

リアルタイム PCR 法を用いた RNA ウイルスの遺伝子学的測定の検討

神野 英毅 (応用分子化学科) 牛島 廣治 (東京大学大学院)

1. 緒言

ノロウイルス (Norovirus) (Fig. 1) は *Caliciviridae* 科に属し、プラス鎖 ssRNA をゲノムに持つ RNA ウイルスである。ウイルスは直径 30~38 nm の正二十面体構造でありエンベロープを持たず、ウイルスカプシド領域の遺伝子型の相違によって、大きく Genogroup1 (G1) と Genogroup2 (G2) の 2 つのグループに分類され、それぞれが、14 種類と 17 種類の遺伝子型に細分化されている。感染すると 24~72 時間に強度の下痢と嘔吐を示し、未だ有効な治療法は確立されていない。

現在、このノロウイルスの効果的な不活化を行うために産学協同で研究が進められている。中でもオゾンガスによる曝気は効果が高いとされる。しかし、ノロウイルスの細胞培養系は未だ確立しておらず、ウイルス不活化の評価は難しい。ノロウイルスの診断法は、従来法として電子顕微鏡や RT-PCR 法が用いられている¹⁾。近年、定量的な PCR 法の一つであるリアルタイム PCR 法が開発され、遺伝子増幅を経時的に測定できる手法であることから、従来の RT-PCR 法に比べ迅速で検出感度や特異性に優れている²⁾。また、ベシウイルス属 (*Vesivirus*) のネコカリシウイルス (*Feline calicivirus:FCV*) はネコ腎細胞で培養が可能で、ノロウイルスと同じカリシウイルス科に属していることからノロウイルスのモデルウイルスとして用いられている³⁾。

そこで RNA ウイルスの遺伝子学的な測定およびノロウイルス不活化とその評価の前段階として、CRFK 細胞によるネコカリシウイルス培養系を構築し、リアルタイム PCR 法にてウイルスの迅速な測定を行った。また、実際に臨床検体としてふん便中に含まれるノロウイルスを抽出し、リアルタイム逆転写 (Reverse Transcription : RT)-PCR 法にて測定して両者を比較した。

2 材料および方法

1) CRFK 細胞培養

ネコ腎細胞 (Crandell-Rees feline kidney cell : CRFK, ATCC:CCL-94) ならびにネコカリシ

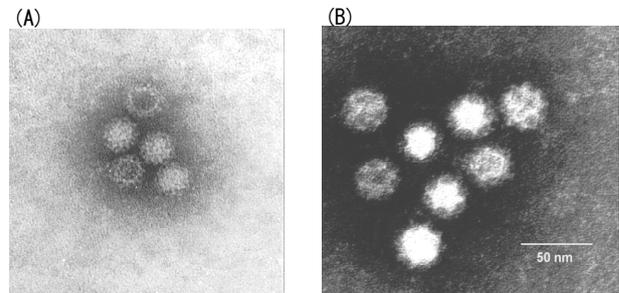


Fig. 1 Photo of *Caliciviridae* by EM
(A) : *Norovirus* (B) : *Feline calicivirus*

ウイルス F9 株 (FCV ATCC:VR-782) は ATCC (American Type Culture Collection, USA) から得たものを使用し、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。CRFK 細胞は、10%FCS を含む E-MEM を培地として使用した。底面積 25 cm² T 型細胞培養用フラスコ (T-25) にて CRFK 細胞を培養し、およそ 3 日間、完全コンフルエントに対して 80%以上増殖した時点で継代を行った。

2) ネコカリシウイルス (FCV) 培養

FCV の培養は CRFK 細胞が 70%コンフルエントに達した時点でを行った。まずフラスコ内の培地を除去し、新しい 2%FCS 含む E-MEM 培地を 5 ml 加えて CO₂ インキュベーターで 1 時間培養した。その後、液体窒素中で保存していた FCV を 37°C 湯浴にて素早く解凍し、その 1 ml を細胞培養中のフラスコに加えた。そして、24°C に調温した CO₂ インキュベーターにておよそ 2~4 日間培養した。CPE が十分確認できてから、ウイルス培養液を回収し、次の細胞に播種して継代した。

3) 臨床検体とその前処理

検体である下痢ふん便は、東京大学医学部発達医科学研究室牛島研より分与していただいたものを使用し、抽出前まで -80°C で保存した。15 ml 遠沈管に検体 1 g と PBS(-) 10 ml を加え分散した後、3,000 rpm 20 分間遠心分離を行いこの上清 140 μl をノロウイルス原液とした。

4) RNA の抽出

FCV およびノロウイルスの RNA はウイルス原液から QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて RNA を抽出した。操作最後の遠心分離により得られた精製 RNA は -20°C で保存した。

5) 逆転写反応(Reverse Transcription)

精製した RNA および Rever Tra-Plus 逆転写 PCR キットを使用し、Table 1 の配合通りに加えて調製した。そして、Table 2 の条件に従い、逆転写反応を行い cDNA とした。得られた cDNA は TE 緩衝液にて 10^{-1} ずつ対数希釈し、リアルタイム PCR における定量測定のサンプルとした。

6) リアルタイム PCR 法によるネコカリシウイルスの定量

Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche, USA)を用いて、逆転写反応により合成した cDNA のリアルタイム PCR 測定を行った。オートクレーブ処理した 200 μ l チューブへ Table 3 に示す試薬組成の通りに反応液を調製した。調製した各反応液 20 μ l をガラス製の専用キャピラリーに加えて Light cycler(Roche, USA)にセットした。リアルタイム PCR 法は Table 4 の条件にて行った。また使用したプライマーはネコカリシウイルス F9 株のカプシド領域 196 bp をコードする Table 5 に示したプライマーを設計し、遺伝子配列検索サービスである BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)にて特異的配列であることを確認して使用した。

7) リアルタイム RT-PCR 法によるノロウイルスの定量

ノロウイルスから抽出した精製 RNA は TAKARA One Step Prime Script を用いてリアルタイム RT-PCR 法を行った。200 μ l チューブを用いて Table 6 に示す組成に反応液を調製し、RNase フリー水で 10^{-1} 倍ずつ対数希釈した RNA サンプル 2 μ l を加えた。ノロウイルスを検出するためのプライマーは、国立感染症研究所感染症情報センター発行のノロウイルスの検出法に準じて、Table 7 に示した物を使用した⁴⁾。調製した各反応液 20 μ l はガラス製の専用キャピラリーに加えて Light cycler にセットした。そして、リアルタイム RT-PCR 法を Table 8 の条件にて行った。

8) プラークアッセイ法による FCV の力価測定およびエタノールによる不活化試験

(1) プラークアッセイ法による FCV の感染力価測定

FCV の感染力価を測定するために、プラークアッセイ法を次のように行った。まず、6-well 細胞培養用プレートに CRFK 細胞を 8×10^5 個/well 単層培養した。次に、FCV を E-MEM 培地にて 10^{-1} ずつ対数希釈してサンプルを調整した。希釈した各ウイルス液 1ml を 1well ずつ播種し、緩やかに振盪しながら 34°C CO₂ インキュベーターで 1 時

Table 1 Composition of RT reagents

Reagents	Amounts
RNase free water	9.0 μ l
5 \times RT Buffer	4.0 μ l
10mM 4dNTPs	2.0 μ l
10U/ μ l RNase Inhibitor	1.0 μ l
Random Primer	1.0 μ l
RNA Sample	3.0 μ l
Rever Tra Ace	1.0 μ l

Table 2 Condition of TR reaction

Step	Temp. (°C)	Time (min)	Cycle
1	30	10	1
2	42	60	1
3	85	5	1

Table 3 Composition of real-time PCR reagents

Reagents	Amounts
Sterile water	13.2 μ l
10 \times Master Mix	2.0 μ l
25mM MgCl ₂	2.0 μ l
F9Cp66F Primer	0.4 μ l
F9Cp68R Primer	0.4 μ l
cDNA Sample	2.0 μ l

Table 4 Condition of RT reaction

Step	Temp. (°C)	Time	Cycle
1	95	10 min	1
2	95	10 sec	45
3	63	10 sec	↓
4	72	5 sec	↓

Table 5 Sequence of primers for Feline calicivirus by real-time PCR

Primers	Sequence(5'-3')
F9Cp66F	ACCCGACAAGGAACAATGGT
F9Cp68R	GAGCAAAGGGCCTAAGGATTGT

Table 6 Composition of real-time PCR reagents

Reagents	Amounts
RNase free water	5.2 μ l
2 \times Buffer	10 μ l
PrimerScript RT enzyme Mix	0.4 μ l
Primer COG2F(10pmol/ μ)	0.4 μ l
Primer ALPF(10pmol/ μ)	0.4 μ l
Taqmanprobe RING2AL-TP (10pmol/ μ)	0.8 μ l
RNA Sample	2.0 μ l

Table 8 Condition of real-time RT-PCR

Step	Temp. (°C)	Time	Cycle
1	42	5 min	1
2	95	10 sec	1
3	95	5 sec	90
4	56	25 sec	↓

The increasing temperature ratio is 20°C/min 間インキュベートした。ウイルスを吸着させた後、加えたウイルス液を吸引して完全に除去し、FCS2%を含む 2 倍濃度 E-MEM 培地 6ml と

PBS(-)3 ml、4%低融点アガロース融解液 4 ml を素早く混合した重曹培地を 2 ml/well ずつ静かに重層した。アガロースが固化したのち、34°C CO₂ インキュベーターで 2~3 日間インキュベートして培養した。その後、PBS(-)6 ml、4%低融点アガロース融解液 2 ml および 3.3 mg/ml ニュートラルレッド液 0.2 ml の染色培地を 1 ml/well 重層しておよそ 1 日間、34°C CO₂ インキュベーターで培養して細胞面に発生したプラークを観察した。

(2) エタノールによる FCV の不活化試験

消毒、殺菌剤として最も一般的に用いられる 80%エタノールの FCV に対する不活化効果を調べた。まず、サンプルの調整は、オートクレーブ済み 2 ml チューブに 99.5%エタノールを 800 μl 加え、FCV ウイルス液 200 μl を加えて転倒混和して 5 分間静置した後に 2%FCS を含む E-MEM 培地を 1 ml 加えた。新たなチューブにあらかじめ 2%FCS を含む E-MEM 培地を 900 μl 加え、ウイルス液を 100 μl ずつ加えて転倒混和して対数希釈した。このサンプルをプラークアッセイ法で測定しウイルス力価を確認した。また、ネガティブコントロールとして PBS(-)をウイルス液の代替とし、同じ操作を同時に行い比較した。

3 結果

1) リアルタイム PCR 法によるネコカリシウイルスとノロウイルスの定量の定量

FCV から抽出した RNA を逆転写反応により cDNA に変換し、リアルタイム PCR により測定した結果を Fig. 2 に示す。測定はおよそ 40 分間で完了した。最も希釈率が高い 10⁻⁶ 希釈は 32 サイクル付近から上昇した。元の濃度に対して 10⁻⁵ 希釈まで測定でき、得られた検量線の相関は R²=0.9947 と良好であった。

臨床検体から抽出したノロウイルス RNA をリアルタイム RT-PCR 法により測定した結果を Fig. 3 に示す。測定は逆転写反応を含むおよそ 80 分で完了し結果が得られた。サンプル希釈に応じたサイクルから蛍光強度は上昇した。測定範囲は 1~10⁻⁴ 希釈であり、得られた検量線の相関は R²=0.9763 であった。

2) ネコカリシウイルスのプラークアッセイ法およびエタノールによる不活化

FCV のプラークアッセイ法の結果を Fig. 4(A)に示す。ウイルスの感染による明確なプラークが希釈率に対応した各 well にて観察でき、ウイルス希釈率 10⁻²~10⁻⁶ の範囲において 10⁻⁵

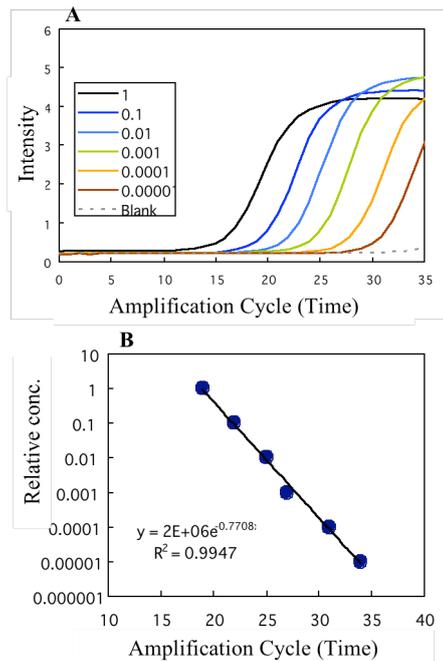


Fig. 2 Result of real-time PCR with Feline Calicivirus (FCV) A: Reaction curves B: calibration curve

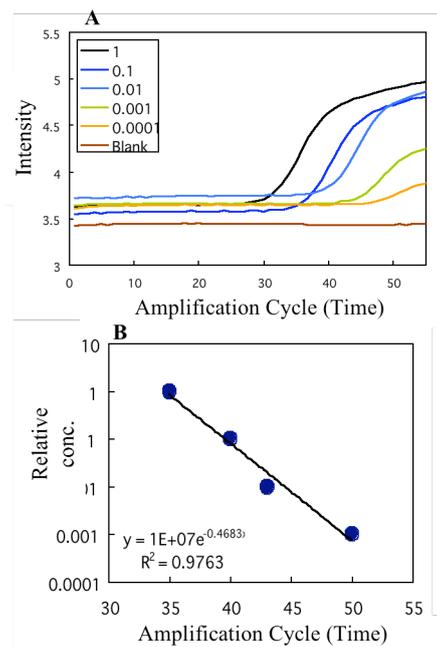


Fig. 3 Result of real-time RT-PCR with Norovirus A: Reaction curves B: calibration curve

希釈までプラークが出現した。この例でのウイルス力価は 10⁻⁵ に一点のプラークが観察されたことから、1×10⁵ pfu/ml と推測された。次に、エタノールで不活化を試みた FCV のプラークアッセイ法の結果を Fig. 4(B)に示す。プラークはウイルス希釈率 10⁻²~10⁻³ まで確認でき、その力価は 10⁻³ に 1 点プラークが観察されたので、1×10³ pfu/ml と推測した。

4 考察

1) リアルタイム PCR によるウイルスの検出と定量の検討

FCV において、通常の PCR・ゲル電気泳動および染色によるウイルスの確認は、5 時間以上かかる。しかし、リアルタイム PCR 法を用いると逆転写反応 85 分を含め約 125 分で定量的に判定できる。さらに、リアルタイム RT-PCR 法では逆転写反応 5 分を含み、およそ 80 分で測定が完了しより迅速であり、1 液反応系のためより簡便な操作であった。しかし、RNA ウイルスの PCR 測定では、ウイルスからの RNA 抽出が必須である。今回は、スピナラムおよび卓上小型遠心器を使用する QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて RNA を抽出した。この方法は、従来法であるグアニジンチオシアネート・フェノール・クロロホルム抽出法と超遠心法を組み合わせた手法と比較すると簡便だが、操作は 1 時間程度必要である。また、操作中は RNase のコンタミによる RNA の分解に常に注意を払わなくてはならない。従って、より簡便で迅速的な診断が必要な、ベットサイドや救命医療現場等の臨床場面での RNA ウイルスの測定には適さないと考えられる。

本研究で使用したリアルタイム PCR 法は蛍光色素である SYBR Green 1 を用いた。また、リアルタイム RT-PCR 法には、ハイブリダイゼーション法の一つである TaqMan 法により行った。FCV とノロウイルスでは FCV の方がより定量的測定が可能であった。これは、FCV は細胞培養系で得られた変異が少ない純培養したウイルスであるのに対して、ノロウイルスが臨床検体から抽出したウイルスであるためと推定される。結果としてリアルタイム PCR による FCV の測定は $R^2=0.9947$ と定量性に優れていた。

2) プラークアッセイ法によりウイルスの感染力価の測定

Fig.4 におけるプラークアッセイ法の結果から、ウイルス原液 1 ml あたり 1×10^5 個のウイルス粒子が存在することが示された。一方、リアルタイム PCR 法の結果より、 1.0×10^5 希釈が検出限界ならば、同ウイルス液 1 ml には、およそ 1.5×10^6 コピーの遺伝子が存在すると示された。1 ウイルス粒子あたり 1 コピーの遺伝子が存在するとして、2 つの方法の差が 1.5×10 であるため、ウイルス粒子 15 個あたり 1 個が感染したと考えられる。プラークアッセイ法では 1 個のウイルス粒子が 1 つの細胞に付着、感染する現象を観察しているため、ウイルス数ではなくウイルス感染力価に基づ

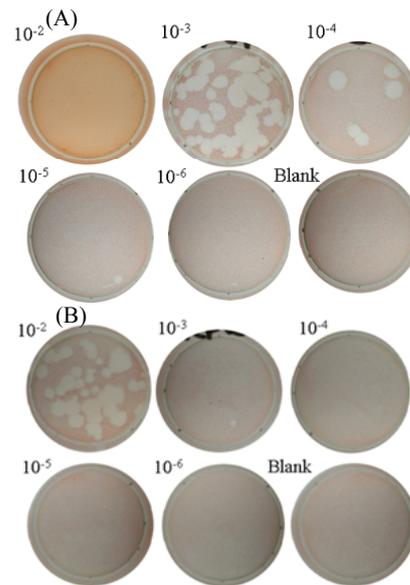


Fig. 4 Photo of plaque assay with Feline Calicivirus (FCV) : (A) , For Inactivated by 80% Ethanol : (B)

く測定ができる。

しかし、この方法では細胞の状態が測定に影響を与え、また細胞の生存率を落とす試薬を使用することができない。我々の実験では、80%エタノールにて FCV を 5 分間不活化し、100 倍まで希釈して細胞に播種したところ、細胞へのダメージは確認されなかった。よって 80%エタノールは FCV に対して効果的であり、この操作では FCV の感染力は 1/100 になった。同様の方法でウイルス不活化の評価ができるものと推測される。

FCV の培養およびリアルタイム PCR 法を用いることで FCV の定量が可能になった。今後はこの系を用いた抗ウイルスの評価が期待できる。また、リアルタイム PCR 法およびリアルタイム RT-PCR 法は RT-PCR 法よりも迅速かつ感度が高く、定量性に優れていると考えられる。

参考文献

- 1) E. O. Caul, H. Appleton : *Journal of Medical Virology*, **9**, 257-265 (1982)
- 2) T. Kageyama, et al. : *Journal of clinical microbiology*, **41**, 1548-1557 (2003)
- 3) Y. S. Malik, M. G. Sagar *International Journal of Food Microbiology*, **109**, 160-163 (2006)
- 4) 西尾 治, 武田 直和 : ウイルス性下痢症検査マニュアル, 第三版, 国立感染症研究所, 東京, (2003) p.44-66