

食安監発1201第1号
平成21年12月1日

各検疫所長 殿

医薬食品局食品安全部監視安全課長

A型肝炎ウイルスの検出法について

今般、国立医薬品食品衛生研究所において、食品中のA型肝炎ウイルスの検出法について検討した結果、別添のとおり「A型肝炎ウイルス検出法」としてとりまとめましたので、食品の検査にあたっては、本法により実施するようお願いいたします。

改正のポイント

A 型肝炎ウイルスの検出法の主な変更点は以下のとおりです。

- 1) セミドライトマト、その他の食品の処理方法及びにそれらに必要な機器、試薬を記載したこと。
- 2) RNA 抽出時のコントロールとしてポリオウルス 2 型 (Sabin 株) に代えて、エコーウイルス 9 型 (Hill 株) を用いることとしたこと。
- 3) その他の部分についても、「厚生労働科学研究費補助金[食品安全確保研究事業]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」(平成 15 年度総括・分担研究報告書(主任研究者 西尾 治))を基本として、若干の変更を加えたこと。

(別添)

A 型肝炎ウイルスの検出法

I. A 型肝炎ウイルスの RT-PCR 法

A 型肝炎ウイルス (HAV) はピコルナウイルス科、ヘパトウイルス属に分類され、直径 27nm の正 20 面体構造で、エンベロープを持たない。

A 型肝炎ウイルスの感染は潜伏期が 2 から 6 週間、平均 1 ヶ月であることから原因食材の検査に当たっては潜伏期間を考慮すること。

1. 必要な器具と試薬

1) 器具

サーマルサイクラー、超高速冷却遠心機、高速冷却遠心機 (10,000rpm)、マイクロ冷却遠心機 (15,000rpm)、超音波発生装置あるいは振盪器、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 (0.5ml、0.2ml、1.5ml、2ml)、遠心管 (15ml、50ml)、1ml 注射器、18G 注射針、フィルター付滅菌ポリ袋 (ストマッカー用)。

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」) }、A 型肝炎ウイルス検出用プライマー (詳細については後述。)、エコーウイルス 9 型 Hill 株検出用プライマー (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・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 : ロシュ・ダイアグノスティック、Cat.No. 1034731
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・2Na (pH8.0) 100ml) を蒸留水で 1,000ml とする。

SDS-Tris Glycine buffer (Tris 3.03g、Glycine 14.4g、SDS 1g を蒸留水で 1 リットルとする。)

(注)

上記のランダムプライマー、逆転写酵素、DNase、リボヌクレアーゼインヒビター、耐熱性 DNA 合成酵素、ウイルス RNA 抽出キット等は例示である。記載された製品と比較して同等以上の性能が確認されている場合は、記載された製品以外の製品を使用してもかまわない。

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、クリーンベンチで行う際にファンは止めること。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) 二枚貝

二枚貝は中腸腺等の消化管にウイルスが主に蓄積しているため、中腸腺を対象に検査を行う。

(貝の中腸腺の処理)

超遠心機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、3～5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(-)を加え粉砕する。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) 粉砕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(ミリQ水を高圧滅菌後、0.22 μ mフィルターで濾過したもの。)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) 超遠心機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℃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り取る。
- (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。

(貝の中腸腺の内容液を用いる方法)

貝の内容液からのウイルス検出は、大型の貝(平貝、ウチムラサキ貝等を検査の対象とする場合に用いる方法である。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、1度凍結融解する(-40 $^{\circ}$ C以下で凍結させ、融解するときには50 $^{\circ}$ 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までサンプルを添加でき、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機による濃縮を行い、200 μ lのDDWに再浮遊させ、それをRNA抽出に用いる。

2) セミドライトマト

(セミドライトマトの処理)

- (1) セミドライトマトをフィルター付滅菌ポリ袋に入れ、トマトの重量を測定する。合計7~10g程度を採取する。
- (2) 5~10倍量のPBS(-)を加える。
- (3) セミドライトマトが完全にPBS(-)に浸かるようにしながら、15分間、超音波処理(100~120W)を行う。超音波発生装置を所有していない場合は、振盪器で30分間、振盪する。いずれも、内容物がこぼれないように注意する。

- (4) フィルターろ液 45ml を遠心管に採取する。
- (5) 8,000~10,000rpm、20 分間、冷却遠心する。
- (6) 遠心上清(水層)40ml を別の遠心管に移す。
- (7) ポリエチレングリコール 6,000 を 4.8g(最終濃度 12%)、NaCl を 2.3g(最終濃度 1M)加え、完全に溶解させる。
- (8) 8,000~10,000rpm、30 分間、冷却遠心する。
- (9) デカンテーションで上清を捨て、管壁の水分を十分に取り除く。
- (10) 沈渣に SDS-Tris Glycine buffer 200 μ l を加え、ピペッティング等により再浮遊させる。SDS を含むため、泡立ちしやすいので注意深く溶解させる。
- (11) 再浮遊液を 2ml チューブに移し、12,000rpm、5 分、遠心分離する。
- (12) 上清 138 μ l を RNA 抽出材料とし、速やかに RNA 抽出を行う。

(オイル漬けセミドライトマトの処理)

オイル漬けセミドライトマトはオイルを主とする液体部分とセミドライトマトとに分けて、それぞれを試験に供する。

オイル漬けセミドライトマト

- (1) オイル漬けセミドライトマトを容器から取り出し、オイルを自然落下等で垂らして除去した後、フィルター付滅菌ポリ袋に入れ、トマトの重量を測定する。
合計 7~10g 程度を採取する。
- (2) 以下、前項 (セミドライトマトの処理) の(2)以下と同様。

液体部分の処理

採取可能な液体部分の容量は製品に依存するので、試験に供する量は適宜変更する。以下、標準的な検査法を示す。

- (1) オイル漬けセミドライトマトの液体部分約 50ml を密閉可能な容器に採取する。
- (2) 等量の PBS(-)を加える。
- (3) 約 5~10 秒間、激しく攪拌後、しばらく静置する。
- (4) 水層 45ml を遠心管に採取する。

- (5) 8,000~10,000rpm、20分、冷却遠心する。
- (6) オイル層を採取しないように注意しながら、遠心上清(水層)40mlを別の遠心管に移す。
- (7) ポリエチレングリコール6,000を4.8g(最終濃度12%)、NaClを2.3g(最終濃度1M)加え、完全に溶解させる。
- (8) 8,000~10,000rpm、30分、冷却遠心する。
- (9) デカンテーションで上清を捨て、管壁の水分を十分に取り除く。
- (10) 沈渣にSDS-Tris Glycine buffer 200 μ lを加え、ピペッティング等により再浮遊させる。SDSを含むため、泡立ちしやすいので注意深く溶解させる。
- (11) 再浮遊液を2mlエッペンチューブに移し、12,000rpm、5分、遠心分離する。
- (12) 上清138 μ lをRNA抽出材料とし、速やかにRNA抽出を行う。

3) その他の食品

推定される汚染経路が食品取扱者の手指を介する場合や汚染水の場合、ウイルスは食品の表面が汚染されていると考えられる。その場合、セミドライトマトの処理法に準じた方法で検査を実施できる場合がある。

(表面汚染が推定される食品の処理)

- (1) 食品7~10g程度をフィルター付滅菌ポリ袋に入れ、食品の重量を測定する。
- (2) 5~10倍量のPBS(-)を加える。
- (3) 食品が完全にPBS(-)に浸かるようにしながら、15分間、超音波処理(100~120W)を行う。超音波発生装置を所有していない場合は、振盪器で30分間、振盪する。いずれも、内容物がこぼれないように注意する。
- (4) フィルターろ液45mlを遠心管に採取する。
- (5) 8,000~10,000rpm、20分間、冷却遠心する。
- (6) 遠心上清40mlを別の遠心管に移す。
- (7) ポリエチレングリコール6,000を4.8g(最終濃度12%)、NaClを2.3g(最終濃度1M)加え、完全に溶解させる。
- (8) 8,000~10,000rpm、30分間、冷却遠心する。
- (9) デカンテーションで上清を捨て、管壁の水分を十分に取り除く。
- (10) 沈渣にSDS-Tris Glycine buffer 200 μ lを加え、ピペッティング等により再

浮遊させる。SDS を含むため、泡立ちしやすいので注意深く溶解させる。

(注意)

沈渣の量が多く 200 μ l の SDS-Tris Glycine buffer に再浮遊できない場合は、約 5~10ml の PBS(-) に再浮遊させ、(13)以降のステップに進み、超遠心分離による再濃縮を行う。

超遠心分離機を所有していない場合は、沈渣に等量~5 倍量の SDS-Tris Glycine buffer を加え、ピペッティング等により再浮遊させる。SDS を含むため、泡立ちしやすいので注意深く溶解させる。

(11) 再浮遊液を 2ml チューブに移し、12,000rpm、5分、遠心分離する。

(12) 上清 138 μ l を RNA 抽出材料とし、速やかに RNA 抽出を行う。

以下、(10)で沈渣の量が多い場合の超遠心分離による再濃縮操作

(13) 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(10)の再浮遊液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)。

↓50,000rpm、120分間、冷却遠心する。

(14) 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。

(15) 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。

(16) 沈渣にSDS-Tris Glycine buffer 200 μ lを加え、ピペッティング等により再浮遊させる。SDSを含むため、泡立ちしやすいので注意深く溶解させる。

(17) 再浮遊液を 2ml チューブに移し、12,000rpm、5分、遠心分離する。

(18) 上清 138 μ l を RNA 抽出材料とし、速やかに RNA 抽出を行う。

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、10,000~12,000rpm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 キットの方法を紹介する。

QIAamp Viral RNA Mini キットは RNA 抽出に 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整が必要となる。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°C) 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) は 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°C 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°C) により溶解する。ただし、5 分間以内で、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) RNA 抽出用の試験液を 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 にかき、室温 (15~25°C) に 10 分間置く。チューブをスピンドウンする。
- (3) 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。
- (4) (3) 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、6,000Xg (8,100 rpm)、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 (3) 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 の時には、この操作が 2 回で終わる)。

- (5) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW1 500 μ l を入れる。
- (6) 蓋を閉め、6,000Xg(8,100 rpm)、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。
- (7) QIAamp スピнкаラムに Buffer AW2 500 μ l を加え、20,000Xg(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(8)を行う(このような事は通常起きない)。
- (8) 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。
- (9) 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、6,000Xg(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 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。従って、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、チューブは全て高压滅菌にかける。

- 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 μ l
5X 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

- 1) 表 2 の RT 反応調製液を作製する。

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

試薬	15 μ l 系	20 μ l 系	30 μ l	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) ^{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
100m M DTT	0.75 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
Super Script RT II (200u/ μ l)	0.75 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
DDW	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 A 型肝炎ウイルスのプライマー、エコーウイルス 9 型 Hill 株プライマーを用いても良い。

- 2) 反応は 42°Cで 30 分~2 時間行う(通常 1 時間)。

3) 次いで 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、A 型肝炎ウイルスについては表 3、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. A 型肝炎ウイルス

1. Distilled water	33.75 μ l
2. 10X Ex Taq™ buffer	5.0 μ l
3. dNTP (2.5mM)	4.0 μ l
4. HAV+2799 プライマー (25 μ M) ^{注3)}	1.0 μ l
5. HAV-3273 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

表 4. エコーウイルス 9 型 Hill 株

1. Distilled water	33.75 μ l
2. 10X Ex Taq™ 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図 2 を参照 文献 1, 2)。

注4) エコーウイルス 9 型 Hill 株プライマー 文献 3)

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

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×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 1 st 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。

1) Nested PCRの調製

表5の混合液を作製する。Nested PCRではHAV+2907/-3162プライマーを用いる^{注5)}。

表5. Nested PCRの混合液

1. Distilled water	36.75 μ l
2. 10X Ex Taq TM buffer	5.0 μ l
3. dNTP (2.5mM)	4.0 μ l
4. HAV+2907 プライマー (25 μ M)	1.0 μ l
5. HAV-3162 プライマー (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)} : プラスミドに組み込んだHAV陽性コントロール (2799-3355領域を組み込んだもの) についても行う。

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9.2)～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(遺伝子の混入が無い)。
- 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HAV陽性コントロール)で目的とするバンドが見られる。(=PCRがうまく行われてた。)
- 4) PCRでの増幅産物は目的とする大きさであること。HAV+2799/HAV-3273は498bp、HAV+2907/HAV-3162は280bpである。(=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A型肝炎ウイルスと類似の配列が認められたときに陽性とする。

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、反応は通常の酵素抗体法と同一である^{文献4)}。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5)}。

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、マイクロ冷却遠心機(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#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(-)+0.5%Tween20)

2. ゲルからの DNA 抽出法

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~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нка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 $\geq 10,000Xg$ (~13,000rpm)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 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 μ l 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 の酢酸ナトリウム(pH5.0)を10 μ l 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(例：100mg のアガロースゲルスライスには、100 μ l 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 $\geq 10,000Xg$ (～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～20 倍希釈して用いる。

↓98℃、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 2 ナトリウム、30mM EDTA、pH7.0 (3 倍濃度 1.5M NaCl buffer を使用時には 3 倍希釈して用いる。)

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

試薬	1	2	3	4	5	6	7
	N C	P C	検 体	検 体	検 体	検 体	検 体
Control HAV-prob+3129	A	○	○	○	○	○	○
	B	○	○	○	○	○	○
	C	○	○	○	○	○	○

図 1. トレイのレイアウト

↓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	プローブ
100pmol/ μ l probe	TE 1 μ l	HAV-probe+3139 1 μ l
100 μ g/ml 牝精子 DNA 注 ⁸	5 μ l	5 μ l
3 倍 1.5M NaCl buffer	3.3 μ l	3.3 μ l
DDW	0.7 μ l	0.7 μ l

注⁸ サケ DNA : DNA 量 10mg/ml のものを T₁₀E₁ で 100 μ g/ml に希釈したもの

- 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 混合液と合わせる。

表 7. ハイブリダイゼーション液(1 検体当たり)注⁹

3 倍 1.5M NaCl buffer	30 μ l
ホルムアミド	50 μ l
10% Tween20	1 μ l
DW	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 (マイクロプレート内の 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 1,000ppm 濃度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を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 リン酸水素二ナトリウム 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法

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で行われている。

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、ポジティブチャージナイロンメンブレン: Nylon membranes, positively charged ベーリンガー 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 の蒸留水に溶解 (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 : ベーリンガー Cat.No.1096176

NBT/BCIP : ベーリンガー 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 μ l 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 HAV 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、その 1 μ l をナイロンメンブレンにスポットし風乾する (II. A. 2 ゲルから DNA 抽出を参照)。
- 2) トランスイルミネーター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 8 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 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 5,000 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、発色基質溶液を 3~5ml 加え、気泡を追い出した後ヒートシーラでシールする。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

リアルタイム PCR は RT-PCR 法の 1 st 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。

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)、Micro Amp Base (ABI Cat.No. N801-0531) [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

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、RNasefree) 和光純薬工業 Cat No. 318-90105、(以下「Distilled water」) }

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 A 型肝炎ウイルスの 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。反応液量は食品の時には $50 \mu\text{l}$ が望ましい。ふん便材料の時には反応液量 $35 \mu\text{l}$ あるいは $25 \mu\text{l}$ 行ってもよい。

表 10. 反応液の調整

試薬	$50 \mu\text{l}$ 系
Distilled water	$13.88 \mu\text{l}$
Taq Man Universal Master Mix	$25.0 \mu\text{l}$
$100\text{pmol}/\mu\text{l}$ プライマー-HAV+449 ^{注 11)}	$0.2 \mu\text{l}$
$100\text{pmol}/\mu\text{l}$ プライマー-HAV-557	$0.2 \mu\text{l}$
$4\text{pmol}/\mu\text{l}$ Taq Man プローブ HAV+482-P-FAM	$3 \mu\text{l}$
計	$45.0 \mu\text{l}$

注 11) : プライマー、プローブの配列は図 2 参照 ^{文献 6)}

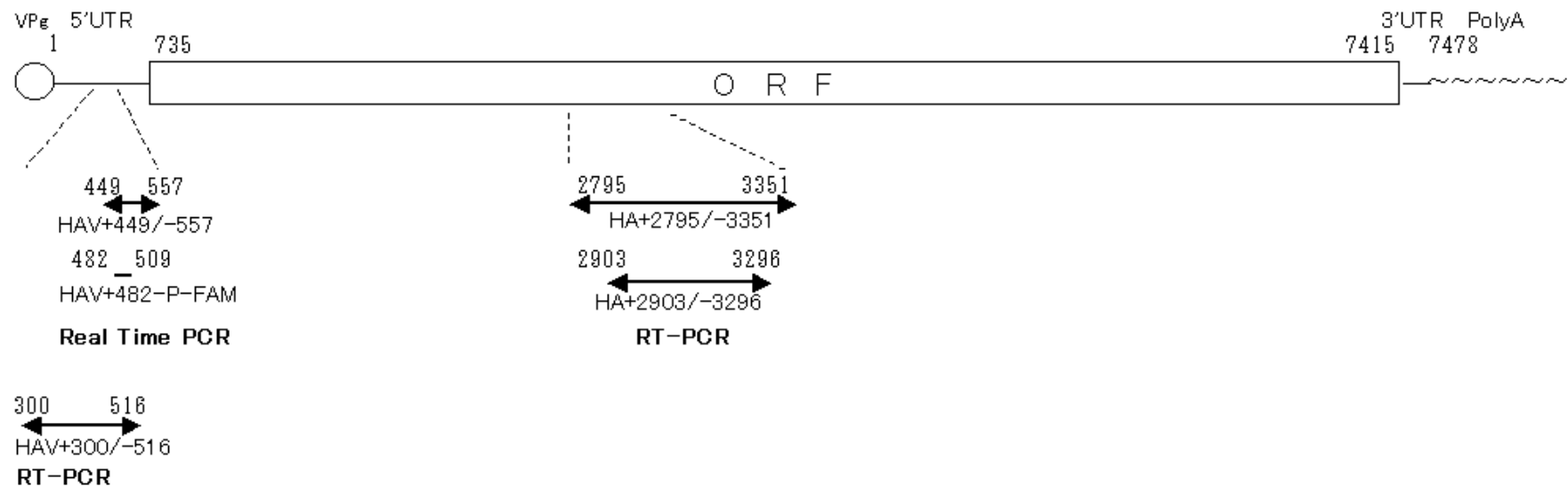
- (2) プレート (Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate) のウェルに $45.0 \mu\text{l}$ ずつ反応液を入れる。コントロール DNA は 3 ウェル以上、サンプル、陰性コントロール (NTC: No Template Control) は 2 ウェル使用する。
- (3) cDNA $5 \mu\text{l}$ を 2 ウェルずつに加え、蓋 (Micro Amp Optical Cap, 8caps/strip) を軽く閉める。
- (4) コントロール DNA (10^7 コピー/ $5 \mu\text{l}$) を 10^7 から 10^0 コピーまで 10 倍階段希釈し、 $5 \mu\text{l}$ 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) 反応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) Amplification Plot 画面を表示させ、Baseline および Threshold Line を設定する。
- (12) Standard Curve を表示させ、 R^2 が 0.990~1 であればよい(1 に近いほどよい)。
- (13) 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。

IV. 参考文献

1. Robertson. H. et al: J Gen Virol. 73:1365-1377
2. 戸塚敦子: 肝炎ウイルス検査法マニュアル、A 型肝炎ウイルス RNA の RT-PCR 法による検出法
3. 藤本嗣人: 兵庫県健康環境科学研究センター年報 2: 107 (2003)
4. Inouye S. et al: J Clin Microbiol 28: 1469 (1990)
5. 西尾 治: 日本臨床 60: 1175 (2002)
6. 西尾 治、秋山美穂、加藤由美子: リアルタイム PCR 法による A 型肝炎ウイルスの検出について、第 76 回日本感染症学会抄録 P251 (2002)

(国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部第四室 野田 衛)



RT-PCR

<Primer>

HAV+300	5'-GCT GTA GGA GTC TAA ATT GGG GAC-3'	HAV-516	5'-ACT CAA TGC ATC CAC TGG ATG AG-3'
HAV+2795	5'-ATT CAG ATT AGA CTG CCT TGG TA-3'	HAV-3351	5'-CCA GCA GCT AAA GAA AAC CCA AA-3'
HAV+2903	5'-GCA AAT TAC AAT CAT TCT GAT GA-3'	HAV-3296	5'-CCA AGA AAC CTT CAT TAT TTC ATG-3'

Real Time PCR

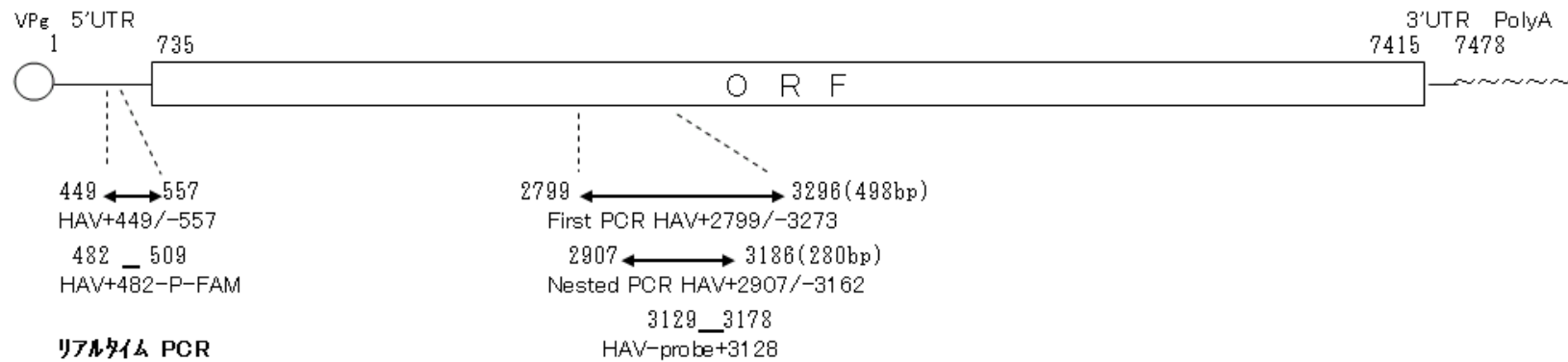
<Primer>

HAV+449	5'-ATG GTA ACA GCG GCG GAT AT-3'	HAV-557	5'-ACA GCC CTG ACA GTC AAT YCA CT-3'
---------	----------------------------------	---------	--------------------------------------

<Probe>

HA+482-P-FAM	5'-FAM-AGA CAA AAA CCA TTC AAC RCC GRA GGA C-TAMRA-3'
--------------	---

図1. A型肝炎ウイルス検出のRT-PCR法とReal Time PCR法におけるプライマーとプローブの位置



RT-PCR,マイクロプレートハイブリダイゼーション

RT-PCR,マイクロプレートハイブリダイゼーション

<Primer> HAV+2799 5'-ATT CAG ATT AGA CTG COT TGG TA-3'
 HAV+2907 5'-GCA AAT TAC AAT CAT TCT GAT GA-3'
 HAV-3162 5'-CTT CYT GAG CAT ACT TKA RTC TTT G-3'
 HAV-3273 5'-CCA AGA AAC CTT CAT TAT TTC ATG-3'
 <Probe> HAV-probe+3129 5'-Biotin-CCA TAT AAA GAA CTG AGA TTA GAA GTT GGG AAR CAA AGA YTC AAG TAT GC-3'

リアルタイムPCR

<Primer> HAV+449 5'-AGG GTA ACA GCG GCG GAT AT-3'
 HAV-557 5'-ACA GCC CTG ACA RTC AAT YCA CT-3'
 <Probe> HA+482-P-FAM 5'-FAM-AGA CAA AAA CCA TTC AAC RCC GRA GGA C-TAMRA-3'

図2. A型肝炎ウイルス検出のプライマーおよびプローブ