

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

アイチウイルスは自然環境中において、二枚貝や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を通しアイチウイルスの環境中の動態を把握することは、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 RT-LAMP 法の開発、および河川水からのアイチウイルス RNA 検出を行った。

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、集団発生および散発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 RT-LAMP 法の開発、実際に河川水からのアイチウイルス RNA の検出を行った。

B. 研究方法

1) 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およびGenotype Aのみを検出可能なプライマーセットを、ソフトウェアPrimer Explorer V5を利用して設計した。コントロールの鋳型としては、

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 RNA増幅試薬キット (RT-LAMP) (栄研化学株式会社)を用い、62℃、60分反応した。白濁の有無を目視で確認し、陽性、陰性を判定した。

2) 河川水からのウイルス RNA 回収

愛知県豊明市の河川 2 か所 (皆瀬川、境川) において、2021 年 9 月から 2022 年 3 月にかけて毎月 1 回、河川水を採集した。河川水 1 リットルに 8% PEG 6000、2.3% NaCl を加え、4℃、16 時間攪拌した後、4℃で 9000×g、30 分遠心し、沈殿を滅菌蒸留水に懸濁した。この懸濁液から、QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen)を用いてウイルス RNA を精製した。ウイルス RNA の検出は、リアルタイム RT-PCR (Kitajima et al., 2013)、および RT-PCR (Yamashita et al., J Clin Microbiol, 2000) により行った。RT-PCR は、Superscript IV One-step RT-PCR System (Invitrogen) および PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (Takara) を用いた。1 回目の PCR は

AV6291F-AV6779Rv のプライマーペア、2 回目の Nested PCR は C94b-246k のプライマーペアで行った。Nested PCR は、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara) を使用した。

C. 研究結果

1) RT-LAMP 法開発の試み

合計 11 のプライマーセットをデザインした。その際、イヌコブウイルスやネココブウイルスなど、身近な動物のコブウイルスの配列と比較し、これらの動物ウイルスを検出しにくいようなプライマーのデザインに留意した。結果として、 10^3 コピーのウイルス RNA を検出可能なプライマーセットが複数得られた。しかし、 10^2 コピーのウイルス RNA の検出はできなかった。

2) 河川水からのウイルス RNA 検出

愛知県豊明市の河川 2 か所 (皆瀬川、境川) で採集したサンプルについて、リアルタイム PCR および RT-PCR の 2 方法により、アイチウイルス RNA の検出を試みた。

① リアルタイム PCR の結果

皆瀬川の 11 月と 1 月、境川の 9~12 月で約 200-450 copies/リットルのアイチウイルス RNA が検出された。

② RT-PCR の結果

One-Step RT-PCR、続けて Nested PCR を行い、PCR 産物が産生されるか調べた。その結果、皆瀬川からは、10 月および 12 から 3 月まで検出された。一方、境川からは一度も検出されなかった。Nested PCR 産物の塩基配列を解析した結果、いずれも Genotype A であった。また、検出されたのは、いずれも Takara のキットで RT-PCR を行った場合であった。

D. 考察

RT-LAMP 法による検出に関して、Genotype A、B 両方検出できるプライマーセットのデザインは、様々な株に対応してすべてを検出しようとするデザインであることに加え、動物コブウイルスを検出しないようなデザインも考えた場合、かなりプライマー設定領域が限られてくることが分かった。結果として本研究でデザインした複数のプライマーセットで、 10^3 コピーのウイルス RNA まで検出できた。アイチウイルスの RT-LAMP 法による検出に関する論文 (Lee et al., Indian J Microbiol, 59:375-378, 2019) で発表されているプライマーセットを利用した RT-LAMP を本研究で行った場合、 10^4 コピーまでしか検出できなかったのも、それよりは感度は高かった。しかし、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) コピーであることを考えると、感度向上にむけた検討の必要があるものと考えられた。

河川水からのウイルス RNA の検出の試みでは、リアルタイム PCR の結果と RT-PCR の結果は一致しなかった (リアルタイム PCR では検出されなかったサンプルから RT-PCR で検出された例も認められた)。この違いに関しては今後検討が必要である。

One-Step RT-PCR でウイルス RNA が検出されたのは、いずれも Takara の PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit で RT-PCR を行った場合であった。このことから、今回用いた One Step RT-PCR 2 キットのうちでは、Takara のキットが検出に適しているものと考えられた。

河川水サンプルを採集した 9 月から 3 月にかけては、感染性胃腸炎症例の増加する冬季を含む。下水調査で、アイチウイルスは、冬季から春季にかけて多くなるとの報告がある (Kitajima et al., Applied Environ Microbiol. 3952-58.

2013)。今回の結果ではそのような傾向は認められなかった。SARS CoV-2 の流行に対する感染対策により、感染性胃腸炎症例が減少していることが関係しているのかもしれない。アイチウイルスの環境中の増減を把握するためには、長期的な調査の継続が必要である。

E. 結論

RT-LAMP法による検出に関して、 10^3 コピーのウイルスRNAまで検出できるプライマーセットを得た。ただし、市販のノロウイルスの検出感度と比較すると劣ることから、感度向上に関する検討の余地が残された。

河川水からのアイチウイルスRNAの検出については、RT-PCR、リアルタイムPCRの2方法でウイルスRNAが検出できた。しかし、両者の結果は一致せず、両方法についてさらなる検討が必要であると考えられた。RT-PCRに関しては、TakaraのPrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kitを用いた場合、より良い結果が得られた。

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