

ノロウイルス検査における使用試薬の検討

内田和江 貫洞里美 中川佳子 富岡恭子 鈴木典子 峯岸俊貴
小川泰卓 青沼えり 篠原美千代 岸本剛

Study of Enzyme used in Norovirus detection method

Kazue Uchida, Satomi Kando, Keiko Nakagawa, Kyoko Tomioka, Noriko Suzuki,
Toshitaka Minegishi, Yasutaka Ogawa, Eri Aonuma, Michiyo Shinohara, Tsuyoshi Kishimoto

はじめに

食中毒検査におけるノロウイルス（以下NV）検査は、厚生労働省通知の「ノロウイルス検出法について」（食安監発第 1105001 号 平成 15 年 11 月 5 日、食安全監発第 0514004 号 最終改訂 平成 25 年 10 月 22 日）¹⁾（以下通知法）において、リアルタイム PCR 法による NV 遺伝子の定量的検出法²⁾、使用試薬等の例示が記載されており、発出から 10 年以上経過した現在でも、精度保障の点から、本通知に例示された試薬を用いた検査が実施されている。NV の検出の感度および特異度を落とすことなく迅速性の向上を図るため、通知法公表後に発売され利便性と高性能が謳われている試薬を用いた検査について検討した。

材料および方法

平成 25-26 年度に採取され、通知法による NV のリアルタイム PCR 検査が実施された糞便 80 検体[採取当時 NV 遺伝子群(G) I, G II 共に陰性判定 30 検体, G I または G II のどちらかが陽性判定 50

検体]で-80℃保存されていたものを用いた。検体及び資料は、埼玉県衛生研究所倫理審査委員会の承認を得て、提供者の情報と匿名連結不可能とする操作を施した後、使用した。

糞便検体からのウイルス核酸抽出は、通知法に従った。すなわち、糞便 0.1g を滅菌超純水 1ml に懸濁し、15000rpm10 分間遠心し得られた上清 140μl から、QIA viral RNA mini kit を使用し、本キットの取扱い説明書に従い実施した。抽出核酸は 60μl のジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理水に溶出した。得られた抽出核酸を鋳型とする cDNA 合成を、通知法に基づき DNA 分解処理工程 (30 分間の DNase 処理と 5 分間の酵素不活化) を実施後、逆転写酵素として SuperScript II Reverse Transcriptase (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用した場合 (系 1) と、DNA 分解処理を実施せず、逆転写反応を PrimeScript RT reagent kit (Perfect RealTime) (タカラバイオ) を用いて実施した場合 (系 2) の 2 とおりで実施した。系 1 及び系 2 の詳細を表 1 に示した。

表 1 系 1 と系 2 の cDNA 合成までの検査法

	系 1	系 2
DNA 分解処理	RQ1 RNase-Free DNase (プロメガ) 1.5μl x5 SuperScriptII First-Strand Bbuffer (サーモフィッシャーサイエンティフィック) 1.0μl 核酸抽出液 12.5μl	実施なし
(反応条件)	37°C, 30分 → 75°C, 5分	
逆転写反応	SuperScriptII Reverse Transcriptase (サーモフィッシャーサイエンティフィック) 1.5μl x5 SuperScriptII First-Strand Buffer 4.5μl 10mM dNTPs 1.5μl 100μM Random 6mers 0.75μl RNasin ^R Ribonuclease Inhibitor (プロメガ) 0.75μl 100mM ジチオスレイトール 1.5μl DEPC 処理水 4.5μl DNA 分解処理反応液 15μl	x5 PrimeScript Buffer(for Realtime) (タカラバイオ) 4.0μl 100μM Random 6mers 4.0μl PrimeScript RT Enzyme Mix 1.0μl DEPC 処理水 1.0μl 核酸抽出液 10.0μl
(反応条件)	42°C, 60分 → 99°C, 10分	37°C, 15分 → 85°C, 5秒
反応時間合計	105分	約 15分

系 1, 系 2 とも, 得られた cDNA 溶液のうち 4 μ l を用いて, 通知法に従い反応液全量を 35 μ l とした NVG I 及び GII のリアルタイム PCR 法を実施した. リアルタイム PCR 法の判定は, 10⁷ から 10⁰ コピー数まで 10 倍段階希釈した NVG I 及び GII の陽性対照 (NV リファレンスセンター作製プラスミド) の同時測定により作成された検量線を基に, DNA 測定値が 10¹ コピー数以上を示した検体を陽性とした.

系 1 または系 2 のどちらかの方法のみで陽性となった場合は, COG I F/G I SKR, または COG IIF/G II SKR プライマーセットによる PCR を行い, 増幅産物をダイレクトシーケンス法により確認した.

リアルタイム PCR およびシーケンスによる結果から, 通知法である系 1 を標準とし, 系 2 の感度及び特異度を検討した.

結果および考察

80 検体の系 1 及び系 2 による試験結果を表 2 に示した. また, 陽性検体における DNA 測定値を表 3 に示した.

NV G I は, 系 1 では, 80 検体のうち陽性 14 検体 (17.5%), 陰性 66 検体 (82.5%), 検討した系 2 では陽性は 16 検体 (20.0%), 陰性 64 検体 (80.0%) であった. 系 1 で陽性だった 14 検体は全て, 系 2 でも陽性であった. 系 1 と比較した場合の系 2 の感度は 100.0%, 特異度は 97.0% であった.

NV G II は系 1 では 80 検体のうち陽性 33 検体 (41.3%), 陰性は 47 検体 (58.7%), 検討した系 2 では陽性 39 検体 (48.8%), 陰性 41 検体 (51.2%) であった. 系 1 で陽性であった 33 検体は全て, 系 2 でも陽性であった. 系 1 と比較した場合の系 2 の感度は 100.0%, 特異度は 87.2% であった.

系 1, 系 2 共に陽性だった検体では, リアルタイム PCR 法の結果で得られた 4 μ l あたりの cDNA コピー数は, すべての検体で系 2 の方が系 1 のものを上回っていた. また, 系 2 のみで陽性だった G I の 2 検体及び G II の 6 検体は, 共に正常な増幅曲線を示し, その DNA 定量値は G I で 28 コピーと 12 コピー, G II で 24 コピーから 180 コピーを示した. それら 8 検体の cDNA について, G I 及び G II 特異的プライマーセットによる PCR を実施し, 増幅産物のシーケンスをしたところ, G I の 2 検体はそれぞれ遺伝子型 G I. 1 と G I. 4 の NV, G II の 6 検体は全て遺伝子型 G II. 4 の NV であることが確認された.

ノロウイルスの遺伝子検査法については, リアルタイム PCR 法を含め, これまで多くの研究者により様々な方法が検討されてきた^{3), 4)}. 本検討は, 通知法と同様の方法である系 1 と系 1 を基に, 抽出核酸から cDNA 合成までの過程を変更した系 2 を比較した. 系 2 は, G I, G II とも系 1 で陽性を示した検体全て及び陰性であった一部の検体から NV を検出したことから, 通知法である系 1 に比較し, 感度の点では劣らないと推察された.

系 1 と系 2 で得られた DNA 測定値が異なる結果となった原因としては, 通知法ではリアルタイム PCR 反応に移行する際の RNA 量が 1.67 μ l なのに対し, 系 2 では 2.0 μ l と若干多くなっていること, 抽出 RNA からの cDNA 合成過程において DNA 分解処理過

程におけるウイルス RNA の分解が避けられていること, などが考えられた.

検体の希釈系列を用いて系 1, 系 2 の検出限界の差異を明らかにしていくことは, 今後の課題と考える. また, 特異度の点では, 系 1 で陰性, 系 2 で陽性を示した検体は全て, RT-PCR とシーケンスの結果から NV 遺伝子を検出したことから, 系 2 の非特異的反応による偽陽性ではないと考えられた. 今後さらに検体数を重ねて確認していく必要がある.

以上の結果から, 通知法である系 1 を基に比較した場合, 系 2 により合成された cDNA は, 引き続き実施するリアルタイム PCR 法での使用において, 偽陰性を増加させる可能性は認められず, また特異度を低下させることなく鋳型としての反応性を保持していると考えられた. 系 2 による cDNA 合成は検査時間を 1 時間以上短縮できることから迅速性の観点からも, 今後さらに検討を重ねることで, 食中毒の行政検査として用いることが可能であると考えられた.

表 2 食中毒検体の NV 試験結果 (N = 80)

		系 1	
		陽性	陰性
系 2	G I	14	2
	G II	0	64

		系 1	
		陽性	陰性
系 2	G I	33	6
	G II	0	41

表3 NV陽性検体のリアルタイムPCR法におけるDNA測定値 (DNAコピー数)

NV G I : 16検体

G I	系1	系2
1	8.86E+06	1.23E+08
2	1.63E+06	2.43E+07
3	9.44E+04	2.91E+06
4	8.50E+04	1.07E+06
5	2.21E+04	1.69E+05
6	2.10E+04	2.81E+05
7	9.62E+03	1.13E+05
8	2.63E+03	2.88E+04
9	9.62E+02	1.13E+04
10	7.19E+02	6.58E+03
11	6.84E+02	1.21E+04
12	1.34E+01	1.16E+02
13	1.21E+01	9.50E+01
14	1.10E+01	1.51E+02
15	UND	2.81E+01
16	UND	1.25E+01

UND: 陰性

NV G II : 39検体

G II	系1	系2
1	2.59E+04	3.16E+05
2	4.05E+06	5.67E+05
3	2.11E+06	3.05E+07
4	5.50E+05	1.22E+07
5	5.01E+05	6.72E+06
6	4.24E+05	6.75E+06
7	1.52E+05	2.48E+06
8	1.47E+05	1.78E+06
9	1.05E+05	2.22E+06
10	1.03E+05	1.48E+06
11	8.60E+04	1.77E+06
12	4.30E+04	6.39E+05
13	3.16E+04	7.53E+05
14	1.79E+04	3.05E+05
15	6.45E+03	6.90E+04
16	2.92E+03	8.58E+04
17	2.90E+03	6.58E+04
18	2.13E+03	4.63E+04
19	1.91E+03	2.78E+04
20	8.59E+02	1.30E+04
21	7.21E+02	1.46E+04
22	6.30E+02	6.93E+03
23	6.23E+02	1.33E+04
24	4.46E+02	8.93E+03
25	3.06E+02	4.43E+03
26	2.02E+02	1.25E+03
27	1.65E+02	2.94E+05
28	1.65E+02	7.26E+02
29	1.47E+02	1.29E+03
30	7.53E+01	7.53E+02
31	6.87E+01	4.33E+02
32	4.05E+01	3.41E+02
33	1.97E+01	8.90E+01
34	UND	1.79E+02
35	UND	4.01E+01
36	UND	3.04E+01
37	UND	4.81E+01
38	UND	2.41E+01
39	UND	1.03E+02

UND: 陰性

【まとめ】

NVのリアルタイムPCR法による検査について、通知法に基づきcDNAを合成した場合(系1)とDNA処理をせず逆転写酵素に通知記載以外の製品を使用しcDNAを合成した場合(系2)を糞便80検体を用いて比較した。その結果、系2では、NVG Iで感度100%、特異度97.0%、GIIで感度100%、特異度87.2%と、検出率では系1に劣らなかった。また、系2では陽性、系1では陰性を示した検体8検体は、シーケンスによりNV遺伝子陽性が確認され、系2の非特異的な偽陽性でないと考えられた。これらのことから系2は系1と比較し、感度と特異度の点で劣らないと考えられ、また、検査時間を短縮できることから、食中毒の行政検査として用いるため、さらに検討する価値があると考えられた。

【文献】

- 1) 厚生労働省：ノロウイルス検出法について。食安監発 第1105001号 平成15年11月5日、食安全監発第0514004号 最終改訂 平成25年10月22日
- 2) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J

Clin Microbiol, 41:1548-1557, 2003

- 3) 左近直美, 核酸精製を必要としないone-step リアルタイムPCRによるノロウイルス検査の有用性. 日本食品微生物学会雑誌 Jpn. J. Food Microbiol., **34**(2), 135-139, 2017
- 4) 柳生文宏, 砂田亜津子, 小島禎, 池戸正成, 沖津祥子, 牛島廣治, 新しい遺伝子増幅技術によるノロウイルスの検出方法の比較J. J. A. Inf. D, 80 : 275~276, 2006