

図4 従来の逆転写方法による semi-nested RT-PCR (NoV-GII.4)

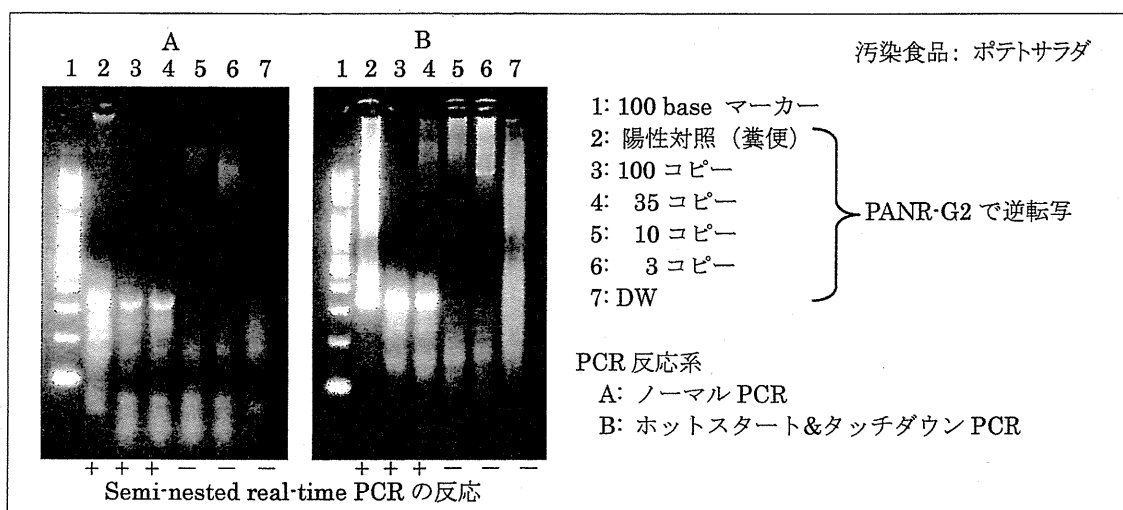


図5 逆転写反応専用プライマーを用いた semi-nested RT-PCR (NoV-GII.4)

考えられたため、表1に示すとおり逆転写反応専用プライマーを設計した。設計にあたっては現行の real-time PCR の原著²²⁾に記載のあるウイルス株の配列を参照し、G1SKR や G2SKR より3'側に保存領域を求めたが、全てのウイルス株をカバーできる領域は見つからなかった。そこで、ウイルス株を部分的な相同性を指標に2~3のグループに分割し、それぞれに対応するプライマーを混合使用する方針をとった。次によりこうして得られたプライマー配列が AT-rich で Tm が低く、そのままでは反応効率に影響するため改良を加えた。PANR-G2 では塩基長を長くすることで十分な Tm を確保することができた。PANR-G1 は、塩基長を長くすると縮重度(特異性に影響する)がランダムプライマーと変わらなくなることから、LNA (Locked Nucleic Acid)

修飾^{23,24)} を使って強制的に Tm を上昇させた。このような方針で設計された逆転写反応専用プライマーを用いて cDNA を合成し、semi-nested RT-PCR を行ったところ、図5Aに示すとおり35コピー/gの汚染レベルまで明瞭な増幅バンドが観察され、それをシークエンスしたところ最初に添加したNoVのものであることが確認された。また、2nd.PCRをreal-time PCRで行った結果とも一致した。

3.4 PCRの反応系の検討

逆転写反応専用プライマーを用いることで、ブ菌遺伝子の混入を抑制し、遺伝子解析可能なNoV増幅断片を得ることが可能になった。一方で、現在用いられているPCRの反応系は10年以上前のプロトコルを踏襲しており、より高度

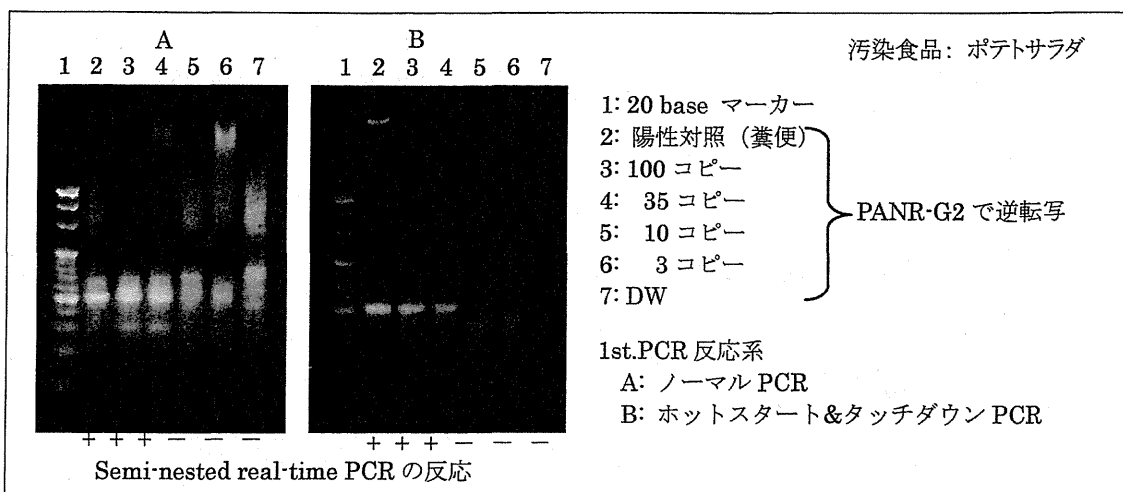


図 6 1st. PCR 反応系の semi-nested real-time PCR への影響 (NoV-GII.4)

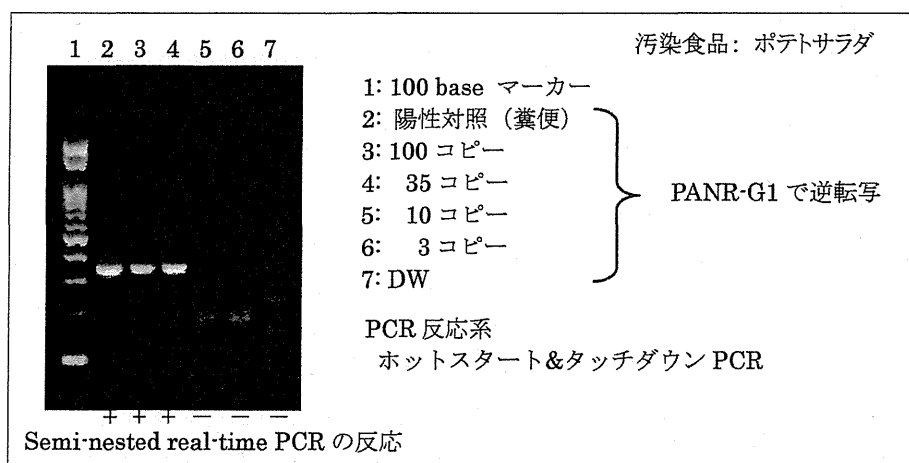


図 7 逆転写反応専用プライマーを用いた semi-nested RT-PCR (NoV-GI.4)

な機能を付加された最新の酵素を活用できていない。そこで、パントラ法の開発を機に PCR 反応系の改良を試みた。図 5B にはホットスタート機能を備えた酵素を用いたタッチダウン PCR による semi-nested RT-PCR の効果を示した。従来の反応系 (ノーマル PCR) である図 5A と比べると増幅バンドがより明瞭になっているのがわかる。そのバンドをシーケンスしたところ、添加したウイルスのものであることが確認できた。また、semi-nested real-time PCR の結果とも一致している。図 5A と図 5B の semi-nested real-time PCR の反応液を回収して電気泳動を行ったものが図 6 である。1st. PCR をノーマル PCR で行った図 6A と比べて、ホットスタート&タッチダウン PCR を行った図 6B の方が非特異的なバンドが少ないのがわかる。この差は、real-time PCR の機器画面における蛍光強度 (増幅カーブ

の高さ) の違いとなって現れる。

3.5 NoV-GI への対応

これまでの検討で、逆転写反応専用プライマーによる cDNA 合成と、ホットスタート&タッチダウン PCR が有効であることが判明したため、引き続き NoV-GI に対する検討を行った。逆転写反応専用プライマーは表 1 に示したとおりである。ポテトサラダを用いた検討では、35 コピー/g の汚染レベルまで semi-nested RT-PCR により明瞭なバンドが認められた (図 7)。このバンドをシーケンスしたところ、添加ウイルスのものであることが確認された。また、semi-nested real-time PCR の結果とも一致した。一方で、逆転写反応専用プライマーである PANR-G1a は、十分な Tm を確保するために LNA 修飾を用いていることから、図 8 においてその効果を検証し

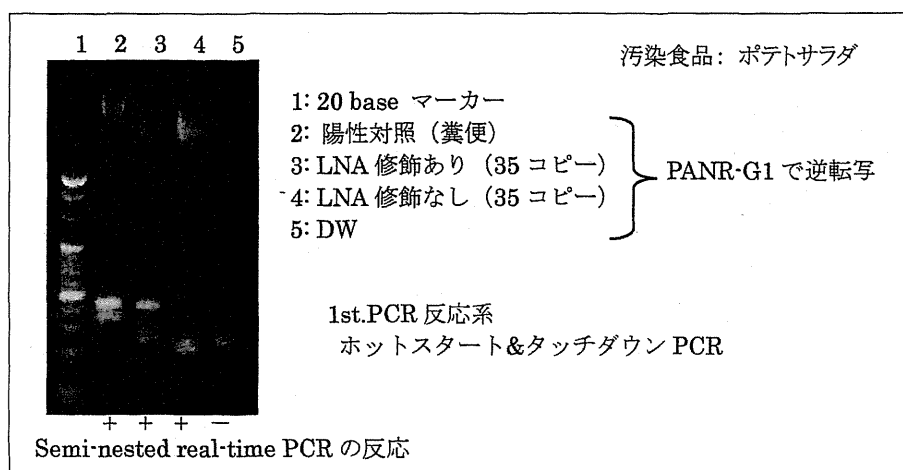


図8 Semi-nested real-time おける LNA 修飾塩基の効果 (NoV-GI.4)

た。LNA 修飾をしていない PANR-G1a の配列で合成したプライマーでは増幅が弱いことがわかる (図8 レーン4)。

4. 考察

4.1 混入するブ菌遺伝子の功罪

本法は食品乳剤にブ菌を投入して、菌体表面にウイルス粒子を吸着させて回収することを基本原理とするため、抽出された RNA にブ菌の遺伝子が大量に混入してくるという性質がある。ブ菌の遺伝子は、極微量のウイルス RNA を安定的に保持するキャリアーとして働くため、検出感度に対してはプラスの効果がある。このことは、サザンブロットハイブリダイゼーション等において、極微量のプローブに大量のサケ精子 DNA を添加するのと同じ理由である。その一方で、検出された遺伝子をさらに詳しく解析しようとする際に妨害物質になるという問題が明らかとなった。しかし、純粋な Protein A を固定化したビーズを使用すると、上記のキャリアー効果が得られなくなることに加えて、単位体積当たりの表面積が小さい (粒子径が大きいため) ことから、十分な感度が得られないことがわかっている。従って、ブ菌遺伝子のキャリアーとしての長所を活かしつつ、遺伝子解析の障害とならないような方法を考案する必要があった。

4.2 逆転写反応と PCR で使用するプライマーと、検出プロセスで起こり得る反応

逆転写反応や PCR には多くの種類のプライマーが用いられるが、本研究の課題においては個々のプライマーの特異性を検討しても有効な策が

打ち出せないことは、

$$[PT]=K[P][T]$$

の式から明らかである (K のみを最適化しても、圧倒的に大量に存在するブ菌の [T] には抗し得ない)。そこで、逆転写反応→1st. PCR→2nd. PCR の3段階の反応を一つのものに見なして、どのような反応が起こっているかを理論的に検討し、実験で確認する作業を行った。ランダムプライマーで逆転写反応を行うと、100 コピー/g 以下の低濃度汚染サンプルでは、全く増幅が起らなかった (図4 レーン3~6)。この場合は、NoV もブ菌も含めて反応系に存在する全ての RNA が基質となるため、逆転写酵素の能力をはるかに超えてしまった (酵素反応速度が飽和した) 状態になっているものと考えられる。オリゴ (dT) を用いた逆転写反応も同様と予測される。

G2SKR のような PCR と同じ NoV 特異的プライマーを使うと、ランダムプライマーよりはブ菌に対する K が小さくなるため、相対的に NoV の RNA を逆転写する割合は増えることが予想される。しかし、ブ菌に対する非特異反応もゼロではなく、元々ブ菌の [T] が圧倒的に大きいため、無視できないくらいのブ菌由来 cDNA が生じることになる。その cDNA は末端が G2SKR の配列になっているため、1st. PCR ではホモロジー100%で効率よく増幅される。最初から多かったブ菌の遺伝子がこの段階でさらに増えるため、NoV の PCR 産物に混入して解析の障害となる (図4 レーン8~11)。

本研究で設計した逆転写反応専用プライマーで cDNA を合成した場合、上記のごとく非特異

反応はゼロではないためブ菌の cDNA が生じるころまでは同じである。しかし、それに続く 1st. PCR でもブ菌の非特異増幅反応は起こるものの、それは逆転写反応時の非特異反応とは異なる、新しい種類の反応が 1 からやり直しとなる。2nd. PCR に移行した際も、ブ菌由来の非特異増幅反応は別の種類のものになる。ここまですべてを総括すると逆転写反応→1st. PCR→2nd. PCR の 3 段階の反応において、NoV 遺伝子だけが連続したプロセスで効率よく増幅をはたし、ブ菌の非特異反応は 2 か所の矢印の部分でリセットされるため、結果として天文学的な初期濃度の差を超えることが可能になるものと考えられた。このことは、図 5 と図 7 において、遺伝子解析可能な NoV の増幅断片が得られたことで確認できた。検出限界は、NoV-GI と NoV-GII のいずれも食品 1 g 当たり 35 コピーであり、予備試験の結果 (図 2, 3) が再現された。

4.3 PCR 反応系の見直し

現在 NoV 検出のために常用されている PCR 反応系は、10 年以上前に作成されたプロトコルを踏襲しており、最新の生命工学の成果を享受できていない部分もある。かつては、PCR に用いる耐熱性 DNA ポリメラーゼに関して選択の余地はほとんど無かったが、近年は反応速度・正確性・阻害物質耐性などの機能を付加した酵素を目的に応じて使い分けることが可能となっている。本研究の目的が、ブ菌の遺伝子に由来する非特異反応の抑制であることから、ホットスタート機能を備えた酵素によるタッチダウン PCR を用いることでさらなる改善が見込めるものと期待された。こうした改善は、図 5B に示すとおり、増幅バンドの明瞭化として観察することができた。また、real-time PCR においてコピー数算定に直接関与する Ct 値 (増幅曲線の横軸) のみが着目され、蛍光強度 (縦軸) はあまり重視されてこなかったという問題がある。しかし、蛍光強度が低い状態での運用は、実事例の大部分を占めると想定される低レベル汚染サンプルにおいて、検出結果が不安定になるため看過し得るものではない。蛍光強度低下の原因には様々な要素があるが、非特異反応によって

1st. PCR の段階で COG2F と G2SKR が "初めて" 反応系に加えられるところに意義が見出される。DNA ポリメラーゼの活性が NoV 遺伝子以外の増幅に奪われる (競合阻害) ことが大きく影響している。図 6 に示すとおり、ホットスタート & タッチダウン PCR によって、増幅時の非特異反応は大幅に抑制されており、real-time PCR における蛍光強度を確保することに寄与するものと考えられた。

4.4 LNA 修飾塩基導入の効果

NoV-GI に対応した逆転写反応専用プライマーである PANR-G1 を構成するオリゴヌクレオチド PANR-G1a には LNA 修飾塩基が用いられた。この措置は、PANR-G2 のように塩基長を延ばすことでは Tm を確保できない事情 (変異が多すぎてランダムプライマーと同じになる) によるものである。LNA 修飾の効果を検証するために、修飾を施していないオリゴヌクレオチドと比較したものが図 8 であり、レーン 3 と 4 を比較すると増幅効率の違いは明らかである。

4.5 実事例へ適用と今後の課題

本研究で得られた知見を総括すると、パントラ法によって抽出された RNA については、図 9 に示したプロセスで検出を試みるのが妥当と考えられる。ここで構築されたプロトコルは、島根県浜田市の仕出し弁当による食中毒事例²⁵⁾や、静岡県浜松市の学校給食パンによる食中毒事例²⁶⁾に実際に適用されたことで、十分実用に耐えるものであることが証明された。また、厚生労働省通知²⁷⁾に記載されたことで、今後導入を進める機関が拡大するものと予想される。表 1 に記載したプライマーは、将来の状況によって柔軟に変更し得るが、PCR で用いるプライマーとは異なる逆転写反応専用プライマーを設定することが、検出後に遺伝子解析を実施するのに不可欠である。NoV 以外の食中毒起因ウイルスについてもパントラ法が適用できることがすでに明らかとなっているが、遺伝子解析まで踏み込むためには逆転写反応専用プライマーの設計を進める必要がある。

一方で、本法が普及するにつれて、実験室内

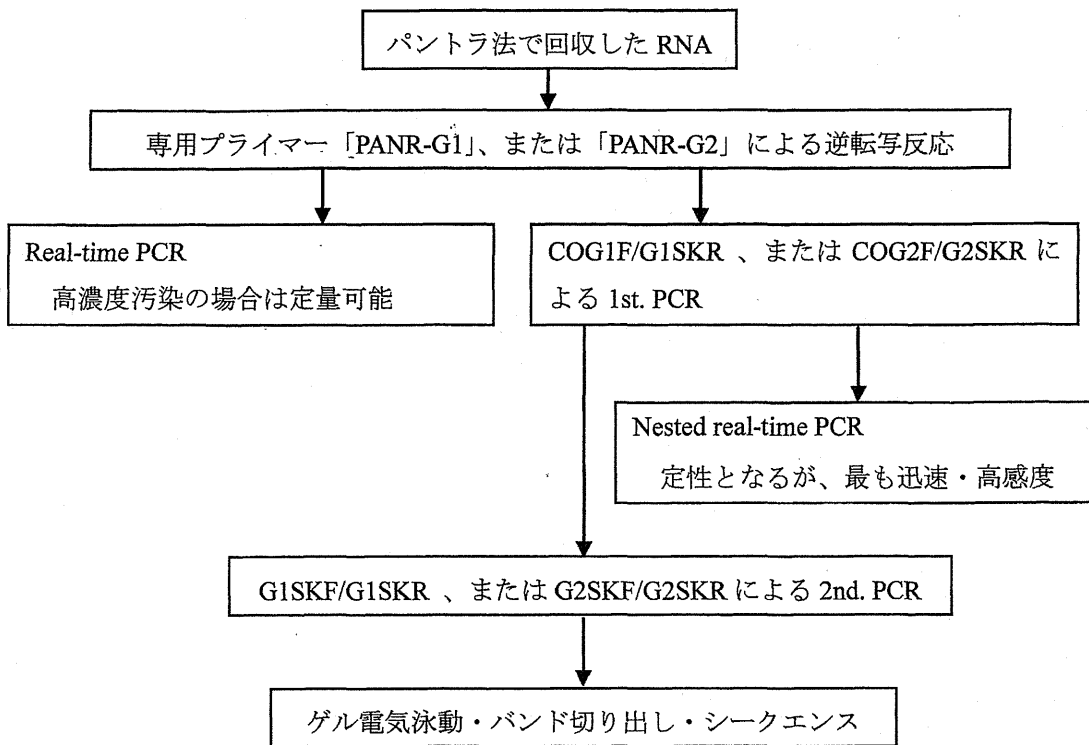


図9 パントラ法による RNA 抽出後のプロセス

汚染による偽陽性の問題が浮上してくることが想定される。本研究では遺伝子解析可能な RNA を得る手法を開発することができたが、それは両刃の剣であることに留意する必要がある。すなわち、遺伝子解析を積極的に実施すれば、それだけ作業環境中の PCR 増幅産物汚染が蓄積されて、新規の食品検査において悪影響を及ぼすというジレンマである。これまでは、作業する実験室を分けて、器具や試薬を分別使用するなど、実験操作を慎重に行うということ以外に積極的な偽陽性対策は取られてこなかった。しかし、食品のウイルス検査が現実的なものとなった段階では、その社会的な影響に鑑みて、一層の偽陽性対策を講じる必要があるものと考えられる。

さらに、本法が有効に活用されるためには、適切な食品サンプルの確保が重要である。具体的には、実際に食卓に供せられる段階の検食（調理から盛り付けのプロセスを経たもの）を保存するという原則を、事業者に周知する必要がある。

5. まとめ

開発途中で浮上した、抽出 RNA の遺伝子解析が困難であるという問題に対して解決策を見出した。PCR で用いるものとは異なる専用プライマーを用いて逆転写反応を行うことで、検出された遺伝子のシーケンスを確認することが可能となった。この方法は島根県浜田市や静岡県浜松市で発生した実際の食中毒事例で活用することができた。今後は、ノロウイルス以外の食中毒起因ウイルスへの対応と、実事例への適用例が増えるにつれて問題となることが予想される偽陽性の抑制が課題となる。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター, 国立感染症研究所ウイルス第二部:ノロウイルス集団発生事例に対して感染症および食品部局が共同で実施する初期実地疫学調査および微生物学的検査のポイント(第1版:平成19年11月18日付け), 2007, 16-17.
- 2) 丸山務(監修):改訂 ノロウイルス現場対策, 2007, 35-36.

- 3) 薬事・食品衛生審議会 食品衛生分科会食中毒部会: ノロウイルス食中毒対策について(提言), 2007, 1-2.
- 4) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業・食品中のウイルスの制御に関する研究 平成 19 年度 総括・分担研究報告書, 2008, 103-111.
- 5) 東方美保, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収(検討2), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成 19 年度 総括・分担研究報告書, 2008, 125-133.
- 6) 斎藤博之, 他: 食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の開発, 秋田県健康環境センター年報, 4, 2008, 75-81.
- 7) 東方美保, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収検討(第1報), 福井県衛生環境研究センター年報, 7, 2008, 69-72.
- 8) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良(検討1), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成 20 年度 総括・分担研究報告書, 2009, 27-38.
- 9) 東方美保, 他: パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良(検討2), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成 20 年度 総括・分担研究報告書, 2009, 181-190.
- 10) 斎藤博之, 他: 食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の実用性向上に関する研究, 秋田県健康環境センター年報, 5, 2009, 54-62.
- 11) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検査法の構築(検討1), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成 21 年度 総括・分担研究報告書, 2010, 45-60.
- 12) 東方美保, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検査法の構築(検討2), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成 21 年度 総括・分担研究報告書, 2010, 187-197.
- 13) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法による食品中のノロウイルス検査法の構築, 秋田県健康環境センター年報, 6, 2010, 59-69.
- 14) 斎藤博之, 他: 食品検体の病原ウイルス検出を可能にした汎用型パンソルビン・トラップ法の開発, 秋田県健康環境センター年報, 7, 2011, 43-53.
- 15) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法による食品からのウイルス検出法, 病原微生物検出情報, 32, 12, 2011, 4-5.
- 16) 斎藤博之, 他: 食品中のウイルス検査に向けてのパンソルビントラップ法の汎用化, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究 平成 22 年度 総括・分担研究報告書, 2011, 45-57.
- 17) 斎藤博之: 食品のノロウイルス検査の汎用化を目指したパンソルビン・トラップ法の開発, 日本食品微生物学会雑誌, 29, 1, 2012, 32-37.
- 18) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法の実用上の問題点解決に向けた検討, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究 平成 23 年度 総括・分担研究報告書, 2012, 43-60.
- 19) 斎藤博之, 他: 自家調製したパンソルビン相当品による食品中のノロウイルス検出法の検討, 秋田県健康環境センター年報, 8, 2012, 71-78.
- 20) 三好龍也, 他: 食品中からノロウイルス遺伝子が検出された食中毒事例, 病原微生物検出情報, 32, 12, 2011, 13-14.
- 21) Kojima S., et. al.: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. J. Virol. Method, 100, 2002, 107-114.
- 22) Kageyama T., et. al.: Broady reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol., 41, 2003, 1548-1577.

- 23) Michael P., et. al.: LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *TRENDS in Biotechnology* **21**, 2003, 74-81.
- 24) Latorra D., et. al.: Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *J. Mol. Cell Probes* **17**, 2003, 253-259.
- 25) 飯塚節子, 他: パンソルビン・トラップ法による食品からのノロウイルス遺伝子の検出—弁当屋を原因施設としたノロウイルス集団食中毒事例—, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究 平成 24 年度総括・分担研究報告書, 2013, 175-180.
- 26) 古田敏彦, 他: 浜松市内におけるノロウイルス集団食中毒事例, 病原微生物検出情報, **35**, 7, 2014, 4-5.
- 27) 厚生労働省通知: 「ノロウイルスの検出法について」の一部改正について, 食安監発 1022 第 1 号, 平成 25 年 10 月 22 日.

厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 (H25~27年度)

食品からのウイルス検出法としての パンソルビン・トラップ法の精度向上に関する研究

齋藤博之 秋野和華子 野田 衛*¹

パンソルビン・トラップ法は、食品検体に含まれるウイルス粒子を黄色ブドウ球菌の表面に吸着させて回収することを基本原理としている。その性質上、抽出された RNA には大量の黄色ブドウ球菌由来の遺伝子が混入することになるが、極微量のウイルス RNA を安定的に保持するキャリアーとして働くため、検出感度に対してはプラスの効果が見込める。その一方で、大量の黄色ブドウ球菌の遺伝子の中に含まれるウイルス遺伝子を検出するという特異な条件下での反応であることから、試験機関によって検出精度がバラつくという問題が指摘された。そこで、検出結果に差を生じやすい箇所について反応条件等を最適化する必要があった。このことから、次の事項について検討した。① α -Amylase 粉末に含まれる賦形剤が残留すると、検出感度に影響することから、これをあらかじめ除去した酵素液を調製しておくことで対応した。液化調製品は -20°C で2ヶ月以上安定保存でき、粉末を直接投入した場合と同等の効果があることを確認した。②黄色ブドウ球菌由来 DNA を除去する方法として、RNA 抽出過程でのオンカラム DNase 処理と、RNA 抽出後の易熱性 DNase 処理の2通りを実施できるようにした。いずれの方法を用いても、これまでの DNase 処理で問題となったコピー数の低下は起こらなかった。③逆転写反応は、 58°C での高温逆転写反応が非特異反応による感度低下を抑制するのに有効であった。④PCR 反応は酵素製品の選択が重要であり、特にホットスタート仕様が必須であることが確認された。

1. はじめに

ウイルス性食中毒の対策として二枚貝の汚染実態調査や、調理従事者への衛生教育等が進められてきている^{1,2)}。しかしながら、原因として疑われる食品からのウイルス検出は、その作業の困難さからこれまでほとんど検討されてこなかったため、具体的な汚染ルートの解明に決め手を欠いていた。原因物質としてはノロウイルス (NoV) が大部分を占めているが、他にもサポウイルス (SaV) やアデノウイルス 41 型 (AdV41) に代表される腸管系アデノウイルスも含まれている。さらに、輸入食品等が原因と考えられる A 型肝炎ウイルス (HAV) 感染者の報告が急増するなど、食品中のウイルスを検出する方法の確立が急務となっている³⁾。平成 19~21 年度に実施された厚生労働科学研究費補助金「食品中のウイルスの制御に関する研究」(H19-食品-一般-016)において、固形、液状、練り物、油物などの一般的な食品から NoV を検出する手法としてパンソルビン・トラップ法 (パントラ法) を開発し、この問題を解決す

るための糸口を見出すことができた⁴⁻¹³⁾。その後、平成 22~24 年度に実施された厚生労働科学研究費補助金「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」(H22-食品-一般-013)において、市販のガンマグロブリン製剤を利用することで添加抗体の安定供給が図られた他、検出した遺伝子の塩基配列解析も可能な方法として発展させることができた¹⁴⁻¹⁸⁾。一方、平成 24 年度に実施した共通試薬と共通検体を用いたコラボ・スタディにおいて、試験機関ごとの結果のバラつきが問題となった¹⁹⁾。そこで本研究では、結果に差が生じやすい箇所に着目し、反応系等を最適化することによって検出精度を向上させるための検討を行った。

2. 方法

2.1 研究材料

実験に用いる食品として、市販されているきな粉とポテトサラダを用いた。また、検出対象となるウイルスとして、NoV-GII.4 (AB293424) を含む糞便を用いた。

*1 国立医薬品食品衛生研究所

2.2 試薬類

2.2.1 食品洗滌液

Tris-HCl (pH8.4) - 0.5 M NaCl - 0.1% Tween20 を調製して使用した。

2.2.2 5%ガンマグロブリン製剤

米国 Baxter 社の 5% 静注用ガンマグロブリン製剤「Gammagard」を用いた。Alfresa Pharma 社から購入した。

2.2.3 パンソルビン

黄色ブドウ球菌を熱処理してホルマリン固定したものの懸濁液で、メルク社から購入した。

2.2.4 フェノール系 RNA 抽出キット

TRIZOL-LS (invitrogen) を使用した。

2.2.5 カラム方式の RNA 抽出キット

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を使用した。

2.2.6 再懸濁液

2.2.5 の抽出キット添付の AVL 液を用いた。

2.2.7 DNase I (RT Grade) 及び RNase inhibitor

ニッポンジーンの製品を使用した。

2.2.8 Heal-labile double strand specific DNase (HL-dsDNase: 易熱性 2 本鎖特異的 DNase)

ノルウェー ArcticZymes 社から購入した。

2.2.9 アミラーゼ

枯草菌由来 α -Amylase 粉末 (和光純薬) を使用した。

2.2.10 食品処理袋

サニスペックテストバッグ (アズワン) を使用した。

2.2.11 conventional PCR 用酵素

表 1 に記載したものを使用した。

2.2.12 逆転写酵素

表 2 に記載したものを使用した。

2.2.13 抗 Taq モノクローナル抗体

anti-Taq high (東洋紡) を使用した。

2.2.14 逆転写反応に用いたプライマー

逆転写反応専用プライマー PANR-G2¹⁸⁾ を用いた。

2.2.15 conventional PCR に用いたプライマー

COG2F²⁰⁾ / G2SKR²¹⁾, または G2SKF²¹⁾ / G2SKR のプライマーセットを用いた。

2.2.16 conventional PCR 装置

アステック社製「PC-320」を用いた。

2.2.17 real-time PCR 装置

ロシュ社製「LightCycler 320S」を用いた。

2.2.18 real-time PCR 用酵素

ロシュ社製「LightCycler FastStart DNA Master PLUS Hybridization Probes」を用いた。

2.2.19 real-time PCR 反応系

Kageyama²¹⁾らの方法に従った。

2.3 結果の差が生じやすい箇所の想定

試験機関によって結果のバラつきが生じやすい部分として、次の 4 箇所を想定した。この内、(1) はウイルス RNA 抽出段階 (狭義のパントラ法) のものであり、(2) ~ (4) は抽出した RNA の検出段階に相当する。

(1) α -Amylase 粉末の不溶性成分の残留に関する問題

(2) 抽出した RNA 溶液に対する DNase 処理の問題

(3) 逆転写酵素の選定と反応条件最適化

(4) PCR 酵素の選定と反応条件最適化

なお、プロトコル上の順番は (1) → (4) であるが、最適化にあたっては逐次結果を観察しながら行う必要があるため、検討の順番は (4) → (1) とした。すなわち、最初に (4) の検討と最適化を行い、次に (3) を検討する (最適化済みの (4) を用いて結果を観察する) という順になる。

2.4 パンソルビン・トラップ法の全体の手順

図 1 に示した汎用プロトコルに従った。本研究では、各種酵素の選択と反応条件の最適化のために、「パントラ抽出物」による負荷試験を行った。「パントラ抽出物」は、ウイルスを含まない市販のきな粉からパントラ法のプロトコルを用いて調製した。

2.5 PCR に関する検討

NoV 検査のために国立感染症研究所より配布されている定量コントロール DNA を蒸留水、及びパントラ抽出物で段階希釈することで、 $10^5 \sim 10^1$ コピー / μL の NoV 遺伝子配列由来 DNA 断片を含む被検体を調製した。これらを、表 1 に示した 32 種類の PCR 反応系で増幅効率を比較した。プライマーセットは G2SKF / G2SKR を用い、反応容量 25 μL 中に上記被検体が 5 μL 含まれるようにした。表 1 では、酵素の種別としてファミリー A (pol 型酵素), ファミリー B (α 型酵素), 及びそれらの混合 (Blend) を示

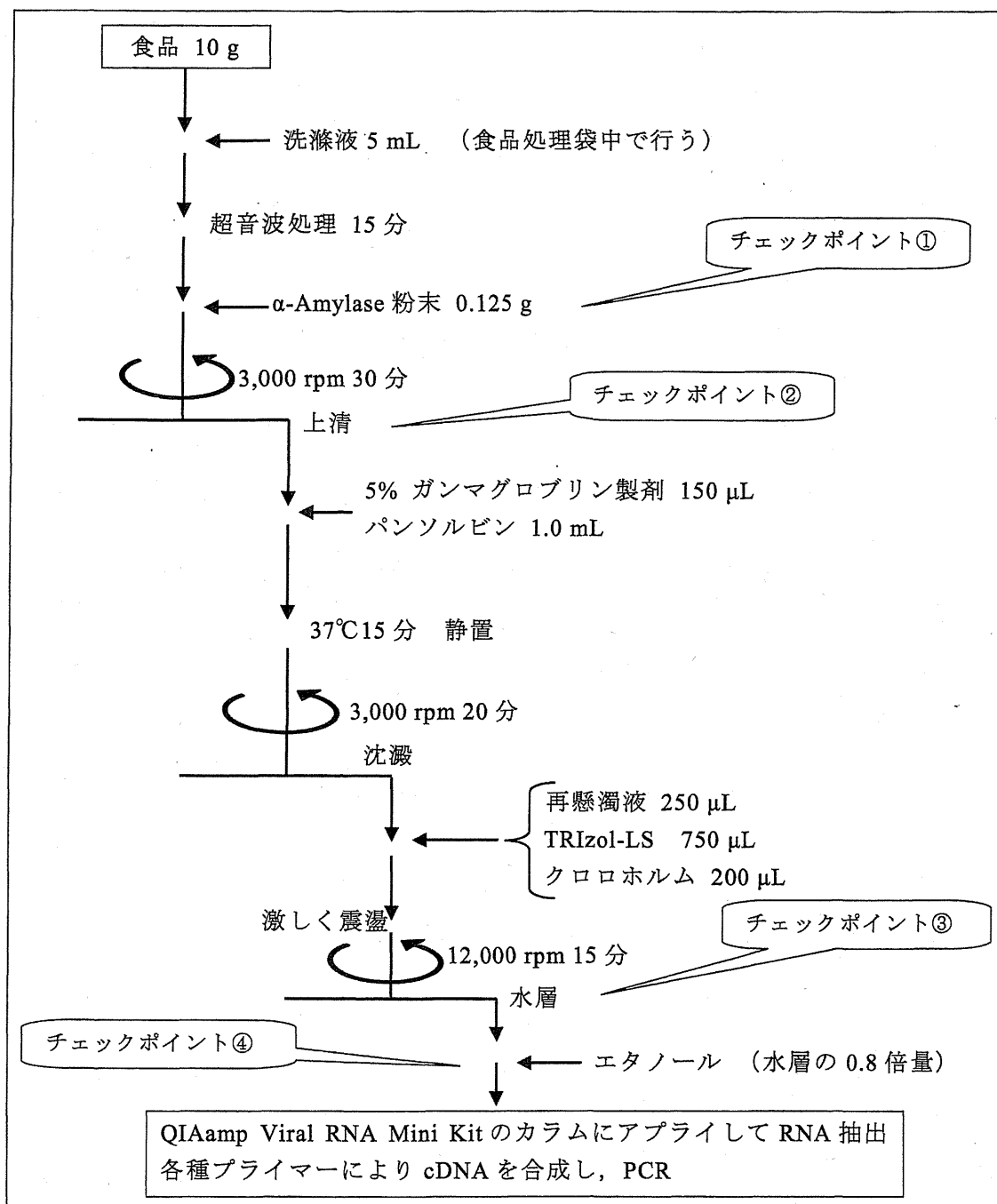


図1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

※①～④のチェックポイントはα-Amylase 液化調製法で参照する。

した。また、ホットスタート仕様の有無(“H”, 及び“-”)とMgの終濃度(mM)も記載した。例えば、「A/H/1.5 mM」の表記は「ファミリーAに属する酵素が用いられ、ホットスタート仕様で、Mg濃度は1.5 mMで反応を行う」という意味になる。また、将来的に偽陽性対策を講ずる布石として、基質にdUTPを用いた反応系も同時に比較した。PCR装置の温度プログラムは、次に示すとおりタッチダウンPCRを基本としたが、denature温度と時間、及びextension温

度と時間は酵素の添付説明書に従って設定した。反応bufferは酵素添付のものを基本とし、さらにMgCl₂を追加してMg²⁺を増加させたものも検討した。

【タッチダウンPCR】

95°C2分 1サイクル

95°C30秒 - (55→50°C) 30秒 - 72°C30秒 5
サイクル：下線部がタッチダウン設定

95°C30秒 - 50°C30秒 - 72°C30秒 40サイクル
72°C7分 1サイクル

表1 比較検討した PCR 用酵素と反応系 (次頁へ続く)

No.	メーカー 品名 (反応系への追加)	ファミリー / ホットスタート / Mg 濃度	No.	メーカー 品名 (反応系への追加)	ファミリー / ホットスタート / Mg 濃度
1	greiner Taq DNA Polymerase, Standard	A / - / 1.5 mM	11	Roche Diagnostics FastStart High Fidelity PCR System	A / H / 1.8 mM
2	greiner Taq DNA Polymerase, Hot Start	A / H / 1.5 mM	12	Roche Diagnostics AptaTaq Fast PCR Master (抗 Taq モノクローナル抗体添加)	A / H / 2.5 mM
3	greiner Taq DNA Polymerase, High Yield	A / - / 2.0 mM	13	TaKaRa TaKaRa Taq	A / - / 1.5 mM
4	greiner Taq DNA Polymerase, High Yield (抗 Taq モノクローナル抗体添加)	A / H / 2.0 mM	14	TaKaRa TaKaRa Taq HS	A / H / 1.5 mM
5	greiner Taq DNA Polymerase, High Yield (抗 Taq モノクローナル抗体添加) (Mg 増量→4.5mM)	A / H / 4.5 mM	15	TaKaRa TaKaRa Ex Taq	Blend / - / 2.0 mM
6	greiner Taq DNA Polymerase, High Fidelity	Blend / - / 2.0 mM	16	TaKaRa TaKaRa Ex Taq HS	Blend / H / 2.0 mM
7	greiner Pfu-X DNA Polymerase	B / - / 2.0 mM	17	TaKaRa TaKaRa Z-Taq	Blend / - / 3.0 mM
8	TOYOBO KOD FX Neo	B / H / 2.0 mM	18	TaKaRa TaKaRa Z-Taq (抗 Taq モノクローナル抗体添加)	Blend / H / 3.0 mM
9	Agilent Technologies PfuTurbo Cx Hotstart DNA Polymerase	B / H / 2.0 mM	19	TaKaRa Tks Gflex DNA Polymerase	B / H / 2.0 mM
10	Roche Diagnostics FastStart Taq DNA Polymerase	A / H / 2.0 mM	20	TaKaRa MightyAmp DNA Polymerase Ver.2	A / H / 4.0 mM

2.6 逆転写反応に関する検討

糞便検体より抽出した NoV の RNA を蒸留水、及びパントラ抽出物で段階希釈した被検体を調製した。DNase 処理は行わずに、逆転写反応専用プライマー PANR-G2 と表 2 に示す逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。反応温度は、添付説明書に記載があるとおりの 37°C, 42°C, 55°C, 58°C, 及び 60°C にて行った。反応容量は 20 µL で、上記被検体が 10 µL 含まれるようにした。30 分の逆転写反応後、蒸留水を 20 µL 加えたもの (2 倍希釈) を 5 µL 取り、real-time PCR と先に最適化を済ませた conventional PCR (プライマーセットは COG2F / G2SKR) の反応系により増幅効率を比較した。conventional PCR で増幅バンドが観察された場合は切り出して塩基配列

を確認した。

2.7 DNase 処理に関する検討

糞便検体より抽出した NoV の RNA 溶液に対して、DNase I 処理 (37°C 10 分) を行い、75°C 5 分加熱する反応系を基本 (一般的に行われている方法) とした。さらに、加熱をしない反応系として、DNase I と易熱性酵素である HL-dsDNase を用いた場合を比較した。また、パントラ法で RNA 抽出を行う途中で DNase I を作用させる「オンカラム DNase I 処理」についても検討した (図 7)。これらの方法で DNase 処理を行った後、先に最適化を済ませた逆転写反応系により cDNA を合成し、real-time PCR でコピー数を測定した。

表1 (前頁からの続き)

No.	メーカー 品名 (反応系への追加)	ファミリー / ホットスタート / Mg 濃度	No.	メーカー 品名 (反応系への追加)	ファミリー / ホットスタート / Mg 濃度
21	New England BioLabs Taq DNA Polymerase with ThermoPol Buffer	A / - / 2.0 mM	27	KAPA BIOSYSTEMS KAPA2G Robust HotStart PCR Kit, buffer A (Mg 増量→4.5 mM)	A / H / 4.5 mM
22	New England BioLabs Taq DNA Polymerase with ThermoPol Buffer (抗 Taq モノクローナル抗体添加)	A / H / 2.0 mM	28	KAPA BIOSYSTEMS KAPA2G Fast HotStart PCR Kit	A / H / 1.5 mM
23	New England BioLabs Taq DNA Polymerase with ThermoPol Buffer (抗 Taq モノクローナル抗体添加) (Mg 増量→4.5 mM)	A / H / 4.5 mM	29	KAPA BIOSYSTEMS KAPA2G Fast HotStart PCR Kit (Mg 増量→4.5 mM)	A / H / 4.5 mM
24	Nippongene THUNDER Taq Gold DNA Polymerase LD	A / H / 1.5 mM	30	BIOLINE HybriPol DNA Polymerase	A / - / 2.0 mM
25	Nippongene THUNDER Taq Gold DNA Polymerase LD (Mg 増量→4.5 mM)	A / H / 4.5 mM	31	BIOLINE HybriPol DNA Polymerase (抗 Taq モノクローナル抗体添加)	A / H / 2.0 mM
26	KAPA BIOSYSTEMS KAPA2G Robust HotStart PCR Kit, buffer A	A / H / 1.5 mM	32	BIOLINE HybriPol DNA Polymerase (抗 Taq モノクローナル抗体添加) (Mg 増量→4.5 mM)	A / H / 4.5 mM

2.8 α -Amylase 処理に関する検討

図10に示したとおりの手順で α -Amylase粉末を液化調製した。-20℃にて2ヶ月保存した後、効果の確認を行った。炭水化物除去効果確認のために、0.1%馬鈴薯デンプン液(蒸留水にて加温糊化)とポテトサラダ10gを50mLの蒸留水に懸濁して食品処理袋のフィルターを通した濾液を用いた。これらの被検体50mLに α -Amylase粉末0.125g, または液化調製品1mLを添加して、37℃ 15分静置し、3,000rpm 30分遠心した上清を5mL分取し、そこに日本薬局方「ヨードチンキ」50 μ Lを加えてヨウ素デンプン反応を観察した。

次にパントラ法を実施する上での影響を検討するために、食品洗滌液にNoVを添加したもの(食品は入れない)に対して、次の操作を行い、RNA抽出液を得た。

(1) 図1のチェックポイント①で α -Amylase粉末0.125gを加え、チェックポイント②において、スポイトを用いて上清を別チューブに丁寧に分取したもの

(2) 図1のチェックポイント①で α -Amylase粉末0.125gを加え、チェックポイント②において、上清をデカントにより別チューブに移したもの

(3) 図1のチェックポイント①で α -Amylase粉末0.125gを加え、その後の遠心を行わなかったもの

(4) 図1のチェックポイント①で α -Amylase液化調製品1mLを加え、チェックポイント②において、上清をデカントにより別チューブに移したもの

抽出したRNAを鋳型として先に最適化を済ませた逆転写反応系でcDNAを合成し、real-time PCRで検出を試みた。

3. 結果

3.1 PCRに用いる酵素の選定と反応条件最適化

NoV遺伝子配列由来DNAを蒸留水で段階希釈した被検体を鋳型とし、通常のデオキシヌクレオチド(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)を基質としてPCRを行った場合には酵素製品間の差

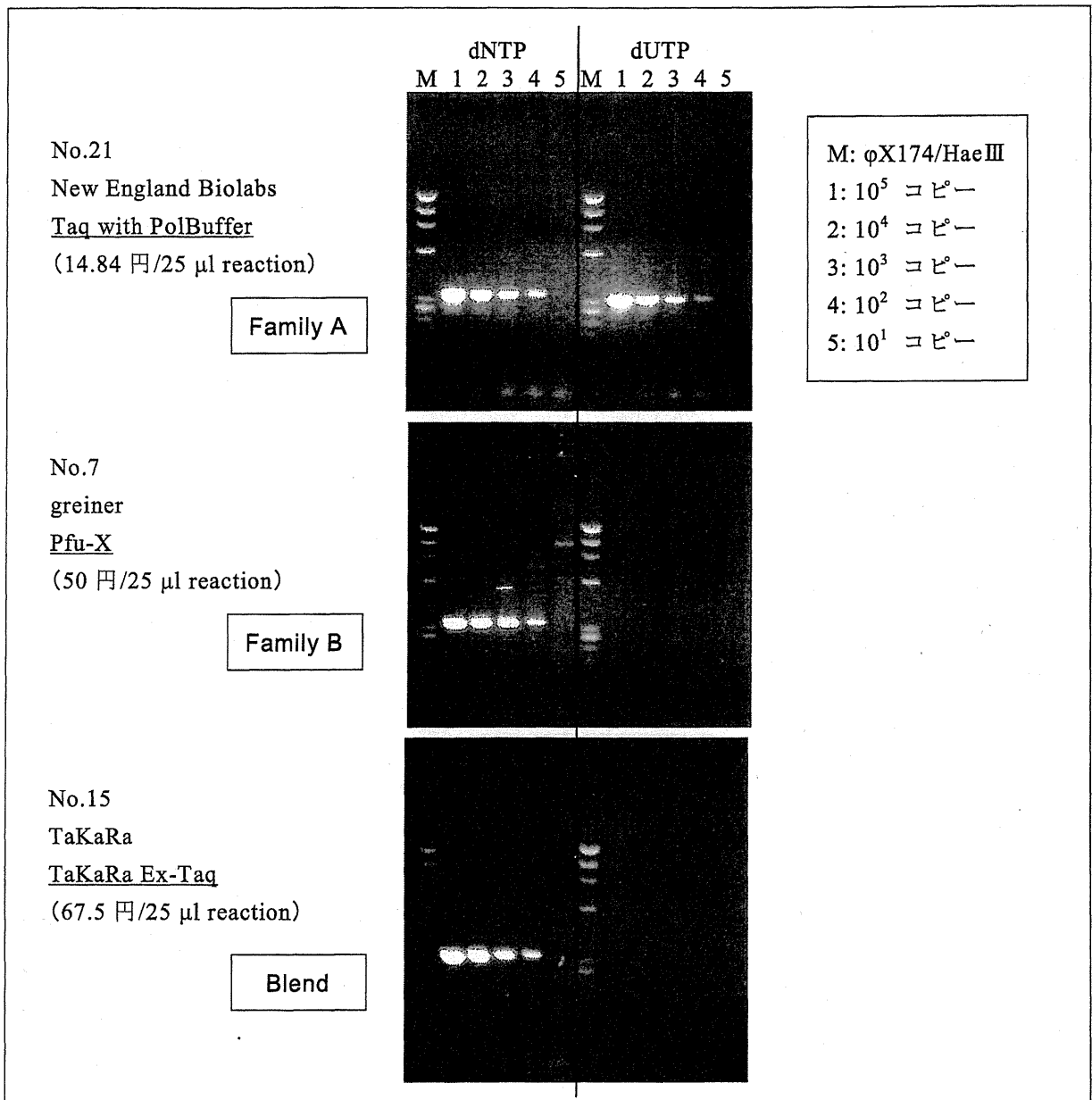


図 2A 蒸留水で段階希釈した NoV 1st. PCR 産物に対する 2nd. PCR

“dNTP”と表記してある反応は dATP, dGTP, dCTP, dTTP を各 200 μ M にて使用

“dUTP”と表記してある反応は dATP, dGTP, dCTP, を各 200 μ M, dUTP を 600 μ M にて使用

はほとんど認められなかった。一方、dTTP を dUTP に置換した場合には、ファミリーA に属する酵素製品のみが有効で、ファミリーB に属する酵素製品、及びファミリーA とファミリーB の混合製品では増幅が起こらなかった(図 2A に一部を示す)。例外として、表 1 の No.9 はファミリーB に属するが、dUTP を取り込めるように酵素蛋白が改変されている。また、表 1 の No.20 はファミリーA であることから、理論的に dUTP を用いることが可能だが、製品構成として buffer とデオキシヌクレオチドがプレミックスされていることから dUTP に置換すること

ができなかった。

一方で、NoV 遺伝子配列由来 DNA をパントラ抽出物で段階希釈した被検体を鋳型とした場合には酵素製品間で大きな差が生じた。例えば、表 1 の No.21 は蒸留水による希釈(図 2A)では良好な遺伝子増幅が得られたが、図 2B 左(パントラ抽出物による希釈)では感度が著しく低下していた。同じ酵素製品に抗 Taq モノクローナル抗体を加えて“ホットスタート化”すると、図 2B の No.22 に示すとおり蒸留水で希釈した場合と同等に感度が回復した。一方、基質の中の dTTP を dUTP に置換した反応系では感度が

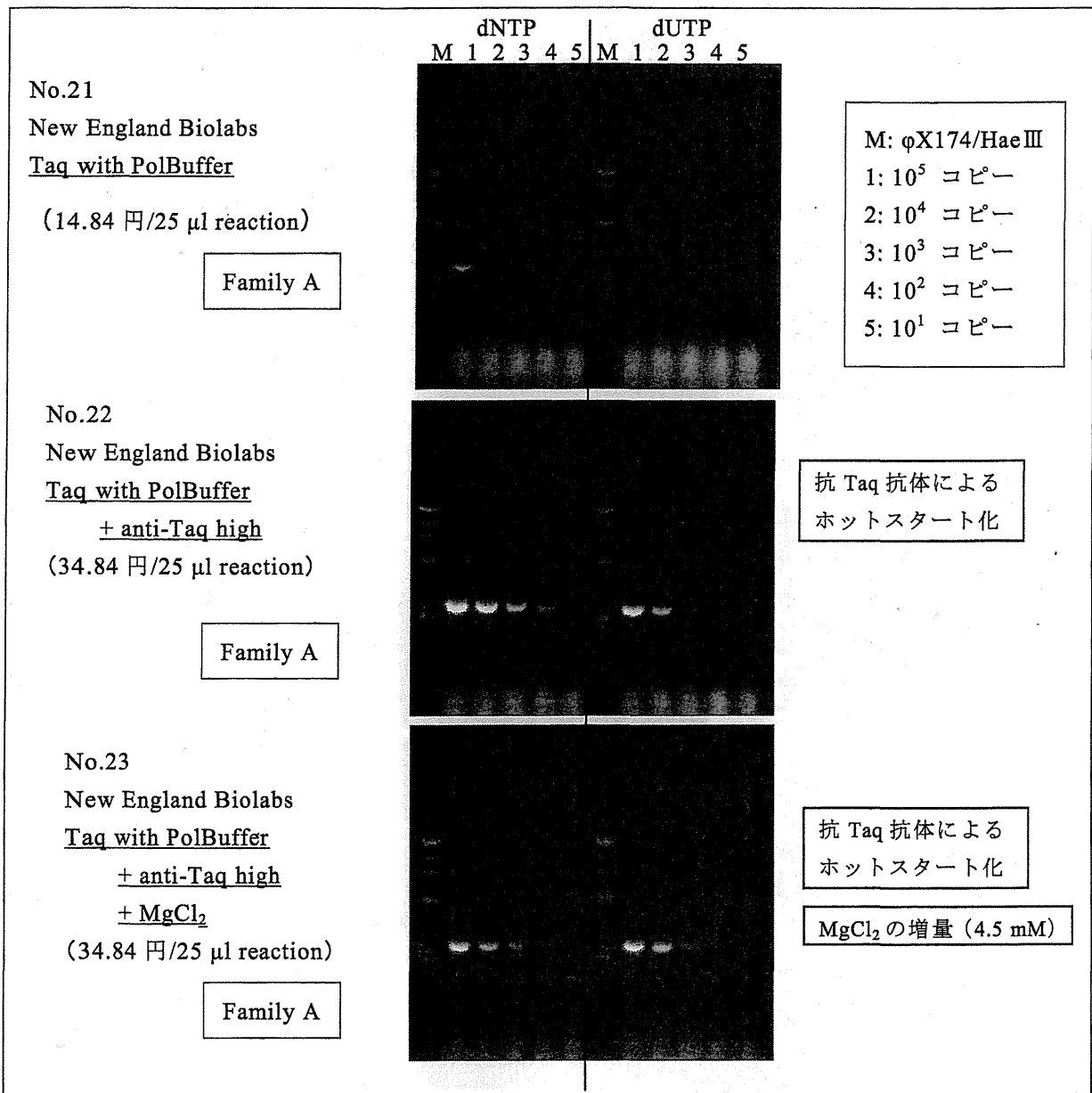


図 2B パントラ抽出物で段階希釈した NoV 1st. PCR 産物に対する 2nd. PCR (1)

“dNTP”と表記してある反応は dATP, dGTP, dCTP, dTTP を各 200 µM にて使用

“dUTP”と表記してある反応は dATP, dGTP, dCTP, を各 200 µM, dUTP を 600 µM にて使用

やや低いものの、No.23 のように Mg 濃度を 4.5mM まで増量することである程度の改善が見られた。そこで、ホットスタート仕様であることと、Mg を増量することに着眼し、基質として dUTP を用いてもなお図 2A の上段右と同等の感度が得られる反応系を検討したところ、図 2C に示す 3 つ (表 1 の No.12, No.27, No.32) が選択された。この内、No.12 (図 2C 下段) については最初から dUTP が組み込まれたプレミックス製品であり、基質を入れ替える必要がないことから第一選択とした。この酵素製品は、55℃を境に酵素活性

が ON / OFF される仕組み (アプタマー) が導入されていて反応特異性の向上に寄与しているが、PCR の第一サイクルだけは、より高温のホットスタートが望ましいため抗 Taq モノクローナル抗体を添加することで補完した。

3.2 逆転写酵素の選定と反応条件最適化

NoV RNA を蒸留水で段階希釈した被検体を鋳型とした場合には表 2 に示した酵素製品間の差はほとんど認められなかった。しかし、パントラ抽出物で段階希釈した被検体では製品間で差が生じ、RNA が低濃度になるにつれ

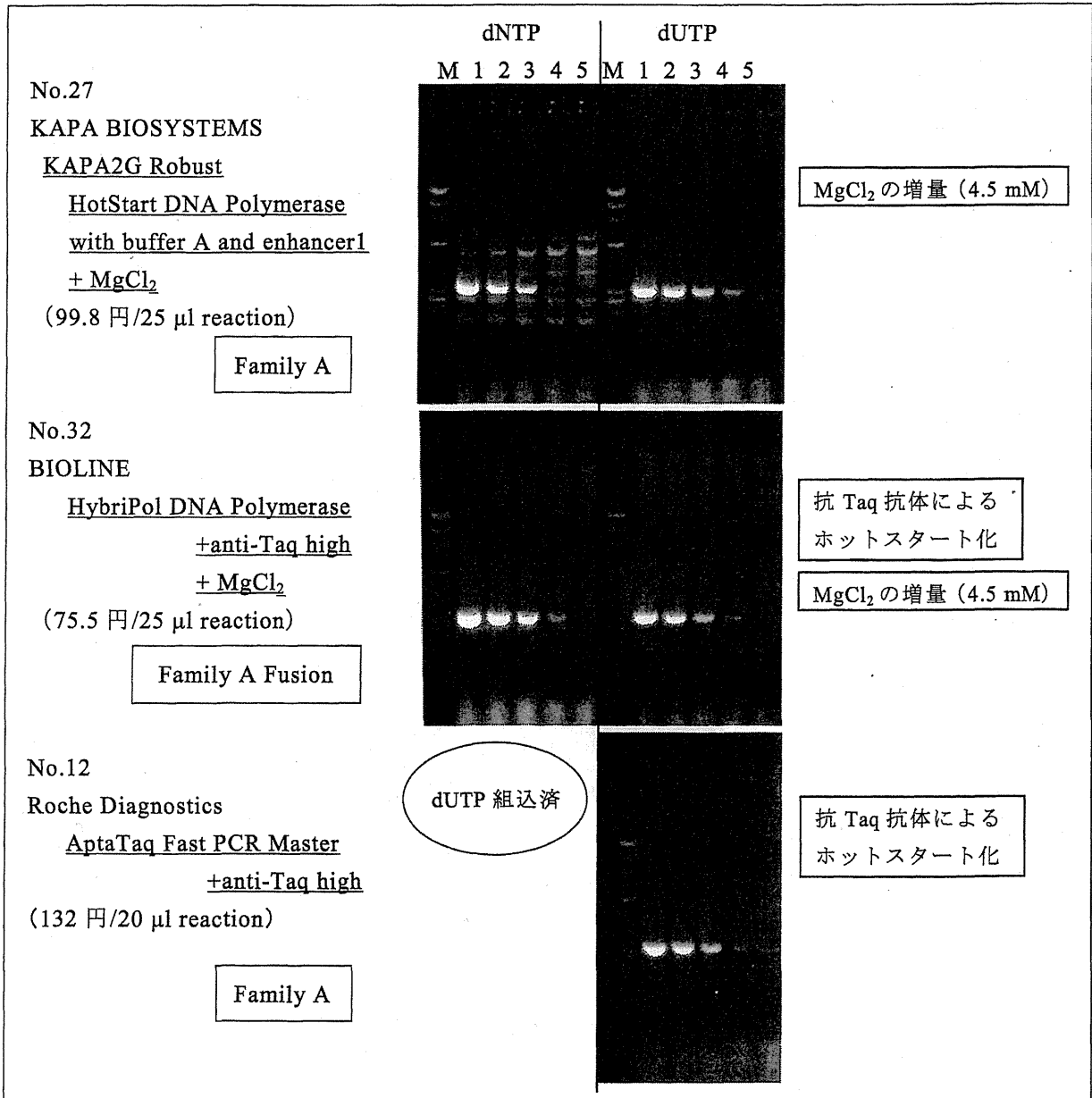


図 2C パントラ抽出物で段階希釈した NoV 1st. PCR 産物に対する 2nd. PCR (2)
 “dNTP”と表記してある反応は dATP, dGTP, dCTP, dTTP を各 200 μM にて使用。
 “dUTP”と表記してある反応は dATP, dGTP, dCTP, を各 200 μM, dUTP を 600 μM にて使用

表 2 比較検討した逆転写酵素と反応温度

No.	メーカー	品名	反応温度 (°C)
1	New England BioLabs	M-MLV Reverse Transcriptase	37
2	TOYOBO	ReverTra Ace	42
3	TaKaRa	PrimeScript	42
4	Roche Diagnostics	Transcriptor	55~65
5	invitrogen	SuperScript II	42
6	invitrogen	Thermoscript	55~65

その差は顕著となった。図 3A には 10⁵ コピー/μL の RNA を被検体とした場合の増幅曲線を示したが、37°C で反応を行う逆転写酵素 (表

2 の No.1) では明らかに増幅効率が落ちていた。10³ コピー/μL (図 3B), 10² コピー/μL (図 3C) と濃度が低い被検体になると 42°C で反応

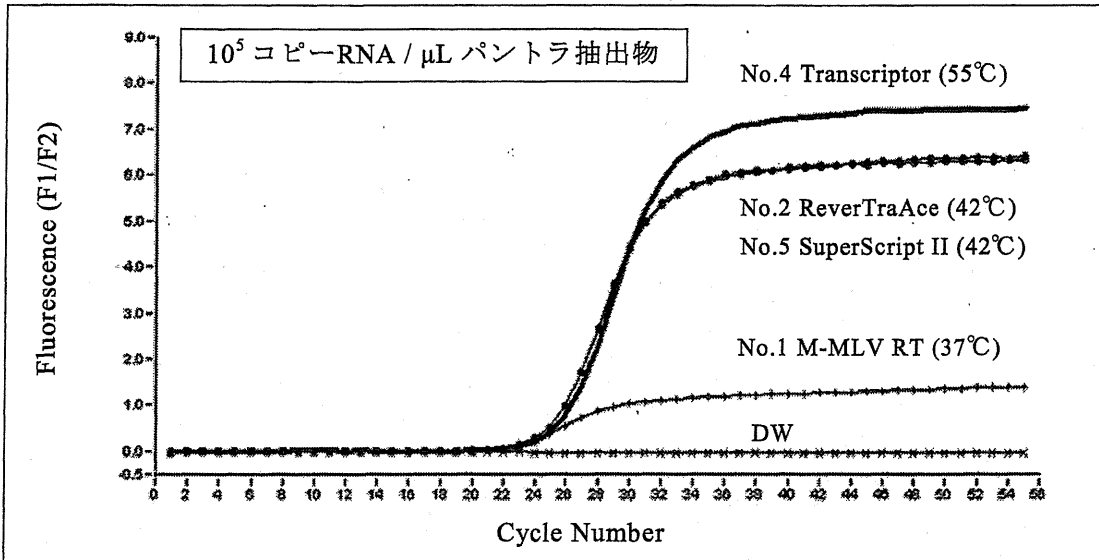


図 3A 逆転写酵素の比較 (1)

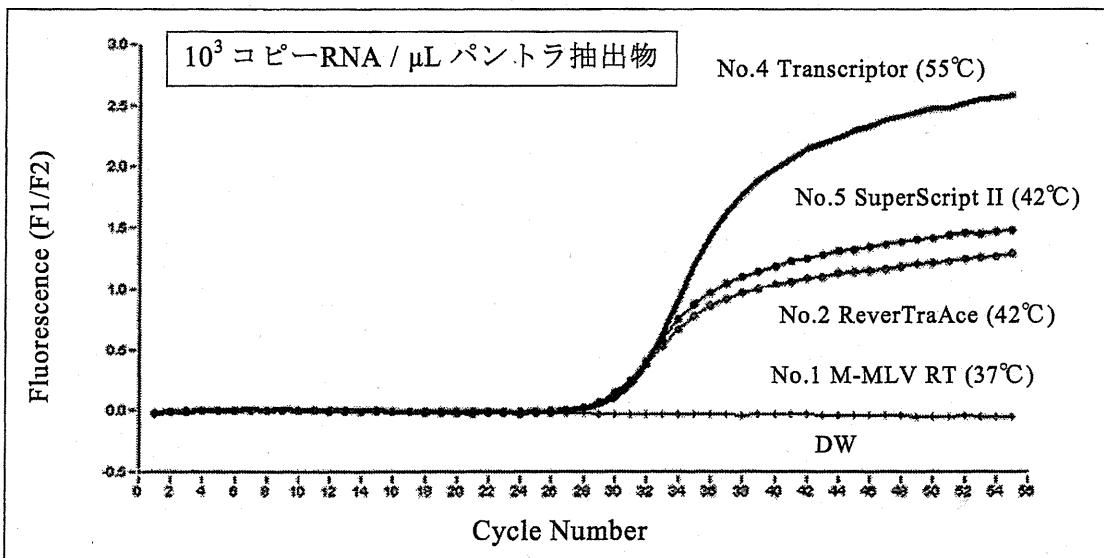


図 3B 逆転写酵素の比較 (2)

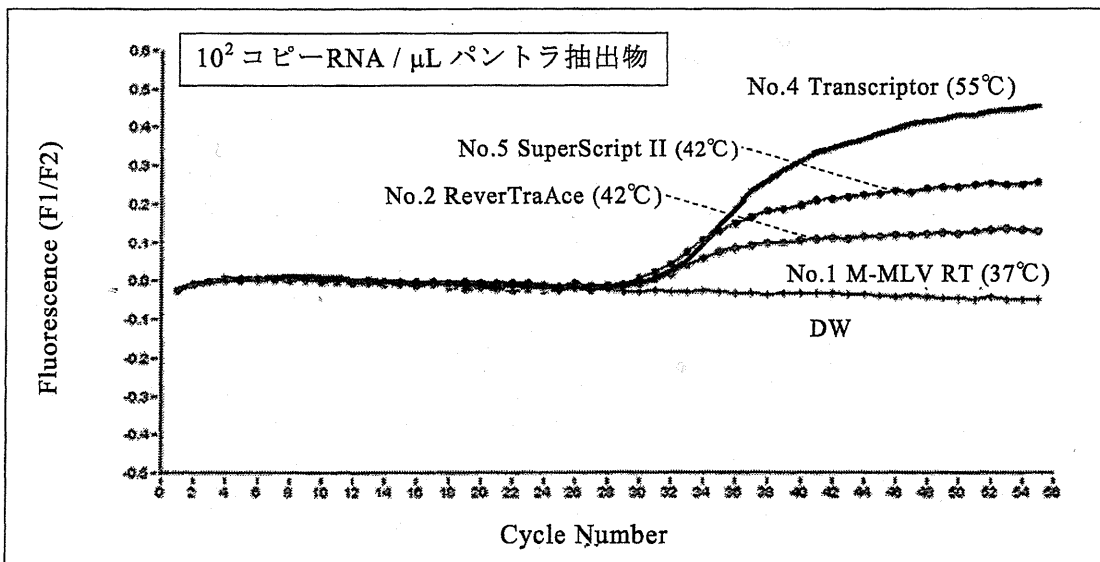


図 3C 逆転写酵素の比較 (3)

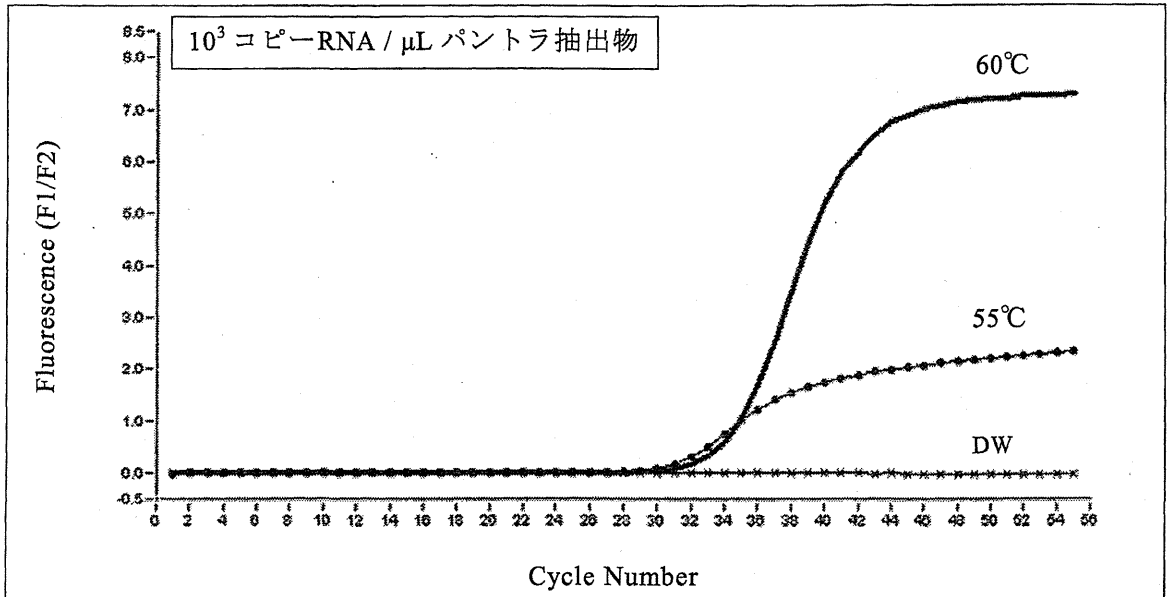


図 4A Transcriptor の反応温度比較 (1)

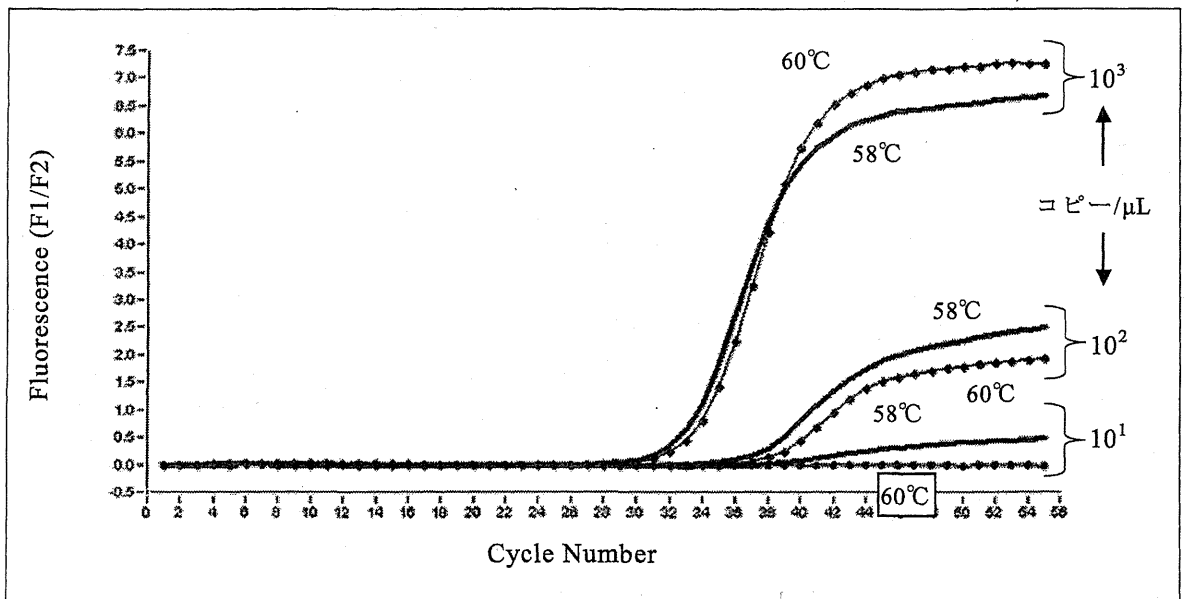


図 4B Transcriptor の反応温度比較 (2)

を行う逆転写酵素 (表 2 の No.2, No.5) においても増幅効率の低下が観察された。図 3A～図 3C の増幅曲線では、横軸からの立ち上がりサイクルを見る限り製品間の差はほとんどなく、被検体に含まれる RNA のコピー数もほぼ同じに算定されたが、縦軸 (増幅効率) において差を生じており、検出限界に影響が及んでいた (37°C で反応を行う酵素では図 3B と図 3C においては、もはや増幅が見られない)。以上のことから、逆転写反応においては反応温度が重要であることがわかったため、温度をさらに上昇させた場合について検討した。高温反応に対応した逆転写酵

素 (表 2 の No.4) を用いて、55°C と 60°C で反応させた場合、後者の増幅効率が高かった (図 4A)。次に反応温度を 58°C と 60°C で比較したところ、低濃度の被検体になるほど前者の増幅効率が高かった (図 4B)。反応温度が 58°C で最適化されたことから、高温反応に対応した逆転写酵素間での比較検討を行った (表 2 の No.4 と No.6)。図 5A と図 5B のとおり、両者の比較では表 2 の No.4 に示した逆転写酵素の増幅効率が高かった。比較対照として、42°C で反応を行う逆転写酵素 (表 2 の No.3) も同時に用いたが、前述のとおり 58°C の高温逆転写酵素よりも

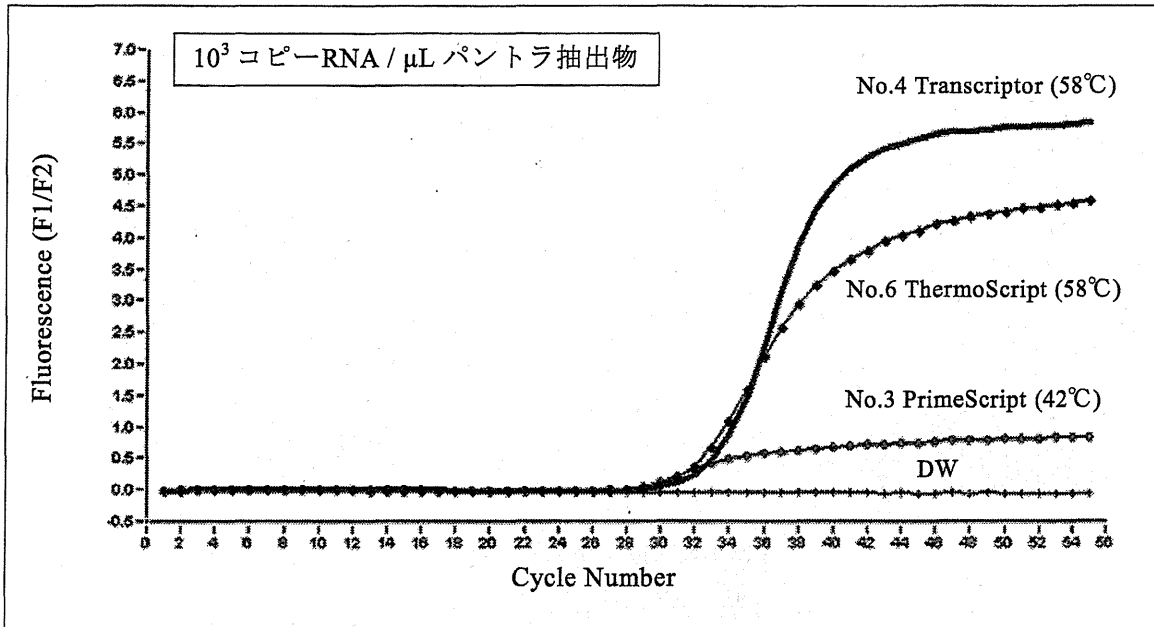


図 5A 高温逆転写酵素の比較 (1)

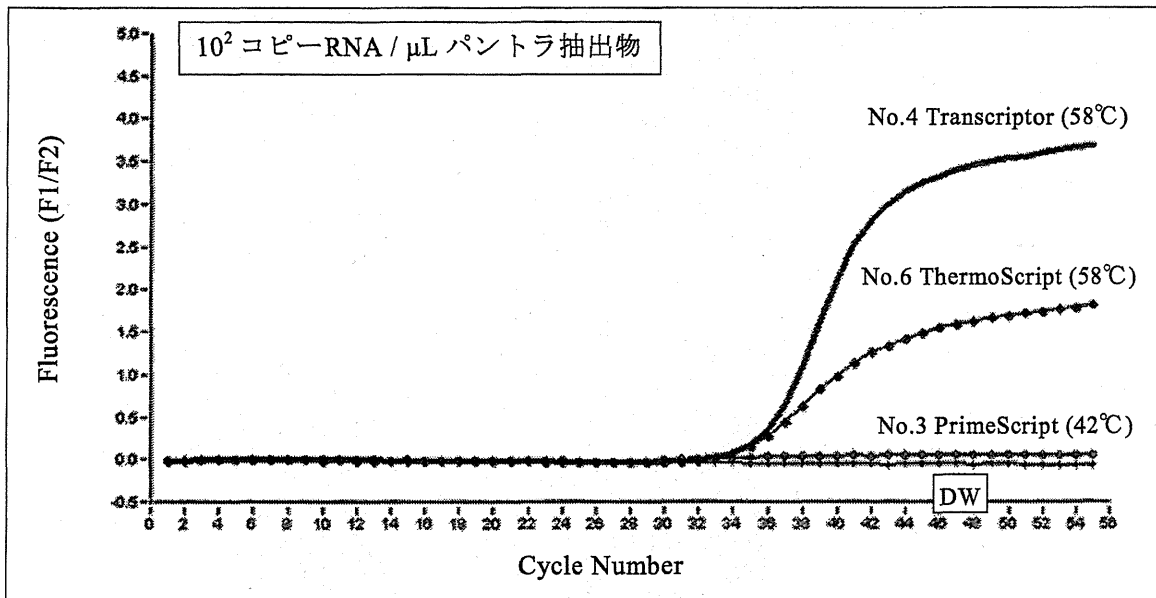


図 5B 高温逆転写酵素の比較 (2)

増幅効率は低かった。

次に図 3~5 において real-time PCR で検討した被検体を、先に最適化を済ませた conventional PCR で増幅して、非特異反応の有無を確認した (図 6)。37°C で反応を行う酵素ではバンドが観察されず (図 6 左), 42°C で反応を行う酵素では低濃度の被検体になると黄色ブドウ球菌のバンド (16s リボソーム) が出現した (図 6 中列)。高温逆転写酵素を用いた場合 (図 6 右列), 55°C の反応では黄色ブドウ球菌のバンドが若干認められたものの, 58°C では NoV のバンドのみが観察された。

3.3 抽出した RNA 溶液に対する DNase 処理法の検討

高温逆転写反応によって、黄色ブドウ球菌由来の遺伝子等に起因する非特異反応を抑制することが可能となったが、陰性検体を semi-nested PCR で再増幅した場合に、NoV とは無関係のバンドが出現することがあった。こうした非特異バンドは、real-time PCR (ハイブリ試験に相当) では反応しないことから誤判定には至らないものの、増幅サイズによっては一時的な混乱をきたすおそれがあるため、逆転写反応の前に DNase 処理を行うことが推奨されている。一方で、一般に広く用いられている DNase I を用い

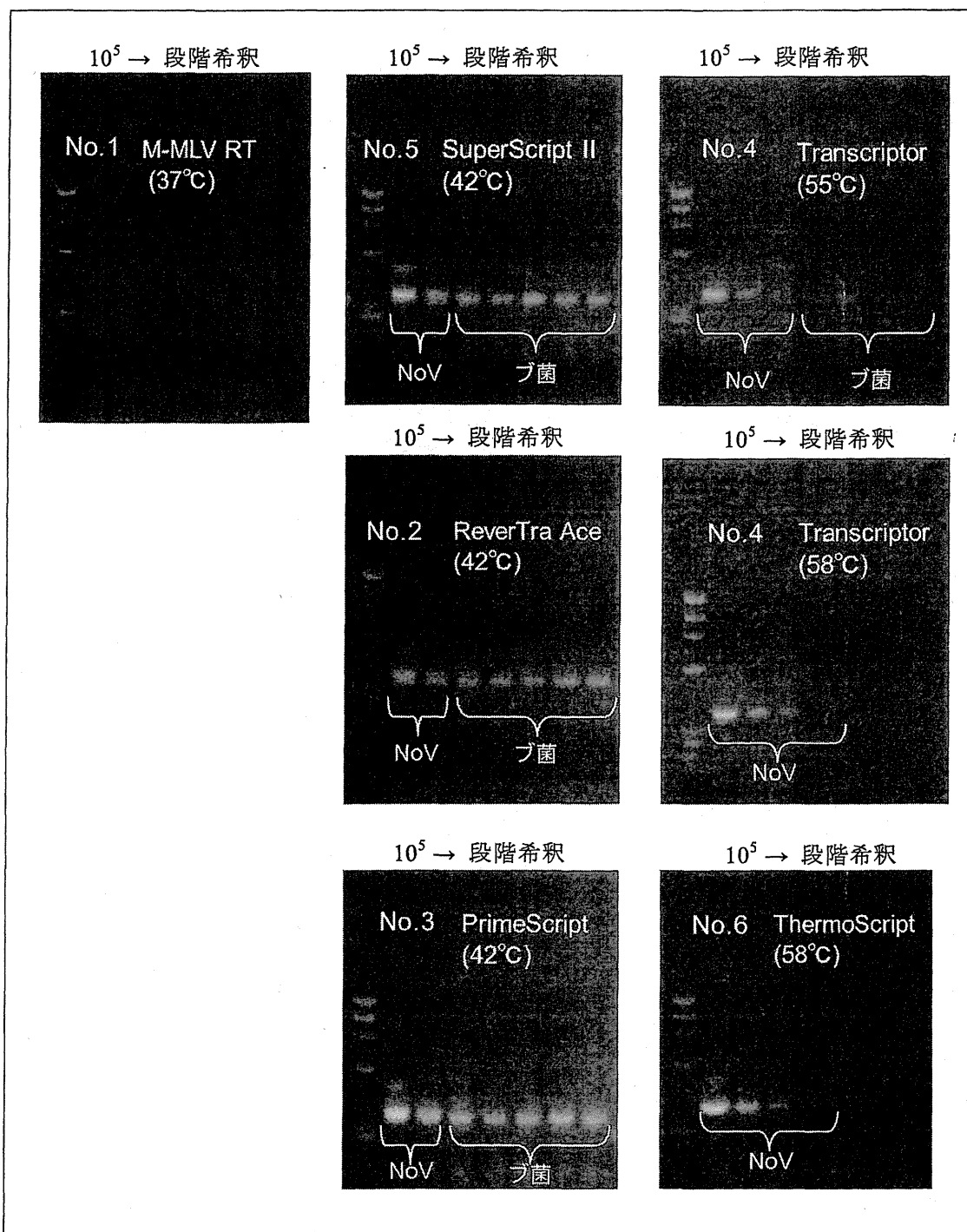


図6 増幅バンドにおける逆転写酵素と反応温度の影響

・10⁵コピー/μLのNoV RNAをパントラ抽出物で段階希釈したものを、各種酵素で逆転写し、COG2F/G2SKRのプライマーセットとAptaTaq(抗Taq抗体添加)によりPCRを行った。各No.は表2に記載した酵素を示す。増幅したDNA断片をシーケンスすることでNoVのバンドであるか否かを確認した。

たプロトコルでは、反応後に不要となったDNase Iを失活させるために75°C 5分の加熱処理が必要であり、そのことがウイルスRNAの分解をもたらすというジレンマが指摘されている。加熱によるRNA分解は、リボースのOH基の求核置換反応に由来するものであり、純粋

に化学的であることからRNase inhibitorの添加では防ぐことができない。従って、解決策として加熱を行わない方法を考案する必要があった。方法の1つとして、北極海に生息するエビ由来の易熱性DNase(HL-dsDNase)の有用性に着目した。この酵素は37°Cで2本鎖DNAを特異的

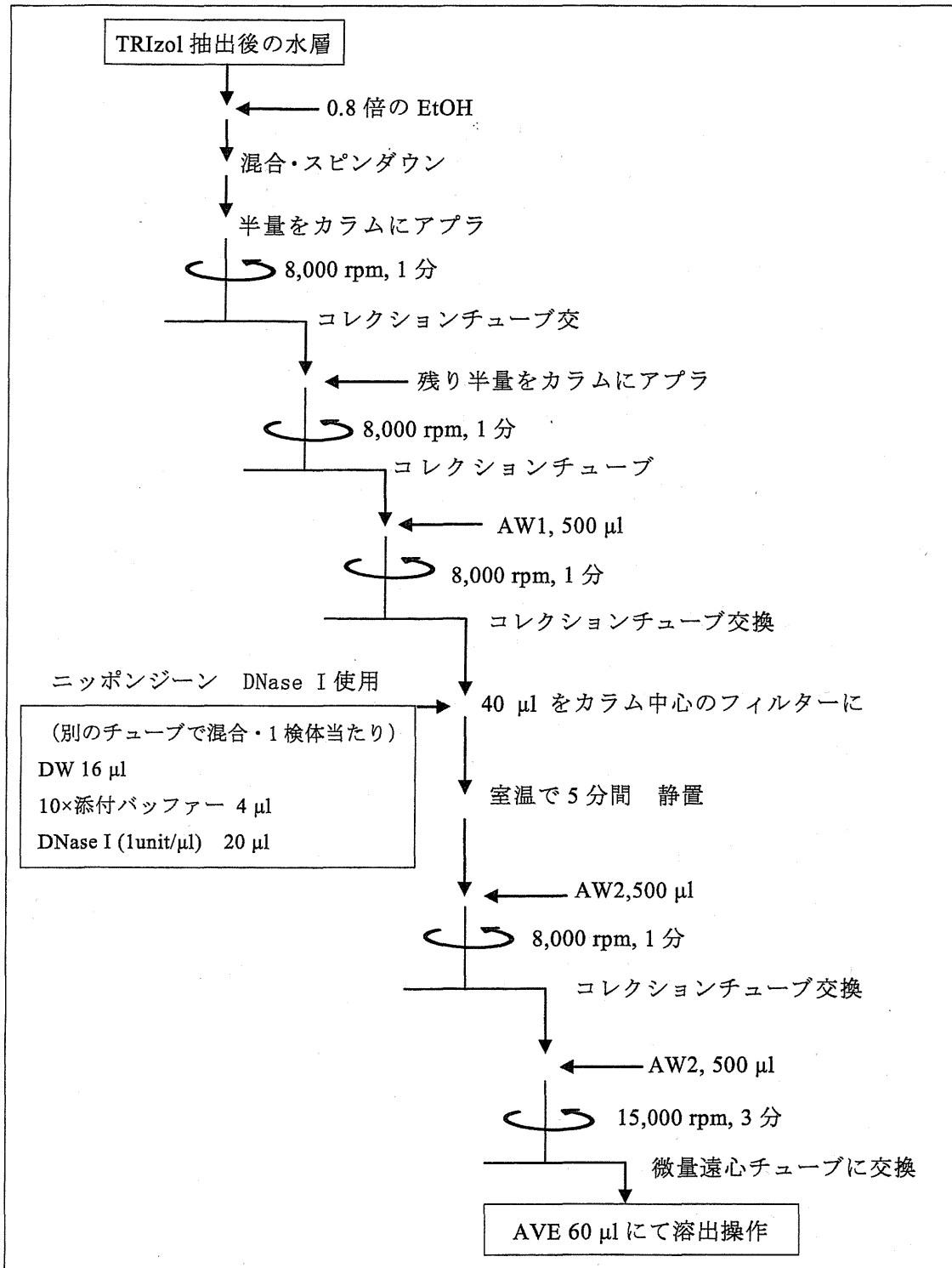


図7 QIAamp Viral RNA Mini Kit へのオンカラム DNase I 処理の組み込み

に分解し、50℃で活性を示さなくなり、55℃で不可逆的に失活する性質を有している。従って、先に最適化を済ませた 58℃での高温逆転写反応を組み合わせるならば、DNase 処理後に 75℃の加熱を行う必要はなくなる。なお、この酵素はまだ我が国では流通していないため、ノルウェーの ArcticZymes 社から直接取り寄せる必要

がある。そこで、一般的に流通している DNase I を用いた上で、加熱を行わない方法としてオンカラム処理を考案した。別メーカーの RNA 抽出キットの中には、オンカラム DNase I 処理工程が組み込まれているものもあるが、「QIAamp Viral RNA Mini Kit」にはそのプロセスがないため、改めて組込んだプロトコルを図7に示した。