

# 香川県下のロタウイルス感染症の疫学 —血清型と電気泳動型について—

山西重機・藤井康三・三木一男

## I はじめに

冬期間の主要な乳幼児感染症の一つにロタウイルスによる急性胃腸炎があり、毎年のように繰り返し多発している。

ロタウイルスは、A～G群に分類できる<sup>1),2)</sup>。国内における流行の大部分は、A群によるものであり一部でC群が検出<sup>3),4)</sup>されている。このうちA群ロタウイルスは、動物ロタウイルスも含め現在13血清型<sup>5)</sup>まで知られている。これとは別に亜群抗原<sup>6)</sup>によってI, II群に分類でき、また11分節RNAは、ポリアクリルアミド電気泳動法による移動度の違いで、S型、L型の泳動型に大別<sup>7)</sup>できるなど、流行分離株の細分類化が可能である。

著者らは、香川県内で発生したA群ロタウイルスの流行を疫学的に再検討するために、1985～91年の検体について、泳動型による分類、1987～91年についてはさらに血清型別ならびに亜群別をおこない、流行期、月間推移による群型の分布、地域間動向、また群型間の相互の関係などについて検討したので、その概要について報告する。

## II 材料と方法

1. ウイルス検査材料は、香川県内の各感染症サーベイランス小児科10定点を受診した下痢症患者から採取し、電子顕微鏡観察およびELISA法<sup>8)</sup>によりロタウイルス陽性と同定された糞便（以下陽性検体）を用いた。

なお、糞便からのウイルス粒子の抽出精製、電子顕微鏡による形態学的同定は、さきに報告した方法によった<sup>9)</sup>。

### 2. ロタウイルス電気泳動法（RNA-PAGE）

糞便からのRNAの抽出は、長谷川らの方法<sup>10)</sup>によっておこなった。10%ポリアクリルアミドSDSスラブゲルでLaemmli法<sup>11)</sup>により電気泳動（10mA, 17時間泳動）をおこなった後、銀染色を施し、各RNA分節の移動度を観察した。Espejoら<sup>7),12)</sup>の第10, 11分節の移動距離によるL型（Long）、S型（Short）パターンによる分類法を用いた。

### 3. ロタウイルスの血清型、亜群型別

ロタウイルス陽性検体の10%乳剤を低速遠心し、その上清を用いた。

血清型、亜群型別は、1～4血清型及びI, II亜群に特異的なモノクローナル抗体（MoAb）を用いた赤谷ら<sup>13)</sup>のELISA法を一部変えて行った。

抗原捕捉用MoAbをELISA用マイクロプレートに分注し、4℃で一夜固相化した。0.05%Tween20を含むPBS（PBS-T）で洗浄後、2.5%Skimmed milk加PBS-T（SMPT）を分注し、さらに検体を加え、4℃で一夜反応させた。PBS-Tで洗浄し、SMPTで希釈したビオチン標識MoAbを添加し、室温で90分反応させた。その後PBS-Tで洗浄し、2%BSAを含むTBS（0.15M NaCl, 0.02 Tris-HCl, PH 7.4）で希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを添加し、室温で20分反応させ、PBS-Tで洗浄後、O-phenylenediamine、過酸化水素を基質とするクエン酸リン酸ナトリウム緩衝液（PH5.0）を加え、酵素反応させた。30分後4 N硫酸を添加し、反応を停止させ、492 nmで吸光度を測定した。

これらは、1987～88年以後の陽性検体について行った。

## III 結 果

### 1. 1985～91流行期のPAGEによる泳動型分類

表1に示したように、1985～86年は、49陽性検体でL型41検体（83.7%）、S型は確認できなかった。1986～87年は、73陽性検体で、S型11検体（15.1%）、L型53検体（72.6%）、1987～88年は、84陽性検体でS型10検体（11.9%）、L型65検体（77.4%）、1988～89年は、50陽性検体でL型44検体（88.0%）、S型は確認できなかった。1989～90年は、106陽性検体でS型15検体（14.2%）、L型65検体（61.3%）、1990～91年は、69陽性検体でS型6検体（8.7%）、L型46検体（66.7%）であ

表1 ロタウイルスの電気泳動型による分類

流行年	検体数	電気泳動型による区分			
		L型	S型	判定不能	検出不能
1985～86	49	41	—	5	3
1986～87	73	53	11	4	5
1987～88	84	65	10	8	1
1988～89	50	44	—	5	1
1989～90	106	65	15	14	12
1990～91	69	46	6	8	9

った。

各年ともL型が主で、60%以上を占めていた。

## 2. 1987～88流行期の血清型

84陽性検体で、1型58検体(69.0%)、2型10検体(11.9%)、4型9検体(10.7%)で、3型は確認できなかった。亜群分類は、I群11検体(13.1%)、II群72検体(85.7%)であり、各群型間の相互の関係は表2に示した。

表2 1987～88流行期の血清型等による分類

血清型	亜群	泳動型	検体数	計
1	II	L	55	58
		判定不能	3	
2	I	S	10	10
3				0
4	II	L	9	9
判定不能	II	L	1	5
		判定不能	3	
		検出不能	1	
検出不能	I	判定不能	1	2
	検出不能	判定不能	1	

表中の判定不能の項はロタウイルスは確認できるが群型判別できない検体、また検出不能の項はロタウイルス、群型ともに確認判定できなかった検体である。

これら血清型を月別推移で見ると、表3のように全期間をとおして、1型が大部分を占め初期段階では2型もかなり確認でき、2月になって4型の比率が増加した。

表3 1987～88流行期の月別ロタウイルス血清型の推移

月別	血清型別			
	1型	2型	3型	4型
1	21	5	—	2
2	22	3	—	6
3	15	2	—	1
計	58	10	—	9

## 3. 1988～89流行期の血清型

50陽性検体を血清型で見ると判定不能6検体と検出不能の1検体を除きその他43検体は全て1型に分類された。

亜群分類ではII群が43検体で、それぞれの型別法で単一型を示した。各群型間における相互の関係は表4に示した。

## 4. 1989～90流行期の血清型

106陽性検体で1型39検体(36.8%)、4型15検体(14.2%)、2型12検体(11.3%)、3型3検体(2.8%)に分類でき、1型から4型までのいわゆる主要血清

表4 1988～89流行期の血清型等による分類

血清型	亜群	泳動型	検体数	計
1	II	L	42	43
	検出不能		1	
2				0
3				0
4				0
判定不能	II	L	1	6
	判定不能	判定不能	1	
			3	
検出不能	検出不能	1		
検出不能	判定不能	判定不能	1	1

表5 1989～90流行期の血清型等による分類

血清型	亜群	泳動型	検体数	計
1	II	L	34	39
		S	1	
		検出不能	1	
	判定不能	L	1	
		検出不能	2	
2	I	S	9	12
		判定不能	1	
	検出不能	判定不能	1	
		検出不能	1	
3	II	L	2	3
	検出不能	判定不能	1	
4	II	L	10	15
		判定不能	3	
	検出不能	L	2	
判定不能	II	L	4	9
	I	S	1	
	検出不能	L	1	
		判定不能	1	
		検出不能	2	
検出不能	II	L	8	28
		判定不能	4	
		検出不能	2	
	I	S	2	
		L	3	
		S	2	
		判定不能	2	
検出不能	検出不能	5		

型全てが確認出来た。

亜群分類では、I群13検体(12.3%)、II群68検体(64.2%)であった。

各群型間における相互関係は表5に示した。このなか

で血清1型でS型が1検体存在した。

また検出血清型の月別推移は流行初期では1型および2型が大部分を占めたが、2～4月では1～4の各血清型が確認され、終息期で4型の占める比率が高くなった(表6)。

表6 1989～90流行期の月別ロタウイルス血清型の推移

月別	血清型別			
	1型	2型	3型	4型
11	1	—	—	—
12	1	—	—	—
1	10	2	—	—
2	12	6	1	9
3	8	3	—	2
4	3	2	1	2
5	1	1	—	2
計	36	14	2	15

#### 5. 1990～91流行期の血清型

陽性69検体を血清型によって分類した。1型45検体(65.2%)、2型10検体(14.5%)、3型、4型は確認できなかった。

亜群分類では、I群6検体(8.7%)、II群51検体(73.9%)であった。

各群間における相互の関係は、表7に示した。

また各血清型の検出数を月別推移でみると、1型は全

表7 1990～91流行期の血清型等による分類

血清型	亜群	泳動型	検体数	計
1	II	L	39	45
		判定不能	2	
		検出不能	3	
2	I	S	5	10
		判定不能	1	
	S	1		
	検出不能	判定不能	1	
		検出不能	1	
3			0	
4			0	
判定不能	II	L	2	5
		判定不能	3	
検出不能	II	L	1	11
		判定不能	1	
	L	3		
	検出不能	判定不能	1	
		検出不能	5	

表8 1990～91流行期の月別ロタウイルス血清型の推移

月別	血清型別			
	1型	2型	3型	4型
1	9	8	—	—
2	19	1	—	—
3	14	—	—	—
4	1	—	—	—
計	43	9	—	—

調査期間にわたって検出されたが2型は流行初期に限定された(表8)。

#### IV 考 察

我が国におけるロタウイルスによる下痢症の発生は冬期間に集中して流行している。その大部分はA群による流行であるが、一部C群が確認されている。香川県内でもC群は、1988年に著者らにより確認された<sup>14)</sup>。しかし、他の群については現在までのところ国内での報告はない。

ヒトA群ロタウイルスは内殻および外殻の抗原的差異によって、それぞれ亜群I、IIに<sup>6)</sup>、主要な血清型1～4型<sup>5)</sup>に、またEspejoら<sup>7)、12)</sup>のRNA第10、11分節移動度の違いによるS型、L型などに分類される。

これらを利用して細分類化し、流行分離株を比較分析することで、県内A群ロタウイルスの疫学的再検討をおこなった。

香川県における1987～88年では1型58検体(69.0%)、2型10検体(11.9%)、4型9検体(10.7%)であり、3型は検出されなかった。浦沢ら<sup>15)</sup>の報告では、札幌で2型52検体(69.3%)、1型15検体(20.0%)、4型1検体(1.3%)であり、富山では、4型を除く1型38検体(63.3%)、3型2検体(3.3%)、2型1検体(1.7%)であった。また松山では1型17検体(34.0%)、2型17検体(34.0%)、3型2検体(4.0%)であり、1型と2型の比率が同じであった。このように同じ年でも、地域により主流となる血清型に違いがみられた。

一方、香川県の1988～89年の調査成績は1型のみを検出であり、牛島ら<sup>16)</sup>による東京、久留米、秋田、福井、金沢、名古屋の結果も1型が85～98%を占め、1型を主流とする流行であった。

ロタウイルスの流行は同一時期でも調査地域間によって、主要な流行血清型や型分布が大きく相違している場合があった。

香川県における流行血清型の推移をみると1987年以降4回の流行期の観察で、各年とも1型を主流とするものであったが、詳細にみると1987～88年では3型が検出されず、1988～89年は1型のみが検出され、1989～90年で

は1～4型の全てが検出され、1990～91年には3型および4型が検出されなかった。

一方、中込ら<sup>17)</sup>の出形における4年間の調査では、血清1型は3流行期で優位主流を占めたが残り1期では低位であったことを報告している。

岐阜における2年間の調査では、1986～87年の流行期で3型26検体(50.0%)、1型7検体(13.3%)、2型2検体(3.8%)、4型1検体(1.9%)、1987～88年では、4型9検体(39.1%)、2型3検体(13.0%)、1型2検体(8.7%)、3型1検体(4.3%)と流行期による変動があった<sup>18)</sup>。

このように報告されている各地域において主に検出される血清型以外に1～3種類の血清型が混在して検出される傾向を示し、その検出比率には多様性が認められている。

しかし、この地域間の変化、年による主流株の変化がどのようにして起るのかは、明らかにできなかった。

各流行期で血清型、亜群型別のできなかった検体が数%あった。理由としては①MoAbを使用しているため、MoAbが認識するエピトープによっては同定できない。②血清型は、検体中のロタウイルスの内殻粒子が多い場合、同定できない。③MoAbの感度との関係で、検体中のウイルス粒子が少ない、などが考えられる。

RNAの泳動型による分類では、1985～86年はL型のみ、1986～87年はL型53検体(82.8%)、1987～88年はL型65検体(86.4%)、1988～89年はL型のみ、1989～90年はL型65検体(81.2%)、1990～91年はL型46検体(88.5%)がそれぞれ検出され、この期間におけるロタウイルスの流行はL型が主流であった。

RNAのL型は亜群Ⅱで、血清型1、3、4型に、S型は亜群Ⅰで血清型2型に対応するという報告<sup>19)・20)</sup>に一致し、血清型1型の流行に対応していた。

しかし、RNA型、亜群、血清型の関係はreassortant株の出現で、全ての株が必ずしも上記のとおりではない<sup>21)</sup>。香川県でも1989～90年の血清型1型、亜群ⅡでRNA型はS型の1検体を検出しているが、この株がどのような特徴をもつかはまだ検討していない。ロタウイルスは11本の分節RNAを持つため、自然界でもreassortant株をつくり易くしていると考えられ、今後もそのような株が検出される可能性は大きい。

一地域における6流行期の調査で、各流行期とも、血清型1型が主流を占め、他の地域のような主流血清型の変動はみられなかった。しかし、1型はどの地域でも、主流株の変化があっても、必ず検出されていて、常在していると考えられ、ロタウイルス流行株の大きな割合をしめている。ロタウイルスの流行がどのようににはじま

って、主流株が決められどのように変化していくか等、今後とも検討していきたい。

## V ま と め

1. 1985～86年は、泳動型でL型のみであった。
2. 1986～87年は、泳動型でS型15.1%、L型72.6%であった。
3. 1987～88年は、血清型1型69.0%、2型11.9%、4型10.7%、亜群分類でⅠ群13.1%、Ⅱ群85.7%、泳動型S型11.9%、L型77.4%であった。
4. 1988～89年は、血清1型、亜群分類Ⅱ群、泳動型L型でそれぞれ単一型を示した。
5. 1989～90年は、血清型1型36.8%、4型14.2%、2型11.3%、3型2.8%、亜群分類Ⅰ群12.3%、Ⅱ群64.2%、泳動型S型14.2%、L型61.3%であった。
6. 1990～91年は、血清型1型65.2%、2型14.5%、亜群分類Ⅰ群8.7%、Ⅱ群73.9%、泳動型S型8.7%、L型66.7%であった。
7. 1989～90年に血清型1型、亜群分類Ⅱ群で泳動型S型が1検体検出された。

## 文 献

- 1) Todd D, McNulty MS: Electrophoretic variation of avian rotavirus RNA in polyacrylamide gels. *Avian Pathology* 15: 149～159, 1986.
- 2) Saif LJ: Nongroup A rotaviruses. In *Viral Diarrheas of Man and Animals*, eds. Saif LJ, Theil KW. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990, pp.73～95.
- 3) 大瀬戸光明, 山下育孝, 奥山正明, 桑原広子, 井上博雄, 石丸啓郎: 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) Matsumoto K, Hatano M, Kobayashi K, Hasegawa A, Yamazaki S, Nakata S, Chiba S, Kimura Y: An outbreak of gastroenteritis associated with acute rotaviral infection in schoolchildren. *J Inf Dis* 160: 611～615, 1989.
- 5) Browning GF, Chalmers RM, Fitzgerald TA, Snodgrass DR: Serological and genomic characterization of L338, a novel equine group A rotavirus G serotype. *J Gen Virol* 72: 1059～1064, 1991.
- 6) Kapikian AZ, Cline WL, Greenberg HB, Wyatt RC, Kalica AR, Banks CE, James HD, Flores J, Chanock RM: Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immune adherence hemagglutination assay (IAHA): evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. *Infect Immune* 33: 415～425, 1981.
- 7) Espejo RT, Avendano LF, Munoz O, Romero P, Eternod JG, Lopez S, Moncaya J: Comparison of human rotavirus isolated in Mexico City and in Santiago, Chile, by electrophoretic migration of their double

- stranded ribonucleic acid segments. *Infect Immun* 30: 342~348, 1980.
- 8) 山西重機, 三木一男, 山本忠雄: ELISAによるヒト及びイヌロタウイルスの抗原検出とブタ, ウシ及びヒトロタウイルスの抗体測定. 香川県衛研所報 15: 15~19, 1986.
  - 9) 山西重機: 香川県におけるウイルス性下痢症とその疫学. 感染症学雑誌 58: 774~783, 1984.
  - 10) Hasegawa A, Mukoyama A, Suzuki H, Inouye S, Chearskul S, Thongkrajai P, Supawadee J, Pongprot B, Yamazi Y: Rota virus infection of Thai infants: antigen detection, RNA electrophoresis and virus cultivation. *J Diarrhoeal Diseases Research* 5: 165~170, 1987.
  - 11) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680~685, 1970.
  - 12) Espejo RT, Calderon E, Gonzalez N, Salomon A, Martuscelli A, Romero P: Presence of two distinct types of rota virus in infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in Mexico City, 1977. *J Infect Dis* 139: 474~477, 1979.
  - 13) 赤谷 薫, 池上信子: 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タイピング. 臨床とウイルス 15: 61~68, 1987.
  - 14) 山西重機, 三木一男, 山本忠雄: RNA電気泳動型からみたロタウイルスの流行について. 香川県衛研所報 16: 23~26, 1987.
  - 15) 浦沢正三, 浦沢价子, 谷口孝喜, 千葉峻三, 桜田教夫, 森田盛大, 森田修行, 時枝正吉, 川本尋義, 峰川好一, 大瀬戸光明: 本邦7地域における下痢症患者便中ヒトロタウイルスの血清型別試験成績. 臨床とウイルス 17: 132~136, 1989.
  - 16) 牛島廣治, 長谷川斐子, 向山淳司, 本間 仁, 松野重夫, 赤谷 薫, 池上信子, 中田修三, 千葉俊三, 中込 治, 篠崎立彦, 岡部信彦, 森島恒雄, 高木道生, 古川 宣, 西村忠史, 山西重機, 實方 剛, 本廣 孝: 東京地域のロタウイルスの流行疫学とその他の地域の流行疫学との比較. 第38回日本ウイルス学会抄録: 243, 1990.
  - 17) Nakagomi O, Nakagomi T, Akatani K, Ikegami N, Katsushima N: Relative frequency of rotavirus serotypes in Yamagata, Japan, over four consecutive rotavirus seasons. *Res Virol* 141: 459~463, 1990.
  - 18) 川本尋義, 北村政和, 久野保夫, 田中 浩, 浦沢正三, 浦沢价子, 谷口孝喜: 岐阜における小児冬季胃腸炎下痢症に関連したA群ヒトロタウイルス流行と血清型疫学. 小児科臨床 42: 79~84, 1989.
  - 19) Kalica AR, Greenberg HB, Espejo RT, Flores J, Wyatt RG, Kapikian AZ, Chanock RM: Distinctive ribonucleic acid patterns of human rotavirus subgroups 1 and 2. *Infect Immun* 33: 958~961, 1981.
  - 20) Hoshino Y, Wyatt RG, Greenberg HB, Flores J, Kapikian AZ: Serotypic similarity and diversity of rotavirus of mammalian and avian origin as studied by plaque-reduction neutralization. *J Infect Dis* 149: 694~702, 1984.
  - 21) Nakagomi O, Nakagomi T, Hoshino Y, Flores J, Kapikian AZ: Genetic analysis of a human rotavirus that belongs to subgroup I but has an RNA pattern typical of subgroup II human rotavirus. *J Clin Microbiol* 25: 1159~1164, 1987.