

大腸菌

セレウス菌

公定法 食中毒検査法

大腸菌群種

大腸菌数生

生菌数生

主材料





検体名称

検体名称	主材料	生菌数生	大腸菌数生	大腸菌群種	公定法	セレウス菌
小松葉一夜漬	小松葉	1,500,000	41,000	Enterobacter cloace	陰性	陽性 (10)
きゅうりからし漬	きゅうり	920,000	>300	Klebsiella pneumoniae	陰性	陽性 (20)
白菜漬	白菜	15,000,000	3,400	Enterobacter cloace	陰性	
からし高菜	高菜	6,400	>300		陰性	
きゅうり浅漬	きゅうり	480,000	500	Enterobacter cloace	陰性	陽性 (20)
ちりめんたかな漬	高菜	9,800	>300		陰性	
野沢菜漬	野沢菜	6,700	>300	Enterobacter cloace	陰性	
胡瓜浅漬	きゅうり	22,000	1,200	Enterobacter cloace, Citrobacter freundii	陰性	陽性 (100)
はくさい漬	白菜	4,700	>300		陰性	陽性 (10)
キュウリのビール漬	きゅうり	2,300,000	26,000	Citrobacter freundii	陰性	陽性 (10)
胡瓜の粕漬	きゅうり	3,900,000	600	Enterobacter cloace	陰性	
胡瓜のあっさり漬	きゅうり	25,000,000	9,100	Enterobacter cloace	陰性	
きゅうり漬	きゅうり	820,000	11,000	Enterobacter cloace	陰性	
粕漬	きゅうり、大根、ナス、うり	33,000,000	>300	Enterobacter cloace	陰性	陽性 (140)
田舎漬	きゅうり、大根、人参、ナス	12,000	>300	Enterobacter cloace	陰性	陽性 (140)
浅漬	きゅうり	520,000	>300	Enterobacter cloace	陰性	陽性 (90)
あっさり漬	白菜、きゅうり、人参	130,000,000	900,000	Enterobacter cloace	陰性	陽性 (20)
キューリのぬか漬	きゅうり	110,000,000	1,500,000	Enterobacter cloace	陰性	
ダイコン浅漬	大根	50,000	>300	Enterobacter cloace	陰性	
桃山キムチ	白菜	250,000,000	>300	Enterobacter cloace	陰性	
うり	うり	900	>300		陰性	
きゅうり	きゅうり	9,500	>300	Enterobacter cloace, Citrobacter amalonaticus	陰性	
白菜ミックス	白菜	1,400	>300		陰性	
白菜	白菜	140,000	>300	Citrobacter freundii	陰性	陽性 (10)
キャベツ	キャベツ	110,000	>300	Citrobacter freundii	陰性	
大根	大根	43,000	1,600	Citrobacter freundii, Seratia marcescens	陰性	
うり	うり	2,800	>300	Seratia liquefaciens	陰性	
きゅうり	きゅうり	65,000	>300		陰性	
白菜キムチ	白菜	220,000,000	15,000	Citrobacter freundii	陰性	
カット茄子	ナス	170,000,000	390,000		陰性	
もろみ漬	きゅうり、人参	3,200,000	450,000		陽性	陽性
あっさり漬	きゅうり、白菜、人参	190,000,000	1,300,000		陽性	陽性 (210)
白菜漬	白菜	750,000	11,000		陽性	陽性 (20)
白菜漬	白菜	3,400,000	66,000	Enterobacter cloace	陽性	陽性 (20)
漬け物 (味噌漬)	ナス	480,000	>300		陰性	陽性 (20)
漬け物 (たこんで漬)	大根	9,200	>300	Enterobacter cloace	陰性	陽性 (10)
昆布白菜漬	白菜	65,000	>300	Enterobacter cloace, Klebsiella pneumoniae	陰性	陽性 (20)

からし漬	きゅうり	370,000	>300	Enterobacter cloace	陰性	
白菜漬	白菜	17,000,000	14,000	Enterobacter cloace, Morganella morganii	陰性	
きゅうり漬	きゅうり	3,000,000	>300	Enterobacter cloace	陰性	陽性 (20)
はくさい減塩浅漬	白菜	370,000	9,200	Enterobacter cloace, Klebsiella pneumoniae	陰性	陽性 (20)
大根薬減塩浅漬	大根	19,000,000	2,100,000		陽性	陽性 (20)
朝鮮漬	白菜、きゅうり、人参	36,000,000	1,500		陰性	陽性 (20)

表1-2. 患者及び健康者由来大腸菌の主な血清型分布

データの個数 / 通		H										NM	総計
O	H/P	2	6	7	11	12	21	27	34	45			
15	Healthy											1	1
	Patient	2		1		3	1					1	8
15 合計		2		1		3	1					2	9
20	Healthy		1									2	3
	Patient		1		2	1							4
20 合計			2		2	1						2	7
25	Healthy											3	3
	Patient		1			4						20	25
25 合計			1			4						23	28
26	Healthy		2					1					4
	Patient												26
26 合計			2					1					30
44	Patient										1	1	2
44 合計											1	1	2
55	Healthy					1							9
	Patient					1						9	27
55 合計						2						9	36
63	Healthy		8									1	9
	Patient	1	11	1									13
63 合計		1	19	1								1	22
111	Healthy												3
	Patient			1								9	47
111 合計				1								9	50
114	Healthy			2									2
	Patient		1	3	1	1	1					3	10
114 合計			1	5	1	1	1					3	12
119	Healthy	4					1	1					6
	Patient	2					1					6	9
119 合計		6					2	1				6	15
125	Patient							1					1
125 合計								1					1
126	Healthy		1	1		1	3	19				1	26
	Patient	1				1		44		1		9	56
126 合計		1	1	1		2	3	63		1		10	82
127	Patient						7						7
127 合計							7						7
128	Healthy	2	1			8			1				12
	Patient	15				11			1			1	28
128 合計		17	1			19			2			1	40
153	Healthy			4		3						1	8
	Patient		6	13		3	7		2			2	33
153 合計			6	17		6	7		2			3	41
157	Healthy				1	1						7	3
	Patient						1			2		7	31
157 合計					1	1	1			2		7	34
総計		27	33	73	15	39	63	65	4	4	93	416	

 厚生科学研究費小林班のEPEC血清型  
 Nataro & Kaperの総説におけるEPEC血清型  
 Nataro & Kaperの総説におけるEHEC血清型  
 Nataro & Kaperの総説におけるEAggEC血清型

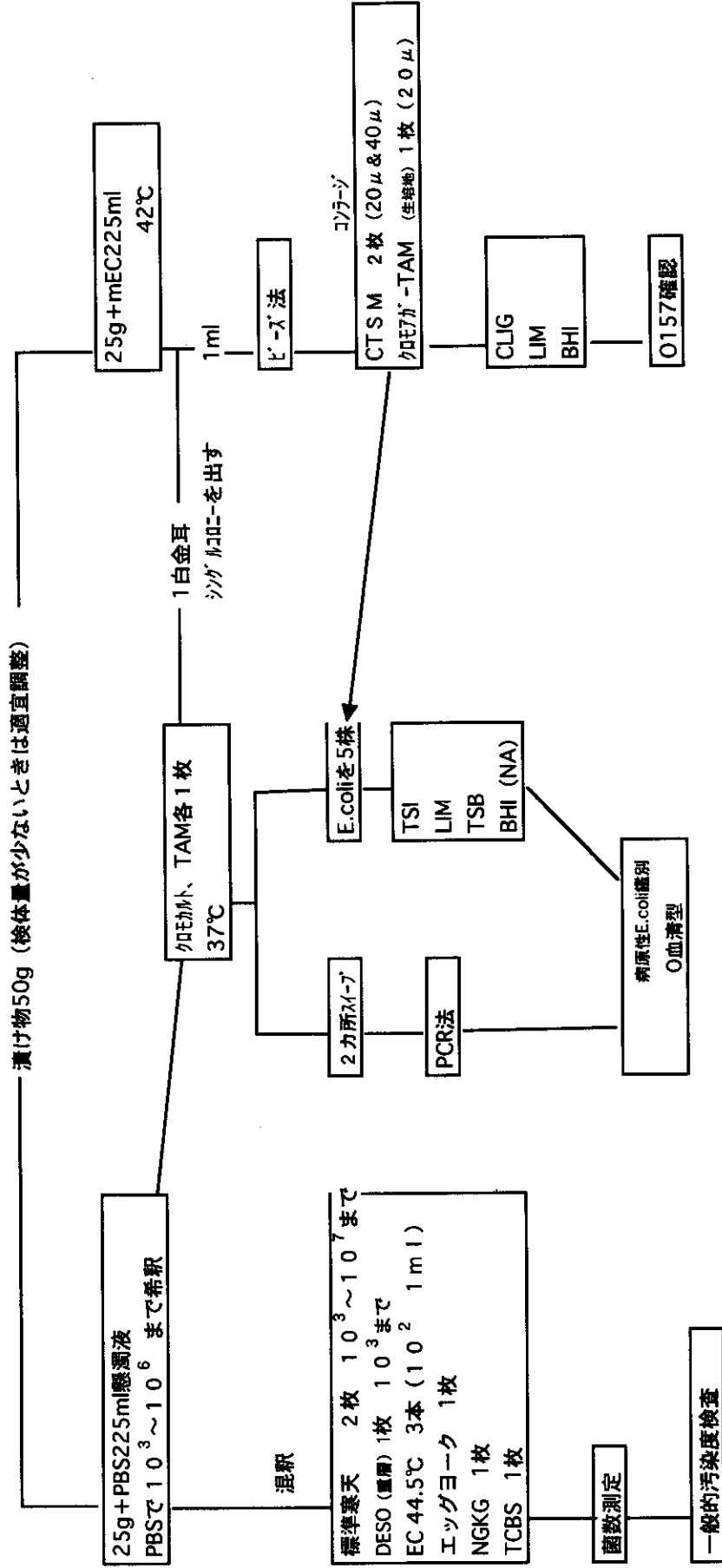
健康者検体数：903株  
 患者検体数：2066株

表1-3. *eae* 陽性大腸菌の主な血清型分布

データの個数 / 通		<i>eae</i> H							+ 合計	総計
		+								
0	H/P	2	6	7	11	12	45	NM		
20	Healthy		1						2	3
	Patient		1							1
20 合計			2						2	4
25	Patient								1	1
25 合計									1	1
26	Healthy		1							1
	Patient				11				14	25
26 合計			1		11				14	26
55	Healthy			8						8
	Patient			16					8	24
55 合計				24					8	32
63	Healthy		7						1	8
	Patient		11	1						12
63 合計			18	1					1	20
111	Patient								1	1
111 合計									1	1
114	Patient					1				1
114 合計						1				1
119	Healthy	4								4
	Patient	2								2
119 合計		6								6
126	Healthy		1							1
126 合計			1							1
128	Healthy	2								2
	Patient	14							1	15
128 合計		16							1	17
153	Healthy			4						4
	Patient			9						9
153 合計				13						13
157	Healthy			1						1
	Patient			21			2	5		28
157 合計				22			2	5		29
総計		22	22	60	11	1	2	33	151	151

*eae* 陽性健康者検体数 (健康者全体) : 59株(903株)

*eae* 患者検体数(患者全体) : 197株 (2066株)



0157検査

食中毒検査

公定法

図2-1. 漬け物の大腸菌汚染実態調査検査法

20020971

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

**PCR 産物のマイクロプレート・ハイブリダイゼーションによるノーウオーク  
ウイルスの確認および遺伝子型別試験について ノーウオークウイルス  
性下痢症 診断・検出法の進歩**

西尾治, 加藤由美子

日本臨床. 60 巻 6 号, Page1175-1180(2002.06)

**Outbreak of central nervous system disease associated with hand, foot,  
and mouth disease in Japan during the summer of 2000: detection and  
molecular epidemiology of enterovirus 71.**

Fujimoto T, Chikahira M, Yoshida S, Ebira H, Hasegawa A, Totsuka A,  
Nishio O.

Microbiol Immunol. 2002; 46(9): 621-7.

**大アサリの喫食を原因とするノーウオーク様ウイルスとA型肝炎ウイルス  
による食中毒事例——浜松市 (情報)**

古田敏彦, 竹内寛行, 東谷市郎, 西尾治

病原微生物検出情報. Vol.23 No.5(2002.05)

**脳症患者の咽頭ぬぐい液および髄液から検出された A 群コクサッキーウ  
イルス——兵庫県 (情報)**

藤本嗣人, 近平雅嗣, 増田邦義, 宗村徹也, 西尾治, 吉田弘, 武田和子,  
吉田真策

病原微生物検出情報. Vol.23 No.7(2002.07)

**輸入生鮮魚介類からの A 型肝炎ウイルス検出状況 (特集関連情報)**

西尾治, 秋山美穂, 長谷川斐子, 古屋由美子, 大瀬戸光明, 杉枝正明

病原微生物検出情報. Vol.23 No.11(2002.11)

**スイミングスクールを介したと推定されるアデノウイルス 4 型による咽頭結膜熱の流行**

岡藤輝夫, 岡藤隆夫, 岡藤みはる, 藤本嗣人, 近平雅嗣, 西尾治  
臨床とウイルス. 30 巻 4 号, Page270-274(2002.10)

**河川水からの Norwalk virus の検出**

入谷展弘, 勢戸祥介, 春木孝祐, 川本尋義, 西尾治, 久保英幸, 村上司, 蓑城昇次, 瀧野薫, 綾田稔, 小倉壽  
生活衛生. 46 巻 4 号, Page137-143(2002.07)

**リアルタイム PCR 法を用いた Norwalk virus 検出法の評価**

入谷展弘, 勢戸祥介, 春木孝祐, 西尾治, 久保英幸, 村上司, 蓑城昇次, 瀧野薫, 綾田稔, 小倉壽  
大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報. 64 号, Page6-10(2002.12)

**ノーウォーク様ウイルスによる集団発生 (季節講座) 冬の食中毒**

西尾治, 新川奈緒美  
日本医事新報. 4105 号, Page5-9(2002.12)

**ノロウイルス(ノーウォーク様ウイルス)と A 型肝炎ウイルスに汚染されたウチムラサキ貝による食中毒事例**

古田敏彦, 秋山美穂, 加藤由美子, 西尾治  
感染症学雑誌. 77 巻 2 号, Page89-94(2003.02)

**養殖カキのウイルス浄化試験**

福田美和, 川田一伸, 矢野拓弥, 杉山明, 中山治, 西尾治, 関根大正, 櫻井悠郎  
感染症学雑誌. 77 巻 2 号, Page95-102(2003.02)

**輸入二枚貝等からの SRSV 遺伝子検出状況**

田中俊光, 西尾治  
JAPHV. 平成 14 年度報告.

**鹿児島県における海域のウイルス汚染実態調査及びウイルス性胃腸炎  
集団発生事例**

新川奈緒美, 永田告治, 有馬忠行, 本田俊郎, 吉國謙一郎, 上野伸広,  
湯又義勝, 西尾治

鹿児島県環境保健センター所報. 3号, Page102-105(2003.01)

**愛媛県において 10 月から流行したノーウォーク様ウイルス胃腸炎 (速  
報)**

近藤玲子, 山下育孝, 吉田紀美, 大瀬戸光明, 浅井忠男, 井上博雄, 西  
尾治, 秋山美穂

病原微生物検出情報. Vol.24 No.1(2003.01)

**Genetic characterisation of adenovirus type 8 isolated in Hiroshima city  
over a 15 year period.**

Adhikary AK, Numaga J, Kaburaki T, Kawashima H, Araie M, Ikeda Y,  
Ogino T, Suzuki E, Ushijima H, Mukoyama A, Matsuno S, Inada T, Okabe  
N.

J Clin Pathol. 2003 Feb; 56(2): 120-5.

**Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized  
children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam.**

Doan LT, Okitsu S, Nishio O, Pham DT, Nguyen DH, Ushijima H.

J Med Virol. 2003 Apr; 69(4): 588-94.

**ノーウォークウイルス集団食中毒と小児急性胃腸炎の関連性 本邦での  
歴史を踏まえて ノーウォークウイルス性下痢症 治療・予防法の進歩  
鈴木宏, 西川眞**

日本臨床. 60 巻 6 号, Page1208-1213(2002.06)

**Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a  
new genetic cluster in genogroup II of the genus "Norwalk-like viruses".**

Sugieda M, Nakajima S.

Virus Res. 2002 Aug; 87(2): 165-72.



**豚盲腸内容物から検出した NV(SRSV)遺伝子の全ゲノム(塩基配列)の解析**

杉枝正明, 佐原啓二, 稲吉恵, 秋山真人

静岡県環境衛生科学研究所報告. 44 号, Page5-8(2002.08)

**急性胃腸炎における Sapporo Virus の役割**

大瀬戸光明, 近藤玲子, 山下育孝, 吉田紀美, 浅井忠男, 井上博雄, 岡田峰幸, 篠崎邦子, 石丸啓郎, 中野省三

愛媛県立衛生環境研究所年報. 3 号, Page5-9(2002.02)

**三重県内の Norwalk virus 動向に関する研究 (2001 年度)**

西香南子, 杉山明, 中山治

三重県科学技術振興センター保健環境研究部年報. 4 号, Page41-46(2002.12)

**Surveillance of poliovirus-isolates in Japan, 2001.**

Yoneyama T, Sasagawa A, Kikuchi M, Noda N, Shinkawa N, Yoshida K, Miyamura T.

Jpn J Infect Dis. 2002 Apr; 55(2): 57-8.

**中枢神経症状を伴う手足口病の臨床的検討**

吉田茂, 藍祥子, 今井恵介, 三舛信一郎, 箆ひとみ, 藤本嗣人

日本小児科学会雑誌. 107 巻 3 号, Page473-479(2003.03)

**と畜場に搬入された豚の糞便中におけるペロ毒素産生性大腸菌(VTEC)の分布と病原性関連因子保有状況調査**

成松浩志, 小林貴廣, 世古庄太, 後藤祐司, 木元正一, 尾形長彦, 瀧祐一, 伊藤健一郎

日本食品微生物学会雑誌. 19 巻 1 号, Page21-26(2002.07)

**下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考察**

小林一寛, 勢戸和子, 八柳潤, 斉藤志保子, 寺尾通徳, 金子通治, 芹川俊彦, 倉本早苗, 藤沢倫彦, 鈴木理恵子, 山崎貢, 林賢一, 松根渉, 安岡富久, 堀川和美, 村上光一, 河野喜美子, 山田亨, 伊藤健一郎  
感染症学雑誌. 76 巻 11 号, Page911-920(2002.11)

**腸管出血性大腸菌 O157 の迅速検査法とその成績の取り扱い 腸管出血性大腸菌感染症 診断・検査法の進歩**

伊藤健一郎, 松崎充宏  
日本臨床. 60 巻 6 号, Page1114-1120(2002.06)

## IV

## 付録

ノロウイルス検査法マニュアル

A型肝炎ウイルス検査法マニュアル

# ノロウイルスの RT-PCR 法

国立感染症研究所 感染症情報センター

西尾 治

## I. RT-PCR 法

### 1. 必要な器具と試薬

#### 1) 器具

サーマルサイクラー、超遠心器、冷却遠心器(5,000rpm)、マイクロ冷却遠心器(15,000rpm)、ホモジナイザーあるいはストマッカー、Vortex、電気泳動装置、UV 照射写真撮影装置、ヘラ、ハサミ、メス、ピンセット、濾紙、マイクロピペット(2、20、200、1000 $\mu$ l)、チューブ(0.5ml、0.2ml、1.5ml)、15ml および 50ml 遠心管、1ml 注射器、18G 注射針

#### 2) 試薬

ショ糖、ポリエチレングリコール 6,000、NaCl、KCl、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、エタノール、Nuclease-Free water、NV プライマー、ポリオ 2 型プライマー、EDTA $\cdot$ 2Na(エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム)、電気泳動用アガロース ME(岩井科学、250g 入り Cat.No. 50013R)、エチジウムプロマイド

Random primer hexamer : Amersham Pharmacia、Cat. 27-2166-01、

Super Script II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase : Invitrogen、Cat.No. 18064-014、

100mM DTT : Super Script II に添付、

QIA Viral RNA Mini Kit : QIAGEN、Cat.No. 52904

DNase I : TaKaRa、Code No. 2215A

Ribonuclease Inhibitor : TaKaRa、Code No. 2310A

Takara EX Taq : TaKaRa、Code No. RR001A

50 倍濃度 TAE buffer : Tris 242g、氷酢酸 57.1ml、0.5M EDTA (pH8.0) 100ml を蒸留水で 1,000ml とする。

### 2. 操作上の注意

患者のふん便を取り扱う時には安全キャビネット内で行い感染防止に最大の注意を払い行うこと。

PCRを行う際には手袋をし、チューブの蓋を開ける時にはその前に軽く遠心した後、オープナーを用いること。

RT-PCR 反応液の調整をする部屋と PCR 産物の電気泳動の部屋を分ける。それができない時には、それぞれのクリーンベンチで行う。クリーンベンチで行う際にファンは止めて行う。コンタミ防止と RNase の混入防止に細心の注意を払うこと。

### 3. 食品の処理

#### 1) 貝類の前処理（超遠心法）

本項では食品として最も重要視されている貝類の方法について記す。他の食品においても基本的にはこの方法に準じて行える。超遠心器のローターとの関係もあるが、貝の中腸腺が1gあるいはそれ以上の時は1個または2個を1件として行い、1ロットにつき3検体から10検体（中腸腺として合計12gから24g程度を目途とする）を行う。シジミ、アサリ等の中腸腺が1g以下の貝では中腸腺1gから1.5gを1件検体として、3検体から5検体の検査を行う。

- (1) 殻付き貝類はヘラ、メス等で貝柱を切り、殻を開く。
- (2) 貝の外套膜を取り、次いで中腸腺の周りに付いている脂質部分をメス、ハサミ等で可能な限り取り除き、中腸腺を取り出す。中腸腺を摘出する際にはできる限り周りの白い組織（脂肪）を取り除くこと。特にリアルタイムPCRを行うときには完全に取り除くこと。
- (3) ホモジナイザーまたはサンプリングバッグに中腸腺をいれ、次いで6~10倍量 PBS(-)を加え粉砕する。貝類の乳剤は15%以上の濃度にしないこと。20%以上になると回収率が悪くなる。
- (4) 粉砕した試料を遠心管に移す。  
↓10,000 rpm. 20 分間冷却遠心し、上清を新しい試験管に取る。
- (5) 超遠心用遠心管に30%ショ糖溶液を遠心管の10%程度入れ、それに(4)の遠心上清を静かに重層させる（ショ糖層を壊さないように初めは特に注意して少量ずつ入れる）  
↓35,000 rpm. 180 分間 あるいは40,000 rpm. 120 分間 冷却遠心する。
- (6) アスピレーター、注射器等で液層を吸引し、沈渣のみとする。
- (7) 遠心管の管壁をPBS(-)で軽く1回洗い、管壁の周りの水分を滅菌した濾紙で吸い取る。
- (8) 沈渣に200  $\mu$  lのDDW（滅菌後、0.22  $\mu$  mフィルターで濾過したもの）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10,000 rpm. 20 分間の遠心を行い、その上清をRNA抽出に用いる)

超遠心器を使えない時には以下の操作で行う。

## 2) ポリエチレングリコールによる濃縮

- (1) 1)貝類の前処理(超遠心法) (4)の遠心上清にポリエチレングリコール 6,000を8%、NaClを2.1g/100mlになるように加え、軽く攪拌し4℃の冷蔵庫に一晩置く、または室温で2時間攪拌する。

↓5,000~12,000 rpm. 20分間、冷却遠心する。

- (2) 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(滅菌したもの)で吸い取る。さらにPBS(-)で管壁を軽く2回洗い、その後濾紙で水分を完全に取る。
- (3) 沈渣を200 $\mu$ 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場合には10,000 rpm. 20 分間の冷却遠心を行い、その上清をRNA抽出に用いる。

## 3) 貝の内容液からのウイルス検出

- (1) 超遠心法(2)の中腸腺を内容液が漏れないように取り出し、それを大きめの遠心管に入れ、ガラス棒等で中腸腺を潰した後、1度凍結融解する(-40℃以下で凍結させ、融解するときには40℃程度のお湯ですばやく融解する)。
- (2) 10,000回転で20分間冷却遠心し、上層の液層を新しいチューブに取る。
- (3) 得られた液をRNA抽出に用いる。但し、QIAamp Viral RNA Mini キットによるRNAの抽出では560 $\mu$ lまで、それ以上の量の時には2つに分けて行うか、PBSで6倍希釈した後、前項のポリエチレングリコールあるいは超遠心器による濃縮を行い、200 $\mu$ lのDDWに再浮遊させ、それをRNA抽出に用いる。

## 4. ふん便材料の処理

- 1) ふん便の10%乳剤(PBS)を作製する。
- 2) 10%乳剤を激しく攪拌した後、10,000から12,000回転、20分間冷却遠心する。
- 3) 遠心上清の138 $\mu$ lを5. QIAamp Viral RNA Mini キットによるRNAの抽出に用い、RNAの抽出を行う。

## 5. QIAamp Viral RNA Mini キットによる RNA の抽出

RNA の抽出には多くの方法があり、またキットも多数市販されている。それぞれが良いと判断した方法を用いて良い。

QIAamp Viral RNA Mini キットは RNA 抽出に Carrier RNA が含まれており、RNA 抽出は SV Total RNA isolation system より 10 倍程度良い。しかし、10%ふん便乳剤を作製し、遠心する必要がある。またこのキットには DNase 処理が含まれていないので、各自が行わなければならない。

### 1) 使用前に行う試薬の調整

サンプルを室温 (15~20℃) に戻す。

Buffer AW1 (Kit Cat. No. 51104) に 96~100%エタノールを 25ml 加える。Buffer AW2 (Kit Cat. No. 51104) に 96~100%エタノールを 30ml 加える。

Carrier RNA (凍結乾燥品) のチューブに Buffer AVL 1ml 添加し Carrier RNA を完全に溶解させ、Buffer AVL に全量を添加する。添加した Buffer AVL/Carrier RNA は室温で 2 週間、2~8℃で 6 ヶ月間安定。Buffer AVL/Carrier RNA 中に沈殿物がある場合には、加熱(80℃)により溶解する。但し、5 分間以内で、6 回以上の加熱は行わない。Buffer AVL/Carrier RNA は使用前に室温に戻す。

### 2) 操作法

以下の操作は室温で行う。

- (1) 1.5ml チューブに Buffer AVL/Carrier RNA 560  $\mu$ l を入れる。
- (2) 10%ふん便乳剤遠心上清(10,000rpm. 10 分間) を 138  $\mu$ l (増量にすることも可能である。詳細はキットの添付マニュアルを参照) とポリオウイルス 2 型 (Sabin 株) を 2  $\mu$ l (10,000 個程度の粒子数) 入れ、サンプルと Buffer を充分混合するため 15 秒間 Vortex にかき、室温 (15~25℃) に 10 分間置く。チューブをスピンドウンする。
- (3) エタノール (96~100%) 560  $\mu$ l をチューブに加え、15 秒間 Vortex をかけた後、チューブをスピンドウンする。液が混濁した時には 9,000Xg (10,000rpm) 5 分間遠心する (リアルタイム PCR を行うときにはこの遠心を行ったほうが良い)。
- (4) (3) の液 630  $\mu$ l を QIAamp スピнкаラム (2ml コレクションチューブ) に注入し、蓋を閉め、6,000Xg (8,100 rpm)、1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい

2ml のチューブに移し、残りの(3)の液 630  $\mu$ l を入れ、同様に遠心し、全ての液が無くなるまで行う (この操作は 2 回で終わる)。

- (5) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW1 500  $\mu$ l を入れる。
- (6) 蓋を閉め、6,000Xg (8,100 rpm)、1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。
- (7) QIAamp スピнкаラムに Buffer AW2 500  $\mu$ l を加え、20,000Xg (14,000 rpm) で 3 分間遠心する。Buffer AW2 とろ液等が接触した時には(8)を行う (このような事は通常起きない)。
- (8) QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。フルスピードで 1 分間遠心する (必ずしも必要でない)。
- (9) QIAamp スピнкаラムを新しい蓋つき 1.5ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。QIAamp スピнкаラムの蓋を開け、室温に戻した Buffer AVE 60  $\mu$ l を加え、蓋を閉めて 1 分間置いた後、6,000Xg (8,100 rpm) で 1 分間遠心する。
- (10) このろ液が抽出 RNA であり、RNA は -20°C 以下で 1 年間は安定。

## 6. DNase 処理

食品、人のふん便中には様々な DNA が含まれており、しばしば PCR で非特異バンドが出現するので、それらを抑制するため、またこの時点までに DNA の混入が起きた時でも、それらを消化することができる。従って、キットに DNase 処理が含まれていない時にはこの操作を行うことが望ましい。注意として DNase I を使用するマイクロピペットは専用のものを用い、可能であればオートクレイブができるものが良い。検査終了後使用した DNase の含まれている液、チューブはオートクレイブにかける。

- 1) 表 1. に示したように DNase 処理混合液の調製を行う。

表 1. DNase 処理混合液

	15 $\mu$ l 系	30 $\mu$ l 系
Sample RNA	12.0 $\mu$ l	24 $\mu$ l
5XFirst-Strand Buffer <sup>注1)</sup>	1.5 $\mu$ l	3.0 $\mu$ l
DDW	0.5 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l
DNase I (1U/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l	2.0 $\mu$ l

注 1) : 使用する Reverse Transcriptase の buffer を用いる。



- 2) 混合液調製後、37℃に 30 分間置く。
- 3) 次いで 75℃に 5 分間置く。
- 4) 直ちに on ice(または 4℃)する。これが DNase 処理済み抽出 RNA である。

## 7. RT 反応 {Super Script II RT (Invitrogen) を用いる時}

- 1) 表 2. の RT 反応調整液を作製する。

表 2. RT 反応液調製液 ( Super Script II RT を用いる時)

	15 $\mu$ l 系	20 $\mu$ l 系	30 $\mu$ l 系	50 $\mu$ l 系
DNase 処理 RNA	7.5 $\mu$ l	10.0 $\mu$ l	15.0 $\mu$ l	30.0 $\mu$ l
5X SS II Buffer	2.25 $\mu$ l	3.0 $\mu$ l	4.5 $\mu$ l	7.0 $\mu$ l
10mM dNTPs	0.75 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
Random Primer (1.0 $\mu$ g) <sup>注 2)</sup>	0.375 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	0.75 $\mu$ l	1.25 $\mu$ l
Ribonuclease Inhibitor (33unit/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	0.67 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l	1.67 $\mu$ l
100m M DTT#	0.75 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
Super Script II RT (200u/ $\mu$ l)	0.75 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
DDW	2.125 $\mu$ l	2.83 $\mu$ l	4.25 $\mu$ l	2.58 $\mu$ l

注 2) : Random Primer の代わりに NV プライマー、ポリオ 2 プライマーを用いても良い。

- 2) 反応は 42℃で 30 分から 2 時間行う (通常 1 時間)。
- 3) 次いで 99℃で 5 分間加熱し、on ice (または 4℃) する。

## 6. 1st PCR

1) 1st PCRは表3.、表4.のNVとポリオの2つのA,B混合液を作製する。

表3. A ノーウオークウイルス

1. DDW	33.75 $\mu$ l
2. 10X Ex Taq™ buffer	5.0 $\mu$ l
3. dNTP(2.5mM)	4.0 $\mu$ l
4. NV primer(25 $\mu$ M) <sup>注3)</sup>	1.0 $\mu$ l
5. NV primer(25 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l
6. cDNA(Template)	5.0 $\mu$ l
7. EX Taq(5unit/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
Total	50.0 $\mu$ l

表4. B ポリオウイルス

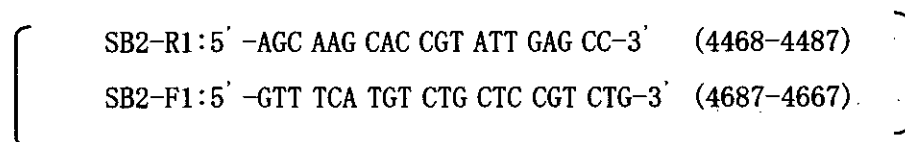
1. DDW	33.75 $\mu$ l
2. 10X Ex Taq™ buffe	5.0 $\mu$ l
3. dNTP(2.5mM)	4.0 $\mu$ l
4. SB2-R1primer(25 $\mu$ M) <sup>注4)</sup>	1.0 $\mu$ l
5. SB2-F1 Primer(25 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l
6. cDNA(Template)	5.0 $\mu$ l
7. EX Taq(5unit/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
Total	50.0 $\mu$ l

注3) : プライマーの塩基配列は表10.、図3.を参照<sup>文献1)2)</sup>。

1st PCRに用いるプライマーは食品のときには、G1ではCOG1F/G1-SKR、G2ではCOG2F/G2-SKRおよびALPF/G2AL-SKR<sup>文献22)24)</sup>(アルファトロン型を検出するプライマー、この2組のプライマーは混合して用いても良い)を、ふん便材料の時にはG1ではG1-SKF/G1-SKR、COG1F/COG1Rを、G2ではG2-SKF/G2-SKR、G2-SKF/G2AL-SKR、COG2F/COG2R、ALPF/COG2Rを用いることが望ましい。

但し、このほかのプライマーを用いてもよい。ポリメラーゼ領域のプライマーは表10.、図2.を参照。

注4) : ポリオ2型プライマー<sup>文献3)</sup>



AとBの混合液を作製し、以下の条件で増幅を行う。

### 2) PCR 反応

増幅は94℃ 3分を1サイクル、94℃ 1分、50℃ 1分、72℃ 2分を40サイクル、72℃ 15分を1サイクルで行う。増幅条件はプライマー、サーマルサイクラーによって異なるので、それぞれ最適な条件で行うと良い。

### 3) 電気泳動

PCR産物 8  $\mu$ l と 5 倍 Loading buffer 2  $\mu$ l を混合し、1.5%アガロースゲルを用いて泳動する。泳動 buffer は TAE を使用する。

### 4) アガロースゲル染色

泳動後ゲルをエチジウムブロマイド染色液 (TAE 溶液 100ml にエチジウムブロマイド 10mg/ml のものを 10  $\mu$ l 加えた溶液) に 20 分間入れておく。この時に緩やかに揺ると良い。

### 5) 写真撮影、バンドの確認

染色したゲルは UV 照射で写真撮影し、バンドの確認を行う。食品では 1st PCR でバンドが見られなかった時には(多くの例では見られない)、次に Nested PCR を行う。

## 7. Nested PCR法

食品の時にはウイルス量が少ないので、1st PCRで陰性の時にはNested PCRを行う。但し、Nested PCRを行う時にはコンタミが起こる危険性が有るので注意して実施する。

### 1) Nested PCRの調製

表5. の混合液を作製する。

表5. Nested PCRの混合液

1. DDW	36.75 $\mu$ l
2. 10X Ex Taq™ buffe	5.0 $\mu$ l
3. dNTP (2.5mM)	4.0 $\mu$ l
4. NV primer (25 $\mu$ M) <sup>注5)</sup>	1.0 $\mu$ l
5. NV Primer (25 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l
6. 1st PCR産物	2.0 $\mu$ l
7. EX Taq	0.25 $\mu$ l
Total	50.0 $\mu$ l

プラスミドに組み込んだNV陽性コントロールについても行う。

注5): NVプライマーは1st PCRに用いたものの内側に設定されたプライマーあるいはセミNested PCRで行う。

Nested PCRに用いるプライマーはG1の1st PCRでCOG1F/G1-SKFRを用いたときにはG1-SKF/G1-SKRおよびCOG1F/COG1Rを、G2の1st PCRでCOG2F/G2-SKFRを用いたときにはG2-SKF/G2-SKRおよびCOG2F/COG2RおよびCOG2F/COG2Rを、ALPF/G2AL-SKRを用いたときにはG2-SKF/G2AL-SKRおよびALPF/COG2Rを用いるのが望ましい。他のプライマーを用いたときにはそれに対応するプライマーを用いること。

## 2) PCR反応、電気泳動

増幅は1st PCRと同様に行うが サイクル数は35とする。

Nested PCR産物の電気泳動、UV照射で写真撮影、バンドの確認は1st PCRと同様に行う。

## 10. PCR結果の判定

- 1) PCR法ではRNA抽出のコントロールとして入れた、ポリオSabin株2型(粒子数10,000個)のPCRで目的とするバンドが認められること (RNAの抽出に問題はない)。
- 2) 検査材料の代わりにDDWを入れた陰性コントロールでバンドが見られない(遺伝子の混入が無い)。
- 3) 陽性コントロール(1st PCRではポリオ2型、Nested PCRではNV陽性コントロール)で目的とするバンドが見られる (PCRがうまく行われた)。
- 4) PCRでの増幅産物は目的とする大きさであること。

以上の条件が満たされたときにPCRの判定を行う。

なお、上記条件が満たされないときには再試験を行う。

PCR陽性と判定されたときに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調べる。ハイブリダイゼーションで陽性、あるいは遺伝子配列で既知のノーウークウイルスと類似の配列が認められた時に陽性とする。