

[技術資料]

## 感染性胃腸炎 8 ウイルス(亜種)の SYBR Green による Real Time PCR 分析

ウイルス課 安藤 克幸 大串 和弘 野田 日登美  
角 典子

キーワード：感染性胃腸炎 ウイルス 一斉分析 SYBR Green

### 1 はじめに

感染性胃腸炎は、ウイルス又は細菌などの感染性病原体による嘔吐、下痢を主症状とする感染症であり、原因はウイルス感染（ノロウイルス、ロタウイルスなど）が多く、毎年秋から冬にかけて流行する。この感染性胃腸炎ウイルスが原因の集団発生も毎年、多数発生している。

また、感染性胃腸炎と診断した小児科定点医療機関は、感染症法第12条第2項による届出が規定されている。

このような集団発生や小児科定点からの調査依頼（感染症発生動向調査）に迅速に対応するため、これまでの個々の検査法を見直し、一斉に分析が可能な方法について検討した。

### 2 方法

#### (1)材料

8 ウイルスの陽性コントロールは感染症発生動向調査及び感染性胃腸炎の集団発生事例で収集し、原因ウイルスが確定したものをを用いた。

#### (2)分析方法

これまでの個別法と一斉分析法について

①Reverse Transcription (RT) の段階（従来の試薬と新規試薬の分析時間と増幅効率）

②PCR の段階（One step , Two step , Real Time PCR , PCR 後電気泳動 各方法における分析時間と増幅効率）

それぞれの方法について各段階で比較検討した。

③primers

既報及び厚労省通知の primer を用いた。

### 3 結果と考察

#### (1)結果

①RT ; これまでの個々の試薬の組合せで行う RT に比較して PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) は増幅効率はやや低いものの、DNase が約 2 分、RT が約 15 分で処理可能であった。

②One step と Two step の比較 ; One step に比較して Two step の方が 10~100 倍 増幅効率が高かった。

③Real Time PCR と PCR 後電気泳動の比較 ; Real Time PCR 用の DNA ポリメラーゼは通常 PCR の強

## [技術資料]

力 DNA ポリメラーゼ (KAPA2G Robust HS RM with dye) に比較して数倍程度増幅効率が低かった。

しかし、amplification plot や Melting Curve により、電気泳動 (視覚) では判定できない、微量の増幅を確認することが可能であった。

## ④分析方法

○DNase 処理 ( 20 又は 15  $\mu$ l )

↓

↓ ( 10 又は 5  $\mu$ l (半量系) )

Rota A, C (95°C 5min DMSO 処理)

↓ (10  $\mu$ l )

↓

○RT ( Random Primers + Oligo(dT) primers )

↓ cDNA 2.8  $\mu$ l を 7 種の PCR 反応へそれぞれ使用する。(4  $\mu$ l 以上の添加は不可)

※DNase と RT は PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser を使用

○Real Time PCR ( SYBR Green )

Holding 95°C 30sec

Cycle ; 40

95°C 15sec

55°C 50sec (Adeno V. は 50°C ゾーン設定で分ける。)

72°C 50sec

Holding 72°C 3min

Melt Curv 95°C 15sec

60°C 1min (データ取得の刻みは 0.3~0.5°C。数値が

小だと分析が長時間になる。)

※アデノウイルスを含めて検査する場合は、RNA 抽出物 (DNA を含む) を使用して Annielig 温度を 50°C に変更して行う。 ※Real Time PCR は SYBR® Premix DimerEraser® を使用。

※Step One Plus で測定する場合の陽性判定基準

Amplification plot が 1.75 ( (liner)4.0 以上の場合は偽陽性の可能性が高い) 以上であり、Melt Curve の融解離温度 (Tm) の変動幅が標準物質の Tm 値の 1.0 未満であること。

○各 primers を使用した PCR 産物の融解離温度 (Tm °C) は以下のとおりであった。

NV G-I ◎ COG1F/G1SKR・・・86.050

NVG-II ◎ COG2F/G2SKR・・・86.640

RV-A Beg9 F / VP7-1 R・・・77.359

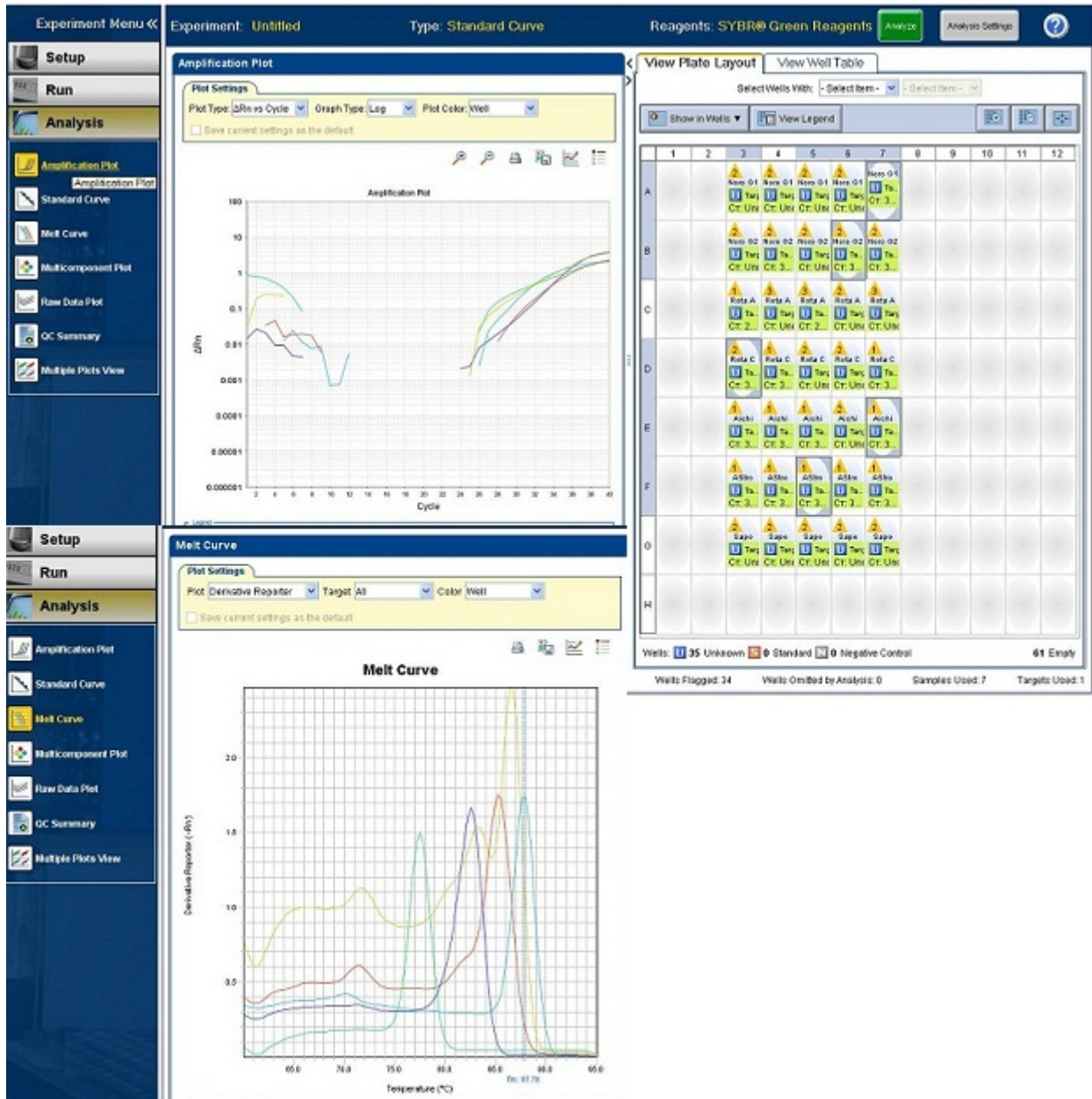
RV-C G8NS1 F / G8NA2 R・・・76.912

Aichi V. C94bF / 264k R・・・87.782

[技術資料]

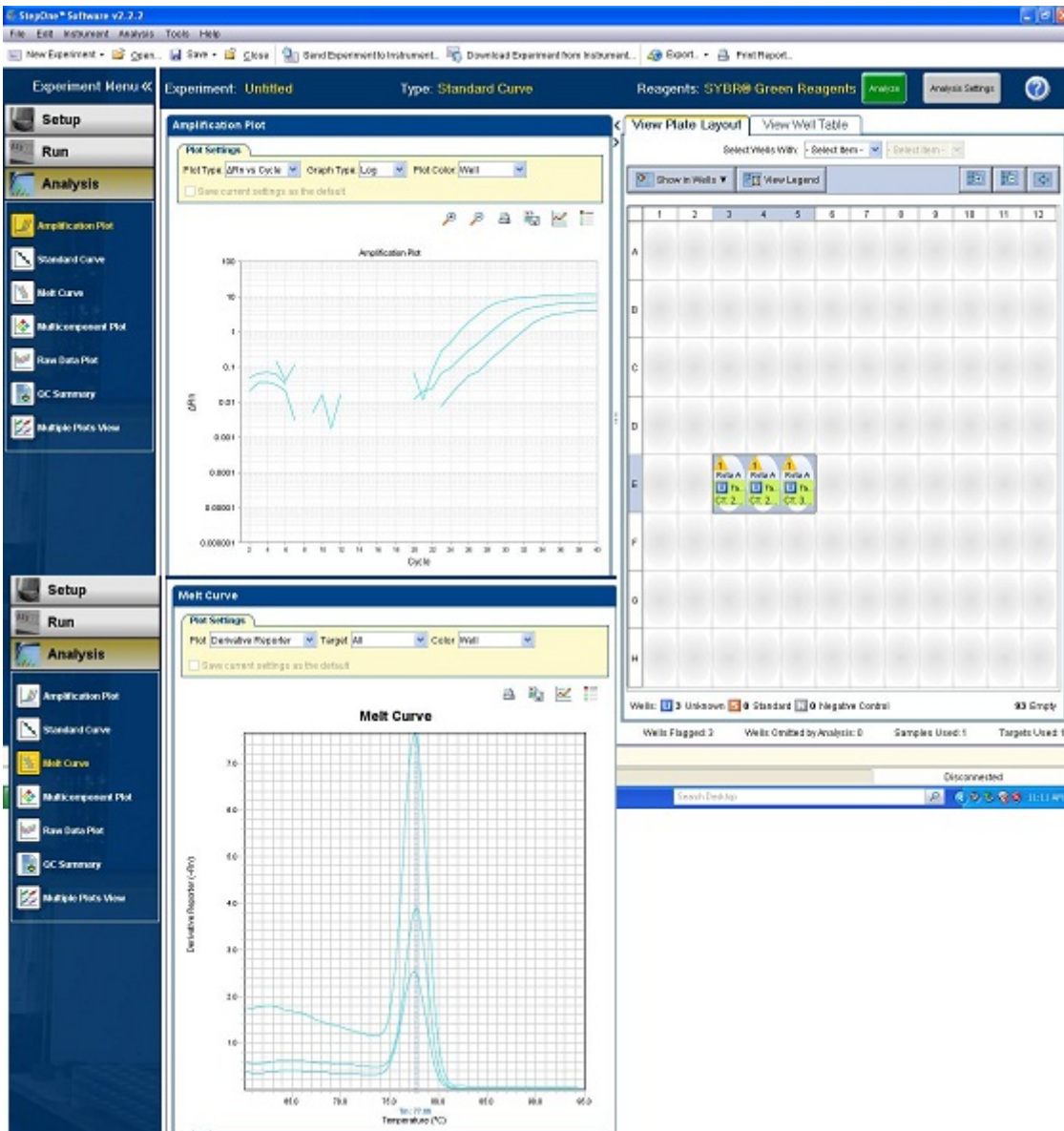
Astro V. AC1F / AC230R・・・82.930  
 Sapo V. SLV5317F / SLV5749R・・・85.110  
 ※Adeno V. AdnU-S' 2/AdnU-A2・・・87.070

⑤陽性コントロールを用いた場合の Amplification plot と Melt Curve



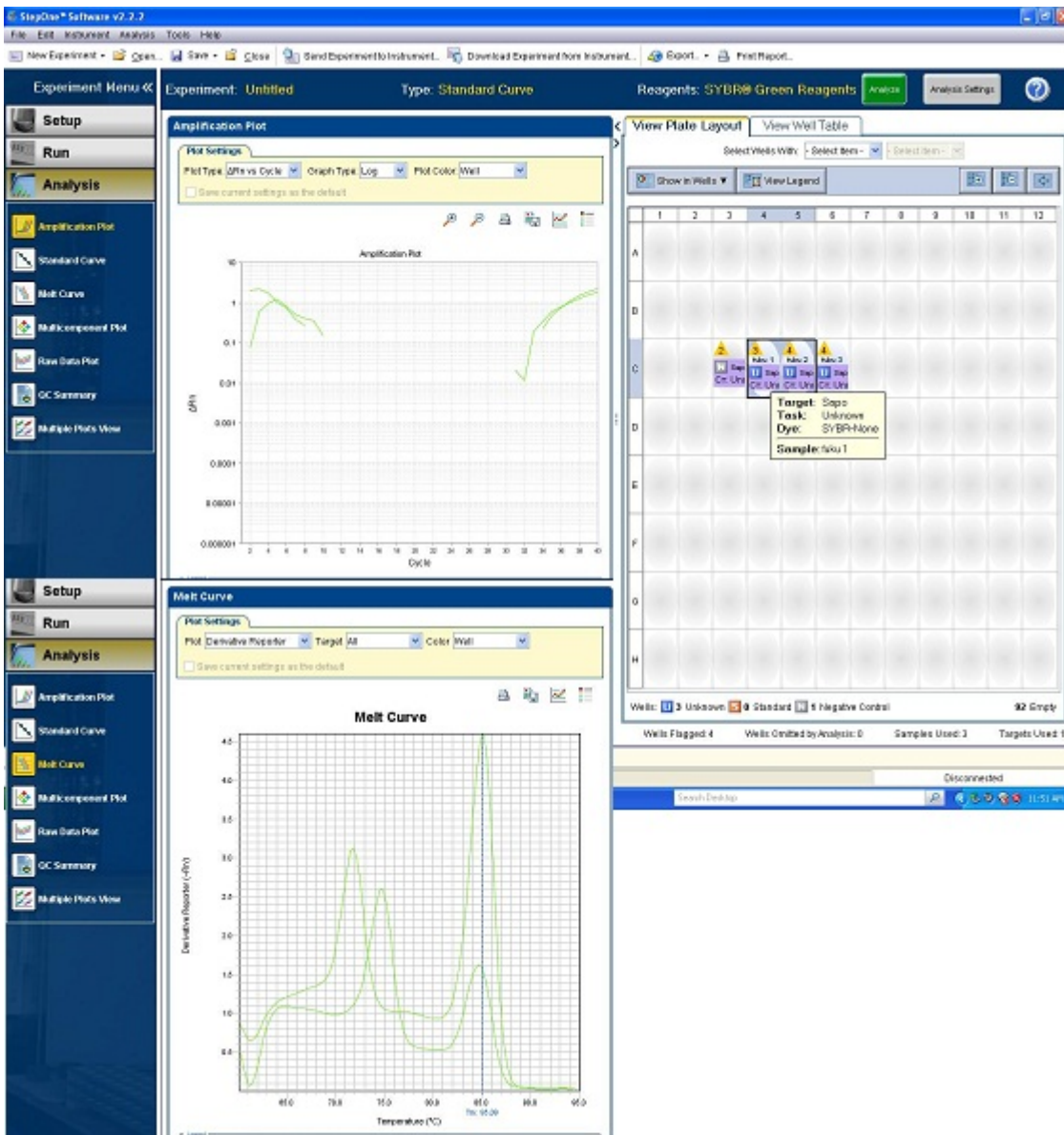
※NoroG I、II、RotaC、Aichi および Astro V.

[技術資料]



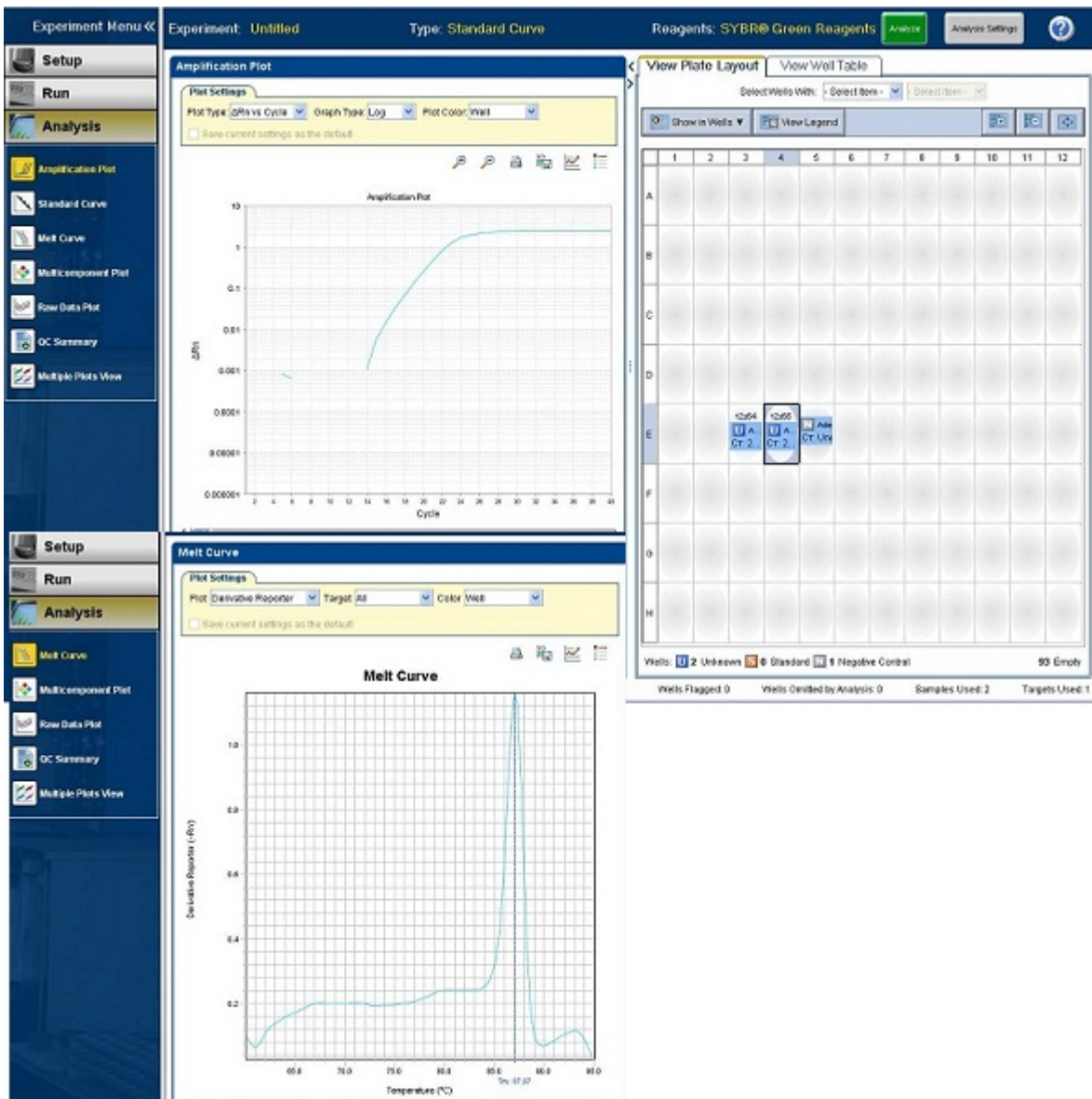
※RotaA

[技術資料]



※Sapo V.

[技術資料]



※Adeno V.

※Amplification plot と Melt Curve による判定が困難な場合は、電気泳動を行い判定する。

PCR 産物のサイズ

NV G- I	COG1F/G1SKR	381bp
NVG- II	COG2F/G2SKR	387bp
RV-A Beg9 F / VP- 1 R		395bp
RV-C G8NS 1 F / G8NA 2 R		350bp
Aichi V. C94bF / 264 k R		266bp
Astro V. AC1F / AC230R		230bp
Sapo V. SLV5317F / SLV5749R		434bp
Adeno V. AdnU-S' 2/AdnU-A2		554bp

## [技術資料]

## (2) 考察

当センターでは、個別法等で感染性胃腸炎ウイルスの検査を行ってきた。今回検討した分析法では、再現性も良好であり、感染性胃腸炎のウイルス量を考慮した場合、Amplification plot と Melt Curve (T<sub>m</sub> 値) により、十分な感度で感染性胃腸炎 8 ウイルス (亜種) の一斉分析が可能となった。

今後の改良点としては、Real Time PCR で使用する DNA ポリメラーゼについては、より正確で、増幅効率の高い試薬の使用について検討することとしたい。

## 4 文献

- (1) Kang G, Iturriza-Gomara M, Wheeler JG, Crystal P, Monica B, Ramani S, et al. Quantitation of group A rotavirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction: correlation with clinical severity in children in South India. *J Med Virol.* 2004;73(1):118-22.
- (2) Logan C, O' Leary JJ, O' Sullivan N. Real-time reverse transcription PCR detection of norovirus, sapovirus and astrovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis. *J Virol Methods.* 2007;146(1-2):36-44.
- (3) Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, Wu FT, et al. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 2006;78(10):1347-53.
- (4) Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, et al. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1405-12.