

アイチウイルス検出法の開発・検討

研究分担者 佐々木 潤 藤田医科大学医学部講師

研究要旨

アイチウイルスは胃腸炎患者や、二枚貝および河川水から検出されている。食品や環境水中のウイルス定量は、感染経路の理解に必要である。本研究では、高感度、簡便なアイチウイルス検出法を開発し、食品や環境水中のウイルス検出、定量を行う。今年度は、アイチウイルス検出リアルタイム PCR 法の検出感度の検討、ウイルス濃縮法の検討、RT-LAMP 法の開発を行った。

A. 研究目的

アイチウイルスは、胃腸炎関連のピコルナウイルスであり、集団発生および散发発生の胃腸炎患者から検出されるほか、二枚貝および下水、河川水などの環境中からも検出されている。食品や環境水中のウイルス定量は、感染経路の理解に必要である。本研究では、本ウイルスの高感度検出法の開発および既報の検出法の評価を行う。加えて、食品や環境水中のウイルス検出、定量を行い、本ウイルスの環境中の分布の理解を深めることを目的とする。今年度は、アイチウイルス検出リアルタイム PCR 法の検出感度の検討、ウイルス濃縮法の検討、RT-LAMP 法の開発を行った。

B. 研究方法

1) リアルタイム RT-PCR 法。リアルタイム RT-PCR は、TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix (Thermo Fisher) および QuantStudio 7 リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher)、あるいは StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher) を用いて行った。鋳型として、アイチウイルス cDNA クローンより *in vitro* で合成した RNA を用いた。

2) 試料水からのウイルス回収。環境水からのウイルス検出の準備として、試料からの回収率を調べた。方法として、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法を用いた。蒸留水 40 ml にウイルス希釈液 10 μ l、8% PEG 6000、2.3% NaCl を加え、遠心によりウイルスを回収し、QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen) を用いてウイルス RNA を精製した。同時に、同量同濃度のウイルス希釈液からも直接ウイルス RNA を精製し、両者のウイルス RNA コピー数をリアルタイム RT-PCR 法で比較した。

3) Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) 法。Genotype A, B ともに検出可能なプライマーセットを、ソフトウェア Primer Explorer を利用して設計した。鋳型としては、アイチウイルス cDNA クローンより *in vitro* で合成した RNA を用いた。Loopamp 遺伝子検査 RNA 増幅試薬キット (栄研化学) を用い、63°C、60 分反応した。

C. 研究結果

1) リアルタイム RT-PCR 法。昨年度は 2-step 法でリアルタイム PCR を行っていたが、班会議

で 1-step 法の利用を助言された。そこで今年度は 1-step 法について検出感度の検討を行った。Kitajima et al. (Appl Environ Microbiol, 2013) のプライマー/プローブを用いた場合、Genotype A, B ともに 10^1 コピーの RNA を検出した。今回新たに VP1 領域にプライマー/プローブをデザインしたが、Kitajima et al.の方法ほどの感度は得られなかった。

2) 試料水からのウイルス回収。高濃度のウイルス (10^4 コピー以上) の場合は 15~20%以上の回収率であったが、低濃度の場合は、5%前後まで回収率が低下した。

3) RT-LAMP 法。現時点で、プライマー 1 セットしか試みていないが、Genotype A, B ともに 10^3 コピーのウイルス RNA から、目視で増幅を確認した。

D. 考察

リアルタイム RT-PCR 法に関しては、1-step 法により、Kitajima et al. (2013)のプライマー/プローブで高感度検出が可能であった。昨年度、2-step 法では 10^1 コピーのウイルス cDNA を検出したが、RNA の検出を行う場合、逆転写のステップを加えることで感度の低下がみられたことから、感度、簡便さから当研究室では 1-step 法で行う方が良いと考える。一方で、Kitajima et al. (2013)の方法を上回る感度の独自のプライマー/プローブはデザインできていない。

試料水からのウイルス回収、および RT-LAMP

法についても、準備段階として当研究室での実施が可能であることが確認できたが、それぞれ回収率と感度の改善が必要である。特に、アイチウイルスの LAMP 法による検出報告はごく限られるため、検出法の開発は有意義であると考え、市販のノロウイルス検出キット(栄研化学)の感度は、60 (GI)および 200 (GII) コピーである。今後、感度向上を目指して検討を加える必要がある。

E. 結論

リアルタイム RT-PCR法に関しては、1-step法で高感度にウイルスRNAを検出できた。感度、簡便さの点から、2-step法より1-step法で行う方が良いと考える。試料水からのPEG沈殿法により、5~20%程度の回収率でウイルス濃縮できた。加えて、RT-LAMP法のためのプライマーセットを設計し、 10^3 コピーのウイルスRNAを検出した。ウイルス濃縮、RT-LAMP法については、効率の改善が必要であった。

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし