

# 磁気ビーズ法とカラム法を用いた ノロウイルス RNA 抽出効率の比較

## Comparison of the extraction efficiency of norovirus RNA using magnetic bead and column methods

坂上 亜希恵 神尾 彩楓 大槻 りつ子 佐々木 美江 植木 洋 畠山 敬  
Akie SAKAGAMI, Sayaka KAMIO, Ritsuko OTSUKI, Mie SASAKI,  
Yo UEKI, Takashi HATAKEYAMA

ノロウイルス陽性患者便，人為的にノロウイルス汚染したカキおよび流入下水を対象として，カラム精製キット（カラム法）と磁気ビーズ精製キット（磁気ビーズ法）によりウイルス RNA を抽出し，リアルタイム PCR 法でウイルス遺伝子を測定することでその効率を評価した。検体 1 ml あたりのノロウイルス遺伝子数は，糞便検体ではカラム法と磁気ビーズ法の間有意な差は確認されなかったが，カキ検体および下水検体では，磁気ビーズ法で有意に高かった（ $P<0.01$ ）。今回の結果より磁気ビーズ法は濁質や浮遊物が多い食品検体や環境検体からの核酸抽出に有効であると考えられた。

キーワード：ノロウイルス；RNA 抽出；磁気ビーズ

*Key words* : Norovirus ; RNA extraction ; magnetic bead

### 1 はじめに

ノロウイルス（Norovirus，以下「NoV」という。）はウイルス性胃腸炎や食中毒の主な原因として知られている。厚生労働省の 2018 年の食中毒統計によると，病因物質別による食中毒事件数において上位を占めており，患者数は食中毒患者総数の 49.0% に相当する 8,475 人で病因物質別患者数では最も多かった<sup>1)</sup>。

NoV の検査法は，厚生労働省から発出された通知法<sup>2)</sup>が地方衛生研究所等では広く用いられている。NoV の細胞培養法はいまだ実用化されていないことから，糞便や食品のウイルス検査は主に遺伝子検査で行われている。NoV は極めて少量で感染・発症することから，食品等に含まれる微量なウイルスを検出するため，検出感度や簡便性を高めた改良法の開発が求められている。そこで，本調査では通知法に例示されているカラム精製キットと ISO (International organization for Standardization) に示されている磁気ビーズ精製キット<sup>3)</sup>を用いて RNA 抽出を行い，リアルタイム PCR 法により RNA の抽出効率について検討を行ったので報告する。

### 2 材料および方法

#### 2.1 材料

糞便検体として，過去の検査において NoVGII 群遺伝子を検出した感染性胃腸炎患者由来便 20 検体，食品検体は，植木らの方法<sup>4)</sup>により NoVGII 群で人為的に汚染したカキ 10 検体，環境検体は，宮城県内の都市部に位置する下水処理場で採取した流入下水 30 検体を用いた。

#### 2.2 方法

##### 2.2.1 検体からのウイルス抽出・濃縮

患者便は通知法に準じて滅菌蒸留水で 10% 乳剤とし， $9,100\times g$  で 10 分間冷却遠心後，上清を RNA 抽出用試料とした。

カキは無菌的に中腸腺を取り出し，重量を計測後，予め直径 3.2 mm のステンレスビーズを 2 個入れたチューブに採取し，重量に関わりなく  $\alpha$ -Amylase 液（蒸留水で 6.3 mg/ml に調整）を添加し， $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間酵素処理を行い， $9,100\times g$  で 10 分間冷却遠心後，上清を RNA 抽出液とした。

流入下水は検体 25 ml を採取し，ポリエチレングリコールおよび NaCl を終濃度がそれぞれ 0.08 g/ml，0.021 g/ml となるように加え， $4^{\circ}\text{C}$  で 1 晩攪拌した後， $9,000\times g$  で 20 分間冷却遠心した。上清をアスピレーターで吸引除去し，沈渣の状況に応じて滅菌蒸留水を 1.0 ml から 1.5 ml 加えウイルス濃縮液とした（図 1）。

##### 2.2.2 ウイルス RNA の抽出とリアルタイム PCR

ウイルス抽出・濃縮液からの RNA 抽出には A 社のカラム精製キット（以下「カラム法」という。）と B 社の磁気ビーズ精製キット（以下「磁気ビーズ法」という。）の二つの方法を用いた。RNA 抽出は同一検体から得たウイルス抽出・濃縮液をそれぞれ専用の自動核酸抽出装置を用いて，キットと装置に添付されている説明書に従って行った。抽出した RNA は通知法に基づき DNase 処理後に逆転写反応を行い cDNA を作成した。リアルタイム PCR 法は NoVGI 群遺伝子の検出はプライマーに COG1F と COG1R，プローブに RING1-TP (a) と

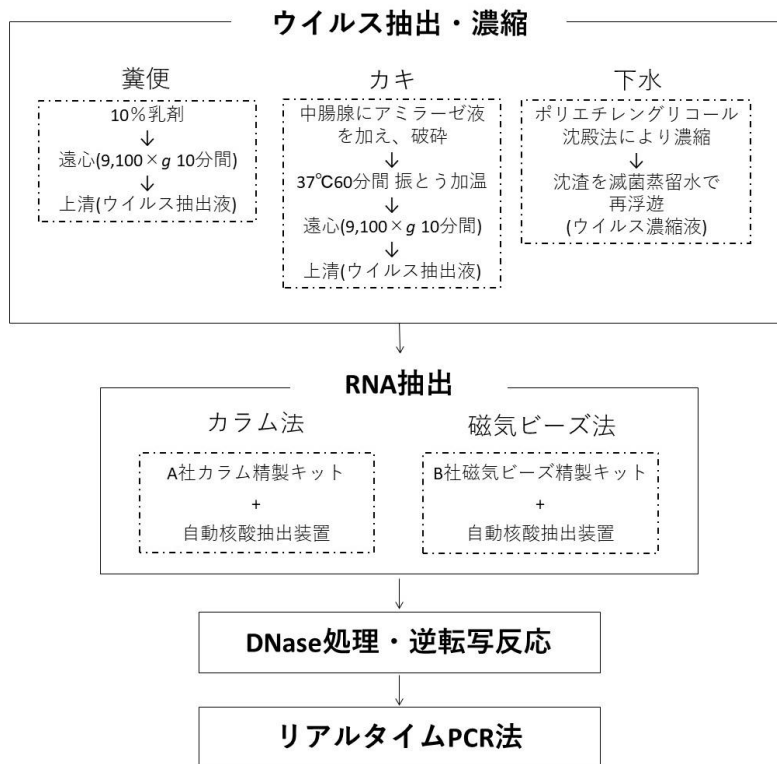


図1 ノロウイルス RNA 検査フロー

RING1-TP (b) を、同様に NoVGII 群遺伝子検出は COG2F, ALPF および COG2R をプライマーとし、プローブは RING2AL-TP を用いた。なお、GI 群遺伝子検出用プローブは 5'末端を VIC で 3'末端を TAMRA で標識し GII 群遺伝子検出用プローブは同じく FAM と TAMRA でそれぞれ 5'末端と 3'末端を標識した。リアルタイム PCR では一つの検体に由来する cDNA 5 µl を 2 ウェルずつに加え測定し、得られた実測値の平均値を用いて換算値 (コピー/ml) を算出した。リアルタイム PCR での検量線の作成は国立感染症研究所感染症疫学センターから分与された NoV 遺伝子の陽性コントロールを  $10^0$ - $10^7$  コピー/5 µl になるように階段希釈して用いた。

下水検体については NoVGI 群遺伝子と GII 群遺伝子それぞれの測定を行ったが、糞便検体とカキ検体については NoVGII 群遺伝子のみを測定した。なお、今回の検討では、測定値が 10 コピー以下であった場合も含め、リアルタイム PCR 測定で増幅曲線が一定の増幅産物が得られるまでのサイクル数 (Threshold cycle, 以下「Ct 値」という。) から得られた値を採用した。

RNA 抽出法の違いによる抽出効率の比較は、測定値からそれぞれの検体 1 ml に含まれるウイルス遺伝子数を求め、それぞれの方法で得られた換算値を Wilcoxon の符号付順位和検定により統計学的に解析して行った。

### 3 結果

各検体での NoV 遺伝子検出数を表 1 に示した。

陽性率は糞便検体ではカラム法で RNA 抽出した検体、カキ検体と下水検体では磁気ビーズ法で RNA 抽出した検体の方が高かった。糞便検体でカラム法で陽性、磁気ビーズ法で陰性であった検体は、リアルタイム PCR 法で NoV 遺伝子陽性と判定した際に確認された Ct 値は 42 であり、通常 Ct 値が 40 を越えた場合に検査の再現性が悪くなることを考慮すると、抽出効率よりもリアルタイム PCR 検査の検出感度が影響していると推測された。

表 1 各検体の NoV 遺伝子検出結果

		陽性数	陽性率 (%)
糞便 (n=20)	カラム法	19	95.0
	磁気ビーズ法	18	90.0
カキ (n=10)	カラム法	9	90.0
	磁気ビーズ法	10	100.0
下水 (n=60)	カラム法	54	90.0
	磁気ビーズ法	56	93.3

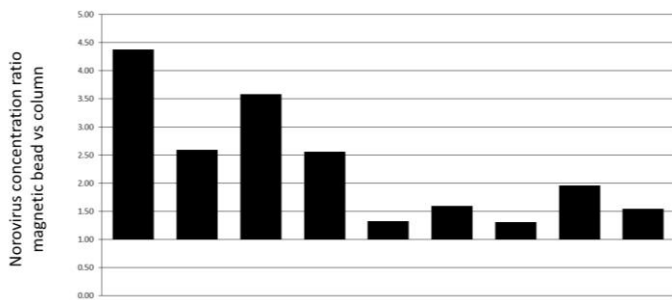


図2 カキ検体におけるカラム法に対する磁気ビーズ法の NoV 遺伝子濃度[log<sub>10</sub> copies/ml]の比 (n=9)  
 \* : 1 検体は磁気ビーズ法のみで検出

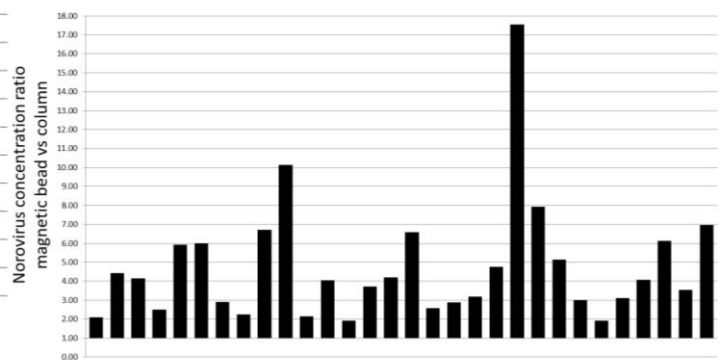


図3 下水検体におけるカラム法に対する磁気ビーズ法の NoV 遺伝子濃度[log<sub>10</sub> copies/ml]の比 (n=30)

換算値を統計学的に解析した結果では、糞便検体では 20 検体中 14 検体でカラム法に対する磁気ビーズ法の換算値比が 1.0 より大きく、カラム法の方が抽出効率が高い傾向を示したが、統計学的な有意差は認められなかった。

一方、カキ検体および下水検体では、磁気ビーズ法の換算値がカラム法に比べ有意に高く ( $P < 0.01$ )、カラム法に対する磁気ビーズ法の換算値比は全ての検体で 1.0 より大きく、磁気ビーズ法の有効性を示す結果となった。(図 2, 図 3)。

#### 4 考察

糞便検体、食品検体および環境検体を対象にカラム法と磁気ビーズ法で同一検体から得たウイルス抽出・濃縮液から抽出した RNA を用いて、NoV 遺伝子をリアルタイム PCR 法で測定し、RNA 抽出法による NoV 遺伝子数を比較した。カキ検体および下水検体では、磁気ビーズ法で抽出した RNA における NoV 遺伝子数がカラム法に比べて有意に高かった一方、糞便検体では抽出法の違いによる NoV 遺伝子数の差は統計学的には確認されなかったが、磁気ビーズ法で抽出したウイルス遺伝子の換算値が高い傾向が認められた。

今回の検討において、カキ検体と下水検体ではカラム法による RNA 抽出後にカラムのメンブレンフィルターに着色が確認された検体があったことから、溶液中に含まれる濁質等の付着が目詰まりの原因となり、核酸抽出に影響を及ぼしている可能性が考えられた。この点において、磁気ビーズ法は検体溶液中に懸濁させた磁気ビーズ表面に核酸を結合させる構造上、目詰まりを起こすことがなく、溶液の性質を受けにくいと推測される。以上から、磁気ビーズ法は濁質や浮遊物が多い食品検体や環境検体からの核酸抽出に有効であると考えられた。

検体中の NoV 遺伝子をより正確に把握する上で、核酸抽出は重要な役割を占めることから、検体の特性に合わせた抽出法の選択がより効果的な核酸抽出につながると考えられた。

#### 謝辞

本調査を実施するにあたり御協力いただいたサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社に感謝申し上げます。

#### 参考文献

- 厚生労働省: “4. 食中毒統計資料 (2) 過去の食中毒発生状況”, [https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html), (2019年8月確認) .
- 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長: “ノロウイルスの検出法について”, 平成 15 年 11 月 5 日, 食安監 1105001 号 (2003) .
- International Organization for Standardization (ISO): Microbiology of the food chain—horizontal method for determination of hepatitis a virus and norovirus using real-time rt-pcr—part 1: method for quantification, ISO 15216-1:2017. ISO, Geneva, Switzerland (2017) .
- Y. Ueki, M. Shoji, A. Suto, T. Tanabe, Y. Okimura, Y. Kikuchi, N. Saito, D. Sano, T. Omura: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 5698 (2007)