

胃腸炎起因ウイルス検索に関する研究

金成篤子 菱沼郁美 柏原尚子 廣瀬昌子 三川正秀 大竹俊秀
微生物グループ

要 旨

胃腸炎患者の糞便検体でノロウイルスが検出されなかったものについて、サポウイルス、アイチウイルス、アストロウイルスの検索を RT-PCR 法により実施した。2005 年から 2007 年における集団発生の 4 事例 33 件について実施したがいずれも検出されず、2007 年 9 月から 2008 年 3 月受付の散发事例 136 件について実施したところ、11 月および 1 月採取の 2 検体からサポウイルスが検出された。

キーワード：サポウイルス、アイチウイルス、アストロウイルス、RT-PCR 法

はじめに

近年、食中毒の病因物質としてウイルスが注目されるようになってきている。また、冬期における集団胃腸炎の原因としてもウイルスが問題になっている。その主なものは、ノロウイルスであるが、ノロウイルスが検出されない事例もしばしば見られる。他県においては、サポウイルス（以下“SV”とする）、アイチウイルス（以下“AiV”とする）、アストロウイルス（以下“AstV”とする）による集団胃腸炎発生の報告^{1)~7)}がされている。しかし、本県においてはこれまでこれらのウイルスについて検索を実施していなかった。そこで、これらの検索を RT-PCR 法によって実施したので報告する。また、胃腸炎起因ウイルスの検索方法として有効といわれている電子顕微鏡法についても若干検討したので併せて報告する。

材 料

1 遺伝子検索

2005 年から 2007 年 12 月に発生した集団胃腸炎事件でノロウイルスの検査依頼があり、ノロウイルスが検出されなかった 4 事例、糞便検体計 33 件(集団発生事例)(表 1)、さらに、2007 年 9 月から 2008 年 3 月に感染症発生動向調査事業で搬入された胃腸炎の診断名で、ノロウイルスの検査を実施しノロウイルスが検出されなかった糞便検体計

136 件(散发事例)(表 2)、合計 169 件について検索を行った。

表 1 検討した集団発生事例

検査依頼年月日	管轄保健所	検体数
2005年9月23日	相双	13
2006年11月7日	県北	7
2007年5月28日	県北	8
2007年8月21日	県中	5
計		33

表 2 検討した散发事例

受付月	2007年				2008年			計
	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	
検体数	10	13	18	18	35	17	25	136

2 電子顕微鏡による検索

今年度は、検体から電子顕微鏡観察用試料の作成から観察、写真撮影までの一連の操作の習得を一番の目的とした。ノロウイルスについては 2007 年感染症動向調査の検体で、ノロウイルスが検出されたものについて観察撮影した。

方 法

1 遺伝子検索

採取液に採られた直腸拭い液等の場合はそのまま、生の糞便検体の場合は、PBS で 10 %乳剤を作成し、それぞれ激しく攪拌した

後, 11,000rpm, 20 分間冷却遠心し RNA の抽出を行った. RNA の抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を使用した. DNase 処理後, RT 反応を Super Script II RT (Invitrogen), または High-Capacity cDNA RT Kits(Applied Biosystems)により行い, cDNA を作成した. 作成後, 「ウイルス性下痢症診断マニュアル」(第 3 版)(平成 15 年 7 月 国立感染症研究所)に準じて SV, AiV, AstV について PCR 反応を実施した. 使用したプライマーは表 3 に示した.

表 3 使用したプライマーとPCR産物のバンドのサイズ

		プライマー	サイズ(bp)
SV	1st	SV-F11/SV-R1	780
	2nd	SV-F2/SV-R2	430
AiV	1st	C6261/C6779	519
	2nd	C94b(+)/C264k(-)	266
AstV	1st	PreCAP1/12Gr	2,556
	2nd	Mon244/82b	390

AstV の 1st PCR 産物については, 1.2%Seakem GTG Agarose, その他は 3%Nusieve3:1Agarose を使用し電気泳動した後, エチジウムブロマイド染色液で染色して UV 照射で写真撮影し, バンドの確認を行った. それぞれのウイルスに該当する位置にバンドが確認された場合は, バンドを切り出し, MinElute Gel Extraction Kit(QIAGEN)にて精製した. 精製した PCR 産物は Big Dye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit(ABI)でサイクルシーケンス反応を行った. その産物を BigDye XTerminator 精製キット(Applied Biosystems)で精製後, ABIPRISM 3100-Avant(Applied Biosystems)を使用して遺伝子配列決定し, さらに BLAST(DDBJ)を用いて相同性検索を行った.

しかし, 上記の方法では, それぞれのウイルスについて個別に 2nd PCR まで検索する必要がある, 手間と時間及び経費を要する. そのため 11 月の散発事例から, 原田らの構築した RT-multiplex PCR 法⁸⁾により検索を実施し, これらの削減を図った. これは, 3 種類のウイルスを 1 本のチューブで同時に

検出できる方法である. なお, 使用したプライマーおよび反応条件は下記のとおりである.

表 4 使用したプライマーとPCR産物のバンドのサイズ

		プライマー	サイズ(bp)
SV	1st	SR80/JV33	320
	2nd	SR80/Sapo-rev4534	189
AiV	1st	C6261/C6779	519
	2nd	C94b/C264k	266
AstV	1st	Mon269/Mon270	449
	2nd	Mon244/82b	410

反応条件

94 °C	3 分	} 40 サイクル (2nd は 30 サイクル)
94 °C	30 秒	
50 °C	30 秒	
72 °C	60 秒	
72 °C	7 分	
4 °C	保存	

2 電子顕微鏡による検索

便検体を PBS5ml に 10 % 乳剤になるよう採り, 激しく攪拌後, 3,000rpm, 15 分間冷却遠心した. その上清に代替フロン剤 (パートレイル) を等量加え, 激しく攪拌後, 3,000rpm, 15 分間冷却遠心した. 3ml のコンカルチューブにその水相 2ml を採り, 0.5ml の 30%蔗糖水溶液に重層し, 40,000rpm, 150 分間遠心した. 沈さを残して水相を除き, 100 μ l の蒸留水で洗った後, 60 μ l の蒸留水で再浮遊させたものを電子顕微鏡観察用試料とした. グリッドは市販の銅製 400 メッシュのものを使用し, イオンスパッターで 1 分間親水化処理を行った. 染色は 2 % リンタングステン酸カリ溶液 (pH7.0) を使用しグリッド固定法により行った. 観察は透過型電子顕微鏡 (日本電子 JEM-100CX 型) により倍率 53,000 倍で行った.

結果及び考察

1 遺伝子検索

集団発生事例 4 例の検体からは, SV, AiV, AstV は検出されなかった. 散発事例では, 11

月および1月採取の2検体からSVが検出された。SVは本県において初めての検出である。11月採取の症例は、相双地区の4歳男児で、臨床症状は下痢、嘔気、嘔吐、腹痛で、発熱はなかった。検体は直腸拭い液であった。また、1月採取の症例は、郡山地区の4歳女児で、臨床症状は嘔気、嘔吐、腹痛で、発熱はなかった。検体は糞便であった。このPCR産物を切り取り、サイクルシーケンス反応を行い決定した遺伝子配列をBLASTで相同性検索を実施した。その結果、11月採取の症例は、Bristol/98/UK (AccessionNo.AJ249939)と最も高い相同性(93%)を示し、SV G II群であることが判明した。1月採取の症例はSLV/Mex14917/2000 (AccessionNo.AF435813)と最も高い相同性(93%)を示し、SV G I群であることが判明した。

2 電子顕微鏡による検索

ノロウイルスについて観察撮影をした写真を示す(図1)。また、遺伝子検索でSVが検出された検体について観察撮影した写真を示す(図2)。

感染症発生動向調査の検体の内、感染性胃腸炎の診断名で細胞分離培養法(LLCMK2細胞)で分離したが難同定であったものについて、試料作成し観察を行った。その結果、レオウイルス様形態が観察された(図3)。この結果を基に、レオウイルスについてRT-PCR法⁹⁾により遺伝子検索を実施したところ、レオウイルス属であることが確認された。電子顕微鏡による形態観察からウイルスの同定に結びつけることが出来た事例であった。

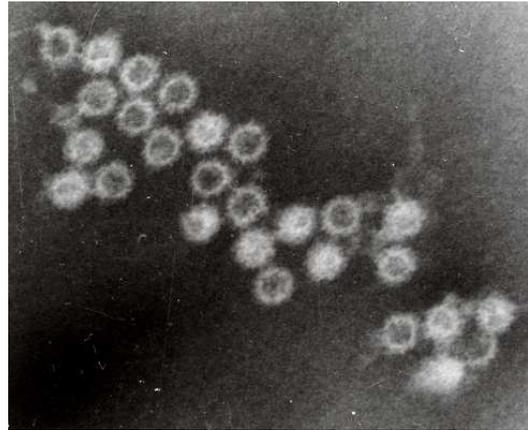


図1 ノロウイルス

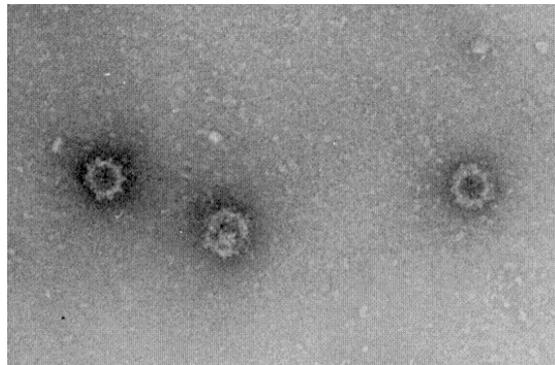


図2 サポウイルス

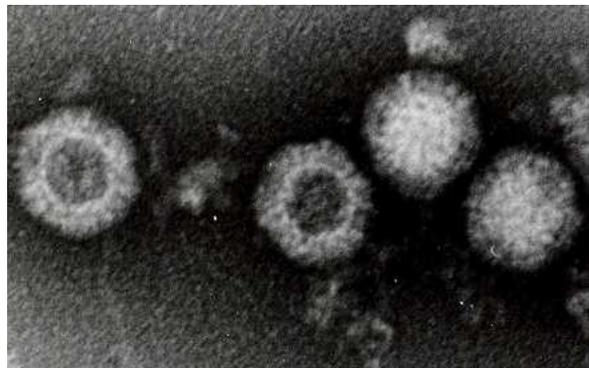


図3 レオウイルス様粒子

まとめ

1 ノロウイルスが検出されなかった胃腸炎事例について、SV、AiV、AstVのRT-PCR法による遺伝子検索を実施した。2005年から2007年12月に発生した集団胃腸炎事件4例、糞便検体計33件からはいずれも検出されなかった。さらに、2007年9月から2008年3月に感染症発生動向調査事業で搬入された散发事例136検体について実施した。

その結果、11月および1月採取の2検体からSVが本県で初めて検出された。

2 遺伝子検索法としては、3種類のウイルスについて個々に実施する方法ではなく、RT-multiplex PCR法で同時に3種類について検索する方法が経費と効率の面で優れており、今後は、この方法で実施していきたいと考えている。

3 電子顕微鏡法については、ノロウイルスを始め種々のウイルスについて観察、撮影が可能であった。今後は、観察するウイルスを増やし、各種ウイルスの電子顕微鏡像資料を作成していき、未知検体のウイルス検索に役立ていきたいと考えている。

ルス同時検出 RT-multiplex PCR法の構築と下痢症起因ウイルスの検査成績。熊本県保健環境科学研究所報。2004；34：31-36。

9)Michael L.Spinner,George D.Di Giovanni. Detection and identification of mammalian reoviruses in surface water by combined cell culture and reverse transcription-PCR. Applied and environmental microbiology. 2001；67：3016-3020.

引用文献

- 1)岩切章，元明秀成，山本正悟，他．サポウイルスによる感染性胃腸炎集団発生の2事例－宮崎県．病原微生物検出情報．2005；26：338-339.
- 2)古屋由美子，片山丘，宮原香代子，他．小学校で発生したサポウイルスによる集団胃腸炎2事例，ヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎1事例－神奈川県．病原微生物検出情報．2005；26：339.
- 3)宇宿秀三，熊崎真琴，野口有三，他．修学旅行時に発生したサポウイルスによる集団食中毒事例－横浜市．病原微生物検出情報．2007；28：294-295.
- 4)山下照夫，都築秀明，小林慎一，他．胃腸炎患者から分離された新型ピコルナウイルス（アイチウイルス）のRT-PCR法による検出．臨床とウイルス．1999；27：127-132.
- 5)小河正雄，田代潔子，吉用省三，他．アイチウイルスが検出された食中毒事例－大分県．病原微生物検出情報．2006；27：13.
- 6)Oishi I, et al. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. J Infect Dis. 1994；170：439-443.
- 7)森功次．アデノウイルス感染症・アストロウイルス感染症．公衆衛生．2007；12：994-997.
- 8)原田誠也，濱洲大輔，荒平雄二，他．サポウイルス，アストロウイルス及びアイチウイ