

胃腸炎ウイルスの疫学的研究

—Real-time RT-PCR法によるヒトC群ロタウイルス検査法の開発—

葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志 (ウイルス科)

【調査研究】

胃腸炎ウイルスの疫学的研究

—Real-time RT-PCR法によるヒトC群ロタウイルス検査法の開発—

Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama

—Development of Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Method for the Detection of Human Group C Rotaviruses—

葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志 (ウイルス科)

Mitsutaka Kuzuya, Masako Hamano, Kouji Kida, and Ritsushi Fujii

要 旨

Real-time RT-PCR法によるヒトC群ロタウイルス(ヒトCRV)の検査法について検討した。既報のプライマー及びプローブの一部改変を加えることで、ほぼ全てのヒトCRV株を特異的かつ定量的に検出できる系を確立した。検証の結果、確立した方法はヒトCRVのみを特異的に検出できること、糞便中の非特異物質等の影響を受けないこと、さらに良好な定量性を示すことなどがわかった。なお、検出限界はアッセイあたり10コピーであった。本法を用いて県内の下水を調査したところ、11,000～4,146,000コピー/LのヒトCRVが存在すること、及びウイルス量は3月下旬頃がピークであることなどが今回初めて明らかになった。今回確立したReal-time RT-PCR法は、Conventional nested RT-PCR法とほぼ同等の感度を有するのみならず、約3時間半程度で結果が判明すること、検体中のウイルスを定量的に検出できるなど、ヒトCRV集団発生事例の感染経路究明等に大いに役立つものと期待される。

[キーワード：ヒトC群ロタウイルス, Real-time RT-PCR, TaqMan MGB probe, 定量的検出, 流入下水]

[Key words : human group C rotavirus, Real-time RT-PCR, TaqMan MGB probe, quantitative detection, influent sewage warter]

1 はじめに

ロタウイルスはレオウイルス科に属する2本鎖のRNAを遺伝子として持つウイルスであり、ヒトおよび動物の重要な胃腸炎起因ウイルスとして知られている¹⁾。ウイルス粒子は二重の殻(内殻および外殻)で構成されており、内殻蛋白の抗原性やウイルス遺伝子の違いによりA～G群に分類されている。これらのうち、ヒトに病原性を有するのはA、BおよびC群である¹⁾。

ヒトA群ロタウイルスは小児胃腸炎の主要な病原体であり、我が国における患者数は年間約80万人に及ぶと推定されている²⁾。ヒトB群ロタウイルスは、1982～87年に中国で発生した集団胃腸炎の病原体として確認された後、インドやバングラディッシュにおける胃腸炎例からも散発的に検出されたものの、それ以外の地域における検出例はない。ヒトC群ロタウイルス(ヒトCRV)は主に年長児～成人に胃腸炎を起し、日本をはじめ世

界各地に広く分布していることがわかっている。本ウイルスの検出頻度はさほど高くないものの、しばしば食中毒様の集団胃腸炎を引き起すため公衆衛生上問題視されている。我が国におけるヒトCRV集団発生事例は、1988年に福井県で発生した大規模事例(有症者675名)以降、2006年までに計19例が報告されている³⁾。推定感染経路については、ヒト→ヒト感染が大部分を占めるものの、食品等が原因と思われるケースも散見される。

ヒトCRVの検査については、我々が開発した⁴⁾逆受身血球凝集反応法により迅速・簡便な検出が可能であり、実際の事例においてその有効性が確認されている^{5)～7)}。しかしながら、その検出感度は約 10^7 個/mLであるため、推定原因食品や病日を経過した患者糞便、及び環境試料中などに含まれる極微量のウイルスを検出することは困難である⁶⁾。一方ノロウイルス検査においては、Real-time RT-PCR法による特異的かつ高感度な検査法が既

に確立されており⁸⁾、患者の特定のみならず食品や環境水中などの検査にも広く応用されている^{9), 10)}。そこで、ヒトCRVの特異的で高感度な検出を目的として、Real-time RT-PCR法に基づく検査法について検討を行った。

2 材料及び方法

2.1 供試検体

Real-time RT-PCR法の特異性を確認するため、ヒトCRV陽性糞便3検体(検体番号:N1217, OH1250, OH1603), 陰性糞便5検体(検体番号:OH1517, OH1557, OH2213, OH2230, OH2334), 及び動物由来CRV株3検体(ブタCRV: Cowden株, OS999株, ウシCRV: Shintoku株)の培養上清をそれぞれ供試した。また環境試料として、2009年1月~2010年1月に県内のA下水処理場で採取された流入下水23検体を、片山らが報告している陰荷電膜濃縮法¹¹⁾により1,250倍に濃縮したものを試料として用いた。

2.2 コントロールプラスミド

Real-time RT-PCR法の検証及び定量用コントロールとして、ヒトCRVの代表的な株である¹²⁾OK118株, OK450株及びK9304株の外殻糖蛋白(VP7)遺伝子を、それぞれプラスミドpUC19にクローニングして作成した組み替えプラスミド^{13), 14)}を使用した。

2.3 逆転写反応によるcDNAの合成

市販のQIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen社製)を用いて検体からウイルスRNAを抽出し、既報の方法^{6), 13)}に従ってVP7遺伝子のcDNAを合成した。すなわち、抽出したRNA 4 μ LにVP7遺伝子の両端に相補的なプライマー(5'-GGC ATT TAA AAA AGA AGA AGC TGT-3'及び5'-AGC CAC ATG ATC TTG TTT ACG C-3', 各25 μ M)及びDMSOをそれぞれ1 μ Lずつ添加し97 $^{\circ}$ C 5分間熱変成後、氷中で急冷した。次に5 \times First-strand buffer (Invitrogen社製) 4 μ L, 2.5mM dNTPs

(Takara社製) 4 μ L, Recombinant RNase inhibitor (40U/ μ L: Takara社製) 0.5 μ L, Nuclease free water 2.5 μ L及びSuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen社製) 1 μ Lをそれぞれ加えて20 μ Lとし、42 $^{\circ}$ C 60分間逆転写反応を行った後、70 $^{\circ}$ C 15分の加熱により酵素を失活させた。

2.4 Real-time RT-PCR法

Real-time RT-PCR法に使用したプライマー及びプローブは基本的にLoganら¹⁵⁾の報告に従ったが、フォワードプライマーについては一部改変を加えた(表1)。TaqMan gene expression master mix (Life technologies社製)の反応液18 μ L(フォワード及びリバースプライマー各0.6 μ M, TaqMan MGB プローブ0.2 μ Mを含む)に合成したcDNA 2 μ Lを加えて20 μ Lとし、StepOnePlus (Life technologies社製)を用いて増幅及び検出を行った。反応条件は50 $^{\circ}$ C 2分, 95 $^{\circ}$ C 10分の後、熱変性(95 $^{\circ}$ C 15秒)及びアニール・伸長反応(60 $^{\circ}$ C 1分)のサイクルを45回繰り返した。解析は、StepOne Software v2.1 (Life technologies社製)を用いた。

2.5 Conventional RT-PCR法

Real-time PCR法と従来法によるRT-PCR法(Conventional RT-PCR法)との一致性を検証するため、逆転写反応で合成したcDNAについて、既報の方法⁶⁾に従いnested PCR法(2段階でPCRを行う高感度な検出法)による検査を実施した。

3 結果

3.1 Real-time RT-PCR法の検討

まず最初に、Loganら¹⁵⁾の報告に従って作製したプライマー及びプローブを使用した検査系について、既知のコピー数に調整したOK118株, OK450株及びK9304株のコントロールプラスミドを用いて検証を行った。その結果、すべてのプラスミドで特異増幅が確認されたも

表1 Real-time RT-PCR法のプライマー及びプローブ配列

プライマーまたは プローブ名	塩基配列(5'-3')	部位	文献
CRV_TqM_F2	CCATTAGATACTACAAGTAATGGAATYGG	652-680	本研究
CRV_TqM_Rev	TGGGTGTCATTTGATACAACCTCA	731-708	Loganら ¹⁴⁾
CRV_TqM_Prb	(FAM) CAGCTAGTACAGAAACTT (MGB/NFQ*)	689-706	Loganら ¹⁴⁾

* MGB: Minor Groove Binder, NFQ: Non Fluorescent Quencher

の、OK450株プラスミドのCt値(増幅曲線がThreshold lineと交差した増幅サイクル数)が、OK118及びK9304株プラスミドの値に比べ同一コピー数において8サイクル程度多く、十分な検出感度が得られていないことがわかった。そこで、プライマー及びプローブ配列についてOK118株、OK450株及びK9304株のVP7

遺伝子配列とのマッチングを検討したところ、OK450株に関してフォワードプライマーの3'端付近に2カ所のミスマッチが存在し、これが感度低下の原因であると考えられた。そこで、このミスマッチを回避すべく新たなプライマーを設計・合成し(表1)、同様に検証実験を行ったところ、OK450株プラスミドの感度低下は解消された。

3.2 Real-time RT-PCR法の特異性及び検出感度

Real-time RT-PCR法の特異性について、ヒトCRV陽性糞便3検体及び陰性糞便5検体に加え、ブタCRV2株及びウシCRV1株を用いて検討を行った。その結果、ヒトCRV陽性糞便のみで特異的増幅が認められ(データを示さず)、本法がヒトCRVのみを特異的に検出できること、及び糞便中の非特異物質等の影響を受けないことがわかった。

次に、Real-time RT-PCR法の定量性及び検出感度を調べるため、OK118株、OK450株、及びK9304株プラスミドを1～100,000copies/tubeの範囲で10倍段階希釈を行って測定した。その結果(図1)、いずれのプラスミドにおいても10～100,000copies/tubeの範囲で、プラスミド希釈の対数値とCt値との間に明確な比例関係が認められ($R^2=0.999\sim 0.9998$)、またプラスミド濃度が10倍濃くなるにしたがいCt値が3.3～3.5ずつ低下していた。このことから本検査法は良好な定量性を有していることがわかった。なお、いずれのプラスミドでも1copy/tubeでは増幅がみられなかったことから、本法の検出感度はアッセイあたり10コピーであると考えられた。

3.3 流入下水の測定結果

環境試料中等に極微量存在するヒトCRVを検出できるのかについて検討するため、流入下水23検体についてReal-time RT-PCR法による定量検査と同時に、Conventional RT-PCR法による検査を実施した。結果は表2に示すように、Real-time RT-PCR法とConventional RT-PCR法の結果はよく一致しており、両法はほぼ同等の感度を有することがわかった。定量結果から、2009年1月～7月に採取された流入下水1Lあたり11,000～4,146,000コピーのウイルス遺伝子が存在することが明らかとなり、また3月下旬を定量値のピークとする検出パターンが認められた。

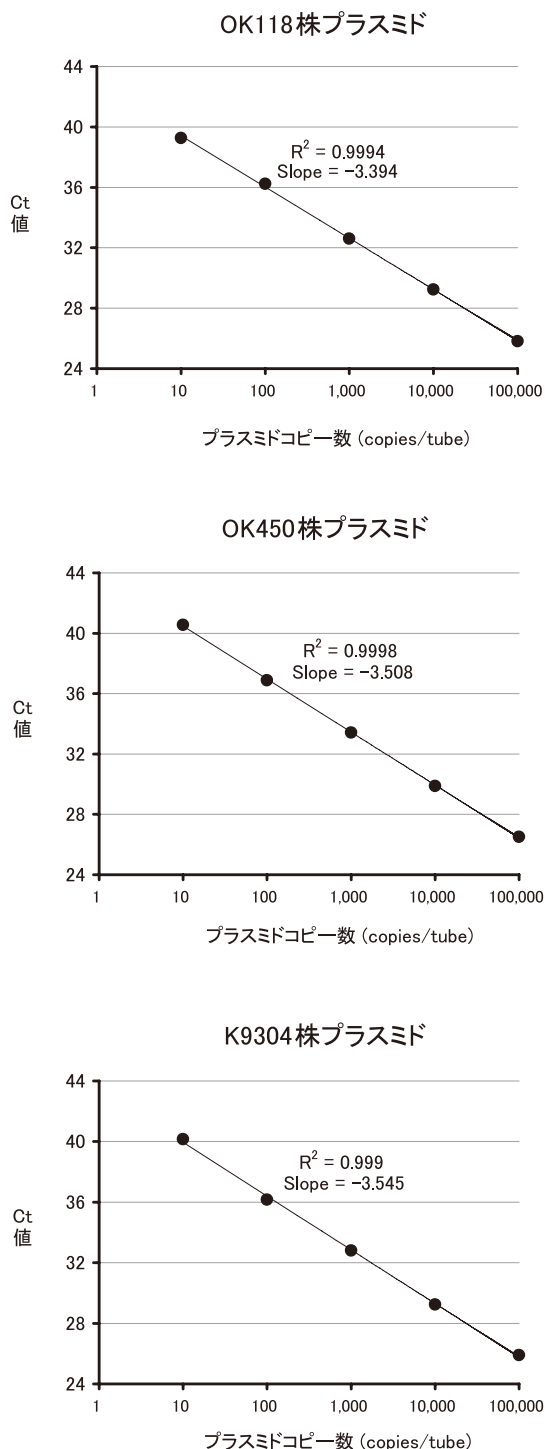


図1 コントロールプラスミドの測定結果
各プラスミドを10倍段階希釈し、Real-time RT-PCR法で測定した。

表2 流入下水の遺伝子検査法による測定結果

検体番号	検体採取日 (月/日/年)	Real-time RT-PCR定量値 ($\times 10^3$ copies/L)	Conventional RT-PCR 検査結果	
			1st PCR	2nd PCR
WW-02	1/27/09	220	-	+
WW-04	2/10/09	572	-	+
WW-06	2/25/09	146	-	+
WW-08	3/10/09	1,408	-	+
WW-10	3/24/09	4,146	-	+
WW-11	4/7/09	2,006	-	+
WW-13	4/21/09	82	-	+
WW-15	5/19/09	42	-	+
WW-17	6/2/09	11	-	+
WW-19	6/16/09	24	-	+
WW-21	6/30/09	14	-	+
WW-23	7/14/09	781	-	+
WW-25	7/28/09	18	-	+
WW-27	8/11/09	<10	-	-
WW-29	8/25/09	<10	-	-
WW-31	9/8/09	<10	-	-
WW-35	10/13/09	<10	-	-
WW-37	10/27/09	<10	-	-
WW-39	11/10/09	<10	-	-
WW-41	11/24/09	<10	-	-
WW-43	12/8/09	<10	-	-
WW-45	12/22/09	<10	-	-
WW-48	1/19/10	<10	-	-

4 考 察

Real-time RT-PCR法に基づくヒトCRVの検出系は、これまでにMelegら¹⁶⁾がサイバークリーンを用いた系を、Loganら¹⁵⁾がTaqManプローブを用いた系をそれぞれ報告している。しかしながら、Melegらの方法はヒトCRVのみを特異的に検出できず、またLoganらの方法も、分離株や臨床検体等を用いた検証実験が行われていないなどの問題点がみられる。実際、今回の検討においてLoganらの報告したオリジナルの検査系では、フォワードプライマーにある2カ所のミスマッチのためにOK450株をうまく検出することができなかった。そこで今回、プライマーに一部改変を加えることで、ほぼ全てのヒトCRV株を特異的かつ定量的に検出できる検査系を確立することができた。さらに検証実験の結果、今回の方法はヒトCRVのみを特異的に検出できること、糞便中の非特異物質等の影響を受けないこと及び良好な定量性を示すことなどがわかった。また、検出限界もアッセイあたり10コピーと十分な感度を有していた。

我々はこれまでに、ヒトCRVの迅速・簡便な検出法としてモノクローナル抗体を用いた逆受身血球凝集反応

法を開発してきた⁴⁾。本法の検出感度は 10^7 個/mLとさほど高くないものの、集団発生時における患者便からのCRV検出には十分な感度を有することがわかっている^{5)~7)}。しかしながら病日が経過した患者便など、ウイルス量が少ないと思われる検体では陰性となるケースもあるため⁶⁾、推定原因食品などの検査には用いることができない。このような場合には、高感度な2段階増幅法によるConventional RT-PCR法による検査が必要となるが、本法は結果判明までに最低でも10時間を要し、また定量的な検出は不可能である⁶⁾。今回確立したReal-time RT-PCR法は、Conventional RT-PCR法と同等の感度を有するのみならず、約3時間半程度で結果が判明すること、検体中のウイルスを定量的に検出できるなど、ヒトCRV集団発生事例の感染経路究明等に大いに役立つものと期待される。さらに今回、流入下水中のヒトCRVの検出も可能であったことから、飲料水などが感染源と疑われる事例の原因究明等にも適用可能であると思われる。

ヒトCRVはその検出頻度が比較的低いにもかかわらず、住民の多くが本ウイルスに対する抗体を保有している¹⁷⁾など、その流行実態については不明な点が多い。Melegら¹⁶⁾は、2005年2月~12月にかけて流入下水中のCRVを定量的に検査し、下水中に多量のヒトCRVが存在することを明らかにした。さらに、ウイルス量のピークは3~4月であり、特に流域人口の多い処理場の流入下水から最も多量のウイルスが検出されたことを報告している。しかしながらその一方で、調査期間中にヒトCRV感染者はわずか1名しか確認されず、ヒトCRVに感染しても明らかな症状を示さない人が多いのではないかと考察している。我々も、県内下水処理場で採取した流入水中に11,000~4,146,000コピー/Lという多量のヒトCRVが存在することを今回初めて明らかにした。さらに、ウイルス量は3月下旬頃にピークとなるなどMelegらの報告と同様であり、またこれは、我々が既に報告した我が国におけるヒトCRVの流行時期¹²⁾とも一致するものであった。今後さらに長期間にわたって下水中のヒトCRVの動態を調べるとともに、感染者のサーベイランスも同時に行うことで、本ウイルス流行実態の解明が進むものと思われる。

文 献

- 1) 小林宣道, 浦沢正三: ロタウイルス, ウイルス, 50, 157-172, 2000
- 2) 中込とよ子, 中込 治: ロタウイルスワクチンの現状と展望, 病原微生物検出情報, 26, 14-16, 2005
- 3) 葛谷光隆: ロタウイルス感染症, 公衆衛生, 71, 991-993, 2007
- 4) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Nakabayashi, T., Tsunemitsu, H., et al.: Rapid detection of human group C rotaviruses by reverse passive hemagglutination and latex agglutination tests using monoclonal antibodies, J. Clin. Microbiol., 31, 1308-1311, 1993
- 5) 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉 肇, 中山 俣槻ら: 岡山県内で初めて確認されたヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例, 岡山県環境保健センター年報, 24, 55-59, 2000
- 6) 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉 肇: 教育研修施設で発生したヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例, 感染症学雑誌, 77, 53-59, 2003
- 7) 葛谷光隆, 濱野雅子, 西島倫子, 藤井理津志, 小倉 肇ら: 保健福祉施設で発生したC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例, 病原微生物検出情報, 26, 100-101, 2005
- 8) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S. 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
- 9) Hamano, M., Kuzuya, M., Fujii, R., Ogura, H., Yamada, M.: Epidemiology of Acute Gastroenteritis Outbreaks Caused by Noroviruses in Okayama, Japan, J. Med. Virol., 77, 282-289, 2005
- 10) Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Ohgaki, S.: Application of cation-coated Filter Method to Detection of Noroviruses, Enteroviruses, Adenoviruses, and Torque Teno Viruses in the Tamagawa River in Japan, Appl. Environ. Microbiol., 71, 2403-2411, 2005
- 11) 片山浩之: 新たなウイルス濃縮方法の開発と水道水および水道水源調査への適用, モダンメディア, 52, 185-190, 2006
- 12) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Nishijima, M., Ogura, H.: Detection and molecular characterization of human group C rotaviruses in Okayama Prefecture, Japan, between 1986 and 2005, J. Med. Virol., 79, 1219-1228, 2007
- 13) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Nakamura, J., Yamada, M., et al.: Molecular analysis of outer capsid glycoprotein (VP7) genes from two isolates of human group C rotavirus with different genome electropherotypes, J. Clin. Microbiol., 34, 3185-3189, 1996
- 14) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Yamada, M., Shinozaki, K., et al.: Survey of human group C rotaviruses in Japan during the winter of 1992 to 1993, J. Clin. Microbiol., 36, 6-10, 1998
- 15) Logan, C., O'Leary, J. J., O'Sullivan N.: Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children, J. Clin. Microbiol., 44, 3189-95, 2006
- 16) Meleg, E., Banyai, K., Martella, V., Jiang, B., Kocsis, et al.: Detection and quantification of group C rotaviruses in communal sewage, Appl. Environ. Microbiol., 74, 3394-3399, 2008
- 17) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Ohata, R., Ogura, H., et al.: Seroepidemiology of human group C rotavirus in Japan based on a blocking enzyme-linked immunosorbent assay, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 8, 161-165, 2001