

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

斎藤博之 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、各種酵素の選定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 を使い、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

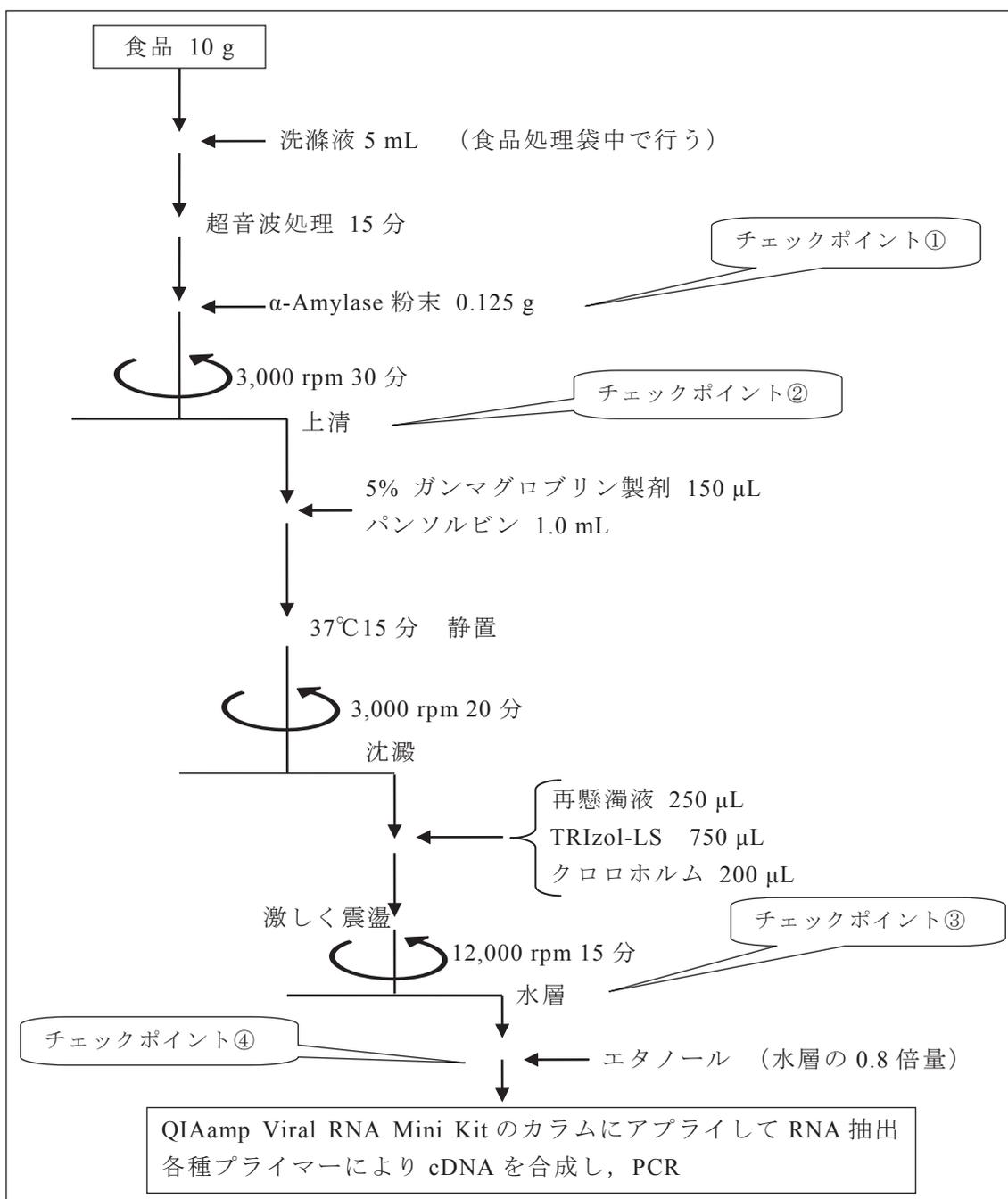


図1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

※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°C 2 分 1 サイクル

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

95°C 30 秒 - 50°C 30 秒 - 72°C 30 秒 40 サイクル

72°C 7 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℃, 42℃, 55℃, 58℃, 及び 60℃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℃ 10 分) を行い、75℃ 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、3,000rpm30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

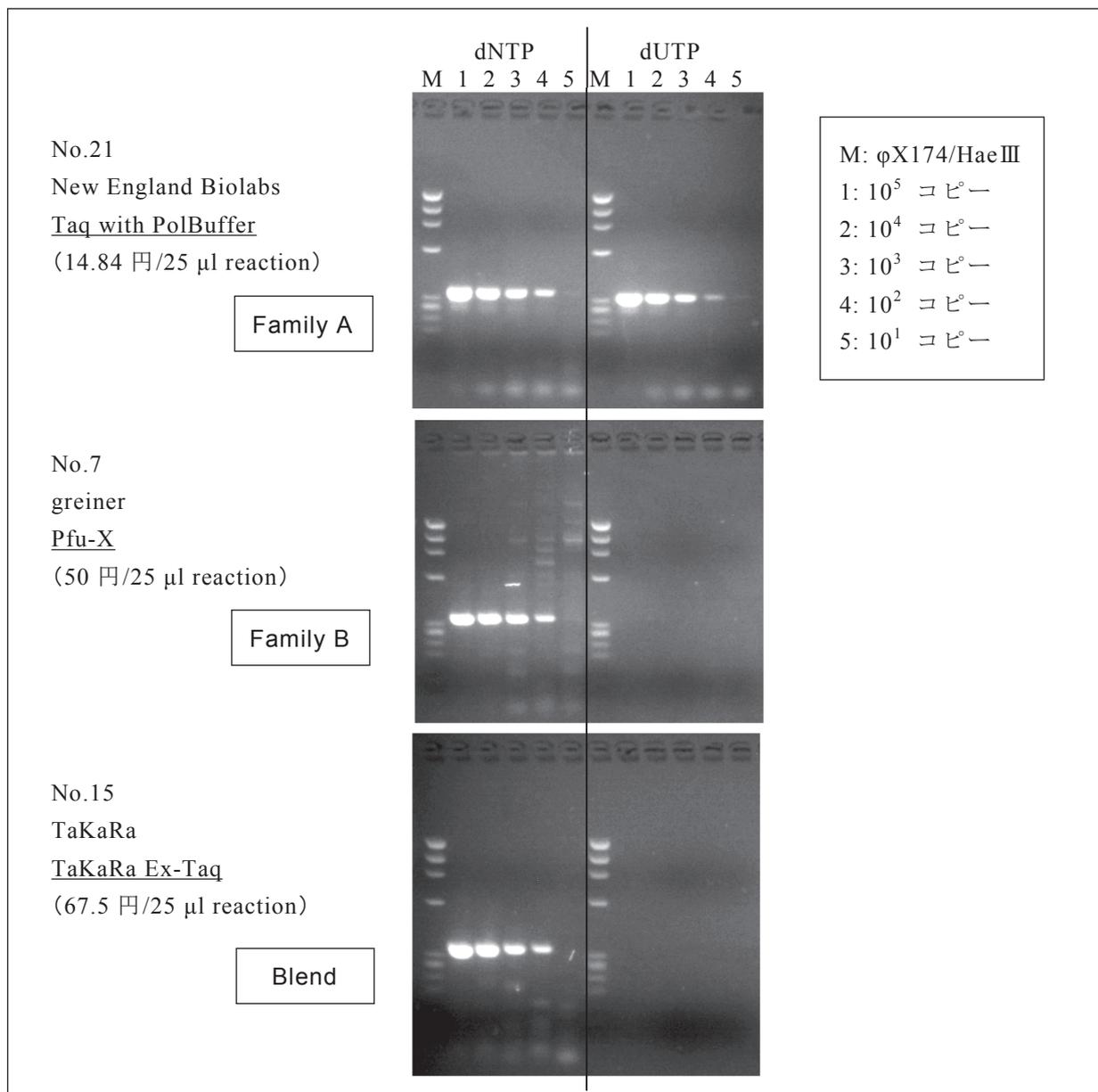


図 2A 蒸留水で段階希釈した NoV 1st. PCR 産物に対する 2nd. PCR

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

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

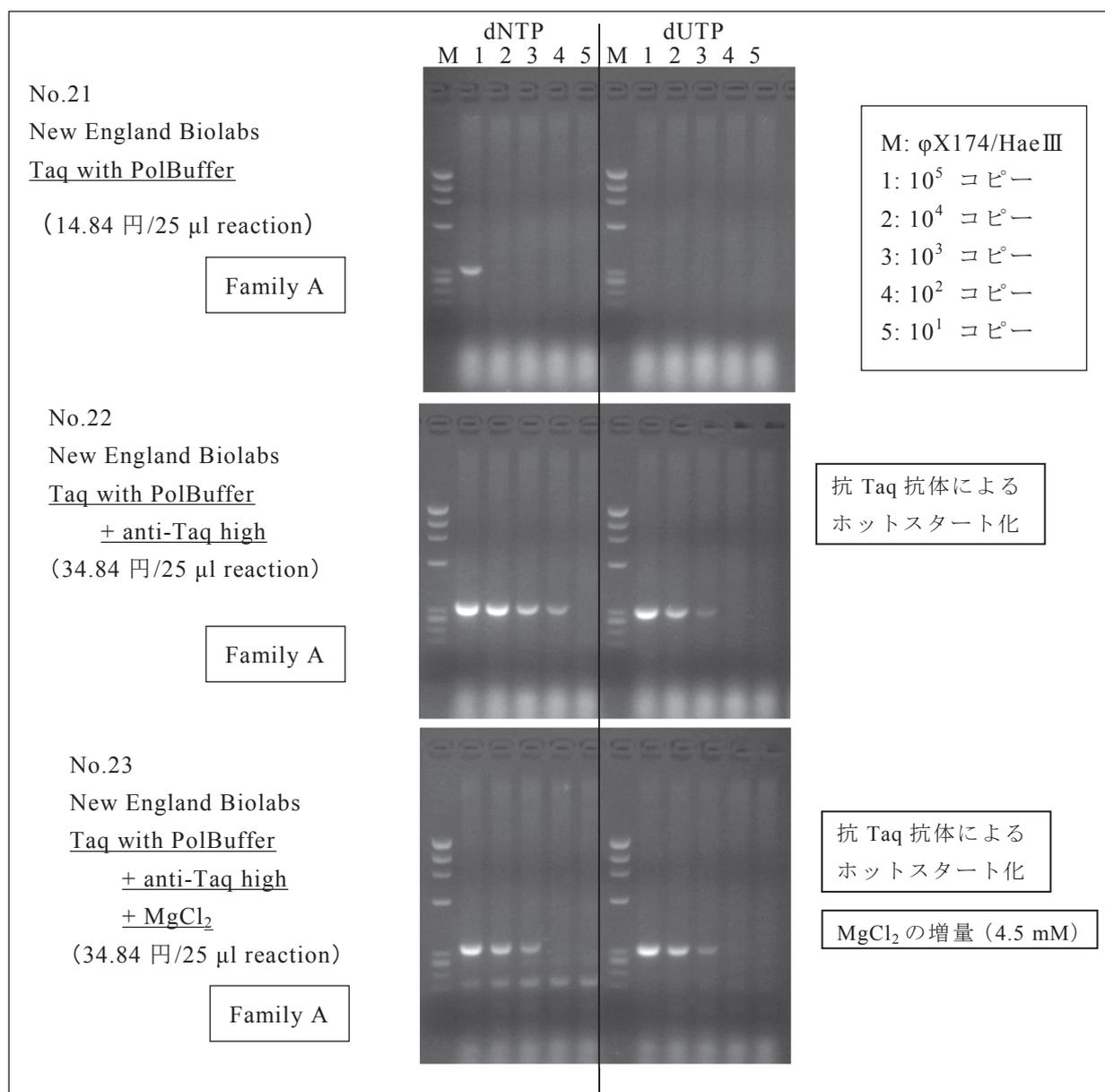


図 2B パントラ抽出物で段階希釈した NoV 1st. PCR 産物に対する 2nd. PCR (1)

“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

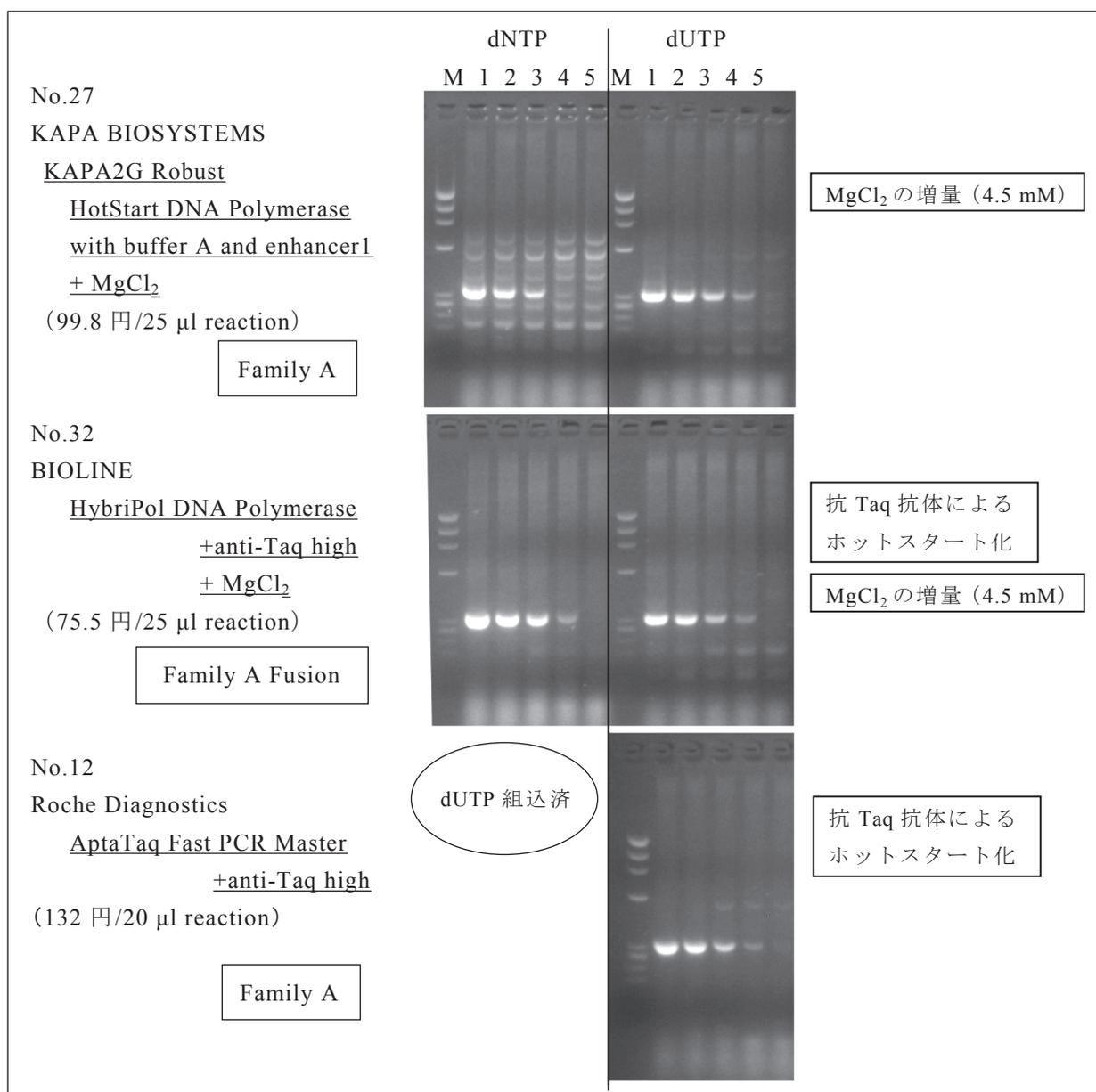


図 2C パントラ抽出物で段階希釈した NoV 1st. PCR 産物に対する 2nd. PCR (2)
 “dNTP”と表記してある反応は dATP, dGTP, dCTP, dTTP を各 200 μM にて使用。
 “dUTP”と表記してある反応は dATP, dGTP, dCTP, を各 200 μM, dUTP を 600 μM にて使用

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

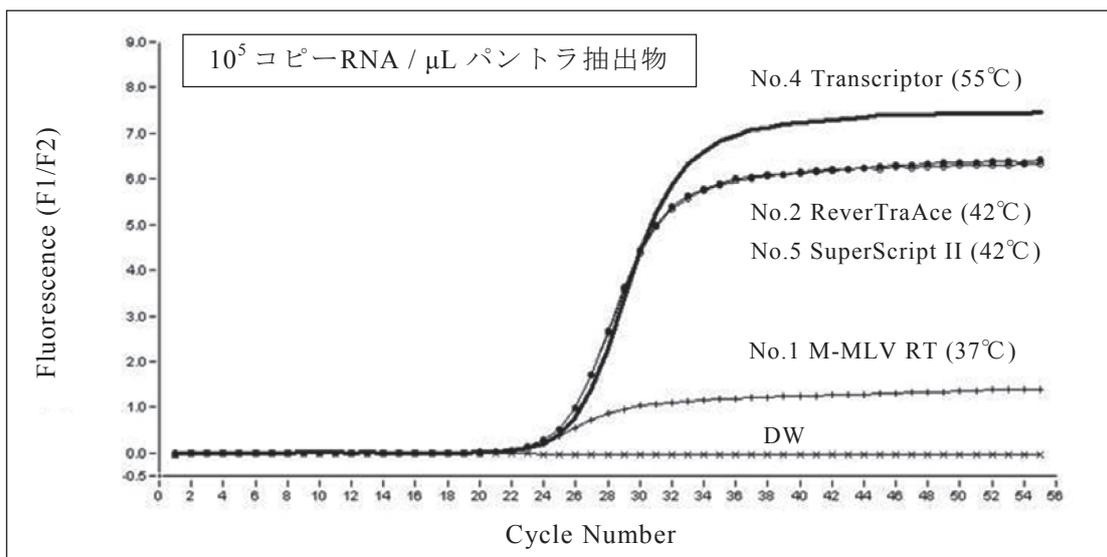


図 3A 逆転写酵素の比較 (1)

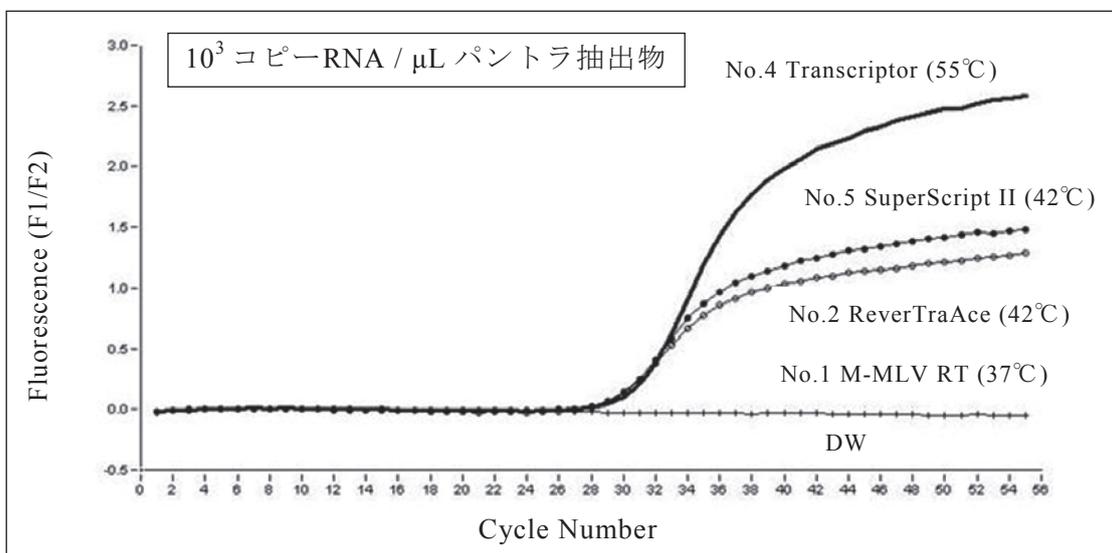


図 3B 逆転写酵素の比較 (2)

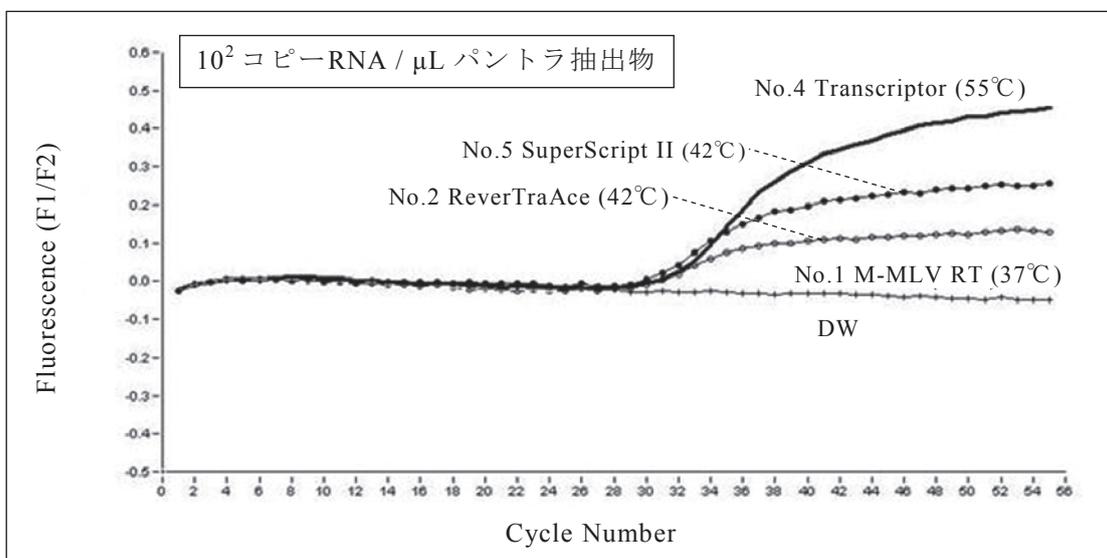


図 3C 逆転写酵素の比較 (3)

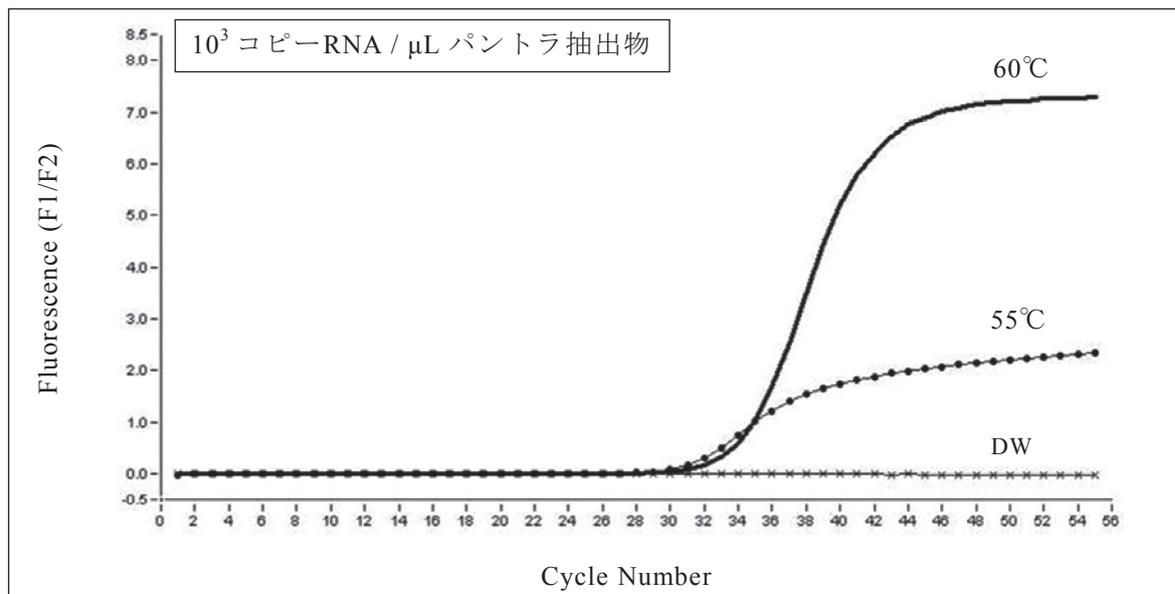


図 4A Transcriptor の反応温度比較 (1)

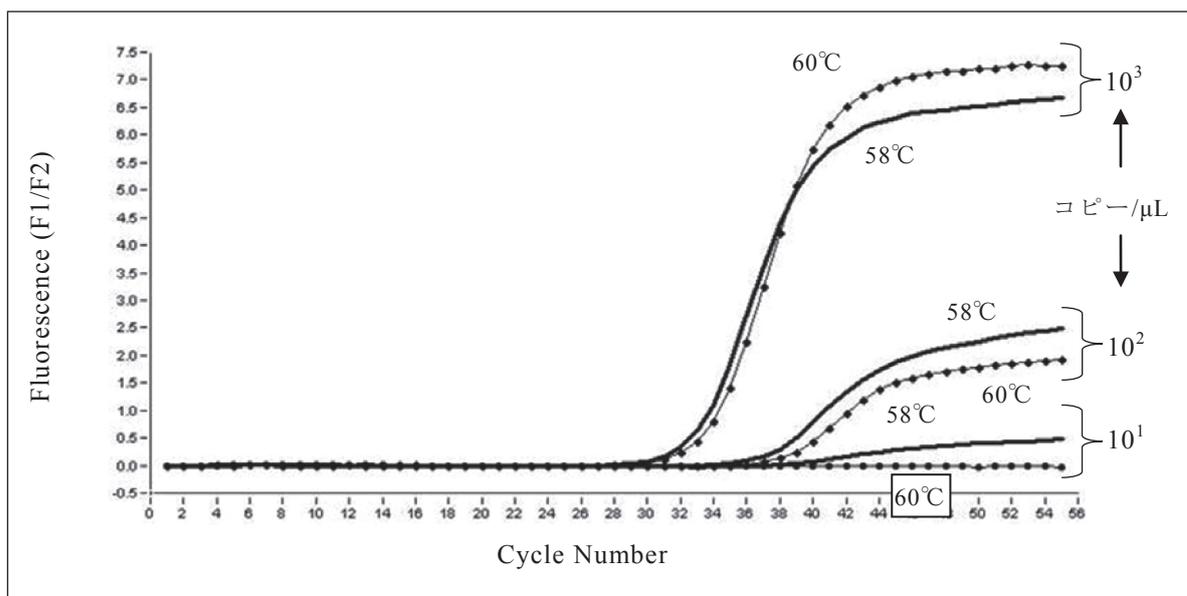


図 4B Transcriptor の反応温度比較 (2)

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、後者の増幅効率がより高かった (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

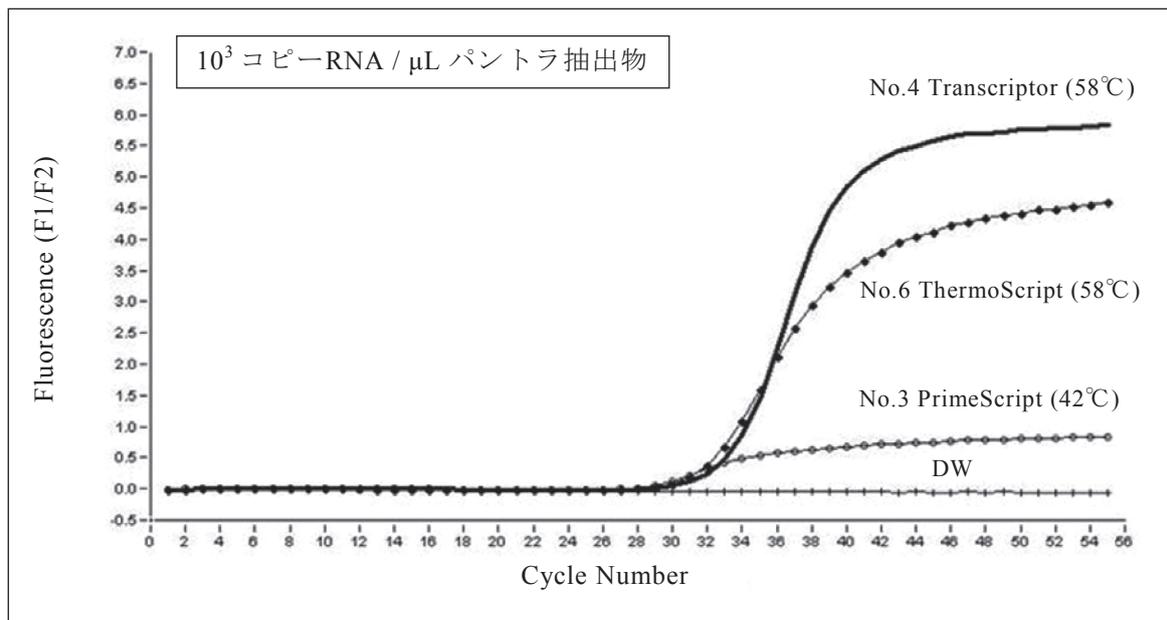


図 5A 高温逆転写酵素の比較 (1)

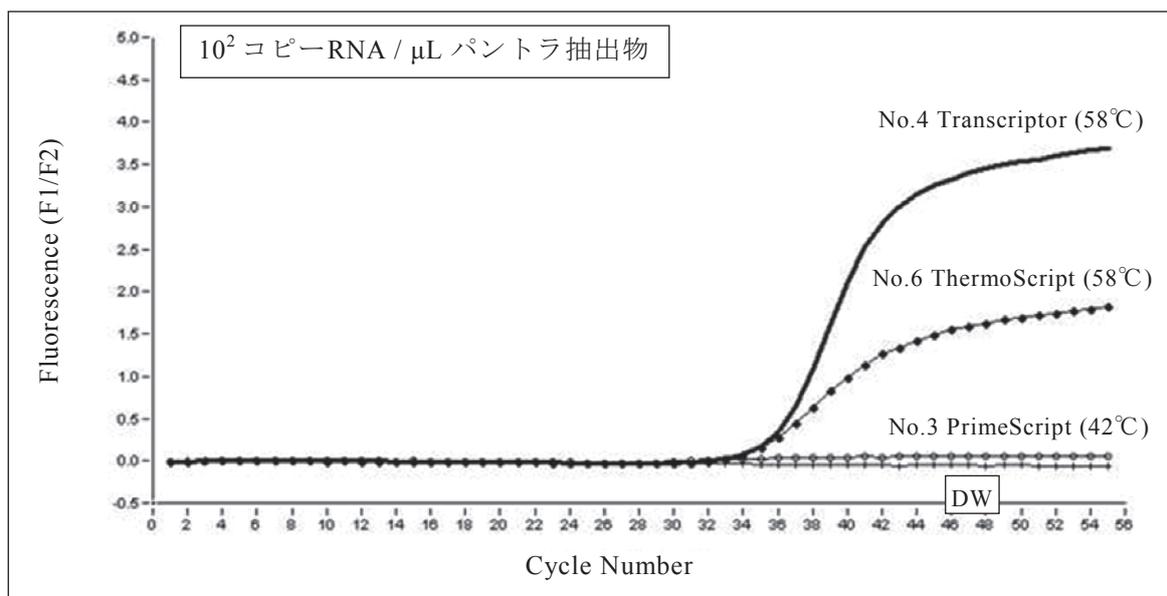


図 5B 高温逆転写酵素の比較 (2)

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

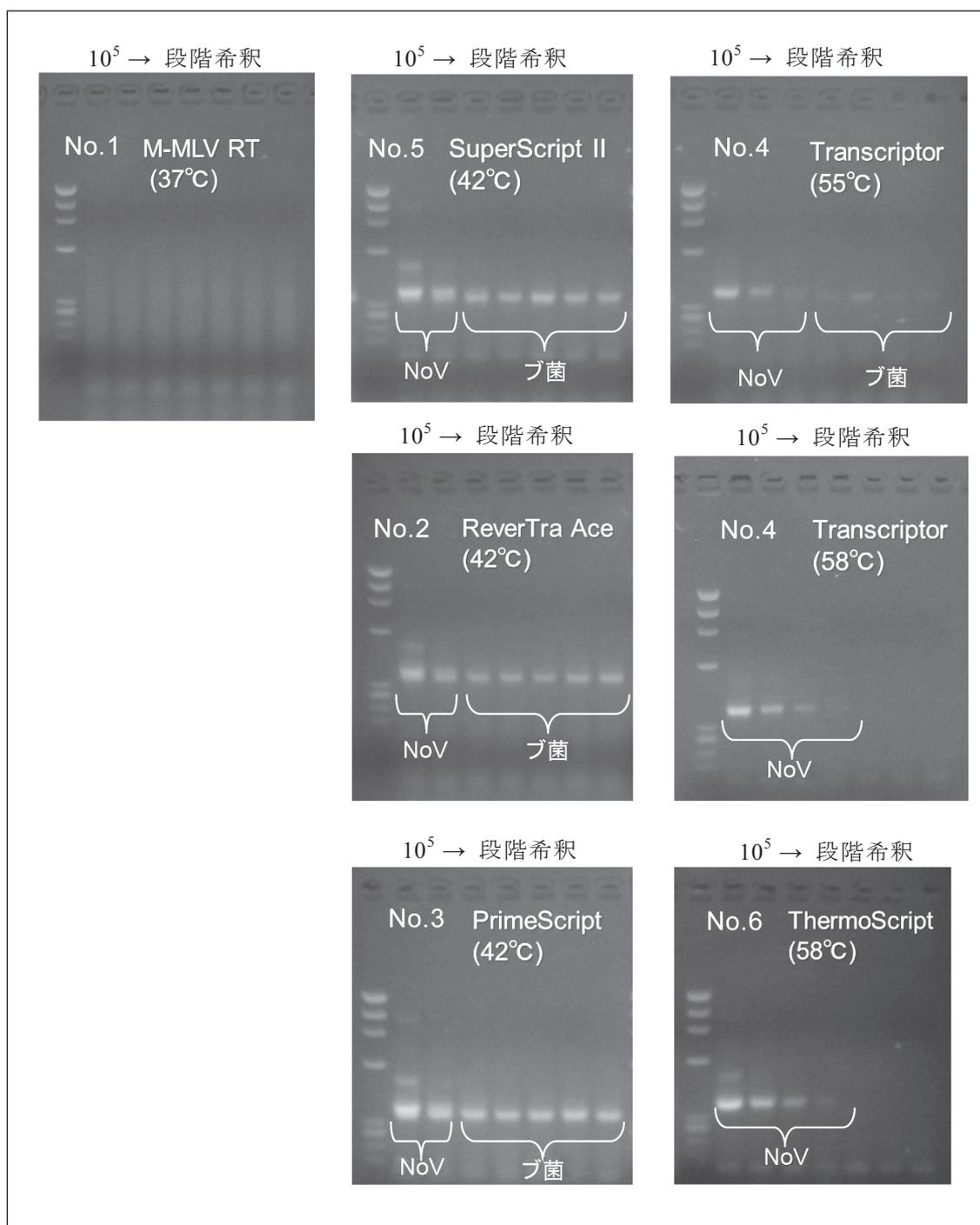


図6 増幅バンドにおける逆転写酵素と反応温度の影響

・ 10^5 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る。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

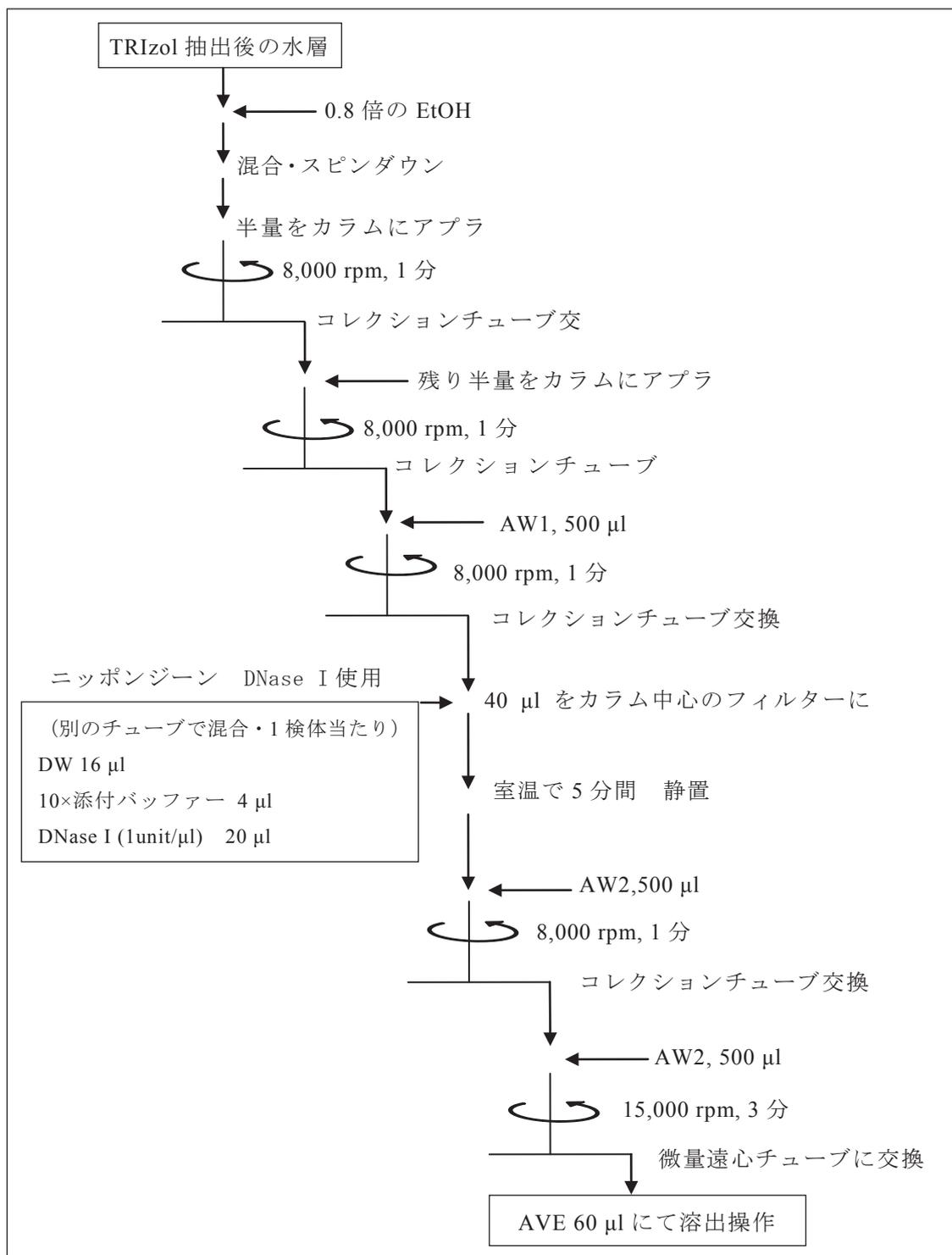


図 7 QIAamp Viral RNA Mini Kit へのオンカラム DNase I 処理の組み込み

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。

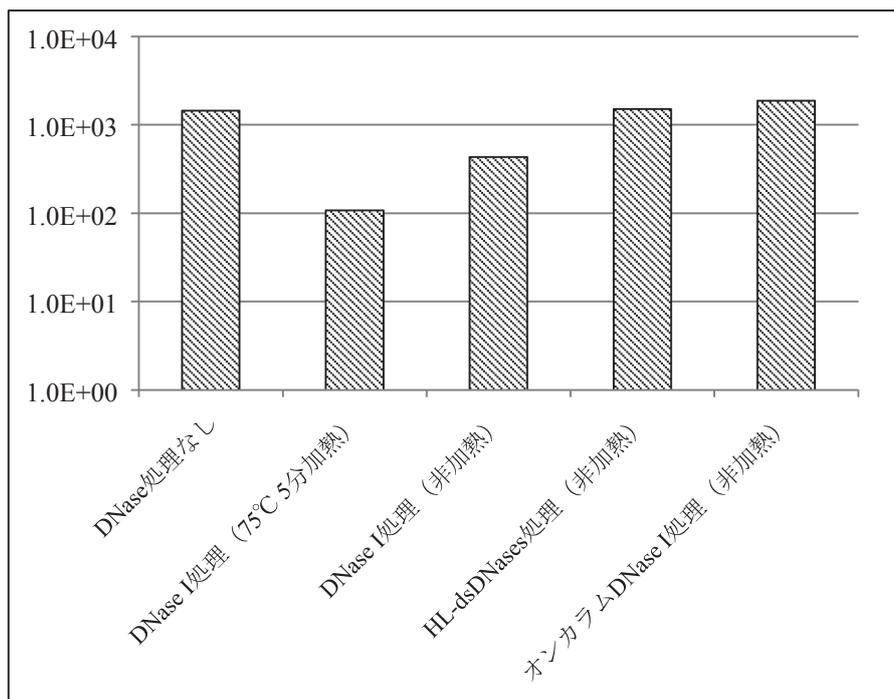


図 8A 蒸留水中の NoV RNA 量に及ぼす DNase 処理の影響

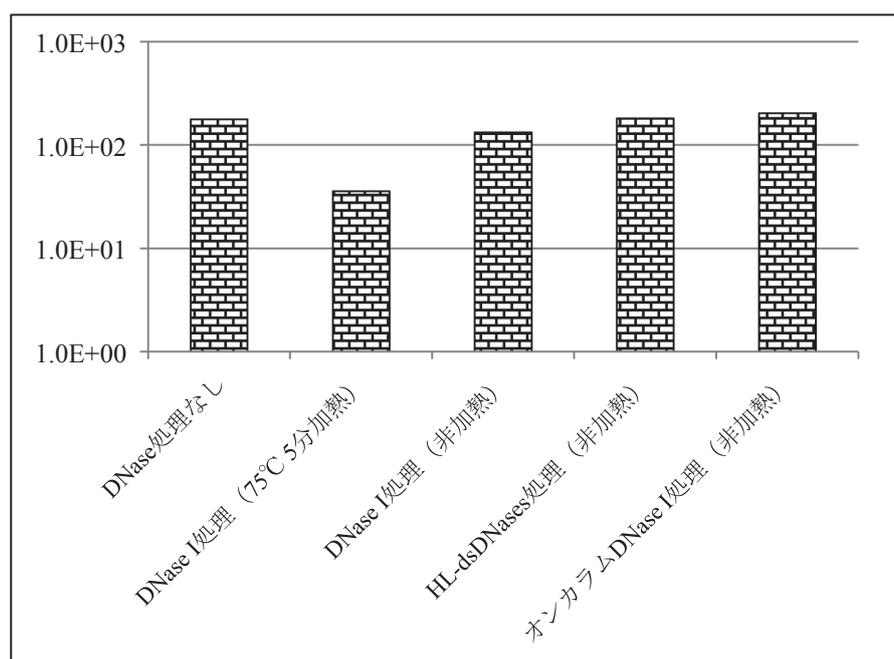


図 8B パントラ抽出物中の NoV RNA 量に及ぼす DNase 処理の影響

NoV RNA を含んだ蒸留水，またはパントラ抽出物に対して上記の DNase 処理を行い，先に最適化を済ませた高温逆転写反応(表 2 の No.4)によって cDNA を合成した後，real-time PCR でコピー数を測定した結果を図 8A と図 8B に示した。DNase 処理を行わなかった場合と比較して，75°C 5 分の加熱を伴う DNase I 処理ではコピー数が 1/5～1/10 に減少した。単純に加熱を省い

た場合でも減少が見られた。一方，HL-dsDNase 処理とオンカラム DNase I 処理ではいずれもコピー数の減少は認められなかった。

3.4 α-Amylase 粉末の不溶性成分の残留に関する検討

食品中に多く含まれる炭水化物は物理化学的挙動が核酸(ポリリボース)と類似しているこ

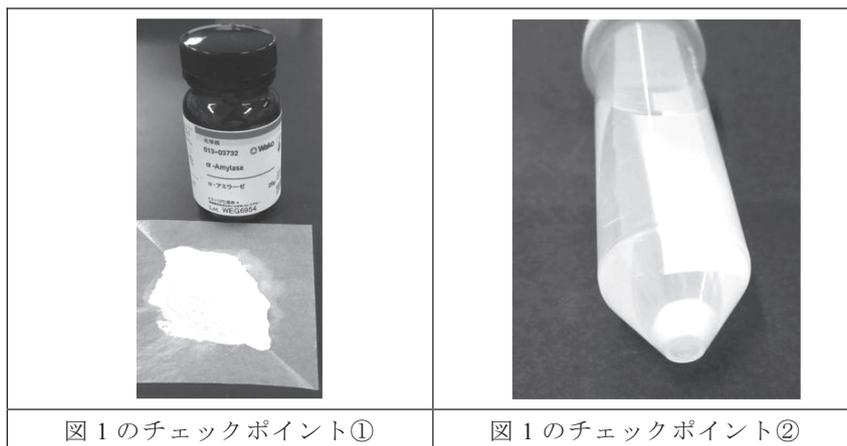


図9 α -Amylase 粉末の不溶性成分

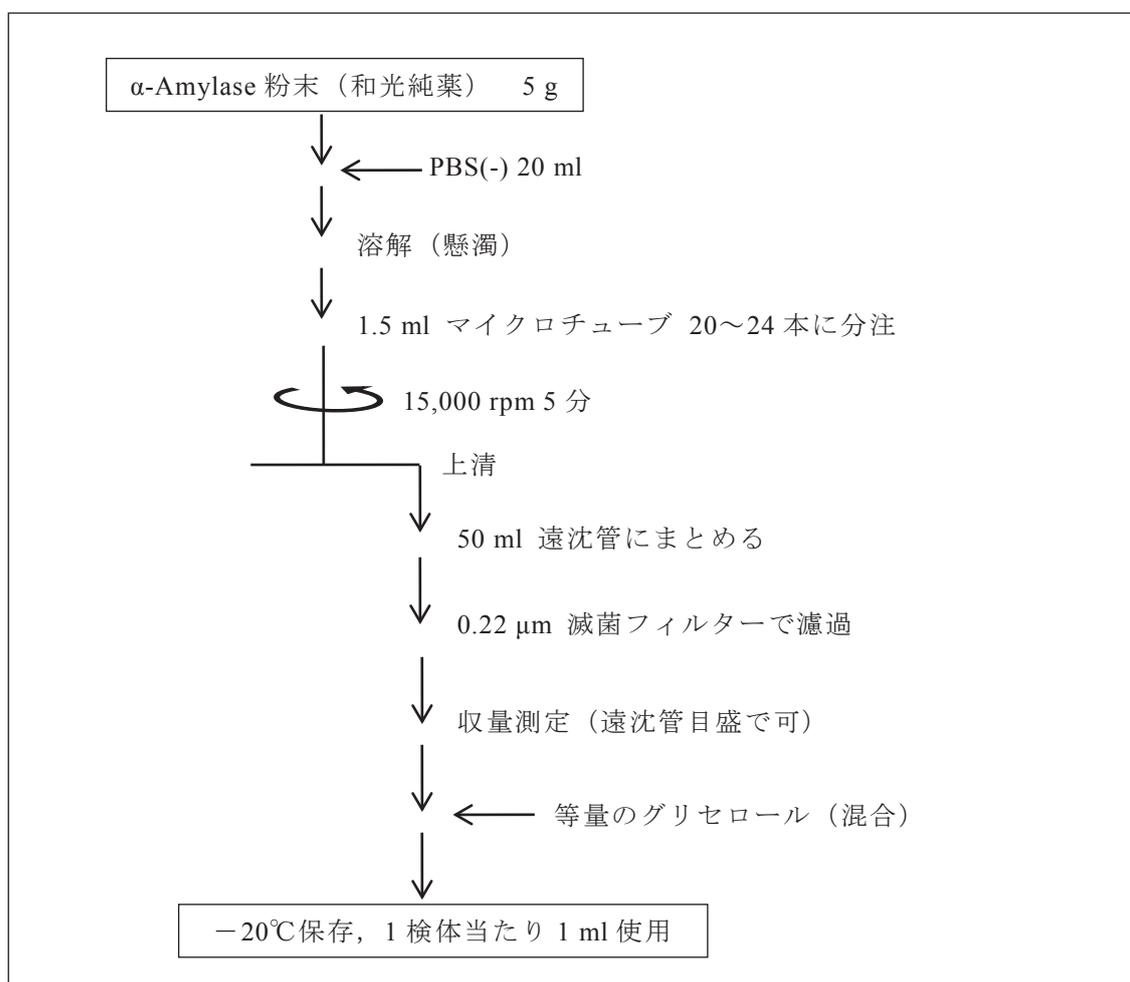


図10 α -Amylase 粉末の液化調製手順

とから、PCR の阻害物質とされている。カキの検査法においても、混入しているグリコーゲンを分解するために α -Amylase 粉末が用いられている。パントラ法では、図 1 に示すとおり α -Amylase 粉末を添加するプロセスがある。しかし、この粉末には不溶性成分が含まれており、

図 9 に示したとおり遠心によって沈澱してくる。メーカーに問い合わせたところ、不溶性成分は錠剤などの製造に使う賦形剤ということであった。具体的な成分は非公開であったが、一般的にメチルセルロースや無水ケイ酸などが用いられることが多い。遠心後に上清を丁寧に別チ

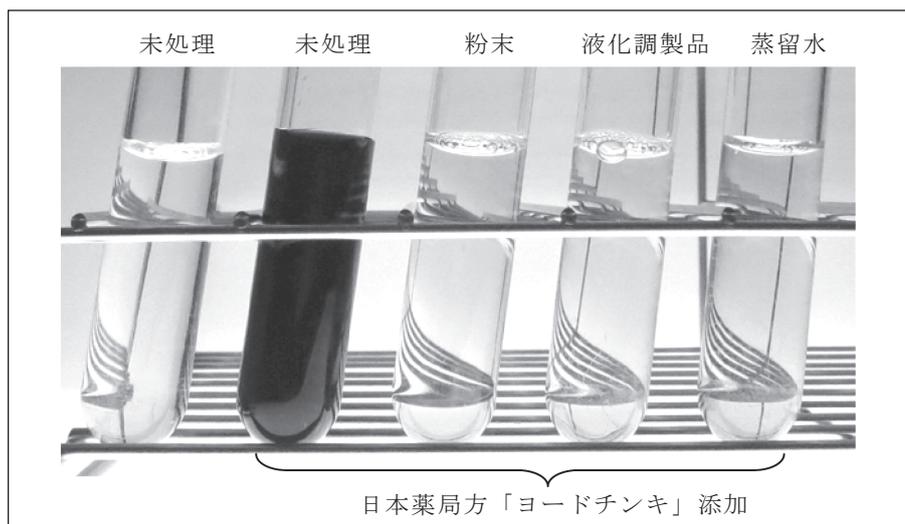


図 11A α -Amylase 液化調製品の効果の確認 (ヨウ素デンプン反応・デンプン液)

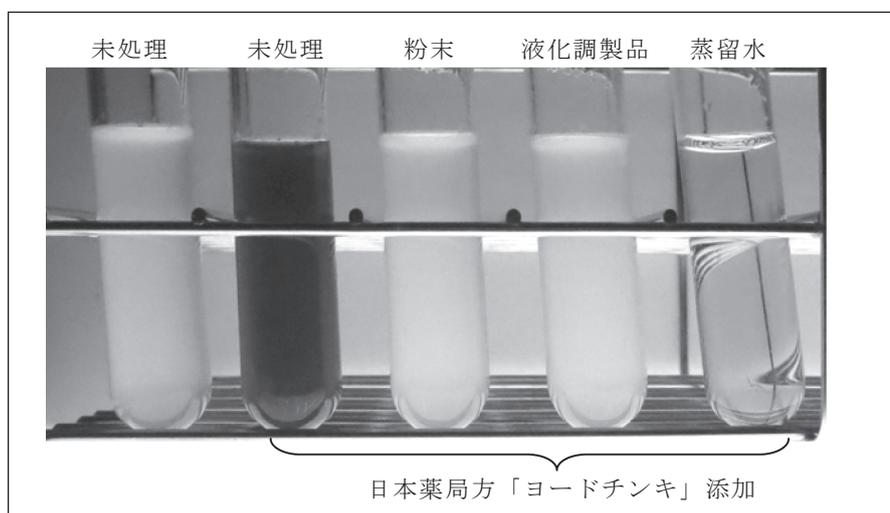


図 11B α -Amylase 液化調製品の効果の確認 (ヨウ素デンプン反応・ポテトサラダ)

ューブに移し、不溶性成分を完全に除去するようにすれば問題は起こらないが、手間がかかることからデカントで済ませるケースも想定されるこの場合、 α -Amylase の不溶性成分が以後の工程に残留することになり、最終的な検出精度に影響を及ぼすことがわかったため、その解決策を検討した。 α -Amylase をグリセロール溶液とした液体酵素製品もあるが、20 μ L 程度の反応系を想定しているため、50 mL のパントラ法のプロトコルで用いるにはコスト面において現実的ではない。そこで、 α -Amylase 粉末を液化調製する方法を考案した(図 10)。この α -Amylase 液化調製品を -20°C に 2 ヶ月保存した後、デンプンの分解効果を観察した。デンプン液(図 11A)とポテトサラダ(図 11B)のい

ずれにおいても、液化調製品を添加することによってヨウ素デンプン反応が消失した。

次にパントラ法のプロトコルにおいて、不溶性成分が残留した場合と、あらかじめ不溶性成分を取り除いた液化調製品を用いた場合とで検出結果への影響を比較した。図 12A の No.2 と No.3 は不溶性成分が認められた。TRIzol 抽出後の水層(図 1 のチェックポイント③)は無色透明であったが、カラムにアプライする直前にエタノールを添加したところ(図 1 のチェックポイント④)、不溶性成分に由来する白濁が生じた(図 12A)。一方、 α -Amylase 液化調製品を添加した場合にはこのような白濁は生じず、円滑に RNA 抽出工程を終えることができた。抽出した RNA を鋳型として、先に最適化を済ませた高

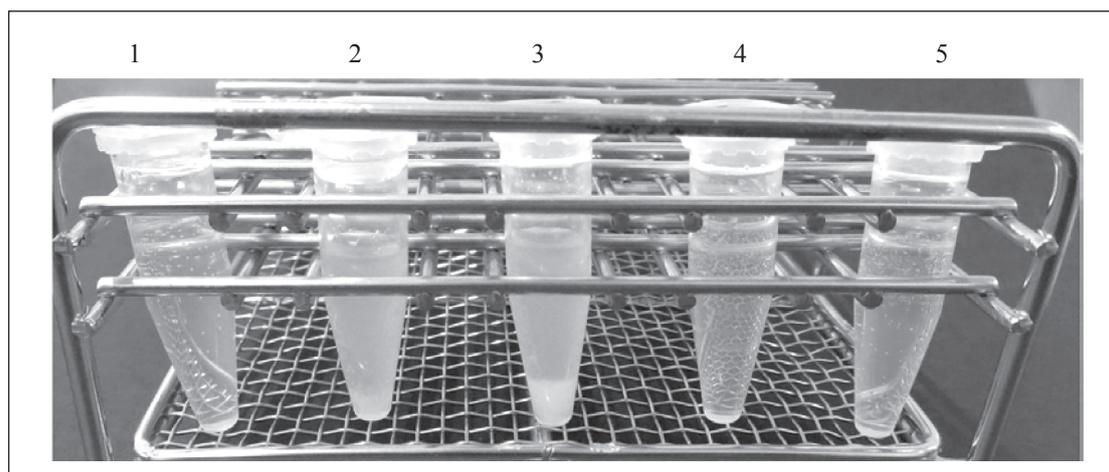


図 12A α -Amylase 液化調製品の効果の確認 (RNA 精製カラムへのアプライ時)

- 1: 図 1 のチェックポイント①で α -Amylase 粉末を加え、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
- 5: 蒸留水

温逆転写反応により cDNA を合成し、real-time PCR で検出を試みた結果を図 12B に示した。不溶性成分が残留した状態では、図 12A で白濁を生じただけでなく、PCR も阻害された。不溶性成分をあらかじめ除去した液化調製品を用いることで、こうした不都合がなくなり、検出結果を正常化することができた。

4. 考察

4.1 結果のバラつきが起りやすい箇所

本法はすでに複数の実事例において食品からの NoV の検出に成功していることから、プロトコルとしては完成の域にあるものと考えられる。しかし、実施する機関が増えるにつれて、検出精度にバラつきを生じることになるため、あらかじめ対策を講じておくことが必要である。当初、結果のバラつきを生じやすい箇所として、パンソルビンの輸送中の凍結や、RNA 精製カラムにアプライする際に添加するエタノールの量についても想定していた。前者については、意図的に凍結融解を繰り返したパンソルビンを用いても結果に影響しないことが確認された。後者については、添加するエタノールの量を段階的に変えても結

果は同じであった。そこで本研究では、結果に影響を及ぼすと考えられる箇所を次の 4 点に絞り、それぞれにおいて最適化を図った。

- (1) α -Amylase 粉末の不溶性成分の混入
- (2) DNase 処理にともなう RNA 分解
- (3) 逆転写反応系の最適化
- (4) PCR 反応系の最適化

最適化は結果を逐次観察しながら行う必要があるため。検討の順番はプロトコルとは逆に (4) → (1) とした ((1) → (4) の検討では、最適化されていないプロセスを経た結果を見ることになり不正確)。

4.2 PCR 反応系の検討

Real-time PCR に用いる試薬の比較検討は平成 24 年度に行っていることから、本研究では conventional PCR の試薬選定と反応条件の最適化について検討した。検討にあたっては、PCR を行う直前の段階である cDNA 合成までは問題がないことを前提としなければならなかった。そこで、結果に影響が及ぶ要因を排除するために、ウイルスを含まない食品から調製したパントラ抽出物をベースとし、そこに NoV の遺伝子

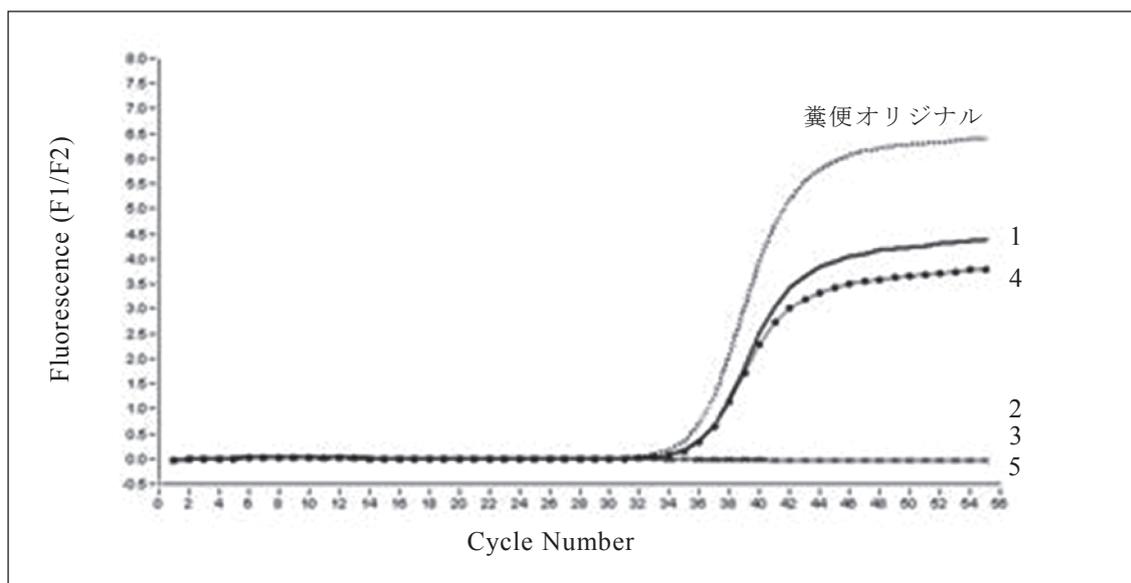


図 12B α -Amylase 液化調製品の効果の確認 (増幅曲線)

※サンプル 1～5 の内容は図 12A を参照

配列由来の DNA 断片を加えた被検体を用いた。検出感度の検討のために段階希釈試験が一般的に行われているが、ここでは蒸留水で希釈する代わりにパントラ抽出物を使うことで、大量の黄色ブドウ球菌遺伝子の存在下という負荷的条件を設定している。また、将来的に偽陽性対策も視野に入れる必要があり、偽陽性の最大のリスク要因である遺伝子解析作業（電気泳動やゲルからの切り出し精製）と両立させるために、基質として dUTP を使えるように検討を進めた。PCR で用いる酵素（DNA polymerase）は、由来によってファミリー A とファミリー B に大別される。後者には、反応中に間違っただけ塩基が取り込まれた場合にやり直すという校正活性があるが、前者にはない。しかし、同時にファミリー B に属する酵素には dUTP を取り込めないという性質もある。図 2A に示したとおり、dUTP を基質として用いることができる酵素はファミリー A に属するものだけであった。ファミリー A には校正活性がないため、塩基の読み間違いが発生（数万塩基に 1 つ）し、遺伝子解析の正確さが損なわれる懸念もある。しかし、通常行われている PCR 産物のダイレクトシーケンスでは、こうしたエラーはバックグラウンドノイズに含まれて顕在化しないため問題はないと考えられる。表 1 の反応系から dUTP を取り込んだものを抜き出し、さらにパントラ抽出物で負荷をかけた条件で検討したところ、図 2B

に示したとおり、ホットスタート仕様が必須であった。これは、大量に存在する黄色ブドウ球菌への非特異反応を抑えることが重要であることを示している。また、基質として dUTP を使用する場合には Mg^{2+} 濃度を増やす必要があることも示された。dUTP は本来の塩基である dTTP よりも取り込み率が落ちることから、反応系に 3 倍量を加えることで対応している（dTTP:200 μ M, dUTP:600 μ M）。ヌクレオチドには弱いながらもキレート効果があるため、 Mg^{2+} の実効濃度が低下する分だけ増量する必要があるものと考えられる。dUTP を用いた上で、蒸留水による段階希釈結果と同等の感度を有する反応系として、最終的に図 2C に示す 3 つが選択された。さらに利便性を考慮し、表 1 の No.12 を第一選択とした。dUTP を取り込んだ増幅断片は、Uracil-N-Glycosylase を作用させることで選択的に分解除去が可能であるため、偽陽性の防止に有効であるものと考えられる。

4.3 逆転写反応系の検討

PCR 反応系の最適化の場合と同様に、逆転写反応直前の段階までは問題がないことを前提として検討を行う必要があることから、NoV RNA をパントラ抽出物で段階希釈した被検体を用いた。表 2 に示した酵素を用いて逆転写反応を行った後は、最適化の済んだ real-time PCR, または conventional PCR で結果を比較検討した。表

2 に示した逆転写酵素は、至適反応温度によって3つに分けられる。M-MLV（モロニー・マウス・白血病ウイルス）由来の逆転写酵素は、37℃で反応が行われる（表2のNo.1）が、これを改変して、反応温度を42℃に高めたものがNo.2, No.3, No.5である。一方、もともと至適反応温度が高いAMV（トリ骨髄芽球症ウイルス）由来の逆転写酵素を改変して、さらに高温反応を行えるようにしたものがNo.4とNo.6である。図3A, 図3B, 図3Cでは、RNAが低濃度であるほど、高温逆転写反応が有効であることが示されている。横軸からの立ち上がりサイクルに大きな違いはないものの、縦軸の蛍光強度に差が見られることから、高温になるほど増幅効率が高くなっているといえる。図3Aのように高濃度のRNAを増幅して検体中の初期コピー数（横軸に依存）を算定しても違いが現れないが、蛍光強度が低い（増幅効率が低い）反応系では検出限界において不利となる（図3B, 図3C）。次に高温逆転写反応の最適化を行ったところ58℃による反応が最も増幅効率が高かった（図4A, 図4B）。高温になるほど非特異反応は減るものの、プライマーのアニーリング効率も下がるため、総合的な増幅効率は両者のバランスで決まる。58℃という温度条件は、そのバランスの上に成り立っているものと考えられるが、高温逆転写反応が可能な酵素同士（表2のNo.4とNo.6）を比較したところNo.4の増幅効率が高かった（図5A, 図5B）。No.4の酵素にはRNaseH活性が残存しており、No.6の酵素では除去されているという違いがある。cDNA合成後は、鋳型となったRNA鎖は不要となり、むしろPCRの効率を悪くすることからRNaseH活性が残存している方が有利であるものと考えられる。

続いて、real-time PCRを用いて行った検討内容をconventional PCRにて行い、非特異反応の程度を比較した（図6）。37℃による逆転写反応系では増幅バンドが認められないが、これは図3A~図3Cにおいて蛍光強度が低かった結果と一致している。42℃の反応系では、高濃度のNoV RNAに対しては正しく増幅できるものの、低濃度では黄色ブドウ球菌の非特異増幅が優位となっている。このことは、図3B, 図3C, 図5A, 図5Bにおいて蛍光強度が低かった理由と

なる。このような黄色ブドウ球菌に対する非特異反応は55℃では若干残るものの、58℃では完全になくなり、NoV遺伝子だけが効率的に増幅できている。すなわち、real-time PCRにおいて蛍光強度が高かった結果を裏付けているものと考えられる。

4.4 DNase 処理法の検討

これまでにカキ等のウイルス検査において、カキ本体由来のDNAを除去するために逆転写反応の前にDNase処理を行うことが推奨されてきた。パントラ法で抽出されたRNAにも大量の黄色ブドウ球菌由来のDNAが混入することから、非特異反応を抑制するためにもDNase処理は有効な手法と考えられる。しかし一方で、DNase処理で一般的に用いられる酵素であるDNase Iは、反応後の失活に75℃5分の加熱を必要とすることから、肝心のウイルスRNAが分解・減少してしまうという難点があった（図8A, 図8B）。極微量のウイルスRNAを扱う食品検査において、この問題は看過し得ないものと考えられる。また、単純に加熱を省いただけでは、残存するDNase Iによって、合成されたcDNAも損傷を受けるため根本的な解決にはなり得ない。そこで、50℃で活性がなくなり、55℃で不可逆的に失活する易熱性DNase（HL-dsDNase）を用いることで、75℃5分の加熱を行わずに逆転写反応に移行することができた。このプロセスを実行するためには、先に最適化を済ませた58℃の高温逆転写反応と組み合わせることが必須であり、42℃の逆転写反応は、活性を発現させたDNaseによってcDNAが損傷を受けるため不適當である。なお、この酵素は我が国で流通していないため、ノルウェーから直接取り寄せる必要がある。そこで一般的に用いられているDNase Iを用いた方法として、図7に示したオンカラム処理法を考案した。パントラ法のRNA抽出工程に組み入れることができるため、最も利便性が高いが、DNAウイルスであるアデノウイルスが想定されるケースでは使用できない。易熱性DNase処理とオンカラムDNase I処理のいずれにおいてもウイルスRNAの減少は認められなかった（図8A, 図8B）ことから、各機関の実状に合わせて選択することが可能である。

4.5 α -Amylase の不溶性成分の影響に関する検討

パントラ法では食品中の炭水化物を分解除去するために α -Amylase 粉末を添加しているが、この粉末には賦形剤が含まれているため完全には溶解しない(図 9)。その後の工程において、3,000 rpm 30 分の遠心によって食品残渣を沈澱除去する際に、この不溶性成分も一緒に取り除くことが可能であるが、そのためにはスポイトで上清を丁寧に別チューブに分離する必要がある。検体数が多い場合には、この操作はかなりの負担となり得る。しかし、デカントによって簡便に上清を分離した場合には、不溶性成分の残留は避けられず、精製カラムにアプライする直前にエタノールを添加した際に白濁を生じ(図 12A の No.2, No.3)、検出結果にも影響する(図 12B の No.2, No.3)。そこで、本研究では α -Amylase 粉末から不溶性成分を除去して液化調製(図 10)することで問題解決を図った。液化調製した α -Amylase は、粉末と同様に炭水化物を分解できることが確認された(図 11A, 図 11B)。また、精製カラムにアプライする工程において白濁せず(図 12A)、検出結果もこれまでの粉末を添加する方法と同等であった(図 12B)。これらの結果は、 -20°C で 2 ヶ月間保存した後の液化調製品を用いて得られたものであり、あらかじめ十分量を調製しておいても不都合はないことを示している。カキのウイルス検査の工程にも α -Amylase 粉末が用いられているが、液化調製品に置き換えることで簡便化が図られるものと考えられる。

4.6 今後の課題

本法は実際の食中毒事例に適用され、食品からのウイルス検出に成功しており²²⁻²⁵⁾、厚生労働省通知²⁶⁾や食品衛生検査指針²⁷⁾に記載されたことから、今後の普及が見込まれる。その一方で、実験室内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。本研究により効率的に遺伝子解析可能な DNA 断片を得ることができるようになったが、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。本研究により最終的に得られる DNA 断片にウラシルが含まれるようにデザインすることができたため、Uracil-N-Glycosylase 処理による偽陽性防止策を取ることが可能である。その方法の評価は今後の課題とする。

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。また、ウイルスは食品中では増えず付着するのみであることから、分取した食品サンプルに付着していなければ陰性となってしまふ。そのため、サンプリングプランや、スケールアップの方法についても検討する余地が残されている。

5. まとめ

本研究で得られた知見を総括すると次の 4 点に集約される。

第一に、パントラ法に添加する α -Amylase はあらかじめ液化調製したものを用いる方が簡便で、その後のトラブルを防止できる。

第二に、黄色ブドウ球菌の DNA を除去するためには RNA 抽出時にオンカラム DNase I 処理を行うか、抽出後に易熱性 DNase 処理を行うことが有効である。いずれの方法も非加熱であるため、RNA の分解・減少は起こらない。

第三に、 58°C の高温逆転写反応を行うことで、黄色ブドウ球菌由来の RNA (16s リボソーム) に対する非特異反応を抑制できる。

第四に、PCR の反応系を適切に選択(酵素の種類、ホットスタート仕様、Mg 濃度)することで、増幅効率を最適化でき、将来的な偽陽性対策の布石として dUTP を用いることができる。

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・トラップ法によって食品検体から検出されたノロウイルスの遺伝子解析法の開発, 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, 35-48.
 - 19) 野田衛, 他: パンソルビン・トラップ法が多機関評価試験結果, 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, 77-110.
 - 20) Kojima S., et. al.: Genogroup-specific PCR

- primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Method*, **100**, 2002, 107-114.
- 21) Kageyama T., et. al.: Broady reactive and highly sensitive assay for Norwalk-lile viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2003, 1548-1577.
- 22) 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.
- 23) 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ー弁当屋を原因施設としたノロウイルス集団食中毒事例ー, 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.
- 24) 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.
- 25) 土屋祐司, 他: パンと原因としたノロウイルス集団食中毒事例, 日本食品微生物学会雑誌, **32**, 3, 2015, 153-158.
- 26) 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.
- 27) 斎藤博之, 他: 食品・臨床材料・拭き取りの前処理法, 食品衛生検査指針 2015 (微生物編), 2015, 607-617.