

胃腸炎ウイルスの研究

—電子顕微鏡を用いた胃腸炎ウイルスの検出（2009年度）—

藤井理津志，濱野雅子，葛谷光隆，木田浩司，植原幸二*，濃野 信**，金谷誠久***（ウイルス科）

*岡山赤十字病院小児科

**のうの小児科

*** 独国立病院機構 岡山医療センター小児科

【資 料】

胃腸炎ウイルスの研究

—電子顕微鏡を用いた胃腸炎ウイルスの検出（2009年度）—

Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama

—Detection of Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis by Electron Microscopy (2009-2010) —

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

Ritsushi Fujii, Masako Hamano, Mitsutaka Kuzuya, Kouji Kida,

Kouji Narahara, Shin Nouno and Tomohisa Kanadani

*岡山赤十字病院小児科

**のうの小児科

*** (独)国立病院機構 岡山医療センター小児科

要 旨

ウイルス性胃腸炎及びウイルス性食中毒の主要な原因ウイルスのうち、小型球形ウイルス(SRSV)の検査法改良のための研究を行い、以下の結果を得た。①：2009年度採取の患者糞便(散発371件)について電子顕微鏡(EM)法によるウイルス検索を行ったところ、ロタウイルス様粒子が63件、アデノウイルス様粒子が2件、SRSV様粒子が18件観察された。②：2001年4月～2008年3月採取の散発患者糞便についてEM法でSRSV様粒子が観察され、PCR法でノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルスが陰性の11件について低速遠心法によるEM観察を行い、3件でSRSV様粒子塊が観察されたので、これらについて同定、確認をするための検査法を検討する必要がある。

[キーワード：小型球形ウイルス，電子顕微鏡法，低速遠心法]

[Key words : Small Round Structured Virus, Electron Microscopy, low-speed centrifugation method]

1. はじめに

A群ロタウイルス(ARV)、C群ロタウイルス(CRV)、及びノロウイルス(NoV)、サポウイルス(SV)、アストロウイルス(AstV)等の小型球形ウイルス(SRSV)は感染性胃腸炎の主原因ウイルスであり、毎年多くの患者が発生している¹⁾。したがって、これらのウイルスの流行状況を解明することは予防対策上不可欠である。

AからG群に分類されるロタウイルスのうち、ARVについては酵素抗体(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が、近年、簡便な検査法のない血清型であるG9型²⁾や、市販試薬による検出率が低下している血清型であるG3型³⁾が増加し、検査法を検討する必要がある。

また、CRVについては日本各地で集団胃腸炎の報告が

なされ、公衆衛生上の問題点となっていた^{4)~14)}が、簡便な検査法がなかったため、我々は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^{15),16)}が、これらの検査法で検出不可能なCRVの出現を監視する必要がある。

さらに、NoV、SV、AstV等のSRSVは感染性胃腸炎の主原因ウイルスであり、これらのウイルスの流行状況を解明することは予防対策上不可欠であるが、電子顕微鏡(EM)法で検出され、PCR法で同定不能なSRSV陽性検体について検査法を検討する必要がある。

以上により、本年度は2009年4月～2010年3月に散発した感染性胃腸炎患者の糞便について、ロタウイルス(RV)、アデノウイルス(ADV)及びSRSV様粒子を検出するためEM法によるウイルス検索を行った。これにより、ウイルスの流行状況を把握するとともに、SRSV様

粒子が観察された検体については、PCR法により同定不能な検体を検索するための検査材料とする。

さらに、電子顕微鏡で観察されるSRSV様粒子は、粒子数が少ない場合、夾雑物との判別が困難であるため、低速遠心法によるウイルス性粒子塊のEM観察を行った。

2. 材料と方法

(1) EM法によるウイルス検索

2009年4月～2010年3月に岡山地区(岡山赤十字病院, 独立行政法人国立病院機構 岡山医療センター)及び玉野地区(のうの小児科)の感染性胃腸炎患者各々52名, 304名及び15名, 合計371名から糞便を採取した。

RV, 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¹⁷⁾。

(2) 低速遠心法によるウイルス粒子塊のEM観察

2001年4月～2008年3月に岡山赤十字病院, 独立行政法人国立病院機構 岡山医療センター及びのうの小児科で採取した散発患者糞便のうち, EMでSRSV様粒子が観察された検体(粒子数が30個/メッシュ程度以上のもの)のうち, 既報¹⁾のPCR法でNoV, SV, AstVが検出されなかった糞便11件について, 既報^{18), 19)}の低速遠心法によるウイルス粒子塊のEM観察を行った。

3. 結果

(1) 患者発生状況

岡山県感染症発生動向調査事業に基づく, 2009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2週(1月)に急増し, 第4週(1月)にはピークの19.91名に達し, 2009年度で最多となった。第8週(2月)以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1に示すとおり, 合計371件の散発患者糞便よりRV63件(17.0%), ADV2件(0.5%), SRSV18件(4.9%), 合計83件(22.4%)のウイルス様粒子がEM法により観察された。

月別ウイルス検出状況は表1に示すとおり, RVは2009年4, 5月, 2010年2, 3月に多く検出された。ADVは2009年5月, 2010年3月に検出された。SRSVは2009年4～6, 9, 10月と2009年12月～2010年3月に検出され, 2010年1月に特に多く検出された。

(3) 低速遠心法によるウイルス粒子塊のEM観察

NoV, SV, AstV用PCR法で同定できなかった糞便11件について, 低速遠心法によるウイルス粒子塊のEM観察を行ったところ, SRSV様粒子3件, RV様粒子とADV様粒子各1件が観察された。

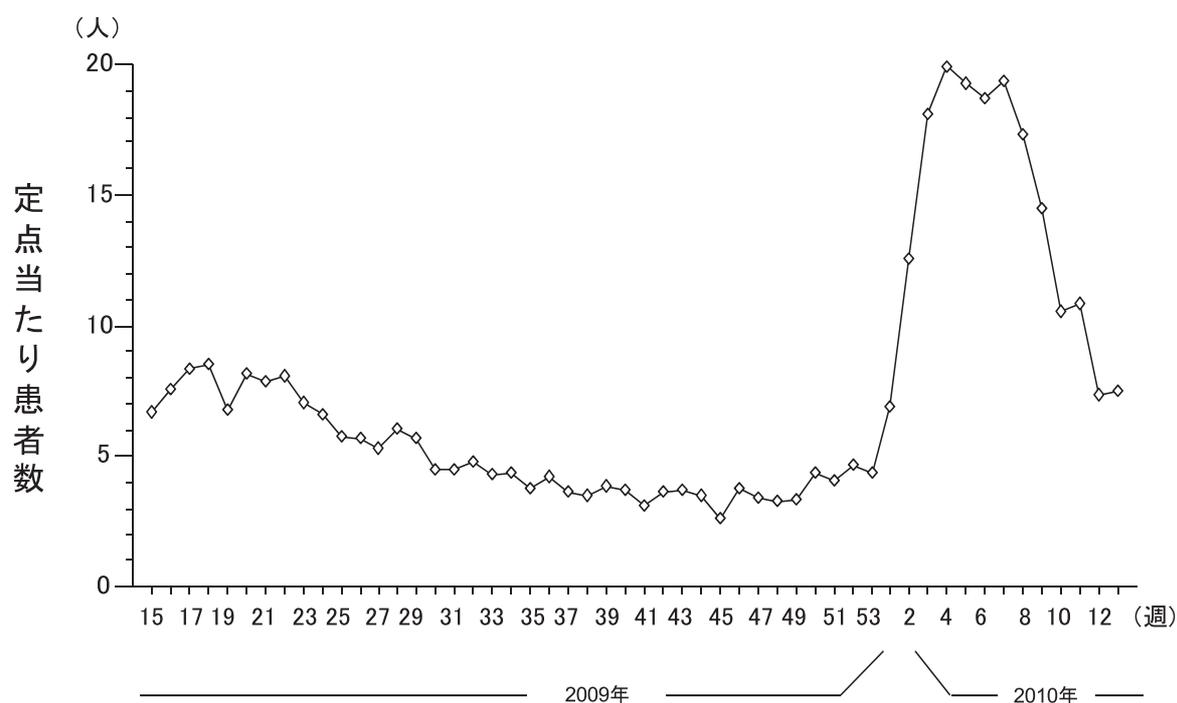


図1 感染性胃腸炎の発生状況

表1 採取年月別・採取機関別ウイルス検出状況（電子顕微鏡法）

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
	RV	SRSV	陰性	小計	RV	ADV	SRSV	陰性	小計	RV	陰性	小計	
2009年4月	1	0	2	3	14	0	2	46	62	0	2	2	67
5月	0	0	4	4	7	1	1	25	34	0	4	4	42
6月	0	0	4	4	0	0	1	6	7	—	—	—	11
7月	0	0	5	5	0	0	0	14	14	—	—	—	19
8月	0	0	6	6	0	0	0	9	9	0	2	2	17
9月	0	0	1	1	0	0	2	10	12	0	1	1	14
10月	0	1	6	7	0	0	1	6	7	0	2	2	16
11月	0	0	3	3	0	0	0	2	2	—	—	—	5
12月	0	0	6	6	0	0	1	2	3	—	—	—	9
2010年1月	0	0	3	3	5	0	6	35	46	0	1	1	50
2月	0	0	6	6	13	0	2	33	48	—	—	—	54
3月	2	0	2	4	20	1	1	38	60	1	2	3	67
計	3	1	48	52	59	2	17	226	304	1	14	15	371

4. 考察

冬期を中心とするウイルス性胃腸炎患者の発生ピークは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RVにより, 二峰性の発生曲線を持つ傾向が指摘されている²⁰⁾が, 2009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とは異なり, 一峰(第4週: 定点当たり患者数19.91名)のみで高いピークを示した(図1)。2008年度冬期も明瞭な二峰性の発生パターンを示さなかった¹⁹⁾が, 2008年度には12月中に患者数の急激な増加が見られたのに対し, 2009年度では12月までは患者数の増大が見られず, 過去の流行状況とは大きく異なっていた。このことは, 10~12月に新型インフルエンザの大きな流行があった(岡山県感染症発生動向調査事業)ことと関連している可能性があると考えられる。

ウイルス検出状況では, SRSVは1月に特に多く検出され, RVは4, 5月及び翌年2, 3月に多く検出された。SRSVの検出状況は患者発生状況と一致する状況であったが, RVの検出状況は患者発生状況とは異なっていた。

EM観察でSRSV様粒子が観察された検体については, 今後, さらに, NoV, SV, AstVの同定を行い, 同定不能な検体については, 同定法を検討するための検査材料として収集していく必要がある。また, これらの検体については培養細胞によるウイルス培養を試みる必要がある。ウイルスの培養が可能な場合は, エンテロウイルス等の可能性を検討する必要があると思われる。

また, 培養不可能なSRSV検体については, さらに多

くの検体をEM観察することにより, 形態的特徴に基づいた分類を行い, 各分類の代表的な検体に対してMAbを用いた検出法やPCR法による検出法等を検討する必要があると考えられる。

文 献

- 1) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 西島倫子, 橋原幸二, 濃野 信, 金谷誠久: 胃腸炎ウイルスの研究(2007年度), 岡山県環境保健センター年報, 32, 115-127, 2008
- 2) Yoshinaga, M., Phan, T. G., Nguyen, T. A., Yan, H., Yagyū, F., Okitsu, S., Muller, W. E., Ushijima, H.: Changing distribution of group A rotavirus G-types and genetic analysis of G9 circulating in Japan, Arch. Virol., 151, 183-192, 2005
- 3) Phan, T. G., Trinh, Q. D., Khamrin, P., Kaneshi, K., Ueda, Y., Nakaya, S., Nishimura, S., Sugita, K., Nishimura, T., Yamamoto, A., Takanashi, S., Yagyū, F., Okitsu, S., Ushijima, H.: Emergence of new variant rotavirus G3 among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2003-2004, Clin. Lab., 53, 41-48, 2007
- 4) 浦沢正三, 谷口孝喜: ロタウイルス—概論—, 臨床と微生物, 13(4), 53-60, 1986
- 5) Matsumoto, K., Hatano, M., Kobayashi, K., Hasegawa, A., Yamazaki, S., Nakata S., Chiba, S., Kimura, Y.: An outbreak of gastroenteritis associ-

- ated with acute rotaviral infection in schoolchildren, *J. Infect. Dis.*, 160, 611-615, 1989
- 6) Otsu, R. : A mass outbreak of gastroenteritis associated with group C rotaviral infection in schoolchildren, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 21, 75-80, 1998
 - 7) Oishi, I., Yamazaki, K., Minekawa, Y. : An occurrence of diarrheal cases associated with group C rotavirus in adults, *Microbiol. Immunol.*, 37, 505-509, 1993
 - 8) 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
 - 9) 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
 - 10) 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
 - 11) 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
 - 12) 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
 - 13) 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
 - 14) 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
 - 15) Fujii, R., Kuzuya, M., Hamano, M., Yamada, M., Yamazaki, S. : Detection of human group C rotaviruses by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies, *J. Clin. Microbiol.*, 31 (5), 1307-1311, 1992
 - 16) 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
 - 17) 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
 - 18) Narang, H. K., Codd, A. A. : Frequency of pre-clumped virus in routine fecal specimens from patients with acute nonbacterial gastroenteritis, *J. Clin. Microbiol.*, 13 (5), 982-988, 1981
 - 19) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 榎原幸二, 濃野信, 金谷誠久 : 胃腸炎ウイルスの研究(2008年度), 岡山県環境保健センター年報, 33, 113-125, 2009
 - 20) 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