

資料

## 小児科領域の検体から検出したSapovirusの遺伝子学的解析

福田 伸治, 高尾 信一, 桑山 勝, 島津 幸枝, 宮崎 佳都夫

### Molecular Epidemiology of Sapovirus in Pediatric Cases

SHINJI FUKUDA, SHINICHI TAKAO, MASARU KUWAYAMA, YUKIE SHIMAZU and KAZUO MIYAZAKI

(Received Sep. 30, 2003)

ウイルス性感染性胃腸炎の原因ウイルスであるSapovirusについて, 乳幼児からの検出株の特徴を明らかにするため, 1995年10月から2003年6月の間に検出した14株の遺伝子学的解析を行った。広島県内におけるSVの主要流行型は遺伝子型ⅠのSG-I-aであり, 次いで遺伝子型ⅡのSG-II-aであったが, 2001年以降はSG-I-aのみの検出であった。0から3歳での検出率が高く, 低年齢層のリスクが高いことが認められたが, 地域により流行型に差は認められなかった。月別では12月の検出率が高かったが, 明確な月集積性は観察されなかった。

キーワード: Sapovirus, 小児, 遺伝子系統解析

#### はじめに

Sapovirus (SV) は急性胃腸炎の原因ウイルスの一つで, Norovirus (NV) と同じCalicivirus科に属し, 図1の形態を示す。我々の調査においては小児の胃腸炎の2.5%がSVに起因しており[1], 検出される割合はNVほど高くはないが, SVは小児の急性胃腸炎の起因ウイルスとして重要であり[2], 食中毒などの集団胃腸炎の原因となることもある[3-5]。SVはNVに比べ, 嘔吐を呈する割合が低いことも報告されており[5], 主要臨床症状はNVとは若干異なっている。SVは現在, 3遺伝子型に分類されており[6], わが国において検出される株は遺伝子型ⅠおよびⅡであることが報告されている[5, 7]が, その報告は多くない。我々は広島県での検出株の特徴を把握することを目的に, 医療機関(小児科)で採取された糞便から検出したSVのカプシッド領域の遺伝子を増幅し, 遺伝子学的解析を行ったので報告する。

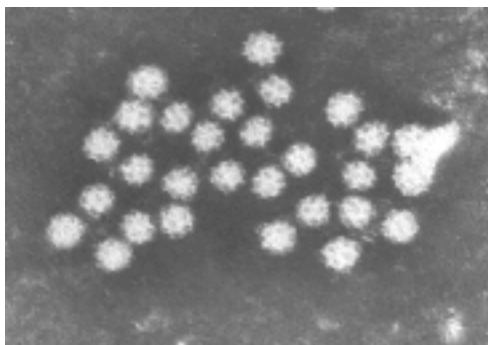


図1 SVの透過型電子顕微鏡像

#### 材料および方法

##### 1 使用株

1995年10月から2003年6月の間に小児科検体から検出したSV14株を使用した。

##### 2 カプシッド領域の遺伝子増幅

Okadaら[7]のプライマーを用い, Reverse Transcription-PCRにより435bpを増幅した。

##### 3 遺伝子のシーケンス

Licor社製シーケンサーモデル4200を用い, Dye primer法により遺伝子配列を解析した。

##### 4 遺伝子系統解析

357bpについて, clustalWプログラム(Neighbor-Joining法)[8]を用いて遺伝子系統解析を行い, TreeExplorerソフトウェア(<http://evolgen.biol.metro-u.ac.jp/TE/>)により系統樹を作成した。

##### 5 標準株

系統解析には検出株14株の他, 標準株として13株(Sapporo/82: GenBank Accession No. U65427, Houston/86: U95643, Plymouth/92: X86559, Manchester/93: X86560, Houston/90: U95644, Parkville/94: U73124, Stockholm/97: AF194182, London/92: U95645, Chiba/000496F/01: AJ412800, Chiba/000671T/99: AJ412805, Chiba01004H/01: AJ412816, Chiba/010469F/01: AJ412820およびPEC/

Cowden: AF182760), およびouter-group株としてNorwalk: M87661を用いた。これらの株の遺伝子配列はGenBankより得た。

## 6 プローブ型別

Vinjéら[9]のJV33, SR80プライマー, SAP, LON, PARおよびSTOプローブを用い, Fukudaら[10]のマイクロプレートハイブリダイゼーション法によりプローブ型別を行った。

## 結 果

検出株の採取年月, 遺伝子型およびプローブ型を表1に, 分子系統樹を図2に示した。SVは2月に1株, 3月に1株, 4月に2株, 5月に2株, 6月に1株, 10月に1株, 11月に1株および12月に5株検出され, 12月の検出率が最も高かったが, 明確な月集積性は認められなかった。

SVが検出された年齢は, 0歳4株, 1歳5株, 2歳2株, 3歳1株, 5歳1株および8歳1株で, 14株中12株は0から3歳の患者から検出されており, 乳児からの検出率が高かった。

プローブ型別ではLON型が4株およびSAP型が10株であったが, 遺伝子型ではSG-I-aが9株, SG-II-aが3株, SG-II-cが1株および型不明(SV371株)が1株であった。SV371株はHouston/86と84.8%, Sapporo/82と85.9%, Manchester/93と86.5%, Polymouth/92と86.8%およびChiba/000496F/00と82.9%の相同性を示した。SV371株を除く遺伝子型Iの9株はすべてSG-I-aに分類され, 97.1から99.7%の相同性を示した。遺伝子型IIではSG-II-aが3株, SG-II-cが1株検出され, SG-II-aに属する3株の相同性は89.9から92.9%であった。また, 2001から2003年に検出した7株はすべてSG-I-a(SAP型)であった。

表1 SV14株の背景, 遺伝子型およびプローブ型

検体番号	検体採取年月	性	年齢	遺伝子型 <sup>1)</sup>	プローブ型 <sup>2)</sup>
SV 88	1995/12	男	0	SG-II-a	LON
SV138	1996/ 5	女	1	SG-I-a	SAP
SV256	1998/12	女	2	SG-I-a	SAP
SV299	1999/ 4	女	0	SG-II-a	LON
SV371	2000/ 4	女	1	UNC	SAP
SV453	2000/12	男	8	SG-II-a	LON
SV454	2000/12	女	5	SG-II-c	LON
SV610	2001/11	不詳	0	SG-I-a	SAP
SV616	2001/12	男	0	SG-I-a	SAP
SV633	2001/10	男	1	SG-I-a	SAP
SV743	2002/ 5	男	2	SG-I-a	SAP
SV861	2003/ 2	男	1	SG-I-a	SAP
SV885	2003/ 3	男	1	SG-I-a	SAP
SV936	2003/ 6	男	3	SG-I-a	SAP

<sup>1)</sup> Okadaら[7]の分類, <sup>2)</sup> Vinjéら[9]のプローブ型  
UNC: 非分類

解析した14株が検出された患者の住居地を図3に示した。8株が広島市およびその近郊, 2株が福山市, 4株が県北に居住する患者から検出された株であった。それぞれの地域においても主要型はSG-I-aであり, 地域による差は認められなかった。

## 考 察

SVは成人よりはむしろ子供の感染性胃腸炎の原因となる傾向にあり[11, 12], Okadaら[7]は6歳以上よりも6歳未満での検出率が高いことを報告している。今

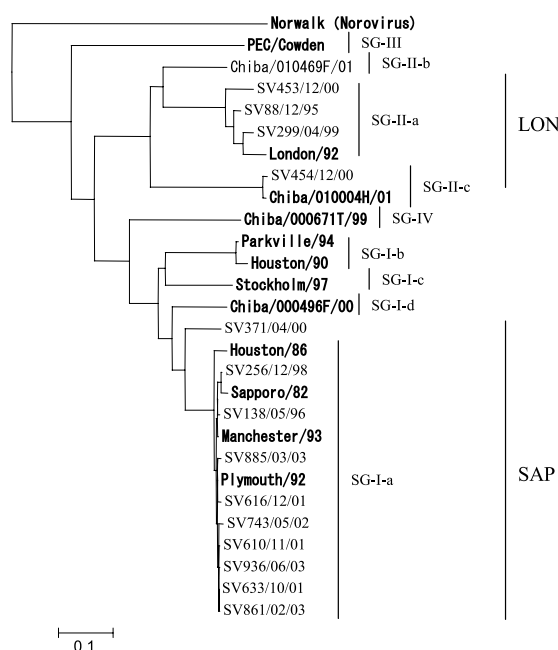


図2 SV14株の遺伝子系統樹

SG-I-a~SG-IV: Okadaら[7]の分類, SAPおよびLON: Vinjéら[9]のプローブ型  
太字は標準株を示す。

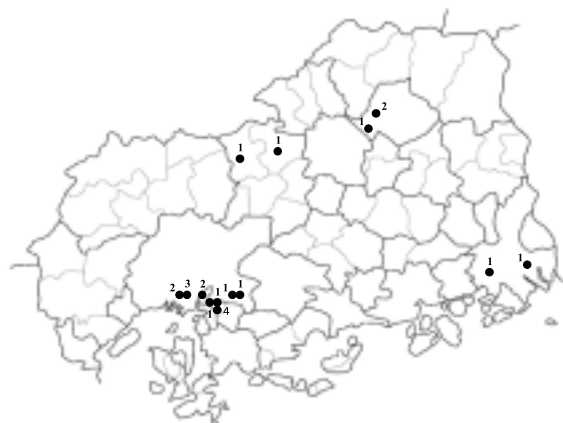


図3 SV14株の地理的分布

1: SG-I-a, 2: SG-II-a, 3: SG-II-c, 4: Okadaら[7]の分類に非該当

回, 14株中12株は0から3歳の乳幼児から検出されており, 低年齢層においてリスクが高いことを示していると考えられるが, 成人の集団胃腸炎の原因となることもある[3-5].

SVの検出時期は3から6月および11月に多く検出されたとの報告がある[5]が, 我々の結果では12月が最も多いものの, 検出数が少なく月集積性を明確にするには至らなかった.

NVは遺伝子配列の異なる多様な株の流行が見られる傾向にある[1]が, 検出したSVは遺伝子型IのSG-I-aが主流で, 次いで遺伝子型IIのSG-II-aが多く検出され, SG-I-aおよびSG-II-aは広島県内における主要流行型であることが示唆された. また, SG-I-aに分類された9株は97.1から99.7%の相同性を持ち, 年によらず遺伝子配列の類似した株が流行しているものと考えられた. 広島県内で検出されたSVの遺伝子型には地域による差は認められず, SG-I-aが主要型であった. 特に, 2001年以降はSG-I-aのみの検出であり, 全県的にもSG-I-aが広く分布していると考えられる. この傾向は国内の他地域においても同様で, 主要流行型はSG-I-aである[7]. このことからSG-I-aはわが国の主要流行型であることを示唆しているものと考えられる. また, スウェーデンにおいても遺伝子型Iが主要流行型となっており[11], 世界的にも遺伝子型Iが主流である可能性が高いと考えられる.

また, Okadaら[7]の分類に分類されなかった株も1株(SV371株)検出されたが, SG-I-aとの相同性が最も高いことから, SG-I-a近縁の株であると考えられた.

## ま と め

- 1 広島県内におけるSVの主要流行型は遺伝子型IのSG-I-aであり, 次いで遺伝子型IIのSG-II-aであったが, 2001年以降はSG-I-aのみの検出であった.
- 2 流行型に地域による差は認められなかった.
- 3 0から3歳での検出率が高く, 低年齢層のリスクが高いことが認められた.
- 4 12月の検出率が高かったが, 明確な月集積性は観察されなかった.

## 文 献

[1] 福田伸治, 宮崎佳都夫 (2003): 乳幼児感染性胃腸炎患者におけるNorwalk virus, Sapporo virusおよびHuman astrovirusの検出状況と流行型. 感染症誌, 77, 965-970.

[2] Chiba, S., Nakata, S., Numata-Kinoshita, K. and Honma, S. (2000) Sapporo virus: history and recent findings. J.

Infect.Dis., 181 (Suppl. 2), S303-308.

- [3] Hedlund, K. O., Rubilar-Abreu, E. and Svensson, L. (2000): Epidemiology of Calicivirus infection in Sweden, 1994-1998. J. Infect. Dis., 181 (Suppl. 2), S275-280.
- [4] Noel, J. S., Liu, B. L., Humphrey, C. D., Rodriguez E. M., Lambden, P. R., Clarke, I. N., Dwyer, D. M., Ando, T., Glass, R. I. and Monroe, S. S. (1997): Parkvill virus: a novel genetic variant of human calicivirus in the Sapporo virus clade, associated with an outbreak of gastroenteritis in adult. J. Med. Virol., 52, 173-178.
- [5] 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, 篠崎邦子, 石丸啓郎, 中野省三 (2000): 急性胃腸炎におけるSapporo virusの役割. 平成12年度愛媛衛環研年報, 3, 5-9.
- [6] Schffenecker, I., Ando, T., Thouvenot, D., Lina, B. and Aymard, M. (2001): Genetic classification of "Sapporo-like virus". Arch. Virol., 146, 2115-2132.
- [7] Okada, M., Shinozaki, K., Ogawa, T. and Kaiho, I. (2002): Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. Arch. Virol., 147, 1445-1451.
- [8] Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., 22, 4673-4680.
- [9] Vinjé, J., Deijl, H., Heide, R., Lewis, D., Hedlund, K-O., Svensson, L. and Koopmans, M.P. (2000): Molecular detection and epidemiology of Sapporo-like viruses. J. Clin. Microbiol., 38, 530-536.
- [10] Fukuda, S., Takao, S., Shimazu, Y. and Miyazaki, K.: An application of microplate hybridization assay for the confirmation and probe typing of "Norwalk-like viruses". Microbiol. Immunol., 46, 495-498.
- [11] Hedlund, K. O., Rubilar-Abreu, E. and Svensson, L. (2000): Epidemiology of Calicivirus infection in Sweden, 1994-1998. J. Infect. Dis., 181 (Suppl. 2), S275-280.
- [12] Nakata, S., Honma, S., Numata, K., Kogawa, K., Ukae, S., Morita, Y., Adachi, N. and Chiba, S. (2000): Members of the family *Caliciviridae* (Norwalk virus and Sapporo virus) are the most prevalent cause of gastroenteritis outbreaks among infants in Japan. J. Infect. Dis., 181, 2029-2032.