

衛生微生物技術協議会

第40回研究会

ノロウイルスレファレンスセンター報告

染谷 雄一

国立感染症研究所 ウイルス第二部 第一室

someya@niid.go.jp

2019年7月11日



世話人交代のお知らせ（再掲）

2018年4月付で、ノロウイルスレファレンスセンターが

国立感染症研究所 感染症疫学センター 第六室 より

同 ウイルス第二部 第一室 に移りました。

これに伴い、本会議の世話人を

前任の 木村 博一 先生（現 群馬パース大学）に代わって

染谷 雄一 が担当しています。

標準プラスミドの請求先

- ノロウイルス

- ➡ 感染症疫学センター 第六室 岡本貴世子 k-okmt@niid.go.jp

- ロタウイルス、サポウイルス

- ➡ ウイルス第二部 第一室 染谷雄一 someya@niid.go.jp

にお願いいたします。

病原体検出マニュアルの作成


- ノロウイルス検出マニュアル 第1版 公開（2019年6月）
- ロタウイルス検出マニュアル 第2版 公開（2019年6月更新）
- サポウイルス検出マニュアル 作成中（2020年度公開を目指す）

「病原体検出マニュアル」 (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>)

ノロウイルス検出マニュアル 第1版

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



3種のPCR法について説明

ノロウイルス検出マニュアル（第1版）の発行

- 令和元年（2019年）6月

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。

PCRによる増幅領域

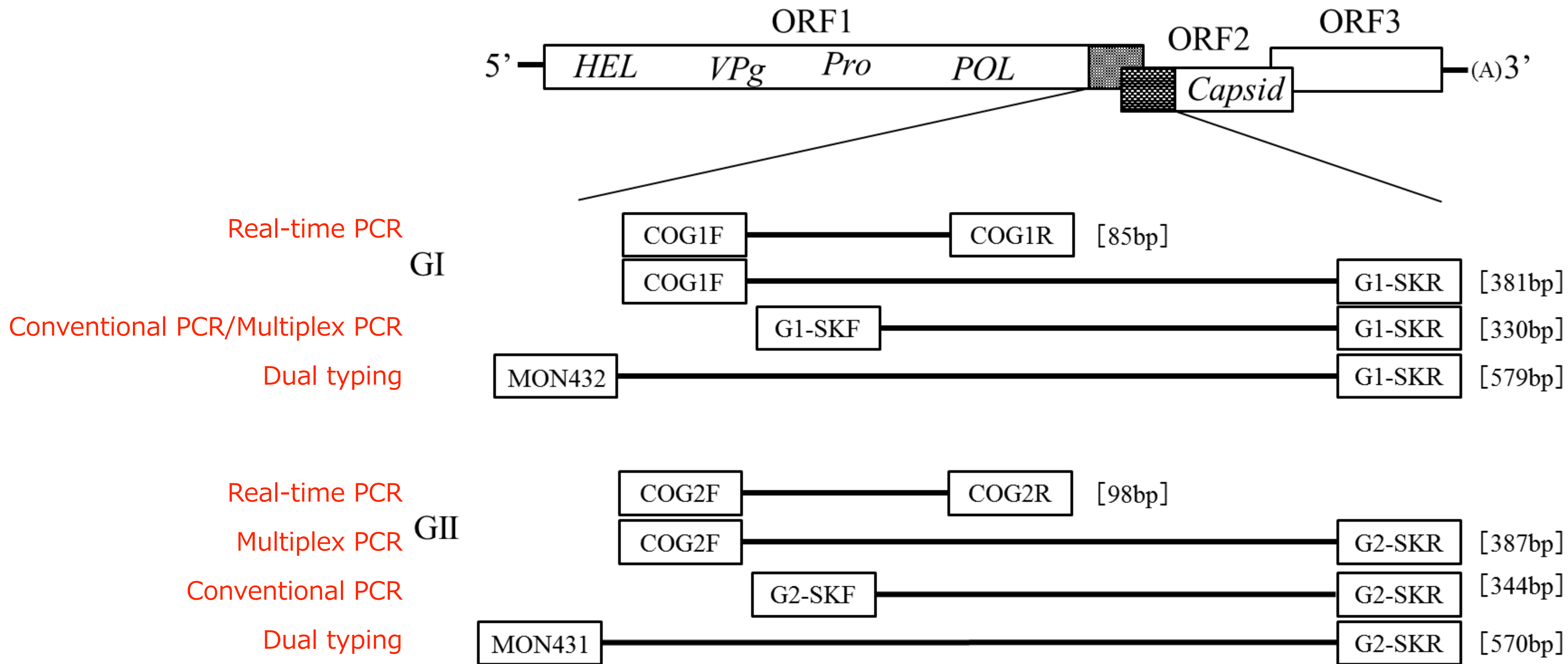


図 2. NoV 検査に使用するプライマーとプローブの位置

PCRに用いるプライマーの塩基配列

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	CTGCCCGAATTYGTAAATGA	+	5342-5361
G1-SKR	CCAACCCARCCATTRTACA	-	5653-5671
G2-SKF	CNTGGGAGGGGCGATCGCAA	+	5046-5067
G2-SKR	CCRCCNGCATRHCCRTRTACAT	-	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

Real-time PCR法の判定について

<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。

測定不具合の報告、判定に関する質問が寄せられる

➡ **Q & A / Troubleshooting を Appendix として公開することを検討**

Real-time PCR法の判定について

<質問1> 試験成立条件の「100コピー/反応でCt値35以内」を満たさない場合はどうすればよいか？

<回答> 平成27年3月27日付「ノロウイルス定量リアルタイムPCR標準物質の更新について」で配布された標準物質を使用した場合、「 10^3 copies/ウエルの標準物質を添加した実験系のCt値は、ほぼ30サイクル」になる。

試験成立条件を満たさない場合、波形を確認し、必要に応じ補正を行い、標準物質1000コピー/反応のCt値が30（±1）となっていることを確認する。

それでも「100コピー/反応でCt値35以内」にならない場合、プローブ等の試薬や標準物質の劣化、希釈系列作成の不備、機械の不調等が考えられる。検査系の見直しが必要と思われる。

Real-time PCR法の判定について

<質問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。」）に関して、

「100コピー/反応でCt値35以上」かつ「100コピー未満/反応でCt値が35～40」の場合、試験は成立しないのか？

<回答> 質問1と同様、検査系の見直しが必要と考えられる。ただし、検査検体のCt値が標準物質100コピーのCt値よりも小さい場合は陽性と判断して問題はない。

ロタウイルス検出マニュアル（第2版）の更新

- 第1版 平成26年（2014年）12月
- 第2版 令和元年（2019年）6月

Ⅲ. 検査方法

Ⅲ-1. イムノクロマト法

Ⅲ-2. ELISA 法

Ⅲ-3. RNA 抽出

Ⅲ-4. PAGE によるウイルス RNA の検出

Ⅲ-5. リアルタイム PCR

Ⅲ-6. マルチプレックス PCR（VP7 の遺伝子型決定法）

Ⅲ-7. RT-PCR

Ⅲ-8. シーケンス解析

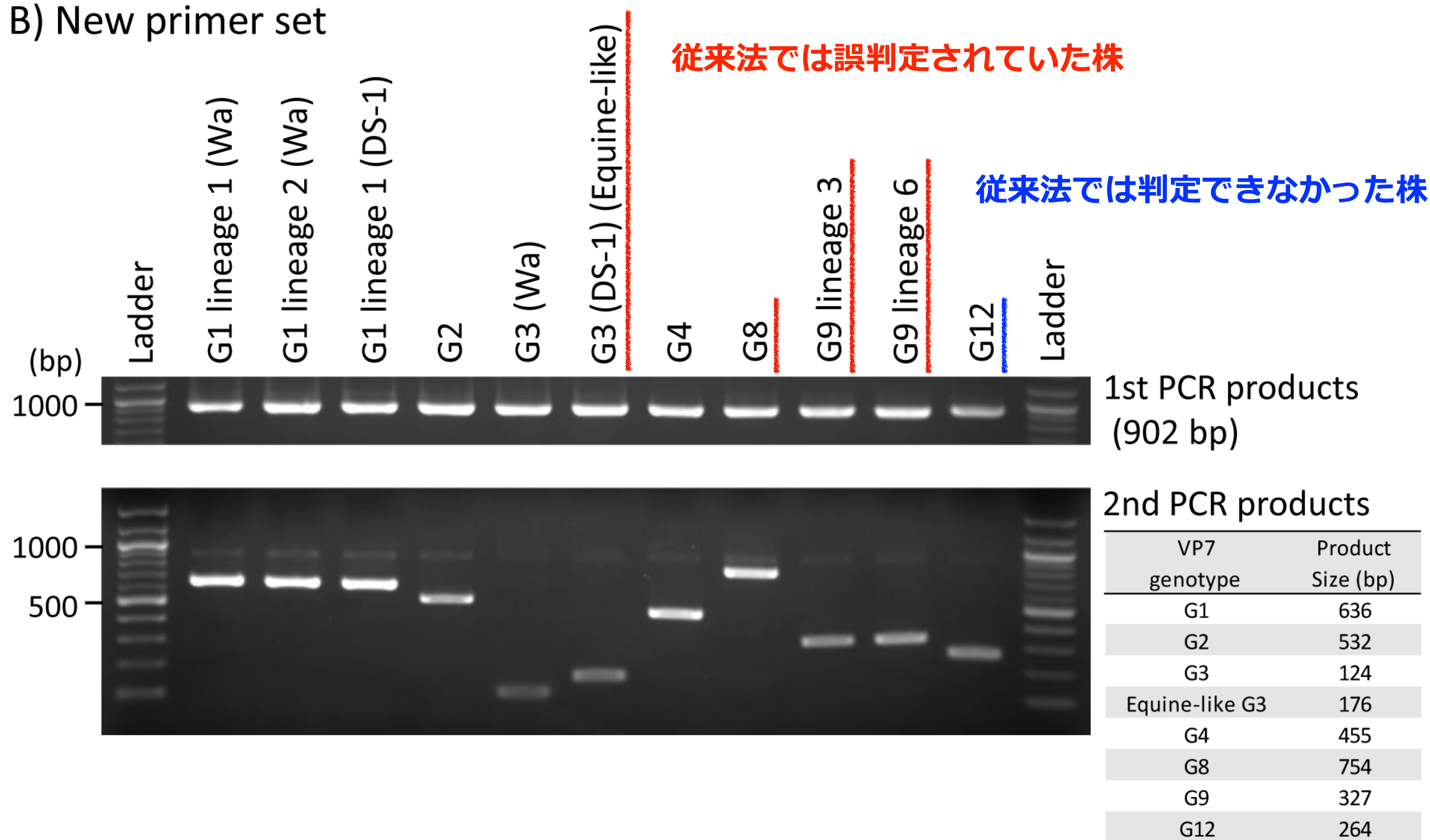
※ワクチン株との鑑別について



第1版より追加・変更

VP7 genotyping法を改良 (new primer setを設計)

B) New primer set



8種類の型 (G1, G2, human G3, equine-like G3, G4, G8, G9, G12) を正しく判別可能

ワクチン株との鑑別について

➤ ワクチン株のアクセッション番号

ロタリックス

	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
Reference	HG917354	JN849113	HG917356	JX943609	JX943610	JX943611	KC580607	HQ392411	HQ392420	HG917357	KC580611

ロタテック

Strain	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
WI79-9 (G1)	GU565057	GU565055	GU565056	GU565052	GU565053	GU565054	GU565058	GU565059	GU565060	GU565061	GU565062
SC2-9 (G2)	GU565068	GU565066	GU565067	GU565063	GU565064	GU565065	GU565069	GU565070	GU565071	GU565072	GU565073
WI78-8 (G3)	GU565079	GU565077	GU565078	GU565074	GU565075	GU565076	GU565080	GU565081	GU565082	GU565083	GU565084
BrB-9 (G4)	GU565090	GU565088	GU565089	GU565085	GU565086	GU565087	GU565091	GU565092	GU565093	GU565094	GU565095
WI79-4 (P[8])	GU565046	GU565044	GU565045	GU565041	GU565042	GU565043	GU565047	GU565048	GU565049	GU565050	GU565051

- ロタテックの場合、VP7、VP4、VP3は複数の遺伝子型が
ワクチンに混在しているため、シークエンス解析が困難。
- シークエンスは他の遺伝子（VP6やNSP4等）をターゲットに解析する。

検討すべき課題

- ノロウイルス検出マニュアル第1版記載の「参考 マルチプレックスPCR法」の位置付け
 - ノロウイルスGI, GII、サポウイルス、アストロウイルス
 - A群, B群, C群ロタウイルス、アデノウイルス
 - アストロウイルス検出法
 - アデノウイルス検出法
- 検出法改善の必要性を検証
標準プラスミドは？
マニュアルの必要性は？