

ノロウイルス（下痢症ウイルス） レファレンスセンター報告

国立感染症研究所 ウイルス第二部
2021年8月

報告内容

- ノロウイルス
 - 現行のGII検出用リアルタイムPCRに用いるプライマー・プローブについて
- ロタウイルス
 - ロタウイルスのリアルタイムPCR用プライマー・プローブセットについて
- サポウイルス
 - 検出マニュアル発行について

ノロウイルスのリアルタイムPCRによる検出

参照論文

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 2003, p. 1548-1557
 0095-1137/03/\$08.00+0 DOI: 10.1128/JCM.41.4.1548-1557.2003
 Copyright © 2003, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 41, No. 4

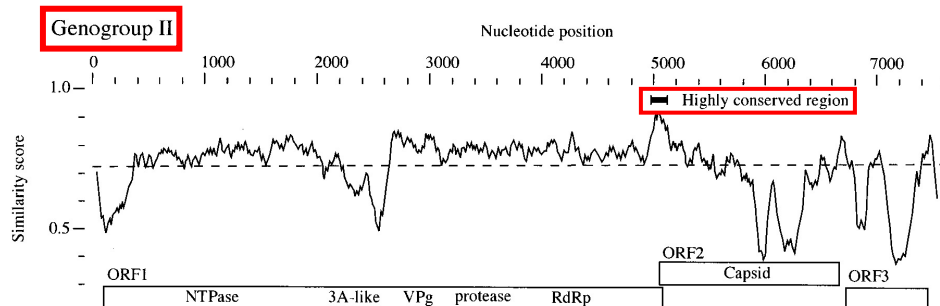
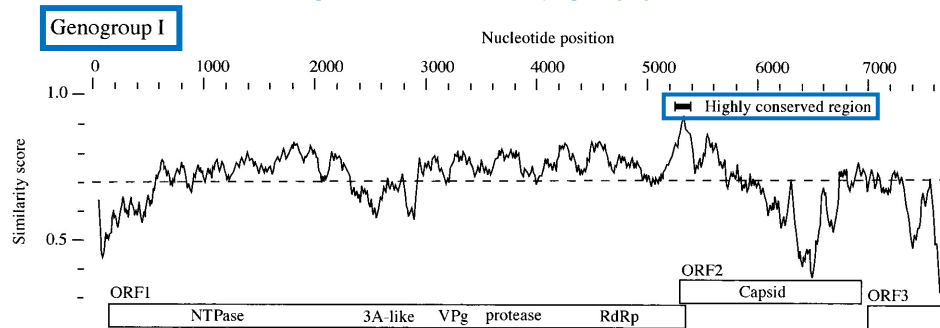
Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR

Tsutomu Kageyama,^{1*} Shigeyuki Kojima,¹ Michiyo Shinohara,² Kazue Uchida,² Shuetsu Fukushi,¹
 Fuminori B. Hoshino,¹ Naokazu Takeda,³ and Kazuhiko Katayama³

Section of Infectious Disease, R&D Center, BML, Kawagoe, Saitama 350-1101,¹ Saitama Institute of Public Health, Saitama, Saitama 338-0824,² and Department of Virus Diseases and Vaccine Control, National Institute of Infectious Diseases, Musashi-murayama, Tokyo 208-0011,³ Japan

Received 15 April 2002/Returned for modification 28 September 2002/Accepted 6 January 2003

遺伝子型内の類似度



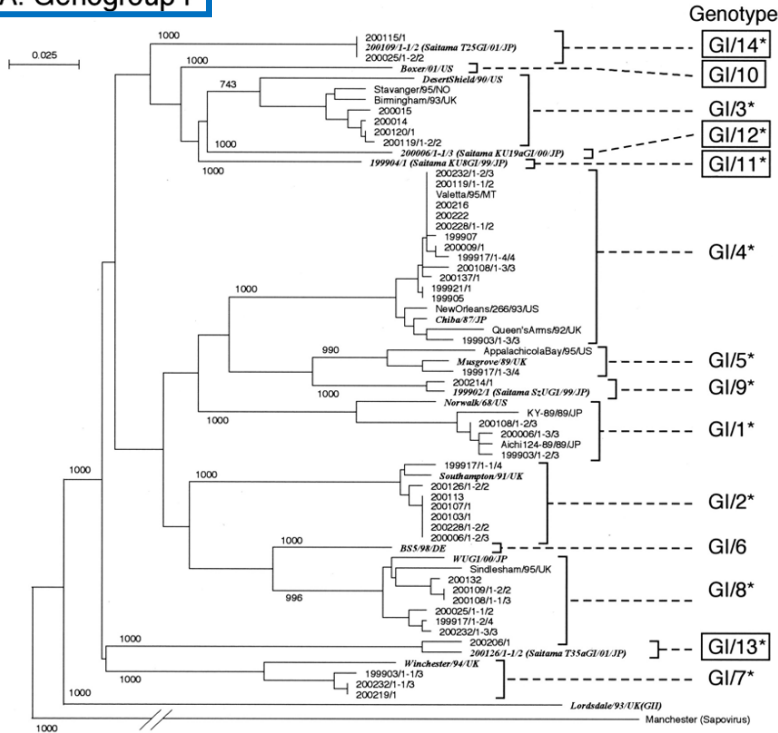
リアルタイムPCR用 プライマー・プローブセット

Genogroup	Primer or probe
GI	Primer COG1F Primer COG1R Probe ^c RING1(a)-TP RING1(b)-TP
GII	Primer COG2F Primer COG2R Probe RING2-TP

Fig. 1、Table 2をそれぞれ改変

既存プライマー・プローブで検出できない GII遺伝子型の出現とプライマー・プローブの変更

A. Genogroup I



B. Genogroup II



Genogroup	Primer or probe
GI	Primer COG1F Primer COG1R Probe ^c RING1(a)-TP RING1(b)-TP
GII	Primer COG2F Primer COG2R Probe RING2-TP + Primer ALPF + Probe RING2AL-TP

ノロウイルスの再分類 (2013年時点)

Genogroup I

旧表記	新表記
GI/1	GI.1
GI/2	GI.2
GI/3	GI.3
GI/4	GI.4
GI/5	GI.5
GI/6	GI.6
GI/7	GI.7
GI/8	GI.6
GI/9	GI.5
GI/10	GI.8
GI/11	GI.3
GI/12	未定NA
GI/13	GI.9
GI/14	GI.3

Genogroup II



旧表記	新表記
GII/1	GII.1
GII/2	GII.2
GII/3	GII.3
GII/4	GII.4
GII/5	GII.5
GII/6	GII.6
GII/7	GII.7
GII/8	GII.8
GII/9	GII.9
GII/10	GII.10
GII/11	GII.17
GII/12	GII.12
GII/13	GII.14
GII/14	GII.13
GII/15	GII.16
GII/16	GII.21
(GII/17=GIV)	-
GII/18	GII.22
GII/19	GII.15
-	GII.11
-	GII.18
-	GII.19
-	GII.20

2013年の再分類で
GII/17がGIVに変更された



GIVは稀にしか検出されないが、
ヒトから検出されることから
引き続きRING2AL-TPを使用

プライマー・プローブ変更前後におけるリアルタイムPCRの比較

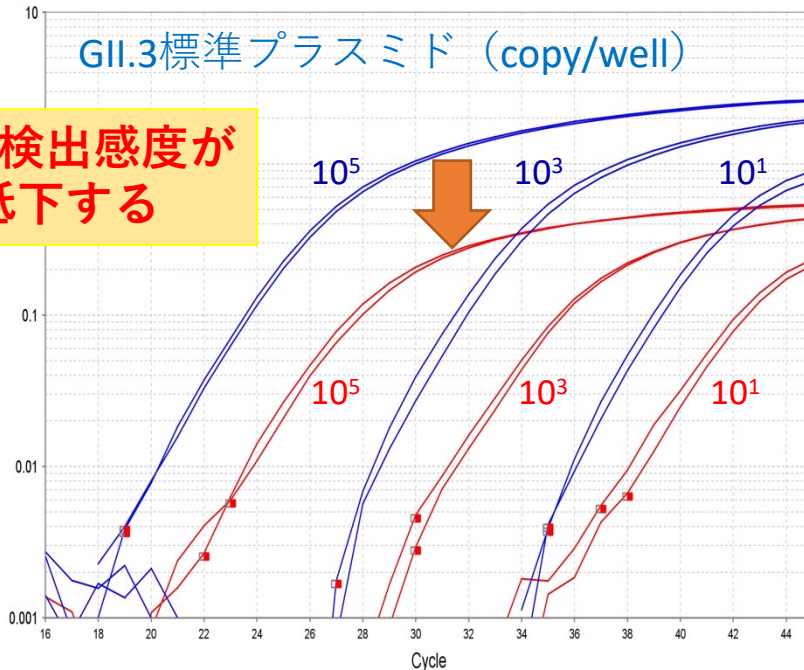
	プライマー (μM)			プローブ (μM)	
	COG2F	COG2R	ALPF	RING2-TP	RING2AL-TP
	0.4	0.4		0.2	
	0.4	0.4	0.4		0.2

RING2-TP: TGGGAGGGCGATCGCAATCT

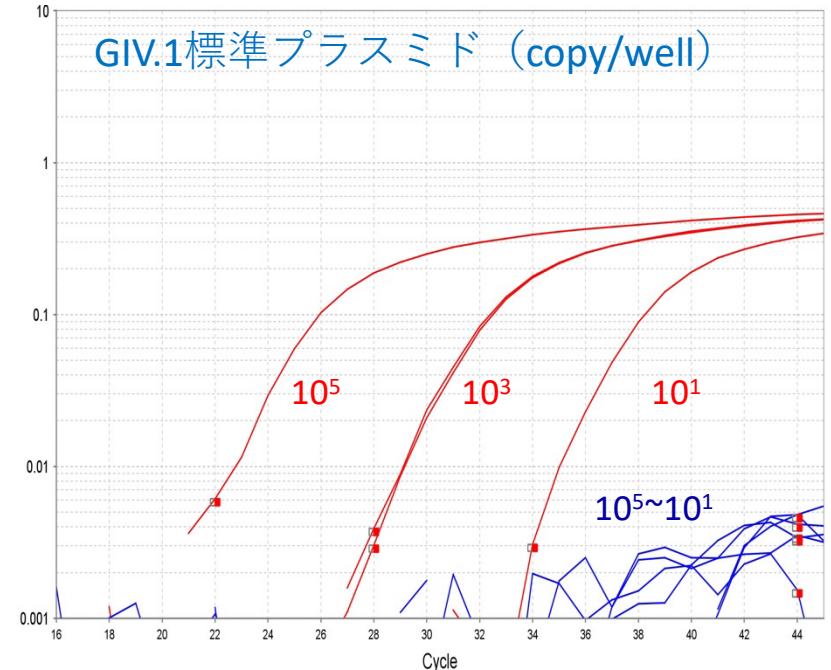
RING2AL-TP: TGGGAGGGSGATCGCRATCT

GII.3標準プラスミド (copy/well)

GIIの検出感度が低下する



GIV.1標準プラスミド (copy/well)



Thermo QuantStudio 3

50°C, 2 min → 95°C, 10 min → (95°C, 15 sec → 56°C, 1 min) x40 cycles

ノロウイルスGII検出用リアルタイムPCR に用いるプライマー・プローブについて

- GIV（旧GII/17：アルファトロン型）は既存のGII検出用プライマー・プローブセットでは検出できない
- GIV用プライマー・プローブセットは、GII用セットに比べてGIIの検出感度が低下するので注意が必要である

ロタウイルスのリアルタイムPCR用プライマー・プローブセットについて

- 現在、2種類のプライマー・プローブセットが広く利用されている。
(ターゲットはいずれもNSP3遺伝子だが、位置が異なる)

セット① (Freeman *et al.*)

Journal of Medical virology 80 (2008) 1489–1496

Target	Primer name	5' - sequence -3'	Product size	Position
NSP3	NVP3-FDeg	ACCATCTWCACRTRACCCTC	87	988–1007
	NVP3-R1	GGTCACATAACGCCCTATA		1055–1074
	NVP3-Probe	ATGAGCACAAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA		1009–1041

※Integrated DNA Technologies (IDT)社のダブルクエンチャープローブ (5'-FAM/ZEN/3'-IBFQ) の使用を推奨。

セット② (Jothikumar *et al.*)

Journal of Virological Methods 155 (2009) 126–131

Target	Primer name	5' - sequence -3'	Product size	Position
NSP3	JVKF	CAGTGGTTGATGCTCAAGATGGA	131	17–39
	JVKR	TCATTGTAATCATATTGAATACCCA		123–147
	JVKP	ACAAGCTGCAGCTTCAAAGAAGWGT		72–96

ロタウイルスのリアルタイムPCR用プライマー・プローブセットについて

- セット①、②とも、主要な流行株（T1型、T2型）は概ね検出可能。
- セット①は幅広いロタウイルス株を検出可能。
ただし、便検体ではしばしば非特異反応が見られ、
陰性検体でも10 copies/uL前後検出されて偽陽性となる場合がある。
100 copies/uL以上を陽性として判定するのが無難。

注意!

- セット②はAU-1型株（T3型）を検出できない。
- ワクチン株のうち、ロタリックス（T1型）は検出可能だが、
ロタテック（T6型）は検出感度が大幅に落ちる。（1/1000程度）
→ セット②は非推奨。

サポウイルス検出マニュアル

- 第1版が2021年7月に発行された

地方衛生研究所担当者の皆さま

- 日頃よりノロウイルス（下痢症ウイルス）レファレンスセンター活動にご協力頂き、ありがとうございます。
- 新型コロナウイルス感染症の流行に伴い、下痢症ウイルスの流行が抑えられています。これにより、下痢症ウイルス感染症に対して免疫力のない、あるいは、低下した人たちが蓄積されていると考えられますので、今後大流行の発生が懸念されます。継続的な注意喚起が必要と考えます。

標準プラスミド（陽性コントロール）請求先

- ノロウイルス
 - 国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター
第六室 岡本 貴世子（k-okmt@nih.go.jp）
- ロタウイルス、サポウイルス
 - 国立感染症研究所 ウイルス第二部
第一室 染谷 雄一（someya@nih.go.jp）

ご意見をお寄せください

- 既存の病原体検出マニュアルに記載された方法の問題点や改善すべき点について
- アストロウイルス、アイチウイルス検出について、実施の有無、方法の比較の経験（優劣）、マニュアル作成の必要性など
- ウイルス第二部 染谷（someya@nih.go.jp）までお願いします。