

小型球形下痢症ウイルス(千葉株)の研究

—部分塩基配列の解説及び疫学への応用—

宇田川 悦 子

小型球形下痢症ウイルス(千葉株)の研究

—部分塩基配列の解読及び疫学への応用—

宇田川 悦 子

研究目的、研究の背景

世界各国において、ロタウイルス (HRV) 下痢症 (胃腸炎) に罹患した患者は年間1億人以上に達し、その内90万人近い患者が毎年死亡していると推定されている¹⁾。ことに、開発途上国の低年齢層(0~5歳年齢群)において死亡する例が顕著である。これらの国々では食料難による栄養状態、衛生状態の不良等が死亡率に拍車を掛けている。

我が国においても、下痢症の患者数は、乳児嘔吐下痢症が毎年10~15万人、感染性胃腸炎が30~50万人に昇っており、合計すると毎年40~60万人もの患者が発生していることが厚生省感染症サーベイランス情報で報告されている²⁾。このうち、ウイルス性胃腸炎の実際は優れた検査方法が存在しないため詳細な報告が得られていない。胃腸炎の起因ウイルスとしては、HRV、アデノウイルス(AdV)のほかに、英国のCaul等の報告に述べられているとうり電子顕微鏡観察で多種多様な形態を持つ小型球形ウイルス (Small Round Structured Virus; SRSV) と総称される一群のウイルス群がある³⁾。このSRSVには、現在カリシウイルス科のNorwalk Virus (NV) やSnow Mountain Virus (SMV)、及びアストロウイルス科のHuman Astrovirus (HAsV) 等が報告されている⁴⁾。また、このSRSVは、水系感染や生牡蠣などの二枚貝を含む食品を介した食中毒事例の原因ウイルスとして世界各国において報告^{5,6,7)}されており注目を集めている。しかしHAsVを除き、これらのSRSVは分離培養できる継代細胞や感染実験動物が未だに存在しない為に、患者便材料が唯一のウイルス供給源であり、この制約によってウイルスの物理化学的、生物学的研究は全く進んでいない。

これまでにSRSV胃腸炎の実用的な病原診断法として開発された方法には、①糞便材料からの電子顕微鏡によるウイルス粒子の検出 (電顕法: EM法)、②同じく免疫電顕 (IEM) 法、および③ウェスタンブロット (WB) 法、EIA法等によるベア血清中のウイルス特異抗体価の有意上昇の検出、がある。1972年にNVが検出されて以来現在までのところ、EM法によるSRSVウイルス粒子の検出が最も主要な検査方法

である。しかし、この方法には患者便材料が大量に必要な事と高価な電子顕微鏡が必須である。さらに、このウイルスは患者便材料中に排泄されるウイルス粒子数も少ない上にウイルス粒子の直径がHRVやAdVの約1/2で、このSRSVを検出するためには大量の患者便材料を100倍以上の濃度に濃縮しなければならず超遠心機も必要となる。また、高度に熟練した電子顕微鏡技術と試料検索のための長い拘束時間等が必要である。特に高年令層において、患者便材料中には夾雑物が多いために、ウイルス粒子が凝集しておらず、また単独で散発的に存在する場合などには判定が難しいという問題点がある。一方、IEM法はウイルス特異的ではあるものの、特異性が高くかつ高い抗体価を有する患者回復期血清が必要であること、また、WB法ではウイルス粒子を大量に含む患者糞便材料に依存することなど実施上の問題があり、一般的にはなっていない。また、培養が出来ないために市販のRIA、EIA検査キットは現在のところ存在しない。さらに、EM法は形態学的にSRSVとまでしか判定しえず、ウイルスの各型別を同定することは不可能である。

私は、我が国において発生した嘔吐下痢症患者由来のSRSV：千葉株を用いて本SRSVの検出・診断に使用できるRT-PCR法を開発し⁸⁾、今回開発した方法による千葉株群SRSVの我が国における浸淫状況の把握、更に、形態学的には類似しているが本ウイルスとは遺伝的に異なるかも知れない他のSRSVが我が国でも存在しているのかどうかを調査する為に各地の地方衛生研究所から集めた患者材料の分子疫学調査を行った。

研究方法

1) 材料:

千葉県において1987年12月発生した急性胃腸炎の患者便材料で、EM法を用いて観察した結果、SRSSVが多量に含まれているものをSRSSV遺伝子クローニングのための出発材料とした²⁾。

また、千葉株の分子疫学的検査のために、1993~1994年秋田県・岐阜県・山口県・島根県・佐賀県・大分県の6県において発生した非細菌性集団食中毒事例(表1-1, 1-2)から得られた便材料143検体、および、同期間に北九州市の一定点観測医療機関を受診した非細菌性胃腸炎患者の便材料のうち電子顕微鏡法によりSRSSV陽性と判定された40検体(表2)についてSRSSV遺伝子の検出を試みた。これらの検体は全て、食品衛生法に基づく細菌学的検査の結果は陰性のものである。

2) ウイルス粒子の精製:

リン酸緩衝食塩水(PBS)を加えて10%乳剤にした便材料を等量のトリフルオロエタン処理後、1,500xg、10分間遠心し、その上清をさらに5,000xg、30分間遠心した。この遠心上清を30%(W/V)ショ糖液に重層して100,000xg、2時間遠心後、沈査をPBSに再浮遊させて部分精製ウイルスとした。さらに、初期密度が1.37g/mlになるように塩化セシウムを加え、270,000xg、20時間遠心後分画した。採取した各画分についてEMを用いたウイルス粒子数の計測によってウイルスの画分を確認し、また各画分の屈折率を測定することによりウイルスの浮遊密度を算出した。

3) ウイルスゲノムRNAの抽出:

上記の精製ウイルス液に10%SDSを最終濃度0.5%になるように加えた後、TNE(10mM Tris-HCl, pH7.5, 100mM NaCl, 1mM EDTA)で飽和させたフェノール抽出液(フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1, 0.1% 8ヒドロキシキノリン)を等量加えて攪拌し、

800 xgで5分間遠心後フェノール層を除去した。中間層が無くなるまでフェノール抽出液を加えて攪拌・遠心する操作を繰り返した。操作終了後、水層のみを新しいチューブへ移し、NaClを最終濃度0.2Mになるように加え、2.5倍量のエタノールと混合後、-70℃で1時間以上静置した。20,000 xg、30分間4℃で遠心後、沈査を0.5% SDSを含むTNEに溶解し、これをウイルスゲノムRNA溶液とした。

疫学的検討を目的として糞便からウイルスゲノムRNAを抽出する際には、Jiang等のCTAB法を用いた¹⁰⁾。10~20% (W/V)の便乳剤を等量の1,1,2-trichloro-1,2,2-trifluoroethane (和光純薬)で処理後、水層中のウイルスを0.4M NaClを添加した8% poly-ethylen glycol 6000 (PEG#6000; Sigma Chemical Co.)で沈殿させた。この沈殿は400 µgのproteinase K存在下で37℃30分反応後、更に0.45M NaClを添加した1.25% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, Sigma Chemical Co.)で56℃、30分反応させた。この溶液からフェノール抽出法によりRNAを抽出後、水層のみを新しいチューブへ移し、NaClを最終濃度0.2Mになるように加え、2.5倍量のエタノールと混合後、-70℃で1時間以上静置した。20,000 xg、30分間4℃で遠心後、沈査をTNEに溶解し、これをウイルスゲノムRNA溶液とした。このRNAはRT-PCRで検査する時まで-20℃で保存した。

4) ショ糖密度勾配遠心法によるRNAの精製:

0.5% SDSを含むTNEを用いて、12ml ショ糖密度勾配 [1.5%~3.0% (W/W)] を作成し、ウイルスゲノムを含む500 µlを重層後、85,900 xg、16時間、22℃で遠心した。遠心後チューブの底から500 µlづつ分画し、各画分について260nmにおける吸光度を測定した。また、各画分からそれぞれ20 µl

ずつ採取して、1%アガロースゲル電気泳動法 (AGE) で電気泳動を行った。この際、3.5 S RNA (コクサッキーA24の精製RNA) をサイズマーカーとして用いた。ゲノムRNAを含む分画を集め、エタノール沈殿によって回収したRNAを1 μ g/mlとなるように蒸留水 (D. W.) に溶解して、精製ウイルスゲノムRNAとした。

5) SRSV-RNAのフィンガープリント分析:

フィンガープリントの方法は武田等の方法によった¹¹⁾。精製ウイルスゲノムRNA (1-2.5 μ g) を10 UのRNase T1 (三共株) で消化後、2.5 Uのpolynucleotide kinase (Boehringer-Mannheim) を用いて25 μ Ciの $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPで5'-末端をラベルし、ポリアクリルアミドゲルで二次元電気泳動を行った。一次元電気泳動は、200 x 400 x 1-mmのポリアクリルアミドゲル (10% (W/V), 6M-Urea, Citric acid, pH3.5) を使用してブロムフェノールブルー (BPB) が20 cm移動するまで4°Cで泳動した。つぎに、二次元の電気泳動は250 x 350 x 1-mmのポリアクリルアミドゲル (2.2% (W/V) 50 mM Tris-borate, pH8.3) を用いて、一次元を展開したストリップからBPBが2.5 cm移動するまで室温において泳動を行った。このゲルは、4°Cで増感板を入れてサクラAO-X線フィルムに感光させた。

6) SRSVのcDNAクローニング:

6-1) cDNAの合成 (Gubler-Hoffman法による¹²⁾)

精製ウイルスゲノムRNA 1 μ gに500 ngのオリゴd(T)₁₂₋₁₈ (Pharmacia) を加え、更にD. W. で全量を12 μ lにした。このサンプルを1分間煮沸後、氷水中で急冷した。ここに2 μ lの10 x RTase 緩衝液 (500 mM Tris-HCl, pH8.3, 500 mM KCl, 80 mM MgCl₂, 50 mM DTT) と1 μ lの20 mM dNTPs, 10 U RNase inhibitor (TAKARA) と40 U RTase (Avian myeloblastosis

virus由来、生化学工業)を加え全量を25 μ lとした後、42 $^{\circ}$ Cで3時間反応させた。その後氷水中で冷却し、20 μ lの10 \times 反応液(200mM Tris-HCl pH7.5, 50mM MgCl₂, 1M KCl), 10ngのBovine serum albumin, 50Uの大腸菌DNAポリメラーゼI (TOYOBO)と1Uの大腸菌RNaseH (SIGMA)を加え全量を200 μ lとした後、16 $^{\circ}$ C 1時間インキュベートした。その後室温で1時間反応させた後、10UのT4 DNAポリメラーゼ (TOYOBO)を加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた。さらに2Uの大腸菌DNAポリメラーゼI クレノー断片 (Klenow (TOYOBO))を加えて室温で5分間反応させた後、20 μ lの0.25M EDTA (pH8.5)を加え、フェノール処理により蛋白を除き、cDNAを水層に回収した。あらかじめ1,000 \times gで2分間遠心し水層を除いたスピニカラム (G-50 DNA用, Boehringer-Mannheim)上に前述のサンプルからの水層をのせ、1,000 \times gで2分間遠心して精製した。エタノール沈殿により合成されたcDNAを回収した。

6-2) cDNAライブラリーの作製:

精製したcDNAをd(C) tailing 緩衝液(140mM cacodylate, 0.3M Tris, 0.11M KOH, 10mM DTT, 100mM CoCl₂, 10mM dCTP) 30 μ lに溶解し、36Uのデオキシスクレオチドターミナルトランスフェラーゼ(TAKARA)を加えて、37 $^{\circ}$ C 3分間インキュベートした。この反応液に3 μ lの0.25M EDTAを加えた後に、フェノール抽出を行い、水層をエタノール沈殿することによりd(C)テーリングを施したcDNAを得た。次に、あらかじめ用意しておいたPst I 切断部位にd(G)テーリングされたpBR322プラスミッド(BRL) 100ngを加え、全量100 μ lの緩衝液(150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM EDTA)中で60 $^{\circ}$ C 1時間反応後、1時間かけてゆっくりと室

温まで冷却した。この組換えDNAプラスミッドを用いて大腸菌MC1061の形質転換を行った。テトラサイクリン(tet)を最終濃度12.5 µg/ml加えたLB (tet+LB) 培地(1% Bacto trypton, 0.5% Yeast extract, 1% NaCl, 1.5% Agar)で37℃1晩培養した。tet耐性遺伝子を持つ大腸菌のコロニーをtet+LB培地2ml中で1晩培養し、アルカリ-SDS法¹³⁾によってプラスミッドを単離し、500個のクローンを得た。

6-3) 制限酵素地図の作製:

挿入DNAの大きいクローンを選び、各々から単離したDNA1 µgに1Uの制限酵素(*Pst*I, *Eco*RI等)を加え全量を20 µlにして37℃、1~2時間反応させて制限酵素切断を行った後、1%AGEを行った。DNA分子量サイズマーカーとの泳動距離の比較から、挿入されたDNA断片の分子量を推定し制限酵素地図を作製した。

7) ジデオキシ法による挿入DNAの塩基配列の決定:

7-1) M13ファージベクターの調製:

挿入DNAのサブクローニングには、M13ファージベクターM13mp10とM13mp11を用いた。精製した5 µgのM13mp10及びM13mp11の複製型DNA(RF-DNA)を5Uの*Eco*RIと*Pst*I(TOYOBO)で酵素切断した。フェノール抽出、エタノール沈殿でDNAを回収し、TE(10mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1mM EDTA)に溶解後、1Uの子牛腸アルカリ性フォスファターゼ(calf intestinal alkaline phosphatase: CIP)を加えて切断箇所を脱リン酸化処理(CIP処理)後、フェノール抽出、エタノール沈殿でDNAを回収した。

7-2) 挿入DNA(pSRSV-94, pSRSV-99, pSRSV-131, pSRSV-225, pSRSV-266, pSRSV-268)の調製:

上記の制限酵素地図に基づいてSRSV遺伝子の挿入位置が明らかにされた組換え

プラスミッドDNA (pSRSV-94, pSRSV-99, pSRSV-131, pSRSV-225, pSRSV-266, pSRSV-268) を以下の実験に用いた。
 10pg ~ 1ng の各 pSRSV プラスミッドDNA で大腸菌 HB101 を形質転換後、
 tetr+LB プレート上で 37℃ に晩培養した。tetr 耐性のコロニーを 2ml の
 tetr+LB で培養した。そのうち、1ml からアルカリ-SDS 法でプラスミッドを
 抽出し、PstI と EcoRI で切断後 1% AGE でそれぞれの挿入 DNA 断片 (pSRSV-94; 500bp, pSRSV-99; 600bp, pSRSV-131; 1,000bp, pSRSV-225; 1,500bp, pSRSV-266; 1,000bp, pSRSV-268; 1,000bp) を確認した。その後培養した
 各 pSRSV の 1ml を取り 500ml の培養液へ移し更に培養を継続した。tetr+LB で 37℃ 振盪培養後、波長 550nm における吸光度値がおよそ 0.8 になっ
 たところでクロラムフェニコールを最終濃度 30µg/ml になるように加え、さらに 12 ~ 20 時間 37℃ で培養を続けた。5,400xg, 10 分間 4℃ で遠心後、菌体のペレットを 25mg/ml のリゾチームを含むリゾチーム溶液 (25mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA, 50mM グルコース) 10ml に懸濁して
 室温 5 分間放置後、20ml の 0.2M NaCl, 0.1% SDS 混合液を加え水中で 5 分間放置した。その後、5M 酢酸カリウムを加え、さらに水中で 10 分間放置した。27,000xg, 20 分間 4℃ 遠心後、上清を新しいチューブへ移し、
 フェノールで DNA を抽出し、800xg, 5 分間遠心後の水層を別の新しいチューブへ移した。これに 2.5 倍量のエタノールを加えて DNA を沈殿させた後この沈渣を 4ml の TE に懸濁させ、4g の CsCl を加えてよく攪拌した。CsCl が完全に溶けた事を確認した後、5ml になるまで TE を加え、更に 0.4ml のエチジウム
 ブロマイド (EtBr; 10mg/ml) を加えた。1,200xg, 10 分間遠心した上清を超遠心チューブへ移し 270,000xg, 18 時間、20℃ で遠心後、紫外線ランプの照射下でプラスミッド DNA のバンドを回収した。蒸留水飽和ブタノー

ルを加えて攪拌し遠心後ブタノール層を除く作業を繰り返し、E. f. B. r. をDNA溶液から取り除いた。4倍量のTEを加えて塩濃度を下げた後からエタノール沈殿でプラスミッドDNAを回収した。波長260 nmにおける吸光度1のときが50 μ g/mlのDNA濃度に相当すると考えて、1 μ g/mlの濃度になるように滅菌蒸留水で溶解し精製プラスミッドDNAを調製した。

7-3) DNA断片の調製

pSRSVの各精製プラスミッドDNAをPst IとEcoRIで制限酵素切断したものを、DNA分子量サイズマーカーと並べて、1%AGEを行った。DNAのバンドの間隔が十分離れたところで、1,000 bpのバンドをそれぞれ切り出した。切り出したアガロースゲルからのDNA断片の抽出はGene Clean IIキット(BIO-101, Inc.)を使用した。すなわち、切り出したアガロースゲル断片をチューブへ移しNaIを加えて50℃、5分間加熱した。ゲルの溶解を確認した後Glass milk(キット内のビーズ懸濁液)を添加し攪拌した。水中で静置後、氷冷した市販の緩衝液を加え攪拌後軽く遠心した。この操作を3回繰り返しビーズを洗浄した。ビーズをTEに浮遊させた後、フェノールクロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿によりDNA断片を回収した。なお、それぞれのDNA断片溶液の一部を採取して、2%AGEを行い、サイズの確認とおおよそのDNA濃度の推定を行った。

7-4) 挿入DNAを持つM13ファージの調製

常法に従い制限酵素切断を行ったM13RF-DNA 20 ngと、同じ制限酵素による切断を行ったプラスミッドDNA断片100 ngを、T4 DNAリガーゼ(TAKARA)を使って連結させた。このM13組換えDNAで大腸菌JM103を形質転換した。形質転換後、42℃3分間の熱処理を行い、再び、水中に置いた後、Isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside [IPTG]と5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactoside [X-gal]ジメチルホルムアミド溶液を最終濃度がそれぞれ1 mMと0.02%に

なるように加えた。対数増殖期の大腸菌 JM103 と共に 42℃ に保温しておいた 2xTY (1, 6% Bacto trypton, 1% Yeast extract, 0.5% NaCl) アガロースに混和後、LBプレートに蒔き 37℃ で 1 晩培養した。プレート上に生じた半透明のブラックをとり、大腸菌 JM103 の 1 晩培養液を 1% 含む 2xTY 2ml に接種した。37℃ で 5 時間震盪培養後、1, 200 xg, 10 分間遠心し、上清 1ml を新しいマイクロチューブへ移し、再度 13, 000 xg で 5 分間遠心して上清を別の新しいチューブへ移した。20% PEG#6000, 2.5 M NaCl 混合液 200 μ l を加え攪拌、室温に 15 分間静置後、16, 000 xg, 10 分間遠心し、沈査を得た。上清をすべて除き、沈査を 100 μ l の TE で溶解後、フェノール抽出、エタノール沈殿法により M13 組み換え DNA を回収した。TE に溶解させたうちの一部を、非組み換えの一本鎖 M13 ファージベクターを分子量のサイズマーカーとして、1% AGE を行い挿入部位の大きさを推定した。

7.5) ジデオキシ法による塩基配列の決定

7-deaza-dGTP SEQUENASE kit, ver. 2.0

(TOYOBO) を用いてマニュアルに従って、ジデオキシシーケンス法¹⁴⁾により、M13 ファージベクターに組み込んだ pSRSV の DNA 断片の塩基配列の決定を行った。プライマーは M4 (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3') を用いた。プライマーから 200 bp 以上離れた部位のシーケンスをする場合は 2 倍希釈で、またプライマーからごく近い 100 bp 以内をシーケンスする場合には Mn^{2+} を最終濃度 5 mM 加え Labeling Mix の希釈は 10 倍で使用した。シーケンス用のゲルは 7% Urea ゲル (200 x 400 x 0.4 mm) [42% 尿素、7% アクリルアミド、1x TBE, 0.1% APS, (100 ml あたり N, N, N', N'-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) 25 μ l を加える。)] を用いた。電気泳動は 1x TBE 緩衝液を用い、定電力 45 W で泳動中。ガラス板が均一にほぼ 50℃ くらいであるようにアルミ放熱板をガラス板に取付けた状態で行った。

泳動終了後、ガラス板を外し、ゲルをワットマン3MM濾紙上にのせ、1.0% 酢酸、1.2% メタノール溶液中で尿素を流出させた後、ゲル乾燥機 (ATTO AE-3700) で約80℃、真空乾燥を行った。完全に乾燥したことを確認した後、ゲルをとりだし、ゲル面に密着するようX線フィルム(コニカ)をおき、オートラジオグラフィー用フィルムカセットに装填した。フィルムカセットを-70℃の冷凍庫に一夜以上置き、オートラジオグラフィーを行った。X線フィルムを現像して塩基配列を読み取り、読み取った塩基配列データは遺伝子情報解析用プログラム GENETYX^RSDCのデーターファイルに収め、解析を行った。

8) ドットプロットハイブリダイゼーション法によるクローン化DNAの同定:

解読した千葉株の塩基配列から合成したプライマー (SRSV-U3: 20mer) 10 ngをT4ポリスクレオチドキナーゼと10 μ Ciの [γ -³²P] ATPで標識し、ドットプロット・ハイブリダイゼーション法用プローブとして使用した。各CsCl 1画分から抽出した *virion*-RNAをフォルムアミド/フォルムアルデヒド/1 x SSCで変性後、ニトロセルロース膜上へプロットしUVリンカーで固定した。プレハイブリダイゼーション緩衝液 (6 x SSC, 0.5% SDS, 5 x Denhardt's, 1 mM EDTA) で55℃4時間反応後、プローブを含むハイブリダイゼーション緩衝液 (プレハイブリダイゼーション緩衝液と同じ) 中で一夜反応させた。この膜は洗浄後乾燥させ、-70℃でX線フィルムへ感光させた。

9) RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) によるSRSV遺伝子の検出:

解読した塩基配列と標準株ウイルスであるNVとの比較により (Lipman等のアルゴリズム¹⁸⁾) 両方の遺伝子に共通した塩基配列を選択し、これを参考にRT-PCR用のプライマーを合成した。プライマーの配列は以下の通りである。

プライマー-#1, 5'-AGATTTTATCAATTAAAGCCTGTGG-3';

プライマー-#2, 5'-GGCAA「C/T」CT「A/G」TCTGTATTGAAATA-3'

便材料から直接RNAを抽出する方法はJiang等の方法と同じCTAB法⁹⁾を使用し、市販の試薬(TAKARA)を用いてRT-PCR法を行った。反応条件は、42℃ 1時間の反応でRNAからcDNAを逆転写した後、94℃1分、55℃2分、72℃3分のPCRサイクルを35回繰り返した。PCR産物は1% AGE後 Et. Br. 染色によりUV照射で可視化し、同時に泳動したマーカーの移動度から長さを算定した。決定したSRSV千葉株の塩基配列によると、このプライマーで増幅できるPCR産物は669bpである。

10) 非放射性標識プローブを用いたサザンブロット・ハイブリダイゼーション法による検出感度の検討；

Griffais等¹⁶⁾の方法をもとに、千葉株のRNAを用いてRT-PCRで産物を増幅するときにジゴキシゲニン標識されたdUTPを加える事で千葉株に対する非放射性標識プローブを作製した。

実験・観察・調査結果

1) ウイルス遺伝子の性状

1987年12月千葉県のレストランで夕食を会食したAとBの二つのグループにおいて急性胃腸炎の流行が発生した⁸⁾。この流行で得られたSRSV(千葉株)について以下の実験を行った。患者材料から得られた部分精製ウイルス粒子濃縮液にCsClを加えて270,000×g、20時間4℃で遠心し、電子顕微鏡によるウイルス粒子観察と浮遊密度を調べた(図1)。遠心後分画したそれぞれの画分についてウイルスの粒子数を計測した結果、画分#4と#5が1スクエアあたりおよそ1,000個のSRSVが観察されるピークを示し、その浮遊密度は1.36~1.37 g/cm³であった。

次にこのピリオンピークからフェノール法によりRNA遺伝子を抽出した。このRNAを、15~30%ショ糖密度勾配遠心法により精製した。対照としてピコルナウイルス属に属するコクサッキーA24(CA-24)ウイルスのRNAを同時に遠心した。CA-24のショ糖密度勾配中の沈降係数は35Sであることが知られており、画分#7に波長260nmにおける吸光度のピークを示しているが、千葉株もこの対照と同じ画分にピークを示した。すなわち、千葉株はCA-24と同様35Sの沈降係数を持つことが明かとなった(図2)。さらに、#6、7、8(画分A)及び#9、10(画分B)を集めた画分から抽出したRNAを1%AGEで解析した結果、千葉株に特異的な核酸バンドが画分Aに認められ、千葉株のRNAもCA-24も同じ移動度である事が明らかとなった(図3)。すなわち、千葉株のRNAはピコルナウイルスと同様約7.5 kbの大きさであることが示された。さらに、千葉株のRNAの特性を調べることを目的としてフィンガープリント法により分析を行った結果、図4に矢印で示す通り本RNAはポリアデニル酸(poly-A)を有していた。1 OD₂₆₀=40 µg RNAをRNA濃度の算定基準として、画分Aの吸光度値と1%AGEの結果から1 µg/ml RNA溶液を調整し、精製ウイルスゲノムRNAとした。

2) 千葉株 cDNA ライブラリーの作製:

精製ウイルスゲノム RNA を鋳型として、Gubler & Hoffman¹¹⁾により報告された方法を一部修飾して千葉株の cDNA ライブラリーを作製した。オリゴ d(T)₁₂₋₁₈ をプライマーとして逆転写酵素によってゲノム RNA に相補的なファーストストランド cDNA を合成した。次いで、大腸菌の RNase H を用いて RNA 鎖にニックとギャップを入れ、この結果生じた RNA 断片をプライマーとして大腸菌のポリメラーゼ I によって RNA/DNA ハイブリットの RNA 鎖を順次 DNA 鎖に置換後、T4 DNA ポリメラーゼで末端を修飾した。合成された二本鎖 cDNA をスピンカラムで精製後、デオキシヌクレオチジルターミナルトランスフェラーゼを用いて末端に d(C) テールを付加し、d(C) - d(G) 法によりプラスミドベクター pBR322 の Pst I 切断部位に連結した。大腸菌 MC1601 をこのプラスミドで形質転換させ 37°C で一晩培養した結果、計 1,500 個の tetr 耐性菌のコロニーが形成された。それらのコロニーをそれぞれ少量ずつ培養し、アルカリ-SDS 法でプラスミドを単離して 1% AGE で解析した結果、最長のものでは 1,500 bp の挿入 cDNA を持つことが示された。

これらのプラスミドの詳細な制限酵素地図を作製するために、比較的長い挿入 cDNA をもつクローン pSRSV-94, pSRSV-99, pSRSV-131, pSRSV-225, pSRSV-266, pSRSV-268 を選択し、Pst I または EcoRI での切断を、さらに Pst I と EcoRI 二重切断を行ってその制限酵素地図を作成した。

3) サブクローニングと塩基配列の決定:

pSRSV131 を制限酵素分解した DNA 断片を、同じ制限酵素で切断した M13 ファージベクターのクローニング部位へ挿入した結果、EcoRI-Pst I 切断では約 1,500 bp の (-) 鎖を挿入した組み換え DNA ファージ UM131-1 と約 1,000 bp の (+) 鎖を挿入した組み換え DNA ファージ UM131-5 が得ら

れた。同様にして、各クローンをM13ベクターへサブクローニングした。

次に、挿入したDNAサブクローンの全塩基配列をジデオキシシークエンス法により決定した。U m 1 3 1-5には、ベクターと挿入DNAの位置を示すP s t I切断部位に続いてポリグアニル酸(p o l y G)があり、さらに8ベースのチミジンが続く塩基配列を認めた。制限酵素地図の結果と合わせると、この領域はS R S V千葉株のRNAの3'末端をコードしているものと考えられる。p S R S V-94、p S R S V-99、p S R S V-131、p S R S V-225、p S R S V-266、p S R S V-268のP s t I切断によるDNA断片をM13ファージベクターに挿入したクローンU M 94~U M 268のうちのいくつかの塩基配列を同様の方法で決定し、重なり合う塩基配列部分を確認しながら、計1,926bpを決定した。図5にはその内

1,015bp (NVの塩基番号6,630-7,644に相当する部分)を示した⁸⁾。

4) ドットプロット・ハイブリダイゼーション法によるクローン化DNAの同定:

解読した千葉株の塩基配列を参考にして合成したオリゴDNAを、T4ポリヌクレオチドキナーゼを使用して³²Pで標識した(S R S V-U3:20mer)。このDNAは、図1の各画分から得られたv i r i o n-RNAとハイブリダイゼーションし、そのパターンは電子顕微鏡によるウイルス粒子算定で明らかとなったウイルス粒子のピークと一致した(図1)。

5) NV3'-末端塩基配列との比較

私が決定した千葉株3'-末端の塩基配列をNVの相当部分とL i p m a n等¹⁴⁾のアルゴリズムを使用して比較した(図5)。配列番号298から951にあるオープンリーディングフレーム(ORF)-3について解析した結果、塩基配列では68%、アミノ酸配列では74%の一致率であった。また、3'-末端側のノンコーディング部分(NCRR)での比較では、塩基配列が65%の一致率となった。

6) RT-PCR法の開発

千葉株とNVに共通する塩基配列に基づいて、便材料中のNV/千葉株群S R S V遺

伝子を検出するためのRT-PCR法用のNV/千葉株群SRSV共通プライマーを合成した(図5)。千葉株由来の患者便材料からJiang等が報告したCTAB法によりウイルスRNAを直接抽出した。このRNAをもとに逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、さらにこのcDNAを鋳型としてタックポリメラーゼを使用したPCR法により目的の遺伝子を増幅した。

まず、千葉株の患者便材料およびNVを経口投与された感染者の便材料から、抽出したRNAを鋳型としてRT-PCRによる検討を加えた。2%AGEによるDNA分子量マーカーとの比較から目的としている増幅産物を確認した。千葉株とNV由来の患者便材料の両方において、予測されたPCR産物が得られ、NV/千葉株群SRSVの検出が可能となった(図6a)。また、千葉株が得られた同じ流行における別の3人の患者便材料について、NV/千葉株群共通プライマーを用いたRT-PCR法で同様なPCR増幅産物が得られた(Data not shown)。

8) サザンブロット・ハイブリダイゼーション法の検出感度の検討

次に、PCR増幅産物の検出感度を上昇させる事を目的に、泳動後のPCR産物を常法に従いアルカリ処理の後にナイロン膜へ転写し、ジゴキシゲニン(DIG)-dUTPで標識した千葉株のプロープによるサザンブロット・ハイブリダイゼーション法を応用した検出方法の併用を検討した。千葉株とNVに共通するプライマーで増幅した各々のPCR産物はいずれも塩濃度が5xSSC、温度が68℃、16時間以上反応させる条件下で千葉株プロープとPCR産物が効率良く反応することを明かにした(図6b)。

更に、各々の検出限界を検討するために、鋳型となる千葉株のRNAを10倍階段希釈後、通常のRT-PCRを行い、増幅されたPCR産物をAGE後EtBrで染色する方法(NV/千葉株群RT-PCR単独法)と、更にサザンブロット・ハイブリダイゼーション法を併用する方法(NV/千葉株群RT-PCR・サザンブロット併用法)を用いて両者の検出感度を比較した。NV/千葉株群RT-PCR単独法では 10^{-1}

希釈まで増幅産物が確認できたが、NV/千葉株群RT-PCR・サザンブロット併用法では 10^{-4} 希釈までバンドの検出が可能であった(図7)。一方、この時使用した千葉株患者材料は電子顕微鏡による観察で 2×10^6 個/mlのウイルス粒子を含んでいた。そこで、図7におけるNV/千葉株群RT-PCR単独法とNV/千葉株群RT-PCR・サザンブロット併用法の各々の検出限界に必要なウイルス粒子数を計算してみると、NV/千葉株群RT-PCR単独法では 10^4 個、NV/千葉株群RT-PCR・サザンブロット併用法では10個のウイルス粒子が必要であった。これらの成績は今回用いたこのNV/千葉株群RT-PCR・サザンブロット併用法が従来のEM法に比べ約100,000倍、またNV/千葉株群RT-PCR単独法に比べても約1,000倍の検出感度を持つ事を示している。

9) NV/千葉株群SRSVの分子疫学:

1993年3月から1994年2月の間に秋田県・岐阜県・山口県・島根県・佐賀県・大分県において発生した非細菌性集団食中毒事例(表1-1; 1-2)を対象に、本検査法がNV/千葉株群のSRSV疫学調査に有用な方法であるのか、更にNV/千葉株群以外のSRSVが存在するかどうかを調べる為に、私が開発した方法でのNV/千葉株群SRSV遺伝子の検出を試みた。検査した143検体は、食品衛生法に基づく細菌学的検査の結果、病原性大腸菌等は陰性であった。また、ロタザイム、アデノザイム検査でウイルス性胃腸炎に関係のあるロタウイルス及びアデノウイルスの検査を行ったが全て陰性であった。これらの事例における個々の患者については臨床症状・潜伏時間等の疫学的な情報は得られていないが、各流行事例全体の疫学情報は表1に示した。この情報から、全体的な事件経過等はNV様SRSV感染で引き起こされたウイルス性食中毒事件として従来報告された事件経過と類似しており、これらの患者についてはSRSVによる感染が疑われた。更に、北九州市において定点観測施設として指定されている一病院を受診したEM法によりNV様SRSV陽性の急性胃腸炎外来患者便材料40検体(表2)も検査対象とした。

まず最初は、6県の流行事例の検体について調べた結果を示した(表3)。これらの流行から得られた患者便材料143検体の中で、NV/千葉株群RT-PCR単独法でPCR増幅産物のバンドが検出されたものは4検体(2.8%)であった。更にNV/千葉株群RT-PCR・サザンブロット併用法を用いることにより陽性数が34検体(24%)と増加した。

陽性検出率を事例毎に見ると、秋田県の学校給食が原因と考えられる事例では、EM法により10検体中1検体からNV/千葉株群SRSSVが検出された。これらの検体はNV/千葉株群RT-PCR単独法ではPCR産物が検出できなかったが、NV/千葉株群RT-PCR・サザンブロット併用法を用いると、EM法で陽性の検体を含めて6検体(60%)が陽性となった。同じく、岐阜県の学校給食関連事例では、検査材料が極く少量しか得られなかったために電顕検索は実施できなかった。この26検体についてもNV/千葉株群RT-PCR単独法では増幅された遺伝子DNAのバンドが検出できなかったが、NV/千葉株群RT-PCR・サザンブロット併用法を用いることにより10検体(38%)が陽性となった。山口県では8回の流行が起こっており、各々の事例に関する疫学情報は表1-1に示した。このうち、学校給食が原因と考えられた事例は4事例、残り4事例は食堂や旅館等における会食後に発生した事例であった。これらの事例で収集された58例中49例について電顕検索した結果、SRSSVを確認できた検体数は7例、陽性率は14%であった。つぎに、電顕検索していない9例を含む58例の検体についてNV/千葉株群RT-PCR単独法で検査した結果、陽性となった検体は4例で陽性率は6.9%であった。この4例はすべてEM法でSRSSV陽性の検体であった。これらのPCR産物をさらにNV/千葉株群RT-PCR・サザンブロット併用法を用いて検査したところ、EM法でSRSSV陽性の検体7例すべてを含む18例が陽性(31%)となった。

一方、同様の流行が発生した島根県の2事例、佐賀県及び大分県の各1事例(合計4事例)の結果(表3)は、私の開発したNV/千葉株群RT-PCR・サザンブロッ

ト併用法ではEM法でSRSVが陽性の2検体も含め検査した49検体が全て陰性の結果だった。従って、陰性となったウイルス性胃腸炎感染に私が開発したNV/千葉株群SRSV検出法で検出できない別種のSRSVが関与していた可能性が強く示唆された。

次に上記流行事例が発生した同時期に一定点観測医療機関で収集した検体についての検査結果を示した(表4)。これらの検体は、前記流行事例の検体と異なり全て北九州市の材料で下痢を主徴として1993年から1994年にかけて外来受診した患者の材料の一部で、すべて細菌学的検査の結果陰性の検体である。1993年から1994年の一年間にEM法で検査した検体は第2病日から第8病日の間に採便された902例で、このうち第1から4病日の間に採便された検体からEM法により、主にHRV、AdV、SRSV等を含むウイルスが902例中428例(48%)検出された。これらのウイルス陽性428検体の中でSRSVの陽性数は72例(8.0%)であった。今回使用した検体はこの形態学的にNV様SRSV陽性の72例のうちの一部(40検体)である。この40検体中NV/千葉株群RT-PCR単独法では6例(15%)が陽性であり、さらにNV/千葉株群RT-PCR・サザンプロット併用法を併用すると18例(45%)が陽性の結果となり、これらのウイルス性胃腸炎にNV/千葉株群SRSVが関与していることが明かとなった。しかし、EM法でSRSVが陽性にもかかわらず、私が構築したNV/千葉株群プライマーでは遺伝子が検出されなかった検体も22例存在した。即ち前記の流行例と同様、我が国には千葉株群SRSV以外にEM法で形態学的には区別し難いが遺伝子レベルで区別可能な別種のSRSVがこれらのウイルス性胃腸炎感染に関与していた可能性を示唆している。

考 察

我が国では、年間60万人にもものぼる急性胃腸炎患者が発生している。このうち、細菌性胃腸炎の病原体は培養等により検出できるが、高感度で再現性の高い検査方法がないウイルス性胃腸炎の占める割合についての詳細な報告はなく、公衆衛生上の大きな問題となっている。ウイルス性胃腸炎の起因ウイルスとして以前はロタウイルス、アデノウイルスの報告が主流であったが、最近では多種多様なSRSVが関与している可能性が多数報告されてきている。また、ロタウイルスやアデノウイルスが特に乳幼児を中心に散発的な胃腸炎感染を引き起こしていることとは対照的に、SRSV感染では年長児から成人まで幅広い年齢層が感染して、集団食中毒事例を起こすことが特徴とされている。ロタウイルスやアデノウイルスの診断には市販のラテックス反応キット等が開発されて実用化されているが、SRSVの診断については、HAs t Vを除いては培養可能な細胞系や実験動物系が存在しないために、EM法による形態学的検出が主になされており、その他に免疫電顕法、ウエスタンブロット法、ELISA法等が試みられている。しかし、これらの検査方法は高価な機械、熟練した技術、特殊な試薬、大量の患者材料が必要であり、更に検査日数が係り過ぎる等の理由で一般的な方法ではなく、より簡便で高感度な臨床検査法の開発が世界各国において強く望まれてきている。

私は、病原診断の迅速化と効率化という観点からも優れた方法であるRT-PCR法に注目して本研究を開始した。まず、ショ糖密度勾配遠心で精製したSRSV千葉株の35S RNAを鋳型に、オリゴd(T)₁₂₋₁₈をプライマーとして用いてcDNAを合成し、これをホモポリマー法によってpBR322のPst I部位に挿入し、cDNAライブラリーを作成して塩基配列を決定した⁷⁾。決定した領域は解析の結果、NVのORF-3に相当することが判明したが、現在までのところORF-3がコードする蛋白の機能は不明である。しかし、今回の成績はこの解析のための重要な情報を提供し、また今後全塩基配列を決定する為の足掛かりとしても重要なことであると考える。

私は、今回解読した塩基配列を参考にしてNV/千葉株群SRSV検出に用いる

RT-PCR法用プライマーを構築した。まず、千葉株とNVとの比較からORF-3領域を挟んで保存された塩基配列が両株間に存在することが明らかとなったので、この部分を共通プライマーとするRT-PCR法を検討した。ゲノムのクローニングと異なり患者便材料中のSRSSVゲノム抽出方法は、直接便材料から抽出する事や多数の検体を一度に処理しなければならない事などの理由からホットフェノール法ではなく、より簡単に再現性のよい米国のJiang⁹⁾等の方法を採用した。千葉株が得られた流行時の別の患者材料を3検体とNVを経口投与した感染者の便材料検体とを使用して、このプライマーによるRT-PCR法を検討した結果、アガロースゲル電気泳動法（千葉株群RT-PCR単独法）による解析からすべての検体において目的としているPCR増幅産物が検出された。これらの結果は、今回構築したプライマーがNV/千葉株群SRSSVをスクリーニングするために有用であることを示している。また、サザンブロット・ハイブリダイゼーション法を併用することによりPCR産物の検出感度を更に上げることが出来た。このハイブリダイゼーション法用プローブは非放射性であるために、特殊な装置や設備、機械等の必要はなく日常の行われる簡単な検査方法として使用可能である。私が開発したNV/千葉株群検出可能なRT-PCR単独法のウイルス検出感度は従来使用されてきたEM法と比較して、およそ100倍上昇した。更にサザンブロット法を併用して解析するとNV/千葉株群RT-PCR単独法と比べても更に1,000倍感度が上昇した。このNV/千葉株群RT-PCR・サザンブロット併用法は、短時間の処理で結果が得られること、EM法と比較して検出感度が非常に高いことに加えて、一般的な手技としてNV/千葉株群のSRSSV遺伝子を検出するためには簡便な方法である。

本検査法がNV/千葉株群のSRSSV疫学調査に有用な方法であるのか、さらにNV/千葉株群以外のSRSSVが存在するかどうかを調べるために、14件の非細菌性集団食中毒事件及び定点観測のために指定されている一病院における外来患者の検体についてそれぞれ検査を行った（表3、4）。これらの検体は所轄保健所で食品衛生法に基

づく細菌学的検査を行った結果、病原大腸菌等は陰性であった。またウイルス性胃腸炎に関与しているHRVやAdVは一般に散発事例のみの原因となり食中毒事件には関与しないとされているが、今回の検体でも市販の検査キットを用いた検査及びEM検査によりHRV、AdVは検出されていない。秋田県、岐阜県、山口県（山口事例-8）、島根県の2つの事件および佐賀県で発生した合計6件の食中毒事件は、特定の給食センター由来の昼食を喫食したあと36時間から72時間後に、一箇所又は数箇所の学校において同時多発的に多数の患者が発生していた。残りの8事例は推定感染源と考えられる施設や食品が特定されていない。しかし、各々の事件についての疫学調査の結果（表1-1、1-2）、臨床症状のうち特に嘔気、嘔吐が主症状であり下痢症状も高い頻度で報告されていること、罹患した患者の年齢層が児童、生徒から成人まで幅広く、HRVやAdVの罹患年齢層である若年令層とは異なること、採取された患者便材料が細菌性下痢症でしばしば観察される膿粘液便とは著しく異なりサラサラとした水様便であること等、全体的な食中毒事件経過は従来報告されているNV様SRSSV感染で引き起こされたウイルス性食中毒の事件経過と類似していることからSRSSV感染が疑われたので、これらの14事例について私が開発したNV/千葉株群共通プライマーを用いたRT-PCR・サザンブロット併用法で検査を行った。NV/千葉株群SRSSV遺伝子が陽性となった事例は秋田県、岐阜県、山口県の合計10事例であった。これら陽性事例におけるNV/千葉株群SRSSV遺伝子の検出率は8%（山口事例-1）から100%（山口事例-5）まで分布していた。また、EM法による北九州市の非細菌性胃腸炎の検体の検査では、NV様SRSSV粒子がEM法で陽性となった検体40例中17例（45%）がNV/千葉株群SRSSV遺伝子陽性であった。これらの結果からSRSSV千葉株と似た塩基配列を有するSRSSVが千葉県以外の全国各地にも分布していることが明らかとなった。

一方、島根県、佐賀県、大分県で発生した4事例の疫学調査の結果では、他の県で発生した給食由来の食中毒と類似した事例でありNV様SRSSVが関与しているもの

と考えられたにもかかわらず、私のNV/千葉株群共通プライマーを用いたRT-PCR・サザンブロット併用法でNV/千葉株群SRSSV遺伝子が検出できなかった。また、NV様SRSSV粒子がEM法で陽性だった北九州市の非細菌性胃腸炎の散発事例の検体の中にも私が構築したNV/千葉株群共通プライマーを用いたRT-PCR法で陰性の結果を示した検体が5.5%存在した。このことは、これらの材料中にはNV/千葉株群SRSSVと形態学的には類似しているが遺伝子配列の異なる別種のSRSSVが存在する可能性を強く示唆している。そこで、千葉株以外のこれらのSRSSVについても、遺伝子クローニングを行いそれらの塩基配列を決定すること、また、それぞれの塩基配列を比較することで多くの型のSRSSVを検出できる共通プライマーを構築すること、更にこの共通プライマーを用いた遺伝子検出および解析等についての新しい方法を開発する必要がある今後の研究課題の一つである。

山口県の事例のうち山口事例-2、3、8において採便後の検体の取り扱いが不適切であった可能性が行政調査で指摘されている。今後は、事件発生後できるだけ早期に検体を採取し検査に使用することまた、検査するまでの期間は出来るだけ低温又は冷凍で保存し、搬送中の温度上昇を抑ええること等に留意することがSRSSV遺伝子の陽性検出率を上昇させる為に必要な事と考える。更に、食中毒事件の場合患者の検体は主に便材料であるが、事件に巻き込まれて罹患した患者数が多い割に実際のウイルス学的検査に供される検体数が少ないのが現状である。この理由は、食中毒事件が起こった場合、最初は細菌学的な検査が進められることや、厚生省による「食中毒取り扱い要領」のなかに食中毒の原因としてウイルスが全く考慮されていないこと等により、実際にウイルス学的な検査に供される検体の数が限定されている為であると考ええる。通常、発生した事件の規模の大小にかかわらず、所轄保健所が収集してウイルス学的な検査に提供される検体数は、一般的に数検体から多くても10数検体にすぎない。私が今回入手できた患者材料も1事例につき1検体から26検体までと事件毎に異なっていた。今後、我が国における種々のSRSSVの浸透状況を調べるためには、細菌学的な検査に提供される

検体数と同等数程度の検体をウイルス検査用に常に確保する事が必要であり、そのためにSRSVに関する研究や情報を各地の保健所員、食品衛生監視員等へ普及する事も今後の課題の一つと考える。

また、今回のNV/千葉株群SRSVを検出できるNV/千葉株群RT-PCR・サザンブロット併用法による検査の結果、山口県の流行事例から得られた材料の中に、PCR産物の泳動バンドがEt、Br、で強く染色されたにもかかわらず、千葉株のプローブを用いたサザンブロット・ハイブリダイゼーションの結果では弱い反応しか示さない検体が存在した。すなわち、この検体中には、使用したプライマーが結合しうるような塩基配列部位をもつRNAが存在していたにもかかわらず、これらのプライマーで挟まれた内側の塩基配列が千葉株とは異なっている可能性が考えられる。この検体についてはPCR増幅産物をクローニングして塩基配列を決定する事、更に解読できた塩基配列を千葉株及びNVと比較検討する事を目的に現在研究を進めている。

近年、ウイルスの構造蛋白質をコードする遺伝子部位の塩基配列を解読し、これを発現ベクターに導入後、ウイルス蛋白として発現させることが世界各国で広く行われている。これらの手法は、特に培養困難なSRSVにとってウイルス構造蛋白を大量に入手するために優れた方法であり、このようにして得られたウイルス蛋白は血清疫学的な研究のために必須な検査方法であるEIA用の抗原として使用できる可能性がある。

またこれらの発現蛋白に対する高度免疫血清は患者便材料中のウイルス抗原を簡単に検出する方法への道を開くかもしれない。千葉株に関しても、さらに上流側の遺伝子をクローニングしてそれらの塩基配列を解読し、これらのDNAクローンをもとに千葉株独自のウイルス構造蛋白を発現させ、広く疫学的研究に資する事が出来るよう研究を進めることが必要であると考えている。

まとめ

我が国においては、細菌性及びウイルス性の胃腸炎の患者が年間60万人近く発生していると推定されている。このうちウイルス性胃腸炎の起因ウイルスとしては従来報告されているHRV、AdVに加えて、近年は小型球形ウイルス(SRSV)と総称される形態学的に多様なウイルスの一群が多数報告されてきている。このSRSV胃腸炎に関して現在使用されている病原診断法は、電顕法、免疫電顕法、あるいはウエスタンブロット法、EIA法等によるベア血清中のウイルス特異抗体価の有意上昇の検出等があるが、多くの問題点を抱えており一般的な方法ではない。

私は病原診断の迅速化と効率化という観点からも優れた方法であるRT-PCR法に注目してSRSV千葉株遺伝子の研究を開始した。まず、遺伝子工学の手法を用いて1987年12月千葉県で発生した急性胃腸炎患者便材料から直接ウイルス遺伝子を抽出、クローン化して、その塩基配列を解読した。本ウイルスは、粒子表面に明瞭なプロジェクションを持つ直径30-35nmのSRSV(千葉株と略す)で、塩化セシウム中における浮上密度は $1.36-1.37\text{ g/cm}^3$ であった。精製したウイルスゲノムはポリアデニル酸(poly A)を持った約7.5Kbの一本鎖RNAである。このウイルスゲノムRNAを鋳型にして、オリゴdTをプライマーに逆転写することによりcDNAを合成し、ホモポリマー法でクローニングを行った。さらに、M13ベクターにサブクローン化を行い塩基配列を解読した。その結果、poly Aを除いて3'末端側から約2,000bpの塩基配列を決定した。この配列の中には208個のアミノ酸をコードするオープンリーディングフレーム(ORF-3)が認められた。このデータをもとに核酸及び蛋白質データベースでホモロジー検索を行った結果、千葉株のORF-3の塩基配列はカリシウイルスのなかのノルウォークウイルス(NV)に類似していることが明らかとなった。決定した領域はNVのORF-3に相当することが判明したが、現在までのところORF-3がコードする蛋白の機能は不明である。しかし、今回の成績はこの解析のための重要な情報を提供し、また今後全塩基配列を決定する為の足掛か

りとしても重要なことであると考え。

次に、千葉株とNVに共通した配列が存在したので、この部分をプライマーとしたNV/千葉株群SRSVの検出用RT-PCR法を検討した。このRT-PCR法によって千葉株と同様にNVにおいても予測されたPCR産物が得られ、NV/千葉株群SRSVの検出が可能となった。更にこのPCR産物の検出感度を上げるために、千葉株に特異的な非放射性プローブを用いて検出するサザンブロット・ハイブリダイゼーション法をRT-PCR法と併用する方法を検討した。このNV/千葉株群共通プライマーを用いたRT-PCR・サザンブロット併用法により、NV/千葉株群SRSV遺伝子のPCR増幅産物を検出する感度がRT-PCR単独法に比較して約1,000倍、また従来のEM法と比較するとおよそ100,000倍上昇した。このRT-PCR・サザンブロット併用法を用いることで、患者糞便材料中にNV/千葉株群SRSVが10個/ml以上存在すればそのNV/千葉株群SRSV遺伝子を検出することが可能となった。

本検査法がNV/千葉株群のSRSV疫学調査に有用な方法であるのか、さらにNV/千葉株群以外のSRSVが存在するかどうかを調べるために、NV/千葉株群SRSVを検出できる共通プライマーを用いて国内における14流行事例の非細菌性胃腸炎患者材料143検体および散発例40検体の遺伝子解析を試みた。事例毎の陽性率に差はあるものの、14流行事例のうち10事例はNV/千葉株群共通プライマーを用いたRT-PCR・サザンブロット併用法でNV/千葉株群SRSVの遺伝子が陽性、さらに散発事例40検体中にNV/千葉株群SRSV遺伝子が17例(45%)陽性となった事から、我が国においてNV/千葉株群SRSVが広く全国各地にも存在している事が明かとなった。しかしながら、検査した流行事例中4事例ではEM法でSRSV陽性の2検体を含めて全くNV/千葉株群SRSVの遺伝子を検出することが出来なかった事。すべての検体がEM法でNV様SRSVが陽性であったにもかかわらず散発例40検体中23検体(55%)でNV/千葉株群SRSVの遺伝子は検出できなかった事等から、私が構築したNV/千葉株群SRSV共通プライマーでは検出できない別種のSRSV

が今回検査し陰性となったウイルス性胃腸炎感染に関与していた可能性を示唆している。

即ち、我が国においてNV／千葉株群SRSVが広く全国各地に存在する事が証明できたと同時に、私が開発したNV／千葉株群SRSV遺伝子検出法では検出できない別種のSRSVの存在も明かとなった。そこで、このように多種多様なSRSVに共通するプライマーを構築するためには、NV／千葉株群以外の幅広い範囲のSRSVについても遺伝子を解析し、それぞれの塩基配列の比較からより適当なプライマーを開発することが必要であり、今後の私の研究課題の一つと考えている。

1. A.ロビンス&P.フリーマン: 第三世界へのワクチン供給を阻むもの。
サイエンス, **1**: 90-96, 1989.
2. 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課: 感染症サーベイランス事業年報,
平成4年, 1995年3月。
3. Caul EO, Appleton H. The electron microscopical and physical
characteristics of samall round human fecal viruses. An interim sheme for
classification. *J Med Virol*: 257-265, 1982.
4. Kapikian AZ, Chanock RM: Norwalk group of viruses. In *Virology*, 2nd
Edition, eds. Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Hirsch MS, Melnick JL,
Monath TP, Roizman B. Raven Press, Ltd. New York, 1990, pp. 671-693.
5. Cannon RO, Poliner R, Hirschhorn RB, Rodeheaver DC, Silverman PR,
Brown EA, Talbot GH, Stine SE, Monroe SS, Dennis DT, Glass RI:
A multistate outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with
consumption of commercial ice. *J Inf Dis* **164**: 860-863, 1991.
6. Kaplan JE, Goodman RA, Schonberger LB, Lippy EC, Gary GW:
Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a
municipal water system. *J Inf Dis* **146**: 190-197, 1982.
7. Gill ON, Cubitt WD, Mcswiggan DA, Watney BM, Bartlett CLR: Epidemic
of gastroenteritis caused by oysters contaminated with samll round
structured viruses. *Bri Med J* **287**: 1532-1534, 1983.
8. Utagawa ET, Takeda N, Inouye S, Kasuga K, Yamazaki S: 3'-Terminal
sequence of a small round structured virus (SRSV) in Japan. *Arch Virol*
135: 185-192, 1994.
9. Kasuga K, Tokieda M, Ohtawara M, Utagawa E T, Yamazaki S.: Small round
structured virus associated with an outbreak of acute gastroenteritis in Chiba,
Japan. *Jpn J Med Sci Biol* **43**: 111-121, 1990.
10. Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK: Detection of Norwalk virus in
stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**: 2529-2534, 1992.
11. Takeda N, Miyamura K, Ogino T, Natori K, Yamazaki S, Sakurai N,
Nakazono N, Ishii K, Kono R. Evolution of enterovirus Type 70:
oligonucleotide mapping analysis of RNA genome. *Virol.* **134**:
375-388, 1984.
12. Gubler U, Hoffman B J. A simple and very efficient method for generating
cDNA libraries. *Gene* **25**: 263-269, 1983.

13. Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. (1982) In Molecular Cloning, 2nd Edition. eds. Irwin N, Ford N, Nolan C, Ferguson M, Ockler M, Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York, 1989.
14. Sanger F, Nicklen S, Coulson R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:5463-5467, 1977.
15. Lipman D J, Pearson W R. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* **227**: 1435-1441, 1985.
16. Griffains R, Angre PM, Thibon M: Synthesis of digoxigenin-labeled DNA probe by polymerase chain reaction : Application to Epstein-Barr Virus and Chlamydia Trachomatis. *Res Virol* **141**: 331-335, 1990.

表 1-1 流行事例の概要

	秋田		山口							
	1	2	3	4	5	6	7	8		
発生年月	1993. 3	1993. 6	1993. 3	1993. 12	1993. 12	1994. 1	1994. 1	1994. 2	1994. 2	
発生施設	小・中学校	小・中学校	職場	保育園	養護施設	職場	職場	高校	中学校	
発生施設数	7	17	1	2	2	2	7	1	1	
推定食品摂取人数	1,408	6,636	30	213	132	84	102	42	665	
患者数	529	2,697	11	103	29	33	44	19	269	
発病率(%)	36	41	38	48	22	36	56	45	40	
年齢	7~15、 25~40	5~60	1~43	0~6、 19~58	11~47	19~24	22~81	18~20	11~47	
推定感染源										
施設	給食センター	給食センター	食堂	不明	不明	レストラン	旅館	不明	給食センター	
食品	不明	不明	不明	不明	不明	餅(?)	餅(?)	不明	不明	
潜伏時間(平均日)	4.8	7.2	3.6	5.0	7.2	4.7	5.2	4.8	3.6	
主要症状(%)										
嘔気	7.5	8.0	3.6	10.0	5.0	8.5	6.8	7.8	8.0	
嘔吐	6.0	3.5	7.2	10.0	3.6	6.4	4.8	7.0	7.0	
下痢	5.0	7.2	8.2	1.3	3.6	5.5	7.3	4.1	5.0	
腹痛	8.2	1.5	6.4	0	7	1.2	6.3	2.4	3.0	
発熱	0	1.0	1.8	1.8	6.4	5.5	3.9	2.7	3.1	
頭痛	0	0	3.8	0	0	0	4.2	2.3	1.4	

表 1-2 流行事例の概要

	島根		佐賀		大分
	1	2			
発生年月	1993. 11	1993. 11	1993. 3	1994. 2	
発生施設	小学校	中学校	小学校	農場	
発生施設数	1	1	1	1	
推定食品曝食者数	156	356	554	55	
患者数	70	158	287	29	
発病率 (%)	45	44	52	53	
年齢	7~12, 25~40	15~17, 30~55	7~12 35~60	22~46	
推定感染源					
施設	給食センター	給食センター	給食センター	料理店	
食品	不明	不明	不明	不明 (精カキ?)	
潜伏時間 (平均日)	4.8	3.7	3.6	3.3	
主要症状 (%)					
嘔気	9.1	8.6	3.6	9.5	
嘔吐	6.0	3.5	5.5	10.0	
下痢	6.5	7.2	8.2	2.3	
腹痛	3.5	1.8	1.5	2.0	
発熱	1.0	2.0	0	1.8	
頭痛	0	0	3.8	0	

表 2 北九州市の一定点観測医療機関におけるSRSV陽性例（1993～94）の概要

表 2-1 性別

	検体数	(%)
男性	3 0	7 5
女性	1 0	1 5
合計	4 0	

表 2-2 年齢分布

年齢	検体数	(%)
0	1 0	(2 5)
1	1 5	(3 8)
2	6	(1 5)
3	3	(7.5)
4	5	(1 3)
5	0	-
6	1	(2.5)
合計	4 0	

表 2-3 臨床症状

症状	検体数	(%)
下痢・嘔吐	2 7	(6 7.5)
嘔吐	3	(7.5)
下痢	1 0	(2 5)
発熱（37℃以上）	2 4	(6 0)
合計	4 0	

表 2-4 採便病日分布

病日	検体数	(%)
0	1 4	(3 5)
1	1 0	(2 5)
2	5	(1 3)
3	4	(1 0)
4	2	(5)
5	1	(2.5)
6	2	(5)
7	1	(2.5)
8	1	(2.5)
合計	4 0	

表3 流行事例におけるSRSV千葉株遺伝子検出率の比較

流行 事例 場所	検体数	RT-PCR		EM
		陽性数		SRSV 陽性数 ／検体数(%)
		単独法 (%)	サンプロット併用法(%)	
秋田県	10	0 (0)	6 (60)	1／10 (10)
岐阜県	26	0 (0)	10 (38)	NT
山口県	-1	0 (0)	1 (8)	2／9 (22)
	-2	6	1 (17)	2 (33)
	-3	10	0 (0)	4 (40)
	-4	9	0 (0)	3 (33)
	-5	1	1 (100)	1 (100)
	-6	4	1 (25)	2 (50)
	-7	8	1 (13)	3 (38)
	-8	8	0 (0)	2 (25)
島根	-1	10	0 (0)	0 (0)
	-2	8	0 (0)	0 (0)
佐賀	27	0 (0)	0 (0)	1／27 (4)
大分	4	0 (0)	0 (0)	NT
合 計	143	4 (2.8)	34 (24)	10／104 (9.6)

表 4 北九州市の散発事例におけるSRSV千葉株遺伝子検出率の比較

検体数	RT-PCR 陽性数 (%)	
	単独法	サングロト併用法
40*	6 (15%)	18 (45%)

* EM法で検査した902検体中SRSV陽性は72検体であった。
今回使用した検体はこの72検体のうちの40検体である。

A

Bottom Top P

B

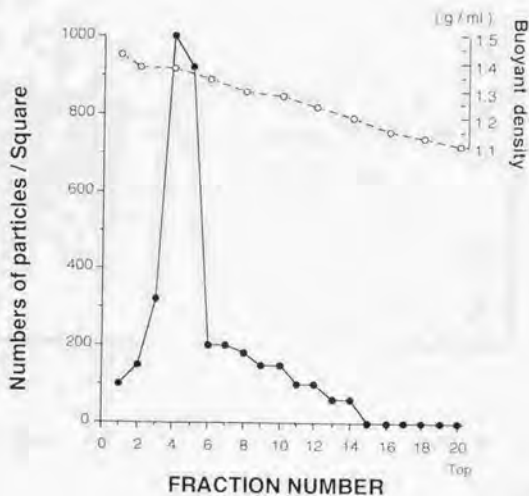


Fig.1. Cesium chloride density gradient centrifugation analysis of the SRSV/Chiba strain.

- 1-(A) Dot-blot hybridization analysis with ^{32}P -labelled probe. RNA was extracted from each fraction and immobilized onto nitrocellulose by dot-blotting and hybridized with the ^{32}P -labelled probe.
- 1-(B) Numbers of virus particles and buoyant density of each fraction were measured.

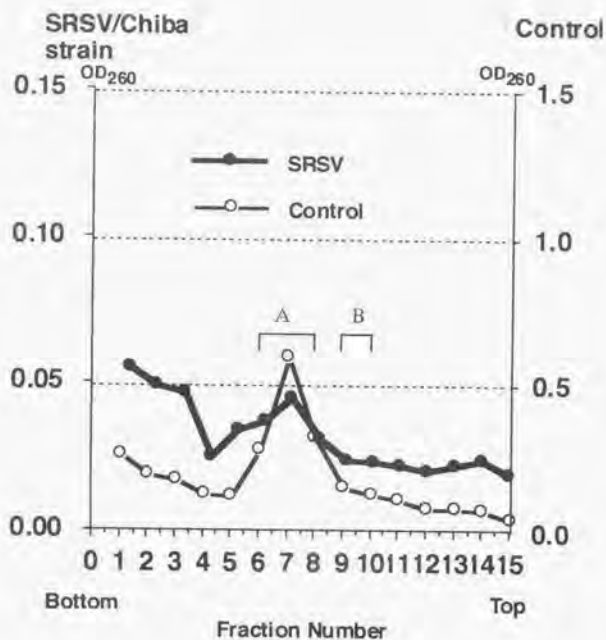


Fig.2. Sedimentation of the SRSV/Chiba strain RNA in a 15-30% sucrose gradient centrifugation.

RNA was extracted from purified virion peak and centrifuged through a 15-30% sucrose gradient at 22 C for 16 Hrs in RPS 40T Hitachi 65P. The absorbance of each fraction was measured at OD_{260nm}. CA-24 RNA was used for the control. A and B shows the pooled fractions (A; fraction 6-8, B; fraction 9-10), respectively.

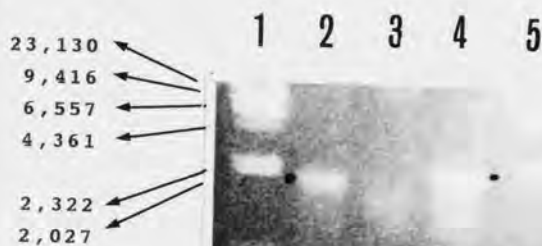


Fig.3. Agarose gel electrophoresis analysis of the SRSV/Chiba strain RNA.

RNA was electrophoresed on a 2.0% agarose gel.

Lanes; 1 and 5 show molecular size markers (Boehringer Mannheim, Germany) that migrated as 23,130, 9,416, 6,577, 4,361, 2,322 and 2,027.

Lane 2 is the SRSV/Chiba strain's pooled A fraction, 3 is the SRSV/Chiba strain's pooled B fraction, 4 is control's pooled A fraction, respectively, as shown in Fig.2.

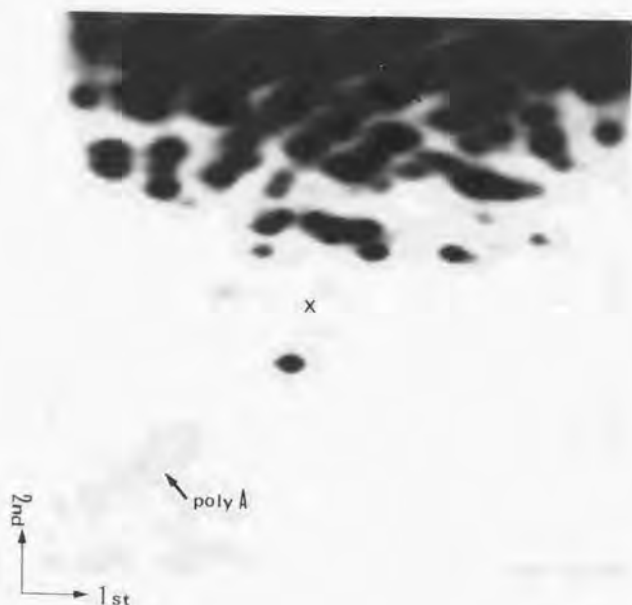


Fig.4. RNA finger printing analysis of the SRSV/Chiba strain.

The RNase T1-resistant oligonucleotides of the SRSV/Chiba strain RNA were 5'-end-labelled and separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, and the autoradiograph was prepared. The origin is towards the bottom left-hand corner. X indicates the position of the dye marker (BPB).

401	AAGCUGCGUUGCAG-GCACAGAGAUCAACAAGAUUCUG-A-CUUUGCA-	450
401	AAGCGGCCCTCCAAAGC-CAAAGGTATCAACAAAATTGCAACT--GCAA	450
451	GCAAAAUUCUUUUUAUCAUGAUAGGAAUUG-UUAGGUUAUCAAUGGAA	500
451	G-AAAATTCTTTTAAACATGACAGGGAAATGATTGGGT-ATCAGGTTGAA	500
501	A-UGUCCAA-CAAGUUGCUGCUAAAAUUCU---AAC-ACCCGCUAUUC	550
501	GCT-TCAAATCAA-TTATTGGCTAAAAAT-TTGGCAACTA---GATATTC	550
551	UCUUCUCCAG-GC-GGGUGGCCUCUCAUCC--U-CUGAUGCGGUAGGGC	600
551	ACTCCTCC-GTGCTGGG-GGT-T-TGA-CCAGTGCTGATGCAGCAAGATC	600
601	UGUAGCCGGGGCCCCCGUCACUAGG-UUGGUCGACUGGG--GG-G-GAGU	650
601	TGTGGCAGGAGCTCCAGTCACCGCATTG-TAGATTGGAATGCGGTGAGA	650
651	GCGUGUUGCGGCACCCCAAUUAUCUGCCACCACAUUGAGAUUGGUAAU	700
651	G--TGT--CTGCTCCCGAGTCTCTGTGTACCACATTGAGATCCGGTGGCT	700
701	UUAUGGCUGUGCCAC-UCCCA---GC-UC-A-GCCAAACAG----AAGC	750
701	TCATGTCAAGTTC-CATACCATTGTCCTCTAAGCAAAACAGGTTCAATC	750
751	CCCUUGCCAGUGA--AGGUUAUUCUAA-----CCUGCUU-AUGACCCUG	800
751	ATCT-G---GT-ATTAG-TAATCCAAATTATCCC--CTTCAT--CCATT	800
801	UG-C-AACGCAC-AGCCUCUUGGGUCAA-UCUCAGAACUC--C-AGCC-	850
801	TCTCGAAC-CACTAG--T-T-GGGT-CGAGTCACAAAACATCATCGAGATT	850
851	-GG---UCUUGGUCUCCAUACCAUA-GGCAAGCCCUUCAG-ACUGUGUGG	900
851	TGGAAATCTT--TCTCCATACCACGCGG-AGGCTCT-CAATACAGTGTGG	900
901	GUGACCCC-CCUGGUUCUAC--C-UCUUCUUCUUCUGU-UUCUACUGCC	950
901	TTGACTCCACCC-GGTTCAACAGCCTCTTCTACA-CTGTCTTCTG-TGCC	950

Fig.5-continued.

```

# 2
951 CCUCGAGGGUAAUUUCAAUACAGAUAGAUGCC-UCUAUUCGCAAAACU--U 1000
    | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
951 AC--GTGGTTATTTCAATACAGACAGGTTGCCAT-TATTCGCAA-TAAT 1000

1001 GAGGCGUUAUUGUUGUAAUUAAGAUUA-GUGAGCAUCCUAUUUCAUUUUUG 1050
    | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1001 -AGGCGATGATGTTGTAATATGAA-ATGTGGGCATCATATTCA-TTTA-- 1050

1051 GCUUUUAUUAUUUUGGUUUAUUUUU-GGCUUUUAUUUUUGAUUUUGGUUGAU 1100
    | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1051 ----AT-TA----GGTT-TAATTAGG-TTT-AATTT-GAT--G-TTAA. 1100

1101 GUU (poly A) ..... 1150

1101 (poly A)..... 1150

```

Fig.5-continued

(A) RT-PCR

(B) Southern blot analysis

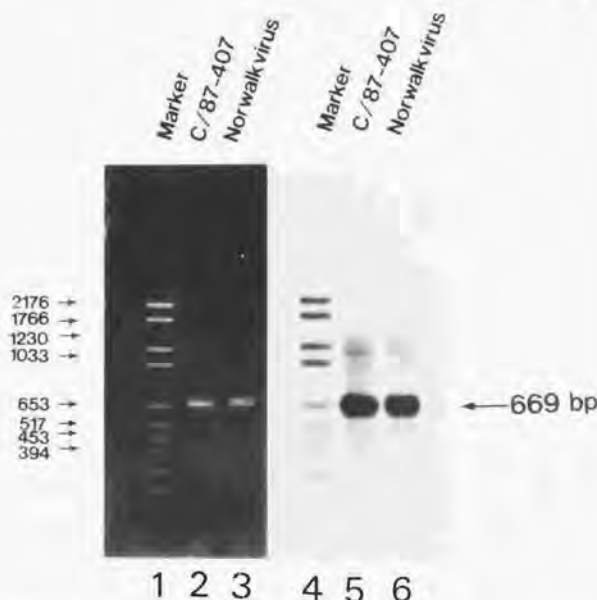


Fig.6. Detection of RT-PCR products of the SRSV/Chiba strain and NV in stools by RT-PCR and Southern blot analysis.

6-(A) RNA was extracted from stool samples by the CTAB technique and amplified by RT-PCR as described in the text.

Lanes; 1 and 4 indicate DIG-labelled molecular weight markers (Boehringer Mannheim, Germany) that migrated as 2,176, 1,766, 1,230, 1,033, 653, 517, 453 and 394.

Lanes 2 and 5 are PCR products of the SRSV/Chiba strain.

Lanes 3 and 6 are PCR products of the NV.

The amplified products were separated on an agarose gel and visualized with UV light after staining with ethidium bromide. The arrow at the right indicates the 669 bp position of the extracted molecular size of the RT-PCR product.

6-(B) Southern blot analysis of PCR products with DIG-labelled the SRSV/Chiba strain specific probe.

(A) Southern blot analysis

(B) RT-PCR

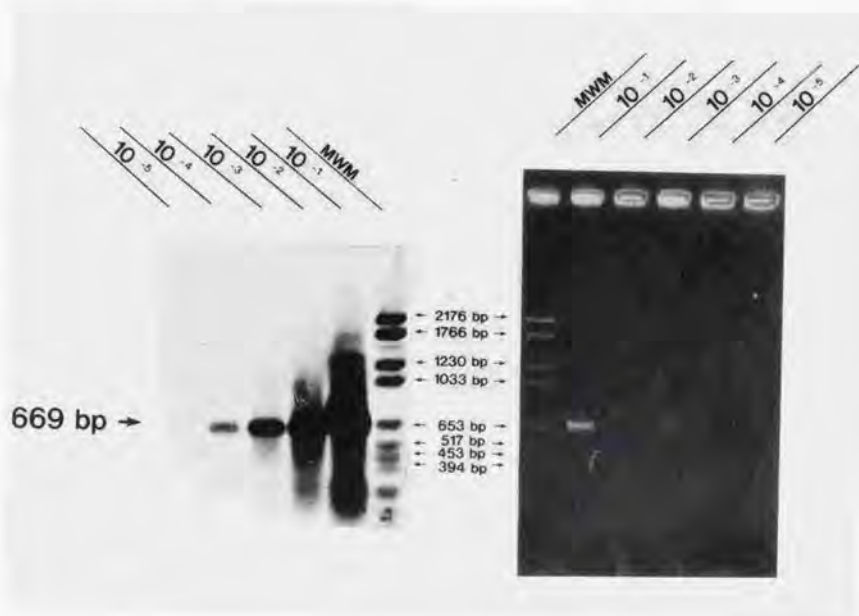


Fig.7. Comparative study of detection level of RT-PCR products between RT-PCR and Southern blot analysis.

7-(A) The each blot was reacted with the DIG-labelled SRSV/Chiba strain specific probe. The arrow at the left indicates the 669 bp position of the expected molecular size of the RT-PCR product.

7-(B) The RNAs extracted from the SRSV/Chiba strain and NV were diluted from 10^{-1} to 10^{-5} , respectively. The RT-PCR products from each dilution were separated on an agarose gel and visualized with UV light after staining with ethidium bromide.

