

## 急性胃腸炎における Sapporo Virus の役割

大瀬戸光明 近藤玲子 山下育孝 吉田紀美 浅井忠男  
井上博雄 岡田峰幸\*1 篠崎邦子\*1 石丸啓郎\*2 中野省三\*2

### The role of sapporo viruses in acute gastroenteritis

Mitsuaki OSETO Reiko KONDO Yasutaka YAMASHITA Kimi YOSHIDA  
Tadao ASAI Hiroo INOUYE Mineyuki OKADA Kuniko SHINOZAKI  
Yoshiro ISHIMARU Shozo NAKANO

Sapporo viruses (SV) are known as causative agents of acute gastroenteritis in young children. But, little is known about the incidence and pathogenicity of these viruses. From January, 1999 to December, 2000, stool specimens from 664 children with sporadic gastroenteritis were screened for the presence of caliciviruses by using electron microscopy and/or RT-PCR. For detection of SV, we have developed new primers targeting the capsid gene. As the results, caliciviruses were detected in 68 (10.2%) cases, in which 39 were norwalk viruses (NV), 21 were SV and 8 were could not typed. And by the RT-PCR for SV, 7 positives were detected from 11 adult patients associated with an outbreak of gastroenteritis, which were all negative for NV RT-PCR. By phylogenetic analysis, eleven SV stains sequenced were clustered separately into three or four clusters. These results indicate that genetically diverse strains were circulating in the same community and the importance of SV as a cause of acute gastroenteritis in children and adults are likely increasing.

**Keywords:** sapporo virus, calicivirus, RT-PCR, electron microscopy, phylogenetic analysis

#### はじめに

ヒトに急性胃腸炎をおこすカリシウイルスは、最初に患者糞便から電子顕微鏡法 (EM) で、直径 35nm の小型球形ウイルスとして検出されたことから、長く Small Round Structured Virus, SRSV と称されていた。最近、ウイルスの分子生物学的性状の解明が進み、SRSV がカリシウイルス科に属することが認められた<sup>1)</sup>。さらに、第 7 回国際ウイルス命名委員会においてヒトのカリシウイルスは“Norwalk like virus”属と“Sapporo like Virus”属の 2 つの属に分類されることとなった<sup>2)</sup>。しかし、これらの属名は正式な属名が決定されるまでの暫定的なものとしてされた。そこで、近い将来消滅する暫定的な属名を使うより、両属にはそれぞれ 1 つの種しかないことから、それぞれの属を代表する Norwalk virus (NV) と Sapporo virus (SV) という種名を使うよう提唱されている<sup>3)</sup>。ここでは可能なかぎりその提唱に従い、NV 及び SV を使用することにする。

NV はウイルス性食中毒や晩秋の嘔吐を主徴とする胃

腸炎の主要原因としてロタウイルスとともに公衆衛生上注目されてきた。特にウイルス性食中毒の原因の 9 割以上は NV であるとされており<sup>4)</sup>、衛生行政上重要視されている。そのため NV に対する検査法の開発は著しく進展し、RT-PCR<sup>5-7)</sup>や NV 抗原検出 ELISA キット<sup>8)</sup>は、患者の病原診断に関してはすでにほぼ十分な段階に達しているといえる。

一方、SV は主に乳幼児に感染し、乳児院や保育園等の施設内で集団感染を起こす<sup>9)</sup>が、地域流行する感染性胃腸炎への関与は低いと考えられてきた。特に成人のウイルス性食中毒の原因としての報告は極めて少なく、唯一米国での報告<sup>10)</sup>が知られているのみである。

県内においても毎年晩秋から冬季にかけて、年長小児や成人の間で嘔吐を主徴とした NV による急性胃腸炎の大規模な流行がみられ<sup>11)</sup>、また、NV による食中毒の発生が毎年数例報告されている<sup>12,13)</sup>。最近散発性の急性胃腸炎患者から、EM で SRSV が検出されても、NV に対する RT-PCR で標的遺伝子の増幅ができない例が、比較的多く見られるようになった。また、2000 年には成人に多発した急性胃腸炎で、EM 陽性、NV 陰性と診断された事例があった。これらの例では EM で典型的カリシ

ウイルスの形態を呈するものが多くみられ、SV の可能性が示唆されたので、急性胃腸炎における SV の役割を再評価するために、ウイルス学的調査を行った。

## 材料と方法

材料：糞便材料は、1999 年 1 月から 2000 年 12 月の間に、感染症発生動向調査病原体検査定点で主に小児の感染性胃腸炎患者から採取した 664 検体を用いた。また、成人の急性胃腸炎多発事例に関連した患者糞便 12 検体を供試した。

方法：糞便からのウイルス検索は、EM 及び RT-PCR で行った。EM は常法により疎精製した糞便材料を、2% PTA 染色後 4 万倍で観察し、下痢症ウイルスの検索を行った。RT-PCR は NV を標的としたプライマーと SV を標的としたプライマーを用いた。NV 検出用としては、ポリメラーゼ遺伝子領域を増幅する NV 系、Yuri 系<sup>6)</sup>、P1/P3 系<sup>7)</sup>とカプシド領域を増幅する G1/G2 系を用いた。SV 検出用はカプシド領域を標的とした SV 系(千葉県衛生研究所 岡田ら<sup>14)</sup>の設計による)を用いた。NV のポリメラーゼ領域の PCR 増幅産物については、Ando ら<sup>5)</sup>のジゴキシゲニン標識プローブを用いたドットプロットハイブリダイゼーションで確認を行った。

SV の遺伝子解析は ABI Genetic analyzer 310 を用い、PCR 産物のダイレクトシーケンス法で SV 遺伝子塩基配列を決定した。そのうち 420 塩基長のカプシド領域部分の塩基配列およびアミノ酸配列について NJ 法により系統樹解析を行った。

## 結 果

1999 年 1 月から 2000 年 12 月までの散発性の急性胃腸炎の EM による継続的病原検索結果を表 1 に示した。EM ではロタウイルスの 75 例(検出率 11.3%)に次いで SRSV が多く 46 例 (6.9%) 検出され、その他にアストロウ

ルスが 22 例、アデノウイルスが 12 例検出された。ロタウイルスは例年と同様、主に 1 月から 4 月に多く検出された。SRSV の検出数は両年とも 3 月から 6 月の間と 11 月 - 12 月の 2 峰性のパターンを示し、明らかにロタウイルスとは異なる季節的消長を示した。アストロウイルスが春に多く検出されたことやアデノウイルスでは季節的消長がみられなかったことは、それぞれ例年の動向と同じであった。

EM で SRSV 陽性の糞便材料 46 例について、NV 遺伝子を標的とした RT-PCR を行ったが、NV 陽性率は 50% 足らずで例年にくらべ低かった。特に、春から初夏に検出された SRSV に占める NV の割合は、両年とも 30% 前後で著しく低率であった。そこで、最近岡田らが新たに設定した SV 検出用のプライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果 46 例中 16 例 (35%) が SV 陽性であった。NV の少ない時期に SV の検出頻度が高くなっていることは注目された。なお、今回 NV、SV とともに陰性で、型別できなかつたものが 8 例残っている。

1999 年 11 月以降は、他の病原ウイルスあるいは病原細菌が陰性の検体で材料が残っているものについては NV と SV の RT-PCR を並行して行った。結果を図 1 に示した。全期間を通じて計 68 例が EM あるいは RT-PCR でカリシウイルス陽性であった。そのうち NV が 39 例 (57%)、SV が 21 例 (31%)、型別不明が 8 例 (12%) であった。このことは NV と SV の陽性例数の比が 2:1 になっていることであり、最近 SV が増加していることを示唆している。

NV と SV の月別検出数をみると、NV が 12 月、1 月の寒冷期に多かったのに比べ、SV は 3 月から 6 月までと 11 月に多く検出された。NV と SV は明らかに流行時期が異なっており、両者の流行様式が異なることが示唆された。

また、SV 陽性例と NV 陽性例の年齢分布に差異はみ

表 1 電子顕微鏡法による散発性急性胃腸炎の病原検索 (1999 - 2000 年)

検出ウイルス	1999												計	(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
SRSV			2	3	5	4	1				3	3	21	5.9
Rotavirus	9	21	6	4					1				41	11.6
Adenovirus			1		1	1		1		1	1	2	8	2.3
Astrovirus		1	5	2	1	2							11	3.1
検査数	30	47	42	27	31	34	26	30	19	20	28	19	353	100.0

検出ウイルス	2000												計	(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
SRSV	1		5	1	3	2					4	9	25	8.0
Rotavirus	1	3	13	12	1	4							34	10.9
Adenovirus		1					2			1			4	1.3
Astrovirus			2	3	5	1							11	3.5
検査数	30	28	35	42	33	27	26	23	15	16	16	20	311	100.0

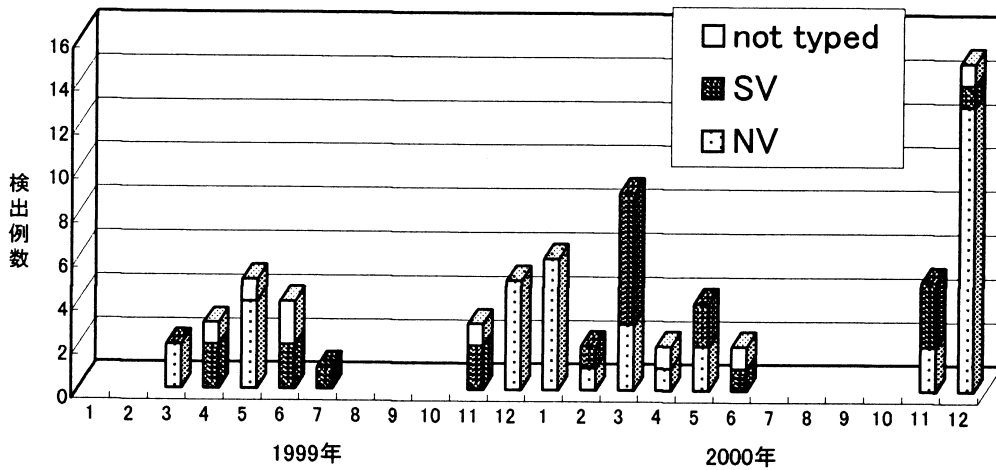


図1 SVおよびNVの検出数の月別推移

られなかった(図2)。対照として示したロタウイルス陽性例は2歳以下の幼若小児に多く、SV、NV陽性例の年齢分布とは有意な差異が認められた。

次にSVによる急性胃腸炎の発熱、下痢、腹痛、嘔吐の主要臨床症状の出現頻度をNVおよびロタウイルスと比較した(表2)。発熱と腹痛の出現頻度はウイルスの種類による差異は認められなかったが、下痢はロタウイルスが有意に多く、嘔吐はNVが有意に多かった。

2000年4月に成人の急性胃腸炎多発事例があった。この事例では、当初仕出し弁当による食中毒であろうと考えられ、病原体の検索が始められた。ウイルス検索の結果を表3に示した。EMで患者糞便12例中6例からSRSVが検出された。そのうち3例は典型的カリシウイルス像を呈していたが、他の3例はいわゆるSRSVの粒子形態であり、2種類のウイルスが混在していたものと推測された。一方、RT-PCRではG1、G2プライマーを含め用いた5種類のNV検出用プライマーでは全く反応がみられなかった。また、疫学調査では当該弁当摂取者のうち発症を確認できた数が非常に少なかった。これらのことから本事例は結局食中毒としては取り扱われなかった。この事例においても岡田らのSVプライマーを用いたRT-PCRを行ったところ、12例中7例に標的遺伝子の強い増幅がみられた。そのうちEMで陽性の6例は観察された形態に関わらず、全てSV陽性であった。このことは、この事例が食中毒事件としては断定できなかったものの、単一の原因物質による集団発生であったことを示唆しており、成人でのSV流行を把握した希少な事例であったことを示している。

小児の散発性急性胃腸炎から検出された21例中7例、および成人の急性胃腸炎集団発生から検出された7例中4例、計11例のSVのRT-PCR産物からダイレクトシーケンシングを行い、得られたSVの420塩基対の系統樹を図3に示し、アミノ酸配列の系統樹を図4に示した。塩基配列でもアミノ酸配列からでもほとんど同じ系統樹が

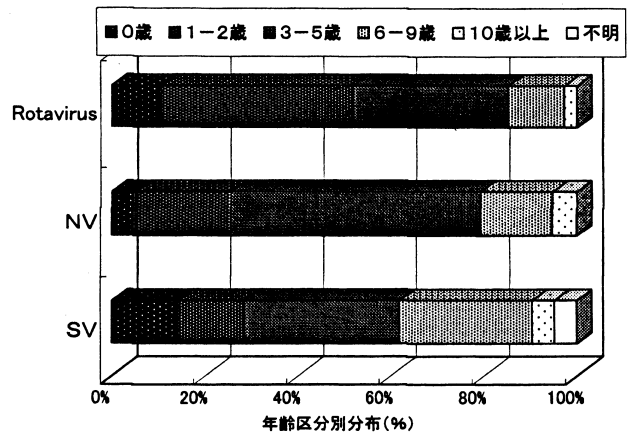


図2 SVおよびNVが検出された急性胃腸炎患者の年齢分布

表2 SVおよびNVによる急性胃腸炎の主要症状の頻度

臨床症状	SV (n=21)		NV (n=36)		Rotavirus (n=70)	
<37°C	15	71.5%	21	58.3%	33	47.1%
37°C	2	38.5%	9	41.7%	10	52.9%
発熱 38°C	2		4		17	
39°C	2		2		6	
40°C					4	
下痢	18	85.7%	30	83.3%	68	97.1%
腹痛	11	52.4%	13	36.1%	31	44.3%
嘔吐	10	47.6%	27	75.0%	40	57.1%

他のウイルス、病原細菌との重複感染例を除く。

描かれ、London株タイプが2株、Sapporo株タイプが2株、Sapporo株とParkville株との中間タイプが5株、既知のタイプに属しないものが2株に分類された。限られた地域内で2年間に検出されたSV間で塩基配列の多様性が認められた。ほぼ同時期に検出された株は互いに相同性が高かった。

表3 成人の急性胃腸炎多発事例のウイルス検索結果

検体番号	電顕法	RT-PCR					SV primer
		NV primer				SV	
		Yuri	NV	P1/P3	G1		
00-812	-	-	-	-	-	-	+
00-814	カリシ様	-	-	-	-	-	+
00-822	SRSV	-	-	-	-	-	+
00-823	-	-	-	-	-	-	-
00-829	カリシ様	-	-	-	-	-	+
00-830	SRSV	-	-	-	-	-	+
00-831	カリシ様	-	-	-	-	-	+
00-833	SRSV	-	-	-	-	-	+
00-835	-	-	-	-	-	-	-
00-836	-	-	-	-	-	-	-
00-839	-	-	-	-	-	-	-

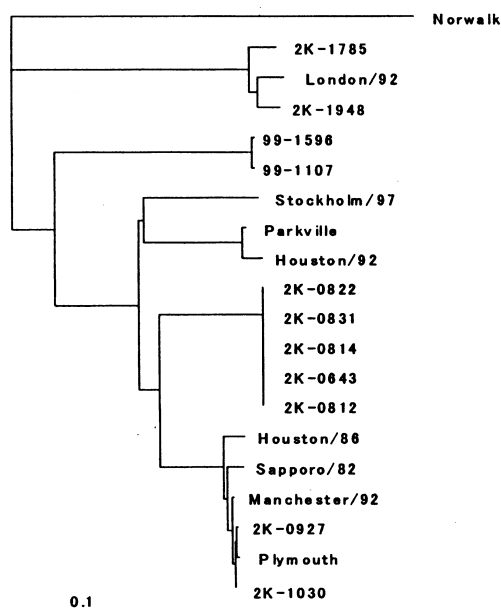


図3 SVの塩基配列の系統樹解析 (NJ法)

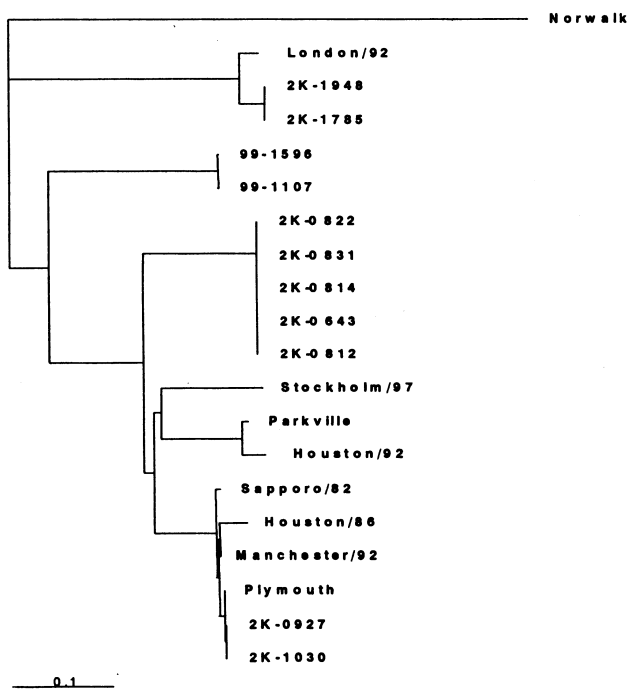


図4 SVのアミノ酸配列の系統樹解析 (NJ法)

2K-0812, 2K-0814, 2K-0822, 2K-0831の各株は上述の成人の集団発生例から検出されたもので、4株とも塩基配列は100%一致していた。このことは集団発生が何らかの単一暴露により引き起こされたことを強く支持している。

### 考 察

1999年1月から2000年12月の間に、小児の散発性急性胃腸炎患者から比較的高頻度にSVが検出され、また、成人の急性胃腸炎集団発生の原因としてSVが推察される事例がみられた。従来、SVは乳児院や保育園等での乳幼児の急性胃腸炎集団発生における重要性が述べられ<sup>9)</sup>、年長小児や成人を含む散発例における関与は重要視されてなかった。しかし、今回の観察からSVが必ずしも幼若小児だけの問題ではなく、年長小児や成人間にも流行を起こしうる可能性があることが示唆された。

われわれが20年来長期継続的に行っている小児急性胃腸炎の病原検索は、基本的にすべての検体について細菌検査とEM検査を並行して実施している。そのためEMでSRSVが検出されてもRT-PCRでNVが検出されない例が年により多くみられることに気付いていた。特に1997年春と1996年秋にはRT-PCRで検出できないSRSVが多くみられた(データ示さず)。今回、岡田らの設定したSVプライマーを導入したところ、2年間を通じて、検出されたカリシウイルスの約30%はSVであったことが示された。このSVの散発的流行が1999年と2000年の2年間だけのものか、それともSVの流行形態に変化が現れたのか、今後積極的に監視する必要がある。

急性胃腸炎の主要臨床症状である発熱、下痢、腹痛、嘔吐の出現頻度について、NVとSV陽性患者に違いがみられるか比較したところ、SVはNVに比べ嘔吐が少ない点にのみ有意差が認められた。また、従来からの知見に反して、NVとSV陽性患者の年齢分布に差異がみられず、SVもNV同様比較的年長小児が多かったことは注目された。

NVのRT-PCRでは数種の優れたプライマーが広く普及しており、特に最近発表されたORF1とORF2の境界領域に設定されたプライマー<sup>15)</sup>は極めて高い検出率を報告している。NV抗原検出ELISAキット<sup>8)</sup>は、抗原補足抗体としてGenogroup 1とGenogroup 2それぞれのgroup内のNV株と広く反応するモノクローナル抗体を導入したことにより検出率が向上し、近く市販される運びとなっている。このようにNVについては、RT-PCRやELISAが患者の診断に関してはほぼ十分な方法として確立しているといえる。

一方、SVについては、ORF1のポリメラーゼ領域に設定されたプライマーが数種の報告されている<sup>16,17)</sup>。しかし、一般にSVは検出数が少ないため、これらのプライマーの評価が十分に確定しているとは言い難い。今回使用した岡田らのSVプライマーは検出感度および検出

スペクトルの点でも良好な反応を示したので、広く用いられるプライマーとして有力な候補であると思われる。今後さらに多くの現場で評価、検討をされることを期待する。

今回、成人の急性胃腸炎集団発生例からSVが検出されたことは、極めて希なことで注目された。世界的にも成人の集団発生例からのSV検出事例は、米国における学校のPTAの昼食会で発生した事例<sup>10)</sup>のみである。今後SV流行の増加に伴いSVによる食中毒が増える懼れがある。

また、SVにおいても遺伝子の多様性が認められ、3または4の系統樹クラスターに分かれると報告されている<sup>10,18)</sup>。今回、限局された地域内でしかも2年間という短期間に検出されたSVが、少なくとも3つのクラスターに分かれ、さらに既知のクラスターに属しない株も見られたことから、多種類の遺伝子型のSVが混ざり合って流行を繰り返していることが推察された。

この調査を通じてEMをRT-PCRと併用することの重要性が認められた。EMではウイルス検出感度は低いですが、検出できるウイルスの種類は多い。急性胃腸炎のように多種類のウイルスが原因となる疾病の病原検索には、特に有用である。EMでSRSV陽性かつRT-PCR陰性の事例について、原因を追求した結果SVが検出された。EMではロタウイルスやアストロウイルス等他のウイルスの流行状況も同時に把握することができ、また、それらのウイルスとの重複感染例もしばしば検出される。このような総合的な診断能力はEMの特徴であり、今後もEMの利点を活用すべきであると思われる。

## まとめ

- 1) 1999年1月から2000年12月に小児の散発性急性胃腸炎からEMおよびRT-PCRでロタウイルスが75例(11.3%)、次いでSRSVが68例(10.2%)検出された。アストロウイルス、アデノウイルスもそれぞれ22例(3.3%)、12例(1.8%)検出された。
- 2) 検出されたSRSVの内訳は、NVが39例(57.4%)、SVが21例(30.9%)、型別不明が8例で、SVの多さが目立った。
- 3) SVの検出時期は3月から6月の間と11月で、NVの好発期と異なっていた。
- 4) SVとNVが検出された患者の年齢分布に差異が認

められなかった。両者とも2歳以下の割合が30%未満で、比較的年長小児が多かった。

- 5) NVに比べ、SVでは嘔吐が少ない点に有意差がみられたが、発熱、下痢、腹痛の出現頻度には差異が認められなかった。
- 6) 成人の急性胃腸炎集団発生例からSVが高率(7/11, 64%)に検出された。シークエンスした4株のSVはすべて同一配列であり、単一暴露による集団発生可能性が示唆された。
- 7) SV遺伝子の系統樹解析では、Sapporo株タイプ、London株タイプ、Sapporo株とParkville株の間タイプ、さらにそれらのどれにも属さないタイプ等が認められ、多様な遺伝子型の株が流行していることが示された。

## 文 献

- 1) Jiang, X. et al. :Science, 250, 1580-1583(1990)
- 2) Pringle, C.R. :Arch. Virol, 144, 2065-2070(1999)
- 3) 中込 治ほか：臨床とウイルス, 28, 339-347(2001)
- 4) 川本尋義ほか：最近5年間の食品媒介性ウイルス性胃腸炎集団発生全国実態調査総合報告書, (1995)
- 5) Ando, T. et al. :J. Clin. Microbiol, 33, 64-71(1995)
- 6) Saito, H. et al. :Microbiol. Immunol, 42, 439-446(1998)
- 7) 厚生科学特別研究事業平成11年度研究報告書, ウイルス性食中毒原因の遺伝子検査標準法確立と全国行政対応整備に関する研究(2000)
- 8) 田中智之ほか：第42回日本臨床ウイルス学会抄録集, S79(2001)
- 9) Chiba, S. et al. :J. Infect. Dis. 181, 303-308(2000)
- 10) Noel, J. S. et al. :J Med. Virol, 52, 173-178(1997)
- 11) 大瀬戸光明ほか：愛媛衛研年報, 59, 14-17(1997)
- 12) 大瀬戸光明ほか：愛媛衛環研年報, 1, 1-5(1998)
- 13) 近藤玲子ほか：愛媛衛環研年報, 2, 11-15(1999)
- 14) Okada, M. et al. : Arch. Virol(受理印刷中).
- 15) 影山 努ほか：Vita, 18, 42-49(2001)
- 16) Honma, S. et al. :Microbiol. Immunol. 44, 411-419(2000)
- 17) Vinje, J. et al. :J. Clin. Microbiol. 38, 530-536(2000)
- 18) Jiang, X. et al. : Arch. Virol. 142, 1813-1827(1997)