

Q(Quenching)プローブを用いた LAMP 法によるノロウイルスの検出

Detection of Norovirus using Loop-Meditated Isothermal Amplification Assay (LAMP) with Quenching Probe

植木 洋 木村俊介 鈴木優子 阿部美和 佐藤俊郎*1 真砂佳史*2 大村達夫*2
Yo UEKI, Shunsuke KIMURA, Yuko SUZUKI, Miwa ABE, Toshiro SATO,
Yoshifumi MASAGO, and Tatsuo OMURA

多検体からノロウイルス (NoV) 遺伝子を短時間で検出するために loop-mediated isothermal amplification 法と消光プローブを組み合わせた検査方法 (Q-LAMP 法) を開発した。NoV 遺伝子の検出に一般に用いられている通知法の定量 PCR 法と同一検体から抽出した RNA を用いて結果を比較したところ、下水検体では 63.5%、カキ検体では 75.0% の一致率が確認された。特に、下水検体では定量 PCR 法陽性で Q-LAMP 法陰性の検体が 8 検体であったのに対し、定量 PCR 法陰性で Q-LAMP 法陽性の検体が 15 件確認され、Q-LAMP 法は NoV 遺伝子の検出方法として有効であることが示唆された。

キーワード：Q-LAMP 法；定量 PCR 法；ノロウイルス；カキ；下水
Key words：Q-LAMP; quantitative PCR; norovirus; oyster; sewage

1 はじめに

ノロウイルス (NoV) 遺伝子の検出法は一般に平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発第 0514004 号の通知 (以下 通知法) ¹⁾ の定量 PCR 法または RT-PCR 法で行われている。定量 PCR 法は検出感度と特異性に優れているが一度に検査できる検体数に制約があり、通知法に従った場合 15 検体と、一方 RT-PCR 法は胃腸炎症状を示した臨床検体などのウイルス濃度が高い検体には適してはいるものの、ウイルス濃度が低い検体には引き続き nested PCR を実施し、ウイルス遺伝子を増幅する上に、サザンハイブリダイゼーションやシーケンシングなどで増幅された遺伝子の確認が必要になり、検査結果が得られるまで数日間を要する。これらの問題を解決すべく loop-mediated isothermal amplification 法 (LAMP 法) に消光プローブ (QProbe) を組み合わせた手法 (以下 Q-LAMP 法) を開発し、流入下水及びカキからの NoV 遺伝子の検出に適用し定量 PCR 法と結果の比較を行った。

2 検査材料と方法

2.1 Q-LAMP 法で検出可能な NoV 遺伝子型の検討

Q-LAMP 法で検出可能な NoV の遺伝子型を把握するため、分子疫学的解析で遺伝子型が既知の NoV 遺伝子を含む試料について、Q-LAMP 法で NoV 遺伝子の検出を行った。対象とした遺伝子群は、GI 群は GI/1, GI/4, GI/7, GI/8, GI/10, GI/11, GI/14, GII 群は

GII/3, GII/4, GII/6, GII/13 とした。なお、検体はいずれも感染性胃腸炎患者便から抽出した RNA とした。

2.2 カキ検体への適用

平成 25 年 10 月に県内の下水処理施設の処理水放流口近傍にカキを垂下した。その後 12 月から 1 月の期間に毎週 10 個体ずつ採取し (平成 26 年第 1 疫学週を除く) 計 80 個体を検査対象とした。

2.3 下水検体への適用

県内の 2 か所の下水処理施設で平成 25 年 4 月から平成 26 年 2 月までに採水した 63 件を対象とした。一施設では流入下水 (最初沈殿地越流水) と処理水 (塩素添加前) を採取し、他施設では流入下水のみ採水した。

2.4 検査方法

2.4.1 検体からのウイルス RNA 抽出

カキ中腸腺からのウイルス抽出は細胞破砕法 ²⁾ で行った。一方、下水検体のウイルス濃縮はポリエチレングリコール沈澱法で行い、流入下水は 50 倍、処理水は 500 倍に濃縮した。ウイルス RNA の抽出は QIAamp Viral RNA mini Kit (Qiagen) を用いて行った。

2.4.2 Q-LAMP 法

Q-LAMP 法は「ノロウイルス G1 検出試薬キット」と「ノロウイルス G2 検出試薬キット」 (栄研化学) を使い、添付書に従い遺伝子群別に試薬を調整した。すなわち、1 テストあたり、2 倍 Reaction Mix 12.5 μ L, Primer Mix 2.5 μ L, Distilled Water 3.0 μ L を加え 95 $^{\circ}$ C 5 分加温後、5 分氷冷した。その後 Enzyme Mix 1.0 μ L と 10 μ M の QProbe 1.0 μ L 添加し検体から抽出した RNA を 5 μ L 加えた。63 $^{\circ}$ C 90 分の反応後、解離曲線解析を行うために 95 $^{\circ}$ C 15 秒加温の後 40 $^{\circ}$ C から 90 $^{\circ}$ C に

*1 現 食肉衛生検査所

*2 東北大学未来科学技術共同研究センター

0.2°C/秒で温度を上昇させた。経時的蛍光強度の測定は Applied Biosystems の PRISM 7900HT Fast リアルタイム PCR システムを用いた。プローブの塩基配列は GI 群が GIQP : GAT GGC GTC TAA GGA C, 同じく GII 群が GIIQP : ATG AAG ATG GCG TCG AAT GAC (下線部は Locked Nucleic Acid) とし、各プローブの 3' 末端を蛍光色素で標識した。

Q-LAMP 法の結果の解析は、以下の二方法で行った。①解離曲線解析にて検体ごとに蛍光値を測定した。次に、95°Cの蛍光強度値に乗ずることで当該蛍光強度値が 1 となる補正係数を検体ごとに求め、この係数を、各検体で得られたすべての蛍光強度に乗ずることで補正蛍光強度値を求めた。さらに各検体の補正蛍光強度値を、陰性コントロールにおける同一温度の補正蛍光強度値にて割り、その値に 100 を乗じ蛍光消光率とした。得られた蛍光消光率を、温度に対してプロットしたグラフを作成し、陽性コントロールと比較した。②解離曲線解析にて検体ごとに微分蛍光値を取得した。次に、90°Cの微分蛍光値に乗ずることで、当該微分蛍光値が 1 となる補正係数を検体ごとに求め、この補正係数を、各検体で得られたすべての微分蛍光値に乗ずることで補正微分蛍光値を求めた。その後、各検体の補正微分蛍光値から、陰性コントロールにおける同一温度の補正微分蛍光値を差し引いて得られたデータを温度に対してプロットし、得られたグラフを、同様の方法で作成した陽性コントロールと比較した。

2.4.3 定量 PCR 法

定量 PCR 法は通知法¹⁾に準じて行った。すなわち、NoV の遺伝子型 GI 群の検出にはプライマー COG1F 及び COG1R (各 100pmol/μL)、TaqMan プローブ RING1-TP (a) 及び RING1-TP (b) (各 4pmol/μL) を、NoV の遺伝子型 GII 群の検出にはプライマー COG2F、COG2R、ALPF (各 100pmol/μL)、TaqMan プローブ RING2AL-TP (4pmol/μL) を用いて GI 群、

GII 群別々に反応を行った³⁾。反応条件は 50°C 2分、95°C 10分の熱処理後、95°C 15秒、56°C 1分の反応を 45回で行い、各遺伝子群の増幅曲線及び検量線を確認した。

定量 PCR 用ノロウイルス GI 群、GII 群コントロール DNA は、国立感染症研究所感染症情報センター第六室より分与されたものを用いた。また、定量値は蛍光強度が閾値に達した場合に検量線から求めた値を用い、通知法に従い各遺伝子群 duplicate で 10 コピー/well 以上を陽性とした。

3 結果

Q-LAMP 法で検出可能な GII 群 NoV の遺伝子型について、補正微分蛍光値を用いて解析した結果を図 1 に示す。

解離曲線解析では、増幅完了後、95°Cで 15秒間加熱し、40°Cに下げた後、0.2°C/秒で 90°Cまで温度を上昇させ、その間蛍光強度ならびに微分蛍光値を連続的に測定した。さらに、得られた蛍光強度より前述の解析方法にて補正微分蛍光値を算出した。

QProbe は、標的遺伝子に結合することで蛍光消光し、解離することで蛍光を発する。このため、解離曲線解析により得られた補正微分蛍光値は、標的遺伝子が存在した場合、QProbe との解離に起因する蛍光変化が最も著しい温度において、最も低い値を示す。このため、補正微分蛍光値を温度に対してプロットしたグラフでは負のピーク (以下 解離ピーク) が観察される。一方、標的遺伝子が存在しない場合、蛍光変化は発生しないため解離ピークは確認されない。このように Q-LAMP 法では、解離ピークの有無を確認することにより、標的遺伝子を検出することが可能になる。

今回の検討では陰性コントロールを除くすべての検体で 71°C付近を頂点とする解離ピークが確認された。この結果より、GII 群遺伝子は GII/3、GII/4、GII/6、

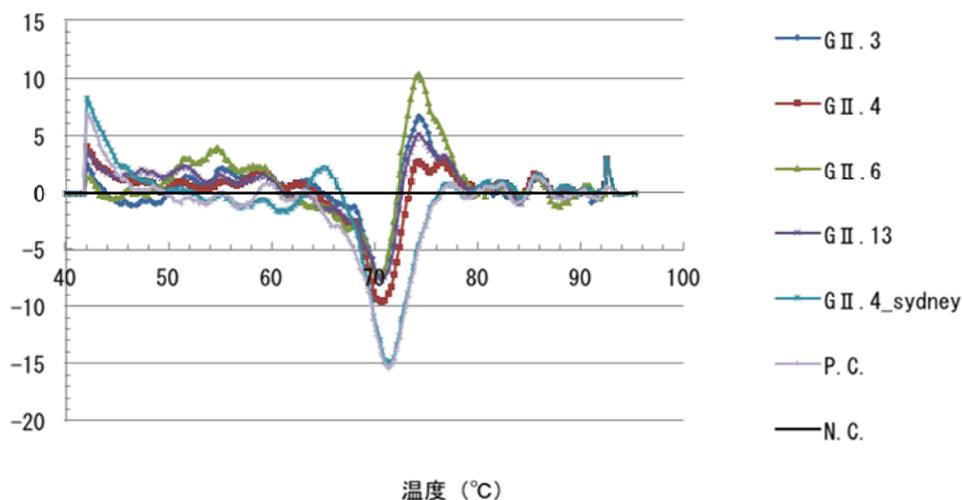


図 1. 遺伝子型既知の GII 群 NoV 遺伝子の補正微分蛍光値を用いた解析結果

表 1. カキを対象とした定量 PCR 法と Q-LAMP 法による NoV 遺伝子の検出結果

		Q-LAMP	
		陽性	陰性
qPCR	陽性	52	12
	陰性	8	8

表 2. 流入下水を対象とした定量 PCR 法と Q-LAMP 法による NoV 遺伝子の検出結果

		Q-LAMP	
		陽性	陰性
qPCR	陽性	22	8
	陰性	15	18

GII/13 に属する株について検出が可能であることが明らかになった。同様に GI 群について検討した結果、GI/1, GI/4, GI/7, GI/8, GI/10, GI/11, GI/14 型に属する株の検出が確認できた。

検出感度についてカキ検体 (n=80) を対象とし Q-LAMP 法と定量 PCR 法と比較した結果を表 1 に示す。両方法の一致率は 75.0% でであった。

同じく流入下水検体 (n=63) を対象に Q-LAMP 法と定量 PCR 法の検出結果を比較した結果を表 2 に示した。両法の解離曲線解析では、間には 63.5% の一致率が確認された。特に下水検体では、qPCR で陰性にもかかわらず Q-LAMP で陽性であった検体が 15 検体確認された。

4 考察

Q-LAMP 法はウイルス RNA 抽出後約 2 時間以内で反応が終了し、1 検体を 1 チューブで検査した場合は、46 検体同時に検査が可能である。今回の結果より、Q-LAMP 法と定量 PCR 法と間に高い一致率が得られたことから、本研究で設計した QProbe を用いた LAMP 法は多検体のカキや下水を対象とした NoV 遺伝子の検出には有効であると推測された。

5 謝辞

QProbe の開発及び解析方法についてご教授頂いた日鉄住金環境 (株) の関係者に感謝いたします。本研究は宮城県農林水産部の生がきノロウイルス対策事業及び独立行政法人 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業の「迅速・高感度・網羅的な病原微生物検出による水監視システムの開発」によって行われた。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課, ノロウイルスの検出法について, 職安監発第 0514004 号, 2007.
- 2) Y. Ueki, D. Sano, T. Watanabe, K. Akiyama, and T. Omura. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Wat. Res.*, 39, 4271-4280, 2005.
- 3) Kageyama, T., S. Kojima, M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, N. Takeda, and K. Katayama. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1548-1557, 2003.