

病原体検出マニュアル
サポウイルス（第1版）
2021年7月

目次

1. 概説
2. 検査の準備
3. 検査の進め方
4. 検査材料懸濁液の調製
5. RNA 抽出
6. cDNA 合成
7. Real-time PCR
8. Capsid 領域の一部を増幅する conventional PCR
9. 塩基配列の解析
10. 遺伝子型の判定
11. 参考文献

執筆者一覧

リアルタイム PCR 用陽性コントロールの問い合わせ先

1. 概説

1-1 病原体と分類

サポウイルスはノロウイルスと同じカリシウイルス科に属する一本鎖 RNA ウイルスである。名前の由来は“札幌”からきている。ウイルス粒子は直径約 41～44nm でエンベロープはない。サポウイルスのゲノムは約 7500 塩基で、共通して 2 つのタンパク質コード領域 (open reading frame; ORF) があり、ORF1 は非構造タンパク質 (NS1～7) と構造タンパク質 (VP1) を、ORF2 はもう 1 つの構造タンパク質 (VP2) をコードしている。ヒトから検出されたサポウイルスは VP1 領域の配列により、現在、4 種類 (GI、GII、GIV、GV) の genogroup に分けられ、さらに複数の genotype に分類可能である^(1, 2)。現時点でヒトからは GI. 1～7、GII. 1～8、GII. NA1、GIV. 1、GV. 1～2 が検出されている^(3, 4)。

1-2 疫学

サポウイルスは、感染性胃腸炎患者や流入下水等の環境水からほぼ通年検出される。全年齢層から検出されており、ウイルス汚染食材や調理従事者が関与したと考えられる食中毒事例や、ヒト-ヒト感染と思われる集団事例も発生している。同一検体、事例から複数のサポウイルス株が検出されたり、ノロウイルス、ロタウイルスなどと同時に検出されることもある⁽¹⁾。

1-3 臨床症状

一般に、潜伏期は 1～4 日程度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、倦怠感などを伴うこともある。発症後、時間経過とともに患者便中のサポウイルス排出濃度が減少する。サポウイルス不顕性感染者の存在や再感染事例も明らかになっている⁽¹⁾。

2. 検査の準備

2-1 検査材料の取り扱い

サポウイルスは BSL2 の病原体であり、ウイルスを含むと考えられる検体 (患者便など) の取り扱いはすべてこの基準をクリアした安全キャビネット内で行う。検体で汚染した器材は、高圧蒸気滅菌もしくは次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理する。感染およびコンタミネーション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

検査材料をプラスチック製容器などに採取して密閉する。短期間の保存、輸送は冷蔵 (4℃) でも問題ない。長期保存の場合は、冷凍 (-70℃以下) が望ましい。便、直腸ぬぐい液、吐物、環境水などが検査に使用できる。

3. 検査の進め方

サポウイルスの検出には遺伝子検査法 (Real-time PCR や conventional PCR) を用いる。目的に応じた検査法を選択する必要がある (図 1)。また、多数あるサポウイルス遺伝子型株を確実に検出できる検出系を採用することが重要である。サポウイルスの遺伝子型判別は、ウイルスゲノムの中でも配列多様性が高く、抗原性との関連も高いと考えられるキャプシド (VP1) 領域で行う。

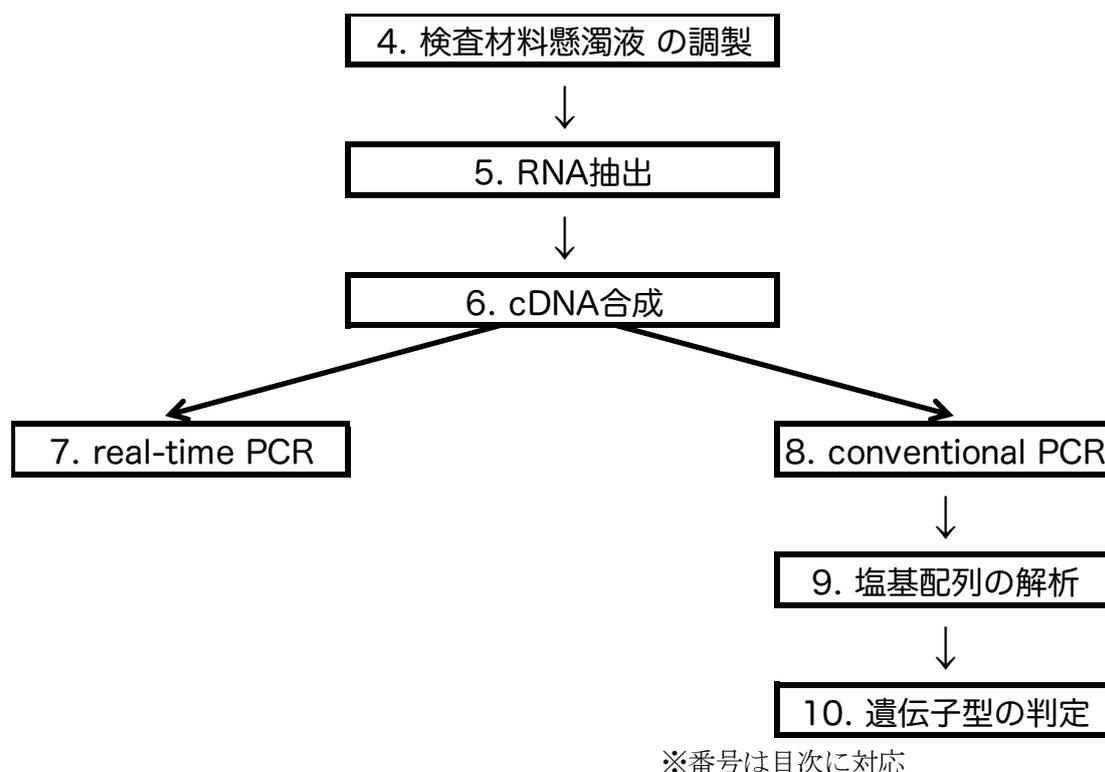


図1 サポウイルスの核酸検出の流れ

4. 検査材料懸濁液の調製

感染性胃腸炎患者の検体として最も一般的と考えられる便検体について記述する。ノロウイルスの検出マニュアルと同様の方法で構わない。

- 1) 適切な容量の遠沈管を使用して、便にPBS (-)などを加え攪拌し、便懸濁液を調製後、夾雑物除去を目的に $5,000\times g$ で、10~30分間冷却遠心する。
- 2) 遠心上清を1.5mLチューブへ移して、 $12,000\times g$ で5分間冷却遠心した上清を検体としてRNA抽出に使用する。検体は冷凍保存 (-70°C 以下)が望ましい。

5. RNA 抽出

ノロウイルスの検出マニュアルと同様の方法で構わない。ウイルス RNA の抽出法には多くの方法があり、抽出キットも多数販売されている。本マニュアルでは例として DNaseI 処理を含む High Pure RNA Isolation Kit による方法を示すが、各施設で適切と判断した方法で RNA 抽出を行う。操作方法は、基本的にそれぞれのキットの説明書に従う。

5-1 必要な器材と試薬

1) 器材

1.5mL マイクロチューブ用高速遠心機 (13,000×g まで使用可能なもの)、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、1000 μL)、チューブ (1.5mL)

2) 試薬

エタノール (96-100%)、

RNA 抽出キット: 例 High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Cat.No. 11 828 665 001)

5-2 High Pure RNA Isolation Kit を用いる時のRNA抽出

1) マニュアルに従い DNaseI に指定された量の溶出バッファー (水) を加える、また洗浄バッファー I および II にそれぞれ指定された量の特級エタノールを加える。

調製した DNaseI 溶液の余りは冷凍 (-20°C 以下)、洗浄バッファーは室温にて保存する。「4. 検査材料懸濁液の調製」の遠心上清は、室温 (15~25°C) に戻してから使用する。使用前にキットに付属している HighPure フィルターチューブと、回収用チューブを組み立てる。

2) 操作法

以下の操作はすべて室温で行う。

- (1) 1.5mL チューブに溶解・結合バッファー 400μL を入れる。
- (2) 「4. 検査材料懸濁液の調製」の便懸濁液遠心上清 200μL を加え、充分混合するため 15 秒間攪拌する。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(スピンドウン) する。
- (3) 全量 600μL を 1) で組み立てたフィルターチューブ上部のバッファー受けに加え、蓋を閉め、8,000×g で 15 秒間(使用機器の設定によっては 1 分間) 遠心する。回収用チューブに排出された液を捨て、フィルターチューブと回収用チューブを組み立てる。
- (4) DNase 溶液 100μL (DNase インキュベーションバッファー 90μL に DNaseI 溶液 10μL を加え混合したもの) をフィルターチューブ上部のバッファー受けに加え、フィルターチューブの蓋を閉めて室温 (15~25°C) に 15 分間置く。
- (5) フィルターチューブの蓋を開け、洗浄バッファー I を 500μL 入れる。蓋を閉め、8,000×g で 1 分間遠心する。回収用チューブに排出された液を捨て、フィルターチューブと回収用チューブを組み立てる。
- (6) フィルターチューブの蓋を開け、洗浄バッファー II を 500μL 入れる。蓋を閉め、

- 8,000×g で 1 分間遠心する。回収用チューブに排出された液を捨て、フィルターチューブと回収用チューブを組み立てる。
- (7) フィルターチューブの蓋を開け、洗浄バッファー II を 200μL 入れる。蓋を閉め、13,000×g で 2 分間遠心する。回収用チューブに排出された液を捨て、フィルターチューブと回収用チューブを組み立てる。
- (8) フィルターチューブを新しい蓋つき 1.5mL のチューブに移し、(7)の排出液の入っているチューブは捨てる。フィルターチューブの蓋を開け、溶出バッファーを 50 ないし 100μL 加え、蓋を閉めて 1 分間程度置いた後、8,000×g 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 は速やかに使用する。すぐに使用しない場合は、-70℃以下で保存することが望ましい。

6. cDNA 合成

6-1 必要な器材と試薬

cDNA 合成 (Reverse Transcription: RT 反応)のための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。

1) 器材

サーマルサイクラー、マイクロピペット、マイクロチップ、マイクロチューブ、PCR チューブもしくは PCR プレート

2) 試薬

例 ReverTra Ace (Toyobo, TRT-101)、RNase inhibitor (Takara, 2313A)、Random 6 mers (Takara, 3801)、10mM dNTPs mixture (Promega, U151B)

6-2 cDNA 合成反応

以下の表に従い、反応液を調製する。

抽出RNA	5 μL
5×ReverTra Ace Buffer	2 μL
RNase inhibitor (40 units/μL)	0.1 μL
Random 6 mers (100 μM)	0.5 μL
10mM dNTPs mixture	1 μL
ReverTra Ace (100 units/ μl)	0.5 μL
DNase/RNase-free Water	0.9 μL
Total	10 μL/sample

- 2) 反応は 30℃で 10 分間、42℃で 30 分間、95℃で 5 分間行い、その後すぐに 4℃に冷却し、保存する。すぐに使用しない場合は、-20℃以下で保存することが望ましい。

7. Real-time PCR

7-1 Real-time PCR 法によるサポウイルスの定量的検出法⁶⁾

Real-time PCR 法は、電気泳動が不要であることから、スクリーニング検査に適する。本マニュアルでは、ヒトから検出されている多様なサポウイルス遺伝子型の検出が可能なプライマー、プローブを用いる系を記載する。ノロウイルスと異なり、genogroup 別検出系ではない。

7-2 必要な器材と試薬

1) 器材

リアルタイムPCR装置(例 ABI7500 Fast Real-Time PCR System)、マイクロピペット、マイクロチップ、マイクロチューブ、MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific, Cat.No. 4346907)、MicroAmp Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific, Cat.No. 4311971)、TaqMan MGBプローブ (5´ FAM - 3´ MGB)、プライマー、DNase/RNase-free Water、サポウイルス定量用陽性コントロール* (検査当日に必要なコピー数に調製する)

*サポウイルス定量用陽性コントロールが必要な場合の問い合わせ先は末尾を参照。

2) 試薬

例 QuantiTect Probe PCR Kit Master Mix (QIAGEN, 204343)

多数の試薬が販売されている。同等の反応性が検証できる場合は、各施設で変更してよい。

使用するプライマー、プローブ

Name	Sequence (5' to 3')	Location in the sapovirus genome with Genbank	
HuSaV-F1	GGC HCT YGC CAC CTA YAA YG	5079-5098	X86560
HuSaV-F2	GAC CAR GCH CTC GCY ACC TAY GA	5078-5100	AJ249939
HuSaV-F3	GCW RYK GCW TGY TAY AAC AGC	5121-5141	DQ366344
HuSaV-R	CCY TCC ATY TCA AAC ACT A	5159-5177	X86560
HuSaV-TP-a	FAM-CCN CCW ATR WAC CA-MGB-NFQ	5101-5114	X86560
HuSaV-TP-b	FAM-CCN CCW ACR WAC CA-MGB-NFQ	5101-5114	X86560

プローブの長さが 14 塩基と短いため、T_m エンハンサーである Minor Groove Binder (MGB) probe を使用する。

7-3 Real-time PCR 反応

1) 以下の表に従い、反応液を調製する*。

DNase/RNase-free Water	2.5 μ L
Quantitect Probe Kit Master Mix	12.5 μ L
HuSaV-F1 primer (20 μ M)	1.5 μ L
HuSaV-F2 primer (20 μ M)	1.5 μ L
HuSaV-F3 primer (20 μ M)	1.5 μ L
HuSaV-R primer (20 μ M)	1.5 μ L
HuSaV-TP-a probe (5 μ M)	1.0 μ L
HuSaV-TP-b probe (5 μ M)*	1.0 μ L
Total	23 μ L / sample

反応液量は上記組成と同等の反応性が得られる範囲で調整してもよい。

*HuSaV-TP-b probe は GI.2 の中でも報告が稀な株の配列 (accession number LC349289) を検出するためのもの。HuSaV-TP-b probe を添加しない場合は、反応液にその分の DNase/RNase-free Water を加える。

- リアルタイム PCR 測定用プレートのウェルに上記の反応液を 23 μ L ずつ入れる。
- 「6-2 cDNA 合成反応」で調製した cDNA を 2 μ L/ウェル添加する。
- 陰性対照として、DNase/RNase-free Water を 2 μ L/ウェル添加する。
- 陽性コントロールを DNase/RNase-free Water で段階希釈し、 $10^7 \sim 10^2$ コピー/2 μ L の範囲の濃度に調製し、各濃度の陽性コントロールを 2 μ L/ウェル添加する。
 10^7 コピーから 10^2 コピーの範囲内に少なくとも 3 点以上置くと、定量直線性の評価や各サンプルのコピー数算出に有用である。必要に応じて、この範囲外の測定点を置いてよい。
- プレートにシールをして、遠心機でスピンドウンする。
- 下記の通り、リアルタイム PCR 反応を行う。

95°C、 15 分	40~45 サイクル
95°C、 15 秒	
60°C、 60 秒	

8) 反応終了後、Amplification Plot 画面を表示させ、Threshold Line を Auto にすると判定がうまくできないため、マニュアルで 0.01 (ABI7500Fast の場合)、Baseline を Auto に設定する。Standard Curve の直線性を確認する。 R^2 は 0.990 以上が望ましい (1 に近いほどよい)。必要に応じて各サンプルのコピー数 (実測値) を算出する。

7-4 リアルタイム PCR の結果解釈と判定

リアルタイムPCR法では蛍光シグナルが閾値を越えたPCRサイクル数をCt (Cycle threshold) 値と呼び、ターゲット核酸が多ければ低いCt値を、少ない場合は高いCt値を示す。各施設における判定においては、使用機器、試薬等の特性を考慮の上、検査材料の代わりに DNase/RNase-free Waterを入れた陰性対照で蛍光強度の増大が認められないことにくわえ、陽性コントロールおよび検体のCt値、増幅曲線、および検量線の直線性などを総合的に判断する必要があるため、Amplification Plot画面の確認は必須である。各施設で陽性コントロールが確実に出るカットオフ (Ct値40未満あるいは、100コピー、もしくはそれ以下など) を設定する。リアルタイムPCR法でサポウイルス陽性となった場合は、検出結果の特異性の検証と検出株遺伝子型を把握するため、別途cDNAを鋳型に、サポウイルスのCapsid領域の一部を増幅するRT-PCRを実施し、PCR産物の塩基配列を決定することを強く推奨する。このマニュアルに記載しているリアルタイムRT-PCR法の増幅産物は約100bpと短いため、シーケンス解析には適さない。

8. Capsid 領域の一部を増幅する conventional PCR⁽⁴⁾

サポウイルスの検出には多様な遺伝子型を検出できるプライマーセットの選択が重要である。また同一検体中に異なる genogroup のサポウイルス株が検出されることもあることから、本マニュアルではヒトから検出されている多様なサポウイルス遺伝子型の検出が可能なプライマーセットのうち、増幅産物の大きさによって genogroup (GI、GII、GIV、GV) を判断可能な系を記載する。

8-1 必要な器材と試薬

1) 器材

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、マイクロチップ、マイクロチューブ、PCR チューブもしくはPCR プレート

2) 試薬

DNase/RNase-free Water、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など)、TAE buffer、分子量マーカー (100 bp DNA Ladder など) PCR 用試薬 (例 : KAPA2G Fast ReadyMix PCR Kit (KAPA Biosystems、Code No. KK5101))

使用するプライマー

Name	Sequence (5' to 3')	Location in the sapovirus genome with Genbank	
M13F-SaV 1245Rfwd	tgtaaaacgacgccagc TAG TGT TTG ARA TGG AGG G	5159-5177	X86560
M13R-SV-G1-R	caggaaacagctatgacc CCC BGG TGG KAY GAC AGA AG	5561-5580	X86560
M13R-SV-G2-R	caggaaacagctatgacc CCA NCC AGC AAA CAT NGC RCT	5483-5503	AY237420
M13R-SV-G4-R	caggaaacagctatgacc GCG TAG CAG ATC CCA GAT AA	5413-5432	DQ058829
M13R-SV-G5-R	caggaaacagctatgacc TTG GAG GWT GTT GCT CCT GTG	5384-5404	AY646856

小文字はM13-tag に相当する付加配列である。M13-tag配列を利用することでgenogroupに関わらず、より確実にシーケンスを行うことができる。

8-2 PCR 反応

1) 以下の表に従い、反応液を調製する*。

cDNAもしくはDNase/RNase-free Water	2 μ L
KAPA2G Fast ReadyMix with dye	10 μ L
Forward primer M13F-1245R fwd (10 μ M)	1 μ L
Reverse primer M13R-SV-G1R (10 μ M)	1 μ L
Reverse primer M13R-SV-G2R (10 μ M)	1 μ L
Reverse primer M13R-SV-G4R (10 μ M)	1 μ L
Reverse primer M13R-SV-G5R (10 μ M)	1 μ L
DNase/RNase-free Water	3 μ L
Total	20 μL / sample

*反応液量は上記組成と同等の反応性が得られる範囲で調整してもよい。

増幅は 95°C 5分を 1 サイクル、95°C 20秒、53°C 20秒、72°C 5秒を 50 サイクル (希釈した PCR 反応液を用いる場合は 25 サイクル)、72°C 1分を 1 サイクルで行う。例示した試薬では約 1.5 時間で反応が終了する。

多数の試薬が販売されている。同等の反応性が検証できる場合は、各施設で変更してよい。

2) 電気泳動

例示した PCR 用試薬を用いた場合、反応液にはローディング色素が含まれるので、そのまま 5 μ L を 2.5 %程度のアガロースゲルにアプライし、泳動する。泳動 buffer は TAE を使用し、核酸染色用試薬で適宜染色する。

3) 写真撮影、バンドの確認

染色したゲルは UV 照射等で写真撮影し、バンドの確認を行う。

8-3 Conventional PCRの結果解釈と判定

検査材料の代わりにDNase/RNase-free Waterを入れた陰性対照でPCR増幅産物が見られないことにくわえ、検査材料から目的とする分子量（GI-約450bp、GII-約380bp、GIV-約310bp、GV-約240bp）にPCR増幅産物が見られた場合、陽性と判断する。陽性の場合、検出株の遺伝子型を把握するため、シーケンス解析を行う。

電気泳動により1つの検査材料から複数のバンドが見られた場合は、アガロースゲルから個別に精製するか、cDNAもしくはDNase/RNase-free Waterで20~100倍程度に希釈したPCR反応液から再度、8-2 1)に記載したようにPCRを実施する。1つの反応液には、Forward primer M13F-1245R fwdと各genogroupに特異的なreverse primerを用いること。鋳型にcDNAを用いる場合は50サイクル、希釈したPCR反応液を用いる場合は25サイクルを目処とする。

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DNA精製試薬（QIAquick PCR Purification Kit [QIAGEN, Cat. No. 28104]やQIAquick Gel Extraction Kit [QIAGEN, Cat. No. 28704]など）を用いて精製する。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。

以下の表に従い、反応液を調製する。反応液量は同等の反応性が得られる範囲で調整してよい。

Template DNA (精製PCR産物)	~13 µL
Primer* (2.5-3.3 µM)	1 µL
5×Sequencing Buffer	2 µL
BigDye [®] Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	4 µL
DNase/RNase-free Water	適量
Total	20 µL/sample

*M13F-tagもしくはM13R-tag Primer

各サンプルについてM13F-tag primer (5'-tgtaaacgacggccagt-3')とM13R-tag Primer (5'-caggaacagctatgacc-3')で別個にシーケンス反応を行い、双方向からアッセンブルした配列を得ることが望ましい。

- 3) 遺伝子増幅反応は96°C 10秒、50°C 5秒、60°C 4分を25サイクル行う。
- 4) 反応後、Auto Seq G-50 (Cytiva, 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は、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

得られた VP1 の塩基配列を BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) や human calicivirus typing website (<https://norovirus.ng.philab.cdc.gov/bctyping.html>)⁽⁶⁾ と いったオンライン解析ツールを用いてサポウイルスであること、および遺伝子型を判定する。Noronet (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>) でもサポウイルスの genogroup の判定はできる⁽⁶⁾。必要に応じて各遺伝子型株の VP1 塩基配列を用いて系統樹を作成する。

11. 参考文献

1. **Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ.** 2015. Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin Microbiol Rev* **28**:32-53.
2. **Takagi H, Oka T, Shimoike T, Saito H, Kobayashi T, Takahashi T, Tatsumi C, Kataoka M, Wang Q, Saif LJ, Noda M.** 2020. Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**:32078-32085.
3. **Diez-Valcarce M, Montmayeur A, Tatusov R, Vinje J.** 2019. Near-Complete Human Sapovirus Genome Sequences from Kenya. *Microbiol Resour Announc* **8**.
4. **Oka T, Yamamoto SP, Iritani N, Sato S, Tatsumi C, Mita T, Yahiro S, Shibata S, Wu FT, Takagi H.** 2020. Polymerase chain reaction primer sets for the detection of genetically diverse human sapoviruses. *Arch Virol* **165**:2335-2340.
5. **Oka T, Iritani N, Yamamoto SP, Mori K, Ogawa T, Tatsumi C, Shibata S, Harada S, Wu FT.** 2019. Broadly reactive real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of human sapovirus genotypes. *J Med Virol* **91**:370-377.
6. **Tatusov RL, Chhabra P, Diez-Valcarce M, Barclay L, Cannon JL, Vinje J.** 2021. Human Calicivirus Typing tool: A web-based tool for genotyping human norovirus and sapovirus sequences. *J Clin Virol* **134**:104718.

執筆者一覧

秋田県健康環境センター	斎藤 博之
岩手県環境保健研究センター	高橋 知子
宮城県保健環境センター	坂上 亜希恵
千葉県衛生研究所	佐藤 重紀
東京都健康安全研究センター	森 功次
名古屋市衛生研究所	柴田 伸一郎
大阪健康安全基盤研究所	山元 誠司
島根県保健環境科学研究所	三田 哲朗
福岡県保健環境研究所	小林 孝行
熊本県保健環境科学研究所	八尋 俊輔
国立感染症研究所	岡 智一郎、高木 弘隆

リアルタイムPCR用陽性コントロールの問い合わせ先

国立感染症研究所 ウイルス第二部
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1
TEL : 042-561-0771