

## 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

前年度に引き続き、リアルタイム qPCR によるロタウイルスの検出法について、従来の検査で行われていた方法よりも特異性や感度を向上するための検討をおこなった。本年度は、ロタウイルスの NSP3 セグメントおよび NSP5 セグメントに新たなプライマー・プローブを設計して非特異反応の発生頻度について検討したが、従来から利用されている Freeman らが設計したプライマー・プローブセットと比較して大幅な改善は見られなかった。次に、プライマー・プローブの濃度を 0.25  $\mu$ M each から様々な濃度に変更して検証したところ、フォワードプライマー 0.4  $\mu$ M、リバースプライマー 0.2  $\mu$ M、プローブ 0.2  $\mu$ M とすることで、従来の方法と比較して、非特異反応の発生頻度がおよそ半減することが判明した。この結果は、ロタウイルスのリアルタイム qPCR 法による検査の精度向上につながると考えられる。

### A. 研究目的

本研究では、昨年度までに RNA 抽出方法やリアルタイム qPCR 試薬間の検出効率の比較等について検討を行った。RNA 抽出方法は Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) を用いて DNase 処理をせずに抽出を行うのが最も抽出効率が高く、プライマー・プローブセットについては Jothikumar らのセット (Journal of Virological Methods, 2009, 155(2), 126-131) より Freeman らのセット (Journal of Medical virology, 2008, 80(8), 1489-1496) 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。試薬に関してはどのメーカーの試薬でも大きな違いはないが、本研究では New England Biolabs (NEB) 社の LunaScript RT SuperMix Kit および Luna Universal Probe qPCR Master Mix がわずかながら非特異反応が発生しにくい結果が得られた。

本年度は上記の最適な RNA 抽出法および NEB 社の試薬を用いて、より非特異反応が発生しにくい

プライマー・プローブセットの探索と qPCR 反応条件の検討を行った。

### B. 研究方法

ロタウイルスのリアルタイム qPCR 法は上記の通り NEB 社の LunaScript RT SuperMix Kit および Luna Universal Probe qPCR Master Mix を使用した。プライマー・プローブは ThermoFisher Scientific 社 および Integrated DNA Technologies (IDT) 社に依頼して合成した。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、Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) を用いて DNase 処理をせずに RNA を抽出した。

(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 Freeman らが設計したプライマー・プローブのターゲットとなっている NSP3 セグメントの 3' 末端付近にある非常に保存性の高い領域 (90 bp 程度) に、より良いプライマー・プローブを設計できるか検証を行った。フォワードプライマー 3 種、リバースプライマー 3 種、プローブ 6 種を作製してその組み合わせによる非特異反応の発生率を検証したが、いずれも Freeman らのオリジナルのプライマー・プローブセットと比較して、非特異反応が大幅に抑えられることはなかった。

続いて、2種類のタンパク質 (NSP5 および NSP6) をコードしている NSP5 セグメントにおいて保存性の高い領域 (250 bp 程度) があるため、そこに良いプライマー・プローブを設計できるか検証を行った。フォワードプライマー 5 種、リバースプライマー 4 種、プローブ 2 種を作成してその組み合わせによる非特異反応の発生率を検証したところ、Freeman らのオリジナルのプライマー・プローブセットと比較して非特異反応が若干抑えられる組み合わせがあったが、NSP3 をターゲットとする場合より検出感度が若干落ちる (Ct 値が 3 程度高くなる) 傾向が見られた。

次に、プライマー・プローブの濃度を変更することで非特異反応の発生率に違いが見られるか検証を行った。上記の検証はフォワードプライマー、リバースプライマー、プローブの濃度をいずれも  $0.25 \mu\text{M}$  で統一していたが、リバースプライマーとプローブの濃度を  $0.2 \mu\text{M}$ 、フォワードプライマー濃度を 2 倍の  $0.4 \mu\text{M}$  とすることで、非特異反応の発生が大幅に軽減される傾向が見られた。この傾向は Freeman らのオリジナルのプライマー・プローブセットを始め、上記の新たに作製した様々なプライマー・プローブの組み合わせでも同様に見られた。検証に用いるサンプルによって非特異反応の発生率にバラツキが見られるが、本研究で用いた約 50 検体のロタウイルス陰性サンプルの場合では、従来のプライマー・プローブの濃度 ( $0.25 \mu\text{M}$  each) では 20~25% のサンプルで非特異反応が見られていたが、濃度を変更

( $0.4 \mu\text{M}$ 、 $0.2 \mu\text{M}$ 、 $0.2 \mu\text{M}$ ) することにより、12% 程度まで軽減された。(これらのサンプルには非特異反応が出やすいサンプルを意図的に含めているので、実際の調査時の発生率を反映しているとは限らない。) また、アニーリング+伸長反応は、 $60^\circ\text{C}$  より  $56^\circ\text{C}$  で行った方が、非特異反応が軽減された。

### D. 考察

プライマー・プローブの濃度を変更することで非特異反応の発生が軽減されるメカニズムについては詳細には解明されていない。Freeman らのオリジナルのプライマー・プローブセットの場合は、ウイルス遺伝子におけるフォワードプライマー結合部位の配列が遺伝子型によって異なるため、フォワードプライマー 20 塩基中に混合塩基が 3 つ入っている (8 番目に W、12 番目に R、14 番目に R)。つまり、ウイルスの塩基配列に対して 100% 相補的なプライマーは、理論的には添加されたフォワードプライマーの内の  $1/8$  ( $1/2 \times 1/2 \times 1/2$ ) に過ぎない。従って、フォワードプライマーの濃度をリバースプライマーおよびプローブの倍量添加することで、PCR 反応の特異性や増幅効率が改善している可能性が考えられる。しかし、フォワードプライマーの濃度を  $0.6 \mu\text{M}$ 、 $0.8 \mu\text{M}$  と増加させても、非特異反応が軽減されることはなく、 $0.4 \mu\text{M}$  が至適濃度であると考えられた。

本研究により、ロタウイルスのリアルタイム qPCR 検出法において現行法よりも非特異反応を軽減させる方法が見いだされた。新たに作製したプライマー・プローブセットの中には Freeman らのプライマー・プローブセットよりわずかに良い結果が得られたものもあるが、大きな差ではないため、地方衛生研究所等における検査業務に混乱を来たさないためには、従来から広く利用されている Freeman らのプライマー・プローブセットの利用を続けるのが無難であると考えられる。今後、各地方衛生研究所でも「濃度を変更することにより非特異反応が軽減される」現象の再現性が確認できれば、検査マニュアル等に反映させていく予

定である。

## E. 結論

現在、ロタウイルスのリアルタイム qPCR 検出法において、幅広い遺伝子型を高い特異性で検出する最適な方法は、Freeman らが設計したプライマー・プローブセット（フォワードプライマー：ACCATCTWCACRTRACCCTC、リバープライマー：GGTCACATAACGCCCTATA、ダブルクエンチャープローブ：ATGAGCACAATAGTAAAAGCTAACACTGTCAA）を用い、それぞれの終濃度を  $0.4\mu\text{M}$ 、 $0.2\mu\text{M}$ 、 $0.2\mu\text{M}$  とし、アニーリング+伸長反応は  $56^{\circ}\text{C}$  で行うものである。

## G. 研究発表

### 論文発表

(英文)

1. 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. 2021 Apr;102(4).
2. Hayashi T, Murakami K, Hirano J, Fujii Y, Yamaoka Y, Ohashi H, Watashi K, Estes MK, Muramatsu M: Dasabuvir Inhibits Human Norovirus Infection in Human Intestinal Enteroids. mSphere. 2021 Nov 3;6(6):e0062321.

(和文)

1. 藤井克樹：特集 ウイルス研究に進歩をもたらした新しい技術 ウイルス遺伝子の網羅的解析：1) 次世代シーケンサー 臨床とウイルス 2022, 50(1), 30-36

### 学会発表

1. 藤井克樹、津川毅、中田修二、村松正道：札幌市において小規模な流行を起こしたロタウイルス G12 株の全遺伝子解析 (Full-genome analysis of rotavirus G12 strains that caused a small epidemic in Sapporo) 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2021 年 11 月 16-18 日

2. 津川毅、藤井克樹、赤根祐介、本庄紗帆、近藤謙次：ウシ由来ロタウイルス G15 株のヒト初感染例の分子的特徴 (Molecular characterization of the first human G15 rotavirus strain of zoonotic origin from the bovine species) 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2021 年 11 月 16-18 日

3. 林豪士、村上耕介、平野順紀、藤井克樹、山岡曜子、大橋啓史、渡士幸一、Mary Estes、村松正道: Screening of an antiviral compound library identifies dasabuvir as a novel anti-human norovirus inhibitor 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2021 年 11 月 16-18 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 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