エンテロウイルス遺伝子診断法における 市販 RNA 抽出キット選択の影響

¹⁾ 星薬科大学微生物学教室, ²⁾ 国立感染症研究所感染症情報センター,
³⁾ 兵庫県立健康環境科学研究所感染症部, ⁴⁾ 国立感染症研究所ウイルス2部
宗村 徹也¹⁾²⁾ 藤本 嗣人²⁾ 近平 雅嗣³⁾ 木村 博一²⁾
西尾 治²⁾ 吉田 弘⁴⁾ 岡部 信彦²⁾ 辻 勉¹⁾

(平成19年5月9日受付)

(平成19年10月12日受理)

Key words: enterovirus, RNA extraction kit, extraction efficiency

序 文

近年, 病因ウイルスの究明には遺伝子診断法が普及し, エンテロウイルスにおいても広く実施されている。遺伝子診断法における要となるのが, エンテロウイルス RNA の抽出操作である。1990 年代後半からウイルス RNA 抽出キットが数種類市販されているが, 市販抽出キットの選択が結果に与える可能性に関しては, ほとんど報告が見られない。そこで本研究では, 臨床検体を材料とし, 市販される3種類の RNA 抽出キットを用いて, 標準法¹⁾に準じた RT-PCR および Semi-nested PCR によるエンテロウイルス検出を試み, その結果を比較検討した。

方 法

1. 臨床検体

臨床検体には1994年8月から2005年11月までに兵庫県内で, 感染症発生動向調査の一環として臨床症状からエンテロウイルス感染症が強く疑われた21名から採取した咽頭ぬぐい液を使用した。

2. エンテロウイルス分離株

エコーウイルス9型の標準株 (Hill 株) を, 10^3 TCID₅₀/mL より 10^{-5} TCID₅₀/mL までの力価に調整し使用した。

3. RNA 抽出

市販の RNA 抽出キットよりフィルター付きカラムを使用するタイプ, すなわち, QIAamp Viral RNA Mini Kit (キット A) (QIAGEN), E. Z. N. A. Viral RNA Isolation Kit (キット B) (Nanonex Technology Pte Ltd), High Pure Viral RNA Kit (キット C)

(Roche) を選択した。操作はキットの添付書に従い, インキュベーションや遠心操作等に選択の幅がある場合は, 抽出される RNA 量がより多くなる方法を採用した。分離株は, 各希釈あたり6回の抽出操作をくりかえし, キットの抽出効率の定量化に供した。

4. 遺伝子増幅

RT-PCR および Semi-nested PCR によるエンテロウイルス遺伝子の増幅を行い, RNA 抽出の良否を判断した。操作による影響を排除するため, 抽出操作がすべて終了した後に, 全検体を同時に RT-PCR 以降の操作に供した。RT-PCR には1ステップ, 1チューブで操作が完了するキットである, Access RT-PCR System (Promega) を使用した。Semi-nested PCR には Ex Taq (TaKaRa) を使用した。プライマーは RT-PCR には上流側に 60-80F: 5'-AAA TCC TTG AKC GCC TGT TTT A-3' を, 下流側に OL68-71R: 5'-GGG AAC TTC CAG TAC CAY CC-3' を, Semi-nested PCR には上流側に EVP-4: 5'-CTA CTT TGG GTG TCC GTG TT-3' を, 下流側に OL68-71R を使用した。各反応条件は標準法¹⁾に従った。

PCR 産物を 1.5% アガロースゲルによる電気泳動の後, エチジウムブロマイドで染色し, 紫外線下で増幅バンドの有無を確認した。

5. 統計学的解析

統計学的解析にはフィッシャーの正確確率検定を用いた。統計学的有意差は $p < 0.05$ として定義した。

結 果

1. 臨床検体を用いたエンテロウイルス検出

臨床検体からのエンテロウイルス検出率は RT-PCR では, キット A で 24% (5/21), キット B で 43% (9/

別刷請求先: (〒142-8501) 東京都品川区荏原 2-4-41

星薬科大学微生物学教室

宗村 徹也

Table 1 Clinical samples from 21 patients with suspected enterovirus infection with a comparison of RT-PCR and semi-nested PCR results

Sample No.	Serotype of isolated virus	Sample collection date	Gender	Age	Clinical Diagnosis	DDBJ-Blast	Accession Number of DDBJ	RT-PCR and semi-nested PCR results					
								Kit A		Kit B		Kit C	
								1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd
1	EV71	1994/8/16	M	1Y5M	HFMD	EV71	AB282817		+		+		+
2	CA16	1994/9/8	M	8Y	HFMD	CA16	AB282810		+		+	+	+
3	ECHO9	1994/9/16	M	11M	eruption	ECHO9	AB282813	+	+	+	+	+	+
4	EV71	1994/10/17	M	1Y11M	HFMD	EV71	AB282819		+	+	+		+
5	Polio 1	1994/11/11	F	7M	herpangina	Polio 1	AB282824		+	+	+	+	+
6	EV71	1994/11/5	M	2Y	HFMD	EV71	AB282820						
7	EV71	1994/12/12	F	4Y	aseptic meningitis	EV71	AB282821				+		
8	EV71	2000/9/8	F	1Y5M	HFMD	ND							
9	EV71	2003/7/11	M	3Y	herpangina	CA10	AB282808	+	+	+	+	+	+
10	EV71	2003/7/26	F	4Y	HFMD	ND							
11	EV71	2003/7/27	F	0Y1M	aseptic meningitis	EV71	AB282823		+		+	+	+
12	CA16	2004/8/21	M	10Y	HFMD	ND			+	+	+		+
13	CA4	2004/6/5	F	4Y	aseptic meningitis	CA4	AB282804	+	+	+	+	+	+
14	CA2	2004/8/16	M	3Y	herpangina	CA2	AB282800	+	+	+	+	+	+
15	CA9	2004/8/19	F	3Y	herpangina	CA9	AB282807		+		+		+
16	CA2	2004/9/11	M	3Y	herpangina	CA2	AB282801		+		+	+	+
17	CA6	2005/6/13	M	2Y	herpangina	CA6	AB282805	+	+	+	+	+	+
18	NT	2005/6/30	F	1Y4M	herpangina	Rhino	AB282825		+		+		+
19	CA6	2005/6/30	M	6Y	herpangina	CA6	AB282806		+		+		+
20	NT	2005/10/21	M	4Y	herpangina	ND							
21	CA10	2005/11/9	F	3Y	herpangina	CA10	AB282809		+	+	+	+	+

EV: enterovirus ECHO: echovirus CA: coxsackievirus A HFMD: hand-foot-and-mouth disease

DDBJ-Blast: Results of DDBJ (DNA Data Bank of Japan)-Blast (Basic Local Alignment Search Tool)

NT: enterovirus not typed ND: not done

21), キット C で 48% (10/21) となった。一方, Semi-nested PCR では, キット A および C で 76% (16/21), キット B で 81% (17/21) となった。使用する抽出キットにより異なった検査結果となった事例が確認された (Table 1)。

2. 分離株を用いたエンテロウイルス検出

ウイルス量が 10^3 TCID₅₀/mL 以上で各キットとも RT-PCR 陽性となった。 10^2 TCID₅₀/mL の希釈系においてはキット A で 17% (1/6), キット B で 83% (5/6), キット C で 100% (6/6) の検出率であり, フィッシャーの正確確率検定により $p=0.012$ で有意差が認められた。キット間ごとの統計学的有意差はキット A とキット C の 10^2 TCID₅₀/mL の希釈系で $p=0.015$ で認められた。 10 TCID₅₀/mL 以下の希釈倍率ではすべてのキットで陰性となった。

Semi-nested PCR では, 検出限界が 10^{-2} TCID₅₀/mL であり, 統計学的有意差は認められなかった。

考 察

本研究において臨床検体に直接適用した RT-PCR の結果が, 使用した RNA 抽出キットにより異なる事例が確認された。我々はエンテロウイルス遺伝子診断法に際し臨床検体を用いる場合, 偽陰性となる事がある危険性を指摘していた²⁾。本研究により, その要因

の一つとして, 実験に用いた RNA 抽出キットが関与する事例が確認された。

樺島ら³⁾はヘルパンギーナ患者 36 名の臨床検体について, トリゾール (Invitrogen) を用いた RNA の抽出の後, RT-nested PCR を行い, 乳のみマウスと同じ検出結果であったことを報告している。Knepp⁴⁾らは, ポリオ 2 型の分離株から, 自動核酸抽出機械, マニュアル抽出キット (キット A) およびトリゾールを用いて RNA の抽出を行い比較しているが, 検体中のウイルス量が多い場合ではどの方法も同様の検出率となるが, 臨床検体では結果が必ずしも一致していなく, 我々の結果と一致する。しかし, 彼らの研究はマニュアル抽出キット間の検出効率を検討したものでなく, 我々はマニュアル抽出キット間の差を比較検討した。

臨床検体の RT-PCR の結果にキット間で差が見られた要因は, ウイルス希釈実験の結果から, 臨床検体中のウイルス量が少ない場合に, 各キットの抽出効率の差が顕在化したものと考えられた。なお, Semi-nested PCR を行くと, 各キット間に有意な差はみられなくなった。

臨床診断上, ウイルス検出結果は極めて重要で, 抽出キットの選択によりその成績が左右される可能性を

示唆された。今日、遺伝子解析による試験検査には市販の RNA 抽出キットの利用がその簡便性から不可欠であるが、適用するウイルスや実験系により今回とは異なる実験結果となる可能性も考慮し、実験系ごとに用いる各キットの有効性を確認しておくことが必要と考えられた。

謝辞：本研究においてご協力いただきました、国立感染症研究所 秋山美穂先生、愛木智香子先生、斉藤優子先生、埼玉県衛生研究所 篠原美千代先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 病原体検出マニュアル ヘルパンギーナ 手足口病 無菌性髄膜炎 国立感染症研究所. (<http://www.nih.go.jp/niid/reference/index.html>)

- 2) 吉田 弘, 清水博之, 若月紀代子, 岩切 章, 高尾信一, 濱野雅子, 他：エンテロウイルスの遺伝子解析に関する諸問題. 病原微生物検出情報 2005 ; 26 (9) : 237—8.
- 3) 梶島由佳, 伊藤 雅, 山下照夫, 藤浦 明, 栄賢司：ヘルパンギーナ患者からの A 群ヒトエンテロウイルス検出方法の比較. 臨床とウイルス 2005 ; 33 (4) : 228—33.
- 4) Knepp JH, Geahr MA, Forman MS, Valsamakis A : Comparison of automated and manual nucleic acid extraction methods for detection of enterovirus RNA. J Clin Microbiol 2003 ; 41 (8) : 3532—6.

Influence of Genome Extraction Kits on Enterovirus Detection Using RT-PCR

Tetsuya MUNEMURA^{1,2)}, Tsuguto FUJIMOTO²⁾, Masatsugu CHIKAHIRA³⁾, Hirokazu KIMURA²⁾, Osamu NISHIO²⁾, Hiromu YOSHIDA⁴⁾, Nobuhiko OKABE²⁾ & Tsutomu TSUJI¹⁾

¹⁾Department of Microbiology, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,

²⁾Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases,

³⁾Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences,

⁴⁾Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases

[J.J.A. Inf. D. 82 : 55~57, 2008]