3　調査研究

3・1　報　文

1) PCR法による集団及び散発性下痢症事例からの起因ウイルス検索

原田 誠也　松尾 繁　濱洲 大輔*　中島 龍一

要　旨

2005～2006年度に発生した食中毒，胃腸炎集団感染，有症苦情及び追跡調査を含む集団発生事例と乳幼児の散発性下痢症例から，real-time PCR法とmultiplex RT-PCR法による起因ウイルス検索を行なった。その結果，集団発生では，48事例中22事例（45.8%）から起因ウイルスが検出された。内訳は，ノロウイルスgenogroupⅡ（NV（GⅡ））が19事例，NV（GⅠ）が1事例，A群ロタウイルス（A群RV）が1事例，NV（GⅠ）/NV（GⅡ）/アイチウイルス（AiV）の重複感染が1事例であった。

一方，散発性下痢症例では，172例中118例（68.6%）から起因ウイルスが検出された。検出ウイルスの内訳は，NV（GⅠ）が4例（3.4%），NV（GⅡ）が78例（66.1 %），サポウイルス（SV）が15例（12.7 %），アストロウイルス（AstV）が2例（1.7 %），AiVが1例（0.8%），エンテロウイルス（EntV）が2例（1.7%），アデノウイルス（AdV）が3例（2.5%）及びA群RVが20例（16.9%）であり，この中には7例の重複感染例（A群RV / NV（GⅡ）：4例，SV / NV（GⅡ）：1例，AiV/ NV（GⅡ）：1例及びA群RV / AstV：1例）が含まれている。

キーワード：ノロウイルス，サポウイルス，アストロウイルス，アイチウイルス，エンテロウイルス，アデノウイルス，ロタウイルス，multiplex RT-PCR法

はじめに

近年，冬季に頻発する感染性下痢症や集団食中毒の起因ウイルスとして，ノロウイルス（NV）が注目されている[1]。NVはわずかなウイルス量で感染が成立するため規模が拡大しやすく，報道される機会も多い。しかし，下痢症起因ウイルスには，ノロウイルスの他にもアデノウイルス（AdV），ロタウイルス（RV），サポウイルス（SV），アストロウイルス（AstV），アイチウイルス（AiV）及びエンテロウイルス（EntV）など，さまざまなウイルスがある。これらは主に乳幼児散発下痢症の起因ウイルスとして知られているが，学童や成人の集団下痢症事例も報告されている。このうち，AdVとRVはすでに簡易検査キットが開発され普及しているが，SV，AstV，AiV及びEntVは簡易な検査法がなく，その実態はよく分かっていない。

我々は，2002年度以降，集団下痢症事例の原因究明と乳幼児の散発下痢症サーベイランスにRT-PCR法によるSV，AstV及びAiV検査を導入した。しかし，各PCR反応液を別々に調整していたため非常に煩雑であり，さらに各PCRの条件も異なっていたため複数のPCR装置が必要であった。そこで，プライマーの種類と反応条件を検討し，1本のチューブでSV，AstV及びAiVを同時に検出できるmultiplex RT-PCR法を構築[2]した。今回この方法をさらに改良し，EntVを追加した。また，市販ELISAキットやRPHAキットで検査していたAdV，A群RV及びC群RVの検査に，Yan[7]らが報告したmultiplex RT-PCR法を導入し，PCR条件を再検討して前者と条件を統一した。なお，検出率の高いNV検査は，2004年度に導入されたreal-time PCR装置で実施していることから，すべての検査が簡便で検出感度の高いPCR法で行なえるようになった。

2002～2004年度の検査結果は既報[2]で報告したので，今回は新たに改良したmultiplex RT-PCR法の

* 現熊本県健康福祉部高齢者支援総室

概要と2005～2006年度に発生した集団及び散発下痢症事例の検査成績を報告する。

材料と方法

1　供試検体

2005年4月～2007年3月に検査した食中毒，胃腸炎集団感染，有症苦情及び追跡調査を含む集団発生48事例及び主に宇土・上天草地区の医療機関（小児科）で散発性感染性胃腸炎として採取された糞便172検体を検査対象とした。集団発生事例における供試検体の内訳は，患者便249検体，吐物：9検体，調理従事者便：143検体，食品・食材：77検体，ふきとり材料：30検体の合計508検体である。

2　検体の前処理とcDNA作製

糞便及び吐物の前処理とcDNA作製は，既報[2]のとおり逆転写酵素にReverTra Ace（TOYOBO）を使用した方法で実施した。

食品・食材及び拭き取り材料の検査は，食品・食材ではPBS（-）で10％乳剤にしたもの，拭き取り材料ではPBS（-）10mℓ中に振り出したものを10,000rpm，20分間冷却遠心後，上清を30％ショ糖溶液1mℓ入れた超遠心用遠心管に重層し，40,000rpm，120分間遠心した。沈渣を200μℓの蒸留水に再浮遊し，厚労省通知[3]に準じてcDNA作製を行なった。ただし，逆転写酵素はSuper Script Ⅲ RNase H- Reverse Transcriptase（Invitrogen）を使用した。

3　real-time PCR法によるNVの検出

検出率の高いNV検査は，既報[2]のとおりLight Cycler DX400 (Roche) によるreal-time PCR法を基本とした。使用したプライマーとTaqManプローブは厚労省通知[3]どおりGⅠ用プライマーがCOG1F/COG1RとTaqManプローブRING1-TP（a），RING1-TP（b），GⅡ用プライマーがCOG2F，ALPF/COG2RとTaqManプローブRING2AL-TPである。なお，食品等，糞便以外の検査では，通常のnested RT-PCR法も平行して実施した。

4　SV，AstV，AiV及びEntV検出用multiplex RT-PCRの構築

SV，AstV，AiV及びEntV同時検出用プライマーとして，既報[2]のプライマー（SVはVinjeら[4]のSR80/JV33，AstVはNoelら[5]のMon269/Mon270，AVはYamashitaら[6]のC6261/C6779）に，EntV検出用として汎用されているEVP4/OL68-1（EVP4：5′-CTA CTT TGG GTG TCC GTG TT-3′，OL68-1：5′-GGT AAY TTC CAC CAC CAN CC-3′，増幅サイズ：約650bp）を追加した。

プライマー溶液の調整は，各プライマーの濃度が25μMになるように滅菌再蒸留水で希釈後，4対8本のプライマー溶液を等量混合してミックス・プライマー溶液とし，PCR反応液の調整を簡素化した。

PCR反応液は10×PCR buffer（Takara）：2.5μℓ，dNTPs（各2.5mM）：2μℓ，ミックス・プライマー溶液：1.6μℓ，EXTaq（2.5u/μℓ，Takara）：0.125μℓ，滅菌再蒸留水：16.275μℓにcDNA溶液：2.5μℓを加え，全量を25μℓとした。反応条件は94℃，3分間加熱後，熱変性（94℃：30秒），アニーリング（50℃：30秒），伸長反応（72℃：60秒）を40サイクル行い，最後に72℃，7分間反応後，4℃保存とした。

5　AdV，A群RV及びC群RV検出用multiplex RT-PCRの導入・改変

AdV，A群RV及びC群RV同時検出用multiplex RT-PCRは，Yanら[7]の方法を導入し，当所で行なっているcDNA合成手順とPCRの温度条件に合わせて若干改変した。すなわち，PCR反応液量を25μℓに減じ，テンプレートとして未処理の抽出RNA溶液とcDNA溶液を1.25μℓずつ等量加えることにした。また，プライマー溶液は，前者のmultiplex RT-PCR法同様ミックス・プライマー溶液とし，反応液の最終プライマー濃度が0.2μMになるように添加するとともに，1台のPCR装置で検査が行えるようPCR条件を前者と統一した。

結　果

1　各multiplex RT-PCR法の検査結果

SV，AstV，AiV及びEntV検出用multiplex RT-PCR法の使用例を図1に示す。この例ではEntV陽性検体に薄い非特異バンドが認められるが，目的バンドは明確であり，判定は容易であった。

次に，AdV，A群RV及びC群RV検査用multiplex RT-PCR法の使用例を図2に示す。AdV陽性検体と単独又は混合して用いた各種陽性対照は正確に検出された。陰性検体に非特異バンドが見られるが，目的バンドとサイズが異なっているため，特に判定に不都合は感じられなかった。

なお，本法の導入に伴い，2002～2004年度の散発性下痢症検体で，原因病原体が検出できなかった111検体を再検査した結果，新たに9検体からA群RVが検出された（データ未掲載）。

2　集団下痢症事例の検査成績

ウイルスが検出された集団発生事例を表1に示す。集団下痢症48事例中22事例（45.8％）からウイルス

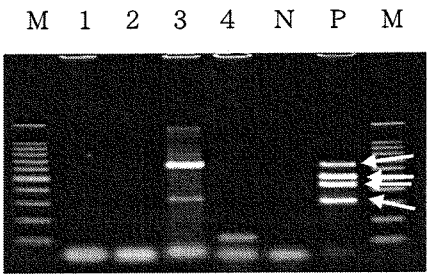

図１　SV/AstV/AiV/EntV検出PCR

M：マーカー，１：陰性検体，２：陰性検体，３：EntV陽性検体，４：NV陽性検体，N：陰性対照，P：ミックス陽性対照，M：マーカー

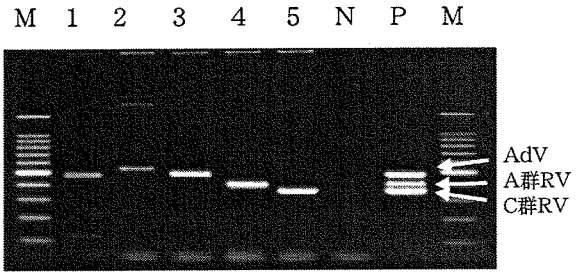

図２　AdV /RV(A&C)検出PCR

M：マーカー，１：AdV陽性検体，２：陰性検体，３：AdV陽性対照，４：RV（A）陽性対照，５：RV（C）:陽性対照，N：陰性対照，P：ミックス陽性対照，M：マーカー

表１　ウイルスが検出された集団発生事例

事例	発生年月	発生施設	発生場所	患者数	陽性数/検体数				検出ウイルス	備考
				摂食者等	患者便	患者吐物	調理従事者便	食品ふきとり		
1	2005. 6	保育園	八代HC管内	8/121	2/2				A群RV	
2	2005. 6	飲食店	人吉HC管内	17/31	7/17				NV（GⅡ）	
					1/17				NV（GⅡ），AstV	
							1/3		NV(GⅡ)/A群RV	
3	2005.11	家庭？	菊池HC管内	4/4	1/1				NV（GⅡ）	
4	2005.11	斎場	熊本市内	15/31	2/2				NV（GⅡ）	
5	2006. 1	家庭？	八代HC管内	6/12	2/2				NV（GⅡ）	
6	2006. 2	高校寮	菊池HC管内	14/32	6/6		0/4		NV（GⅡ）	
7	2006. 2	飲食店	菊池HC管内	4/7	4/4		0/3	0/11	NV（GⅡ）	カキ関連?
8	2006. 3	旅館	山鹿HC管内	13/24	5/6		0/5	0/24	NV（GⅡ）	
					1/6				NV（GⅠ）	
9	2006. 3	飲食店	天草HC管内	8/15	1/6		0/2		NV（GⅠ）	
					2/6				NV(GⅠ)/NV(GⅡ)	カキ関連?
					2/6				NV（GⅠ）/AiV	
10	2006. 4	結婚式場	東京都内	20/77	3/3				NV（GⅡ）	
11	2006. 4	飲食店	福岡市内	27/36	2/2				NV（GⅠ）	
12	2006. 4	旅館	東京都内	56/76	2/2				NV（GⅡ）	
13	2006. 9	飲食店	宇城HC管内	17/33	3/4		4/12	0/1	NV（GⅡ）	
14	2006.10	家庭?	菊池HC管内	2/2	1/1				NV（GⅡ）	
15	2006.10	飲食店（旅行）	北海道内	12/50	1/1				NV（GⅡ）	
16	2006.10	家庭	菊池HC管内	3/4	3/3				NV（GⅡ）	
17	2006.11	飲食店	八代HC管内	16/26	6/6		0/1		NV（GⅡ）	
18	2006.11	老健施設	山鹿HC管内	23/44	3/4				NV（GⅡ）	
19	2006.12	飲食店（旅行）	奈良市内	?	11/12				NV（GⅡ）	
20	2006.12	老健施設	阿蘇HC管内	41/98	20/31	5/6		0/8	NV（GⅡ）	
21	2007. 1	家庭	菊池HC管内	2/3	2/3				NV（GⅡ）	
22	2007. 2	中学校	天草HC管内	64/164	3/3	1/1	0/8	0/23	NV（GⅡ）	

表２　散発性下痢症例からのウイルス検出成績（延べ数）

年度	月	検体数	陽性検体数	NV (GⅠ)	NV (GⅡ)	SV	AstV	AiV	EntV	AdV	A群RV	C群RV	陰性
	4												
	5	6	3	2							1		3
	6	5	1								1		4
	7	2											2
	8	1											1
	9												
2005	10												
	11	25	15		13	2							10
	12	27	22		19	4					1		5
	1	2	2								2		
	2	6	2		1					1			4
	3	4	4		3						1		
	小計	78	49	2	36	6	0	0	0	1	6	0	29
	4	2	1								1		1
	5												
	6												
	7	2	1						1				1
	8	1	0										1
	9	5	2			1			1				3
2006	10	11	6		4					1	1		5
	11	22	18		16	1					3		4
	12	20	16	1	9	5		1		1			4
	1	18	15		10	2	2				2		3
	2	5	5		1						5		
	3	8	5	1	2						2		3
	小計	94	69	2	42	9	2	1	2	2	14	0	25
合　計		172	118	4	78	15	2	1	2	3	20	0	54
検出率（%）		100.0%	68.6%	2.3%	45.3%	8.7%	1.2%	0.6%	1.2%	1.7%	11.6%	0.0%	31.4%
陽性検体の内訳（%）			100%	3.4%	66.1%	12.7%	1.7%	0.8%	1.7%	2.5%	16.9%	0.0%	

表３　複数のウイルスが検出された散発症例

年　度	A群RV NV(GⅡ)	SV NV(GⅡ)	AV NV(GⅡ)	A群RV AstV
2005	1	1		
2006	3		1	1
合　計	4	1	1	1

が検出された。このうちNV（GⅡ）単独感染事例が19事例（86.4%）を占めた。その他NV（GⅠ）が1事例（4.5%），A群RVが1事例（4.5%），NV（GⅠ）/NV（GⅡ）/AiVの重複感染が１事例（4.5%）であった。なお今回は，熊本市や他都道県で発生し，追跡調査を行なった事例が６事例あった。これらを除いた原因施設別では，飲食店・旅館が６事例，家庭での感染症と考えられる事例が５事例，学校･保育園が３事例，老健施設が2事例の順であった。

ウイルス性集団下痢症事例のピークは10月～12月の冬季であったが，4月～6月にも5事例発生している。また，前回[2]に比べ，家庭での小規模なNV感染事例が増加し，老健施設等での発生が減少した。

3　散発下痢症事例の検査成績

散発下痢症事例からのウイルス検出状況を表２に示す。散発下痢症172例中118例（68.6%）からウイルスが検出された。延べ数によるウイルス陽性検体の内訳は，NV（GⅠ）が4例（3.4%），NV（GⅡ）が78例(66.1%)，SVが15例(12.7%)，AstVが２例(1.7%)，AiVが１例（0.8%），EntVが２例（1.7%），AdVが３例（2.5%）及びA群RVが20例（16.9%）であった。なお，この中に含まれている複数ウイルス検出例を表３に示す。内訳はA群RV / NV（GⅡ）が４例で最も多く，その他SV / NV（GⅡ）が1例，AiV/ NV（GⅡ）が1例及びA群RV / AstVが１例であった。

今回新たに改良したmultiplex RT-PCR法で検出されたEntVは，２例とも細胞培養法でウイルスが分離されており，抗血清による中和試験でエコーウイルス18と同定された。

月別にみると，大部分が 10月～翌年４月に検出されている。特にNVは11月～翌年１月に検出数が急増した。また，既報[2]よりもSVの検出数が少し増加し，NV同様11月～翌年1月に発生する傾向が窺われた。一方，A群RVはNVより少し遅れ，翌1月から検出率が増す傾向にあったが，その他のウイルスは検出率が低く，発生時期の傾向を把握することはできなかった。

考　察

2005～2007年度間に搬入された食中毒，胃腸炎集団感染，有症苦情及び追跡調査を含む集団発生事例48事例508検体と乳幼児の散発性感染性胃腸炎由来糞

便172検体から，real-time PCR法と2つのmultiplex RT-PCR法による起因ウイルスの検索を行なった。

集団発生事例では，ウイルスが検出された事例の95.5％をNVが占め，そのほとんどがNV（GⅡ）によるものであった。発生時期は拡大し，冬季のみならず，真夏の数ヶ月を除き年中発生している。特に今回は，家庭，学校・保育園，老健施設での集団感染症事例が多く，食中毒との区別が難しい事例も見られた。従来多かったカキ関連の事例はわずか２事例で，1事例はＮＶ（ＧⅡ）単独感染，他の１事例はNV（ＧⅠ）/ NV（GⅡ）/ AiVの重複感染であった。また，2004/2005シーズンに比べ，老健施設での発生件数は減少した。NVはわずかなウイルス量で感染するため規模が拡大し，患者が複数の県にまたがる事例も多い。当所でもこの２年間に，熊本市と他都県からの依頼により，６事例の追跡調査を行なった。

なお，前述のようにカキ関連の集団発生事例から，本県でも初めてAiVが検出された。AiVについて，1987年から1998年の12年間に発生した集団下痢症37事例268名の患者便をRT-PCR法で調べたYamashitaら[6]は，12事例54名からAiVを検出したが，すべてNVとの重複感染であったと報告しており，感染経路として生カキとの関連性を指摘している。また，小河ら[18]も，カキの塩辛が原因と見られる集団発生事例で，遺伝子群と型の異なる複数のNVとAiVの重複感染事例を報告している。本県の事例も，他県の同様カキ関連の事例であり，NVとの重複感染であったことは興味深い。

NV以外の事例は，保育園で発生した集団感染症事例からA群RVが検出されたのみであった。なお，NV（GⅡ）による集団発生事例から，集団発生とは無関係と思われるAstVとA群RVが1例ずつ検出されるなど，ウイルス検索項目を増やしたことで，複数のウイルスによる感染事例の発見が容易になった。

一方，散発下痢症例では172例中118例（68.6％）からウイルスが検出されたが，こちらもNV（GⅡ）が最も高率に検出された。NV（ＧⅠ）単独検出例とNVを含む重複感染例を併せると，ウイルスが検出された118検体中82検体（69.5％）をNVが占めた。遺伝子群別ではＧⅡが主流で，ＧⅠはわずか４例に過ぎない。NVは10月から検出され始め，11月～12月にかけて発生のピークがあった。前回の調査も同様の傾向であったことから，乳幼児散発性下痢症の主因はNV（GⅡ）であることが再確認された。

SVは15例（8.7％）から検出されたが，１例はＮＶ（ＧⅡ）との重複感染であった。SVはA群RVの20例に次ぎ多く検出され，2005年度が6例，2006年が９例で，年度により検出率に差があった。特に上天草地区での増加が目立つことから，この地区での地域流行が示唆された。患者に男女の偏りはなく，年齢は９ヶ月～９歳(平均３歳４ヶ月)の範囲であった。大部分が11月～翌１月間に検出されており，NVの流行期と重なっていた。

なお，SVは，最近Okaら[12]がTaqMan MGBプローブによるreal-time PCR法を，Okadaら[13]がnested RT-PCR法と群別用RT-PCR法を新たに報告するなど，現在注目されている下痢症起因ウイルスである。近年，集団感染事例も多数報告[8～11]されていることから，今後，SV感染症の発生実態を把握するため，サーベイランスの強化を図る必要がある。

AstVは，A群RVとの重複感染1例を含め，散発性下痢症からわずか２例（1.2％）検出されたのみで，前回[2]同様検出率が低かった。AstVの調査報告を行なっている福田ら[14]の検出率は3.2％，小島[15]は6.9％である。本県での検出率は，彼らの成績と比べても低く，ほとんど流行していないように思われた。しかし，AstVによる集団下痢症事例の報告[16,17]もあり，今後も動向調査を継続する必要があろう。

AiVは，前述の生カキを含む生鮮魚介類を食したNV（ＧⅠ）/ NV（GⅡ）/ AiVの重複感染による集団発生１事例とNV（GⅡ）/AiVの散発性下痢症例１例のみであった。両事例ともNVと共に検出されている。

A群RVは，保育園の集団下痢症から１事例検出された。散発下痢症172例では，重複感染を含め，20例（11.6％）がA群RV陽性であった。また，今回新たにmultiplex RT-PCR法を導入して検出率の向上を図った結果，臨床現場の簡易検査ではA群RV陰性と判定された検体からA群RVが数例検出された。それでも，他の報告[14,15]に比べてA群RVの検出率は低かった。検査定点の小児科は，A群RVとAdVの簡易検査成績いかんに関わらず，当所に検査を依頼していることから，検体採取地域での流行の減少が考えられた。なお，C群RVは不検出，AdVは３例（1.7％）検出であった。

複数のウイルスが検出された事例は，田中ら[19]の報告同様，本県でも集団発生事例で３件，散発性下痢症例で７例検出された。集団発生事例では前述の通り，本来の原因とは無関係と思われる下痢症起因ウイルス検出例もある。

NVが2004/2005シーズンに全国の老健施設等で多発して以来，すっかり定着し，現在では夏場の発生報

告も稀ではない。NV下痢症事例の増加にともない，検体数の増加も著しく，簡便・迅速で経済的な下痢症起因ウイルス検査法が望まれる。当所では2004年にreal-timePCR装置を導入したことでNV検査は非常に迅速に判定可能となった。さらに，今回われわれはSV，AstV及びAiV同時検出multiplex RT-PCR法[2]を改良し，乳幼児下痢症の原因ともなるEntV検出用のプライマーを追加した。また，同時に，Yanら[7]のAdV，A群RV及びC群RV同時検出multiplex RT-PCR法を導入し，反応条件等を前者と統一した。これにより，NV以外の７種類のウイルスが，わずか２本のチューブと１台のPCR装置で検査可能となった。ただし，使用しているプライマーの設計が多少古いため，検出不可能なウイルスの存在も否めないが，PCR法のため高感度であり，検査に要する手間，時間，経費等を大幅に削減することができた。また，複数のウイルスによる重複感染等も感度よく検出できるようになったことから，ウイルス性下痢症のスクリーニング検査として十分役立つと思われる。

参考文献

1) 西尾　治，吉澄志磨，野田　衛：日食徴誌，**21**，173（2004）.
2) 原田誠也，濱洲大輔，荒平 雄二，西村浩一，松尾　繁，甲木和子：熊本県保健環境科学研究所報，**31**，37（2004）.
3) 平成15年11月5日付け，食監発第1105001号，厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知
4) Vinje J., Deijl H., Heide R., Lewis D., Helund K.O, Svensson L. and KoopMans M.P.G.：J.Clin. Microbiol., **38**, 530 (2000).
5) Noel J. S., Lee T. W., Kurtz J. B., Glass R. I. and Monroe S. S.: J.Clin.Microbiol., **33**, 797 (1995).
6) Yamashita T., Sugiyama M., Tsuzuki H., Sakae K., Suzuki Y. and Miyazaki Y.：J.Clin. Microbiol., **38**, 2955 (2000).
7) Yan H., Nguyen T. A., Phan T. G., Okitsu S., Yan L. I. and Ushijima H.：感染症誌, **78**, 699 (2004).
8) 篠崎邦子，岡田峰幸，小川知子，窪谷弘子，吉住秀隆：千葉県衛研年報，**54**，76（2005）.
9) 岩切　章，元明秀成，山本正吾，平崎勝之，鈴木　泉，木添茂子，三笠美恵子，岡田峰幸：病原微生物検出情報，**26**，338（2006）.
10) 長谷川嘉子，田中千賀子，大内好美，井上明宏，辻　元宏，川村嘉彦，佐野幸代，野坂節子，角野文彦：病原微生物検出情報，**27**，319（2007）.
11) Hansman G. S., Saito H., Shibata C., Ishizuka S., Oseto M., Oka T. and Takeda N.: J. Clin. Microbiol., **45**, 1347 (2007).
12) Oka T., Oka, Katayama K., Hansman G. S., Kageyama T., Ogawa S., Wu F-T, White P.A. and Takeda N.:J Med Virol., **78**, 1347 (2006).
13) Okada M., Yamashita Y., Oseto M. and Shinozaki K.:Archi Virol., **151**, 2503 (2006).
14) 福田伸治，宮崎佳都夫：感染症誌，77，965（2003）.
15) 小島　禎：感染症誌，**75**，333（2001）.
16) Marshall J. A., Bruggink L. D., Sturge K., Subasinghe N., Tan A., Hogg G. G.; Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **26**, 67 (2007).
17) Belliot G., Laveran H., Monroe S.S.：J. Med. Virol., **51**, 101 (1997).
18) 小河正雄　田代潔子　吉用省三　内山静夫：病原微生物検出情報，**27**，13（2006）.
19) 田中俊光，横井一，都竹眞実，秋元徹，三井良雄，小笠原義博，池上宏：病原微生物検出情報，**26**，No.5，(2005).