

感染性胃腸炎ウイルスの多種同時検査の実用化に関する研究

【保健衛生室】

山根拓也、市川利奈

要旨

感染性胃腸炎を引き起こす代表的なウイルスとして、ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス等が挙げられる。ノロウイルスを除いた感染性胃腸炎ウイルス6種（サポウイルス、A群ロタウイルス、腸管系アデノウイルス、C群ロタウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルス）を対象に、同時検出可能なmultiplex real-time PCR法について、先行研究が行われている¹⁾。このmultiplex real-time PCR法を当所においても導入するべく、既報¹⁾に従い、検討を行ったところ、良好な遺伝子増幅反応を確認した。当所において、検査法導入済みのサポウイルス、A群ロタウイルス、腸管系アデノウイルスは現行法と比較して検出下限について劣っていないこと、もしくは、優れていることを確認した。2018年12月から2019年12月までに採取された感染性胃腸炎疑い小児散発例患者100検体の内、51検体からノロウイルスを除く感染性胃腸炎ウイルスを検出した（※重複感染を含む）。現行法等で得られた結果と本法で得られた結果が一致した割合を算出したところ、いずれのウイルス種においても良好な一致率が得られた。よって、本法の導入により、ノロウイルスを除く感染性胃腸炎ウイルスの検査に要する時間を大幅に短縮可能となった。有用性の高い検出系であると考えられた。

1 はじめに

感染性胃腸炎は、鳥取県においても毎年患者発生数が多い疾病の一つである。原因となるウイルスは、ノロウイルスをはじめとした、サポウイルス、ロタウイルス等が挙げられる。現状、感染性胃腸炎の行政検査で原因ウイルス同定の迅速検査法を導入済みの検査項目は、ノロウイルス、サポウイルス、A群ロタウイルス及び腸管系アデノウイルスである。ノロウイルス、サポウイルスはリアルタイムPCR法、A群ロタウイルス及び腸管系アデノウイルスはELISA法により検査を実施している。各ウイルスの個別での検査実施は煩雑であり、多くの時間を要する。そのため、食中毒等の緊急検査では、迅速かつ多様な検査対応が困難となる。そこで、ノロウイルスを除く感染性胃腸炎ウイルス6種（サポウイルス、A群ロタウイルス、腸管系アデノウイルス、C群ロタウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルス）を対象に、同時検出可能なmultiplex real-time PCR法（以下、本法とする）について、先行研究¹⁾に準じ、当所においても導入を図ることを目的と

した。導入により、結果判定までに要する時間の短縮、同時に行える検査項目の増加、検査に必要な人員の抑制が期待できるためである。今回、2018年12月から2019年12月までに採取された感染性胃腸炎疑い小児散発例患者100検体を用いて検討したので、概要を報告する。

2 材料及び方法

2.1 材料

2018年12月から2019年12月までに鳥取県内で採取された感染性胃腸炎疑い小児散発例患者の糞便100検体を用いた。

サポウイルス及びC群ロタウイルスの陽性対照検体については、国立感染症研究所より分与された濃度既知のプラスミドを用いた。A群ロタウイルス、腸管系アデノウイルス、アストロウイルス及びエンテロウイルスについては、過去に当所で試験を実施して陽性となった検体を用いた。

2.2 方法

検体輸送用培地（VIB 培地：Veal Infusion Broth）に入った糞便検体を、0.45 μ m のフィルターでろ過し、得られたものを検体とした。

QIAamp Viral RNA mini kit[QIAGEN]を用いて、試料から核酸を抽出した。その核酸 10 μ L をテンプレートとして、表 1 に示す試薬の割合で PrimeScript™ RT reagent Kit[タカラバイオ]を用いて、反応液を調製し、逆転写反応により cDNA を合成した²⁾。なお、37°C：15 分、85°C：5 秒、4°C：forever で処理する反応条件で行った。

得られた cDNA 2 μ L をテンプレートとして、表 2 に示す試薬の割合で、QuantiTect2 \times Multiplex PCR Master mix[QIAGEN]を用いて、反応液を調製し、95°C：15 分、94°C：60 秒及び 57°C：90 秒を 45 回処理する反応条件で、multiplex real-time PCR を実施した。リアルタイム PCR 装置は、リアルタイム PCR システム 7500 [サーモフィッシャーサイエンティフィックライフテクノロジーズジャパン]を使用した。

プライマー及びプローブは既報¹⁾ に示されているものを使用した。また、これらのプライマー及びプローブを、サポウイルス、C 群ロタウイルス及びアストロウイルスの組み合わせ、A 群ロタウイルス、腸管系アデノウイルス及びエンテロウイルスの組み合わせで使用した。

反応時間内に増幅曲線の立ち上がりが見られた場合を陽性、立ち上がりを確認できない場合は陰性とした。

まず、陽性対照検体を用いて、反応条件の検証を行った。サポウイルス、A 群ロタウイルス及び腸管系アデノウイルスについては、現行法との検出下限の比較検討を行った。その他 3 項目については、現行法が存在しないため、現行法との比較検討は実施できなかった。

次に、臨床検体を 100 検体用いて、現行法もしくは参考試験法で得られた結果と本法で得られた結果との一致率を算出した。なお、サポウイルスはリアルタイム PCR 法、A 群ロタウイルス及び腸管系アデノウイルスは ELISA 法を現行法とした。その他 3 項目については、現行法が存在しないため、C 群ロタウイルスは Nested-PCR 法³⁾、アストロウイルスはコンベンショナ

ル PCR 法⁴⁾、エンテロウイルスは Nested-PCR 法⁵⁾を参考試験法とした。

3 結果及び考察

3.1 反応条件の検証と検出下限について現行法との比較検討

陽性対照検体を用いて、既報に準じた反応条件で検討したところ、全てのウイルスについて、良好な反応を確認した。よって、プライマー・プローブ濃度を 0.2 μ M、95°C：15 分、94°C：60 秒及び 57°C：90 秒を 45 回処理する反応条件で、検出下限等について検討を進めることとした。

陽性対照検体の段階希釈を行い、得られた各濃度の検体を用いて、検出下限の検討を行った。陽性対照検体がプラスミドの場合は遺伝子工学用水、臨床検体の場合は VIB 培地を用いて段階希釈を行った。

サポウイルスでは、現行法と比較した結果、両法ともに検出下限濃度は 1.0×10^4 copy/2.5 μ L であった。したがって、現行法と比較して、検出下限について劣っていないことを確認した。

A 群ロタウイルスでは、現行法は陽性検体の 200 倍希釈まで検出可能であったのに対して、本法では陽性検体の 1000 倍希釈まで検出可能であった。したがって、現行法と比較して、本法では低濃度の陽性検体を検出できることを確認した。

腸管系アデノウイルスでは、現行法は陽性検体の 20 倍希釈まで検出可能であったのに対して、本法では陽性検体の 1000 倍希釈まで検出可能であった。したがって、現行法と比較して、本法では低濃度の陽性検体を検出できることを確認した。

3.2 臨床検体を用いた現行法等との結果の一致率の算出

2018 年 12 月から 2019 年 12 月の間に採取された感染性胃腸炎疑い小児散発例患者糞便 100 検体について、本法と現行法又は参考試験法との 2 法で検査を実施した。現行法及び参考試験法では、31 検体からノロウイルスを除く感染性胃腸炎ウイルスを検出した。一方、本法では、51 検体からノロウイルスを除く感染性胃腸炎ウイルスを検出した（※重複感染を含む）。現行

法又は参考試験法で得られた結果が、本法で得られた結果と一致した検体の割合を算出した。各ウイルスについて、得られた結果は表3から表8のとおりであった。

現行法等で陽性となった検体が、本法でも陽性であった割合は、サポウイルスが100%、A群ロタウイルスが100%、腸管系アデノウイルスが100%、C群ロタウイルスが算出不可、アストロウイルスが75%、エンテロウイルスが82%であった。

一方、現行法等で陰性となった検体が、本法でも陰性であった割合は、サポウイルスが100%、A群ロタウイルスが94%、腸管系アデノウイルスが87%、C群ロタウイルスが100%、アストロウイルスが88%、エンテロウイルスが96%であった。

サポウイルスについては、いずれも100%であったため、現行法に対して同等の精度を有していることが考えられた。

A群ロタウイルス及び腸管系アデノウイルスについては、陽性の一致率が100%であったことから現行法と比較して同等の精度を有していることが考えられた。また、陰性の一致率については、現行法と比較して本法のほうが低濃度の検体を検出可能であることが寄与していることが考えられた。

C群ロタウイルス、アストロウイルス及びエンテロウイルスについては、参考試験法による結果との一致率を算出したところ、比較的良好的な値であった。

4 今後の課題

A群ロタウイルスについて、本法で検討したプライマー・プローブセットは、NSP3遺伝子をターゲットにしている。このプライマー・プローブセットでは、NSP3遺伝子のT3型を検出できないことが判明した⁶⁾。そのため、T3型も検出可能なプライマー・プローブセットで検討する必要がある。

濃度既知のプラスミドを入手できていないA群ロタウイルス、腸管系アデノウイルス、アストロウイルス及びエンテロウイルスについては、定量的な検出下限の探索を行えていない。したがって、本法により何コピーまでなら検出可能

かについて、定量的な把握はできていない。そのため、判定困難な場合等については、状況に応じて、参考試験法等で対応する必要があるといえる。

5 まとめ

感染性胃腸炎の病原体としては、細菌、ウイルスや寄生虫等が挙げられ、多種多様である。そこで、先行研究に準じて、ノロウイルスを除く胃腸炎ウイルス6種（サポウイルス、A群ロタウイルス、腸管系アデノウイルス、C群ロタウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルス）を検出できる検査系の導入を図るべく、検討を行った。本法導入により、これらの胃腸炎ウイルスの検索に要する時間の削減が可能となった。なお、A群ロタウイルス及び腸管系アデノウイルスについて、ELISA法を現行法として採用していたが、検査試薬が2020年1月末頃をもって、販売終了となった。以上より、現行法による継続的な検査実施が困難となったことから、本法は代替法として導入の必要性は高く、有用性の高い検査系と考えられた。

6 参考文献

- 1) 小和田和誠 他, Multiplex real-time PCR を利用した胃腸炎ウイルス検査の検討, 福井県衛生環境研究センター年報, 10, 40-44, 2011.
- 2) 国立感染症研究所, 病原体検出マニュアル ノロウイルス (第1版), 2019.
- 3) 野口やよい 他, C群ロタウイルスの検出された集団胃腸炎事例の検討, 東京都立衛生研究所研究年報, 53, 28-32, 2002.
- 4) 原田誠也 他, サポウイルス、アストロウイルス及びアイチウイルス同時検出 RT-multiplex PCR 法の構築と下痢症起因ウイルスの検査成績, 熊本県保健環境科学研究所報, 34, 31-36, 2004.
- 5) 西村順裕 他, CODEHOP PCR によるエンテロウイルス同定, 国立感染症研究所ウイルス第二部. IASR, 30, 12-13, 2009.
- 6) 藤井克樹, ロタウイルスワクチン定期接種化とサーベイランス (検査方法について), 令和元年度希少感染症診断技術研修会発表資料, 2020.

表 1. RT 反応調製液

試薬	容量 (μl)
核酸	10
5×PrimeScript Buffer(for Real Time)	4
Random 6 mers(100μM)	4
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1
DDW	1
Total	20

表 2. リアルタイム PCR 反応調製液

試薬	容量 (μl)
核酸	2
QuantiTect2×Multiplex PCR Master mix	10
Primer/Probe set (各 0.2μM)	3
DDW	5
Total	20

表 3. 本法及び現行法で得られた結果 (サポウイルス)

サポウイルス		現行法 (リアルタイム PCR 法)		計
		陽性	(-)	
本法	陽性	3	0	3
	(-)	0	97	97
計		3	97	100

表 4. 本法及び現行法で得られた結果 (A 群ロタウイルス)

A 群ロタウイルス		現行法 (ELISA 法)		計
		陽性	(-)	
本法	陽性	5	6	11
	(-)	0	89	89
計		5	95	100

表 5. 本法及び現行法で得られた結果 (腸管系アデノウイルス)

腸管系アデノウイルス		現行法 (ELISA 法)		計
		陽性	(-)	
本法	陽性	2	13	15
	(-)	0	85	85
計		2	98	100

表 6. 本法及び参考試験法で得られた結果 (C 群ロタウイルス)

C 群ロタウイルス		参考試験法 (Nested-PCR 法)		計
		陽性	(一)	
本法	陽性	0	0	0
	(一)	0	100	100
計		0	100	100

表 7. 本法及び参考試験法で得られた結果 (アストロウイルス)

アストロウイルス		参考試験法 (コンベンショナル PCR 法)		計
		陽性	(一)	
本法	陽性	3	12	15
	(一)	1	84	85
計		4	96	100

表 8. 本法及び参考試験法で得られた結果 (エンテロウイルス)

エンテロウイルス		参考試験法 (Nested-PCR 法)		計
		陽性	(一)	
本法	陽性	14	3	17
	(一)	3	80	83
計		17	83	100

Examination for practical application of Multiplex real-time PCR for detecting gastroenteritis virus in Human Feces

Takuya YAMANE, Rina ICHIKAWA

Abstract

Typical viruses that cause infectious gastroenteritis include norovirus, sapovirus, rotavirus and so on. Previous study has reported that a multiplex real-time PCR assay for detecting six kinds of infectious gastroenteritis viruses excluding norovirus (sapovirus, group A rotavirus, intestinal adenovirus, group C rotavirus, astrovirus, enterovirus) at the same time. In order to introduce this multiplex real-time PCR assay, we conducted the study according to the previous study. As the result, we confirmed good reactions. We confirmed that this multiplex real-time PCR assay is not inferior or superior to the current method in terms of the lower limit of detection for sapovirus, group A rotavirus, and intestinal adenovirus. We detected infectious gastroenteritis virus excluding norovirus in 51 samples of 100 samples which were collected from sporadic pediatric patients with suspected infectious gastroenteritis from December 2018 to December 2019 (* including superinfection). We calculated the ratio that the results obtained by the current method or the reference method dovetailed with the results obtained by this multiplex real-time PCR assay. As the result, we obtained good concordance ratios for six viruses. Therefore the introduction of this assay has made it possible to significantly reduce the time required for detecting infectious gastroenteritis viruses excluding norovirus. In conclusion, the present study has demonstrated that highly useful detection system.