

神戸市で発生したサポウイルス食中毒(疑い)事例の詳細な遺伝子解析

花房剛志、有川健太郎、谷本佳彦、森愛、岩本朋忠

神戸市健康科学研究所 感染症部

1 はじめに

サポウイルスはノロウイルスと同様にカリシウイルス科に属し、全長約 7,500 塩基からなる RNA ウイルスである。そのカプシドの構造タンパク質である VP1 領域の塩基配列から Genogroup I (GI)~Genogroup V (GV) の 5 つの主要な遺伝子群に分類され、このうち GI、GII、GIV および GV はヒトに感染することが知られている。さらに、GI は 7 種類 (GI.1-7)、GII は 8 種類 (GII.1-8)、GV は 2 種類 (GV.1-2) の遺伝子型に分類される¹⁾。また、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼをコードする RdRp 領域が、サポウイルスの遺伝的多様性の評価に用いられている²⁾。

サポウイルスは、ヒトでは小腸粘膜で増殖し、嘔吐、下痢、発熱といった症状を呈する³⁾。従来は乳幼児の感染症と考えられていたが、近年は成人における大規模な食中毒事例も報告されている。2013 年度以降、神戸市ではサポウイルス食中毒(疑い)事例が 3 件発生し、うち 2 件は 2019 年度に同一施設から発生している(表 1)。

当所では、サポウイルス検査にリアルタイム PCR 法を用いている。この方法では、陽性または陰性を迅速に判定できるが、遺伝子型別判定やウイルスの相同性を解析することができない。遺伝子型別判定や相同性を解析することで、サポウイルス食中毒(疑い)事例について、より詳細な原因の解明や今後の再発防止につながる可能性がある。本研究では、サポウイルスの遺伝子型別判定法の導入を試み、公衆衛生の向上に寄与する知見が得られたので報告する。

2 方法

2.1 対象検体

表 1 に示した食中毒(疑い) 3 事例と他都市依頼 2 検体を含む 66 検体のうち、リアルタイム PCR で陽性であった 34 検体を対象とした。

表 1. 対象検体の内訳

検体内訳	発生年月	陽性検体数	利用者	従業員	備考
事例A	2014.2	19 (24)	14 (15)	5 (9)	飲食店での宴会
他都市依頼	2014.3	1 (2)	1 (2)	0 (0)	不明
事例B	2019.11	11 (25)	8 (11)	3 (14)	ホテルでの宴会
事例C	2020.2	3 (15)	3 (3)	0 (12)	事例Bと同一施設

()は陰性も含めた検体数

2.2 ウイルス RNA 抽出と cDNA 作製

便試料を PBS に懸濁させて 10% 乳剤を作製し、遠心後の上清から QIAamp Viral RNA Mini Kit(キアゲン)を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA を PrimeScript™ RT Reagent Kit (TaKaRa)を用いて逆転写し、cDNA を作製した。

2.3 VP1 領域を標的としたコンベンショナル PCR

作製した cDNA について、VP1 領域を標的としたコンベンショナル PCR を行った。プライマーには SV-F11 および SV-R1⁴⁾を用いた(表 2)。酵素は KOD FX(東洋紡)を用いた。反応条件は、94°C/2 分、(98°C/45 秒・58°C/45 秒・68°C/45 秒)×28 ~ 40 サイクル、68°C/2 分で行った。目的の PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で確認した。また、得られた PCR 産物について、VP1 領域のダイレクトシーケンスを行った。

2.4 RdRp 領域を標的としたコンベンショナル PCR

作製した cDNA について、RdRp 領域を標的としたコンベンショナル PCR を行った。1st PCR プライマーには Sapp36 および SaV1245R²⁾を用いた。また、2nd PCR プライマーには GV-GLPSGM および SaV1245R を用いた(表 2)。酵素は Ex Taq (TaKaRa)を用いた。反応条件は、94°C/3 分、(94°C/30 秒・55°C/30 秒・72°C/45 秒~1 分)×40 サイクル、72°C/7 分で行った。目的の PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で確認した。また、得られた PCR 産物について、RdRp 領域のダイレクトシーケンスを行った。

表 2. 使用したプライマー

Primer	Sequence (5' to 3')	Function	Location
SV-F11	GCT TGG TTY ATA GGT GGT AC	Forward	5098-5117
SV-R1	CWG GTG AMA CMC CAT TKT CCA T	Reverse	5857-5878
Sapp36	GTT GCT GTT GGC ATT AAC A	forward	4273-4291
SaV-1245R	CCC TCC ATY TCA AAC ACT A	Reverse	5159-5177
GV-GLPSGM	GGT CTC CCC TCG GGC ATG	forward	4560-4577
SaV-1245R	CCC TCC ATY TCA AAC ACT A	Reverse	5159-5177

2.5 遺伝子解析

ダイレクトシーケンスで得られたサポウイルスの塩基配列について、既知のウイルスの塩基配列と比較できる BLAST 検索を行い、遺伝子型を決定した。また、得られた

塩基配列情報をもとに、Molecular Evolutionary Genetics Analysis ver. 6.06 プログラムを用いて、近隣結合法による系統樹解析を行った⁵⁾。

3 結果

3.1 VP1 領域を標的としたコンベンショナル PCR

リアルタイム PCR で陽性となった 34 検体の cDNA について、VP1 領域を標的としたコンベンショナル PCR を行った。目的の PCR 産物(780 bp)の増幅をアガロースゲル電気泳動で確認した。サンプル①(Ct 値:20.1)、サンプル②(Ct 値:25.2)、サンプル③(Ct 値:30.4)および Negative Control (N.C.)の結果を図 1 に示す。

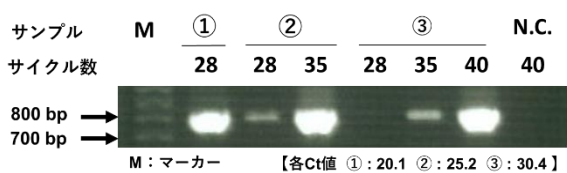


図 1. アガロースゲル電気泳動の結果

サンプル①は 28 サイクルの PCR で遺伝子解析を行うために十分な遺伝子増幅が確認された。一方で、サンプル②およびサンプル③では遺伝子解析を行うには不十分であったため、35 サイクルの PCR を行ったところ、サンプル②では十分な増幅が確認された。サンプル③では 40 サイクルの PCR を行ったところ、十分な増幅が確認された。N.C. では 40 サイクルの PCR を行っても増幅が確認されなかった。その他のサンプルについても検討したところ、リアルタイム PCR の Ct 値が 22 未満であれば 28 サイクルで、Ct 値が 22~29 未満であれば 35 サイクルで、Ct 値が 29~31.5 未満であれば 40 サイクルで目的遺伝子の十分な増幅が確認された。一方、Ct 値が 33 を超えた検体では十分な遺伝子増幅が確認されなかった(図 2)。

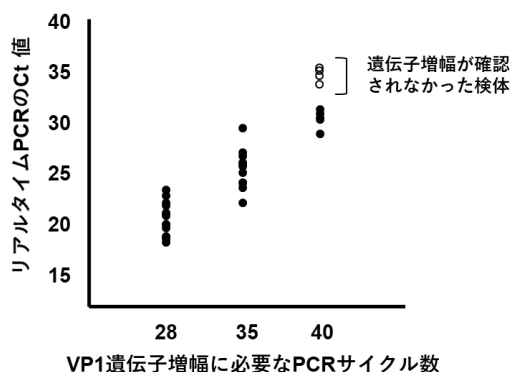


図 2. Ct 値と VP1 遺伝子増幅に必要な PCR サイクル数の関係

3.2 RdRp 領域を標的としたコンベンショナル PCR

リアルタイム PCR で陽性となった 34 検体の cDNA について、RdRp 領域を標的としたコンベンショナル PCR を行った。目的の 1st PCR 産物(904 bp)または 2nd PCR 産物(617 bp)の増幅をアガロースゲル電気泳動で確認した。

RdRp 領域を標的とした PCR は、VP1 領域を標的とした PCR と比較して検出感度が低く、リアルタイム PCR の Ct 値が 20 前後であれば、遺伝子解析を行うために十分な遺伝子増幅が確認された検体もあったが、Ct 値が 23.7 を超えた検体では遺伝子増幅が確認できなかった(図 3)。

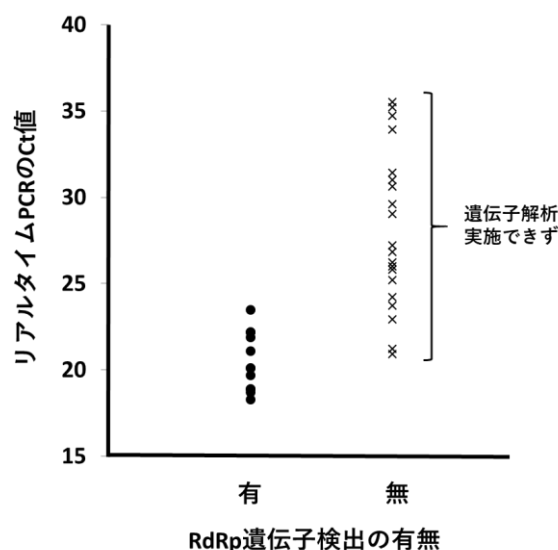


図 3. Ct 値と RdRp 遺伝子検出の関係

3.3 VP1 領域における遺伝子解析

VP1 領域を標的としたコンベンショナル PCR で十分な遺伝子増幅が確認された 30 検体について、ダイレクトシーケンスを行い、得られた塩基配列を解析した。

事例 A、事例 B、事例 C および他都市依頼検体から得られた塩基配列について、BLAST 検索を行ったところ、すべてサポウイルス GL2 と高い相同性が認められた。

また、事例 A では利用者 13 名と従業員 2 名について、共通して得られた 723 塩基の配列が一致した。事例 B では利用者 8 名と従業員 3 名について、共通して得られた 655 塩基の配列が一致した。事例 C では利用者 3 名について、共通して得られた 714 塩基の配列が一致した。

続いて、サポウイルス VP1 領域の部分配列(636 nt)に基づく系統樹解析を行った(図 4)。

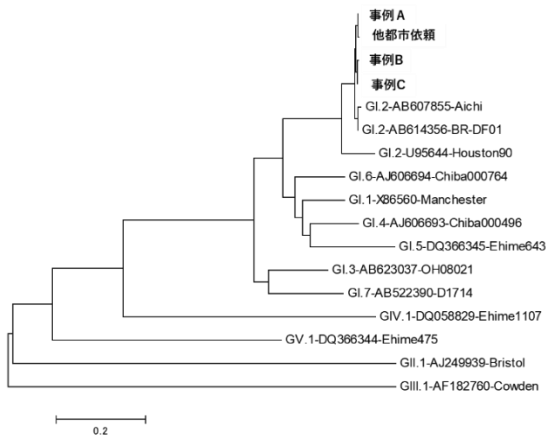


図 4. VP1 領域の部分配列(636 nt)に基づく系統樹解析

事例 A と他都市依頼検体を比較すると、VP1 領域の部分配列(636 nt)に 1 塩基の違いがみられた。同様に、事例 B と事例 C を比較すると、1 塩基の違いがみられた。また、最も古い事例 A と最も新しい事例 C を比較すると、4 塩基の違いがみられた。

3.4 RdRp 領域における遺伝子解析

RdRp 領域を標的としたコンベンショナル PCR で十分な遺伝子増幅が確認された 12 検体について、ダイレクトシーケンスを行い、得られた塩基配列を解析した。

事例 A、事例 B、事例 C から得られた塩基配列について、BLAST 検索を行ったところ、すべてサポウイルス GI.2 と高い相同性が認められた。

また、事例 A では利用者 4 名と従業員 1 名について、共通して得られた 544 塩基の配列が一致した。事例 B では利用者 4 名と従業員 2 名から 731 塩基の配列が得られ、そのうち利用者 2 名と従業員 2 名については配列が一致した。事例 C では利用者 1 名から 540 塩基の配列が得られた。

続いて、サポウイルス RdRp 領域の部分配列(494 nt)に基づく系統樹解析を行った(図 5)。

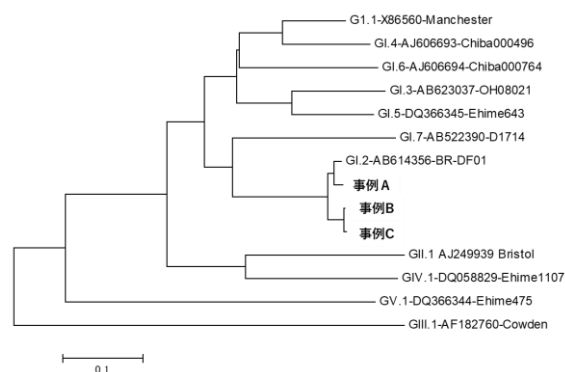


図 5. RdRp 領域の部分配列(494 nt)に基づく系統樹解析

事例 A と事例 B を比較すると、RdRp 領域の部分配列(494 nt)に 19 塩基の違いがみられた。同様に、事例 B と事例 C を比較すると、2 塩基の違いがみられた。

4 考察

過去に神戸市で発生したサポウイルス食中毒(疑い)事例について、コンベンショナル PCR 法により、遺伝子型別判定や相同性を解析することができた。また、リアルタイム PCR で得た Ct 値から VP1 領域における遺伝子解析に必要な PCR サイクル数を予測することで、迅速な遺伝子型別検査を行うことが可能となった。RdRp 領域を標的とした PCR では、VP1 領域を標的とした PCR と比較して検出感度が低く、リアルタイム PCR の Ct 値が 23.5 を超える検体からは遺伝子解析を行うために十分な増幅が確認されなかったため、今後は PCR 条件の見直しや使用するプライマーの改良を行う必要があると思われる。

各事例の検体から得られた VP1 領域および RdRp 領域の部分配列はすべて、サポウイルス GI.2 と高い相同性が認められた。サポウイルスについての全国的な疫学データは少ないが、サポウイルス GI.2 による食中毒事例は複数報告されている。

各事例について、保健所が行った聞き取り調査情報と本結果を併せて考察する。

事例 A では 17 名が宴会に参加し、連絡の取れた 15 名のうち 12 名が翌日以降に嘔吐や下痢を呈した。VP1 領域における遺伝子解析の結果、利用者 13 名と従業員 2 名から検出された塩基配列が一致した。また、RdRp 領域における遺伝子解析の結果、利用者 4 名と従業員 1 名から検出された塩基配列が一致した。よって、施設内で集団感染が発生した可能性が高い。聞き取り調査情報では、利用者と従業員の接触やトイレ等共有場所の有無といった詳細な情報はなかったが、食中毒事件もしくは両者の接触時やトイレ等共有場所で感染した可能性が示唆された。

事例 B では 45 名が宴会に参加し、2 日後以降に 40 名が下痢等の身体異常を呈した。VP1 領域における遺伝子解析の結果、利用者 8 名と従業員 3 名から検出された塩基配列が一致した。また、RdRp 領域における遺伝子解析の結果、利用者 4 名と従業員 2 名から検出された塩基配列が一致した。よって、施設内で集団感染が発生した可能性が高い。聞き取り調査情報では、会場内でのオムツ交換や嘔吐等はないとあったが、両者の接触やトイレ等共有場所に関する記載はなかった。したがって、食中毒事件もし

くは両者の接触時やトイレ等共有場所で感染した可能性が示唆された。

事例 C は、事例 B の 3 か月後に発生した。宴会後、36 名のうち 18 名が翌日以降に嘔吐や下痢を呈した。リアルタイム PCR の結果、利用者 3 名からサポウイルスが検出されたが、従業員からは検出されなかった。よって、食中毒事件とは断定できない。また、VP1 領域における遺伝子解析の結果、利用者 3 名から検出された塩基配列が一致した。聞き取り調査によって、会場出入口周辺でオムツ交換が行われたことが分かっており、それが感染源となった可能性がある。

事例 B と事例 C について、同一施設で 3 カ月後に発生したため、事例 C は事例 B で検出されたサポウイルスが残存して発生した可能性が考えられた。今回の研究で、両者のサポウイルスの VP1 領域の部分配列に 1 塩基の違いが認められ、RdRp 領域の部分配列に 2 塩基の違いが認められた。両者を比較するためにはより詳細な遺伝子解析が必要である。そこで、今後は次世代シーケンサーを活用したサポウイルスゲノムの全長解析を検討し、複数の領域で遺伝子型別判定や相同性を解析することで、検査結果の信頼性を高めていきたい。

5 まとめ

本研究では、サポウイルスの VP1 領域および RdRp 領域を標的としたコンベンショナル PCR 法を検討し、過去に神戸市で発生したサポウイルス食中毒(疑い)事例について遺伝子解析を行った。リアルタイム PCR で Ct 値が 31.5 未満の検体から、VP1 領域の部分配列が得られた。また、Ct 値が 20 前後の検体では RdRp 領域の部分配列も得られた。遺伝子解析の結果、すべての事例で遺伝子型は GI.2 であったが、塩基配列には各事例でそれぞれ違いがみられた。

食中毒(疑い)事例について、遺伝子型の判別や相同性を解析することで、聞き取り調査情報と併せて様々な考察を行うことができ、より詳細な原因の解明や今後の再発防止につながる可能性が示唆された。

6 参考文献

- 1) Oka T, et al. 2020. Polymerase chain reaction primer sets for the detection of genetically diverse human sapoviruses. *Archives of Virology* 165:2335-2340.
- 2) Harada S, et al. 2013. Phylogenetic Analysis of the Nonstructural and Structural Protein Encoding Region Sequences, Indicating Successive Appearance of Genomically Diverse Sapovirus Strains from Gastroenteritis Patients. *Jpn. J. Infect. Dis* 66, 454-457, 2013.
- 3) サポウイルス「食品衛生の窓」東京都福祉保健局 <https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/shokuhin/micro/sapo.html>.
- 4) Okada M, et al. 2002. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. *Archives of Virology* 147:1445-1451.
- 5) Oka T, et al. Comprehensive Review of Human Sapoviruses. *Clin Microbiol Rev* 28:32-53, 2015.