

# RNA電気泳動型からみたロタウイルスの流行について

山西重機・三木一男・山本忠雄

## I はじめに

例年のごとく冬期になると流行を繰り返し多発する乳児嘔吐下痢症の原因ウイルスのロタウイルスは、培養増殖によって分類同定する以外の方法として、ELISA法、R-PHA法、電子顕微鏡法など種々の抗原検出方法<sup>1)</sup>が報告されている。しかしこのウイルスの核酸は、11分節の2本鎖RNAからなり、ポリアクリルアミド電気泳動法による移動度が地域によって、また年度によって大きく変化することが知られている<sup>2)</sup>。また群分類としてA B C Dに分かれ、ヒトや動物ロタウイルスはA群に属し、国内ではこの群のみの流行が確認されていたが、最近になってA群とは抗原交叉のないC群ロタウイルスの存在が大瀬戸ら<sup>3)</sup>によって報告された。このウイルスは培養が困難なため、確認方法としては電気泳動法によるRNAの検出によってのみである。そこで我々は、このRNA電気泳動型による流行パターンの解析とC群ロタウイルスの確認のために乳児嘔吐下痢症患者のウイルス検索を従来方法に併せて、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法をおこなったのでその概要について報告する。

## II 材料と方法

1. 分離材料の糞便は、香川県感染症サーベイランス定点を受診した下痢症患者から採取し送付を受けたもの

で、検体の処理、電子顕微鏡法、ELISA法などはさきに報告<sup>1)</sup>したとおりである。

2. ロタウイルスRNAの電気泳動法：RNAの抽出はEspejoら<sup>4)</sup>の変法によりおこない、10%ポリアクリルアミドSDSスラブゲルでLaemmli法<sup>5)</sup>により、10mA、17時間泳動後、銀染色液（和光純薬）を用いて染色し、ゲル乾燥をおこなった。
3. A群ロタウイルスの血清型別は、糞便から直接抽出したロタウイルス抗原をモノクローナル抗体を用いたELISA法<sup>6)</sup>による分類同定を国立大阪病院の赤谷、池上先生にお願いした。

## III 結 果

### 1 週別ロタウイルスの分離状況について

図1に示したのは、1987～1988年流行年における乳児

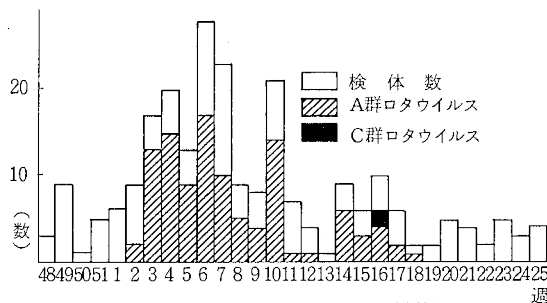


図1 週別ロタウイルスの分離状況

表1 A群ロタウイルスの血清型別

週	日	血 清 型 別				型別不能
		1 型	2 型	3 型	4 型	
1	1. 3 ~ 1. 9		1			
2	1. 10 ~ 1. 16	4			1	
3	1. 17 ~ 1. 23	6	1			1
4	1. 24 ~ 1. 30	11	3		1	
5	1. 31 ~ 2. 6	3			3	1
6	2. 7 ~ 2. 13	12			1	1
7	2. 14 ~ 2. 20	4	1		2	1
8	2. 21 ~ 2. 27	3				
9	2. 28 ~ 3. 5	6	1			2
10	3. 6 ~ 3. 12	8	1		1	1
11	3. 13 ~ 3. 19	1				
計	1. 3 ~ 3. 19	58	10	0	9	7

嘔吐下痢症患者からのロタウイルスの分離状況で週別に区分した。白地が材料数、斜緑地がA群ロタウイルスの分離数、黒地がC群ロタウイルス分離数である。今冬におけるロタウイルスの検出は、例年(11月)にくらべると、おそく1月13日に最初が分離され、それ以降の分離数も少ない傾向にあったが第3週から第10週頃がピークで、全体で109株が検出された。また流行が終る頃に2株であるがC群ロタウイルスが電気泳動型によって確認された。

## 2 週別A群ロタウイルスの血清型別について

モノクローナル抗体を用いたELISA法によって、他法でロタウイルスが確認できた84株について、血清型別をおこない表1の結果を得た。1型58株69.0%、2型10株11.9%、4型9株10.7%であり、3型は今冬流行年では検出できなかった。また型別できなかった株は、血清型を決定する外層抗原の脱落もしくは量の少ないために決定不能となったものである。各型の週別の流行パターンに特徴はみられなかった。

## 3 A群ロタウイルスとC群ロタウイルスの電気泳動型

図2は県下で検出できたロタウイルスのRNAの移動度による分類を模式図で示した。A~Cタイプの3例はA群S型で、D~Mタイプの10例はA群L型で、Nタイプは1例であるがC群ロタウイルスである。

RNA移動度でみると1~4分節はほぼ安定しているが、5~6分節の間隔と7, 8, 9分節の違いがあり、10, 11分節は、S型L型と2つに分類でき、このためA~Nの14タイプに分類できた。またA群L型は、5, 6分節のちがいで2つに区分でき、7, 8, 9分節の違いは複雑である。

NタイプはA群と抗原交叉のないC群ロタウイルスで各分節に相違点がみられ、7, 10, 11分節が大きく異なっている。

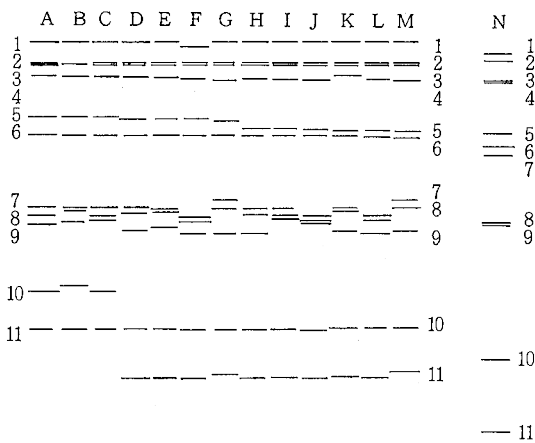


図2 A群ロタウイルスとC群ロタウイルスの電気泳動型

## 4 1987~1988年流行年における電気泳動型

写真1は、ヒトロタウイルスのRNA電気泳動型を示したもので、1075, 1098がC群ロタウイルスで、0179~0866の4例はA群ロタウイルス血清型1型で、0204~0104の3例はA群ロタウイルス血清型4型、0103~0001の4例はA群ロタウイルスS型で血清型2型である。RNAの移動度による今回のタイプ分類では、N, N, G, H, E, K, I, I, I, A, C, A, Bタイプに分類した。

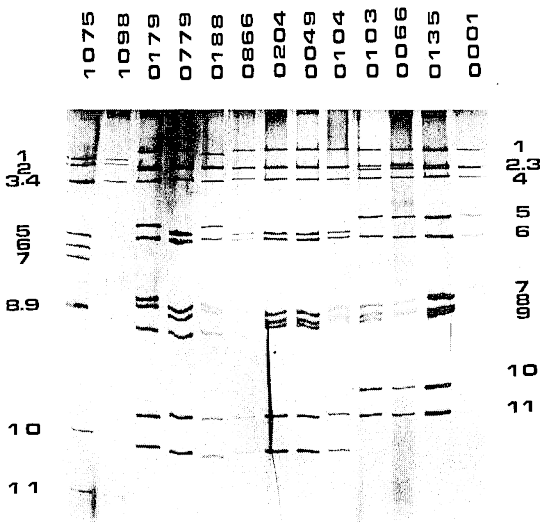


写真1 ヒトロタウイルスの電気泳動型(A群-L型, S型)(C群) 1987~1988流行年

## 5 1986~1987年流行年における電気泳動型

写真2は、ヒトロタウイルスのRNA電気泳動型を示したもので、標準株として血清型1型のWa株、血清型2型のS2型、血清型3型のY0型、血清型4型のHochi型の移動度を示した。検査材料からのロタウイルスのタイプ分類では、5, 6分節のせまいIタイプと広いGタイプがみられた。

## 6 1985~1986年流行年における電気泳動型

写真3は、ヒトロタウイルスのRNA電気泳動型を示したもので、L型の5, 6分節の幅のちがいで写真1, 写真2で示したケースの中間の位置の株がみられた。またウシロタウイルス(BRV) Lincoln株の移動度をみたが、これと同じパターンの検体がみられた。

## 7 各流行年区分による各タイプの泳動型の分布

表2に示したように1987~1988年流行年に分離した92株についてRNA移動度をみるとA群S型3タイプ, A群L型10タイプ, C群1タイプに分類できた。最も多くを占めたのは、Hタイプ43株47.7%, Dタイプ11株11.9%, Cタイプ株7.7%であり、また1986~1987年流行年の34株についてみるとIタイプ12株35.2%と多く、1985

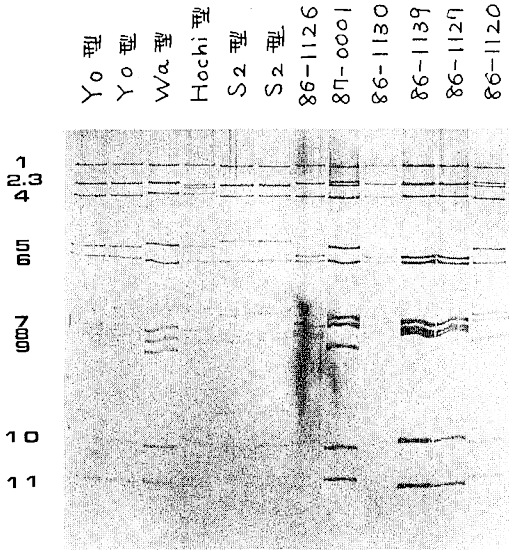


写真2 ヒトロタウイルスの電気泳動型(A群-L群, S型) 1986~1987流行年

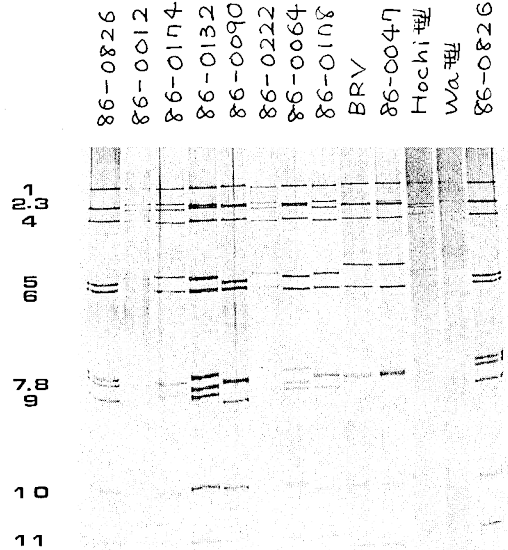


写真3 ヒトロタウイルスの電気泳動型 1985~1986流行年

表2 各年流行区分による泳動型について

群別	泳動型	流行区分		
		1987~1988	1986~1987	1985~1986
A群S型	A	4	1	
	B	2		
	C	7	5	
A群L型	D	11	3	
	E	2		5
	F	2		2
	G	3	4	1
	H	43	3	3
	I	5	12	4
	J	4	4	
	K	2		1
	L	2	2	4
M	3			
C群	N	2		
合計		92	34	20

~1986年流行年は20株と例数は少ないが7つのタイプに分類できほぼ平均であり、S型はみられなかった。

#### 8 C群ロタウイルス分離患者の状況

1987~1988年流行年で流行末期の4月18日、4月22日に採取した下痢症患者の糞便から、2株のC群ロタウイルスが確認された。状況については表3に示した。

表3 C群ロタウイルス分離患者の状況

No.	採取日	発病日	病名	性別	年齢	住所
88-1075	63.4.18	63.4.15	感冒性消化不良症	男	1歳1ヶ月	高松市
88-1098	63.4.22	63.4.17	急性胃腸炎	男	7歳3ヶ月	高松市

## IV 考 察

1987~1988流行年における県下の乳児嘔吐下痢症患者からのロタウイルスの分離は、例年<sup>7)</sup>に較べると遅く、1月13日に始めて分離できたが患者数も少くそれ以降低率であるが第18週(5月6日)まで分離可能で総計109株であった。このうち群分類でそのほとんどはA群ロタウイルスであったが、流行終息時の第16週になって2株のC群ロタウイルスが始めて確認できた。またA群ロタウイルス84株についてモノクローナル抗体を用いたELISA法で抗原タイピングをおこない、4~5種とされている血清型を糞便から直接抽出した抗原で検討した。その結果、1型58株69.0%、2型10株11.9%、4型9株10.7%で3型は検出できなかった。また型別できない抗原が7株あったが、血清型は外層カプシッドの糖蛋白VP7(8,9分節)VP3(4分節)にあるため外層部分の壊れた粒子などのためと考える。この血清型分布は、赤谷ら<sup>8)</sup>は1986~1987流行年、大阪市内の違った地域でも主流となる血清型また出現しない血清型が異なることで検出される血清型の頻度には、せまい範囲でも地域差が存在することを報告している。また全国調査をおこなった浦沢ら<sup>9)</sup>は、1986~1987流行年、1987~1988流行年に札幌、秋田、富山、岐阜、千葉、大阪、松山で各血清

型を比較しているが血清型の分布割合には、地域差が認められ、また年度によっても異なっていると報告している。このなかで近接している松山地域と比較すると今流行期の主流は2型が占め、ついで1型、そして少数の3型であり、4型は検出されないことで県下の分布パターンとは異なり、地域差のあることが明確となった。

ロタウイルスは、11分節からなる二重鎖RNAであり、そのためSDS-ポリアクリルアミド電気泳動では、株によって移動度が異なり、細分別でできることから疫学に応用できることに着目し、1987～1988流行年で分離ロタウイルス全てについて泳動を実施した。

11分節中1～4分節は各株はほぼ一定であり、10、11分節は大きく安定した2タイプのEspejo<sup>4)</sup>らの言うS型、L型に分けることができ、5、6分節は、幅による違いで大きいものと小さいものの2タイプに分けることができ最も複雑な移動パターンをとるのは、7、8、9分節で最も多くの株間における相違点があらわれ、分別数が増加した。今回の調査ではA群ロタウイルスでL型10パターンとS型3パターンの13泳動型に分類できた。金ら<sup>2)</sup>は1981年から1985年にかけての東京地域での成績でL型8タイプ、S型6タイプに分類している。また中込ら<sup>10)</sup>は、24の泳動型に分類できたと報告している。この泳動型のパターンによる分別数は報告者によってまちまちであるため、上羽ら<sup>11)</sup>は電気泳動パターンの分節を推定分子量で表示する方法を検討し17泳動型に分類できたと報告している。

我々は泳動パターンを13泳動型に分類したが流行年による比較でも主流パターンの分布は大きく変動し、1987～1988流行年はHタイプで、1986～1987流行年はIタイプであり、年度による変異は金ら<sup>2)</sup>もまた報告している。またA群血清型と泳動型の関連についてみると、同一血清型でも泳動パターンは異なっているが、同一泳動パターンは同一血清型に属することが判った。

また今回の泳動によって、1985～1986流行年でBRVと同時に泳動したヒトロタウイルス株が同一パターンとなったケースが存在したが、同一の泳動型か、実験中のBRV汚染も考えられ決定が保留されるところである。

非定型であるC群ロタウイルスは、1986年松山地域で国内で初めての報告<sup>12)</sup>以来、福井<sup>13)</sup>、岡山<sup>14)</sup>など検出確認の報告があり、県下でも今回、2株が確認された。A群ロタウイルスは、その泳動パターンから、Rodger<sup>15)</sup>、Dimitrow<sup>16)</sup>、Nicolas<sup>17)</sup>らのウイルスと同一であり、4月18日と4月22日の2株の泳動パターンと一致し、C群ロタウイルスに属することは明らかである。

C群ロタウイルスの分離報告機関が増加し、だんだんと浸入地域が広がり、これから以降、如何なる推移をと

るか、ロタウイルス検索には今後とも従来検査法に併せて、RNA電気泳動法による分析をおこないたい。

## 文 献

- 1) 山西重機, 他: Enzyme-linked immunosorbent assayによるヒト及びイヌロタウイルスの抗原検出とブタ, ウン及びヒトロタウイルスの抗体測定, 香川県衛生研究所報, 15, 15～23, (1986)。
- 2) 金保洙, 他: RNA-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による東京北部地域におけるロタウイルス感染の疫学研究, 臨床とウイルス, 13, 487-489, (1985)。
- 3) 大瀬戸光明, 他: ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による非定型ロタウイルスの検出, 医学のあゆみ, 136, 223-224, (1986)。
- 4) Espejo, RT, et al.: Distinct reovirus-like agent associated with acute infantile gastroenteritis, J. Clin. Microbiol, 6, 502-506, (1977)。
- 5) Laemmli, UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685, (1970)。
- 6) 赤谷薫, 他: モノクローナル抗体を用いた酵素免疫固相法 (ELISA) による糞便中ロタウイルス抗原のタイピング, 臨床とウイルス, 15, 61-68, (1987)。
- 7) 香川県環境保健部環境衛生課: 病原微生物検出状況ウイルス部門, 香川県感染症サーベイランス報告書, 118-124, (1987)。
- 8) 赤谷薫, 他: ロタウイルス流行株の地域的局在性とその伝播, 第36回日本ウイルス学会講演要旨, 318, (1988)。
- 9) 浦沢价子, 他: 単クローン抗体を用いるELISA法による本邦7地域のヒトロタウイルス血清型の検索, 第36回日本ウイルス学会講演要旨, 319, (1988)。
- 10) 中込とよ子, 他: ロタウイルスの血清型とRNAパターンについての疫学的研究, 第36回日本ウイルス学会講演要旨, 330, (1988)。
- 11) 上羽修, 他: ロタウイルスRNA電気泳動パターンの分節推定分子量による表示法について, 第35回日本ウイルス学会講演要旨, 4044, (1987)。
- 12) 大瀬戸光明, 他: 松山市におけるC群ロタウイルスによる下痢症の継続的調査, 愛媛県衛生研究所年報, 49, 5-9, (1988)。
- 13) 松本和男, 他: 福井県の小学校で食中毒様症状を呈して集団発生した非定型ロタウイルス感染症, 病原微生物検出情報, 102, 147, (1988)。
- 14) 藤井理津志, 他: 1987/88年冬期に検出したロタウイルスの分子疫学的検討, 岡山県環境保健センター年報, 12, 124-126, (1988)。
- 15) Rodger, S. M, et al: Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant, J. Clin. Microbiol, 16, 724-726, (1982)。
- 16) Dimitrov, D. H, et al: Detection of antigenically distinct rotaviruses from infants, Infect. Immun, 41, 523-526, (1983)。
- 17) Nicolas, J. C. et al: Isolation of a human pararotavirus, Virology, 124, 181-184, (1983)。