

小型球形ウイルス検査における RT - PCR 法の改良

西川 眞・青木 順子*・渡邊香奈子・新井 礼子・篠川 旦

Keywords : SRSV ; Norwalk-like viruses ; RT-PCR ; Rapid detection

1 はじめに

小型球形ウイルス (Small round structured virus, 以下「SRSV」と略す) は、カリシウイルス科 “Norwalk - like viruses” 属及び “Sapporo - like viruses” 属のウイルスの総称で、小児や成人の流行性胃腸炎の原因ウイルスである。また、食品衛生法では食中毒の病因物質として指定されている。

食中毒事例における原因調査は、病因物質を明らかにし、その汚染経路を究明して、事故の拡大と再発を防止することを目的として行われる。このため、検査には迅速性が求められ、検査材料から直接 SRSV 遺伝子を検出する遺伝子増幅法 (以下「PCR」と略す) が有用とされ、検査が行われてきた。しかし、SRSV には遺伝子多型が報告されており^{1, 2)}、このため多数のウイルス系統を検査対象とすることになり、検査に時間を要していた。そこで、検査の方法を見直し、手順を簡略化して早期に判定ができる方法について検討した。その結果を報告する。

2 材料及び方法

2.1 検討材料

1997年2月から1999年1月までの2年間に新潟県内で発生した食中毒7事例で得た患者便61検体を検討材料とした。これらの患者便はすべて厚生省生活衛生局食品保健課長・乳肉衛生課長通知 (平成9年5月30日付け衛食第156号、以下「標準法」とする) により Nested PCR まで増幅し、SRSV を検出した保存検体である。検体は、便のままサンプル瓶に -20°C で凍結保存したものをを用いた。1997年採取の6検体については、キャリーブリア培地用に採取されていたので、受領時に固形物のみを分離し凍結保存したものをを用いた。

2.2 方法

2.2.1 SRSV 遺伝子の増幅部位の検討

当所で使用している36/35及び NV82+SM82/NV81 の各プライマーセットについて、SRSV のポリメラーゼ領域における当該部分との相同性について比較検討した。遺伝子解析は GENETYX - MAC/DB Ver.38.0 及び GENETYX - MAC 遺伝情報処理ソフトウェア Ver.8.0 を用いて行った。

*相川保健所

2.2.2 SRSV 遺伝子の増幅方法の検討

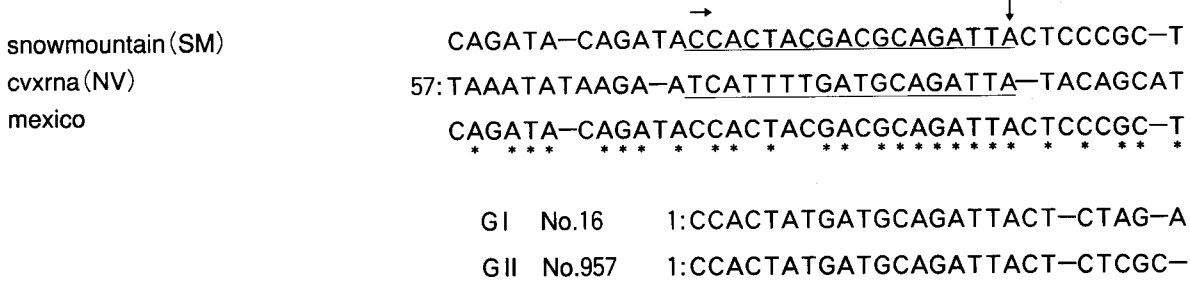
糞便材料の前処理及び核酸抽出までを標準法に示された方法に基づいて行い、以下を検討対象とした。核酸沈殿法をエタチンメイト (Wako, Nippon Gene) に変更し、抽出 RNA を 97°C 5分間加熱変性させる過程を追加した。また、以後の核酸の逆転写は Promega 社 Reverse Transcription System #A3500 を使用して行った。この反応系の試薬は 10×Reaction buffer $2.0\mu\text{l}$, 25mM MgCl_2 $4.0\mu\text{l}$, 10mM dNTPs $2.0\mu\text{l}$, 15U AMV - RT $1.0\mu\text{l}$, RNasin $0.5\mu\text{l}$, NV81 Primer $1.0\mu\text{l}$ ($50\text{pmol}/\mu\text{l}$), RNA sample $9.5\mu\text{l}$ の計 $20\mu\text{l}$ とした。逆転写反応は 42°C 1時間で行った。次いで転写された cDNA を 1×PCR で増幅した。PCR 反応試薬は、核酸分解酵素を含まない精製水 $30.5\mu\text{l}$ に、10×Reaction buffer $4.0\mu\text{l}$, 25mM MgCl_2 $2.0\mu\text{l}$, 各 $50\text{pmol}/\mu\text{l}$ の NV82, SM82, NV81 の3種のプライマー各 $1\mu\text{l}$, Taq Polymerase (Biotech International, $5\text{U}/\mu\text{l}$) $0.5\mu\text{l}$ の組成で、これに逆転写で得た cDNA $10\mu\text{l}$ を加え $50\mu\text{l}$ とした。増幅時間は Saito³⁾ らの方法に準拠し、前段階の増幅をホットスタート法で 94°C 1分, 45°C 2分, 60°C 3分で2回行い、次いで 94°C 1分, 45°C 1分, 72°C 1分の増幅サイクルを30回繰り返し、 72°C 5分の伸展増幅時間を追加する方法で行った。遺伝子増幅は、Astec 社製 Program Temp Control System PC - 800 及び Techne 社製 PROGENE Thermal Cycler を用いた。

3 結果及び考察

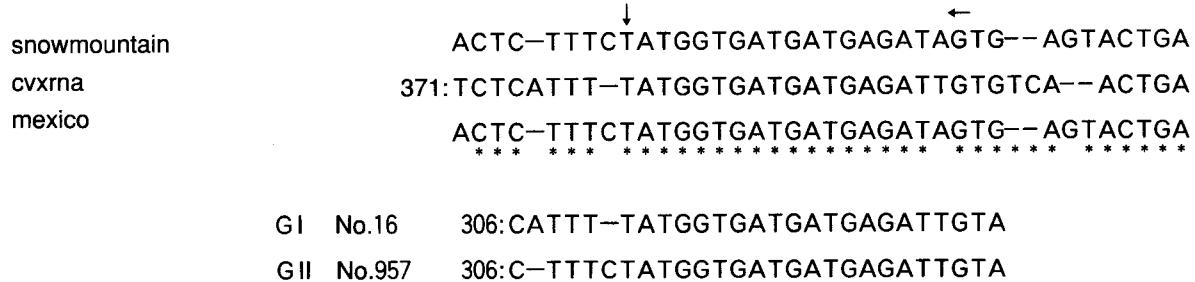
3.1 SRSV 遺伝子の増幅部位

SRSV 遺伝子の核酸は約7,600個前後⁴⁾であり、このうち36/35のプライマーセットで増幅する領域は、このうちの4475番目から4944番目の470個の核酸で構成される部位である。Fig. 1で代表的な “Norwalk - like viruses” 属3系統の SRSV と当所検出株の遺伝子配列の一部を示した。標準法では36/35プライマーで RT - PCR を行い、NV82+SM82/NV81 プライマーで Nested PCR を行うこととしている。これは、ウイルス量が少ないか、糞便中の核酸合成阻害物質により、十分な量の PCR 産物が得られない場合を想定し、Nested PCR に安定領域を準備したものと解される。Fig. 1の(1)は36/35プライマー増幅領域470個の核酸配列中、第57番目以降の配列を示し、NV82 又は

(1) Primer site of NV82, SM82



(2) Primer site of reverse NV81



(3) Primer site of reverse 35

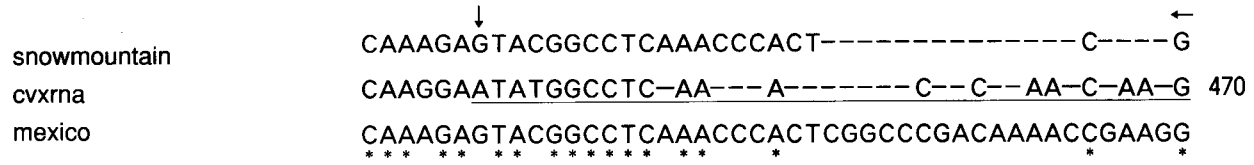


Fig 1. Primer site and similarity of alignment.

* : consensus

SM82 プライマーとの相補的結合部位を、(2)は中間部371番目からの NV81 プライマーとの結合部を、(3)は470個目末端部における35プライマーとの結合部をそれぞれ下線で示している。標準法の逆転写工程に使用される35プライマーは、矢印方向の3'付近の相同性は高いものの、下向き矢印部分の末端の核酸が異なっており、系統の異なる SRSV では逆転写効率が悪いことが予想された。これに対し、(1)の NV82 又は SM82 との結合部位及び(2)の NV81 結合部位では相同性が高く、3'末端の核酸も一致している。回文構造もないことからこの部分は変化の少ない部分

と考えられる。そこで、核酸精製を十分に行い、結合温度条件を整えれば、SM82, NV82, NV81のプライマーセットを、RT - PCR に使用するプライマーに選定すれば感度が安定し、再度の増幅が不要になることが考えられる。

3.2 SRSV 遺伝子の増幅方法

そこで、NV82, SM82, NV81 のプライマーを用いての RT - PCR 法による検出について検討した。その結果を Table 1 に示した。表の標準法欄で、Standard Method として示した部分は、過去の食中毒調査において検出した結果を示した。そこで、NV82+SM82/NV81 プライマーセットの理論上の結合最適温度 (Tm 値) が46℃から54℃の範囲にあり、その部位の核酸配列にいくつかの異動が認められることから、ある程度非特異増幅を許容する温度帯を考え、Saito³⁾らの報告に従って、アニーリング温度は最初の2回を40℃、続く30回を45℃に設定して試行した。NV81 プライマーで核酸の逆転写を行い、得られた cDNA に SM82, NV82 それぞれのプライマーを加えて PCR を行った。その結果、genogroup I 及びIIいずれの系統の SRSV も目的の330bpの位置にバンドとして検出されたが、プライマーセットごとのバンドの出現パターンは異なっており、NV82/NV81 の増幅系には弱い非特異バンドが、また SM82/NV81 系では強い非特異バンドが検出された (Fig. 2)。非特異バンドは核酸抽出後、逆転写の前の段階での DNaseI による処理で消失することが報告されてい

Table 1. Results of SRSV detection by two PCR method

Outbreak	Tested samples	Standard method		Improved
		36/35 RT-PCR	82/81 Nested	
1997 Feb.	1	0/1	1/1	1/1
	5	1/5	5/5	5/5
1998	Jan. 5	0/5	5/5	5/5
	Feb. 5	0/5	5/5	5/5
	Mar. 5	1/5	5/5	5/5
	Aug. 36	0/36	0/36	0/36
1999 Jan.	4	0/4	4/4	4/4
	61	2/61	61/61	61/61

36/35: 36/35 primer pair

82/81: NV82+SM82/NV81 primer pairs

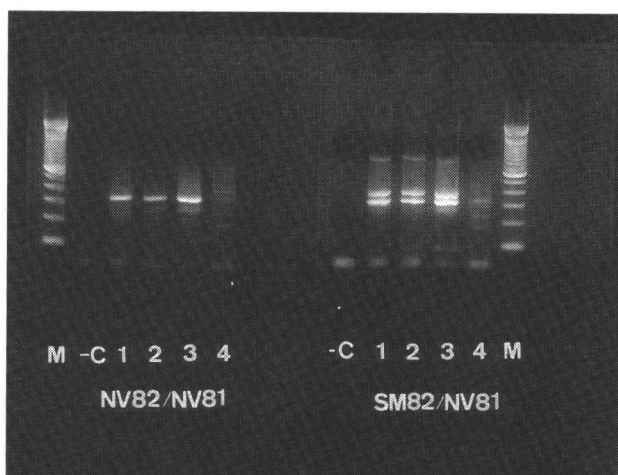


Fig. 2. Annealing temperature at 40°C.

(M : DNA size marker, - C : negative control, 1 - 4 : stool specimens.)



Fig. 3. Annealing temperature at 45°C.

(- C : negative control, 4 - 1 : stool specimens, M : DNA size marker)

る³⁾。しかし、工程を少なくして同等の結果が得られないかと考え、増幅温度の組み合わせを検討した結果、アニーリング温度を45°Cにした方法で非特異バンドが消え、この条件が適当であることが認められた (Fig. 3)。この方法で、検討対象の61検体について RT - PCR を行ったとこ

ろ、すべての検体で SRSV 遺伝子が検出され、再度 PCR で増幅する標準法の Nested PCR 法と同等の成績を得た。このことは6時間あるいは1夜分の時間短縮が図られたことを意味する。一般に、SRSV は成人では激しい嘔吐、下痢などの症状のあと、15日前後で回復する⁵⁾が、発症後66時間を経過した軽症患者の固結便からも1回の PCR で検出できた。SRSV が原因の食中毒事例では、有症時の患者便中には1回の PCR で検出されるに十分な量のウイルス粒子があると考えられる。それが場合により困難なのは、SRSV 遺伝子の配列が多型性に富むためである。しかし、発症時間と採便時間を検体採取者に記載してもらい、時間経過が短い検体を優先し、アニーリング温度を45°Cに設定する方法で検査することにより、より早い検査が可能になると考える。

4 ま と め

- (1) 有症患者便から多く検出される“Norwalk - like viruses”属 genogroup I 及びIIの SRSV については、NV82, SM82/NV81 のプライマーセットによる RT - PCR 1 回法で高い感度での検出が可能である。
- (2) 患者便検体では、適正な T_m 値よりわずかに低い温度設定により、PCR の増幅感度を上げ、非特異増幅を抑えることができる。

謝 辞

この研究は、厚生科学特別研究平成10年度研究課題「ウイルス性食中毒原因の遺伝子検査標準法確立と全国行政対応整備に関する研究」(主任研究者：岐阜県生物産業技術研究所川本尋義部長研究員)の補助金を得て行いました。また、検討に際し、新潟大学教授鈴木宏先生から御指導をいただきました。ここに謹んで感謝の意を表します。

文 献

- 1) Wang J., et al. : J. Virol., **68**, 5982 (1994).
- 2) Ando T. et al. : J. Clin. Microbiol., **33**, 64 (1995).
- 3) Saito, H., et al. : Microbiol. Immunol., **42**, 439 (1998).
- 4) Jiang X., Wang M., Wang K., Estes M. K. : Virology, **195**, 51 (1993).
- 5) Kilgore, P., et al. : JID., **173**, 787 (1996).