

厚生労働科学研究費 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と
共同研究体制の強化に関する研究 (H23 - 新興 指定 020)

下痢症ウイルスの高感度検出法の確立と分子疫学に関する共同研究

分担研究者 片山 和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究協力者 朴 英斌 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究協力者 戸高 玲子 国立感染症研究所ウイルス第二部

カウンターパート : Taiwan CDC, Ms. Fang-tzy Wu.

研究要旨： 台湾における 2010 年から 2012 年の Norovirus 感染患者便検体約 300 検体を解析するため、2012 年 12 月 16 日から 2 週間、台湾 CDC の Ms. Wu Fang-Tzy が来日し、新規 genotyping システムによる流行分析を行った。2011 年までの事前調査では、両国の Norovirus 流行は GII.4 を主要流行株とする流行から GII.4 と GII.2, GII.3 が同レベルに混在する流行パターンを示していた。2012 年度は、日本だけでなくヨーロッパやアメリカでも新規 GII.4 2012 バリエントが大流行した。台湾では新規 GII.4 2012 バリエントが大流行の兆しを見せ始めた。

Abstract:

We investigated Taiwan CDC Norovirus (NoV) positive stool specimens using Super rapid RT-PCR and Super high sensitive ELISA method that called BLEIA and evaluated with these two NoV detection system. The BLEIA showed high sensitivity as same as the standard real-time RT-PCR. We also sequenced 4 of Taiwan CDC (TCDC) GII.4 strains #4, 5, 8, 9. TCDC strain 4 and 5 were classified as GII.4 2012 valiant as same as Sydney 2012 valiant. However, number 8 and 9 showed completely identical sequence and they were classified as a GII.4 2008a valiant. GII.4 2012 valiant made big outbreak in Japan, Australia, Europe, USA in this 2012/13 season. However, Taiwan did not have outbreak with GII.4 2012 valiant. We estimate that GII.4 2012 valiant will make a big outbreak in Taiwan next year.

A. 研究目的

便懸濁検体から直接 Norovirus 核酸を検出可能な迅速検出システム (Super rapid real-time RT-PCR) ルシフェラーゼを用いた超高感度 ELISA (BLEIA) で Norovirus キャプシドタンパク質を検出するシステムを台湾 CDC に供給し、共通の方法によって Norovirus の分子疫学研究を行う。また、陽性を呈した検体の Norovirus は、部分塩基配列、必要に応じて全長塩基配列を決定し、台湾における Norovirus の流行と、我が国における流行を比較検討する。日本、台湾の分子疫学調査結果に基づき、アジア近隣諸国におけるノロウイルス流行のメカニズムを考察し、Norovirus の流行予測に応用する。Norovirus は、遺伝子の ORF1 と ORF2 のジャンクション領域のホットスポットを起点とするゲノム組換えによる高速進化を遂げる。今年度から、このような組換え型ウイルス (キメラウイルス) の genotyping に対応したシステムを感染研が構築し、遺伝子組み換えを考慮に入れた分子疫学研究を行う。

B. 研究方法

1. 材料と方法

< NoV, SaV 陽性検体 >

台湾 CDC (TCDC) によって 2010 年から 2011 年にかけて収集された、ウイルス性下痢症患者検体を NoV、SaV のコンベンショナルな RT-PCR (Kojima et al. JVM, 2002. NoV: G1SKF & R, G2SKF & R, SaV Okada et al primer sets) によって検査し、NoV 陽性を

呈した糞便検体 169 検体を用いた。

また、埼玉県衛生研究所によって検査された、1990 年から 2000 年にかけて埼玉県近傍で発生した集団食中毒事例の糞便検体 132 検体を新手法の評価用レファレンス NoV 陽性糞便パネルとして用いた。これらの検体は、埼玉県衛生研究所より国立感染症研究所ウイルス第二部第一室が分与を受け、すべての genotype の約 90% をカバーする糞便レファレンスパネルとして管理運用している。

< コンベンショナル RT-PCR >

NoV の検出には、Kojima et al. JVM, 2002. によって報告された G1SKF & R, G2SKF & R プライマーセットを用いた RT-PCR を行った。

< Real-time RT-PCR >

NoV の RNA ゲノム定量には、Kageyama et al. JCM, 2004 によって報告され、現在も世界のゴールドスタンダードとして位置づけられている COG primer set と RING probe を用いた real-time RT-PCR を用いた。本方法で得られた RNA 定量値を基準として、Super rapid RT-PCR, BLEIA を評価した。

< Super rapid RT-PCR >

Shimazu 社によって開発され、供給されているノロウイルス GI、GII 検出試薬キットを用いて、前述の検体を処理し、ノロウイルスの検出を行った。10%糞便乳剤 1 μ L をキットに添付された検体処理試薬 19 μ L に加え、85 1min の熱処理を行う。その後、RT 反応液、PCR 反応液を加え、real-time PCR、もしくは、PCR 後、電気泳動によって

標的サイズの増幅産物を確認することで判定した。前述のすべてのサンプルについて、NoV GI の検出と NoV GII の検出を別々に行った。NoV GI、NOV GII が双方とも陽性を示したサンプルを混合感染と判定した。

<塩基配列解析>

NoV の塩基配列解析は、RT-PCR で得られた PCR アンプリコンを鋳型としたダイレクトシーケンスとプライマーウォーキングによって行った。ゲノム量末端の塩基配列解析は、5' RACE および 3' RACE を用いて決定した。

<分子系統解析>

得られた NoV ゲノムシーケンスは、Clustal W version 1.8 でアライメントし、kimura の 2 パラメーターによって genetic distance を算出した。その後、NJ 法によって分子系統樹を作成し、解析した。

C. 研究結果

1. Super rapid real-time RT-PCR は、10%糞便乳剤からの RNA 抽出が、試薬添加と 1 min の加熱だけで修了する。従来法では、RNA の抽出操作に約 1 時間半、その後の逆転写反応に 1 時間の操作が必要であったが、本法では、試薬準備時間も含め、約 40 分で実施可能であった。

2. レファレンス 132 検体は、すべてコンベンショナルな RT-PCR を施行し、得られた PCR 産物を用いて、塩基配列を決定後、genotyping が明らかにされた NoV 陽性検体である。その内訳は、GI 単独感染 18 検体、GII 単独感染 76 検体、GI, GII の混合感染

38 検体であった。これらの値を基準に、Super rapid RT-PCR の陽性率を検討したところ、GI 単独感染検体に対する陽性率は、17/18 (94.4%)、GII 単独感染検体に対する陽性率は、72/76 (94.7%)、混合感染検体の陽性率は、GI 18/38 (47.4%)、GII 37/38 (97.4%)であった。

3. TCDC の検体 169 検体の内訳は、GI 単独感染 39 検体、GII 単独感染 123 検体、GI, GII 混合感染 7 検体であった。これを基準に Super rapid RT-PCR の陽性率を検討したところ、GII 単独感染に関しては完全にコンベンショナル RT-PCR, standard real-time RT-PCR と同様であった。しかし、GI 単独感染検体に対する陽性率は、7/39 (18%)と極めて低かった。陰性を示した検体は、そのほとんどが 10^4 copies /uL を示した。

4. TCDC の GI 陽性サンプルを除き、他の全てのサンプルにおいて、Super rapid RT-PCR と BLEIA は良い相関関係を示した。BLEIA の定量値である COI は、ELISA における OD value に相当する。Standard real-time RT-PCR と BLEIA の COI の相関関係は 1 に近く、非常に強い相関関係が認められた。

NoV 陽性糞便レファレンスパネル検体を用いた比較検討において、全ての genotype を検出可能で有り、全ての genotype において、その COI は RNA titer と強い相関関係を保持していた。

5. TCDC より持ち込まれた GII.4 の 2011/12 シーズンの流行株 4 株の全塩基配列を決定したところ、TCDC#5, 6 は 2012 年に日本で

大規模な流行を示した GII.4 2012 変異株と同じクラスターに属することが明らかになった。しかし、TCDC#8, 9 は互いに 100%同じ配列を有しており、さらに GII.4 2008 クラスターに属していた。2012/13 シーズンにおいて台湾では GII.4 2012 年変異株と従来の変異株の混合流行が認められた。この傾向は、2012 年変異株が流行の 9 割を占める日本、ヨーロッパ、USA と異なる傾向であり、GII.4 のバリエーションの流行は、日本よりも遅れる傾向にあることが明らかになった。

D. 結論

本年は、従来のコンベンショナルな RT-PCR 法に変わる Super rapid RT-PCR を確立し、簡便かつ高感度に NoV、SaV の分子疫学に用いることのできる検出法を開発、構築することを目的とし、Shimazu 社より供給された糞便検体をほぼダイレクトに RT-PCR に用いることのできる super rapid RT-PCR 法を評価した。本検出法の感度は、1990 年代にサンプリングされた GI, GII レファレンス検体を用いた場合、両者ともに 85%以上を示し、十分な感度を有すると考えられた。テストあたりに含まれる 10%糞便懸濁液量は、コンベンショナル RT-PCR が 1.7 μ L であるのに対し、Super rapid 法は、1 μ L と、約 40%持ち込む NoV RNA 量が異なると思われる。この条件下で、15%の感度低下にとどまっていたのは、評価に値する。

2010 年から 2011 年に台湾でサンプリン

グされた検体で比較検討した場合、GI の検出率が極めて低い値を示した。レファレンスには、多種多様な GI genotype が認められるとともに、多様な GI genotype の混合感染も認められた。しかし、2010 年から 2011 年にサンプリングされた台湾 CDC の検体では、GI.1, GI.4, GI.8 などの単一 genotype の感染事例であった。塩基配列と便検体中の RNA titer を確認したところ、プライマープローブの標的領域に変化は認められなかった。しかし、おしなべて RNA titer が 10^4 copies/uL と低値を示したことから、Super rapid RT-PCR は、 10^5 copies/uL 以下の検体は検出が困難であると考えられた。しかし、Super rapid RT-PCR は、抽出操作が簡便で、操作性が高く、大規模なスクリーニングを施行し、素早く結果を得るなど、迅速な NoV 流行解析に適していると思われる。

TCDC の GII.4 変異株解析の結果、日本や Europe, USA で観察された GII.4 2012 年変異株の流行は、まだ味待ったばかりで有り、従来型 2008 年変異株と勢力を分かち状態である事が明らかになった。台湾での NoV 流行は、日本、Europe, USA, Australia よりも遅れて始まることが示唆された。流行株の違いは、ヒトの航空機による移動の頻度に影響されている可能性がある。来年度は、タイ、ベトナム、韓国などの他のアジア諸国における NoV 流行調査を行い、NoV 流行のメカニズムの解明に取り組む予定である。

健康危険情報

なし

F. 論文発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし