

SRSV 検査に向けた検体処理法の検討

斎藤 博之 原田誠三郎 佐藤 宏康

新たに食中毒原因物質に指定された SRSV の検査に RT-PCR 法を用いる場合の PCR プライマーに関する比較検討はすでに多くの研究機関においてなされている。しかしながら、検体の処理方法 (RNA 抽出法) に関しては十分な検討がなされていない。今年度は市販キットも含めた 8 種類の抽出法に関して、検査成績に及ぼす影響や試薬コストについて比較した。実際の試験にあたっては、培養不可能で量的に限りのある SRSV の代わりに、同じプラス鎖 RNA ウイルスであるコクサッキー A16 ウイルスを用いて抽出過程を再現した。糞便検体に関しては方法間で大きな差は無く、手間とコストを基準に選んでよいことがわかった。一方、カキ検体に関しては Hot Phenol 法が最も抽出効率において優れていた。

I はじめに

SRSV 検出のための RT-PCR 法においては、プライマー選定の他に検体からの RNA 抽出法が大きな意味を持つてくる。これまでは、検体処理法として CTAB 法¹⁾が事実上の標準法として用いられてきており、検出成績においても問題点は無かったため、この種の検討は PCR プライマーの検討に比べてほとんど行われていない。しかしながら、行政依頼検査においては大量の検体を限られた時間で処理しなければならず、CTAB 法の煩雑さがあらためて浮き彫りになってきた。また、RNA 抽出用の市販キットは、検体として培養細胞や血液を想定しており、糞便に対しての適否はあらためて検討しなければならない。今回は検体からの RNA 抽出法について複数の方法を比較検討した。検体としては、糞便に加えて、最近検査依頼が増えつつある生カキに対しても同様に比較検討を行った。

II 材料と方法

比較検討のためには十分量の共通検体が必要であるが、SRSV は未だ培養方法が確立されていないため、試験に用いるのは困難である。そこで、SRSV と同じ遺伝子構造 (プラス鎖 RNA ウイルス) を持つコクサッキー A16 ウイルスでもって代用した。すなわち、 10^5 TCID₅₀/ml のコクサッキー A16 培養上清を原液とし、次の 3 種類の希釈液で段階希釈した。

1. 蒸留水
2. 10% 糞便乳剤をフルオロカーボン処理したもの
3. 生カキ中腸腺の凍結融解抽出液をフルオロカーボン処理したもの

蒸留水を加えたのは、純粋な「回収効率」を比較するためである。糞便とカキに関してはあらかじめコクサッ

キー A16 ウイルスが陰性であることを確認してある。

このようにして調製した共通試料に対して次の 8 種類の抽出法で RNA を回収して RT-PCR を行い、どの程度の希釈まで増幅バンドが検出できるかを比較した。この中で、事実上の標準法とされている CTAB 法は処理に 1 日を要するが、2～7 の方法は検体数にもよるが、おおむね 3 時間程度で終了する。Boiling 法は検体をプラスチックチューブに入れて 5 分間煮沸するだけである。

1. CTAB 法
2. SepaGene RV-R (三光純薬)
3. ISOGEN-LS (ニッポンジーン)
4. Glassmilk 法
5. Catrimox-14 (宝酒造)
6. Dr.GenTLE (宝酒造)
7. Hot Phenol 法
8. Boiling

処理量は各希釈試料ごとに 0.1ml である。なお、市販キット (SepaGene RV-R、ISOGEN-LS、Catrimox-14、Dr.GenTLE) の使用条件は添付説明書に従うが、それ以外の方法については以下のとおりである。

Glassmilk 法

6M チオシアン酸グアニジン 0.3ml と Glassmilk (Glass Powder を蒸留水でスラリーとする) 10 μ l を加えて室温で 10 分放置する。遠心して上清を除き、沈澱を 1ml の NEW buffer (50mM NaCl - 50% Ethanol - 5mM Tris-HCl - 0.5mM EDTA, pH7.5) で 1 回、純エタノールで 1 回洗滌する。沈澱を乾燥させてから蒸留水 50 μ l を加えて 65°C で 5 分処理して RNA を溶出させる。最後に遠心して上清を回収する。

Hot Phenol 法

酸性 GTC 溶液 (5.5M チオシアン酸グアニジン-25mM クエン酸 Na-0.5% ラウロイルサルコシン酸 Na-0.1M 2-メルカプトエタノール-0.4M 酢酸 Na-3 μ g/ml グリコーゲン)を混合し、最後に酢酸で pH4~5 に合わせる)を調製する。これを試料に 0.3ml 加えて 65°C に加温する。フェノール/クロロホルム 0.4ml を加えて加温したまま 10 分間放置する (5 分後にチューブを良く振って混ぜる)。氷上で冷やした後、遠心して水層を回収し、再度クロロホルム/イソアミルアルコールで抽出する。水層を回収してエタノール沈澱する (酢酸 Na はすでに加えられているのでこの段階では不要)。

PCR に用いたプライマーはエンテロウイルス共通で 5' ノンコーディング領域の配列を用いた²⁾。なお、全ての反応において DNase I 処理を加えた³⁾。

III 結果と考察

図 1 に方法別、検体別の RNA 抽出効率を比較した成績を示した。糞便検体に対する抽出効率では Dr. GenTLE の成績が低かったがそれ以外はどの方法を用いても差が無かった。カキ検体では Hot Phenol 法の抽出効率が最も高く他の方法とは明らかな差が認められた。

本研究では、検査にかかるコストも体制整備のための重要なファクターとして位置付けているため、図 2 に 1 検体当りの処理コスト (プラスチック容器類も含む) を示した。

糞便の場合は Dr.GenTLE 以外は方法ごとの効率の差は無いため、コストと手間を選んでかまわないことになる。図 2 にコストの比較を示したが、Catrimox-14 と Glassmilk 法が最も安く済む。より手間のかからない方は前者だが、糞便の性状 (脂質の多い便やキャリアブレア入りの便など) によって影響を受けやすいので、ここでは安定した検査精度を得られる Glassmilk 法を推奨したい。

カキ検体では Hot Phenol 法の抽出効率が極めて高かったので、通常はこれを選択すべきであろう。コストも安く済み、手間も他の市販キットと同程度と考えられる。

阻害物質を含まない対照として蒸留水で希釈した試料についてもテストしたが、意外なことに糞便検体より成績が低い場合が多かった。これは、Boiling 法以外は全て沈澱反応でもって RNA を回収するようになっており、また、血液や培養細胞を検査対象として作られているためキャリアーが添加されておらず、極微量の RNA の回収には不利に働いたと考えられる。むしろ糞便やカキ検体では不純物がキャリアーの役目を果たしたものと考えられる。そのため単純な煮沸のみの処理では損失が少なくなっている。Hot Phenol 法では反応系にキャリアーとしてグリコーゲンが添加されているため、どのような検体でも安定した成績が得られている。この結果は、環境水に対してモニタリング調査を行う場合、あらかじめ適当なキャリアーを添加する必要性を示唆している。

図 1 RNA の抽出効率比較

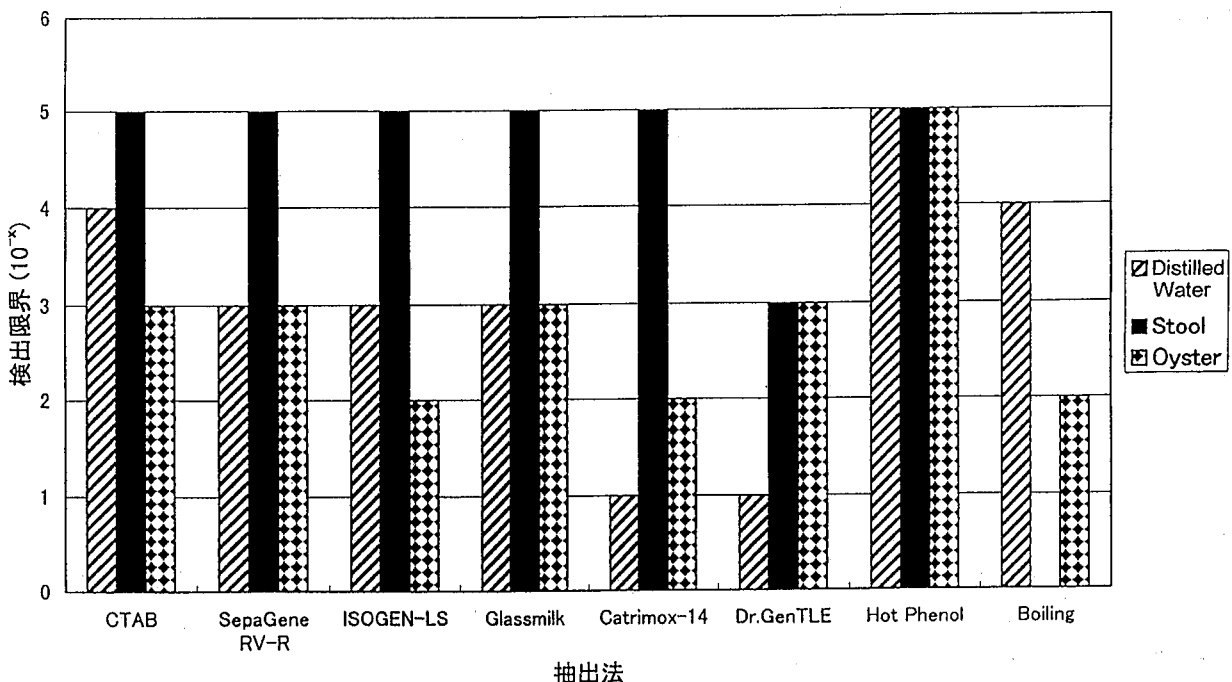
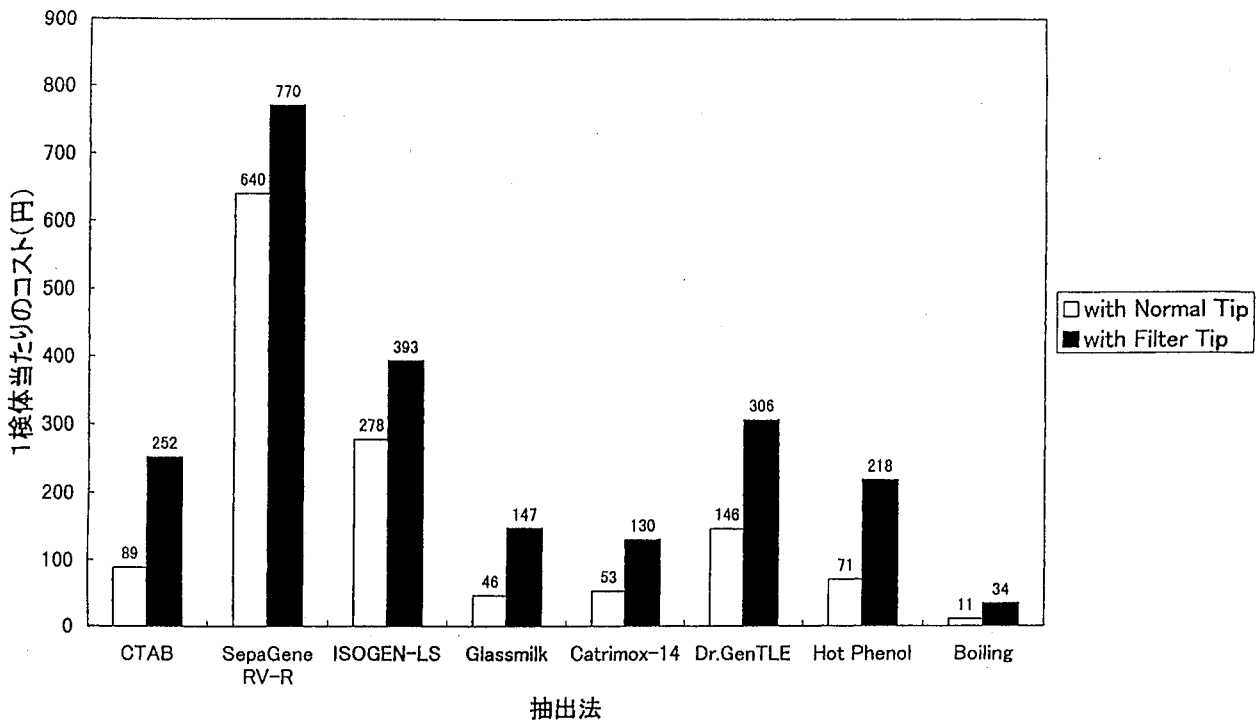


図2 抽出法別コスト比較



IV ま と め

これまでの研究では、RNA 抽出法に関する十分な比較検討がなされていなかった。これは、SRSV 陽性の糞便検体を研究材料にした場合、量に限りがあるため同一条件下の比較が困難であったことが理由である。今回は、あえて SRSV の PCR を用いずに培養可能なコクサッキー A16 ウイルスを健状人の糞便、及びカキ凍結融解物に添加することで RNA 抽出過程を再現した。遺伝子構造が SRSV と同じプラス鎖 RNA ウイルスで、物理化学的性状に差が無いため、本研究で得られた結果を実際の SRSV 検査に適用しても差し支えないと考えられる。Glassmilk 法はこれまでキット製品しか市販されていなかったためコスト的に不利であったが、単品の「Glass Powder」を購入してスラリーにすればこの問題は解決できる。一方、カキ検体に関しては、Hot Phenol 法が最も良い結果となった。簡便さにおいては、必要試薬を可能な限りプレミックスしておけば、他の市販キットと同じくらいになるし、CTAB 法よりははるかに迅速である。

V 文 献

- 1) Jiang, X. et al. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30: 2529-2534.
- 2) Rotbart, H. A. Enzymatic RNA Amplification of the Enterovirus. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 438-442.

- 3) Saito, H. et al. Application of RT-PCR designed from the sequence of the local SRSV strain to the screening in viral gastro-enteritis outbreak. *Microbiol. Immunol.* 1998; 42: 439-446.