

2000～2001年度の札幌市における ノーウォークウイルス遺伝子の検出成績

菊地正幸 宮北佳恵 赤石尚一 大谷倫子 藤田晃三

要 旨

2000年度および2001年度に札幌市で発生した食中毒等の事例において採取された糞便材料154検体について、3種類のプライマーを用いてノーウォークウイルスの検査を行い、検出された遺伝子型と各プライマーの検出率を比較検討した。ウイルス遺伝子が検出されたのは47検体で、G型が27検体、G型が20検体であった。NV81/82・SM82プライマーではG型、Yuri22R/FおよびP1/P3プライマーではG型の検出率が高かったが、2つのgenogroupの遺伝子を単独のプライマーで検出することはできず、当面複数のプライマーの併用が必要と考えられる。

1. 緒 言

ノーウォークウイルス(Norwalk Virus:以下NV)はヒトに感染して嘔吐、下痢などを伴う急性胃腸炎を引き起こし、冬季に頻発する胃腸炎や食中毒の原因ウイルスとして知られている。NVは培養系が確立されておらず、その検査は従来から電子顕微鏡によるウイルス粒子の直接観察により行われてきたが、検出感度が低いことから少量の糞便材料や食品中などに含まれる微量のウイルスの検出は困難であった。近年、NVの遺伝子配列が解読され¹⁾、RT-PCR法を用いた検査法が開発されて高感度にNVを検出することが可能となり、この検査が広く実施されるようになった。さらに、遺伝子配列の解析が進み、遺伝子型の多様性が明らかとなり²⁾、様々なPCR用のプライマーが設計されている。しかし、単一のプライマーで全てのNVを検出することができないため、用いるプライマーの種類が検出率に影響する可能性が考えられる。そこで、2000年度および2001年度に札幌市で発生した食中毒およびウイルス性胃腸炎の集団発生が疑われた事例等について3種類のプライマーを用いて検査を行い、検出されたNV遺伝子のプローブ型と各プライ

マーの検出率を比較検討した。

2. 方 法

2-1 材 料

札幌市において発生した食中毒、有症苦情および集団発生事例等の患者および調理従事者等から採取された、2000年度104検体および2001年度50検体の計154検体の糞便材料を対象とした。

2-2 RNA抽出

PBS(-)を用いて10%糞便乳剤を調製し、3000rpmで20分の遠心後、得られた上清を10000rpmで20分再度遠心した上清をRNA抽出用試料とした。2000年度の検体はISOGEN-LS(ニッポンジーン)を、2001年度の検体はQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNA抽出を行った。

2-3 RT-PCR法およびマイクロプレートハイブリダイゼーション

RT-PCR法およびマイクロプレートハイブリダイゼーションは、「ウイルス性下痢症診断マニュアルカリシウイルスのRT-PCR法とハイブリダイゼーション」³⁾に準じて行った。すなわち、RT反応は、プライマーとしてOligo(dT)(12-18)(GIBCO)およ

び35'プライマーを用いて37℃で1時間行った。PCR反応は、プライマーとして従来から日本で広く使用されているNV81/82・SM82⁴⁾、Yuri22R/F⁵⁾および国内分離株の解析により設計されたP1/P3⁶⁾の3組のプライマーを用いて、94℃で3分間変性した後、94℃1分、48℃1分、72℃2分を40サイクル行い、最後に72℃で15分間反応した。PCR産物の確認はアガロースゲル電気泳動により行った。

PCR産物が確認された検体については、確認検査として、国立公衆衛生院より配布された1999年度プローブ（G1P-A，G1P-B，G2P-A，G2P-B，G2P-C）を用いたマイクロプレートハイブリダイゼーション法によりプローブ型別を行った。

3. 結果

3-1 NVの検査成績

2000年度および2001年度に実施した月別の検査結果を表1に示す。今回対象とした期間中に糞便検体からNVが検出されたのは11月から3月の冬季に検査依頼のあった検体からであり、4月から8月の間に検査を行った検体からは検出されなかった。

2000年度においては、2000年12月に発生した、宴会料理が原因食品と考えられる食中毒事例において、14検体中9検体からNVが検出されたのが最初の検出例であった。その後、3月までに合計104検体について検査を行い、36検体（34.6%）からNVが検出された。

2001年度においては、2001年11月に検査を実施した1事例5検体から初めてNVが検出された。その後、1月から3月までの検体数は23検体であった。合計では、検体数は50検体、そのうち11検体（22.0%）がNV陽性であった。

表1 月別NV検査成績（2000-2001年度）

年	月	検体数	陽性数（%）
2000	5	10	0（0）
	12	20	11（55.0）
2001	1	43	14（32.6）
	2	10	6（60.0）
	3	21	5（23.8）
2000年度 合計		104	36（34.6）
2001	4	6	0（0）
	5	7	0（0）
	7	5	0（0）
	8	4	0（0）
	11	5	5（100）
2002	1	7	2（28.6）
	2	15	3（20.0）
	3	1	1（100）
2001年度 合計		50	11（22.0）
合計		154	47（30.5）

3-2 NV 遺伝子のプローブ型別
マイクロプレートハイブリダイゼーション法に

よりプローブ型別が可能であった 47 検体について、
プローブ型と各プライマーの検出成績を表 2 に示す。

表 2-1 事例別 NV 遺伝子のプローブ型とプライマーの検出成績 (2000 年度)

年	月	事例	検体番号	プローブ型*	プライマー					
					NV81/82,SM82	Yuri22R/F	P1/P3			
2000	12		1	G2P-A,B	+	+	+			
			2	G2P-A,B	+	+	+			
			3	G2P-A,B	+	+	+			
			4	G2P-A,B	+	+	+			
			5	G2P-A,B	+	+	+			
			6	G2P-A,B	-	-	+			
			7	G2P-A,B	-	+	+			
			8	G2P-A,B	-	-	+			
			9	G2P-A,B	-	+	+			
			10	G1P-A	+	+	-			
			11	G1P-A	+	+	-			
2001	1		12	G2P-A,B	-	+	+			
			13	G2P-A,B	-	+	+			
			14	G2P-A,B	-	+	+			
			15	G1P-A,B	+	-	+			
			16	G1P-B	+	-	-			
			17	G1P-A	+	-	-			
			18	G1P-A	+	-	+			
			19	G1P-B	-	-	+			
			20	G1P-B	+	-	+			
			21	G1P-B	+	-	+			
			22	G1P-B	+	-	+			
			23	G1P-B	+	-	-			
			24	G1P-B	+	-	-			
			25	G2P-A,B	-	-	+			
			2			26	G1P-A	+	-	-
						27	G1P-A	+	-	-
28	G1P-A	+				-	-			
29	G2P-A,B	-				+	+			
30	G1P-A	+				+	+			
31	G1P-A	+				-	-			
3			32	G1P-A	+	-	+			
			33	G1P-A	+	-	-			
			34	G1P-A	+	-	-			
			35	G1P-A,B	+	-	+			
			36	G1P-A	+	-	-			

*G1P-A,B は G1P-A と G1P-B の両方に、G2P-A,B は G2P-A と G2P-B の両方に反応したことを示す

表 2-2 事例別 NV 遺伝子のプローブ型とプライマーの検出成績 (2001 年度)

年	月	事例	検体番号	プローブ型	プライマー		
					NV81/82,SM82	Yuri22R/F	P1/P3
2001	11		37	G2P-A	+	+	+
			38	G2P-A	+	+	+
			39	G2P-A	+	+	+
			40	G2P-A	+	+	+
			41	G2P-A	+	+	+
2002	1		42	G1P-B	+	-	-
			43	G1P-A	+	-	-
2		44	G2P-C	+	+	+	
		45	G1P-B	+	-	-	
		46	G1P-B	+	-	+	
3		47	G1P-B	+	-	-	

検出された NV 遺伝子のプローブ型別は, G1P-A と G2P-A,B (G2P-A と G2P-B に反応) が各 14 検体と最も多く, 次いで G1P-B が 11 検体, 以下 G2P-A 5 検体, G1P-A,B (G1P-A と G1P-B に反応) 2 検体, G2P-C 1 検体であった。genogroup 別については, 2000 年度は G 22 検体, G 14 検体, 2001 年度は G 5 検体, G 6 検体であった。事例 , , および において複数のプローブ型が検出され, それ以外の事例については単一のプローブ型が検

出された。

今回使用した 3 組のプライマーの検出成績をプローブ型別に表 3 にまとめた。G については, NV81/82・SM82 が最も多く (96.3%) 検出できた。Yuri22R/F および P1/P3 は, それぞれ 11.1% および 33.3% と低い検出率であった。一方, G については, P1/P3 が全例検出でき, Yuri22R/F は 85% の高い検出率であったが, 逆に NV81/82・SM82 は 55.0% で G と比較して検出率は低かった。

表 3 プローブ型別プライマーの検出成績 (2000-2001 年度)

genogroup	プローブ型	陽性検体	検出成績(%)		
			プライマー		
			NV81/82,SM82	Yuri22R/F	P1/P3
G	G1P-A	14	14 (100)	3 (21.4)	3 (21.4)
	G1P-B	11	10 (90.9)	0 (0)	5 (45.5)
	G1P-A,B	2	2 (100)	0 (0)	2 (100)
	合計	27	26 (96.3)	3 (11.1)	9 (33.3)
G	G2P-A	5	5 (100)	5 (100)	5 (100)
	G2P-A,B	14	5 (35.7)	11 (78.6)	14 (100)
	G2P-C	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)
	合計	20	11 (55.0)	17 (85.0)	20 (100)
合計		47	37 (78.7)	20 (42.6)	29 (61.7)

4. 考 察

日本で検出された NV 遺伝子の解析結果から、我が国の NV は G 型が主流である⁶⁻⁸⁾。今回、2000 年度および 2001 年度に札幌市で検出された 47 検体の NV 遺伝子の genogroup 別は、G 型が 27 検体、G 型が 20 検体であった。事例別でも G 型が 14 事例、G 型が 6 事例（1 事例については G、G とともに検出）であり、G 型の NV が優勢であった。さらに下位の分類であるプローブ型については、複数の種類の NV 遺伝子が検出され、NV 遺伝子の多様性を示す結果となった。1982 年から 1998 年に日本において検出された NV の遺伝子解析から、年代ごとに優勢な遺伝子型ウイルスの存在が示されており⁸⁾、長期的な NV 遺伝子の解析によるデータの蓄積が NV の検査法の改良等に重要であると思われる。また、今回 2 つのプローブに反応する検体があったが（表 2, 3）、より詳細で有益な分子疫学的情報を得るためには、PCR 産物のダイレクトシーケンス等により塩基配列を決定して解析を進めることが必要である。

プライマー別の検出率の比較では、G 型の NV 遺伝子は NV81/82・SM82 プライマーにより最も多く検出され（96.3%）、その他のプライマーでは検出率が低かった。一方、G 型の NV 遺伝子は P1/P3 プライマーで全例検出され、Yuri22R/F プライマーも高い検出率であったが、逆に NV81/82・SM82 プライマーの検出率は 55% と低かった。今回の結果から、NV81/82・SM82 プライマーは G 型に、P1/P3 および Yuri22R/F は G に特異性が高いことが示唆され、現段階においても NV の検査には複数のプライマーを併用する必要がある。

最近、18 株の NV ゲノム全長塩基配列を用いた塩基配列の解析により、最も相同性の高い領域は ORF1 と ORF2 のジャンクション領域を中

心とした約 200 塩基であることが明らかになった⁹⁾。平成 13 年 11 月 16 日付食監発第 267 号厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知「ノーウォーク様ウイルス (NLV) の RT-PCR について」には、このジャンクション領域に設計されたプライマーが示されている。食中毒やウイルス性胃腸炎の集団発生事例における検査では迅速性・正確性が求められる。しかし、NV 遺伝子の多様性により今回使用した 3 組のプライマーでは検出されない NV が存在する可能性があること、また、年代の隔たりがあっても極めて遺伝子的に近縁な NV が検出されること⁸⁾等を考慮すると、新しく設計されたものを含めた様々なプライマーの反応性、使用するプライマーの選択および組み合わせ等について常に検討しておく必要がある。

現在、NV 検査法は RT-PCR 法が最も広く実施されているが、組換えバキュロウイルスで発現されたウイルス様中空粒子を利用して開発された抗原 ELISA 法が多数検体のスクリーニングに有用と考えられている¹⁰⁾。また、蛍光プローブを用いた高感度かつ簡便な検出法や¹¹⁾、抗 NV 抗体を結合した磁気ビーズによる検査法¹²⁾が開発されており、混入しているウイルス量が少ないため検出が困難である食品や水等の検査に有用な方法と考えられる。このような検査法の開発や従来から行われている NV の分子生物学的研究のさらなる進展が、NV の環境中の分布や伝播経路の解明につながるものと期待される。

5. 結 語

2000 年度および 2001 年度に札幌市で発生した食中毒事例等について、3 種類のプライマーを用いて検査を行い、検出された NV 遺伝子のプローブ型と各プライマーの検出率を比較検討した。genogroup 別の検出数は、G 型が 27

検体，G 型が 20 検体であり，G 型が優勢であった。従来から使用されている NV81/82・SM82 プライマーでは G 型，新たに設計された P1/P3 プライマーでは G 型の検出率が高かったが，単独のプライマーで全例を検出することはできず，当面複数のプライマーの併用が必要と考えられる。

6. 文献

- 1) Jiang, X., Wang, M., Wang, K. et al : Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 195, 51-61, 1993.
- 2) 染谷雄一，名取克郎，武田直和 他：ヒトカリシウイルスの多様性. *臨床とウイルス*, 27, 294-303, 1999.
- 3) 国立感染症研究所ウイルス第二部，衛生微生物技術協議会レファレンス委員会編：ウイルス性下痢症診断マニュアル(第2版)，44-54, 平成12年7月.
- 4) 佐々木由紀子，太田健爾，林志直 他：RT-PCR法を用いたウイルス性胃腸炎の検査. *東京都立衛生研究所年報*, 47, 8-14, 1996.
- 5) Saito, H., Saito, S., Kamada, K. et al : Application of RT-PCR designed from the sequence of the local SRSV strain to the screening in viral gastroenteritis outbreaks. *Microbiol. Immunol.*, 42, 439-446, 1998.
- 6) 山崎謙治，大山徹，宇田川悦子 他：1989年～1998年に日本国内で検出された Norwalk-like viruses (NLV) の遺伝的特徴および統一プライマーの検討. *感染症学雑誌*, 74, 470-474, 2000.
- 7) 病原微生物検出情報(月報)20, No.11(No.237),1-2, 1999.
- 8) 大石功，左近直美，山崎謙治 他：1982年から1998年の期間に本邦で検出した Norwalk virus の遺伝子型の変遷. *大阪府立公衆衛生研究所研究報告*, 39, 1-9, 2001.
- 9) Katayama, K., Shirato-Horikoshi, H., Kojima, S. et al : Phylogenetic Analysis of the Complete Genome of 18 Norwalk-like Viruses. *Virology*, 299, 225-239, 2002.
- 10) 染谷雄一：カリシウイルス. *ウイルス*, 50, 173-184, 2000.
- 11) 篠原美千代，内田和江，島田慎一 他：新たに構築した NLV の検出法. *衛生微生物協議会第22回研究会講演抄録集*, 67, 2001.
- 12) 小林慎一，榮賢司，宮崎豊：Immunomagnetic capture RT-PCR 法による食品中のノーウォークウイルスの検出. *衛生微生物協議会第23回研究会講演抄録集*, 68, 2002.

Detection of Norwalk Virus Genes in Stool Specimens in Sapporo from April 2000 to March 2002

Masayuki Kikuchi, Yoshie Miyakita, Shoichi Akaishi, Tomoko Otani and Kozo Fujita

One hundred and fifty-four stool specimens from patients with gastroenteritis were examined for the detection of Norwalk viruses (NVs) by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using three primer sets in Sapporo from April 2000 to March 2002. Forty-seven samples were positive for NVs. Twenty-seven strains of them belonged to genogroup I (GI), and the other 20 strains belonged to genogroup II (GII). The primer set of NV81/82/SM82 was most sensitive for the detection of GI strains, although it was less sensitive for the detection of GII strains than the other primer sets. The primer pairs of Yuri22R/F and P1/P3 preferentially amplified GII strains. This result suggests that it is important to use multiple primer sets for the successful detection of NVs in patients with gastroenteritis by RT-PCR method.