

4. ウイルス性胃腸炎の診断法と疫学の過去、現在と今後の展望

牛島 廣治

藍野大学藍野健康科学センター

ウイルス性胃腸炎の研究の流れ、概要、診断法、分子疫学について述べた。ロタウイルス、アデノウイルス、ノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、ヒトパレコウイルス、アイチウイルス、ヒトボカウイルスを取り上げた。それぞれに遺伝子群(genogroup)、遺伝子型(genotype)、亜型(subgenotype)/クラスター(cluster)/リネージ(lineage)などがあり、地域・年によって変異が起きていることがわかった。これらの変異には点変異のみならず、ヒト-ヒトおよびヒト-動物ウイルス間の組み換えもみられた。ウイルス性胃腸炎は食物だけではなく、ヒト-ヒト感染が重要であり、また環境との関係も注目される。研究の進歩で少しずつ自然生態系の中での各ウイルスの有り様がわかってきた。すでに究明されたウイルスに対しては免疫学的方法あるいは遺伝子学的方法で検査が可能となった。しかし更なる検査法の開発および未知のウイルスの発見が今後期待される。疫学は長く行っではじめて現象が理解されることが多く地道な努力が必要である。新しい技術を用いながら研究を進めるとともに、流行時など社会の要求に対処する必要がある。

はじめに

感染性胃腸炎は呼吸器感染症に次ぐ大きな感染症である^{1,2)}。近年ロタウイルスワクチンが開発されたが、胃腸炎ウイルスには通常どの子どもも感染する。5歳未満の子どもでは、ロタウイルス感染症で1年間に40~60万人が死亡し^{3,4)}、ノロウイルス感染症では20万人が死亡すると推定されている⁵⁾。

また、細菌性胃腸炎での死亡が抗生薬の使用により減ってきたために、ウイルス性胃腸炎による死亡の割合が増加している⁶⁾。今回、「ウイルス性胃腸炎の診断法と疫学の過去、現在と今後の展望」を書くことになり、これまでわれわれのグループでおこなってきたことを含めて報告したい。最初に研究の流れ、次にウイルスの概要、そして診断法、分子疫学、最後に今後の展望を述べる。

世界の下痢症ウイルスの研究の流れ

プロトタイプのノーウォークウイルスは1972年にKapikianらにより糞便の中から免疫電子顕微鏡で見い出された⁷⁾。1973年にはBishopらよりロタウイルスが患児の十二指腸生検標本から電子顕微鏡で見い出された⁸⁾。また1975年にはアストロウイルスがMadeleyらにより糞便から電子顕微鏡で見出された⁹⁾。また1979年にサッポロウイルスがChibaらによって見い出された¹⁰⁾。1982年にSatoらによりヒトロタウイルスの細胞培養が可能となった¹¹⁾。ロタウイルスは小児の死亡に大きく関係することからワクチンの開発が必要とされた。1986年にKapikianらはサルロタウイルスをもとにサルロタウイルスのVP7遺伝子をヒトのVP7遺伝子と組み換えたウイルスを作り、その後のRotashieldロタウイルスワクチンの基礎を作った¹²⁾。1990年にJiang,Estesらによりノーウォークウイルスの全塩基配列が決定された¹³⁾。その後もノロウイルスの全遺伝子配列が決められ、その結果適切なプライマーを設定しノロウイルスの遺伝子診断が行われるようになった¹⁴⁾。ノロウイルスは細胞培養ができず、今でも遺伝子増幅法が第一選択とされている。遺伝子組換え技術の進歩からバキュロウイルスにノロウイルスの遺伝子を組込み、培養細胞の中で人工的にウイルス様中空ウイルス(VLP)を作り、有用なウイ

連絡先

〒150-0002

東京都渋谷区渋谷2丁目17番地3号

藍野大学藍野健康科学センター

TEL/FAX: 03-3486-8481

E-mail: ushijima-hiroshi@jcom.home.ne.jp

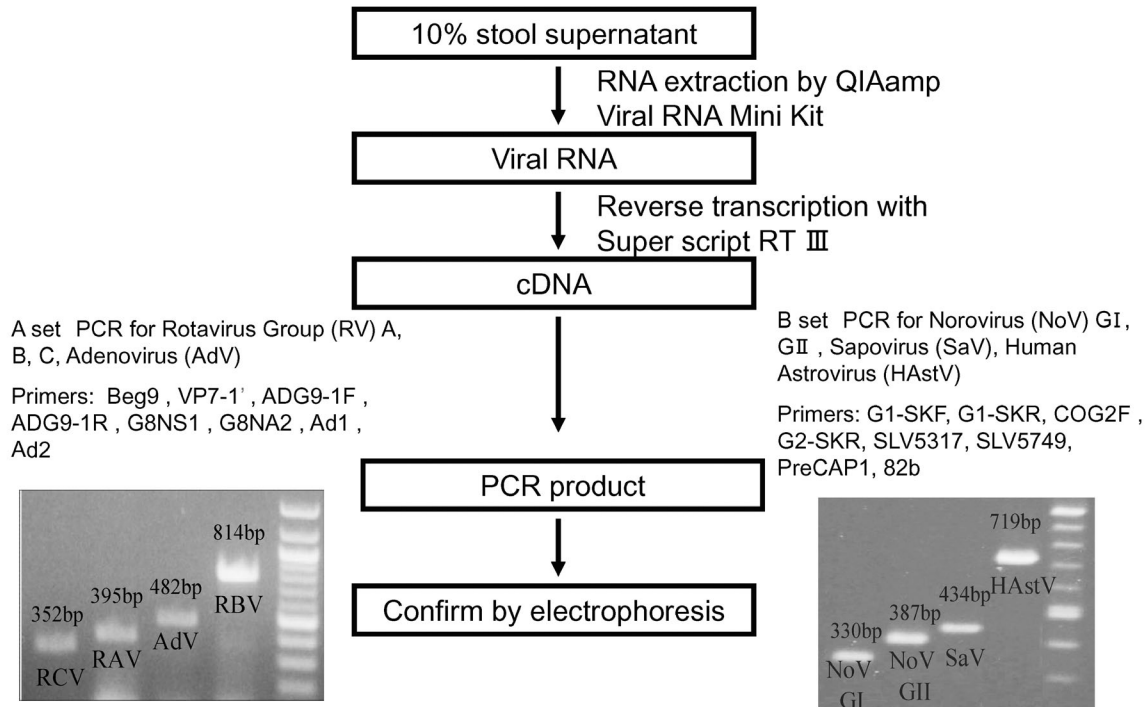


図1 下痢原性ウイルスに対する RT-multiplex PCR

ルス蛋白の作製に成功した¹⁵⁾。一方、1992年 EstesらはロタウイルスのNSP4にコレラトキシンと似た細胞毒素(エンテロトキシン)作用があることを見出した¹⁶⁾。1993年に Yamashitaらは当時愛知で流行したウイルス性下痢症の糞便からアイチウイルスを見出した¹⁷⁾。1996年に Ball, EstesらはノロウイルスVLPを用いたワクチンの開発に着手した¹⁸⁾。2002年 Marinonneau, Jiangらは細胞表面にある histoblood group antigen (HBGA) がノロウイルスの細胞側のレセプターであることを見出した¹⁹⁾。同2002年に Sugieda, Nakajimaらはブタのノロウイルスをブタ糞便中から見出した²⁰⁾。

まとめると、1970年代から電子顕微鏡法、1980年代から抗原・抗体反応、1990年代から遺伝子増幅法によるウイルス性下痢症の診断が始まった。また2000年代になりロタウイルスワクチンが実用化されるようになった²¹⁾。

下痢症をきたすウイルス

胃腸炎起因ウイルスの性状を表1に示す。

ロタウイルス：レオウイルス科に属する。電子顕微鏡では直径約70nmの舵輪の形をしている。3層の蛋白からなる。中間層VP6(ウイルス蛋白6)の抗原性によりA~G群に分類される。A,B,C群に属するウイルスがヒトに感染する²¹⁾。多くの動物のロタウイルスはA群であるがブタではA,B,E群、ウシではA,B,C群、ニワトリではA,D,F,G群などがある²²⁾。近年H群とも言うべき New Adult Diarrheal

Rotavirusが見い出されている²³⁾。外層のVP7とVP4が中和に関係し細胞のレセプターに結合する。現在、A群ロタウイルスはVP7が20のG(Glycoprotein, 糖蛋白)遺伝子型に分けられ、G1,2,3,4,9,12、とりわけG1が主流である^{24,25)}。VP4は現在28のP(Proteolytic protein)遺伝子型に分けられる^{24,25)}(表2)。その中で、P[8],P[4]が主流である。A群ロタウイルスはG,Pの組合せで表現されるようになった。現在G1P[8],G2P[4],G3P[8],G4P[8],G9P[8]が全体の9割を占める。この中でG1P[8]が最も多い。その他にG3P[6],G9P[6]など多彩な組み合わせが見られる²⁶⁾。時にヒトおよび動物ウイルス間で分節の再集合(リアソータント)が自然界でおきる²⁷⁾。NSP4(エンテロトキシン)を支配する遺伝子による遺伝子型はA-Eに分けられる²¹⁾。同時に群を決定するVP6遺伝子型はI,II,I+II, Non I and Non IIに分けられている²¹⁾。ロタウイルスの分類として最近さらに細かく基準が作られ、NSP4, VP6をそれぞれ11に分けている(表2)²⁴⁾。

アデノウイルス：直径70~80nmの正20面体の形態をもち、特徴的なファイバーの突起がある。A~F群²⁸⁾があり、更に53の血清型(遺伝子型にも相当)に分けられる。胃腸炎を起こすものは腸管アデノウイルスと呼ばれ主にF群(40, 41型)に属する。41型はさらに2つのサブタイプに分かれる²⁹⁾。その他の血清型、たとえば3,7,8,31型も胃腸炎をおこす^{28,29)}。

ノロウイルス：カリシウイルス科の属である。以前はノー

表1 ヒト胃腸炎ウイルスの性状

ウイルス名	科	大きさ(nm)	核酸	塩基数(kb)	ヒトに感染する群・遺伝子型	ウイルス培養
ロタウイルス	レオウイルス	70	dsRNA 11分節	18.5	A,B,C 群 A (1,2,3,4,9,12 G 遺伝子型)	+
腸管アデノウイルス	アデノウイルス	80	dsDNA	35	主として 40, 41 遺伝子型	+
ノロウイルス	カリシウイルス	30 ~ 35	ss (+) RNA	7.5 ~ 7.7	I,II,IV 遺伝子群	-
サポウイルス	カリシウイルス	30 ~ 35	ss (+) RNA	7.6	I,II,IV,V 遺伝子群	-
アストロウイルス	アストロウイルス	30 ~ 35	ss (+) RNA	7.2	I~8 遺伝子型 主として 1 型	+
ヒトパレコウイルス	ピコルナウイルス	22 ~ 30	ss (+) RNA	7.3	1 ~ 8 (14) 遺伝子型 主として 1-4 型	+
ヒトボカウイルス	パルボウイルス	20	ss (+ or -) DNA	5	3 遺伝子型	-

表2 ロタウイルスの11分節の分類

Gene Product	Percentage identity cut-off values (%)	Genotypes	Name of genotypes
VP7	80	20 G	<u>G</u> lycosylated
VP4	80	28P	<u>P</u> rotease-sensitive
VP6	85	11I	<u>I</u> nter capsid
VP1	83	4R	<u>R</u> DRP
VP2	84	5C	<u>C</u> ore protein
VP3	81	6M	<u>M</u> ethyltransferase
NSP1	79	14A	<u>A</u> ntagonist
NSP2	85	5N	<u>N</u> Tase
NSP3	85	7T	<u>T</u> ranslation enhancer
NSP4	85	11E	<u>E</u> nterotoxin
NSP5	91	6H	<u>H</u> osphoprotein

文献 24 に新しい成績を加えた。RDRP: RNA dependent RNA polymerase

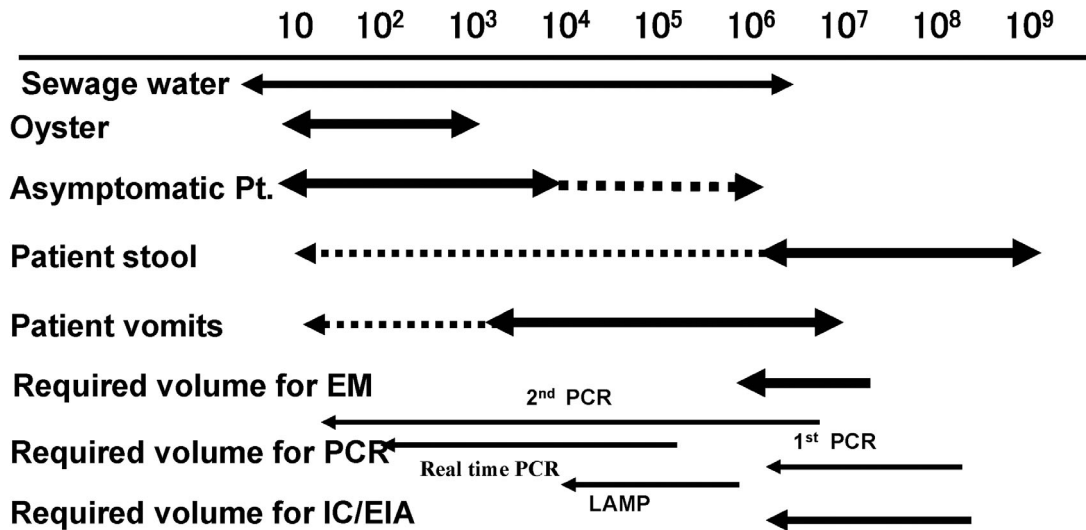
ウォーク様ウイルス、あるいは小型球形ウイルス (SRSV) と言われた。ノロウイルスは G (genogroup, 遺伝子群) I ~ V がある。ヒトに関係するのは GI, GII, GIV であり、現在は GII が主である。遺伝子群はさらに遺伝子型 (ゲノタイプ)、亜遺伝子型 (サブゲノタイプ) あるいはクラスターなどに下部に細分類される。GI は 15, GII は 18 の遺伝子型に分けられ現在 GII/4 が流行している^{30,31)}。

サポウイルス: ノロウイルス同様にカリシウイルス科に属する。以前はサッポロ様ウイルスといわれ、小型球形ウイルスの 1 つであった。GI ~ GV の遺伝子群があり GI, GII, GIV, GV がヒトに関係する。少なくとも GI には 8,

GII は 5 の遺伝子型に分かれる^{32,33,34)}。

アストロウイルス: アストロウイルス科で 30nm の星状の小型球形を示す。1~8 の血清型 (または遺伝子型) があるが 1 型が主である³⁵⁾。

ヒトパレコウイルス: ピコルナウイルス科に属するパレコウイルス属の中の種である^{36,37)}。全塩基配列から 1 から 8 型に分けられ、さらに部分の遺伝子配列を含めると 14 遺伝子型の報告が見られる。疾患として胃腸炎、呼吸器感染、髄膜炎が関係する。胃腸炎に関係するのは主に 1 型である。ヒトパレコウイルス 1 型は 1999 年まではエコー 22 型と、ヒトパレコウイルス 2 型はエコー 23 型と呼ばれた³⁸⁾。



Glass, RL. et al., J Infect Dis. 2000 (Modified)

図2 検体中のウイルス濃度、検出方法ごとの検出濃度（コピー数/g）

アイチウイルス：ピコルナウイルス科のコブウイルス属の種である¹⁷⁾。さらにアイチウイルスはA,Bに分けられる³⁹⁾。

ヒトボカウイルス：ヒトボカウイルスはパルボウイルス科に属する。2005年に見い出されたウイルスで呼吸器系感染が主である⁴⁰⁾。しかし胃腸炎の症例からも見い出されており胃腸炎を主体とする感染症も考えられる^{41,42)}。ヒトボカウイルスは3遺伝子型に分けられる。

その他：ヒトコロナウイルス⁴³⁾、ピコビルナウイルス⁴⁴⁾などが胃腸炎と関係する。呼吸器ウイルス疾患、たとえばインフルエンザウイルス、パラインフルエンザ、ライノウイルスでも下痢を伴う。免疫不全の状態ではサイトメガロウイルスやヒトヘルペスウイルス6, 7型などでも胃腸炎を示す⁴³⁾。

一般にRNAウイルスは変異をきたしやすく、ノロウイルスの場合は遺伝子内での組み換え（リコンビネーション）、ロタウイルスの場合は分節の再集合（リアソートメント）が新しい流行の要因となる^{26,27)}。ロタウイルスの場合、自然界あるいは人工的にヒトと動物ウイルスの分節の再集合ができるが、ノロウイルスなどの一本鎖RNAウイルスでは動物とヒトのウイルスのリコンビネーションは今のところ報告はない。もちろんヒトのノロウイルスで株間の組み換えが生じる。特にノロウイルスのポリメラーゼ遺伝子と capsid 遺伝子の間で組み換えが起こりやすい⁴⁵⁾。ロタウイルス、ノロウイルスなどの下痢症ウイルスの場合ではインフルエンザで恐れられている死にいたる新型の大流行は今のところ見られない。

診断法

現在のウイルスの検査法でもっぱら使用されているのは免疫学的方法と遺伝子増幅による診断法である^{46,47)}。以前は電子顕微鏡法あるいは免疫電子顕微鏡法であったが技術的な習得が必要なことや最終診断にはなりにくいことから現在ではほとんど用いられない。ウイルスと抗体との中和反応による診断もあるが技術が必要な事と結果が出るのに時間を要する。免疫学的方法では、酵素抗体法を用いた抗原あるいは抗体の検出法がある⁴⁸⁾。一方最近、迅速診断法としてのイムノクロト法が用いられるようになった⁴⁹⁻⁵¹⁾。施設等での集団感染時あるいはその予防として有用であるが、遺伝子診断法の1st PCR程度の感度である。やや時間がかかるが遺伝子診断が感度・精度の面で gold standard として用いられる^{50,51)}。real time PCR法は定量が可能である⁵²⁻⁵⁴⁾。また簡易にできる RCR法（定温増幅など）が市販されている^{55,56)}。多くの下痢症ウイルスを同時に検出するため multiplex RT-PCR法がある⁵⁷⁾（図1）。アデノウイルスはDNAウイルスであるが逆転写の過程が入っていてもRNAウイルス同様にRT-PCR法で検出される⁵⁷⁾。multiplex RT-PCR法でも検体1つのチューブに測定したいウイルスのプライマーセットを数ペア以上入れる場合と、1検体につき1個ずつのウイルスのプライマーを各チューブに使用する場合がある。real time multiplex PCR法も出てきており2~3種の異なるウイルス別の蛍光標識プライマー（もしくはプローブ）も用いられる。real time PCR法もサイバークリーン法⁵⁸⁾とタックマン法⁵⁹⁾がある。またDNA

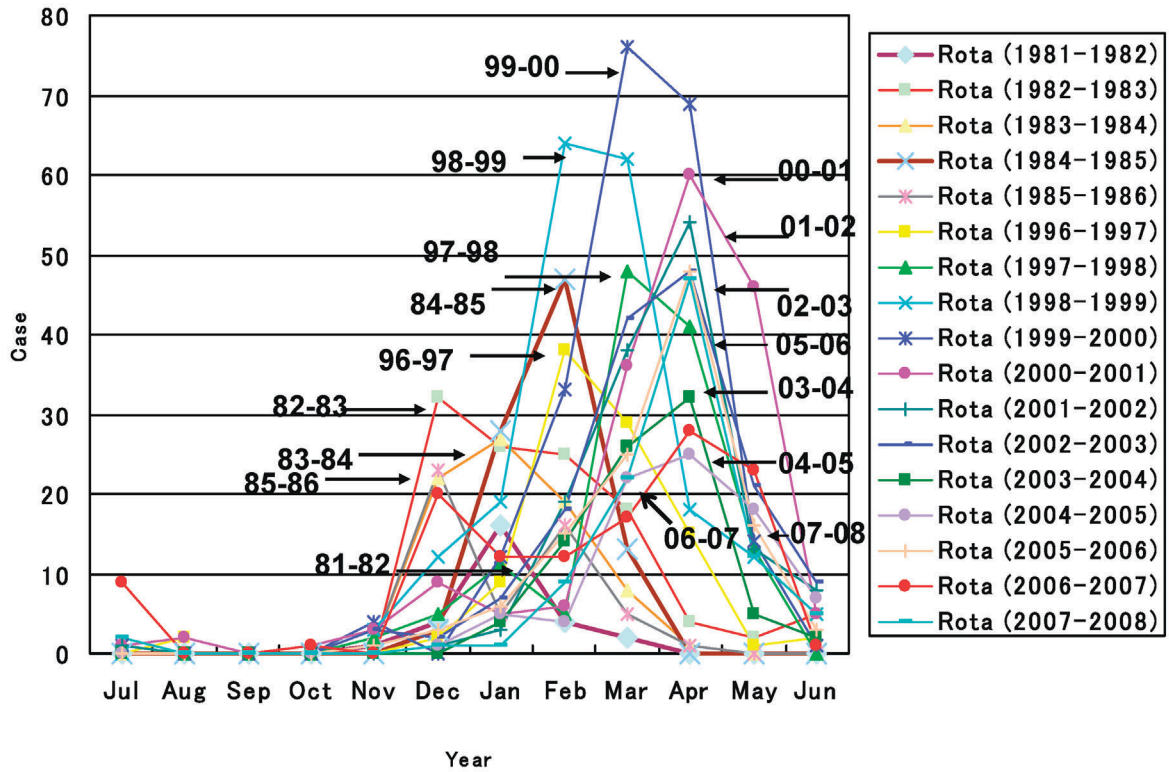


図3 わが国のロタウイルスの季節変動

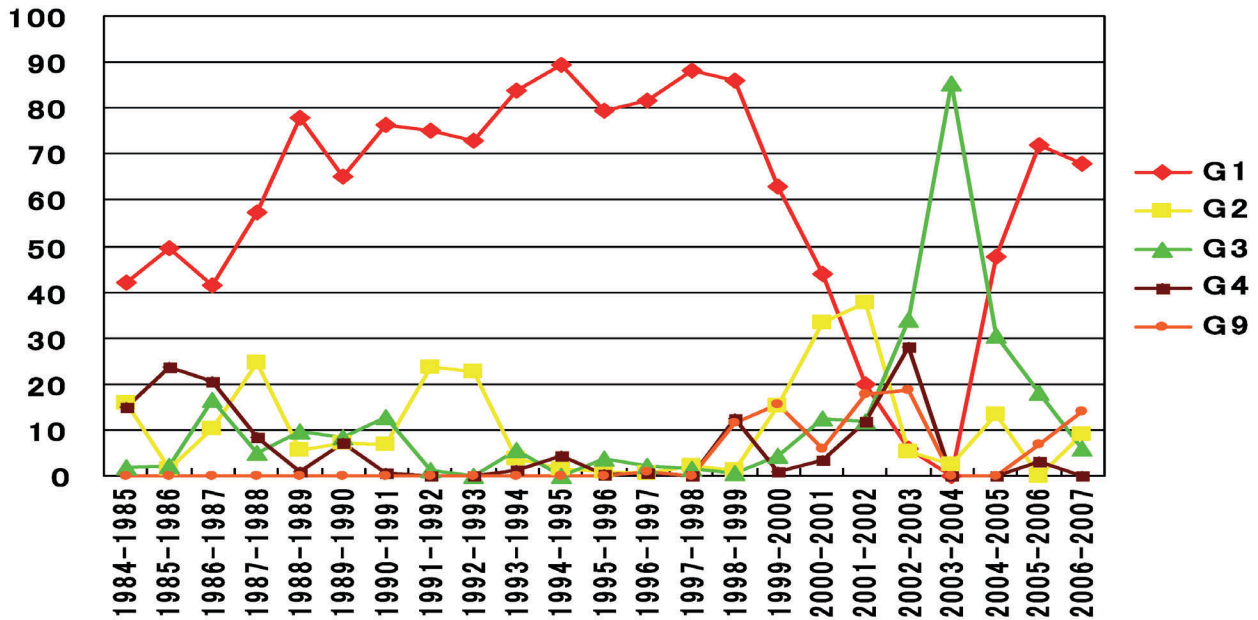


図4 わが国のロタウイルスG遺伝子型別の年ごとの変動

チップを用いて各ウイルスを増幅した後に DNA ハイブリダイゼーションを行う方法がある⁶⁰⁾。各ウイルスの検査法は表3に示す。またノロウイルスに関しては検査法ごとの感度、および検体の由来別の大凡の1g当たりのコピー数を

示した。不顕性感染者でも糞便中のコピー数が多かったり、感染者でも糞便中のコピー数が少なかったり、吐物中では少ないことがあるので、それらは点線で示した(図2)。

表3 ウイルス性下痢症の最近の診断法

ロタウイルスの抗原・遺伝子検査 1) 酵素抗体法、イムノクロマト法 逆受身赤血球凝集法 (C群ロタウイルス) 2) RNA-PAGE、RT-PCR、リアルタイム PCR アデノウイルスの抗原・遺伝子検査 1) 酵素抗体法、イムノクロマト法 2) PCR、リアルタイム PCR 3) 制限酵素 ノロウイルスの抗原・遺伝子検査 1) 酵素抗体法、イムノクロマト法 2) RT-PCR、リアルタイム PCR 等 サボウイルスの抗原・遺伝子検査 1) RT-PCR、リアルタイム PCR アストロウイルスの抗原・遺伝子検査 1) 酵素抗体法、イムノクロマト法 2) RT-PCR、リアルタイム PCR ヒトパレコウイルスの抗原・遺伝子検査 1) RT-PCR、リアルタイム PCR ヒトボカウイルスの抗原・遺伝子検査 1) PCR、リアルタイム PCR

尚、ロタウイルス、アデノウイルス、アストロウイルス、パレコウイルスは細胞培養ができる。

32 G1 strains

- Vietnam (VN): 12 strains
- Japan: 8 strains
- China (Chi): 8 strains
- Thailand (Thai): 4 strains

G1ロタウイルスでの解析を示す。
G2, G3, G4, G9は省略

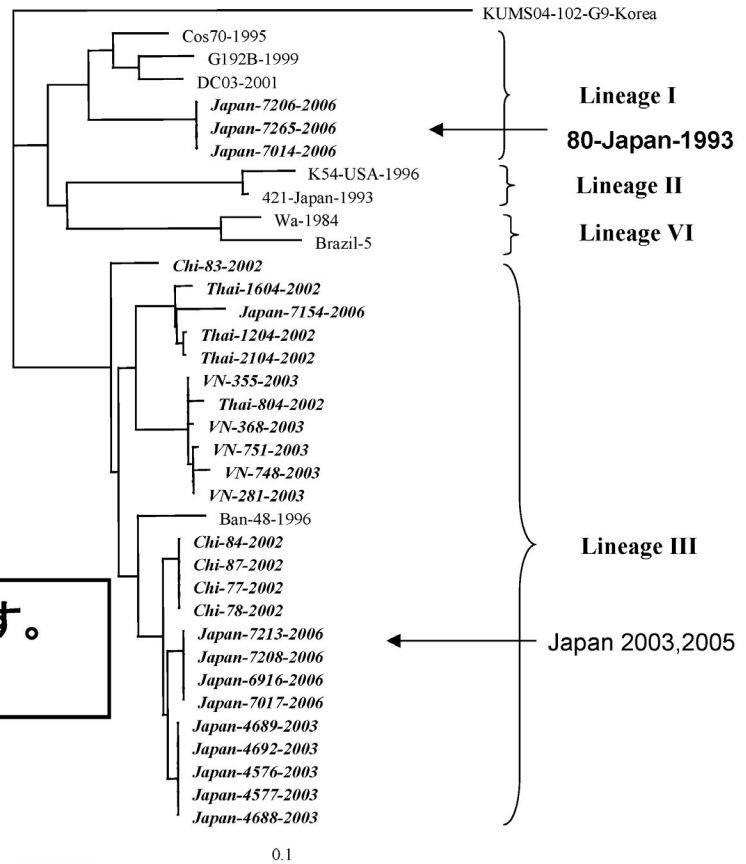


図5 G1ロタウイルスの系統樹

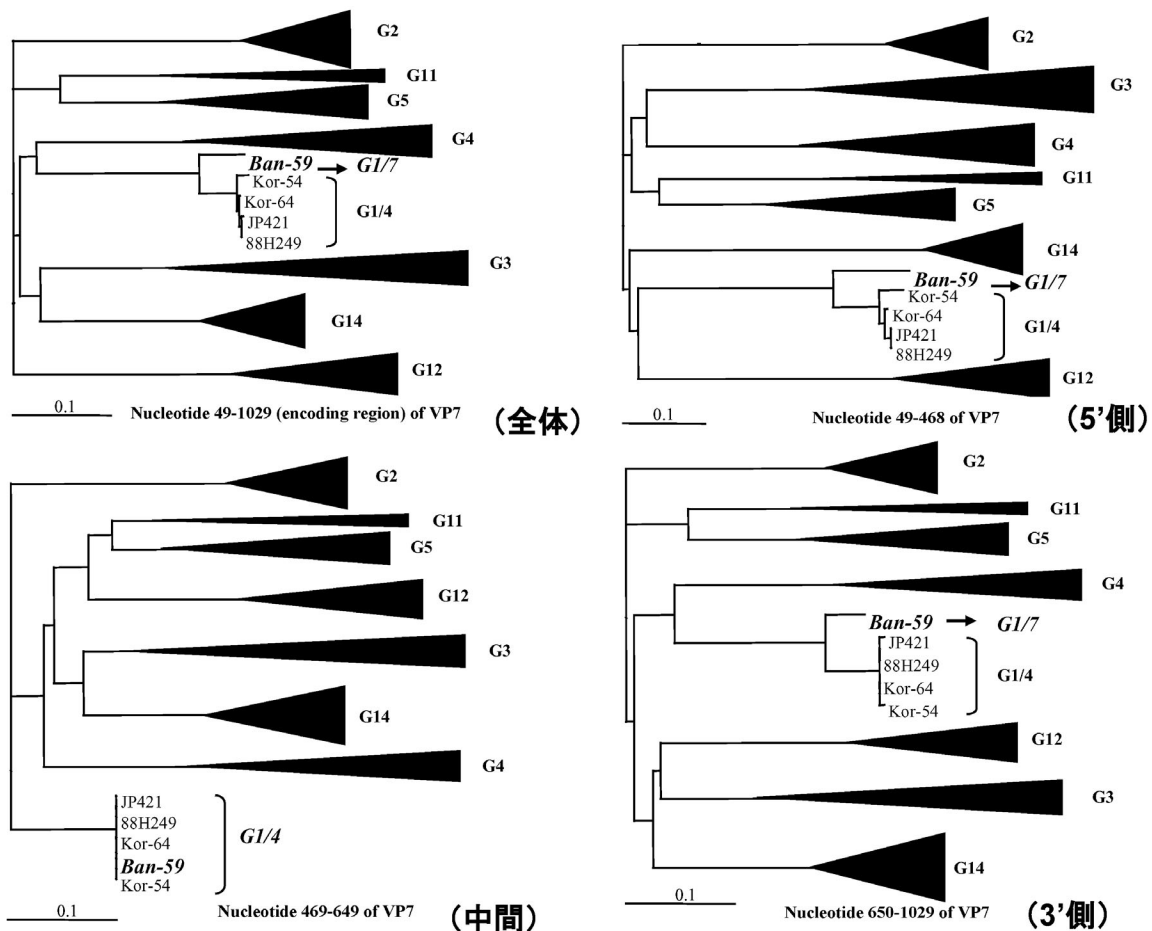


図6 ロタウイルス G1 内の組換え

疫学

a. 原因ウイルス検出頻度

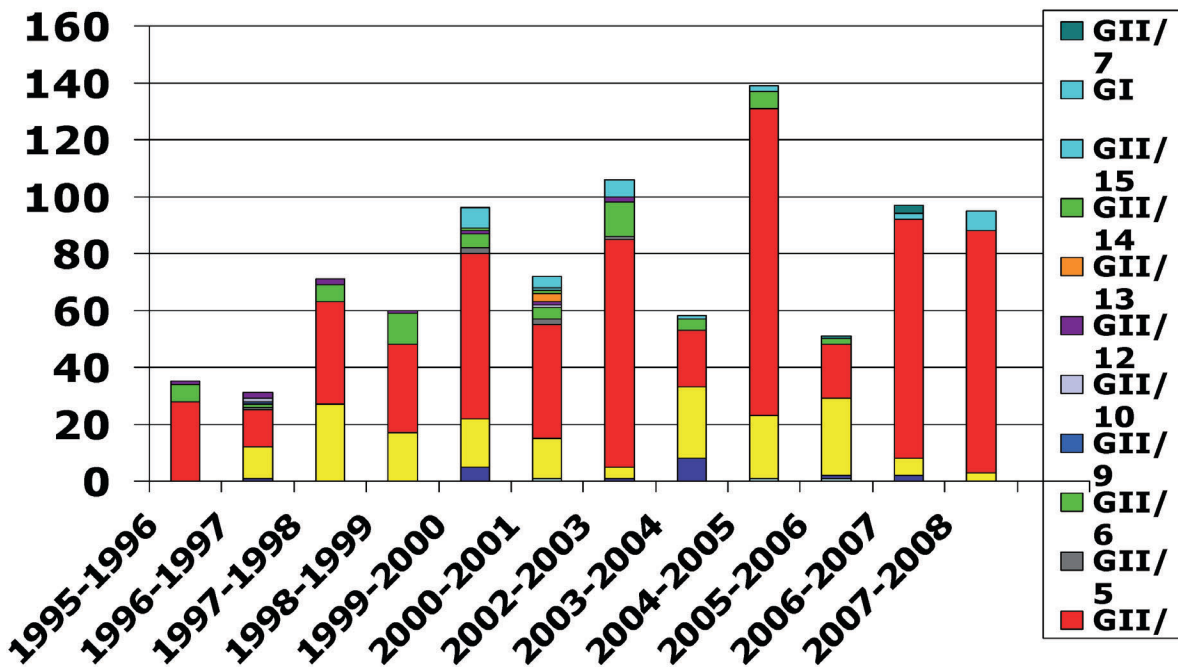
われわれは全国5か所の小児科クリニックにおいて臨床的にウイルス性胃腸炎と診断された糞便検体を用い multiplex RT-PCR 法で検出率を調べた。2007年7月から2008年6月の1年間ではウイルス検出率は48%，そのうちロタウイルス17%（A群16%，C群1%），ノロウイルス18%（GI 1%，GII 17%），サポウイルス3%，アデノウイルス2%，ヒトパレコウイルス5%，ヒトボカウイルス1%，ウイルス混合感染2%であった。2006年7月から2007年6月の1年間ではウイルス検出率は46%，そのうちロタウイルス20%（A群20%），ノロウイルス16%（GII 16%），サポウイルス4%，アデノウイルス5%，アストロウイルス2%，ウイルス混合感染2%であった。しかし病因で述べたすべてのウイルスを調べることは難しく，ウイルス性胃腸炎と臨床的に判断しても不明が30～50%を占めた。一方，最近ヒトパレコウイルスまたはヒトボカウイルスが頻度で3，4位を示すことがあるという^{38,42)}。

ここに述べた個々のウイルスは群，血清型・遺伝子型に分かれ，さらに亜型・クラスターに分けられるが年，地域などによってその割合が異なる⁶¹⁾。感染の成立には伝播様式，宿主の免疫などと共にウイルスの変異が大きく関係する。以下，この稿での1年間は7月から翌年の6月までを意味する。

b. ロタウイルスの疫学

b-1. 用いる方法

ロタウイルスの分子疫学を考える場合，11本のdsRNAに注目しRNA-ポリアクリルアミドゲル泳動法での電気泳動パターン（泳動型）を他の株と比較することから始まった^{62,63)}。さらに放射性標識あるいは蛍光標識ウイルス遺伝子（またはその部分遺伝子）とのハイブリダイゼーションの割合を見ることによって株間あるいは遺伝子間の相同性を見た^{64,65)}。現在では遺伝子およびアミノ酸配列で比較するようになった。一方，糞便中あるいは培養ロタウイルスと，ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を用いた抗原抗体反応（ELISA）によるG血清型別がなされた⁶⁶⁾。



註) 2003-2004および2005-2006のGII/3はポリメラーゼ領域は、それぞれGII/4とGIIbである組換えウイルス
2004-2005、2006-2007および2007-2008のGII/4はカプシド内配列の異なるクラスター

図7 わが国の小児科外来における年ごとのノロウイルスゲノタイプの頻度

G 遺伝子型は Gouvea らにより G 遺伝子全体を増幅した後に seminested PCR 法により行われた⁶⁷⁾。また P 遺伝子は Gentsch らにより同様に始められた⁶⁸⁾。ロタウイルス陽性とされた検体で Gouvea らのプライマーでは G 遺伝子型が決められないことがあり、新しいプライマーが考案された⁶⁹⁾。

b-2. 遺伝子型

季節性として我々が調べたロタウイルスの流行を図3に示す。1980年代は12月～1月にピークがあったが次第に遅れ2～4月になってきた⁷⁰⁾。図4にはG血清型/遺伝子型の変動を示す。2000年のころ、今まで90%ぐらいを示していたG1が一時的に減少したが数年後には再度増加した。その間はG3の割合が増加した⁷¹⁾。これらのG1,G3はP[8]である。この4年間のG、P遺伝子型を見てみると2003-2004年はG3P[8]で、2004-2005年、2005-2006年、2006-2007年はG1P[8]であった。広く世界をみると四季がはっきりしている国では冬季を中心に見られるが、季節性のない国では一年を通して見られ、時には雨季、乾季の2回みられることがある。

b-3. 亜型

ロタウイルスのG、P遺伝子型はPCR産物を遺伝子解析することによりさらに情報が得られる。G遺伝子は1062塩基数であることから全塩基の比較がされている。図5には

我々のデータをもとにG1の系統樹を示した。この図で見られるように、枝分かれした集団として lineage 1-4に分けることができる⁷²⁾。2006年の日本の下痢便からのロタウイルスは lineage 1 と 3 に属していた。またベトナムの2003年、中国の2002年は lineage 3ではあるが日本の2006年と少し異なった枝であった⁷²⁾。このように年、国によっても異なっている。また図の右にあるように日本の1980年から1993年の検体は lineage 1であったし、2003、2005年は lineage 3であった。動物のG1ロタウイルスを含めて系統樹を書くと lineage はとりあえず11まで存在した⁷³⁾。これらの変化は点変異の集合と解釈できる。

b-4. ロタウイルスのリアソートメント

ロタウイルスは分節になっていることから2つの異なった遺伝子をもつロタウイルスに同時感染すると計算上では分節が再集合したウイルスが新しく出現する可能性がある。ワクチン用のヒトとウシおよびサルとの再集合ウイルスは人工的に作ったウイルスである。自然界でも同様なことが起きる。我々が経験したロタウイルス株は(1)タイで見出した2001年のG3P[3]を有する株で、G3はサルロタウイルス様遺伝子、P[3]はヤギロタウイルス様遺伝子、VP6はサルロタウイルス様遺伝子、NSP4はヤギロタウイルス様遺伝子であった²⁷⁾。(2)タイで見出した2004年のG3P[9]を有する株のG3はヒトロタウイルス遺伝子、P[9]はAU-1

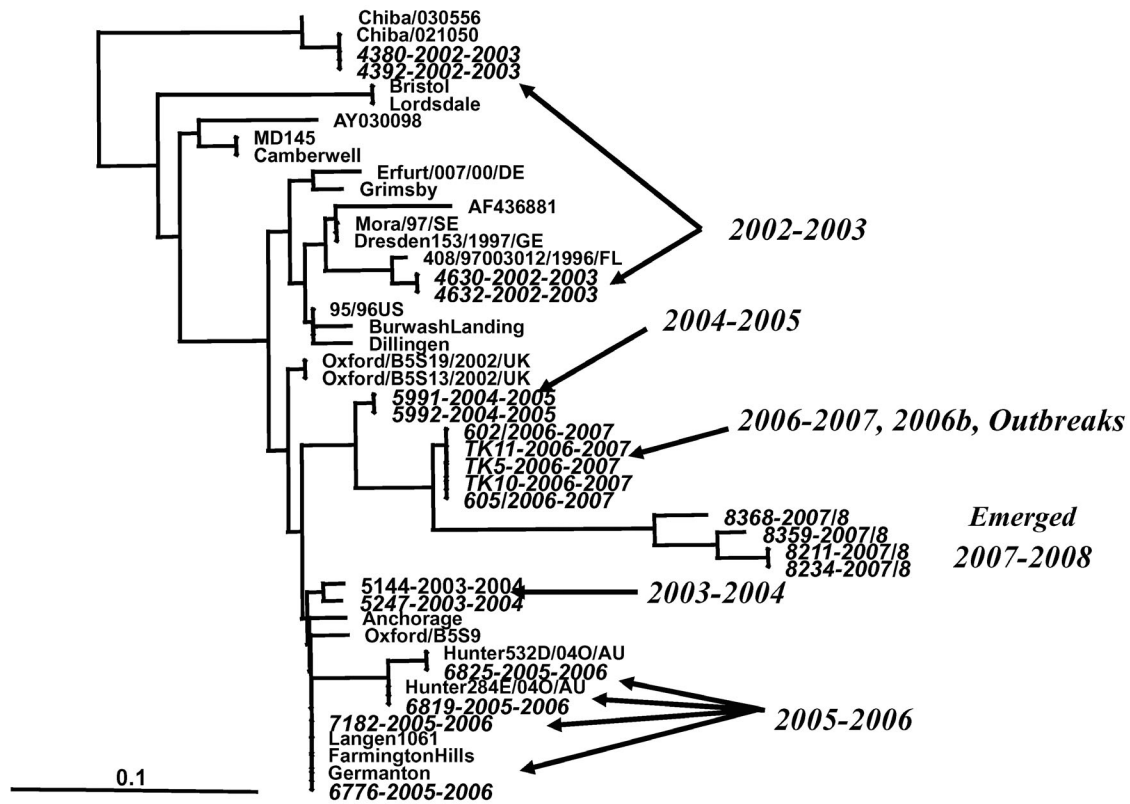


図8 日本のノロウイルス GII/4 の年次変化 (2002-2008)

様遺伝子であった⁷⁴⁾。(3) またベトナムでの2002-2003年のG4P[6]は、G4はブタロタウイルス様株であり、P[6]もブタロタウイルス様株であった²⁶⁾。(4) G3P[10]ロタウイルス株はG3はCMH22というヒトでは通常ない配列を示し、P[10]も69Mというユニークな株を示していた⁷⁵⁾。

b-5. リコンビネーション

図6にはVP7遺伝子内の組み換えを示すBan-59株について述べる。この株は、全シーケンスを見るとG1でlineage7であるが、3つの部分に分けると5'末端側(49-468)はlineage7、中央部(469-649)はlineage4、3'末端側(650-1029)はlineage7であった⁷⁶⁾。このようなリコンビナントの株がどのようにして生じたか、どのような頻度で見られるか、今後どう変わるかについては明らかではない。

c. アデノウイルス

c-1. 用いる方法

以前は細胞培養し、そのウイルスと抗体の反応から診断あるいは型を決めていた²⁸⁾。次に培養あるいは糞便中のウイルスを精製し、DNAを幾つかの制限酵素で切断しその電気泳動型から型を決めていた^{29,77)}。現在では遺伝子増幅法と免疫学的方法を用いている。免疫学的方法はイムノクロ

マト法およびEIA法がある⁴⁹⁾。遺伝子診断にはヘキソンあるいはファイバー部分の遺伝子増幅を行い、分子疫学には更にPCR産物の制限酵素での切断や遺伝子解析を行う。

c-2. 遺伝子型

胃腸炎にはF群の40、41型が関係し、1980年代は40型が主流であったが現在は41型である。しかしながら31型や通常の呼吸器アデノウイルスも下痢を伴うことがある⁷⁸⁾。またヒト以外の動物(ネコ)アデノウイルスがヒトに感染したことを示すことがある⁷⁹⁾。

c-3. 亜型

ペントンあるいはファイバーの遺伝子解析あるいは制限酵素での解析からアデノウイルス41型はさらに分類ができる²⁹⁾。2つの亜型とともに制限酵素による切断片泳動型から、わが国の1998-2001年でアデノウイルス41ではD12、D26、D27が主に見られた。国によっては違いがあった。アデノウイルスでは自然界でのリコンビナントウイルスについての報告はない。

d. ノロウイルス

d-1. 用いる方法

近年イムノクロマト法が開発された^{50,51)}。疫学としては遺伝子解析を視野に入れた遺伝子診断法が有用である^{52,53)}。

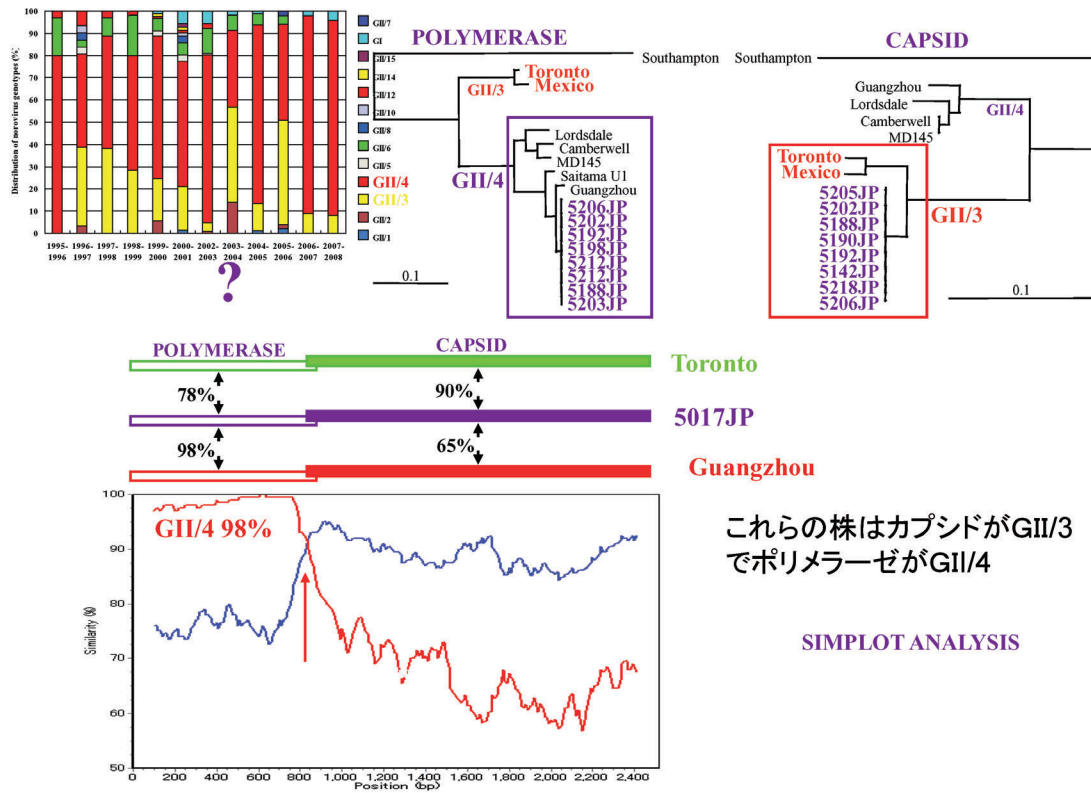


図9 リコンビナント NoVGII/3 2003-2004, JAPAN

ヒトの場合は GI,GII,GIV である。検出感度を上げるために nested PCR あるいは real time PCR を行う⁸⁰⁾。通常ポリメラーゼ領域を含んだカプシドの 5' 末端側を遺伝子診断および遺伝子解析による遺伝子型別に用いる。

d-2. 遺伝子型

Jiang らが最初に全塩基配列を決定したのは GI に属する株であった¹³⁾。われわれの有する 1995 年からの年度別の遺伝子型を図 7 に示す。われわれがノロウイルスと診断した検体数を縦軸に取った。必ずしもその年の流行の数を示しているわけではない。割合を見てもらうと 2005-2006 年を除くと GII/4 がすべての年を通して多い。しかしながら 2005-2006 年は GII/3 が GII/4 を超えて見られた。また 1999-2000 および 2003-2004 年は GII/2 も見られた。1995-2001 と 2002-2007 年の下痢便 6256 中、ノロウイルスは 815 検体 (13%) である。GII/4 が 63%, GII/3 が 21%, GII/6 が 7%, GII/2 が 2%, GI/1 が 1%, GII/12 が 1% でそれ以外には 1% 以下で GI/3,GI/4, GI/8,GI/11, GII/1, GII/5, GII/7, GII/9, GII/10, GII/13, GII/14, GII/15 などが見い出された^{80,81)}。

d-3. 亜型

ロタウイルスやその他のウイルスと同様にノロウイルスでも複製の途中での読み誤りによって点変異がおりそれ

が流行することがある。図 8 には日本のノロウイルスの 2002 年から 2008 年の GII/4 株のキャプシド領域 5' 末端側の年次変異を示している。この図でわかるように年次ごとにクラスターを作っていることがわかる。2006 - 2007 年のノロウイルスの流行の時には、ヨーロッパで流行した 2006b が日本でも半年から 1 年遅れで全国に広がった。2004-2005, 2006-2007 および 2007-2008 の GII/4 はカプシド内配列の異なるクラスターが主流として見られる^{31,82,83)}。

d-4. リコンビネーション

カリシウイルスは一本鎖の RNA ウイルスであり、5' 末端側に非構造蛋白を司る部位と 3' 側にカプシド蛋白を司る部位がある。2 つあるいは 3 つの ORF があり、その 5' 側は遺伝子配列が類似する。したがって 2 つの異なったカリシウイルスが同時に感染をうけると、たとえば A (A1+A2), B (B1+B2) とすると A1B2 (A1+B2) や B1A2 (B1+A2) の組換えウイルスができる。ノロウイルスは 3 つの ORF からなり、ORF1 と ORF2 の交差するところで組換えが生じる。2003-2004 年のノロウイルス主流はカプシド領域は GII/3 であるがポリメラーゼ領域は GII/4 に属していた^{31,82)} (図 9)。また 2005-2006 の主流はカプシドが GII/3 であるがポリメラーゼ領域は GIIb の組換えウイルスであった⁸³⁾。このようなリコンビネーションは報告が既にされている⁴⁵⁾。

多くは遺伝子型間 (intergenotype) で見られるが, さらに遺伝子型内 (intra-genotype) や遺伝子群間 (intergenogroup) でも見られる^{31,45,82,84)}.

e. サポウイルス

e-1. 用いる方法

ノロウイルス同様, 診断で標準的な方法としては遺伝子増幅法がある⁵⁷⁾. サポウイルスのイムノクロマト法はまだ作られていない. 遺伝子診断法がその後の解析のために有用である. ヒトの場合 GI, GII, GIV, GV がある³⁰⁾. 検出感度を上げるためには nested PCR あるいは real time PCR を行う⁵⁴⁾.

e-2. 遺伝子型

ヒトに関するサポウイルスは GI から GV の遺伝子群の中で GI, GII, GIV, GV である. 我々が行った 2007-2008 年の我が国でのサポウイルスの状況で, 下痢便 493 検体の内サポウイルス陽性 19 例のうち遺伝子型は GI/1 が 1 (5%), GI/4 が 3 (16%) まとめると GI が 4 (21%), GIV が 15 (79%) に見られた. その前の 2006-2007 年では 628 下痢便検体中 24 検体 (3.8%) がサポウイルス陽性, その中 GI/1 が 22 検体 (92%), GI/2 が 2 検体 (8%) であった. すなわちすべてが GI であった. この年には GIV は見られなかった. GI, GII は少なくとも 4 つの遺伝子型に分けられている^{85, 86)}.

e-3. 亜型

サポウイルスもノロウイルスと同様に遺伝子型はクラスターに分けられる.

e-4. リコンビネーション

ノロウイルスとおなじくリコンビネーションが報告されている.

カプシドが GII/4 でポリメラーゼが GII/1 の intergenotype リコンビネーションがあった⁸⁵⁾. また GI/1 の intra-genotype リコンビネーションを見出した^{87, 88)}. さらにカプシドは GIV でポリメラーゼは GII である intergenogroup のリコンビネーションを見出した⁸⁹⁾.

f. アストロウイルス

RT-PCR 法でアストロウイルスの遺伝子診断^{35,54)}をし, さらに遺伝子型 (血清型) を行う multiplex PCR により遺伝子型がわかる⁹⁰⁾. さらに遺伝子型内の亜型などを決めるためには遺伝子解析を行う⁹⁰⁾.

1~8 の遺伝子型が存在するが 1 型が一番多い. 系統樹で 1~8 とは離れた MLB1 株が発見された⁹¹⁾. 診断には遺伝子診断とともに免疫型診断法 (ラテックス凝集法⁹²⁾, 酵素抗体法⁹³⁾, イムノクロマト法 (イムノプローブ社, 日本) が用いられる. 3 型と 5 型の組換えウイルスが見出された⁹⁴⁾.

g. ヒトパレコウイルスとアイチウイルス

ピコウイルス科ウイルスは Vero あるいは Hela 細胞の細胞培養で分離が従来なされ, 同時にパネルの抗血清を用いて型別がなされた. ヒトパレコウイルスはウイルスの増殖が困難なこと, 1~3 型の抗血清のみが入手しやすいことから 1~14 型までを考えると遺伝子診断が望まれる³⁵⁻³⁸⁾. ヒトパレコウイルスの診断には 5' 末端側の非翻訳部分の遺伝子増幅法を用いる. さらに抗原決定基の VP1 領域の遺伝子解析をして行うのが一般的である. 抗原性の変化を見るためにはカプシド部分の解析も行う^{95,96)}. われわれが行った日本の糞便検体からは, 1 型が, タイの糞便検体からは, 1, 2, 3, 4 型が検出された. Ito らはわが国で 1, 2, 3, 4, 6 型を見出している^{97,98)}. パレコウイルスは株の蓄積をさらに進め, それを解析することによって進化の方向性を考えることが可能と思われる. また VP1 と 3Dpol 領域を遺伝子解析し intergenotypic リコンビネーションを報告している^{99, 100)}.

アイチウイルスは小児のウイルス性胃腸炎の中で占める頻度は少ないがアジアの国々でも見出すことができる. われわれは Yamashita らの方法に従ってアイチウイルスの検出をおこなった¹⁷⁾. 現在 A と B の genotype に分かれておりカプシドおよび CD 領域の解析で調べた範囲ではわが国, タイの株は A に属し, バングラデシュの株は B に属していた^{101, 102)}. 現時点ではアイチウイルスのリコンビネーションはまだ見出されていないようである.

h. ヒトボカウイルス

ヒトボカウイルスは既に述べたように呼吸器感染で注目されている⁴⁰⁻⁴²⁾ が, 胃腸炎ウイルスとしても考えられている. 糞便検査により胃腸炎児で 17%, 健常児で約 8% に見いだされ⁴²⁾, 病態としては重症ではないように思われる. ボカウイルスと他のウイルスの混合感染も考えなければならない. ヒトボカウイルスは 1~3 型が見出されている. われわれは日本の乳幼児の約 2% の下痢便にボカウイルスを見出している. ヒトボカウイルス 2 に variant 型があり, 他の型とのリコンビネーションが推測された¹⁰³⁾.

今後の展望

ウイルス性下痢症の診断法および疫学の進展が見られたものの, ワクチンはロタウイルスのみが市販され, 治療については特異的なものがない. 疫学では流行株の予測, 季節変動と流行の理由, 感染経路の解明と感染拡大防止, 体内での病態と合併症, ロタウイルスワクチン使用によるロタウイルスの疫学変動が考えられる. 診断法では, 診断法でつかない未知ウイルスに対しての戦略, より微量なウイルスを測定するための抽出・増幅・確認法, 網羅的な診断法, 安価な迅速診断法の開発, そしてヒトのノロウイルス・サポウイルス・ボカウイルスの細胞培養法の開発があげられ

る。さらにウイルス性下痢症での死亡を減らすための途上国への協力が必要と思われる。

終りに

私の分子疫学の研究は1978～1982年の米国アラバマ大学でのブニヤウイルスに始まる。その後帝京大学小児科時代から下痢症ウイルスの、そして更に国立予防衛生研究所からHIVの研究を行ない現在となっている。その中でロタウイルスのRNA-PAGEから始まり今の遺伝子解析に至る分子疫学、ノロウイルスのVLP(ウイルス様粒子)とイムノクロマト法の開発等々ウイルス性下痢症を中心に行ってきた。多くの国内外の研究者と会う良い機会ともなった。わが国の先人が行ってきたウイルス分離の技術は今後も継承されなければならないし、新しいウイルスの発見にもチャレンジが必要と思っている。

謝辞

これらの研究は、西尾治、沖津祥子、Khamrin Pattara, Maneekarn Niwat氏等の国内外の研究者、長年糞便検体を採取していただいた西村修一氏等の臨床医および国内外の大学院生等と共に行われた。

文献

- 1) Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE: WHO Child Health Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 365(9465):1147-1152, 2005.
- 2) WHO: World Health Statistics Report 20008. http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS08_Full.pdf
- 3) Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI: Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 9:565-572, 2003.
- 4) Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI: Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12:304-306, 2006.
- 5) Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD: Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 14: 1224-1231, 2008.
- 6) Bresee J, Fang ZY, Wang B, Nelson EA, Tam J, Soenarto Y, Wilopo SA, Kilgore P, Kim JS, Kang JO, Lan WS, Gaik CL, Moe K, Chen KT, Jiraphongsa C, Ponguswana Y, Nguyen VM, Phan VT, Le TL, Hummelman E, Gentsch JR, Glass R: Asian Rotavirus Surveillance Network. First report from the Asian Rotavirus Surveillance Network. *Emerg Infect Dis* 10:988-995, 2004.
- 7) Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM: Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 10:1075-1081, 1972.
- 8) Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ: Evidence for viral gastroenteritis. *New Eng J Med* 289: 1096-1097, 1973.
- 9) Madeley CR, Cosgrove BP: Viruses in infantile gastroenteritis. *Lancet* 2(7925): 124, 1975.
- 10) Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Horino K, Nakao T, Fukui S: An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *J Med Virol* 4:249-254, 1979.
- 11) Sato K, Inaba Y, Shinozaki T, Fujii R, Matumoto M: Isolation of human rotavirus in cell cultures: brief report. *Arch Virol* 69:155-160, 1981.
- 12) Kapikian AZ, Flores J, Hoshino Y, Glass RI, Midthun K, Gorziglia M, Chanock RM: Rotavirus: the major etiologic agent of severe infantile diarrhea may be controllable by a "Jennerian" approach to vaccination. *J Infect Dis* 153:815-822, 1986.
- 13) Jiang X, Graham DY, Wang KN, Estes MK: Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science*; 250: 1580-1583, 1990.
- 14) 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.
- 15) Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK: Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 66:6527-6532, 1992.
- 16) Tian P, Hu Y, Schilling WP, Lindsay DA, Eiden J, Estes MK: The nonstructural glycoprotein of rotavirus affects intracellular calcium levels. *J Virol* 68:251-257, 1994.
- 17) Yamashita T, Sakae K, Ishihara Y, Isomura S, Utagawa E: Prevalence of newly isolated, cytopathic small round virus (Aichi strain) in Japan. *J Clin Microbiol* 31:2938-2943, 1993.
- 18) Ball JM, Estes MK, Hardy ME, Conner ME, Opekun AR, Graham DY: Recombinant Norwalk virus-like particles as an oral vaccine. *Arch Virol Suppl* 12:243-249, 1996.
- 19) Marionneau S, Ruvoën N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, Huang P, Jiang X, Le Pendu J: Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology*. 122:1967-1977, 2002.
- 20) Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S: Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol* 143:1215-1221, 1998.
- 21) Estes ME, Kapikian AZ: Rotaviruses, in *Fields Virology*. pp 1917-1974. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA, 2007.
- 22) Santos N, Hoshino Y: Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 15: 29-56, 2005.
- 23) Yang H, Chen S, Ji S: A novel rotavirus causing large scale of adult diarrhea in Shi Jiazhuang. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 19:336-338, 1998.
- 24) Matthijnsens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H,

- Bányai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Patton JT, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Desselberger U, Van Ranst M: Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol* 153:1621-1629, 2008.
- 25) Solberg OD, Hasing ME, Trueba G, Eisenberg JN. Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus. *Virology* 385: 58-67, 2009.
 - 26) Nguyen TA, Khamrin P, Trinh QD, Phan TG, Pham le D, Hoang le P, Hoang KT, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H: Sequence analysis of Vietnamese P[6] rotavirus strains suggests evidence of interspecies transmission. *J Med Virol* 79: 1959-1965, 2007.
 - 27) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H: Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J Med Virol* 78:986-994, 2006.
 - 28) Wold WSM, Horwitz MS. Adenovirus. in *Filds Virology* pp2395-2436, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA, 2007.
 - 29) Li L, Dian LT, Tung PG, Okitsu S, Nishio O, Suzuki E, Seo JK, Kim KS, Müller WE, Ushijima H: Characterizations of adenovirus type 41 isolates from children with acute gastroenteritis in Japan, Vietnam, and Korea. *J Clin Microbiol* 42: 4032-4039, 2004.
 - 30) Green KY. *Caliciviridae: The noroviruses*. in *Filds Virology* 949-979, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA, 2007.
 - 31) Phan TG, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Takanashi S, Okitsu S, Ushijima H: Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in norovirus. *J Med Virol* 79: 1388-1400, 2007.
 - 32) Farkas T, Zhong WM, Jing Y, Huang PW, Espinosa SM, Martinez N, Morrow AL, Ruiz-Plalacios GM, Pickering LK, Jiang X: Genetic diversity among sapovirus. *Arch Virol* 149: 1309-1323, 2004.
 - 33) Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Yagyu F, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H: Viral etiology and incidence of acute gastroenteritis in a day care center. *J Med Virol* 77: 595-601, 2005.
 - 34) Okada M, Yamashita Y, Oseto M, Ogawa T, Kaiho I, Shinozaki K: Genetic variability in the sapovirus capsid protein. *Virus Genes* 33: 157-161, 2006.
 - 35) Méndez E, Arias CF. Astroviruses. in *Filds Virology* 981-1000, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA, 2007.
 - 36) Hyypiä T, Horsnell C, Maaronen M, Khan M, Kalkkinen N, Auvinen P, Kinnunen L, Stanway G: A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci US A*. 89:8847-8851, 1992.
 - 37) Oberste MS, Maher K, Pallansch MA: Complete sequence of echovirus 23 and its relationship to echovirus 22 and other human enterovirus. *Virus Res* 56: 217-223, 1998.
 - 38) Benschop K, Thomas X, Serpenti C, Molenkamp R, Wolthers KF: High prevalence of human parechovirus genotypes in the Amsterdam region and the identification of specific HPeV variants by direct genotyping of stool samples. *J Clin Microbiol* 46: 3965-3970, 2008.
 - 39) Pham NT, Trinh QD, Nguyen TA, Dey SK, Phan TG, Hoang le P, Khamrin P, Maneekarn N, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H: Development of genotype-specific primers for differentiation of genotypes A and B of Aichi viruses. *J Virol Methods* 156(1-2):107-110, 2009.
 - 40) Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B: Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 12891-12896, 2005.
 - 41) Lee JI, Chung JY, Han TH, Song MO, Hwang ES: Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis. *J Infect Dis* 196: 994-997, 2007.
 - 42) Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM: A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog* 5 : e1000391, 2009.
 - 43) Clark B, McKendrick M: A review of viral gastroenteritis *Curr Opin Infect Dis* 17: 461-469, 2004
 - 44) Pereira HG, Fialho AM, Flewett TH, Teixeira JM, Andrade ZP: Novel viruses in human faeces. *Lancet* 2: 103-104, 1988.
 - 45) Bull RA, Tanaka MM, White PA: Norovirus recombination. *J Gen Virol*. 88(Pt 12):3347-3359, 2007.
 - 46) Xu L, Harbour D, McCrae MA: The application of polymerase chain reaction to the detection of rotaviruses in faeces. *J Virol Methods* 27:29-37, 1990.
 - 47) Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY: Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 28:276-82, 1990.
 - 48) Yolken R, Wilde J: Assays for detecting human rotavirus. In Kapikian AZ ed. *Viral Infections of the gastrointestinal tract*. pp251-278, 2nd ed. New York, 1994.
 - 49) 牛島廣治, 沖津祥子: ロタウイルス, アデノウイルス, ノロウイルス感染症の迅速診断キット. *小児科臨床* 61 : 203-209, 2008.
 - 50) Nguyen TA, Khamrin P, Takanashi S, Le Hoang P, Pham le D, Hoang KT, Satou K, Masuoka Y, Okitsu S, Ushijima H: Evaluation of immunochromatography tests for detection of rotavirus and norovirus among Vietnamese children with acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GII.4 variant. *J Trop Pediatr* 53:264-269, 2007.
 - 51) Khamrin P, Takanashi S, Chan-It W, Kobayashi M, Nishimura S, Katsumata N, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H. Immunochromatography test for rapid detection of norovirus in fecal specimens. *J Virol Methods* 157:219-222, 2009.
 - 52) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Nor-

- walk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR *J Clin Microbiol* 41:1548-1557,2003.
- 53) Fisman DN, Greer AL, Brouhanski G, Drews SJ: Of gastro and the gold standard: evaluation and policy implications of norovirus test performance for outbreak detection. *J Transl Med*: 7:23, 2009.
 - 54) Logan C, O'Leary JJ, O'Sullivan N: Real-time reverse transcription PCR detection of norovirus, sapovirus and astrovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis. *J Virol Methods* 146: 36-44, 2007.
 - 55) Yoda T, Suzuki Y, Yamazaki K, Sakon N, Kanki M, Aoyama I, Tsukamoto T: Evaluation and application of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of noroviruses. *J Med Virol* 79:326-334, 2007. Erratum in: *J Med Virol* 79:863, 2007.
 - 56) Greene SR, Moe CL, Jaykus LA, Cronin M, Grosso L, Aarle P: Evaluation of the NucliSens Basic Kit assay for detection of Norwalk virus RNA in stool specimens *J Virol Methods* 108:123-131, 2003.
 - 57) Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H: Detection of norovirus (GI, GII), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J Virol Methods* 114:37-44, 2003.
 - 58) Beuret C: Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 115:1-8, 2004.
 - 59) Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, Ando T, Glass RI, Monroe SS: Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J Clin Microbiol* 44:1405-1412, 2006.
 - 60) Santos N, Honma S, Timenetsky Mdo C, Linhares AC, Ushijima H, Armah GE, Gentsch JR, Hoshino Y. Development of a microtiter plate hybridization-based PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for identification of clinically relevant human group A rotavirus G and P genotypes. *J Clin Microbiol* 46:462-469, 2008.
 - 61) Pham NT, Trinh QD, Khamrin P, Nguyen TA, Dey SK, Phan TG, Hoang le P, Maneekarn N, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H: Sequence analysis of the capsid gene of Aichi viruses detected from Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam. *J Med Virol* 80:1222-1227, 2008.
 - 62) Albert MJ, Soenarto Y, Bishop RF: Epidemiology of rotavirus diarrhea in Yogyakarta, Indonesia as revealed by electrophoresis of genome RNA. *J Clin Microbiol* 14: 123-129, 1982.
 - 63) Ushijima H, Kim B, Tajima T, Araki K, Yoshino K, Shinozaki T, Fujii R: Epidemiology of rotavirus infection in Tokyo during two winter seasons, as revealed by analyses of recovered viral RNA. *Eur J Pediatr* 142: 71-72, 1984.
 - 64) Nakagomi O, Nakagomi T: Molecular epidemiology of human rotaviruses: genogrouping by RNA-RNA hybridization. *Arch Virol Suppl* 12:93-98,1996.
 - 65) Lovmar L, Fock C, Espinoza F, Bucardo F, Syvänen AC, Bondeson K: Microarrays for genotyping human group A rotavirus by multiplex capture and type-specific primer extension. *J Clin Microbiol* 41:5153-5158, 2003.
 - 66) Taniguchi K, Urasawa T, Morita Y, Greenberg HB, Urasawa S: Direct serotyping of human rotavirus in stools by an enzyme-linked immunosorbent assay using serotype 1-, 2-, 3-, and 4-specific monoclonal antibodies to VP7. *J Infect Dis* 155:1159-1166, 1987.
 - 67) Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY: Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 28:276-282,1990.
 - 68) Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK: Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction *J Clin Microbiol* 30:1365-1373,1992.
 - 69) Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, Kumar R, Bhan MK, Glass RI: Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol* 32:1820-1822, 1994.
 - 70) Zhou Y, Li L, Kim B, Kaneshi K, Nishimura S, Kuroiwa T, Nishimura T, Sugita K, Ueda Y, Nakaya S, Ushijima H: Rotavirus infection in children in Japan. *Pediatr Int* 42:428-439, 2000.
 - 71) Yoshinaga M, Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Müller WE, Ushijima H: Changing distribution of group A rotavirus G-types and genetic analysis of G9 circulating in Japan. *Arch Virol* 151:183-192,2006.
 - 72) Trinh QD, Nguyen TA, Phan TG, Khamrin P, Yan H, Hoang PL, Maneekarn N, Li Y, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H: Sequence analysis of the VP7 gene of human rotavirus G1 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam in the context of changing distribution of rotavirus G-types. *J Med Virol* 79:1009-1016, 2007.
 - 73) Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H: Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan. *J Virol* 81:4645-4653, 2007.
 - 74) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Tonusin S, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H: Molecular characterization of rare G3P[9] rotavirus strains isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis. *J Med Virol* 79:843-851, 2007.
 - 75) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Malasao R, Thongprachum A, Chan-It W, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of VP4, VP6, VP7, NSP4, and NSP5/6 genes identifies an unusual G3P[10] human rotavirus strain. *J Med Virol* 81:176-182, 2009.
 - 76) Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H: Evidence of intragenic recombination in G1 rotavirus VP7 genes. *J Virol* 81:10188-10194, 2007.
 - 77) Shimizu H, Phan TG, Nishimura S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H: An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with

- acute gastroenteritis in Maizuru City, Japan. *Infect Genet Evol* 7:279-284, 2007.
- 78) Li L, Phan TG, Nguyen TA, Kim KS, Seo JK, Shimizu H, Suzuki E, Okitsu S, Ushijima H: Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. *Microbiol Immunol* 49:121-128, 2005.
 - 79) Phan TG, Shimizu H, Nishimura S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H: Human adenovirus type 1 related to feline adenovirus: evidence of interspecies transmission. *Clin Lab* 52:515-518, 2006.
 - 80) Phan TG, Khamrin P, Akiyama M, Yagyu F, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H: Detection and genetic characterization of norovirus in oysters from China and Japan. *Clin Lab* 53:405-412, 2007.
 - 81) Okame M, Akihara S, Hansman G, Hainian Y, Tran HT, Phan TG, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H: Existence of multiple genotypes associated with acute gastroenteritis during 6-year survey of norovirus infection in Japan. *J Med Virol* 78:1318-1324, 2006.
 - 82) Phan TG, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Okitsu S, Ushijima H: Multiple recombinant noroviruses in Japan. *Clin Lab* 53:567-570, 2007.
 - 83) Phan TG, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Nishimura T, Yagyu F, Okitsu S, Müller WE, Maneekarn N, Ushijima H: Changing distribution of norovirus genotypes and genetic analysis of recombinant GIIB among infants and children with diarrhea in Japan. *J Med Virol* 78:971-978, 2006.
 - 84) Nayak MK, Balasubramanian G, Sahoo GC, Bhat-tacharya R, Vinje J, Kobayashi N, Sarkar MC, Bhat-tacharya MK, Krishnan T: Detection of a novel intergenogroup recombinant Norovirus from Kolkata, India. *Virology* 377:117-123, 2008.
 - 85) Nguyen TA, Hoang L, Pham le D, Hoang KT, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H: Norovirus and sapovirus infections among children with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City during 2005-2006. *J Trop Pediatr* 54:102-113, 2008.
 - 86) Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H: Emergence of rare sapovirus genotype among infants and children with acute gastroenteritis in Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26:21-27, 2007.
 - 87) Phan TG, Yan H, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Müller WE, Ushijima H: Novel intragenotype recombination in sapovirus. *Clin Lab* 52:363-366, 2006.
 - 88) Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H: Emergence of intragenotype recombinant sapovirus in Japan. *Infect Genet Evol* 7:542-546, 2007.
 - 89) Chanit W, Thongprachum A, Khamrin P, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H: Intergenogroup recombinant sapovirus in Japan, 2007-2008. *Emerg Infect Dis* 2009 in press.
 - 90) Sakamoto T, Negishi H, Wang QH, Akihara S, Kim B, Nishimura S, Kaneshi K, Nakaya S, Ueda Y, Sugita K, Motohiro T, Nishimura T, Ushijima H: Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1 to 8). *J Med Virol* 61:326-331, 2000.
 - 91) Finkbeiner SR, Le BM, Holtz LR, Storch GA, Wang D: Detection of newly described astrovirus MLB1 in stool samples from children. *Emerg Infect Dis* 15:441-444, 2009.
 - 92) Komoriya T, Kohno H, Kimura A, Ushijima H: The development of sensitive latex agglutination tests for detecting astroviruses (serotypes 1 and 3) from clinical stool specimen. *Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shin-dan Kenkyukai Shi*. 13:103-114, 2003.
 - 93) Herrmann JE, Nowak NA, Perron-Henry DM, Hudson RW, Cubitt WD, Blacklow NR: Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 161:226-229, 1990.
 - 94) Walter JE, Briggs J, Guerrero ML, Matson DO, Pickering LK, Ruiz-Palacios G, Berke T, Mitchell DK: Molecular characterization of a novel recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children. *Arch Virol* 146:2357-2367, 2001.
 - 95) Joki-Korpela P, Roivainen M, Lankinen H, Pöyry T, Hyypiä T: Antigenic properties of human parechovirus 1. *J Gen Virol* 81: 1709-1718, 2000.
 - 96) Benschop KS, Schinkel J, Minnaar RP, Pajkrt D, Spanjerberg L, Kraakman HC, Berkhout B, Zaaijer HL, Beld MG, Wolthers KC: Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. *Clin Infect Dis* 42:204-210, 2006.
 - 97) Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda N, Sakae K: Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J Gen Virol* 85:391-398, 2004.
 - 98) 伊藤 雅, 山下照夫, 皆川洋子: ヒトパレコウイルス. 最近注目される微生物 臨床と微生物 36 : 351-356, 2009.
 - 99) Benschop KS, Williams CH, Wolthers KC, Stanway G, Simmonds P: Widespread recombination within human parechoviruses: analysis of temporal dynamics and constraints. *J Gen Virol* 89:1030-1035, 2008.
 - 100) Williams CH, Panayiotou M, Girling GD, Peard CI, Oikarinen S, Hyöty H, Stanway G: Evolution and conservation in human parechovirus genomes. *J Gen Virol* 2009 in Press.
 - 101) Pham NT, Khamrin P, Nguyen TA, Kanti DS, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H: Isolation and molecular characterization of Aichi viruses from fecal specimens collected in Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam. *J Clin Microbiol* 45:2287-2288, 2007.
 - 102) Pham NT, Trinh QD, Nguyen TA, Dey SK, Phan TG, Hoang le P, Khamrin P, Maneekarn N, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H: Development of genotype-specific primers for differentiation of genotypes A and B of Aichi viruses. *J Virol Methods* 156:107-110, 2009.
 - 103) Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chieochansin T, Naem A, Shaikat S, Alam MM, Sharif S, Angez M, Zaidi S, Delwart E: A newly identified bocavirus species in human stool. *I Infect Dis* 199: 196-200, 2009.

Diagnosis and molecular epidemiology of viral gastroenteritis in the past, present and future

Hiroshi USHIJIMA

Aino Health Science Center
Aino University
2-17-3 Shibuya, Shibuya-ku, Tokyo 150-0002

Outline, history of research, diagnosis and molecular epidemiology of viral gastroenteritis were described. Rotavirus, adenovirus, norovirus, sapovirus, astrovirus, human parechovirus, Aichivirus, and human bocavirus are the major target viruses which cause acute gastroenteritis. The viruses were differentiated into genogroup, genotypes and subgenotypes/ clusters/ lineages. The changing of their genetic backgrounds was well recognized in different areas and years. Some reassortments or recombinations were observed not only between humans and humans but also between humans and animals. Viral gastroenteritis diseases were transmitted by food-borne and humans to humans contact. The environmental factors were also impacted on the infections. Recently, situation of the diseases in the natural ecosystem is becoming clearly. Diagnoses by immunological methods and gene technology are available for the known viruses. Further development of diagnosis and discovery of new viruses will be expected. Therefore, the research on molecular epidemiology is needed to be conducted continuously and then new findings will appear. We need to precede the research by using new techniques and we need to cope with the demand of society especially during acute gastroenteritis outbreak seasons.