

(別添)

ノロウイルスの検出法

目次

I	ノロウイルスの RT-PCR 法	1
	1. 必要な器具と試薬	
	2. 操作上の注意	
	3. 食品の処理	
	4. ふん便材料の処理	
	5. QIAamp Viral RNA Mini キットによる RNA の抽出	
	6. DNase 処理	
	7. RT 反応	
	8. 1st PCR	
	9. Nested PCR 法	
	10. PCR 結果の判定	
II	ハイブリダイゼーション	11
	A. マイクロプレートハイブリダイゼーション法	
	1. 必要な器具と試薬	
	2. ゲルからの DNA 抽出法 (MinElute Gel Extraction Kit による PCR 産物の精製)	
	3. ハイブリダイゼーション	
	B. ドットハイブリダイゼーションによるノロウイルス遺伝子確認検査	
	1. 必要な器具と試薬	
	2. 操作法	
	3. 判定	
III	リアルタイム PCR 法によるノロウイルスの定量的検出法	19
	1. 必要な器具と試薬	
	2. 反応プレートの準備	
IV	文献	25

I ノロウイルスのRT-PCR法

1. 必要な器具と試薬

1) 器具

サーマルサイクラー、超遠心器、冷却遠心器(5,000rpm)、マイクロ冷却遠心器(15,000rpm)、ホモジナイザーあるいはストマッカー、Vortex、電気泳動装置、UV照射写真撮影装置、ヘラ、ハサミ、メス、ピンセット、濾紙、マイクロピペット(2、20、200、1000 μ l)、チューブ(0.2ml、0.5ml、1.5ml)、遠心管(15ml、50ml)、1ml注射器、18G注射針

2) 試薬

ショ糖、ポリエチレングリコール 6,000、塩化ナトリウム(NaCl)、塩化カリウム(KCl)、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、エタノール、Distilled water (Deionized, Sterile, autoclaved, DNase free、RNase free) (和光純薬工業 Cat No. 318-90105, (以下「Distilled water」という。))、ノロウイルス検出用プライマー(以下、「NVプライマー」という。詳細については後述。)、エコーウイルス9型 Hill 株プライマー(詳細については後述。)、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA \cdot 2Na)、電気泳動用アガロース ME(岩井科学、250g 入り Cat.No.50013R)、エチジウムブロマイド

Random primer hexamer : Amersham Pharmacia、Cat.No. 27-2166-01

Super Script II RNase H⁻ Reverse Transcriptase : Invitrogen, Cat.No. 18064-014

100mM DTT : Super Script IIに添付

QIA Viral RNA Mini Kit : QIAGEN、Cat.No. 52904

DNase I : TaKaRa、Code No. 2215A

Ribonuclease Inhibitor : TaKaRa、Code No. 2310A

Takara EX Taq : TaKaRa、Code No. RR001A

50倍濃度 TAE buffer : Tris 242g、氷酢酸 57.1ml、0.5M EDTA (pH8.0)100mlを蒸留水で1,000mlとする。

2. 操作上の注意

1) 患者のふん便を取り扱う時には安全キャビネット内で行い、感染防止に最大の

注意を払うこと。

- 2) PCR を行う際には手袋をし、チューブの蓋を開ける時にはその前に軽く遠心した後、オープナーを用いること。
- 3) RT-PCR 反応液の調製をする部屋と PCR 産物の電気泳動の部屋を分けることとし、それができない時には、それぞれの操作を別のクリーンベンチ内で行うこと。その際クリーンベンチのファンを止めること。コンタミ防止と RNase の混入防止に細心の注意を払うこと。

3. 食品の処理

1) 貝の中腸腺を用いる方法（超遠心法）

本項ではノロウイルスによる食中毒の原因食品として最も重要視されている貝類の処理方法について記す。他の食品においても基本的にはこの方法に準じて行える。超遠心器のローターとの関係もあるが、貝の中腸腺が1gあるいはそれ以上の時は1個または2個を1検体とし、貝1ロットにつき3検体から10検体（中腸腺として合計12gから24g程度を目途とする。）の検査を行う。シジミ、アサリ等のように中腸腺が1g以下の貝では中腸腺1gから1.5gを1検体として、3検体から5検体の検査を行う。

- (1) 殻付き貝類はヘラ、メス等で貝柱を切り、殻を開く。
- (2) 貝の外套膜を取り、次いで中腸腺の周りに付いている脂質部分をメス、ハサミ等で可能な限り取り除き、中腸腺を取り出す。中腸腺を摘出する際にはできる限り周りの白い組織(脂肪)を取り除くこと。特にリアルタイムPCRを行うときには完全に取り除くこと。
- (3) ホモジナイザーまたはストマッカー用のサンプリングバッグに中腸腺をいれ、次いで7~10倍量のPBS(-)を加え粉碎する。貝類の乳剤は15%以上の濃度にしなないこと。15%以上にするとRNAの回収率が悪くなる。
- (4) 粉碎した試料を遠心管に移す。
↓10,000rpm. 20分間冷却遠心し、上清を新しい試験管に採る。
- (5) 超遠心用遠心管に30%ショ糖溶液を遠心管量の10%程度入れ、それに(4)の遠心上清を静かに重層させる（ショ糖溶液層を壊さないように初めは特に注意して少量ずつ入れる）。

↓35,000rpm. 180分間あるいは40,000rpm. 120分間冷却遠心する。

- (6) アスピレーター、注射器等で液層を吸引し、沈渣のみとする。
- (7) 遠心管の管壁をPBS(-)で軽く1回洗い、管壁の周りの水分を滅菌した濾紙で吸い取る。
- (8) 沈渣に200 μ lのDDW（超純水を高圧滅菌後、0.22 μ mフィルターで濾過したものを。）を加え、浮遊させる。これをウイルスRNAの抽出に用いる。
（浮遊液に不純物が多いときには10,000rpm. 20分間の遠心を行い、その上清をRNA抽出に用いる。）

（注）超遠心器を使えない時には以下の操作を行う。

ポリエチレングリコールによる濃縮方法

- (1) 前項1) (4)の遠心上清にポリエチレングリコール 6,000を8%、NaClを2.1g/100mlになるように加え、軽く攪拌し、4°Cの冷蔵庫に一晩置く、または室温で2時間攪拌する。

↓5,000～12,000rpm. 20分間、冷却遠心する。

- (2) 上清をアスピレーター、注射器等で吸引し、沈渣のみとし、管壁の周りの水分を滅菌した濾紙で吸い取る。さらにPBS(-)で管壁を軽く2回洗い、その後濾紙で水分を完全に取る。
- (3) 沈渣を200 μ lのDDWに浮遊させる。これをウイルスRNAの抽出に用いる。浮遊液に不純物が多い場合には10,000rpm. 20分間の冷却遠心を行い、その上清をRNA抽出に用いる。

2) 貝の中腸腺の内容液を用いる方法

大型の貝(平貝、ウチムラサキ貝等)からウイルスを検出する場合は、中腸腺の内容液を用いることができる。カキ、アサリ、シジミ等の小型の貝類ではウイルス回収率が必ずしもよくないので、本法は適さない。

- (1) 前項 1)(2)において、中腸腺を内容液が漏れないように取り出し、大きめの遠心管に入れ、ガラス棒等で中腸腺を潰した後、一度凍結融解する（-40°C以下で凍結させ、融解するときには50°C程度のお湯ですばやく融解する）。
- (2) 10,000rpm で20分間冷却遠心し、上層の液層を新しいチューブに採る。

- (3) 得られた液を RNA 抽出に用いる。ただし、QIAamp Viral RNA Mini キットによる RNA の抽出では 560 μ l までしかサンプルを添加できないので、それ以上の量の時には 2 つに分けて行うか、PBS (-) で 6 倍希釈した後、前項のポリエチレングリコールあるいは超遠心器による濃縮を行い、200 μ l の Distilled water に再浮遊させ、それを RNA 抽出に用いる。

4. ふん便材料の処理

- 1) ふん便の10%乳剤（PBS (-)）を作製する。
- 2) 10%乳剤を激しく攪拌した後、10,000から12,000rpmで、20分間冷却遠心する。
- 3) 遠心上清の138 μ lをサンプルとして、次項5.の方法でRNAの抽出を行う。

5. QIAamp Viral RNA Mini キットによるRNAの抽出

RNA の抽出には多くの方法があり、また抽出キットも多数市販されている。それぞれが良いと判断した方法を用いて良い。ここでは QIAamp Viral RNA Mini キットを用いる方法を紹介する。

QIAamp Viral RNA Mini キットは Carrier RNA が含まれており、RNA 抽出効率が高いが、前項 4. のようなサンプルの調製が必要となる。またこのキットには DNase 処理が含まれていないので、各自が行わなければならない。

1) 使用前に行う試薬の調整

サンプルを室温（15～20℃）に戻す。

Buffer AW1 (Kit Cat.No.51104) に 96～100%エタノールを 25ml 加える。Buffer AW2 (Kit Cat.No.51104) に 96～100%エタノールを 30ml 加える。

Carrier RNA（凍結乾燥品）のチューブに Buffer AVL 1ml 添加し Carrier RNA を完全に溶解させ、Buffer AVL に全量を添加する。添加した Buffer AVL/Carrier RNA は室温で 2 週間、2～8℃で 6 ヶ月間安定である。Buffer AVL/Carrier RNA 中に沈殿物がある場合には、加熱(80℃)により溶解する。ただし、加熱は 5 分間以内とし、6 回以上の加熱は行わないこと。Buffer AVL/Carrier RNA は使用前に室温に戻す。

2) 操作法

以下の操作は室温で行う。

- (1) 1.5ml チューブに Buffer AVL/Carrier RNA 560 μ l を入れる。
- (2) 10%ふん便乳剤遠心上清(10,000rpm, 10 分間)を 138 μ l (増量することも可能である。詳細はキットの添付マニュアルを参照) とエコーウイルス 9 型 Hill 株を 2 μ l (10,000 個程度の粒子数) 入れ、サンプルと Buffer を充分混合するため 15 秒間 Vortex にかかけ、室温 (15~25°C) に 10 分間置く。チューブをスピンドウンする。

エタノール (96~100%) 560 μ l をチューブに加え、15 秒間 Vortex をかけた後、チューブをスピンドウンする。液が混濁した時には 9,000 \times g (10,000rpm) で 5 分間遠心する (リアルタイム PCR を行うときにはこの遠心を行ったほうが良い)。

- (3) (2)の液 630 μ l を QIAamp スピнкаラム(2ml コレクションチューブ)に注入し、蓋を閉め、6,000 \times g (8,100 rpm) で 1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のチューブに移し、残りの(2)の液 630 μ l を入れ、同様に遠心し、全ての液が無くなるまで行う (サンプル量が 138 μ l のときには、この操作が 2 回で終わる)。
- (4) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW1 500 μ l を入れる。
- (5) 蓋を閉め、6,000 \times g (8,100 rpm) で 1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。
- (6) QIAamp スピнкаラムに Buffer AW2 500 μ l を加え、20,000 \times g (14,000 rpm) で 3 分間遠心する。Buffer AW2 とろ液等が接触した時には (7) を行う (このような事は通常起きない)。
- (7) QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。フルスピードで 1 分間遠心する。
- (8) QIAamp スピнкаラムを新しい蓋つき 1.5ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。QIAamp スピнкаラムの蓋を開け、室温に戻した Buffer AVE 60 μ l を加え、蓋を閉めて 1 分間置いた後、6,000 \times g (8,100 rpm) で 1 分間遠心する。
- (10) このろ液が抽出 RNA であり、抽出 RNA は -80°Cでの保存が望ましいが、-20°C以下で 1 年間は安定である。

6. DNase 処理

食品、人のふん便中には様々な DNA が含まれており、しばしば PCR で非特異バンドが出現するので、それらを抑制するため、DNase 処理を行う。またそうすることで、この時点までに DNA の混入が起きた時でも、それらを消化することができる。したがって、キットに DNase 処理が含まれていない時にはこの操作を行うことが望ましい。注意として DNase I を使用するマイクロピペットは専用のもを用い、可能であればオートクレイブができるものが良い。検査終了後、使用した DNase の含まれている液、チューブは高圧滅菌にかける。

- 1) 表 1. に示したように DNase 処理混合液の調製を行う。

表 1. DNase 処理混合液

試 薬	15 μ l 系	30 μ l 系
抽出 RNA	12.0 μ l	24.0 μ l
5 \times First-Strand Buffer ^{注 1)}	1.5 μ l	3.0 μ l
Distilled water	0.5 μ l	1.0 μ l
DNase I (1U/ μ l)	1.0 μ l	2.0 μ l

注 1) : 使用する Reverse Transcriptase の buffer を用いる。

- 2) 混合液調製後、37°C に 30 分間置く。
- 3) 次いで 75°C に 5 分間置く。
- 4) 直ちに on ice (または 4°C) する。これが DNase 処理済み抽出 RNA である。

7. RT 反応 (Super Script II RT (Invitrogen) を用いる時)

- 1) 表 2. の RT 反応調整液を作製する。

表 2. RT 反応液調製液 (Super Script II RT を用いる時)

	15 μ l 系	20 μ l 系	30 μ l 系	50 μ l 系
DNase 処理 RNA	7.5 μ l	10.0 μ l	15.0 μ l	30.0 μ l
5X SSII Buffer	2.25 μ l	3.0 μ l	4.5 μ l	7.0 μ l
10mM dNTPs	0.75 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
Random Primer(1.0 μ g/ μ l) ^{注 2)}	0.375 μ l	0.5 μ l	0.75 μ l	1.25 μ l
Ribonuclease Inhibitor (33unit/ μ l)	0.5 μ l	0.67 μ l	1.0 μ l	1.67 μ l
100mM DTT	0.75 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
Super Script II RT (200u/ μ l)	0.75 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
Distilled water	2.125 μ l	2.83 μ l	4.25 μ l	2.58 μ l

注 2) : Random Primer の代わりに NV プライマー、ポリオ 2 プライマーを用いても良い。

- 2) 反応は 42°C で 30 分から 2 時間行う (通常 1 時間)。
- 3) 次に 99°C で 5 分間加熱し、on ice (または 4°C) する。

8. 1st PCR

- 1) 1st PCR は、ノロウイルスについては表 3. の (G1 と G2 を別々に作製する)、エコーウイルス 9 型 Hill 株については表 4. の混合液を作製する。

表 3. ノロウイルス

1. Distilled water	33.75 μ l
2. 10 \times Ex Taq TM buffer	5.0 μ l
3. dNTP(2.5mM)	4.0 μ l
4. NV プライマー-F(25 μ M) ^{注 3)}	1.0 μ l
5. NV プライマー-R(25 μ M)	1.0 μ l
6. cDNA(Template)	5.0 μ l
7. EX Taq(5unit/ μ l)	0.25 μ l
Total	50.0 μ l

表 4. エコーウイルス 9 型 Hill 株

1. Distilled water	33.75 μ l
2. 10 \times Ex Taq TM buffer	5.0 μ l
3. dNTP(2.5mM)	4.0 μ l
4. E9Hill-F プライマー-(25 μ M) ^{注 4)}	1.0 μ l
5. E9Hill-R プライマー-(25 μ M)	1.0 μ l
6. cDNA(Template)	5.0 μ l
7. EX Taq(5unit/ μ l)	0.25 μ l
Total	50.0 μ l

注 3) : プライマーの塩基配列は表 11.、図 3. を参照。

1st PCR に用いるプライマーは、食品のときには、G1 では COG1F/G1-SKR、G2 では COG2F/G2-SKR および ALPF/G2AL-SKR(アルファトロン型を検出するプライマー、この2組のプライマーは混合して用いても良い)を、ふん便材料の時には G1 では G1-SKF/G1-SKR、COG1F/ COG1R を、G2 では G2-SKF/G2-SKR、G2-SKF/G2AL-SKR、COG2F/COG2R、ALPF/COG2R を用いることが望ましい。

ただし、このほかのプライマーを用いてもよい。ポリメラーゼ領域のプライマーは表 11.、図 2.を参照。

注4) : エコーウイルス 9 型 Hill 株プライマー^{文献1)}

E9Hill-F 5'-GTT AAC TCC ACC CTA CAG AT-3' ポジション 5192-5211
E9Hill-R 5'-TGA ACT CAC CAT ACT CAG TC-3' ポジション5459-5440

PCR 産物は 268bp である。

2) PCR 反応

増幅は 94°C, 3 分を 1 サイクル、94°C, 1 分、50°C, 1 分、72°C, 2 分を 40 サイクル、72°C, 15 分を 1 サイクルで行う。増幅条件はプライマー、サーマルサイクラーによって若干異なることもあるので、それぞれ最適な条件で行うと良い。

3) 電気泳動

PCR 産物 8 μ l と 5 \times Loading buffer 2 μ l を混合し、1.5%アガロースゲルを用いて泳動する。泳動 buffer は TAE を使用する。

4) アガロースゲル染色

泳動後ゲルをエチジウムブロマイド染色液 (TAE 溶液 100ml にエチジウムブロマイド 10mg/ml のものを 10 μ l 加えた溶液)に 20 分間入れておく。この時に緩やかに揺ると良い。

5) 写真撮影、バンドの確認

染色したゲルは UV 照射で写真撮影し、バンドの確認を行う。食品では 1st PCR でバンドが見られなかった時には(多くの例では見られない)、次に Nested PCR

を行う。

9. Nested PCR法

食品をサンプルとする時にはウイルス量が少ないので、1st PCRで陰性の時にはNested PCRを行う。ただし、Nested PCRを行う時にはコンタミの危険性が高いので細心の注意のもとに実施する。

なお、Nested PCRの陽性コントロールとして、プラスミドに組み込んだノロウイルス(NV)陽性コントロールを用いる。【RNA抽出時のエコーウイルス9型Hill型およびPCR用ノロウイルス陽性コントロールG1,G2の分与を希望する機関は、国立感染症研究所感染症情報センター第六室長あて依頼すること。】

1) Nested PCRの調製

表5.の混合液を作製する。

表5. Nested PCRの混合液

1. Distilled water	36.75 μ l
2. 10 \times Ex Taq TM buffer	5.0 μ l
3. dNTP(2.5mM)	4.0 μ l
4. NVプライマー-F (25 μ M) 注5)	1.0 μ l
5. NVプライマー-R (25 μ M)	1.0 μ l
6. 1st PCR産物	2.0 μ l
7. EX Taq	0.25 μ l
Total	50.0 μ l

注5)：ノロウイルスのプライマーは1st PCRに用いたものの内側に設定されたプライマーあるいはセミNested PCRで行う。

Nested PCRに用いるプライマーは、G1の1st PCRでCOG1F/G1-SKRを用いたときにはG1-SKF/G1-SKRおよびCOG1F/COG1Rを、G2の1st PCRでCOG2F/G2-SKRを用いたときにはG2-SKF/G2-SKRおよびCOG2F/COG2Rを、ALPF/G2AL-SKRを用いたときにはG2-SKF/G2AL-SKRおよびALPF/COG2Rを用いるのが望ましい。他のプライマーを用いたときにはそれに対応するプラ

イマーを用いること。

2) PCR反応、電気泳動

増幅は1st PCRと同様の条件で行うが、サイクル数は35とする。

Nested PCR産物の電気泳動、UV照射で写真撮影、バンドの確認は1st PCRと同様に行う。(前項8.2)～5)を参照)

10. PCR結果の判定

- 1) RNA抽出のコントロールとして入れたエコーウイルス9型Hill株(粒子数約10,000個)のPCRで目的とするバンドが認められること。(=RNAの抽出に問題はない。)
- 2) 検査材料の代わりにDDWを入れた陰性コントロールでバンドが見られない。(=遺伝子の混入がない。)
- 3) 陽性コントロール(1st PCRではエコーウイルス9型Hill株、Nested PCRではNV陽性コントロール)で目的とするバンドが見られる。(=PCRがうまく行われた。)
- 4) PCRでの増幅産物は目的とする大きさであること。(=標的の部分が増幅されている。)

以上の条件が満たされたときにPCRの判定を行う。なお、上記条件が満たされないときには再試験を行う。

PCR陽性と判定されたときには、確認試験としてハイブリダイゼーションあるいは遺伝子配列を調べる。ハイブリダイゼーションで陽性、あるいは遺伝子配列で既知のノロウイルスと類似の配列が認められた時に陽性とする。

II ハイブリダイゼーション

A. マイクロプレートハイブリダイゼーション法

ここではPCR産物の確認試験としてのマイクロプレートハイブリダイゼーション法について記す。この方法はマイクロプレート上でハイブリダイゼーションを行うもので、洗いが簡単であり、反応は酵素抗体法と同一である^{文献2)}。42°Cでハイブリダイゼーションを行うと、80%以上の相同性のときに陽性となる。ハイブリダイゼーションの温度を上げるとさらにその感度は高まる^{文献3)}。

1. 必要な器具と試薬

1) 器具

恒温器、ヒートブロック、電気泳動装置、UV照射写真撮影装置、マイクロプレートリーダー、UV 防御メガネ、サーマルサイクラー、マイクロ冷却遠心器(15,000rpm)、ウォーターバス、メス、フナゲルチップ（フナコシ、CaT.No.DR-50）、マイクロピペット（2、20、200、1000 μ l）、マイクロプレート（NUNC-IMMUNO PLATE Cat.No.442404）

2) 試薬

MinElute Gel Extraction Kit(QIAGEN、Cat.No.28604)、ホルムアミド、Tween20、サケ精子 DNA、マイクロプレートシール、ペーパータオル、ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ（BIOSOURCE、Cat.No. SNN1004）、リン酸水素二ナトリウム、クエン酸、30%過酸化水素、硫酸、T3,3,5,5'-Tetramethylbenzidine(TMB)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ウシ血清アルブミン(BSA)(SIGMA、Cat.No. A-2153)、3M酢酸ナトリウム(pH5.0)、100%イソプロパノール、PBS-T(PBS(-)+0.05%Tween20)

2. ゲルからのDNA抽出法（MinElute Gel Extraction KitによるPCR産物の精製）

ゲルからのDNAの抽出には多くの方法があり、また抽出キットも多数市販されている。それぞれが良いと判断した方法を用いて良い。ここでは、MinElute Gel Extraction Kitを用い、マイクロ遠心機を利用する方法を示す。

このプロトコールは、TAE buffer または TBE buffer の標準的なアガロースゲル、

あるいは低温融解アガロースゲルから、70bp から 4kb の DNA フラグメントを高い最終濃度で抽出、精製することができる。1 個のスピンカラムにつき、最大 400mg のアガロース処理が可能である。Buffer QG は pH7.5 以下の時、黄色になる。すべての遠心操作は、一般的な卓上遠心機で $\geq 10,000 \times g$ ($\sim 13,000\text{rpm}$) で行う。

1) 使用前に行う試薬の調整

- (1) 使用前に Buffer PE にエタノール (96~100%) を添加する (添加容量は試薬ボトルのラベルを参照)。
- (2) 3M の酢酸ナトリウム溶液 (pH5.0) が必要な場合がある。

2) 操作法

- (1) 清潔で刃の鋭いメスあるいはフナコシのフナゲルチップでアガロースゲルから DNA フラグメントの部分を切り取る。余分なゲルを取り除いて、ゲルスライスサイズを最小とする。
- (2) 1.5ml のチューブにゲルスライスを入れ、重さを測る。サンプルゲル (100mg = 100 μl とする) に対して 3 倍容量の Buffer QG を添加する。
- (3) 50°C で 10 分間 (ゲルが完全に溶解するまで) インキュベートする。ゲルの溶解を助けるため、インキュベーション中、2~3 分に 1 度チューブを Vortex にかけて溶液を混合する。2% 以上のゲルを用いる場合は、インキュベーション時間を長くする。
- (4) ゲルスライスが完全に溶解後、溶液の色が黄色であることを確認する (アガロース溶解前の Buffer QG の色とほぼ同じ)。なお、溶液の色がオレンジ色あるいは紫色の場合は、3M 酢酸ナトリウム (pH5.0) を 10 μl ずつ添加混合し、溶液の色が黄色になるようにする。(DNA のメンブレンへの吸着は、pH7.5 以下においてのみ効率的に行われるので、pH 指示薬により pH7.5 以下で黄色、それより高い pH ではオレンジまたは紫色を呈する Buffer QG は、DNA 結合に最適な pH を決定するのに大変便利である。)
- (5) ゲルと同容量のイソプロパノールをサンプル溶液に添加し、例えば、100mg のアガロースゲルスライスには、100 μl のイソプロパノールを添加する。チューブを 10 回上下混合する。

- (6) ラックにセットした 2ml コレクションチューブに MinElute カラムを乗せる。
- (7) サンプルを MinElute カラムに添加し、DNA をカラムに結合して、1 分間遠心する。最大の回収率を得るために、サンプル液は残さず全てカラムに添加する。カラムへ 1 度に添加可能な最大容量は 800 μ l である。800 μ l よりサンプル量が多い場合には、数回に分けて添加、遠心操作を行う。
- (8) フロースルー液は捨て、MinElute カラムを同じコレクションチューブに再度の乗せる。
- (9) 500 μ l の Buffer QG をスピンカラムに添加し、1 分間遠心する。
- (10) フロースルー液は捨て、Min Elute カラムを同じコレクションチューブに再度乗せる。
- (11) 洗浄のため、750 μ l の Buffer PE を MinElute カラムに添加し、1 分間遠心する。
- (12) フロースルー液を捨てた後、MinElute カラムをさらに 1 分間 $\geq 10,000 \times g$ (~ 13,000rpm) で遠心する。
- (13) 新しい 1.5ml のマイクロ遠心チューブに MinElute カラムを乗せる。
- (14) DNA の溶出を行うために、10 μ l の Buffer EB (10mM Tris-Cl、pH8.5) あるいは DDW をメンブレン表面の中央に添加し、1 分間カラムを放置後、1 分間遠心する。
遠心によって得られた溶液が、抽出 DNA である。

3. ハイブリダイゼーション

- 1) 抽出 DNA を 0.5ml のチューブに取り、1.5M NaCl buffer^{注6)} で、電気泳動時のバンドの濃さに応じ適宜希釈する (DNA 量は 200ng/ml 程度の濃度とする)。なお通常の PCR でバンドがしっかりとみられた増幅 DNA (PCR 産物 8 μ l を泳動) は 5 倍から 20 倍希釈して用いる。

↓ 98°C、5 分間加熱処理、直ちに on ice する。

- 2) マイクロトレイに固定化液^{注7)} を 90 μ l 入れ、それに加熱処理した DNA を 10 μ l ずつ 1 検体当たり 3 ウェルに入れる (プローブが 2 種類の時、通常プローブの数 + 1)。

注6) : 3 倍濃度 1.5M NaCl buffer: 4.5M NaCl、30mM リン酸二ナトリウム、30mM EDTA、pH7.0 (使用時には最終濃度 1.5M NaCl buffer として用いる。)

注7) : 固定化液 : 3 倍濃度 1.5M NaCl buffer 3.0ml、DDW 6.0ml

図 1. トレイのレイアウト

試 薬	1 2 3 4 5 6 7						
		N C	G 1	G 2	検 体	検 体	検 体
Control RING1-Tp(a),(b) プローブ RING2-Plate プローブ	A	○	○	○	○	○	○
	B	○	○	○	○	○	○
	C	○	○	○	○	○	○
	D	○	○	○	○	○	○

↓ プレートにシールし、37 °C恒温槽に重しをして沈めて 2 時間以上置く。

- 3) PBS-T でプレートを 3 回洗浄する。
- 4) 表 6. に示したようにプローブの調製を行い、98 °C、5 分間加熱処理、直ちに on ice する。

表 6. プローブの調製 (1 検体当たり)

	プローブ コントロール	RING1-Tp(a),(b) ビオチン標識プローブ	RING2-Plate ビオチン標識プローブ
100pmol/μl プローブ (プローブ コントロールは TE)	TE 1 μl	RING1-Tp(a) プローブ RING1-Tp(b) プローブ 各 0.5 μl	RING2-Plate プローブ 1 μl
100 μg/ml サケ精子 DNA 注 8)	5 μl	5 μl	5 μl
3 倍濃度 1.5M NaCl buffer	3.3 μl	3.3 μl	3.3 μl
DDW	0.7 μl	0.7 μl	0.7 μl

注 8) : サケ DNA は DNA 量 10mg/ml のものを T₁₀E₁ 緩衝液で 100 μg/ml に希釈したものである。

- 5) 表 7. に示したようにハイブリダイゼーション液を調整し、4)のプローブ・サケ精子 DNA 混合液に合わせる。

表 7.ハイブリダイゼーション液(1 検体当たり)^{注9)}

3 倍濃度 1.5M NaCl buffer	30 μ l
ホルムアミド	50 μ l
10% Tween20	1 μ l
DDW	9 μ l

注9) : ハイブリダイゼーション液は使用前に冷やしておく。

- 6) 5)の混合液を各ウェルに 100 μ l ずつ入れる。
 ↓ プレートにシールをし、45 °C恒温槽に重しをして沈め、6 時間以上あるいは 1 夜置く。
- 7) シールのプレート側を内側にして巻き込むように剥がす(プレート内の DNA を撒き散らさないように包み込む)。45 °Cに温めておいた PBS-T で 3 回洗浄する。プレート洗浄時にはプレートをペーパータオル等で包み、その後叩き水分を完全に除くと同時に DNA を周りに撒き散らさないように細心の注意を払う。使用したペーパータオル、洗浄液等は 1000ppm の次亜塩素酸ソーダに漬ける。
 ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ (1%BSA+PBS-T で適宜希釈したものを全てのウェルに 100 μ l 入れる。ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ入れた容器は使用後廃棄するか高圧滅菌し、酵素を不活化する。
 ↓ 室温 1 時間置く (軽く振とうするとよい)。
- 8) プレートを PBS-T で 5 回洗浄する。
- 9) 全てのウェルに発色液^{注10)}を 100 μ l 入れる。
 注10) : TMB 1mg、 DMSO 1ml、 phosphate-citrate buffer 9ml (0.2M リン酸水素ナトリウム 25.7ml、 0.1M クエン酸 24.3ml、 DDW 50ml、 pH5.0)を作製し、30%過酸化水素水 2 μ l を使用直前に入れる。
 ↓ 室温 15 分間 (プレートは遮光しておく)。
- 10) 停止液 (4N 硫酸)を 50 μ l 入れる。
- 11) 450nm で吸光度を測定する。
- 12) 判定: コントロールに比べ OD 値が 2 倍以上、かつ 0.2 以上の差が認められた時に陽性とする。

B. ドットハイブリダイゼーションによるノロウイルス遺伝子確認検査

この方法はメンブレンに DNA を吸着させて行う方法である。他のウイルスでは一般的にこの方法が用いられている。

1. 必要な器具と試薬

1) 器具

恒温水槽、ハイブリダイゼーションインキュベーター、トランスイルミネーター、ヒートシーラー、ポジティブチャージナイロンメンブレン：Nylon membranes, positively charged ベーリングー Cat.No.1209272、ハイブリダイゼーションバッグ：ニッポンジーン, Cat.No.533-19171、タッパー：井内 Code.No. 45-068-022)

2) 試薬

塩化ナトリウム(NaCl)、濃塩酸、DDW、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、マレイン酸、塩化マグネシウム(MgCl₂)

20×SSC: NaCl 100g を 900ml の DDW に溶解(68°C)し、濃塩酸で pH7.2 に調整後、DDW で、1000ml とする。

10% SDS : SDS 100g を 900ml の DDW に溶解 (68°C)し、濃塩酸で pH7.2 に調整後、蒸留水を加え全量を 1000ml とする。

N-Lauroylsarcosine : SIGMA, Cat.No. L-5777

ホルムアミド : Wako, Cat.No. 068-00426

Blocking reagent : ベーリングー Cat.No. 1096176

NBT/BCIP : ベーリングー Cat.No. 1681451

Buffer 1 : 0.1M マレイン酸 ; 0.15M NaCl (pH7.5, 20°C)pH の調整は pH6.5 くらいまで固形 NaOH (8.5g)で、それ以降は 1N NaOH を加えて調整する。

洗浄 Buffer : Buffer 1 に 0.3%となるように Tween 20 を加える。

ブロッキング溶液 : Buffer 1 で Blocking reagent を 1%とする。

検出溶液 : 100mM Tris-HCl ; 100mM NaCl (pH9.5, 20°C)10ml に 2.5M MgCl₂ を 200 μl 加える (最終濃度 50mM MgCl₂)

Streptavidin Alkaline Phosphatase : Promega, Cat.No. V5591

ビオチン標識プローブ : プローブにビオチンを標識したもの。

2. 操作法

- 1) アガロースゲル電気泳動で NV 陽性バンドが認められた部分から DNA を抽出後、100°C で 5 分間熱変成し、1 μ l をナイロンメンブレンにスポットし風乾する（上記ゲルから DNA 抽出を参照）。
- 2) トランスイルミネータ上でスポットした面を下にして 3 分間 UV 照射する。それをハイブリダイゼーションする。
- 3) 溶液量は、約 20cm² のメンブレンで計算してあるので、メンブレンの面積によって以後適宜調整する。
- 4) ハイブリダイゼーション液（表 8.）5ml にビオチン標識プローブを 50 μ l (200ng/ml) 加えプローブ溶液を調整し、沸騰水中で 5 分間(98°C、5 分間)加熱しプローブ溶液を調整する。
適量のプローブ溶液 (2~5ml) をメンブレンの入っているバックに加え、バッグ中から気泡を追い出した後ヒートシーラーでシールする。
- 5) 42°C の恒温水槽中で 6 時間～一夜ハイブリダイゼーションする。

表 8. ハイブリダイゼーション溶液

	最終濃度	50ml 作るのに必要な量
20 × SSC	5 ×	12.5ml
10% Blocking reagent	2%	10ml
10% N-Lauroylsarcosine	0.1%	0.5ml
10% SDS	0.02%	0.1ml
ホルムアミド	50%	25ml
DDW		2ml

- 6) バッグからメンブレンを取り出し、タッパーに移し 0.1% SDS を含む 2 × SSC（表 9.参照）20ml で 5 分間、室温で 2 回洗浄する。その後、0.1% SDS を含む 0.1 × SSC（表 9.参照）20ml で 15 分間、42°C で 2 回洗浄する。

使用したプローブ溶液は、数回使用できるので、捨てずに取っておく。使用前には、沸騰水中で 5~10 分間熱変成する。0.1% SDS を含む 0.1 × SSC は、あらかじめ

めハイブリダイゼーション温度と同じ温度に温めておく。

表 9. 洗浄液の組成

	2×SSC, 0.1% SDS	0.1×SSC, 0.1% SDS
20×SSC	50ml	2.5ml
10% SDS	5ml	5ml
DDW	445ml	492.5ml
Total	500ml	500ml

- 7) メンブレンを洗浄 20ml の Buffer 1 に 10% Tween 20 を 600 μ l 加えた Buffer で 1 分間洗浄する。
- 8) ブロッキング溶液 20ml で 30 分間、室温でインキュベートする。
- 9) ブロッキング溶液 200ml で Streptavidin Alkaline Phosphatase を 5000 倍希釈した溶液 20ml にメンブレンを浸漬し、30 分間室温でインキュベートする。
- 10) 洗浄 Buffer 25ml で 15 分間室温 2 回洗浄する。
- 11) 検出溶液 20ml で 2 分間、平衡化のためインキュベートする。
- 12) 検出溶液 5ml に NBT/BCIP stock 溶液 100 μ l を加え、発色基質溶液を調整する。加える stock 溶液は 50 μ l でも行える。
- 13) 検出溶液で平衡化したメンブレンをハイブリダイゼーションバッグに移し、発色気質溶液を 3~5ml 加え、気泡を追い出した後ヒートシーラーでシールする。発色するまで、静置する。発色中は、振とうしたり攪拌したりしない
- 14) 発色が確認できたら、メンブレンを TE Buffer 30~50ml で 5 分間洗浄して、反応を停止させる

3. 判定

スポットが紫色に染色されたものを陽性とする。判定は必ずゲルの陰性コントロールと比較して行う。

Ⅲ リアルタイムPCR法によるノロウイルスの定量的検出法

リアルタイムPCRはRT-PCR法の1st PCRよりも検出感度が良く、PCRにおける増幅産物に蛍光プローブが高い特異性で反応することから、DNAの増殖と定量そしてハイブリダイゼーションが同時に行われ、電気泳動、確認試験も行う必要がなく、短時間で結果が得られるという利点がある。一方、機器、試薬が高価であるという欠点も有する。

ここでは、ABI PRISM 7000(Applied Biosystems)を使った方法を示す。なお、Kageyamaら^{文献4)}のG2用のプライマー(図3参照)およびプローブではアルファトロロン型を検出できないので、少し配列を変えたものを用いている。

1. 必要な器具と試薬

1) 器具

ABI PRISM 7000、マイクロピペット、Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate (ABI Cat.No. N801-0560)、Micro Amp Optical Cap, 8caps/strip (ABI Cat.No. 4323032)〔操作方法はMicro Amp Optical Capを使用した場合を記すが、Optical Adhesive Covers(ABI Cat.No. 4311971)、Optical Cover Compression pads (ABI Cat.No. 4312639)、Adhesive Seal Applicators(ABI Cat.No. 4333183)を用いても良い〕

2) 試薬

Micro Amp Base(ABI Cat.No. N801-0531)、Taq Man Universal PCR Master Mix(ABI Cat.No. 4304437)、Taq Man プローブ、プライマー
Distilled water ((Deionized, Sterile, autoclaved, DNase free、RNase free) 和光純薬工業 Cat.No. 318-90105、(以下「Distilled water」という。))

2. 反応プレートの準備

1) ふん便および食品からのRNA抽出、cDNAの合成は前項IのRT-PCR法と全く同一の方法で行う。

表10.に示した反応液を調整する。なお、リアルタイムPCRではG1とG2を別々に行う。反応液量は食品の時には50 μ lが望ましい。ふん便材料の時には反応液量35 μ lあるいは25 μ lで行ってもよい。

表 10. 反応液の調整

試 薬	G1	G2
Distilled water	13.88 μ l	16.54 μ l
Taq Man Universal Master MIX	25.0 μ l	25.0 μ l
100pmol/ μ l プライマー	COG1F 0.2 μ l	COG2F 0.2 μ l
	COG1R 0.2 μ l	ALPF 0.2 μ l
		COG2R 0.2 μ l
4pmol/ μ l Taq Man プローブ	RING1-TP(a) ^{注 11)} 4.29 μ l	RING2AL-TP ^{注 13)} 2.86 μ l
	RING1-TP(b) ^{注 12)} 1.43 μ l	
計	45.0 μ l	45.0 μ l

注 11) : RING1 - TP(a) : 5'-VIC あるいは FAM-AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA-TMRA-3'

注 12) : RING1 - TP(b) : 5'-VIC あるいは FAM-AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA-TMRA-3'

注 13) : RING2AL-TP : 5'-FAM あるいは VIC-TGG GAG GGS GAT CGC RAT CT-TMRA-3' または、RING2-TP : 5'-FAM あるいは VIC-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-TMRA-3'

- 2) プレート(Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate)のウェルに 45.0 μ l ずつ反応液を入れる。コントロール DNA は 3 ウェル以上、サンプル、陰性コントロール (NTC:No Template Control)は 2 ウェル使用する。
- 3) cDNA 5 μ l を 2 ウェルずつに加え、蓋(Micro Amp Optical Cap,8caps/strip)を軽く閉める。
- 4) コントロール DNA G1 と G2 を別々に (10⁷ コピー/5 μ l) を 10⁷ から 10⁰ コピーまで 10 倍階段希釈し、5 μ l を 3 ウェルずつに加え、蓋を軽く閉める。
- 5) NTC として DDW 5 μ l を 2 ウェルずつに加え、蓋を軽く閉める。
- 6) プレートを Micro Amp Base にセットし、蓋をしっかりと閉める。
- 7) ウェルの壁についている反応液を遠心して落とす。(遠心機が無い場合はプレートを軽く叩いたり、振り下ろしたりする。
- 8) Instrument タブをクリックし、サーマルサイクラー条件を以下のように設定す

る。

50°C, 2分、95°C, 10分を1回、次いで95°C, 15秒、56°C, 1分を45回、25°Cで保存。

- 9) ランを開始する。
- 10) ランが終了したら、データ解析をする。
- 11) Threshold Line を設定する。Amplification 上に全てのデータを表示し、グラフ上の緑色の線を増幅曲線の指数関数的増幅領域の中央に設定し、Analysis をクリックする。緑色の線は、マウスでドラッグするか、Analysis Setting 内の Threshold フィールドに数値を入力することで移動する。
- 12) Standard Curve タブをクリックし、Standard Curve を表示する。右側の R^2 が 0.990~1 であればよい(1に近いほどよい)。
- 13) Report タブをクリックし、Report 画面を表示させ、下の画面のウェルをハイライト選択し、解析データを表示させる。(コピー数は Plate 画面でも確認できる。) 2つのウェルにおいて、実測値 10 コピー以上で陽性とする。

なお、リアルタイム用ノロウイルス G1,G2 コントロール DNA の分与を希望する機関は、国立感染症研究所 感染症情報センター第六室長あて依頼すること。

図 2. ノロウイルス ORF1 部分のプライマーとプローブの位置

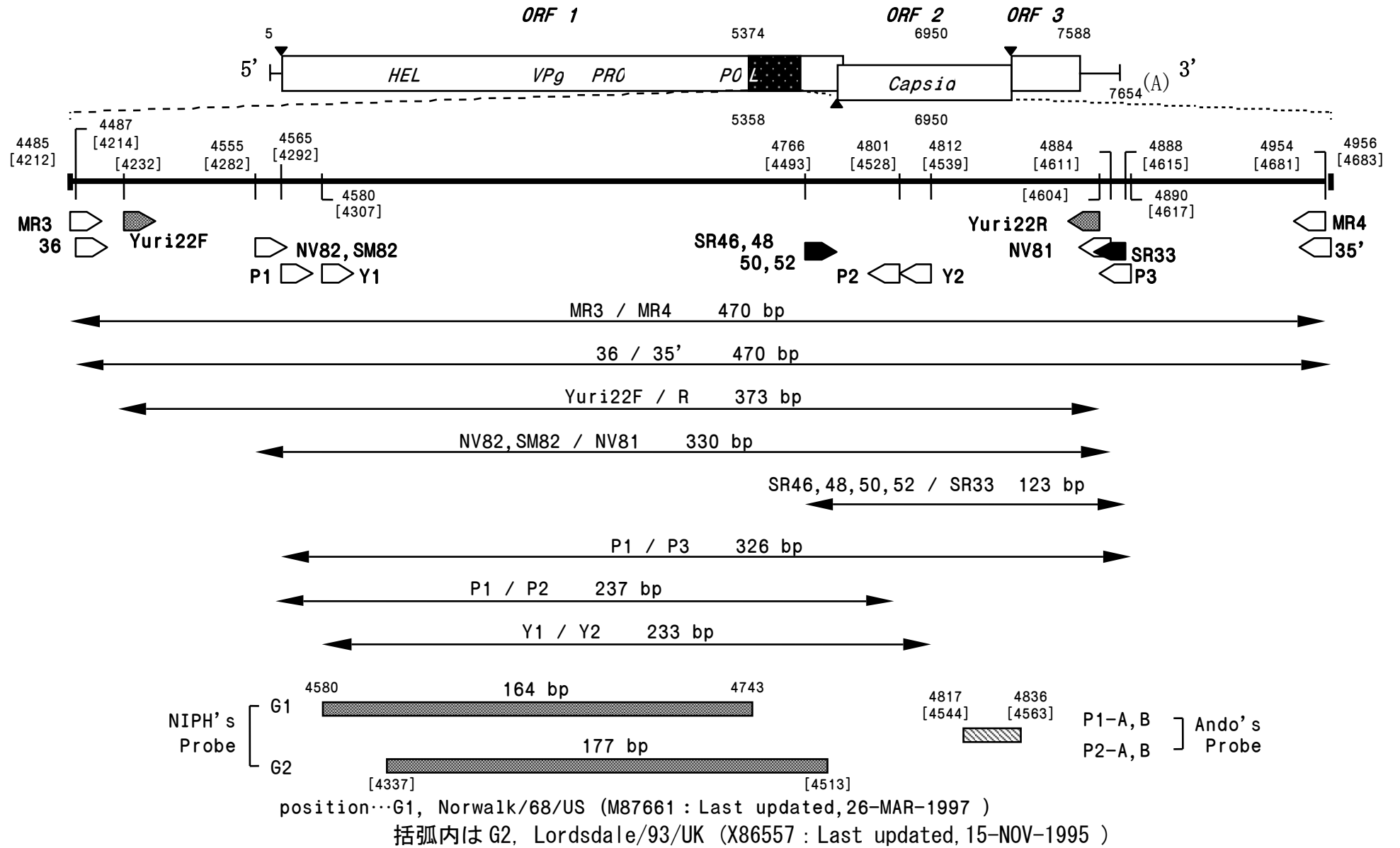
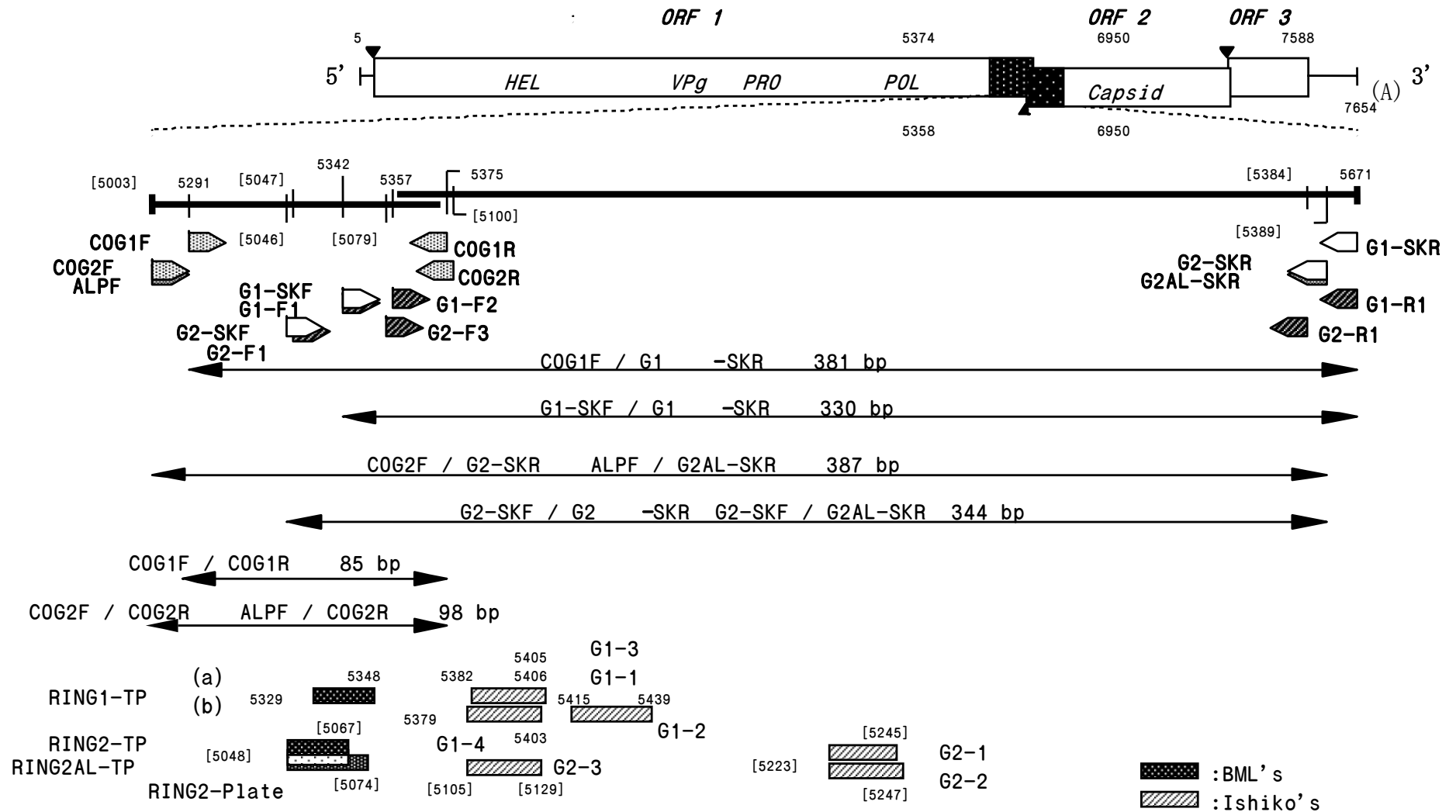


図 3. ノロウイルス ORF2 部分のプライマーとプローブの位置



position...G1, Norwalk/68/US (M87661 : Last updated, 26-MAR-1997)

括弧内は G2, Lordsdale/93/UK (X86557 : Last updated, 15-NOV-1995)

表 11. ノロウイルスのプライマーとプローブの塩基配列

Primer	塩基配列 [5' - 3']	sense	文献	Probe	塩基配列 [5' - 3']	sense	文献
36	ATA AAA GTT GGC ATG AAC A	+	5	SR47d : P2B	ATG TCA GGG GAC AGG TTT GT	-	10
35'	CTT GTT GGT TTG AGG CCA TA	-	5	SR61d : P2A	ATG TCG GGG CCT AGT CCT GT	-	10
MR3	CCG TCA GAG TGG GTA TGA A	+	6	SR63d : P1A	ACA TCA GGA GAG TGC CCA CT	-	10
MR4	AGT GGG TTT GAG GCC GTA	-	6	SR65d : P1A	ACA TCA GGT GAT AAG CCA GT	-	10
NW82	TCA TTT TGA TGC AGA TTA	+	7	SR67d : P1B	ACA TCT GGT GAG AGA CCT GA	-	10
SM82	CCA CTA TGA TGC AGA TTA	+	7	SR69d : P1A	ACA TCG GGT GAT AGG CCT GT	-	10
NW81	ACA ATC TCA TCA TCA CCA TA	-	7	RING1 - TP (a)	AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA	+	4
YUR122F	ATG AAT GAG GAT GGA CCC AT	+	8	RING1 - TP (b)	AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA	+	4
YUR122R	CAT CAT CCC CGT AGA AAG AG	-	8	RING2 - TP	TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT	+	4
P1	GCT GAT TAC TCT SGS TGG GA	+	9	RING2AL-TP	TGG GAG GGS GAT CGC RAT CT	+	13
P2	ACA CAG AGT GAG SAR CCA GTG	-	9	RING2 - Plate	TGG GAG GGC GAT CGC AAT CTB GCT CCC	+	13
P3	GTR STC ACA ATY TCA TCA TC	-	9	G1-1(Ishiko)	CCA ACA AAC ATG GAT GGC ACC AGT G	+	14
Y1	TGG GAC TCA ACA CAR CAG AG	+	9	G1-2(Ishiko)	CAG TTG GTA CCG GAG GTT AAT GCT T	+	14
Y2	TCA GAM AGK GCA CAS AGA GT	-	9	G1-3(Ishiko)	CCT CAA AGC GCT GAT GGC GCA AGC	+	14
SR33	TGT CAC GAT CTC ATC ATC ACC	-	10	G1-4(Ishiko)	GCT ACA CCA AGC GCA GAT GGC GCC A	+	14
SR46	TGG AAT TCC ATC GCC CAC TGG	+	10	G2-1(Ishiko)	ATA ATT GAC CCC TGG ATT AGA AA	+	14
SR48	GTG AAC AGC ATA AAT CAC TGG	+	10	G2-2(Ishiko)	ATA ATT GAT CCC TGG ATT ATG AAT A	+	14
SR50	GTG AAC AGT ATA AAC CAC TGG	+	10	G2-3(Ishiko)	CGC CGC TCC ATC TAA TGA TGG TGC A	+	14
SR52	GTG AAC AGT ATA AAC CAT TGG	+	10	IUB CODES			
G1 - SKF	CTG CCC GAA TTY GTA AAT GA	+	11	R = A or G	B = C, G or T		
G1 - F2	AAT GAT GAT GGC GTC TAA GGA	+	12	Y = C or T	D = A, G or T		
G1 - SKR	CCA ACC CAR CCA TTR TAC A	-	11	K = G or T	H = A, C or T		
G2 - SKF	CNT GGG AGG GCG ATC GCA A	+	11	M = A or C	V = A, C or G		
G2 - F3	TTG TGA ATG AAG ATG GCG TCG A	+	12	S = G or C			
G2 - SKR	CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT	-	11	W = A or T			
G2AL-SKR	CCA CCA GCA TAT GAA TTG TAC AT	-	13	N = aNy base			
COG1F	CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA	+	4				
COG1R	CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C	-	4				
COG2F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	+	4				
ALPF	TTT GAG TCC ATG TAC AAG TGG ATG CG	+	13				
COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	-	4				

IV 文献

- 1) 藤本嗣人、西尾 治他：兵庫県立健康環境科学研究所研究報告 投稿中
- 2) Inoue S. et al. : *J. Clin. Microbiol.* 28 : 1469 (1990)
- 3) 西尾 治 他 : 日本臨床 60 : 1175(2002)
- 4) Kageyama K et al.; *J. Clin. Microbiol.* 41:1548 (2003)
- 5) Moe C.I.et al. : *J. Clin. Microbiol.* 32:642 (1994)
- 6) Lew J.F. et al. : *J. Virol.* 68:3391 (1994)
- 7) 林直志他 : 未発表
- 8) Saito H. et al. : *Microbiol. Immunol.* 42:439 (1998)
- 9) 山崎謙治他 : 感染症学雑誌 74:470 (2000)
- 10) Ando T. et al. : *J. Clin. Microbiol.* 33:64 (1995)
- 11) 篠原美千代他 : 第48回日本ウイルス学会学術集会抄録 P264 (2000)
- 12) Kobayashi S. et al.: *Microbiol. Immunol.* 44:687 (2000)
- 13) 西尾 治他 : 未発表
- 14) 石古博昭他 : 未発表

(国立感染症研究所感染症情報センター第六室 西尾 治)