

図2 標準cDNA溶液および糞便乳剤のノロウイルス検査におけるCt値

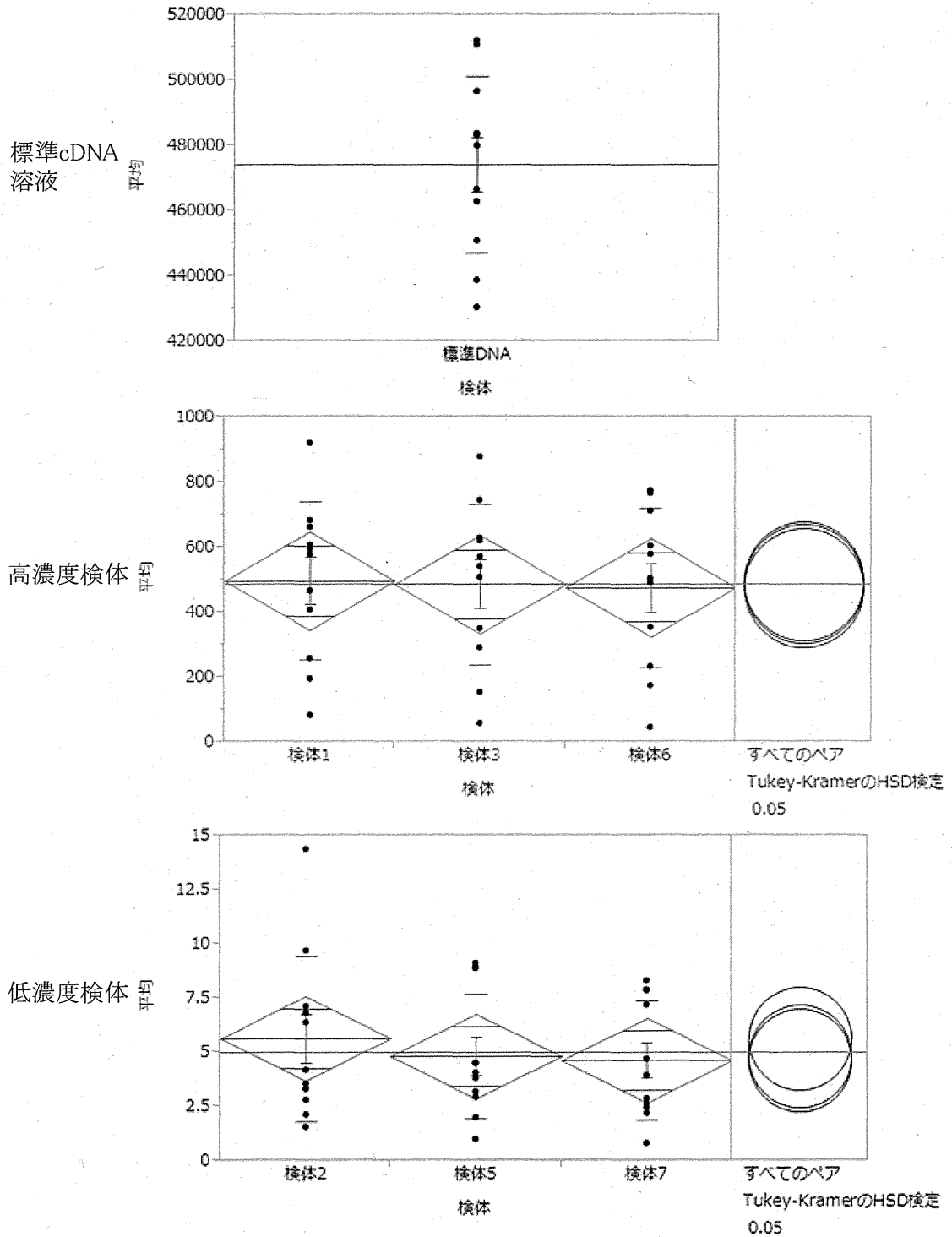


図3 標準cDNA溶液および糞便乳剤中のノロウイルス検査における実測値(実数解析)

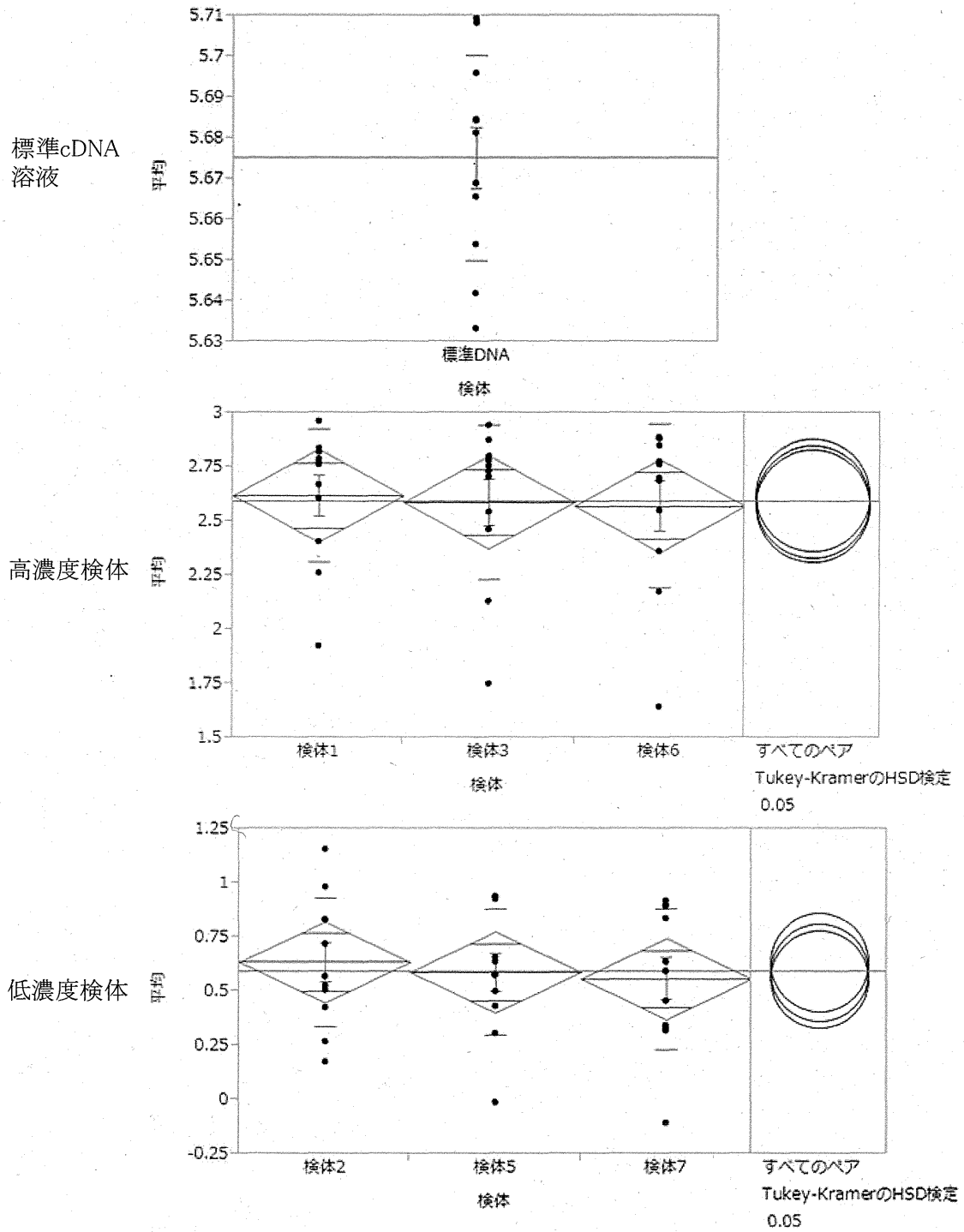


図4 標準cDNA溶液および糞便乳剤中のノロウイルス検査における実測値(対数解析)

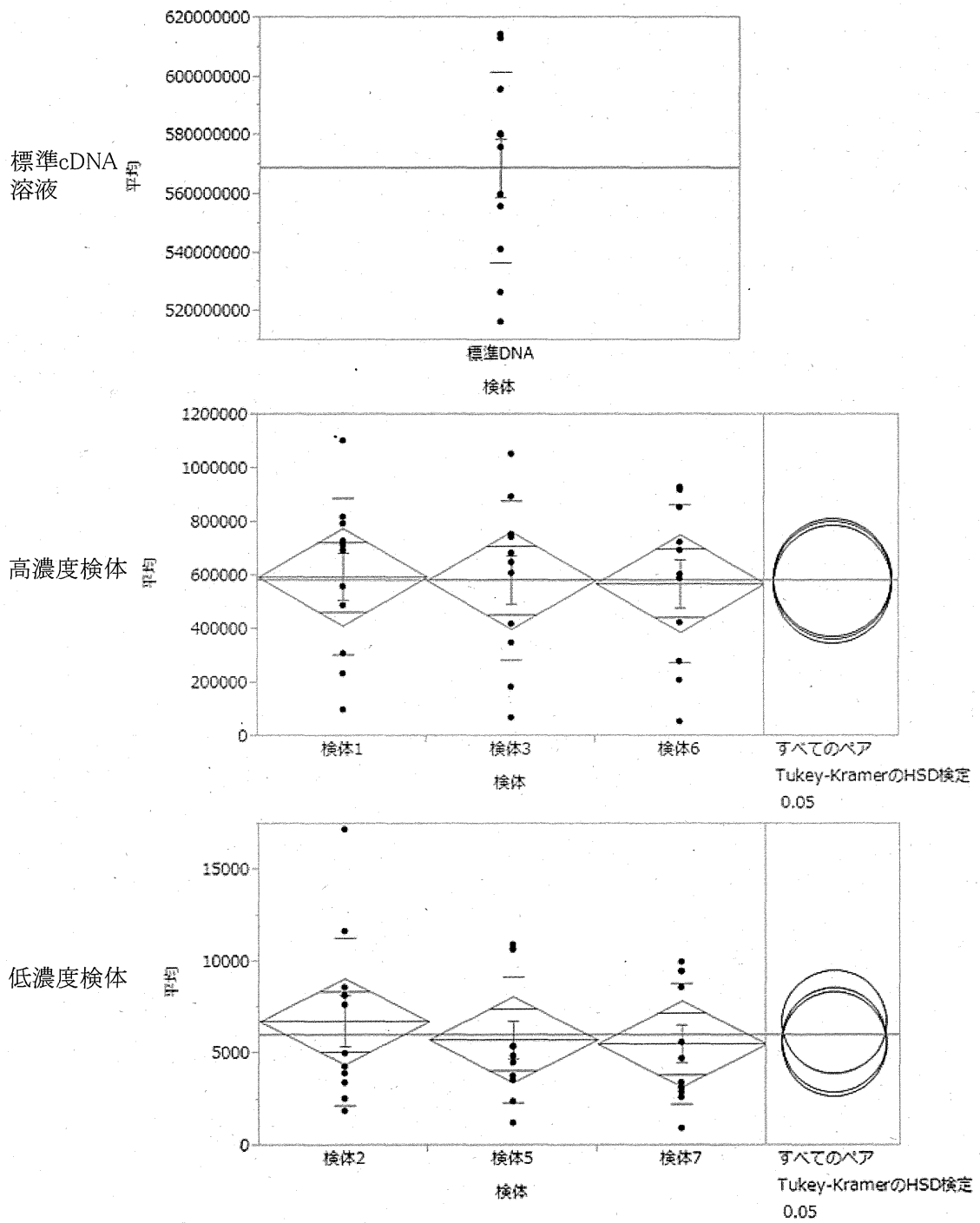


図5 標準cDNA溶液および糞便乳剤中のノロウイルス検査における換算値(実数解析)

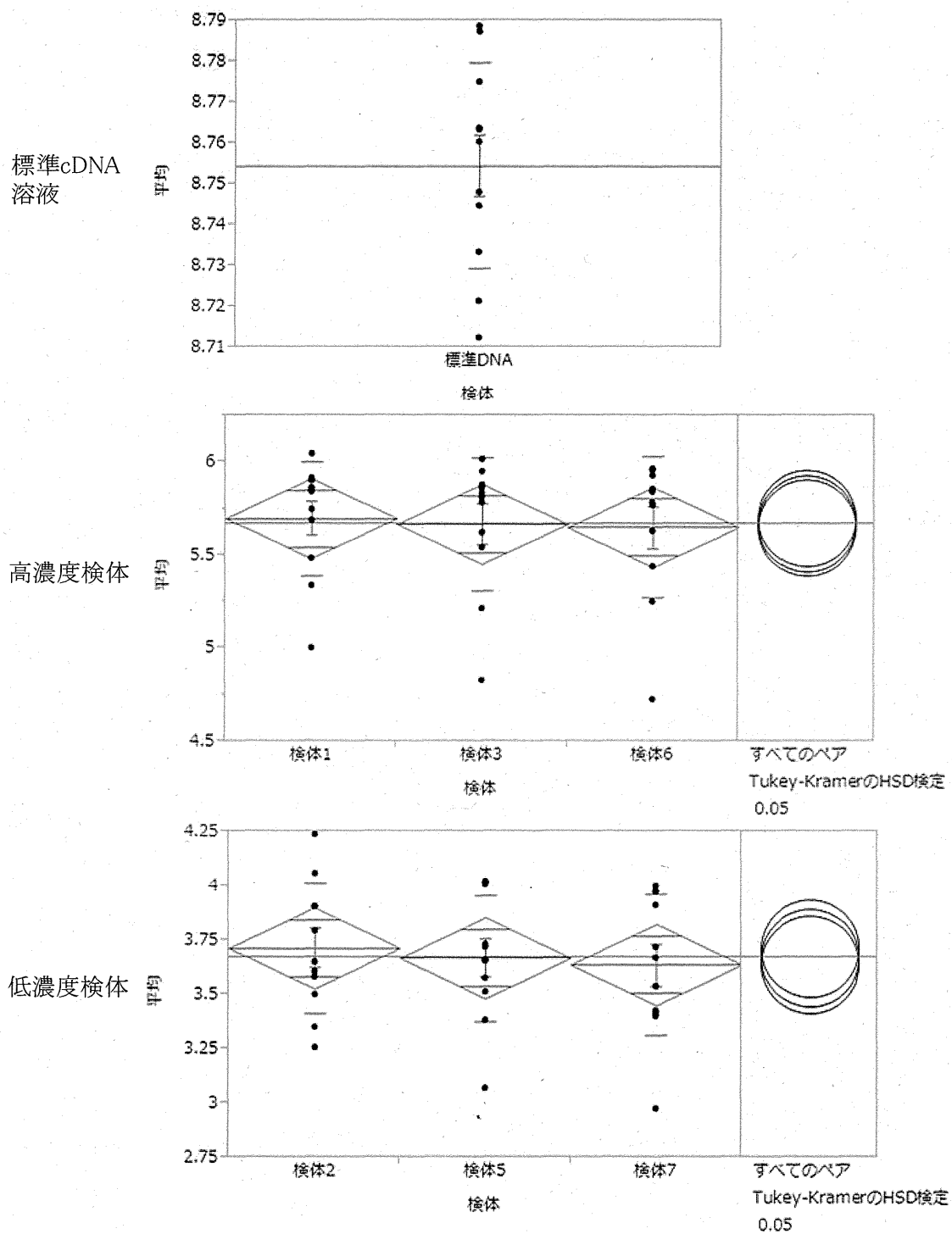


図6 標準cDNA溶液および糞便乳剤中のノロウイルス検査における換算値(対数解析)

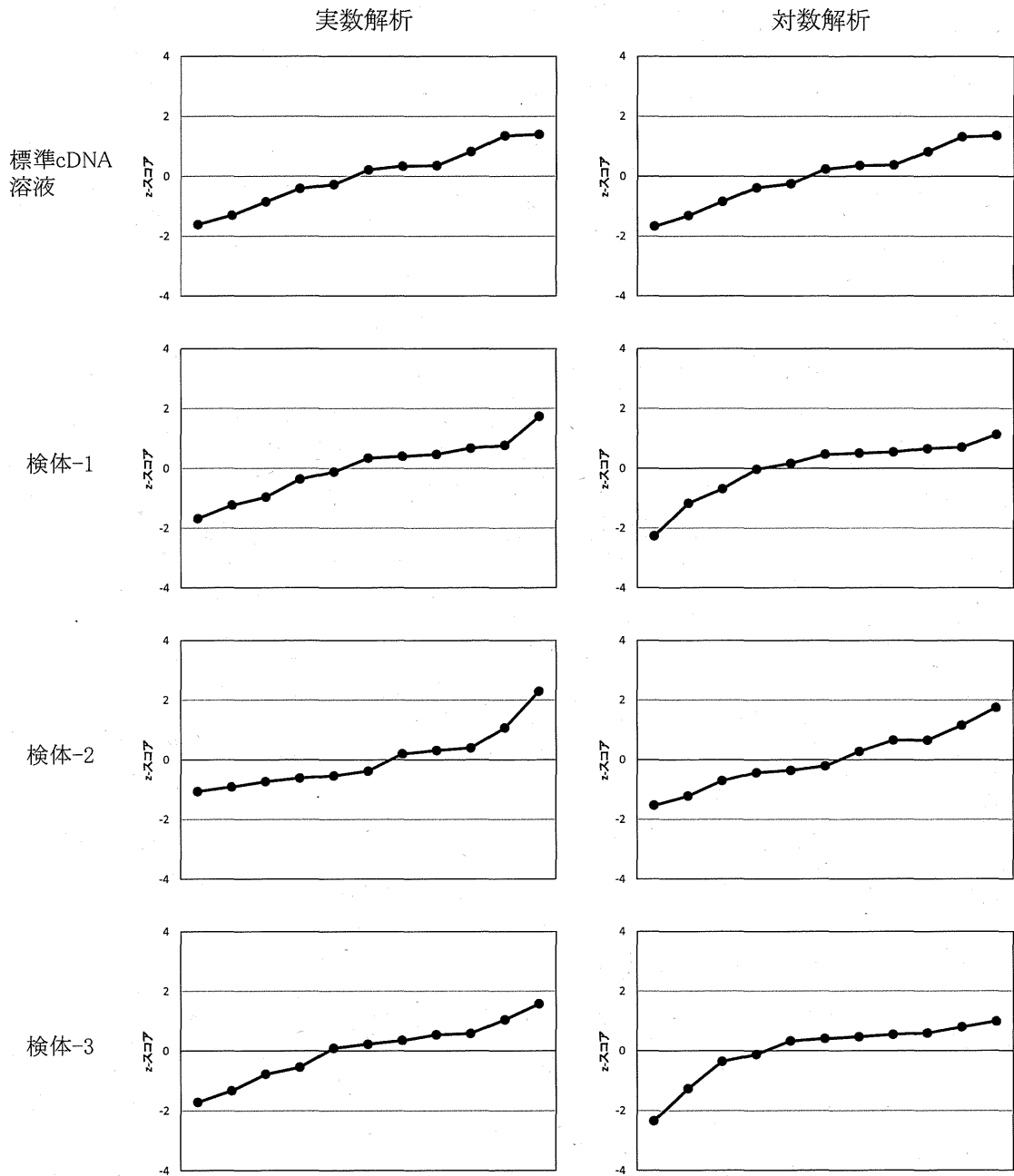


図7 ノロウイルス検査(実測値)におけるzスコアの順位(1/2)

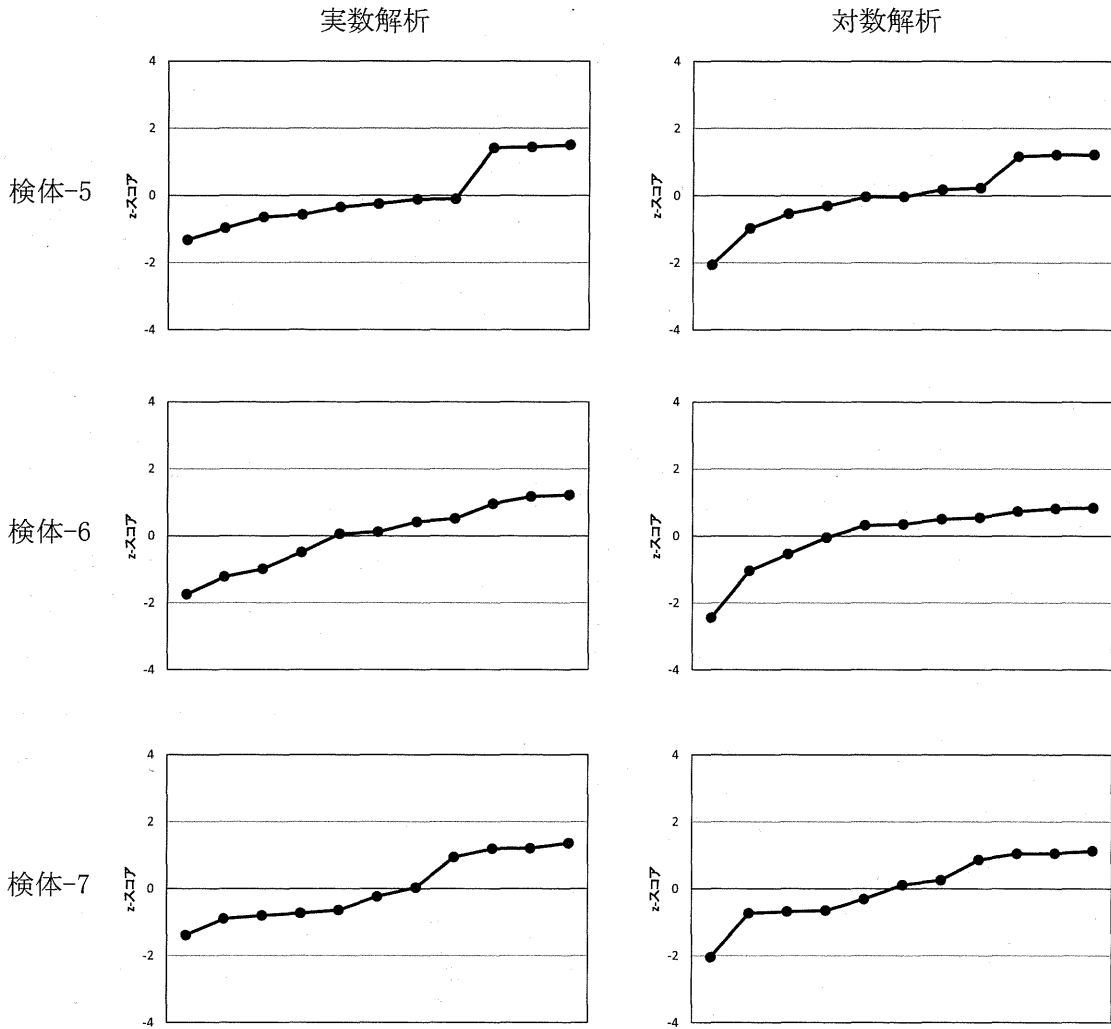


図8 ノロウイルス検査(実測値)におけるzスコアの順位(2/2)

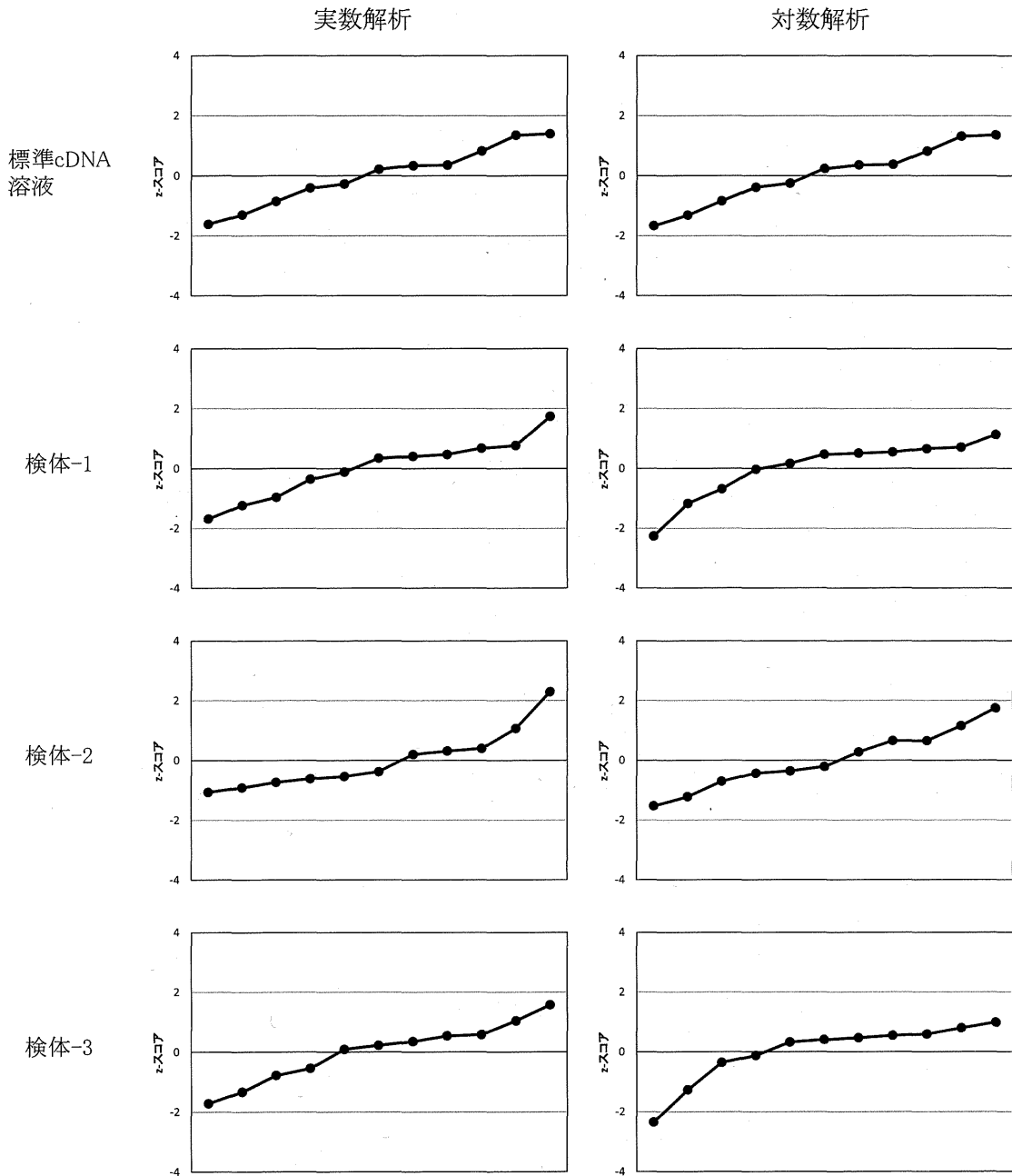


図9 ノロウイルス検査(換算値)におけるzスコアの順位(1/2)

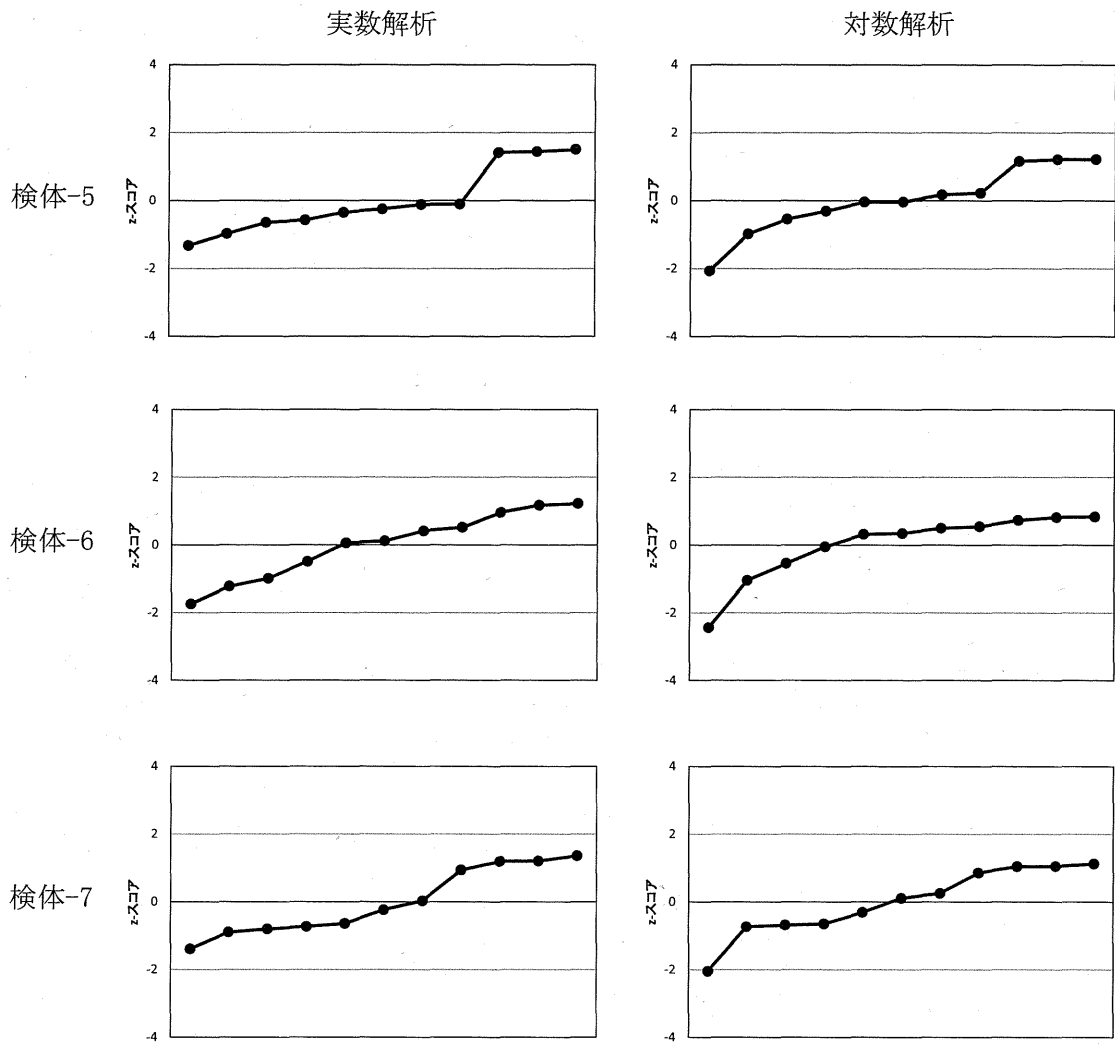


図10 ノロウイルス検査(換算値)におけるz-スコアの順位(2/2)

標準cDNA溶液

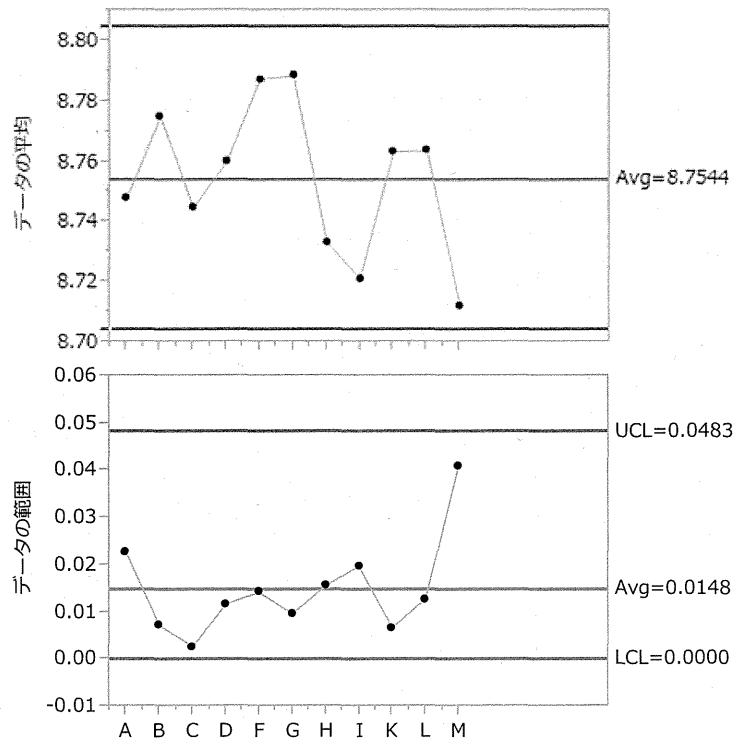
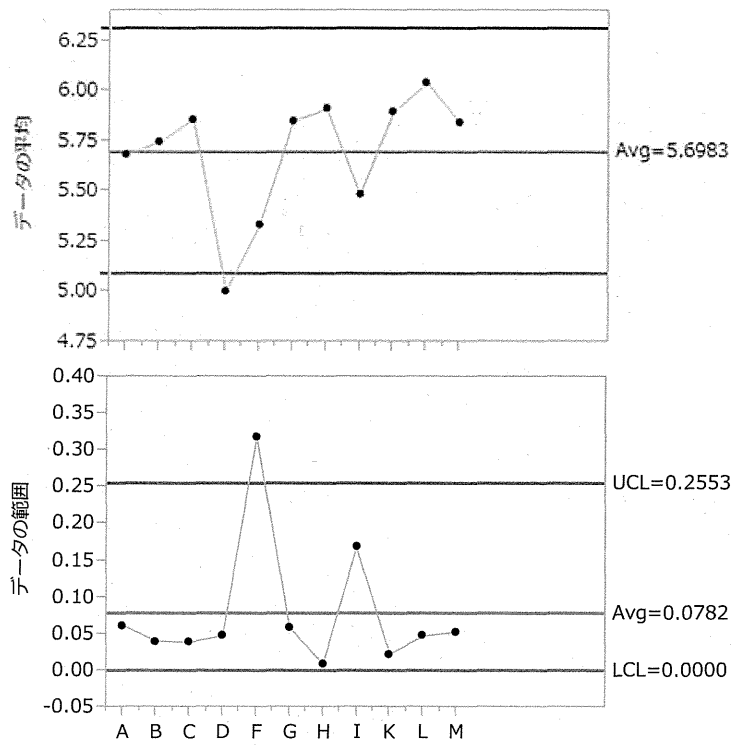


図11 ノロウイルス検査(換算値、対数解析)におけるXbar-R管理図(1/4)
 Xbar管理図における管理限界線は $|z\text{-スコア}| = 2$ とした。R管理図における管理限界線は
 JISの係数表から求めた。

検体-1



検体-2

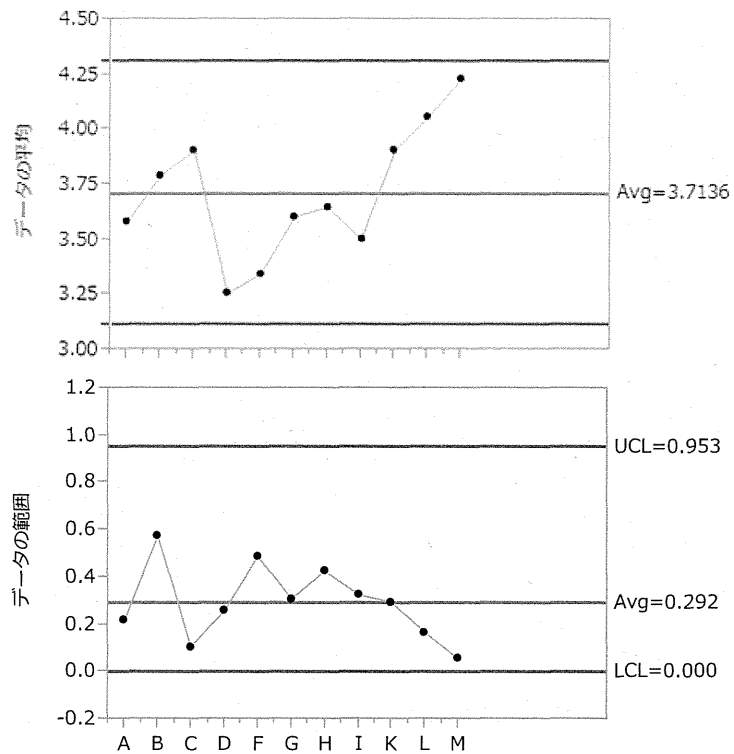
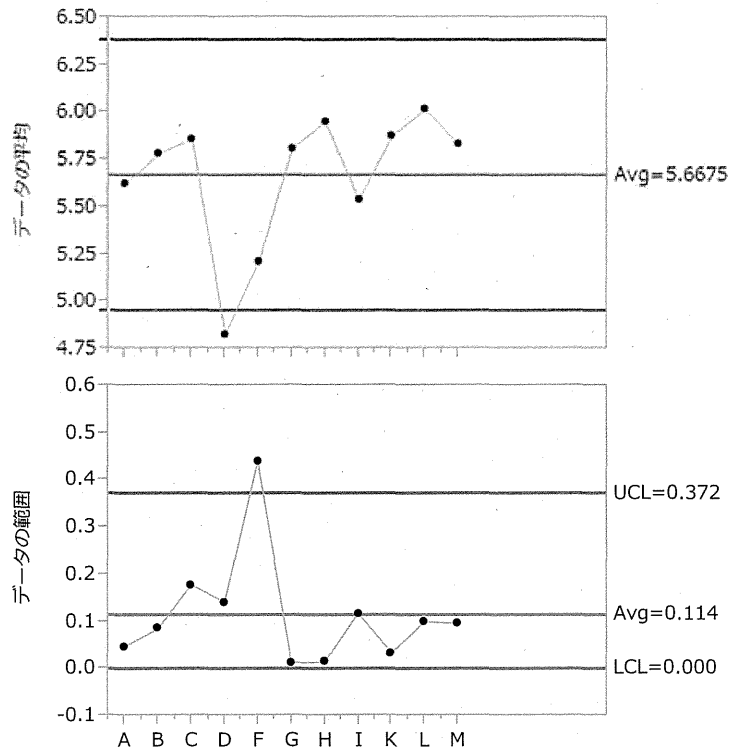


図12 ノロウイルス検査(換算値、対数解析)におけるXbar-R管理図(2/4)
Xbar管理図における管理限界線は $|z\text{-スコア}| = 2$ とした。R管理図における管理限界線は JISの係数表から求めた。

検体-3



検体-5

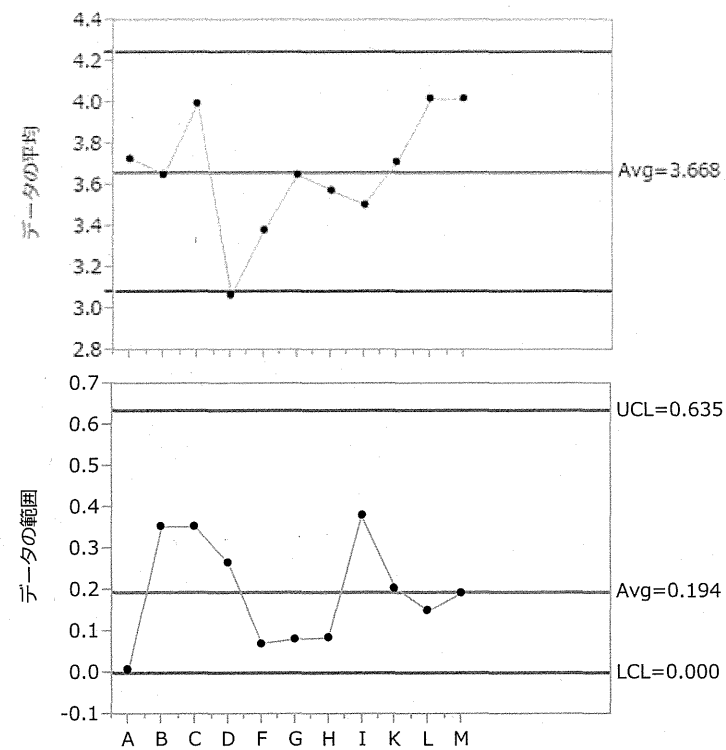
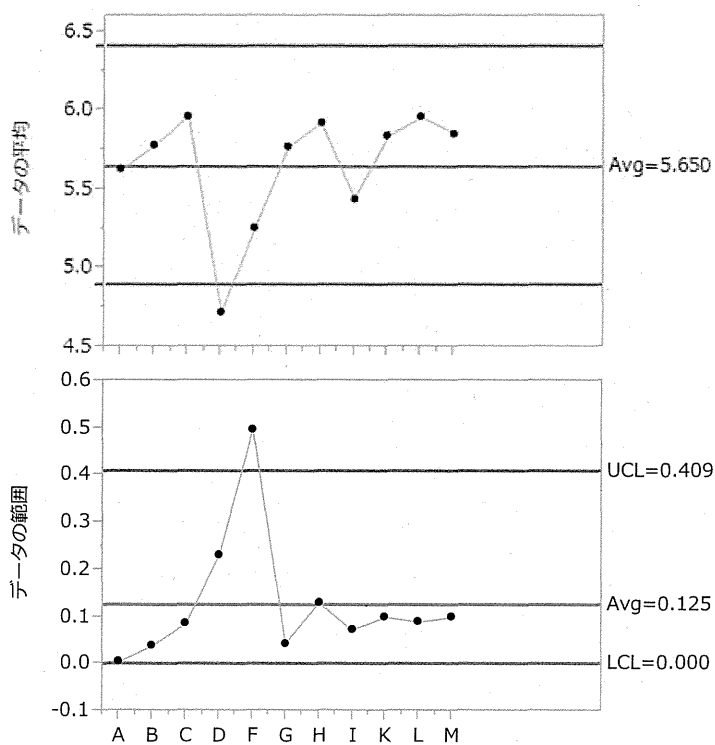


図13 ノロウイルス検査(換算値、対数解析)におけるXbar-R管理図(3/4)
 Xbar管理図における管理限界線は $|z\text{-スコア}| = 2$ とした。R管理図における管理限界線は
 JISの係数表から求めた。

検体-6



検体-7

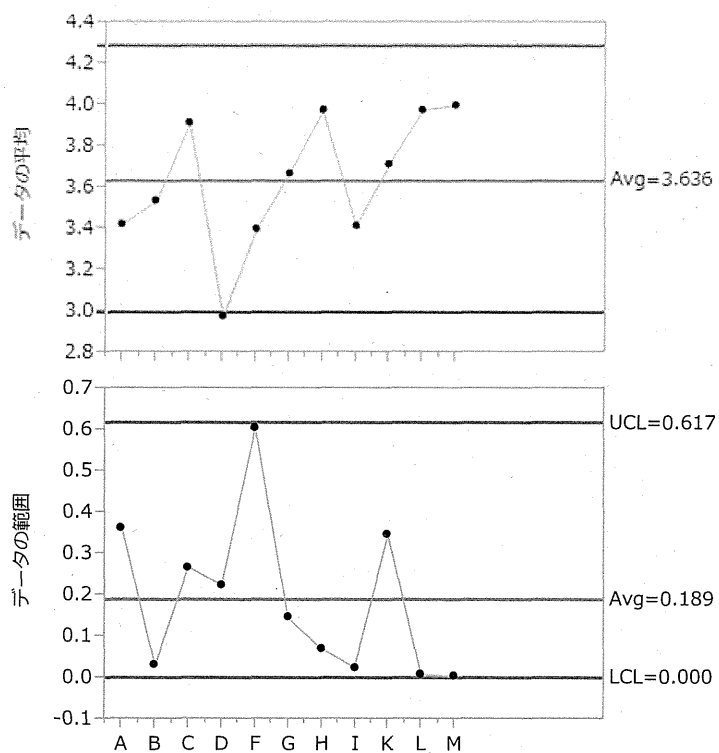


図14 ノロウイルス検査(換算値、対数解析)におけるXbar-R管理図(4/4)
 Xbar管理図における管理限界線は $|z\text{-スコア}| = 2$ とした。R管理図における管理限界線は
 JISの係数表から求めた。

平成 27 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

食品からのウイルス遺伝子検出法で用いられる標準 DNA のデジタル PCR によるばらつきの検討

研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
	筒井 理華	青森県環境保健センター
	斎藤 博之	秋田県健康環境センター
	植木 洋	宮城県保健環境センター
	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
	滝澤 剛則	富山県衛生研究所
	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
	三好 龍也	堺市衛生研究所
	山本 美和子	広島市衛生研究所
	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
	山下 育孝	愛媛県衛生環境研究所
	西村 浩一	熊本県保健環境研究所

研究要旨

現在食品からのウイルスの検査は主に、ウイルス遺伝子を検出する PCR 法を基本として各検査機関が実施している。ノロウイルスや A 型肝炎ウイルス等の食品媒介ウイルスの検出法については厚生労働省通知法に基づいて実施されるが、各機関で使用する検査機器や試薬、検査手順については基本仕様以外は統一されていない。このため各機関で実施される検査結果を厳密に同等のものとして比較することが困難な現状となっている。

この現状を踏まえ、各機関のノロウイルス遺伝子検査で実際に使用している陽性コントロールについてデジタル PCR を用いて同時に定量を行い、機関間のばらつきの現状の確認を行ったところ、最大 280 倍の違いがあることが明らかとなり、検査法の制度管理において陽性コントロールの管理が大きな課題であることが示された。

A. 研究目的

現在食中毒事例での推定原因食品など

からのウイルスの検出には主に食品中に含まれるウイルスの定量までを短時間に

行えるリアルタイム PCR が広く利用されている。

また、とくにノロウイルスによる汚染リスクがあり生食されるカキについては、リアルタイム PCR によってウイルスに汚染されていないこと、または汚染のあった場合には検出されるウイルスを定量し具体的な汚染度合いについて確認するための自主検査が生産者・出荷者によって実施されている。

検査の実施については厚生労働省の通知に基づいて、食品からのウイルス濃縮ののち、ウイルス遺伝子(RNA)の抽出、RNA から cDNA への逆転写およびリアルタイム PCR という大きく 4 段階の手順を行う。通知では検出法について使用する機器や試薬の指定はされず、基本的な仕様が示されており同等の性能を有する機器および試薬を各機関の状況に合わせて使用して検査が実施されている。

食中毒事例や出荷前検査に関わらず、食品中に含まれるウイルスは一般的に非常に少なく、リアルタイム PCR の機器の検出限界と同等かそれ以下のレベルの汚染の判断が求められることが多いため、検査精度を担保することは非常に重要な課題である。

最終的には、どこの機関で誰が検査を実施しても、同じ検体であれば同等の検査結果が得られるべきであるが、前述のように検査機関によって使用機器や試薬が異なる場合もあり、各機関の検査結果を全く同等に比較することが困難なのが現状であり、検査の精度管理体制の構築が課題となっている。

一方で、リアルタイム PCR による定量法

では、検出遺伝子の定量の際に、定量値が既知である陽性コントロールを用いるため、検査の使用機器や試薬が異なる場合でも陽性コントロールの定量値が同等であれば、検体の定量結果も同程度であることが期待出来る。

食品からのウイルス検出法の精度管理体制構築のためには検査に用いる陽性コントロールの管理が非常に重要である。本研究では検査現場の現状把握の目的で、各機関(研究協力地方衛研等)で実際に使用されている陽性コントロールの一部を国立衛研に集約し、同条件で定量を実施した場合のばらつきについて確認を行った。

B. 研究方法

1. ノロウイルス GII 陽性コントロールプラスミド

協力機関(合計 12 機関)で実際の検査に使用している陽性プラスミドの一部を国立衛研に送付してもらった。

GII 陽性コントロールは 2015 年に国立感染症研究所より新たに配布されており、12 機関のうち 11 機関について 2015 年の新コントロールプラスミド、8 機関については従来から使用している旧コントロールプラスミドも合わせて送付してもらった。

2. デジタル PCR

測定機器にバイオラッド社の QX200、PCR 用試薬としてバイオラッド社の ddPCR Supermix for Probes を用いて定量を行った。

10 検体分の組成は以下の通り(1 検体あた

り 20ul).

2x Supermix 10ul
COG2F(100uM) 0.2ul
COG2R(100uM) 0.2ul
ALPF(100uM) 0.2ul
RINGAL-TP(11.2uM) 0.4ul
plasmid 2ul
DW 20ul にメスアップ

(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. デジタル PCR で測定できるコピー数の検討

バイオラッド社 QX200 では検体あたりの最大カウント数がおよそ 20,000 カウントであることから、陽性コントロールプラスミドの測定にあたり、デジタル PCR でコピー数カウントができる最適なプラスミド濃度の検討を行った。

10^3 コピー 8 検体, 10^4 コピー 8 検体, 10^5 コピー 3 検体と陰性コントロール(蒸留水)の合計 24 検体についてデジタル PCR で定量した。

その結果, 10^3 コピーの検体では 8 検体の陽性カウントの平均が 491.9, 陰性カウント 15009.3 (合計平均 15501.1 カウント, 757.5 コピー/tube), 10^4 コピー 8 検体の陽性カウントは 4403.9, 陰性カウントは 12314.1 (合計平均 16718.0, 7200.0 コピー/tube), 10^5 コピー 3 検体の陽性カウントは 14590.0, 陰性カウントは 1349.3 (合計平均 15939.3, 58600.0 コピー/tube), 陰性検体 DW の陽性カウ

ント 8, 陰性カウント 17142(11 コピー/tube)であった(表 1)。

10^3 コピーの検体の結果より, 10^2 コピーより低いコピー数の場合に陰性検体と区別ができなくなることが考えられた。また, 10^5 コピーの検体の tube あたりのカウント数は 10^4 コピーの検体の 10 倍未満となっており, 10^5 コピー程度の検体では正確にカウントできていないことが考えられた。以上のことから各機関の 10^4 コピーの陽性コントロールを用いて検討することとした。

2. 各機関の陽性コントロールの測定結果

合計 12 機関で使用中の陽性コントロール(10^4 コピー/5ul に調整, 実測は検体 2ul を用いるので理論的には 4000 コピーとなる)を実測した結果を表 2 に示す。

2015 年に新たに国立感染症研究所より配布された陽性コントロール(11 機関提供)について, 最大値は機関 F の 22,360 コピー/2ul, 最小値は機関 A,C の 72 コピー/2ul, 平均 3,028 コピー/2ul, 中央値 1,422 コピー/2ul となった。

従来から使用の旧陽性コントロール(8 機関提供)については最大値は機関 B の 4,100 コピー/2ul, 最小値は機関 C の 38 コピー/2ul, 平均 1,114 コピー/2ul, 中央値 487 コピー/2ul となった。

平均値, 中央値を比較すると新陽性コントロールのほうがより正確な試験結果となることが期待できるが, 機関 A,C など実測値が低い機関では, 実際の検査では定量値が大きくなる可能性が高いことが懸念される。反対に機関 F については実

際の検体の汚染度合いを低く見積もる可能性が高くなることが懸念された。

また、機関 B については実際の検体を従来は正確に定量できていたが、新陽性コントロールを用いている現在は従来よりも高めに定量している可能性が懸念された。

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は、非常に少ないウイルスを検出し、汚染の判定を行わなければならない状況にあり、検査機関によって検査結果が大きく異なることがないよう検査の精度管理システムの構築は非常に重要な課題となっている。

精度管理の対象のひとつとして、実際の検体検査(リアルタイム PCR)に用いる陽性コントロールの検査機関ごとのばらつきについて、デジタルPCRを用いて確認したところ、検査機関により $2\log_{10}$ 程度の大きなばらつきがあることが明らかとなった。これは同じ検体を検査しても機関によって検査結果が 100 倍程度異なる可能性がある現状が示されたものであり、陽性コントロールの管理が検査の精度管理上非常に重要な管理点となることを示している。

陽性コントロールの精度確認法としては本報告のように各機関から陽性コントロールを一カ所に集約し、同時に測定する方法が使用試薬や機器の差がなく、もっとも客観的に判定できる方法と考えられた。

デジタル PCR は陽性コントロールを用いることなく検体に含まれる遺伝子のコ

ピー数の絶対定量が行えるとする定量方法であるが、実際には陰性検体からもわずかながら陽性カウントが生じるため、食品からのウイルス検出のような微量測定に利用するのは現段階では困難である。しかし、陽性コントロールの検定では 10^4 コピーという比較的高濃度の検体を用いるため、実験でのばらつきは小さくなり精度管理への利用に適していると考えられた。

E. 結論

- 12 機関で利用している NoV 遺伝子検査の陽性コントロールの検定を行った。
- 2015 年に配布された新陽性コントロールは旧陽性コントロールよりもより正確な検定結果となった。
- 新陽性コントロールであっても検定結果には機関によって最大 $2\log_{10}$ のばらつきが確認された。
- 食品からのウイルス検出検査の精度管理において、陽性コントロールの管理が非常に重要な管理点であることが示された。
- デジタル PCR が検査の精度管理において、陽性コントロールの検定に有用であることが示された。

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 1. デジタル PCR の測定範囲の検討

Sample	コピー数/2ul	陽性	陰性	合計カウント
10 ³ -1	724	394	12595	12989
10 ³ -2	736	473	14876	15349
10 ³ -3	844	580	15865	16445
10 ³ -4	710	483	15770	16253
10 ³ -5	796	525	15239	15764
10 ³ -6	814	548	15586	16134
10 ³ -7	766	479	14460	14939
10 ³ -8	670	453	15683	16136
10 ⁴ -1	7620	4565	11922	16487
10 ⁴ -2	7180	4321	12122	16443
10 ⁴ -3	7320	4604	12613	17217
10 ⁴ -4	6160	3943	13157	17100
10 ⁴ -5	7660	4594	11936	16530
10 ⁴ -6	7100	4133	11743	15876
10 ⁴ -7	7540	4773	12642	17415
10 ⁴ -8	7020	4298	12378	16676
10 ⁵ -1	52800	14343	1705	16048
10 ⁵ -2	65000	15210	1021	16231
10 ⁵ -3	58000	14217	1322	15539
DW	11	8	17142	17150

表 2 12 機関で実際に利用している陽性コントロール(10^4 コピー/5 μ l)の定量結果

	機関	コピー数/2 μ l	
国衛研	N	2684	
新しい PC	A	72	平均 3,028 中央値 1,422
	B	1568	
	C	72	
	D	714	
	E	382	
	F	22360	
	G	1422	
	I	686	
	J	1924	
	K	2180	
	L	1928	
古い PC	A	76	平均 1,114 中央値 487
	B	4100	
	C	38	
	D	362	
	E	612	
	F	1504	
	G	1916	
	H	304	

平成 27 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

次世代シーケンスサーによるカキから検出された ノロウイルス遺伝子の網羅的解析

研究分担者

上間 匡

国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

現在ウイルスが関与する食中毒および感染性胃腸炎事例においては迅速に結果を求められることからウイルス遺伝子を検出する PCR 法が各検査機関で実施され, 原因食品や感染ルートの解明には検出ウイルスの塩基配列解析による科学的根拠の提示が求められる. しかしながら, 食中毒事例(とくに二枚貝関連事例)では患者間, あるいは食品と患者間で検出される遺伝子型が異なる場合や 1 人から複数の遺伝子型が検出されるなど原因特定が困難な事例も少なくない.

二枚貝や食品, 臨床検体には複数の遺伝子型のノロウイルスが含まれる可能性があるが従来のクローニングやダイレクトシーケンスでは, 検体に含まれるごく一部の主要な遺伝子型のみしか検出できない状況であった. 検体に含まれる複数のノロウイルスの遺伝子型を可能な限り検出するための検査法の確立を目的に, 市販カキから検出されるノロウイルス遺伝子について網羅的解析を行い現状把握を試みた. その結果, 厚労省通知法に準じた PCR を用いることでカキに含まれるノロウイルスの網羅的解析が可能であり, 1 検体から複数の遺伝子型が検出できることが示された.

A. 研究目的

現在ウイルスが関与する食中毒および感染性胃腸炎事例においては迅速に結果を求められることからウイルス遺伝子を検出する PCR 法が各検査機関で実施されており, 迅速性の点から主にリアルタイム PCR によって原因ウイルスの検出が行われている. 原因食品や感染ルートのさらに詳細な解明のためには検出ウイルス

の塩基配列解析を行い, 患者間, 患者・食品間で検出されるウイルスの遺伝子型の相同性比較による科学的根拠の提示が求められる. しかしながら, 食中毒事例(とくに二枚貝関連事例)では患者間, あるいは食品と患者間で検出される遺伝子型が異なる場合や 1 人から複数の遺伝子型が検出されるなど原因特定が困難な事例も少なくない.