

図2 カリシウイルスG1型の輸入食品と日本の検出株との比較

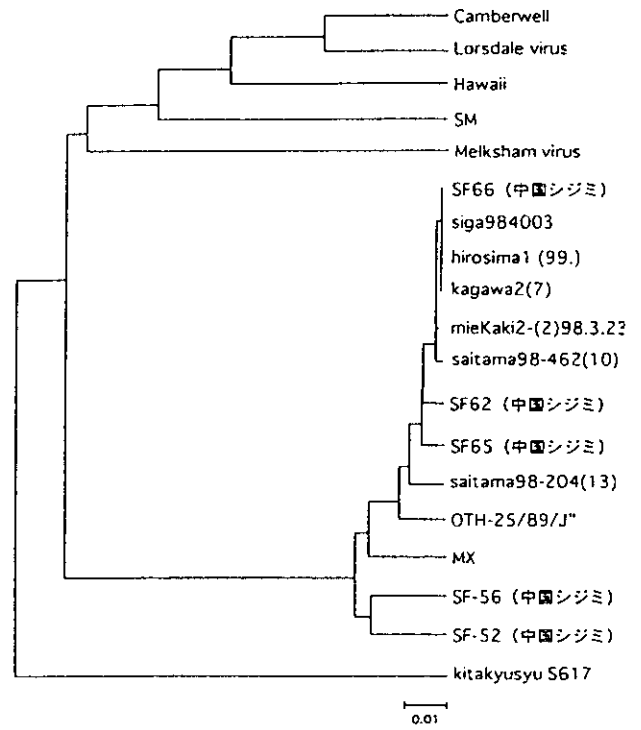


図3 カリシウイルスG2型の輸入食品と日本の検出株との比較

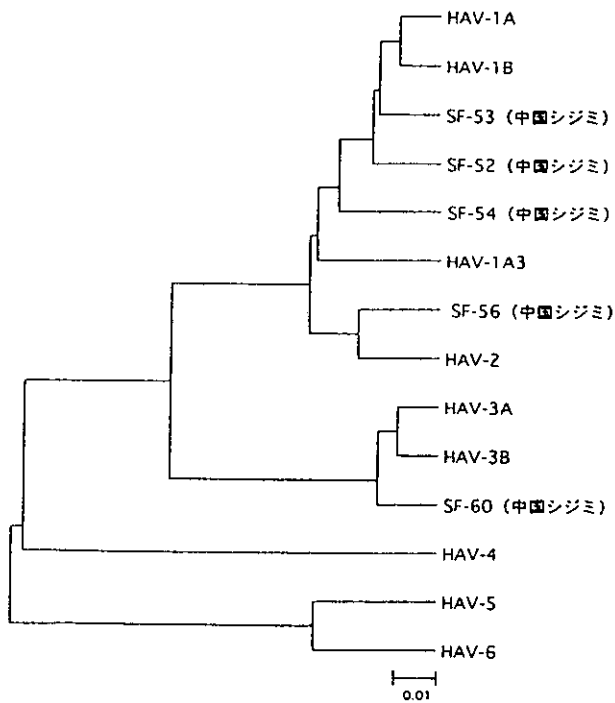


図4 A型肝炎ウイルスの系統樹

検査法・プロトコール編

S R S V 検査法

分担研究者 沢田春美
 協力研究者 吉澄志磨
 玉手直人
 大山 徹
 北海道立衛生研究所

1. 糞便からのRNA抽出

10% 糞便乳剤 (DEPC H₂O) ----- 15ml tube.

3,000rpm, 30分, 4°C

上清500 μlをNew 1.5ml tubeに採取

← 5' 1700 *1 500 μl
 vortex

15,000rpm, 30分, 4°C

上清500 μlをNew 1.5ml tubeに採取

← 16% PEG8000 500 μl
 vortex

4°C, 90分以上静置 (オハナ付可)

*1 CCI 2 FCH 3
 X-8110
 株式会社化成 (株)

15,000rpm, 30分, 4°C

上清を除去

沈 査

← DEPC H₂O 150 μl
 vortex

← 2x Proteinase K Buffer 150 μl
 Proteinase K (10mg/ml) 12 μl
 vortex

37°C, 30分加温

← 10% CTAB *2 50 μl
 ← 4M NaCl 50 μl
 vortex

56°C, 30分加温

← Phenol/CHCl₃/isoAmOH (25:24:1) 400 μl
 vortex

15,000rpm, 30分, 4°C

上清をNew 1.5ml tubeに採取

← CHCl₃/isoAmOH (24:1) 350 μl
 vortex

15,000rpm, 30分, 4°C

上清をNew 1.5ml tubeに採取

← EtOH 750 μl
 ← 3M NaOAc 30 μl
 ← Glycogen *3 1 μl
 vortex

*2 HEXADECYL, TRIMETHYL
 AMMONIUM BROMIDE
 H-5882 SIGMA

*3 Glycogen
 901393 20mg/ml
 Boehringer Mannheim

-70°C, 30分静置

15,000rpm, 30分, 4°C

上清を除去
 真空乾燥

沈 査

← DEPC H₂O 25 μl

RNA solution

2. 食品からのRNA抽出

分担研究者 沢田春美
協力研究者 吉澄志磨
玉手直人
大山 徹
北海道立衛生研究所

20% 食品乳剤 (PBS) ----- ストマフィルター
濾液を15mlまたは50ml tubeに採取
3,000rpm, 30分, 4°C
上清4~20mlをNew tubeに採取
← 9'700*1 等量
vortex
3,000rpm, 30分, 4°C
上清をNew tubeに採取 ----- Sample

片については中腸腺を摘出し20% 乳剤に調製する

超遠心処理

超遠心用tube
← 30% Saccharose 3ml
← Sample 5~7ml (静かに重層する)
35,000rpm, 3.5時間, 4°C
上清を除去
↳ DEPC H₂O でリンス
← DEPC H₂O 500 μl

超遠心処理Sample

Sample 500 μlをNew tubeに採取 ----- 1.5ml tube
← 16% PEG8000 500 μl
vortex
4°C, 90分以上静置 (オバーナイト可)

以降 糞便と同じ方法にてRNA抽出

分担研究者 沢田春美
 協力研究者 吉澄志磨
 玉手直人
 大山 徹
 北海道立衛生研究所

3. RT-PCR

(1) cDNA合成

試 薬	1 Sample
DEPC H ₂ O	4.2 μ l
10 \times PCR Buffer	1.5 μ l
dNTPs mix 2.5mM	4.0 μ l
Primer 10 μ M (R)	2.0 μ l
RNase inh (40U/ μ l)	0.5 μ l
R T (15U/ μ l)	0.3 μ l
RNA Sample	2.5 μ l
total	15 μ l

42°C 60min \rightarrow 95°C 5min

(3) Nested PCR

試 薬	1 Sample
dH ₂ O	31.15 μ l
10 \times PCR Buffer	4.5 μ l
dNTPs mix 2.5mM	4.0 μ l
Primer 10 μ M (F)	2.5 μ l
Primer 10 μ M (R)	2.5 μ l
Taq Polymerasee	0.35 μ l
1st PCR Product	5.0 μ l
total	50 μ l

(2) 1st PCR

試 薬	1 Sample
dH ₂ O	26.15 μ l
10 \times PCR Buffer	3.5 μ l
Primer 10 μ M (F)	2.5 μ l
Primer 10 μ M (R)	2.5 μ l
Taq Polymerasee	0.35 μ l
cDNA Sample	15 μ l
total	50 μ l

1st PCR

Primer MR-3/4 (470bp)
 94 °C 30sec
 52 °C 30sec
 72 °C 90sec] \times 35

Nested PCR

Primer Yuri-22 F/R (373bp)
 94 °C 30sec
 52 °C 30sec
 72 °C 90sec] \times 35

dNTP mixture each 2.5mM
 code No. 4030
 TaKaRa

Recombinant RNasin
 Ribonuclease Inhibitor
 catalog # N2511
 2.500U (40U/ μ l)

Reverse Transcriptase (AMV)
 120248
 SEAKAGAKU CORPRATION

DNA Polymerase
 Expand High Fidelity
 PCR System
 cat.No. 1732641 100U
 10X PCR Buffer添付
 Boehringer Mannheim

4. シークエンシング

試薬
*パーキンエルマー ABI PRISM Dye Terminator Cycle sequencing ready reaction (Part Number 402079)
Big Dye Terminator Cycle sequencing ready reaction (Part Number 4303152)

分担研究者 沢田春美
協力研究者 吉澄志磨
 玉手直人
 大山 徹
北海道立衛生研究所

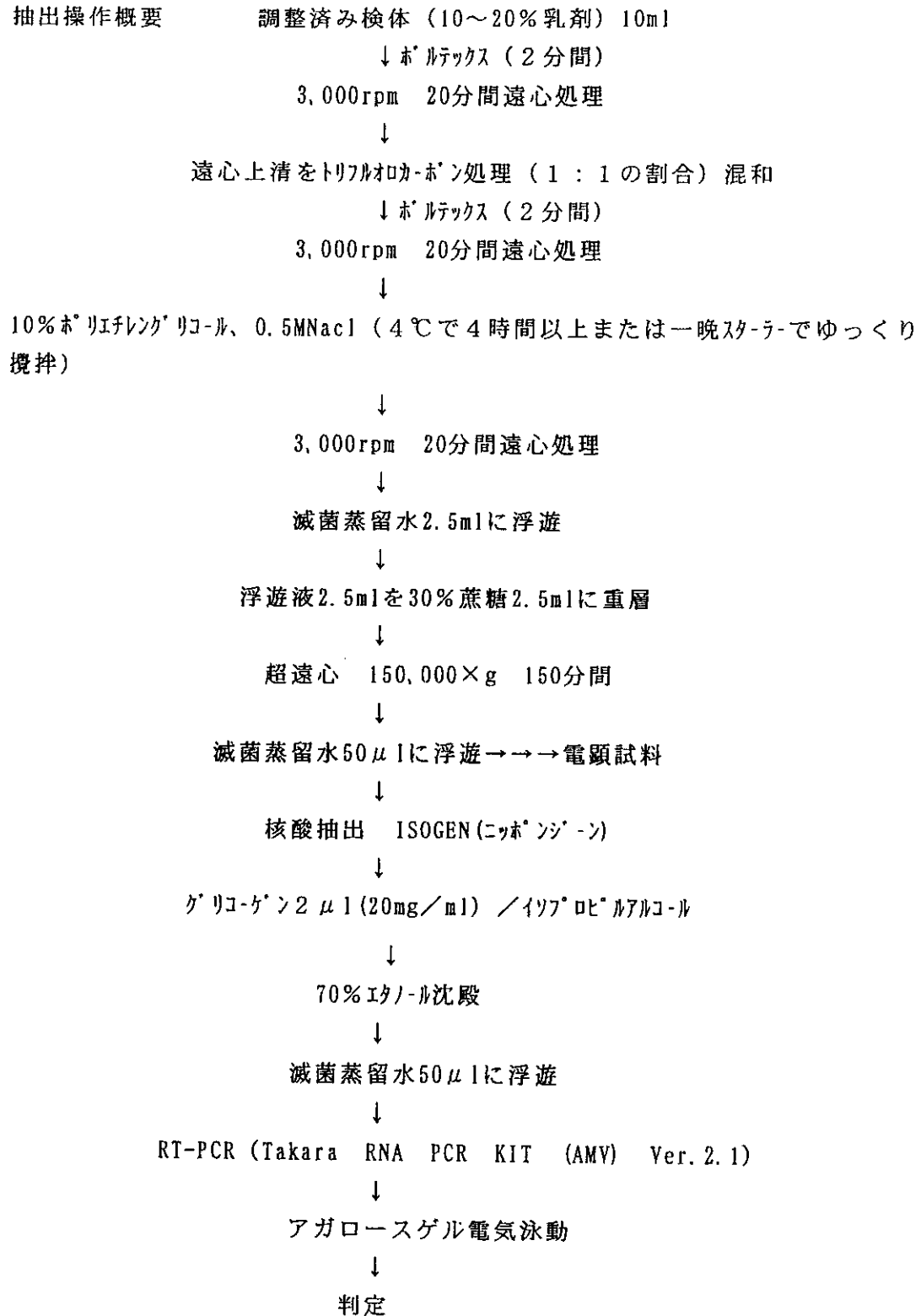
使用機器

- * 遺伝子増幅装置……パーキンエルマー GenAmp PCRSystem 2400
- * シーケンサー ……パーキンエルマー 310, 377

A-1 材料調整フローチャート

三上稔之（青森県環境保健センター微生物部）

抽出操作概要



食品および疫学的に（サウザンブロット法、遺伝子クローニング）実施。

プロトコール

○糞便検体は1～5 gを蔵菌蒸留水にて10～20%乳剤に調整、食品の生ガキは5個の中腸腺をストマッカー用蔵菌ビニール袋に入れ(－)PBSを10ml加えストマッカーで、3分間ホモジナイズし、調整剤検体とした。

○水系試料は15～20Lを濃縮(ウォーターコンセル、水中ウイルス濃縮用キット(株)日研生物医学研究所)し、電顕、RT-PCR、分離培養のウイルス検索試料とする。調整後の検体は-80℃に保存する。

RT-PCRKIT (AMV) (TAKARA) を使用。

○増幅機種 TAKARA

PCR Thermal Cycler 480使用。

○Taq DNA Polymerase

はWakoのGene Taq (5 units / ul) を使用。

○RT-PCRは、Takara RT-PCRKIT (AMV)

の説明どおりに実施。

○RNA抽出 ISOGEN (ニッポンジーン) を使用。

○厚生省の指針及び、公衆衛生院研修における実施法に準じて実施している。

1, RT-PCR 1st, 2nd PCRの試薬調整とcDNA合成及び増幅条件

RT-PCR (cDNA)

Mgcl ₂	4.0 μl
10Xbuffer	2.0 μl
RNase Free dH ₂ O	7.5 μl
dNTO Mixture	2.0 μl
RNase Inhibitor	0.5 μl
Revers Transcriptase (AMV)	1.0 μl
Random primer (9mers)	1.0 μl

(反応条件)	
30℃	10mn
42℃	45min
99℃	5min
4℃	5min

1 tube 18 μl

Sample RNA 2 μlを加え計20 μlで実施

2, 1st PCR primer NV36/35 (470bp) (35cycle)

H ₂ O	35.75 μl
10Xbuffe	5.0 μl
dNTPs Mix (2.5mM)	4.0 μl
primerNV36 (20M)	1.0 μl
primerNV35 (20M)	1.0 μl
TaqDNA polymarese	0.25 μl

1stPCR増幅条件	
94℃	3min
94℃	1min
43℃	1min20s c
72℃	1min
72℃	10min

Sample cDNA 3 μlを加え50 μlで実施

3, 2nd PCR primer NV82/8135 (330bp) (35cycle)

H ₂ O	35.75 μl
10Xbuffe	5.0 μl
dNTPs Mix (2.5mM)	4.0 μl
primerNV ⁸¹ 36 (20M)	1.0 μl
primerNV ⁸² 35 (20M)	1.0 μl
TaqDNA polymarese	0.25 μl

2ndPCR増幅条件	
94℃	3min
94℃	1min
43℃	1min20sec
72℃	1min
72℃	10min

1st product 3 μlを加え50 μlで実施

SRSVのRT-PCR (秋田衛研仕様 Ver.3)

1. DNase I処理

(Master mixture D)	(1検体当たり, μ l)
5 × RT buffer	4
1unit/ μ l DNase I	1
25units/ μ l RNase inhibitor	0.4
	<hr/>
	5.4
Sample + DW	<hr/>
	8.5

37°C 10分 (厳守!)

65°C 5分 (厳守!)

2. 逆転写反応

(Master mixture R)	(1検体当たり, μ l)
10 μ M Random nonamers	5
20mM dNTPs	1
200units/ μ l Reverse transcriptase	0.1
	<hr/>
	6.1

DNase I処理検体にMaster mixture Rを 6.1 μ l 加える。

30°C 10分 (省略不可!)

37°C 30分

3. First PCR

(Master mixture S)	(1検体当たり, μ l)
DW	14.7
10 × Taq buffer	2
25mM MgCl ₂	2
10 μ M Multiplex primer set	1
20mM dNTPs	0.25
Taq DNA polymerase	0.05
	<hr/>
	20

逆転写検体を 5 μ l 加える。

(PCR反応条件)

94°C 5' × 1

94°C 1'

45°C 2'

60°C 4'

× 5

94°C 1'

50°C 1' 20"

72°C 1'

× 30

(増幅 682, 470bp)

4. Nested PCR (Yuri)

(Master mixture Y)	(1検体当たり, μ l)
DW	14.1
10 \times Taq buffer	2
25mM MgCl ₂	1.6
10 μ M Yuri22F (primer)	1
10 μ M Yuri22R (primer)	1
20mM dNTPs	0.25
Taq DNA polymerase	0.05
	<hr/> 20

First PCR反応液を 5 μ l 加える。

(PCR反応条件)

94°C 5' \times 1

94°C 1'

45°C 2'

60°C 4'

 \times 5

94°C 1'

55°C 1' 20"

72°C 1'

 \times 30

(増幅 373bp)

5. Nested PCR (81/82)

(Master mixture E)	(1検体当たり, μ l)
DW	14.1
10 \times Taq buffer	2
25mM MgCl ₂	1.6
10 μ M 81 (primer)	1
10 μ M 82 (primer)	1
20mM dNTPs	0.25
Taq DNA polymerase	0.05
	<hr/> 20

First PCR反応液を 5 μ l 加える。

(PCR反応条件)

94°C 5' \times 1

94°C 1'

40°C 2'

60°C 4'

 \times 5

94°C 1'

45°C 1' 20"

72°C 1'

 \times 30

(増幅 330bp)

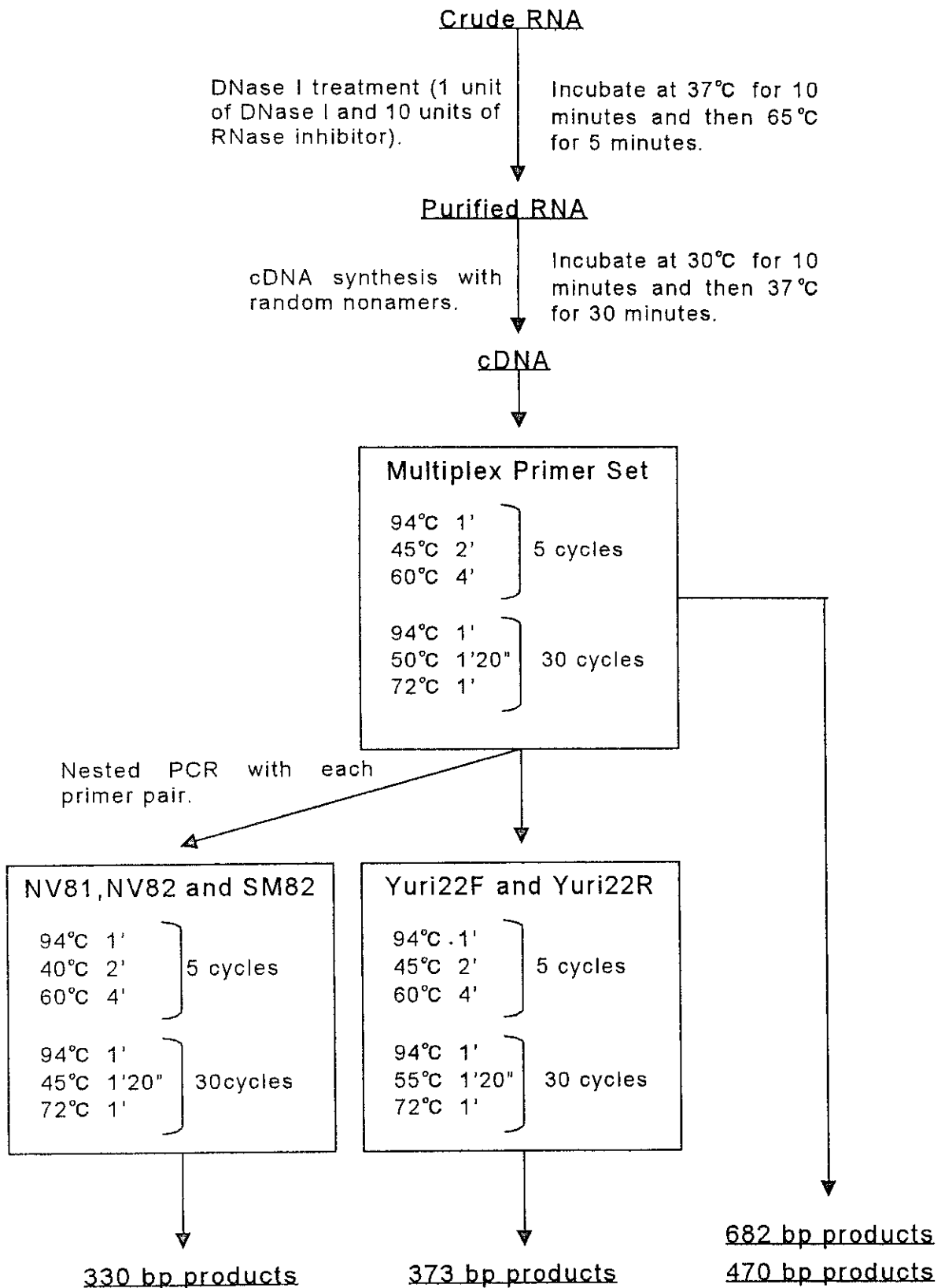


表1-1 抽出法別コスト比較(Normal Tipを使用した場合)

抽出法	キット価格(円)		処理数	1検体当たりの必要チューブ数		必要チューブ数		1検体当たりの	
	試薬コスト(円)	容器コスト(円)		(大)	(小)	容器コスト(円)	合計コスト(円)		
CTAB	33.1			3	5	11		55.4	89
SepaGene RV-R	60000	100		2	7	3		36.8	640
ISOGEN-LS	32000	133		2	6	3		34.0	278
Glassmilk		12.6		2	4	5		33.2	46
Catrimox-14	16000	500		1	4	2		21.0	53
Dr.GenTLE	20000	200		2	9	3		42.4	146
Hot Phenol		22.4		3	6	7		48.6	71
Boiling		0.0		1	1	1		10.2	11

表1-2 抽出法別コスト比較(Filter Tipを使用した場合)

抽出法	キット価格(円)		処理数	1検体当たりの必要チューブ数		必要チューブ数		1検体当たりの	
	試薬コスト(円)	容器コスト(円)		(大)	(小)	容器コスト(円)	合計コスト(円)		
CTAB	33.1			3	5	11		218.3	252
SepaGene RV-R	60000	100		2	7	3		166.9	770
ISOGEN-LS	32000	133		2	6	3		148.9	393
Glassmilk		12.6		2	4	5		133.5	147
Catrimox-14	16000	500		1	4	2		97.6	130
Dr. GenTLE	20000	200		2	9	3		202.9	306
Hot Phenol		22.4		3	6	7		195.1	218
Boiling		0.0		1	1	1		33.3	34

* SepaGen RV-R、ISOGEN-LS、及びDr. GenTLEの1検体当たりの試薬コストには、2-プロパノールとエタノールのコスト3円が加算されている。
 ** CTAB、Glassmilk、及びHot Phenol法のコストは表2の価格表から計算した。
 *** 合計コストは1円未満を切り上げ表示した。

図2-3 コスト計算に用いた容器類の価格(1998年12月現在)

品名	メーカー
エッペンチューブ(相当品)	フナコシ
フィルターチップ 1000	フナコシ
フィルターチップ 200	サワディー
フィルターチップ 20	サワディー
ノーマルチップ 1000	フナコシ
ノーマルチップ 200/20	フナコシ

200

20000

包装(本)	価格(円)	単価(円)
1000	5000	5.0
800	14400	18.0
960	9900	10.3
960	9900	10.3
1000	2800	2.8
1000	2400	2.4

図2-1 コスト計算に用いた試薬類の価格(1998年12月現在)

品名	メーカー
チオシアン酸グアニジン	和光純薬
ラウロイルサルコシン酸Na	和光純薬
クエン酸Na	和光純薬
酢酸Na	和光純薬
トリス	和光純薬
SDS	和光純薬
EDTA	和光純薬
NaCl	和光純薬
2-メルカプトエタノール	和光純薬
2-プロパノール	和光純薬
エタノール	和光純薬
フェノール	和光純薬
クロロホルム	和光純薬
CTAB	Sigma
Proteinase K	ニッポンジーン
Glass Powder	ニッポンジーン
グリコーゲン	ベーリンガー

図2-2 コスト計算に用いたキット類の価格(1998年12月現在)

品名	メーカー
SepaGene RV-R	三光純薬
ISOGEN-LS	ニッポンジーン
Catrimox-14	ニッポンジーン

形状	内容量	価格(円)
粉末	500g	18000
30%溶液	500ml	11400
粉末	500g	1750
粉末	500g	1100
粉末	500g	5600
粉末	500g	3500
粉末	500g	3300
粉末	500g	700
液体	500ml	3600
液体	500ml	1600
液体	500ml	2000
結晶	500g	1360
液体	3l	5600
粉末	500g	10000
20mg/ml溶液	5ml	14700
粉末	200mg	3100
20mg/ml溶液	1ml	15700

)

処理検体数	価格(円)
100	60000
133	32000
500	16000

糞便・食品（かき）からのRNA抽出法

- 1) 10～20%浮遊液の作成
 - 1-1 糞便は1.5mlマイクロチューブにつまようじの先で約0.05g取り，DW500 μ lを加え浮遊する。
 - 1-2 かきは中腸腺を解剖鋏を用いて取り出し，8gに40mlの滅菌PBSを加え，ストマッカーで1min混和する。
*ストマッカー(Lab-Blender400)
- 2) 10,000rpm, 15min, 4℃で遠心し，上清250 μ lにフロロカーボン250 μ lを加え，ミキサーで10min攪拌し，10,000rpm, 5min, 4℃で遠心する。
*Micro Tube Mixer(TOMY MT360) *遠心機；KUBOTA 1920
- 3) 上清200 μ lに6Mグアニジンチオシアネートを200 μ l加え，ミキサーで1min攪拌する。
- 4) 次に，良く混和したグラスパウダーを6 μ l加え，ミキサーで10min攪拌した後，10,000rpm, 15min, 4℃で遠心する。
*グラスパウダー；DNA PREP(ダ'イトロン)
- 5) 上清を捨て，RNAid洗浄緩衝液を500 μ l加え，ミキサーで2～3min攪拌した後，1,000rpm, 1min軽く遠心する。この操作を2回行う。
*RNAid洗浄緩衝液；DNA PREP(ダ'イトロン)
- 6) 上清を捨て，99.5%エタノール600 μ l加え，ミキサーで攪拌した後10,000rpm, 6min, 4℃で遠心する。
- 7) 上清を捨て，チューブを逆向きにして10,000rpm, 1min, 4℃再度遠心し，完全に上清を取り除く。
- 8) 次に，減圧乾固した後，DW30 μ l加えて軽く混和して溶解する。その後，65℃で加温し，12,000rpm, 6min遠心する。その上清をRNA抽出液とする。
-80℃に保存可能であり，使用時再度65℃で加温する。
- 9) PCRは食品衛生施行規則に準拠して行う。

参考文献

- 1) 植木 洋他：「原因不明食中毒の病因微生物の検索」宮城県保健環境センター
一年報 13, 1995
- 2) 秋山和夫他：「集団胃腸炎におけるSRSVの検索」第50回日本細菌学会
東北支部総会 1996

グアニジン・グラスパウダー法

10~20%糞便（食品）浮遊液
↓ 10,000rpm, 15min
上清 250 μ l
700カボン 250 μ l
↓ 10,000rpm, 5min
上清 200 μ l
6Mグアニジンチオシアネート 200 μ l
↓
グラスパウダー 6 μ l
↓ 10,000rpm, 1min
上清を捨てる
↓
RNaid洗浄バッファー 500 μ l
↓
ミキサー 2~3min
↓ 1,000rpm, 1min
上清捨てる
↓
99.5%エタノール 600 μ l
↓ 10,000rpm, 6min
上清を捨て、逆向きにして再遠心
↓ 10,000rpm, 1min
上清を捨てる
↓
減圧乾固
↓
DW 30 μ l
↓
65℃ 10min
↓ 12,000rpm, 6min
上清；RNA抽出液
↓
PCR（食品衛生法施行規則による）

A 1 ウイルス性食中毒 S R S V 検査法のフローチャート

分担研究者 篠川 旦

新潟県保健環境科学研究所ウイルス

科長

PBS (-) で検体の乳剤を作成

↓

2 分間攪拌、2,000xg、15 分間冷却遠心、上清を採取、500 μ l を検体とする

↓

等量のフルオロカーボンで 2 分間攪拌

↓

2,000xg、15 分間冷却遠心、上清 400 μ l を採取

↓

24% PEG (#6000)、4M NaCl 200 μ l を加え、8 時間放置

↓

18,000xg、40 分間冷却遠心。沈渣を 50 μ l 蒸留水に再浮遊

↓

20mg/ml PK 4 μ l、

PK buffer (0.2M Tris, 25mMEDTA, 0.3M NaCl, 2%SDS, pH7.5) 50 μ l

を加え 37 $^{\circ}$ C 30 分間処理

↓

6% CTAB 40 μ l、4M NaCl 25 μ l を加え、56 $^{\circ}$ C 30 分間処理

↓

フェノール・クロロホルム 100 μ l を加え、2 分間よく攪拌

↓

18,000xg、20 分間冷却遠心、上清 120 μ l 採取

↓

クロロホルム 100 μ l を加え、2 分間よく攪拌

↓

18,000xg、20 分間冷却遠心、上清 100 μ l 採取

↓

エタチンメイト (Wako) + エタノール 250 μ l でよく攪拌

↓

直ちに 18,000xg、20 分間冷却遠心。沈渣を乾燥

↓

Rnase free water 20 μ l に再浮遊。 RNA 原液とする。