

原 著

原因不明の集団胃腸炎事案及び食中毒事案におけるサポウイルスの ブロードリアクティブ・リアルタイムPCRを用いた遡り調査

鈴藤 和, 谷澤 由枝, 重本 直樹

Retrospective investigation of unexplained outbreaks of gastroenteritis using a broadly reactive real-time PCR assay of sapovirus.

SUZUTO MADOKA, TANIZAWA YUKIE and SHIGEMOTO NAOKI

(Received : November 24, 2020)

Sapoviruses (SaVs), members of the family *Caliciviridae*, are recognized as the leading cause of sporadic gastroenteritis in young children, they have also been implicated in gastroenteritis outbreaks caused by foodborne transmission recently. We have developed a reverse transcription (RT)-multiplex PCR assay with fluorescent dye-labeled primers for the detection of 10 viruses, including SaVs, associated with gastroenteritis outbreaks. However, in some cases, the causative pathogens could not be identified by using the standard methods. Recently, more genetically diverse SaVs strains including SaVs GV.2 were detected in gastroenteritis patients.

Here, we have introduced a broadly reactive real-time PCR assay which detected strains that are representative of all 18 human SaVs genotypes, including SaVs GV.2. We determined the presence of SaVs in causeless gastroenteritis samples (173 samples from 51 cases collected between 2012 and 2019). In addition, we designed a method to detect the genotypes of SaVs, that involved sequence-based typing analysis of SaVs detected in Hiroshima Prefecture between 2012 and 2019. As a result, it was found that there were epidemics of infectious gastroenteritis due to SaVs mainly composed of genotype GII.3 among the cases of unknown cause in the 2018/19 and 2015/16 seasons.

Key words : Sapoviruses, infectious gastroenteritis, foodborne gastroenteritis, sequence-based typing analysis

緒 言

わが国におけるウイルス性食中毒及び胃腸炎の大半がノロウイルスの感染によるものであるが、他にもサポウイルス (SaV) やロタウイルスが毎年検出されている。

SaVは、1977年に札幌市の児童福祉施設における胃腸炎の集団発生において初めて報告されたものであり [1]、主に乳幼児の散発性下痢症の起因ウイルスとして知られている [2] が、近年、食中毒をはじめとした集団感染事例の報告が増加している [3-5]。

広島県では、行政検査として実施する食中毒及び感染性胃腸炎集団事例や、感染症発生動向調査事業における小児の感染性胃腸炎の検査において、当センターが開発した蛍光マルチプレックス RT-PCR法 [6-8] を導入することにより10種類のウイルスを包括的に検

査している。しかしながら、地域流行があるにもかかわらず、ウイルスが検出されず原因不明となるケースも何度かあった。また、SaVについては、近年、従来のリアルタイム RT-PCR検査法に用いるプライマー及びプローブの結合部位に変異が見られる SaV GV.2が検出される [9] など、広島県においても、従来の検査法では検出できない遺伝子型が流行している可能性が懸念されている。

今回、SaV GV.2を含む18種のヒトサポウイルスの遺伝子型に対応した新しいSaVのリアルタイムPCR検査系 [10] を導入し、2012年から2019年の間に原因不明となった食中毒及び感染症の集団発生事例を対象に遡り調査を実施したところ、今回新たにサポウイルスの地域流行があったことが判明したので報告する。

材料及び方法

1 供試検体

SaVの流行状況を把握するための廻り調査には、2012年から2019年の食中毒及び感染症の集団発生事例のうち、当時の検査で原因不明となった51事例について-40℃で保管していた173検体のcDNAを材料とした。cDNAの合成は、10%糞便乳剤からQIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN)によりRNA抽出を行った後、抽出RNA 9.5 μlを5×buffer 4 μl, 2mM dNTPs 4 μl, 50 μM Random primer pd (N)₉ (タカラバイオ株式会社) 1 μl, RNase Inhibitor (40U/μl) (TOYOBO) 0.5 μl, ReverTra Ace (100U/μl) (TOYOBO) 1 μlを含む反応液に加え、30℃ /10分, 42℃ /60分, 99℃ /5分の反応を行ったものである。

2 リアルタイムPCR検査

リアルタイムPCR法にはOkaらの報告[10]のプライマー及びプローブ (Table 1) を用いた。また、当所で最適化を図る目的でPCR機器にApplied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)及びLightCycler480 System II (Roche Diagnostics), 試薬にはQuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) 及びLightCycler480 Probes Master (Roche Diagnostics) を用いた。反応条件は、95℃ /15分, (95℃ /15秒・60℃ /1分) × 45サイクル, 72℃ /10分及び95℃ /15分, (95℃ /15秒・53℃ /1分・72℃ /1分) × 45サイクル, 72℃ /10分の2種の条件で行った。なお、最適化の指標として国立感染研究所から配布されたコントロールプラスミド (SaV GII.1) を10¹ ~ 10⁵コピーを反応液に加え、反応を行った。また、反応特異

性を見るため、SaV陽性cDNA5検体とSaV陰性cDNA5検体 (ノロウイルスGI, ノロウイルスGII, アデノウイルス)が検出された各3検体と、細菌分離検査によりサルモネラ属菌が分離された2検体)を供した。

3 遺伝子型別検査

SaVの遺伝子型別には既知のSaVの塩基配列を参考に、Table1に示す遺伝子型別用のプライマーを新たに設計し、原因不明事例のうち、リアルタイムPCR検査で陽性となった検体を対象に、遺伝子型別を行った。PCR試薬はAmpliTaq Gold™ Fast PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)を用い、95℃ /10分, (95℃ /3秒・57℃ /30秒・68℃ /5秒) × 40サイクル, 72℃ /10分での反応後、アガロースゲル電気泳動で435bpの増幅産物が得られた検体について、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を解読した。得られた塩基配列データについて、遺伝子解析ソフトMEGA X [11]を用いて、近隣結合法による遺伝子系統樹解析を行い、SaVの遺伝子型を判定した。

結 果

1 リアルタイムPCR反応条件の検討と廻り調査

Okaら[10]が報告したSaVのリアルタイムPCR系を当センターでの機器、試薬で検査するにあたり条件検討を行った結果、機種はLightCycler480 System II, 試薬はQuantiTect Probe RT-PCR Kitを使用し、PCR反応を95℃ /15秒・53℃ /1分・72℃ /1分で行った時に、最も蛍光強度が高く、Okaらの報告[10]に近いCp値で検出された (Figure 1)。また、本条件下において、SaV陽性、陰性の既知検体を用いた反応特異性の検定ではすべて一致する結果が得られた。

Table 1 Primers and probes used for real-time PCR and sequence-based typing analysis.

Method	Primers and probes	Sequence (5'3') ^a	Conc. (μM)	Refs.
Real-time PCR	HuSaV-F1	GGCHCTYGCCACCTAYAAAYG	1.2	Oka et al. (2018) [10]
	HuSaV-F2	GACCARGCHCTCGCYACCTAYGA	1.2	
	HuSaV-F3	GCRYKGCWTGYTAYAACAGC	1.2	
	HuSaV-R	CCYTCCATYTCAAACACTA	1.2	
	HuSaV-TP-a	FAM-CCNCCWATRWACCA-MGB-NFQ	0.2	
	HuSaV-TP-b	FAM-CCNCCWACRWACCA-MGB-EQ	0.2	
Sequence-based Typing	SV-F21m1	CAAAWTAGTGTTTGARATGGAGGG	0.2	Shigemoto et al. (2017) [8]
	SV-F21m2	GCTATTAGTGTTTGARATGGAGGG	0.2	
	SV-R2.1.3	GTCGGGTCAACCCCGGGCGG	0.2	
	SV-R2.1	GWBGRTCAACCCWGGTGG	0.2	This study
	SV-R2.2.3	GCHGGRTTRACHCCTGGWGG	0.2	
	SV-R2.2	GCVGGRTSACDCCNGGTGG	0.2	
	SV-R2.4	GTTGGGTCAACCCGGGGG	0.2	
	SV-R2.5	GYKGGRTTRACYCCAGGAGG	0.2	

Abbreviation: FAM, 6-carboxyfluorescein; MGB, minor groove binder; NFQ, nonfluorescent quencher; EQ, Eclipse quencher

^aMix bases in degenerated primers and probes are as follows: R=A/G, W=A/T, S=C/G, Y=C/T, K/G/T, H=A/C/T, B:A/T/C, D:G/A/T, V=A/C/G, N=A/C/G/T

次に、過去に原因ウイルスが特定出来ずに原因不明となった事例51件173検体について遡り調査を行ったところ、13件27検体からSaV遺伝子が新たに検出された (Table 2).

2 遺伝子型別検査

過去に原因不明となった事例から新たにSaVが検出された13件27検体について、遺伝子型別用のPCR検査を実施したところ、11件23検体について、増幅産物が得られた。得られた増幅産物の塩基配列データについて遺伝子系統樹解析を実施したところ、遺伝子型

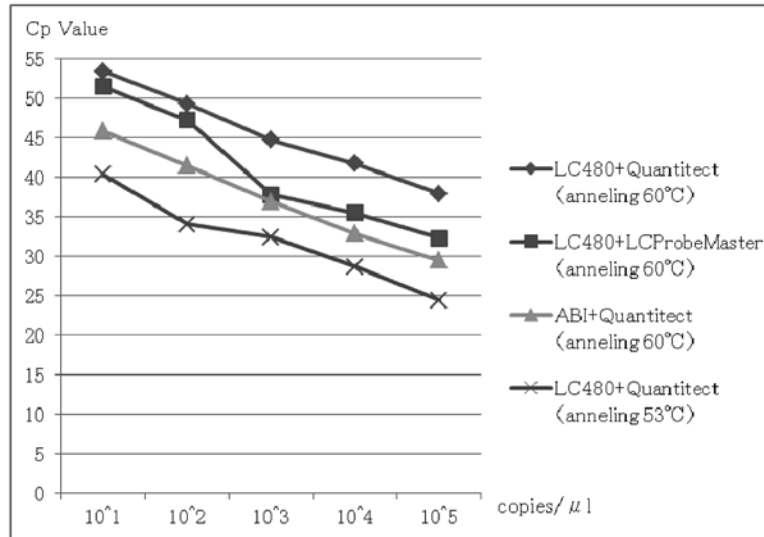


Figure 1 Reactivity against serially diluted GII.1 sapovirus plasmids.

^aLC480, Lightcycler480 system; ^bABI, Applied biosystems 7500 real-time PCR system.

^cQuantitect, QuantiTect probe RT-PCR kit; ^dLC Probe Master, LightCycler 480 Probes Master.

Table 2 Characteristics of retrospective investigation of unexplained outbreak cases using the broadly reactive real-time RT-PCR assay and sequence-based typing

Season	Date	Case No.	Epidemiology		Rate of positive sample	The broadly reactive real-time RT-PCR assay (Cq value)	Sequence-based typing
			Transmission ^a	Setting			
18/19	2019/01/09	439	p	nursing home	1/7	34.03	GII.3
	2018/12/18	434	p	nursery school	3/4	25.50 22.23 26.89	GII.3 GII.3 GII.3
18/19	2018/12/17	432	p	nursery school	4/5	21.73	GII.1
						37.87	not detected
						26.88	GII.3
						30.92	GII.3
18/19	2018/12/07	431	p	nursery school	2/2	18.82	GII.3
						20.80	GII.3
18/19	2018/12/10	430	p	nursery school	4/4	18.89	GII.3
						29.30	GII.3
						19.58	GII.3
						19.57	GII.3
18/19	2018/11/05	427	p	nursery school	2/3	36.33	not detected
						30.49	GII.3
16/17	2016/12/06	374	p	vocational school	1/3	40.0	not detected
15/16	2016/05/20	343	p	nursery school	2/2	18.45	GII.3
						30.64	GII.3
15/16	2016/01/21	336	p	nursery school	2/2	26.31	GII.3
						26.92	GII.3
15/16	2015/12/21	329	p	nursery school	1/1	31.95	GII.1
						20.80	GII.3
15/16	2015/12/17	327	p	nursery school	2/2	18.97	GII.3
						27.89	GIV.1
15/16	2015/12/16	326	p	nursery school	2/3	19.59	GIV.1
						40.0	not detected
14/15	2015/02/19	307	f	restaurant	1/7	40.0	not detected

^a p, person to person; f, food borne.

は, GII.1 2検体, GII.3 19検体, GIV.1 2検体に分類された (Table 2). また, 事案毎に整理すると, GII.1, GII.3, GIV.1が検出された事例がそれぞれ, 1件, 8件, 1件で, GII.1と GII.3両方が検出された事例が1件であった (Table 2).

考 察

今回, Okaらが報告 [10] したプライマー及びプローブを用いたサポウイルスのブロードリアクティブ・リアルタイムPCRを導入し, 2012年から2019年の食中毒及び感染症の集団発生事例において蛍光マルチプレックスRT-PCR法で検査した結果, 原因不明であった食中毒及び感染症の集団発生事例51件173検体を対象にSaVの廻り調査を実施したところ, 13件27検体でSaV遺伝子が検出された. 遺伝子型を同定した結果, SaV GII.3(9件)と, 次いでGII.1(2件), GIV.1(1件)が検出され, 特にGII.3は新たにSaVが検出された事例中で62%を占めた. 現在, SaVには五つの遺伝子群 (GI ~ GV) が知られており, それぞれに複数の遺伝子型が存在するが, ヒトへの感染が報告されているのはGI, GII, GIV, GVである [12]. Okaらの報告 [10] に記載されているヒト由来であるSaVの各遺伝子型と, 当センターが開発した蛍光マルチプレックスRT-PCR法で使用するプライマーのフォワード側及びリバーズ側の2種類のプライマー [8,13] の塩基配列を比較したところ, フォワード側では最大1塩基, リバーズ側では最大6塩基の相違があり, 特にSaV GIIの各遺伝

子型に対しリバーズ側で3~6塩基の相違があることが判明した (Figure 2). よって, 遺伝子型によっては, 当センターで用いていた蛍光マルチプレックスRT-PCR法ではウイルスが検出出来なかったと考えられた. 今後, SaVの関与を見逃さないために, 当センターが開発した蛍光マルチプレックスRT-PCR法のプライマーの改良が必要である.

今回, 新たにSaVが陽性となった13事例の概要 (Table 2) は, 食中毒1件, 感染症12件で, 原因施設別では保育施設が10件, 特別養護老人ホームが1件, 専門学校が1件, 飲食店が1件であった. 発生時期は2018/19シーズンが6件と最も多く, 2015/16シーズンが5件, 2016/17シーズンが1件, 2014/15シーズンが1件であり, 発生月は, 12月が8件, 1月が2件, 2月, 5月及び11月が1件であった. また, 2018/19シーズン, 2015/16シーズンのSaVの遺伝子型の多くがGII.3であったことから, 少なくともこの2シーズンにおいて冬季にSaV GII.3による地域流行が保育園や幼稚園の施設であったことが明らかになった.

SaVについては, 国内の既報において, 保育施設や幼稚園, 小学校等の若齢での発生が多い傾向にあり [3-5,14], さらに病原微生物検出情報 (IASR) ノロウイルス等検出速報によると, 2016/17シーズンから2019/20シーズンの11月から12月をピークにノロウイルス及びSaV等の小型球形ウイルス (SRSV) が検出されている. 今回, 新たに明らかになった広島県内におけるSaVの地域流行もこれらの状況を裏付けるものと考えられる.

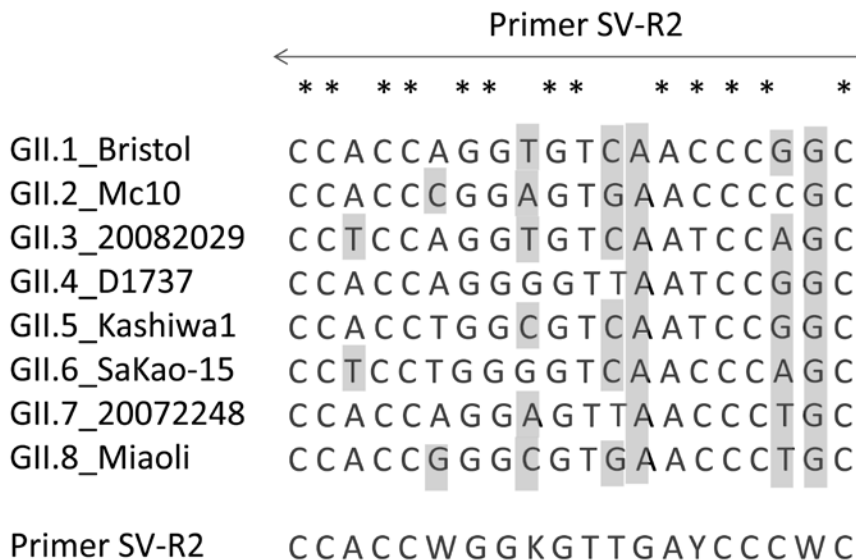


Figure 2 Comparison of the SV-R2 primer sequence with the corresponding region of sapovirus GII genotypes. An asterisk shows a mismatch sequence between primer SV-R2 and sapovirus GII genotypes.

今回の遡り調査において2015/16シーズンに保育園での集団事例において, SaV GIV.1が検出された. 病原微生物検出情報 (IASR) ノロウイルス等検出速報によると, 2010/11から2020/21シーズンにおいて, サポウイルスの遺伝子グループはGIとGIIが多い傾向にあり, GIVの報告は稀である. しかしながら, GIVの報告がそれまでほぼ1桁台であったものが, 2015/16シーズンにおいては, 21例と比較的多く報告されており, 県内の集団事例でGIV.1が検出されたのは, こういった背景を反映しているのかもしれない.

ま と め

今回, SaV GV.2を含む18種のヒトサポウイルスの遺伝子型に対応した新しいSaVのリアルタイムPCR検査系での遡り検査により, 県内で2018/19及び2015/16シーズンにSaVによる集団胃腸炎の地域流行があったことが判明し, 流行の主な遺伝子型はSaV GII.3であった. また, 当時原因不明となった原因の一因として, 当センターで使用している蛍光マルチプレックスRT-PCR法のSaV検出用プライマーにSaVの一部の遺伝子グループでミスマッチがあるためと考えられた. 本研究により, シーズンによっては広島県内における感染性胃腸炎の流行にSaVが大きく関与していることが明らかになったことから, 今後, SaVの動向を監視するとともに, より高い精度でSaVが検出できる方法の開発に取り組む必要がある.

参考文献

- [1] Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Terashima H, Horino K, Nakao T. (1980) : Fecal Shedding of Virus in Relation to the Days of Illness in Infantile Gastroenteritis Due to Calicivirus, *J Infect Dis.* 142 : 247-249.
- [2] 岡田峰幸, 篠崎邦子 (2007) : サポウイルス感染症. *公衆衛生*, 71, 998-1000.
- [3] 吉田徹也, 粕尾しず子, 畔上由佳, 宮澤衣鶴, 小林正人, 白石崇 (2008) : 長野県内で発生したサポウイルスによる集団感染性胃腸炎の2事例, *IASR病原微生物検出情報月報.* 29 : 129-132.
- [4] 辰己智香, 三田哲朗, 山田直子, 藤澤直輝, 熱田純子, 柳俊徳 (2019) : 自校調理施設を有する中学校でのサポウイルス食中毒事例 - 島根県, *IASR病原微生物検出情報月報.* 40 : 90-91.
- [5] 林慎一 (2010) : 給食弁当を原因としたサポウイルスによる大規模食中毒事例 - 愛知県, *IASR病原微生物検出情報月報.* 31 (11) : 322-323.
- [6] Shigemoto N, Fukuda S, Tanizawa Y, Kuwayama M, Ohara S, Seno M. (2011) : Detection of norovirus, sapovirus, and human astrovirus in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers. *Microbiol Immunol.* 55 : 369-372.
- [7] Shigemoto N, Hisatune Y, Toukubo Y, Tanizawa Y, Shimazu Y, Takao S, Tanaka T, Noda M, Shinji F. (2017) : Detection of gastroenteritis viruses among pediatric patients in Hiroshima Prefecture, Japan, between 2006 and 2013 using multiplex reverse transcription PCR-based assays involving fluorescent dye-labeled primers. *J Med Virol.* 89 : 791-800.
- [8] 重本直樹, 久常有里, 谷澤由枝 (2017) : 下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法のアップデート Ver.2.0. *広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告.* 25 : 1-7.
- [9] 稲崎倫子, 板持雅恵, 名古屋真弓, 佐賀由美子, 稲畑良, 滝澤剛則, 小淵正次 (2018) : 次世代シーケンサーを用いた食中毒疑い事例からのサポウイルスGV.2の検出. *Jpn J Food Microbiol.* 35 (2) : 81-87.
- [10] Oka T, Iritani N, Yamamoto SP, Mori K, Ogawa T, Tatsumi C, Shibata S, Harada S, Wu FT. (2018) : Broadly reactive real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of human sapovirus genotypes. *J Med Virol.* 91 : 370-377.
- [11] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. (2018) : MEGA X : Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 35 (6) : 1547-1549.
- [12] Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ. (2015) : Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin Microbiol Rev.* 28 : 32-35.
- [13] Okada M, Shinozaki K, Ogawa T, Kaiho I. (2002) : Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. *Arch Virol.* 147 : 1445-1451.
- [14] 原稔美, 酒井悠希子, 大石沙織, 阿部冬樹, 神田隆 (2019) : 小学校で発生したサポウイルスによる集団感染性胃腸炎事例 - 静岡県, *IASR病原微生物検出情報月報.* 40 : 108-109.