

病原体検出マニュアル
ノロウイルス (第1版)
令和元年6月

目次

1. 概説
2. 検査の準備
3. 検査の進め方
4. 10%ふん便懸濁液の作成
5. RNA 抽出 (QIAamp Viral RNA Mini キットを用いる時)
6. cDNA 合成
7. Capsid 領域の一部を増幅する conventional PCR 法
8. RdRp 領域の一部と capsid 領域の一部を増幅する conventional PCR 法 (dual typing 法)
9. 塩基配列の解析
10. 遺伝子型の判定
11. NoV の命名法
12. Real-time PCR 法
13. 参考 (マルチプレックス PCR 法)
14. 参考文献

執筆者一覧

1. 概説

1-1 病原体

ノロウイルス (Norovirus, 以下 NoV)は一本鎖 RNA ウイルスで GI～GVII の遺伝子群 (genogroup)に分けられ、主に GI と GII がヒトに感染する。NoV のゲノムには、3つのタンパク質コード領域 (open reading frame; ORF)が存在しており、ORF1 は非構造タンパク質、ORF2 は構造タンパク質 1 (VP1)、ORF3 は構造タンパク質 2 (VP2) をコードしている。現在では、主に VP1 領域の塩基配列による遺伝子型判別が行われている¹⁾。

1-2 疫学

NoV は、感染性胃腸炎患者報告数の増加する 11～12 月に流行のピークを迎える傾向がみられ、感染性胃腸炎散発例から検出された病原体のおよそ半数を占めている。また、高齢者福祉施設、学校、保育園・幼稚園における感染性胃腸炎の集団発生の主な原因となっている。NoV もインフルエンザウイルスと同様に、ウイルスの変異により数年ごとに世界的大流行を引き起こすことが示されており、本邦の感染症発生動向調査においては、その変化を把握することのできる検査法を採用することが重要である。非流行期にも食中毒などの集団感染事例は発生しているため、通年的な衛生管理が重要である。調理従事者により汚染された食品を介した食中毒を防ぐためには、手洗いや食品取り扱い施設での作業衣や手袋着用などを含めた基本的な衛生管理および調理従事者の健康管理の徹底が重要である²⁾。

1-3 臨床症状

一般に、潜伏期は1～2日であると考えられている。嘔気、嘔吐、下痢を主症状とし、腹痛、頭痛、発熱、悪寒、筋痛、咽頭痛、倦怠感を伴うこともある。多くの症例において、特別な治療をせずに軽快するが、乳幼児や高齢者に加えて、体力が低下した者は、嘔吐、下痢による脱水や吐物による窒息に注意する必要がある。症状が消失した後も患者のふん便中に NoV が排出 (長い場合は3週間以上)されるため、二次感染に注意が必要である³⁾。

2. 検査の準備

2-1 検査材料の取り扱い

NoV は BSL2 の病原体であり、患者の臨床検体 (ふん便あるいは吐物など)およびウイルスの取り扱いはすべて安全キャビネット内で行う。検体などで汚染した機材は、次亜塩素酸ナトリウム溶液など NoV の感染性を消失、あるいは、著しく低下させることが明らかな不活化剤で適切に処理する必要がある。NoV の感染力は非常に強く、また、多量のウイルスが排出されている可能性があるため、感染拡大防止のためにも検査材料の取り扱いには十分な注意が必要である。

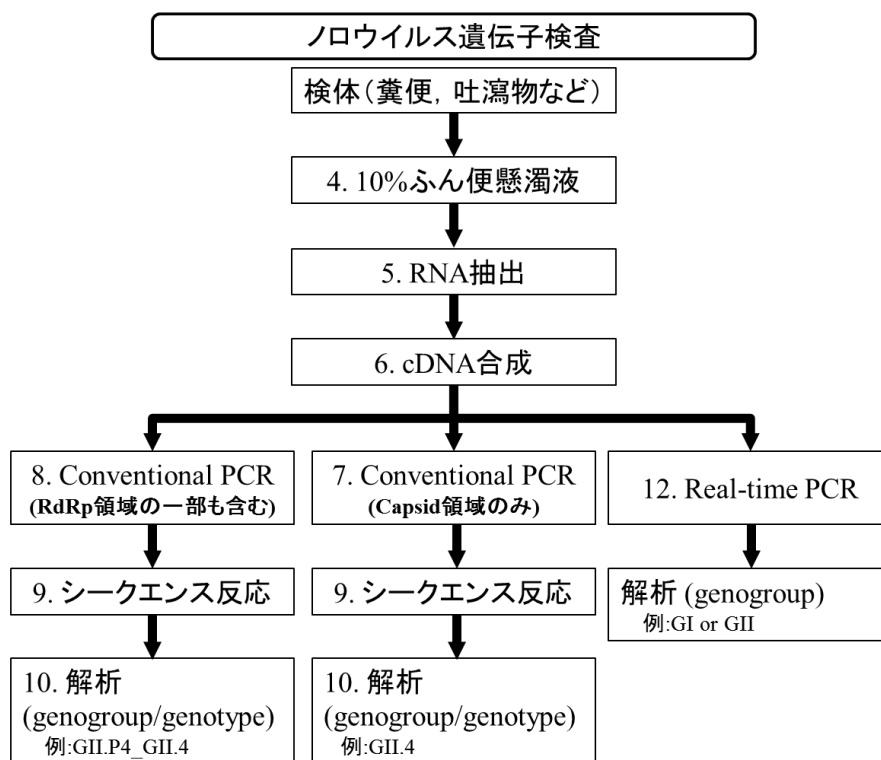
2-2 検査材料の採取

患者のふん便をプラスチック製容器などに採取して冷蔵 (4℃)にて保存する。排出されるウイルス量が非常に多いため、直腸ぬぐい液や吐物なども検査に使用できる。

3. 検査の進め方

NoV の培養方法は実用的な段階にないため、一般的にその検出には感度や特異性の高い遺伝子検査法が用いられる。現在では、遺伝子検査試薬が市販されているため、検査の頻度が少なく、精度の維持が困難である施設においては有用である。遺伝子検査法には、conventional PCR や real-time PCR が普及しているが、それぞれの検査法によって検出感度が異なることや解析できる遺伝子領域が異なるため、目的に応じた検査法を選択する必要がある (図 1)。また、NoV には多くの遺伝子型が存在し、ゲノムの組換え (リコンビネーション) による多型が認められることから、増幅した遺伝子断片の塩基配列を決定することも重要である。

これまでも中和抗体エピトープが存在する VP1 領域に焦点を当てた遺伝子型判別およびアミノ酸変異の把握が行われてきた。近年、NoV では RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) 領域と VP1 領域の間でゲノムの組換えが顕著に認められることから、遺伝子型判別は複雑化している。最近の研究では VP1 遺伝子と RdRp 遺伝子の組み合わせの変化がウイルスの流行に影響することが示唆されている^{4,5)}。したがって、VP1 と RdRp の両方の遺伝子型を効率よく決定する方法が求められている。本マニュアルでは、型別において有用性が確認されたこの新しい方法を推奨する⁶⁾。



※番号は目次に対応

図1 ノロウイルス検査フロー

4. 10%ふん便懸濁液の作成

患者のふん便中には多量のウイルスが含まれているため、取り扱いには安全キャビネット内にて、適切な personal protective equipment (PPE)を着用して行う。廃棄の際も取り扱いには十分に注意する。また、ふん便検体の量が少なく 10%懸濁液が作成できないような場合でも、検体中には多量のウイルスが含まれていることから検出可能である場合が多い。

- 1) 15mlなどの適切な遠沈管を使用して、ふん便の重量を測定して10%懸濁液となるようにPBS (-)を加える。
- 2) 1)で調製したチューブを激しく攪拌した後、5,000×g (5000 rpm)で、30分間冷却遠心する。
- 3) 遠心上清を1.5mlチューブへ移して、12,000 ×g (12,000rpm)で5分間冷却遠心した上清をRNA抽出に使用する。

5. RNA 抽出 (QIAamp Viral RNA Mini キットを用いる時)

5-1 必要な器具と試薬

1) 器具

1.5ml マイクロチューブ用高速遠心機 (15,000rpm まで使用可能)、1.5ml 卓上遠心機 (例: チビタン)、ボルテックスミキサー、マイクロピペット (200、1000μl)、チューブ (1.5ml)

2) 試薬

エタノール (96-100%)、脱イオン蒸留水 { (例: 和光純薬工業 Cat No. 318-90105、Deionized, Sterile, Autoclaved, DNase free, RNase free) 以下「DDW」}

RNA 抽出キット: 例 QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Cat.No.52904)

5-2 操作上の注意

- 1) 操作中は手袋を着用し、チューブの蓋を開ける時にはその前に軽く遠心 (スピンドウン) した後、オープナーを用いるなどコンタミネーションに注意をする。また、試薬の調製をする部屋と PCR 産物などサンプルを扱う部屋を分けることが望ましい。部屋を分けることができない場合は、作業ごとに場所を決めて一方通行の動線で作業する。
- 2) 手袋や白衣なども部屋ごとに使い分けることや高濃度 DNA を取り扱う順番などもコンタミネーション防止には重要である。

5-3 QIAamp Viral RNA Mini キットを用いる時のRNA抽出

RNA 抽出にはいくつかの方法があり、抽出キットも数種市販されている。本マニュアルでは例として QIAamp Viral RNA Mini kit による方法を示すが、各施設で目的に応じて適切と判断した方法にて RNA 抽出を行っても問題ない。

- 1) 使用前にキットに付属している Carrier RNA 溶液 1μg/μl、Buffer AVL/Carrier RNA 混和物、Buffer AW1、Buffer AW2 をマニュアルに従い調製する。「4. 10%ふん便懸濁液の作成」で調製した遠心上清は、室温 (15~25°C)に戻してから使用する。
- 2) 操作法

以下の操作はすべて室温で行う。

- (1) 1.5ml チューブに Buffer AVL/Carrier RNA 560 μ l を入れる。
- (2) 「4. 10%ふん便懸濁液の作成」により調製した 10%ふん便懸濁液遠心上清 140 μ l を加え、充分混合するため 15 秒間激しく攪拌した後、室温 (15~25 $^{\circ}$ C) に 10 分間置く。チューブの壁面等に付着している液体を落とすため卓上遠心機で数秒間遠心する (スピンドウン)。
- (3) エタノール (96~100%) 560 μ l をチューブに加え、15 秒間激しく攪拌した後、チューブをスピンドウンする。
- (4) (3)の液 630 μ l を QIAamp スピнкаラムに入れ、蓋を閉め、6,000 \times g (8,000 rpm) で 1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のコレクションチューブに移し、残りの (3) の液 630 μ l を入れ、同様に遠心し、全ての液が無くなるまで行う。
- (5) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW1 を 500 μ l 入れる。蓋を閉め、6,000 \times g (8,000 rpm)、で 1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のコレクションチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。
- (6) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW2 を 500 μ l 入れる。蓋を閉め、20,000 \times g (14,000 rpm) で 3 分間遠心する。スピнкаラムとろ液等を接触させないように静かに取り出す。接触した時には (7)を行う。
- (7) QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のコレクションチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。フルスピードで 1 分間遠心する。
- (8) QIAamp スピнкаラムを新しい蓋つき 1.5ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。QIAamp スピнкаラムの蓋を開け、室温に戻した Buffer AVE を 60 μ l 加え、蓋を閉めて 1 分間置いた後、6,000 \times g (8,000 rpm) で 1 分間遠心する。
- (9) このろ液に抽出 RNA が含まれる。抽出 RNA は-80 $^{\circ}$ Cでの保存が望ましい。

6. cDNA 合成

6-1 必要な器具と試薬

cDNA 合成 (RT 反応)には多くの試薬が販売されている。それぞれの施設が適切と判断した方法を用いて良いが、PCR への影響を考慮しジチオスレイトール (DTT)を含まない試薬を用いることが望ましい。なお、試薬の調製は氷上 (冷却した状態)で行うことが望ましい。

1) 器具

サーマルサイクラー、マイクロピペット、チューブ (0.2ml、0.5ml)、アルミラック・アイ スボックス (試薬調製時に使用)

2) 試薬

PrimeScriptTM RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TakaraBio、Code No. RR037A)

6-2 cDNA 合成反応

- 1) 試薬を表 1 に従い調製する。

表 1. RT 反応調製液 (PrimeScript™ RT reagent Kit を用いる時)

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

- 2) 反応は 37°C で 15 分間、85°C で 5 秒間行い、4°C で保存する。長期保存する場合には、-20°C 以下で保存することが望ましい。

7. Capsid 領域の一部を増幅する conventional PCR 法⁷⁾

NoV はふん便中に多量に排出されるため、多くの場合 1st PCR にて NoV を検出することが可能である。Capsid 領域の一部を増幅する方法は感度も良好であるため優れている。増幅産物の塩基配列は、「10. 遺伝子型の判定」に従い解析することができる。なお、**PCR に使用する試薬および反応容量は各施設で検討の上で変更が可能である。**

7-1 必要な器具と試薬

1) 器具

サーマルサイクラー、電気泳動装置、UV 照射写真撮影装置、マイクロピペット、チューブ (0.2ml、0.5ml、1.5ml)

2) 試薬

DDW、プライマー、電気泳動用アガロース、核酸染色用試薬 (例: エチジウムブロマイド、Gel red など)、TAE buffer、分子量マーカー (100 bp DNA Ladder など)

PCR 用試薬 (例: PerfectShot™ Ex Taq (Loading dye mix) (TakaraBio、Code No. RR005A))

7-2 Capsid 領域における PCR 法

- 1) PCR に使用する混合液を表 2 に従い作製する。

表2 Capsid 領域 PCR 反応調製液

試薬	GI 容量 (μl)	GII 容量 (μl)
DDW	18	18
Forward primer (25μM)	G1-SKF 1	G2-SKF 1
Reverse primer (25μM)	G1-SKR 1	G2-SKR 1
cDNA (Template)	5	5
PerfectShot™ Ex Taq	25	25
Total	50	50

(GII にはアルファトロン型を検出するため ALPF を混合して使用することも可能)

2) PCR 反応

増幅は 94°C3 分を 1 サイクル、94°C10 秒、50°C30 秒、72°C30 秒を 40 サイクル、72°C5 分を 1 サイクルで行う。用いる試薬により反応条件が異なるので確認の上行う。

3) 電気泳動

PCR 産物 5μl を、1.5%アガロースゲルを用いて泳動する。泳動 buffer は TAE を使用し、泳動後ゲルを核酸染色用試薬で 10 分から 20 分間程度染色する。

4) 写真撮影、バンドの確認

染色したゲルは UV 照射で写真撮影し、バンドの確認を行う。

7-3 Conventional PCR結果の判定

1) 試験成立条件

- ①検査材料の代わりにDDWを入れた陰性コントロールでバンドが見られない。
 - ②陽性コントロールのPCR増幅も並行して行ったとき、目的の分子量の位置にバンドが見られる。
- 上記条件が満たされないときは再試験を行う。

2) 判定

検査材料のPCR増幅産物から目的とする分子量付近の位置にバンドが見られた場合、陽性と判断し、塩基配列の決定を行い遺伝子型を判別する。また、電気泳動により非特異的なバンドが見られた場合にはアガロースゲルから目的のバンドを切り出して精製し、塩基配列を決定する。

8. RdRp 領域の一部と capsid 領域の一部を増幅する conventional PCR 法 (dual typing 法)⁸⁾

本法は、NoV の RdRp の一部と capsid の一部を含む遺伝子領域を増幅できる。増幅条件は、試薬やサーマルサイクラーなどによって異なる場合がある。また、MON432 プライマーと MON431 プライマーはイノシンを含んでいるため、用いる試薬によっては検出感度が低下する場合がある。特に、例示された試薬以外を用いる場合は、各施設において試薬や反応温度など

の条件検討を行った上で最適な条件で行うことが望ましい。なお、検出感度は capsid 領域を対象とした PCR 法よりも劣ることがあるため、注意を要する (検出用としては推奨しない)。増幅産物の塩基配列を「10. 遺伝子型の判定」に従って解析することで RdRp 領域と capsid 領域におけるタイピングが可能である。

8-1 必要な器具と試薬

1) 器具

サーマルサイクラー、電気泳動装置、UV 照射写真撮影装置、マイクロピペット、チューブ (0.2ml、0.5ml、1.5ml)

2) 試薬

DDW、プライマー、電気泳動用アガロース、エチジウムブロマイドなどの核酸染色用試薬、TAE buffer、分子量マーカー (100 bp DNA Ladder など)

KOD-Multi&Epi-™ (東洋紡、Code No. KME-101)

8-2 RdRp 領域の一部と capsid 領域の一部を含む PCR 法

1) PCR に使用する混合液を表 3 に従い調製する。

表 3 RdRp の一部を含む PCR 反応調製液

試薬	GI 容量 (μl)	GII 容量 (μl)
2×PCR Buffer for KOD-Multi&Epi	25	25
DDW	14	14
Forward primer (10μM)	MON432 2.5	MON431 2.5
Reverse primer (10μM)	G1-SKR 2.5	G2-SKR 2.5
cDNA (Template)	5	5
KOD-Multi&Epi-™	1	1
Total	50	50

2) PCR 反応

増幅は 94°C2 分を 1 サイクル、98°C10 秒、50°C15 秒、68°C30 秒を 40 サイクルで行う。用いる試薬により反応条件が異なるので確認の上行う。

3) 電気泳動

PCR 産物 5μl を、1.5%アガロースゲルを用いて泳動する。泳動 buffer は TAE を使用し、泳動後ゲルを核酸染色用試薬で 10 分から 20 分間染色する。

4) 写真撮影、バンドの確認

染色したゲルは UV 照射で写真撮影し、バンドの確認を行う。

8-3 Conventional PCR結果の判定

電気泳動結果の判定は「7-3 Conventional PCR結果の判定」と同様に行う。

9. 塩基配列の解析

9-1 PCR産物の精製と塩基配列決定

- 1) 電気泳動の結果に基づいて、PCR産物を各施設で使用しているDNA精製試薬 {QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Cat.No. 28104)など}により精製する。なお、DNA精製試薬は同程度の性能を有している物であれば代用可能である。
- 2) BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat.No.4337454)などを使用して、精製PCR産物を鋳型とした遺伝子増幅を行う(表4)。

表4 塩基配列決定のための遺伝子増幅反应用調整液

試薬	容量 (μl)
DDW	12-X
Primer (2.5-3.2μM)	2
5×Sequencing Buffer	2
BigDye [®] Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	4
Template (3-10ng)	X
Total	20

- 3) PCR反応は 96°C10秒、50°C5秒、60°C4分を25サイクル行う。
- 4) 反応後、Auto Seq G-50 (GEヘルスケア, Cat.No. 27-5340-01)などを用いて未反応ダイターミネーターを除去する。この試料をDNAシーケンサー (3500 Genetic Analyzer、Thermo Fisher Scientificなど)により解析し、塩基配列を決定する。未反応ダイターミネーターの除去には、Auto-Seq G-50以外にBigDye XTerminator[™] Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat.No. 4376486)などでも代用可能である。

10. 遺伝子型の判定

NoVの遺伝子型は、得られた配列をもとに決定する。Noronet (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>)やBLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)などのデータベースを用いることにより遺伝子型を判定できる⁹⁾。

11. NoV の命名法

推奨される標準株の遺伝子型表記方法は、「グループ/宿主/日本/検出年/ RdRp 領域タイプ-VP1 領域タイプ/株名」のように表記することが望ましい¹⁰⁾。下記に表記例を示した。

例) Norovirus GII/Hu/JP/2004/GII.P12-GII.3/

12. Real-time PCR 法

12-1 Real-time PCR 法による NoV の定量的検出法

Real-time PCR 法は、PCR 増幅産物に蛍光プローブが高い特異性で反応することから、Conventional PCR 法の 1st PCR よりも高感度かつ短時間で結果が得られる利点がある。現在では、NoV の検出に特化した試薬も市販されていることから、各施設の状況に応じて適切であると判断した方法を用いても良い。本マニュアルでは、Kageyama らのプライマーを使用した方法を示す¹¹⁾。本マニュアルでは、ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を使った方法を示すが、他の機器を使用する場合は、試薬や測定条件の至適化が必要である。

12-2 必要な器具と試薬

1) 器具

ABI7500 Fast Real-Time PCR System、マイクロピペット、チューブ、MicroAmp FAST 96-well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific, Cat.No. 4346907)、MicroAmp Optical Adhesive Film (ABI, Cat.No. 4311971)、TaqManプローブ (5' FAM - 3' TAMRAあるいは5' FAM - 3'MGB)、プライマー、DDW、ノロウイルス定量リアルタイムPCR用標準物質 (使用前に必要なコピー数に調整する)

2) 試薬

TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, 4304437)

12-3 Real-time PCR 反応

1) 表 5 に示した反応液を調製する。

表 5 Real-time PCR 反应用調製液

試薬	GI	容量 (μl)	GII	容量 (μl)
DDW		4.4		4.6
Taq Man Universal PCR Master Mix		10.0		10.0
Forward primer (10μM)	COG1F	0.8	COG2F	0.8
			ALPF	0.8
Reverse primer (10μM)	COG1R	0.8	COG2R	0.8
TaqMan プローブ (4pmol/μl)	RING1-TP (a)	1.5	RING2AL-TP	1.0
	RING1-TP (b)	0.5		
Total		18.0		18.0

- 2) プレート (Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate)のウェルに 18μl ずつ反応液を入れる。
- 3) No Template Control (NTC)として DDW 2μl を 1 ウェルに加える。
- 4) 「6-2. cDNA 合成反応」により作成した cDNA 2μl を 2 ウェルずつ加える。
- 5) 標準物質用ウェルは各濃度 1 ウェル以上とし、ノロウイルス GIおよびGIIの標準物質を別々に 1 ウェルあたり 2μl 加える。なお、標準物質は目的に応じて必要な濃度(10²-10⁴ コピー/2μl)に調製する。

- 6) MicroAmp Optical Adhesive Film でプレートにシールをする。
- 7) プレートをスピンドウンして、ウェルの側面に付着した反応液を落とす。
- 8) 50°C 2分、95°C 10分を1回、次いで95°C 15秒、56°C 1分を45サイクル、で反応させる。
- 9) 反応が終了したら、データを解析する。
- 10) Amplification Plot 画面を表示させ、Baseline および Threshold Line を設定する。
- 11) Standard Curve を表示させ、 R^2 が 0.990 以上であればよい (1 に近いほどよい)。
- 12) Amplification Plot 画面で結果を解析する。

<判定基準>

判定においては、Ct 値、増幅曲線、検量線の直線性、反応効率などを総合的に判断することが前提である。

1) 試験成立条件

検査材料の代わりにDDWを入れた陰性対照が陰性(蛍光強度の増大が認められないあるいはCt値40以上)であり、100コピー/反応の標準物質がCt値35以内となった場合に試験が成立する。上記条件が満たされないときは再試験を行う。

2) 判定

100 コピー/反応よりも低い濃度の標準物質を使用した場合に、Ct 値が 35 以上 (40 以内)で蛍光強度の増大が見られた場合には、該当する濃度を判定基準とすることも可能である。

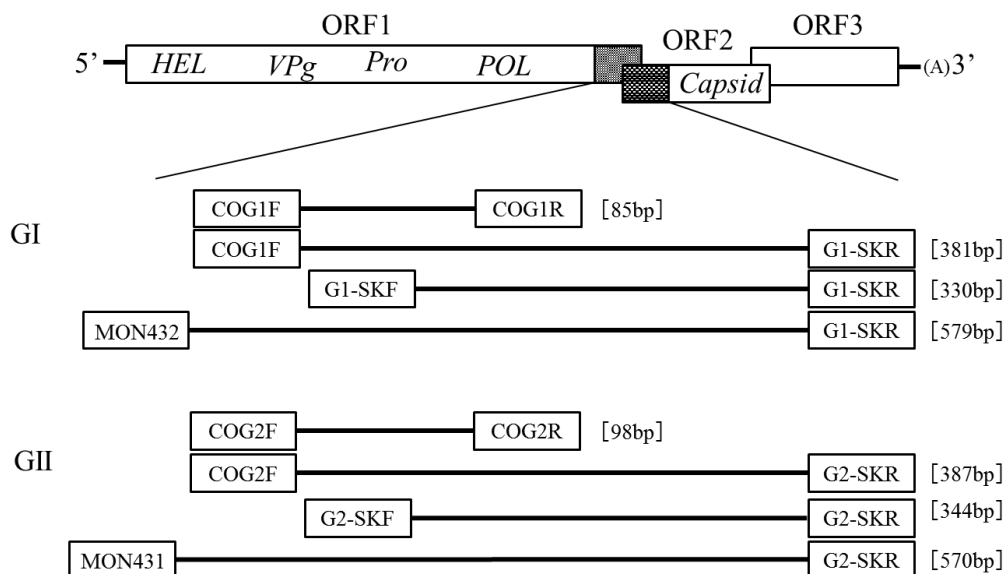


図 2. NoV 検査に使用するプライマーとプローブの位置

表 6. NoV 検査に使用するプライマーとプローブ

Primer	Sequence (5'→3')	Polarity	Position
G1-SKF	CTGCCCCGAATTGTAATGA	+	5342-5361
G1-SKR	CCAACCCARCCATTRTACA	-	5653-5671
G2-SKF	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	+	5046-5067
G2-SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	-	5367-5389
G2AL-SKR	CCACCAGCATATGAATTGTACAT	-	5367-5389
MON432	TGGACICGYGGICCYAAYCA	+	5093-5112
MON431	TGGACIAGRGGICCYAAYCA	+	4820-4839
COG1F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	+	5291-5310
COG1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	-	5354-5375
COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	+	5003-5028
ALPF	TTTGAGTCCATGTACAAGTGGATGCG	+	5003-5028
COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	-	5080-5100

Probe	Sequence (5'→3')*	Polarity	Position
RING1-TP(a)	AGATYGCGATCYCCTGTCCA	+	5321-5340
RING1-TP(b)	AGATCGCGGTCTCCTGTCCA	+	5321-5340
RING2AL-TP	TGGGAGGGSGATCGCRATCT	+	5048-5067

*5'-FAM あるいは VIC, 3'-TAMRA あるいは MGB、BHQ

12. 参考

マルチプレックス PCR 法

検査対象とする病原体が検体中に多種含まれる場合、それぞれの病原体を対象とした PCR を個別に行うことが望ましい。一方、マルチプレックス PCR 法は一度の PCR で複数の病原体の検出することができる利点がある。しかしながら、検出感度の低下や非特異的な増幅が起こるなど注意すべき点もあるため、結果は慎重に取り扱う必要がある。ここでは、参考として、NoV、サポウイルス、アストロウイルスの検出が可能な「ノロウイルス系」と、ロタウイルス、アデノウイルスの検出が可能な「ロタウイルス系」のマルチプレックス PCR 法を示す^{12,13)}。

表7 マルチプレックス PCR 試薬調製

ノロウイルス系 (μl)		ロタウイルス系 (μl)	
Template cDNA	10	Template cDNA	10
G1-SKF (50μM)	0.4	Beg 9 (50μM)	0.4
G1-SKR (50μM)	0.4	VP7-10' (50μM)	0.4
COG2F (50μM)	0.4	ADG9-1F (50μM)	0.4
G2-SKR (50μM)	0.4	ADG9-1R (50μM)	0.4
SLV5317 (50μM)	0.4	G8NS1 (50μM)	0.4
SLV 5749 (50μM)	0.4	G8NS2 (50μM)	0.4
PreCAP1 (50μM)	0.4	Ad1 (50μM)	0.4
82b (50μM)	0.4	Ad2 (50μM)	0.4
DDW	11.8	DDW	11.8
Perfect shot Ex Taq	25	Perfect shot Ex Taq	25
Total	50	Total	50
94°C	3min	94°C	3min
94°C	1 min	94°C	1 min
50°C	1 min	50°C	1 min
72°C	1 min	72°C	1 min
72°C	10min	72°C	10min
増副産物		増副産物	
NoV GI	330 (bp)	A 群ロタウイルス	395 (bp)
NoV GII	387	B 群ロタウイルス	814
サポウイルス	434	C 群ロタウイルス	351
アストロウイルス	719	アデノウイルス	462

表8 マルチプレックス RT-PCR 法に使用するプライマー

Primer	Sequence (5'-3')	Polarity	Position
G1-SKF	CTGCCCCGAATTYGTAAATGA	+	5342-5361
G1-SKR	CCAACCCARCCATTRTACA	-	5653-5671
COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATG	+	5003-5028
G2-SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	-	5367-5389
SLV5317	CTCGCCACCTACRAWGCBTGGTT	+	5317-5339
SLV5749	CGGRCYTCAA AVSTACCBCCCCA	-	5727-5749
PreCAP1	GGACTGCAAAGCAGCTTCGTG	+	4235-4255
82b	GTGAGCCACCAGCCATCCCT	-	4934-4953
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	+	1-28
VP7-1'	ACTGATCCTGTTGGCCATCCTTT	-	373-395
ADG9-1F	GGCAATAAAATGGCTTCATTGC	+	1-22
ADG9-1R	GGGTTTTTACAGCTTCGGCT	-	795-814
G8NS1	ATTATGCTCAGACTATCGCCAC	+	353-374
G8NS2	GTTTCTGTACTAGCTGGTGAAC	-	683-704
Ad1	TCCCCATGGCICAYAACAC	+	1834-1853
Ad2	CCCTGGTAKCCRATRTTGTA	-	2315-2296

13. 参考文献

- 1) 片山和彦、木村博一. ノーウォークウイルス(ノロウイルス)の遺伝子型(2015年改訂版). 病原微生物検出情報. 2015, 9月8日掲載.
- 2) 田中智之、三好龍也、内野清子. 感染症(腸管感染症)ノロウイルスの迅速診断法. 診断と治療. 2009;97(9):1728-1731.
- 3) 田中智之、位田忍、浅利誠志、藤沢卓爾、鍵本誠一、牛島廣治、武田直和、田尻仁. 臨床とウイルス. 2011;39(3), 155-160.
- 4) de Graaf M, van Beek J, Koopmans MP. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(7):421-33.
- 5) Ruis C, Roy S, Brown JR, Allen DJ, Goldstein RA, Breuer J. The emerging GII.P16-GII.4 Sydney 2012 norovirus lineage is circulating worldwide, arose by late-2014 and contains polymerase changes that may increase virus transmission. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179572.
- 6) 平成 29-31 年度 AMED 新興・再興感染症に対する革新的医薬品開発研究事業「究「下痢症ウイルス感染症の分子疫学および流行予測に関する研究」(研究代表者: 木村博一、研究分担者: 調恒明) 結果より引用(投稿準備中)
- 7) Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods*. 2002;100(1-2):107-114.
- 8) Cannon JL, Barclay L, Collins NR, Wikswø ME, Castro CJ, Magaña LC, Gregoricus N, Marine RL, Chhabra P, Vinjé J. Genetic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States from 2013 to 2016 Demonstrated Emergence of Novel GII.4 Recombinant Viruses. *J Clin Microbiol*. 2017;55(7):2208-2221
- 9) Kroneman A, Vennema H, Deforche K, Avoort HV, Peñaranda S, Oberste MS, Vinjé J, Koopmans An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol*. 2011;51(2):121-125.
- 10) Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol*. 2013;158(10):2059-68.
- 11) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2003;41(4):1548-1557.
- 12) Yan H, Nguyen TA, Phan TG, Okitsu S, Li Y, Ushijima H. Development of RT-multiplex PCR assay for detection of adenovirus and group A and C rotaviruses in diarrheal fecal specimens from children in China. *Kansenshogaku Zasshi*. 2004;78(8):699-709.
- 13) Kittigul L, Pombubpa K, Taweekate Y, Yeephoo T, Khamrin P, Ushijima H. Molecular characterization of rotaviruses, noroviruses, sapovirus, and adenoviruses in patients with acute gastroenteritis in Thailand. *J Med Virol*. 2009;81(2):345-353.

執筆者一覧

群馬パース大学

北里大学

北海道大学

群馬県衛生環境研究所

川崎市衛生研究所

大阪健康安全基盤研究所

愛媛県立衛生環境研究所

山口県環境保健センター

福岡県保健環境研究所

国立感染症研究所

木村博一

片山和彦

大森亮介

高橋裕、塚越博之、猿木信裕

松島勇紀、清水英明、岡部信彦

左近直美、本村和嗣

豊嶋千俊、四宮博人

岡本玲子、村田祥子、戸田昌一、調恒明

吉富秀亮、中村麻子、小林孝行

染谷雄一、村上耕介、岡本貴世子

【謝辞】本マニュアルは、新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業（18fk0108033）の補助金を受けて作成された。