

遺伝子変異によるノロウイルスのリアルタイム PCR 検出感度の低下について

藤井 慶樹 則常 浩太 兼重 泰弘 山本 美和子
松室 信宏 坂本 綾

はじめに

当所ではノロウイルス (NoV) が病因物質として疑われる食中毒等の集団事例が発生した際、厚生労働省通知¹⁾に準拠した検査法(以下、通知法)により NoV の検査を実施している。

2018 年 2 月に発生した有症苦情事例において、リアルタイム PCR 法の結果、患者便から NoV が検出された。遺伝子型別分類を行った結果、検出された NoV は GII.2 であった。その後の遺伝子解析において、本事例で検出された NoV GII.2(以下、GII.2)ではプライマー結合部位の遺伝子変異が確認され、このことが原因でリアルタイム PCR 法による著しい検出感度の低下を引き起こしていたことが推定された。その概要について報告する。

方 法

1 解析材料

2018 年 2 月に発生した有症苦情事例の患者便 6 検体及び同検体から検出された GII.2 を解析対象とした。

2 解析方法

(1) イムノクロマト法(IC 法)

イムノキャッチ-ノロ(栄研化学)を用いて、便検体からの NoV 抗原検出を測定した。

(2) リアルタイム PCR

QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて、糞便 10% 乳剤の遠心上清 140 μ l から RNA を抽出し、High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit(life technologies)を用いた逆転写反応により cDNA を作製した。

プライマーは通知法記載の COG2F, COG2R に加えて、リバースプライマー結合部位に遺伝子変異の認められた GII.2 の遺伝子配列に合わせて別途設計した COG2R_GII.2(5' -TCGACGCCATCTTCATTCACG-3')を用いた。また、プローブは RING2AL-TP-N4²⁾(life technologies)を用いた。

反応試薬については、通知法記載の TaqMan Universal PCR Master Mix 及び比較解析のため、TaqMan Fast Advanced Master Mix(いずれも life technologies)を用いた。陽性コントロールは国立

感染症研究所から配布された標準物質を使用し、 10^3 , 10^5 コピー/ 5μ l の 2 点検量線による定量リアルタイム PCR 検査を行った。

結果及び考察

検出された GII.2 のリアルタイム PCR 増幅領域の遺伝子配列とプライマー、プローブ配列とのアライメント結果を図 1 に示す。なお、参考配列として、当所の検査で検出されている他の GII.2 の遺伝子配列についても図 1 に示す。

図 1 に示したとおり、当該事例で検出された GII.2 ではリアルタイム PCR 用のリバースプライマー結合部位 3' 末端において、他の GII.2 では認められない T(チミン)から C(シトシン)への変異が認められた。

一般的に、プライマーの 3' 末端は PCR における伸長反応の起点となるため、当部位のミスマッチは PCR 反応性の低下を起こすとされる。そこで、ミスマッチ部位の配列を変更したプライマーを別途設計し、通知法に準拠したリアルタイム PCR 法による定量結果との比較を行った。

その結果、COG2R を使用した場合(以下、A 法)と COG2R_GII.2 を使用した場合(以下、B 法)とでは定量値に 66~80 倍の差が認められ、A 法では著しい反応性の低下が認められた(表 1)。

リアルタイム PCR 反応試薬を TaqMan Fast Advanced Master Mix に変更した場合、B 法では標準物質の反応性が低下し、定量値が得られなかったため、A 法、B 法による結果を Ct 値により比較した。なお、B 法における標準物質の反応性低下について、標準物質は COG2R の配列にマッチするように作製されているため、COG2R_GII.2 を用いる B 法では反応性が低下したものと推察される。

2180401F, 2180403F, 2180404F の 3 検体においては、A 法では陰性となり、B 法でのみ陽性となった。それ以外の 3 検体では A 法、B 法ともに陽性となったが、Ct 値では約 13 の差が認められ、A 法における反応性の低下は顕著であった(表 1)。

一方、IC 法では、2180401F, 2180403F, 2180404F の 3 検体は弱陽性であるものの、NoV 抗原が検出

された(表 1)。すなわち, TaqMan Fast Advanced Master Mix を使用して, A 法によるリアルタイム PCR 検査を実施した場合, IC 法よりも検出感度が劣っていた。

ま と め

NoV を含め, ウイルスの遺伝子は絶えず変異し続けている。現在, NoV のリアルタイム PCR による遺伝子検査は通知法に準拠した定量検査を行っているが, 今回, 遺伝子変異が原因と推定される著しい反応性の低下を認めた。

通知法での判定基準は「実測値 10 コピー以上を陽性とする。」とされているが, プライマーやプローブ結合領域の遺伝子変異した場合, 反応性の低下に伴い, 定量値が変化するため, 判定基準自体が無意味なものになってしまう恐れがある。

ウイルスの遺伝子変異の動向を常に注視し, 流行しているウイルスを確実に検出できるよう, 検査法の検討を行っていくことも大切であるが, 食中毒等の検査時には迅速な結果が求められるため, 対応が追いつかないのも実状である。検査には限界がある点を念頭に置いておかなければならない。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長: ノロウイルスの検出について, 食安監発第 1105001 号(2003)
- 2) 木村博一: リアルタイム PCR 法によるノロウイルスの病原診断の有用性と課題, http://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/jp/products/no_ro_cf.pdf

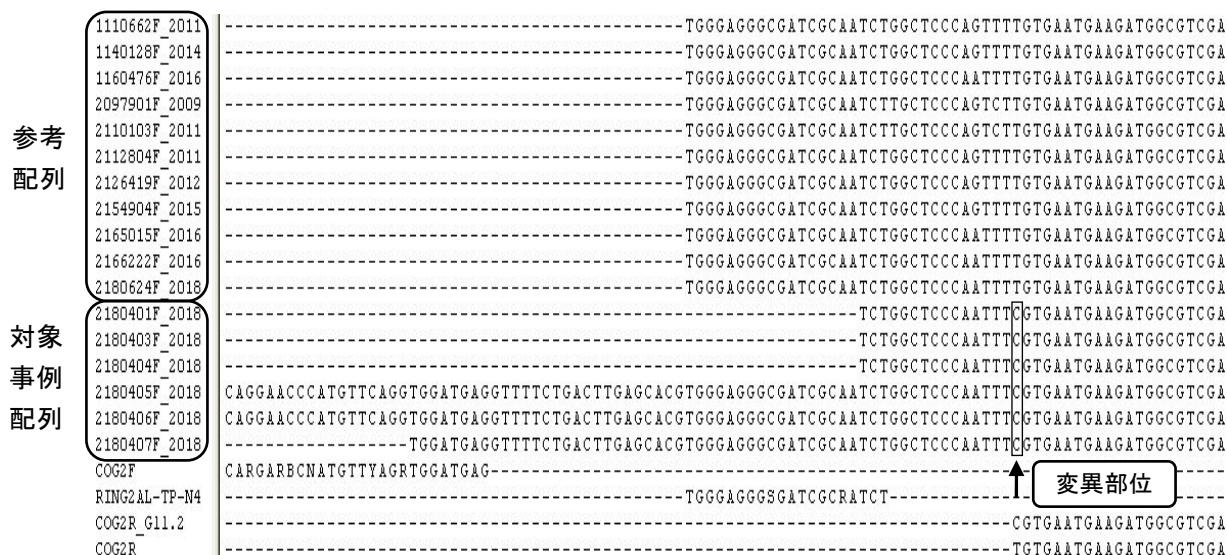


図 1 GII.2 の遺伝子配列とプライマー, プローブの配列との比較

表 1 リアルタイム PCR 法及び IC 法による結果の比較

検体	通知法準拠 ^{†1}		試薬変更 ^{†2}		IC 法
	(TaqMan Universal PCR Master Mix)		(TaqMan Fast Advanced Mater Mix)		
	A 法	B 法	A 法	B 法	
2180401F	343.22	2.75E+04	—	33.5	+ ^W
2180403F	86.65	5.96E+03	—	36.3	+ ^W
2180404F	35.72	2.79E+03	—	37.8	+ ^W
2180405F	2.06E+05	1.42E+07	34.8	21.4	+
2180406F	1.46E+06	9.69E+07	31.3	17.6	+
2180407F	2.85E+04	1.90E+06	39.0	25.5	+

†1: 結果は cDNA 5 μl 中の定量値(コピー数)を記載。 †2: 結果は Ct 値を記載。

A 法: COG2F/COG2R/RING2AL-TP-N4, B 法: COG2F/COG2R_GII.2/RING2AL-TP-N4

-: 陰性, +^W: 弱陽性, +: 陽性