

[ノート]

ノロウイルス検査における RNA 抽出コントロールとしての エコーウイルス 9 型 Hill 株の適用について

藤 本 嗣 人^{1*} 近 平 雅 嗣¹
秋 山 美 穂² 西 尾 治²

Application of Echovirus Type 9 strain Hill as an Alternative Positive Control of RNA Extraction on *Norovirus* Diagnosis

Tsuguto Fujimoto^{1*}, Masatsugu Chikahira¹
Miho Akiyama² and Osamu Nishio²

¹Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

²National Institute of Infectious Disease, IDSC, Musashimurayama 208-0011, Japan

SUMMARY

Application of Echovirus type 9 strain Hill (E9 Hill) was found to be possible as an alternative positive control of RNA extraction on *Norovirus* Diagnosis. To date, Poliovirus type 2 strain Sabin (P2) has been used for this purpose. However, under recent progress of polio eradication program, it is preferable to apply other safe virus which can substitute for P2. Using newly designed primer pair, E9 Hill was detectable sensitively and accurately. Addition of E9 Hill to the clinical samples had no effect to the *Norovirus* diagnosis. Therefore, E9 Hill was found to be able to substitute for P2 in *Norovirus* diagnosis.

I はじめに

小型球形ウイルスと呼称されているものにはノーウォークウイルス、サッポロウイルスおよびアストロウイルスが含まれている。これらは、主に冬季に感染性胃腸炎およびウイルス性食中毒を引き起こし、そのほとんどがノーウォークウイルスによる^{1,2)}。2002年8月の第8次国際

ウイルス命名委員会において、従来ノーウォークウイルスとしていたものはノロウイルスに、サッポロウイルスはサポウイルスと命名された。ノロウイルスの実験室診断には近年まで、電子顕微鏡での糞便中ウイルスの形態学的確認が用いられてきた。一方、近年は、種々の感染症や食中毒の原因特定などに必須の迅速性、感度および特異性を持ち、検出後の分子疫学的解析も可能なRT-PCR法がノロウイルス検査法の主流となった²⁾。

RT-PCR法において、検査材料からのRNA抽出は重要な工程である。特にノロウイルス検査におけるRNA抽出は、検査材料が糞便や食材であるために、検体中にRT-PCR反応を阻害する物質が含まれている可能性が

¹感染症部, ²国立感染症研究所 感染症情報センター

* 別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所

感染症部 藤 本 嗣 人

ある。そのため我々³⁾はノロウイルス検査におけるRNA抽出コントロールとしてポリオウイルス2型Sabin株を用い、「ウイルス性下痢症診断マニュアル(第3版)(以下マニュアルとする)」の中で標準化した。

しかし、ポリオ根絶計画は最終段階に進み、ポリオワクチン株の実験室での保管・管理の厳密化が進み、使用しにくくなることが予想される。また、ワクチン株であっても感染した場合に、ポリオ様の麻痺を発症する可能性がきわめて稀ながら存在する。そこでポリオウイルスの代替として、一般的にヒトに病原性がないと考えられているエコーウイルス9型(E9)Hill株を用いることが可能か否かについて検討した。

II 材料と方法

1. 便材料の処理およびRNA抽出

便材料の処理およびRNA抽出は、マニュアルに準じて行った。被検材料はすべて兵庫県内の患者からウイルス検査目的で採取された。ノロウイルス陽性の8名および下痢症以外の患者便検体12名(うち6名は無菌性髄膜炎)、計20名の糞便を用いた。

これらの便をPBS(-)2.7 mLに加えて全量3 mL(10%)になるよう加え、激しく攪拌して乳剤を作製した。その乳剤200 μ Lを分取して12,000 rpmで20分間冷却遠心した。この遠心上清からQIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen)を用い、添付のマニュアルに従ってRNAを抽出した。

検体20件のうち、ノロウイルス陽性検体8件にE9 Hill株2 μ Lを追加分注したものも作製してRNA抽出コントロールとした。

2. cDNAの合成

マニュアル³⁾に準じSuperScriptTM II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen)を用いて全量30 μ Lの系でおこなった。反応液組成は、RNA抽出液、14 μ L, 5 $\times$ 添付バッファー, 6 μ L, 10mM dNTP (Invitrogen), 1.5 μ L, pd(N)₆ (Amersham Biosciences, 500ng/ μ Lに調製), 0.8 μ L, Ribonuclease Inhibitor (40U/ μ L) (Invitrogen), 1.0 μ L, 100mM dTT#, 1.5 μ L, 上記のRT酵素(200U/ μ L), 1.5 μ L, およびRNA用の水3.7 μ Lを用いた。反応温度は42 $^{\circ}$ C 1時間とし、99 $^{\circ}$ C 5分間加熱して酵素を失活させ、4 $^{\circ}$ Cに急冷した。温度制御には下記のPCRの過程を含めてThermal cycler Dice (TaKaRa)を用いた。

3. E9 Hill用のプライマー

E9 Hill株の全ゲノム配列(GenBank accession No.X84981)7420baseのうち、ポジション5003-5671の間に、増幅産物のサイズが260-280bpになるようプライマー(Tm値は約50 $^{\circ}$ C)を設定した。この領域は、これまで使用してきたポリオウイルスの増幅部位に近く、pd(N)₆に代えてpd(T)₁₂₋₁₈を用いた場合でもゲノムの3'末端(ポリA鎖)からの位置が大きく異なるためである。

E9 Hill用のプライマー対はPrimer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html) およびGenetyx等のソフトウェアを利用してデザインした。E9 Hill-F, 5'-gTT AAC TCC ACC CTA CAG AT-3', センスプライマー, ポジション5192-5211, およびE9 Hill-R, 5'-TgA ACT CAC CAT ACT CAG T C-3', アンチセンスプライマー, ポジション 5459-5440である。このプライマー対によるE9 Hill株の増幅産物のサイズは268bpと計算された。

4. ノロウイルス検出用プライマー

マニュアルに準じてジェノグループG1用のプライマー対としてG1-SKF, 5'-CTg CCC gAA TTY gTA AAT gA-3' (Y=C or T)/G1-SKR, 5'-CCA ACC CAR CCA TTR TAC A-3' (R=A or G) およびCOG1F, 5'-CgY Tgg ATg CgN TTY CAT gA-3' (N=A,C,G or T)/COG1R, 5'-CTT AgA CgC CAT CAT CAT TYA C-3'を用いた。同様にジェノグループG2にも2種類のプライマー対として、G2-SKF, 5'-CNT ggg Agg gCg ATC gCA A-3'/G2-SKR, 5'-CCR CCN gCA TRH CCR TTR TAC AT-3' (H=A, C or T) およびCOG2F, 5'-CAR gAR BCN ATg TTY AgR Tgg ATg Ag-3' (B=C, g or T)/COG2R, 5'-TCg ACg CCA TCT TCA TTC ACA-3'を用いた。

5. PCR

マニュアルに準じてEx-Taq (TaKaRa)を用いた。反応は94 $^{\circ}$ Cで3分間反応後、94 $^{\circ}$ C30秒, 50 $^{\circ}$ C30秒, 72 $^{\circ}$ C1分を1サイクルとして40サイクルのPCR増幅を行い、72 $^{\circ}$ C7分反応させた。反応液の組成は、蒸留水, 17.7 μ L, 10 $\times$ Ex-Taq バッファー, 2.5 μ L, 2.5mM dNTP 2 μ L, センスプライマー(100 μ M), 0.12 μ L, アンチセンスプライマー(100 μ M), 0.12 μ L, cDNA, 2.5 μ L, Ex-Taq, 0.12 μ Lで全量25 μ Lとした。

プライマー対はノロウイルス用4対, E9Hill-FおよびE9Hill-Rに加えて、エンテロウイルスのユニバーサ

ルプライマー⁴⁾である EVP4 および OL68-1 も用いた。

6. E9 Hill 用 PCR の感度に関する実験

E9 Hill 株の RD-18S 細胞での力価は Reed-Muench 法で $5.67 \log \text{TCID}_{50}/25 \mu\text{L}$ であった。このウイルス液を PBS(-) で $10^{-2} \sim 10^{-8}$ に階段希釈して、各希釈倍率の $140 \mu\text{L}$ から上記の 2 と同様に cDNA を合成した。これを 5 の PCR で増幅して産物が見られるか否かを検討した。

7. アガロース電気泳動による増幅産物の確認

2% ウルトラピュア アガロース (Invitrogen) および TAE バッファーを用いて ミューピッド α (100V) で 30 分間泳動した。染色はエチジウムブロマイドで行い、UV 照射下で写真撮影した。マーカーには 100bp DNA Ladder (第一化学) を用いた。

III 結 果

1. E9 Hill 用のプライマーを用いた PCR

ノロウイルス陽性の下痢症検体 8 件に E9 Hill 株を添加してから RNA 抽出した検体では、E9 Hill-F および E9 Hill-R を使用した PCR で 268bp の増幅産物が明瞭に観察された。一方、未添加の対応するノロウイルス陽性検体では、同じ反応で全く増幅産物が見られなかった (Fig. 1)。その他の無菌性髄膜炎検体 6 件および感染性胃腸炎検体 6 件 (計 12 件) でも増幅産物は確認されなかった。

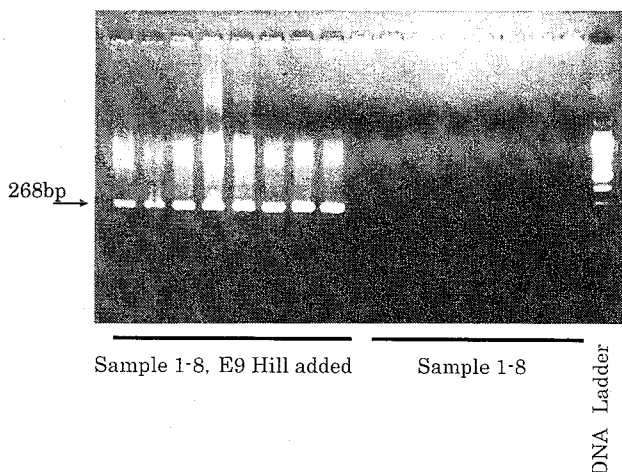


Fig. 1 Electrophoresis photo of amplification product of Echo 9 (E9) using primers E9 Hill-F and E9 Hill-R. Detection of E9 Hill added as a positive control of RNA extraction was possible. Samples 1-8 were all *Norovirus* positive.

2. ノロウイルス特異的プライマーを用いた PCR

E9 Hill 株を添加したノロウイルス陽性検体 8 件についてノロウイルス PCR を実施したところ、全ての検体でノロウイルスのゲノムが確実に検出された。Table. 1 に示した通り 8 件中 1 件はジェノグループ G1 と G2 の混合感染、5 件は G2 の感染、2 件は G1 に感染していたと判定された。これらの結果は E9 Hill 株を添加しない検体で得られた結果と同じで、添加による影響は観察されなかった。

Table. 1 Results of *Norovirus* specific PCRs and E9 Hill specific PCR

Primer pair	Norovirus positive samples E9 Hill added								product size
	1	2	3	4	5	6	7	8	
G1-SKF/ G1-SKR	+	-	-	-	-	-	+	+	330bp
COG1F/ COG1R	+	-	-	-	-	-	+	+	85bp
G2-SKF/ G2-SKR	+	+	+	+	+	+	-	-	344bp
COG2F/ COG2R	+	+	+	+	+	+	-	-	98bp
E9 Hill-F/ E9 Hill-R	+	+	+	+	+	+	+	+	268bp

+:positive, -:negative

3. エンテロウイルス検出用プライマーを用いた PCR

E9 Hill 株を添加したノロウイルス陽性検体 8 件では増幅がはっきりと確認できたが、未添加の同じ 8 件はすべて陰性であった。その他の 12 名中 5 名の検体からエンテロウイルス遺伝子が検出された。うち 4 名は無菌性髄膜炎患者であり、1 名は感染性胃腸炎患者 (髄膜炎に伴う嘔吐が疑われた患者) であった。この結果から E9 Hill 株用にデザインしたプライマー対は少なくとも今回 5 名から検出されたエンテロウイルスのゲノムを増幅しないことが示された。

4. E9 用 PCR の感度

10^{-6} 倍まで明瞭な 268bp の増幅産物が見られた (Fig. 2)。陽性コントロールは確実に検出される必要があり、 10^{-4} 倍希釈は明瞭な増幅バンドが観察されて非特異増幅がほとんど見られなかったので、陽性コントロールの希釈倍率として適切と考えられた。計算の結果、E9 Hill 株の力価 $3.5 \log \text{TCID}_{50}/25 \mu\text{L}$ のウイルス液 $2 \mu\text{L}$ が RNA 抽出コントロールとして適していた。

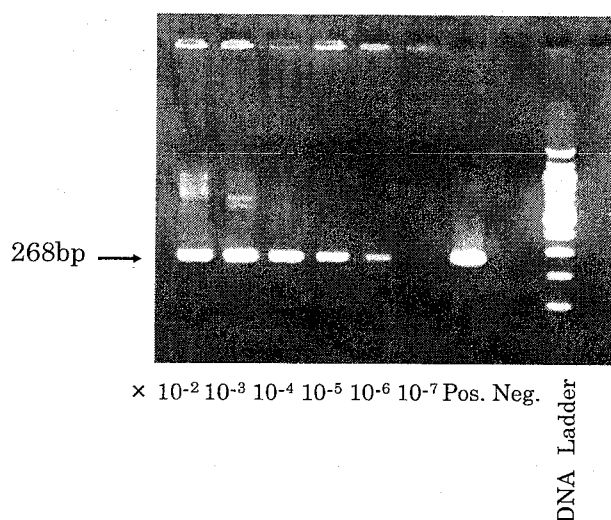


Fig. 2 Sensitivity of RT-PCR for detection of E9 Hill using primers E9Hill-F and E9Hill-R. E9 Hill was diluted from 10^{-2} to 10^{-7} and RNA was extracted from each aliquot. Pos indicates E9 Hill solution without dilution. Neg means negative control.

IV 考 察

本研究の目的は、国がノロウイルス検査法を標準化する目的で発行する検査マニュアル中で用いられるポリオウイルスに代えて E9 Hill 株を用いる手法を示すことであり、それが可能なことが明らかになった。

E9 Hill 株の添加は、ノロウイルス PCR に影響が見られず、反応を阻害しないものと考えられる。

今回デザインした E9 Hill 用プライマー対による E9 Hill 株 PCR で、検査結果に影響しないレベルの少量の非特異的な増幅が見られるケースが見られた (Fig. 1, 2) が、これは添加する E9 Hill 溶液を希釈することで防止でき、力価 $3.5 \log \text{TCID}_{50}/25 \mu\text{L}$ のウイルス液 $2 \mu\text{L}$ が RNA 抽出コントロールとして適していると計算された。この陽性コントロールを添加した場合、ノロウイルス検査においても前述したように検査結果に影響を及ぼさなかった。

便中のウイルス RNA の抽出は、糞便以外に適切な検査材料がないノロウイルス検査において特に重要であるので、その抽出法の標準化が必要である。しかし、2003 年現在、ウイルス RNA 抽出キットとして市販されているもので、糞便を適用対象としているものは、我々が把握している限り、存在しない (ただし、便中のウイルス DNA を対象としたものは近年入手可能となった)。これは、RNA が壊れやすい物質で、RT-PCR に及ぼす糞便の組成等が個々に異なり、標準化しにくいと考えられる。E9 Hill 株と今回デザインしたプライマー対

(E9Hill-S + E9Hill-R) を使用した手法は、RNA 抽出および RT 反応過程のコントロール実験として有用であると考ええる。

V ま と め

ノロウイルス検査の RNA 抽出コントロールにおいてエコーウイルス 9 型 Hill 株 (E9 Hill) が RNA 抽出のポジティブコントロールとして使用可能であることが明らかになった。これまで、ポリオウイルス 2 型 Sabin 株 (P2) がこの目的のために用いられてきた。しかし、ポリオ撲滅プログラムの進展とともに、実験室診断においてもポリオウイルスに代わる安全なウイルスの使用が望ましくなりつつある。今回、新たにデザインしたプライマー対を使用して、E9 Hill は高感度かつ正確に検出可能であった。また、E9 Hill の添加はノロウイルス検査に影響しなかった。従って、ノロウイルス検査において E9 Hill を P2 に代えて用いることが出来ることが示された。

謝 辞

本論文を作成するにあたり、ご助言を賜りました山岡政興感染症部長に深謝いたします。

本研究の一部は平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金 (食品安全確保研究事業) ならびに文部科学省研究補助金 (基盤研究 C, #15590568) を受けて行われた。

文 献

- 1) 近平雅嗣, 藤本嗣人, 岡藤輝夫, 増田邦義: 感染症発生動向調査において小児から分離された下痢症関連ウイルス. 兵庫県立衛生研究所年報, 33, p99-104 (1998)
- 2) 西尾治, 西香南子, 福田伸治, 西田知子, 篠原美千代, 三上稔之, 沖村容子, 新川奈緒美, 杉枝正明, 古屋由美子, 大瀬戸光明, 鈴木宏: ウイルス性食中毒の病因. 臨床とウイルス, 31-3, p163-169 (2003)
- 3) 西尾治: ノロウイルスの RT-PCR 法. ウイルス性下痢症診断マニュアル (第 3 版), p44-62 (2003)
- 4) Ishiko H, Shimada Y, Yonaha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, Takeda N.: Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. J Infect Dis, 185, p.744-754 (2002)

(受理 2003 年 11 月 25 日)