

## ロタウイルスの検出方法の開発・改良

分担研究者 藤井克樹 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

### 研究要旨

リアルタイム PCR によるロタウイルスの検出法について、最適な RNA 抽出方法の検討および Freeman らが報告したプライマー・プローブセットの性能について評価を行った。RNA 抽出に関しては ZYMO Research 社の Direct-zol RNA kit を用いることで安定して高感度な検出が可能であった。また、DNase 処理はロタウイルスゲノム (dsRNA) が分解されるため、実施しない事が望ましいと考えられた。Freeman らのプライマー・プローブセットは、幅広いロタウイルス株を検出可能であるが、便検体からの検出においては、しばしば非特異反応が認められた。この非特異的増幅の原因としては、ヒトゲノムや腸内細菌、アストロウイルスなど様々な要因が関与し得ると考えられた。これらの非特異反応は、多くの場合  $10^2$  コピー未満として検出されるため、 $10^2$  コピー以上を閾値として陽性判定すれば、ほとんど問題は起こらないと考えられた。

### A. 研究目的

本研究では昨年度、ロタウイルスのリアルタイム qPCR 法に関して、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 (Freeman らのセットおよび Jothikumar らのセット) について比較検討を行ったところ、Freeman らのセットの方が幅広いウイルス株を検出可能であることを明らかにした。本年度はこのプライマー・プローブセットを用いて、RNA 抽出方法や qPCR 試薬間の検出効率の比較検討を行った。

### B. 研究方法

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プライマー・プローブセットのうち、基本的に Freeman らが報告したセット (Freeman *et al.*, J Med Virol. 2008, 80(8):1489-96) を利用した。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

まず 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) を利用した。QIAGEN のキットにはキャリア RNA が付属しているため、キャリア RNA 使用の有無による差も検討した。その結果、QIAGEN のキットでは、キャリア RNA 使用の有無による抽出効率の差はほとんど見られなかった。一方、ZYMO Research のキットでは、QIAGEN のキットで抽出した場合より 10-1000 倍程度高く検出される例が見られた。キット間の差がほとんど無い検体もあれば 1000 倍以上の差が現れる検体もあり、検体による差が非常に大きかった。大きな差が見られた検体について、便乳剤を 10-1000 倍まで希釈してから同様の RNA 抽出を行ったところ、キット間の差が軽減される傾向が見られた。この現象の原因は特定できていないが、抽出キットによる PCR 阻害物質の除去効率などが影響しているのではないかと考えられる。以降の検証では、ロタウイルス遺伝子を一貫して高感度で検出できる ZYMO Research のキットを使用した。

続いて、ZYMO Research のキットに付属している DNase の使用の影響を検証した。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、ロタウイルス胃腸炎患者の便検体について DNase 処理を行ったところ、行わなかった場合と比較して検出効率が 1/10 から 1/100 程度に低下した。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。

次に、より多くの臨床検体を用いて qPCR 試薬間の検出効率の比較検討を行った。使用した試薬は、Thermo Fisher Scientific 社の SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit および TaqMan Universal PCR Master Mix、タカラバイオ社の PrimeScript RT reagent Kit および Premix Ex Taq (Probe qPCR)、New England Biolabs 社の LunaScript RT SuperMix Kit および Luna Universal Probe qPCR Master Mix である。急性胃腸炎患者の場合、一度に複数の胃腸炎原因ウイルスを調べる機会が多いため、いずれも 2-step 法を用いて検討した。その結果、いずれの試薬でもほとんど遜色なくウイルスを検出できることが確認できた。ただし、検体によっては非特異反応が現れやすいものがあり、ロタウイルス陰性であっても 35-40 サイクル付近でシグナルの上昇が見られることがあった。非特異反応の原因を調べるため、どの試薬でも非特異反応が見られた検体について、同じ反応条件で RT-PCR 反応を行い、その PCR 増幅産物のシーケンス解析を行った。その結果、得られた配列には、ヒトゲノム (Human chromosome 14)、腸内細菌 (Bacteroides fragilis)、アストロウイルス (Astrovirus 4) 等があり、様々な原因で非特異反応が現れることが判明した。

現状より非特異反応の少ないプライマー・プローブセットの作製を試みているが、現時点では Freeman らのセット以上の良好な結果は得られていない。

#### D. 考察

通常、ロタウイルス胃腸炎患者の便検体には大量のウイルスが存在している事が多く、qPCR において高コピーが検出される例が多い。本研究において観察された非特異反応は  $10^2$  コピー未満として検出される事が多いため、 $10^2$  コピー以上を陽性判定の閾値として設定すれば、ほとんど問題は起こらないと考えられる。食品からロタウイルスを検出する目的では、低コピーの検体を検査するケースも多いと考えられるが、検体に混入する夾雑物の種類も便検体とは大きく異なるため、別途の検証が必要である。今後は更なるプライマー・プローブセットの改良および食品サンプルからの検出方法とその検出感度について検証を進める予定である。

#### E. 結論

Freeman らが設計したロタウイルス検出用のプライマー・プローブセットは幅広い流行株を高感度で検出可能であるが、便検体からの検出においては非特異反応が見られることがある。ただし、 $10^2$  コピー以上を閾値として陽性判定すれば、偽陽性となる懸念はほとんど無いと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

(英文)

1. Murakami K, Fujii Y, Someya Y: Effects of the thermal denaturation of Sabin-derived inactivated polio vaccines on the

D-antigenicity and the immunogenicity in rats. *Vaccine*. 2020, 38(17):3295-3299.

2. 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).

3. 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)

(和文)  
なし

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  
なし

3. その他  
なし