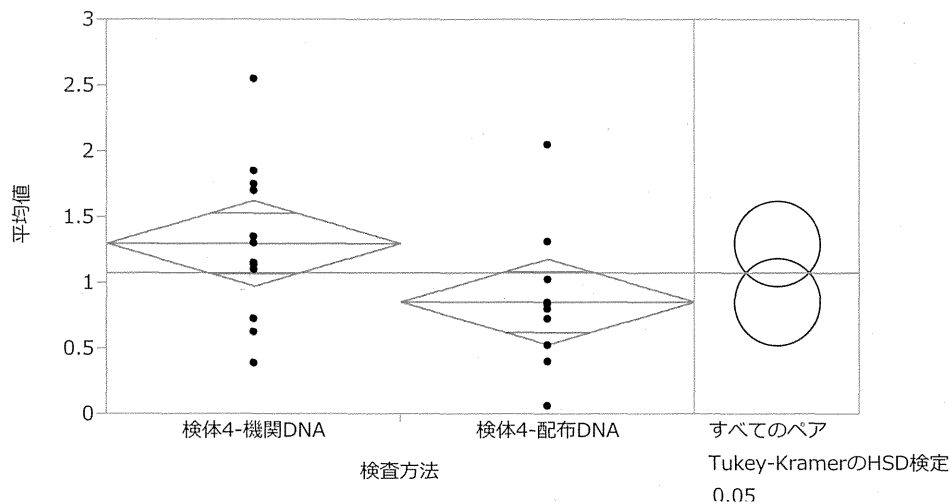


### 検体-4



### 検体-5

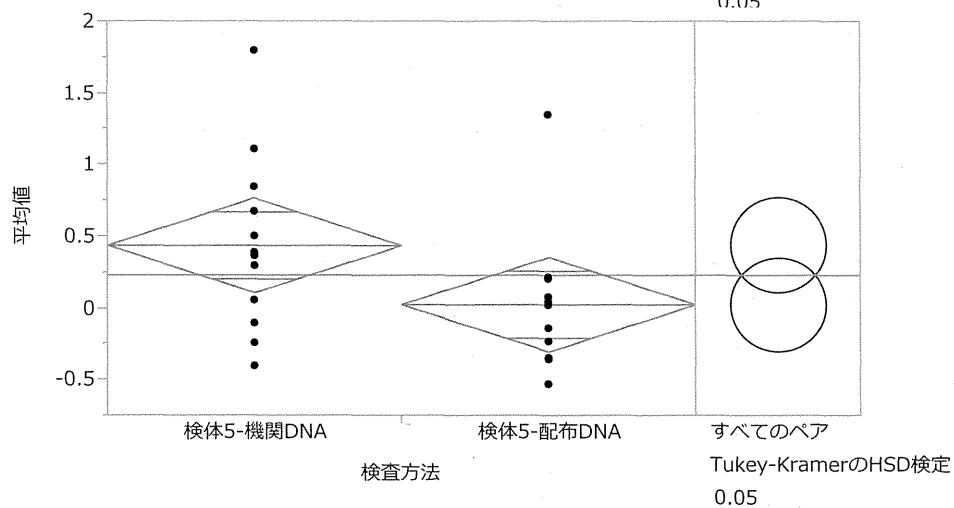


図2 検体-4、検体-5における検量線ごとのデータ分布（実測値）

# 標準cDNA

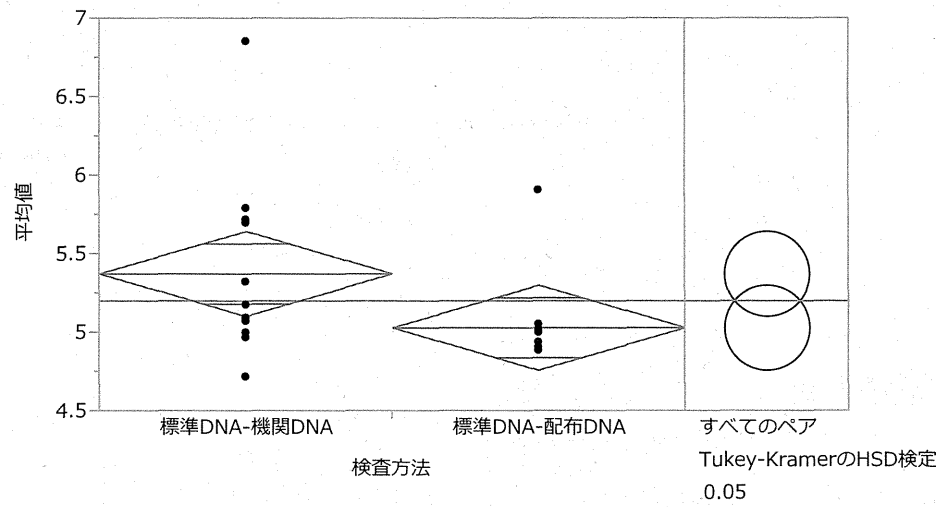
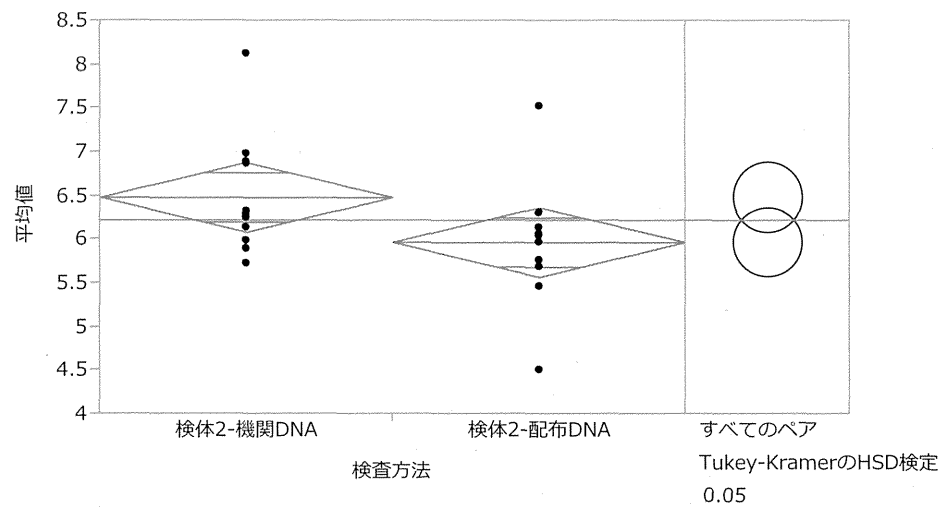


図3 標準 cDNA における検量線ごとのデータ分布 (実測値)

検体-2



検体-3

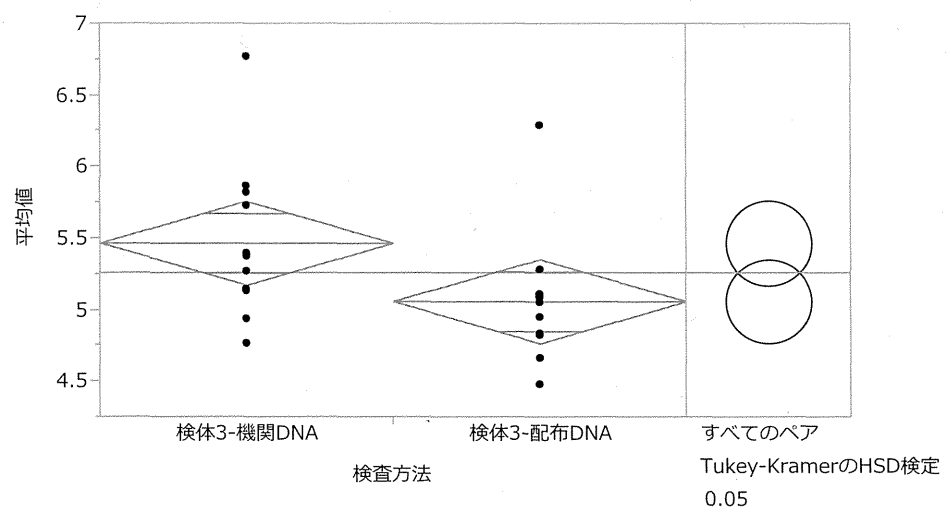


図4 検体-2、検体-3における検量線ごとのデータ分布（換算量）

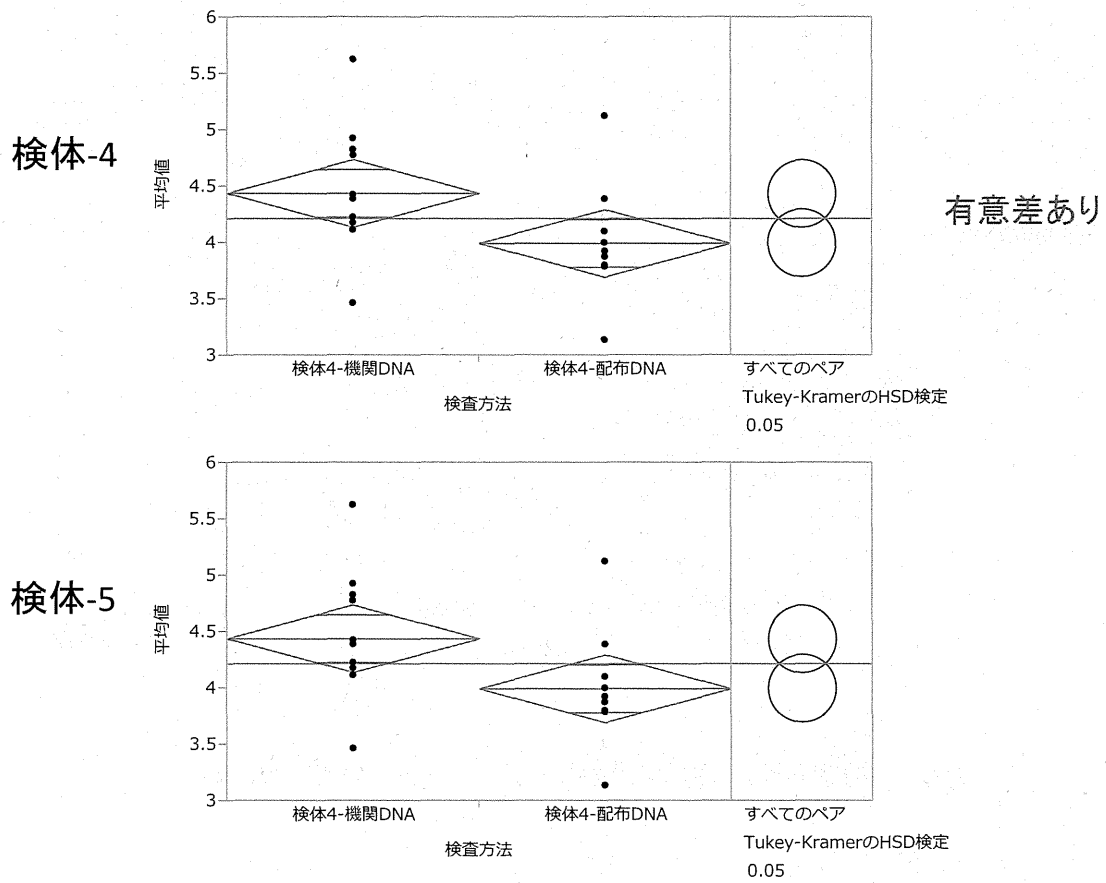


図5 検体-4、検体-5における検量線ごとのデータ分布（換算量）

標準cDNA

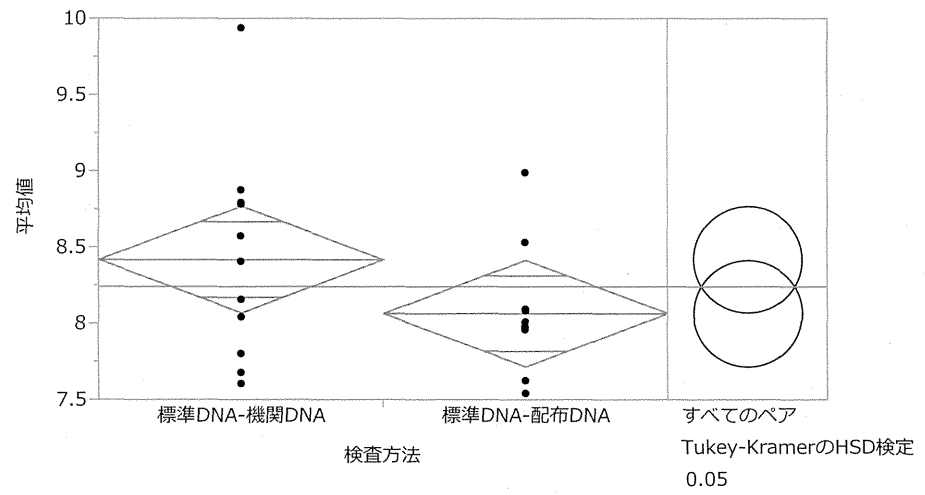


図6 標準cDNAにおける検量線ごとのデータ分布(換算量)

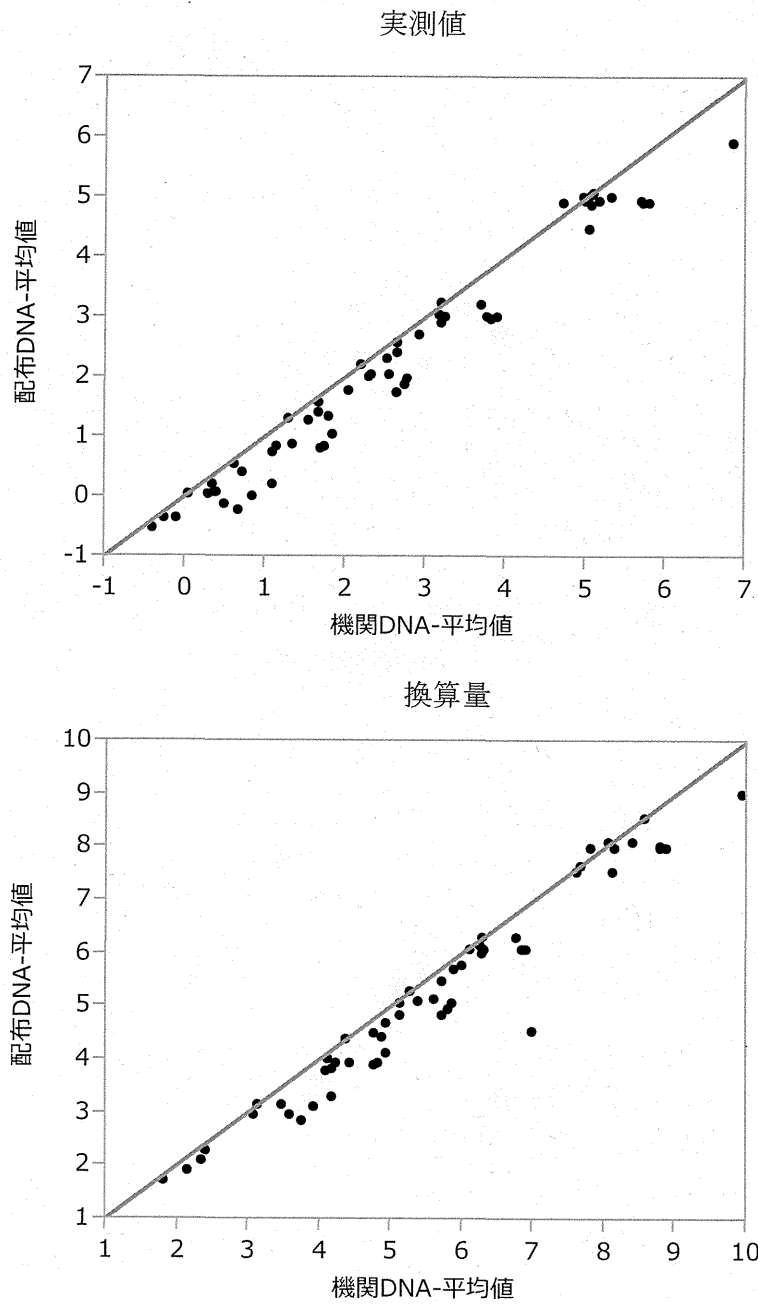
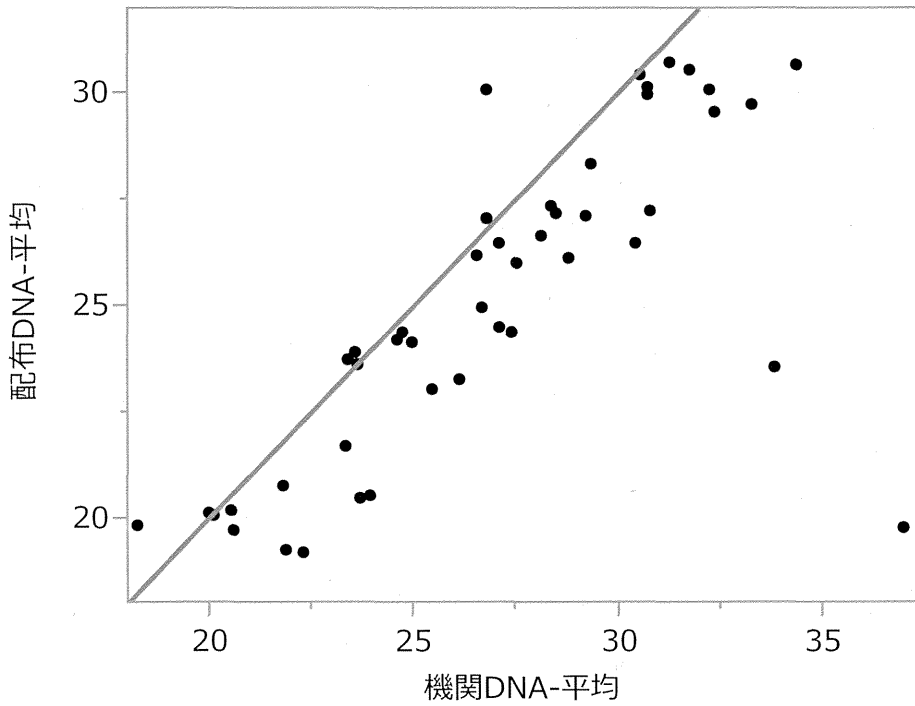


図7 全調査試料における測定値の分布  
直線は  $y=x$  を示す

検量線作成用標準 cDNA の Ct 値



定量値

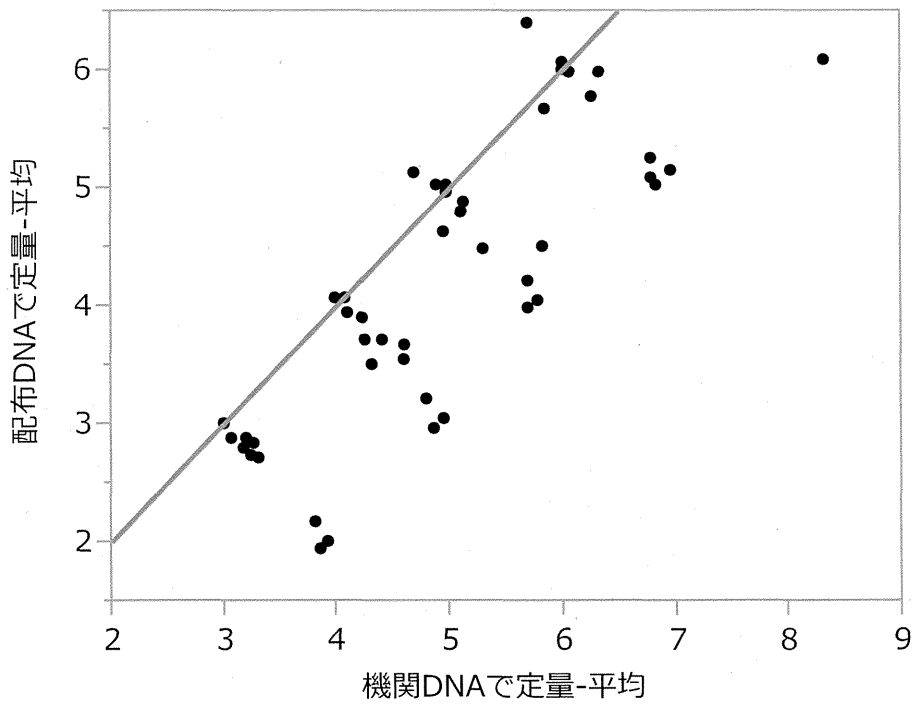


図 8 検量線作成用標準 cDNA 溶液に関する解析  
直線は  $y=x$  を示す

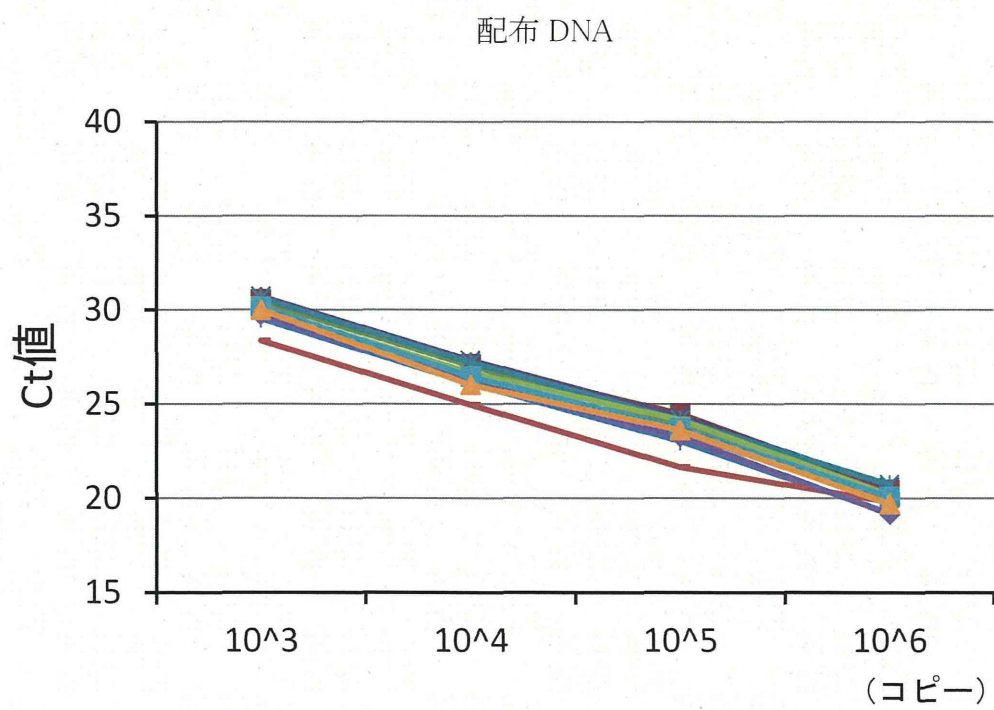
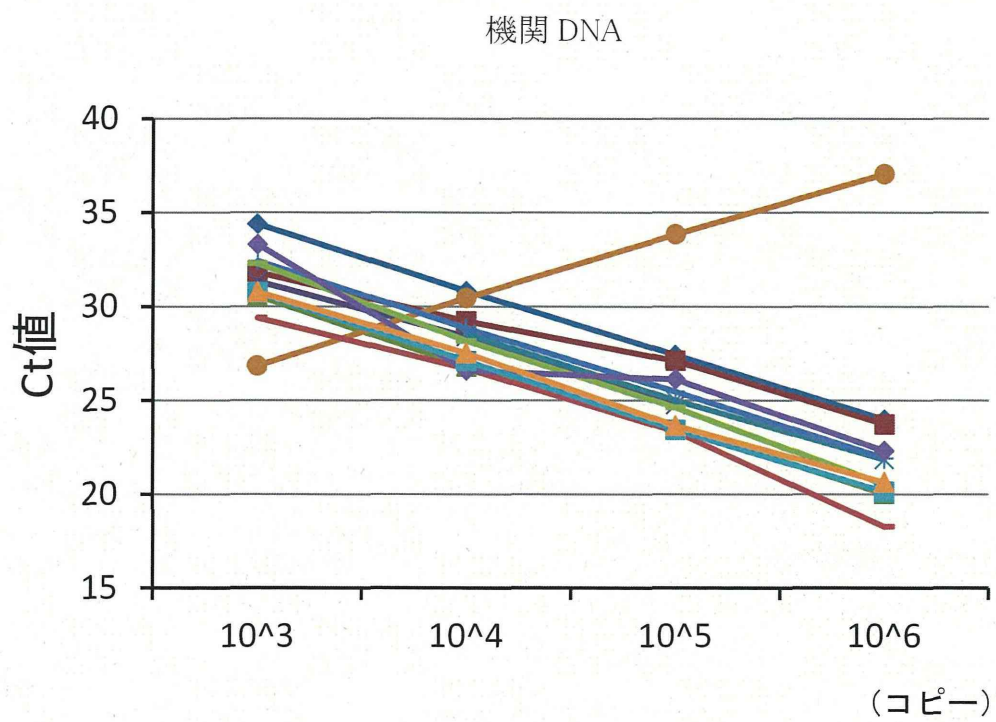


図9 検量線作成用標準 cDNA 溶液に関する解析



## 検体-2

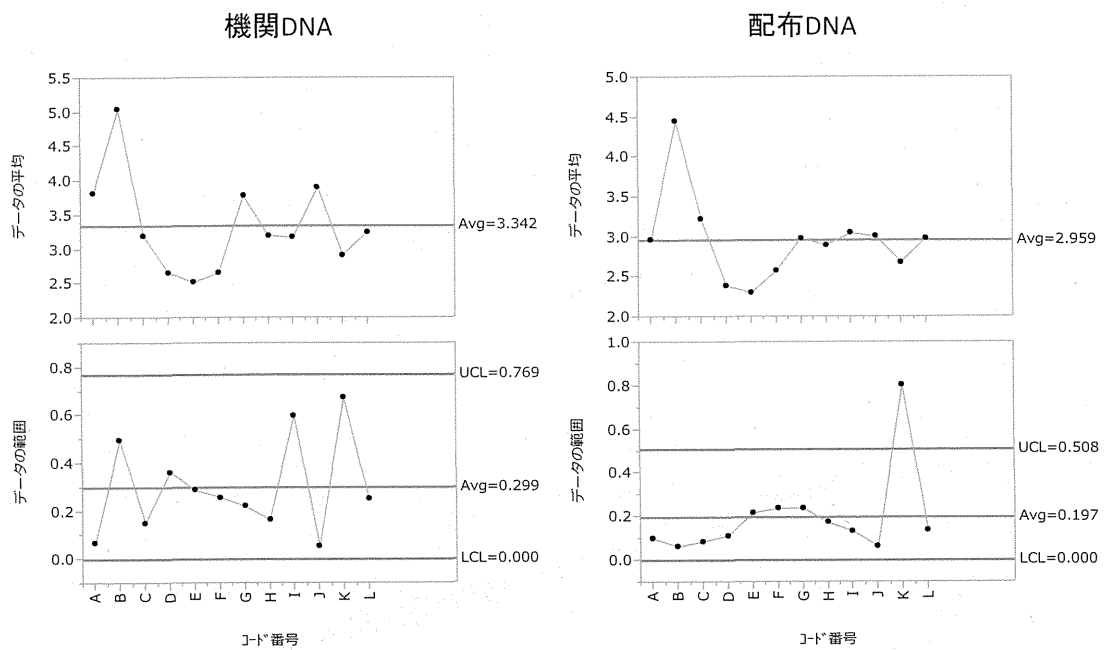
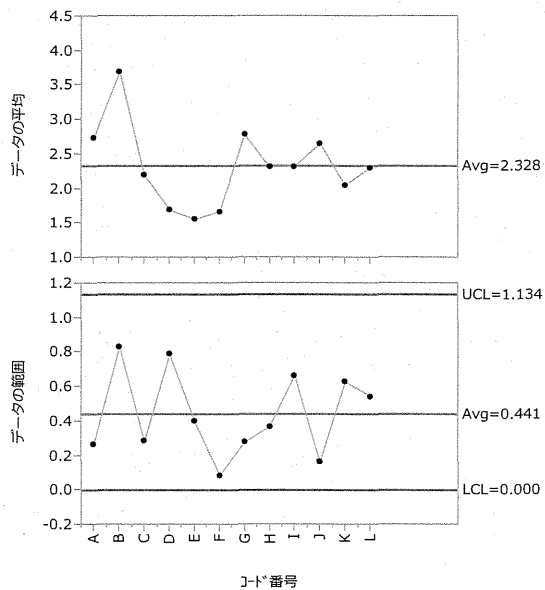


図 10 検体-2 における機関 DNA と配布 DNA 採用時の Xbar-R 管理図

### 検体-3

#### 機関DNA



#### 配布DNA

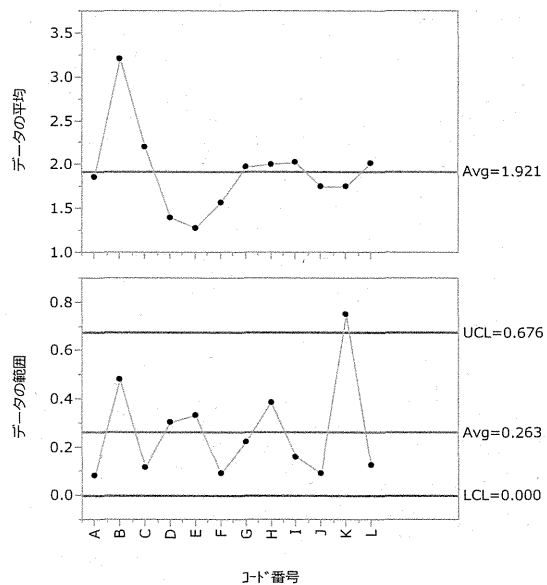


図 11 検体-3 における機関 DNA と配布 DNA 採用時の Xbar-R 管理図

## 検体-4

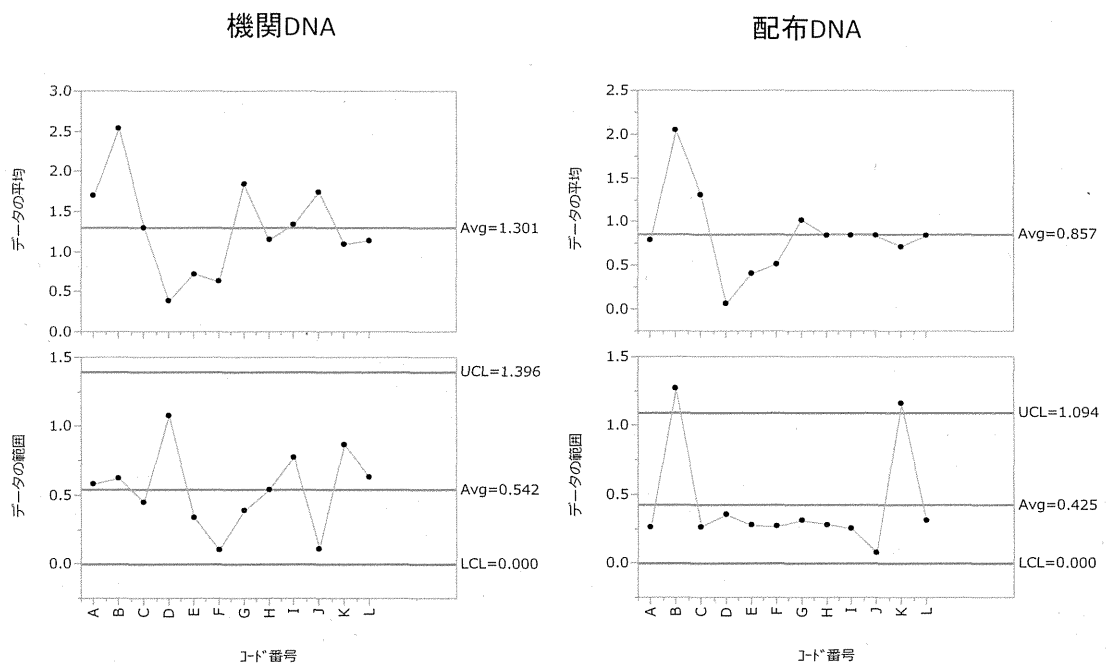


図 12 検体-4 における機関 DNA と配布 DNA 採用時の Xbar-R 管理図

## 検体-5

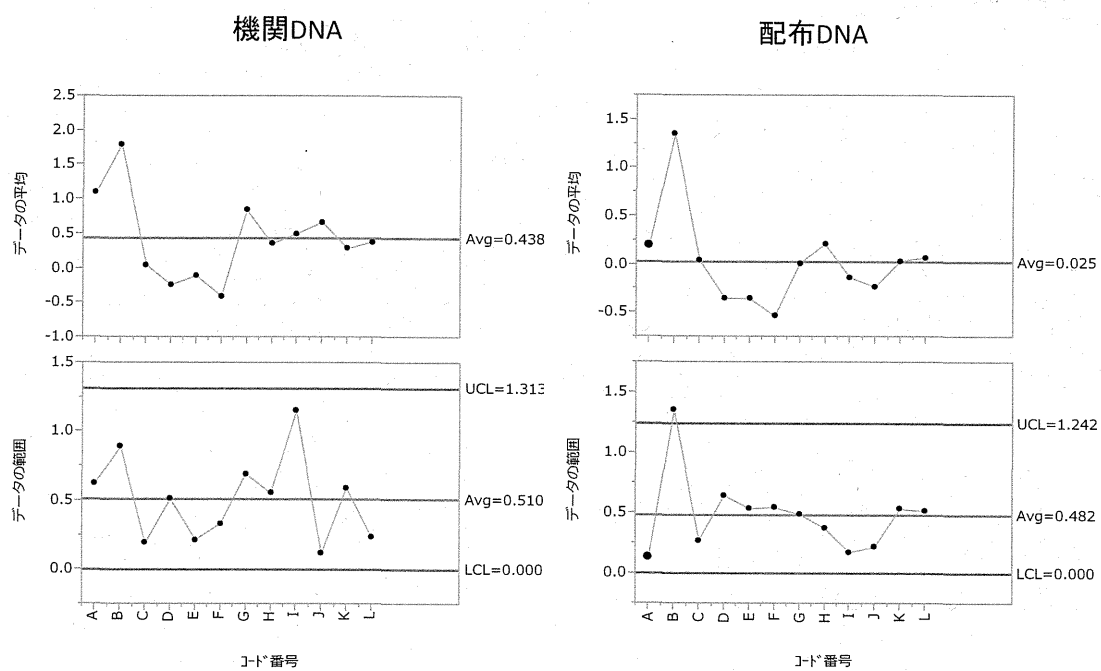


図 13 検体-5 における機関 DNA と配布 DNA 採用時の Xbar-R 管理図

# 標準cDNA

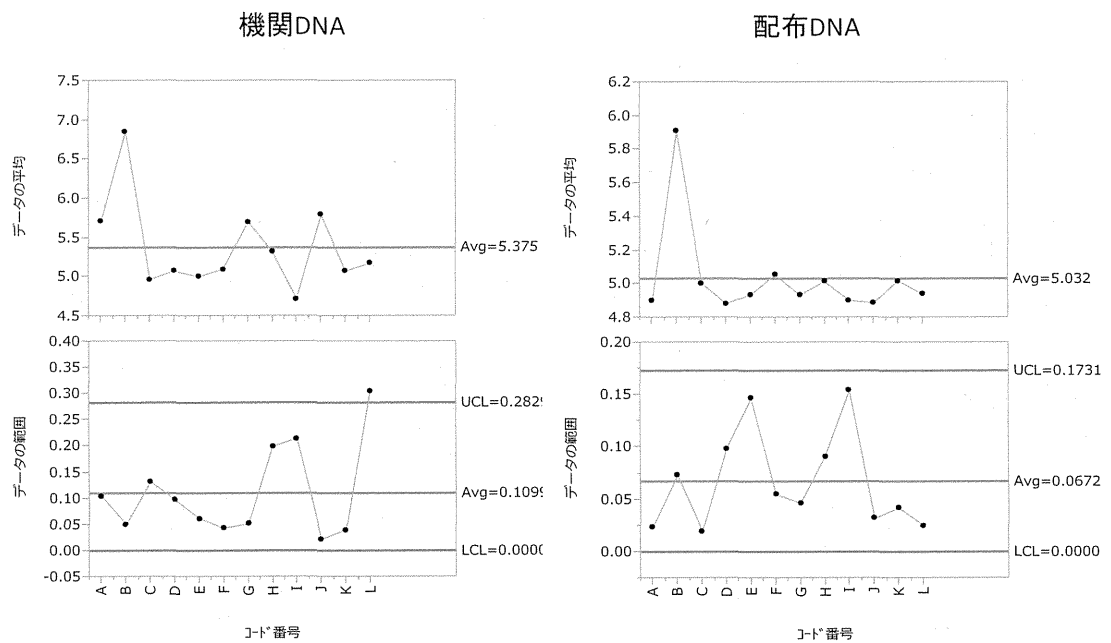


図 14 標準 cDNA における機関 DNA と配布 DNA 採用時の Xbar-R 管理図

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」

研究分担報告

## 食品媒介ウイルス検査の開発・標準化に関する検討

研究分担者

上間 匡

国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

現在食品媒介性のウイルスの検査は主に、ノロウイルス(NoV)、A型肝炎ウイルス(HAV)等を対象にPCRを用いた遺伝子検出が行われ、検査手法の検証には内部コントロールとしてネコカリシウイルス(FCV)やマウスノロウイルス(MNV)、エコーウイルス9型、メンゴウイルス(Mengo virus, MeV)、コクサッキーウイルスB群5型(CB5)等が利用されているが、一部を除いて陽性コントロールの作成や配布体制が整っていない。

本研究では厚生労働省通知法その他、ISO/TS 15216-1:2013、および研究班で開発した感染性推定遺伝子検査法の比較・検討を行う為の陽性コントロールの作成を行った。

また、A型肝炎ウイルスのRT-PCRによる検出について、研究班で開発したプライマーセットを用いて、サイバークリーン検出系リアル・タイムPCRへの応用を検討し、約670塩基の長鎖をリアルタイムPCRで検出するための条件を見出した。

### A. 研究目的

現在食品媒介性のウイルスの検査は主に、ノロウイルス(NoV)、A型肝炎ウイルス(HAV)等を対象にPCRを用いた遺伝子検出が行われ、検査手法の検証には内部コントロールとしてネコカリシウイルス(FCV)やマウスノロウイルス(MNV)、エコーウイルス9型等が利用されている。一方で2013年には国際標準化機構(ISO)より食品検体等からのNoVとHAVの遺伝子検出法(ISO/TS 15216-1:2013)が公開され、内部コントロールとしてFCVの他、メンゴウイルス(Mengovirus; MeV)が指定

された。また、研究班で開発した感染性推定遺伝子検査法では内部コントロールとしてFCVに加えてコクサッキーウイルスB群5型(CB5)を利用している。

以上のように食品検体等からのウイルス遺伝子検出法は共通の検査手技としてはRT-PCRおよびRT-qPCRであるが、検査用の陽性コントロールの配布体制は市販キットに付属するNoVや一部研究機関から分与されるHAVの他は検体由来のcDNAを利用する必要があるなど準備体制が整っていない。

本研究では、HAV検出通知法の改良法に

対応した陽性コントロールプラスミドの他、ISO/TS 15216-1:2013 に記載された MeV の検出系に対応する陽性コントロールプラスミドの作成を行った。また、代替ウイルスとしての評価を得る目的で CB5 と MeV を感染性推定遺伝子検査法に応用するために感染性推定遺伝子検査法に対応した陽性コントロールプラスミドを作成した。

また、HAV 検出改良法については、コンベンショナルな RT-PCR だけでなく、サイバークリーン検出系を用いたリアルタイム PCR を検討し、通知法では別々に実施する必要のあるリアルタイム PCR とコンベンショナルな RT-PCR の一本化について検討した。この方法が確立すれば一度の PCR 実施によりリアルタイム PCR による検出と分子疫学解析が同時に行え、検査の時間短縮等が期待出来る。

## B. 研究方法

### 1. 材料

#### 1-1. ウイルスおよびウイルス RNA

A 型肝炎ウイルス KRM238G59 株培養上清から抽出した RNA より逆転写で作成した cDNA を用いた。

コクサッキーウイルス B 群 5 型(CB5) 培養上清から抽出した RNA より逆転写で作成した cDNA を用いた。

ISO/TS 15216-1:2013 に記載されたメングウイルス(Mengo virus, strain MC0, ATCC No. VR-1597)を ATCC より購入し、HeLa 細胞にて増殖後に、細胞培養上清より RNA 抽出キットにてゲノム RNA を抽出し逆転写を行い cDNA を得た。

#### 1-2. プライマー

陽性コントロールとしてプラスミドを作成するために表に示すプライマーを用いた。

#### 2-1. プラスミドの作成

HAV, CB5, MeV について、表に示したプライマーを用いて PCR を行い、PCR 産物を Zero Blunt TOPO PCR cloning kit (Invitrogen)を用いてクローニングを行った。

HAV のプラスミドについては臨床検体との区別のために表の FLAG 挿入用プライマーを用いて PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (タカラバイオ)を用いて FLAG 配列を挿入した。

#### 3-1. HAV 検出リアルタイム PCR サイクル条件の検討

リアルタイム PCR 試薬として以下の 3 社の試薬を用いた。

SYBR® Premix Ex Taq™ II (タカラバイオ),

KOD SYBR® qPCR Mix (東洋紡),

FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)(Roche)

PCR サイクルとして、各試薬の推奨条件となる 2 ステップシャトル PCR {95°C 5 秒→(95°C 30 秒, 60°C 30 秒)x40 サイクル} と 3 ステップ PCR サイクル{95°C 30 秒→(95°C 5 秒,60°C 30 秒, 72°C 60 秒)x40 サイクル} の比較を行った。

#### 3-2. リアルタイム PCR 装置の比較

HAV 検出リアルタイム PCR を行うにあたり、以下の 2 社のリアルタイム PCR 用の装置の比較を行った。

Thermal Cycler Dice® Real Time System II (タカラバイオ)

Applied7500Biosystems Fast Real-Time PCR System (ABI)

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

## C. 研究結果

### 1. 遺伝子検出検査用 陽性コントロールプラスミドの作成

#### 1-1. HAV

プライマー HAV-JCT-2F および HAV-JCT-1R-A を用いて、KRM238G59 株 cDNA から PCR 増幅を行い、目的の断片を得た。PCR 断片のクローニング後にキットを用いてクローニングを行い、塩基配列の確認を行った。

その後、FLAG 挿入用プライマーセットを用いて、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (タカラバイオ)を用いて FLAG 配列の挿入を行い、塩基配列を解析し、FLAG 配列の挿入を確認した(図 1)。

#### 1-2. MeV

ISO/TS 15216-1:2013 記載のリアルタイム PCR 用の陽性コントロールプラスミド作成のためにプライマーセット (Mengo+16-35 及び Mengo-629-607)を用いて PCR を行い、目的の断片を得てクローニング、塩基配列を確認した。

また、感染性推定遺伝子検査法へ Mengovirus を用いることが出来るように感染性推定遺伝子検査法での検出範囲を MengoFW4176-4197 および MengoRV5777-5797 を用いて PCR を行い、目的断片を得てクローニング、塩基配列を確認した。

#### 1-3. CB5

感染性推定遺伝子検査法に用いる CB5 の陽性コントロールプラスミドを作成するために CB5 プライマーセット (CoxB5 +3609 および CoxB5 -4837)を用いて PCR を行い、クローニングと塩基配列解析を行った。

### 2. HAV リアルタイム PCR 条件の検討

結果 1-1 で作成した FLAG 配列入り HAV プラスミドを用いて、サイバークリーン系リアルタイム PCR の検討を行った。

まず、SYBR® Premix Ex Taq™ II (タカラバイオ)を用いてサイクルステップ、伸長時間等のリアルタイム PCR 条件の検討を行った。

2-1. キット説明書に従い 2 ステップサイクル {95°C 5 秒→(95°C 30 秒, 60°C 30 秒)x40 サイクル}にてリアルタイム PCR を行ったが、10<sup>7</sup> コピー以下の濃度のプラスミドを検出できなかった。

2-2. 2 ステップサイクルのまま、伸長時間を 60 秒に延長して検討した {95°C 5 秒→(95°C 30 秒, 60°C 60 秒)x40 サイクル}と、10<sup>7</sup> コピー以下の濃度のプラスミドの検出もされるようになったが、



増幅が 30 サイクル以降となり、増幅効率が非常に悪い結果となった (図 2 上段)。

2-3. 3 ステップサイクル{95°C 5 秒→(95°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C60 秒)x40 サイクル}にて PCR を行った結果、 $10^5$  コピーから  $10^2$  コピーまで検出されるようになった (図 2 下段)。

HAV-JCT-2F および HAV-JCT-1R-A を用いたリアルタイム PCR は 3 ステップサイクルを行うのが良いことがわかった。

### 3. リアルタイム PCR 試薬の比較

3 社のリアルタイム PCR の性能比較を行った。SYBR® Premix Ex Taq™ II (タカラバイオ) および KOD SYBR® qPCR Mix (東洋紡) は 3 ステップサイクル{95°C 5 秒→(95°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C60 秒)x40 サイクル}で行い、Hotstart 酵素を使用する FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)(Roche) は 10 分のプレインキュベーション後に 3 ステップサイクル{95°C 10 分→(95°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C60 秒)x40 サイクル}を行った。

その結果、HAV-JCT-2F および HAV-JCT-1R-A を用いたリアルタイム PCR は 3 試薬ともに同等の結果を得ることが出来た (図 3)。

### 4. リアルタイム PCR 装置の比較

2 社のリアルタイム PCR 装置 Thermal Cycler Dice® Real Time System II (タカラバイオ) および Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (ABI) の性能を比較するために KOD SYBR® qPCR Mix (東洋紡) を用いて 3 ステップサイクル{95°C 5 秒→(95°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C60 秒)x40

サイクル}で検討を行った。その結果、ABI の装置がプラスミド各濃度の増幅開始が 3 サイクル程度早く、約 10 倍程度の検出感度の高さであったが、2 社の装置共に、同等に使用できることを確認した (データ示さず)。

### 5. リアルタイム PCR におけるネガティブコントロールの出現

各社の試薬、装置を用いてサイバーグリーン検出系リアルタイム PCR の条件を決定したが、現在のところネガティブコントロールが  $10^2$  コピー未満程度検出されてしまう現象が起きている。

### D. 考察

現在主に行われている食品からのウイルス遺伝子検出において、NoV についてはタカラバイオ社等から厚生労働省通知法に従った試薬、プライマー、陽性コントロール等が検出キットとして市販されており、利用可能である。一方、A 型肝炎ウイルスについては HAV-JCT-2F, 1R-A, 2R を用いた RT-PCR については陽性コントロールプラスミドの配布体制が整っていなかった。本研究では、HAV-JCT-2F, 1R-A を用いて増幅した PCR 断片をクローニングし、さらに FLAG 配列を挿入することで臨床検体との区別が可能な陽性コントロールを作成した。今後各機関での HAV 検出 RT-PCR の検討を行う際に陽性コントロールとして利用できるように準備を進めたい。

また、ISO/TS 15216-1:2013 に記載された Mengovirus 検出リアルタイム PCR について、陽性コントロールプラスミドを作

成し、今後 ISO/TS 15216-1:2013 にした  
がった検査法の検討などに各機関で利用  
できるようになった。更に、MeV ゲノム  
3' 末端から約 2500 塩基程度の場所を標的  
にプラスミドを作成し、感染性推定遺伝  
子検査法にも利用できるようになった。  
今後 NoV の代替ウイルスとして FCV, MNV  
と同様に利用できるのか、FCV 等と比較し  
て有用であるかなど検討を行うことが可  
能である。

感染性推定遺伝子検査法の開発に用い  
ている CB5 についても陽性コントロール  
プラスミドの作成を行った。CB5 を代替ウ  
イルスに用いた検査制度管理等に利用で  
きるようになった。

HAV 遺伝子検出用プライマーセット  
HAV-JCT-2F, 1R-A を用いたサイバーク  
リーン検出系リアルタイム PCR が実施可能  
であることがわかった。HAV-JCT-2F, 1R-A  
および 2R のプライマーを用いた検出系は  
厚生労働省通知法に比べて、検出感度が  
高く、分子疫学解析のための解析範囲も  
500 塩基以上と大きいことが利点である  
が、増幅断片が長いことからリアルタイ  
ム PCR での検出には向いていなかったが、  
300 塩基以上の長鎖 PCR でもリアルタイ  
ム PCR 実施可能な試薬が市販されるよう  
になり、高い検出感度と分子疫学解析能  
をもつプライマーセットをリアルタイム  
PCR で利用出来るようになった。

分子疫学解析の際には陽性コントロール  
との区別が重要になってくるが、これ  
までは臨床検体などの陽性検体由来 cDNA  
等を用いていたために陽性コントロール  
と検体を区別出来ない事例があったが、

本研究では FLAG 配列を挿入することによ  
り容易に臨床検体と区別可能な陽性コン  
トロールプラスミドを作成し、検査の正  
確性を担保できるようになった。

また、HAV-JCT-2F, 1R-A のプライマーセ  
ットを用いたリアルタイム PCR は増幅断  
片が長いことから、試薬等に付属の説明  
書等で推奨される 2 ステップ PCR サイ  
クルではうまく増幅できないため、3 ステ  
ップ PCR サイクルを用いて、伸長反応を長  
くすることで、今回約 670 塩基の長鎖で  
もリアルタイム PCR で検出が可能となっ  
た。また、3 社のサイバークリーン系検出  
試薬及び、タカラバイオ、ABI 社のリアル  
タイム PCR 装置を用いて検討した結果、  
いずれにおいても同等の検出感度が確認  
され、長鎖断片を標的にしたリアルタイ  
ム PCR の検出系が汎用的に利用できるこ  
とが示唆された。

しかしながら、現状ではネガティブコン  
トロールにも  $10^2$  コピー程度の反応が  
検出されており、プライマーダイマーに  
よるサイバークリーンの反応や陽性コン  
トロールのコンタミネーションなど、ネ  
ガティブコントロールが検出される原因  
を確認し、検査時のプライマー濃度の調  
整などを検討していく必要がある。

今後は、HAV-JCT-2F, 1R-A のセットおよ  
び HAV-JCT-2F, 2R のセットを用いた  
RT-nested qPCR の検討や、実際の食品、  
臨床検体からの検出と分子疫学解析能を  
検証していく必要がある。

## E. 結論

・HAV-JCT-2F, 1R-A のプライマーセッ  
トを用いた PCR 断片より、HAV 遺伝子検出

に用いる陽性コントロールプラスミドを作成した。

・ISO/TS 15216-1:2013 に記載された NoV 代替ウイルスである MeV のリアルタイム PCR および感染性推定遺伝子検査法に対応する陽性コントロールプラスミドを作成した。

・NoV 代替ウイルスである CB5 を用いた感染性推定遺伝子検査法に対応する陽性コントロールプラスミドを作成した。

・HAV 検出に関して約 670 塩基の長鎖断

片を検出するサイバーグリーン検出系リアルタイム PCR 法の条件を決定した。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表. 陽性コントロールプラスミド作成に用いたプライマー

virus	primer	配列	strand
HAV	HAV-JCT-2F	GRAGAACAGGRAAYATTCARATTAG	+
	HAV-JCT-1R-A	YTTRTCATCYTTCAATTTCTGTCCA	-
	HAV-JCT-2R	CAGTHARMACHCCAGCATCCAT	-
HAV FLAG挿入用	HAV+3127FLAG+3148	GATT GAC TAC AAG GAT GAC GAT GAC AAG GGAGGTTGGCAAACAAAG	+
	HAV-3135FLAG-3113	CCTCC CTT GTC ATC GTC ATC CTT GAT GTC AATCTCAATTCCTTATA	-
CB5	CoxB5 +3609	TCTGAGCCAGGCGACTGTGG	+
	CoxB5 -4837	GACATGGGCATGTTGATCCTTACC	-
MeV	Mengo+16-35	TGGGAGATCCGGATTGC	+
	Mengo-629-607	TACCTTCTGGGCATCCTTCAGC	-
	Mengo FW 4176-4197	ATAGCAGTGATGCATCCGGACC	+
	Mengo RV 5777-5797	CAGTCAGACTCTGCCATGTG	-

```

HAV_Flag      --TCCGGAGCATTGGATGGACTTGGAGACAAAAGTATTCAACTTTTGGACTTGTTTCCA 58
KRM238G      TTTCCGGAGCATTGGATGGACTTGGAGACAAAAGTATTCAACTTTTGGACTTGTTTCCA 360
                *****

HAV_Flag      TTCAAATTGCAAATTACGATCATTCTGATGAGTATTTGTCTTTAGTTGTTATTTGTCTG 118
KRM238G      TTCAAATTGCAAATTACGATCATTCTGATGAGTATTTGTCTTTAGTTGTTATTTGTCTG 420
                *****

HAV_Flag      TGACTGAACAGTCTGAGTTTTATTTTCTAGGGCACCTTTGAACACCAATGCTATGATGT 178
KRM238G      TGACTGAACAGTCTGAGTTTTATTTTCTAGGGCACCTTTGAACACCAATGCTATGATGT 480
                *****

HAV_Flag      CATCTGAAACAATGCTAGATAGAATTGCTCTTGGTGATCTTGAATCTTCAGTTGATGATC 238
KRM238G      CATCTGAAACAATGCTAGATAGAATTGCTCTTGGTGATCTTGAATCTTCAGTTGATGATC 540
                *****

HAV_Flag      CTCGGTCTGAAGAAGATCGAAAATTTGAAAGTCACATTGAGAAGAGAAAACCTATAAGG 298
KRM238G      CTCGGTCTGAAGAAGATCGAAAATTTGAAAGTCACATTGAGAAGAGAAAACCTATAAGG 600
                *****

HAV_Flag      AATTGATTTGACATCAAGGATGACGATGACAAGGGAGCTGGCAAACAAGATTAAAGT 358
KRM238G      AATTGATTTGACATCAAGGATGACGATGACAAGGGAGCTGGCAAACAAGATTAAAGT 636
                *****

HAV_Flag      ATGCTCAAGAAGAAGTGTCAAATGAAGTGTTCCTCCTCCTCGGAAAATCAAGGGTGTGT 418
KRM238G      ATGCTCAAGAAGAAGTGTCAAATGAAGTGTTCCTCCTCCTCGGAAAATCAAGGGTGTGT 696
                *****

HAV_Flag      TCTCACAAGCAAAAATTTCACTGTTTTATACAGAGGACCATGAAATAATGAAGTTTCTT 478
KRM238G      TCTCACAAGCAAAAATTTCACTGTTTTATACAGAGGACCATGAAATAATGAAGTTTCTT 756
                *****

HAV_Flag      GGAAGGGAATTACTGCTGACACTAGAGCTCTGAGGAGATTTGGGTTTTCTTTAGCTGCTG 538
KRM238G      GGAAGGGAATTACTGCTGACACTAGAGCTCTGAGGAGATTTGGGTTTTCTTTAGCTGCTG 816
                *****

HAV_Flag      GCAGAAGTGTGTGGACATTAGAAATGGATGCTGGTGTTTAACTGGAAGATTGGTGAGAG 598
KRM238G      GCAGAAGTGTGTGGACATTAGAAATGGATGCTGGTGTTTAACTGGAAGATTGGTGAGAG 876
                *****

HAV_Flag      TTAATGATGAGAAATGGACAGAAATGAAAGATGACAA----- 635
KRM238G      TTAATGATGAGAAATGGACAGAAATGAAAGATGATAAAATGTTTCTCTGGTAGAAAAGT 936
                *****
    
```

図 1 : HAV 陽性コントロールプラスミドの塩基配列確認  
 上段 FLAG 配列挿入した HAV, 下段 FLAG 配列挿入前の HAV クローン  
 線で囲んだ部分に FLAG 配列の挿入が確認できた。