

ノロウイルスRNA検出試薬

TRCRtest Noro1, TRCRtest Noro2の開発

科学計測事業部 TRCプロジェクトチーム 開発・製造G 益田 昇佳
齋藤 寿一
林 俊典

1. はじめに

ノロウイルスは、主に食品や水を媒介として経口感染し、ヒトの小腸で増殖して急性胃腸炎を引き起こす病原体として知られる。ノロウイルスによる食中毒は、汚染された食品の喫食、又は、感染者を通じて付着した食品の喫食によって引き起こされ、その患者数は食中毒事件全体の38%（病因物質別の第一位）を占めている。さらに、感染者の糞便や吐瀉物を介するヒト-ヒト感染により、幼稚園、小・中学校、社会福祉施設などで集団感染が多発するなど大きな社会問題となっている。

現在、ノロウイルスの主要な検出法はウイルスRNAを逆転写して得たDNAを複写増幅するRT-PCR法である。しかし、逆転写反応が必要であること、PCR後にハイブリダイゼーションまたは塩基配列分析による同定が必要なことからノロウイルスの同定までに2~3日を必要とし、感染拡大の早期対応には迅速性を欠くことが問題であった。さらに、RT-PCR法は国内で市販されるキットがなく、操作が煩雑で熟練を要することから、検査可能な施設が限定されていた。

科学計測事業部では、迅速・簡易な遺伝子検査法であるTRC技術を用いてノロウイルスRNAを直接増幅および検出する研究用試薬キット「TRCRtest Noro1」と「TRCRtest Noro2」を開発し、2004年12月に上市した。

2. TRC法の原理と特長

TRC法は43℃の一定温度でRNAを複写増幅するTRC (Transcription-Reverse transcription-Concerted) 反応と標的核酸に特異的に相補結合することで蛍光増感するINAF (INtercalation Activating Fluorescence probe) プローブを組み合わせた方法であり、標的RNAの増幅と検出を1本のチューブ内で10~60分で実施することができる¹⁾ (Fig. 1)。さらに、検体から抽出した

RNA溶液に2種類の試薬（基質とプライマーの混合試薬および酵素試薬）を加え、専用装置であるTRCRリアルタイムモニターTRCRapid-160にセットするだけの簡便な操作が特徴である (Fig. 2)。

3. ノロウイルスRNA検出試薬の開発

TRC法を用いたノロウイルスRNA検出試薬では、ノロウイルスRNAの塩基配列のうちノロウイルスに特異的な塩基配列を増幅および検出する。しかし、ノロウイルスは多様な遺伝子型（大別して2つの遺伝子群 [G・G] さらにG内14の、G内17の遺伝子型に分類）が存在する²⁾。そのため、本試薬の開発にあたっては遺伝子データベースに登録されている塩基配列9種類に加え、国内のノロウイルス陽性検体から得た塩基配列11種類および川本らの解析した塩基配列^{3)~8)}を使用し、塩基配列の相同性の解析結果をもとにRNA増幅の起点となるプライマーやINAFプローブの塩基配列を設計した。

その結果、TRC法における増幅検出領域はノロウイルスの各遺伝子型間で相同性の高いORF1 (RNAポリメラーゼ領域) の3'末端側からORF2 (構造蛋白領域) の5'末端側にかけてのjunction領域を含めるように設定した。そして、Gの遺伝子型間で相同性の高い領域にanti-sense primerとpromoter primerを1セット設定して「TRCRtest Noro1」のRNA増幅用プライマーとし、さらに、promoter primerの結合領域の5'側にscissors probeを設定した。一方、Gの遺伝子型間で相同性の高い領域に対しても同様の設計を行ない、「TRCRtest Noro2」用のanti-sense primer、promoter primerおよびscissors probeの塩基配列を決定した。なお、増幅RNAの蛍光検出に使用するINAFプローブは各遺伝子群 (G・G) 間で相同性の高い領域に設定し、「TRCRtest Noro1」と「TRCRtest Noro2」で共通の塩基配列とした。

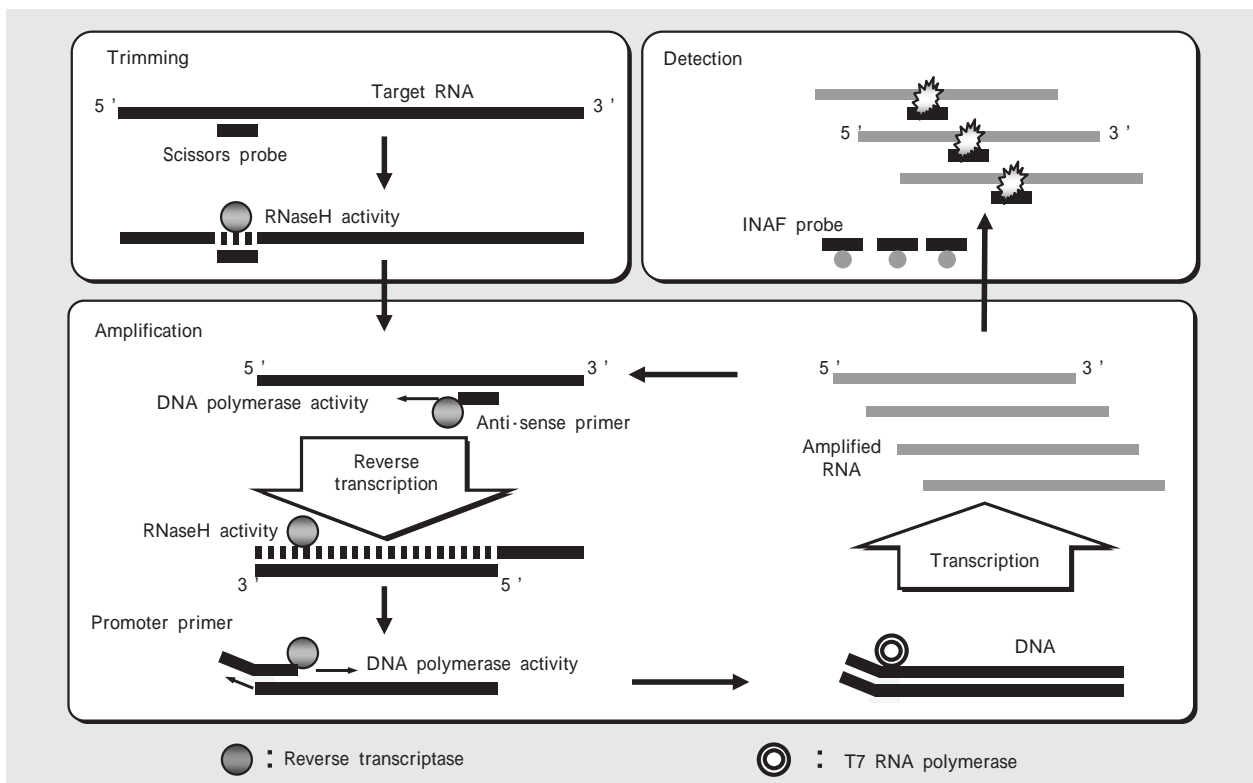


Fig. 1 Elementary steps of the TRC reaction.

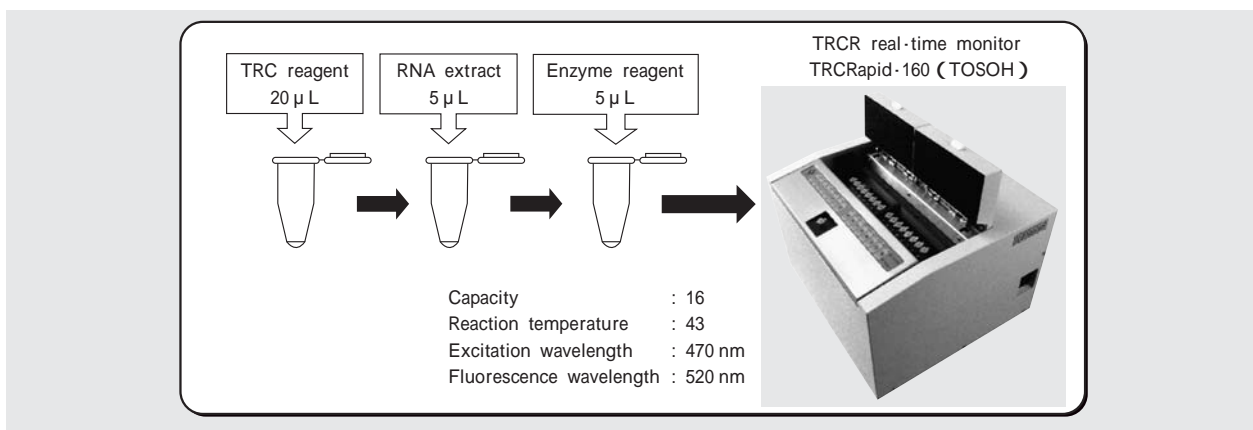


Fig. 2 Protocol of TRC method.

4. 感度・特異性

[1] 評価方法

「TRCRtest Noro1」と「TRCRtest Noro2」の感度評価には、それぞれChiba type (G / 4) および Kashiwa 47 type (G / 14) を含む検体のRT-PCR産物 (cDNA) より *in vitro* 転写にて調製したRNA (以下、それぞれをG RNAおよびG RNAと表記) の水溶液5 μ Lを用いた。さらに特異性評価には、RT-PCR法によりノロウイルス陽性と判定されている糞便検体32検体 (ノロウイルスの遺伝子群はRT-PCRで得られた

増幅産物の塩基配列の相同性結果、または増幅産物に対するプローブハイブリダイゼーションの結果より決定) A型ロタウイルスを含有する糞便検体5検体、ノロウイルス以外の腸管感染症病原菌4検体から得られた核酸抽出物を用いた。なお、糞便検体は10% [w/v] 乳濁液からEXTRAGEN (東ソー) にて、腸管感染症病原菌は一昼夜培養液からRNeasy Mini kit (QIAGEN) にてそれぞれ核酸抽出した。いずれの測定も専用装置であるTRCRリアルタイムモニターTRCRapid-160を使用した。

[2] 評価結果

G RNA溶液を「TRCRtest Noro1」で測定した結果をFig. 3 (a)に、G RNA溶液を「TRCRtest Noro2」で測定した結果をFig. 3 (b)に示す。なお、Fig. 3において横軸は酵素試薬を添加してからの反応時間を示し、縦軸は蛍光強度比（蛍光強度/初期蛍光強度）を示している。そして、蛍光強度比が1.2を超えた時間を検出時間とした場合、「TRCRtest Noro1」は300コピー/5 μLのG RNAを20分以内に、「TRCRtest Noro2」は10⁴コピー/5 μLのG RNAを15分以内にそれぞれ検出した。

「TRCRtest Noro1」と「TRCRtest Noro2」の特異性試験の結果をTable 1に示す。なお、判定は反応開始後60分以内に蛍光強度比が1.2以上になったときに陽性、1.2未満のときを陰性とした。結果、「TRCRtest Noro1」はノロウイルスG 陽性検体全てと一部のノロウイルスG 陽性検体を、「TRCRtest Noro2」はノ

ロウイルスG 陽性検体全てと一部のノロウイルスG 陽性検体を検出した。「TRCRtest Noro1」と「TRCRtest Noro2」を組み合わせることで全てのノロウイルスを検出できた。一方、ノロウイルス以外の検体については両試薬とも陰性判定であった。

5. 実検体を用いた評価^{9), 10)}

[1] 評価方法

食中毒患者の糞便検体252検体を使用し、Fig. 4に示すフローにて評価した。糞便検体（10%[w/v]乳濁液）100 μLより、グアジニン・塩化セシウム超遠心法、QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）、EXTRAGEN（東ソー）のうちのいずれかの方法にてRNA（EXTRAGEN では全核酸）を抽出した。

TRC法では核酸抽出物原液あるいは10倍希釈液5 μLを試料とし「TRCRtest Noro1」と「TRCRtest Noro2」でTRCRapid-160を用いて60分間測定した。一方、RT-

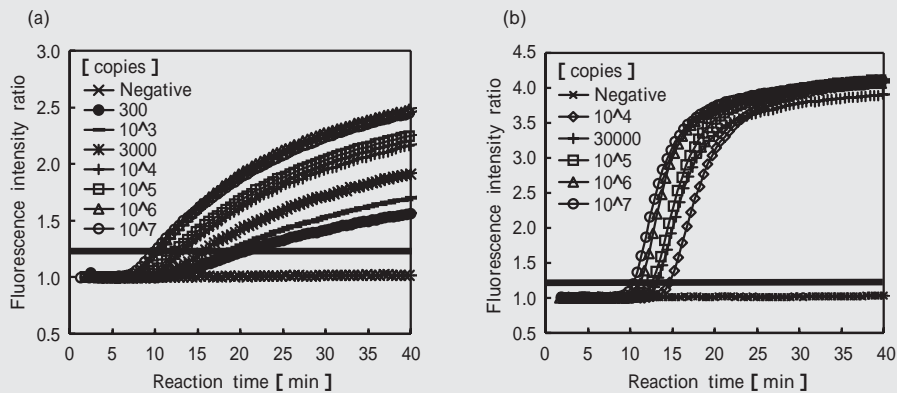


Fig. 3 Fluorescence monitoring of the TRC reaction of the G RNA(a), and the G RNA(b). Horizontal line indicates the cut-off value 1.2.

Table 1 Specificity of “TRCRtest Noro1” and “TRCRtest Noro2”.

Sample	TRCRtest Noro1		TRCRtest Noro2		TRCRtest Noro1 + Noro2	
	+	-	+	-	+	-
Stool sample						
Norovirus	20	12	25	7	32	0
(G)	(8)	(0)	(1)	(7)	(8)	(0)
(G)	(11)	(12)	(23)	(0)	(23)	(0)
(G +G)	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)
Rotavirus A	0	5	0	5	0	5
Bacterial cells						
Vibrio parahaemolyticus	0	2	0	2	0	2
Salmonella Enteritidis	0	1	0	1	0	1
Escherichia coli O157:H7	0	1	0	1	0	1

PCR法の結果は、核酸抽出物1~10 µLを試料として、ORF1のRNAポリメラーゼ領域にあるプライマーセット2系列 (SR46, 48, 50, 52/SR33系¹¹⁾、NV82, SM82/NV81 + Yuri22F/22R¹²⁾系)を用いたRT-PCRおよびORF2領域にあるプライマーセット1系列 (G1SKF/R + G2SKF/R系¹³⁾)を用いたRT-PCR、ORF1とORF2のjunction領域にあるG1COF/RとG2COF/R¹⁴⁾

のプライマーセットを用いたリアルタイムRT-PCRによって得られた。

[2] 評価結果

TRC法とRT-PCR法との成績比較をTable 2に示す。Table 2の結果のうち(a)はRT-PCRをSR46, 48, 50, 52/SR33¹¹⁾のプライマーで実施したときの、(b)はRT-

Table 2 Result of evaluation by stock samples.

(a)

83 feces		RT - PCR		Total	Positive ratio
		SR46, 48, 50, 52/SR33			
		+	-		
TRCRtest Noro1 + Noro2	+	57	6	63	TRC 76%
	-	3	17	20	
Total		60	23	83	
Positive ratio		RT - PCR 72%		Concordance 89%	

(b)

169 feces		RT - PCR						Total	Positive ratio
		NV82, SM82/NV81		Yuri22F/22R		+			
		+	-	+	-	+	-		
TRCRtest Noro1 + Noro2	+	88	20	59	47	100	8	108	TRC 64%
	-	0	61	4	57	4	57	61	
Total		88	81	63	104	104	65	169	
Positive ratio		RT - PCR 52%		RT - PCR 38%		RT - PCR 62%		Concordance 93%	

(c)

82 feces		RT - PCR		Total	Positive ratio
		G1SKF/R, G2SKF/R			
		+	-		
TRCRtest Noro1 + Noro2	+	46	5	51	TRC 62%
	-	1	30	31	
Total		47	35	82	
Positive ratio		RT - PCR 57%		Concordance 93%	

(d)

85 feces		Real-time RT - PCR		Total	Positive ratio
		G1COF/R, G2COF/R			
		+	-		
TRCRtest Noro1 + Noro2	+	48	5	53	TRC 62%
	-	1	31	32	
Total		49	36	85	
Positive ratio		RT - PCR 58%		Concordance 93%	

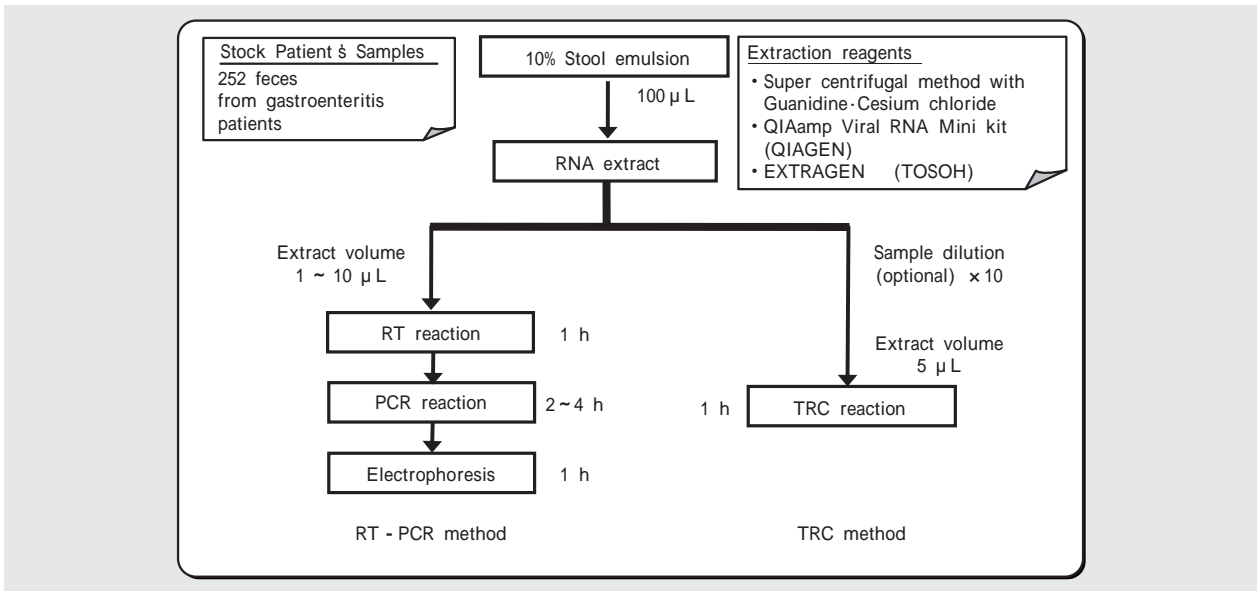


Fig. 4 Protocol of evaluation by stock samples.

PCRをNV82, SM82/NV81とYuri22F/22R¹²⁾のプライマーで実施したときの、(c)はRT-PCRをG1SKF/RとG2SKF/R¹³⁾で実施した時の、(d)はリアルタイムRT-PCR (G1COF/RとG2COF/R)⁴⁾を実施したときの成績比較である。いずれの場合においてもノロウイルス検出率はTRC法とRT-PCR法とでほぼ一致し、陽性と陰性の一致率も約90%と高く、今回開発した試薬は

RT-PCR法と同等以上の成績を示した。

一方、糞便検体252検体のうち集団発生事例20件についてその事件毎にRT-PCR法との成績を比較した。その結果、どの集団発生事例においても検出率はほぼ一致しており、本試薬がノロウイルス急性胃腸炎の集団発生における病原体の迅速検査に適した性能を持っていることがわかった (Table 3)。

Table 3 Result of evaluation by outbreak samples.

Outbreak No.	Number of positive/tested	
	RT - PCR	TRC
I - 1	4/ 6	4/ 6
I - 2	10/14	10/14
I - 3	10/14	10/14
I - 4	11/11	11/11
I - 5	6/ 6	6/ 6
I - 6	5/ 9	5/ 9
N - 1	6/ 6	6/ 6
N - 2	4/ 6	4/ 6
N - 3	1/ 3	1/ 3
N - 4	3/12	3/12
N - 5	3/ 6	3/ 6
N - 6	4/ 5	3/ 5
N - 7	5/ 6	6/ 6
N - 8	3/ 3	3/ 3
O - 1	4/ 5	4/ 5
O - 2	9/ 9	9/ 9
O - 3	5/ 7	5/ 7
O - 4	7/ 9	7/ 9
O - 5	5/ 6	5/ 6
O - 6	5/ 7	5/ 7

6. まとめ

今回開発した「TRCRtest Noro1」と「TRCRtest Noro2」はノロウイルスRNAを直接増幅するため逆転写反応が不要であり、反応開始から判定までに要する時間も最長60分と短時間である。また、増幅反応後の電気泳動による判定やDNAハイブリダイゼーションによる同定も不要であるため、迅速かつ簡便な試薬である。ノロウイルスによる感染性胃腸炎の集団発生時、感染拡大防止の早期対応を可能とする迅速試験としての利用が期待される。

7. 謝辞

本研究は下記施設との共同研究として実施されました。貴重な検体の供給および測定の実施に対し、各先生に厚く御礼申し上げます。

岐阜県保健環境研究所：川本 尊義 先生

岐阜県生物産業技術研究所：葛口 剛 先生

岩手県環境保健研究センター：齋藤 幸一 先生

新潟県保健環境科学研究所：西川 眞 先生、田村 務 先生

岡山県環境保健センター：藤井 理津志 先生、濱野
雅子 先生

参考文献

- 1) T. Ishiguro *et al.*, *Anal. Biochem.*, 314 (1), 77 (2003)
- 2) 感染症発生動向調査週報、6 (11), 14 (2004)
- 3) 川本尋義、厚生科学特別研究総合報告書、平成10年度
- 4) 川本尋義、厚生科学特別研究総合報告書、平成11年度
- 5) 山崎謙治ら、*感染症学雑誌*、74 (5), 470 (2000)
- 6) 川本尋義、*化学と生物*、38 (12), 782 (2000)
- 7) H. Kawamoto *et al.*, *J. Med. Virol.*, 64 (4), 569 (2001)
- 8) T. Kuzuguchi *et al.*, 12th Internatioanl Congress of Virology (2002)
- 9) 益田昇佳ら、第52回日本ウイルス学会学術集会抄録集、245 (2004)
- 10) 濱野雅子ら、第74回日本感染症学会西日本地方会総会講演抄録集 (2004)
- 11) T. Ando *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 33 (1) 64 (1995)
- 12) H. Saito *et al.*, *Microbiol. Immunol.*, 42 (6), 439 (1998)
- 13) 篠原美千代ら、第48回日本ウイルス学会学術集会抄録集、264 (2000)
- 14) K. Kageyama *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 41 (7), 1548 (2003)