

=原 著=

蛍光消光現象を利用した Duplex RT-LAMP 法による ノロウイルス遺伝子グループ I および II の 同時検出および識別

山田裕子^{*1, †}・桑山 勝・重本直樹^{*1}・谷澤由枝^{*1}
松尾 健^{*1}・福田伸治^{*1}

(^{*1} 広島県立総合技術研究所保健環境センター, ^{*2} 広島県西部畜産事務所)

(受付: 平成23年8月16日)

(受理: 平成23年10月21日)

Simultaneous Detection and Visual Identification of Norovirus Genogroups I and II by Duplex Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay with Fluorescent Quenching-Based System

Hiroko YAMADA^{*1, †}, Masaru KUWAYAMA^{*2}, Naoki SHIGEMOTO^{*1}
Yukie TANIZAWA^{*1}, Takeshi MATSUO^{*1} and Shinji FUKUDA^{*1}

(^{*1} Center for Public Health and Environment, Hiroshima Prefectural Technology Research Institute,
Minami-machi, Minami-ku, Hiroshima 734-0007; † Corresponding author)

(^{*2} Hiroshima Prefectural Western Office of Livestock Industry,
Saijogojo-cho, Higashihiroshima, Hiroshima 739-0013)

We have developed a duplex reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay with a fluorescent quenching-based system for the simultaneous and rapid detection of norovirus (NoV) genogroup I (GI) and genogroup II (GII) genomes in a single tube. After amplifying, NoV genomes could be identified visually in a tube by adding only quencher-labeled oligonucleotides, which have complementary sequences to the fluorescence-labeled primers. This assay requires no further tests such as electrophoresis or hybridization. In the evaluation tests with 70 NoV RT-PCR-positive fecal specimens, the green and red colors for GI and GII, respectively, and sometimes with yellow color for NoV GI and GII mixture, could be identified easily by the naked eye under UV light. The detection limits for NoV GI and GII genomes by duplex RT-LAMP were estimated to be between 10^3 and 10^4 copies/tube. Our duplex RT-LAMP assay allows for rapid, simple and simultaneous detection and supports genogroup-screening test of NoV GI and GII genomes from fecal specimens in most laboratories. Furthermore, this fluorescent quenching-based system is potentially useful for all gene amplification assays in a wide range of gene-related fields due to its simple principle.

Key words: NoV, Duplex RT-LAMP assay, Fluorescent quenching-based system, Simultaneous detection

† 連絡先

*1 ☎ 734-0007 広島市南区皆実町1丁目6-29

*2 ☎ 739-0013 広島県東広島市西条御条町1-15

緒 言

ノロウイルス (NoV) は、厚生労働省の食中毒統計 (<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>) において病因物質別事件数、患者数ともに毎年上位に位置しており、また、乳幼児、小児のウイルス性下痢症の原因の大部分を占めている^{7,12,18)}。さらに、NoVは世界各地において急性胃腸炎の主要な原因物質であり、冬季を中心に、高齢者施設や病院、学校などで集団感染事例が多発している^{1,2,7,8,10,17)}。NoVに起因する食中毒などの集団感染事例の大部分は遺伝子グループII (GII) を原因としているが、二枚貝を原因とする食中毒では遺伝子グループI (GI) が同時に検出されることも少なくない^{6,15)}。NoVの検出のみを目的とする場合には遺伝子グループを識別する必要はないが、集団感染事例では感染経路の解明も大きな目的となるため、遺伝子グループなどの、より詳細な情報の把握を求められることが多い。その際、NoV GIとGIIは遺伝子配列が異なっているため、PCR法などによる遺伝子増幅は、通常遺伝子グループごとを実施されている。

NoVの検出のみを目的とする場合は、簡易遺伝子検出法である Reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) 法、Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) 法、Transcription reverse transcription concerted reaction (TRC) 法が有用であり、NoV検出キットとして市販されている。このうち、RT-LAMP法は、増幅反応過程でピロリ

ン酸マグネシウムが生成され、白濁の有無により視覚的に陽性・陰性を判定できる特徴があることから、インフルエンザウイルス¹⁴⁾、ウエストナイルウイルス¹³⁾、SARSコロナウイルス¹⁹⁾など、種々の微生物の迅速遺伝子検査に用いられている。反面、RT-LAMP法は対象としている単一遺伝子を検出するのみで、遺伝子の多重検出には不向きである。

われわれは先に、RT-LAMP法によるNoVの簡易検出法⁵⁾と、蛍光標識プライマーを用いたRT-LAMP法によりNoV GIおよびGIIの同時遺伝子増幅を行い、増幅産物を電気泳動することにより、泳動バンドの蛍光色から遺伝子グループを鑑別する方法³⁾を報告した。本報では、この発展系として、電気泳動を必要とせず、遺伝子増幅後、蛍光物質とクエンチャーが近接することにより起こる蛍光消光現象を利用して、反応後直ちに、チューブの蛍光色からNoV GIおよびGIIを簡便に検出・識別する方法を確立し、糞便からのNoV検出に応用した。

材料および方法

1. 供試検体

RT-PCR法でNoV陽性であった食中毒または感染性胃腸炎患者由来の糞便70検体を用いた。糞便からのNoV RNAの抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用い、マニュアルに従って実施した。

2. Duplex RT-LAMP法

遺伝子増幅は、NoV GIおよびGIIの二つの遺伝子グループを1本のチューブで同時増幅するDuplex RT-

Table 1. Primer sets for genogroups I and II for detection of noroviruses

Primer name	Sequence (5'-3')	Labeled dye	Final concentration (μ M)	Reference
G1F3	CCRGNTGGCARGCNATGTT		0.2	5
G1B3	CCAACCCARCCATTRTACA		0.2	5
G1FIP1	CATTTACGAATTCGGGCAGGTTTTTCGCTGGATGCGNTTCCATGA		1.6	5
G1FIP2	CATTTACAAAATCGGGCAGGTTTTTCGCTGGATGCGNTTCCATGA		0.8	5
G1BIP1	GATGGCGTCTAAGGACGCTTTTAGCTGTRTTTGCCCTCGGWAC		1.6	5
G1BIP2	GATGGCGTCTAAGGACGCTTTTAGCWGTATTAACCTCCGGYAC		0.8	5
G1BIP3	GATGGCGTCTAAGGACGCTTTTAGCTGYAYTAACCTCTGGAAC		0.8	3
G1LF1	AGATYGGGATCYCCTGTCCA	Alexa Fluor 488	0.8	5
G1LF2	AGATTGCGATCCTGCCCA	Alexa Fluor 488	0.8	5
G1LF3	AGCTCGCGTCTCCTGTCCA	Alexa Fluor 488	0.8	5
G2F3	GGNMTGGANTTTTAYGTGCCMAG		0.2	5
G2B3	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT		0.2	5
G2FIP1	GGGAGCMAGATTGCGATCGCTTTTGAGBCNATGTTYAGRTGGAT		1.6	5
G2FIP2	GGGAGCMAGATTGCGATCGCTTTTGAGCCCATGTTTCAGRTGGAT		0.8	5
G2FIP3	GGGAGCGAGATTGCGATCGCTTTTGAGTCAATGTTYAGGTGGAT		0.8	5
G2FIP4	GGGAGCGAGATTGCGATCGCTTTTGAGCCYATGTTYAGGTGGAT		0.8	3
G2FIP5	GGGAGCMAGATTGCGATCGCTTTTGAACCCWATGTTYAGGTGGAT		0.8	3
G2BIP1	TGTGAATGAAGATGGCGTCGTTTTCTCATTRTTRVCTCTGGBACGAG		1.6	5
G2BIP2	TGTGAATGAAGATGGCGTCGTTTTCTCATTRTTCYCTCTGGYACGAG		0.8	5
G2BIP3	TGTGAATGAAGATGGCGTCGTTTTCTCATTTGAYCTCTGGKACGAG		0.8	5
G2BIP4	TGTGAATGAAGATGGCGTCGTTTTCTCATTRTTACTTTCTGGCACGAG		0.8	5
G2LF1	GTGCTCARATCWGARAACCTC	Alexa Fluor 594	0.8	5
G2LF2	GTGCTGAGTCTCWGARAATCTC	Alexa Fluor 594	0.8	5
G2LF3	GTGCTCAAATCTGAGAATCTC	Alexa Fluor 594	0.8	5
G2LF4	GTGCTCAAGTCTGAGAACTC	Alexa Fluor 594	0.8	5

Mixed bases in degenerate primers are as follows: K, T or G; M, A or C; R, A or G; W, A or T; Y, C or T; B, not A; H, not G; V, not T; N, any.

LAMP法として実施した。RT-LAMP反応は、Table 1に示したとおり、一部をAlexa Fluor488 (緑) またはAlexa Fluor594 (赤) で蛍光標識したFukudaら^{3,5)}のプライマーおよびRNA増幅試薬キット (栄研化学) を用いて、63°C、90分間行った。反応終了後、RT-LAMP法の陽性反応であるピロリン酸マグネシウムの白濁が認められた場合は、室温にて100 pmol/ μ l濃度の3'-BHQ-1標識オリゴヌクレオチド (G1LF_R; TGGRCAGGRGAYCGCRAKCT) および100 pmol/ μ l濃度の3'-BHQ-2標識オリゴヌクレオチド (G2LF_R; GAGRTTYTCWGAYYTSAGCAC) をそれぞれ5 μ l加えた。その後、直ちにUVトランスイルミネーターにより312 nmの紫外線を反応チューブに照射し蛍光色を観察した。

3. リアルタイムPCR法による遺伝子コピー数の定量

LightCycler 480システムおよびLightCycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics) を用いて、TaqManプローブ法により糞便中に含まれる遺伝子コピー数を算定した³⁾。リアルタイムPCR反応は95°Cで5分間酵素活性化後、95°Cで10秒間、56°Cで20秒間を50サイクル行い、50°Cで10秒間ターニングした。

4. 遺伝子型別

平成15年11月5日付け食安監発第1105001号、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知法⁹⁾に準拠して遺伝子増幅を行い、DNA gel extraction kit (Millipore) を用いて1.5%アガロースゲルからPCR増幅産物を精製後、SequiTherm EXCEL II DNA sequencing kit LC for 25- and 41-cm gels (EPICENTRE Technologies) およびLI-COR4200 series sequencer (LI-COR) を用いてダイレクトシーケンスを行った。そして、Kageyama

らの報告⁸⁾および現在広く使用されている型別法 (Capsid N/S regionに基づく遺伝子型、<http://idsc.nih.gov/pathogen/refer/norokaisetu1.html>) に従って遺伝子型別を行った。

結 果

NoV陽性の糞便70検体の遺伝子型は、GI単独陽性がGI1 (2検体)、GI4 (8)、GI8 (6) およびGI未型別(1)の計17検体、GII単独陽性がGII1 (2)、GII2 (7)、GII3 (5)、GII4 (9)、GII5 (5)、GII6 (2)、GII7 (1)、GII12 (2)、GII13 (3)、GII14 (2)、GII16 (1) およびGII19 (2) の計41検体、GIおよびGIIの両方が陽性 (以降GIおよびGII混合とする) がGI1、GII2 (1)、GI1、GII3 (2)、GI2、GII2 (1)、GI2、GII12 (1)、GI2、GII14 (1)、GI4、GII5 (1)、GI4、GII14 (1)、GI7、GII12 (1)、GI8、GII2 (1)、GI8、GII12 (1)、GI14、GII5 (1) の計12検体であった。

これらのうち、NoV GIまたはGII単独陽性検体について、Duplex RT-LAMP法によるNoVの検出結果とリアルタイムPCR法により定量した反応当たりの遺伝子コピー数との関係を遺伝子グループごとにFig. 1に示した。NoV GI陽性17検体のコピー数は1反応チューブ当たり 10^2 から 10^7 オーダー (最小値: 5.5×10^2 , 最大値: 5.9×10^7) であり、Duplex RT-LAMP法によりすべてAlexa Fluor 488の緑色蛍光が検出され、陽性と判定された。また、NoV GII陽性の41検体のうち、37検体で、Duplex RT-LAMP法により陽性反応であるAlexa Fluor 594の赤色蛍光が検出され、1反応チューブ当たりのコピー数は 10^3 から 10^7 オーダー (最小値: 2.1×10^3 , 最大値: 9.7×10^7) であった。Duplex RT-LAMP法で陰性を示した残り4検体の遺伝子型はGII2 (1)、GII4 (1) およびGII5 (2)で、これらの1反応チューブ当たりの遺伝

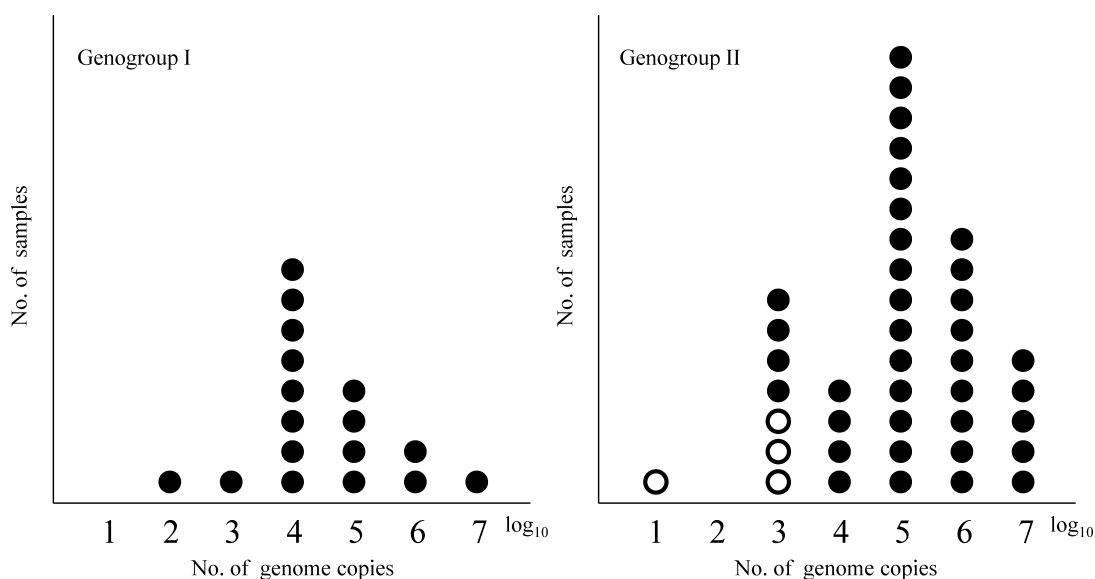


Fig. 1. Detection of norovirus genomes by duplex RT-LAMP with fluorescent quenching-based system from fecal specimens containing a single genogroup I or II and number of genome copies per reaction. ●, positive; ○, negative.

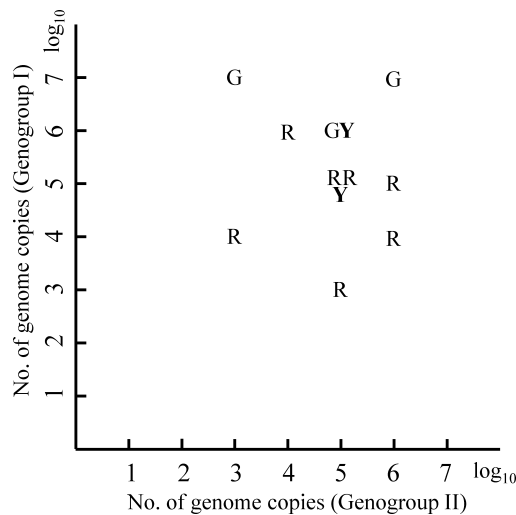


Fig. 2. Colors indicated in co-infection of norovirus genogroups I and II by duplex RT-LAMP with fluorescent quenching-based system and number of genome copies per reaction in fecal specimens. G, green; R, red; Y, yellow.

子コピー数は 10^3 オーダーおよび 10^4 オーダーであった。1反応チューブ当たりのコピー数が 10^3 オーダーであった7検体のうち、Duplex RT-LAMP法により4検体が陽性、3検体が陰性を示した。

次に、NoV GIおよびGII混合陽性の12検体について、Duplex RT-LAMP法によるNoVの検出結果と糞便中に含まれていたNoV GIおよびGIIの遺伝子コピー数との関係をFig. 2に示した。12検体のうち、緑色と赤色の混色である黄色蛍光が検出されたものはGI.1およびGII.2混合とGI.2およびGII.2混合の2検体で、1反応チューブ当たりのコピー数はそれぞれ 3.7×10^5 および 2.5×10^5 、 1.0×10^6 および 7.7×10^4 であった。また、GI.1およびGII.3混合の2検体とGI.2およびGII.14混合の計3検体はGIの蛍光色である緑色を示し、その他の7検体はGIIの蛍光色である赤色を示した。コピー数の多い遺伝子グループの蛍光色が優勢に示される検体も存在したが、必ずしもその傾向が認められるとは限らなかった。

クエンチャーによる蛍光消光現象を利用したDuplex RT-LAMP法の例をFig. 3に示した。RT-LAMP反応後、NoV GIまたはGII陽性検体のチューブ内の反応液は白濁し [Fig. 3(A)], これに紫外線を照射すると、すべて同一の蛍光色 (黄色) が確認された [Fig. 3(B)]. しかし、クエンチャー標識オリゴヌクレオチドを加えると、NoV GIは緑色、NoV GIIは赤色、GIおよびGII混合は黄色の蛍光色を呈した [Fig. 3(C)]. このとき、緑色蛍光は1種であったが、赤色蛍光および黄色蛍光はわずかに異なる2種がそれぞれ認められた。なお、緑色と赤色の混色である黄色蛍光にカチオン性ポリマーである2.5%ポリエチレンイミンを $1 \mu\text{l}$ 加えると、緑色蛍光が消光して赤色蛍光を呈し、混色であることが確認された

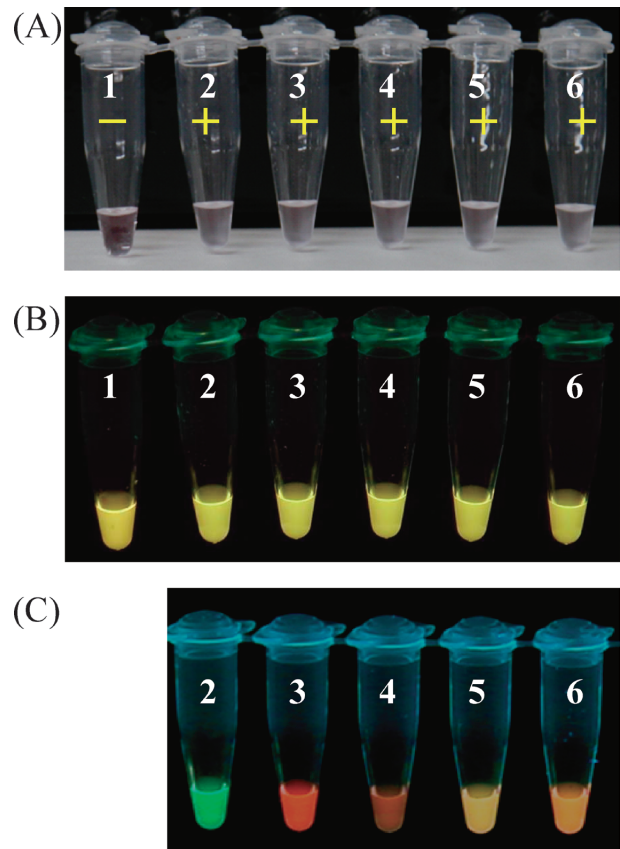


Fig. 3. Positive reaction indicated in duplex RT-LAMP with fluorescent quenching-based system. (A), White precipitate as positive reaction in RT-LAMP; (B), Fluorescent colors under UV light at 312 nm before adding quencher-labeled oligonucleotides; (C), Fluorescent colors under UV light at 312 nm after adding quencher-labeled oligonucleotides into RT-LAMP-positive tubes. 1, negative control; 2, genogroup I; 3 and 4, genogroup II; 5 and 6, genogroups I and II mixture.

(data not shown).

考 察

NoVは食中毒および感染症対策上重要な病原ウイルスであり、その迅速検出が求められている。今回われわれは、NoV GIおよびGIIの同時遺伝子増幅を行い、クエンチャーによる蛍光消光現象を利用して、反応後のチューブの蛍光色からNoV GIおよびGIIを簡便に検出・識別するDuplex RT-LAMP法を確立し、1チューブでの迅速検出を可能にした。NoV GIまたはGII陽性の反応チューブはそれぞれ、緑色、赤色の蛍光色を示し、容易に識別が可能であった。複数の標的遺伝子の同時検出には、一般的にマルチプレックスPCR法などが用いられるが、通常、遺伝子増幅後に電気泳動あるいはハイブリダイゼーションなどの追加操作により、どの遺伝子が増幅したかを確認する必要があり、先に報告したRT-LAMP法も同様である³⁾。一方、Duplex RT-LAMP

法に利用した蛍光消光現象による標的遺伝子の検出・識別方法は、蛍光標識したプライマーを用いて遺伝子増幅を行った後、これらのプライマーと相補配列を有するクエンチャー標識オリゴヌクレオチドを加えるのみで、増幅した複数の遺伝子を視覚的に、迅速かつ簡易に、同時に検出・識別することが可能である。この原理を次に示す。クエンチャー標識オリゴヌクレオチドは、遺伝子増幅に用いられなかった蛍光標識プライマーとハイブリダイズし、プライマーの標識蛍光物質がオリゴヌクレオチドのクエンチャーと近接するため消光する。一方、遺伝子増幅に利用された蛍光標識プライマーは、2本鎖DNAを形成しており、クエンチャー標識オリゴヌクレオチドがハイブリダイズしないため、発光したままである。その結果、増幅された遺伝子に対応するプライマーの蛍光色のみが発光し、識別が可能となる。なお、蛍光標識プライマーとクエンチャー標識オリゴヌクレオチドのハイブリダイズは室温のため直ちに起こり、反応時間を必要としない。

NoV陽性検体を用いてDuplex RT-LAMP法を検証したところ、NoV GIおよびGIIともに、1反応チューブ当たりの遺伝子コピー数が 10^3 から 10^4 以上で陽性を示した。患者糞便中に含まれるNoVコピー数/gは、中央値で 10^7 から 10^9 であることから^{4, 16)}、Duplex RT-LAMP法で十分検出できるレベルにあった。本法は、RT-LAMP反応後電気泳動バンドの蛍光色から遺伝子グループを鑑別する、先に報告した方法³⁾と同等の検出感度を有していたが、電気泳動などの追加操作を必要としないことから、さらなる操作の簡略化と検査の時間短縮が可能となった。一方、NoV GIおよびGIIの遺伝子が同時増幅された場合、理論上は混色の黄色を呈するが、GIおよびGII混合検体のうち、実際に黄色を呈した検体は一部であった。NoVには、それぞれGIが14、GIIが17あるいはそれ以上の遺伝子型が存在している^{8, 20)}。本法はこれら多くの遺伝子型を検出対象としてデザインされているため、遺伝子型による検出感度の差異⁵⁾は避けられず、検体に含まれるNoVのコピー数の差は必ずしも結果に反映されない。具体的には、プライマーのアニーリング効率をはじめとしたLAMP法のさまざまな反応プロセスにおける効率の影響を受け、最終的により多く増幅された遺伝子グループの蛍光色が観察されるものと考えられる。以上の理由から、Duplex RT-LAMP法によりNoV GIおよびGII混合検体から両者を同等の効率で増幅することは難しく、また、GIあるいはGIIの一方が単独で陽性であっても、他方を完全には否定できない場合も存在する。しかしながら、1反応チューブ当たりの遺伝子コピー数が 10^3 から 10^4 以上を含むNoV陽性検体からは少なくともGIあるいはGIIのいずれかが確実に検出されており、食中毒・感染症事案などの迅速性と簡便性が重要な局面においては、NoV遺伝子の検出および遺伝子グループのスクリーニング試験を迅速に行い、

その後の調査などに結びつけることが可能であり、簡便であるという特性を最大限に発揮できるものと考えられる。なお、われわれがDuplex RT-LAMP法に用いたプライマーは、先に報告したRT-LAMP法と同じものであり、これらの特異性は確認されている³⁾。

また、緑色と赤色の混色である黄色蛍光を呈した場合、その反応液にカチオン性ポリマーであるポリエチレンイミンを加えることで緑色蛍光が消光し、結果として赤色蛍光が残り、混色が確認できることを明らかにした。これまでに、蛍光標識したオリゴヌクレオチドを含むLAMP法の増幅産物にポリエチレンイミンを加えることにより沈殿を生じさせ、その蛍光色から増幅した遺伝子を検出・識別する方法が報告されているが¹¹⁾、ポリエチレンイミンによる緑色蛍光の消光は新しい知見である。このメカニズムは明らかではないが、黄色を含む複数の蛍光色を利用して遺伝子を同時増幅する方法に拡張する場合に、黄色蛍光が単独遺伝子の増幅によるものであるか、あるいはそれぞれ緑色と赤色を呈する複数の遺伝子の増幅によるものであるかの識別に応用できる。

Duplex RT-LAMP法は、特別な機器を必要としないため、小規模の検査機関においても、糞便あるいは嘔吐物検体からNoV GIおよびGIIを迅速かつ簡便に検出・識別することが可能であり、多くの検査機関での利用が期待される。さらに、われわれの開発した蛍光標識プライマーと相補配列を有するクエンチャー標識オリゴヌクレオチドによる蛍光消光現象は、RT-LAMP法だけでなく、PCR法、NASBA法、TRC法などのすべての遺伝子増幅法に応用でき、また、NoVのみならずすべての生物の遺伝子を対象に適用可能である。われわれは、マルチプレックスPCR法による下痢症ウイルスの多重検出、細菌性嘔吐毒関連遺伝子の多重検出などへも利用可能であることを確認しており (data not shown)、幅広い分野への応用が期待される。

なお、本法は、「標的核酸の検出・識別方法」として特許出願中 (特願2011-134800) である。

要 約

われわれは、ノロウイルス (NoV) 遺伝子グループI (GI) および遺伝子グループII (GII) の同時遺伝子増幅を行い、クエンチャーによる蛍光消光現象を利用して、1本のチューブでNoV GIおよびGIIを迅速かつ簡便に検出・識別するDuplex RT-LAMP法を確立した。本法は、RT-LAMP反応後に電気泳動あるいはハイブリダイゼーションなどの追加操作を必要とせず、増幅に使用した蛍光標識プライマーと相補配列を有するクエンチャー標識オリゴヌクレオチドを反応チューブに加えるのみで、紫外線を反応チューブに照射した際の蛍光色から増幅された遺伝子を視覚的に検出・識別可能である。RT-PCR法でNoV陽性の糞便70検体を用いてDuplex RT-LAMP法を検証したところ、1反応チューブ当たりの遺

伝子コピー数が 10^3 から 10^4 以上でそれぞれNoV GIは赤色, GIIは緑色, GIおよびGII混合は一部が混色の黄色の陽性反応を示し, その有用性が確認された. 本法は, NoV食中毒または感染症発生時に, 糞便検体からのNoV GIおよびGII遺伝子の迅速検出および遺伝子グループのスクリーニング試験法として, 多くの検査機関での利用が期待される. さらに, われわれの開発したクエンチャー標識オリゴヌクレオチドによる蛍光消光現象は, すべての遺伝子増幅法に応用可能であり, 幅広い分野への応用が期待される.

文 献

- Blanton, L.H., Adams, S.M., Beard, R.S., Wei, G., Bulens, S.N., Widdowson, M.-A., Glass, R.I. and Monroe S.S.: Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *J. Infect. Dis.*, **193**, 413-421 (2006).
- Bon, F., Ambert-Balay, K., Giraudon, H., Kaplon, J., Le Guyader, S., Pommepuy, M., Gally, A., Vaillant, V., de Valk, H., Chikhi-Brachet, R., Flahaut, A., Pothier, P. and Kohli, E.: Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 4659-4664 (2005).
- Fukuda, S., Sasaki, Y., Kuwayama, M. and Miyazaki, K.: Simultaneous detection and genogroup-screening test for norovirus genogroups I and II from fecal specimens in single tube by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *Microbiol. Immunol.*, **51**, 547-550 (2007).
- 福田伸治, 重本直樹, 谷澤由枝, 妹尾正登: 患者糞便中に排泄されるノロウイルス遺伝子量の遺伝子型による差異と吐物中に排泄される遺伝子量. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告, **17**, 11-14 (2009).
- Fukuda, S., Takao, S., Kuwayama, M., Shimazu, Y. and Miyazaki, K.: Rapid detection of norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 1376-1381 (2006).
- 林 志直: ノロウイルス食中毒の最近動向. 日食徴誌, **27**, 109-114 (2010).
- Inouye, S., Yamashita, K., Yamadera, S., Yoshikawa, M., Kato, N. and Okabe, N.: Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: Pediatric cases and outbreak incidents. *J. Infect. Dis.*, **181**, S270-S274 (2000).
- Kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, B. F., Kojima, S., Takai, R., Oka, T., Takeda, N. and Katayama, K.: Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 2988-2995 (2004).
- 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長: ノロウイルスの検出法について. 平成15年11月5日, 食安監発第1105001号(2003).
- Lopman, B. A., Reacher, M. H., van Duinhoven, Y., Hanon, F.-X., Brown, D. and Koopmans, M.: Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg. Infect. Dis.*, **9**, 90-96 (2003).
- Mori, Y., Hirano, T. and Notomi, T.: Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnol.*, **6**, (2006).
- Nakata, S., Honma, S., Numata, K.-K., Kogawa, K., Ukae, S., Morita, Y., Adachi, N. and Chiba, S.: Members of the family caliciviridae (Norwalk virus and Sapporo virus) are the most prevalent cause of gastroenteritis outbreaks among infants in Japan. *J. Infect. Dis.*, **181**, 2029-2032 (2000).
- Parida, M., Posadas, G., Inoue, S., Hasebe, F. and Morita, K.: Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 257-263 (2004).
- 重本直樹, 福田伸治, 高尾信一, 島津幸枝, 谷澤由枝, 桑山 勝, 大原祥子: Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) 法による新型インフルエンザウイルスおよび季節性A型インフルエンザウイルス (H1N1, H3N2) の迅速検出. 感染症学雑誌, **84**, 431-436 (2010).
- 重本直樹, 谷澤由枝, 福田伸治: 2009/10年シーズンのノロウイルス感染症・食中毒事例から検出された遺伝子型について. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告, **18**, 1-6 (2010).
- Shinkawa, N., Noda, M., Yoshizumi, S., Tokutake, Y., Shiraishi, T., Arita-Nishida, T., Nishio, O., Oka, T., Hansman, G.S., Takeda, N. and Kimura, H.: Molecular epidemiology of noroviruses detected in food handler-associated outbreaks of gastroenteritis in Japan. *Intervirology*, **51**, 422-426 (2008).
- Svraka, S., Duizer, E., Vennema, H., de Bruin, E., van der Veer, B., Dorresteyn, B., and Koopmans, M.: Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in the Netherlands from 1994 through 2005. *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 1389-1394 (2007).
- 谷澤由枝, 福田伸治, 重本直樹, 高尾信一, 妹尾正登: 広島県の小児感染性胃腸炎患者における下痢症ウイルス検出状況と流行型, 2002/03~2008/09. 広島県獣医学会雑誌, **25**, 89-95 (2010).
- Thai, H. T. C., Le, M. Q., Vuong, C. D., Parida, M., Minekawa, H., Notomi, T., Hasebe, F. and Morita, K.: Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 1956-1961 (2004).
- Zheng, D.-P., Ando, T., Fankhauser, R. L., Beard, R. S., Glass, R. I. and Monroe, S. S.: Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, **346**, 312-323 (2006).