

45. Huy T T-T, Ushijima H, Ngoc TT, Ha LD, Hayashi S, Sata T, Abe K :Recombination of genotype B and C in hepatitis B virus isolated from a Vietnamese patient with fulminant hepatitis. *Jpn J Infect Dis.* 56:35-37, 2003
46. Young-Hee L, Hirose K, Izumiya H, Arakawa E, Takahashi H, Terajima J, Ito K, Tamura K, Sung-Il K, Watanabe H: Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Jpn J Infect Dis.* 56:151-155, 2003
47. Zhou Y, Li L, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H : Distribution of Human Rotaviruses, especially G9 Strains, in Japan from 1996 to 2000. *Microbiol Immunol.* 47:591-599, 2003
48. Schroder HC, Ushijima H, Krasko A, Gamulin V, Thakur NL, Diehl-Seifert B, Mueller WEG : Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa, a tachylectin-related protein in the sponge *Suberites domuncula*. *J Biol Chem.* 278:32810-32817, 2003
49. Huy T T-T, Ushijima H, Quang X, Phuong N, Li TC, Hayashi S, Lien TX, Sata T, Abe K: Prevalence of hepatitis virus types B through E and genotypic distribution of HBV and HCV in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Hepatology Research.* 26:275-280, 2003
50. Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H : Detection of norovirus (GI, GII), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J Virol Methods.* 114:37-44, 2003
51. Iritani N, Seto Y, Kubo H, Murakami T, Haruki K, Ayata M, Ogura H: Prevalence of Norwalk-like virus infections in cases of viral gastroenteritis among children in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol.* 41:1756-1759, 2003
52. Huy T T-T, Ushijima H, Win KM, Luengrojanakul P, Shrestha PK, Zhong ZH, Smirnov AV, Taltavull TC, Sata T, Abe K : High prevalence of hepatitis B virus pre-S mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. *J Clin Microbiol.* 41:5449-5455, 2003
53. Sakamoto T, Ushijima H, Okitsu S, Suzuki E, Sakai K, Morikawa S, Muller WEG : Establishment of an HIV cell-cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and receptor gene. *J Virol Methods.* 114:159-166, 2003

54. Hirose K, Ito K, Arakawa E, Tamura K, Watanabe H: DNA-based diagnosis method for typhoid fever and paratyphoid fever, and the screening method for *Salmonella enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A with decreased susceptibility to fluoroquinolones by PCR-restriction fragment length polymorphism(RFLP). Res Adv Microbiology. 3:109-121, 2003
55. 西尾治: ノロウイルス検査法の改訂、食品衛生研究、54(2):9-15、2004
56. 新川奈緒美、藏元強、川元孝久、吉永正夫 他: 2003 年の麻疹の流行ー鹿児島県、病原微生物検出情報、25:69-70、2004
57. 安藤克幸、森永康裕、藤原義行: 生食用カキの採取海域海水、感染性胃腸炎及び食中毒事例からのノロウイルスの検出、佐賀県衛生薬業センター所報、28、2004
58. Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N, Ushijima H: Genetic diversity of Norovirus and Sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. J Clin Microbiol. 42(3):1305-1307, 2004
59. Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Maneekarn N, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H: Human astrovirus, Norovirus (GI, GII), and Sapovirus infections in Pakistan children with diarrhea. J Med Virol. 73:256-261, 2004
60. Huy T T-T, Ushijima H, Quang VX, Win KM, Luengrojanakul P, Kikuchi K, Sata T, Abe K: Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. J Gen Virol. 85:283-292, 2004

研究成果の刊行物・別冊

(平成 14 年度 報告書掲載)

平成 14 年度報告書に掲載のため、本報告書には別冊を掲載しておりません。
(平成 14 年度報告書に掲載順)

1. 西尾治、加藤由美子：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ォークウイルスの確認および遺伝子型別について、日本臨床、60:1175-1180、2002
2. Fujimoto T, Chikahira M, Yoshida S, Ebira H, Hasegawa A, Totsuka A, Nishio O :
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. Microbiol Immunol. 46:621-627, 2002
3. 古田敏彦、竹内寛行、東谷市郎、西尾治：大アサリの喫食を原因とするノーウォーク
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、病原微生物検出情報、
23 : 119-120、2002
4. 藤本嗣人、近平雅嗣、宗村徹也、西尾治、吉田弘、武田和子、吉田真策：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、病原
微生物検出情報、23 : 174-174、2002
5. 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：輸入生鮮魚
介類からの A 型肝炎ウイルス検出状況、病原微生物検出情報、23 : 274-275、2002
6. 岡藤輝夫、岡藤隆夫、岡藤みはる、藤本嗣人、近平雅嗣、西尾治：スイミングプー
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、臨床とウイ
ルス、 30-4 : 270-274、2002
7. 入谷展弘、勢戸祥介、春木孝裕、川本尋義、西尾治、久保英幸、村上司、養城昇次、
瀧野薫、小倉壽：河川水からの Norwalk virus の検出、生活衛生、46:137-143、2002
8. 入谷展弘、勢戸祥介、春木孝祐、西尾治、久保英幸、村上司、養城昇次、瀧野薫、
綾田 稔、小倉壽：リアルタイム PCR 法を用いた Norwalk virus 検出法の評価、大
阪市立環境科学研究所報告、64 : 6-10、2002
9. 西尾治、新川奈緒美：ノーウォーク様ウイルスによる集団発生、日本医事新報、4105 :
5-9、2002

10. 古田俊彦、秋山美穂、加藤由美子、西尾治：ノロウイルス（ノーウォークウイルス）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、感染症学雑誌、77：89-94、2003
11. 福田美和、川田一伸、矢野拓也、杉山明、中山治、西尾治、関根大正、櫻井悠朗：養殖カキのウイルス浄化試験、感染症学雑誌、77：95-102、2003
12. 田中俊光、西尾治：輸入二枚貝等からの SRSV 遺伝子検出状況、獣医公衆衛生研究、5：15-17、2003
13. 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、鹿児島県環境保健センター所報、3：102-105、2002
14. 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：愛媛県において 10 月から流行したノーウォークウイルス様ウイルス胃腸炎、病原微生物検出情報、24：9-10、2003
15. 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 : Genetic characterization of adenovirus type 8 isolated in Hiroshima city over a 15 year period. J Clin Pathol. 56:120-125, 2003
16. Doan LT, Okitsu S, Nishio O, Pham DT, Nguyen DH, Ushijima H : Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Ming City. Vietnam. J Med Virol. 69:588-594, 2003
17. 鈴木宏、西川眞：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—、日本臨床、60:1208-1213、2002
18. Sugieda M, Nakajima S : Viruses detected in the Cecum Contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus Norwalk-like viruses. V Research. 165-172, 2002
19. 杉枝正明、佐原啓二、稲吉 恵、秋山眞人：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、静岡県環境衛生科学研究所報告、44：5-8、2001
20. 西香南子、杉山明、中山治：三重県内における Norwalk virus 動向に関する研究（2001 年度）、三重保環研年報、47：41-46、2002
21. Yoneyama T, Sasagawa A, Kikuchi M, Noda N, Shinkawa N, Yoshida K, Miyamura T: Surveillance of Poliovirus-Isolates in Japan, 2001. Jpn J Infect Dis. 55:57-58, 2002

22. 吉田茂、藍 祥子、今井恵介、三舛信一郎、籠ひとみ、藤本嗣人：中枢神経系症状を伴う手足口病の臨床的検討、日本小児科学会雑誌、107：473-479、2003
23. 成松浩志、小林貴廣、世古庄太、後藤祐司、木元正一、尾形長彦、淵 祐一、伊藤健一郎：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、日本食品微生物学雑誌、19：21-26、2002
24. 小林一寛、伊藤健一郎 他：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の一考察、感染症学雑誌、76：911-920、2002
25. 伊藤健一郎、松崎充宏：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、日本臨床、60：1114-1120、2002

20031203

以降「V 付録」の前ページまでは雑誌/図書に掲載された論文となりますので、「研究成果の刊行物・別冊」をご参照ください。

V
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

ノロウイルスの検出法

国立感染症研究所 感染症情報センター

西尾 治

I ノロウイルスの RT-PCR 法

1. 必要な器具と試薬

1) 器具

サーマルサイクラー、超遠心機、冷却遠心機(5,000rpm)、マイクロ冷却遠心機(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 μ l)、チューブ(0.2ml、0.5ml、1.5ml)、遠心管(15ml、50ml)、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、塩化ナトリウム(NaCl)、塩化カリウム(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、Distilled water{(Deionized, Sterile, autoclaved, DNase free, RNase free) 和光純薬工業 Cat No. 318-90105, (以下「Distilled water」)}, ノロウイルス検出用プライマー(以下、「NVプライマー」という。詳細については後述。)、エコーウイルス9型Hill株プライマー(詳細については後述。)、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA \cdot 2Na)、電気泳動用アガロースME(岩井科学、250g入り Cat.No.50013R)、エチジウムブロマイド

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

Super Script II RNase H⁻ 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 \cdot 2Na(pH8.0)100mlを蒸留水で1,000mlとする。

2. 操作上の注意

- 1) 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うこと。
- 2) 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。
- 3) RT-PCR反応液の調製をする部屋とPCR産物の電気泳動の部屋を分けることとし、それができない時には、それぞれの操作を別のクリーンベンチ内で行うこと、クリーンベンチで行う際にファンは止めること。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) 貝の中腸腺の処理（超遠心法）

本項ではノロウイルスによる食中毒の原因食品として最も重要視されている貝類の処理方法について記す。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。超遠心機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検体とし、貝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。）の検査を行う。シジミ、アサリ等のように中腸腺が1g以下の貝では中腸腺1gから1.5gを1検体として、3～5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ストマッカー用のサンプリングバッグに中腸腺をいれ、次いで7～10倍量のPBS(-)を加え粉碎する。貝類の乳剤は15%以上の濃度にしないこと。15%以上にするとRNAの回収率が悪くなる。
- (4) 粉碎した試料を遠心管に移す。
↓10,000rpm. 20分間冷却遠心し、上清を新しい試験管に採る。
- (5) 超遠心用遠心管に30%ショ糖溶液を遠心管量の10%程度入れ、それに(4)の遠心上清を静かに重層させる（ショ糖溶液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）。
↓35,000rpm. 180分間あるいは40,000rpm. 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 μ lのDDW（ミリQ水を高圧滅菌後、0.22 μ 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10,000rpm. 20分間の遠心を行い、その上清をRNA抽出に用いる。)

(注) 超遠心機を使えない時には以下の操作を行う。

2) ポリエチレングリコールによる濃縮方法

(1) 前項1) (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。

↓5,000~12,000rpm. 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滅菌した濾紙で吸い取る。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 μ lのに浮遊させる。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10,000rpm. 20分間の冷却遠心を行い、その上清をRNA抽出に用いる。

3) 貝の中腸腺の内容液を用いる方法

貝の内容液からのウイルス検出は、大型の貝(平貝、ウチムラサキ貝等を検査の対象とする場合に用いる方法である。カキ、アサリ、シジミ等の小型の貝類ではウイルス回収率が必ずしもよくないので、本法は適さない。

(1) 前項1)(2)において、中腸腺を内容液が漏れないように取り出し、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50℃程度のお湯ですばやく融解する)。

(2) 10,000rpmで20分間冷却遠心し、上層の液層を新しいチューブに採る。

(3) 得られた液をRNA抽出に用いる。ただし、QIAamp Viral RNA MiniキットによるRNAの抽出では560 μ lまでサンプルを添加でき、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機による濃縮を行い、200 μ lのDistilled water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12,000rpmで、20分間冷却遠心する。

3) 遠心上清の138 μ lをサンプルとして、次項5.の方法で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、また抽出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。ここでは QIAamp Viral RNA Mini キットの方法を紹介する。

QIAamp Viral RNA Mini キットは RNA 抽出に Carrier RNA が含まれており、RNA 抽出効率が高いが、前項4. のようなサンプルの調整が必要となる。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製

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 ヶ月間安定である。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。ただし、5 分間以内で、6 回以上の加熱は行わないこと。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 μ l を入れる。
- (2) 10%ふん便乳剤遠心上清(10,000rpm. 10 分間)を 138 μ l (増量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) とエコーウイルス 9 型 Hill 株を 2 μ 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 μ 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。
- (4) (3)の液 630 μ 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、6,000 \times g (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 μ l を入れ、同様に遠心し、全ての液が無くなるまで行う (サンプル量が 138 μ l のときには、この操作が 2 回で終わる)。
- (5) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW1 500 μ l を入れる。
- (6) 蓋を閉め、6,000 \times g (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 μ l を加え、20,000 \times g (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。
- (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 μ l を加え、蓋を閉めて1分間置いた後、6,000 \times g (8,100 rpm) で1分間遠心する。
- (10) このろ液が抽出 RNA であり、抽出 RNA は-80 $^{\circ}$ Cでの保存が望ましいが、-20 $^{\circ}$ C以下で1年間は安定である。

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、DNase 処理を行う。またそうすることで、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。したがって、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、チューブは高圧滅菌にかける。

- 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

試 薬	15 μ l 系	30 μ l 系
抽出 RNA	12.0 μ l	24.0 μ l
5 \times First-Strand Buffer ^{注1)}	1.5 μ l	3.0 μ l
Distilled water	0.5 μ l	1.0 μ l
DNase I(1U/ μ l)	1.0 μ l	2.0 μ l

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

- 2) 混合液調製後、37 $^{\circ}$ Cに30分間置く。
- 3) 次いで75 $^{\circ}$ Cに5分間置く。
- 4) 直ちに on ice(または4 $^{\circ}$ C)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 反応調製液を作製する。

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

	15 μ l 系	20 μ l 系	30 μ l 系	50 μ l 系
DNase 処理 RNA	7.5 μ l	10.0 μ l	15.0 μ l	30.0 μ l
5X SSII Buffer	2.25 μ l	3.0 μ l	4.5 μ l	7.0 μ l
10mM dNTPs	0.75 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
Random Primer(1.0 μ g) ^{注2)}	0.375 μ l	0.5 μ l	0.75 μ l	1.25 μ l
Ribonuclease Inhibitor (33unit/ μ l)	0.5 μ l	0.67 μ l	1.0 μ l	1.67 μ l
100mM DTT	0.75 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
Super Script II RT (200u/ μ l)	0.75 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
Distilled water	2.125 μ l	2.83 μ l	4.25 μ l	2.58 μ l

注2) : Random Primer の代わりに NV プライマー、エコーウイルス 9 型 Hill 株プライマーを用いても良い。

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

8. 1st PCR

1) 1st PCR は、ノロウイルスについては表 3. (G1 と G2 を別々に作製する)、エコーウイルス 9 型 Hill 株については表 4. の混合液を作製する。

表 3. ノロウイルス

1. Distilled water	33.75 μ l
2. 10 \times Ex Taq™ buffer	5.0 μ l
3. dNTP(2.5mM)	4.0 μ l
4. NV プライマー-F(25 μ M) ^{注3)}	1.0 μ l
5. NV プライマー-R(25 μ M)	1.0 μ l
6. cDNA(Template)	5.0 μ l
7. EX Taq(5unit/ μ l)	0.25 μ l
Total	50.0 μ l

表 4. エコーウイルス 9 型 Hill 株

1. Distilled water	33.75 μ l
2. 10 \times Ex Taq™ buffer	5.0 μ l
3. dNTP(2.5mM)	4.0 μ l
4. E9Hill-F プライマー(25 μ M) ^{注4)}	1.0 μ l
5. E9Hill-R プライマー(25 μ M)	1.0 μ l
6. cDNA(Template)	5.0 μ l
7. EX Taq(5unit/ μ l)	0.25 μ l
Total	50.0 μ l

注3) : プライマーの塩基配列は表 11.、図 3. を参照。

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(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。余裕がある場合は食品のときの1st PCRプライマーについても行う。ただし、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 11.、図 2.を参照。

注4) : エコーウイルス9型 Hill 株プライマー^{文献1)}

E9Hill-F 5' -GTT AAC TCC ACC CTA CAG AT-3' ポジション 5192-5211

E9Hill-R 5' -TGA ACT CAC CAT ACT CAG TC-3' ポジション5459-5440

PCR産物は268bpである。

2) PCR 反応

増幅は 94°C 3分を1サイクル、94°C 1分、50°C 1分、72°C 2分を40サイクル、72°C 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若干異なることもあるので、それぞれ最適な条件で行うと良い。

3) 電気泳動

PCR産物 8 μ l と 5 \times Loading buffer 2 μ 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 μ 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。

9. Nested PCR法

食品をサンプルとする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。ただし、Nested PCRを行う時にはコンタミの危険性が高いので細心の注意のもとに実施する。

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. Distilled water	36.75 μ l
2. 10 \times Ex Taq™ buffer	5.0 μ l
3. dNTP (2.5mM)	4.0 μ l
4. NVプライマー-F (25 μ M) ^{注5)}	1.0 μ l
5. NVプライマー-R (25 μ M)	1.0 μ l
6. 1st PCR産物	2.0 μ l
7. EX Taq	0.25 μ l
Total	50.0 μ l

注5) : ノロウイルスのプライマーは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-SKR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-SKRを用いたときにはG2-SKF/G2-SKR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と同様の条件で行うが、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。(前項8. 2)～5)を参照)

10. PCR結果の判定

- 1) RNA抽出のコントロールとして入れたエコーウイルス9型Hill株 (粒子数約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ではエコーウイルス9型Hill株、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。(=標的の部分が増幅されている。)

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ロウイルスと類似の配列が認められた時に陽性とする。

II ハイブリダイゼーション

A. マイクロプレートハイブリダイゼーション法

ここではPCR産物の確認試験としてのマイクロプレートハイブリダイゼーション法について記す。この方法はマイクロプレート上でハイブリダイゼーションを行うもので、洗いが簡単であり、反応は酵素抗体法と同一である^{文献2)}。42℃でハイブリダイゼーションを行うと、80%以上の相同性のときに陽性となる。ハイブリダイゼーションの温度を上げるとさらにその感度は高まる^{文献3)}。

1. 必要な器具と試薬

1) 器具

恒温器、ヒートブロック、電気泳動装置、UV 照射写真撮影装置、マイクロプレートリーダー、UV 防御メガネ、サーマルサイクラー、マイクロ冷却遠心機 (15,000rpm)、ウォーターバス、メス、フナゲルチップ (フナコシ、CaT. No. DR-50)、マイクロピペット (2, 20, 200, 1000 μ l)、マイクロプレート (NUNC-IMMUNO PLATE Cat. No. 442404)

2) 試薬

MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN, Cat. No. 28604)、ホルムアミド、Tween20、サケ精子 DNA、マイクロプレートシール、ペーパータオル、ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ (BIOSOURCE, Cat#SNN1004)、リン酸水素二ナトリウム、クエン酸、30%過酸化水素、硫酸、T3, 3, 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ウシ血清アルブミン (BSA) (SIGMA, Cat No. A-2153)、3M 酢酸ナトリウム (pH5.0)、100%イソプロパノール、PBS-T (PBS (-) +0.5%Tween20)

2. ゲルからのDNA抽出法 (MinElute Gel Extraction KitによるPCR産物の精製)

ゲルからの DNA の抽出には多くの方法があり、また抽出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。ここでは、MinElute Gel Extraction Kit を用い、マイクロ遠心機を利用する方法を示す。

このプロトコールは、TAE buffer または TBE buffer の標準的なアガロースゲル、

あるいは低温融解アガロースゲルから、70bp~4kb の DNA フラグメントを高い最終濃度で抽出、精製することができる。1 個のスピнкаラムにつき、最大 400mg のアガロース処理が可能である。Buffer QG は pH7.5 以下の時、黄色になる。すべての遠心操作は、一般的な卓上遠心機で $\geq 10,000 \times g$ (~13,000rpm) で行う。

1) 使用前に行う試薬の調製

- (1) 使用前に Buffer PE にエタノール (96~100%) を添加する (添加容量は試薬ボトルのラベルを参照)。
- (2) 3M の酢酸ナトリウム溶液 (pH5.0) が必要な場合がある。

2) 操作法

- (1) 清潔で刃の鋭いメスあるいはフナコシのフナゲルチップでアガロースゲルから DNA フラグメントの部分を取り取る。余分なゲルを取り除いて、ゲルスライスのサイズを最小とする。
- (2) 1.5ml のチューブにゲルスライスを入れ、重さを測る。サンプルゲル (100mg = 100 μ l とする) に対して 3 倍容量の Buffer QG を添加する。
- (3) 50°C で 10 分間 (ゲルが完全に溶解するまで) インキュベートする。ゲルの溶解を助けるため、インキュベーション中、2~3 分に 1 度チューブを Vortex にかけて溶液を混合する。2% 以上のゲルを用いる場合は、インキュベーション時間を長くする。
- (4) ゲルスライスが完全に溶解後、溶液の色が黄色であることを確認する (アガロース溶解前の Buffer QG の色とほぼ同じ)。なお、溶液の色がオレンジ色あるいは紫色の場合は、3M 酢酸ナトリウム (pH5.0) を 10 μ l ずつ添加混合し、溶液の色が黄色になるようにする。(DNA のメンブレンへの吸着は、pH7.5 以下においてのみ効率的に行われるので、pH 指示薬により pH7.5 以下で黄色、それより高い pH ではオレンジまたは紫色を呈する Buffer QG は、DNA 結合に最適な pH を決定するのに大変便利である。)
- (5) ゲルと同容量のイソプロパノールをサンプル溶液に添加し、例えば、100mg のアガロースゲルスライスには、100 μ l のイソプロパノールを添加する。チューブを 10 回上下混合する。
- (6) ラックにセットした 2ml コレクションチューブに MinElute カラムを乗せる。
- (7) サンプルを MinElute カラムに添加し、DNA をカラムに結合して、1 分間遠心する。最大の回収率を得るために、サンプル液は残さず全てカラムに添加する。カラムへ 1 度に添加可能な最大容量は 800 μ l である。800 μ l よりサンプル量が多い場合には、数回に分けて添加、遠心操作を行う。
- (8) フロースルー液は捨て、MinElute カラムを同じコレクションチューブに再度

の乗せる。

- (9) 500 μ l の Buffer QG をスピncラムに添加し、1 分間遠心する。
- (10) フロースルー液は捨て、Min Elute カラムを同じコレクションチューブに再度乗せる。
- (11) 洗浄のため、750 μ l の Buffer PE を MinElute カラムに添加し、1 分間遠心する。
- (12) フロースルー液を捨てた後、MinElute カラムをさらに 1 分間 $\geq 10,000 \times g$ ($\sim 13,000$ rpm) で遠心する。
- (13) 新しい 1.5ml のマイクロ遠心チューブに MinElute カラムを乗せる。
- (14) DNA の溶出を行うために、10 μ l の Buffer EB (10mM Tris-Cl, pH8.5) あるいは DDW をメンブレン表面の中央に添加し、1 分間カラムを放置後、1 分間遠心する。
遠心によって得られた溶液が、抽出 DNA である。

3. ハイブリダイゼーション

- 1) 抽出 DNA を 0.5ml のチューブに取り、1.5M NaCl buffer^{注6)} で、電気泳動時のバンドの濃さに応じ適宜希釈する (DNA 量は 200ng/ml 程度の濃度とする)。なお通常の PCR でバンドがしっかりとみられた増幅 DNA (PCR 産物 8 μ l を泳動) は 5 ~ 20 倍希釈して用いる。

↓ 98°C、5 分間加熱処理、直ちに on ice する。

- 2) マイクロトレイに固定化液^{注7)} を 90 μ l 入れ、それに加熱処理した DNA を 10 μ l ずつ 1 検体当たり 3 ウェルに入れる (プローブが 2 種類の時、通常プローブの数 + 1)。

注6) : 3 倍濃度 1.5M NaCl buffer : 4.5M NaCl、30mM リン酸二ナトリウム、30mM EDTA \cdot 2Na、pH7.0 (3 倍濃度 1.5M NaCl buffer を使用時には 3 倍希釈して用いる)

注7) : 固定化液 : 3 倍濃度 1.5M NaCl buffer 3.0ml、DDW 6.0ml

試 薬	1	2	3	4	5	6	7
	A	N	G	G	検	検	検
	C	1	2	体	体	体	
Control	○	○	○	○	○	○	○
RING1-Tp(a), (b) probe	○	○	○	○	○	○	○
RING2-Plate probe	○	○	○	○	○	○	○

図 1. トレイのレイアウト

↓プレートにシールし、37℃恒温槽に重しをして沈めて2時間以上置く。

- 3) PBS-Tでプレートを3回洗浄する。
- 4) 表6.に示したようにプローブの調製を行い、98℃、5分間加熱処理後、直ちに on ice する。

表6. プローブの調製 (1検体当たり)

	プローブ コントロール	RING1-Tp (a), (b) ビオチン標識プローブ	RING2-Plate ビオチン標識プローブ
100pmol/ μ l プローブ (プローブ・コントロールはTE)	TE 1 μ l	RING1-Tp (a) プローブ RING1-Tp (b) プローブ 各 0.5 μ l	RING2-Plate プローブ 1 μ l
100 μ g/ml サケ精子 DNA ^{注8)}	5 μ l	5 μ l	5 μ l
3倍濃度 1.5M NaCl buffer	3.3 μ l	3.3 μ l	3.3 μ l
DDW	0.7 μ l	0.7 μ l	0.7 μ l

注8) : サケDNAはDNA量10mg/mlのものをT₁₀E₁緩衝液で100 μ g/mlに希釈したもの

- 5) 表7.に示したようにハイブリダイゼーション液を調製し、4)のプローブ・サケ精子DNA混合液に合わせる。

表7. ハイブリダイゼーション液(1検体当たり)^{注9)}

3倍濃度 1.5M NaCl buffer	30 μ l
ホルムアミド	50 μ l
10% Tween20	1 μ l
DDW	9 μ l

注9) : ハイブリダイゼーション液は使用前に冷やしておく。

- 6) 5)の混合液を各ウェルに100 μ lずつ入れる。

↓ プレートにシールをし、45℃恒温槽に重しをして沈め、6時間以上あるいは1夜置く。

- 7) シールのプレート側を内側にして巻き込むように剥がす(プレート内のDNAを撒き散らさないように包み込む)。45℃に温めておいたPBS-Tで3回洗浄する。プレート洗浄時にはプレートをペーパータオル等で包み、その後叩き水分を完全に除くと同時にDNAを周りに撒き散らさないように細心の注意を払う。使用したペーパータオル、洗浄液等は1000ppmの次亜塩素酸ソーダに漬ける。

streptavidin標識ペルオキシダーゼ (1%BSA+PBS-Tで適宜希釈したもの)

を全てのウェルに 100 μ l 入れる。ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ入れた容器は使用後廃棄するか高圧滅菌し、酵素を不活化する。

↓室温 1 時間置く (軽く振とうするとよい)。

- 8) プレートを PBS-T で 5 回洗浄する。
- 9) 全てのウェルに発色液^{注10)}を 100 μ l 入れる。

^{注10)} : TMB 1mg、DMSO 1ml、phosphate-citrate buffer 9ml (0.2M リン酸水素二ナトリウム 25.7ml、0.1M クエン酸 24.3ml、DDW 50ml、pH5.0) を作製し、30%過酸化水素水 2 μ l を使用直前に入れる。

↓室温 15 分間 (プレートは遮光しておく)。

- 10) 停止液 (4N 硫酸) を 50 μ l 入れる。
- 11) 450nm で吸光度を測定する。
- 12) 判定: コントロールに比べ OD 値が 2 倍以上、かつ 0.2 以上の差が認められた時に陽性とする。

B. ドットハイブリダイゼーションによるノロウイルス遺伝子確認検査

この方法はメンブレンに DNA を吸着させて行う方法である。他のウイルスでは一般的にこの方法が用いられている。

1. 必要な器具と試薬

1) 器具

恒温水槽、ハイブリダイゼーションインキュベーター、トランスイルミネーター、ヒートシーラー、ポジティブチャージナイロンメンブレン: Nylon membranes, positively charged ベーリンガー Cat.No. 1209272、ハイブリダイゼーションバッグ: ニッポンジーン, Cat.No. 533-19171、タッパー: 井内 Code.No. 45-068-022)

2) 試薬

塩化ナトリウム (NaCl)、濃塩酸、DDW、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、マレイン酸、塩化マグネシウム ($MgCl_2$)、

20×SSC: NaCl 100g を 900ml の DDW に溶解 (68°C) し、濃塩酸で pH7.2 に調整後、DDW で、1000ml とする。

10% SDS: SDS 100g を 900ml の DDW に溶解 (68°C) し、濃塩酸で pH7.2 に調整後、蒸留水を加え全量を 1000ml とする。

N-Lauroylsarcosine: SIGMA, Cat.No. L-5777

ホルムアミド: Wako, Cat.No. 068-00426

Blocking reagent: ベーリンガー Cat.No. 1096176