

一般的な食品検体からのウイルスの回収・濃縮法

1. 適用範囲

1) 対象ウイルス

ノロウイルス, サポウイルス, A 型肝炎ウイルス等の食品媒介性ウイルス。

2) 対象食品

食材および調理済の食品一般。

3) 本プロトコールの範囲

食品一般から洗滌液にて遊離させたウイルス粒子を, 抗原抗体複合体の形で黄色ブドウ球菌の表面に吸着させることによって回収し, RNA を抽出した後, RT-PCR の鋳型となる cDNA を合成するまでの工程。

2. 必要な器具・試薬

1) 器具

マイクロピペットおよびチップ(1000 μ l, 200 μ l)

ディスポーザブル微量遠心管(1.5ml, 0.2ml あるいは 0.5ml)

ディスポーザブル遠心管(50ml 程度)

フィルター付き滅菌バッグ(アズワン サニスペックテストバッグ 2-6391-03 等)

ディスポーザブルスポイト(2.0ml および 5.0ml 程度)

1.5ml 微量遠心管用遠心分離機

低速遠心分離機 (50ml ディスポーザブル遠心管を 1,870 \times g(3,000rpm 程度)で遠心できる機器)

ペーパータオル

超音波洗浄器*¹(ガラス器具洗浄に用いる水槽タイプのもの, 40kHz 程度)

ボルテックスミキサー

37°Cフラン器(恒温槽でも可)

*¹ 無くても実施可能だが, 油物の食品検体の場合は使用した方がよい。

2) 試薬

下記の試薬のうち、アンダーラインを付したものについては、本プロトコールでの使用において同等以上の性能を有することが確認された場合は、他社メーカーの試薬を使用しても差し支えない。

食品洗滌液 (0.1M Tris・HCl - 0.5M NaCl - 0.1% Tween20 (pH8.4))

10×食品洗滌液*² (1M Tris・HCl - 1% Tween20 (pH8.4))

塩化ナトリウム*²

ウイルス捕捉用抗体(ガンマグロブリン製剤*³ (静注用または筋注用医薬品)、ヒト血清*^{4,5} またはウイルス特異的抗血清*⁵)

α アミラーゼ粉末 (和光純薬, 013-03732)

黄色ブドウ球菌加工試薬 (「PANSORBIN[®] Cells」, Calbiochem 507861-25ML または 507861-50ML)*⁶

TRIzol[®]-LS (invitrogen)

クロロホルム

エタノール

QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)

Recombinant RNase inhibitor (TaKaRa, 2313A)

dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP を各 10mM になるように混合)

Super Script[®] II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014)

逆転写反応専用プライマー*⁷

遺伝子解析用蒸留水(高圧滅菌済, DNase フリー, RNase フリー)

*² 液状の食品の場合に使用する。

*³ ガンマガード静注用 2.5g (Baxter, 1501891) などがある。患者便等由来のウイルスを用いて、本法でウイルスが回収できること(抗体陽性である)を確認して使用する。

*⁴ 抗体保有者のものを用いる場合。

*⁵ 保有しているか、入手可能な場合。

*⁶ 凍結乾燥品 (Calbiochem , 507862-5GM) に 0.1% アジ化ナトリウム添加 PBS を 31ml 加えたものを用いてもよい。また、黄色ブドウ球菌(CowanI 株)を用いて、自家調製することができる¹⁾。

*⁷ 本プロトコールにおいて抽出された RNA には黄色ブドウ球菌由来のものが含まれているた

め、cDNA 合成において、Random primer や Oligo(dT) primer は使用できず、ウイルス特異的プライマーを用いる必要がある。特に、現在ノロウイルス検出に汎用されているカプシド領域の semi-nested PCR 法 (GI:COG1F/G1SKR ⇒ G1SKF/G1SKR, GII:COG2F/G2SKR ⇒ G2SKF/G2SKR) はリバーズ側プライマーが共通であることなどから、黄色ブドウ球菌由来 RNA の非特異的増幅が起こるため、逆転写反応専用のプライマーを使用する必要がある。その場合の逆転写反応専用プライマーを次のとおり例示する。他の RNA ウイルスにおいても、逆転写反应用プライマーと PCR 用プライマーが同じ場合は非特異的増幅が起こりやすいので、原則として逆転写反応専用プライマーを使用する。

・ノロウイルス GI 用 (PANR-G1)

PANR-G1a: 5' GTBCKMACATCAGCAATCA 3'

下線部は LNA (Locked Nucleic Acid) 修飾で合成する。

PANR-G1b: 5' GGKTCAAGSRYCCTAACATCWGCAATGA 3'

100 μ M PANR-G1a と 100 μ M PANR-G1b を 1:1 で混合したものを、PANR-G1 とする。

・ノロウイルス GII 用 (PANR-G2)

PANR-G2a: 5' TCYARWKYCTWACATCTAYAATYAYRTGGGGGAACAT 3'

PANR-G2b: 5' ARDGTCCCTAACATCWATAATYAYATGAGGGGAACAT 3'

PANR-G2c: 5' CTSACATCCACMAYYACRTGCGGRCACAT 3'

100 μ M PANR-G2a, 100 μ M PANR-G2b, および 100 μ M PANR-G2c を 2:1:1 で混合したものを、PANR-G2 とする。

3. 操作法

- 1) 固形食品は 10g を量り取るか、それに満たない場合は重量を記録してフィルター付き滅菌バッグに採取する。液状食品は 45ml を分取するか、それに満たない場合は容量を記録して滅菌バッグに採取する。固形・液状混合食品の場合は固形食品として扱う。
- 2) 固形食品に対しては、食品洗滌液 50ml を加えてよく混ぜる。液状食品に対しては、10×食品洗滌液 5ml と塩化ナトリウム 1.5g を加えてよく混ぜる(45ml 分取の場合)。液状食品の容量が 45ml に満たない場合は、その容量に応じて 10×食品洗滌液と塩化ナトリウムの添加量を調整する。

- 3) 食品検体と食品洗滌液の入ったフィルター付き滅菌バッグを食品浮遊液が水浴に沈むように超音波洗浄器に着けて、15 分間処理する。超音波洗浄器を用いない場合は、バッグの上から手でよく揉みほぐして食品に付着しているウイルス粒子を洗い出す。
- 4) 空の 50ml ディスポーザブル遠心管に α アミラーゼ粉末 125mg を量り取る(検体の数だけ準備する)。
- 5) 超音波処理後のフィルター付き滅菌バッグからフィルター濾液約 45ml を、 α アミラーゼ粉末の入った遠心管に採取してよく混合する(α アミラーゼ粉末は不溶性成分を含むため完全には溶けない)。
- 6) $1,870 \times g(3,000\text{rpm})$ 、室温(25°C に設定)で 30 分間遠心する。この段階で、食品残渣と α アミラーゼ粉末の不溶性成分が沈殿する。
- 7) ディスポーザブルスポイトを用いて、上清を別の 50ml ディスポーザブル遠心管に移す。多くの食品検体の場合、この上清は濁っているがそのまま問題はない。
- 8) ガンマグロブリン製剤、ヒト血清またはウイルス特異的抗血清を添加してよく混ぜる。添加量は、5%ガンマグロブリン製剤を用いる場合は $150 \mu\text{l}$ 、10%同製剤の場合は $75 \mu\text{l}$ 、15%同製剤の場合は $50 \mu\text{l}$ 、ヒト血清の場合は $500 \mu\text{l}$ 、ウイルス特異的抗血清の場合は $5 \mu\text{l}$ とする。過剰量の添加は検出感度低下の原因となるため注意すること。
- 9) 黄色ブドウ球菌加工試薬(PANSORBIN[®] Cells) 1.0ml (ウイルス特異的抗血清を用いる場合は $300 \mu\text{l}$)を添加してよく混合し、 37°C (フラン器か恒温槽)で 15 分間静置する。
- 10) $1,870 \times g(3,000\text{rpm})$ で 20 分間遠心する。この段階で、ウイルス粒子を吸着した黄色ブドウ球菌が沈殿する。この遠心条件で沈殿する食品残渣はすでに除去済みであるから、上清が濁っていたとしてもここで沈殿してくることはない。
- 11) 50ml ディスポーザブル遠心管をデカントして、上清を別の遠心管に移して冷蔵保存する(他の原理による回収法を試みる場合に備える)。
- 12) 黄色ブドウ球菌が沈殿している遠心管をペーパータオルの上で逆さにして、わずかに残った上清を吸い取る。
- 13) AVLBuffer (QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit に添付されているもの) 0.25ml と TRIzol[®]-LS 0.75ml を遠心管に入れて黄色ブドウ球菌の沈殿を完全に均一になるまで懸濁し、 1.5ml ディスポーザブル微量遠心管に移す。懸濁と微量遠心管に移す操作はディスポーザブルスポイトを使う(マイクロピペットの汚染を避けるため)。
- 14) クロロホルム 0.2ml を加えて、ボルテックスミキサーでよく混ぜた後 $13,000 \times g(12,000\text{rpm})$ で

- 15 分間遠心する。
- 15) 水層を別の微量遠心管に移し、0.8 倍量のエタノール(水層が 650 μ l の場合は、エタノールを 520 μ l 添加する)を加えてボルテックスミキサーでよく混合する。この段階でわずかに白濁が認められる場合があるが、そのまま先に進んで問題はない。
- 16) 得られた液 630 μ l を QIAamp スピнкаラム(2ml コレクションチューブの中にスピнкаラムが装着されている。)に入れ、6,000 \times g(8,100 rpm), 1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のチューブに移し、残りの液(630 μ l より少量。多い場合は再度同様の操作を繰り返す)をカラム入れ、同様に遠心する。
- 17) 以降は QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit の説明書に従い、AW1 の添加、遠心、AW2 の添加、遠心、AVE への回収等を行うことで、RNA 抽出液が得られる。AVE は説明書どおり、60 μ l 用いるが、スピнкаラムのフィルターに完全に浸み込んだこと(2~3 分かかる場合がある)を確認してから遠心すること。
- 18) 抽出した RNA は-80 $^{\circ}$ C 以下で凍結保存する。cDNA を合成する場合は次に進む。
- 19) DNase 処理から逆転写反応は、厚生労働省から通知されている「ノロウイルスの検出法(食安監発第 1105001 号)」に準じた方法等で実施する。DNase 処理を行うと一般的に検出感度は低下する。本プロトコールでは逆転写反応専用プライマーを用いるので、DNase 処理を省略しても構わないが、その場合は、増幅産物が目的とするウイルス由来であることをシーケンス検査等で確認するとともに、クロスコンタミネーションの防止には最大限の注意を払う必要がある。以下、逆転写反応について通知法に準じた Super Script[®]II RNase H- Reverse Transcriptase を用いた場合について例示する。

 表 1 逆転写反応液(Super Script[®]II RNase H- Reverse Transcriptase を用いる場合)

試薬等	1 検体当たりの使用量 (μ l)			
	15 μ l 系	20 μ l 系	30 μ l 系	50 μ l 系
抽出 RNA	7.5 μ l	10.0 μ l	15.0 μ l	25.0 μ l
5X SSII Buffer ^{*8}	3.0 μ l	4.0 μ l	6.0 μ l	10.0 μ l
10mM dNTPs	0.75 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
逆転写反応専用プライマー(100 μ M) ^{*9}	0.375 μ l	0.5 μ l	0.75 μ l	1.25 μ l
Recombinant RNase inhibitor	0.5 μ l	0.67 μ l	1.0 μ l	1.67 μ l

100mM DTT ^{*8}	0.75 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
Super Script II RT (200u/ μ l)	0.75 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
遺伝子解析用蒸留水	1.375 μ l	1.83 μ l	2.75 μ l	4.58 μ l

^{*8} Super Script II RT に添付のものを用いる。

^{*9} ノロウイルスの場合、GI用とGII用の逆転写反応専用プライマーを混合してもよい(その場合は、プライマーの容量が2倍になるため、表1の遺伝子解析用蒸留水を相当量だけ少なくする)が、別々に逆転写反応を行うほうが感度は高い。

- 20) 表1のとおり、0.2mlあるいは0.5mlの微量遠心管を用いて処理混合液の調製を行う。
- 21) 42℃で60分間(30分～2時間)、逆転写反応を行い、95℃、5分加熱後速やかに冷却する。これでcDNA合成が完了する。
- 22) 以降は、各ウイルスに対応したnested RT-PCR法等による検出を試みる。

4. 備考

本プロトコールにおいて合成されたcDNAからPCR法によって増幅されたDNA断片はシーケンス解析に用いることが可能であるが、非特異的増幅反応を抑制するためにホットスタート・タッチダウンPCR(通知法の増幅サイクルの直前に55℃から51℃まで1℃ずつ下げてアリーニングを行う5サイクルを挿入する)を行うことが望ましい。

リアルタイムPCR法は、使用する耐熱性DNA合成酵素やPCR増幅装置の違いなどにより結果が大きく異なる場合がある。食品から安定的にウイルス遺伝子を検出するためには、通常のnested PCR法で遺伝子増幅を行った後、シーケンス解析を実施するか、あるいは、COG1F/G1SKRまたはCOG2F/G2SKRでPCR反応を行った後リアルタイムPCRを行う、nestedリアルタイムPCR法を実施することが推奨される。

通常のリアルタイムPCR法で遺伝子検出を行う場合は、事前にリアルタイムPCR用のマスターミックス液等について検討を行い、検出感度に問題がないことを確認する。比較的安定的な結果が得られるマスターミックス液としてはLightCycler® FastStart DNA MasterPLUS HybProbe (Roche, 3752178)またはEagleTaq Master Mix with ROX (Roche, 6427022)がある。

本プロトコールにおいて、遠心分離における条件は、最大遠心加速度($\times g$)で記載してある。

参考文献

- 1) Kessler, S. W.: Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A-antibody absorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. J. Immunol., 115, 1617-1624 (1975).

作成日:平成 25 年 1 月 13 日