

B-26 環境試料のヒトノロウイルス (GI, GII, GIV) スクリーニングに有用なリアルタイムRT-PCR の開発

○三浦 尚之^{1,2*}・Sylvain PARNAUDEAU¹・Marco GRODZKI¹・岡部 聡²・
Robert L. ATMAR³・Françoise S. LE GUYADER¹

¹フランス海洋開発研究所微生物学研究室 (IFREMER, 44311 Nantes Cedex 03, France)

²北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門 (〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目)

³ベイラー医科大学分子ウイルス学・微生物学研究室 (1 Baylor Plaza, MS BCM280, Houston, TX 77030, USA)

* E-mail: tmiura312@eng.hokudai.ac.jp

1. はじめに

ノロウイルス (NoV) は、ヒトに感染すると下痢、発熱、嘔吐などを伴う胃腸炎を引き起こし、世界各国で流行や食中毒の集団発生が報告され問題となっている。NoVは感染者の糞便中に高濃度で排出されるため、河川などの水環境を汚染している。NoV汚染海域でカキが養殖される場合には、カキに蓄積することが示されており、NoVの環境中での動態を考慮した流域規模での感染症対策が重要な課題となっている。

NoVによって汚染された食品のスクリーニングや環境モニタリングでは、検出感度の高いリアルタイムRT-PCR (rRT-PCR) が広く用いられている。NoVは遺伝的多様性が高いために、ヒトに感染する3つの遺伝子群 (GI, GII, GIV) それぞれに特異的なrRT-PCR (spe-rRT-PCR) が開発されているが、それぞれの遺伝子群の分析に要する時間と費用が問題として指摘されている。本研究では、ヒトノロウイルス陽性試料を効率的にスクリーニングする方法として、GI, GII, GIVを同時に検出するrRT-PCR (gen-rRT-PCR) を開発し、二枚貝および流入下水試料を対象に手法の適用性を評価した。

2. 方法

(1) 手法開発に用いたウイルス株

プライマー・プローブの設計およびPCR条件の検討には、NoV GL1, GIL3, GIV.1を用いた。手法の反応性評価には、9つのGI, 9つのGII, および1つのGIV参考株のポリメラーゼ領域の一部からカプシド領域の一部の遺伝子を

含んだプラスミドを利用した。プラスミドからは、*in vitro* transcription反応によってRNAを合成した。手法の特異性評価には、アイチウイルス (AiV), アストロウイルス (AstV), A型肝炎ウイルス (HAV), E型肝炎ウイルス (HEV), メンゴウイルス (MgV), ポリオウイルス (PV), ロタウイルス (RV) およびサボウイルス (SaV) を使用した。糞便試料に含まれるウイルス (NoV GL1, GIL3, HEV, SaV) RNAは、リン酸緩衝液を用いて10%糞便懸濁液を作製し、NucliSENS (bioMérieux)を用いて抽出した。細胞培養上清に含まれるウイルス (AiV, AstV, HAV, MgV, PV, RV) RNAは、95℃, 5分間による熱処理によって抽出した。

(2) 手法の適用性評価に用いたRNA試料

食中毒事例や環境モニタリングにおいて収集された157の二枚貝試料 (カキやムール貝など)¹³⁾および16の流入下水試料⁹⁾から濃縮・抽出したウイルスRNAを使用した。

(3) rRT-PCR

Spe-rRT-PCRには、既存のプライマー・プローブを使用し^{5,9)}、これらをもとにgen-rRT-PCRのプライマー・プローブを設計した (表1)。その他のウイルス (AiV, AstV, HAV, HEV, MgV, PV, RV, SaV) 遺伝子検出には、既存のプライマー・プローブを使用した¹⁰⁾。

rRT-PCRには、RNA UltraSense One-Step quantitative RT-PCR system (Life Technologies)とMx3000P quantitative PCR system (Agilent Technologies)を用いた。1反応系あたり5 μLのRNA試料を使用し、最終反応液量は25 μLとした。RTプライマー、フォワード (FW) プライマー、ブロー

表1. リアルタイムRT-PCRに用いたプライマーおよびプローブ

遺伝子群	プライマー・プローブ	Sequence (5'-3') ^a	Spe-rRT-PCR	Gen-rRT-PCR	参考文献
GI	RT primer	NVILCR CCTTAGACGCCATCATCATTTAC	✓	✓	5)
	FW primer	QNIF4 CGCTGGATGCGNTTCCAT	✓		6)
		NIFG1F ATGTTCCGCTGGATGCG		✓	本研究
	Probe	NVILCpr FAM-TGGACAGGAGAYCGCRATCT-BHQ	✓		5)
		NIFG1P FAM-TGTGGACAGGAGAYCGCRATCT-BHQ		✓	本研究
GII	RT primer	COG2R TCGACGCCATCTTCATTACACA	✓	✓	7)
	FW primer	QNIF2d ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA	✓		8)
		NIFG2F ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTC		✓	本研究
	Probe	QNIFS FAM-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-BHQ	✓	✓	8)
GIV	RT primer	COG2R TCGACGCCATCTTCATTACACA	✓	✓	7)
	FW primer	Mon4F TTTGAGTCYATGTACAAAGTGGATGC	✓		9)
		NIFG4F ATGTACAAGTGGATGCGRTTC		✓	本研究
	Probe	Ring4 FAM-TGGGAGGGGGATCGCGATCT-BHQ	✓		9)
		NIFG4P FAM-AGCACTTGGGAGGGGGATCG-BHQ		✓	本研究

^a混合塩基の表記は、次の通りである。N (A, T, C, G), Y (T, C), R (A, G), W (A, T), B (T, C, G).

FAM (6-carboxy-fluorescein reporter dye). BHQ (Black Hole Quencher dye).

ブの濃度は、spe-rRT-PCRでは900, 500, 250 nMとし、gen-rRT-PCRでは400, 400, 200 nMとした。rRT-PCRの温度条件は、55℃で15分間のRT反応、95℃で5分間の熱変性の後、95℃で15秒間、55℃で1分間、65℃で1分間のサイクルを45回繰り返した。蛍光の有意な増加が観測されたサイクル数をC_T値と定義し、1試料あたり3ウェルを使用してC_T値を平均値±標準偏差として示した。

3. 結果および考察

(1) プライマー・プローブの設計

予備実験では、spe-rRT-PCRに用いるGI, GII, GIV用の全てのプライマー・プローブ (表1) を混合し、GI1, GII3, GIV1の検出を試みた。その結果、プライマー・プローブを個別に用いた場合と比較して、検出感度が低下し (4~5 C_T units増加)、低濃度域は非検出となった¹⁰⁾。NoVが高濃度で含まれる糞便試料を対象とする場合は、このことは欠点とはならないが、食品や環境試料ではC_T値36以上の低濃度域における検出感度が重要である。したがって、複数のプライマー・プローブを設計・試験し、最も検出感度が高い組み合わせをgen-rRT-PCRのプライマー・プローブとした (表1)。

(2) Gen-rRT-PCRの反応性

9つのGI, 9つのGII, および1つのGIV参考株を用いて、gen-rRT-PCRの反応性を評価した (表2)。その結果、GI5とGIV1を除いて、gen-rRT-PCRはspe-rRT-PCRと同等の検出感度で多様な遺伝子型を検出した。GI5とGIV1については、検出感度が向上した (表2)。一方でGI7とGI8に関しては、検出感度がやや低下した (それぞれ2.8,

1.8 C_T units増加)。Gen-rRT-PCRのGIに対するプライマー・プローブを個別に使用したところ、spe-rRT-PCRとC_T値に差が見られなかったことから¹⁰⁾、他のプライマー・プローブが混合されることで、わずかに検出感度が低下することがわかった。

(3) Gen-rRT-PCRの特異性

環境試料中においてNoVとともに検出される可能性のある腸管系ウイルス (AiV, AsV, HAV, HEV, PV, RV, SaV) は、開発したgen-rRT-PCRによっていずれも非検出だった。また、本研究室でRNA抽出コントロールとして使用しているMgVもgen-rRT-PCRによっては検出されず、本手法の高い特異性が示された。

表2. Gen-rRT-PCRのNoV参考株への反応性

遺伝子型	株	C _T 値 (平均値 ± 標準偏差)	
		Spe-rRT-PCR	Gen-rRT-PCR
GI.1	Norwalk	28.3 ± 0.1	27.9 ± 0.6
GI.2	Whiterose	30.0 ± 0.1	30.5 ± 0.3
GI.2	Southampton	31.3 ± 0.3	31.3 ± 0.5
GI.3	Birmingham	30.3 ± 0.1	30.3 ± 0.3
GI.4	Malta	29.4 ± 0.4	30.4 ± 0.8
GI.5	Musgrove	No C _T	30.9 ± 0.6
GI.6	Kingston	28.5 ± 0.1	29.1 ± 0.1
GI.7	Winchester	31.3 ± 0.3	34.1 ± 0.7
GI.8	Boxer	30.8 ± 0.2	32.6 ± 0.7
GII.1	Hawaii	30.5 ± 0.2	30.7 ± 0.2
GII.2	Melksham	29.2 ± 0.5	29.4 ± 0.6
GII.3	Toronto	31.4 ± 0.2	31.8 ± 0.1
GII.4	Grimsby	29.3 ± 0.2	29.4 ± 0.1
GII.6	Seacroft	30.1 ± 0.1	30.2 ± 0.2
GII.7	Leeds	30.8 ± 0.1	30.2 ± 0.1
GII.10	Erfurt	31.3 ± 0.1	31.9 ± 0.2
GII.b	GIIb	31.8 ± 0.3	32.2 ± 0.4
GII.c	GIIc	30.2 ± 0.2	30.6 ± 0.3
GIV.1	Alphatron	34.1 ± 0.1	30.7 ± 0.3

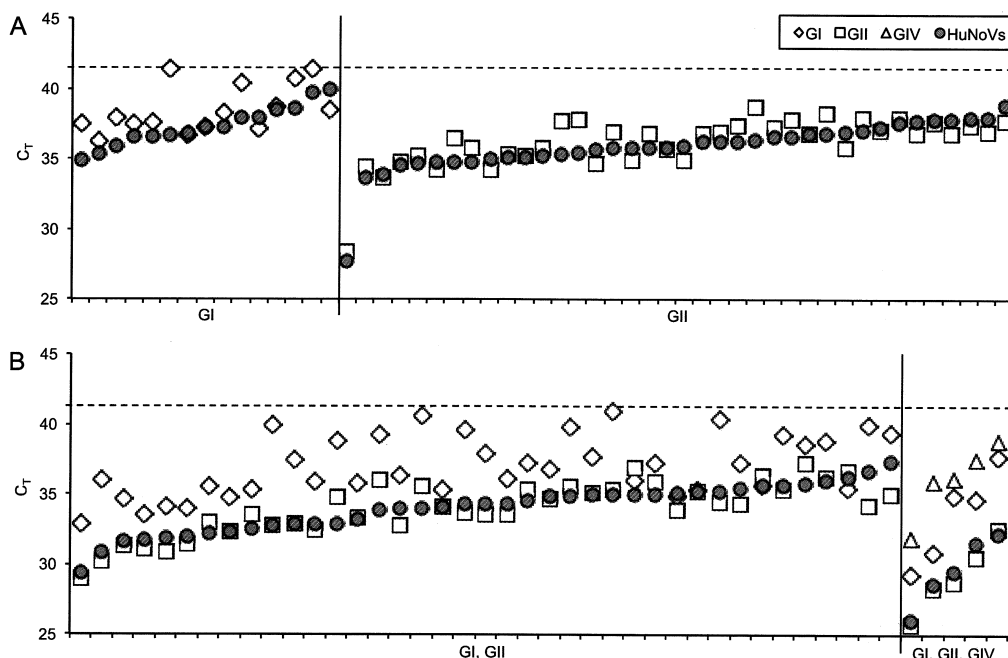


図1. 二枚貝試料を用いたgen-rRT-PCRの適用性。GI, GII, GIVの C_T 値はspe-rRT-PCRで測定し, gen-rRT-PCRの C_T 値は, HuNoVsとしてプロットした。A: 単独遺伝子群に汚染されていた試料。B: 複数遺伝子群に汚染されていた試料。破線は検出限界を示した。

(4) Gen-rRT-PCRの環境試料への適用性

幅広い濃度域でNoVが含まれる157の二枚貝由来RNA試料をspe-rRT-PCRとgen-rRT-PCRに供した。その結果, 両手法で60試料が陰性, 97試料が陽性と判定された。GIにのみ汚染されていた15試料のうち11試料では, spe-rRT-PCRよりもgen-rRT-PCRの方が検出感度が高かった(図1A)。また, 複数の遺伝子群に汚染されていた試料では, gen-rRT-PCRの C_T 値は, 試料中に最も高濃度で含まれていたGIIの C_T 値と同等かそれ以下だった(図1B)。さらにRT-PCRの酵素阻害が大きいことが知られている16の流入下水試料に適用したところ, 二枚貝試料と同様に, gen-rRT-PCRの C_T 値は最も高濃度で含まれていたGIIの C_T 値と同等だった¹⁰⁾。以上より, gen-rRT-PCRの環境試料への適用可能性が示された。

4. おわりに

本研究では, GI, GII, GIVの3つの遺伝子群に属する遺伝的に多様なヒトノロウイルスを特異的に検出するgen-rRT-PCRを開発した。本手法は, 低濃度のNoVで汚染された二枚貝試料とRT-PCR阻害が大きい流入下水試料に対して十分な検出感度を示し, ヒトノロウイルス陽性試料のスクリーニングに有用である。

参考文献

- 1) Le Guyader *et al.*: Comprehensive analysis of a norovirus-associated gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer, *J. Clin. Microbiol.*, Vol.48, pp.915-920, 2010.
- 2) Grodzki *et al.*: Impact of Xynthia tempest on viral contamination of shellfish, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.78, pp.3508-3511, 2012.
- 3) Benabbas *et al.*: Norovirus and other human enteric viruses in moroccan shellfish, *Food and Environmental Virology*, Vol.5, pp.35-40, 2013.
- 4) Sima *et al.*: Calicivirus removal in a membrane bioreactor wastewater treatment plant, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.77, pp.5170-5177, 2011.
- 5) Svraka *et al.*: Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in the Netherlands from 1994 through 2005, *J. Clin. Microbiol.*, Vol.45, pp.1389-1394, 2007.
- 6) da Silva *et al.*: Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.73, pp.7891-7897, 2007.
- 7) Kageyama *et al.*: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR, *J. Clin. Microbiol.*, Vol.41, pp.1548-1557, 2003.
- 8) Loisy *et al.*: Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish, *J. Virol. Methods*, Vol.123, pp.1-7, 2005.
- 9) Trujillo *et al.*: Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of Norovirus, *J. Clin. Microbiol.*, Vol.44, pp.1405-1412, 2006.
- 10) Miura *et al.*: Environmental detection of genogroup I, II, and IV noroviruses by using a generic real-time reverse transcription-PCR assay, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013, in press.