

# ノロウイルス検査におけるエコーウイルス9型Hill株を用いた 核酸検出効率の評価

木田浩司, 溝口嘉範, 濱野雅子, 葛谷光隆, 藤井理津志 (ウイルス科)

【調査研究】

## ノロウイルス検査におけるエコーウイルス9型Hill株を用いた 核酸検出効率の評価

Evaluation of Nucleic acid Detection Efficiency by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Using Echovirus Type 9 strain Hill for Diagnosis of Norovirus Infection

木田浩司, 溝口嘉範, 濱野雅子, 葛谷光隆, 藤井理津志 (ウイルス科)

Kouji Kida, Yoshinori Mizoguchi, Masako Hamano, Mitsutaka Kuzuya, Ritsushi Fujii  
(Department of Virology)

### 要 旨

ノロウイルス (NoV) 検査における内部対照ウイルスであるエコーウイルス9型 (E9) Hill株の遺伝子配列の一部をプラスミドベクターに組換えたコントロールプラスミドを作成し, 2010年に開発したE9 Hill株のリアルタイムRT-PCR法の指標とすることで定量性のある検査系を構築した。食中毒事件の主要原因であるノロウイルス (NoV) のPCR法による検査では, 検体の種類によって検出感度が著しく異なることが知られているが, E9 Hill株の定量値から核酸検出効率を算定することで, 間接的にNoVの検出感度の検証が可能となった。そこで, 食中毒5事例21名から採取した糞便検体を対象として核酸検出効率の評価を試みたところ, 核酸検出効率は2~109%であり, 検体による差が大きいことが確認された。本法は迅速性に優れるだけでなく, 感度検証も可能であり, 応用範囲は広い。今後, 検出感度が低いとされる様々な食品検体でも核酸検出効率を検証することで, NoV検査法改良への一助としたい。

[キーワード: ノロウイルス, エコーウイルス, リアルタイムRT-PCR, TaqMan MGB probe]

[Key words: Norovirus, Echovirus, Real-time RT-PCR, TaqMan MGB probe]

## 1 はじめに

感染性胃腸炎や冬期食中毒の主要原因の1つであるノロウイルス (NoV) は, カリシウイルス科ノロウイルス属に分類され, 直径30-38nmで+鎖の一本鎖RNAを有するウイルスであるが, 培養細胞・実験動物により人工的に増殖させる技術は, いまだ確立されていない<sup>1)</sup>。そのため, 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知NoV検査法 (通知法)<sup>2)</sup>は, 逆転写酵素 (reverse transcriptase: RT) を利用したRT-PCR法により実施される。しかし, 検査材料である糞便, 食品等は酵素反応を阻害する夾雑物を多量に含み, また一本鎖RNAはDNAと比較して不安定であるため, NoVの検査において, 検査自体の成立の確認は特に重要である。通知法では, 内部対照ウイルスとして検体に加えたエコーウイルス9型 (E9) Hill株が正しく検出されることで間接的にNoVの検査成立を保証している。しかし, 藤本らによって開発され, 通知法に示されたE9 Hill株のコンベンショナルRT-PCR法<sup>3)</sup>は定量性が無く, 検出感度の検証ができない。そこで我々は, E9 Hill株の遺伝子配列の一部をプラスミドベクターに組換え, 2010年に開発したE9 Hill株のリアルタイムPCR法<sup>4)</sup>の指標とすることで定量性のある検査系を構築した。また, 臨床検体における本

法の有用性を検討するため, 食中毒5事例21名の糞便検体を対象として核酸検出効率の評価を試みた。

## 2 材料と方法

### 2.1 E9 Hill株及び糞便検体の調製

E9 Hill株をヒト羊膜由来株化細胞のFL細胞に接種して培養し, 上清中の力価をBehrens-KärBer法で測定して $2.6 \times 10^3$ TCID<sub>50</sub>/2 $\mu$ Lに調製し, 試験に供した。

食中毒5事例 (事例A~E) における糞便 (事例A 9名, 事例B 1名, 事例C 7名, 事例D 2名及び事例E 2名) について, PBS(-)を用いて10%乳剤を調製した後, 4℃で15,000rpm, 10分間遠心後, 上清を前処理糞便検体として試験に供した。

### 2.2 ウィルスRNAの抽出

E9 Hill株の培養上清140 $\mu$ Lをコントロールプラスミド作成用の試験液とした。食中毒事例については, 通知法<sup>2)</sup>に準じ, 前処理糞便検体138 $\mu$ LにE9 Hill株を2 $\mu$ L加えて検体試験液とした。また, PBS(-)138 $\mu$ LにE9 Hill株を2 $\mu$ L加え, 抽出対照試験液とした。RNA抽出は市販のキット (QIAamp Viral RNA mini kit Qiagen社製) を用い, カラムからのRNAの溶出にはRT bufferを用いた以外は添付マ

マニュアルに従って実施した。RNA抽出液60  $\mu$ Lに、DNase I (5U/ $\mu$ L Takara社製) 1.2  $\mu$ L及びRNase Inhibitor (40U/ $\mu$ L Takara社製) 0.4  $\mu$ Lを加え、37°C 10分間消化した。次に75°C 5分間加熱処理し、DNaseIを失活させた。

### 2.3 逆転写反応によるcDNAの合成

逆転写反応は、RevaTra Ace (100U/ $\mu$ L Toyobo社製)を用いた。DNase処理RNA抽出液5  $\mu$ Lに、pd(N)6 random hexamer (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L Takara社製) 1  $\mu$ L及びnuclease free water 3  $\mu$ Lを加え、70°Cで10分間加熱後ただちに水中に移して急冷した。次に5x RT buffer 3  $\mu$ L, 10mM dNTPs 2  $\mu$ L, Recombinant RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ L Takara社製) 0.5  $\mu$ L, nuclease free water 4.5  $\mu$ L及びRevaTra Ace 1  $\mu$ Lを加えて20  $\mu$ Lとし、30°C 10分間、42°C 60分間及び98°C 5分間反応させた。

### 2.4 コントロールプラスミドの作成

E9 Hill株から作成したcDNAについて、酵素としてEX-Taq (Takara社製)、プライマーとしてE9 Hill-F及びE9 Hill-R (表1)を用いたPCR法で増幅した。反応条件は、酵素活性化95°C 1分間、熱変成94°C 1分間、アニーリング50°C 1分間及び伸長反応72°C 2分間を行い、熱変成から伸長反応のサイクルを40回繰り返した後、最終伸長反応を72°C 15分間行った。PCR増幅産物をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用い、添付マニュアルに従ってpCR2.1-TOPO vectorにクローニングした。挿入した遺伝子配列を、キット添付のM13プライマーセットを用いたダイレクトシーケンス法により確認した後、PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen)を用い、添付マニュアルに従って組換えプラスミドを精製した。得られた組換えプラスミド溶液のOD値から、TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH8.0)にて $10^7$ copies/ $2\mu$ Lに調製したものをコントロールプラスミド原液とした。

### 2.5 リアルタイムPCR法

リアルタイムPCR法には、TaqMan Universal Master mix (life technologies社)を用いた。プライマー及びMGBプローブの配列を表1に示した。反応試薬18  $\mu$ LにcDNA

または10倍階段希釈したコントロールプラスミド溶液 ( $1\times 10^7\sim 1\times 10^9$ copies/ $2\mu$ L) 2  $\mu$ Lを加えて20  $\mu$ L (各プライマー0.4  $\mu$ M, TaqMan MGBプローブ0.2  $\mu$ M)とした後、StepOnePlus (life technologies社)を用いて増幅反応を行った。反応条件は、50°C 2分間、95°C 10分間の後、熱変性95°C 15秒間及び伸長反応56°C 1分間を行い、熱変性から伸長反応のサイクルを45回繰り返した。解析は、StepOne Software v2.1 (life technologies社)を用いて行った。

## 3 結果

### 3.1 コントロールプラスミドを利用した定量性の検証試験

10倍階段希釈したコントロールプラスミド溶液を用いて、リアルタイムPCR法における増幅効率及び検量線の検討を行った。その結果、 $1\times 10^7\sim 1\times 10^1$ copies/tubeの範囲内で、PCRサイクル数に比例した遺伝子の増幅が認められた。また、X軸にコントロールプラスミドのコピー数、Y軸にThreshold cycle (Ct)をプロットした検量線を作成したところ、直線性、傾きともに良好であった(図1)。このことから、本法によるコントロールプラスミドを用いた定量が可能であることが明らかとなり、その感度は $1\times 10^1$ copies/tubeであると推定された。

### 3.2 糞便検体における核酸検出効率の評価試験

食中毒5事例(事例A~E)における21名の糞便(事例A 9名, 事例B 1名, 事例C 7名, 事例D 2名及び事例E 2名)について検討した。核酸検出効率の評価試験においては、誤差を少なくするため、PBS(-)にE9 Hill株を添加した抽出対照及び糞便検体について3 tubeずつリアルタイムRT-PCR法で定量し、平均値を算定した。次に抽出対照の定量平均値を核酸検出効率100%と仮定し、糞便検体の核酸検出効率を算定した。その結果、糞便検体の核酸検出率は2~109%の範囲であった(表2)。また、検体提供者の年齢、性別及び便性状(水様便~性状便)と核酸検出効率との間に、特に相関性は認められなかった(データは示していない)。

表1 プライマー及びプローブ

	塩基長 (base)	塩基配列	部位*	文献
E9Hill-F	20	5'-GTT AAC TCC ACC CTA CAG AT-3'	5192-5211	2)
E9Hill-R	20	5'-TGA ACT CAC CAT ACT CAG TC-3'	5459-5440	2)
E9-real-F	20	5'-CGT CTC AGT GGC TGG AAT CA-3'	5263-5282	4)
E9-real-R	21	5'-CCC TGT GTA TGC TCC TTG GAA-3'	5312-5332	4)
E9MGB	22	5'-(FAM)-ACA TAA TCT ACA AAC TCT TTG C-(NFQ)-(MGB)-3'	5286-5307	4)

\* E9 Hill株の全塩基配列7420base (Accession No. X84981)における部位

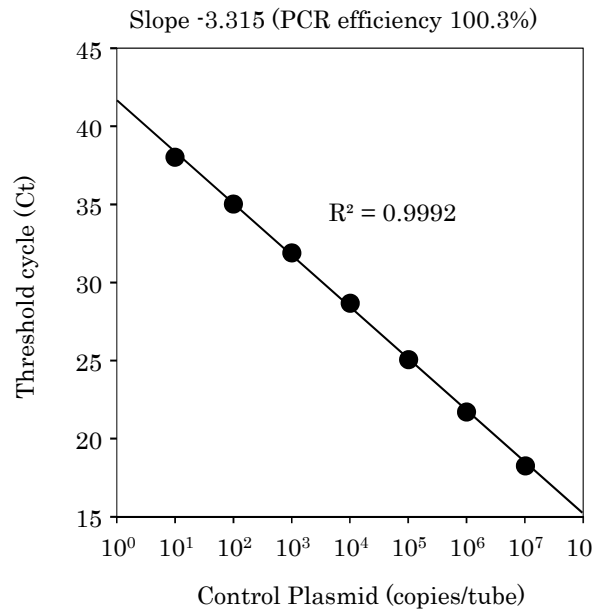


図1 E9 Hill株のリアルタイムRT-PCR法におけるコントロールプラスミドによる検量線

表2 食中毒事例の糞便検体におけるE9 Hill株の核酸検出効率

事例	検体	定量値 (copies/well)		核酸 検出効率 (%)
		平均値 (n = 3)	抽出対照 (PBS + E9)	
A	A-1	14,225		65
	A-2	4,714		21
	A-3	14,696		67
	A-4	21,182		96
	A-5	6,181	22,052	28
	A-6	4,636		21
	A-7	10,472		47
	A-8	9,145		41
	A-9	10,997		50
B	B-1	158	9,907	2
C	C-1	23,848		87
	C-2	23,077		84
	C-3	29,891		109
	C-4	19,844	27,376	72
	C-5	20,835		76
	C-6	26,133		95
	C-7	11,934		44
D	D-1	8,275	32,669	25
	D-2	14,677		45
E	E-1	31,195	31,203	100
	E-2	19,132		61

#### 4 考察

NoVの検査では、検体の種類によって検出感度が著しく異なることが知られており、近年では、斎藤らの開発したパンソルビン・トラップ法<sup>5)</sup>等、NoVの検出感度向上のための様々な検体処理法が考案されている。しかし、検出感度の検証には、患者糞便を希釈して添加するなど、煩雑な操作が必要である。今回我々は、内部対照ウイルスであるE9 Hill株のコントロールプラスミドを作成し、2010年に開発したリアルタイムRT-PCR法<sup>4)</sup>における定量性を検証した。

その結果、本法は $1 \times 10^1$  copies/tube以上のE9 Hill株が存在すれば、検出と定量が可能であることが確認された。このことから、NoV検査におけるE9 Hill株の定量値から核酸検出効率を算定することで、間接的にNoVの検出感度を検証できると考えられた。

実検体を用いた検証試験として、食中毒5事例21名の糞便検体について、E9 Hill株の核酸検出効率を算定したところ、2~109%の範囲で様々であった。核酸検出効率100%を超える検体が存在するのは、リアルタイムRT-PCR

による定量は、原理上誤差が大きいためであると考えられた。糞便検体は、食品検体と比較してNoVの検出感度が高いとされているが<sup>5)</sup>、E9 Hill株においては20名中5名の核酸検出効率が30%以下であった。このことから、糞便検体にも一定の割合で検出感度の悪い検体が存在し、これはNoV検出においても同様であると考えられた。また、本試験では、抽出対照として検体と同量のE9 Hill株を添加したPBS(-)を設定し、この定量値を核酸抽出効率100%と仮定して評価を行ったが、抽出対照の定量値は9,907～3,120copies/tubeの範囲で変動しており、事例によって3倍程度の差が確認された。これは、定量に至るまでの多くの検査行程の中で、反応条件の僅かな差が積み重なるためであると考えられた。従って、本法による核酸抽出効率を算定する場合、試験ごとに抽出対照を設定することが重要であると考えられた。

リアルタイムRT-PCR法は、迅速性や定量性など、多くの利点を併せ持つ検査法であり、今後様々な分野で応用されると考えられる。今回、NoV検査における内部対照ウイルスであるE9 Hill株の定量が可能となったことで、間接的にNoV核酸の検出効率の評価が可能となった。ただし、本法は、エコーウイルスの多くに交差反応を示すと推測されることから、NoVとの混合感染をおこしている患者便では正確な評価が不可能になることを念頭に置く必要がある。一方、食品は糞便よりもNoVの検出感度が低いとされているが、食品の種類ごとの検出感度の評価はほとんどなされていない。今後、本法を応用し、様々な食品検体における核酸検出効率を検証することで、NoVの新たな検査法開発の一助としたい。

## 文 献

- 1) 西尾 治, 秋山美穂, 愛木智香子, 杉枝正明, 福田伸治, 西田知子, 植木 洋, 入谷展弘, 篠原美千代, 木村博一: ノロウイルスによる食中毒について, 食品衛生学雑誌, 46(6), 235-245, 2005
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知: ノロウイルスの検出法について, 食安監発第1105001号, 平成15年11月5日
- 3) 藤本嗣人, 近平雅嗣, 秋山美保, 西尾 治: ノロウイルス検査におけるRNA抽出コントロールとしてのエコーウイルス9型Hill株の適用について, 兵庫県立健康環境科学研究所年報, 2, 107-110, 2003
- 4) 木田浩司, 濱野雅子, 葛谷光隆, 藤井理津志: ノロウイルス検査における抽出コントロールとしてのエコーウイルス9型Hill株のReal-time RT-PCR法による検出, 岡山県環境保健センター年報, 34, 73-76, 2010
- 5) 斎藤博之: 食品のノロウイルス検査の汎用化を目指したパンソルビン・トラップ法の開発, 日本食品微生物学会雑誌, 29(1), 32-37, 2012