



Title	Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real Time Quantitative Reverse Transcription-PCR
Author(s)	影山, 努
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44653
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	かげ 影 山 努
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 18863 号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real Time Quantitative Reverse Transcription-PCR (リアルタイム RT-PCR を用いたノロウイルスの高感度検出系の開発)
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 雅人 (副査) 教授 松浦 善治 教授 塩田 達雄

論文内容の要旨

〔目的〕

ノロウイルス (Norovirus : NV) (以前は Norwalk-like virus あるいは小型球形ウイルスと呼ばれていた) は、非細菌性嘔吐下痢症の主要な原因因子として知られている。特に冬季に頻発するウイルス性食中毒の大多数は NV によるものと考えられている。従来の NV 検出法は、電子顕微鏡 (EM) にてウイルス粒子を直接確認する EM 法が主流であった。しかし、EM 法は操作が煩雑で大量の検体を迅速に処理するには向きであった。一方、RT-PCR による NV 核酸検出法はいくつか報告されているが、用いるプライマーによって特異性や検出感度が異なり、検出精度や信頼性に問題があった。そこで本研究では、迅速、簡便かつ高感度な NV 検出系の開発を目的として、まず、NV ゲノム全長にわたる核酸の多様性について解析し、高度に核酸配列が保存されている領域の探索を行った。次に、その領域をターゲットとしたリアルタイム RT-PCR 法による NV 検出系を構築し、検出精度や信頼性について従来法と比較検討した。

〔方法ならびに成績〕

EM 法にて NV 粒子の確認された糞便検体から、新たに Genogroup I (G I) 1 株、Genogroup II (G II) 、8 株の合計 9 株の NV ゲノム全長配列を決定し、Genbank に登録されている NV 全長塩基配列と NV ゲノム核酸配列の多様性について解析した。その結果、塩基配列が高度に保存されている領域は翻訳領域 1/2 のジャンクション領域付近 (翻訳領域 1 の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) コーディング領域の 3' 末端側から翻訳領域 2 のキャップシド N-terminal/shell(N/S) ドメインまで) に存在する事が明らかとなった。この領域内に G I および G II 毎に特異的なプライマーおよび蛍光プローブ (TaqMan プローブ) を設計し、10⁷-10¹ コピー/反応チューブ (10 倍希釈系列) のコントロール (標的領域をクローニングしたプラスミドおよび合成全長 RNA) を用いてリアルタイム RT-PCR 法にて検討を行った結果、10 コピー/反応チューブまで NV を検出可能であり、なおかつ定量性も有していた。次に、1997 年 1 月から 2000 年 12 月に埼玉県内で発生した非細菌性嘔吐下痢症集団発生 37 事例より得られた糞便検体を試料に用い、本法にて検討を行った。まず、EM 法で NV 陽性となった 81 検体に対し従来法と本法の検出率の比較を行った。その結果、RdRp を標的にした従来の RT-PCR 法で 77% (62/81) 、キャップシド領域を標的にした RT-PCR 法で 83% (67/81) の検出率であったのに対し、本法は 99% (80/81) の検出率であった。次に、EM 法で NV 陰性

だった 28 検体に対して本法を試みたところ、20 検体が NV 陽性となった。また、本法の NV に対する特異性を調べるために、他の腸炎感染症（ロタウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス、ポリオウイルス、腸炎ビブリオ、腸炎ビブリオ感染、キャンピロバクター、黄色ブドウ球菌）および健常者の糞便について本法を施行したが、全て陰性であった。さらに、本法で陽性となった糞便検体を用いて、標的領域近傍の NV ゲノム核酸のシークエンスを行ったところ、プライマーおよび蛍光プローブ領域の核酸配列は非常に良く保存されていた。

〔総括〕

NV ゲノム全長にわたる遺伝子解析の結果、NV の保存性の高い領域は翻訳領域 1 と翻訳領域 2 のジャンクションにあり、この領域をターゲットにした本法は、従来の方法（EM 法および RT-PCR 法）にくらべ、高感度で検出精度が高く、非特異反応の無い NV 検出法であった。また、NV のゲノム塩基配列は不均一性が強い事が知られているが、本法で用いたプライマーおよびプローブ領域の核酸配列は保存性が高く、様々な株を検出できる信頼性の高い検出法であると考えられた。さらに、本法はコンタミネーションによる擬陽性を減らすため、DNase I やウラシル N-グリコシラーゼによるキャリーオーバーDNA の分解処理を反応工程に入れているため、NV 感染の原因食材と考えられているカキなどの食品検査、河川水や海水などの環境水検査などへの応用にも役立つ、簡便、高感度かつ特異的な NV 検出系であると考えられた。NV を迅速に検出することが可能になることで、今後、ウイルス性食中毒の疫学調査や予防衛生に本法が貢献できるものと思われた。

論文審査の結果の要旨

ノロウイルス (Norovirus : NV と略、以前は小型球形ウイルスあるいは Norwalk-like virus と呼んでいた) は、冬季に頻発する非細菌性胃腸炎の主要な原因因子である。従来、その同定は電子顕微鏡観察により行われてきた。しかし、操作が煩雑で大量の検体を迅速に処理するには向きであった。また、RT-PCR による NV 核酸検出法は、用いるプライマーによって特異性や検出感度が異なり、検出精度や信頼性に問題があった。本研究では、従来法よりも迅速、簡便かつ高感度な NV 検出法を開発する事を目的とした。

NV ゲノム全長にわたる核酸の多様性について、様々な NV 陽性検体を用いて解析した結果、NV の高度核酸配列保存領域が翻訳領域 1 と翻訳領域 2 のジャンクション近傍に存在する事を見いだした。その領域をターゲットとした、リアルタイム RT-PCR 法は、10 コピーより検出可能であり、核酸配列の多様性に対しても高い検出精度を有していた。本研究により大量の検体を迅速に処理して、高感度かつ簡便に NV を同定する事が可能になった。

本研究は、非細菌性胃腸炎の原因調査や食中毒の疫学調査あるいは食中毒予防衛生に重要な貢献をするものとして高く評価でき、学位の授与に値すると考える。