資　料

リアルタイムPCRを用いたRT-PCR法の検討

青 木 洋 子，須 藤 亜寿佳，水 田 克 巳，保 科　　仁，大 谷 勝 実

Examination of laboratory procedure RT-PCR for Realtime-PCR

by Yoko AOKI, Asuka SUTHO, Katsumi MIZUTA, Hitoshi, HOSHINA and Katsumi OOTANI

2006／2007シーズン，全国的にノロウイルスGⅡTypeが大流行し，山形県でも多くの集団発生患者が報告された．昨年度導入されたリアルタイムPCRを利用し，現在行っているRT-PCR法によるノロウイルスの検査法について検出率を上げるための検討をした．

現在のRT-PCR法は，プライマー：COG2F／G2SKR・ALPF／G2ALSKRを使用し遺伝子増幅を行い，電気泳動によりバンドが確認されたものをドットハイブリダイゼーションで確認している．この方法で感染性胃腸炎の患者便15検体を検査したところ5検体からノロウイルスGⅡ遺伝子を検出した．同様な方法でプライマーをCOG2F／COG2Rにしたところ，15検体中6検体から検出された．さらに，ここで得られた遺伝子増幅産物すべてをドットハイブリダイゼーションしたところ15検体中8検体から遺伝子が検出され，リアルタイムPCRを使用した時の15検体中9検体検出に近い結果が得られた．

Key Words：ノロウイルス，リアルタイムPCR，RT-PCT，ドットハイブリダイゼーション

Ⅰ　はじめに

ノロウイルスは，嘔吐や下痢などの急性胃腸炎の症状を引き起こすことが知られ，その感染経路は，主に経口感染である．感染力が強いことから，同一施設内での集団発生や，食中毒の原因となるなど冬場の感染性胃腸炎の主な原因である．2006／2007シーズンは，全国的にノロウイルスGⅡTypeの大きな流行が確認された[1]．山形県も例外ではなく，多くの集団発生が報告された．

集団的な患者が発生した場合，行政として感染の拡大防止と，今後の対応を示すためにも感染症の原因を究明することは大切である．このため，検査側には，より感度良く，正確で迅速な検査を行うことが要求される．

そこで，昨年度導入されたリアルタイムPCRの定量性を利用し，これまで行ってきた検査の精度を確認するとともに，より的確な検査を行えるよう検査方法の見直しを行ったので報告する．

Ⅱ　材料と方法

1．材料

2006／2007シーズンに感染症サーベイランス事業で依頼のあった小児便と，施設内集団発生が疑われ衛生研究所に依頼があった患者便のうち，ノロウイルスGⅡ遺伝子が検出・確認されたもの5検体と，陰性であったもの10検体を無作為に抽出して材料とした．

2．方法

(1) RNAの抽出

患者便10％乳剤を10000rpmで10分間遠心分離した後，その上清200μlからHigh Pure Viral RNA kit（ロッシュ社製）を用いRNAの抽出を行った．

(2) RT-PCR法

表1に示したRT反応液15μlにRNase Inhibitor，MuLV Reverse Trancriptaseを各々10U，20U加えた反応液に，抽出したRNA5μl加え，30℃ 10分，37℃ 45分の条件でcDNAを作成した．

表2に示したノロウイルス反応液にTaqポリメラーゼ1U（プロメガ製）とcDNA 3μlを加え，94℃ 5分，94℃ 30秒－50℃ 30秒－72℃ 60秒（40サイクル），72℃ 10分の条件で遺伝子の増幅を行った．プライマーは，プライマー①：COG2F／G2SKR・ALPF／G2ALSKR（387bp）とプライマー②：COG2F／COG2R（98bp）[2]を使用した．

表1　RT-PCR反応液

0.1M DTT	100μl
2 mM dNTPs	100μl
×10PCR　Buffer	200μl
25 mM　$MgCl_2$	200μl
random primer	50μl
DDW	850μl

(3) ドットハイブリダイゼーション（以下ハイブリ）

既報[3]に従い，厚

生労働省が通知した（以下通知）ノロウイルス検出方法[2] にあるビオチン標識プローブRING2AL-TP，RING2-TPを用いて検出を行い，紫色のスポットを呈したものを陽性とした．

(4)　リアルタイムPCR法（以下リアルタイム）

通知の方法[2] に従い，表３に示した反応液を調製し，感染症研究所より分与されたコントロールDNAを100, 10^2, 10^4, 10^6に希釈して，この２μlずつを用いて検量線を作成した．また，検体のcDNAを同様に２μlずつ用い50℃２分，95℃ 10分，95℃ 15秒－56℃１分（45サイクル），25℃Holdの条件で定量した．

今回は，各々の方法により得られた遺伝子増幅産物（以下産物）を目視で判定した結果が陰性のものも含め，全てをハイブリの検査対象とした．

表２　PCR反応液

25 mM　$MgCl_2$	60μl	
2 mM dNTPs	50μl	
×10PCR Buffer	100μl	
10μMPrimer F	50μl	
10μMPrimer R	50μl	
DDW	720μl	
	Primer F	Primer R
プライマー①	COG2F ALPF	G2-SKR G2AL-SKR
プライマー②	COG2F ALPF	COG2R

表３　リアルタイムPCRマスターミックス

Taq Man Universal Master Mix		10μl
100 pM/μl primer	COG2F	0.08μl
	ALPF	0.08μl
	COG2R	0.08μl
4 pM/μl Taq Man プローブ	RING2AL-TP	1.14μl
DDW		6.62μl

Ⅲ　結　　果

表４にリアルタイムとRT-PCR法，RT-PCR法に加えハイブリを行った検査結果を示した．

リアルタイムでの定量結果から，15検体中９検体が陽性であった．この産物をハイブリしたところ全てのものが紫色のスポットを示した．

プライマー①によるRT-PCR法は，15検体中５検体から遺伝子が検出，ハイブリにより確認され，検査の再現性が認められた．ハイブリの結果から泳動バンドの目視ができない産物10検体中１検体も陽性を示した．

プライマー②によるRT-PCR法は，15検体中６検体で遺伝子増幅が確認された．また，産物のハイブリ結果は，15検体中８検体で陽性が確認された．

Ⅳ　考　　察

リアルタイムを用いた定量結果と各々の結果から，以下のことが考えられた．

【リアルタイム法】定量の結果，陽性（定量下限10^2）と

表４　リアルタイムPCR，RT-PCR，ハイブリ検査結果

検体No.	リアルタイムPCR		RT-PCR①		RT-PCR②	
	定量値（コピー／μl）	ハイブリ	PCR	ハイブリ	PCR	ハイブリ
1	1.10×10^5	＋	＋	＋	＋	＋
2	2.34×10^6	＋	＋	＋	＋	＋
3	6.21×10^4	＋	＋	＋	＋	＋
4	3.39×10^7	＋	＋	＋	＋	＋
5	3.11×10^5	＋	＋	＋	＋	＋
6	ND	－	－	－	－	－
7	ND	－	－	－	－	－
8	ND	－	－	－	－	－
9	ND	－	－	－	－	－
10	ND	－	－	－	－	－
11	ND	－	－	－	－	－
12	1.41×10^3	＋	－	－	－	＋
13	1.08×10^2	＋	－	－	－	－
14	6.11×10^4	＋	－	＋	＋	＋
15	2.25×10^3	＋	－	－	－	＋

なったのは，15検体中９検体であり，RT-PCR 法よりも感度が良いことが確認された．

コントロールDNAを10, 10^2, 10^4, 10^6に希釈し定量した結果，公定法に定められた陽性判定値である10コピーを検出することができなかった．これは，コントロールDNAの希釈を行う際のピペッティングによる撹拌が十分に行われず，低濃度ではより偏りが生じたためと考えられた．しかし，10^2, 10^4, 10^6では相関係数（R2）：0.999の直線が得られ，この間の定量値は正しいと判断した．

【プライマー①でのRT-PCR法】現在行っているRT-PCR法は，6.21×10^4コピー以上のウイルスがないと電気泳動像の目視による判定で陰性となってしまうことがわかった．このように現在行っている方法では，リアルタイムの検出限界の約100分の１しか感度がないため，検査方法に何らかの改善が必要であると思われた．

【プライマー②でのRT-PCR法】現在のプライマーをリアルタイムで使用したものにかえてPCRを行ったところ，15検体中６検体で遺伝子が検出された．これにより，プライマー②を使用する方が検出率は良いと思われた．さらに，産物をハイブリすることにより，15検体中８検体で紫色のスポットが確認された．これらは，リアルタイムPCRの定量値から約10^3コピーまでの検出が可能であることがわかった．このように，電気泳動でバンドが検出されなかったとしてもスポットが確認できるので，ハイブリはRT-PCR法後の遺伝子検出を確認するための有効な手段であると考えられた．

Ⅴ　ま　と　め

冬期間は，ノロウイルス疑われる集団発生や食中毒による検査の依頼が増加する．リアルタイムは，検出感度が良く，遺伝子の検出・確認までの時間も短い．しかし，試薬類が高価であるのに加え，何回にも分けて依頼される検査に対応するには１台の機器では難しいと考えられる．そこで，現在行っているRT-PCR法の検出感度をあげる方法の検討を行った．現在，RT-PCR法に使用しているプライマー①では15検体中５検体からノロウイルスGⅡ遺伝子が検出されたが，プライマー②を使うと15検体中６検体から検出することができた．また，電気泳動による遺伝子増幅の確認ができない産物についてもドットハイブリダイゼーションをすることにより，15検体中８検体から遺伝子が検出確認された．この方法によれば，リアルタイムPCRを使用した時の検出（15検体中９検体）に近い結果を得ることができることがわかった．これにより，検査に時間を要することにはなるが，特別な機器を必要とせず，的確な検査データを提供できると考えられた．

今後は，定期的にRT-PCR法による検査の感度確認をするなど，リアルタイムを有効に活用したいと考える．

文　　献

１）感染研感染症情報センター：ノロウイルス感染症集団発生2006／2007シーズン（2007年９月11日現在報告数）

２）ノーウォーク様ウイルス（NLV）のRT-PCR法について，平成13年11月16日厚生労働省通知

３）青木洋子，安孫子千恵子，水田克巳，他：ドットハイブリダイゼーションによるヘルペスウイルスの確認．山形県衛生研究所所報　38：30-32, 2005