

2002年12月～2003年6月の札幌市における ノロウイルス遺伝子のプライマー別検出成績

菊地 正幸 宮北 佳恵 土屋 英保 大谷 倫子 藤田 晃三

要 旨

2002年12月から2003年6月まで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102検体および嘔吐物4検体について、Open reading frame (ORF)1 と ORF2 のジャンクション領域に設定されたプライマー (COG1R/F および COG2R/F) を含めて4種類のプライマーを用いてノロウイルスの検査を行い、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58検体で、G1が2検体、G2が54検体、G1とG2が同時に検出されたものが2検体であった。多数を占めたG2についてみると、従来より使用されている NV81/82・SM82 および P1/P3 プライマーの検出率はそれぞれ 31.5% および 55.6% であったのに対し、G2 に特異的な新しいプライマー (COG2R/F) はすべての陽性検体を検出することができ、非常に有用なプライマーと考えられる。

1. 緒 言

1997年に食品衛生法施行規則の一部改正により、小型球形ウイルス (SRSV) をはじめとしたウイルスが食中毒の原因物質と明示された。これ以降、電子顕微鏡によりウイルス粒子を直接観察する従来からの検査法に加えて、RT-PCR法を用いた検査法が開発されて高感度にウイルス遺伝子を検出することが可能となったことから、食中毒の原因物質としての SRSV の報告数は増加している。現在では RT-PCR 法による検査が広く実施されており、報告されている SRSV のほとんどはウイルス学的にノロウイルス (Norovirus: 以下 NV) と考えられる。近年、NV 遺伝子の配列の解析 (分子疫学的解析) が進み、遺伝子型の多様性が明らかとなり、この多様性に対応するために様々な PCR 用のプライマーが設計されている。昨年は、RNA ポリメラーゼ領域に設定された3種類のプライマーの検出率を比較検討するために、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の結果を報告した¹⁾。これら3種類のプライマーとは異なる領域 (Open reading frame (ORF)1 と ORF2 のジャンクション領域) に設定されたプライマーが、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」(以下厚生労働省通知)により示された。そこで、この新しいプライマーを加えて、2002年12月から2003年6月まで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2002年12月から2003年6月までに

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、糞便102検体および嘔吐物4検体の合計106検体を対象とした。

2-2 RNA抽出

PBS(-)を用いて10%糞便または嘔吐物乳剤を調製し、10000rpmで20分の冷却遠心後、得られた上清をRNA抽出用試料とした。RNA抽出はQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて行った。

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、厚生労働省通知に準じて行った。すなわち、RT反応は、プライマーとしてRandom primer hexamer (Amersham Biosciences)を用いて42℃で1時間行った。PCR反応は、RNAポリメラーゼ領域に設定されたプライマーとしてNV81/82・SM82²⁾およびP1/P3³⁾の2組のプライマーを、新しく設定されたプライマーとしてCOG1R/FおよびCOG2R/F^{4,5)}のプライマー2組を用いて、94℃で3分間変性した後、94℃1分、52℃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、プローブRING1-TP (a)、(b)およびRING2-Plate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確認試験を行った。

3. 結果

3-1 NVの検査成績

2002年12月から2003年6月までにNV検査を実施した糞便および嘔吐物の月別検体数とその検査結果を表1に示す。期間中、4月を除き12月から6月まで毎月NVが検出された。

2002年12月に発生した食中毒事例において、糞便12検体中5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、2003年6月までに17事例における糞便102検体および嘔吐物4検体の合計106検体を対象に検査を行い、16事例58検体(54.7%)からNVが検出された。

3-2 プライマー別検出成績

マイクロプレートハイブリダイゼーション法によりNV遺伝子が確認された58検体(16事例)について、genogroup型別と各プライマーの検出成績を表2に示す。

表1 月別NV検査成績

| 年 | 月 | 検体数 | | 陽性数(%) | |
|------|----|-----|-----|-----------|----------|
| | | 糞便 | 嘔吐物 | 糞便 | 嘔吐物 |
| 2002 | 12 | 12 | | 5 (41.7) | |
| 2003 | 1 | 17 | 1 | 13 (76.5) | 0 (0) |
| | 2 | 41 | | 25 (61.0) | |
| | 3 | 14 | | 3 (21.4) | |
| | 4 | 2 | | 0 (0) | |
| | 5 | 11 | 3 | 7 (63.6) | 3 (100) |
| | 6 | 5 | | 2 (40.0) | |
| 合計 | | 102 | 4 | 55 (54.7) | 3 (75.0) |

表2 事例別 NV 遺伝子のプライマー別検出成績

| 年 | 月 | 事例 | 検体 番号 | 検体 種類 | genogrou P | プライマー | | | | |
|------|----|----|----------|----------|---------------|--------------|-------|---------|---------|---|
| | | | | | | NV81/82・SM82 | P1/P3 | COG1R/F | COG2R/F | |
| 2002 | 12 | | 1 | 便 | G2 | - | - | - | + | |
| | | | 2 | 便 | G2 | - | - | - | + | |
| | | | 3 | 便 | G2 | - | - | - | + | |
| | | | 4 | 便 | G2 | - | - | - | + | |
| | | | 5 | 便 | G2 | - | - | - | + | |
| 2003 | 1 | | 6 | 便 | G2 | + | - | - | + | |
| | | | 7 | 便 | G2 | + | + | - | + | |
| | | | 8 | 便 | G2 | - | + | - | + | |
| | | | 9 | 便 | G2 | + | + | - | + | |
| | | | 10 | 便 | G2 | - | + | - | + | |
| | | | 11 | 便 | G2 | - | + | - | + | |
| | | | 12 | 便 | G2 | - | - | - | + | |
| | | | 13 | 便 | G2 | + | + | - | + | |
| | | | 14 | 便 | G2 | - | + | - | + | |
| | | | 15 | 便 | G2 | - | - | - | + | |
| | | | 16 | 便 | G2 | - | - | - | + | |
| | | | 17 | 便 | G2 | - | - | - | + | |
| | | | 18 | 便 | G1 | + | - | + | - | |
| | | 2 | | 19 | 便 | G2 | - | - | - | + |
| | | | | 20 | 便 | G2 | - | - | - | + |
| | | | | 21 | 便 | G2 | - | + | - | + |
| | | | | 22 | 便 | G1,G2 | + | + | + | + |
| | | | 23 | 便 | G2 | + | + | - | + | |
| | | | 24 | 便 | G2 | - | + | - | + | |
| | | | 25 | 便 | G2 | - | - | - | + | |
| | | | 26 | 便 | G2 | - | + | - | + | |
| | | | 27 | 便 | G2 | - | + | - | + | |
| | | | 28 | 便 | G2 | + | + | - | + | |
| | | | 29 | 便 | G2 | - | + | - | + | |
| | | | 30 | 便 | G2 | - | + | - | + | |
| | | | 31 | 便 | G2 | - | - | - | + | |
| | | | 32 | 便 | G2 | - | + | - | + | |
| | | | 33 | 便 | G2 | - | + | + | + | |
| | | | 34 | 便 | G2 | - | - | - | + | |
| | | | 35 | 便 | G2 | - | + | + | + | |
| | | | 36 | 便 | G2 | - | - | - | + | |
| | | | 37 | 便 | G2 | - | - | - | + | |
| | | | 38 | 便 | G2 | + | + | - | + | |
| | | | 39 | 便 | G2 | + | + | - | + | |
| | | | 40 | 便 | G2 | + | + | - | + | |

| | | | | | | | |
|---|----|-----|-------|---|---|---|---|
| | 41 | 便 | G2 | - | + | + | + |
| | 42 | 便 | G1,G2 | - | + | + | + |
| | 43 | 便 | G1 | + | - | + | - |
| 3 | 44 | 便 | G2 | + | - | - | + |
| | 45 | 便 | G2 | + | + | - | + |
| | 46 | 便 | G2 | - | + | - | + |
| 5 | 47 | 便 | G2 | - | - | - | + |
| | 48 | 便 | G2 | - | - | - | + |
| | 49 | 便 | G2 | - | - | - | + |
| | 50 | 便 | G2 | - | - | - | + |
| | 51 | 便 | G2 | + | - | - | + |
| | 52 | 嘔吐物 | G2 | + | + | - | + |
| | 53 | 嘔吐物 | G2 | + | + | - | + |
| | 54 | 便 | G2 | + | + | - | + |
| | 55 | 便 | G2 | + | + | - | + |
| | 56 | 嘔吐物 | G2 | + | + | - | + |
| 6 | 57 | 便 | G2 | + | + | - | + |
| | 58 | 便 | G2 | - | - | - | + |

検出された NV 遺伝子の genogroup 別は, G1 が 2 検体, G2 が 54 検体, G1 と G2 が同時に検出された検体が 2 検体であった。事例 および においては, G1 および G2 が同時に検出され, それ以外の事例については単一の genogroup が検出された。事例 では患者 1 名からの同一検体から同時に両 genogroup が検出された。事例 においては 3 名の患者から NV 遺伝子が検出されたが, 各々 G1 のみ, G2 のみ, G1 と G2 が同時に検出された。

今回使用したプライマーの検出成績を genogroup 別に表 3 にまとめた。G2 については, COG2R/F プライマーが全例検出することができた。続いて

P1/P3 プライマーが 55.6%, NV81/82・SM82 プライマーが 31.5% の検出率であった。COG1R/F プライマーは G1 に特異的なプライマーであるが, 3 検体(5.6%) 検出された。

G2 について, 検出されたプライマーの組み合わせを図 1 に示す。COG2R/F プライマーのみで検出されたものが 21 検体あった。それ以外の検体は, 他のプライマー (NV81/82・SM82 and/or P1/P3) でも検出された。NV81/82・SM82 および P1/P3 プライマーのみで検出された例は無かった。一方, G1 については検出数が 2 検体と少ないが, NV81/82・SM82 と COG1R/F プライマーは全例検出することができた。

表 3 genogroup 別プライマーの検出成績

| genogroup | 陽性検体数 | 検出成績(%) | | | |
|-----------|-------|--------------|-----------|----------|-----------|
| | | プライマー | | | |
| | | NV81/82・SM82 | P1/P3 | COG1R/F | COG2R/F |
| G1 | 2 | 2 (100) | 0 (0) | 2 (100) | 0 (0) |
| G1&G2 | 2 | 1 (50.0) | 2 (100) | 2 (100) | 2 (100) |
| G2 | 54 | 17 (31.5) | 30 (55.6) | 3 (5.6) | 54 (100) |
| 合計 | 58 | 20 (34.5) | 32 (55.2) | 7 (12.1) | 56 (96.6) |

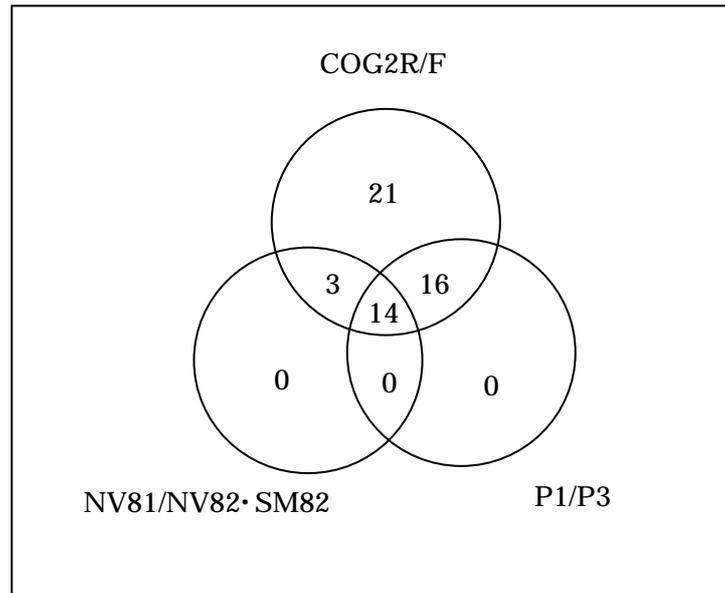


図1 G2陽性検体 (n=54) と検出プライマーの組み合わせ

4. 考 察

昨年、2000年度および2001年度に札幌市で検出されたNV遺伝子の、genogroup別およびORF1のRNAポリメラーゼ領域に設定された3種類のプライマー(NV81/82・SM82、P1/P3およびYuri22R/F)の検出成績について報告した¹⁾。その結果、この期間の札幌市における食中毒等の原因となったNVについて、G1が優勢であり、NV81/82・SM82プライマーはG1に、P1/P3およびYuri22R/FはG2に特異性が高いことが示唆された。

今回、2002年12月以降に発生した食中毒事例等について、NV81/82・SM82およびP1/P3両プライマーに加えて、ORF1とORF2のジャンクション領域に設定されたプライマー(COG1R/FおよびCOG2R/Fプライマー)を使用してNV検査を実施した。G1が検出された事例は3事例(4検体)のみであり、G2が事例数および検出数ともに圧倒的に多かった。G2については、COG2R/Fプライマーが全例検出することができ、それ以外ではP1/P3プライマーが55.6%、NV81/82・SM82プライマーが31.5%と低

い検出率であった。COG系プライマーは、NVゲノム全塩基配列の解析により、最も高度に保存されている領域にgenogroup別に設定されたものであり^{4,5)}、各々のgenogroupに特異性が高いと考えられる。しかしながら、検体番号33、35および41の検体について、ハイブリダイゼーションによりG2と確認されたが、COG1R/Fでも目的とするサイズのPCR産物が確認された。この原因を明らかにするには、塩基配列の解析が必要である。昨年の結果では、P1/P3プライマーはG2を100%検出していたが、今回の結果ではP1/P3プライマーでは検出されず、COG2R/Fプライマーのみで検出されたものが21検体あった。事例については、COG2R/Fプライマーを使用していなければ原因ウイルスを明らかにすることができなかった可能性があり、新たに使用したプライマーはG2に対して非常に有用であると思われる。G1については陽性数が少ないことから、さらに検討が必要である。

食中毒やウイルス性胃腸炎の集団発生事例

における検査では多数検体を迅速かつ正確に処理する必要がある。しかし、NV 遺伝子の多様性により RT-PCR 法に使用するプライマーは複数を組み合わせる必要があり、より効率的かつ効果的に検査を実施するには、様々なプライマーについて検討しておく必要がある。今回新たに使用した COG 系プライマーは、リアルタイム RT-PCR 用にプローブとともに設計された^{4,5)}。これらを用いたリアルタイム RT-PCR 法は、電子顕微鏡でウイルス粒子が確認された患者糞便検体の 99% (80/81) から NV 遺伝子を定量的に検出することが可能であり、他の RT-PCR 法よりも高感度であるとされている⁵⁾。今回はこれらのプライマーとプローブを使用して RT-PCR 法とマイクロプレートハイブリダイゼーションを実施したが、検出率は非常に高いものであり、NV の RT-PCR 法による検査にも有用なプライマーおよびプローブと考えられる。

5. 結 語

2002 年 12 月から 2003 年 6 月までに札幌市で発生した食中毒等の事例について、4 種類のプライマーを用いて検査を行い、各プライマーの検出率を比較検討した。genogroup 別の検出数は、G1 が 2 検体、G2 が 54 検体、G1 と G2 が同時に検出されたものが 2 検体であり、G2 が圧倒的に多かった。従来から使用されている

RNA ポリメラーゼ領域に設定されたプライマーと比較して、ORF1 と ORF2 のジャンクション領域に新たに設定されたプライマーの検出率が非常に高く (100%)、有用なプライマーであると思われる。

6. 文 献

- 1) 菊地正幸, 宮北佳恵, 赤石尚一 他 : 2001~2001 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. 札幌市衛生研究所年報, 29, 76-82, 2002.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 影山 努, 小嶋慈之, 福士秀悦 他 : 蛍光プローブを用いた *Norwalk virus* (NV) の高感度検出法の開発. *Vita*, 18, 42-49, 2001.
- 5) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M. et al : Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 1548-1557, 2003.

Detection of Norovirus Genes by RT-PCR with Four Primer Sets in Sapporo from December 2002 to June 2003

Masayuki Kikuchi, Yoshie Miyakita, Hideyasu Tsuchiya, Tomoko Otani and Kozo Fujita

Stool and vomitus samples from patients with gastroenteritis were examined for the detection of Noroviruses (NV) by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using four primer sets in Sapporo from December 2002 to June 2003. NV genes were detected in 55 of 102 stool specimens and in three of four vomitus specimens. Genogroup II (GII) and GI genes were detected in 54 and two samples, respectively. In another two samples GI and GII strains were detected simultaneously. The primer set of COG2R/F designed for the open reading frame (ORF) 1 and ORF2 junction region detected all of the GII viruses. The detection rates for GII strains using primer sets of NV81/82/SM82 and P1/P3 were 31.5% and 55.6% respectively, in 54 samples.

This result suggests that the primer set of COG2R/F is highly sensitive and specific for detection of NV GII strains.