

アストロウイルスの分離・同定検査

1. 器具および試薬

組織培養用ボトル, 組織培養用マイクロプレート, 0.45 μ m メンブランフィルター, セルスクレーパー, アスピレーター, 小試験管

Eagle's MEM 培地, 牛胎児血清(FCS), トリプシン(アセチル化トリプシンまたはトリプシン type-III, SIGMA), 1M HEPES 緩衝液, 抗アストロウイルス標準株免疫血清, Hanks'緩衝生理食塩水(Hanks BSS)

2. アストロウイルス分離培養

糞便からのアストロウイルスの分離には, 最初 HEK (ヒト胎児腎細胞) が用いられていたが, 最近では分離率が高いことからほとんど CaCo-2細胞 (ヒト結腸癌細胞由来) が用いられている。ここでは我々が用いている CaCo-2細胞でのアストロウイルス分離法を紹介する。

1) CaCo-2細胞の継代培養

- ① 培養液を完全に除く。
- ② 0.25%トリプシン, 0.02%EDTA 加 PBS(-)を培養液の半量加え, 37°Cで10分間消化する。
- ③ 消化が不十分の場合は, セルスクレーパーで細胞を培養ボトルから剥ぎ落としてから, ピペッティングで細胞を細かく分散させる。
- ④ 低速遠心で集めた細胞沈渣を2~3倍量の10%FCS加 Eagle's MEM 培地に再浮遊, 新しいボトルに分注し37°Cで培養する。
- ⑤ CaCo-2細胞は5~7日でフルシートを形成する。

ウイルス分離には培養7日目から14日目位の細胞を使用するとよい。

2) アストロウイルスの分離培養

- ① PBSで10~20%糞便乳剤を作る。3,000rpm, 10分間の遠心上清を接種材料とする。
- ② 接種材料1容を5 μ g/mlトリプシン添加20mMHEPES 緩衝 Eagle's MEM 培地4容に加え, 0.45 μ mのメンブランフィルターで濾過し, 37°C10分間置く。
- ③ 200 μ lのHanks BSSで1回洗ったCaCo-2細胞に, トリプシン処理接種材料をCaCo-2細胞ボトル(12.5cm²又は25cm²プラスチックボトル)に0.3~0.5ml接種す

る。37℃で1～2時間、吸着させる。その間に2～3回ボトルを軽くゆすり、細胞に接種液を万遍なく行き渡らせる。

- ④ 接種材料を取り除き、さらに2回 Hanks BSS で細胞を洗う。
- ⑤ 維持培地として5μg/ml トリプシン添加 HEPES 緩衝 Eagle's MEM 培地を3～5ml 加えて、37℃で4～5日間培養する。
- ⑥ アストロウイルスの分離初代の細胞変性は、トリプシンによる細胞の円形化や剥離と紛らわしいので、4、5日間隔で2回継代する。ウイルス分離陽性の場合、継代3代目には接種後2、3日目に、トリプシンによる形態変化より著しく早い細胞変性が観察されるようになる。

CaCo-2細胞はアストロウイルスだけでなく、エンテロウイルス、アデノウイルス、インフルエンザウイルス等多くのウイルスに感受性を示すので、ウイルス分離の確認のため、中和試験、ELISA、ラテックス凝集反応、PCR 等でアストロウイルスの同定あるいはアストロウイルス血清型の同定をする必要がある。

また、ウイルスを継代する時には、接種前のトリプシン処理及び吸着後の細胞の洗浄は必要ないと思われる。効率のよいウイルスの増殖には、維持培地中にトリプシンがあることが必須であるので、トリプシン活性を阻害する FCS 等、蛋白成分が維持培地に多く含まれないようにする注意が必要である。

維持培地の pH 調整に NaHCO₃-CO₂緩衝系ではなく、最終濃度20mM の HEPES 緩衝液を用いているが、これはアストロウイルスがアルカリで不安定であるといわれているためである。

2. 中和試験によるアストロウイルスの同定

アストロウイルスには1型から8型までの血清型が存在することが知られている。各血清型標準株に対する高度免疫血清を用いた中和試験は、高い血清型特異性を示す。そのためエンテロウイルスやアデノウイルスの同定検査と同様に、中和試験によりアストロウイルス血清型の同定を行うことができる。難点は維持培地中のトリプシンの影響を受け、ウイルスによる CaCo-2細胞の変性が明瞭に観察され難いことである。別項に記した ELISA によるアストロウイルス抗原検出法を併用することにより、中和試験の判定が明らかになる。

ウイルス同定に用いる1型から7型までの抗標準株血清は、必要な機関には愛媛県立衛生環境研究所から分与することができる。

- 1) 被検ウイルス株1株につき、キャップ付き小試験管を8本準備する。1型から7

- 型の抗標準株血清（100単位）を50 μ l ずつ入れる。ウイルス対照用に HEPES 緩衝 Eagle's MEM 培地を50 μ l 入れておく。
- 2) 被検ウイルス液を100TCID₅₀/25 μ l になるように HEPES 緩衝 Eagle's MEM 培地で希釈する。通常ウイルス培養液を1：10～1：100希釈する。希釈したウイルス液を小試験管に50 μ l ずつ加える。
 - 3) 抗血清とウイルス液の混合液をよくミックスし、37℃で2時間中和する。
 - 4) CaCo-2細胞を培養した96ウェルマイクロプレートの細胞増殖培地を除き、中和した小試験管中のウイルス液を2ウェルに50 μ l ずつ接種する。
 - 5) 37℃で2時間吸着後、200 μ l の Hanks BSS 等で2回ウェルを洗う。
 - 6) 5 μ g/ml トリプシン添加 HEPES 緩衝 Eagle's MEM 培地を150 μ l/ウェル加え、37℃で3～5日間培養し、毎日細胞変性を観察する。
 - 7) ウイルス対照が明らかな細胞変性を示し、いずれか一つの抗血清がウイルスの増殖を抑制していれば、その血清型が被検ウイルスの血清型と判定される。

細胞の状態により、ウイルスによる細胞変性を確認しがたい時があるが、そういう場合はマイクロプレートの培養上清を25 μ l とり、アストロウイルス抗原検出 ELISA を行うことにより中和の成否を判定することができる。

酵素抗体法によるアストロウイルス抗原の検出

アストロウイルスは1型から8型までの血清型に分けられているが、アストロウイルス共通の抗原を共有していることが知られている。アストロウイルス特異モノクローナル抗体を用いることにより、ELISAにより全ての血清型のアストロウイルス抗原を検出することができるので、その方法を紹介する。

なお、本検査法と同様のアストロウイルス抗原検出 ELISA キット “IDEIA Astrovirus” (DAKO 社) が市販されている。このキットは8ウェルストリップ×12本のマイクロプレートにアストロウイルス特異モノクローナル抗体をコートした状態で提供されている。方法は基本的には本法と同じであるが、詳細は添付のマニュアルに従って行うとよい。

1. 器具および試薬

ELISA 用マイクロプレートリーダー、マイクロプレートミキサー、マイクロプレート洗浄機、マイクロピペット、ELISA 用マイクロプレート (Nunc Immunoplate Maxisorp 同等品)、プレートシール

Na₂CO₃, NaHCO₃, NaCl, Na₂HPO₄·12H₂O, KH₂PO₄, Tween 20, 牛血清アルブミン (SIGMA, A2153), スキムミルク (DIFCO, 0032-17-3), クエン酸, 酢酸ナトリウム, テトラメチルベンジジン (SIGMA, T2885), ジメチルサルフォキシド, 過酸化水素水, H₂SO₄, ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体, アストロウイルス特異モノクローナル抗体 3A3 (マウス腹水), 抗アストロウイルス 2 型ウサギ IgG (20mg/ml), 正常ウサギ IgG (20mg/ml)

2. 試薬の調整

1) 0.05M 炭酸重炭酸緩衝液 pH9.6 (0.05M CBB)

Na ₂ CO ₃	1.59g
NaHCO ₃	2.93g

蒸留水で1 lにする。

2) 0.01M PBS-Tween 20 (PBS-T)

(5倍濃度)	NaCl	200g
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	72.5g

KH ₂ PO ₄	5.0g
Tween 20	12.5ml

蒸留水で1 lにメスアップする。

3) 希釈液/ブロッキング液 (3%BSA, 2.5%SM, PBS-T)

牛血清アルブミン	3g
スキムミルク	2.5g
PBS-T	100ml

マグネチックスターラーで攪拌溶解, 4℃保存, 3日以内に使用する。

4) 1M クエン酸水溶液

クエン酸1水塩	21g
---------	-----

蒸留水で100mlにメスアップする。4℃保存。

5) 0.1M クエン酸酢酸緩衝液, pH5.5

1 M クエン酸水溶液	4.0ml
酢酸ナトリウム (無水)	8.2g

蒸留水で1 lにメスアップする。高圧滅菌, 4℃保存。

6) 5 mg/ml TMB 溶液

TMB(3, 3', 5, 5'tetramethyl benzidine, SIGMA, T2885)	0.5g
DMSO(dimethyl sulfoxide)	100ml

1mlずつ分注, -20℃保存, 使用後速やかに凍結すれば, 2, 3回の再使用可能。

変異原性あり, 注意!

7) 発色基質液

0.1M クエン酸酢酸緩衝液, pH5.5	10ml
0.5mg/ml TMB 溶液	100μl
H ₂ O ₂ (30%)	2μl

8) 停止液(2M H₂SO₄)

蒸留水	80ml
H ₂ SO ₄	10ml

3. 糞便抽出液の調整

- 1) 4容のPBSに1容の糞便を加え, よくボルテックスする。
- 2) 10,000rpm, 10分遠心し, その上清を糞便抽出液とする。1検体あたり約100μl必要。

- 3) 非特異反応をできるだけ少なくするため、希釈液を糞便抽出液に等量加える。

4. 検査方法

- 1) 0.05M CBB でアストロウイルス特異モノクローナル抗体 3 A3 を希釈(1 : 5,000)し、マイクロプレートの全ウェルに100 μ l ずつ分注し、プレートシールでシールする。4℃で一夜置く。

↓ PBS-T でウェルを 2 回洗浄

- 2) 全ウェルにブロッキング液を200 μ l ずつ分注、プレートシールをして37℃で2時間置く。

↓ PBS-T でウェルを 2 回洗浄

- 3) 50 μ l の糞便抽出液を、1検体につき2ウェルずつ分注する。同時に希釈液対照、抗原対照(アストロウイルス感染細胞培養上清を1:10希釈したもの)を各2ウェル分注する。プレートシールをして37℃で1時間または室温で穏やかな振とう1時間。

↓ PBS-T でウェルを 2 回洗浄

- 4) 検出抗体(抗アストロウイルス2型ウサギIgG, 20mg/ml)と検出抗体の対照(正常ウサギIgG, 20mg/ml)を希釈液で1:3,000希釈しする。各検体および対照の1ウェルに検出抗体、他の1ウェルに検出抗体の対照を50 μ l ずつ分注する。プレートシールをして37℃で30分または室温で穏やかな振とう30分。

↓ PBS-T でウェルを 2 回洗浄

- 5) ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG ヤギ抗体を希釈液で希釈(1:3,000)し、全ウェルに50 μ l ずつ分注。プレートシールをして37℃で30分間または室温で穏やかな振とう30分間。

↓ PBS-T でウェルを 5 回洗浄

- 6) 使用直前に調整した発色基質液を全ウェルに100 μ l ずつ分注。室温で10-20分間置く。

↓

- 7) 青色に発色するので適当な濃度になれば、停止液を50 μ l ずつ加える。黄色を呈するので波長450nm で吸光度を測定する。

5. 結果の判定

- 1) 吸光度の測定：蒸留水をブランクとして、測定波長450nm で測定する。

2) 希釈液対照及び抗原対照に検出抗体対照を加えたウェルの吸光度が0.1未満, 抗原対照の吸光度が1.0以上であることを確認する。

3) 陽性判定のクライテリア:

$$P/N \geq 2 \quad \text{かつ} \quad P-N \geq 0.1$$

P=検出抗体(抗アストロウイルス2型ウサギIgG)を加えたウェルの吸光度

N=検出抗体対照(正常ウサギIgG)ウェルの吸光度

5. 注意

1) 本方法による糞便材料からのアストロウイルス検出感度は, 電子顕微鏡法の約70%程度であった。

2) アストロウイルス4型の検出感度は低く, 電子顕微鏡法の約50%であった。

3) アストロウイルス感染細胞 Lysate での感度は良好で, CaCo-2細胞を用いたウイルス分離の成否の確認に有用であった。

なお, 本検査法に用いるアストロウイルス特異モノクローナル抗体 3A3 及び抗アストロウイルス2型ウサギ血清の分与が必要な機関は, 愛媛県立衛生環境研究所ウイルス科までご連絡ください。

アストロウイルス RT-PCR 法

下痢症ウイルスの中にしめるアストロウイルスの頻度は5-10%で、ロタウイルスやカリシウイルスと比較すると少ない。しかし多くは不顕性あるいは軽症の下痢で医院を訪れないことがある。一方、アストロウイルスによる食中毒の報告がある。検査としてラテックス法や酵素抗体法によるアストロウイルスの診断は有用であるが、広く用いられるには至っていない。RT-PCR法は最近種々のウイルス診断に用いられており、比較的容易にしかも感度がより高く検出できる。ここでは1-8の血清型のすべてを検出する方法ならびに血清型を決定する方法について述べる。

1. 器具および試薬

サーマルサイクラー、マイクロ冷却遠心機、マイクロピペット、電気泳動装置、UV照射写真撮影装置、マイクロミキサー、マイクロチューブ、電気泳動アガロース、分子量マーカー、グアニジンチオシアネート、トリクロロトリフルオロエタン（ダイフロン）または代用品、ガラスパウダー

2. ウイルス RNA の抽出

RNAの抽出はガラスパウダー法（BIO101社あるいはダイアトロン社）、Isogen法（ニッポンジーン社）など種々のものがある。抽出方法はキットの添付文書を参照して行う。ここでは我々が行っているガラスパウダー法について述べる。

1. マイクロチューブに約10%の便液を作り5分ボルテックスする。
2. その後10分、12,000回転/分で遠心し上清をとり、新しいチューブに300 μ lをいれる。
3. ダイフロンを同量加え激しく10分間上下に振るかボルテックスで3-5分攪拌し、その後、10分12,000回転/分で遠心し上清を新しいチューブに200 μ lとる。
4. さらに200 μ lの6Mグアニジンチオシアネートを加え5分間ボルテックスする。
5. ガラスパウダー液4.8 μ lを加え、転倒混和で20分攪拌する。
6. 2分間1,200回転/分で回転し、上清液を捨てた後に800 μ lの洗浄液（試薬キットの中に入っている）を加えRNAの付着したガラスパウダー（RNA matrix）ペレットを壊し均一にする。さらに2分間1,200回転/分で遠心する。この洗浄操作を3回行う。

7. 最後に洗った沈殿物に100%エタノールを500 μ l加え、よく混ぜた後に5分間12,000回転/分で遠心する。
8. 上清は捨てて、真空乾燥機を用いRNA matrixを55 $^{\circ}$ Cで遠心乾燥させる。
9. その後24 μ l(20–30 μ l)の蒸留水を加え沈殿したRNA matrixを良く攪拌する。
10. 65 $^{\circ}$ C10分加熱した後、5分間12,000回転/分で遠心し上清中のゲノムRNAを–30 $^{\circ}$ Cに保存する。

(各項目の目的を理解していただき、遠心速度がどの位であれば良いか、また攪拌の強さと時間、グラスパウダーの原理などを理解する)

3. RT-PCR

ここではゲノムRNAからアストロウイルスカプシド領域をRT-PCRで増幅し、さらに型共通あるいは型別のプライマーを用いることにより診断と型別を行う。カプシド領域の遺伝子解析については省略する。

- (1) 抽出したRNA3 μ lをPCR用のチューブに入れ、97 $^{\circ}$ C5分間加熱した後に、急冷を5分ぐらいする。
- (2) よくflash downした後、下記の液をその中に加える。液はあらかじめ4 $^{\circ}$ Cに保っておく。加えた後は37 $^{\circ}$ Cに1時間置く。

反応液*	2.5 μ l
33 μ Mプライマー (PreCAP1と12Gr各0.75 μ l)	1.5 μ l
10mMdATP, dCTP, dGTP, dTTP	1.0 μ l
37unit/ μ l AMV 逆転写酵素	0.5 μ l
ribonuclease inhibitor	0.25 μ l
DDW	16.15 μ l

なお、サンプルRNA3.0 μ lと合わせると総計は24.9 μ lとなる。

*反応液はTaqのキットに含まれているのを用いる。

- (3) その後1単位のTaq DNA polymerase 0.1 μ lを加える(総計25 μ l) PCR反応を行う。

94°C	1分	}	35回
45°C	2分		
72°C	3分		
72°C	7分		1回

4. secondary PCR

上記の 1 st PCR product は電気泳動を行い産生物を確認するとともに、(a)型共通のプライマー(b)型別混合プライマーによる 2 nd PCR を行う。

(a)の場合

1st PCR product	3.0 μ l
反応液*	2.5 μ l
33 μ M プライマー 各0.75 μ l**	1.5 μ l
10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	1.0 μ l
1unit Taq DNA polymerase	0.1 μ l
DDW	16.9 μ l
総計	25.0 μ l

(b)の場合

1st PCR product	3.0 μ l
反応液*	2.5 μ l
33 μ M (プライマー 各0.7 μ lを9個)*	6.3 μ l
10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	1.0 μ l
1unit Taq DNA polymerase	0.1 μ l
DDW	12.1 μ l
総計	25.0 μ l

**我々は型共通プライマーとして Mon244 と 82b, 型別混合プライマーとして S1-S8 と END を用いている (配列は下記参照)。

5. アガロースゲル電気泳動

1.2%Seakem agarose を使用し, 0.5g/ml ethidium bromide を含む Tris-borate

buffer (0.089M Tris-0.089M boric acid-0.02M EDTA, pH8) で100V 約40分間電気泳動後, UV 照射写真撮影装置上でバンドのサイズを確認して血清型を決定する。

PCR プライマー塩基配列

プライマー	極性	配列 (5'-3')	部位
PreCAP1	+	GGACTGCAAAGCAGCTTCGTG	-82 -62
12Gr	-	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGC	2454 2473
Mon244	+	GGTGTACAGGACCAAACC	228 247
82b	-	GTGAGCCACCAGCCATCCCT	637 617
AST-S1	+	AACCAAGGAATGACAATGAC	2166 2185
AST-S2	+	ACCTGCGCTGAGAACTG	2247 2264
AST-S3	+	CTGCTTGCATCTGGTCTTTCA	2283 2303
AST-S4	+	TGATGATGAAGACTCTAATAC	2071 2091
AST-S5	+	TAGTAACTTATGATAGCC	2014 2031
AST-S6	+	TGGCCACCCTTGTTCCTCAGA	1951 1971
AST-S7	+	CTAGACAACAACACCCCG	1842 1859
AST-S8	+	GGTAAGTGGTACCTGCTAACTAG	1753 1775
END	-	TCCTACTCGGCGTGGCCGC	2377 2359

部位の開始部位は各血清型のカプシド領域の5'末端である。各血清型でカプシドの塩基数は異なる。PreCAP1, 12Gr, END, Mon244, 82b は共通のプライマーであるが、血清型1の5'末端から部位を決定した。

参考文献：

- 1) Matsui M et al. Determination of serotypes of astroviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and homologies of the types by the sequencing of Japanese isolates. *Microbiol & Immunol* 42 ; 539-547, 1998.
- 2) Sakamoto T et al. Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by RT-PCR with serotype-specific primers (1 to 8). *J Med. Virol* in press, 2000.

アイチウイルスの検査法

アイチウイルスはピコルナウイルス科のコブウイルス属に分類されたウイルスで、エンテロウイルスとは抗原性状や遺伝子構造が若干異なっている。感染性胃腸炎患者の糞便からウイルスが分離されたり検出されたりする。

I. 培養法

アイチウイルスは Vero, BS-C-1, BGM 細胞などサルの腎臓由来細胞で CPE を伴って増殖する。CPE はポリオウイルスなどのように細胞を完全に破壊してしまう感じではなく、変形した細胞が徐々に壁面から脱落してゆくような感じである。初代では増殖も遅いようで細胞がきたなくなると見づらいため見逃す場合が多く、継代により CPE がはっきりしてくる。検体の処理や接種方法はエンテロウイルスのそれと全く一緒である。CPE が現れた場合、以下に述べる ELISA を用いてウイルスの同定を行う。

II. ELISA によるアイチウイルス抗原の検出

1. 抗アイチウイルスプレートの作製

- 1) 1次コーティング：抗アイチウイルスモノクローナル抗体 (Ai/2) と抗ツツガ虫病リケッチアモノクローナル抗体 (Kp/1 C10; 陰性コントロール) を PBS で 1 : 10,000 に希釈し 96 穴アッセイプレートの各ウェルに 100 μ l ずつ添加後、湿潤箱に入れ 4 $^{\circ}$ C で 1 夜置く。
- 2) 2次コーティング：プレートのモノクローナル抗体をすて、0.05% Tween 20 加 PBS (PBS-T) で 2 回洗浄後 0.5% BSA 加 PBS-T (0.02% アジ化ナトリウム加) を各ウェルに 200 μ l ずつ添加し 4 $^{\circ}$ C で 1 夜以上置く (この状態で保存可)。

2. 試料の添加

2 次コーティング液を捨て、アッセイ用試料を各ウェルに 100 μ l ずつ試料を添加し 4 $^{\circ}$ C で 1 夜置く。

3. 2 次抗体の添加

アッセイ用試料を捨て、PBS-T にて 3 回洗浄後、抗アイチウイルスモルモット血清を 0.2% BSA 加 PBS-T にて 1 : 20,000 に希釈したものを各ウェルに 100 μ l ずつ添加し、

37℃, 2時間置く。

4. 反応の確認

2次抗体を捨て、PBS-Tにて3回洗浄後、0.2%BSA加PBS-Tにて適宜希釈したペルオキシダーゼ標識抗モルモット血清を反応させる。PBS-Tにて3回洗浄後、O-フェニレンジアミン液を加え、室温に30分置いた後4 N H₂SO₄を加え発色を停止させ、492nmで吸光度を測定する。

5. 判定

両対数表の縦軸に陽性ウェルのOD値、横軸に陰性ウェルのOD値をとる。(陽性；陰性) = (0.05；0.004) および (0.2；0.09) の点を通る直線を引く。陽性ウェルのOD値が0.1以上で、作成した表に各試料の陽性ウェルと陰性ウェルOD値に基づきプロットした位置が直線より上にきた場合陽性と判断する。

細胞培養でCPEが現れた場合、その上清をELISAで調べると1.0前後のOD値を示す。CPEが観られなくてもELISAで陽性の場合、新しい細胞に摂取すれば1週間くらいではっきりしたCPEが観察される。本ELISAの検出感度は約5ng/mlである。糞便から直接ウイルスを検出する場合は分離法よりELISAの方が感度が良い。

III. RT-PCR法によるアイチウイルス遺伝子の検出

精製した標準株を用いた試験では、RT-PCR法は10⁻¹TCID₅₀/mlでも検出でき、ELISAによる抗原検出に比較して1万倍の感度(約500fg/ml)を示した。アイチウイルス抗血清が手元にない場合でもウイルスの検出や同定が可能である。以下にその手順を述べる。

1. 主な試薬

TRizol LS Reagent (Gibco BRL: 10296-028)

グリコーゲン (Boehringer Mannheim: 901393)

Oligo (dT)15 Primer (Promega: C110A)

Random Primer pd(N) 9 (Takara: 3802)

Ribonuclease Inhibitor (Takara: 2310A)

M-MLV RT (Gibco BRL: 28025-021)

Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim: 1596594)

2. TRIzol LS Reagent による抽出

1ml エッペンドルフチューブに TRIzol LS Reagent 0.75ml とサンプル液0.25ml を加え 5 分間混合する。クロロホルム0.2ml を加え 2 分間混合する。12,000rpm, 10min. 遠心分離し, 上精(水層)を1.5ml チューブに採取する。2 μ l のグリコーゲン(20mg/ml) と 0.5ml のイソプロピルアルコールを加え室温に10分置く。14,000rpm で10分遠心して上清を除き, 70%エタノールで1回洗浄後ペレットを乾燥させる。

3. cDNA の作成

15	ml	DW
4	ml	X5 RT buffer
0.5	ml	Oligo (dT)15 primer (5 μ g/ml)
0.5	ml	Random primer (10 μ M)

上記の混合液を, 先のチューブに加え100 $^{\circ}$ C で1分加熱後 0 $^{\circ}$ C に急冷する。

下記の混合液 (RTmix) を添加し37 $^{\circ}$ C で1時間保つ。

RTmix

3.75	ml	DW
2	ml	X5 RT buffer
2	ml	10mM dNTPs
1	ml	0.1M DTT
1	ml	M-MLV RT
0.25	ml	RNase Inhibitor

4. PCR 反応

45 μ l の PCRmix に上記 RT 反応液 5 μ l を加え PCR 反応を行う。アガロースゲル電気泳動にてバンドを確認する。

PCRmix

33.25 μ l	DW
5	10x PCR buffer
5	2.5mM dNTP
0.5	(+, -) Primers
0.25	Taq. DNA Polymerase

PCR の温度条件 (Cutus Thermal Cyclor 9600)

95°C 2m → 94°C 30sec

55°C 30sec

72°C 60sec 40Cycles → 72°C 7m → 4°C

Primer の sequence

Primer C (+) 5'-ACACTCCCACCTCCCGCCAGTA

Primer C (-) 5'-GGAAGAGCTGGGTGTCAAGA

Primer C94b(+) 5'-GACTTCCCCGGAGTCGTCGTCT

Primer 264k(-) 5'-GACATCCGGTTGACGTTGAC

Primer C セットはアイチウイルス遺伝子 (AB010145) の6,261から6,779番目の遺伝子を増幅し, Primer C94b-264k セットは6,398から6,663番目を増幅する。感度はほぼ同じで今まで分離された株すべてが反応した。組み合わせにより 2nd PCR も可能である。

5. 確認

今までに分離されたウイルス (16株) から得られた遺伝子の塩基配列は標準株と比較して90~100%の相同性をしめした。PCR 産物の塩基配列の決定ができない場合, サザントランスファー法による確認が可能である。すなわち, アガロースゲル電気泳動にて陽性のサンプルをナイロンフィルター (Nytran, S&S 社) に転写する。プローブ (AiPrb2, 5'-Biotin-ACCTTCGAAGGTCTGTGCGG) をハイブリダイゼーション液 (0.75M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH8.0), 205mM EDTA, 1% SDS, Denhardt's solution (0.2% bovine serum albumin, Ficoll, and polyvinylpyrrolidone), 50µg/ml salmon sperm DNA) で0.1µM 濃度に希釈し60°Cで一晩反応させる。SSC で洗浄後, 0.2%BSA 加 PBS-T 液に浸しブロッッキングを行い, ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ反応で特異バンドの発色を確認する。

IV. アイチウイルス中和抗体価の測定方法

アイチウイルスの抗体測定にはエンテロウイルスと同様な中和法が用いられる。8倍以上の抗体価を陽性とする。以下にその手順を示す。

1. 血清の処理

血清を MEM 培地で4倍に希釈し56°C, 30分非働化する。

2. 血清の希釈

96穴トランスファープレートに MEM 培地を25 μ l ずつ入れ、プレートの H 列に上記の4倍血清を25 μ l 加え混和する。8倍希釈となった血清25 μ l をとり隣の G 列に加え混和する。

以下同様に A 列まで2倍階段希釈列をつくる。(A 列は1024倍)

3. ウイルスの添加

100TCID₅₀/25 μ l に調整したアイチウイルス(A846/88株)を25 μ l ずつ加え混和する。ウイルス力価確認のため中和に用いたウイルス液を0, 10, 100, 1,000倍に希釈し各希釈の25 μ l を4穴ずつに入れ、MEM25 μ l と混和する。37℃, 2時間反応後、4℃で一晩静置する。

4. 反応液を細胞に接種

96穴マイクロプレートに準備した Vero 細胞の培地を1%FCS加 MEM 培地150 μ l に換える。トランスファープレート中の反応液を上記マイクロプレートに移す。

5. 判定

1週間をめぐりに各穴の CPE を観察するが100倍のウイルス希釈列に CPE が観られた時点で、血清抗体価を判定する。

カリシウイルスの RT-PCR 法とハイブリダイゼーション

従来小型球形ウイルス (SRSV) と呼称されていたものは、カリシウイルス科に属し、Norwalk like virus (NLV) と Sapporo like virus (SLV) に分けられ、NLV には genogroup 1 (Norwalk 群) と genogroup 2 (Snow Mountain 群) が含まれる。SLV は古典的なカリシウイルスである。食品による食中毒下痢症の原因ウイルスは NLV によることが多い。ここでは PCR 法による NLV の検出について述べる。

I. 検査の進め方

食品関連下痢症患者のカリシウイルス (SRSV) の検査は電子顕微鏡での検索が行える機関では糞便材料が必要量得られた時に電子顕微鏡で行い、ウイルス粒子が確認された場合にはウイルス陽性とする。

電子顕微鏡の検査が行うことができない、あるいは電子顕微鏡で陰性の時には PCR 法でウイルス検出を行う。原則的に糞便材料の PCR は 1st PCR で診断し、Nested PCR は行わない。

食品に含まれるウイルス量は少ないと思われるので PCR 法で行い Nested PCR まで行う。

PCR で目的とするバンドが見られた時には確認試験としてハイブリダイゼーションあるいは遺伝子配列を決定し診断する。

II. 牡蠣の前処理

1. 器具および試薬

超遠心器、冷却遠心器 (10,000rpm)、ヘラ、ホモジナイザーまたはストマッカー、ハサミ、メス、超遠心用遠心管、遠心管

PBS, ショ糖溶液, Polyethylene Glycol 6,000, NaCl

2. 検査方法

ここでは原因食品として重要視されている牡蠣の処理方法について示す。

- 1) 殻付き牡蠣はヘラ等で貝柱を切り殻を除く。
- 2) 牡蠣の外套膜を取り、次いで中腸腺の周りについている脂質部分をはさみ、メス、ハサミ等で可能な限り取り除き、中腸腺を取り出す。
- 3) ホモジナイザーまたはストマッカーに摘出した中腸腺をいれ、次いで5から10倍量の PBS (-) を加え良く粉砕する。

4) 粉碎した試料を遠心管に移す。

↓10,000rpm 20分間冷却遠心し、上清を取る。

5) 超遠心用遠心管に30%ショ糖溶液を遠心管の10%程度を入れ、それに4)の遠心上清を静かに重層させる。

↓35,000rpm 3時間あるいは40,000rpm 2時間冷却遠心する。

6) 上清をアスピレーター、注射器等で吸引し、沈渣のみとする。

7) 遠心管の周りをPBS(-)で軽く洗い、遠心管の周りを滅菌した濾紙で水分を取る。

8) 沈渣に200 μ lのDDWを加え、浮遊させる。これをウイルスRNAの抽出に用いる。(浮遊液に不純物が多いときには10,000rpm 20分間遠心を行い、その上清をRNA抽出に用いる)

超遠心器を使えない時には

4)の遠心上清に Polyehylene Glycol 6,000 を8%, NaClを2.1g/100mlになるように加え、軽く攪拌し、4℃に1晩置く。(時間の無いときには室温で2時間攪拌)

↓5,000から12,000rpm.20分間冷却遠心する。

上清をアスピレーター、注射器等で吸引し、沈渣のみとし、管壁の周りの水分を濾紙で吸い取る。

沈渣を200 μ lのDDWに浮遊させる。これをウイルスRNAの抽出に用いる。(浮遊液に不純物が多いときには10,000rpm 20分間遠心を行い、その上清をRNA抽出に用いる)

III. RT-PCR 法

1. 器具および試薬

サーマルサイクラー、マイクロ冷却遠心器(15,000rpm)、マイクロピペット(2, 20, 200, 1000 μ l)、ヒートブロック、電気泳動装置、UV照射写真撮影装置、UV防御メガネ、0.5ml, 0.2ml, 1.5ml チューブ、1 ml 注射器、SV Total RNA isolation system(Promega.Cat. # Z3100),

Oligo (dt) (12-18) primer (GibcoBRL, Cat. No. 18418-012), M-MLV Reverse Transcriptase (GibcoBRL, Cat. No. 28025-013), 5X Strand buffer (M-MLV Reverse Transcriptaseに添付), RNase Inhibitor, DDW (高圧滅菌後フィルター濾過したもの、あるいは市販されている Nuclease-Free water あるいは DEPEC 水), Takara EX Taq (Takara, RR001B), 10X PCR buffer (Takara EX Taq

に添付), 2.5mM dNTPs (Takara EX Taq に添付), ポリオ 2 型ウイルス (Sabin 株), 99.5%エタノール, 75%ethanol, NaOAC, Glycogen(Boehringer Mannheim 901393), primer は末尾に示した。

Loading buffer (0.025%プロモフェノールブルー, 50%グリセロール, 1 mM EDTA, pH8.0), 電気泳動用 Agarose, Molecular Marker, 50倍 TAE{Tris 108 g, 氷酢酸11.4ml, 0.5M EDTA (pH8.0) を精製水で1,000ml とする, 使用時50倍希釈で使用}, エチジウムブロマイド

2. 検査の進め方

RNA の抽出には多くの方法があり, また各種キットも市販されている。特にこの方法と指定はしないので, それぞれが良いと判断した方法を用いて良い。またプライマーも現在の時点で推奨するものを末尾に示している。他に優れていると考えられるものがあれば新たに加えたり変更しても良い。

3. ウイルス RNA の抽出

ここでは SV Total RNA isolation system について紹介する。このキットは便材料を直接使え, フロン処理が不要であり, DNase の処理も含まれており, 非特異バンドの出現を抑える利点を持っている。基本的には使用説明書に従って行う。ここではわれわれが行っている方法について記す。

a) 使用前に行う試薬の調整

添付の β -Mercaptoethanol (BME) を SV RNA Lysis buffer に加える。

99.5%Ethanol を SV RNA Wash Solution と SV DNase Stop Solution に加える。凍結乾燥の DNase I の入っている瓶に Nuclease-Free water を入れて, 溶解する (Vortex はしない)。なお操作法の 1) から 12) までの試薬は 99.5%エタノールのほかは全て添付されている。

b) 操作法

食品あるいは糞便の遠心上清を用いる (フロン処理は不要)。また糞便は乳剤でないものも直接行える。

1) 滅菌チューブ (1.5ml) に SV RNA Lysis Buffer (BME を加えてあるもの) を 350 μ l 入れる。それに検査材料を 100 μ l とポリオ 2 型ウイルス (Sabin 株) を 2 μ l 入れた後, 3 から 4 回上下混合し, 軽く遠心する。(糞便を直接用いるときには重量を測定し, 30mg/175 μ l に比例して SV RNA Lysis Buffer を加える)。なお,

- 陰性コントロールとして糞便の代わりに DDW を入れたものも行う。
- 2) 次に SV RNA Dilution Buffer を $350\mu\text{l}$ 入れ, 攪拌, (糞便材料の時には完全に溶解させるため, 良く混合する)。溶解しない時には Vortex する。
 - 3) チューブを 70°C の water bath に 3 分間静置, 直ちに on ice する。
↓ $12,000$ から $14,000\times g$ で 10 分間遠心する。
 - 4) 新しい 1.5ml のチューブに 99.5% Ethanol を $300\mu\text{l}$ (糞便 30mg を用いたときには $200\mu\text{l}$) を入れ, それに遠心上清を加え, 攪拌 (3 から 4 回上下混合), 軽く遠心。
 - 5) 新しいチューブ (1.5ml) に Spin Basket Assembly をセットし, その Basket に 4 の溶液を入れる。
↓ $12,000$ から $14,000\times g$ で 1 分間遠心し, 下のチューブ液を捨てる。
 - 6) Basket に SV RNA Wash Solution を $60\mu\text{l}$ 入れる。
↓ $12,000$ から $14,000\times g$ で遠心し, 下のチューブの液を捨てる。
 - 7) Basket に DNase incubation mix を $50\mu\text{l}$ 入れ, 室温に 15 分間置く。
 - 8) Basket に SV DNase Stop solution を $200\mu\text{l}$ 入れる。
↓ $12,000$ から $14,000\times g$ で 1 分間遠心, チューブの液を捨てる。
 - 9) Basket に SV RNA Wash Solution を $600\mu\text{l}$ 加える。
↓ $12,000$ から $14,000\times g$ で 1 分間遠心し, チューブの溶液を捨てる。
 - 10) Basket に SV RNA Wash Solution を $200\mu\text{l}$ 加える。
↓ $14,000\times g$ で 2 分間遠心する。
 - 11) Basket を新しいチューブ (Elution チューブ) にセットし, 蓋を 2 分間開け, Ethanol を飛ばす。
 - 12) 次いで食品の時には $\text{Nuclease-free Water } 100\mu\text{l}$, 糞便材料は $40\mu\text{l}$ を Basket に入れ, 2 分間置く。
↓ $12,000\times g$ で 2 分間遠心。
チューブに溜まった液が抽出 RNA である。
糞便材料はこれを PCR に用いる。
食品の時には以下の操作を続けて行う。
 - 13) Elution チューブに 99.5% Ethanol $300\mu\text{l}$, glycogen $2\mu\text{l}$ および $3\text{M NaOAc } 40\mu\text{l}$ を加え上下混合し, -70°C 以下に 30 分置いた後 (over night のときは -20°C に置く),
↓ $15,000\text{rpm}$ で 30 分間遠心し, 上清を完全に除く。
 - 14) Basket に 75% Ethanol を $400\mu\text{l}$ 加え, 上下混合後,