

PCR-SSCP 法により解析した NLV による胃腸炎の集団発生事例について

徳島県保健環境センター

山本 保男・嶋田 啓司・竹谷美智子

An outbreak of gastroenteritis caused
by Norwalk-like virus using PCR-SSCP analysis

Yasuo YAMAMOTO, Keiji SHIMADA and Michiko TAKEYA

Tokushima Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences

Key Words : ノーウオーク様ウイルス Norwalk-like virus, 胃腸炎 gastroenteritis,
単一暴露 single exposure, PCR-SSCP 法 PCR-SSCP analysis

I はじめに

ノーウオーク様ウイルス (Norwalk like virus : NLV) はウイルス性胃腸炎や食中毒の起因ウイルスとして公衆衛生上重要な位置を占めるウイルスである。

平成13年5月、徳島県西部の小学校においてNLVによる胃腸炎の集団発生事例を経験した。この事例において、患者発生状況、NLVが検出されたプライマー、及びプローブ型別等の状況から単一暴露が強く示唆された。このため疫学的マーカーとしてミニゲルによるSSCP法 (Single-strand conformation polymorphism analysis : 1本鎖DNA高次構造多型) を検討したのでその結果を報告する。

II 事例の概要

平成13年5月、本県西部に位置するX町X小学校において嘔吐・嘔気、下痢を主訴とする腸炎患者の集団発生がみられた (図-1)。患者は1年生を中心とし (全発症者の46%)、5月24日夜から25日にかけて集中的に発生した。2次感染と思われる患者も含め5月31日まで発生した。聞き取り調査が可能であった5月24日・25日に発症した患者37名中17名が医療機関を受診し、その臨床診断名は食中毒、胃腸炎、感冒等であった。当初は食中毒も疑われたが、同じ給食を喫食した他学校での有症者がみられなかったこと、及びX小学校において同じ棟に属する学年に有症者が集中していたこと等から感染性胃腸炎の集団発生と判断された。

当該小学校は3年生・4年生が別棟で、患者が集中した1年生・2年生・5年生が同じ棟であった。6年生も同じ棟であったが患者発生はみられなかった。

III 検査方法

1 検査材料

胃腸炎症状の他、発熱、咽頭痛、咳がみられる患者があったことから、糞便 (7検体) の他うがい液 (9検体) を検査

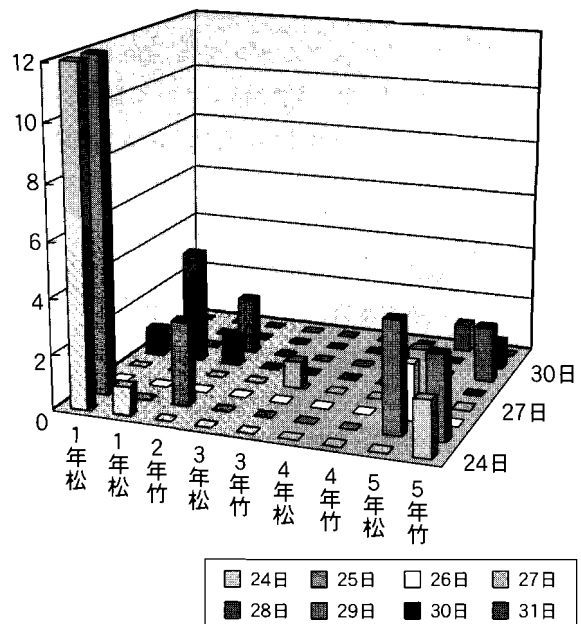


図-1 患者発生状況

材料とした。

2 ウイルス検査

(1) 分離培養

糞便10%乳剤7検体及びうがい液9検体をVero, HEp-2, RD-18S, MDCKの各細胞に接種し、呼吸器系疾患起因ウイルスと胃腸炎起因ウイルスの検索をおこなった。

(2) NLV 遺伝子検査

NLVの遺伝子検出はRT-PCR法で既報¹⁾に準じて実施した。材料は糞便10%乳剤、及びうがい液の超遠心沈査を蒸留水0.1mlで懸濁したものを使用した。使用したプライマーはNV81/82・SM82, YURI22R/F, SR33/48・50・52 (SR1), SR33/46 (SR2)を用いた。RT-PCR陽性検体についてはAndoら²⁾のプロープでドットプロットハイブリダイゼーションで確認試験を行った。

(3) その他の検査

アデノウイルス、ロタウイルスはラテックス凝集試薬を用い、NLVについてはEIA法によるキット(国立感染症ウイルス第2部より分与)により追試を行った。

3 PCR-SSCP法

(1) 検査材料

陽性コントロール、対照、試料とも全てYURI22R/Fによる増幅DNA(373bp)をPCR-SSCP法³⁾に用いた。

(2) 条件設定

① ミニゲルによるSSCP法を報告した菅野ら⁴⁾によると350塩基対くらいまでは10%ゲルが適当であったが、今回我々が使用したプレキャストゲルでは7.5%が適当と認められたので以後の条件設定は7.5%ゲル(オリエンタルインスツルメンツ社: Bis比率は4.0±0.5%)を使用した。条件設定のための陽性コントロールとして国立公衆衛生院(現、国立保健医療科学院)の西尾治博士より全国地方衛生研究所へ分与されたGeno Type 1(以後G I)と、Geno Type 2(以後G II)の陽性コントロールをNV81/82, NV81/SM82, YURI22R/Fで増幅させたDNAを用いた。

② 荷電条件: 定電圧方式と定電力方式について検討した。関谷⁵⁾によると塩基配列決定用ポリアクリルアミド電気泳動装置を使用する場合、標準的には室温で30~40Wの定電力で泳動する。また菅野によるとポリアクリルアミドミニゲルを使用する場合、標準的には室温で200~300Vの定電圧で泳動する。このため、我々は20℃における40W, 90分の定電力と300V, 3時間の定電圧について検討した。

③ 温度条件: 荷電条件設定は標準的な20℃で決定したが、条件決定後あらためて15℃, 20℃, 25℃の3温度条件を検討した。

IV 結果

1 ウイルス分離・検出結果

(1) ウイルス分離結果

糞便、うがい液について組織培養法でウイルス分離を実施したが、分離されなかった。

(2) NLV 遺伝子検査結果

糞便7検体のうち5検体からNLV遺伝子が検出された(表-1)。プライマー毎の内訳は、YURI22R/Fが5検体、SR33/46が3検体であった。YURI22R/Fからの増幅DNAを使用したハイブリダイゼーションの結果、プロープ型別は全てPIB(G II)であった。NV81/82・SM82の系からは検出されなかった。うがい液については、YuriMR4/3, YURI22R/FによるNested PCRを実施したが、NLV遺伝子は検出されなかった。

(3) その他の結果

EIA法によるキットでNLVを検索した結果、7検体中6検体が陽性であった(表-1)

表-1 NLV 検出状況

検体番号	検査法	RT-PCR		ELISA	
		YURI22R/F	SR33/46	G I	G II
1		-	-	-	+
2		+	-	-	+
3		+	-	-	+
4		+	+	-	-
5		-	-	-	+
6		+	+	-	+
7		+	+	-	+

2 PCR-SSCP法の条件設定結果

(1) 荷電条件

7.5%ゲルを使用し、20℃における荷電条件を検討した結果、40W, 90分の泳動条件を採用した。図-2からも明らかなように、定電力が泳動時間が半分であるうえにG I, G IIともに2本鎖に分離した。特にYuri22R/FによるDNAの二本鎖の距離は約1cmであり十分な分離能を示した。

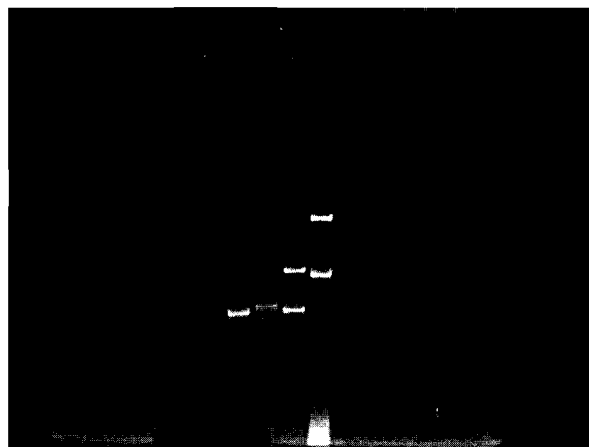
(2) 温度条件

ゲル濃度、荷電条件を決定するために標準的な20℃で試験を行ったが、これらの条件が決定後あらためて温度条件を検討した。その結果15℃ではG IIの分離能は良いもののG Iが分離しなかった。20℃ではG IIの分離

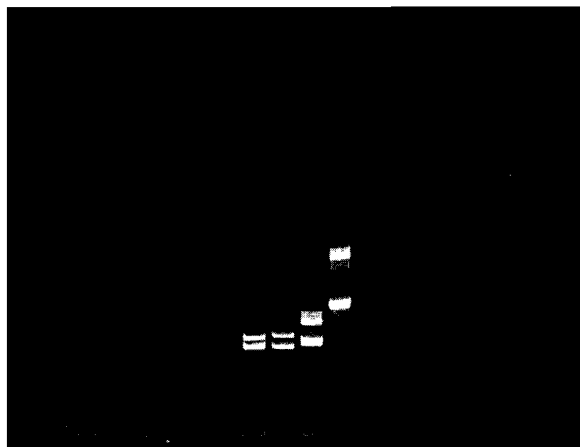
能は15℃より若干劣るもののG Iの分離能は15℃より良かった。25℃では各陽性コントロールは2本鎖に分離したものの全体的評価としては一番悪かった(図-3)。以上のことから Yuri22R/Fを含むG IIに関しては15℃

が一番良かったが、20℃も遜色がない成績が得られたことから、当初の予定どおり温度条件は20℃とした。

以上のことから、本事例におけるPCR-SSCP法の条件は40W、90分、20℃とした。



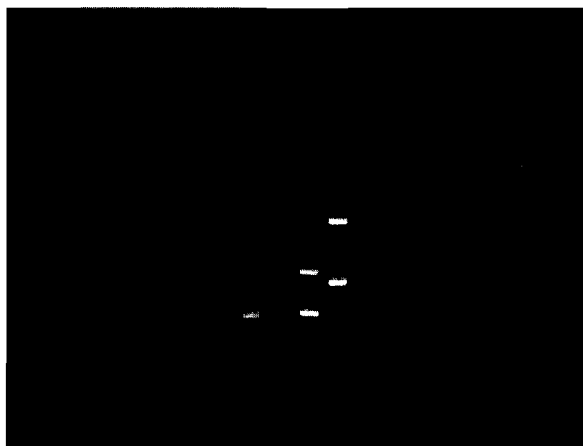
300V, 3時間, 20℃



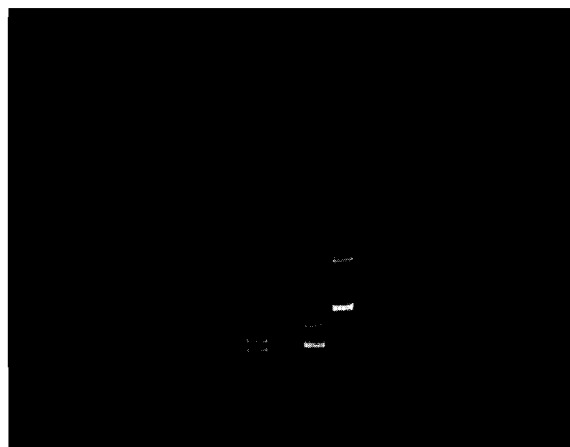
40W, 90分, 20℃

図-2 荷電条件の設定

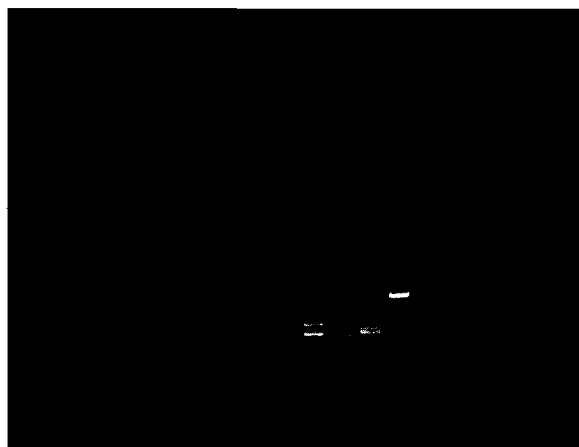
レーン1 : NV81/82 (G I) レーン3 : NV81/SM82 (G II)
 レーン2 : NV81/SM82 (G I) レーン4 : YURI22R/F (G II)



15℃



20℃



25℃

図-3 温度条件の設定

レーン1 : NV81/82 (G I) レーン3 : NV81/SM82 (G II)
 レーン2 : NV81/SM82 (G I) レーン4 : YURI22R/F (G II)

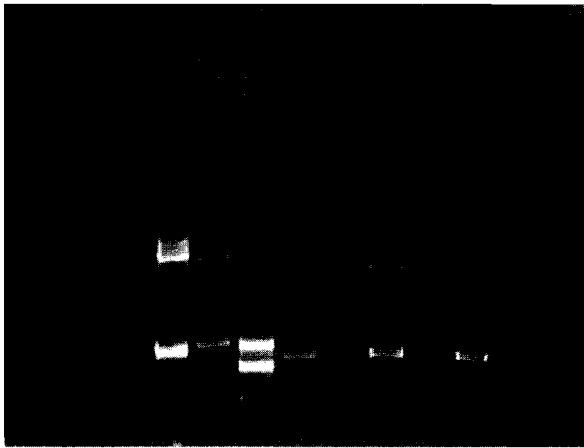


図-4 検体のSSCP像

レーン1：陽性コントロール
レーン2・3：対照
レーン4～8：検体

3 試料のSSCP像

本事例におけるSSCP像を図-4に示した。レーン1はYuri22R/Fで増幅させたGⅡ陽性コントロール、レーン2はプローブ型別P1Bの他事例DNA、レーン3はプローブ型別P2Bの他事例DNA、レーン4～8は本事例試料である。図からも明らかなように本事例試料は同じプローブ型であるレーン2とよく似たSSCP像であったが、試料の5検体は同じパターンを示し、その塩基配列が同一であることが強く示唆された。

V 考 察

本事例において、同じ棟で学習していた学年のうち6年生からの発生がみられなかった。このことは、6年生は修学旅行のため5月23日は給食を食べた後下校していたことと関連あると思われる。NLVの潜伏期間は通常24～48時間といわれている。5月23日午後から下校した6年生から患者発生がみられないこと、及び患者発生が5月24日夜から25日にかけて集中していることから、5月23日午後NLVの集中的な暴露があったと推測された。本事例において集団発生前の疫学的事項は不明であるが、1階トイレに隣接する1年生が全発症者の46%を占めていたことから1階トイレ・廊下等が糞便・吐瀉物によりNLVに汚染され、感染が広がったと推測された。

NLV検出に関してはRT-PCRとハイブリダイゼーションによる方法の他、ELISA(酵素抗体法)法キットを追求した。陽性検体数はRT-PCR法が5検体であるのに対しELISA法は6検体であった。RT-PCR法で検出されずELISA法が陽性の2検体は、ELISA法が擬陽性である場合と、ELISA法は陽性であるがRT-PCR法がインヒビター等の関係で検出されなかった両方の可能性が考えられる。これに対し、ELISA法が陰性でRT-PCR法で検出された1

検体は、検査法の感度の差と思われる。NLVは抗原性が多様なためELISA法などの免疫学的方法では検出が難しいといわれているが⁶⁾、従来のRT-PCR法に比べ迅速性、簡便性に優れていることから特異性がさらに良くなれば有益な検査法と思われる。

SSCP法は極めて簡便で高感度な塩基置換検出法といわれており、斉藤ら⁷⁾もNLVの検査に応用している。しかし、従来から塩基配列決定用のポリアクリルアミド電気泳動装置を使用するなど、核酸の検出方法も含め非常に手間と時間がかかる方法である。今回我々は管野の方法に準じ、ミニゲルを使用したSSCP法を実施した。ミニゲルを使用する場合、泳動距離が約8cmと短いため荷電条件や温度条件でその成績は大きく左右される。しかし、プレキャストゲルと高感度核酸検出試薬を用いることで、簡単・迅速に条件を設定することができた。SSCP法を日常業務にほとんど使用することができない我々にとって有用な方法であった。しかし、SSCP像が異なる場合の成績の解釈は簡単であるが、SSCP像が同じである場合は、塩基配列の決定が一般的となった現在、成績の解釈には注意を要する。

VI まとめ

- 1 平成13年5月、徳島県西部X小学校において発生したウイルス性胃腸炎の集団発生はノーウオーク様ウイルス(NLV)によるものであった。NLV遺伝子型別はPCR法及びELISA法ともgenotypeⅡであった。
- 2 プレキャストポリアクリルアミドゲル及び高感度核酸検出試薬を用いることで、簡単・迅速にPCR-SSCP法が行えた。
- 3 PCR-SSCP法により、本集団発生事例は単一暴露であることが示唆された。

稿を終えるにあたり、疫学調査結果を提供して下さった保健所関係職員の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) 嶋田啓司, 山本保男, 津島明: 徳島県保健環境センター年報, 17, 5-9 (1999)
- 2) T.ANDO,S.S.MONROE,J.R.G.ENTSCHE et al: J.Clin. Microbiol., 64-71 (1995)
- 3) ORITA M.,IWAHARA H.,KANA ZAWA H.,et al: Proc. Natl.Acad.Sci.USA, 86, 2766-8409 (1989a)
- 4) 管野康吉: 蛋白質・核酸・酵素, 41(5), 638-639(1996)
- 5) 関谷剛男: 蛋白質・核酸・酵素, 41(5), 539-545(1996)
- 6) 中田修二: ウイルス, 52(1), 7-13 (2002)
- 7) 斉藤博之, 原田誠三郎, 佐藤宏康他: 臨床とウイルス, 30(3), 163-171 (2002)