

平成 29 年度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)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究分担報告

カキからのノロウイルス検出のための nested リアルタイム PCR 法の改良

研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	永嶋 俊樹	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	永田 文宏	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

生食用カキの安全性確保のためのノロウイルス検査として、特に生産現場においては迅速簡便なリアルタイム PCR が用いられているが、カキに含まれるウイルス量が微量なことから偽陰性(実測値 10 未満)になることが少なくない。一方、nested PCR は感度が高い反面、時間がかかる、相互汚染のリスクが高いなどの問題点がある。そこで、先行研究において両者の長所を生かした 1stPCR を 15 サイクルで行う nested リアルタイム PCR を検討したところ、ノロウイルス GI において定量値が低くでる検体がみられた。本研究では、その原因を明らかにし、検査法を改良することを目的として、1stPCR におけるプライマー濃度や DNA 合成酵素の検討、非特異的増幅の有無の確認、プライマー及びプローブの検討等を行った。その結果、カキ検体から検出されたノロウイルス GI の塩基配列を基に新たに設計したプローブ(RING-TP-n)を用いることで、カキ中のノロウイルス GI の定量値が有意に増加し、定量値が低くなった主要な原因はプローブと検体中のノロウイルス GI の塩基配列のミスマッチであることが明らかになった。一方、RING-TP-n を使用すると GI 陽性コントロール(PC)DNA では定量値が低下した。そこで RING-TP-n, RING1-TP-(a), TP-(b)の各プローブを混合した系を検討した結果、カキ検体中のノロウイルス GI の定量値は RING-TP-n 単独の場合には及ばないものの、PC の定量値は増加し、検体によらず全体的に良好な定量値が得られた。以上のことから、nested リアルタイム PCR に RING-TP-n を単独あるいは従来のプローブと混合して用いることで偽陰性の減少や、検査精度の向上が期待され、それに伴い生食用カキの安全性が向上すると考えられる。

A. 研究目的

現在生食用カキの検査にはノロウイルス検査の通知法に記載されているリアルタイム PCR 法と nested PCR が主に使われている。

迅速簡便なリアルタイム PCR は主にカキの出荷前の自主検査等に使用されているが、カキに含まれているノロウイルスは微量であるため陽性基準(実測値 10 未満)に満た

ない場合が少なくなく、また、10 コピー前後の低い定量値ではその定量性に信頼性に欠ける。一方、nested PCR 法はリアルタイム PCR 法よりも一般的に高感度であるが、時間がかかり、相互汚染を起こすリスクが高い。さらにそれら固有の問題点に加えて、リアルタイム PCR と nested PCR の結果が一致しないという問題点もある。そこで、当研究室の先行研究でリアルタイム PCR 法と nested PCR 法の長所を生かした 1stPCR を 15 サイクルで行う nested リアルタイム PCR 法を検討したところ、ノロウイルス GII においては問題なく増幅したものの、ノロウイルス GI において定量値が極端に低くなる検体が認められた。そのため、本研究では、その原因を明らかにし、検査法を改良することを目的に検討した。

B. 研究方法

1. 材料

検討に使用した検体は、ノロウイルス懸濁液 3 検体 (GI.2, GI.4, GI.6)、2016 年に採取されたカキ 8 検体 (GI.2=①, ③, ⑥, ⑧, GI.4=④, ⑤, ⑦, 遺伝子型不明=②) を用いた。

2. カキからのウイルスの回収, RNA 抽出および逆転写反応

カキからのウイルスの回収には、リパーゼとアミラーゼを併用した酵素処理を導入した簡便法で実施した。使用したリパーゼ溶液およびアミラーゼ溶液の調整法および簡便法の手順は以下のとおりである。

(1) リパーゼ溶液の調整法

リパーゼ (東京化成工業株式会社, LD0057) 5g に PBS(-) 20ml を加え、よく混

和し、溶解後、10,000rpm、20 分間遠心した。得られた遠心上清に等量のグリセロールを加え、使用時まで -20°C で凍結保存した。

(2) アミラーゼ溶液の調整法

斎藤らの方法に従い、 α -Amylase 粉末 (和光純薬, 017-26371) 5g に PBS(-) 20ml を加え、よく攪拌した後、10,000rpm、20 分で遠心した。得られた遠心上清を滅菌フィルターで濾過後、等量のグリセロールを加え、使用時まで -20°C で凍結保存した。

(3) 簡便法の手順

ハサミで細切したカキの中腸腺 0.3g を 1.5ml チューブに入れ、PBS(-) 700 μ l を加え、よく攪拌した。その後リパーゼ溶液 10 μ l とネコカリシウイルス 20 μ l を加え、37°C、45 分間消化した後、10,000rpm、20 分遠心した。遠心上清 500 μ l を別の 1.5ml チューブに移し、アミラーゼ溶液 50 μ l を加え 37°C、45 分間消化した。その後 4 倍濃度 PEG 溶液 220 μ l を加え、混和後 10,000rpm、20 分遠心した。遠心上清を除去し、0.5% Zwittergent in PBS(-) 200 μ l に再浮遊させた後、その全量から High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いて RNA 抽出を行った。抽出 RNA 50 μ l を用いて、ランダムプライマーにより逆転写反応を行い cDNA を合成した。

3. 1stPCR におけるプライマー濃度の検討

1stPCR におけるプライマー濃度を変更することにより増幅率の改善を試みた。ヒト糞便由来のノロウイルス GI の cDNA を Eagle Taq (Roche) を用いてリアルタイム PCR を行い、得られた増幅 DNA をそれぞれ

10¹, 10³ コピー(実測値)になるように希釈したものを検体 DNA とした。その検体 DNA について 1stPCR のプライマー濃度を 0.5 μM, 1 μM, 2.5 μM, 5 μM, 7.5 μM, 10 μM とし、PCR 増幅を行い、その増幅産物をリアルタイム PCR で定量した。1stPCR の条件は 94°C5 分→[94°C30 秒→50°C30 秒→72°C1 分]×15 サイクル→72°C5 分とした。

また、カキ検体由来 cDNA についてプライマー濃度 5 μM で 1stPCR を行い、リアルタイム PCR で定量した。この場合、1stPCR による 1 次増幅を行わない、通常のリアルタイム PCR でも定量した。

4. 1stPCR に用いる DNA 合成酵素の検討

1stPCR に使用する DNA 合成酵素を変更することにより増幅効率が改善するかを検討した。すなわち、1stPCR に EXTaq 及び KAPATaq を用いて PCR を行い、リアルタイム PCR で定量した。1stPCR の条件は 94°C5 分→[94°C30 秒→50°C30 秒→72°C1 分]×15 サイクル→72°C5 分とした。

5. 低定量値が非特異増幅によるものかの確認

ノロウイルス GI の nested リアルタイム PCR において低い定量値を示した原因として検体中にノロウイルスが含まれておらず非特異増幅を起こした可能性が考えられる。そこで、それらの検体について nested PCR を行い、アガロースゲル電気泳動法による増幅 DNA の検出を行うとともに、一部の検体について増幅産物の塩基配列を決定した。

6. 新たに設計したプライマー及びプローブを用いた nested リアルタイム PCR の検討

nested リアルタイムにおいて低い定量値を示した原因としてカキ検体中のノロウイ

ルス GI の塩基配列と 1stPCR やリアルタイムに使用するプライマーやプローブの塩基配列にミスマッチがあることにより定量値が低くなっている可能性が考えられる。そこで検体中のノロウイルスの塩基配列を基に設計したプライマー及びプローブを用いて検査を実施し、増幅率が向上するかを確認した。検体 cDNA を COG1F と G1SKR の外側に設計した G1+F5228, G1-R5754 を用いて PCR にかけて後 ExoSap IT を用い未反応のプライマーや dNTP を除去し、シークエンス解析を行った。PCR の温度条件は 94°C5 分→[94°C30 秒→50°C30 秒→72°C1 分]×40 サイクル→72°C5 分で行った。シークエンス解析の結果を基に新しいプライマー (G1SKR-n) 及びプローブ (RING-TP-n) を設計し nested リアルタイム PCR を行った。

7. 混合プローブを用いた nested リアルタイム PCR の検討

RING1-TP-(a), TP-(b), TP-n をそれぞれ 1:1:1, 2:1:1, 1:2:1, 1:1:2 の割合で混ぜたプローブ mix①~④を用意し、nested リアルタイム PCR を行った。RING1-TP-(a) と (b) および RING-TP-n のみを用いた系を対照とした。検体はカキ由来 cDNA①~⑧の 1stPCR 産物をまとめたものを使用した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 1stPCR におけるプライマー濃度の検討

ヒト糞便由来ノロウイルス GI の cDNA を用いて 1stPCR におけるプライマー濃度の違いによる増幅効率への影響を調べた。平均増幅率は、プライマー濃度 $0.5 \mu\text{M}$ が 651 倍、 $1 \mu\text{M}$ が 833 倍、 $2.5 \mu\text{M}$ が 1,321 倍、 $5 \mu\text{M}$ が 1,539 倍、 $7.5 \mu\text{M}$ が 1,083 倍、 $10 \mu\text{M}$ が 1,274 倍で、プライマー濃度 $5 \mu\text{M}$ が最も高い増幅率を示した。

次に、カキ由来 cDNA を用いて、1stPCR におけるプライマー濃度を $5 \mu\text{M}$ として nested リアルタイム PCR を行った。その結果、平均定量値は、検体①が 58.17 コピー (実測値)、検体②が 48.19 コピー、検体③が 907.95 コピー、検体④が 994.1 コピー、検体⑤が 256.12 コピー、検体⑥が 101.13 コピー、検体⑦が 49.57 コピー、検体⑧が 99.38 コピーで、検体③、④以外は定量値が低く、定量値の有意な改善は認められなかった。

2. 1stPCR に用いる DNA 合成酵素の検討

1stPCR において使用する DNA 合成酵素を換えることで、nested リアルタイム PCR における定量値が改善するかを、EXTaq と KAPATaq を用いて調べた。カキ由来 cDNA の nested リアルタイム PCR による定量値は、EXTaq を用いた場合、検体①が 105.9 コピー、②が 33.24 コピー、③が 1782.56 コピー、④が 173 コピー、⑤が 275.42 コピー、⑥が 208.75 コピー、⑦が 161.51 コピー、⑧が 152.93 コピー、KAPATaq を用いた場合、検体①が 93.18 コピー、②が 54.68 コピー、③が 2487.98 コピー、④が 2055 コピー、⑤が 319.44 コピー、⑥が 68.55 コピー、⑦が 198.74 コピー、⑧が 486.85 コピーで、両者に大きな違いは認められなかった。このことから、DNA 合成酵素を変更しても、大

幅な定量値の改善は認められないと考えられた。

3. 低定量値が非特異的増幅によるものかの確認

カキ検体において nested リアルタイム PCR で低定量を示した原因が非特異的増幅によるものかについて調べるために、カキ由来 cDNA8 検体について nestedPCR を行った後、アガロースゲル電気泳動により増幅 DNA の有無を確認した。各検体につき、3 回繰り返し実験を行った。その結果、4 検体は 3 回中 3 回陽性、他の 4 検体は 3 回中 2 回が陽性になった。得られた DNA の一部について、後述の方法により塩基配列を決定したところ、すべてノロウイルス GI の塩基配列であった。これらの結果から、カキ由来 cDNA のすべての検体にノロウイルスが含まれており、nested リアルタイム PCR において低定量値を示したものは非特異増幅によるものではないことが示された。

また、カキ由来 cDNA 中に存在する PCR 阻害物質により定量値が低下する可能性を調べるために、ノロウイルス GI の陽性コントロール DNA に等量のカキ由来 cDNA あるいは遺伝子解析用蒸留水を添加して、定量値を比較したところ、両者に違いはなく、PCR 増幅阻害が起こっている可能性は低いものと考えられた(データ示さず)。

4. 新たに設計したプライマー及びプローブを用いた nested リアルタイム PCR の検討

カキ検体に含まれるノロウイルス RNA の塩基配列と nested リアルタイム PCR に使用するプライマーやプローブの塩基配列のミスマッチにより定量値が低くなっている可能性を調べるために、新しいプ

ライマーやプローブを設計した。すなわち, nestedPCR の増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法で決定し, その塩基配列について blast 検索を行い, 1stPCR の増幅領域(COG1F~G1SKR)より外側の塩基配列が登録されているものの中でスコアの一番高いものを基に COG1F~G1SKR の外側にアニーリングするプライマー-G1+F5228, G1-R5754 を設計した(未発表)。次に G1+F5228, G1-R5754 で PCR 増幅を行い, 得られた PCR 断片(5228bp~5754bp)の塩基配列を決定し, COG1F, COG1R, G1SKR, RING1-TP-(a), RING1-TP-(b)の各プライマーやプローブの配列と比較した。その結果, G1SKR, RING1-TP-(a), RING1-TP-(b)の位置に配列が一致しない箇所が確認された(表 1)。そこで, 検体中のノロウイルス RNA の塩基配列を基にプライマー及びプローブを設計し, それらを用いて nested リアルタイム PCR の定量値が改善されるかを調べた。予備実験においてプライマーを G1SKR から G1SKR-n に変更しても実測値に変化はみられなかった。一方, プローブを RING-TP-n に変更すると全てのカキ検体において有意な定量値の増加がみられた(表 2)。一方, ポジティブコントロールの定量値は逆に低下した。このことから, nested リアルタイム PCR において低定量値を示した原因は, リアルタイム PCR においてプローブのミスマッチによりみかけ上低く定量されていることが大きな原因の一つであることが示された。一方, RING-TP-n を使用すると, 陽性コントロール DNA の定量値は低くなり, これもプローブの塩基配列とコントロール DNA の塩

基配列のミスマッチによるものと考えられた。

5. 混合プローブを用いた nested リアルタイム PCR の検討

前記の検討より, リアルタイム PCR に TP-n を使用することによりカキ検体のノロウイルス GI の定量値は大幅に増加するものの, 陽性コントロール DNA の定量値は低下したことから, RING1-TP-(a), TP-(b), TP-n を混合した場合の定量値を調べた。その結果, 検討した混合条件のいずれにおいても, RING1-TP-(a), TP-(b)を用いた場合と比較して, カキ検体では定量値の増加, 陽性コントロール DNA では定量値の低下が認められ, TP-n を単独で使用した場合と比較してカキ検体では定量値の低下, 陽性コントロール DNA では定量値の増加が認められ, 平均的に良好な結果が得られた(図 1)。特に, プローブの混合比が RING1-TP-(a) : TP-(b) : TP-n=1:1:2 の場合の定量値が高くなる傾向が認められた。

D. 考察

今回, 1stPCR を 15 サイクル行った後, リアルタイム PCR を行う nested リアルタイム PCR において, ノロウイルス GI で認められた低定量値を示す原因について調べた。その結果, リアルタイム PCR に使用するプローブを変更したことで陽性コントロールを除くすべてのカキ由来検体において有意に nested リアルタイム PCR によるノロウイルス GI 定量値が増加した。このことから, 低い定量値を示していたのは, リアルタイム PCR におけるプローブと検体中のノロウイルスの塩基配列のミスマッチ

によることが主要な原因であることが明らかとなった。このことは、通常のリアルタイム PCR においても、検体中のノロウイルスの塩基配列がプローブとミスマッチを起こしている場合は、見かけ上低く定量される可能性があることを示唆する。さらに今回カキ検体中に含まれていたノロウイルス GI は遺伝子型 GI.2 と GI.4 であり、比較的カキから高頻度に検出される遺伝子型であった。このことから、特に、カキの検査におけるノロウイルス GI のリアルタイム PCR による定量値は低く定量されている可能性が少なくないと考えられた。

一方、今回新たに設計したプローブを使用した場合、GI 陽性コントロール DNA では定量値が逆に低下した。そのため、従来のプローブと新たに設計したプローブを混合した増幅系を検討した結果、RING1-TP-(a)、TP-(b)を用いた場合と比較して、カキ検体では定量値の増加、陽性コントロール DNA では定量値の低下が認められ、TP-n を単独で使用した場合と比較してカキ検体では定量値の低下、陽性コントロール DNA では定量値の増加が認められ、検体の種類(遺伝子型)によらず平均的に良好な結果が得られた(図 1)。しかし、それぞれを単独で使用する場合と比較して満足できる定量値ではなかったことから、混合比や濃度等を含め、今後検討する必要がある。

通知法¹⁴⁾では2003年に設計されたプライマー及びプローブを使用しているが、今回使用した2016年に採取したカキに含まれているノロウイルス GI.2、GI.4 と塩基配列が合わなかったことから、通知法に記載されているプライマー及びプローブが近年のノロウイルスの配列に合わなくなっ

きている可能性がある。そのため将来的にノロウイルス GI だけでなく GI.2 などでもプライマー及びプローブが合わなくなる可能性があるため、定期的にノロウイルスの塩基配列をチェックし、適時プライマー及びプローブを改変していくことが、常に高感度にノロウイルスを検出するために必要である。

今回使用したカキに含まれていたノロウイルスの遺伝子型は GI.2 と GI.4 であったが、他の遺伝子型を RING-TP-n を用いた時に高感度にノロウイルスを検出できるかをみるために他の遺伝子型でも検討が必要であると考えられる。また、使用するノロウイルスも個体によって塩基配列が異なる場合があるので、より多くの検体を使用してデータを蓄積することが必要である。他の遺伝子型でも高感度に検出することができれば、RING-TP-n を用いることで現在のノロウイルス検査よりも偽陰性を減らすことができ、生食用カキの安全性がより高まることが期待される。

E. 結論

リアルタイム PCR に用いるプローブを RING1-TP-(a)、TP-(b) から RING-TP-n に変更することで定量値が増加した。そのため RING-TP-n は従来のプローブより高感度にノロウイルスを検出できると考えられる。また RING-TP-n を用いると PC の定量値が低下したが RING1-TP-(a) の割合を低く設定したプローブ mix を用いることで PC の定量値の低下を軽減することが出来た。しかしプローブ mix を用いることでカキ検体自体の定量値が RING-TP-n のみを用いた時よりも低下する。そのためプローブ

の割合についてはさらに検討する必要がある。また今回使用したカキに含まれていたノロウイルスの遺伝子型は G I . 2 と G I . 4 であったが他の遺伝子型を RING-TP-n を用いた時に高感度にノロウイルスを検出できるかをみるために他の遺伝子型についても検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表 1. プライマー、プローブとカキ由来ノロウイルス GI の塩基配列の比較

プライマー名 サンプル番号	遺伝子型	G1SKR (CCA ACC CAR CCA TTR TAC A)	RING1-TP(a) (AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA)	RING1-TP(b) (AGA TCG CCG TCT CCT GTC CA)
①	G I .2	CCA ACC CAG CCA TTA TAC A	抽出エラー	抽出エラー
②	不明	抽出エラー	抽出エラー	抽出エラー
③	G I .2	CC C ACC CAG CCA TTG TAC A	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG
④	G I .4	CC C ACC CAG CCA TTG TAC A	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG
⑤	G I .4	CC C ACC CAG CCA TTG TAC A	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG
⑥	G I .2	CCA ACC CAG CCA TTA TAC A	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG
⑦	G I .4	CC C ACC CAG CCA TTG TAC A	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG
⑧	G I .2	CCA ACC CAG CCA TTA TAC A	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG

検体中のノロウイルスのプライマー結合領域の塩基配列においてプライマーと一致していない部位を赤で示した。抽出エラーと書かれた検体はシーケンス解析ができなかったもの。

表 2. nested リアルタイム PCR において RING-TP-(a), (b) と RING-TP-n を使用した際の実測値の比較(* = t 検定において p<0.05)

サンプル番号	RING1-TP-(a),(b)	RING-TP-nagashima
①	70.36	805.60*
②	49.65	641.29*
③	1606.99	17558.61*
④	1361.47	14475.90*
⑤	244.29	2654.16*
⑥	376.33	4731.83*
⑦	67.96	1056.20*
⑧	62.58	1119.38*
pc10 ¹	11079.60	10403.76
pc10 ³	1714294.58	1286837.21

図 1. 混合プローブを用いた場合の nested リアルタイム PCR 定量値の比較

