

Multiplex real-time PCR を利用した 胃腸炎ウイルス検査の検討

小和田和誠・東方美保*1・平野映子・中村雅子・大村勝彦

Examination of the inspection using Multiplex real-time PCR of gastroenteritis virus

Kazuaki KOWADA, Miho TOHO*1, Eiko HIRANO, Masako NAKAMURA, Katsuhiko OMURA

感染性胃腸炎の発症要因となるウイルスには様々なものがある。そこで、複数のウイルスを同時検出が可能な multiplex real-time PCR 法の導入を検討した。検査対象は、ノロウイルス以外の胃腸炎ウイルス 6 種（サポウイルス、アストロウイルス、A 群ロタウイルス、C 群ロタウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス）とした。アニーリング温度は 57°C、プライマー・プローブ濃度は各 0.2 μM の条件に設定することで良好な検出感度が得られた。本研究で設計した multiplex real-time PCR 法を実施した結果、2009 年 4 月から 2012 年 3 月までに採取された感染性胃腸炎疑い小児散発例患者 97 検体中 45 検体および集団発生事例 57 事例 484 検体中 13 事例 19 検体からノロウイルス以外の胃腸炎ウイルスを検出した。本法の利用により、ウイルスの検索に要する時間を大幅に削減することができたことから、食中毒などの緊急時対応に非常に効果的な検出系であると考えられた。

1. はじめに

非細菌性食中毒あるいは地域流行として小児に蔓延する感染性胃腸炎は、福井県においても毎年患者発生数が多い疾病の一つである。様々な胃腸炎ウイルスが、その発症要因として指摘されており、当センターでもこれまでに、ノロウイルスや A 群ロタウイルス等の腸管系ウイルスの流行を確認し、解析を実施してきた^{1,2)}。近年は、発症要因として挙げられるサポウイルスやアストロウイルス等の胃腸炎ウイルスの検査も求められている。しかし、ウイルスの個別検査は煩雑なうえに多くの時間を要するため、食中毒などの緊急検査の際に迅速で適切な検査対応が困難となる。そこで、本研究では複数のウイルス遺伝子を同時に増幅する multiplex real-time PCR 法の導入を検討し、より迅速な検査体制の構築を目的とした。

ノロウイルスは、2011 年の全国のウイルス性食中毒事例の約 99% を占め、食中毒発症要因として全国的に突出して多い³⁾。そのため、緊急検査時には非細菌性かつノロウイルス陰性とされた後に、その他の胃腸炎ウイルスの検索を実施してきた。その他の胃腸炎ウイルスの検索を multiplex real-time PCR 法で実施することで、コストを必要最低限に抑えながら大幅な時間短縮が期待できる。そこで、multiplex real-time PCR 法の検査対象ウイルスには、ノロウイルスを除く胃腸炎ウイルスを対象とした。

今回我々は、胃腸炎ウイルスの multiplex real-time PCR 法を設計し、2009 年度から 2011 年度に当センターに搬入された小児散発例および集団発生事例の検体に適用し、検討したのでその概要を報告する。

2. 方法

2. 1 材料

2009 年 4 月から 2012 年 3 月の間に福井県内で採取された感染性胃腸炎疑い小児散発例患者の糞便 97 検体および食中毒等の集団発生 57 事例 484 検体（糞便 445 検体、嘔吐物 5 検体、肛門拭い液 32 検体、牡蠣 2 検体）を用いた。

陽性対照検体のサポウイルス、A 群ロタウイルス、腸管系アデノウイルスおよびエンテロウイルスについては、過去に当センターでウイルス陽性となった糞便検体を用いた。その他については、岡山県環境保健センターより分与された C 群ロタウイルス陽性糞便および愛媛県立衛生環境研究所より分与されたアストロウイルス陽性糞便を用いた。

2. 2 方法

糞便および嘔吐物は滅菌水で 10% 乳剤とし、8,500G、10 分間冷却遠心後の上清を試料とし、肛門拭い液は粗遠心後の上清を試料とした。牡蠣は中腸腺摘出後、滅菌水で 10% 乳剤とし、30% ショ糖を用いた超遠心（36,000rpm、2hr）で濃縮したものを試料とした。

試料から、QIAamp Viral RNA mini kit [QIAGEN] を用いて RNA および DNA を抽出した。その核酸 10 μL をテンプレートとして、5×First Strand buffer [Invitrogen] 4 μL、DTT (100mM) [Invitrogen] 2 μL、dNTP mix (10mM) [Promega] 1 μL、ランダムプライマー (Nona-deoxyribonucleotide mixture) (1 μg/μL) [TaKaRa] 0.5 μL、RNase inhibitor (40 U/μL) [Wako] 0.25 μL、Super Script III Reverse Transcriptase [Invitrogen] (200 U/μL) 1 μL および dH₂O 1.25 μL で構成される逆転写反応液を用い、30 °C : 10 分、50 °C : 60 分、98 °C : 5 分処理する逆転写反応により、RNA からは cDNA を合成した。

得られた cDNA 2 μL をテンプレートとして、QuantiTect 2×Multiplex PCR Master mix [QIAGEN]

*1 元福井県衛生環境研究センター

表1 Multiplex real-time PCR 法に使用するプライマーおよびプローブ

検索ウイルス	名称	Sequence / (Reporter-Quencher)	方向
サポウイルス	SaV124F	GAYCASGCTCTCGCYACCTAC	+
	SaV1F	TTGGCCCTCGCCACCTAC	+
	SaV5F	TTGAACAAGCTGTGGCATGCTAC	+
	SaV1245R	CCCTCCATYTTCAAACACTA	-
	SaV124TP	CCRCTATRAACCA (FAM-MGB)	-
	SaV5TP	TGCCACCAATGTACCA (FAM-MGB)	-
A群ロタウイルス	JVKF	CAGTGGTTGATGCTCAAGATGGA	+
	JVKR	TCATTGTAATCATATTGAATACCCA	-
	JVKP	ACAAGTGCAGCTTCAAAGAAGWGT (TAMRA - BHQ)	+
C群ロタウイルス	CRV7F	GCTGCATTGGTAGTGACTGYGA	+
	CRV7R	AGTTTCTGTACTAGCCGGTGAACA	-
	CRV7	TCTGTCTGTCCATTAGATACTACAAGTAATGGAATYGG (TAMRA - BHQ)	+
アストロウイルス	Hast.fwd	TCAACGTGTCCGTAAMATTGTCA	+
	HastV.rev	TGCWGGTTTTGGTCTGTGA	-
	HastV.probel+2	CAACTCAGGAAACARG (VIC-MGB)	+
アデノウイルス	JTVXF	GGACGCCTCGGAGTACCTGAG	+
	JTVXR	ACIGTGGGTTTCTGAACTTGTT	-
	JTVXP	CTGGTGCAGTTCGCCCGTGCCA (VIC-MGB)	+
エンテロウイルス	EnteroPrimer1F	TCCTCCGCCCCCTGA	+
	EnteroPrimer1R	RATTGTACCATAAGCAGCCA	-
	EnteroTaqman1	CGGAACCGACTACTTTGGGTGWCCGT (FAM-MGB)	+

10 μL、primer/ probe set (each 0.2 μM) 3 μL および dH₂O 5 μL で構成される PCR 反応液を用い、95 °C : 15 分処理後、94 °C : 60 秒と 57 °C : 90 秒を 45 回処理する反応条件で multiplex real-time PCR を実施した。

プライマーおよびプローブは、サポウイルスは Oka ら⁴⁾ の、A群ロタウイルスは Jothikumar ら⁵⁾ の、C群ロタウイルスは Mori ら⁶⁾ の、アストロウイルスは Logan ら⁷⁾ の、アデノウイルスは Jothikumar ら⁸⁾ の、エンテロウイルスは Nijhuis ら⁹⁾ の報告によるものを利用した(表1)。これらのプライマーおよびプローブを、Aセット(サポウイルス・アストロウイルス・C群ロタウイルス)もしくはBセット(エンテロウイルス・アデノウイルス・A群ロタウイルス)の組み合わせで使用し、PCR を実施した。ノロウイルスの検査については、前記と同様に cDNA

合成まで実施し、国立感染症研究所発行のウイルス性下痢症診断マニュアル¹⁰⁾のリアルタイム PCR 法に準じて検査した。real-time PCR 装置は、StepOne Plus [Applied Biosystems]を使用した。

3. 結果および考察

3. 1 Multiplex real-time PCR 条件の検討

Multiplex real-time PCR を実施するためには、検査対象ウイルスが全て検出可能な PCR 条件でなければならない。そのため、PCR 反応時のアニーリング温度と、プライマーおよびプローブの濃度について、全ての検査対象ウイルスが特異的かつ良好な感度で検出される条件を検討した。

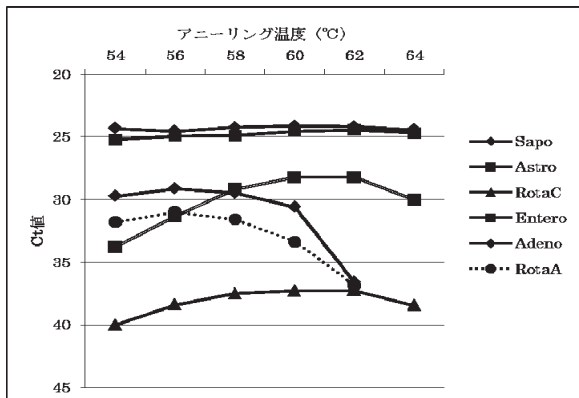


図1 Multiplex real-time PCR のアニーリング温度の検討

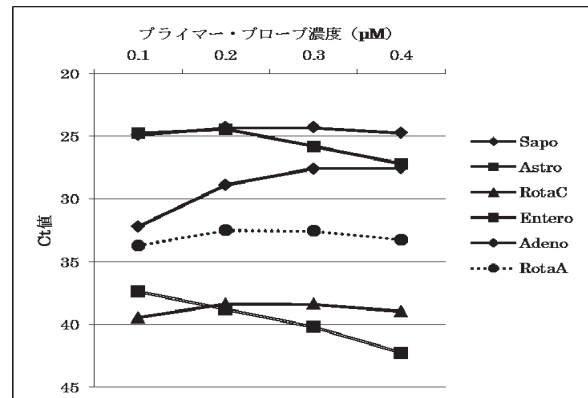


図2 Multiplex real-time PCR の試薬濃度の検討

の中学校区内にある小学校 2 校および保育園の 4 施設で集団発生した感染症疑い事例であった。3 施設 (中学校、B 小学校、保育園) から搬入された 6 検体のうち 5 検体からノロウイルスが検出された。その中に、サポウイルスの同時検出が 1 検体およびアデノウイルスの同時検出が 1 検体含まれていた。残る 1 施設 (A 小学校) の 4 検体全てから C 群ロタウイルスが検出された。

これにより、検査前は原因が同一事例であると考えられていたが、C 群ロタウイルスが検出された小学校では、他の施設と感染源が異なることが示唆された。ノロウイルス

陽性事例であっても、ノロウイルス陰性の検体がある場合には、multiplex real-time PCR で他のウイルスの検索を実施する必要があると考えられた (表 4)。

2009 年 4 月から 2012 年 3 月の間に発生した感染性胃腸炎集団発生事例において、検出された全てのウイルスの中で、ノロウイルスが約 95% を占めた。そのため、集団発生の際には、従来通りまず初めにノロウイルスの検査を実施し、他の胃腸炎ウイルスの関与が考えられる場合に今後は本法を利用することが効率的だと考えられた。

表 3 Multiplex real-time PCR 法でウイルスが検出された集団発生事例一覧

事例 No	初発患者 発生日	検査 依頼	発生施設 原因施設	発症 者数	NV陽性数 / 検査数	Multiplex 陽性 / 検査数	Multiplex 陽性ウイルス (患者種別)	推定感染経路
1	2009.10.17	食中毒	旅館	6	0 / 5	2 / 5	RotaA(有症者1名) Entero(有症者1名)	不明
2	2009.10.26	食中毒	飲食店	5	0 / 7	1 / 7	Adeno(有症者1名)	不明
3	2009.11.11	感染症	保育園	2	6 / 8	1 / 8	Adeno(有症者1名)	ヒト-ヒト感染
4	2010.2.27	食中毒	家庭	10	4 / 10	1 / 10	Sapo,Astro(有症者1名)	ヒト-ヒト感染
5	2010.10 月 下旬	食中毒	保育園	16	2 / 3	1 / 3	Adeno(有症者1名)	ヒト-ヒト感染
6	2010.11.22	感染症	小学校	110 以上	3 / 6	1 / 6	Adeno(有症者1名)	不明
7	2011.2.12	食中毒	飲食店	3	0 / 8	1 / 8	Adeno(従事者1名)	不明
8	2011.5.22	感染症	中学校 小学校 保育園	20 以上	5 / 10	7 / 10	Sapo(有症者1名) RotaC(有症者4名) Adeno(有症者1名)	ヒト-ヒト感染
9	2011.8.2	食中毒	飲食店	5	0 / 6	1 / 6	Adeno(有症者1名)	不明
10	2012.1.24	食中毒	旅館	6	5 / 5	1 / 5	Adeno(有症者1名)	ヒト-ヒト感染
11	2012.2.21	食中毒	社員食堂	26	6 / 8	1 / 8	Sapo(従事者1名)	ヒト-ヒト感染
12	2012.3.19	食中毒	旅館	5	4 / 11	1 / 11	Astro(有症者1名)	カキ喫食
13	2012.3.20	食中毒	飲食店	3	0 / 6	1 / 6	Sapo(従事者1名)	不明

表 4 事例 No. 8 における各検体の検査結果

番号	検体 種類	所属		Real-time PCR		Multiplex real-time PCR					
				Noro G I	Noro G II	Sapo	Rota A	Rota C	Adeno	Astro	Entero
1	便	保育園	園児	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
2	便	小学校 A	児童	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
3	吐物	小学校 A	児童	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
4	便	中学校	生徒	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	便	保育園	保育士	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	便	中学校	教諭	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7	便	中学校	生徒	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
8	便	小学校 A	児童	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
9	便	小学校 A	児童	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
10	便	小学校 B	児童	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

4. まとめ

ウイルス性食中毒等による感染性胃腸炎の発症要因となる胃腸炎ウイルスは多種多様であり、これらのウイルスの迅速な検査対応が求められている。そこで、複数のウイルスの特異的遺伝子領域を同時に検索が可能な multiplex real-time PCR 法の導入を検討した。

本法では、サポウイルス、アストロウイルス、C 群ロタウイルスの同時検出系と、A 群ロタウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルスの同時検出系を構築した。本法の実施により、これらのウイルスの検索に要する時間を大幅に削減することが可能となった。

ノロウイルスは、小児散発事例および集団発生事例で他のウイルスよりも検出率が突出して高かった。そのため、緊急時検査では初めにノロウイルスを検索し、ノロウイルスの関与が低い場合、もしくは他のウイルスの混合感染が疑われる場合に、他の腸管系ウイルスの検索を multiplex real-time PCR 法で実施する方法が効果的と考えられた。

数は少ないが、ノロウイルス以外の胃腸炎ウイルスが福井県内においても検出されており、今後集団発生要因となりうる可能性がある。そのために、ノロウイルス以外のウイルスについて multiplex real-time PCR を利用して検索する機会は今後多くなると考えられる。

謝辞

本調査研究を行うに当たり、検体採取にご協力いただきました医療機関および関係健康福祉センターの関係者の方々に深謝いたします。

なお、本調査研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金食品の安全確保推進研究事業「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」の協力研究として実施した。

参考文献

- 1) 松本和男他：福井県における A 群ヒトロタウイルスの血清型疫学調査, 福井県衛生研究所年報, 31.51-55(1992)
- 2) 東方美保他：平成 14~18 年度に福井県で検出されたノロウイルスの遺伝子解析, 福井県衛生環境研究センター年報, 5.60-72(2006)
- 3) 厚生労働省ホームページ：食中毒統計資料(2012)
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>
- 4) T.Oka et al.: Detection of Human Sapovirus by Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, *J.Med.Virol.*78.1347-1353(2006)
- 5) N.Jothikumar et al.: Broadly reactive TaqManR assay for real-time RT-PCR detection of rotavirus in clinical and environmental samples, *J.Virol.Methods.*155. 126-131 (2009)
- 6) 森攻次他：急性胃腸炎事例における real-time PCR 法を用いたウイルスの迅速検索について, 第 57 回日本ウイルス学会学術集会(2009)
- 7) C.Logan et al.: 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)
- 8) N.Jothikumar et al.: Quantitative Real-Time PCR Assays for Detection of Human Adenoviruses and Identification of Serotypes 40 and 41, *Appl.Environ.Microbiol.*71.6.3131-3136 (2005)
- 9) M.Nijhuis et al.: Rapid and Sensitive Routine Detection of All Members of the Genus Enterovirus in Different Clinical Specimens by Real-Time PCR, *J.Clin.Microbiol.*40.10.3666-3670(2002)
- 10) 国立感染症研究所ウイルス第二部他：ウイルス性下痢症診断マニュアル (第 3 版) (2003)