

【調査研究】

逆転写リアルタイムPCR法によるノロウイルス、サポウイルス及びアストロウイルスの同時検出法の検討

Examination of the conditions on Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Method for the Simultaneous Detection of Norovirus, Sapovirus and Astrovirus

梶原香代子, 木田浩司, 谷川徳行, 野宮加代子, 松岡保博, 濱野雅子

Kayoko Kajihara, Kouji Kida, Noriyuki Tanikawa, Kayoko Nomiya, Yasuhiro Matsuoka
and Masako Hamano (Virology Section)

要 旨

逆転写リアルタイムPCR法によりノロウイルス、サポウイルス及びアストロウイルスを同時に効率よく検出するために、各ウイルスのコントロールプラスミドを用いて使用試薬キットとアニール/伸長反応温度を比較検討した。その結果、試薬キットをQuantiTect Probe PCR Master Mix (QIAGEN)、アニール/伸長反応時の温度を58℃とした場合にノロウイルス、サポウイルス及びアストロウイルスを最も効率よく同時検出できた。患者検体を用いて、この条件下での偽陰性、偽陽性及び非特異反応の有無を検証したところ、それらの反応は認められず、各ウイルスを個別に検出する条件下でのPCR結果と完全に一致した。今回検討した方法は、検査時間の短縮による迅速な結果判明により、食中毒及び感染症の原因究明と感染拡大防止に資するものと考えられた。

[キーワード：ノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、逆転写リアルタイムPCR、同時検出]

[key word : Norovirus, Sapovirus, Astrovirus, Real-time RT-PCR, Simultaneous detection]

1 はじめに

感染性胃腸炎は毎年多くの患者が報告されているが、その原因の大半はウイルスによるものである。ウイルス性胃腸炎は食中毒等の集団発生の形態をとることも多く、原因究明と感染拡大防止の観点から迅速な検査結果の還元が求められる公衆衛生上重要な感染症である。ウイルス性胃腸炎の原因となる主要なウイルスとして、カリシウイルス科に属するノロウイルス（以下「NoV」という。）及びサポウイルス（以下「SaV」という。）並びにアストロウイルス科に属するアストロウイルス（以下「AstV」という。）があげられるが、症状の程度、り患年齢、流行時期等に若干の違いはあるものの、臨床症状による鑑別は難しく、またウイルス粒子の形態も似ていることから電子顕微鏡による同定も困難である。そのため、これらのウイルスの検出と同定は、遺伝子情報に基づいた2ステップ逆転写リアルタイムPCR法による遺伝子検索によって行われているが、リアルタイムPCRの試薬キット及び反応条件が各ウイルスで異なっており、個別に検査する必要があった（以下「個別法」という。）。そこで、検査時間の短縮を目的として、これらの検査法を基に各ウイルスを同時に検出可能な試薬キット及び反応条件（以

下「同時検出法」という。）を検討したので報告する。

2 対象と方法

2.1 NoV, SaV及びAstVの個別法

個別法は、NoVは厚生労働省通知¹⁾に示された影山らの方法²⁾、SaVは岡らの方法³⁾、AstVは横井らの方法⁴⁾を用いた（表1）。なお、NoVについては、NoV Genogroup I (G I) 及びGenogroup II (G II) の2系列に分けて実施するため、SaV、AstVとあわせて4系列のリアルタイムPCRを実施した。なお、リアルタイムPCR装置は、StepOnePlus (ThermoFisher Scientific) を使用した。

2.2 NoV, SaV及びAstVの同時検出法

同時検出法は、各ウイルスの個別法で示されたプライマー及びプローブをそれぞれ使用し、4系列のリアルタイムPCRをそれぞれ同一プレート内で実施した。試薬は、QuantiTect Probe PCR Master Mix (QIAGEN)（以下「Q試薬」という。）を用い、反応条件は、ポリメラーゼ活性化反応を95℃ 15分、熱変性反応を94℃ 15秒、アニール/伸長反応を58℃ 1分、PCRサイクル数を55サイクルとした。

表 1 ノロウイルス、サボウイルス、アストロウイルスの個別法

ウイルス	PCR 産物長	試薬キット	PCR 反応条件					PCR サイクル数	参考文献
			ポリメラーゼ 活性化	変性	アニーリング/ 伸長反応				
NoV G I	85 bp	Universal Master Mix (ThermoFisher Scientific)	95°C 10分	95°C 15秒	56°C 1分		45	2)	
NoV G II	98 bp	Universal Master Mix (ThermoFisher Scientific)	95°C 10分	95°C 15秒	56°C 1分		45	2)	
SaV	104 bp	QuantiTect Probe PCR Master Mix (QIAGEN)	95°C 15分	94°C 15秒	62°C 1分		40	3)	
AstV	214 bp	QuantiTect Probe PCR Master Mix (QIAGEN)	95°C 15分	94°C 15秒	62°C 1分		45	4)	

NoV G I : NoV Genogroup I
NoV G II : NoV Genogroup II

2.3 コントロールプラスミドを用いた試薬キットの検討

各ウイルスのPCR標的領域を人工的に組み込んだプラスミドDNA（以下「コントロールプラスミド」という。）をそれぞれ 10^4 copies/tubeに調製し、Universal Master Mix (ThermoFisher Scientific)（以下「A試薬」という。）とQ試薬の2種類の試薬キット、56°C、58°C、60°C及び62°Cのアニール/伸長温度条件下で各ウイルスのリアルタイムPCRをそれぞれ実施し、得られたThreshold cycle値（以下「Ct値」という。）を比較検討した。その他のPCR条件は、個別法の反応温度及び時間で実施した。

2.4 コントロールプラスミドを用いたアニーリング/伸長温度の検討

各ウイルスのコントロールプラスミドを $10^1 \sim 10^5$ copies/tubeに調製し、試験に供した。Q試薬を用いて、アニーリング/伸長温度56°C、58°C及び60°Cの条件下で各ウイルスのリアルタイムPCRをそれぞれ実施し、検量線を作成後、その傾きの値（以下「slope値」という。）を比較検討した。その他のPCR条件は、Q試薬のメーカー推奨の反応温度及び時間で実施した。

2.5 コントロールプラスミドを用いた同時検出法と個別法の比較

$10^1 \sim 10^5$ copies/tubeに調製した各ウイルスのコントロールプラスミドを用いて同時検出法及び個別法を実施し、それぞれの検量線を作成後、そのslope値とCt値を比較検討した。

2.6 患者検体を用いた同時検出法の検証

個別法で検出結果が判明している患者検体を用いて、同時検出法における偽陰性、偽陽性及び非特異反応の有

無を確認した。患者検体は、2005年以降の感染症発生动向調査で採取されたふん便検体、または県内の医療機関の感染性胃腸炎患者から採取されたふん便検体のうち、各ウイルスの陽性検体36件（NoV GI : 6件、NoV GII, SaV及びAstV : 各10件）及び陰性検体46件を用いた。また、ウイルス陽性検体のうち各5件（NoV G I : 380487, AE122, AE124, AE125, OH5095, NoV G II : 22395, 382572, 382742, 382761, 382765, SaV : OH2226, 380574, 380615, OH3210, OH4845, AstV : OH2321, OH2894, OH2909, OH4857, OH2338）について、個別法と同時検出法で得られたCt値を比較した。

3 結果

3.1 コントロールプラスミドを用いた試薬キットの検討

各ウイルスのコントロールプラスミドでの検出状況についてA試薬とQ試薬を比較した結果、Q試薬では4段階のアニーリング温度（56°C、58°C、60°C、62°C）のいずれの温度でも全てのウイルスが検出されたのに対し、A試薬では60°C及び62°CでSaVが検出されなかった（図1）。また、個別法でA試薬を使用するNoVを含め、いずれのウイルスもQ試薬の方がCt値が小さく、A試薬よりも早期に検出された。これらのことから、同時検出法に使用する試薬キットはQ試薬が適切であると判断し、以後の検討にはQ試薬を用いた。

3.2 コントロールプラスミドを用いたアニーリング/伸長温度の検討

各ウイルスの56°C、58°C、60°Cのアニーリング/伸長温度での検量線のslope値を比較した結果、NoV G IIは58°C (-3.32)と60°C (-3.31)、NoV G Iは58°C (-3.43)、SaVは60°C (-3.36)、AstVは58°C (-3.97)で最も増幅効率が高かった（図2）。NoV G I、NoV G II及びSaVについては58°Cと60°Cの

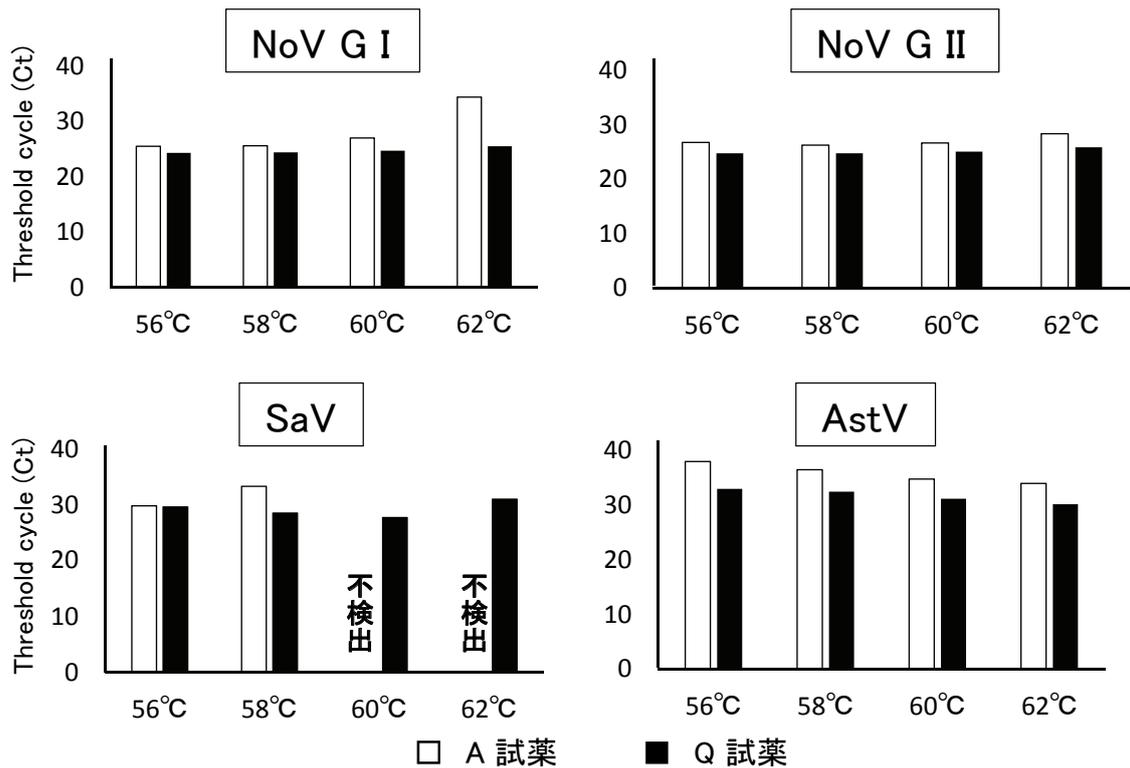


図1 コントロールプラスミドによるA試薬とQ試薬のCt値の比較

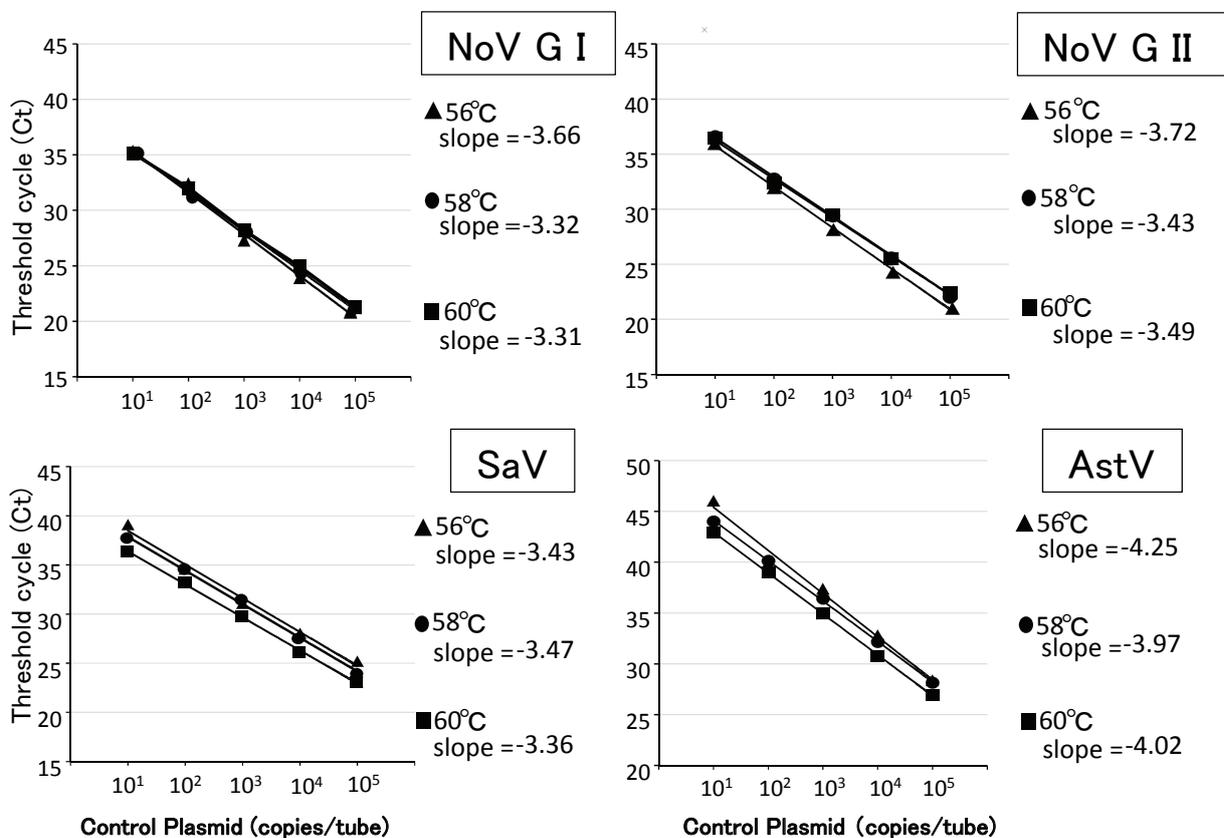


図2 コントロールプラスミドによる各アニール/伸長温度におけるslope値の比較

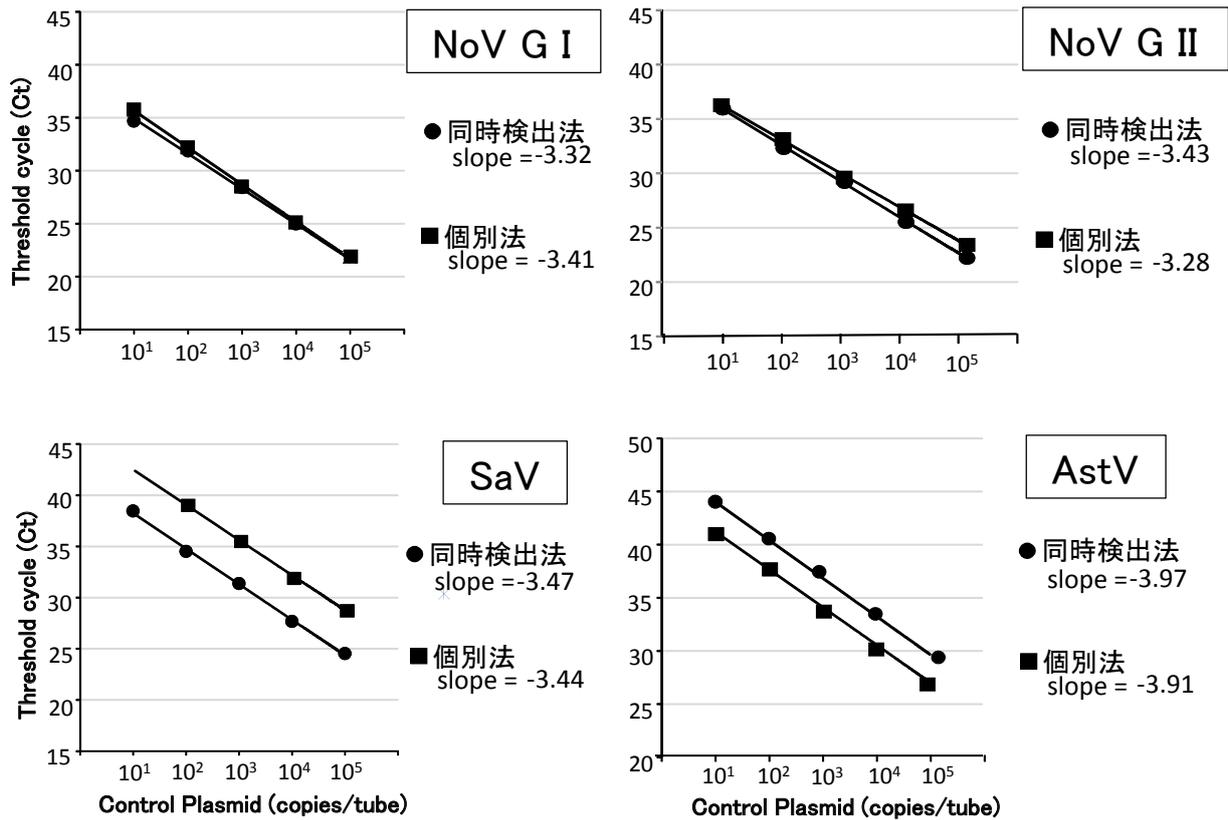


図3 コントロールプラスミドによる個別法と同時検出法におけるslope 値の比較

slope値がいずれも-3.5を超えており一定以上の効率が期待できるのに対し、AstVでは60℃のslope値が4未満であり大きく効率が低下する。このことから、各ウイルス共通で増幅効率が高くなる58℃を、同時検出法のアニール/伸長温度とした。また、AstVでは 10^1 copies/tubeでのCt値が個別法のPCRサイクル数である45サイクル付近となる傾向が見られたため、ウイルス量が少ない場合の確実な検出を考慮して、PCRサイクル数を55サイクルとした。

3.3 コントロールプラスミドを用いた同時検出法と個別法の比較

3.1及び3.2で決定した条件の同時検出法と個別法での各ウイルスの検量線のslope値をそれぞれ比較した結果、全てのウイルスにおいて大きな差はなく、同時検出法は個別法とほぼ同等の増幅効率を示した(図3)。Ct値は、NoV G IとNoV G IIでは同時検出法と個別法でのかい離はなかったが、SaVでは同時検出法の方が個別法より小さく、AstVでは逆に個別法の方が同時検出法より小さい傾向が見られた。

3.4 患者検体を用いた同時検出法の検証

個別法で結果の判明している患者検体を用いて同時検出法を実施したところ、いずれのウイルス検出系でも陽

性検体、陰性検体ともに個別法の結果と完全に一致しており、偽陰性、偽陽性及び非特異反応は認められなかった(表2)。また、各ウイルスの陽性検体各5件で同時検出法と個別法のCt値を比較した結果、AstVの3検体を除き、同時検出法のCt値は個別法とほぼ同じか、小さかった(図4)。

表2 既知の患者検体における偽陰性、偽陽性及び非特異的反応の検証

検体種別	ウイルス	NoV G I	NoV G II	SaV	AstV
陽性検体	検体数	6	10	10	10
	検出数	6	10	10	10
	検出率(%)	100	100	100	100
陰性検体	検体数	46	46	46	46
	検出数	0	0	0	0
	検出率(%)	0	0	0	0

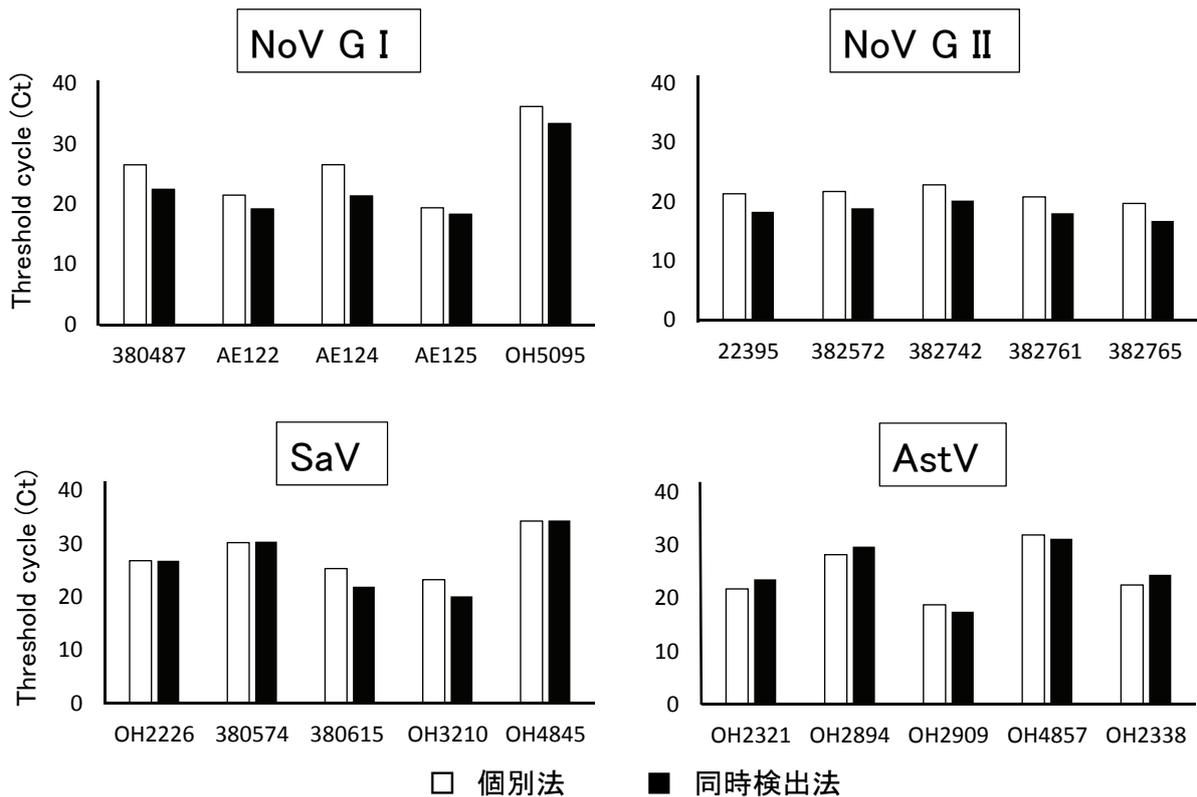


図4 患者検体による同時検出法と個別法におけるCt値の比較

4 考察及びまとめ

PCR条件のうち、アニール温度はPCRの増幅効率と特異性に大きく影響する。一般に、アニール温度が高すぎるとプライマーの鋳型DNAへの結合効率が低下し、逆に低すぎるとプライマーの非特異的な結合が増加するため、いずれの場合もPCRの増幅効率や検出感度に悪影響があることが知られている。また、アニール温度が低すぎる場合は、非特異的結合による偽陽性反応が生じる可能性がある。今回検討した各ウイルスの個別法のアニール/伸長温度は、NoVが56℃、SaV及びAstVが62℃であるが、NoVについては、個別法よりも高温の58℃及び60℃で増幅効率が高くなった。これは、同時検出法で使用したQ試薬と個別法のA試薬とで、使用している酵素の特性が異なることが一因と考えられる。Q試薬は、検討したすべてのアニール/伸長温度で、いずれのウイルスでもA試薬よりCt値が小さい結果となっており、同時検出法で、NoVにおいてアニール温度を上げたことによる増幅効率の低下は見られなかった。一方、SaV及びAstVについては、アニール/伸長温度を62℃（個別法）から58℃（同時検出法）に下げているが、懸念される非特異的結合による偽陽性反応については既知の患者検体による検証で全く認められなかった。また、AstVでは両法のCt値にかい

離が見られ、同時検出法の方が個別法より大きくなる傾向であった。これは、ウイルス量の少ない検体においては増幅曲線がPCRの最終盤に立ち上がり、サイクル数によっては検出できない可能性を意味する。今回の検討では、個別法よりサイクル数を増やすことでこれを回避しているが、既知の患者検体による検証では、サイクル数の増加による非特異的反応は認められなかった。これらの結果から、今回検討した同時検出法は、個別法からのPCR条件変更による増幅効率低下や非特異反応の出現は見られず、個別法と遜色ない検出能を有すると考えられた。

複数の胃腸炎ウイルスを同時に検出する方法として、すでに1ウェルで検出を行うマルチプレックスrealtime-PCR法が報告されている^{5), 6)}。この方法は、定量精度の高さ、試薬・器材の使用量減少によるコスト削減等のメリットがある反面、1ウェル内で反応が完結するため、標的遺伝子の量のアンバランスによる検出感度の低下や複数の蛍光色素使用による非特異的蛍光の検出、異なるアッセイ用プライマー間の相互作用等のリスク⁷⁾がある。また、現在行われているマルチプレックス-リアルタイムPCRは、通常、標的遺伝子が3種までである^{5), 6)}が、本検討では4種の標的遺伝子同時検出のため、同一プレート

上の別ウエルでウイルス毎にリアルタイムPCRを行う方式を選択した。これにより、標的遺伝子量のアンバランス、複数の蛍光色素使用による非特異的蛍光の検出及びプライマー間の相互作用等による検出への悪影響を回避しつつ、個別法実施に比べてリアルタイムPCRの所要時間を約1/2に短縮可能であり、食中毒等、ウイルス性胃腸炎集団発生時の迅速な原因究明と拡大防止に有用と考えられた。

文 献

- 1) 平成15年11月5日付け食安監第1105001号厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知：ノロウイルスの検査法について
- 2) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S. *et al.* : Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR, *J Clin Microbiol*, 41, 1548-1557, 2003
- 3) Oka, T., Katayama, K., Hansman, GS., Kageyama, T., Ogawa, S. *et al.* : Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription polymerase chain Reaction, *J Med Virol*, 78, 1347-53, 2006
- 4) 横井 一, 北橋智子 : Real-time RT-PCR法によるアストロウイルス遺伝子の検出, *感染症誌*, 83, 120-126, 2009
- 5) 小和田和誠, 東方美保, 平野映子, 中村雅子, 大村勝彦 : Multiplex real-time PCR を利用した胃腸炎ウイルス検査の検討, *福井県衛生環境研究センター年報*, 10, 40-44, 2011
- 6) Mori, K., Hayashi, Y., Akiba, T., Nagano, M., Tanaka, T. *et al.* : Multiplex real-time PCR assays for the detection of group C rotavirus, astrovirus, and Subgenus F adenovirus in stool specimens, *J Virol Methods*, 191, 141-147, 2013
- 7) ThermoFisher Scientific : マルチプレックスリアルタイムPCR, *リアルタイムPCRハンドブック*, 16-18