

小型球形ウイルス遺伝子の検出を目的とした RT-PCR 法の迅速・簡便化の検討

山上隆也 小澤 茂

Detection of Norwalk-Like Viruses (NLVs) Genome in Stool
by Rapid and Easy RT-PCR Methods.

Takaya YAMAGAMI and Shigeru OZAWA

小型球形ウイルス (*Norwalk-like viruses*, NLVs) は冬季に多発する非細菌性急性胃腸炎の主要な原因ウイルスとして知られ、約 7.6kb のプラス 1 本鎖 RNA を遺伝子に持つ。その解析からカリシウイルス科ノウォーク様ウイルス属 (Family *Caliciviridae*, genus *Norwalk-like viruses*) に分類され、さらに Norwalk virus を代表とする Genogroup1 (G1), Snow Mountain virus を代表とする Genogroup2 (G2) の 2 つの遺伝子型群に大きく分けられている。

NLVs の検出は電子顕微鏡によるウイルス粒子の確認が基本法とされる。これは NLVs が動物や培養細胞をもちいて分離培養できないためであるが、電子顕微鏡による検出は高価な設備と操作技術の熟練を要し、検査法として一般的とは言い難い。1993 年に NLVs のプロトタイプである Norwalk virus の全塩基配列が解読^{1,2)}されて以降は、操作が簡便で高感度な RT-PCR 法による遺伝子検出が普及し、主流になりつつある。

しかし、RT-PCR 法による NLVs 遺伝子の検出は、糞便中に存在する PCR 阻害物質を除去し、純度の高いウイルス RNA を効率よく抽出できる方法が確立されていないこと、数多くある遺伝子型の全てを検出できるプライマーが構築されていないこと、集団食中毒発生時の多検体の迅速処理には操作が煩雑であることなど、数多くの問題が指摘されている。

そこで今回我々は、RT-PCR 法による NLVs 遺伝子検出のさらなる簡便・効率化を目的に、簡易 RNA 抽出キッ

トの比較検討を行うとともに、逆転写反応と PCR を連続して行う One step RT-PCR 法ならびに PCR チューブ内に必要な試薬が全て分注された cDNA 合成キット Ready To Go (ファルマシア) の有用性について検討を行った。また、平成 10 年度の山梨県における非細菌性集団食中毒事例からの NLVs 遺伝子の検出状況とそのプライマー別の評価についてもあわせて報告する。

材 料 と 方 法

1 検査材料

RNA 抽出キット、RT-PCR 法の検討には、1998 年 5 月に発生した非細菌性急性胃腸炎の集団発生に由来し、RT-PCR 法およびマイクロプレートハイブリダイゼーション (MPH) 法³⁾で NLVs 遺伝子が検出され、電子顕微鏡によって NLVs 粒子が確認された同一の患者糞便を材料とした。また、平成 10 年度中に発生した非細菌性集団食中毒事例からの NLVs 遺伝子の検出には、その患者および調理従事者の糞便をもちいた。糞便は PBS(-) で 10% 乳剤として等量のフルオロカーボンで処理し、RNA 抽出試料とした。

2 RNA 抽出法

RNA の抽出は 3 種類の簡易 RNA 抽出キット Ultraspec 3 RNA (BIOTECX), Totally RNA (Ambion), ISOGEN-LS (ニッポンジーン) をもちいて行った (表 1)。RNA 抽

表 1 簡易 RNA 抽出キットの概要

キット名	Ultraspec3RNA	ISOGEN-LS	TotallyRNA
メーカー	BIOTECX	ニッポンジーン	Ambion
薬品数	2	1	5
保存条件	2 ~ 8 °C	2 ~ 10 °C	4 °C
保存期間	9 ヶ月間	6 ヶ月間	6 ヶ月間
RNA 精製法	RNA tack resin による RNA 吸着	—	2 度のフェノール・クロロホルム処理
RNA 共沈剤	RNA tack resin の白色沈殿	—	—

出試料 100 μ l よりキットに添付の使用説明書に準じて RNA を抽出し、20 μ l の滅菌蒸留水に溶解したものを全 RNA 液とした (図1)。RT-PCR 法の検討、非細菌性集団食中毒事例からの検出には Ultraspec 3 RNA で得た全 RNA 液をもちいた。

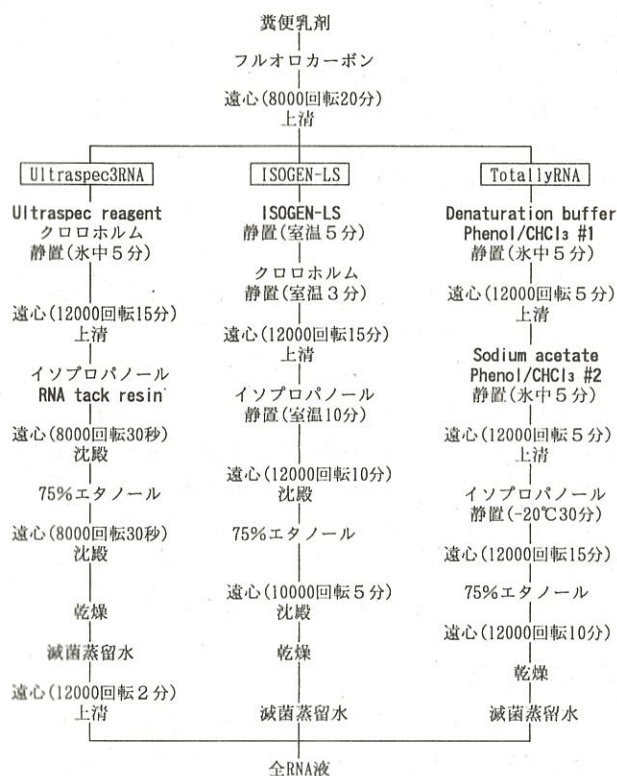


図1 各RNA抽出キットの使用法

3 RT-PCR 法

(1) プライマー

RNA 抽出法、RT-PCR 法の検討には YURI22F/R⁴⁾ をもちいた。また、非細菌性集団食中毒事例からの検出には YURI22F/R に加えて、35'/36⁵⁾、NV81/82SM82、SRセット⁶⁾ をもちいた (表2)。増幅部位はいずれのプライマーも NLVs 遺伝子の RNA ポリメラーゼ領域である (図2)。

(2) Two step 法

RT-PCR は前報⁷⁾ のとおりに行った。全 RNA 液 2 μ l に、2.5mM dNTPs 4 μ l、10 \times PCR 緩衝液 1.5 μ l、100mM Dithiothreitol 1 μ l、3.5U AMV 逆転写酵素(生化学工業)、20U RNase inhibitor(TOYOBO)、50 μ M アンチセンスプライマー 0.5 μ l を加え滅菌蒸留水で全量 15 μ l として 42 $^{\circ}$ C 1 時間の反応で cDNA を合成した。

得られた cDNA 15 μ l に 10 \times PCR 緩衝液 3.5 μ l、50 μ M センスプライマー 0.5 μ l、1.25U Taq ポリメラーゼ(TaKaRa)

表2 NLVs 遺伝子の検出にもちいたプライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列	極性
YURI22F	5' ATGAATGAGGATGGACCCAT	3' -
YURI22R	5' CATCATCCCCGTAGAAAGAG	3' +
35'	5' CTTGTTGGTTTGAGGCCATA	3' -
36	5' ATAAAAGTTGGCATGAACA	3' +
NV81	5' ACAATCTCATCATCACCATA	3' -
NV82	5' TCATTTTGTATGCAGATTA	3' +
SM82	5' CCACTATGATGCAGATTA	3' +
SR33	5' TGTCACGATCTCATCATCACC	3' -
SR46	5' TGGAATTCCATCGCCCCACTGG	3' +
SR48	5' GTGAACAGCATAAATCACTGG	3' +
SR50	5' GTGAACAGTATAAACCCTGG	3' +
SR52	5' GTGAACAGTATAAACCATTGG	3' +

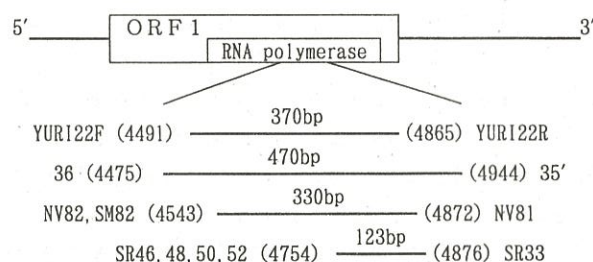


図2 各プライマーペアの増幅領域

を加え滅菌蒸留水で全量 50 μ l として 94 $^{\circ}$ C 1 分、50 $^{\circ}$ C 1 分、72 $^{\circ}$ C 1 分の PCR サイクルを 40 回行った。PCR サイクルの最初に 94 $^{\circ}$ C 3 分、最後に 72 $^{\circ}$ C 15 分の反応を付加した。以下、この方法を Two step 法と呼ぶ。

(3) One step 法

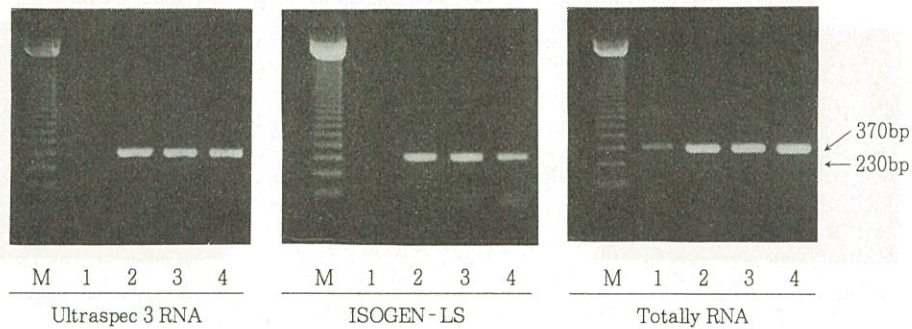
全 RNA 液 2 μ l に Two step 法と同量の RT-PCR 試薬を加え、42 $^{\circ}$ C 1 時間、94 $^{\circ}$ C 3 分の後に 94 $^{\circ}$ C 1 分、50 $^{\circ}$ C 1 分、72 $^{\circ}$ C 1 分の PCR サイクルを 40 回行った。PCR サイクルの最後に 72 $^{\circ}$ C 15 分の反応を付加した。以下、この方法を One step 法と呼ぶ。また、One step 法を利用した市販キット One step RNA PCR kit (TaKaRa) を使用法の一般例に準じて試薬を調整し、同様に RT-PCR を行った。

(4) Ready To Go

試薬ビーズの入った Ready To Go の PCR チューブに全 RNA 液 4 μ l、50 μ M アンチセンスプライマー 1.0 μ l を加え滅菌蒸留水で全量 33 μ l として 37 $^{\circ}$ C 1 時間の反応で cDNA を合成した。さらに 50 μ M センスプライマー 1.0 μ l、2.5U Taq ポリメラーゼ、滅菌蒸留水を加えて全量 100 μ l として Two step 法と同様に PCR を行った。

4 PCR 産物の検出と判定

PCR 産物 6 μ l を 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、UV 照射下で目的のバンドを確認した。RT-PCR の検出成績は、得られたバンドの強さと、非特異バンドの有無を基準に比較を行った。



M : マーカー (123bp Ladder, GIBCO BRL)
 1 : 40% 糞便乳剤
 2 : 20% "
 3 : 10% "
 4 : 5% "

図3 糞便乳剤濃度の検討

結果

1 簡易 RNA 抽出キットの比較

(1) 糞便乳剤濃度の検討

40, 20, 10, 5% に調整した糞便乳剤から前述の3種類の RNA 抽出キットをもちいて RNA を抽出し、糞便乳剤濃度の検討を行った。40% 乳剤では Totally RNA のみが弱いバンドが検出されたが、他のキットではバンドは検出されなかった。20% 乳剤ではいずれのキットでも強いバンドが得られたが、ISOGEN-LS, Totally RNA では 230bp 付近に非特異的なバンドがみられた。しかし、10% 乳剤ではいずれのキットも非特異的なバンドはみられず、20% 乳剤と同様の強いバンドが得られた。5% 乳剤では 10% に比較して若干弱いバンドであった (図3)。

(2) 検出成績と感度の比較

10% 糞便乳剤を PBS(-) で 10 倍段階希釈したものを試料として RNA を抽出し、各キットの検出成績と感度を比較した。10% 乳剤から得られたバンドを比較すると Totally RNA のバンドが最も強く、ISOGEN-LS が最も弱いバンドであった (図4)。感度は Ultraspec 3 RNA, Totally RNA がともに 10^{-6} 希釈まで検出されたのに対して、ISOGEN-LS は 10^{-4} 希釈までしか検出されず、100 倍低感度であった。

(3) 操作性と所要時間

抽出操作が最も簡便であったのは、RNA が RNA tack resin の白色沈殿として明瞭に確認できる Ultraspec 3 RNA で、所要時間も最も短時間の 23 分であった。また、抽出操作が最も煩雑で、長時間を要したのは Totally RNA で 75 分、ISOGEN-LS はその中間程度の 48 分であった。

2 RT-PCR 法の検討

(1) One step 法の反応条件の検討

Two step 法の反応条件をもとにして逆転写酵素濃度

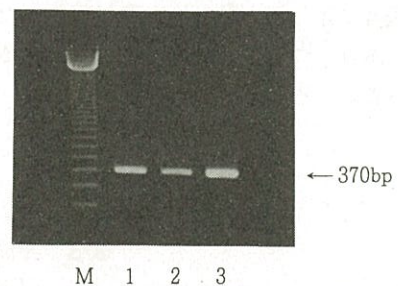
(3.5, 7.0U), Taq ポリメラーゼ濃度 (1.25, 2.5, 5.0U), プライマー濃度 (0.2, 0.5 μ M), アニール温度 (40, 45, 50, 55, 60 $^{\circ}$ C) について検討を行った。その結果、AMV 逆転写酵素は Two step 法と同量の 3.5U, Taq ポリメラーゼは 4 倍量の 5.0U, プライマーは約半量の 0.2 μ M, アニールは同じく 50 $^{\circ}$ C で非特異的なバンドのない最も強いバンドが得られた (図5)。

(2) One step 法と Two step 法の比較

One step 法で得られたバンドと One step RNA PCR kit および Two step 法で得られたバンドはいずれも同等の強さのバンドであった (図6)。しかし、10% 糞便乳剤から得られた全 RNA 液を滅菌蒸留水で 10 倍段階希釈して RT-PCR を行い検出感度を比較した結果、Two step 法では 10^{-3} 希釈までバンドが検出されたが、One step 法、One step RNA PCR kit ではともに 10^{-1} 希釈までしかバンドが検出されず、Two step 法と比較して 100 倍低い検出感度であった。

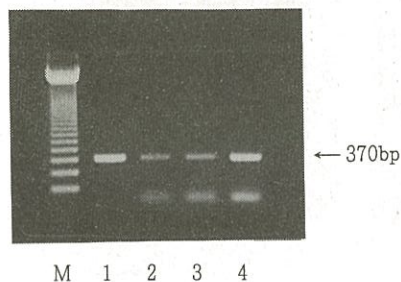
(3) cDNA 合成キットと Two step 法の比較

Ready To Go をもちいて得られたバンドは Two step



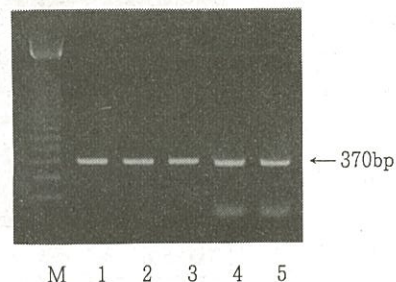
M : マーカー (123bp Ladder, GIBCO BRL)
 1 : Ultraspec 3 RNA
 2 : ISOGEN-LS
 3 : Totally RNA

図4 各抽出キットで得られたバンドの比較



M : マーカー (123bp Ladder, GIBCO BRL)
 1 : Two step 法
 2 : One step 法 AMV 逆転写酵素 7.0U Tap ポリメラーゼ 1.25U
 3 : " " 3.5U " 2.50U
 4 : " " 3.5U " 5.00U

図5 One step 法の酵素濃度の検討



M : マーカー (123bp Ladder, GIBCO BRL)
 1 : Two step 法
 2 : " "
 3 : Ready To Go
 4 : One step 法
 5 : One step RNA PCR kit

図6 RT-PCR 各法でのバンドの比較

法で得られたバンドと同等の強さであり、非特異的なバンドも認められなかった(図6)。また、One step 法と同様に検出感度を比較した結果、 10^{-3} 希釈 RNA までバンドが検出され、Two step 法と同等の検出感度であった。

3 平成10年度の非細菌性集団食中毒事例からのNLVs 遺伝子検出状況

平成10年度に発生した非細菌性集団食中毒事例(有症苦情、関連調査を含む)は4事例38検体であった(表3)。そのうちRT-PCR(Two step)法およびMPH法で2事例12検体からNLVs 遺伝子が検出された。MPH法による遺伝子型別の結果、G1が2検体、G2が24検体であったが、G1とG2がともに検出された事例が1事例あった。

4 プライマー別検出率

1998年1月から99年3月までに検出されたNLVs 遺伝子のプライマー別検出率を既に報告⁷⁾した成績を合わせて表4に示した。最も検出率が高かったのはYURI22 F/Rであり、ついでSRセット、35'/36、NV81/82SM82であった。

考 察

NLVsは感染して、数時間の潜伏期間の後に激しい嘔吐、吐き気、下痢、腹痛、ときに頭痛、発熱などを主症状として発症する。特に生カキを喫食して感染することが多く知られており、食品衛生上重要な感染症である。

RT-PCR法によるNLVs 遺伝子の検出は主にヒトの糞便を対象とするが、糞便中には他生物由来の遺伝子や、RNA分解酵素などPCRを阻害する物質が多量に含まれていることが考えられ、これら除去した純度の高いウイルスRNAが必要とされる。抽出にもちいる糞便乳剤は高濃度であるほど糞便中に含まれるウイルスRNA量が多いと思われ、より高濃度の糞便乳剤の使用が望まれるが、それに比例して反応阻害物質や他の遺伝子の混入量も多くなることから、一概に高濃度の乳剤が良いとは言えない。今回の検討から糞便乳剤の最適濃度は10-20%であることが考えられ、これよりも高濃度ではPCR反応に阻害が生じ、低濃度ではウイルスRNA量が減少することが示唆された。

RT-PCRにもちいるウイルスRNAを糞便から抽出する方法としては陽イオン性界面活性剤であるCTABをもちいる方法⁸⁾が良く知られ普及しているが、操作が煩雑で工程が多く、また比較的長時間を要するといった欠点

表3 平成10年度の非細菌性集団食中毒事例の概要

事例	発生年月日	摂食者数	患者数	原因施設	原因食品	検査数	NLVs 遺伝子検出数
1	98. 5. 8	234	93	仕出し弁当	不明	8	7 (87.5%)
2	98. 5.20	90	52	給食施設	不明	18	0
3	98. 9. 5	6	5	仕出し弁当	不明	7	0
4	99. 2. 5	15	10	飲食店	生カキ	5	5 (100.0%)
計						38	12 (31.6%)

表4 NLVs 遺伝子検出事例のプライマー別検出数

事例	検査数	RT-PCR 陽性数							MPH 陽性数		
		35'/36	81/82	YURI22	SR			計	G1	G2	計
					G1	G2	計				
1	16	10	9	12	0	11	11	13	0	13	13
2	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
3	8	6	5	7	0	6	6	7	0	7	7
4	5	3	5	4	2	3	5	5	2	3	5
計 (%)	30	20 (66.7)	20 (66.7)	24 (80.0)	2 (6.7)	21 (70.0)	23 (76.7)	26 (86.7)	2	24	26

があり、簡便で短時間で抽出のできる市販の簡易 RNA 抽出キットをもちいる検査機関が増加している。我々も以前から Ultraspec 3 RNA をもちいて安定した成績を得ていたが、さらに簡便で高感度な方法を検討するため、3種類の簡易 RNA 抽出キットをもちいて検出成績の比較を行った。

今回もちいたキットはいずれも RNA が酸性条件下では水層に分配されることを利用した AGPC 法を原理としているが、より高純度な RNA の抽出を目的として Ultraspec 3 RNA には RNA tack resin による RNA 精製工程があり、Totally RNA にはフェノール・クロロホルム抽出を2度行なうという特色がある。この操作のために両キットで得られた RNA は特別な過程のない ISOGEN-LS よりも反応阻害物質の混入が少なく、より強いバンドが得られ高感度であったものと思われた。また、Totally RNA で得られたバンドは今回検討した中で最も強く、40%乳剤からも唯一バンドが検出されたことから、検体中の反応阻害物質の除去効率が Ultraspec 3 RNA よりも優れていたと考えられたが、フェノール・クロロホルム処理だけの AGPC 法ではわずかな DNA のコンタミが起こりやすい⁹⁾ため、ISOGEN-LS と同様に非特異的なバンドが見られたものと推測された。

抽出操作はより簡便に効率よく行なえることが望ましいが、Totally RNA は Ultraspec 3 RNA や ISOGEN-LS よりも操作が煩雑で長時間を要するため多検体処理には不適当であろうと思われた。Ultraspec 3 RNA は操作が簡便で最も短時間で抽出できたことから、検出成績の結果と総合して集団食中毒発生時のような多検体の迅速処理を必要とする場面では最も有用ではなかろうかと考えられた。

One step 法は逆転写反応と PCR の試薬類を同時に加え、連続して RT-PCR を行う方法であり、検査の省力化に期待される。One step 法には逆転写酵素と Taq ポリメラーゼの2種類の酵素をもちいる方法と、tTh ポリメラーゼのみをもちいる方法があるが、今回我々は前者の方法による One step 法と Two step 法との検出成績の

比較を行い、One step 法が Two step 法よりも感度的に劣るとの結果を得た。これは逆転写反応時に Taq ポリメラーゼとセンスプライマーが存在することにより、プライマーが非特異的なアニーリングと伸長反応を起こし、特異性を低下させたためではないかと推測され、Two step 法と同等の検出感度を得るには、純度のより高い RNA と特異性の高い逆転写反応条件の再検討が必要であろうと考えられた。また、Two step 法と同等の強さのバンドを得るには通常の4倍量の Taq ポリメラーゼが必要であったが、これは通常量の Taq ポリメラーゼでは逆転写反応時に失活してしまうためであると考えられた。

以上のことから RT-PCR 法で糞便中の NLVs 遺伝子を検出するには、Two step 法が One step 法に比較して反応効率が良く、高感度であることが考えられた。しかし、RNA 量が比較的多く、感度が要求されない場合や、交雑物の影響が少ない検体を材料とする場合には、操作の簡便な One step 法は有用ではないかと推測された。また、cDNA 合成キット Ready To Go は必要な試薬類が全て PCR チューブ一本の中に乾燥状態で分注されており、室温保存も可能であることから、これをもちいることで Two step 法でも検査の省力化が可能であり、多検体の迅速処理にも有用であろうと思われた。

平成10年度に山梨県で発生し NLVs 遺伝子が検出された非細菌性集団食中毒様事例は2事例であり、昨年度とはほぼ同様の検出状況であった。検出された遺伝子型別では全国的な状況¹⁰⁾と同様に G2 が主体であったが、G1 と G2 の混合感染例が1事例認められた。疫学調査の結果からこの事例の原因食品は生カキであったと推定され、生カキ喫食事例では異なる遺伝子型が同時に検出されることが示唆された。

プライマー別の検出率は YURI22F/R が最も高かったが、これは最近の日本の流行株(G2)をもとに設計されたことによると思われた。しかし、上述の G1, G2 混合感染例では YURI22F/R は G1 については陰性もしくは弱陽性の結果しか得られなかった。また、同一事例内で

同じ遺伝子型群であるにもかかわらずプライマー特異性が検体によって異なる⁷⁾場合があり、多様な遺伝子型の検出を想定して複数のプライマーを併用することが必要であろうと考えられた。

謝 辞

集団食中毒発生時の検体採取ならびに疫学調査にご協力いただきました各保健所の担当者の方々、県衛生業務課の担当者の方々に深謝いたします。

文 献

- 1) Jiang, X. et al. : Science, **250**, 1580~1583 (1990)
- 2) Lambden, P. R. et al. : Science, **259**, 516~519 (1993)

- 3) 西尾 治：病原微生物検出情報（国立感染症研究所編），**19**, 6 (1998)
- 4) Saito, H. et al. : Microbiol. Immunol., **42**, 439~446 (1998)
- 5) Moe, C. L. et al. : J. Clin. Microbiol., **32**, 642~648 (1994)
- 6) Ando, T. et al. : J. Clin. Microbiol., **33**, 64~71 (1995)
- 7) 山上隆也, 小澤 茂：山梨衛公研年報, **41**, 38~43 (1997)
- 8) Jiang, X. et al. : J. Clin. Microbiol., **30**, 2529~2534 (1992)
- 9) 中山広樹：バイオ実験イラストレイテッド3 本当にふえるPCR, 86, 秀潤社 (1996)
- 10) 武田直和, 名取克郎：食品衛生研究, **48**, 65~75 (1998)