

資料

下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法
Ver. 2.1へのアップデート
—広島県の急性胃腸炎患者から検出されるエンテロウイルスの特徴—

重本 直樹, 谷澤 由枝

Updated version 2.1 of multiplex reverse transcription
PCR-based assays involving fluorescent dye-labeled primers
for detecting gastroenteritis viruses.
—Enterovirus detection and genetic characterization among patients
with acute gastroenteritis in Hiroshima prefecture, Japan.—

SHIGEMOTO Naoki and TANIZAWA Yukie

(Received : October 6, 2021)

我々が開発した下痢症ウイルスを対象とした蛍光マルチプレックスRT-PCR法 Ver. 2.0について、エンテロウイルスの検出系を加えるなどの修正を行い、アップデート版Ver. 2.1とした。

また、このVer. 2.1の検査系で過去の小児の感染性胃腸炎患者検体を用いてエンテロウイルスの廻り調査を行い、検出ウイルスの遺伝子型等を決定して、小児胃腸炎患者におけるエンテロウイルス感染実態について明らかにした。

Key words : 下痢症ウイルス, エンテロウイルス, 蛍光マルチプレックスRT-PCR法, 感染症発生動向調査事業

緒 言

小児下痢症の原因として多くのウイルスが関与していることが知られており、我々はこれらに対処するため、労力、時間、コストの観点から下痢症ウイルス検出用の蛍光マルチプレックスRT-PCR法[1-3]を開発し、サーベイランス検査、食中毒や集団胃腸炎の事案検査に利用している。前回アップデートの下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver. 2.0 [3]では、9種類のウイルス（ノロウイルスGI (NoV GI), ノロウイルスGII (NoV GII), サポウイルス (SaV), アストロウイルス (HAstV), アイチウイルス (AiV), パレコウイルス (HPeV), A群ロタウイルス (RVA), C群ロタウイルス (RVC), アデノウイルス (AdV))を3セットの反応系で検出することが可能であるが、NoV GI用のフォワードプライマーのミスマッチによりNoV GI.3が不検出になるなどの課題が生じた。また、小児の胃腸炎患者便検体を用いたウイルス培養では、しばしばエンテロウイルス (EV) が分離されることがあり、胃腸炎症状にどの程度EVが関与しているのか不明な部分も多

い。そこで、今回のアップデートでは、逆転写反応時間の短縮やNoV GI 検出プライマーの修正、EV検出プライマーの追加を行い、下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver. 2.1とした。また、このVer. 2.1で過去3年間の小児胃腸炎患者検体の廻り検査を行い、検出されたEVの遺伝子型を特定することで小児胃腸炎患者におけるEVの感染実態を把握し、その傾向について考察を行ったので報告する。

材料および方法

1 供試検体

今回、改良を加えた下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver. 2.1 (以下Ver. 2.1) のAセット、Bセットの評価には、それぞれ検体中のウイルスが判明している糞便68検体、67検体由来のcDNAを用いた。

EVの廻り調査には、感染症発生動向調査事業において広島県の医療機関より2016年から2018年までに搬入されてきた糞便281検体を用いた。

2 RNA抽出と逆転写反応

10%糞便乳剤からQIAamp Viral RNA mini Kit (キアゲン) によりRNA抽出を行った。抽出したRNAは使用まで-80℃で保管した。

逆転写反応は5×buffer 4 μl, 2 mM dNTPs 4 μl, 50 μM Random primer pd(N)₉ (タカラバイオ) 1 μl, RNase Inhibitor (40U/μl) (TOYOBO) 0.5 μl, ReverTra Ace (100U/μl) 1 μlを含む反応液に抽出RNA 9.5 μlを加え, 30℃/10分, 42℃/30分, 99℃/5分の反応を行った(表1)。なお, 従前の反応時間では42℃/60分であったが, 今回は半分の30分に変更した。RVA及びRVC検査用のcDNA合成の際には, 抽出RNAにDMSOを10%になるように加えた後, 97℃で5分処理後に氷冷したものを使用した。

3 蛍光マルチプレックスPCR Ver. 2.1

マルチプレックスPCR反応にはMultiplex PCR Assay Kit Ver. 2(タカラバイオ)を用い, 表2に示すプライマー[4-13]及び濃度の反応液48 μlにcDNAを2 μl加えた。PCR反応は, 94℃/1分の熱変性後, 94℃/30秒, 57℃/30秒, 72℃/30秒を40サイクル行い, 最後に72℃/10分の最終伸長を行った(表1)。

4 電気泳動

電気泳動には2%アガロースゲルを用い, PCR反応済みの液10 μlをアプライした。サイズマーカーには100bpラダー(GEヘルスケア)1.5 μlに1 μlのEzVISON(Amresco)を混合したものをを用いた。電気泳動後のゲルは, UVトランスイルミネーター上で増幅産物の蛍光バンドと増幅長を確認した後, エチジウムブロマイド染色を行って再度増幅産物の確認を行った。

5 エンテロウイルスの遺伝子型別

EV陽性検体のcDNAをテンプレートに, PCR試薬にTaKaRa Ex Taq Hot Start version(タカラバイオ)を使用し, 表3, 4のPCR条件, プライマー[14-18]を使用してNested-PCRを行った。増幅産物がシングルバンドの場合はQIAquick PCR Purification Kit(キアゲン)を, 複数バンドの場合は目的のバンドの切り出しを行い, QIAquick Gel Extraction Kit(キアゲン)を使用してPCR産物の精製を行った。その後, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)にてシーケンス反応を行い, Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)にて塩基配列を解読, 得られた塩基配列データをEnterovirus Genotyping Tool Version 0.1(<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/enterovirus/>)にて解析し, 遺伝子型を特定した。

結 果

1 蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver. 2.1の検証

下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver. 2.1ではVer. 2.0のAセットのNoV GI検出プライマーの修正とBセットの検出ウイルスの組み合わせを変更, 逆転写反応時間の短縮を行い, 図1に示すように, 10種類のウイルスを5色の蛍光とそれぞれの増幅産物の長さで区別することができるようになった。特に今回改良を加えたVer. 2.1のAセットとBセットについては, 検体中に含まれるウイルスが明らかな既知検体を用いて検証を行ったところ, 表5に示すようにVer. 2.1のAセット, Bセットとも検出対象ウイルスを検出できることが確認できた。特にVer. 2.1のAセットでは, NoV GIのG1SKFプライマーのミスマッチによりコンベンショナ

表1 蛍光マルチプレックスRT-PCR Ver. 2.0とVer. 2.1の比較

反応工程	反応条件	蛍光マルチプレックスRT-PCR Ver. 2.0	蛍光マルチプレックスRT-PCR Ver. 2.1
逆転写	試薬	ReverTra Ace (TOYOBO)	同左
	反応時間	30℃/10min→42℃/60min→99℃/5 min	30℃/10min→42℃/30min→99℃/5 min
PCR	試薬	Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2 (タカラバイオ)	同左
	反応時間	94℃/60sec→(94℃/30sec・57℃/30sec・72℃/30sec)×40→72℃/10min	同左
プライマー セットA	NoV GI	G1SKF/G1SKR	NoV GI G1SKFm/G1SKR
	NoV GII	G2SKF/G2SKR, G2ALSKR	NoV GII G2SKF/G2SKR, G2ALSKR
	SaV	SV-F21m1, SV-F21m2/SV-R2	SaV SV-F21m1, SV-F21m2/SV-R2
	HAstV	AC1'/AC230	HAstV AC1'/AC230
プライマー セットB	AiV	C(+)/6261/C(-)/6779	AiV C(+)/6261/C(-)/6779
	AdV	Ad-Aml/Ad-A2	AdV Ad-Aml/Ad-A2
	HPeV	AN345/AN344	HPeV AN345/AN344
			EV EV-Fm/EV-Rm
プライマー セットC	RVA	RotaA-fwd1, RotaA-fwd2/RotaA rev1, RotaA rev2	RVA RotaA-fwd1, RotaA-fwd2/RotaA rev1, RotaA rev2
	RVC	G8NS1/G8NA2	RVC G8NS1/G8NA2

表2 蛍光マルチプレックスRT-PCR Ver. 2.1 使用プライマー

プライマーセット	検出対象	プライマー	Sequence (5'-3')	標識蛍光	濃度 (μM)	増幅産物 (bp)	出典	出典	
A	NoV G I	G1SKFm	CTGCCGAWTWYGTAAATGA	Alexa488 (緑)	0.4	330	[4]	Kojima <i>et al.</i> (2002) (slightly modified)	
		G1SKR	CCAAACCCARCCATRTACA		0.4		(slightly modified)		
	NoV G II	G2SKF	CNTGGAGGGCGATCGCAA	Alexa594 (赤)	0.4	344	[4]	Kojima <i>et al.</i> (2002)	
		G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT		0.4		[5]	Nishida <i>et al.</i> (2007)	
		G2ALSKR	CCACCAGCATATGAAATTGTACAT		0.2		[6]	Okada <i>et al.</i> (2002) (slightly modified)	
		SV-F21m1	CAAAWTAGTGTGGARATGGAGGG		0.2	435	[6]		
	SaV	SV-F21m2	GCTATTAGTGTGGARATGGAGGG		0.2		(slightly modified)		
		SV-R2	GWGGRTCAACMCCWGGTGG	Alexa532 (黄)	0.2				
	HAstV	ACI'	ATGGCTAGCAAGTCTGACAAG	Alexa350 (青)	0.2	230	[7]	Sakon <i>et al.</i> (2000)	
		AC230	GGTTTTGGTCCCTGTGACACC		0.2				
B	AiV	C(+)-6261	ACACTCCCACCTCCCGCCAGTA	Alexa488 (緑)	0.4	519	[8]	Yamashita <i>et al.</i> (2000)	
		C(-)-6779	GGAAGAGCTGGGTGTCAAGA		0.4				
	HPeV	AN345	GTAACASWWGCCCTCTGGGCCAAAAG		0.4	195	[9]	Nix <i>et al.</i> (2008)	
		AN344	GGCCCCWGRTCAGATCCAYAGT	Alexa594 (赤)	0.4				
	AdV	Ad-A1m	GCCGCARTGGTCTTACATGCACATC	Alexa546 (橙)	0.2	300	[10]	Allard <i>et al.</i> (1992) (slightly modified)	
		Ad-A2	CAGCACGCCGGGATGTCAAAGT		0.2				
	EV	EV-Fm	GCCCCTGAATCGGGCTAATC	Alexa532 (黄)	0.4	148	[11]	McLeish <i>et al.</i> (2012) (slightly modified)	
		EV-Rm	ATTGTCACCATWAGCAGYCA		0.4		(slightly modified)	Logan <i>et al.</i> (2006)	
	C	RVA	RotaA-fwd1	GGATGTCTGTACTCCTTGTCAAAA	Alexa488 (緑)	0.4	145	[12]	
			RotaA-fwd2	GGAGGTTCTGTACTCATTTGTCAAAAA	Alexa488 (緑)	0.4			
RotaA-rev1		TCCAGTTTGGAACTCATTTCCA		0.4					
RotaA-rev2		TCCAGTTTGGAAAGTCATTTCCATT		0.4					
RVC	G8NS1	ATTATGCACAGACTATCGCCAC	Alexa594 (赤)	0.4	351	[13]	葛谷ら (2003)		
	G8NA2	GTTTCTGTACTAGCTGGTGAAC		0.4					

表3 エンテロウイルスの型別PCR反応条件

増幅領域	反応条件		
VP1	1st PCR	反応時間 94℃/3 min→(95℃/30sec・42℃/30sec・72℃/45sec)×40→72℃/5 min	
		プライマー 244 (終濃度0.3μM) 222 (終濃度0.3μM)	
	2nd PCR	反応時間 94℃/60sec→(95℃/30sec・60℃/30sec・72℃/30sec)×40→72℃/5 min	
		プライマー AN89 (終濃度0.3μM) AN88 (終濃度0.3μM)	
VP1	1st PCR	反応時間 94℃/2 min→(94℃/30sec・50℃/30sec・72℃/1 min)×45→72℃/5 min	
		プライマー 187 (終濃度0.4μM) 188 (終濃度0.4μM) 189 (終濃度0.4μM) 011 (終濃度0.4μM)	
		2nd PCR	反応時間 94℃/3 min→(95℃/30sec・60℃/30sec・72℃/30sec)×40→72℃/5 min
			プライマー AN89 (終濃度0.3μM) AN88 (終濃度0.3μM)
	NTR-VP2	1st PCR	反応時間 94℃/2 min→(94℃/30sec・50℃/30sec・72℃/1 min)×40→72℃/7 min
			プライマー OL68-1 (終濃度0.4μM) EVP2 (終濃度0.4μM)
NTR-VP2	2nd PCR	反応時間 94℃/2 min→(94℃/30sec・50℃/30sec・72℃/1 min)×40→72℃/7 min	
		プライマー OL68-1 (終濃度0.4μM) EVP4 (終濃度0.4μM)	

表4 エンテロウイルス遺伝子型別PCR用プライマー

プライマー	Sequence (5'-3')	出典
224	GCIATGYTIGGIACICAYRT	[14]
222	CICIGGIGGIAYRWACAT	
AN89	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACA	
187	ACIGCIGYIGARACIGGNCA	[15]
188	ACIGCIGTIGARACIGGNG	
189	CARGCIGCIGARACIGGNGC	
O11	GCICIGAYTGITGICCAA	
EVP2	CCTCCGGCCCCCTGAATGCGGCTAAT	[16]
EVP4	CTACTTTGGGTGTCCGTGTT	[17]
OL68-1	GGTAAAYTCCACCACCANCC	[18]

ルPCRでは検出できなかったNoV G I.3も問題なく検出することができた。

2 エンテロウイルスの廻り調査 (2016-2018)

2016年1月から2018年12月までに感染症発生動向調査事業において当センターに搬入されてきた小児の胃腸炎患者の糞便281検体について、Ver. 2.1のBセットによる廻り検査を実施した。281検体中34検体からEVが検出された。今回検出されたEVと他の胃腸炎ウイルスとの月別の検出状況を表6に示した。検出ウイルスで最も多く検出されたウイルスはNoV G IIで全体の24.2%であった。以下、RVAが12.8%、EVが11.7%、AdVが9.6%、SaVが8.9%、HPeVが5.3%、HAstVが4.3%、NoV G Iが0.4%であった。月別の流行状況は、NoV G IIが冬季(11-12月)、RVAが春先(2-3月)に明確なピークがあるのに対し、EVは明確なピークはないが、初夏と冬

季(6月、11-12月)にやや多く検出されていた。また、EVが検出された34検体について、うち19検体が他の胃腸炎関連ウイルスとの複合感染であり、15検体がEV単独感染であった(表7)。検出されたEVの遺伝子型はA群とB群に属するEVで、A群が4種(CV-A2, CV-A4, CV-A10, EV-A71)、B群が8種(E-6, E11, E-25, CV-A9, CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5)であった。

考 察

現行の下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver. 2.0の改良を行い、Ver. 2.1とした。主な改良点は、逆転写反応時間の短縮、NoV G I検出用フォワードプライマーの改良、EV検出プライマーの追加である。

逆転写における反応時間の短縮では、従来の42℃/60

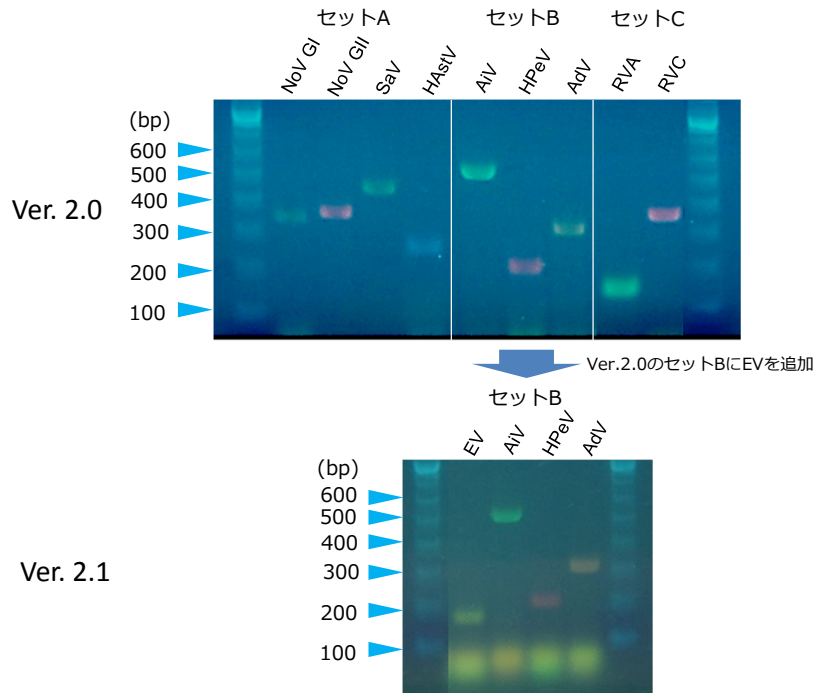


図1 蛍光マルチプレックスRT-PCR Ver. 2.0からVer. 2.1の変更点

分から42℃/30分へ変更しても、合成されるcDNAの量には差がなく、検出結果への影響はなかった（データ略）ことから、Ver. 2.1ではVer. 2.0と比べ逆転写反応を30分短縮することができた。

NoV GI.3に対するG1SKFプライマーのミスマッチによる不検出対策では、ミスマッチ部位の2塩基をミックススペースに変更した新しいプライマー-G1SKFmを設計した（図2）。また、蛍光標識をフォワードプライマーからリバースプライマーのG1SKRへ変更し、Aセットに加えて評価を行ったところ、コンベンショナルPCRでは不検出であったNoV GI.3が検出可能になると共に、Aセット検出対象の他のウイルスもこれまで通りに検出できることが確認できた（表5）。

Ver. 2.0のBセットに加えるEV検出プライマー配列は、他のウイルスの増幅長や標識蛍光を考慮した結果、McLeishらの報告 [11] にあるリアルタイムPCR用のプライマー配列を基に、このプライマー領域にミスマッチのあるEVの各遺伝子型の配列を考慮して設計した（図3）。日本国内において検出の可能性の低いポリオウイルス3型（Po3）や、対象外のライノウイルス（Rhino）に対しては、プライマーの3'端にミスマッチを残し、非対応とした。既知ウイルスを含む検体を用いたVer. 2.1のBセットの評価では、表5の通り検出されるべきウイルスが検出され、良好な結果が得られた。BセットではAiVも検出対象であるが、適当な臨床検体がなかったため、過去の患者の糞便検体から合成したcDNAで検出を試みたが、問題なく検出でき、Bセットで対象とするウ

イルスの検出が可能であると判断した。

EVの検出割合はNoV GII、RVAに次いで多く、11.7%の検出率であった。NoV GIIやRVAのように明確な季節性は認められなかったが、検体採取時期の近い検体において、同じ遺伝子型のEVが検出される傾向があり（表7）、一定期間に様々なEVが小児の間で流行しているように見受けられた。また、EVが検出された患者からは半数以上（19/34）で他の胃腸炎ウイルスも検出されているが、EV単独感染の例（15/34）もあることから、EVが少なくとも胃腸炎症状に関与しているものと考えられた。検出遺伝子型は多様で、無菌性髄膜炎（CV-A9, CV-B5）、手足口病（EV-A71）、ヘルパンギーナ（CV-A2）、上気道炎（CV-A2, CV-A9, EV-A71）、下気道炎（CV-A2）に関与すると言われているEVも今回の調査で検出された。これら遺伝子型のEVの症状を深く理解するためには、今後さらに多くの検体について詳細な調査が必要と思われる。

小児の胃腸炎患者におけるEVの調査については先行報告がいくつかあるが、それらのデータを今回の我々のデータと比較した（表8）。基本的には当方の調査で検出された遺伝子型のEVは、先行報告2例でも検出されている遺伝子型であり、特にPhamらの報告 [19] とは同じ日本国内であることから同様な結果であった。Kumthipらの報告 [20] はタイでの調査であり、我々やPhamらとは異なり、ポリオウイルス（PV-1~3）を含むC群のEVが検出され、その国の事情が反映されているものと考えられた。

表5 蛍光マルチプレックスPCR ver. 2.1の検証結果

検体番号	Ver. 2.1 Aセット		検体番号	Ver. 2.1 Bセット	
	含有ウイルス	検出結果		含有ウイルス	検出結果
既-1	SaV	SaV	既-69	陰性	陰性
既-2	陰性	陰性	既-70	NoV G II	陰性
既-3	NoV G I *	NoV G I	既-71	AdV(41)	AdV
既-4	NoV G I *	NoV G I	既-72	陰性	陰性
既-5	NoV G I *	NoV G I	既-73	NoV G II, AdV(2)	AdV
既-6	NoV G I *	NoV G I	既-74	陰性	陰性
既-7	RVA	陰性	既-75	SaV	陰性
既-8	陰性	陰性	既-76	NoV G II, EV	EV
既-9	陰性	陰性	既-77	陰性	陰性
既-10	陰性	陰性	既-78	陰性	陰性
既-11	陰性	陰性	既-79	陰性	陰性
既-12	陰性	陰性	既-80	NoV G II, EV	EV
既-13	陰性	陰性	既-81	陰性	陰性
既-14	陰性	陰性	既-82	陰性	陰性
既-15	陰性	陰性	既-83	陰性	陰性
既-16	陰性	陰性	既-84	陰性	陰性
既-17	陰性	陰性	既-85	HPeV	HPeV
既-18	陰性	陰性	既-86	AdV(41)	AdV
既-19	陰性	陰性	既-87	陰性	陰性
既-20	RVA	陰性	既-88	HRV	陰性
既-21	陰性	陰性	既-89	HAstV	陰性
既-22	NoV G I *	NoV G I	既-90	陰性	陰性
既-23	陰性	陰性	既-91	陰性	陰性
既-24	陰性	陰性	既-92	AdV	AdV
既-25	陰性	陰性	既-93	NoV G II	陰性
既-26	RVA	陰性	既-94	EV	EV
既-27	NoV G II	NoV G II	既-95	NoV G II	陰性
既-28	陰性	陰性	既-96	NoV G II, EV	EV
既-29	陰性	陰性	既-97	NoV G II	陰性
既-30	陰性	陰性	既-98	NoV G II	陰性
既-31	陰性	陰性	既-99	陰性	陰性
既-32	陰性	陰性	既-100	AdV(41)	AdV
既-33	陰性	陰性	既-101	NoV G II	陰性
既-34	陰性	陰性	既-102	SaV	陰性
既-35	NoV G II	NoV G II	既-103	AdV(41)	AdV
既-36	陰性	陰性	既-104	AdV	AdV
既-37	陰性	陰性	既-105	HAstV	陰性
既-38	陰性	陰性	既-106	陰性	陰性
既-39	陰性	陰性	既-107	NoV G II	陰性
既-40	陰性	陰性	既-108	AdV(41)	AdV
既-41	NoV G II	NoV G II	既-109	NoV G II, HAstV	陰性
既-42	陰性	陰性	既-110	NoV G II	陰性
既-43	AdV(41)	陰性	既-111	陰性	陰性
既-44	NoV G II	NoV G II	既-112	陰性	陰性
既-45	陰性	陰性	既-113	AdV	AdV
既-46	NoV G II	NoV G II	既-114	RVA	陰性
既-47	NoV G II	NoV G II	既-115	陰性	陰性
既-48	陰性	陰性	既-116	RVA	陰性
既-49	陰性	陰性	既-117	NoV G II	陰性
既-50	NoV G II	NoV G II	既-118	RVA	陰性
既-51	NoV G II	NoV G II	既-119	RVA	陰性
既-52	NoV G II	NoV G II	既-120	NoV G I, SaV	陰性
既-53	陰性	陰性	既-121	NoV G II	陰性
既-54	陰性	陰性	既-122	SaV, RVA, EV	EV
既-55	NoV G II	NoV G II	既-123	RVA	陰性
既-56	陰性	陰性	既-124	AdV, RVA	AdV
既-57	NoV G II	NoV G II	既-125	RVA, EV	EV
既-58	NoV G II	NoV G II	既-126	RVA	陰性
既-59	NoV G II	NoV G II	既-127	陰性	陰性
既-60	陰性	陰性	既-128	NoV G II	陰性
既-61	RVA	陰性	既-129	AdV, RVA	AdV
既-62	RVA	陰性	既-130	AdV(41)	AdV
既-63	RVA	陰性	既-131	陰性	陰性
既-64	RVA	陰性	既-132	RVA	陰性
既-65	AstV	AstV	既-133	RVA	陰性
既-66	SaV	SaV	既-134	RVA	陰性
既-67	SaV, AstV	SaV, AstV	既-135	RVA	陰性
既-68	SaV	SaV			

* G1SKF/G1SKRのコンベンショナルPCRでは不検出のG I.3

表6 月別のウイルス検出状況

	NoVG I	NoVG II	SaV	HAstV	HPeV	AdV	EV	RVA
1月	0	4	0	0	0	1	1	2
2月	1	5	2	1	0	3	2	13
3月	0	3	7	1	0	1	2	13
4月	0	3	1	1	0	2	0	5
5月	0	5	1	0	1	2	1	0
6月	0	3	1	0	0	1	5	2
7月	0	4	1	0	1	4	3	0
8月	0	5	0	0	2	1	3	0
9月	0	4	1	1	5	1	2	1
10月	0	0	2	1	2	1	2	0
11月	0	17	5	3	3	6	6	0
12月	0	15	4	4	1	4	6	0
合計	1	68	25	12	15	27	33	36
(検出率)	0.4%	24.2%	8.9%	4.3%	5.3%	9.6%	11.7%	12.8%

表7 小児胃腸炎患者から検出されたエンテロウイルスの概要

Sample No.	検体採取日	検出ウイルス	EV遺伝子型
1645	2016/ 1/ 8	NoVG2, AdV6, EV	EV-B (CV-A9)
1669	3/17	EV	EV-B (CV-B4)
1675	5/30	EV	EV-A (CV-A4)
1681	7/26	AdV, EV	EV-B (CV-B5)
1687	8/22	NoVG2, EV	EV-B (CV-B5)
1693	9/ 6	AdV2, HPeV, EV	EV-B (CV-B5)
1694	7/22	EV	型不明
1717	10/28	EV	型不明
1722	11/17	NoVG2, EV	EV-A (CV-A2)
1729	11/11	NoVG2, EV	EV-B (CV-B2)
1731	11/22	NoVG2, EV	EV-A (CV-A10)
1735	11/26	AdV41, EV	EV-B (CV-B3)
1736	12/ 2	SaV, EV	EV-A (CV-A2)
1737	12/ 2	NoVG2, EV	EV-B (E-6)
1756	2017/ 3/23	EV	EV-A (CV-A2)
1784	6/30	NoVG2, EV	型不明
1792	8/ 5	NoVG2, EV	型不明
1796	9/ 5	NoVG2, EV	EV-A (CV-A10)
1810	11/21	EV	EV-B (E-25)
1812	11/29	NoVG2, EV	EV-A (CV-A10)
1838	2018/2/19	SaV, RVA, EV	型不明
1841	2/19	RVA, EV	型不明
1877	6/ 4	EV	EV-A (CV-A2)
1881	6/29	SaV, EV	EV-A (CV-A2)
1882	6/30	EV	EV-A (EV-A71)
1884	7/10	EV	EV-A (EV-A71)
1886	6/ 7	EV	EV-B (CV-A9)
1889	8/27	EV	EV-B (CV-A9)
1894	10/ 1	EV	EV-B (CV-A9)
1906	11/28	SaV, EV	EV-B (E11)
1907	12/ 3	EV	EV-B (E11)
1908	12/ 4	EV	EV-B (E11)
1914	12/17	HAstV, AdV, EV	EV-A (CV-A4)
1916	12/22	EV	EV-A (CV-A4)

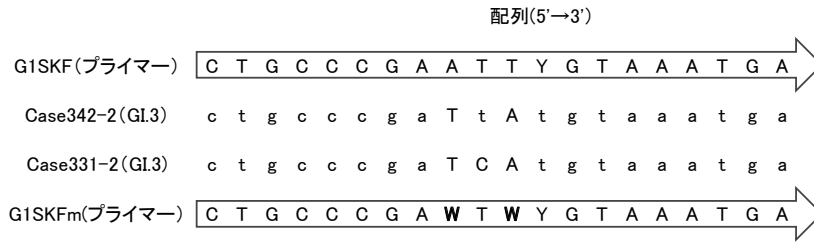


図2 NoV GIのフォワードプライマー領域の塩基配列情報

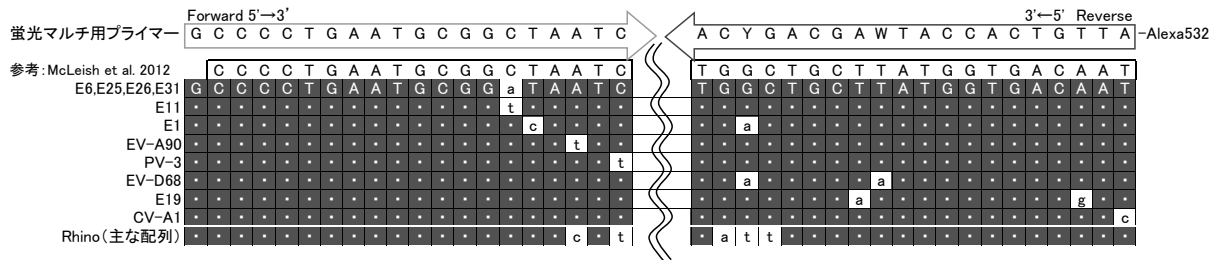


図3 エンテロウイルス検出用のプライマーの設定領域 (NTR領域)

表8 小児胃腸炎患者から検出されたEV遺伝子型の地域間差

遺伝子型		This Study	Pham et al. 2018	Kumthip et al. 2017
		Japan (Hiroshima Pref.) 2016 Jan. - 2018 Dec.	Japan 2014 Jun. - 2016 Jun.	Thailand 2010 Jan. - 2014 Dec.
EV-A	CV-A2	5	4	3
	CV-A4	3	8	1
	CV-A5		6	
	CV-A6		3	1
	CV-A10	3	4	2
	CV-A16		5	1
	EV-A71	2		1
EV-B	E-2			1
	E-3		2	
	E-6	1		
	E-9		2	
	E-11	3	1	2
	E-14			3
	E-15			4
	E-18		3	
	E-21			1
	E-25	1	1	
	E-30		4	2
	CV-A9	4	4	1
	CV-B1			1
	CV-B2	1		
	CV-B3	1	2	3
CV-B4	1	5	4	
CV-B5	3	7		
EV-B88			1	
EV-C	CV-A13			3
	CV-A19			1
	CV-A20			1
	CV-A22			1
	CV-A24			8
	EV-C96			8
	EV-C99			1
	EV-C116			1
EV-D	PV-1			2
	PV-2			3
	PV-3			4
EV-D	EV-D68		1	
Total		28	62	65

以上のことから、小児の胃腸炎患者からは11%程度の頻度で多様なEVが検出され、半数以上は他の胃腸炎関連ウイルスとの混合感染であるものの、単独感染事例もあることから、胃腸炎の要因ウイルスとしても否定できない。今後は、アップデートした蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver. 2.1を活用し、継続的な検査を実施することで、年毎の流行性や遺伝子型の頻度等の追跡調査を行っていく必要があると思われる。

文 献

- [1] Shigemoto N, Fukuda S, Tanizawa Y, Kuwayama M, Ohara S, Seno M. (2011): Detection of norovirus, sapovirus, and human astrovirus in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers. *Microbiol Immunol.* 55: 369-372.
- [2] Shigemoto N, Hisatsune Y, Toukubo Y, Tanizawa Y, Shimazu Y, Takao S, Tanaka T, Noda M, Fukuda S. (2017): Detection of gastroenteritis viruses among pediatric patients in Hiroshima prefecture, Japan, between 2006 and 2013 using multiplex reverse transcription PCR-based assays involving fluorescent dye-labeled primers. *J Virol Methods.* 89: 791-800.
- [3] 重本直樹, 久常有里, 谷澤由枝. (2017): 下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法のアップデートVer. 2.0. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 25: 1-8.
- [4] Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K. (2002): Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods.* 100: 107-114.
- [5] Nishida T, Nishio O, Kato M, Chuma T, Kato H, Iwata H, Kimura H. (200): Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol Immunol.* 51: 177-184.
- [6] Okada M, Shinozaki K, Ogawa T, Kaiho I. (2002): Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. *Arch Virol.* 147: 1445-1451.
- [7] Sakon N, Yamazaki K, Utagawa E, Okuno Y, Oishi I. (2000): Genomic characterization of human astrovirus type 6 katano virus and the establishment of a rapid and effective reverse transcription-polymerase chain reaction to detect all serotypes of human astrovirus. *J Med Virol.* 61: 125-131.
- [8] Yamashita T, Sugiyama M, Tsuzuki H, Sakae K, Suzuki Y, Miyazaki Y. (2000): Application of a reverse transcription-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the picornavirus family associated with gastroenteritis in humans. *J Clin Microbiol.* 38: 2955-2961.
- [9] Nix WA, Maher K, Johansson ES, Niklasson B, Lindberg AM, Pallansch MA, Oberste MS. (2008): Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 46: 2519-2524.
- [10] Allard A, Albinsson B, Wadell G. (1992): Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 37: 149-157.
- [11] McLeish NJ, Wittevelde J, Clasper L, McIntyre C, McWilliam Leitch EC, Hardie A, Bennett S, Gunson R, Carman WF, Feeney SA, et al. (2012): Development and assay of RNA transcripts of enterovirus species A to D, rhinovirus species A to C, and human parechovirus: assessment of assay sensitivity and specificity of real-time screening and typing methods. *J Clin Microbiol.* 50: 2910-2917.
- [12] Logan C, O'Leary JJ, O'Sullivan N. (2006): Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clin Microbiol.* 44: 3189-3195.
- [13] 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉 肇. (2003): 教育研修施設で発生したヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例. *感染症学雑誌.* 77: 53-59.
- [14] Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. (2006): Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 44: 2698-2704.
- [15] Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. (2000): Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol.* 38: 1170-1174.
- [16] Rotbart HA. (1990): Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. *J Clin Microbiol.* 28: 438-442.
- [17] Ishiko H, Shimada Y, Yonaha M, Hashimoto

- O, Hayashi A, Takeda N. (2002): Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. *J Infect Dis.* 185: 744-754.
- [18] Olive DM, Al-Mufti S, Al-Mulla W, Khan MA, Pasca A, Stanway G, Al-Nakib W. (1990): Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. *J Gen Virol.* 71: 2141-2147.
- [19] Pham NTK, Thongprachum A, Trinh QD, Okitsu S, Komine-Aizawa S, Shimizu H, Hayakawa S, Ushijima H. (2018): Detection and genetic characterization of enterovirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan during 2014-2016. *Infect Genet Evol.* 61: 16-19.
- [20] Kumthip K, Khamrin P, Ushijima H, Maneekarn N. (2017): Multiple enterovirus genotypes circulating in children hospitalized with acute gastroenteritis in Thailand. *Infect Genet Evol.* 55: 324-331.