

【資 料】

リアルタイムPCRによるポリオウイルス1型ワクチン株 (Sabin1株)
検出のためのコントロールプラスミドDNAの作製

Construction of Control Plasmid for Detecting Oral Polio Vaccine Strains (Sabin1) by Real-time PCR

岡本尚子, 松岡保博*, 野宮加代子*, 濱野雅子, 木田浩司

*現 岡山県備前保健所

OKAMOTO Naoko, MATSUOKA Yasuhiro*, NOMIYA Kayoko*, HAMANO Masako, KIDA Kouji

要 旨

下水処理場に流入する下水(以下「流入下水」という。)による環境水サーベイランスは、ウイルスの地域流行の把握に有効とされている。流入下水からウイルスを検出するためには、まず検出可能なレベルまでウイルスを濃縮する必要があるが、最適化された濃縮法は確立されておらず、その検討には指標となるウイルスを用いた添加回収試験系の構築が必要である。そこで今回我々は、岩井らの開発したポリオウイルス1型ワクチン株(Sabin1株)のリアルタイムPCRについて、その標的配列をプラスミドベクターに組換えたコントロールプラスミドを作製し、十分な感度と定量性があることを確認した。この添加回収試験系は、ウイルス検出率の向上のための流入下水の濃縮法の比較検討に当たり、有用な評価指標になるものと考えられた。

[キーワード: ポリオウイルス, リアルタイムPCR, プラスミド, 下水]

[Key words: Poliovirus, Sabin1, Real-time PCR, Plasmid, Sewage water]

1 はじめに

下水処理場に流入する下水(以下「流入下水」という。)を利用した環境水サーベイランスは、地域における感染者の存在を不顕性感染者を含めて把握することができるため、感染症の発生や流行拡大を早期探知、予測するツールとして注目を集めている¹⁾。しかし、ウイルスの検出に必要な流入下水の濃縮については、未だ広く受け入れられる最適化された方法が確立されていない²⁾。

これまで我々は、陰電荷膜法を用いて流入下水を濃縮し、ノロウイルス等を対象とした調査を実施してきた³⁾。しかし、濃縮液に含まれるウイルス量は少なく、リアルタイムPCRによる正確な定量は困難であった。そこで、複数の濃縮法について比較検討するため、指標となるウイルスを用いた添加回収試験系を構築することとした。

流入下水には、微生物はもとより、夾雑物、界面活性剤等が含まれていることから、指標ウイルスは、非病原性であることに加え、エンベロープを持たないこと及び現在国内に感染者が確認されていないことを条件として、ポリオウイルス1型ワクチン株(Sabin1株)を選定した。当該ウイルスは、我が国で2012(平成24)年8月まで生ポリオワクチンとして定期接種に用いられていたが、下水を対象として全国十数か所で実施されている感

染症流行予測調査では、2013(平成25)年以降検出されていない^{4), 5)}。また、検出のためのリアルタイムPCRについては、Sabin1株のゲノムを鋳型として開発された岩井らの方法⁶⁾を選定した。これを基本として今回我々は、Sabin1株の添加回収試験系の構築を目的として、リアルタイムPCRの標的領域をプラスミドベクターに挿入したコントロールプラスミドを作製し、その定量性及び検出感度を検証した。

2 材料と方法

2.1 ウイルス株及びウイルスRNAの抽出

国立感染症研究所から分与されたSabin1株をアフリカミドリザルの腎臓上皮細胞由来のVeroE6細胞に接種して培養し、QIAamp Viral RNA mini kit(QIAGEN社)を用いて培養上清からRNAを抽出した。

2.2 cDNAの合成及び標的領域の増幅

2.1で得られたRNAの逆転写反応及び標的領域の増幅は、プライマーPolioS1F及びPolioS1Rを用い(表1)、PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit(Takara Bio社)により、45℃ 10分、94℃ 2分、(98℃ 10秒、55℃ 15秒、68℃ 10秒)×45サイクルで実施した。得られたPCR増幅産物を電気泳動し、目的サ

イズ (110 bp) のバンドを確認した。

2.3 コントロールプラスミドの作製

2.2で得られたPCR増幅産物を精製したDNA断片を、Sma Iで消化したプラスミドベクターpUC19 (Takara Bio社) にT4 DNA Ligase (Takara Bio社) を用いて挿入した。次に、*E. coli* JM109株に形質転換してクローニングを実施した後、増幅した組換えプラスミドを抽出、精製した。

2.4 挿入配列の確認

得られた組換えプラスミドの挿入配列は、M13 Primer M4 (Takara Bio社) を用いたダイレクトシークエンス法により確認した。組換えプラスミド溶液のOD値から、TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA ; pH8.0) にて 10^7 copies/2 μ Lに調整したものをコントロールプラスミド原液とした。なお、本実験は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成15年法律第97号) に基づき、当センターの遺伝子

組換え生物等安全管理委員会の承認を得て実施した。

2.5 リアルタイムPCRによる定量性及び検出感度の確認

リアルタイムPCR反応にはTaqMan[®] Universal Master mix (Thermo Fisher Scientific社) を用いた。使用したプライマー及びプローブを表1に示す。なお、プライマーは2.2と同じものを使用した。10倍階段希釈したコントロールプラスミド原液 ($1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^5$ copies/2 μ L) 2 μ Lと反応試薬18 μ Lを加えて20 μ L (最終濃度は、各プライマー0.4 μ M, TaqMan MGB probe 0.2 μ M) とし、StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific社) を用いて、50 $^{\circ}$ C 2分, 95 $^{\circ}$ C 10分, (95 $^{\circ}$ C 15秒, 56 $^{\circ}$ C 1分) \times 50サイクル反応させた。

3 結果及び考察

3.1 挿入配列の確認

プラスミドに挿入した塩基配列を確認したところ、Sabin1株の登録配列 (DDBJ/ENA/GenBank accession

表1 プライマー及びプローブ

	塩基長 (base)	塩基配列	Position [*]	文献
PolioS1_Probe	26	FAM-ATCACACCGGACCAAGGTCACCTCC-BHQ	3219-3244	6)
PolioS1F	27	CTTCGGTATTTTGGCTGTAGAGTAGT	3187-3213	6)
PolioS1R	17	GACGCGGGCACCAGACT	3280-3296	6)

^{*}GenBank accession no. AY184219におけるPosition

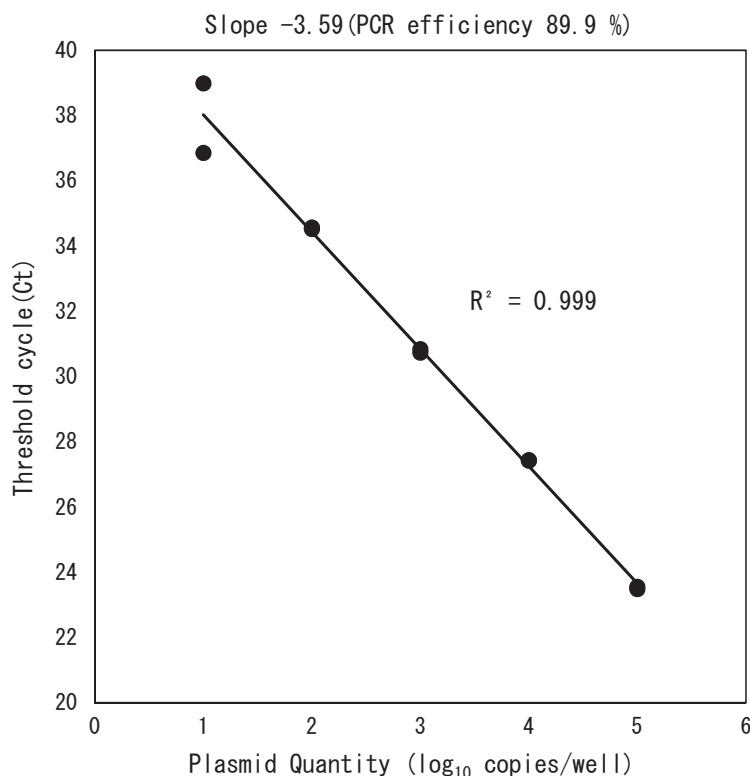


図1 リアルタイムPCR法によるプラスミドの測定

no. AY184219) と100 %一致した。このことから、設計したプライマー及びプローブと配列が一致しないことによるリアルタイムPCRの定量誤差は生じないと考えられる。

3.2 リアルタイムPCRによるコントロールプラスミドの検出感度

作製したコントロールプラスミドの10倍階段希釈液を調製し、リアルタイムPCRで測定した。X軸にコントロールプラスミドのコピー数、Y軸にThreshold cycle (Ct) をプロットした検量線を作成したところ、 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^5$ copies/wellの範囲で良好な直線性 ($R^2 = 0.999$) 及び傾き (Slope = -3.59) を示した (図1)。このことから、作製したコントロールプラスミドは、Sabin1株の添加回収試験において十分な定量性及び感度を有していると考えられた。

今回構築したSabin1株の添加回収試験系は様々な下水濃縮法の評価に有用な指標になるものと考ええる。今後、調査対象ウイルスに適した濃縮法を選定するとともに、その改良を行い、PCRによるウイルス検出はもとより、細胞によるウイルス分離にも活用していきたい。

文 献

- 1) 吉田 弘：環境水系の感染症：オーバービュー，臨床とウイルス，36(3)，121-126，2008
- 2) 佐野大輔：水環境中からのウイルス情報収集とその活用 総説，臨床とウイルス，42(5)，211-223，2014
- 3) 磯田美穂子，藤原香代子，松岡保博，濱野雅子，藤井理津志：岡山県内の下水におけるノロウイルス遺伝子調査について，岡山県環境保健センター年報，39，137-141，2015
- 4) 吉田 弘：ポリオウイルス－不活化ワクチン開発後の野生株侵入状況把握－，臨床とウイルス，42(5)，224-230，2014
- 5) 吉田 弘：下水中のポリオウイルスと新型コロナウイルス検査，薬学雑誌，142(1)，11-15，2022
- 6) 岩井雅恵，吉田 弘，小原真弓，堀元栄詩，倉田 毅ら：新規リアルタイムPCR法による下水流入水中のワクチン様ポリオウイルスの検出，富山県衛生研究所年報，34，80-87，2011