

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26820222

研究課題名(和文) デジタルPCRを用いた水中ノロウイルスの遺伝子型別定量手法の開発

研究課題名(英文) Establishment of a digital PCR-based genotyping method for noroviruses in water

研究代表者

端 昭彦 (Hata, Akihiko)

京都大学・工学研究科・特別研究員(PD)

研究者番号：70726306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：水中には疫学的な特徴の異なる複数のノロウイルス遺伝子型が共存している。特定の遺伝子型の特異的な検出・定量により、水系感染リスクや疫学的特性について新たな知見が得られると考えられる。本研究では新規遺伝子定量手法であるデジタルPCRを用い、水中ノロウイルスについて「総濃度」および「特定の遺伝子型の濃度」を同時に計測可能な手法の構築を目指した。

国内の水試料を継続的に収集、分析し、流行遺伝子型を特定し、これらに特異的な蛍光プローブを設計した。本プローブはReal-time PCRでは良好に機能したが、デジタルPCRにおいては非特異シグナルが生じたため、反応条件等の詳細な検討が必要となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：It is known that genetically broad types of noroviruses are exist together in the water environment. Quantification of single genotype of noroviruses seems to be important to understand characteristics of noroviruses, in view of infection risk via water and epidemiology, more deeply. The aim of the study was to establish a method for simultaneous quantification of "whole norovirus" and "a genotype of norovirus" using the novel digital PCR platform. Water samples in Japan were continuously collected and analyzed to determine epidemic norovirus genotypes. Based on nucleotide sequences of the epidemic types and those on the database, fluorescent probes, which react to each epidemic genotype specifically, were designed. In the conventional real-time PCR platform, the fluorescent probes worked ideally, while they resulted in non-specific signal in the digital PCR platform. The results imply that further improvement is necessary for establishing the assay.

研究分野：水環境学

キーワード：健康関連微生物 ノロウイルス Real-time PCR デジタルPCR 水系感染症

1. 研究開始当初の背景

ノロウイルス(NoV)はウイルス性胃腸炎の主要因であり、世界中で年齢に関係なく胃腸炎を引き起こしている。NoVを始めとする腸管系ウイルスは感染者糞便より高濃度で排出され、下水処理場等を介して水環境を汚染する。水浴場での親水行為や飲料水を介した水系感染が感染経路の一つと捉えられている。日本国内においては、NoVの水系感染事例は浄水処理が不適切であった簡易水道で1例のみが報告されている(斎藤ら, 2005. 感染症情報センター月報)。しかしながら、大規模な感染流行が生じた場合でなければ水系感染は検知しにくく、散発感染や比較的軽症であり医療行為を必要としない不顕性感染などが想定されるため、潜在的にはより多くの水系感染が生じていると推察できる。従って、適切な水質調査や各種水処理への耐性評価、定量的リスク評価等を通じて水の安全性評価を試み、感染リスクを許容値未満まで低減することが望まれる。

ヒトに感染するNoVとして、主にGI群とGII群の2遺伝子群が知られている。GI群、GII群はそれぞれ少なくとも9(GI.1-GI.9), 22(GII.1-GII.22)の遺伝子型に分類され、遺伝子型ごとに異なる疫学特性を示す。胃腸炎患者からは主にGII群が検出されており、近年では特にGII.4型が高頻度で検出される。一方で、水試料からはGI群がより高頻度・高濃度で検出される傾向にある。また、遺伝子型についても臨床検体と比較し幅広い型が検出される傾向にあり、GII.4型は必ずしも優占しない。これらより、散発感染・不顕性感染を含めると従来考えられていたよりも多様なNoV遺伝子型が感染流行を引き起こしており、人間社会と水環境を循環していると考えられる。先行研究では下水処理耐性や水中での生残性が遺伝子型に依存することも示唆されている。従って、水由来のNoV感染リスク制御を考える上では遺伝子型レベルで水処理耐性、水中での生残性、時空間的な存在濃度分布等を評価していく必要がある。

2. 研究の目的

新規の遺伝子定量手法であるデジタル

PCRを用い、環境水中のノロウイルスを遺伝子型レベルで定量する手法の構築を目的とした。

NoVの検出・定量法として、RT-PCRによる遺伝子検査が最も有効とされている。既往のRT-PCRによるNoV検出系はGI群、GII群のそれぞれについて各遺伝子型を網羅的に検出可能なプライマー、蛍光プローブ(網羅的プローブ)が用いられてきており、各遺伝子型に特異的な検出系は報告されていない。既往の遺伝子型同定データもこれらのプライマーによる遺伝子増幅と配列解読に基づく定性的なものである。遺伝的に近縁な遺伝子型のそれぞれに特異的なプライマー・蛍光プローブ系を設計するのは現実的でないため、本研究では遺伝子型に特異的な蛍光プローブ(特異的プローブ)のみを設計し、既往のプライマー、蛍光プローブと組み合わせる。網羅的プローブと特異的プローブをそれぞれ異なる蛍光色素で標識することにより、1度のPCR runで"総NoV数"と"対象遺伝子型NoV数"のそれぞれを同時に定量可能とする。本研究で目指すように、1対のプライマーペアによる増幅産物のうちの一部を検出しようとする場合、通常のReal-time PCRではプライマーの競合等により、過小評価・偽陰性が生じやすい。デジタルPCRでは、試料を数万の反応wellに分注し、各wellでPCRを行い陽性well数から元の遺伝子数を推定する手法であり、1wellあたりの鑄型量が限られるためプライマーの競合による悪影響は生じにくいと考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、まず京都府を対象に水環境試料を継続的に収集し、試料中のNoVの遺伝子定量および遺伝子配列解読を試みた。得られた遺伝子配列情報より、当該地域で流行しているNoV遺伝子型を判定した。さらに、データベース上の遺伝子配列情報も加味して流行遺伝子型のNoV遺伝子と特異的に反応する蛍光プローブを設計した。これを用い、デジタルPCRによる遺伝子型レベルでのNoV定量を試みた。

表1. デジタルPCRでのGII-NoVの検出に用いたプライマー、蛍光プローブ

Function	Target	Sequence (5' 3')	Reference
Fluorescent probe	GII.3	VIC-TGAGGCAATGGCGCTAGA-MGB-NFQ	This study
	GII.4	VIC-ACTATGGAGCGCGCCC-MGB-NFQ	This study
	GII.17	VIC-CGAGACCCCTCCCTA-MGB-NFQ	This study
	All GII	FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA	Kageyama et al., 2003, J. Clin. Microbiol.
+ primer	All GII	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	Kageyama et al., 2003, J. Clin. Microbiol.
- primer	All GII	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	Kojima et al., 2002, J. Virol. Methods

VIC: 6-carboxyrhodamine; MGB: minor groove binder; NFQ: nonfluorescent quencher; FAM: 6-Carboxyfluorescein; TAMRA: 6-carboxy-tetramethylrhodamine

Mixed bases in degenerate primers and probes are as follows: Y, C or T; R, A or G; B, not A; H, not G; N, any.

3.1 試料の収集，前処理

水環境中のノロウイルスの流行状況を把握するため，京都府内の河川4地点で試料を収集・分析した．試料収集は2014年6月から2015年6月までの約1年間，ほぼ月に1度の頻度で行い4地点から計52試料を得た．4地点のうち1地点は下水処理場の放流口直近に位置し（地点1），その上流および下流の1地点ずつでも採水した（地点2および3）．このほか，都市下水道での処理を受けていない排水が流入している河川の1地点でも採水した（地点4）．試料は1Lを陰電荷MF膜による吸着・誘出法及び遠心式UF膜を用いた手法により0.7 mLまで減容した．減容した試料はRNA抽出操作に供し，以降の遺伝子解析に供した．

3.2 NoV 遺伝子の検出

試料はまず，従来より用いられている逆転写（Reverse transcription-: RT-）Real time PCRによるNoVの定量検出に供した．本検査系はGI群GII群に属するNoV株について，それぞれ全ての遺伝子型を一括して定量す

る手法である．また，NoVの他にサポウイルス，ロタウイルス，アイチウイルス，エンテロウイルス，トウガラシ斑ウイルス等の腸管系ウイルスやウイルス汚染の指標となるウイルスも同時に定量した．

RT-real time PCRにおいて，GI群ないしGII群NoV陽性であった試料のうち，検出濃度の高さや採水地点，採水時期を考慮し24試料を選定し，NoV遺伝子配列解析操作に供した．まず，RT-nested-PCRによる遺伝子増幅を試みた．本手法はRT-real time PCRと同様にGI群GII群に属するNoV株について，それぞれ全ての遺伝子型を一括して検出する手法であるが，増幅する遺伝子長が300 nt程度であり，100 nt程度を増幅するRT-real time PCRと比較して長い．このため，遺伝子配列解析および遺伝子型同定に適しており，水試料中のNoV遺伝子型分布の解析に広く用いられるものである．Rt-nested-PCRにより得られたPCR産物はillumina Miseqによる次世代シーケンシングに供し，試料中のNoV遺伝子配列を網羅的に解読した．

表2．河川水試料から検出されたNoVの遺伝子型

採水月	地点	Real-time PCR での Ct 値		次世代シーケンシングにより検出・同定された遺伝子型				
		GI	GII	GI	GII	GI	GII	
2014年6月	1	N.D.	38.94	GII.6				
2014年7月	1	N.D.	39.53	GI.2	GII.4S	GII.6		
2014年10月	2	N.D.	45.66	GI.2	GII.3			
2014年10月	4	47.25	38.49	GI.1				
2014年11月	3	48.21	39.88	GII.3				
2014年11月	4	48.83	43.55	GI.2				
2014年12月	4	N.D.	N.D.	GI.1	GI.4	GII.4	GII.4S	
2015年1月	1	N.D.	38.42	GI.1	GI.4	GII.4S	GII.17	
2015年1月	2	N.D.	N.D.	GI.4	GI.5	GII.17		
2015年1月	3	N.D.	38.74	GI.2	GII.4	GII.4S		
2015年1月	4	46.19	37.69	GI.2	GII.4	GII.4S		
2015年2月	1	43.91	36.82	GI.2	GI.5	GII.4S		
2015年2月	2	N.D.	N.D.	GI.2	GII.4S			
2015年2月	3	N.D.	38.06	GI.1	GI.4	GI.5	GII.4S	
2015年2月	4	46.19	37.94	GI.2	GI.6	GII.4	GII.4S	GII.17
2015年3月	1	32.91	45.84	GI.1	GII.4S			
2015年3月	2	N.D.	N.D.	GI.2	GI.4			
2015年3月	3	42.69	N.D.	GI.1	GI.2			
2015年3月	4	44.14	37.71	GI.2	GI.6	GII.4S		
2015年4月	3	N.D.	N.D.	GI.2	GII.4S	GII.17		
2015年4月	4	N.D.	37.19	GI.2				
2015年5月	1	46.77	41.2	GI.2	GII.17			
2015年5月	4	47.19	41.95	GI.1	GI.2	GI.4	GII.4S	
2015年6月	1	45.95	42.34	GI.2		GII.17		

N.D.: Not detected

NoVの遺伝子型はNorovirus Genotyping Tool (<http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>) により同定した．

3.3 NoV プラスミド DNA の作成

RT-nested-PCR 産物は別途クローニング操作に供した。本操作により得られたプラスミド DNA は Sanger Sequencing に供し、遺伝子配列の解読および遺伝子型同定を試みた。得られたプラスミド DNA のうち、流行型であったと考えられた GII.3 型, GII.17 型 NoV に由来するものを後の実験に用いた。

3.4 遺伝子型特異的蛍光プローブの設計

次世代シーケンシングの結果、特に流行していたと考えられた GII.3 型, GII.17 型及び 2014 年ころまで世界中で流行していた GII.4 型について、特異的な蛍光プローブ設計を試みた。設計にあたっては、次世代シーケンシングにより得られた配列情報とデータベースより取得した配列情報 (750 本程度) を基にした。

3.5 遺伝子定量系の検討

設計した特異的プローブおよび従来より用いられている網羅的プローブを用い (表 1)、デジタル PCR による NoV 遺伝子型定量可能性を検討した。増幅対象は作成したプラスミド DNA とした。まず、Real-time PCR により目的遺伝子が問題なく検出可能であることを確認し、Real-time PCR と同様の検出条件 (プライマー、プローブ濃度、酵素系、サーマルサイクリング条件) をデジタル PCR に適用した。

プラスミド DNA の添加濃度は 10 倍段階で設定し、10,000 から 10 copies/reaction とするにした。

4. 研究成果

4.1 河川における NoV 流行状況

RT-Real-time PCR による遺伝子定量の結果、52 試料中 13 試料 (25%)、30 試料 (58%) がそれぞれ GI-, GII-NoV 陽性であった。NoV と同時にエンテロウイルス、アイチウイルス、サポウイルス、ロタウイルス等のヒト腸管系ウイルスを測定したが、特に GII-NoV の陽性率は他の腸管系ウイルスよりも高かった。特に GII-NoV は水中において、冬季に高陽性率、高濃度となることが知られている。しかしながら、本研究で対象とした試料については夏季においても冬季と同程度の頻度で GII-NoV が検出された。夏季に陽性率が低下しなかったことが、他の腸管系ウイルスよりも高陽性率となった要因の一つと考えられる。

シーケンシング解析の結果、2015-2016 年

シーズンに流行を引き起こした GII.17 型や、2015 年以前に流行していた GII.4 型をはじめ、GI.1, GI.2, GI.4, GI.5, GI.6, GII.3 型, GII.6 型といった、多様な遺伝子型に由来する配列が得られた (表 2)。これらのうち、GII.3, GII.4, GII.17 型を対象に、デジタル PCR による特異的遺伝子定量系の構築に取り組んだ。

NoV 遺伝子配列情報を基に、RT-nested-PCR による増幅対象領域である ORF1-ORF2 ジャンクション領域において、GII.3, GII.4, GII.17 の各型に特異的に反応すると考えられる蛍光プローブを設計することができた。設計した蛍光プローブの配列は、16-18 塩基で、対象としない遺伝子型の配列とは少なくとも 2 塩基以上異なるよう設計した。また、設計した蛍光プローブの配列は、データベースを用いた相動性検索 (Blast) に供し、特異性が高いと考えられることを確認した。

4.2 デジタル PCR による NoV 遺伝子型定量

デジタル PCR による NoV 遺伝子定量においては、蛍光プローブとして、遺伝子群 (GII) を網羅的に検出可能なもの (網羅的プローブ) と遺伝子型に特異的なもの (特異プローブ) を同時に用いた (表 1)。両プローブはそれぞれ異なる蛍光色素 (FAM および VIC) で標識し、判別可能とした。デジタル PCR において、遺伝子増幅条件の最適化を試みた結果、プラスミド DNA が高濃度 (10,000 copies 程度以上) 存在する場合には網羅プローブ、特異プローブの両者ともに、期待値通りの測定値が得られた。一方で、低濃度域では測定値と期待値に差異が生じた。さらに、遺伝子を添加しないネガティブコントロール系において偽陽性が生じた (表 3)。使用する酵素系や PCR 時のアニーリング温度、エクステンション温度、反応サイクル数を変更しながら複数回の検討を試みたが、いずれも同様の結果であった。なお、本検出系を Real-time PCR に供した場合は、10 copies/reaction 程度の低濃度域においても期待値通りの結果が得られた。さらに、PCR 産物を電気泳動に供した結果、陽性の産物が得られていることも確認できた。これらより、本研究で設計した遺伝子検出系はデジタル PCR による低濃度ウイルスの検出には適さないことが示唆された。今後はさらなる検出系の最適化を試み、測定感度の向上を試みる必要がある。

表 3. デジタル PCR で得られたデータの一例 (網羅プローブによる定量結果)

Expected concentration (copies/reaction)	Determined concentration (copies/reaction, geometric mean \pm SD)
10^3	$10^{2.8 \pm 0.1}$
10^2	$10^{1.4 \pm 0.5}$
10^1	$10^{3.8 \pm 1.9}$
0 (Negative control)	$10^{2.6}$

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Akihiko Hata, Masaaki Kitajima, Masaru Ihara, Charles P. Gerba, Hiroaki Tanaka. Illuminating the prevalence of genetically diverse astroviruses, including novel MLB- and VA-clades, in environmental water samples. 5th Food and Environmental Virology Conference, 2016年9月15日.

Akihiko Hata, Yuya Shirasaka, Masaru Ihara, Naoyuki Yamashita, Hiroaki Tanaka. Two-year monthly study on viruses in lake water polluted by wastewater effluents. 19th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, 2017年5月16日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

端 昭彦 (HATA, Akihiko)

京都大学・大学院工学研究科附属流域圏

総合環境質研究センター・研究員

研究者番号： 70726306

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし