

食中毒及び感染症事案におけるマルチプレックスリアルタイム PCR 法を用いた胃腸炎起因ウイルスのスクリーニング検査について

平田 佐知 永田 瑞絵 長谷川 和宏 藤本 直樹

Screening Tests of the Virus Causing Food Poisoning and Gastroenteritis Using Multiplex Real-time PCR

Sachi HIRATA Mizue EITA Kazuhiro HASEGAWA Naoki FUJIMOTO

近年、胃腸炎起因ウイルスによる集団食中毒事件が多発している。そこで、6種類の胃腸炎起因ウイルス—アデノウイルス、エンテロウイルス、アストロウイルス、サポウイルス、A群ロタウイルス及びC群ロタウイルスを同時に検出できるマルチプレックスリアルタイム PCR法を導入し、原因としてウイルスが疑われる食中毒事例や集団胃腸炎事例においてノロウイルスが検出されなかった場合のスクリーニング検査法として応用することを試みた。糞便試料から核酸を抽出し、逆転写反応により得られたcDNAをテンプレートとして、マルチプレックスリアルタイム PCRを行った。本法により、食中毒5事例の糞便31検体からは上述6種類のウイルスは検出されなかった。感染性胃腸炎の小児散発5事例の糞便5検体中1検体からサポウイルスが、別の1検体からアデノウイルスが、さらに別の1検体からはアデノウイルスとエンテロウイルスが重複して検出された。この重複して検出された検体からはノロウイルスGⅡも検出された。

キーワード：マルチプレックスリアルタイム PCR、食中毒、感染性胃腸炎、アデノウイルス、エンテロウイルス、アストロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス

Keywords：Multiplex real-time PCR, Food poisoning, Gastroenteritis, Adenovirus, Enterovirus, Astrovirus, Sapovirus, Rotavirus

はじめに

近年、ロタウイルスやサポウイルスのような胃腸炎起因ウイルスによる食中毒事例が増えている。2012年に千葉県では10例のA群ロタウイルスによる胃腸炎の集団発生が相次ぎ、うち1例は食中毒事件として行政処分された¹⁾。サポウイルスによる食中毒事例は2011年以降、年間10件を超え、その後も増加傾向にある (http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/foods_archives/publications/summary/pdf/summary_h25/summary_h25-03.pdf)。

本府においては、これまで細菌性あるいはウイルス性が疑われる食中毒事例や胃腸炎の集団発生事例において、食中毒を引き起こす細菌群及びノロウイルスの検査を実施してきた。ノロウイルスは、ウイルス起因食中毒事例の90%以上を占めるもの (<https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=0045191&tstat=000001040259&cycle=7&tclass1=000001127521>)、近年の動向を踏まえれば、これらの病原体が検出されなかった場合、その他の胃腸炎ウイルスを迅速に検索できる体制を整えておくことが望ましい。そこで、小和田らの報告²⁾に基づき、6種類の胃腸炎起因ウイルス (アデノウイルス、エンテロウイルス、アストロウイルス、サポウイルス、A群ロタウイルス、C群ロタウイルス) を同時に検出できるマルチプレックスリアルタイム PCR (以

下、「MR-PCR」とする) 法を導入し、京都府内で過去に発生した食中毒事例や感染性胃腸炎の小児散発事例に試みたので、報告する。

材料及び方法

1. 材料

2018年2月から2019年3月までに本府内で発生した食中毒5事例の糞便31検体、及び府内医療機関において「感染性胃腸炎」と診断された小児散発感染症5事例の糞便5検体を用いた。

陽性対照としての、アデノウイルス、エンテロウイルス及びアストロウイルスは、過去に当所でウイルス陽性となった糞便検体を用いた。サポウイルス、A群ロタウイルス及びC群ロタウイルスは、国立感染症研究所から配布されたRNAを用いた。

2. 方法

MR-PCR法は、小和田ら²⁾の方法に準拠して行った。検査法の概要を以下に示す。

糞便検体はPBS(-)で10%乳剤とし、2,000 rpm、10分間冷却遠心後の上清をフィルター (孔径0.20 µm) 滅菌し、これを試料とした。

試料から、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて核酸 (RNA及びDNA) を抽出した。抽出したRNA10 µLをテンプレートとして、表1に示す逆転写反応液を用い、37℃

(令和2年1月8日受理)

表 1. 胃腸炎起因ウイルス 6 種のマルチプレックスリアルタイム PCR 法における反応液の組成

反応液の種類	試薬の種類	1検体あたりの容量(μL)
逆転写反応液	5×PrimeScript Buffer(TaKaRa)	4
	PrimeScript RT Enzyme Mix I (TaKaRa)	1
	Random 6mers(TaKaRa)	4
	大塚蒸留水	1
マルチプレックスリアルタイムPCR反応液	2x QuantiTect Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN)	10
	Primer Probe Set(each0.2μM)	3
	大塚蒸留水	5

表 2. ノロウイルス及びマルチプレックスリアルタイム PCR 検査結果一覧

事例番号	事例の種類	初発患者発生月	原因施設	ノロウイルス陽性検体数/検体総数	マルチプレックス陽性検体数/検体総数	検出ウイルス							
						ノロウイルスG I	ノロウイルスG II	サポウイルス	A群ロタウイルス	C群ロタウイルス	アデノウイルス	アストロウイルス	エンテロウイルス
1	食中毒	2018/2	研修所	1/7	0/7	0	1	0	0	0	0	0	0
2		2018/3	幼稚園	2/2	0/2	0	1	0	0	0	0	0	0
3		2018/8	飲食店	0/8	0/8	0	0	0	0	0	0	0	0
4		2018/11	飲食店	0/12	0/12	0	0	0	0	0	0	0	0
5		2018/11	旅館	0/2	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0
6	小児散発	2018/2	散発	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0
7		2018/6	散発	0/1	1/1	0	0	1	0	0	0	0	0
8		2018/11	散発	1/1	1/1	0	1	0	0	0	1	0	1
9		2018/10	散発	0/1	1/1	0	0	0	0	0	1	0	0
10		2019/1	散発	1/1	0/1	0	1	0	0	0	0	0	0

で15分その後85℃で5秒処理する逆転写反応により、RNAからcDNAを合成した。得られたcDNA 2μLをテンプレートとして、表1に示すMR-PCR反応液を用い、95℃で15分処理した後、94℃ 60秒と60℃ 90秒を45サイクル処理して、MR-PCRを行った。プライマーとプローブは小和田ら²⁾が用いたものをAセット(サポウイルス・アストロウイルス・C群ロタウイルス)もしくはBセット(エンテロウイルス・アデノウイルス・A群ロタウイルス)の組み合わせで使用した。リアルタイムPCR装置は、ABI 7900 HT Fast (Applied Biosystems)を使用した。

ノロウイルスG I及びG IIの検査は通知法³⁾により実施した。

結果及び考察

1. MR-PCR法の検討

各陽性対照のcDNAを用いて、MR-PCR法を実施したところ、6種類のウイルス全てを同時検出できることが確認された。本法により、6時間程度で最大で糞便44検体から6種類のウイルスを同時検出することが可能となった。ただし、A

群ロタウイルス及びC群ロタウイルスについては、他のウイルスと比較して増幅曲線の立ち上がりが高く、ウイルス量が少ない検体からは検出できない可能性がある。後述の食中毒事例及び小児散発事例の結果においても、ウイルス量が少なかったため、検出できなかった事例があると考えられた。

MR-PCR法では、精度良く検査を実施するには、使用する機器、試薬、蛍光色素等の選択が重要である。A群ロタウイルス及びC群ロタウイルスの感度を向上するため、使用する機器、試薬、蛍光色素等の条件を検討することが必要と考えられた。

2. 食中毒事例からの検出

食中毒5事例の糞便31検体について、MR-PCR法を実施したところ、全ての検体からウイルスは検出されなかった。5事例のうち2事例の糞便3検体からはノロウイルスG IIが検出された(表2)。小和田ら²⁾は、4施設で発生したノロウイルスによる同一事例と考えられていた食中毒事例にMR-PCR法を適用し、4施設中1施設における集団発生はC群ロタウイルスを原因とする別の事例であった可能性を示唆している。本府においても、今後事例を積み重ねていくこ

とで、より正確な原因究明に近づくことができると考えられる。

3. 小児散発事例からの検出

「感染性胃腸炎」と診断された5検体について、MR-PCR法を実施したところ、3検体からウイルスが検出された。内訳は、サポウイルスが1検体、アデノウイルスが1検体、アデノウイルス及びエンテロウイルスが1検体であった。重複して検出された1検体からはノロウイルスGⅡも検出された(表2)。検体数は少ないものの、ノロウイルス以外の胃腸炎ウイルスが本府内においても検出された。

MR-PCR法に要する時間は6時間であり、食中毒疑い事例や胃腸炎の集団事例でノロウイルスが陰性の場合、本法をスクリーニング検査として追加することで、迅速かつこれまで以上に原因究明に貢献することが期待できる。

謝 辞

本調査を行うにあたり、検体採取等に御協力いただきました

た各医療機関の諸先生方並びに保健所関係者の皆様に深謝します。

引用文献

- 1) 堀田千恵美, 小倉惇, 仁和岳史, 小川知子, 篠崎邦子, 江口弘久. 2012. A群ロタウイルスによる胃腸炎集団事例発生状況(千葉県). 病原微生物検出情報(IASR)月報. 33. 197-198
- 2) 小和田和誠, 東方美保, 平野映子, 中村雅子, 大村勝彦. 2011. Multiplex real-time PCRを利用した胃腸炎ウイルス検査の検討. 福井県衛生環境研究センター年報, 第10巻(2011), 40-44.
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知(食安監発第1105001号平成15年11月5日. 最終改訂食安監発第0514004号平成19年5月14日). 2007. ノロウイルスの検出法について.