

資料

最確数法を応用したカキのノロウイルス遺伝子の定量

福田 伸治, 桑山 勝, 高尾 信一, 島津 幸枝, 宮崎 佳都夫

Quantitative approach to estimate of Noroviruses in Oysters by Most Probable Number Technique

SHINJI FUKUDA, MASARU KUWAYAMA, SHINICHI TAKAO, YUKIE SHIMAZU and KAZUO MIYAZAKI

(Received Sept. 27, 2004)

最確数法(MPN法)は細菌学分野で広く用いられている方法で、菌量の少ない検体の定量に適している。我々は特別な機器を必要とせず、遺伝子量が既知のスタンダードを必要としないMPN法に注目し、カキのノロウイルス(NV)遺伝子定量に応用した。NV陽性カキ16検体について、MPN法とリアルタイムPCR法による遺伝子定量値を比較したところ高い相関が認められた。また、MPN法はNV量が少ない場合に有用な定量法であることが確認された。

キーワード：ノロウイルス, 定量, MPN

はじめに

ノロウイルス(NV)は冬季に発生する食中毒の原因の大部分を占めるウイルスであり、その約半数はカキが原因食品となっている[1]。NVは培養に成功していないウイルスであることから、その検出には主にRT-PCR法が用いられているが、食中毒などの集団感染事例発生時には、定性検査のみならずカキなどの原因食品の定量検査が必要である。近年、リアルタイムPCR装置が普及し比較的容易にNV遺伝子を定量することができるようになった。しかし、リアルタイムPCR法による定量は遺伝子量が既知のスタンダードが必要である。スタンダードの市販はなく自ら調整する必要がある。作成者によるばらつきを除去することができない。一方、細菌学領域で用いられる最確数法(MPN法)は統計学的確率論に基づき定量する方法であり、スタンダードを必要としない利点がある。今回、我々はMPN法によるカキのNV遺伝子定量法を検討し、リアルタイムPCR法と比較検討したので報告する。

材料および方法

1 RNAの抽出およびcDNAの作製

RNAはカキ中腸腺からQIAamp viral RNA miniキット(Qiagen)により抽出した。cDNAの作製はランダムプライマー(TAKARA)を用い、ReverTra Ace(TOYOBO)により行った。

2 使用機種、試薬およびプライマー

MPN法およびリアルタイムPCR法ともRoche社のLightCyclerを用い、cDNAにおけるNV遺伝子量を測定した。MPN法ではFastStart DNA Master SYBG Green I試薬、Kojimaら[2]のG1SKF/R、G2SKF/Rプライマーを用い、3mMMgCl₂存在下で、95℃10分間加熱後、95℃15秒、56℃10秒、72℃14秒を50サイクル行った。NV遺伝子の確認は電気泳動および融解曲線分析により行った。また、MPNは3本法により行った。

リアルタイムPCR法ではFastStart DNA Master Hybridization Probes試薬、Kageyamaら[3]のCOG1F/R、COG2F/RプライマーとRINGプローブを用い、3mMMgCl₂存在下で、95℃10分間加熱後、95℃15秒、56℃20秒、72℃4秒を60サイクル行った。

3 スタンダード遺伝子

ORF1, ORF2ジャンクション近傍領域からカプシッド領域の遺伝子の一部分をプラスミドに組込み作製した。遺伝子グループ1のスタンダード遺伝子はSouthampton(GenBank Accession No. L07418)類似株から、遺伝子グループ2はChitta(AB032758)類似株から作製した。

4 MPN値の再現性

スタンダード遺伝子をNV陰性カキ中腸腺のQIAamp viral RNA miniキットによる抽出液に50コピー/ μ l加え検討した。

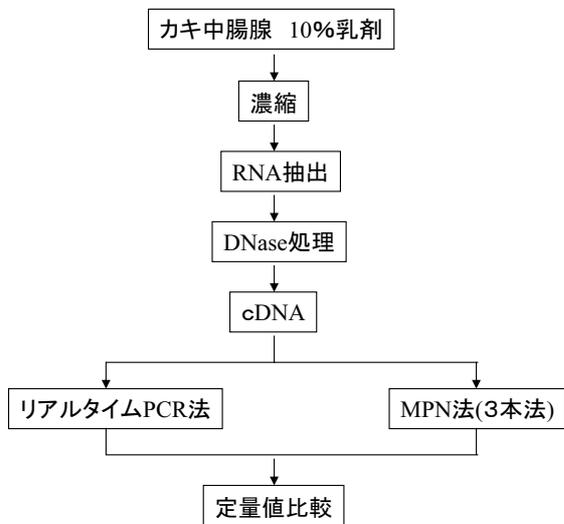


図1 MPN法とリアルタイムPCR法による定量値の比較検討フロー

5 カキのNV定量

図1に示したフローに従い、NV陽性カキ中腸腺16検体から作製したcDNAを用い、MPN法およびリアルタイムPCR法による定量値を比較した。

結 果

1 MPN値の再現性(表1)

スタンダード遺伝子を50コピー/ μ l加え、3回試験を行ったところ、遺伝子グループ1および2とも24から46コピー/ μ lを示し再現性が確認された。

表1 MPN値の再現性

遺伝子グループ1		遺伝子グループ2	
試験No.	MPN値	試験No.	MPN値
1	24	1	24
2	46	2	24
3	24	3	46

50コピー/ μ l添加
MPN値/ μ l

2 電気泳動と融解曲線分析による感度の比較(図2)

融解曲線分析によるNV遺伝子の確認は遺伝子増幅に引き続き実施できるため、電気泳動による検出に比較し迅速性に優れていた。また、増幅効率の悪い場合にも電気泳動に比較し高感度であることが認められた。

3 MPN法とリアルタイムPCR法によるカキのNV定量値(表2, 図3)

16検体のカキ中腸腺から抽出したNV遺伝子はMPN法により、すべて定量可能であった。遺伝子グループ1の2検体(カキNo.1210, 1225)および遺伝子グループ2の4検体(1208, 1215, 1226, 1235)はリアルタイムPCR法ではNV遺伝子量が測定できなかった。これらの検体は μ l当たりのコピー数が10以下であった。

MPNとリアルタイムPCR両法で定量できた検体では、遺伝子グループ1および2ともMPN法とリアルタイムPCR法による定量値には相関が認められた。

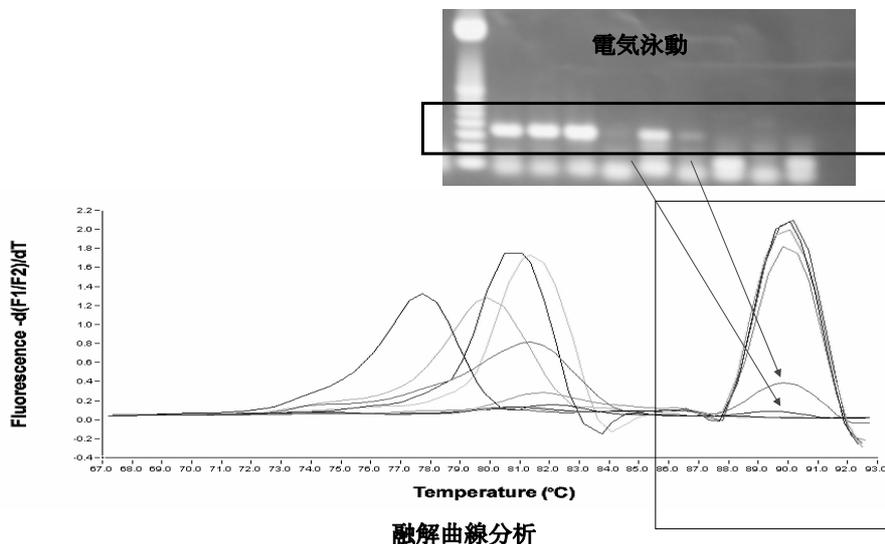


図2 電気泳動と融解曲線分析による感度の比較

表2 MPN法とリアルタイムPCR法による定量値¹⁾

カキNo.	遺伝子グループ	Real T	MPN法	カキNo.	遺伝子グループ	Real T	MPN法
1205	2	92.6	93	1226	1	208.3	3.9
1206	1	1.5	2.3		2	—	7.5
1208	2	—	7.5	1227	1	22.7	9.3
1210	1	—	9.1		2	25.8	24
1211	2	49.7	15	1228	1	34.5	24
1215	2	—	15		2	69.6	110
1218	2	13.7	3.9	1229	1	3.7	24
1221	2	19	21		2	23.1	6.4
1225	1	—	2.3	1232	1	9.1	2.3
	2	16.7	4.3	1235	1	4.9	1.5
					2	—	1.5
				1245	1	0.48	0.73

1) コピー数/ μ l
Real T: リアルタイムPCR法

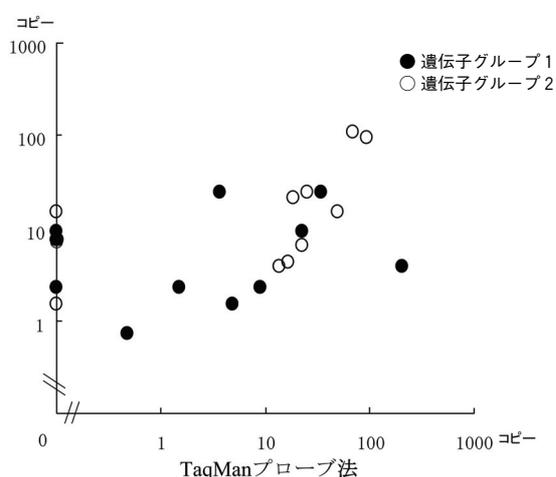


図3 MPN法とリアルタイムPCR法による定量値の相関

考 察

リアルタイムPCR装置による定量法に代わるNVなどのウイルス遺伝子の定量法として、RT-PCR単位 (RT-PCRが陽性となる最小の遺伝子量が1RT-PCR単位) [4], 競合型PCR法 [5] およびMPN法を応用した方法 [6] が見られる。Guyaderら [6] のMPN-RT-PCR法はRNA抽出液を10倍段階希釈し5本法により定量する方法であるが、我々ではできるだけ簡略化することを目的にcDNAからMPN法 (RT-PCR-MPN) で遺伝子の定量を行い、MPN法とリアルタイムPCR法に高い相関を認めた。また、Michoteyら [7] は細菌が対象ではあるが、MPN-PCRと競合型PCR法を比較し同様な結果が得られたことを報告している。これらのことから、MPN法、競合型PCR法およびリアルタイムPCR法の間には相関があり、いずれの方法によってもNV遺伝子の定量が可能であると考えられる。

最近、Nishidaら [8] はカキの定量にリアルタイムPCR法を用い有用な結果を得ている。しかしながら、リアルタイムPCR法は簡易に実施できる反面、チューブ当たりの遺伝子のコピー数が少ない場合には再現性に乏しく、10コピー以下の値については信頼性が低い場合がある [9]。一方で、正確な遺伝子スタンダードが必要であり、同じスタンダードを用いなければ施設間あるいは研究者間のばらつきを除くことができない。MPN法はリアルタイムPCR法に比較し、多くのチューブを必要とする (3本法で9本/検体) 欠点があるが、スタンダードを必要とせず、検査プロトコルを標準化すれば施設間および研究者間のばらつきを最小限にすることが可能であると考えられる。我々の結果ではチューブ当たりのコピー数が10コピー以下で、リアルタイムPCR法で定量できない検体についても定量可能であることが認められた。NV含有量が少ない検体の場合にはMPN法は有用な方法の一つであると考えられる。また、MPN法は通常のPCR装置でも実施可能であり、PCR後電気泳動によりNV遺伝子の存在を確認する煩雑さはあるが、高価なリアルタイムPCR装置がない施設においても実施可能な有用な方法であると考えられる。

文 献

- [1] Inouye, S., Yamashita, K., Yamadera, S., Yoshikawa, M., Kato, N. and Okabe N. (2000): Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. J. Infect. Dis., 181, Suppl 2, S270-274.
- [2] Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N. and Katayama, K. (2002): Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses.

- J. Virol. Methods, 100, 107-114.
- [3] Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N. and Katayama, K. (2003): Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 1548-1557.
- [4] Atmar, R.L., Neill, F.H., Romalde J.L., Le Guyader, F., Woodley, C.M., Metcalf, T.G. and Estes, M.K. (1995): Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3014-3018.
- [5] Arnal, C., Ferre-Aubineau, V., Mignotte, B., Imbert-Marcille, B.M. and Billaudel, S. (1999): Quantification of hepatitis A virus in shellfish by competitive reverse transcription-PCR with coextraction of standard RNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 322-326.
- [6] Le Guyader, F.S., Neill, F.H., Dubois, E., Bon, F., Loisy, F., Kohli, E., Pommepuy, M. and Atmar, R.L. (2003): A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. *Int. J. Food Microbiol.*, 87, 107-112.
- [7] Michotey, V., Mejean, V. and Bonin, P. (2000): Comparison of methods for quantification of cytochrome cd (1)-denitrifying bacteria in environmental marine samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1564-1571.
- [8] Nishida, T., Kimura, H., Saitoh, M., Shinohara, M., Kato, M., Fukuda, S., Munemura, T., Mikami, T., Kawamoto, A., Akiyama, M., Kato, Y., Nishi, K., Kozawa, K. and Nishio, O. (2003): Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5782-5786.
- [9] 篠原美千代, 西尾 治 (2003): リアルタイムPCR法で得られた低い値の信頼性について. 平成14年度厚生労働科学研究費補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究分担報告書, 56-59.