

資料

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

末井 真菜, 伊藤 彩乃, 重本 直樹

Update to version 2.2 of multiplex reverse transcription PCR-based assay involving fluorescent dye-labeled primer for gastroenteritis viruses to detect genetically diverse human sapoviruses.

SUEI Mana, ITO Ayano and SHIGEMOTO Naoki

(Received : October 7, 2022)

当センターで開発した下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックス RT-PCR Ver.2.1では検出できないサポウイルスの遺伝子型があることから、サポウイルス検出用プライマーの変更を行い、アップデート版 Ver.2.2とした。また、サポウイルスの遺伝子型別法の検討を行った。

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

緒 言

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、ロタウイルスなどの10種類の下痢症ウイルスを包括的に検査している [1-4]。しかし、近年ヒト由来のサポウイルスについては、当センターで開発し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.2.1 [4] では検出できない遺伝子型 (例: GII. 1, GII. 3) があるため [5]、いずれのウイルスも不検出だった場合、追加でサポウイルスのリアルタイム PCR [6] を行っており、問題となっている。そこで、今回のアップデートでは、不検出であったサポウイルスの遺伝子型に対応するためにサポ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.2.2とした。また、検出されたサポウイルスの流行遺伝子型を特定するためにサポウイルスの遺伝子型別法の見直しを行った。

方 法

1 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 法の A セットの評価には、感染症発生动向調査事業の検査で収集し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 50 検体由来の cDNA を用いた。

2 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 4 μL, 2mM dNTPs 4 μL, 50 μM Random primer pd (N)₉ (タカラバイオ) 1 μL, RNase inhibitor (40U/μL) (TOYOBO) 0.5 μL, ReverTra Ace (100U/μL) (TOYOBO) 1 μL を含む反応液に抽出 RNA 9.5 μL を加え、30℃・10分、42℃・30分、99℃・5分の条件で行った。

3 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 1 に示すプライマー [7-16] 及び濃度の反応液 48 μL に cDNA を 2 μL 加えた。A セットのサポウイルス検出用プライマーにはフォワードが HuSaV-5159F, リバーズが HuSaV-5498R の組み合わせ A (1), フォワードが HuSaV-F1, F2, F3, リバーズが HuSaV-5498R の組み合わせ A (2) の 2 通りを検討した。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。

表1 蛍光マルチプレックス RT-PCR法 Ver.2.2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)	GISKFm	CTGCCCCGAWTWYGTAAATGA		0.4	330	[7]
		G1SKR	CCAACCCARCCATTTRTACA	Alexa488 (緑)	0.4		(slightly modified)
	ノロウイルス GII (NoVGII)	G2SKF	CNTGGGAGGGCGATCCCAA	Alexa594 (赤)	0.4	344	[7]
		G2SKR	CCRCNGCATRHCCRTTRTACAT		0.4		
	サボウウイルス (SaV)	G2ALSKR	CCACCAGCATA TGAATTGTACAT		0.2		[8]
		HuSaV-5159F (1)	TAGTGTTTGARATGGARGG		0.4	340	[9]
		HuSaV-5498R (2)	CCCCANCCNGCVHACAT	Alexa532 (黄)	0.4		(slightly modified)
		HuSaV-F1	GGCHCTYGCCACCTAYAAAYG		0.4	420	
		HuSaV-F2	GACCARGCHCTCGYACCTAYGA		0.4		
		HuSaV-F3	GCWRYKGCWGTGYTAYAACAGC		0.4		
	HuSaV-5498R	CCCCANCCNGCVHACAT	Alexa532 (黄)	0.4			
B	アストロウイルス (HAstV)	AC1	ATGGCTAGCAAGTCTGACAAG	Alexa350 (青)	0.2	230	[10]
		AC230	GGTTTTGGTCCTGTGACACC		0.2		
	アイチウイルス (AIV)	C (+) 6261	ACACTCCCACCTCCCGCCAGTA	Alexa488 (緑)	0.4	519	[11]
		C (-) 6779	GGAAGAGCTGGGTGTCAAGA		0.4		
	パレコウイルス (HPeV)	AN345	GTAACASWWGCCTCTGGGCCAAAAG		0.4	195	[12]
		AN344	GGCCCCWGRTCAGATCCAYAGT	Alexa594 (赤)	0.4		
	アデノウイルス (AdV)	Ad-A1m	GCCGCARTGGTCTTACATGCACATC	Alexa546 (橙)	0.2	300	[13]
		Ad-A2	CAGCAGCCGGGGATGTCAAAAGT		0.2		(slightly modified)
	エンテロウイルス (EV)	EV-Fm	GCCCCTGAATGCGGCTAAATC		0.4	148	[14]
		EV-Rm	ATTGTCACCATWAGCAGYCA	Alexa532 (黄)	0.4		(slightly modified)
C	A 群ロタウイルス (RVA)	RotaA-fwd1	GGATGTCCTCTACTCCTTGTCAAAA	Alexa488 (緑)	0.4	145	[15]
		RotaA-fwd2	GGAGGTTCTGTACTCATGTCAAAA	Alexa488 (緑)	0.4		
	C 群ロタウイルス (RVC)	RotaA_rev1	TCCAGTTTGGAACTCATTTCCA		0.4		
		RotaA_rev2	TCCAGTTTGGAAAGTCATTTCCATT		0.4		
		G8NS1	ATTATGCACAGACTATCGCCAC		0.4	351	[16]
		G8NA2	GTTTCTGTACTAGCTGGTGAAC	Alexa594 (赤)	0.4		

表2 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	含有ウイルス (Ver. 2.1の結果)	A (1) セット		A (2) セット
		HuSaV-5159F HuSaV-5498R		HuSaV-F1, -F2, -F3 HuSaV-5498R
1	不検出	-	-	-
2	不検出	-	-	-
3	不検出	-	-	-
4	不検出	-	-	-
5	NoVGII	NoVGII		NoVGII
6	SaV	SaV		SaV
7	不検出	-	-	-
8	不検出	-	-	-
9	NoVGII	NoVGII		NoVGII
10	不検出	-	-	-
11	NoVGII	NoVGII		NoVGII
12	不検出	-	-	-
13	NoVGII	NoVGII		NoVGII
14	NoVGII	NoVGII		NoVGII
15	NoVGII	NoVGII		NoVGII
16	不検出	-	-	-
17	不検出	-	-	-
18	不検出	-	-	-
19	不検出	-	-	-
20	不検出	-	-	-
21	不検出	-	-	-
22	不検出	-	-	-
23	不検出	-	-	-
24	不検出	-	-	-
25	不検出	-	-	-
26	不検出	-	-	-
27	AdV,HPeV	-	-	-
28	HPeV	-	-	-
29	不検出	-	-	-
30	不検出	-	-	-
31	不検出	-	-	-
32	NoVGII	NoVGII		NoVGII
33	不検出	-	-	-
34	RVA	-	-	-
35	不検出	-	-	-
36	HAstV	HAstV		HAstV
37	RVC	-	-	-
38	SaV, EV	SaV		SaV
39	NoVGI	NoVGI		NoVGI
40	不検出	SaV ^{*1}		-
41	不検出	SaV ^{*1}		-
42	HAstV	HAstV		HAstV
43	SaV, EV	SaV		- ^{*2}
44	SaV, HAstV	SaV, HAstV		HAstV ^{*2}
45	不検出	-	-	-
46	不検出	SaV ^{*1}		-
47	NoVGII	NoVGII		NoVGII
48	SaV	SaV		SaV
49	SaV	SaV		SaV
50	NoVGI, SaV	NoVGI, SaV		NoVGI ^{*2}

*1 Ver. 2.1では不検出のサポウイルスが検出された。

*2 Ver. 2.1で検出されたサポウイルスが不検出となった。

表3 遺伝子型別用PCRのアニーリング温度の検討

アニーリング温度	検体希釈率				
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
53℃	+	+	+	-	-
55℃	+	+	+	-	-
57℃	+	+	+	+	-

	5' 3'																													
SV-F21m1 (Ver2. 1)	C	A	A	A	W	T	A	G	T	G	T	T	T	G	A	R	A	T	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G		
SV-F21m2 (Ver2. 1)	G	C	T	A	T	T	A	G	T	G	T	T	T	G	A	R	A	T	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	
GI. 1 X86560	C	A	A	A	A	T	A	G	T	G	T	T	T	G	A	G	A	T	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	
GI. 2 AB614356
GI. 3 AB623037	G
GI. 4 AJ606693	A	.	.
GI. 5 DQ366345
GI. 6 AJ606694
GI. 7 AB522390	.	C
GII. 1 AJ249939
GII. 2 AY237420
GII. 3 AB630068
GII. 4 AB522397
GII. 5 LC190463
GII. 6 AY646855
GII. 7 AB630067
GII. 8 KX894315
GIV. 1 DQ058829
GV. 1 DQ366344
GV. 2 AB775659	A

	3' 5'																														
SV-R2 (Ver2. 1)	C	C	A	C	C	W	G	G	K	G	T	T	G	A	Y	C	C	C	W	C											
GI. 1 X86560	C	C	A	C	C	T	G	G	G	G	T	T	G	A	C	C	C	C	A	C											
GI. 2 AB614356
GI. 3 AB623037	.	.	G	.	.	C	G	
GI. 4 AJ606693	A	
GI. 5 DQ366345	A	
GI. 6 AJ606694	
GI. 7 AB522390	G	
GII. 1 AJ249939	C	A	G	G	
GII. 2 AY237420	C	.	.	A	.	.	.	G	A	G	
GII. 3 AB630068	.	.	T	C	A	A	G	
GII. 4 AB522397	A	G	G	
GII. 5 LC190463	C	.	.	.	C	A	G	G	
GII. 6 AY646855	.	.	T	C	A	A	G	
GII. 7 AB630067	A	.	.	.	A	T	G	
GII. 8 KX894315	G	.	.	C	.	.	G	A	T	G	
GIV. 1 DQ058829	.	.	C	.	.	G	.	.	.	T	.	G	A	
GV. 1 DQ366344	.	.	T	A	.	.	.	A	
GV. 2 AB775659	.	.	T	A	.	.	.	A	

図1 Ver. 2.1 サポウイルスプライマーとヒト由来サポウイルスの塩基配列比較

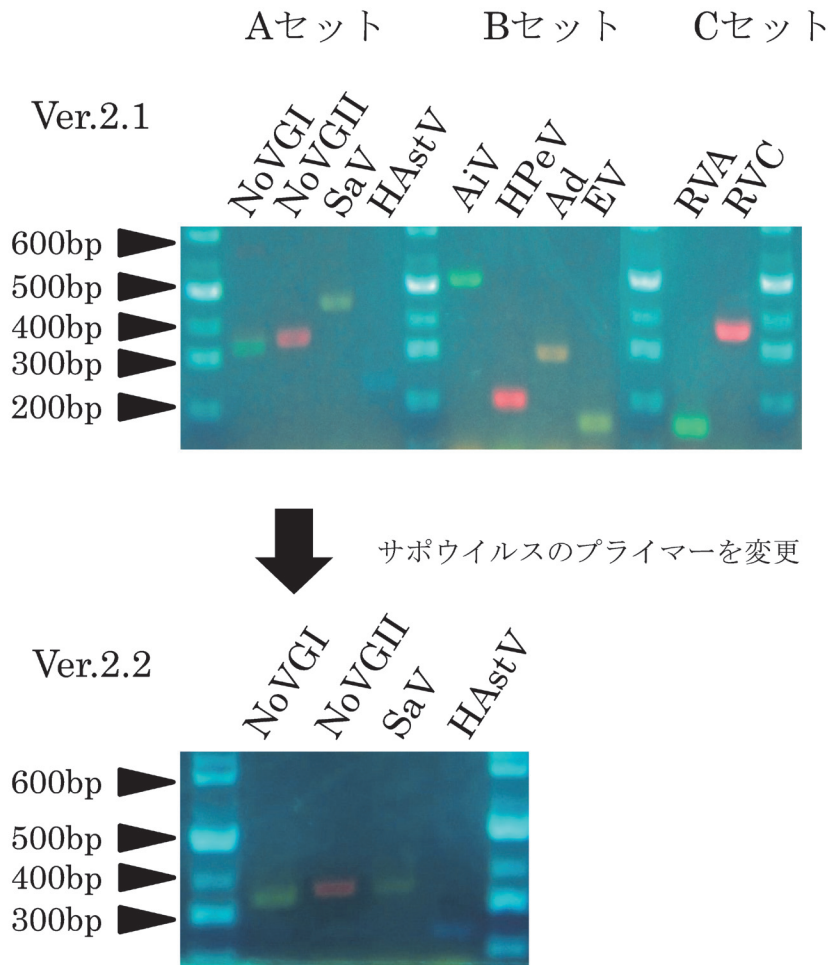


図2 蛍光マルチプレックスRT-PCR法 Ver.2.1から Ver. 2.2への変更点

4 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10 μ Lをアプライした。サイズマーカーには100bpラダー (MAESTOROGEN) 10 μ Lに1 μ LのEzVISION (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。

5 サポウウイルスの遺伝子型別法の検討

サポウウイルス陽性検体1検体 (GIL 3) のcDNAを10倍段階希釈してテンプレートとし、PCR試薬にAmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix UP (Applied Bio systems)を用いた。Okaraの報告[9]のプライマーHuSaV-5159FとHuSaV-5498Rを用い、アニーリング温度を変えた3つのPCR反応条件(95 $^{\circ}$ C・10分→96 $^{\circ}$ C・3秒, 53 $^{\circ}$ C, または55 $^{\circ}$ C, または57 $^{\circ}$ C・30秒, 68 $^{\circ}$ C・5秒)×40サイクル→72 $^{\circ}$ C・10分)で

増幅反応を行った。次に340bpの増幅産物について常法によりシーケンスを行い、得られた配列を用いて、Human Calicivirus Typing Tool [17] (<https://calicivirustypingtool.cdc.gov/>)にて型別を実施した。

結 果

従来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.2.1では検出されないサポウウイルスの遺伝子型があったため、サポウウイルス検出用プライマーの変更を行った。検体中のウイルスが判明している50検体をA(1)セットと、A(2)セットを用いて検証したところ表2に示すような結果となった。A(1)セットでは、Ver.2.1では検出されていなかったサポウウイルスが3件検出された以外は全ての検体で正しく検出された。一方でA(2)セットでは、Ver.2.1で検出されていたサポウウイルス3件が検出されなかった。

サポウウイルスの遺伝子型別用PCRの増幅効率の良いアニーリング温度の検討では、57 $^{\circ}$ Cでのみ10 $^{-4}$ ま

でバンドを確認することができた(表3)。また、この340bpの増幅産物のシーケンスを用いることにより、Human Calicivirus Typing Toolでの型別が可能であった。

考 察

当センターで使用している蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.1のサポウイルスのプライマーのフォワード側とリバース側の塩基配列とヒト由来サポウイルスの各遺伝子型の塩基配列を比較したところ、フォワード側では最大1塩基、リバース側では最大6塩基相違があった(図1)。特にGIIでは少なくとも3塩基以上の相違があった。このため、現行のVer.2.1では遺伝子型によっては検出できない型があったと考えられ、蛍光マルチプレックスRT-PCR法のアップデートが必要であった。

Okaらの報告[9]にあるPCR用のプライマーをもとに、A(1)とA(2)のプライマーセットについて、含有ウイルスが判明している検体を用いて検討したところ、A(1)セットでは、Ver.2.1で検出されたウイルスと、Ver.2.1では検出されなかったサポウイルス3検体が新たに検出された。一方でA(2)セットでは、Ver.2.1で検出されていたサポウイルス3件とA(1)セットでは検出されたサポウイルス3件の計6件が不検出であった。これらの結果からサポウイルスのプライマーはA(1)セットのフォワードプライマーHuSaV-5159FとリバースプライマーHuSaV-5498Rが適していると考えられ、サポウイルス検出プライマーを本プライマーセットに変更し、蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver.2.2(以下Ver.2.2)とした。Ver.2.2の泳動パターンを図2に示した。Ver.2.2のAセットはノロウイルスGIとGIIの増幅産物のサイズがそれぞれ330bp、344bpであり、サポウイルスの増幅産物のサイズが340bpのため、3種のウイルスの増幅バンドが非常に近接しているが、増幅バンドの色により識別が可能であった。しかしながら、感染症発生动向調査における感染性胃腸炎では複数のウイルスが同時に検出されることもあり、サポウイルスとノロウイルスの混合感染の場合、蛍光バンドが重なって見えるため、結果の判定が困難であると思われる。そのため、ノロウイルスとサポウイルスの混合感染事例に対応するためには、新たなプライマーの組み合わせの検討などが必要であると考えられた。

サポウイルスの遺伝子型別用PCR法のアニーリング温度の検討では、57℃が最適であり、また、得られた増幅産物のシーケンスをWebベースのHuman

Calicivirus Typing Toolで解析することで、サポウイルスの遺伝子型を特定することができた。今後は、Ver.2.2を活用しながら、過去に検出されたサポウイルスを含め流行遺伝子型の変遷を明らかにしていく予定である。

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 dye-labeled 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] 鈴藤和, 谷澤由枝, 他. 原因不明の集団胃腸炎事案及び食中毒事案におけるサポウイルスのブロードリアクティブ・リアルタイムPCRを用いた遡り調査. 広島県立総合技術研究所 保健環境センター研究報告. 2020, 28, 1-5.
- [6] Oka T, Iritani N, et al. Broadly reactive real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of human sapovirus genotypes. *J Med Virol.* 2019, 91, 370-377.
- [7] Kojima S, Kageyama T, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods.* 2002, 100, 107-114.
- [8] 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.

- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Nix WA, Maher K, et al. Detection of all known parechoviruses by realtime PCR. *J Clin Microbiol.* 2008, 46, 2519-2524.
- [13] 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.
- [14] McLeish NJ, Witteveldt 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Tatusov R, 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.