＝短 報＝

LightCycler[®]を用いたノロウイルス遺伝子検出法の検討

森田幸雄^{*1,†}・藤田雅弘^{*1}・斎藤美香^{*1}・塚越博之^{*1}・星野利得^{*1}
加藤政彦^{*1}・小澤邦寿^{*1}・西尾 治^{*2}・木村博一^{*2}

(^{*1}群馬県衛生環境研究所, ^{*2}国立感染症研究所感染症情報センター)

(受付: 平成 19 年 4 月 26 日)

(受理: 平成 19 年 9 月 21 日)

Detection Assays of *Norovirus* Genome Using LightCycler[®]

Yukio MORITA^{*1,†}, Masahiro FUJITA^{*1}, Mika SAITO^{*1},
Hiroyuki TSUKAGOSHI^{*1}, Toshie HOSHINO^{*1}, Masahiko KATO^{*1},
Kunihisa KOZAWA^{*1}, Osamu NISHIO^{*2} and Hirokazu KIMURA^{*2}

(^{*1}Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 378
Kamioki, Maebashi, Gunma 371-0052; [†]Corresponding author)

(^{*2}National Institute of Infectious Disease, Infectious Disease Surveillance Center, 4-7-1
Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011)

In 2003, the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan presented the official assay using ABI PRISM 7000[®] for the detection of *Norovirus* (NV) genogroups I (GI) and II (GII). We have recently modified the official assay and, using LightCycler[®] PCR equipment, have developed the “LC cDNA” and “LC One-Step” detection assays. These two assays enabled detection and quantitation of the NV genome within 6 hrs using the LC cDNA assay, and within 3 hr using the LC One-Step assay. The primers and probes used in both assays were identical to those used in the official assay, because there are no idiosyncrasies between them. The detection limits of our assays for the GI and GII genomes were 10 copies/5 μ l. Results of field samples using both the LC cDNA and One-Step assays were the same. In correlation analysis between log transformed genome copy numbers of the LC cDNA and One-Step assays, fecal samples from food poisoning cases ($n=27$) were $y=0.9627x-0.1034$ ($R^2=0.9888$), and patient samples from a hospital ($n=22$) were $y=1.0064x-0.3473$ ($R^2=0.9610$). Utilizing LightCycler[®] PCR equipment, our assays detected NV GI and GII. In particular, the One-Step assay could detect within 3 hrs; hence, it is a very useful laboratory technique for the detection of NV from field samples.

Key words: LightCycler[®] PCR equipment, *Norovirus*, One-Step Real-Time PCR assay

緒 言

カリシウイルス科に属するノロウイルス (*Norovirus*, 以下「NV」と略) は 1968 年に米国オハイオ州ノーウォークの小学校で発生した集団胃腸炎から検出され, 1972 年に免疫電子顕微鏡下でその形態が明らかになった²⁾. 今日, わが国における NV 感染症は小児や高齢者のみならず, 全年齢層において発生しており, 本ウイルスは「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関

する法律」の 5 類感染症の感染性胃腸炎の原因物質の一つとして重要であると推定される. さらに, NV は「食品衛生法」において平成 9 年 5 月から食中毒原因物質として取扱われるようになり, 平成 16 年の食中毒統計 (<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04hassei/xls/04hassei.xls>) では, 全国で発生した食中毒 (患者数 28,175 名, 事件数 1,666 件) のうち, NV によるものは 12,537 名 (44.5%), 277 件 (16.6%) で, 患者数は第 1 位, 事件数はカンピロバクター (558 件) に次いで第 2 位であり, 食品衛生学的に重要なウイルスである. よって, NV は感染症・食中毒の両面から原因物質として同定検査を実施する必要性が高く, さらに, 防疫

[†] 連絡先

^{*1} ☎371-0052 前橋市上沖町 378

^{*2} ☎208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

対策や行政処分を早期に講じるために、正確で迅速な検査が求められている。

NV は培養細胞や実験動物への感染がいまだに成功していないウイルスで、ヒトが唯一の感受性動物であるといわれている^{1,5)}。今日、NV の検出には遺伝子学的検出法が汎用されている。厚生労働省は「ノロウイルス検出法について」(医薬品食品局食品安全部監視安全課長通知, 食安監発第 1105001 号, 平成 15 年 11 月 5 日)の中で, ABI PRISM 7000[®] (Applied Biosystems) を検出器として使用した「リアルタイム PCR 法によるノロウイルスの定量的検出法」(以下「公定法」と略)を提示している⁴⁾。公定法は, 検体から RNA を抽出し DNase 処理を実施後, RT 反応によって cDNA を合成, 次にリアルタイム PCR を用いてその cDNA を増幅検出するものであり, 測定結果が得られるまで約 6 時間を要し, さらに抽出 RNA も cDNA 合成時には約 2.5 倍希釈となっている。

LightCycler[®] (以下, LightCycler[®] 表記のものは Roche Diagnostics) はキャピラリー内で短時間に標的遺伝子を増幅し, 検出するリアルタイム PCR 装置である。われわれは, 公定法に従い cDNA を合成後, LightCycler[®] を用いて検出する方法 (以下「LC cDNA 法」と略), および, キャピラリー内で抽出 RNA を One-step 反応で cDNA に合成, 増幅し LightCycler[®] を用いて検出する方法 (以下「LC One-Step 法」と略) の 2 つの検出系を検討したので以下に概要を報告する。

材料および方法

1. LC cDNA 法および LC One-Step 法で用いたプライマー, プローブ, 試薬, 組成, 反応条件および機器等

LC cDNA 法および LC One-Step 法で使用したプライマーおよびプローブを Table 1 に, 組成ならびに反応条件を Table 2 に示した。両方法ともに, カプシド領域を増幅・検出するプライマーおよびプローブで, 公定法と同じものを用いた。

LC cDNA 法は, 公定法に準じて検体から RNA を抽

出後, DNase 処理, RT 反応を実施し, 得られた cDNA をテンプレートにして, LightCycler[®] FastStart DNA Master Hyb Probe を用いて反応液を作製した。反応は 95°C, 10 分を 1 回, 次いで 95°C, 10 秒, 60°C, 25 秒を 45 回, その後 40°C, 30 秒を実施した。

LC One-Step 法は公定法に準じて検体から抽出した RNA をテンプレートにして, LightCycler[®] RNA Amplification Kit Hybridization Probes を用いて反応液を作製した。反応は 52°C, 10 分, 95°C, 30 秒を 1 回, 次いで 95°C, 10 秒, 60°C, 25 秒を 45 回, その後 40°C, 30 秒を実施した。

検出機器は LightCycler[®] DX-400 を用いた。検出・分析は LightCycler[®] Software ver. 4.0 を用いた。

条件設定および野外検体測定に際して, 外部標準として国立感染症研究所感染症情報センター第六室より提供された NVGI および GII コントロールプラスミド DNA (以下「標準 DNA」と略)を用いた。なお GI 標準 DNA はプライマー COG1F と G1SKR で増幅される 381 bp (GenBank Accession No. M87661, Position 5291–5671) および GII 標準 DNA はプライマー COG2F と G2SKR で増幅される 387 bp (X86557, Position 5003–5389) である³⁾。

2. LC cDNA 法と LC One-Step 法の検出条件および検出限界値の測定

検量線および検出限界値の測定は, GI および GII それぞれの標準 DNA を $10^1 \sim 10^7$ copies/ $5 \mu\text{l}$ になるように希釈し, これらの検体と陰性対照 (DNA/RNA-Free の精製水) について, LC cDNA 法と LC One-Step 法とを 5 回ずつ実施した。

3. LC cDNA 法および LC One-Step 法の野外検体測定結果の比較

平成 17 年 11 月から平成 18 年 6 月の間に, 小児科定点等から感染性胃腸炎として搬入されロタウイルスおよびアデノウイルス感染症を否定した感染症由来検体 (42 検体), および, 食中毒由来検体 (37 検体), 計 79 検体

Table 1. Nucleotide sequences of primers and TaqMan probes used in this study

Geno/groups	Primer or probe	Nucleotide sequence	Position	Sense***
GI	Primer COG1F	5'-CGYTGGATGCGNTTYCATGA-3'	5291*	+
	Primer COG1R	5'-CTTAGACGCCATCATCATTYAC-3'	5375*	—
	Probe RING1(a)-TP	5'-FAM-AGATYGCATCYCCTGTCCA-TAMRA-3'	5340*	—
	Probe RING1(b)-TP	5'-FAM-AGATCGCGGTCTCCTGTCCA-TAMRA-3'	5340*	—
GII	Primer COG2F	5'-CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG-3'	5003**	+
	Primer ALPF	5'-TTTGAGTCCATGTACAAGTGGATGCG-3'	5003**	+
	Primer COG2R	5'-TCGACGCCATCTTCATTCACA-3'	5100**	—
	Probe RING2AL-TP	5'-FAM-TGGGAGGGGSGATCGCRATCT-TAMRA-3'	5048**	+

* Position number of 5' end on GenBank accession no. M87661 (Norwalk/68 virus).

** Position number of 5' end on GenBank accession no. AF145896 (Camberwell virus).

*** +, virus sense; —, anti-virus sense.

Table 2. Component of *Norovirus* GI or II by LC cDNA assay and LC One-Step assay

Geno/group	Component and concentration	LC cDNA assay**	LC One-Step assay***
		Volume	Volume
GI	H ₂ O	6.6 μ l	2.6 μ l
	25 mM MgCl ₂	2.4 μ l	4.0 μ l
	Primer COG1F	1.0 μ l	1.0 μ l
	Primer COG1R	1.0 μ l	1.0 μ l
	Probe RING1(a)-TP	1.0 μ l	1.0 μ l
	Probe RING1(b)-TP	1.0 μ l	1.0 μ l
	LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	2.0 μ l	—
	LightCycler® RT-PCR Reaction Mix HybProbe	—	4.0 μ l
	LightCycler® RT-PCR Enzyme Mix	—	0.4 μ l
	Template*	5.0 μ l	5.0 μ l
Total		20.0 μ l	20.0 μ l
GII	H ₂ O	4.8 μ l	1.6 μ l
	25 mM MgCl ₂	3.2 μ l	4.0 μ l
	Primer COG2F	1.0 μ l	1.0 μ l
	Primer ALPF	1.0 μ l	1.0 μ l
	Primer COG2R	1.0 μ l	1.0 μ l
	Probe RING2AL-TP	2.0 μ l	2.0 μ l
	LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	2.0 μ l	—
	LightCycler® RT-PCR Reaction Mix HybProbe	—	4.0 μ l
	LightCycler® RT-PCR Enzyme Mix	—	0.4 μ l
	Template*	5.0 μ l	5.0 μ l
Total		20.0 μ l	20.0 μ l

* Sample for LC cDNA assay is cDNA, and sample for LC One-Step assay is extracted RNA.

** Cycling profile for LC cDNA assay consisted of 95°C for 10 min, which was followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 60°C at 25 s, and elongation at 40°C for 30 s.

*** Cycling profile for LC One-Step assay consisted of 52°C for 10 min, and then 95°C for 30 s, which was followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 60°C at 25 s, and elongation at 40°C for 30 s.

について、LC cDNA 法と LC One-Step 法を実施し、両方法の成績を比較した。なお、食中毒および感染症検体はふん便のまま冷蔵搬入されているため、約 1 g のふん便を感染症用検体は 9 ml の modified D-MEM で、食中毒由来検体は 9 ml の PBS(−) で懸濁したものから QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出を行った。

結果および考察

1. LC cDNA 法と LC One-Step 法における GI, GII の蛍光増幅曲線、検量線・検出限界値および測定時間 (Fig. 1~4)

LC cDNA 法および LC One-Step 法による GI ならびに GII 標準 DNA の蛍光増幅曲線を、それぞれ Fig. 1 および Fig. 2 に示した。両方法ともに GII 標準 DNA の蛍光値は GI 標準 DNA のそれと比べ高値を示した。さらに、LC cDNA 法は $10^7 \sim 10^1$ copies/5 μ l 濃度のテンプレートすべての蛍光値は良好に上昇した。しかし、LC One-Step 法はテンプレートの標準 DNA 量が減少するにつれて蛍光値は LC cDNA 法のそれと比較し上昇していなかった。LC One-Step 法ではキャピラリー内で RNA より RT 反応で cDNA 合成後、PCR 増幅を実施

するため、反応条件が PCR 用に最適化されていないなどが本現象に関与するものと思われた。

両方法による GI および GII 標準 DNA の検量線を Fig. 3 および Fig. 4 に示した。LC cDNA 法の GI 標準 DNA の検量線は $y = -3.6922x + 43.406$ ($R^2 = 0.9994$)、GII 標準 DNA のそれは $y = -3.4097x + 38.810$ ($R^2 = 0.9912$)、LC One-Step 法の GI 標準 DNA の検量線は $y = -3.5495x + 40.715$ ($R^2 = 0.9978$)、GII 標準 DNA のそれは $y = -3.4502x + 39.250$ ($R^2 = 0.9932$) であった。両方法における GI および GII 遺伝子はともに、 $10^1 \sim 10^7$ copies/5 μ l では良好な直線性を示し、検出限界値はいずれも 10^1 copies/5 μ l であった。

両法ともに測定のみにかかる時間は約 50 分であった。10 検体検査する場合、LC cDNA 法は検体からテンプレート作製まで約 5 時間を必要とするため、検体搬入から判定までに計 6 時間を、LC One-Step 法は検体からテンプレート作製まで約 1 時間、さらに試薬の調製等も含め、検体搬入から判定までに計 3 時間を要した。

2. 野外検体を用いた LC cDNA 法と LC One-Step 法の成績の比較 (Table 3, Fig. 5)

LC cDNA 法では感染症由来検体 42 検体中 22 検体

Fig. 1. Fluorescent amplification curves of *Norovirus* GI (-----) and GII (—) product using the LC cDNA assay. DNA standard samples were 10^7 (●), 10^6 (○), 10^5 (■), 10^4 (□), 10^3 (▲), 10^2 (△), 10^1 (+) copies/ $5\mu\text{l}$, and negative control (*).

Fig. 2. Fluorescent amplification curves of *Norovirus* GI (-----) and GII (—) product using the LC One-Step assay. DNA standard samples were 10^7 (●), 10^6 (○), 10^5 (■), 10^4 (□), 10^3 (▲), 10^2 (△), 10^1 (+) copies/ $5\mu\text{l}$, and negative control (*).

から、食中毒由来検体 37 検体中 27 検体から、NV 遺伝子が検出された。食中毒検体由来の 1 検体のみが GI で、ほかはすべて GII であった。この成績は LC One-Step 法によるものと完全に一致した。よって、LC cDNA 法と LC One-Step 法は特異性および検出感度において同等であることが確認された。国立感染症研究所発行「病原微生物検出情報」(<http://idsc.nih.go.jp/iasr/virus/virus-j.html>)の平成 17 年 11 月から平成 18 年 6 月の統計においても、NVGI が 440 件、GII が 2491 件と GII の検出が多くなっており、今回の供試検体において GII

の検出が多かった理由として、日本全国において GII による感染症や食中毒が蔓延していることを反映したものと思われた。

LC cDNA 法および LC One-Step 法による感染症由来検体テンプレート中の遺伝子の幾何平均コピー数はそれぞれ 3.2×10^5 cDNA copies/ $5\mu\text{l}$ ならびに 6.6×10^5 RNA copies/ $5\mu\text{l}$ 、食中毒由来検体テンプレートのそれは、それぞれ 8.8×10^4 cDNA copies/ $5\mu\text{l}$ ならびに 1.8×10^5 RNA copies/ $5\mu\text{l}$ であった。LC One-Step 法による遺伝子の幾何平均コピー数は LC cDNA 法のそれと比

Fig. 3. Log concentration and crossing point of *Norovirus* GI and GII using the LC cDNA assay ($n=5$).

Fig. 4. Log concentration and crossing point of *Norovirus* GI and GII using the LC One-Step assay ($n=5$).

Table 3. Results of field samples using the LC cDNA and LC One-Step assays

Origin	Sample treatment	Sample number	Results of LC cDNA assay	Sample number	Average (cDNA copies/5 μ l)	Results of LC One-Step assay		
						+	-	Average (RNA copies/5 μ l)
Fecal samples from hospital patients	10-fold dilution by modified D-MEM	42	+	22	3.2×10^5 *	22	0	6.6×10^5 *
			-	20	-	0	20	-
Fecal samples from food poisoning cases	10-fold dilution by PBS(-)	37	+	27	8.8×10^4 **	27	0	1.8×10^5 **
			-	10	-	0	10	-

* All positive samples were identified as GII.

** One positive sample was identified as GI and the other 26 positive samples were identified as GII.

べ、感染症由来検体テンプレートで 2.06 倍、食中毒由来検体テンプレートで 2.05 倍高い値を示した。LC One-Step 法はテンプレートとして抽出 RNA を、LC cDNA 法は cDNA を用いており、cDNA 合成過程で抽出 RNA は約 2.5 倍に希釈されている。LC cDNA 法と LC One-Step 法のテンプレートの遺伝子数の差は両方法のテンプレートの希釈割合や DNA 合成酵素の合成効率の差などによるものと考えられた。

LC cDNA 法と LC One-Step 法のテンプレート中の

遺伝子数の相関は、感染症由来検体では $y = 1.0064x - 0.3473$ ($R^2 = 0.9610$), 食中毒由来検体では $y = 0.9627x - 0.1034$ ($R^2 = 0.9888$) であり、良好な相関を示した (Fig. 5)。

最近、NV 感染症がわが国を含め全世界で大流行している⁶⁾。また、NV は感染症、食中毒の原因ウイルスとして重要であり、防疫対策や行政処分を講じるために、衛生研究所等での検査の需要が増加している。LightCycler[®] を用いた LC cDNA 法および LC One-

Fig. 5. Correlation analysis between copy numbers of the LC One-Step and LC cDNA assays.

Step 法は NVGI, GII を迅速に検出するための方法として有効であると思われた。特に LC One-Step 法は検体搬入から約 3 時間で結果が判明することから、有益な方法であると思われた。

謝 辞

本研究の一部は、(独)科学技術振興機構、平成 17 年度 群馬県地域研究開発促進拠点支援 (RSP) 事業：研究成果育成型の「食品と水に含まれる有害微生物の迅速高感度遺伝子検出法の確立」により実施されたものである。さらに、本研究を実施するにあたり、有益な助言を頂いた新美真一先生 ((株)日本遺伝子研究所)、宮崎 愛先生、山城 亮先生、宮崎春香先生 (以上、ロッシュ・ダイアグノスティックス(株)) に深謝する。

文 献

- 1) Goodgame, R.: Norovirus gastroenteritis. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, **8**, 401-408 (2006).
- 2) Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R. and Chanock, R. M.: Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.*, **10**, 1075-1081(1972).
- 3) Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N. and Katayama, K.: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods*, **100**, 107-114 (2002).
- 4) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部監視安全課長：ノロウイルス検出法について。平成 15 年 11 月 5 日，食安監発第 1105001 号 (2003).
- 5) 西尾 治，秋山美穂，愛木智香子，杉枝正明，福田伸治，西田知子，植木 洋，入谷展弘，篠原美千代，木村博一：ノロウイルスによる食中毒について。日食衛誌，**46**，235-245 (2005).
- 6) Siebenga, J. J., Vennema, H., Duizer, E. and Koopmans, M. P.: Gastroenteritis caused by norovirus GGII. 4, The Netherlands, 1994-2005. *Emerg. Infect. Dis.*, **13**, 144-146 (2007).