

媒介蚊からのデングウイルス RNA 抽出法の検討

財津修一・古川英臣・松藤貴久・宮代守*

福岡市保健環境研究所保健科学課

*城南区保健福祉センター衛生課

Study on Dengue Virus RNA Extraction Methods from Mosquitoes

Shuichi ZAITSU, Hideomi FURUKAWA,
Takahisa MATSUFUJI and Mamoru MIYASHIRO

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

*Hygiene Section, Jonan Health and Welfare Center

要約

平成 26 年 8 月に蚊媒介感染症であるデング熱の国内感染がおよそ 70 年ぶりに報告された。リアルタイム RT-PCR を用いたデングウイルス検査を行うため、ヒトスジシマカを用いてデングウイルスの RNA 抽出法を検討した。蚊の破碎, RNA 抽出及び RNA 精製法の検討を行った結果, 破碎はビーズ式破碎機でビーズ径 2.8mm と 1.4mm の混合ビーズを用い, RNA の抽出はフェノール・クロロホルム法で実施し, 精製はスピнкаラム法で実施した場合に最も良好な結果が得られた。また, 多数の検体を同時に検査する場合には, 抽出精製を操作が簡便なスピнкаラム法のみで行う方法も有用と考えられた。

Key Words: 蚊媒介感染症 Mosquito-Borne Diseases, リアルタイム RT-PCR Real-time RT-PCR, ヒトスジシマカ *Aedes albopictus*, デングウイルス dengue virus, RNA 精製 purification of RNA

1 はじめに

平成 26 年 8 月にデング熱の国内感染がおよそ 70 年ぶりに報告された。国際的な人の移動の活発化に伴い, 国内での感染があまり見られない感染症について, 海外から持ち込まれる事例が増加しており¹⁾, アジアの玄関口として海外からの観光客が多数来訪する本市においては特に患者発生時の体制を十分に整えておく必要がある。今後, デング熱の市内感染が発生した場合, 発生地域における蚊の密度調査を実施することとなるが, 併せて蚊のウイルス保有調査の実施も想定される。従前より, デングウイルスの検査について臨床検体に関しては, 国立感染症研究所監修のデングウイルス感染症診断マニュアル (<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Dengue2014.pdf>) を参考とし, リアルタイム RT-PCR 法により行っているところであるが, 蚊を検体とした場合の検査については実績がないことから, PCR 検査の前処理方法として蚊の破碎方法, RNA 抽出及び精製方法について検討を行った。

2 実験方法

2.1 蚊の破碎条件の検討

ビーズ式破碎機及び手動式ホモジナイザーを用いて検討を行った。本市が行った蚊の生息調査時に採取されたヒトスジシマカの雌(以下, ヒトスジシマカという。) 20 頭又は 50 頭に PBS(-) 600 μ L を添加し, ビーズ式破碎機 (Thermo Savant 社製 FastPrep FP120) を使用し, 最大スピード (6.5 m/s) で 45 秒間破碎を行った。破碎に使用するビーズは, Bertin Technologies 社製 Precellys Lysis kit CK28 (ビーズ径 2.8mm, 以下 CK28 ビーズという。), CKMix (ビーズ径 2.8mm と 1.4mm の混合, 以下 CKMix ビーズという。), CK14 (ビーズ径 1.4mm, 以下 CK14 ビーズという。) の 3 種類を用いた。また, ヒトスジシマカ 20 頭又は 50 頭に PBS(-) 200 μ L を添加し, 手動式ホモジナイザー (アズワン社製ビオラモホモジナイザーペッスル R-1.5) を用い破碎した。破碎したものについて, 破碎物の密度を 20 頭/600 μ L となるよう PBS(-) を用いて調整し, 実体顕微鏡で破碎物の状態を観察した。

2.2 リアルタイム RT-PCR 法

リアルタイム RT-PCR 装置は, Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies) を使用し, 試薬は QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を用い, プライマー, プロローブは国立感染症研究所監修のデングウイルス感染症診断マニュアルを参考とし, 表 1 のプライマー, プロローブを用いた. また, 反応溶液の組成は表 2, 反応条件は表 3 のとおりである.

表 1 プライマー及びプロローブ

名称	配列(5'-3')
D1MEBEn469s forward	GAACATGGRACAAYTGCAACYAT
D1MEBEn536r reverse	CCGTAGTCDGTCTCAGCTGTATTTCA
D1MEBEn493p probe	FAM-ACACCTCAAGCTCC-MGB

表 2 反応溶液の組成

H ₂ O	16.5μL
QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	16.5μL
D1MEBEn469s (25μM)	1.0μL
D1MEBEn536r (25μM)	1.0μL
D1MEBEn493p (10μM)	1.0μL
鋳型RNA	5.0μL
Total	50.0μL

表 3 リアルタイム RT-PCR 反応条件

温度	時間	サイクル数
50°C	30min	} 40cycle
95°C	15min	
94°C	15sec	
60°C	1min	

2.3 RNA 抽出法の検討

PBS(-)1mL にヒトスジシマカ 20 頭及び国立感染症研究所より分与されたデングウイルス 1 型リアルタイム PCR 用スタンダードを 10 倍希釈したもの 10μL を加え, ビーズ式破砕機で破砕後, 3,000g, 3 分間遠心した. 上清を回収したものを検体とし, ①フェノール法 (Isogen II (ニッポンジーン) 使用), ②フェノール・クロロホルム法 (TRIzol LS (Invitrogen) 使用), ③スピнкаラム法 (QIAmp Viral RNA Minikit (QIAGEN) 使用), ④磁気ビーズ法 (Maxwell 16LEV simply RNA Tissue kit

(Promega) 使用) の 4 つの方法で RNA 抽出を行った. 抽出に供する検体量はそれぞれ 140μl とした. 操作は各試薬の添付文書に従った. なお, ①及び②の方法は RNA 抽出後にそれぞれ添付文書に記載のエタノール沈殿法で

RNA 精製を行った.

2.4 RNA 精製法の検討

2.4.1 デングウイルス液の作成

デングウイルス 1 型 PCR 陽性の血清を VeroE6 細胞に接種し, 37°C, CO₂ インキュベーター (CO₂ 5%) で培養した. 盲継代を 5 回実施し, その分離液を 0.2%FBS 加 E-MEM で 10 倍希釈しデングウイルス液とした.

2.4.2 抽出に供するヒトスジシマカの乳剤の作成

PBS(-)1,000μL にデングウイルス液 10μL を加え, ここにヒトスジシマカを 20 頭又は 50 頭を加えたものをビーズ式破砕機で破砕し乳剤を作成した.

2.4.3 RNA の精製

2.4.2 で作成した乳剤各 400mL を前述のフェノール・クロロホルム法を用い RNA 抽出を行った. 得られた RNA 溶液から各 250μL をとり, ①エタノール沈殿法, ②スピнкаラム法 (QIAmp Viral RNA Minikit (QIAGEN) 使用), ③磁気ビーズ法 (Maxwell 16LEV simply RNA Tissue kit (Promega) 使用) の 3 通りの方法で精製を行った.

2.5 RNA 抽出・精製法の再検討

2.5.1 抽出に供するヒトスジシマカの乳剤の作成

PBS(-)800μL, ヒトスジシマカ 20 頭, デングウイルス液 10μL を混合したもの 8 セットを, ビーズ式破砕機により破砕し, 合わせて均一な乳剤とした.

2.5.2 RNA 抽出・精製

乳剤を①フェノール・クロロホルム法で抽出しスピнкаラムで精製, ②スピнкаラム法 (QIAmp Viral RNA Minikit (QIAGEN) 使用), ③磁気ビーズ法 (Maxwell 16LEV simply RNA Tissue kit (Promega) 使用) の 3 通りの方法で処理した.

抽出に供する乳剤の量は各キットの添付文書の記載に合わせて, ①は 400μL, ②は 140μL, ③は 200μL とした.

また, 検査者の手技によるばらつきが比較的大きいと思われる①については, 9 回試験を行い, ②及び③は各 3 回試験した.

3 結果

3.1 蚊の破砕条件の検討

検体に含まれている核酸を効率的に抽出するには, 検体をできるだけ均一に細かく粉砕するのがよいと考えられる. 実体顕微鏡で観察した結果は図 1~図 8 に示すとおり, 蚊 20 頭及び 50 頭のいずれにおいてもビーズ式破

碎機で CKMix ビーズを用いた場合に最も均一で細かく破碎された (図 3, 4) . 以下, 本実験でビーズ式破碎機を使用する場合, CKMix ビーズを使用することとした.

3.2 RNA 抽出法の検討

①フェノール法, ②フェノール・クロロホルム法, ③スピнкаラム法, ④磁気ビーズ法の 4 種の方法で抽出した抽出物についてそれぞれリアルタイム RT-PCR を実施したところ, Ct 値は①が 35.21, ②が 34.85, ③が 35.69, ④が 37.05 であり, ②の方法を用いた場合に Ct 値が最も小さかった (表 4) .

表 4 RNA 抽出法の比較

RNA抽出法	精製法	Ct値
①フェノール法	エタノール沈殿法	35.21
②フェノール・クロロホルム法	エタノール沈殿法	34.85
③スピнкаラム法	—	35.69
④磁気ビーズ法	—	37.05

3.3 RNA 精製法の検討

2.4.3 に示す方法で RNA 精製後, リアルタイム RT-PCR を実施し, Ct 値を比較した. 結果は表 5 のとおりである. いずれの精製方法を用いた場合も Ct 値は 20 頭を粉砕した場合と 50 頭を粉砕した場合では 20 頭を粉砕した場合のほうが Ct 値が小さかった. 精製方法として②スピнкаラム法を用いた場合, 蚊の頭数にかかわらず, 3 つの精製方法の中で最も Ct 値が小さかった.

表 5 RNA 精製法の比較 (数値は Ct 値)

精製方法	蚊20頭	蚊50頭
①エタノール沈殿法	30.58	36.58
②スピнкаラム法	30.43	33.66
③磁気ビーズ法	36.75	No Ct

3.4 RNA 抽出・精製法の再検討

RNA 抽出法及び RNA 精製法の検討結果を受け, 良好と考えられる方法及び簡便な操作方法 2 法について再検討を

行った. 各方法で抽出した RNA をリアルタイム RT-PCR に供した結果は表 6 のとおりである. フェノール・クロロホルム法で抽出後スピнкаラム法で精製する方法は検査者の手技によるばらつきが大きいと考えられたため 3 人で 3 検体ずつ操作を実施したが, Ct 値は 29.61 から 30.39 となり, 手技による大きな差は見られなかった. Ct 値の平均は①が 30.06, ②が 30.57, ③が 39.06 であり, ①の方法を用いた場合に Ct 値が最も小さかった.

表 6 RNA 抽出・精製法の比較 (数値は Ct 値)

RNA抽出・精製法	n数	平均	最大	最小
①フェノール・クロロホルム法で抽出, スピнкаラムで精製	9	30.06	30.39	29.61
②スピнкаラム法	3	30.57	30.70	30.37
③磁気ビーズ法	3	39.06	39.39	38.59

4 考察

比較した破碎法の中では, CKMix ビーズを用いたビーズ式破碎機での破碎が最も良好であった. また, 抽出精製の方法については, フェノール・クロロホルム法で抽出, スピнкаラムで精製する方法が最も良好な結果であった. しかし, スピнкаラムのみで抽出精製を行った場合との Ct 値の差は平均で 0.5 程度と大きいものではなく, 操作の簡便さは重要であることから, 多数の検体を同時に処理する場合には, スピнкаラム法のみで抽出精製する方法が最も適していると考えられた.

謝辞

本調査研究を実施するにあたりご協力を頂きました福岡市保健福祉局生活衛生課の皆様に深謝いたします.

文献

- 1) 厚生労働省告示第 260 号: 蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針, 平成 27 年 4 月 28 日厚生. 労働省告示第 260 号

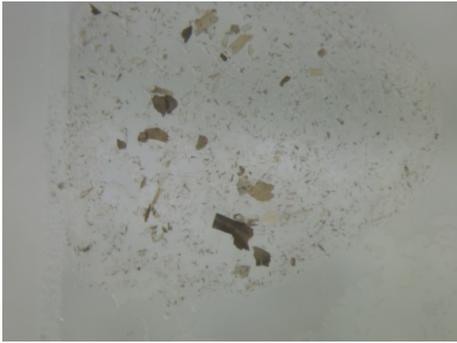


図1 蚊 50 頭のビーズ式破砕機による破砕結果
(CK28 ビーズを使用)

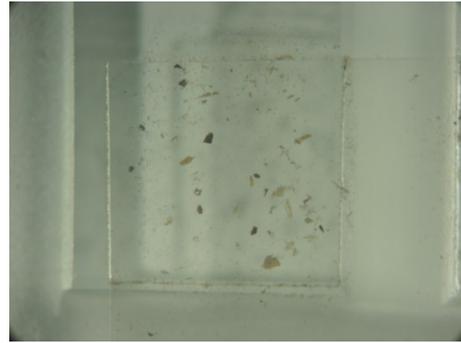


図2 蚊 20 頭のビーズ式破砕機による破砕結果
(CK28 ビーズを使用)

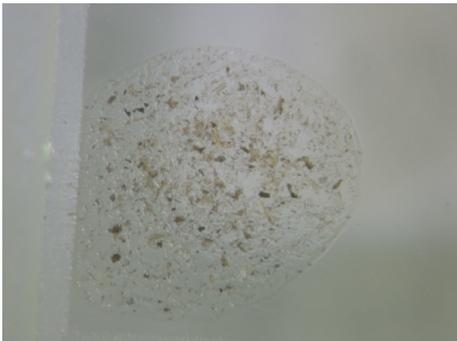


図3 蚊 50 頭のビーズ式破砕機による破砕結果
(CKMix ビーズを使用)

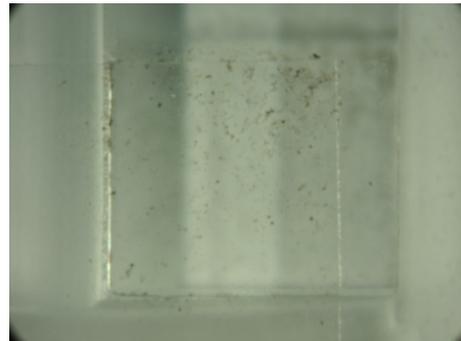


図4 蚊 20 頭のビーズ式破砕機による破砕結果
(CKMix ビーズを使用)



図5 蚊 50 頭のビーズ式破砕機による破砕結果
(CK14 ビーズを使用)



図6 蚊 20 頭のビーズ式破砕機による破砕結果
(CK14 ビーズを使用)



図7 蚊 50 頭の手動式ホモジナイザーによる
破砕結果



図8 蚊 20 頭の手動式ホモジナイザーによる
破砕結果