

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）  
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークを強化するための研究」  
分担研究報告書  
ノロウイルス等下痢症ウイルス検出系とマニュアルの整備

研究分担者 染谷 雄一 国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究協力者 岡本貴世子 国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター  
岡智一郎 国立感染症研究所 ウイルス第二部  
藤井克樹 国立感染症研究所 ウイルス第二部  
村上耕介 国立感染症研究所 ウイルス第二部  
林 豪士 国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究要旨 ノロウイルス検出マニュアルに記載されているリアルタイムPCR法において、まれに検出されるGIV遺伝子型ノロウイルス株の検出感度向上を目指し、既存のプライマー・プローブの濃度を検討したところ、GII特異的プローブを混合することで、GIVも検出しつつ、GIIの検出感度を改善可能であることが示唆された。また、ロタウイルスのリアルタイムPCRによる検出法については、最適なプライマー・プローブや反応条件の検討を行った。その結果、世界的に広く利用されている2種類のプライマー・プローブセット（Freemanらのセット、および、Jothikumarらのセット）で、主要な流行型であるT1型やT2型の検出においては両者に大きな差は見られなかったが、ややマイナーなT3型やワクチン株であるT6型の検出はFreemanらのプライマー・プローブセットが優れていた。RNA抽出に関しては、Direct-zol RNA kit（ZYMO Research）の抽出効率が良好であった。

#### A. 研究目的

ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス等下痢症ウイルスはヒトに感染して嘔吐下痢症を引き起こす。ノロウイルスは特にウイルス性食中毒の主要な原因ウイルスでもあり、公衆衛生のみならず、食品衛生の観点からも検査法の整備と改良、検査マニュアルの整備と更新は重要な課題である。

2019年に「ノロウイルス検出マニュアル第1版」がAMED研究班（代表木村博一、2017-2019年度）の成果として公開された。本年度は、本マニュアル記載のノロウイルス検出法について、GIV遺伝子型株の検出感度向上を目指し検討を行った。

また、2019年には「ロタウイルス検出マニュアル第2版」が公開されている。本年度はリアルタイムPCRによるロタウイルス遺伝子の検出法について、最適なプライマー・プローブや反応条件の検討を行った。また、RNAの抽出方法についても検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. ノロウイルス検出法について

ノロウイルス検出マニュアルに記載されているリアルタイムPCR法では、検出されるノロウイルスの多数を占める遺伝子群II（GII）に加え、稀に検出されるGIVも検出可能なプライマー（COG2F、ALPF、COG2R）およびプローブ（RING2AL-TP）のセットを使用している。しかし

RING2AL-TPを使用すると、GII特異的プローブ（RING2-TP）に比べてGIIの検出感度が低下する。本年度は、既存のプライマー・プローブを使用しながら、GIVも検出しつつ、GIIの検出感度を改善させる方法を模索した。なおテンプレートとして、GIIおよびGIVの標的配列を含むDNAプラスミドを使用した。

##### 2. ロタウイルス検出法について

ロタウイルスのリアルタイムPCR法としては、NSP3遺伝子をターゲットとした2種類のプライマー・プローブセット（Freeman et al., J Med Virol. 2008, 80(8):1489-96 および Jothikumar et al., J Virol Methods. 2009, 155(2):126-31）が世界的に広く利用されているため、両者のプライマー・プローブセットの性能について比較検証を行った。検体は、ロタウイルス胃腸炎患者から採取された糞便をPBSで10%乳剤としたものを使用した。

（倫理面への配慮）

ヒト由来の検体を使用する際には実験計画書を提出して、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得た上で研究を行った。

#### C. 研究結果

##### 1. ノロウイルス検出法について

最終反応量 20  $\mu$ L の系において、RING2AL-TP および RING2 をそれぞれ

0.1  $\mu$ M ずつ含む反応液を使って GII を検出したところ、RING2-TP のみを 0.2  $\mu$ M 添加した場合に比べて Ct 値が 1 程度遅延したが、RING2AL-TP のみを 0.2  $\mu$ M 添加した場合に比べると Ct 値が 1.5 程度改善した。一方で、GIV を検出したところ、RING2AL-TP のみの場合に比べて 0.5 程度の遅延であった。

## 2. ロタウイルス検出法について

ロタウイルスのリアルタイム qPCR 法として世界的に広く利用されている 2 種類のプライマー・プローブセットについて、比較検討を行った。標準品 (Wa 株) の増幅効率に関しては、両者はほぼ同等であった。ただし、ヒトロタウイルスの主要な流行型 (NSP3 の遺伝子型) である T1 型と T2 型については両者とも問題なく検出できたものの、ややマイナーな T3 型に関しては Jothikumar らのセットでは検出できなかった。また、ワクチン株 (ロタテック) の T6 型に関しても、Freeman らのセットと比較して Jothikumar らのセットでは検出感度が 1/1000 程度まで低下した。従って、以降の検証では、より幅広い株を検出可能な Freeman らのプライマー・プローブセットを用いることとした。

次に、RNA 抽出方法の最適化を図るため、よく汎用されているキットとして Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) と QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN) の抽出効率を比較検討した。その結果、検体によって程度の差はあるが、QIAGEN 社のキットより ZYMO Research 社のキットの方が一貫して抽出効率が高かった。キャリア RNA 使用の有無による抽出効率の違いは無かった。RNA 抽出時に DNase 処理を行ったところ、行わなかった場合と比較して抽出効率が 1/10 から 1/100 程度まで低下したため、DNase 処理によりロタウイルス遺伝子 (dsRNA) が分解されることが示された。

## D. 考察

### 1. ノロウイルス検出法について

世界的にも GII が主流であり、一方で GIV は稀にしか検出されていない現状であり、GII の感度改善による本系の安定化が期待される。また RING2-TP は、RING2AL-TP が開発される以前に使用されていたプローブであり、使用に対する障壁は低いように思われる。しかし本年度は、テンプレートとして DNA を使用したことから、実際の糞便検体を用いた検証が必要である。また RING2AL-TP と RING2-TP の混合比の最適化を実施する必要がある。

### 2. ロタウイルス検出法について

Jothikumar らのプライマー・プローブセ

ットでは、T3 型および T6 型の検出に支障が出るのが明らかとなった。これは、T3 型のプローブ結合部位の塩基配列がプローブの配列と 25 塩基中 4 塩基異なっている、また、T6 型のプローブ結合部位の塩基配列がプローブの配列と 25 塩基中 2 塩基異なっているためであると考えられた。従って、幅広い遺伝子型を確実に検出するためには、Freeman らのプライマー・プローブセットの方が優れていると考えられた。RNA 抽出に関しては、DNase 処理は RNA 抽出時に混入する DNA を分解除去して非特異反応を軽減させる効果が期待されるが、ロタウイルスのゲノムは 2 本鎖 RNA であるため、DNase による非特異的な分解を受けてしまうと考えられる。従って、ロタウイルス遺伝子の検出を目的として RNA 抽出を行う場合には、DNase 処理は行うべきではない。

## E. 結論

### 1. ノロウイルス検出法について

ノロウイルス検出マニュアルに記載されているリアルタイム PCR 法 (ノロウイルス GII および GIV を検出するに対するプライマー (COG2F、ALPF、COG2R) およびプローブ (RING2AL-TP) を使用) において、GII 特異的プローブ (RING2-TP) を混合することで、GIV も検出しつつ、GII の検出感度を改善可能であることが示唆された。

### 2. ロタウイルス検出法について

ロタウイルスのリアルタイム PCR による検出法としては、Freeman らが設計したプライマー・プローブセットを用いるのが望ましい。また、RNA 抽出法としては Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) の効率が良好であるが、DNase 処理は行うべきではない。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Akane Y, Tsugawa T, Fujii Y, Honjo S, Kondo K, Nakata S, Fujibayashi S, Ohara T, Mori T, Higashidate Y, Nagai K, Kikuchi M, Sato T, Kato S, Tahara Y, Kubo N, Katayama K, Kimura H, Tsutsumi H, Kawasaki Y. Molecular and clinical characterization of the equine-like G3 rotavirus that caused the first outbreak in Japan, 2016. J Gen Virol. 2021 Mar;102(3).
2. Tsugawa T, Fujii Y, Akane Y, Honjo S,

Kondo K, Nihira H, Kimura H,  
Kawasaki Y. Molecular  
characterization of the first human  
G15 rotavirus strain of bovine origin.  
J Gen Virol. (in press)

学会発表

1. 廣瀬翔子、千野梓、早田衣里、藤森誠、  
濱田洋通、高梨潤一、藤井克樹：当院  
入院患者におけるロタウイルス遺伝子  
型の検討（2019年）第52回日本小児  
感染症学会学術集会（オンライン）2020  
年11月7-8日

H. 知的財産権の出願・登録状況  
（予定を含む。）

1. 特許取得

特願2018-188665（2018年10月3日出願）、  
PCT/JP2019/038893（2019年10月2日PCT  
出願）、ロタウイルスの遺伝子型検出方法  
と、これに用いる遺伝子増幅用プライマー  
セット 藤井克樹、株式会社島津製作所

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし