

ノート

## 還元剤処理と等温遺伝子増幅法を併用した 二枚貝からのノロウイルス遺伝子の迅速検出

福田 伸治, 重本 直樹, 谷澤 由枝, 妹尾 正登

### Rapid Detection of Norovirus Genomes in Bivalves using Reductant-Treatment and Isothermal Amplification Assays

SHINJI FUKUDA, NAOKI SHIGEMOTO, YUKIE TANIZAWA and MASATO SENO

(Received Oct. 1, 2009)

We achieved the detection of norovirus (NoV) genomes in bivalves with a sensitivity similar to that of conventional method by using two-step isothermal amplification assay systems combining NASBA and RT-LAMP assays, following N-Acetyl-L-cystein-pretreatment of digestive tissues. The time taken for the examination was shortened to about 5 to 6 h. This method is available to detect NoV genomes in bivalves such as oysters even in small laboratories because the system requires no precision instrument.

Key words : Norovirus, N-Acetyl-L-cystein, NASBA, RT-LAMP, oyster

#### 緒 言

2007年および2008年の厚生労働省の食中毒統計によると、ノロウイルス(NoV)を原因とする食中毒患者数はそれぞれ55.3%(18520/33477)および47.8%(11618/24303)であり、食中毒の主要な病因物質となっている(<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/>)。しかしながら、食品からNoVが検出される事例は極めて稀であり、食品からNoVを効率的に回収する種々の方法が検討されている[1-5]。

NoVは人工培養ができないことから[6]、その検出はRT-PCR法などによる遺伝子学的方法により行われるが、食品成分や食品に含まれるPCR阻害物質などが遺伝子増幅に阻害的に働くことがNoVの検出を困難にしている原因であると考えられている。唯一、二枚貝についてはNoVが蓄積される中腸腺部分のみを検査に用いるため、他の食品に比しNoVを検出しやすい状況にある。

一方で、NoV検出の迅速化を目的に、RT-LAMP(Reverse Transcription-Loop Mediated Isothermal Amplification)法[7]、NASBA(Nucleic Acid Sequence Based Amplification)法およびTRC(Transcription Reverse-Transcription Concerted)法が開発され、そのキットが市販されている。これらは等温遺伝子増幅法で短時間(60~90分)にNoV遺伝子を増幅できるが、糞便を対象にしたキットで食品からのNoV検出を目的とし

たものではない。これらの方法はRT-PCR法と同様に遺伝子増幅に阻害的に働く物質の影響を受ける。

ここでは、カキなどの二枚貝からのNoV迅速検出を目的に、N-アセチル-L-システイン(NALC)による前処理(佐々木ら:ノロウイルス迅速検出を目的としたカキ中腸腺の簡易処理法,第29回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集 p.32)およびNASBA法とRT-LAMP法を組合せた検出法[8]によるNoVの検出効果を平成15年11月5日付け食安監発第1105001号,厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知法(通知法)と比較検討した。

#### 材料と方法

##### 1. 供試サンプル

河口部で人工的に汚染させたカキ30個体を用いた。中腸腺を摘出後、それぞれ1/3~1/4量を以下に示す「RT-seminested PCR法によるNoV遺伝子の検出」および「NALCによる前処理およびNASBA法とRT-LAMP法を組合せた方法によるNoV遺伝子の検出」に用いた。

##### 2. RT-seminested PCR法によるNoV遺伝子の検出

通知法に準拠し、ポリエチレングリコール6000による濃縮沈澱を4℃、1夜行い、500μlのDNaseおよびRNaseフリー水に再浮遊した後、QIAamp viral RNA mini kit(キアゲン)によりRNAを抽出(60μl)し、

RT-seminestedPCR 法により NoV 遺伝子を増幅・検出した。

### 3. NALC による前処理および NASBA 法と RT-LAMP 法を組合せた方法 (N-N-L 法) による NoV 遺伝子の検出

Fig.1 に示したように、中腸腺を潰し、1% の割合に NALC (和光純薬) を含む SDS トリスグリシンバッファー (コスモバイオ) 500 $\mu$ l (用事調整) を加え、約 30 秒間激しく攪拌した。37 $^{\circ}$ C 30 分間加熱後、13,000rpm 10 分間遠心した上清から QIAampviral RNAMinikit を用いて RNA を抽出 (60 $\mu$ l) した。そして、先に報告した NASBA 法と RT-LAMP 法を組合せた方法 [8] に準拠し NoV 遺伝子増幅を行っ

た。ただし、以下の点を変更して遺伝子増幅を行った。NASBA 用の G2B31T7 プライマーを NASBAG2R11, NASBAG2R21, NASBAG2R31 および NASBAG2R41 プライマーに変更して用いた。NASBA 用プライマーおよび RT-LAMP 用プライマー配列は Table 1 に示した。また、RT-LAMP 反応溶液にはエリオクロムブラック T (シグマアルドリッチ ジャパン) を最終濃度 0.001% の割合で加えた。

### 4. リアルタイム PCR 法による NoV 遺伝子の定量

通知法に基づくポリエチレングリコール沈澱および NALC 処理を行った後、抽出した RNA から逆転写反応により得られた cDNA を用いて、先に報告した方法 [7] により NoV 遺伝子の定量を行った。

Table 1 Primer sets for NASBA and RT-LAMP assays

Assay	Primers name	Sequence (5'-3')	Reference
NASBA	G1F3N1	CCAGGYTGGCAGGCCATGTT	8
	G1F3N2	CCTGGKTGGCAGGCCATGTT	8
	G1F3N3	CCCGGCTGGCAGCCCATGTT	8
	G1F3N4	CCAGGRTGGCARGCCATGTT	8
	G1F3N5	CCGGGTTGGCAGGCAATGTT	8
	G1F3N6	CCAGGTTGGCAGGCTATATT	8
	G2F3N1	GGCATGGATTCTACGTGCCCA	8
	G2F3N2	GGRATGGATTTTACGTGCCAA	8
	G2F3N3	GGRATGGATTTYATGTGCCRA	8
	G2F3N4	GGMATGGATTTTACGTGCCCA	8
	G2F3N5	GGTCTGGARTTTTATGTGCCCA	8
	G1B31T7	aattctaatacactactatagggagaGCCAACCCARCCATTRTACA	8
	NASBAG2R11	aattctaatacactactatagggaaTCTATAATCACATGTGGAAACA	Thisstudy
	NASBAG2R21	aattctaatacactactatagggaaTCAAYAATYAYATGRGGGAACA	Thisstudy
	NASBAG2R31	aattctaatacactactatagggaaTCCACMACCARTGSGGRCACA	Thisstudy
NASBAG2R41	aattctaatacactactatagggaaTCTACTATTATRTGGGGRAACA	Thisstudy	
RT-LAMP for GI	F3	CCRGNTGGCARGCNATGTT	7
	B3	CCAACCCARCCATTRTACA	7
	FIP1	CATTTACGAATTCGGGCAGGTTTTCGCTGGATGCGNTTCCATGA	7
	FIP2	CATTTACAAAATTCGGGCAGGTTTTCGCTGGATGCGNTTCCATGA	7
	BIP1	GATGGCGTCTAAGGACGCTTTTAGCTGTRTTTGCCCTCTGGWAC	7
	BIP2	GATGGCGTCTAAGGACGCTTTTAGCWGTATTAACCTCCGGYAC	7
	LF1	AGATYGCGATCYCCTGTCCA	7
	LF2	AGATTGCGATCTCCTGCCCA	7
	LF3	AGCTCGCGGTCTCCTGTCCA	7
RT-LAMP for GII	F3	GGNMTGGANTTTTAYGTGCCMAG	7
	B3	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	7
	FIP1	GGGAGCMAGATTGCGATCGCTTTTGAGBCNATGTTYAGRTGGAT	7
	FIP2	GGGAGCMAGATTGCGATCGCTTTTGAGCCCATGTTTACAGRTGGAT	7
	FIP3	GGGAGCGAGATTGCGATCGCTTTTGAGTCAATGTTYAGGTGGAT	7
	BIP1	TGTGAATGAAGATGGCGTCGTTTTCTCATTRTTRVCTCTGGBACGAG	7
	BIP2	TGTGAATGAAGATGGCGTCGTTTTCTCATTRTTGCYCTCTGGYACGAG	7
	BIP3	TGTGAATGAAGATGGCGTCGTTTTCTCATTGTTGAYCTCTGGKACGAG	7
	BIP4	TGTGAATGAAGATGGCGTCGTTTTCTCATTRTTACTTTCTGGCACGAG	7
	LF1	GTGCTCARATCWGARAACCTC	7
	LF2	GTGCTGAGGTCWGARAATCTC	7
	LF3	GTGCTCAAATCTGAGAAATCTC	7
	LF4	GTGCTCAAGTCTGAGAAAYCTC	7

Lowercase letters indicate T7 promoter sequence.

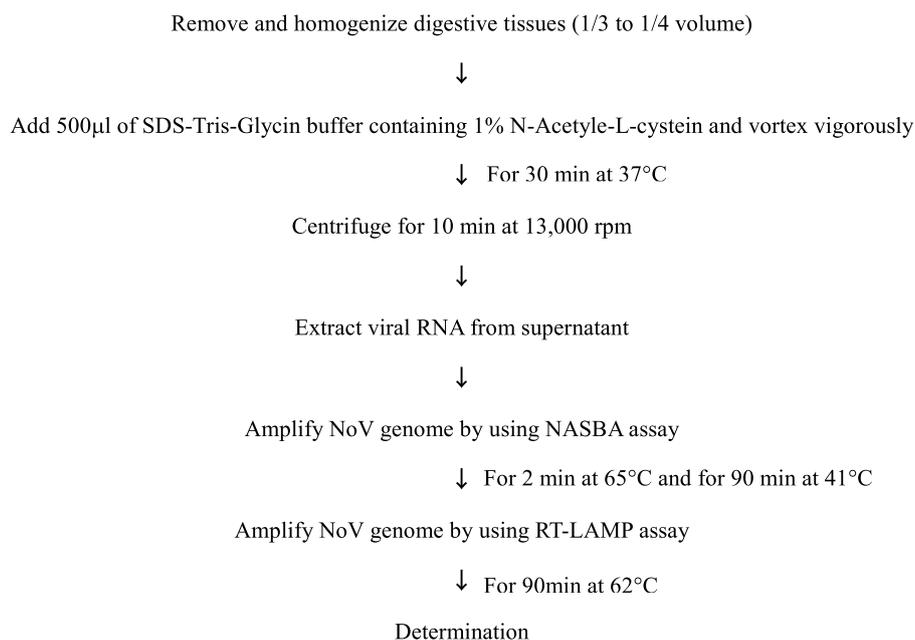


Fig. 1 Scheme for NoV detection

Table 2 Detection of NoV genomes from oysters by using conventional method and two-step isothermal amplification assay system following N-Acetylcysteine-pretreatment of digestive tissues (N-N-L assay)

Oyster sample	Conventional method		N-N-L assay	
	GenogroupI	GenogroupII	GenogroupI	GenogroupII
1	+ (-)	- (-)	+ (2.6)	+ (-)
2	- (-)	- (-)	+ (14.3)	- (-)
3	+ (7.5)	- (2.9)	+ (22.1)	+ (4.9)
4	+ (18.1)	+ (3.4)	+ (41.4)	+ (2.1)
5	+ (-)	- (-)	+ (5.7)	+ (-)
6	+ (-)	- (3.0)	- (-)	- (1.0)
7	+ (23.3)	- (3.9)	- (-)	- (1.5)
8	- (-)	- (-)	+ (19.0)	- (6.9)
9	- (-)	- (-)	- (7.7)	- (3.0)
10	+ (13.5)	+ (1.3)	+ (20.1)	- (-)
11	- (10.2)	+ (15.3)	+ (-)	+ (20.7)
12	- (1.6)	+ (10.0)	+ (-)	+ (10.7)
13	- (-)	- (4.3)	- (12.8)	- (-)
14	- (18.3)	+ (6.3)	- (1.7)	+ (8.3)
15	+ (-)	- (3.2)	+ (-)	+ (5.4)
16	- (-)	- (3.9)	+ (-)	- (7.4)
17	+ (8.5)	+ (5.0)	+ (4.9)	+ (19.2)
18	- (-)	+ (6.6)	+ (1.6)	+ (15.6)
19	+ (2.8)	+ (23.7)	+ (7.6)	+ (18.4)
20	- (-)	+ (15.6)	+ (3.7)	- (22.4)
21	+ (10.5)	+ (11.6)	- (-)	+ (-)
22	+ (-)	+ (1.9)	+ (14.9)	+ (4.6)
23	+ (-)	+ (4.7)	+ (13.4)	- (3.7)
24	+ (6.1)	+ (2.8)	- (-)	- (1.4)
25	- (-)	+ (1.8)	+ (18.2)	+ (1.8)
26	+ (24.1)	+ (-)	- (-)	- (-)
27	+ (6.2)	- (1.5)	+ (-)	- (3.3)
28	+ (12.3)	+ (2.8)	+ (-)	- (1.3)
29	+ (-)	+ (-)	+ (12.1)	+ (-)
30	+ (7.4)	+ (5.8)	- (13.0)	- (30.4)

Number of copies per 2 μl of cDNA denote in parentheses.

## 結 果

通知法と N-N-L 法のカキからの NoV 検出状況を Table 2 に示した。通知法と N-N-L 法による 30 個のカキからの NoV 遺伝子グループ I (GI) の検出率はそれぞれ 63.3% (19/30) および 70.0% (21/30)、同様に GII の検出率はそれぞれ 60.0% (18/30) および 50.0% (15/30) であった。GI では N-N-L 法が、GII では通知法の検出率が高かったが、両者に統計学的有意差 (McNemer test, GI :  $p=0.791$ , GII :  $p=0.549$ ) は認められなかった。また、通知法 (ポリエチレングリコール沈澱) および NALC 処理における cDNA  $2 \mu\text{l}$  中のコピー数の中央値 (最小値, 最大値) は GI でそれぞれ 0.8 (0, 24.1) および 4.3 (0, 41.4), GII でそれぞれ 3.1 (0, 23.1) および 3.15 (0, 30.4) であった。GI においては NALC 処理の NoV 遺伝子抽出量が多い傾向を示したが、両者に統計学的有意差 (Wilcoxon signed-rank test, GI :  $p=0.259$ , GII :  $p=0.123$ ) は認められなかった。

通知法による検査時間は全工程 2~3 日必要であるのに対し、N-N-L 法は 5~6 時間で NoV 遺伝子の検出が可能であった。また、RT-LAMP 反応液にエリオクロムブラック T を加えることにより、NoV 陽性の場合には反応溶液が白濁と同時に紫色から青色に色調変化し、陽性・陰性の判定が容易であった。

## 考 察

通知法と N-N-L 法の NoV 検出率および抽出コピー数に有意差は認められなかったが、N-N-L 法は短時間 (全工程 5-6 時間) に NoV 遺伝子の検出が可能であり、生産現場などでの迅速検出に有用であることが示唆された。N-N-L 法は最終段階で RT-LAMP 法を用いており、その特徴である白濁を視覚的に観察することにより陽性・陰性の判定が可能である。通常は濁度測定装置を用いてリアルタイムに濁度を測定するが、N-N-L 法はエリオクロムブラック T を添加し、白濁と同時に色調変化 (陽性の場合には青色) で簡易に陽性・陰性の判定が可能であることから、安価なブロックヒーターなどの温度を一定に保つ恒温装置があれば小さな研究室でも検査可能であると考えられる。

食品、主にカキを対象とした NoV 回収法には大きく分けて 2 つの方法が報告されている。1 つは NoV RNA の抽出効率を向上させる方法、他の 1 つはカキに含まれるカキ由来の夾雑物の除去に主眼を置いたものである。前者はフェノール-クロロフォルム-イソアミルアルコールによる処理 [4] あるいはシリカ磁気ビーズ [2] や豚胃ムチンを結合させた磁気ビーズ [5] による RNA

抽出率の向上を目的としている。後者は  $\alpha$ -アミラーゼによるグリコーゲンの消化 [3] あるいは細菌による夾雑物の分解・消化 [1] を行い、ウイルス粒子の回収率を高めようとするものである。これらの方法は実験的に NoV 検出率向上の成果が得られているが、多くの検査時間が必要であり生産現場などでの迅速簡易検出には不向きである。N-N-L 法に用いる NALC は喀痰の結核菌検査などに用いられる一種の還元剤で、カキ由来のタンパク質成分などのジスルフィド結合を切断して液状化させることにより NoV の回収効果を高めていると考えられる。

カキ以外の食品からの NoV 回収の効率化に関する研究はほとんどないが、 $\alpha$ -アミラーゼ処理をパンに応用した研究 [9] が見られる。カキ以外の食品に応用すると回収率が 5% 程度と低い。食品それぞれに含まれる成分が異なっていることが影響していると思われる。全ての食品に同じ方法を適用することには限界があると考えられる。N-N-L 法もカキからの NoV 検出には通知法と同等の効果が得られているが、他の食品への応用については今後の検討課題である。

## まとめ

N-アセチル-L-システイン (NALC) による前処理および NASBA 法と RT-LAMP 法を組合せた迅速・簡易法によるカキからのノロウイルス (NoV) の検出効果について検討した。この方法は全工程 5~6 時間で NoV の検出が可能であり、厚生労働省の通知法 (平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発第 1105001 号、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知法) による検出率とほぼ同等 (統計学的有意差なし) であった。また、この方法は一定温度で遺伝子増幅を行うため恒温装置があれば実施可能であり、しかも視覚的に陽性・陰性の判定ができることから、生産現場などの小さな研究室での検査が可能であると考えられる。

## 文 献

- [1] 秋場哲哉, 田中達也, 新井輝義, 林志直, 森功次, 野口やよい, 永野美由紀, 吉田靖子, 矢野一好 (2008): 細菌添加培養処理によるカキなどからのノロウイルス検出率の向上. 食衛誌, 49, 407-410.
- [2] Le Guyader F. S., S. Parnaudeau, J. Schaeffer, A. Bosch, F. Loisy, M. Pommepuy, and R. L. Atmer (2009): Detection and quantification of noroviruses in shellfish. Appl. Environ. Microbiol., 75, 628-624.
- [3] 野田衛, 西尾治, 山本美和子, 伊藤文明, 池田義文,

- 松本勝, 萩野武雄 (2006): 混合カキ検体からのノロウイルス濃縮操作におけるアミラーゼ処理の有用性. 広島市衛研年報, 25, 35-43.
- [4] 田中達也, 秋場哲哉, 森功次, 野口やよい, 林志直, 小沼博隆, 吉田靖子, 山田澄夫 (2007): カキからのノロウイルス RNA 抽出方法の検討. 日食微誌, 24, 157-162.
- [5] Tian P., A. Engelbrektsen, and R. Mandrell (2008): Two-log increase in sensitivity for detection of norovirus in complex samples by concentration with porcine mucin conjugated to magnetic beads. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 4271-4276.
- [6] Green K. Y., R. M. Chanock, and A. Z. Kapikian (2001): Human caliciviruses, p. 841-847. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, et al. (ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- [7] Fukuda S., S. Takao, M. Kuwayama, Y. Shimazu, and K. Miyazaki (2006): Rapid detection of norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 1376-1381.
- [8] Fukuda S., Y. Sasaki, and M. Seno. (2008): Rapid and sensitive detection of norovirus genomes in oysters by a two-step isothermal amplification assay system combining nucleic acid sequence-based amplification and reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assays. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 3912-3914.
- [9] 有田知子, 木村博一, 野田衛, 西尾治 (2008): パンに含まれるノロウイルスの回収法の検討. 感染症誌, 82, 473-475.

