

〔資 料〕

ノロウイルス遺伝子の可変領域の検出について

石川県保健環境センター健康・食品安全科学部 大矢 英紀・黒崎 直子・尾西 一

キーワード：ノロウイルス，可変領域

1 はじめに

ノロウイルスによる食中毒の発生時において，患者の他に感染源追求のため調理従事者の検便が通常行われ，両者からノロウイルス遺伝子が検出されることが多い。このとき患者と調理従事者の因果関係を明らかにするためには，更に全塩基配列を決定して，その同一性をもって調理従事者が感染源となり患者が発生したと結論づけるなければならない。しかし，この方法は迅速な対応が困難であり，現段階では事件発生時の検査としては非現実的であると考える。

一方，ノロウイルス遺伝子には，ORF (open reading frame) 2 に可変領域（相同性の低い部分）が存在することが知られており¹⁾，この部分の検出，解析をもって患者と調理従事者の因果関係を判定できないか，新たに PCR 用のプライマーを作成してその有効性を検討したので，その結果について報告する。

2 検 討 方 法

2・1 プライマーの作成

近年，石川県では，胃腸炎の集団発生でノロウイルス GⅡ/3，GⅡ/4，GⅡ/6 の検出が多いため（図1），日本 DNA データバンク（DDBJ）に登録されているこれらの genotype の配列を参考に，ORF 2 の可変領域の一部を検出するプライマー，Forward 1 種類（以下，F2）と Reverse 2 種類（以下，R2，R3）を作成した。な

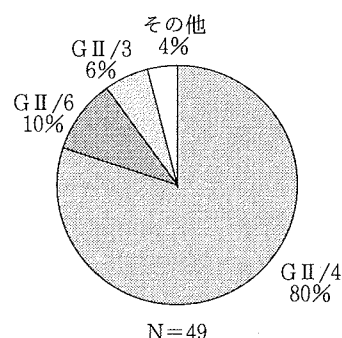


図1 genotype 別ノロウイルス検出状況

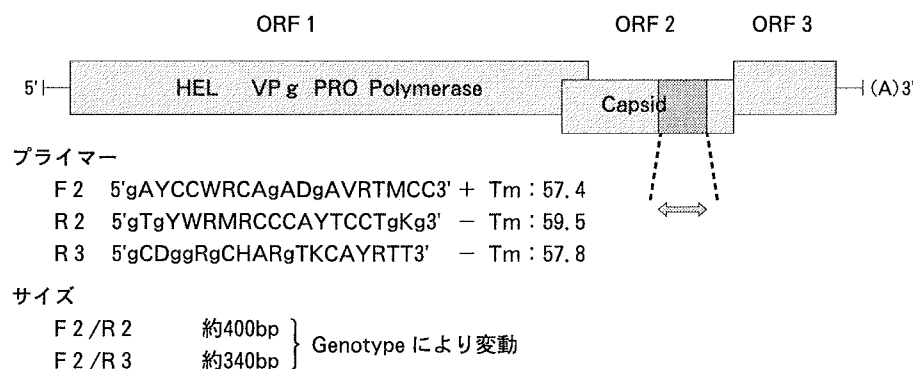


図2 プライマーの位置と配列

お，プライマーの位置と配列，参考とした配列等は図2，3のとおりである。

2・2 プライマーの有効性の確認

(1) GⅡ/3，GⅡ/4，GⅡ/6 の検出と確認

ノロウイルス GⅡ/3，GⅡ/4，GⅡ/6 について上記2・1に示したプライマーで検出できるか確認するため，平

Detection of Variable Region in Norovirus Genome. by OHYA Hideki, KUROSAKI Naoko and ONISHI Hajime (Health and Food Safety Department, Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science)

Key words : Norovirus, Variable Region

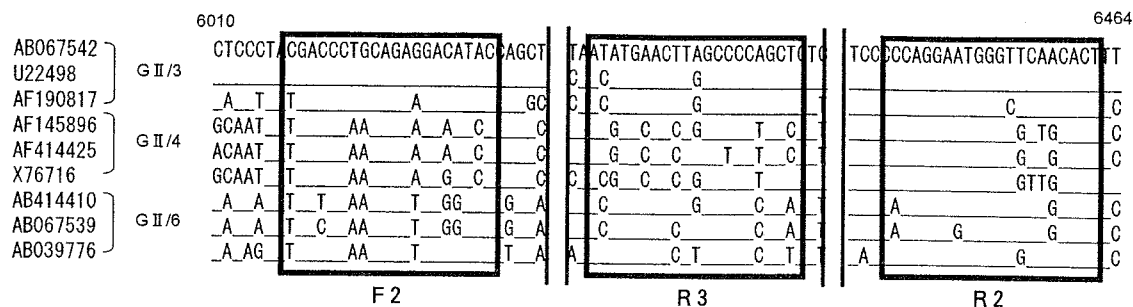


図 3 参考とした配列 (ノロウイルス, ORF2)

成16年度から19年度にかけて、石川県で発生したノロウイルスによる食中毒と感染症の糞便検体のうち、厚生労働省通知「ノロウイルスの検出法について（平成15年11月5日食安監発第1105001号）」の capsid 領域を検出する RT-PCR 法で陽性で、かつダイレクトシーケンスによる解析で GII/3, GII/4, GII/6 のいずれかと確認された26事例117検体の糞便検体について、F2 R2 および F2 R3 のプライマーペアで PCR による検出 (PCR

でバンドが認められない場合は F2 R2 で 1st PCR 後、F2 R3 で semi-nestedPCR を実施) を行った。

検査は、PCR において HotStart 用の酵素 (Amplitaq Gold, ABI 社製) を使用し、95°C 9 分で酵素を活性化後、95°C 1 分 (熱変性)、50°C 1 分 (アニーリング)、68°C 2 分 (伸長反応) を 40 サイクル行い、さらに 68°C 15 分の伸長反応を行った。さらに検出バンドの一部についてダイレクトシーケンスを実施し、F2 R2 で増幅される ORF2 の約 390bp について、DDBJ の clustalW を用い系統解析を行った。

なお、食中毒発生時の患者と調理従事者の因果関係について調べるため 2 事例 (事例 7: GII/3, 事例 24: GII/4) および同一のウイルスか調べるため感染症の 1 事例 (事例 5: GII/6) について検討を行った。

(2) GII/3, GII/4, GII/6 以外の検出

ノロウイルス GII/3, GII/4, GII/6 以外の genotype についても上記 2・1 に示したプライマーで検出できるか確認するため、平成13年度から18年度にかけて、食中毒および感染症 6 事例 (GII/1 が 2 事例, GII/5, GII/7, GII/8, GII/12 が各 1 事例) のノロウイルス陽性と確認された糞便 30 検体について、同様に検出を行った。

3 成 績

3・1 GII/3, GII/4, GII/6 の検出結果と解析結果

作成したプライマーにより GII/3, GII/4, GII/6 は、F2/R2 では 110 検体 (94.0%)、F2/R3 では 112 検体 (95.7%)、1stPCR でバンドが認められなかった検体も semi-nestedPCR ですべて (100%) 検出できた (表 1)。また系統解析では capsid 領域の genotype ごとに分類でき、系統樹もこれに類似した結果が得られた (図 4)。

食中毒発生時の患者と調理従事者の因果関係について検討した 2 事例 (事例 7, 24) および同一のウイルスか調べるため検討した 1 事例 (事例 5) では、検査したすべての検体において PCR 陽性となり、検出バンドの塩基配列は事例ごとにすべて一致していた (図 5)。

表 1 対象とした事例と PCR の結果

事例No.	発生年月	遺伝子型	検体数	F2/R2	F2/R3
1	16. 5	GI/4	3	3	3
2	16.12	GI/4	3	3	3
3	17. 1	GI/4	3	3	3
4	17. 5	GI/4	6	6	6
5	17. 5	GI/6	3	3	3
6	17.10	GI/6	3	3	3
7	17.12	GI/3	7	5*	7
8	17.12	GI/4	7	7	7
9	18. 1	GI/4	6	6	6
10	18. 2	GI/4	4	4	4
11	18. 2	GI/3	4	3*	3
12	18. 5	GI/6	3	3	3
13	18.11	GI/4	3	3	3
14	18.11	GI/4	5	5	5
15	18.11	GI/4	5	5	5
16	18.11	GI/4	7	7	7
17	18.11	GI/4	4	4	4
18	18.11	GI/4	2	2	2
19	18.11	GI/4	6	2*	2
20	18.11	GI/4	1	1	1
21	18.12	GI/4	4	4	4
22	18.12	GI/4	2	2	2
23	18.12	GI/4	12	12	12
24	19. 1	GI/4	5	5	5
25	19. 1	GI/4	8	8	8
26	19. 4	GI/4	1	1	1
117			110(94.0%)	112(95.7%)	

* semi-nestedPCR ですべて陽性

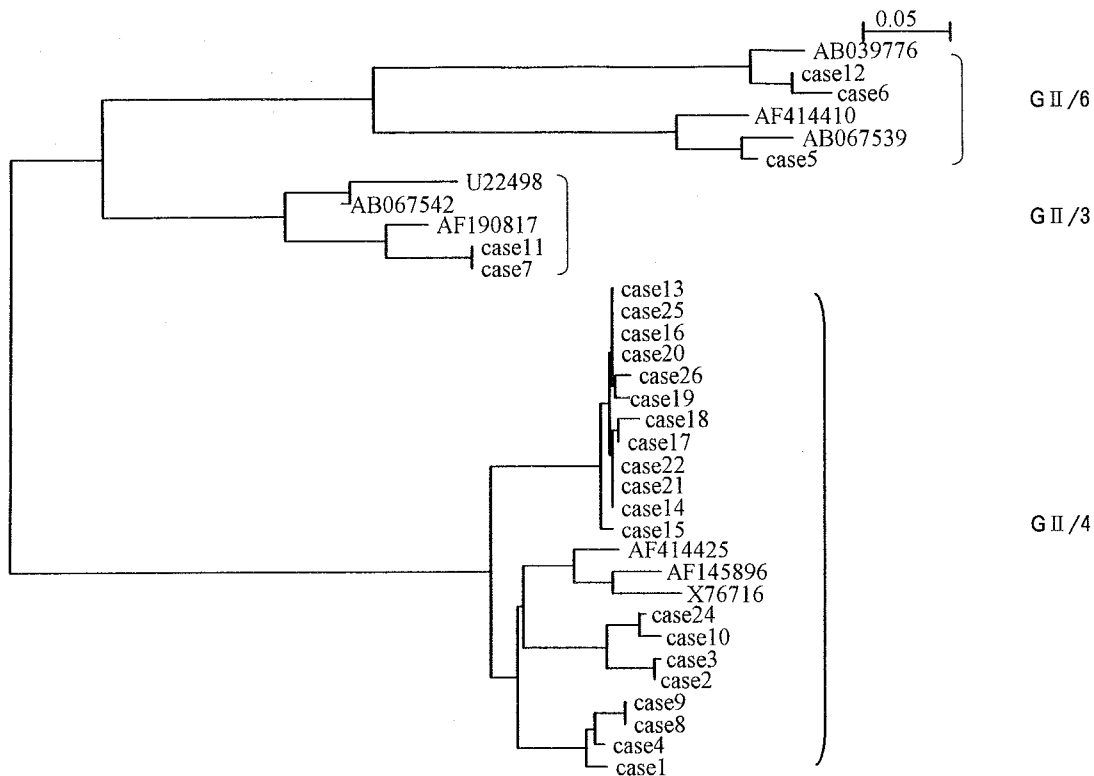


図 4 系 統 解 析 (ORF6038—6441)

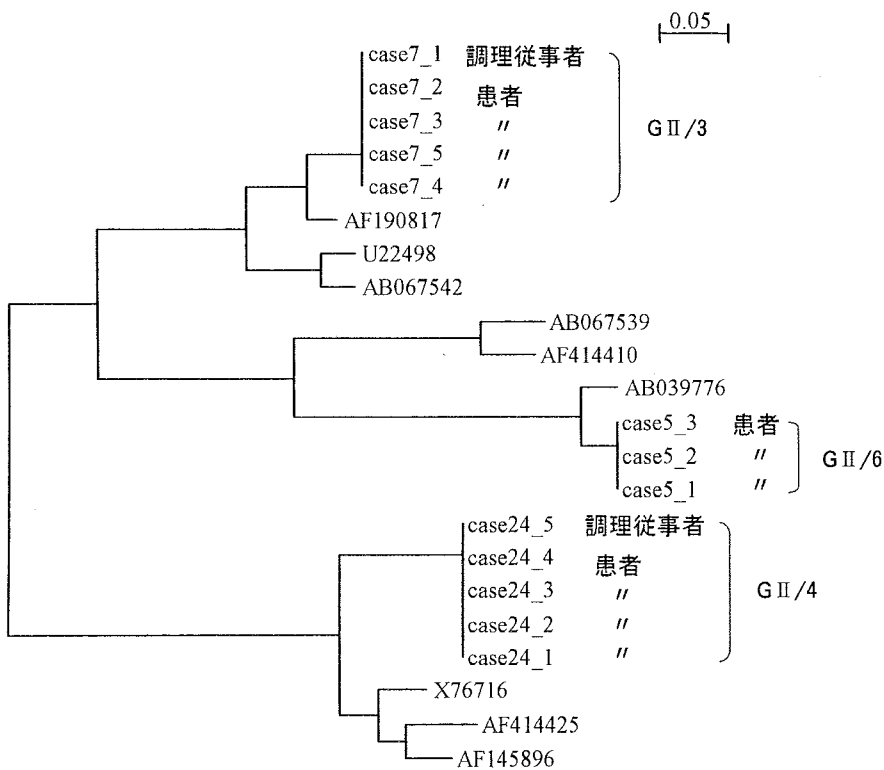


図 5 食中毒および感染症事例での検討 (ORF6038—6441)

は検出可能であったが、GII/7 と GII/1 の 1 事例は検出できなかった (表 2)。

4 考 察

近年、石川県ではノロウイルスによる食中毒が増加傾向にあるが、それに伴う検査で、患者と調理従事者の両方でノロウイルス遺伝子が検出される例が多くなっている²⁾。食中毒事件において、保健所は疫学調査や検査データをもとに営業者に対し行政処分が行うが、調理従事者の検便が陽性の場合、このウイルスが患者のものと同等かの判断が重要となる。

4・1 検査方法について

従来、我々は公定法に従い capsid 領域を検出するプライマー SKF/R で増幅した遺

3・2 GII/3, GII/4, GII/6 以外の検出結果

GII/5, GII/8, GII/12 と GII/1 のそれぞれ 1 事例

伝子の塩基配列をダイレクトシーケンスにより決定し、同等性の有無を報告している。しかし、ここで行って

表 2 他の genotype の検出

事例No.	発生年月	遺伝子型	検体数	F 2/R 2	F 2/R 3	semi-nestedPCR
27	13.12	G II/7	3	0	0	0
28	15. 2	G II/1	5	4	4	5
29	15. 4	G II/8	7	7	7	
30	15.12	G II/5	4	4	4	
31	16. 3	G II/12	6	6	6	
32	18. 2	G II/1	5	0	0	0

るのは全長約7.5Kbのノロウイルス遺伝子の僅か一部分(約300bp)の解析で、しかもノロウイルス遺伝子のなかで相同性の高い部分である。篠原らの報告によれば、この方法での患者と調理従事者の単なる関連付けは今後さらに継続した検討が必要であるとしている³⁾。従って、患者と調理従事者との因果関係を示す検査結果を報告する際に、一部分のシーケンスデータより、できれば全塩基配列データを提示するのが望ましい。しかし食中毒事件のような緊急を要する検査としては、全塩基配列データを提示するには迅速性に問題がある。

一方、ノロウイルスにはORF2の後半からORF3にかけて、可変領域と呼ばれるノロウイルス遺伝子で相同性が低く、変異が大きい部分が存在し、この部分の検出、解析をもって代用(同一もしくはそれに近いとすることが)できないか検討した。

ノロウイルスが元来兼ね備えている多様な遺伝子の、さらに変化の大きい部分をPCRで検出するには、ノロウイルスのgenotypeごとにプライマーを設定することが必要と思われる。しかし実際の食中毒事件の際には、どのgenotypeが検出されるか不明であり、それに伴う手間と経費が膨らむこととなる。そのため検出するgenotypeを近年石川県で発生の多いG II/3, G II/4, G II/6に絞り、DDBJのデータベース上の配列を基にプライマーを作成した。

この方法は、塩基配列の変化の激しい部分の検出であるため、できる限り配列の揃っている部分を選び、塩基の違う部分は混合塩基でカバーした。またプライマーの結合力を考慮し、G (guanine) と C (cytosine) の含量をできるだけ多くして、Tm 値を60°C近くに設定し、さらに非特異増幅対策のために Hot Start 法を使用した⁴⁾。

4・2 検査結果について

作成したプライマーを用いてPCRを行ったところ、石川県で検出されたG II/3, G II/4, G II/6はほぼ感度良く検出することができた。G II/4とG II/3の一部で、1stPCRでバンドが認められない検体があったが、

semi-nestedPCRですべて検出することができた。

これらのPCR産物の解析では、capsid領域のgenotypeと同様、明瞭に分類でき、genotype内でもcapsid領域の解析結果と類似していた。

さらに実際のG II/3とG II/4による食中毒事例のうち、患者および調理従事者で陽性となった事例では、それぞれの塩基配列はすべて一致し、因果関係が確認できた。また

G II/6については、本県での食中毒の発生事例はないため、感染症事例の患者検体について検討したところ、塩基配列はすべて一致し、同一のウイルスの関与が確認できた。このような結果から、この方法は、食中毒発生時の患者と調理従事者から検出したウイルスの同等性について、従来のcapsid領域の解析を補うものとして期待できると考えている。

一方、G II/3, G II/4, G II/6以外のgenotypeについて検出を行ったところ、検出できるものとできないものがあった。検出できないものについて精査したところ、プライマーの3'末端の結合する塩基が異なっており、これが大きく影響したと思われる。今回検討したものは事例数が少ないため今後さらに検討が必要である。

現在、当センターでは食中毒が発生し、患者と調理従事者の両方でノロウイルス陽性となった場合、公定法と平行して補助的にこの検査を実施している。しかし、変異の大きい部分の検出であり、常に作成したプライマーが適用できるとは限らず、新たな遺伝子変化に対応したプライマーの作成が必要となる。

今回増幅した場所よりさらにORF2の下流部分とORF3にも相同性の低い部分が存在するため、これらを併せた領域を検出できるような新たなプライマーを作成する等、全塩基配列決定に代用できるようなデータを得たいと考えている。

5 ま と め

集団発生の糞便検体について、ノロウイルスの相同性の低い部分を検出するプライマーを作成し、保存検体について検出、解析を行った。

(1) ノロウイルスG II/3, G II/4, G II/6についてはすべて検出することができ、また解析結果はcapsid領域の解析と類似していた。

(2) G II/3, G II/4, G II/6による集団発生事例について適用したところ、塩基配列は事例ごとに一致し、患者と調理従事者の因果関係が認められた。

(3) G II/3, G II/4, G II/6以外のgenotypeについ

ても一部検出可能であった。

(4) この方法は、ノロウイルスの変異の大きい部分の検出のため、常に新たなプライマーを作成する等の改良が必要と考えている。

文 献

- 1) Tsutomu Kageyama, Shigeyuki Kojima, Michiyo Shinohara, Kazue Uchida, Shuetsu Fukushi, Fuminori Hoshino, Naokazu Takeda and Kazuhiko Katayama : J Clin. Microbiol, **41**, 3950—3957 (2003)
- 2) 大矢英紀, 黒崎直子, 尾西 一: 石川保環研報, **42**, 13—23 (2005)
- 3) 埼玉県衛生研究所: 地域保健推進特別事業報告書, 2—23 (2006)
- 4) 中山広樹: バイオ実験イラストレイテッド③第2版 本当にふえる PCR, 秀潤社 (1998)