

酵素を用いた牡蠣中腸腺からのウイルス誘出における RNA 抽出および定量 PCR 阻害の定量的評価

東北大学 ○奥村 千恵
東北大学 正会員 真砂 佳史
東北大学 正会員 今井 崇博
バルセロナ大学 佐野 大輔
東北大学 正会員 大村 達夫

1. はじめに

ウイルスによる感染性胃腸炎を起こす主要な原因としてノロウイルス(NoVs)がある。牡蠣の生食は NoVs の感染経路の 1 つであると考えられているが、牡蠣が NoVs 感染症発生にどの程度寄与しているかは明らかになっていない。その理由の 1 つとして、牡蠣から効率よくウイルスを検出する手法がないことが挙げられる。牡蠣由来の有機物が NoVs の一般的な検出法である PCR 法に悪影響を及ぼしている可能性は高いが、このような阻害を定量的に評価した知見は存在せず、また阻害を軽減できる検出手法も開発途上である。

PCR 法による検出を行う前に、牡蠣由来の有機物をあらかじめ分解することが出来れば、PCR 検出効率の改善に繋がると考えられる。Sano ら¹⁾は、下水汚泥からのウイルス誘出に際し、加水分解酵素によりウイルスが吸着している固形分を分解することで回収率が改善したと報告した(Enzymatic Virus Elution (EVE) 法)。本法を牡蠣中腸腺からのウイルス検出に応用することで、PCR 阻害物質を除去する前処理法が開発できると考えられる。

そこで本研究では、EVE 法およびこれまで用いられてきた手法(従来法)による牡蠣中腸腺からのウイルス検出において、牡蠣に含まれる物質がウイルス RNA の抽出や定量 PCR 法に与える影響を定量的に評価した。

2. 実験方法

2.1. 使用したウイルス株

主要な測定対象である NoVs は培養系を持たず、実験に必要な大量のウイルスを用意することが困難であるので、ウイルスの性状、形態が NoVs に近い 1 型ポリオウイルスセイビン株(PV1)を用いた。

2.2. 牡蠣試料の前処理

牡蠣試料として松島湾で 1 年間養殖された食用生牡蠣(*Crassostrea gigas*)を使用した。牡蠣剥き用ナイフで牡蠣の身を取り出し、中腸腺を傷つけないように注意しながら滅菌済み医療用はさみで周りの身を切り落とし、中腸腺を取り出した。これを半分に切り分け、2mL スクリューチューブ(ミニビードビーダー用 2.0mL チューブ, BioSpec)に 1 つずつ入れ、重量を計測した。

2.3. ウイルス誘出

2.3.1. EVE 法で使用した酵素

本研究では、酵素による処理対象物質として生体に存在する物質である多糖、脂質、タンパク質を選択した。それぞれの分解には、 α -アミラーゼ(枯草菌由来, 20units/mg 以上, 最適 pH 5.3-9.9, 和光純薬)リパーゼ(ブタ肝臓由来, 25.9 USP units/mg, 最適 pH 4.0-5.0, 和光純薬), ペプシン(ブタ胃粘膜由来, 800-2,500 units/mg, 最適 pH 1.8-2.0, Sigma-Aldrich)を用いた。

2.3.2. ウイルス誘出液の作成

EVE 法で用いるウイルス誘出液は、酵素の活性を保持するために各酵素に最適な pH 付近で緩衝能を有する溶媒を用いることが重要である。よって、アミラーゼにはリン酸緩衝液(pH 7.45), リパーゼには酢酸緩衝液(pH 4.4), ペプシンにはリン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.1)を使用した。これらの緩衝液を滅菌した後、実験で使用する直前にそれぞれ酵素を 10g/L となるように添加し、これをウイルス誘出液とした。なお、中腸腺添加後の pH を調整することができないため、それぞれの緩衝液の pH は中腸腺添加前に最適 pH となるように調整した。

従来法で用いるウイルス誘出液は、Ueki ら²⁾に従い、滅菌超純水を使用した。

2.3.3. EVE 法によるウイルス誘出

中腸腺半分が入った 2mL スクリューチューブに、ウイルス誘出液 0.5mL と滅菌済みスチレンビーズ(3.2mm スチレンビーズ, TOMY)を 2 個入れ、ミニビードビーダー(BioSpec Products)で 4,800rpm、1 分間の破碎を行い、酵素処理を行うため 37°C で 1 時間静置した。その後、12,000rpm で 12 分間遠心分離して上清を得、これを牡蠣抽出液とした。

2.3.4. 従来法によるウイルス誘出

中腸腺半分が入った 2mL スクリューチューブに、滅菌超純水 0.5mL と滅菌済みスチレンビーズを 2 個入れ、ミニビードビーダーで 4,800rpm、1 分間の破碎を行った。その後の操作は 2.3.3. と同様である。

2.4. ウイルス RNA の抽出および定量

PV1 の RNA 抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を使用した。RNA 抽出後、First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR(AMV) (Roche)を用いて逆転写反応を行い、PV1 の cDNA を作成した。得た cDNA はライトサイクラー(Roche Applied Sciences)を用いて定量 PCR(qPCR)法により定量した。qPCR 法で使用したプライマーは Monpoeho ら³⁾に従った。

2.5. 牡蠣中腸腺由来物質が RNA 抽出および RT-qPCR に及ぼす影響の評価

本研究では、RNA 抽出と定量 PCR におけるウイルス回収率をそれぞれ評価するため、以下に示す 2 系列の実験を行った。実験 1 では RNA 抽出と RT-qPCR 法を合わせたウイルス回収率を、実験 2 では RT-qPCR 法のみでのウイルス回収率を算出した。ウイルス回収率は以下の式により求めた。

$$\text{回収率(\%)} = \frac{\text{実際の定量結果}(\text{copy}/\mu\text{L})}{\text{阻害が全くない時の検出量}(\text{copy}/\mu\text{L})} \times 100$$

実験 1 では、牡蠣抽出液を滅菌超純水で希釈倍率×1, 10, 100 となるように希釈し、それぞれ 140 μL に 2.69-9.77×10⁶ copy の PV1 を添加し、これらの試料に対して RNA 抽出及び RT-qPCR を行った。実験 2 では、牡蠣抽出液に対して PV1 を添加せずに同様の希釈倍率で RNA 抽出操作を行い、0.38-1.37×10⁸ copy の PV1 の RNA を添加して RT-qPCR を行った。

3. 実験結果と考察

実験 1, 2 でアミラーゼ, リパーゼ, ペプシン, 従来法を用いて得た牡蠣抽出液を 1 倍, 10 倍, 100 倍した際のウイルス回収率をそれぞれ図 1, 2 に示した。

従来法では, RNA 抽出および RT-qPCR をあわせた回収率は 9.1%であった (図 1)。これに比べて, EVE 法を用いた場合はどの酵素を使用した場合でも回収率は 20%以上となり, 2 倍以上の改善がみられた。特にペプシンによる回収率が最も良く (47%), 従来法と比べて 5 倍以上の改善が見られた。

牡蠣の身の構成成分は重量比で水分約 80%, タンパク質約 10%, グリコーゲン 5.3%, 脂質約 3%であるとの報告があり⁴⁾, これらの酵素を用いることで遺伝子定量を阻害する牡蠣由来の有機物質が分解されたものと考えられる。牡蠣中腸腺のみの構成成分比は著者の検索の範囲では見られなかったが, 牡蠣の身の構成成分の占める割合と回収率が改善される酵素の傾向が同じであることから, 牡蠣中腸腺中においてもタンパク質が高い割合を占めており, ペプシンが最も効果的であったのだと考えられる。

また, どの系においても試料の希釈を行うことで回収率が改善されたが, それぞれ希釈倍率以上の回収率の増加が見られなかったことから, 試料の希釈ではウイルス検出効率の改善は期待できないことが分かった。

RT-qPCR の回収率 (図 2) は, リパーゼを用いた場合のみ 100%より低く (69-87%), その他のすべての系ではほぼ 100%となった。これより, 牡蠣由来物質がウイルス定量を阻害するのは主に RNA 抽出の段階であることが示された。

また, 酵素を使用した場合は希釈による回収率の改善が見られなかったのに対し, 従来法では希釈によりウイルス回収率が 112%から 144%に改善した。これは, 酵素で処理した系と比較して, 従来法では RNA 抽出の際に RT-qPCR 阻害物質が十分に除去されていない可能性を示唆するものである。これより, アミラーゼやペプシンで処理した牡蠣抽出液には RT-qPCR を阻害する物質はほとんど残存していないものと考えられる。

4. 結論

ウイルス RNA の抽出や定量 PCR 法の操作過程において, 牡蠣由来の物質が主に阻害原因となるのは RNA 抽出の段階であり, EVE 法を併用することでこの阻害物質を効果的に取り除くことが出来ることがわかった。さらに, 従来法では RT-qPCR を阻害する物質を完全に除去出来なかった可能性があるが, EVE 法を用いた場合は完全に除去できていることが示唆された。今回試験した範囲においては, ペプシン, アミラーゼ, リパーゼの順に高い回収率を示したが, 今後はウイルス

検出手法全体の回収率を評価し, 最もウイルスの回収に効果的な酵素を決定する必要がある。

謝辞

本研究は, 日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(S)「ウイルス吸着タンパク質を用いた環境中からの病原ウイルス濃縮、検出、同定技術開発」(研究代表者: 大村達夫) によって行われた。

参考文献

- 1) Sano, D., et al : Detection of enteric viruses in municipal sewage sludge by a combination of the enzymatic virus elution method and RT-PCR, *Water Research*, Vol.37, No.14, pp.3490-3498, 2003.
- 2) Ueki, Y., et al : Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters, *Water Research*, Vol.39, No.18, pp.4271-4280, 2005.
- 3) Monpoeho, S., et al : Quantification of Enterovirus RNA in Sludge Samples Using Single Tube Real-Time RT-qPCR, *BioTechniques*, Vol.29, No.1, pp.88-93, 2000.
- 4) Zamir, R., et al : Physicochemical changes in tissue of edible oyster *Crassostrea glomerata* at refrigerated temperature, *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, Vol.3, No.1, pp.88

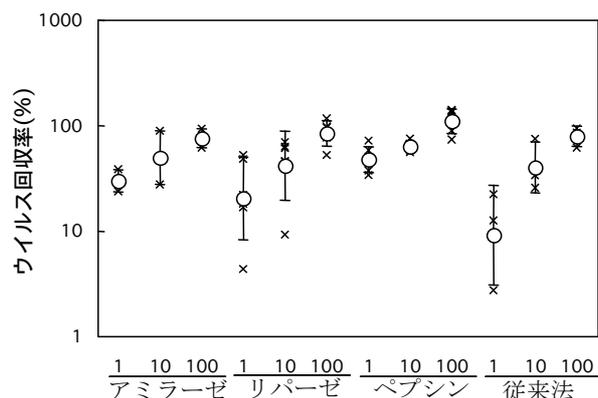


図 1 RNA 抽出および定量 PCR のウイルス回収率 (%)。数値はウイルス誘出液の希釈倍率, ×はウイルス回収率(%), ○はウイルス回収率の平均値(%), エラーバーの長さは幾何標準偏差を示す。

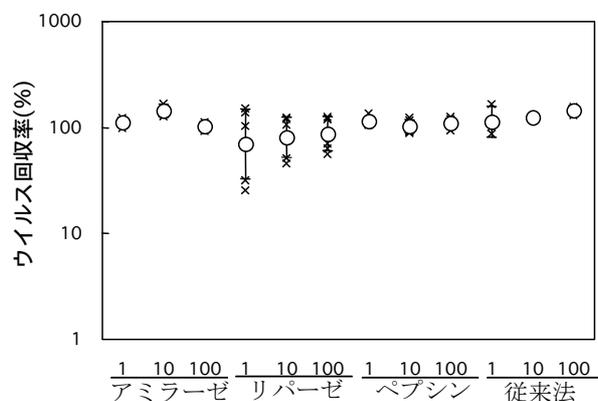


図 2 定量 PCR のウイルス回収率 (%)。記号は図 1 と同様。