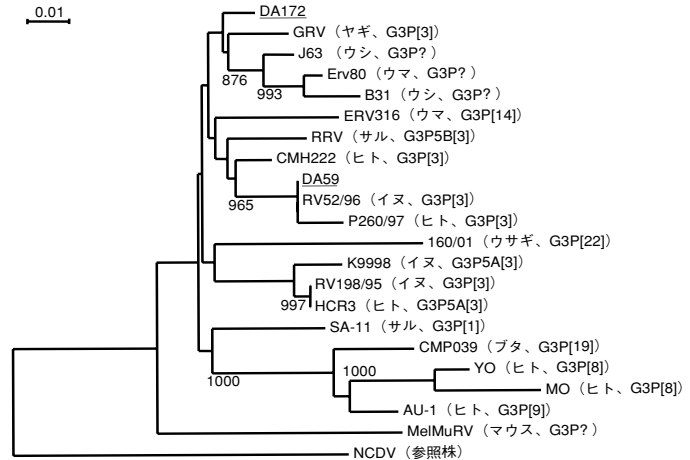


図2 VP7アミノ酸配列の系統解析結果

A群ロタウイルスNCDV株を参照株として近隣結合法により系統解析を実施した(1,000回のブートストラップを行い、700以上の数値を系統樹上に示す)。今回検出された株をアンダーラインで示した。既知の株の由来動物及びG型、P型を括弧内に示す。

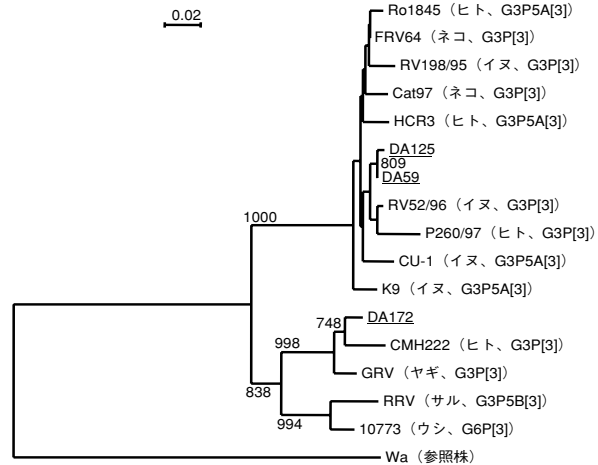


図3 VP8*アミノ酸配列の系統解析結果

A群ロタウイルスWa株を参照株として近隣結合法により系統解析を実施した(1,000回のブートストラップを行い、700以上の数値を系統樹上に示す)。今回検出された株をアンダーラインで示した。既知の株の由来動物及びG型、P型を括弧内に示す。

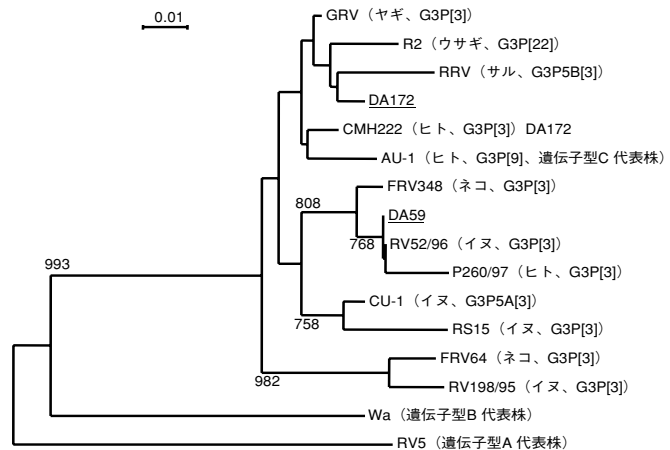


図4 NSP4アミノ酸配列の系統解析結果

A群ロタウイルスWa株およびRV5を参照株として近隣結合法により系統解析を実施した(1,000回のブートストラップを行い、700以上の数値を系統樹上に示す)。今回検出された株をアンダーラインで示す。既知の株の由来動物およびG型、P型を括弧内に示す。

表5 月別 NV 検出状況 (2007年4月～2008年3月)

発生形態	採取月 遺伝子型	2007年												2008年			計
		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月				
散 発 事 例	NV G I /14													2		2	
	NV G II /4									1	4	1				6	
	NV G II 型不明										3	1				4	
	小 計	0	0	0	0	0	0	0	1	7	2	0	2	0	12		
集 団 事 例	NV G I /8												4		2 (2)	6 (2)	
	NV G I /14		2												2	4	
	NV G I 型不明												3		5	8	
	NV G II /4									2 (1)	2			1		5 (1)	
	NV G II /13														2	2	
	NV G II 型不明									7	6 (1)			5	1	19 (1)	
	小 計	0	2							9	8	7	6	12	44		
合 計		0	2	0	0	0	0	0	1	16 (1)	10 (1)	7	8	12 (2)	56 (4)		

() 内は、調理従事者からの検出数を再掲

3月に、それぞれ発生していた。

(3) 2004年度～2006年度散発事例からのSVおよびAstVの検出状況

SVは、散発事例検体164検体中32検体(19.5%)から検出された。検出されたSVの遺伝子群別は、SV-G I : 20株, SV-G II : 7株, SV-G IV : 2株, SV-G V : 3株であった。検出時期は7月, 8月を除く9月～6月の間検出されたが、特に2月～4月に多く検出される傾向があった(図6)。一方, AstVは、散発事例検体164検体中16検体(9.8%)から検出された。検出されたAstVのうち11株について、遺伝子の塩基配列に基づいて血清型別した結果, AstV-1 : 10株, AstV-4 : 1株であった。検出時期は2月～6月の間検出されたが、特に5月に多く検出される傾向があった(図7)。なお、この164検体についてはNVの検索も実施しており、112株(G I : 7株, G II : 105株)が検出され、結果の一部は昨年度報告済み⁴⁵⁾である。NV, SVおよびAstVの流行状況を比較するため、各ウイルスの検出総数に対する月別検出割合を図8に示した。NVは11月が最も多く40.2%で10～12月の間に全体の66.9%が検出されたのに対し、SVは2月が最も多く25.0%で2～5月の間に全体の62.5%が検出された。また、AstVは検出が5月に集中し、全体の50.0%が検出された。

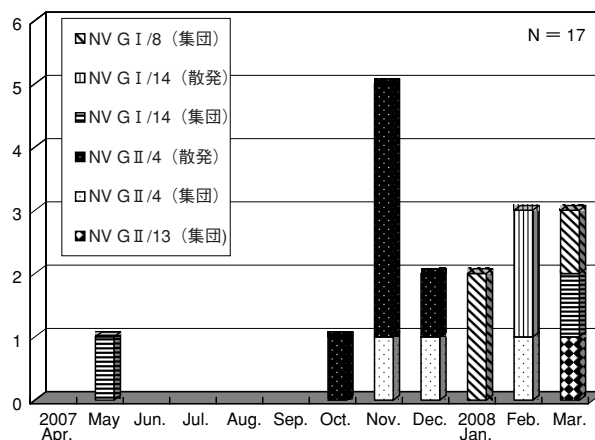


図5 月別 検出 NV の遺伝子型

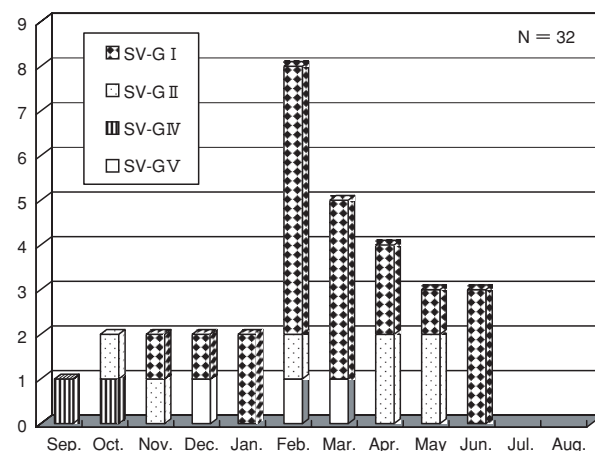


図6 月別 SV 検出状況 (2004年4月～2007年3月累計)

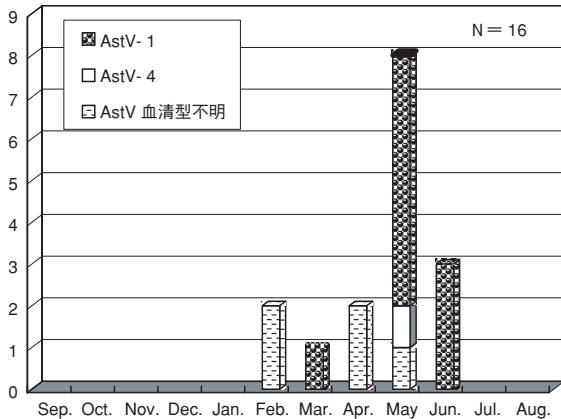


図7 月別 AstV 検出状況 (2004年4月~2007年3月 累計)

4 考察

4.1 ヒトC群ロタウイルスの免疫学的検出

冬期を中心とするウイルス性胃腸炎の発生ピークは12月をピークとするSRSVと2, 3月をピークとして発生するARVにより, 二峰性の発生曲線を持つ傾向が指摘されている⁴⁶⁾が, 2007年度冬期の感染性胃腸炎患者の発生パターンは, 標準的な二峰性の発生パターンを示した(図1)。

また, 2006年度では一峰目のみが明瞭なピークを示していたが⁴⁵⁾, 2007年度のピーク時定点当たり患者数は20.19名(一峰目:第50週)及び16.59名(二峰目:第11週)で, 一峰目の方がかなり高いピークを示した。

このことをウイルス検出状況と比較すると, 2006年度では, SRSVは年度を通して検出されたものの, 10~12月に特に多く検出され, ARVは4, 5月及び翌年2, 3月に検出されていたものの, ARVの検出数は2月に少なかった。これに対して2007年度では, SRSVは年度を通じて検出されたが, 特に2007年11~12月に多く検出され, ARVは2007年4, 5月, 2008年2, 3月に多く検出された。このため, 患者発生状況とウイルス検出状況が同様の傾向となっていると考えられた。

EM法でロタウイルス様粒子が観察された検体82件のうち2件からCRVが検出され, 78件の検体からはARVが検出された。群を同定できないロタウイルス陽性検体が2件あったものの, この検体については電子顕微鏡観察で夾雑物がロタウイルス様粒子表面に厚い層を形成していることが確認され, このため, 免疫学的検査法では反応が劣っていたと考えられ, 免疫学的検査法のためのウイルス精製法に改良の余地がある

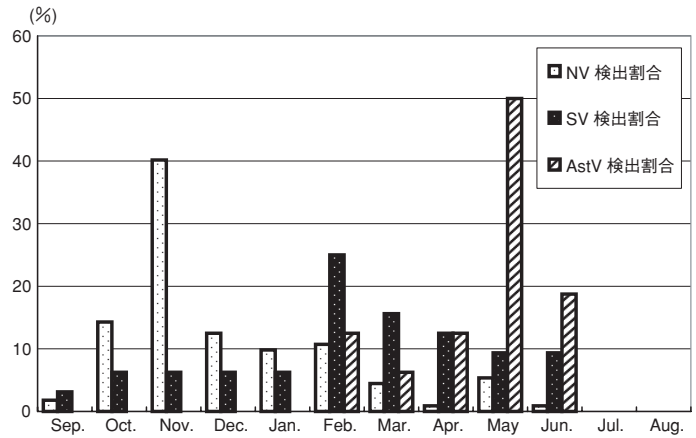


図8 NV, SV, AstV の月別ウイルス別検出割合

と思われた。この検体を除けばMAb 13A3との反応性が劣るCRVの出現は認められなかった。今後も, このMAbで検出できないCRVの出現に注意を払う必要があると思われる。

4.2 岡山県のイヌにおけるC群及びA群ロタウイルス保有調査

今回, 岡山県内で飼育されていたイヌの糞便についてCRV及びARVの検索を行ったところ, CRVについては陽性例は認められなかった一方で, ARVについては7.7%が陽性であることがわかった。Ottoら¹⁶⁾は, 1999年にドイツにおいて, イヌの下痢便9検体中3検体から世界で初めてCRVを検出したと報告しているが, 他の研究者による同様な報告はそれ以後なく, イヌにおける本ウイルスの侵淫状況については不明な点が多く残されている。今回, 下痢便26検体を含む計183検体のイヌ糞便について調査を行ったものの, CRVを一例も検出することができなかった。したがって, 岡山県内のイヌがCRVを保有する可能性は低いものと考えられるが, 今回は1シーズンのみのしかも限られた検体数による調査であることから, 今後とも継続的な保有調査を行っていく予定である。

望月らはイヌにおけるARV保有調査を行い, その検出率は0.2~2.1%であったと報告している^{47), 48)}。我々の調査では, 検出率が7.7%と望月らの報告の約3倍であり, 特に子犬に限定すれば14.9%という高い値であった。今回は, 動物愛護センターという特殊な環境に置かれたイヌを対象としたため, ストレス等によりウイルスの排泄が促進された可能性が考えられる。また, 望月らの調査が1989年~2000年に行われたものであることから, 近年になってARV保有率が上

昇した可能性も示唆される。したがって、今後も本調査を継続しイヌにおけるARV保有状況を明らかにしていく必要があると思われる。

今回検出されたARVのうち、G型及びP型がともに同定できたものについては、すべてがG3P[3]であることがわかった。このタイプのウイルスは、主にイヌやネコ等から検出されることが多いものの、低頻度ながらヒト及びサルなどからも検出されており、幅広い宿主域を持つことが示されている¹⁾。さらに詳細な解析の結果、検出されたウイルスにはDA59株類似のもの、DA172株類似のもの大きく2種類が存在することが明らかとなった。最近De Graziaら¹⁹⁾は、1997年にイタリアの小児胃腸炎事例から検出されたG3P[3]のARV (PA260/97株) について詳しく調べた結果、その遺伝子が1996年に同国においてイヌから検出されたRV52/96株に極めて類似していたことから、イヌARVが直接ヒトに感染した事例であると結論づけている。今回行ったアミノ酸配列に基づく系統解析の結果、DA59株類似ウイルスがPA260/97株及びRV52/96株と極めて近縁であることが示されたことから、今回検出されたウイルスがヒトに感染性を有する可能性は極めて高いものと思われる。

一方、DA172類似株については、アミノ酸配列の系統解析結果から、VP7についてはイヌARVよりはむしろ、ヤギやウシなどの反芻獣由来ウイルスと密接に関連していることがわかった。また、VP8*についても同様に、イヌARVよりはヒトARVやヤギARVとの関連性がみられ、またNSP4についてもイヌARV以外との関連性が示唆された。特に、ウイルスが宿主細胞表面レセプターと結合する際に重要な役割を担っているVP8*部分¹⁾について、ヒトARV株との関連性が認められたことから、DA172株類似ウイルスがヒトに対し潜在的な感染性を有する可能性も十分考えられる。なおDA172株のVP8*部分が、P型がP5BであるRRV株と92.2%と比較的高い相同性を示したことから、同株がイヌARVとしては世界で初めてP5Bに属する株であることが強く示唆された。今後、本ウイルスの由来等を明らかにするため、さらに詳細な解析を行う予定である。

今回の調査により、ヒトに感染性を有する可能性が極めて高いか、または潜在的にその可能性がある

ARVが、県内のイヌの間で流行している実態が今回初めて明らかになった。さらに、ARV陽性例のうち明らかな下痢便は1検体のみであり、また便性状に特に異常がない場合でも、多量のウイルスが含まれる例が認められたことから、イヌ糞便の取り扱いには十分注意する必要があると思われる。特に、イヌARVがヒトに感染した事例はいずれも小児において発生していることから^{17)~19)}、子供の手に触れることのないように気を配る必要がある。

4.3 小型球形ウイルスの遺伝子学的検出と分子疫学

2007年度の散発事例と集団事例から検出されたNVの遺伝子型は、G II/4の単独流行であった昨年度⁴⁵⁾とは対照的に、多岐にわたった。特に、これまで検出頻度の低かったG I に属するNVが比較的高頻度に検出されたことが特徴であった。検出時期から見ると2007年12月までは、主として昨年度と同系統のG II/4が検出されていたが、2008年に入ると散発事例・集団事例ともG II/4以外の遺伝子型が検出され始めた。同様の傾向は全国の地方衛生研究所からの病原体検出報告でもうかがわれ⁴⁹⁾、これらのことから、岡山県内では、昨年度全国的に胃腸炎の多発を引き起こしたG II/4 2006bの流行が、非流行期の夏季を挟んで2007/2008シーズンの前半まで継続していたものと推察された。一方、シーズン後半に入って検出されたG I /8とG I /14については、過去に県内で検出例があるものの検出頻度は低く、浸淫度の低いウイルスと考えられる。したがって、来シーズン以降流行するおそれもあり、非流行期の散発事例等の検索で監視していく必要がある。

SVは、3年間の散発事例での検出率が19.5%であり、これはHansmanら(4.1%)⁵⁰⁾やOkadaらの報告(9.2%)³⁹⁾よりも高かった。これは、電子顕微鏡検索でSRSVが観察されたもののみを対照としたためと考えられ、電子顕微鏡によるスクリーニングが胃腸炎ウイルスの効率的な検索に有用であることを示している。SVの流行時期は、漠然とほぼNVの流行時期と重なると考えられていたが、報告数が少なくはっきりしなかった。今回の結果より、少なくとも散発事例においては、1年の内でNVよりも広範な時期に検出されることが明らかになった。SVの遺伝子群については、現在ヒトから検出される4群³²⁾全てが検出された。SV-G I の検出割合が多い点は全国的傾向⁴⁹⁾と一致していたが、

近年全国的に検出頻度が高まっているSV-GIVやSV-GV⁴⁹⁾も少数ながら検出されているため、今後も流行状況に注目していく必要がある。

AstVは、3年間の散発事例での検出率が9.8%とSVよりもさらに検出数が少なかったが、検出される時期は比較的集中しており、SVよりさらに遅い5月に検出極期を持つ特徴的な流行パターンを示すことが明らかになった。検出される血清型はAstV-1が大部分を占め、全国的傾向⁴⁹⁾と一致していた。

今回の解析から、NV、SVおよびAstVの検出ピークが、それぞれ11月、2月、5月とずれることが明らかになり、三種のウイルスは、流行規模の大きさは異なるものの、秋季から始まるウイルス性胃腸炎の流行期において、時期をずらして流行しているものと考えられた。

謝 辞

イヌ便検体の採取にあたり多大なるご協力をいただきました、岡山県動物愛護センターの関係各位に深謝致します。

文 献

- 1) 小林宣道, 浦沢正三: ロタウイルス, ウイルス, 50, 157-172, 2000
- 2) Matsumoto, K., Hatano, M., Kobayashi, K., Hasegawa, A., Yamazaki, S., Nakata S., Chiba, S., Kimura, Y.: An outbreak of gastroenteritis associated with acute rotaviral infection in schoolchildren, *J. Infect. Dis.*, 160, 611-615, 1989
- 3) Otsu, R.: A mass outbreak of gastroenteritis associated with group C rotaviral infection in schoolchildren, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 21, 75-80, 1998
- 4) Oishi, I., Yamazaki, K., Minekawa, Y.: An occurrence of diarrheal cases associated with group C rotavirus in adults, *Microbiol. Immunol.*, 37, 505-509, 1993
- 5) 篠崎邦子, 海保郁男, 時枝正吉, 實川 浩: 千葉県で発生したC群ロタウイルスによる集団下痢症, 病原微生物検出情報, 14, 160, 1993
- 6) 篠崎邦子, 山中隆也, 小川知子, 時枝正吉, 高橋

亮, 太田洋子, 酒井利郎, 常包正俊: C群ロタウイルスによる集団下痢症, 病原微生物検出情報, 17, 202, 1996

- 7) 長谷川澄代, 松浦久美子, 中山 喬, 石倉康宏, 北村 敬, 安井良夫, 金子望博: 小学校で発生したC群ロタウイルスによる急性胃腸炎の集団発生, 病原微生物検出情報, 18, 302-304, 1997
- 8) 沢田春美, 吉澄志磨, 玉手直人, 荒田吉彦, 勝山真吉, 古屋孝子, 堀田智仙, 平木雅久: 小学校でみられたC群ロタウイルスによる急性胃腸炎の集団発生, 病原微生物検出情報, 19, 252-253, 1998
- 9) 江頭康子, 吉森清史, 船津丸貞幸, 松浦元幹: C群ロタウイルスによる急性胃腸炎集団発生事例, 病原微生物検出情報, 22, 32-33, 2001
- 10) 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉 肇, 中山俣槻, 結縁栄次, 片山健一, 光信泰昇, 井上康二郎: 岡山県内で初めて確認されたヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例, 岡山県環境保健センター年報, 24, 55-59, 2000
- 11) 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉 肇: 教育研修施設において発生したヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例, 病原微生物検出情報, 21, 169-170, 2000
- 12) Fuji, R., Kuzuya, M., Hamano, M., Yamada, M. and Yamazaki, S.: Detection of human group C rotaviruses by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies, *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1307-1311, 1992
- 13) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Nagabayashi, T., Tsunemitsu, H., Yamada, M., Nii, S., Mori, T.: Rapid detection of human group C rotaviruses by reverse passive hemagglutination and latex agglutination tests using monoclonal antibodies, *J. Clin. Microbiol.*, 31(5), 1308-1311, 1993
- 14) 中込とよ子, 中込 治: ロタウイルスワクチンの現状と展望, 病原微生物検出情報, 22, 14-16, 2005
- 15) Saif, L. J.: Nongroup A rotaviruses: Viral diarrhea of man and animals, p. 73-95, CRC Press, Florida, USA, 1990

- 16) Otto, P., Schulze, P., Herbst, W. : Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs in Germany, *Arch. Virol.*, 144, 2467–2473, 1999
- 17) Nakagomi, O., Isegawa, Y., Hoshino, Y., Aboudy, Y., Shif, I., Silberstein, I., Nakagomi, T., Ueda, S., Sears, J., Flores, J. : A new serotype of the outer capsid protein VP4 shared by an unusual human rotavirus strain Ro1845 and canine rotaviruses, *J. Gen. Virol.*, 74, 2771–2774, 1993
- 18) Nakagomi, T., Nakagomi, O. : Human rotavirus HCR3 possesses a genomic RNA constellation indistinguishable from that of feline and canine rotaviruses, *Arch. Virol.*, 145, 2403-2409, 2000
- 19) De Grazia, S., Martella, V., Giammanco, G. M., Iturriza Gomara, M., Ramirez, S., Cascio, A., Colomba, C., Arista, S. : Canine-Origin G3P[3] Rotavirus Strain in Child with Acute Gastroenteritis, *Emerging Infect. Dis.* 13, 1091–1093, 2007
- 20) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆 : 胃腸炎ウイルスの研究 (平成14年度), 岡山県環境七年報, 27, 45-61, 2003
- 21) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 西島倫子, 国富泰二, 濃野信, 金谷誠久 : 胃腸炎ウイルスの研究 (平成15年度), 岡山県環境七年報, 28, 79-92, 2004
- 22) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 西島倫子, 国富泰二, 濃野信, 金谷誠久 : 胃腸炎ウイルスの研究 (平成16年度), 岡山県環境七年報, 29, 89-102, 2005
- 23) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 西島倫子, 国富泰二, 濃野信, 金谷誠久 : 胃腸炎ウイルスの研究 (平成17年度), 岡山県環境七年報, 30, 101-114, 2006
- 24) Jiang, X., Wang, M., Wang, K., Estes, M.K. : Sequence and genomic organization of Norwalk virus, *Virology*, 195, 51-61, 1993
- 25) 片山和彦 : 胃腸炎関連カリシウイルス (ノロウイルス, サポウイルス) 総論, 病原微生物検出情報 (IASR), 24, 312–314, 2003
- 26) Hamano, M., Kuzuya, M., Fujii, R., Ogura, H., Yamada, M. : Epidemiology of acute gastroenteritis outbreaks caused by Noroviruses in Okayama, Japan, *J. Med. Virol.*, 282-289, 2005
- 27) Sugieda, M., Nakajima, K., Nakajima, S. : Outbreak of Norwalk-like virus associated gastroenteritis traced to shellfish, Coexistence of two genotypes in one specimen, *Epidemiol. Infect.*, 116, 339-346, 1996
- 28) Kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, FB., Kojima, S., Takai, R., Oka, T., Takeda, N., Katayama, K. : Coexistence of plural genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan, *J Clin Microbiol*, 42, 2988-2995, 2004.
- 29) Reuter, G., Krisztalovics, K., Vennema, H., Koopmans, M., Szucs, G. : Evidence of the etiological predominance of Norovirus in gastroenteritis outbreaks-Emerging new-variant and recombinant Noroviruses in Hungary, *J. Med. Virol.*, 76, 598-607, 2005
- 30) Bull, R.A., Tu, E.T.V., McIver, C.J., Rawlinson, W.D., White, P.A. : Emergence of a new Norovirus genotype IL4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis, *J. Clin. Microbiol.*, 327-333, 2006
- 31) Kroneman, A., Vennema, H., Harris, J., Reuter, G., Bonsdorff, C-H von, Hedlund, K-O., Vainio, K., Jackson, V., Pothier, P., Koch, J., Schreier, E., Bottiger, B., Koopmans, M. : Increase in norovirus activity reported in Europe, *Eurosurveillance Weekly*, 11, 12, 2006
- 32) Hansman, GS., Takeda, N., Oka, T., Oseto, M., Hedlund, KO., katayama, K. : Intergenogroup recombination in Sapoviruses, *Emerging Infect. Dis.*, 11, 1916-1920, 2005
- 33) Sakon, N., Yamazaki, K., Utagawa, E., Okubo, Y., Oishi, I. : Genomic characterization of human astrovirus type6 Katano virus and the establishment of rapid and effective reverse

- transcription-polymerase chain reaction to detect all serotypes of human astrovirus, *J. Med. Virol.*, 61, 125-131, 2000
- 34) 藤井理津志, 葛谷光隆, 濱野雅子, 小倉 肇: C 群ロタウイルスの免疫学的検査法による検出, 岡山県環境保健センター年報, 24, 42-45, 2000
- 35) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Nakamura, J., Yamada, M., Nii, S. and Mori, T.: Molecular analysis of outer capsid glycoprotein (VP7) genes from two isolates of human group C rotavirus with different genome electropherotypes, *J. Clin. Microbiol.*, 34, 3185-3189, 1996
- 36) 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, 食安監発第1105001号, 平成15年11月5日
- 37) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., Katayama, K.: Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR, *J. Clin. Microbiol.*, 41, 1548-1557, 2003
- 38) Oka, T., Katayama, K., Hansman, GS., Kageyama, T., Ogawa, S., Wu, FT., White, PA., Takeda, N.: Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, *J. Med. Virol.*, 78, 1347-53, 2006
- 39) Okada, M., Yamashita, Y., Oseto, M., Shinozaki, K.: The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers., *Arch. Virol.*, 151, 2503-2509, 2006
- 40) Martella, V., Pratelli, A., Greco, G., Gentile, M., Fiorente, P., Tempesta, M., Buonavoglia, C.: Nucleotide sequence variation of the VP7 gene of two G3-type rotaviruses isolated from dogs, *Virus. Res.*, 74, 17-25, 2001
- 41) Lee, J. B., Youn, S. J., Nakagomi, T., Park, S. Y., Kim, T. J., Song, C. S., Jang, H. K., Kim, B. S., Nakagomi, O.: Isolation, serologic and molecular characterization of the first G3 caprine rotavirus, *Arch. Virol.*, 148, 643-657, 2003
- 42) Varshney, B., Jagannath, M. R., Vethanayagam, R. R., Kodhandharaman, S., Jagannath, H. V., Gowda, K., Singh, D. K., Rao, C. D.: Prevalence of, and antigenic variation in, serotype G10 rotaviruses and detection of serotype G3 strains in diarrhetic calves: implications for the origin of G10P11 or P11 type reassortant asymptomatic strains in newborn children in India, *Arch. Virol.*, 147, 143-165, 2002
- 43) Khamrin, P., Maneekarn, N., Peerakome, S., Yagy, F., Okitsu, S., Ushijima, H.: Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions, *J. Med. Virol.*, 78, 986-994, 2006
- 44) Koopmans, M., Harris, J., Verhoef, L., Depoortere, E., Takkinen, J., Coulombier, D.: European investigation into recent norovirus outbreaks on cruise ships: update *Eurosurveillance Weekly*, 11, 7, E060706.5, 2006
- 45) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 西島倫子, 国富泰二, 濃野 信, 金谷誠久: 胃腸炎ウイルスの研究 (2006年度), 岡山県環境保健センター年報, 31, 107-118, 2007
- 46) 上羽 修, 藤井理津志, 谷本浩一: ウイルス下痢症に関する研究 第2報 1988/87年冬期の検出ウイルスについて, 岡山県環境保健センター年報, 11, 132-135, 1987
- 47) 望月雅美: 犬と猫の下痢症ウイルス, *日獣会誌*, 49, 293-300, 1996
- 48) Mochizuki, M., Hashimoto, M., Ishida, T.: Recent epidemiological status of canine viral enteric infections and Giardia infection in Japan, *J. Vet. Med. Sci.*, 63, 573-575, 2001
- 49) 国立感染症研究所感染症情報センター: 病原体検出情報システム データベース, 感染症サーベイランスシステム (一般には非公開)
- 50) Hansman, GS., Takeda, N., Katayama, K., Tu, E.T.V., McIver, C.J., Rawlinson, WD., White, PA.: Genetic diversity of Sapovirus in children, Australia, *Emerging Infect. Dis.*, 12, 141-143, 2006