

感染性胃腸炎ウイルスの同時複数検出系について

稲崎 倫子 畠田 嵩久 山崎 笑子 矢澤 俊輔
佐賀由美子 板持 雅恵 谷 英樹

Simultaneous Multiple Detection Systems for Infectious Gastroenteritis Viruses.

Noriko INASAKI, Takahisa SHIMADA, Emiko YAMAZAKI, Shunsuke YAZAWA,
Yumiko SAGA, Masae ITAMOCHI, and Hideki TANI

感染性胃腸炎は細菌やウイルスなどの感染性病原体による嘔吐、下痢を主症状とする感染症であり、中でもウイルスが主な病原体である。主な原因ウイルスとしては、ノロウイルス、ロタウイルス、サポウイルス、アデノウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルス、パレコウイルス、アイチウイルス等が知られている。これまで当衛生研究所では感染症発生动向調査、集団事例の行政検査および調査研究において、感染性胃腸炎の患者検体からの原因ウイルスの検査を行ってきた。しかし、従来のPCR法またはリアルタイムPCR法では、ウイルス種ごとに試薬および反応条件が異なるため、手技が煩雑で時間を要していた。食中毒の原因究明のための検査など、迅速に結果を出すことが求められることがあるため、複数のウイルスを同時検出する検査手法が必要であると考えられる。

先行研究において、サポウイルス、アストロウイルス、A群ロタウイルス、C群ロタウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルスを同時に検出可能なマルチプレックスリアルタイムPCR法が報告されている[1]。しかし、この検査法で使用しているサポウイルスおよびA群ロタウイルスのプライマー・プローブでは、一部の型のウイルスが検出不可能であることが報告されている[2, 3]。また、ノロウイルスについては別に検査を行う必要があり、小児感染性胃腸炎患者からしばしば検出されるパレコウイルスや、集団胃腸炎事例から検出報告のあるアイチウイルスについては検出対象外となっている。そこで本研究では、先行研究における検査法を改良し、より多くの種類のウイルスを同時に検出可能なマルチプレックスリアルタイムPCR法の反応条件を検討した。また、設計した検査法を用いて小児胃腸炎患者検体から感染性胃腸炎ウイルスの検出を試みたので、その概要

を報告する。

材料と方法：

1. 材料

サポウイルス、A群ロタウイルス及びノロウイルスの陽性対照検体は、国立感染症研究所から分与された既知の濃度のプラスミドを用いた。C群ロタウイルス、アデノウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルス、パレコウイルス、アイチウイルスについては、過去に当所で陽性と判定された臨床検体を用いた。

ウイルス検出用胃腸炎検体として、2016年8月から2022年8月までに当所で受け付けた集団胃腸炎事例検体のうち、行政検査でノロウイルス陰性であった17事例27名の便検体より合成したcDNAを用いた。

2. 方法

臨床検体は滅菌PBS(-)にて乳剤を作成し、14,000 rpmで10分間冷却遠心後に上清を回収し、うち140 µLからQIAamp Viral RNA mini kit(QIAGEN)を用いて核酸60 µLを抽出した。抽出した核酸はノロウイルスの病原体検出マニュアル[4]に基づき逆転写反応を行い、RNAからcDNAを合成した。

リアルタイムPCRのプライマー及びプローブは、サポウイルスとA群ロタウイルスはそれぞれの病原体検出マニュアルのもの[5, 6]を、C群ロタウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルスは先行研究のもの[1]を、アストロウイルスはMoriら[7]の、パレコウイルスはNixら[8]の、アイチウイルスはKitajimaら[9]の報告によるものを使用した(表1)。これらのプライマー・プローブを、Aセット(サポウイルス、C群ロタウイルス、アストロウイルス、パレコウイルス)、Bセット(A群ロタウイルス、エンテロウイルス、

アイチウイルス、アデノウイルス)の組み合わせで使用した。プライマー・プローブの濃度は、HuSaV-F1, HuSaV-F2, HuSaV-F3は1.2 μ M, NSP3-FDegは0.4 μ M, その他のプライマー・プローブは0.2 μ Mとなるよう調製した。試薬はQuantiTect ProbePCR Kit (QIAGEN)を使用し、cDNAのテンプレートは1反応当たり2 μ Lとして、合計20 μ Lとなるよう反応液を調製した。

リアルタイムPCRの測定機器はQuantStudio5 (ThermoFisher)を用いた。反応時間は、95℃15分で処理後、熱変性95℃15秒、アニーリングと伸長反応1分を45サイクル行った。アニーリング温度は56℃と60℃の2種類の条件でリアルタイムPCRを実施した。反応終了後、Threshold lineをマニュアルで0.01に設定し、各温度条件におけるCt値を比較した。

ノロウイルスについては、病原体検査マニュアルに記載されたプライマー・プローブ[4]を用いて、試薬をQuantiTect ProbePCR Kitに変更し、設計したマルチプレックスリアルタイムPCR法の反応条件でリアルタイムPCRを行った。

結果および考察：

1. リアルタイムPCR条件の検討

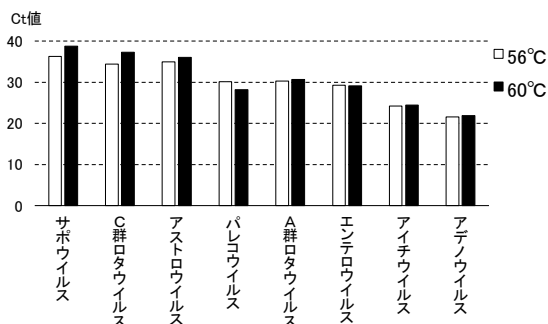


図1. アニーリング温度ごとのCt値比較サポウイルス、A群ロタウイルスはプラスミド103コピー/ウェル、その他のウイルスは陽性検体を使用した。

アニーリング温度を56℃と60℃の2種類の条件においてマルチプレックスリアルタイムPCRを行ったところ、いずれの条件においても標的ウイルスを対象とした蛍光色素において増殖曲線が確認された(図1)。同一セット内で標的とするウイルス種以外を対象とする増殖曲線がみられた検体は確認されなかった。

サポウイルスにおいては25, 102～104コピー/ウェルまで、A群ロタウイルスは102～105コ

ピー/ウェルまでの希釈系列を作製してCt値を比較した(図2)。その結果、A群ロタウイルスではアニーリング温度の違いによるCt値の差は小さく、いずれの温度でもマニュアルに記載された100コピーまで検出された。これに対してサポウイルスでは、56℃では単独検出法の検出限界[2]である25コピー/ウェルまで検出されたものの、60℃では検出されなかった。また、102～104コピー/ウェルにおいては、いずれも56℃より60℃の方がCt値が高かった。このことから、アニーリング温度条件を56℃に設定して以降の実験を行った。

マルチプレックスリアルタイムPCR法とノロウイルスリアルタイムPCR法の同時検出について検討するため、ノロウイルス検出マニュアルに記載のリアルタイムPCR法の温度条件と試薬の種類をマルチプレックスリアルタイムPCR法のものに変更し、ノロウイルスGI, GIIの陽性コントロールプラスミドを対象としたリアルタイムPCRを行った。その結果、GI, GIIともに10コピー/ウェルまで検出が確認された。これより、マルチプレックスリアルタイムPCRと同時にノロウイルスGI, GIIの検出が可能であることが確認された。

陽性検体のリアルタイムPCR結果をもとに、マルチプレックスリアルタイムPCR法の判定方法を以下の通り設定した。

パレコウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルスにおいては陽性コントロールにおける蛍光強度が低いためThreshold lineを0.005に、その他の検査項目においては0.01に設定する。また、baselineが正しく設定されないことがあるため、その場合は手動でbaselineを設定する。

ノロウイルスは10コピー/ウェル、サポウイルスとA群ロタウイルスは病原体検出マニュアル[5, 6]の記述に準じて100コピー/ウェル以上の検体を陽性と判定した。その他のウイルスについては、増殖曲線の立ち上がりが見られた検体を陽性と判定した。

2. 集団事例からのウイルス検出

2016年8月から2022年8月までに当所で受け付け、行政検査でノロウイルス陰性であった17事例27名の検体について、ノロウイルス以外の胃腸炎ウイルスのマルチプレックスリアルタイムPCRを行った。その結果、2事例4検体においてサポウイルスが陽性となった。この2事例の検体

についてPCR法[5]によるサポウイルスの検出を行ったところ、患者全員からサポウイルスの遺伝子が検出され、同一事例内の患者で遺伝子配列が一致していたことから、この2事例はサポウイルスが原因の集団胃腸炎であったと考えられた。

本研究では、多様なウイルスが原因となる感染性胃腸炎の原因ウイルス検出を迅速に行うため、マルチプレックスリアルタイムPCR法による胃腸炎ウイルスの同時検出法を検討した。その結果、10種類のウイルスを同時に検出することが可能な検出系を設計した。ただし、今回の検討では一部のウイルスについて既知の濃度のプラスミドを用いた検出下限値の確認を行えておらず、既存の検出法との検出感度の比較を行えていない。また、近年胃腸炎患者から確認され、胃腸炎を引き起こすとされるアストロウイルスMLB株やVA株については検出不可能である。そのため、従来の検出法との比較検討や、新たな胃腸炎ウイルスへの対応を行う必要があると考えられた。

謝 辞

本調査の実施にあたり、検体採取等にご協力いただきました厚生センター、富山市保健所、感染症対策課、生活衛生課、感染症発生動向調査定点医療機関の関係各位に深謝いたします。

文 献

1. 小和田和誠, 東方美保, 平野映子, 他. (2011). 福井県衛生環境研究センター年報, 10, 40-44
2. Oka T, Iritani N, Yamamoto S, et al. (2019). J Med Virol., 91, 370-377
3. ノロウイルス（下痢症ウイルス）レファレンスセンター会議報告. 2022. https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/R4_Norovirus.pdf (2023年3月26日アクセス可能)
4. 木村博一, 片山和彦, 大森亮介, 他. 病原体検出マニュアル ノロウイルス（第1版）. <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Norovirus20190611.pdf> (2022年5月18日アクセス可能)
5. 斎藤 博之, 高橋 知子, 坂上 亜希恵, 他. 病原体検出マニュアル サポウイルス（第1版）. <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Sapovirus20210716.pdf> (2023年3月26日アクセス可能)
6. 藤井克樹, 染谷雄一. 病原体検出マニュアル ロタウイルス（第2版）. <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Rotavirus20190619.pdf> (2023年3月26日アクセス可能)
7. Mori K, Hayashi Y, Akiba T, et al. (2013). J. Virol. Methods., 191, 141-147
8. Nix WA, Maher K, Johansson ES, et al. (2008). J. Clin. Microbiol., 46(8), 2519-2524
9. Kitajima M, Hata A, Yamashita T, et al. (2013). Appl Environ Microbiol., 79(13), 3952-3958

表 1. マルチプレックスリアルタイム PCR 法に用いたプライマー・プローブ

セット	検索ウイルス	名称	Sequencea (5'-3')	Reporter - Quencher	終濃度 (μM)	出典
A	サポウイルス	HuSaV-F1	GGCHCTYGCCACCTAYAAAYG		1.2	[5]
		HuSaV-F2	GACCARGCHCTCGCYACCTAYGA		1.2	
		HuSaV-F3	GCWRYKGCWTGYTAYAACAGC		1.2	
		HuSaV-R	CCYTCCATYTCAAACACTA		1.2	
		HuSaV-TP-a	CCNCCWATRWACCA	FAM-MGB	0.2	
		HuSaV-TP-b	CCNCCWACRWACCA	FAM-MGB	0.2	
	C 群ロタウイルス	CRV7F	GCTGCATTTGGTAGTGACTGYGA		0.2	[1]
		CRV7R	AGTTTCTGTACTAGCCGGTGAACA		0.2	
		CRV7	TCTGTCTGTCCATTAGATACTACAAGTAATGGAATYGG	Cy5-TAO-IBFQ	0.2	
	アストロウイルス	AstF	CATGGGAAGCTCCTRTGCTAYCA		0.2	[7]
		AstR	GABAGGCAGTGYTCYACA		0.2	
		Ast	TGCTYGCTGCRTTYATGGCAGARG	SUN-ZEN-IBFQ	0.2	
	パレコウイルス	AN345	GTAACASWWGCCTCTGGGSCCAAAAG		0.2	[8]
		AN344	GGCCCCWGRTCAGATCCAYAGT		0.2	
		AN257	CCTRYGGGTACCTYCWGGGCATCCTTC	TAMRA-BHQ2	0.2	
B	A 群ロタウイルス	NSP3-FDeg	ACCATCTWCACRTRACCCTC		0.4	[6]
		NSP3-R1	GGTCACATAACGCCCTATA		0.2	
		NSP3-Probe	ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA	FAM-ZEN-IBFQ	0.2	
	エンテロウイルス	EnteroPrimer1F	TCCTCCGGCCCCTGA		0.2	[1]
		EnteroPrimer1R	RATTGTACACATAAGCAGCCA		0.2	
		EnteroTaqman1	CGGAACCGACTACTTTGGGTGWCCGT	Cy5-TAO-IBFQ	0.2	
	アイチウイルス	AiV-AB-F	GTCTCCACHGACACYAAYTGGAC		0.2	[9]
		AiV-AB-R	GTTGTACATRGACGCCAGG		0.2	
		AiV-AB-TP	TTYTCCTTYGTGCGTGCG	VIC-MGB	0.2	
	アデノウイルス	JTVXF	GGACGCCTCGGAGTACCTGAG		0.2	[1]
		JTVXR	ACIGTGGGGTTTCTGAACCTGTT		0.2	
		JTVXP	CTGGTGCGAGTTCGCCCGTGCCA	TAMRA-BHQ2	0.2	

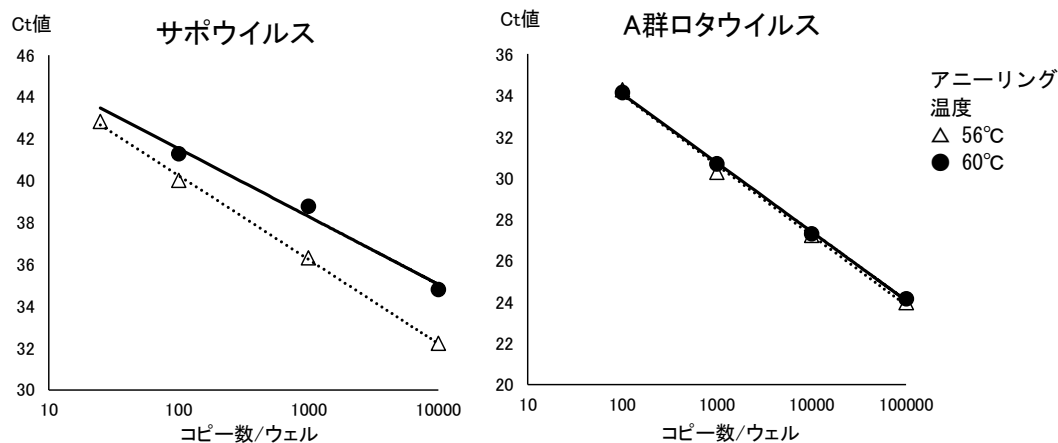


図 2. サポウイルス・A 群ロタウイルスのアニーリング温度別・コピー数別 Ct 値の比較