

資 料

下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.3へのアップデート

末井 真菜, 伊藤 彩乃, 重本 直樹

Update Ver. 2.3 of multiplex reverse transcription PCR-based assays involving fluorescent dye-labeled primers for detecting gastroenteritis viruses

SUEI Mana, ITO Ayano and SHIGEMOTO Naoki

(Received: October 23, 2024)

当センターで開発された下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法は、蛍光標識プライマーを用いることで、電気泳動後の増幅産物の蛍光色と位置により複数の下痢症ウイルスを包括的に検査することができる。現行の蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.2では、ノロウイルスGII とサポウイルスの混合感染時に両者の増幅産物が近接して判定が困難な点、一部のサポウイルスの遺伝子型（GII.1, GII.3）では検出感度が劣る点が課題となったことから、サポウイルス検出用プライマーの追加とノロウイルスGII検出用プライマーの変更を行い、アップデート版Ver.2.3とした。

Key words : 下痢症ウイルス, ノロウイルス, サポウイルス, 蛍光マルチプレックスRT-PCR法, 感染症発生動向調査

結 言 方 法

小児の下痢症は複数のウイルスが関与していることから、当センターではノロウイルス、サポウイルスなどの様々な下痢症ウイルスを包括的に検査している[1-4]。しかし、現行の下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.2 (以下Ver.2.2) [5]では、ノロウイルスGIIとサポウイルスの混合感染時に両者の増幅産物が近接して判定が困難な点が課題となった[5]。また、新たに一部のサポウイルスの遺伝子型（GII.1, GII.3）で検出感度が劣る点も課題となった。そこで、今回のアップデートでは、サポウイルスの検出感度を改善し、さらにノロウイルスとサポウイルスの増幅産物のサイズの差を大きくするために、サポウイルス検出用プライマーの追加とノロウイルス検出用プライマーの変更を行い、下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.3とした。

1 サポウイルスの遺伝子解析

現行のVer.2.2で検出感度が低かったサポウイルスの遺伝子型GII.1とGII.3の10検体（表1）のうち、Ver.2.2で不検出であったサポウイルス6検体（GII.1 4検体, GII.3 2検体）の遺伝子解析を行った。Ver.2.2で使用しているサポウイルス検出用プライマーとこれら6検体の塩基配列を比較するために、フォワードプライマーにSLV-5317を、リバープライマーにSVR-2を使用して[6]ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、Human Calicivirus Typing Tool[7]及び遺伝子解析ソフトMEGA X[8]を用いて解析した。

2 プライマーの追加と変更

サポウイルスについては、遺伝子解析で得られたVer.2.2で不検出だった遺伝子型6検体（GII.1 4検体, GII.3 2検体）の塩基配列を参考に新たにリバープライ

イマーを作成し、追加した。また、ノロウイルスGIIについては、サポウイルスの増幅産物 (340bp) とノロウイルスGIIの増幅産物 (344bp) のバンドサイズの差を大きくするために、ノロウイルスGIIのフォワードプライマーを変更した。

3 供試サンプル

今回改良を行った下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.3のAセットの評価には、感染症発生動向調査事業において搬入された糞便検体から、それぞれ検体中のウイルスが判明している45検体由来のcDNAを用いた。なお、使用したcDNAは以下に示す手順により行ったものである。

4 RNA抽出と逆転写反応

10 %糞便乳剤からQIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) によりRNA抽出を行った。

逆転写反応は5×buffer 4μL, 2mM dNTPs 4μL, 50μM Random primer pd (N) (タカラバイオ) 1μL, RNase inhibitor (40U/μL) (TOYOBO) 0.5μL, ReverTra Ace (100U/μL) (TOYOBO) 1μLを含む反応液に抽出RNA 9.5μLを加え、30℃・10分、42℃・30分、99℃・5分の条件で行った。

5 蛍光マルチプレックス PCR

マルチプレックスPCR反応にはMultiplex PCR Assay Kit Ver.2 (タカラバイオ) を用い、表2に示すプライマー[9-19]及び濃度の反応液48μLにcDNAを2μL加えた。PCR反応は、94℃・1分の熱変性の後、94℃・30秒、57℃・30秒、72℃・30秒を40サイクル行い、最後に72℃・10分の最終伸長を行った。

6 電気泳動

電気泳動には、2%アガロースゲルを使用し、PCR反応液10μLをアプライした。サイズマーカーには100bp ラダー (MAESTOROGEN) 10μLに1μLのEzVISON (Amresco) を混合したものをを用いた。電気泳動後のゲルは、UVトランスイルミネーター上で増幅産物の蛍光バンドの色と増幅長を確認し、その後エチジウムブロマイド染色を行って再度増幅産物を確認した。

結 果

Ver.2.2で使用しているサポウイルス検出用プライマーとVer.2.2で不検出であったサポウイルス6検体 (GII.1 4検体, GII.3 2検体) の塩基配列の比較を行ったところ、リバープライマーの領域においてサポウイルス1検体でのみ1塩基の相違があったが、その他はすべて一致していた (図1)。これを参考に、不検出株の検出を可能とするために、サポウイルスGII.1とGII.3用検出プライマーHuSaV-5498Rmを新たに作成し、Aセットのプライマーに追加することとした。

続いてVer.2.2では、ノロウイルスGIIとサポウイルスの混合感染時には両者の増幅産物が近接して判定が困難なため、ノロウイルスGII検出用プライマーのフォワードプライマーをG2SKFからCOG2Fに変更した (表2)。これにより、ノロウイルスGIIの増幅産物が387bp、サポウイルスの増幅産物が340-358bpとなり、増幅バンドの色とサイズによる識別が容易に可能となった (図2)。

最後に、今回改良を行った表2のAセットで、検体中に含まれるウイルスが明らかな既知検体を用いて検証を行ったところ、表3に示すようにVer.2.2のAセットと同様に検出対象ウイルスを正確に検出できたと共に、不検出であった一部のサポウイルスが検出可能となったことが確認できた。

考 察

Ver.2.2のサポウイルス検出用プライマーとVer.2.2で検出感度が低かったサポウイルスGII.1及びGII.3の検体の塩基配列を比較したところ、ほとんど一致していた (図1)。しかしながら、本プライマーはMix塩基が多く含まれているため、GII.1, GII.3では検出感度が低下していたと考えられた。そこで、Ver.2.2のAセットで使用しているサポウイルスのリバープライマーHuSaV-5498Rの塩基配列と、Ver.2.2で検出感度が低かったサポウイルスGII.1とGII.3の当該領域の配列を参考に、これらの株に対してより特異的なプライマーHuSaV-5498Rmを設計し、これをAセットのサポウイルス検出用プライマーに追加することとした。続いて、Ver.2.2では、ノロウイルスGIとGIIの増幅産物のサイズがそれぞれ330bpと344bpであり、サポウイル

表1 蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.2で検出感が低かったサポウイルスGII.1とGII.3

検体番号	サポウイルスの 遺伝子型	Ver.2.2の結果
1	GII.1	不検出
2	GII.1	不検出
3	GII.1	検出
4	GII.1	不検出
5	GII.1	不検出
6	GII.3	検出
7	GII.3	検出
8	GII.3	検出
9	GII.3	不検出
10	GII.3	不検出

		5'															3'	
1	(GII.1)	A	T	G	T	T	T	G	C	T	G	G	T	T	G	G	G	G
2	(GII.1)	A	T	G	T	T	T	G	C	T	G	G	T	T	G	G	G	G
3	(GII.1)	A	T	G	T	T	T	G	C	T	G	G	T	T	G	G	G	G
4	(GII.1)	A	T	G	T	T	T	G	C	T	G	G	T	T	G	G	G	G
5	(GII.3)	A	T	G	T	T	T	G	C	T	G	G	C	G	G	G	G	G
6	(GII.3)	A	T	G	T	T	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	G
		3'																5'
HuSaV-5498R (Ver.2.2)		T	A	C	A	H	V	C	G	N	C	C	N	A	C	C	C	C
HuSaV-5498Rm(Ver.2.3)		T	A	C	A	A	A	C	G	A	C	C	R	A	C	C	C	C

図1 Ver.2.2で不検出だったサポウイルスの塩基配列とVer.2.2及びVer.2.3のリバースプライマー

	プライマーとの相違	H:A,T,C	N:A,C,G,T
	追加プライマーの変更点	V:A,C,G	R:A,G

スの増幅産物のサイズが340bpとなっている。そのため、特にノロウイルスGIIとサポウイルスの混合感染時に蛍光バンドが重なって結果の判定が困難であったことから、増幅産物の位置をずらすために、ノロウイルスGIIのフォワードプライマーとしてKageyamaらの報告[10]にあるプライマーを採用することとした。これらプライマーの追加と変更により、ノロウイルスGIIとサポウイルスの増幅産物の位置をずらし、電気泳動後の視認性を改善することができた(図2)。

今回のノロウイルスGII検出用プライマーの変更とサポウイルス検出用プライマーの追加によるアップデ

ート版を、蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.3とした。検体中のウイルスが判明している45検体由来のcDNAを用いた検証では(表3)、すべて正しい検査結果が得られ、本検査系が十分に機能していることが確かめられた。一方で、ノロウイルスGIとサポウイルスの増幅バンドが近接している点、サポウイルスの遺伝子型によっては増幅産物の大きさが異なる点については、判定時に注意が必要と考えられた。今後は、アップデートした蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.3を活用し、継続的な検査を実施することで、年毎の流行ウイルス等を明らかにしていく予定である。

表2 蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.3に使用するプライマー

プライマーセット	検出ウイルス	プライマー	Sequence(5'-3')	標識蛍光	濃度 (μM)	増幅産物 (bp)	出典
A	ノロウイルスGI (NoVGI)	G1SKFm	CTGCCCCGAWTWYGTAAATGA	Alexa488 (緑)	0.4	330	[9] (slightly modified)
		G1SKR	CCAACCCARCCATTRTACA		0.4		
	ノロウイルスGII (NoVGII)	COG2F *1	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	Alexa594 (赤)	0.4	387	[10] [9] [11]
		G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTTRTACAT		0.4		
		G2ALSKR	CCACCAGCATATGAATTGTACAT		0.2		
	サポウイルス (SaV)	HuSaV-5159F	TAGTGTTTGARATGGARGG	Alexa532 (黄)	0.4	340-358	[12] (slightly modified)
		HuSaV-5498R	CCCCANCCNGCVHACAT		0.4		
		HuSaV-5498Rm *2	CCCCARCCAGCAAACAT		0.4		
	アストロウイルス (HAstV)	AC1'	ATGGCTAGCAAGTCTGACAAG	Alexa350 (青)	0.2	230	[13]
		AC230	GGTTTGGTCTCTGTGACACC		0.2		
B	アイチウイルス (AiV)	C(+)-6261	ACACTCCACCTCCGCGCAGTA	Alexa488 (緑)	0.4	519	[14]
		C(-)-6779	GGAAGAGCTGGGTGTCAAGA		0.4		
	パレコウイルス (HPeV)	AN345	GTAACASWWGCCTCTGGGSCCAAAAG	Alexa594 (赤)	0.4	195	[15]
		AN344	GGCCCCWGRTCAGATCCAYAGT		0.4		
	アデノウイルス (AdV)	Ad-A1m	GCGCARTGGTCTTACATGCACATC	Alexa546 (橙)	0.2	300	[16] (slightly modified)
		Ad-A2	CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT		0.2		
	エンテロウイルス (EV)	EV-Fm	GCCCCTGAATGCGGCTAATC	Alexa532 (黄)	0.4	148	[17] (slightly modified)
		EV-Rm	ATTGTCACCATWAGCAGYCA		0.4		
C	A群ロタウイルス (RVA)	RotaA-fwd1	GGATGTCTGTACTCCTTGTCAAAA	Alexa488 (緑)	0.4	145	[18]
		RotaA-fwd2	GGAGGTTCTGTACTCATTTGTCAAAAA	Alexa488 (緑)	0.4		
		RotaA rev1	TCCAGTTTGGAACATCATTCCA	Alexa488 (緑)	0.4		
		RotaA rev2	TCCAGTTTGAAAGTCATTTCCATT	Alexa488 (緑)	0.4		
	C群ロタウイルス (RVC)	G8NS1	ATTATGCACAGACTATCGCCAC	Alexa594 (赤)	0.4	351	[19]
		G8NA2	GTTTCTGTACTAGCTGGTGAAC		0.4		

*1 Ver.2.2のG2SKFから変更した

*2 Ver.2.3で追加した

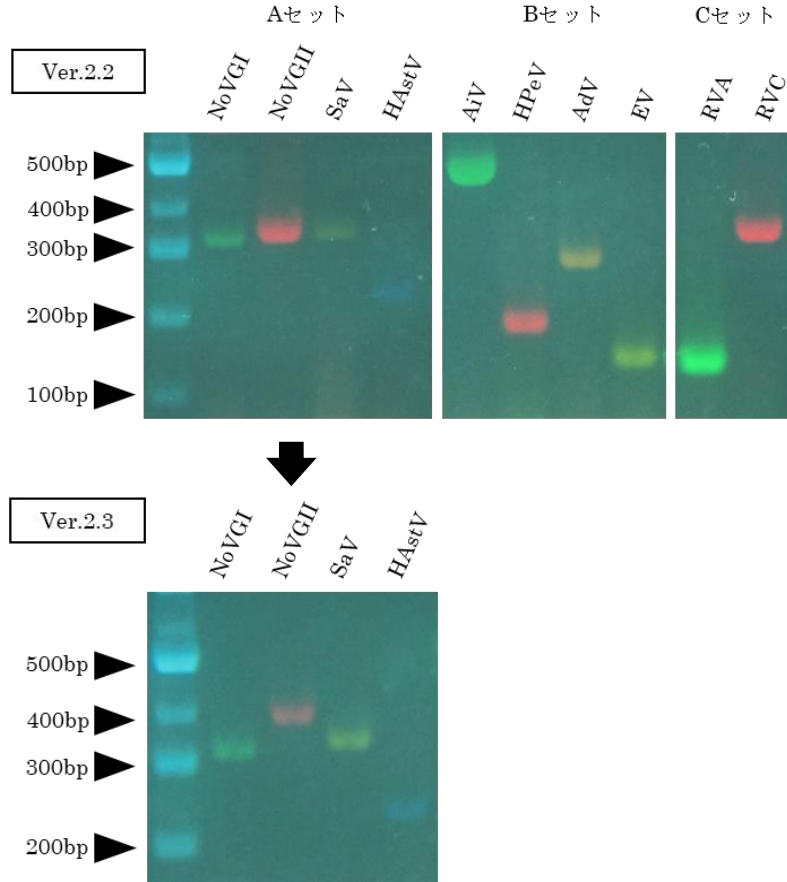


図2 蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.2及びVer.2.3の泳動像

表3 蛍光マルチプレックスRT-PCR法Aセット変更の検証結果

検体番号	検体中の 含有ウイルス*	Ver.2.2 Aセットの結果	Ver.2.3 Aセットの結果
1	SaV(GIV.1)	SaV(GIV.1)	SaV(GIV.1)
2 (6)	SaV(GII.3)	SaV(GII.3)	SaV(GII.3)
3 (7)	SaV(GII.3)	SaV(GII.3)	SaV(GII.3)
4 (8)	SaV(GII.3)	SaV(GII.3)	SaV(GII.3)
5	SaV(GI.2)	SaV(GI.2)	SaV(GI.2)
6 (1)	SaV(GII.1)	不検出	SaV(GII.1)
7 (2)	SaV(GII.1)	不検出	SaV(GII.1)
8 (9)	SaV(GII.3)	不検出	SaV(GII.3)
9 (3)	SaV(GII.1)	SaV(GII.1)	SaV(GII.1)
10 (4)	SaV(GII.1)	不検出	SaV(GII.1)
11 (10)	SaV(GII.3)	不検出	SaV(GII.3)
12 (5)	SaV(GII.1)	不検出	SaV(GII.1)
13	NoVGII, EV	NoVGII	NoVGII
14	SaV(GI.1), EV	SaV(GI.1)	SaV(GI.1)
15	RVC	不検出	不検出
16	HAdV	HAdV	HAdV
17	NoVGII	NoVGII	NoVGII
18	RVA	不検出	不検出
19	AdV	不検出	不検出
20	不検出	不検出	不検出
21	不検出	不検出	不検出
22	不検出	不検出	不検出
23	不検出	不検出	不検出
24	不検出	不検出	不検出
25	HPeV	不検出	不検出
26	不検出	不検出	不検出
27	不検出	不検出	不検出
28	不検出	不検出	不検出
29	不検出	不検出	不検出
30	NoVGII	NoVGII	NoVGII
31	不検出	不検出	不検出
32	不検出	不検出	不検出
33	不検出	不検出	不検出
34	不検出	不検出	不検出
35	不検出	不検出	不検出
36	不検出	不検出	不検出
37	SaV(GI.1)	SaV(GI.1)	SaV(GI.1)
38	不検出	不検出	不検出
39	不検出	不検出	不検出
40	不検出	不検出	不検出
41	AdV	不検出	不検出
42	EV	不検出	不検出
43	AdV	不検出	不検出
44	NoVGII, HPeV	NoVGII	NoVGII
45	NoVGII	NoVGII	NoVGII

* Ver2.2及びVer2.3以外の遺伝子検出法にて確認され、検体中に存在するウイルス
検体番号の()内の数字は表1の検体番号に対応する

で囲んだ検体は、表1で解析を行った検体

文 献

- [1] Shigemoto N, Fukuda S, et al. Detection of norovirus, sapovirus, and human astrovirus in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers. *Microbiol Immunol.* 2011, 55, 369-372.
- [2] Shigemoto N, Hisatsune Y, et al. Detection of gastroenteritis viruses among pediatric patients in Hiroshima prefecture, Japan, between 2006 and 2013 using multiplex reverse transcription PCR-based assays involving fluorescent dyelabeled primers. *J Virol Methods.* 2017, 89, 791-800.
- [3] 重本直樹, 久常有里, 他. 下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法のアップデート Ver.2.0. 広島県立総合技術研究所 保健環境センター研究報告. 2017, 25, 1-8.
- [4] 重本直樹, 谷澤由枝. 下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.1へのアップデート-広島県の急性胃腸炎患者から検出されるエンテロウイルスの特徴-. 広島県立総合技術研究所 保健環境センター研究報告. 2021, 29, 7-16.
- [5] 末井真菜, 伊藤彩乃, 重本直樹. 多様なサポウイルスを検出するための下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.2. 広島県立総合技術研究所 保健環境センター研究報告. 2022, 30, 7-13.
- [6] Oka T, Wang Q, et al. Comprehensive Review of Human Sapoviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2015, 1, 32-53.
- [7] Tatusov RL, Chhabra P, et al. Human calicivirus typing tool : A web-based tool for genotyping human norovirus and sapovirus sequences. *J Clin Virol.* 2021, 134, 104718.
- [8] Kumar S, Stecher G, et al. MEGA X : Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Bio Evol.* 2018, 35, 1547-1549.
- [9] Kojima S, Kageyama T, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods.* 2002, 100, 107-114.
- [10] Kageyama T, Kogima S, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2003, 4, 1548-1557.
- [11] Nishida T, Nishio O, et al. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol Immunol.* 2013, 51, 177-184.
- [12] Oka T, Yamamoto S, et al. Polymerase chain reaction primer sets for the detection of genetically diverse human sapoviruses. *Arch Virol.* 2020, 165, 2335-2340.
- [13] Sakon N, Yamazaki K, et al. Genomic characterization of human astrovirus type 6 katano virus and the establishment of a rapid and effective reverse transcription-polymerase chain reaction to detect all serotypes of human astrovirus. *J Med Virol.* 2000, 61, 125-131.
- [14] Yamashita T, Sugiyama M, et al. Application of a reverse transcription-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the picornavirus family associated with gastroenteritis in humans. *J Clin Microbiol.* 2000, 38, 2955-2961.
- [15] Nix WA, Maher K, et al. Detection of all known parechoviruses by realtime PCR. *J Clin Microbiol.* 2008, 46, 2519-2524.
- [16] Allard A, Albinsson B, et al. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 1992, 37, 149-157.
- [17] McLeish NJ, Witteveltd J, et al. Development and assay of RNA transcripts of enterovirus species A to D, rhinovirus species A to C, and human parechovirus: assessment of assay sensitivity and specificity of real-time screening and typing methods. *J Clin Microbiol.* 2012, 50, 2910-2917.
- [18] Logan C, O' Leary JJ, et al. Realtime reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clin Microbiol.* 2006, 44, 3189-3195.
- [19] 葛谷光隆, 藤井理津志, 他. 教育研修施設で発生したヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例. *感染症学雑誌.* 2003, 77, 53-59.