

愛媛県の急性胃腸炎事例におけるDual Typing法によるノロウイルス遺伝子型別の検討

豊嶋千俊 越智晶絵 山下まゆみ 青野学 井上智 四宮博人

Examination of norovirus genotypes by a dual-typing method in acute gastroenteritis cases in Ehime

Chitoshi TOYOSHIMA, Akie OCHI, Mayumi YAMASHITA, Manabu AONO,
Satoshi INOUE, Hiroto SHINOMIYA

Noroviruses (NoVs) have been detected from sporadic cases of viral acute gastroenteritis as well as gastroenteritis outbreaks such as food poisoning. NoV has a RNA genome containing three open reading frames (ORFs). Many NoV genotypes have been identified, and it has been found that Nov recombination frequently occurs in the ORF1/ORF2 overlap. Therefore, it is recommended that both the ORF1 RNA-dependent RNA polymerase (Polymerase) region and the ORF2 N/S region are examined, and that Nov genotypes are determined based on the dual typing.

In this study, we tested a dual-typing method using the MON primer including a part of the N/S region and a part of the polymerase region, for PCR detection of NoV in clinical specimens from sporadic cases and outbreaks of acute viral gastroenteritis from Jan. 2011 to March 2019. It was revealed that we could successfully performed the dual-typing of the NoVs tested and phylogenetic tree analysis of them, in a shorter time than conventional method.

Keywords : Norovirus, Gastroenteritis, Polymerase region, N/S region, MON primer, Dual Typing

はじめに

ノロウイルス (NoV)は、感染性胃腸炎の散発例から検出される病原体のおよそ半数を占めているほか、食中毒等の集団発生事例からも多数検出されている。

NoVのゲノムは3つのOpen reading frame (ORF)を有するRNAゲノムで、多くの遺伝子型が存在している。現在、基本的には、ORF2の Capsid (N/S)領域の配列による遺伝子型別が行われている。しかし、NoVは、ORF1とORF2のジャンクション領域での遺伝子の組換えが頻発することが知られており、流行状況等の疫学情報を的確に把握するためには、遺伝子型別についてORF1のRNA-dependent RNA polymerase (Polymerase)領域とORF2のN/S領域を対照にし、それぞれの遺伝子型分類を組み合わせることで推定されている(例:GII.P21-GII.1)。

このことから、当所においても検出されたウイルスの一部について、必要に応じて両領域の解析を行ってきたが、遺伝子解析装置の能力の関係上、両領域をそれぞれ遺伝子増幅した上で解析する必要があり、迅速性・効率性の面で課題があった。

そこで今回、増幅部位にN/S領域とPolymerase領域の一部を含むMONプライマーを用いてDual Typing法により解析し、その有用性について検討を行ったので報告する。

材料と方法

1 使用プライマー

Cannon JL¹⁾により報告されている、Dual Typingが可能とされているプライマーセットとして、NoV GIにはMON432(5'-TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA-3')とG1SKR(5'-CCA ACC CAR CCA TTR TAC A-3')を、NoV GIIにはMON431(5'-TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA-3')とG2SKR(5'-CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT-

3')の組み合わせを使用した(図1).

2 反応条件の検討

(1) 供試検体

2011年1月から2018年12月の間に感染症発生動向調査事業等で胃腸炎患者から採取され、NoV陽性でウイルス量の多かった検体計14検体について、あらかじめ国立感染症研究所のウイルス性下痢症診断マニュアル²⁾やKageyama³⁾らの方法によるRealtime PCRによりウイルス濃度を測定し、階段希釈したものを供試した。14検体の内訳は、GIが9検体(過去に遺伝子型別未実施), GIIが5検体(過去にN/S領域の遺伝子型別実施済4検体(GII.3, 4, 6, 17各1検体), 遺伝子型別未実施1検体)である。

(2) 反応試薬

今回使用するプライマーにはイノシンを含んでおり、プライマーとPCR試薬の組み合わせにより増幅効率等が異なることがあるため、1で示したプライマーに最も適したDNAポリメラーゼの検討を行った。プライマーの特徴や汎用性等を考慮し、KOD Multi & Epi (TOYOBO), Tks Gflex (Takara), Ex Taq Hot Start Version (Takara)及びGo Taq Hot Start Colorless (Promega)の計4種類のPCR試薬を選択し、感度及び特異度等の点で最も適した試薬を検討した。なお反応条件は各試薬のプロトコルに従った。代表例としてKOD Multi & Epiの条件を表1に示した。

3 Dual Typing法の検討

上記2の検討で得られた増幅産物について、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、オランダのMarion Koopmans博士らのNoronet上のNorovirus Typing Tool (<http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>)でDual Typingが可能かどうか確認を行った。

4 集団発生事例等における有用性の検討

上記2の条件が集団発生事例等でも有用かどうかを確認するために、最も適していると考えられたDNAポリメラーゼを用いて、2018年1月から2019年3月の間に集団発生もしくは施設内流行事例として当所に搬入され、NoV陽性であった9事例33検体を供試し、検出の可否及び遺伝

子型別について検討を行った。さらに、NoV GIIの増幅産物については、Polymerase領域及びN/S領域の系統樹解析も行った。

なお、途中で検出感度の向上を目的に、検体の量やプライマー濃度の再検討を行い、2018年12月以降の検体については、検討後の検体量及び濃度で試験を行った。

結果及び考察

1 反応条件等の検討

検出感度の比較結果を表2, 3に示した。比較した4種類のDNAポリメラーゼの間では感度に大きな差は認められなかったが、その中でもKOD Multi & Epiが比較的良好であった。

一方、遺伝子型による感度の差については、GII.6において感度が大きく低下する結果となり、一部の遺伝子型においては解析が困難となる可能性が示唆された。但し、当所での同一遺伝子型の検出例が少なく、1検体しか検討できていないため、検体由来のPCR阻害物質による感度低下の可能性も否定できなかった。なお、GIについては遺伝子型別実施済みの検体がなく、ランダムに選択したため、2013年の2検体及び2015年の5検体の遺伝子型は結果的に同一となったが、いずれの検体も検出感度の結果は同一であった。

本法による検出限界は 10^3 から 10^4 コピー/2.5 μ L程度と考えられ、KageyamaらのRealtime PCR法より感度が100倍以上劣る結果となった。従って、NoV検出系としての使用は困難と考えられたが、得られた増幅産物のDual Typingは安定かつ的確に実施できたことから、解析系としての使用は有用と考えられた。

2 集団発生事例における有用性の検討

MONプライマーに最も適していると考えられたKOD Multi & Epiの反応系を用いて行った、集団発生・施設内流行事例における、検出・遺伝子型別及び系統樹解析の結果を表4及び図2に示した。当初の反応条件下では、Realtime PCR法でのウイルス量が 3.49×10^3 コピー/2.5 μ L

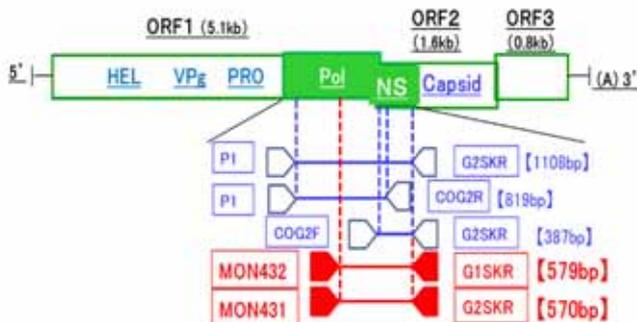


図1 NoVの遺伝子構造と各種プライマーセットの増幅領域

表1 PCR反応液の組成と反応条件

Mix	Volume (μ L)
2xKOD Buffer	25.0
F Primer : MON432 or MON431 (10 μ M)	1.0
R Primer : G1SKR or G2SKR (10 μ M)	1.0
KOD-Multi&Epi	1.0
Template (cDNA)	2.0
DW	20.0
Total	50.0

94 2 min, (98 10 sec, 50 15 sec, 68 30 sec) \times 40 cycles

以上の検体で検出・解析が可能であった。NoV胃腸炎患者の糞便中からはそれ以上のウイルス量が検出されることが多いが、無症状の調理従事者等から検出されるウイルス量はそれよりも少ないことが多く、調理従事者と患者の関連性等、集団発生事例における解析を考慮すると、十分に対応しうるとは言い難い結果であった。

このため、反応条件の検討の際に使用し、感度の非常に悪かったGII6の検体を用いて、プライマー濃度と検体量の条件について再検討を行ったところ、プライマー濃度を当初の10 µMから50 µMに、検体量を2.5 µL/50 µL から5.0 µL/50 µLにすると、1000倍程度感度を向上させることができ、かつ非特異反応も認められず、より幅広い事例において適用が可能になると考えられた。

このことから、2018年12月以降の集団発生事例については、この改良した方法で調査を実施したところ、ウイルス量が 5.4×10^1 コピー/2.5 µLという低濃度でも検出・解析が

表2 DNAポリメラーゼの種類による検出感度の比較(NoV GI)

検体	ウイルス濃度 ($2\text{C}^-/2.5\mu\text{L}$)	DNA ポリメラーゼ別検出可否				Dual Typing 可否	Dual Typing 遺伝子型
		KOD	Gflex	EX Taq	Go Taq		
2018 (N=1)	1.0×10^5	+	+	+	+	可	GII.P2-GI.2
	1.0×10^4	+	±	+	+	N.D.	
	1.0×10^3	±	-	±	±	N.D.	
	1.0×10^2	-	-	-	-	N.D.	
2015 (N=5) (はN=1)	1.0×10^5	+	+	+	+	可	GII.P3-GI.3
	1.0×10^4	+	+	+	+	N.D.	
	1.0×10^3	±	±	±	±	N.D.	
	1.0×10^2	-	-	-	-	N.D.	
2013 (N=2) (はN=1)	1.0×10^5	+	+	+	+	可	GII.P6-GI.6
	1.0×10^4	+	±	±	±	N.D.	
	1.0×10^3	±	±	-	-	N.D.	
	1.0×10^2	-	-	-	-	N.D.	
2011 (N=1)	7.1×10^4	+	+	+	+	可	GII.P1-GI.1
	1.0×10^4	+	±	±	+	N.D.	
	1.0×10^3	±	-	-	±	N.D.	
	1.0×10^2	-	-	-	-	N.D.	

表3 DNAポリメラーゼの種類による検出感度の比較(Nov GII)

検体	ウイルス濃度 ($2\text{C}^-/2.5\mu\text{L}$)	DNA ポリメラーゼ別検出可否				Dual Typing 可否	Dual Typing 遺伝子型
		KOD	Gflex	EX Taq	Go Taq		
2017(GII4) (N=1)	1.0×10^5	+	+	+	+	可	GII.Pe-GII.4
	1.0×10^4	±	±	+	±	N.D.	
	1.0×10^3	-	±	±	-	N.D.	
	1.0×10^2	-	-	-	-	N.D.	
2017(未分類) (N=1)	1.0×10^5	+	+	+	+	可	GII.P12-GII.3
	1.0×10^4	±	+	+	±	N.D.	
	1.0×10^3	±	±	±	±	N.D.	
	1.0×10^2	-	-	-	-	N.D.	
2015 (GII17) (N=1)	1.0×10^5	+	+	+	+	可	GII.P17-GII.17
	1.0×10^4	+	+	+	±	N.D.	
	1.0×10^3	±	±	±	±	N.D.	
	1.0×10^2	-	-	-	-	N.D.	
2014 (GII6) (N=1)	1.0×10^5	-	-	±	±	不可	
	1.0×10^4	-	-	±	-	N.D.	
	1.0×10^3	-	-	-	-	N.D.	
	1.0×10^2	-	-	-	-	N.D.	

+ : 増幅産物が良好に確認できる
 ± : 増幅産物は概ね確認できるがかなり薄い
 - : 増幅産物は確認されず

可能であった。

検出されたNoV GIIのMaximum Likelihood (ML) 法による系統樹解析では、Polymerase領域においては、同じ事例では100%の相同性であったほか、同じ遺伝子型(GIIP.16)でも事例が異なると別のクラスタに属する(99.18% ~ 99.59%の相同性)など、疫学調査への活用も可能と考えられる良好な解析結果となった。また、N/S領域も概ねPolymerase領域と同じ傾向であったが、施設内流行検体間については99.288 ~ 99.644%の相同性となり、単一暴露の集団発生事例とそうでない施設内感染事例の相違も解析できる結果となった。

これらの結果から、この改良法を用いると集団発生事例の疫学調査等への適用も可能と思われ、遺伝子解析に要する時間の大幅短縮及び効率化が可能になり、保健所調査の一助になるものと考えられた。

ただし改良法を用いてもRealtime PCR法よりはやや感度が劣ることに留意する必要がある。施設ふき取りや食材等、微量のウイルスしか含まない検体への適用は困難で、今後、更なる感度上昇に向けた反応条件等の検討を行う必要がある他、未検討の遺伝子型での確認等、より多くの事例において、更なる検証を進めていく必要があると考えられた。

表3 愛媛県の集団発生事例等における検出・解析結果

No.	検体番号	採取年月	Real time コピー数 ($2\text{C}^-/2.5\mu\text{L}$)	MON 検出 可否	MON 遺伝子型	発生保健所
1	18-32		4.82×10^3	+		
2	18-54	2018年 1月	6.63×10^5	+	GII.P17-GII.17	今治 HC 集発
3	18-55		5.59×10^4	+		
4	18-150	2018年 4月	3.69×10^5	+	GII.Pe-GII.4	八幡浜 HC 集発 1
5	18-168		3.49×10^3	+		
6	18-173		1.48×10^5	+		
7	18-191	2018年 4月	1.90×10^6	+	GII.P16-GII.2	八幡浜 HC 集発 2
8	18-193		3.50×10^5	+		
9	18-217		2.04×10^4	+		
10	18-218		1.05×10^4	+		
11	18-219	2018年 4月	1.11×10^5	+	GII.P16-GII.2	宇和島 HC 施設内流行
12	18-220		8.26×10^4	+		
13	18-221		1.42×10^6	+		
14	18-222		1.60×10^4	+		
15	18-224		3.90×10^5	+		
16	18-279		1.14×10^5	+		
17	18-280		1.96×10^5	+	GII.P16-GII.2	
18	18-281	2018年 7月	3.07×10^5	+		西条 HC 集発 1
19	18-282		1.33×10^3	-		
20	18-285		1.01×10^3	-	N.D.	
21	18-288		1.42×10^3	-		
以下の検体は検体量及びプライマー濃度を変更して実施						
22	18-454	2018年 12月	2.1×10^2	+	GII.Pe-GII.4	西条 HC 集発 2
23	18-455		1.1×10^3	+		
24	18-456		5.4×10^1	+		
25	19-149	2019年 2月	7.18×10^2	+	GII.16-GII.2	四国中央 HC 集発 1
26	19-151		3.52×10^3	+		
27	19-152		5.49×10^4	+		
28	19-198	2019年 3月	2.79×10^3	+	GII.P16-GII.4	西条 HC 集発 3
29	19-206		5.36×10^2	+		

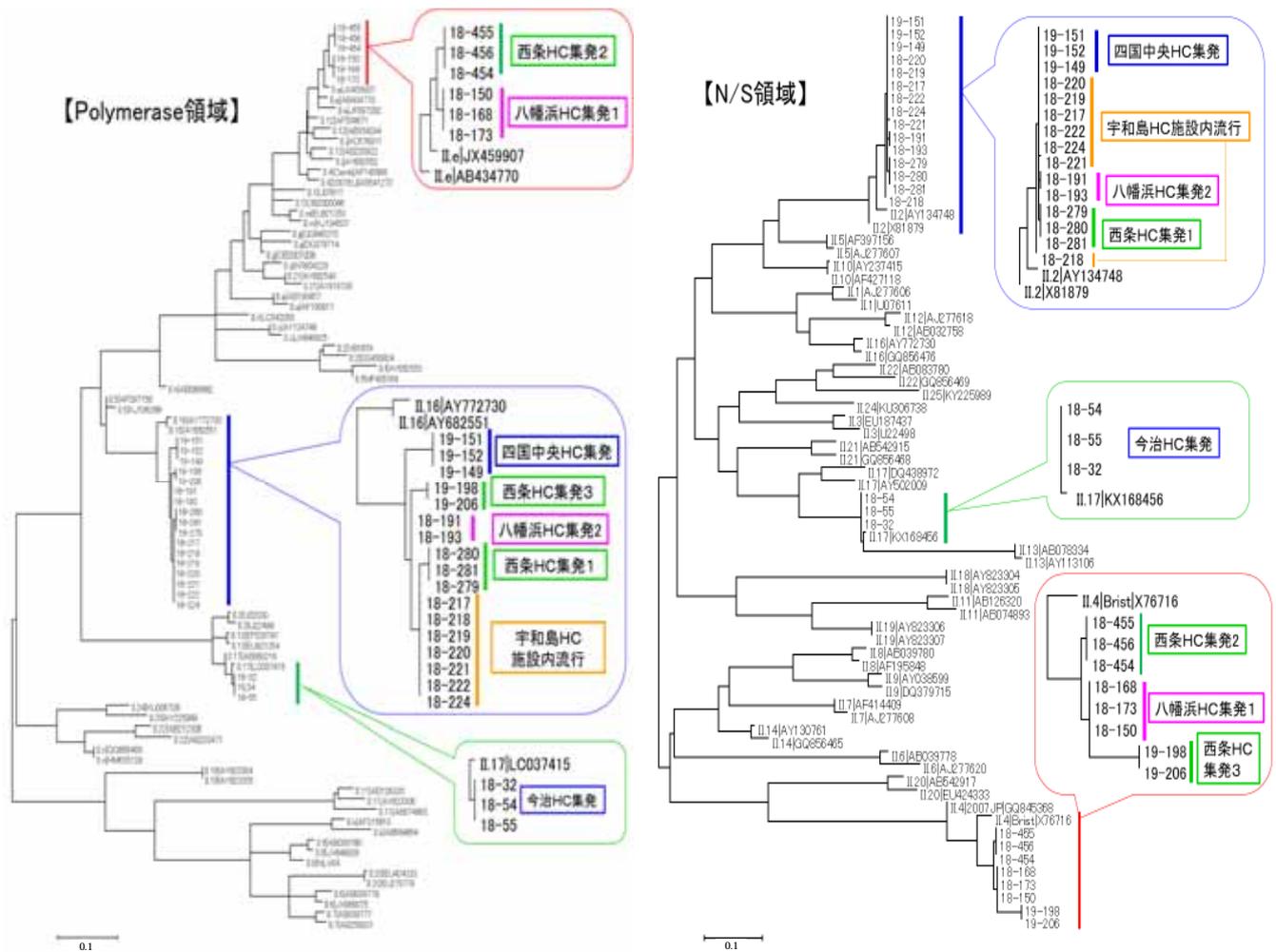


図2 愛媛県の集団発生・施設内流行事例における系統樹解析結果 (ML法)

まとめ

- 1 MONプライマーによって、多くの感染性胃腸炎散发事例や集団発生事例等で、Polymerase領域とN/S領域のDual Typingが可能であった。
- 2 集団発生事例における調理従事者と患者等における遺伝子解析等にも概ね適用でき、保健所が行う疫学調査の一助になりうると考えられた。
- 3 本方法は、一度の反応でDual Typing及び解析が可能であることから、解析に要する時間の短縮やコスト面等での効率化も期待できる。
- 4 従来から行っているRealtime PCR法より感度がやや劣ることから、施設のふき取り検体や食材等、微量のウイルスしか含まれない検体への適用は困難と思われた。
- 5 更なる感度向上に向けた反応条件等の検討の他、未検討の遺伝子型での確認等、より多くの事例において、今後検証を進めていく必要があると考えられた。

本研究の一部は、AMED医療研究開発推進事業費補助金(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発研究事業)「下痢症ウイルス感染症の分子疫学及び流行予測に関する研究」によりなされたものであり、国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル ノロウイルス(第1版)令和元年6月」⁴⁾に反映された。

文献

- 1) ウイルス性下痢症診断マニュアル第3版, 国立感染症研究所, 平成15年7月(2003)
- 2) Cannon JL, et al: J Clin Microbiol, 55(7), 2208-2221(2017)
- 3) Kageyama T, et al: J Clin Microbiol, 41(4), 1548-1557(2003)
- 4) 病原体検出マニュアル ノロウイルス(第1版), 国立感染症研究所, 令和元年6月(2019)