

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）  
「食品微生物試験法の国際標準化実装に向けた研究」  
分担報告書

デジタル PCR とリアルタイム PCR の性能比較に関する研究  
研究分担者 上間 匡 国立医薬品食品衛生研究所

## 研究要旨

微生物の検出において、従来の培養法による検査では、結果判定までに数日の時間が必要となること、また食品媒介性ウイルスなど有効な培養法が十分確立されていない病原体には対応できないこと、ゲノム解析による詳細な微生物の疫学解析の発展などから、遺伝子検査法は食品からの微生物検出において重要なツールとなっている。

従来からのコンベンショナル PCR に続いて、検査の迅速性を目的に、定性性と定量性を併せ持ったリアルタイム PCR が多く実用されてきた。近年、リアルタイム PCR の定量性をさらに発展させ、リアルタイム PCR に比較して絶対定量などの多くの利点をもつデジタル PCR 技術が医薬の分野で利用され始めている。本研究では食品分野でのデジタル PCR 活用のためのガイドライン策定に向けた検討として、国内外での利用実績のあるノロウイルス検出のためのリアルタイム PCR 法の条件等を基本条件としてデジタル PCR の検証を実施した。その結果デジタル PCR の利用に向けては現時点でのリアルタイム PCR の条件に加えて、さまざまな条件を検討する必要があることが示された。

本研究では、デジタル PCR とリアルタイム PCR の直接比較のため、ノロウイルス検出のためのリアルタイム PCR 試薬を用いて検討を行った。

### A. 研究目的

食品中の微生物に対する規格基準の設定、製品の規格検査においては、昨今輸出入を前提に、国際整合性を持つことが重要となっている。規格基準の設定は、食品に由来する微生物学的リスクの管理を目的として、検査法と合わせて設定される。従来、食品由来病原微生物は主に細菌を対象として培養法を基本として検査法が整備されてきた。従来の培養法による検査では、結果判定までに数日

の時間が必要となること、また食品媒介性ウイルスなど有効な培養法が十分確立されていない病原体には対応できないこと、ゲノム解析による詳細な微生物の疫学解析の発展などから、遺伝子検査法は食品からの微生物検出において重要なツールとなっている。

国内の食中毒統計資料<sup>1)</sup>から読み取れるように、国内で報告される食中毒事件の約3割、食中毒患者の半数においてノロウイルスが原因と推定されている。また、米国、欧州

などでもノロウイルスや A 型肝炎ウイルスは代表的な食品由来病原ウイルスとして認識され、食品からの検査法として ISO15216-1<sup>2)</sup>が示されている。また、CODEX 委員会では食品衛生部会において、今後優先的に取り組む課題として、食品中のウイルスに関する衛生管理ガイドラインの改正を挙げている<sup>3)</sup>。

ノロウイルスなどの食品媒介ウイルスについては培養ができないために現状では遺伝子検査のみが実施されるが、ウイルス遺伝子検出は感染性ウイルスの検出ではないため、健康リスクとウイルス感染性の関係性を示すことができず、食品中の病原ウイルスの規格基準は世界的にも設定されていないが、輸入カキについて ISO15216-1 に準じたウイルス検査を実施して輸入許可を行うシンガポールの事例<sup>4)</sup>や、スイスにおける食肉製品製造における E 型肝炎ウイルス汚染検査導入の試み<sup>5)</sup>など、食品中の病原ウイルスの規格基準設定につながる可能性のある動きは見られる。

これまで遺伝子検査は、PCR 後に電気泳動および塩基配列解析によって標的遺伝子の増幅を確認するコンベンショナル PCR (コンベ PCR)、加水分解プローブを用いて、標的遺伝子の増幅を特異的かつリアルタイムに確認できるリアルタイム PCR(qPCR)が行われてきた。近年、qPCR の定量性をさらに発展させ、qPCR に比較して絶対定量などの多くの利点をもつデジタル PCR(dPCR)技術が医薬分野で利用され始めている。

本研究では、dPCR の原理や利点について、機器、試薬メーカー等のサイト情報や European Network of GMO Laboratories (ENGL)の報告書など情報収集を実施した。また、遺伝子検査による食品中の微生物規格

基準の設定に向けた今後の国際的な動向にも対応するために、dPCR を食品検査に導入するためのガイドライン策定に向けた dPCR の基本的性能について qPCR と比較することで検証した。

## B. 研究方法

### 1) dPCR の原理・メリットなどについて

Google 検索にて[ dPCR 原理]のキーワードで検索を実施して上位に表示された以下の 4 社のサイトを参照した。

Thermofisher Scientific 「次世代の定量技術！デジタル PCR の原理とは？」<sup>6)</sup>

QIAGEN 「dPCR 対 qPCR」<sup>7)</sup>

Eurofins 「第 3 世代の PCR～デジタル PCR～ddPCR はここがすごい | これって何？バイオコラム第 44 回」<sup>8)</sup>

AZ Science 「デジタル PCR 装置とは？原理やメリット・用途を分かりやすく解説」<sup>9)</sup>

### 2) dPCR 関連文書

European Network of GMO Laboratories (ENGL) の 報 告 書 Overview and recommendation for the application of digital PCR<sup>10)</sup>を参照した。

### 3) dPCR の基本性能の検証

#### 3)-1 使用機器

qPCR: 7500 realtime PCR システム (Thermofisher)

dPCR: QIAcuity ONE (QIAGEN)

#### 3)-2 使用試薬

qPCR: TaqMan Fast Virus 1 Step Mastre Mix (Thermofisher)

dPCR: QIAcuity OneStep Advanced Probe

Kit (QIAGEN)

### 3)-3 PCR用プライマープローブ

ノロウイルス：病原体検出マニュアル ノロウイルス（通知法）および ISO15216-1(ISO)に示される配列。

A 型肝炎ウイルス：ISO15216-1(ISO)に示される配列。

### 4) ノロウイルス qPCR 用陽性コントロールプラスミド

タカラ社 RR250A を用いた。

### 5) 試薬の調整および PCR 条件

qPCR については ISO に準じてプライマー、プローブの濃度を設定し、試薬の説明書に従って調整した。

dPCR については ISO に準じてプライマー、プローブの濃度を設定し、試薬説明書に従って調整した。

## C. 研究結果

### 1) dPCR の原理、メリット

図 1 に dPCR の原理を示した。dPCR は検体由来の核酸と増幅用の試薬（PCR 酵素やプライマー、プローブなど）の混合は qPCR と同様に行う。qPCR がチューブで検体と試薬の混合を行い、そのままサーマルサイクラーにて PCR 反応を行うのに対して、dPCR では検体に含まれる標的遺伝子を限界希釈して微小区画に 1 または 0 となるように分配する。微小区画は検体・試薬の混合液にオイルを加えてエマルジョン化して微小区画化するドロップレット方式または、専用のプレート上に作成された微小ウェルに分配するウェル

チップ方式がある。どちらも 1 反応あたりの微小区画数は数万から数十万程度となる。

qPCR では微小区画化せずに反応液中に含まれるテンプレートの量に比例して増幅されてくるターゲットを検出するのに対して、dPCR では微小区画ごとにターゲットが存在すれば増幅により陽性と判定される。検体・試薬の混合液は多くの場合 50 $\mu$ L 程度であるので、数万の微小区画それぞれの陰陽判定にはキャピラリーや高精度カメラによる撮影が必要となる。

主な dPCR のメリットとしては以下の点が挙げられる。

- ・ qPCR が定量のために検量線、および検量線作成のための標準遺伝子が必要であるのに対して、検量線や標準品の必要なく定量が可能。
- ・ dPCR は PCR 終了後のエンドポイントで判定するため PCR 増幅効率の影響が小さい。
- ・ 微小区画化することで阻害物質の影響を小さくできる。

qPCR のメリットは以下の点が挙げられる。

- ・ 低濃度から高濃度まで検出可能な広いダイナミックレンジを持つ。
- ・ PCR 反応中に増幅の確認ができる。
- ・ 広く確立されたプロトコルが豊富にある。

表 1 に dPCR と qPCR の比較を示した。

### 2) dPCR 関連文書の解析

dPCR は、PCR であるので、コンベ PCR、qPCR と基本的なターゲット遺伝子増幅の原理は同様である。従って、qPCR で確立された多くのプロトコル（プライマー、プローブ

の濃度、温度サイクル条件など)が応用可能と考えられるが、dPCRの導入にあたって検討すべきこととして以下の点が挙げられる。

- ・ ドロップレット dPCR の場合、核酸抽出試薬がドロップレット形成に影響する可能性がある。
- ・ 2本鎖 DNA の場合、2本鎖を denature 後に微小区画へ分配すると2倍にカウントされる可能性がある。
- ・ ドロップレット、ウェルチップどちらの dPCR においても、機器に最適化された試薬を用いる必要がある、qPCR で使用している試薬はそのまま利用できない可能性が高い。
- ・ プライマー、プローブの濃度は微小区画化されることで qPCR よりも相対的に高濃度となるため、至適濃度については検討が必要となる可能性がある。
- ・ qPCR プローブでクエンチャーとして使用している標識を見直す必要がある場合がある。
- ・ PCR サイクルのアニーリング温度は至適条件を検討する必要がある可能性が高い。

### 3)dPCR の基本性能の検証

#### 3)-1 ノロウイルスコントロールプラスミドを用いたダイナミックレンジの検証

qPCR 用試薬として市販されているノロウイルス GI および GII のコントロールプラスミド(タカラ社 RR251A)をと ISO プライマー、プローブ用いて、qPCR と dPCR の測定レンジを比較した。qPCR では GI、GII とともに

には  $4.0 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L のレンジで確実に検出可能であった。dPCR では  $4.0 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L のレンジで検出可能であった(図2: GI, 図3: GII)。

通知法プライマー、プローブを用いた場合、dPCR では GI (図4)、GII (図5)ともに定量不可能となった。

#### 3)-2 qPCR の Ct 値と dPCR による定量値の関係

3)-1 の結果を参考に、陽性コントロールプラスミドの希釈液を調整し、qPCR および dPCR を実施し、検出感度を比較した結果を図6に示す。X軸が qPCR による Ct 値を示しており、最小 20.2 から最大 41.0 まで qPCR では検出されていた。一方で、dPCR では ISO プライマーを用いる場合 Ct 値 23.5 から 31.9 までは陽性として定量値が示された。

### D. 考察

dPCR の原理はコンベ PCR、qPCR と基本的に同様であるが、大きなメリットは検量線作成のための標準検体を必要とせずに、検体中の遺伝子コピー数を定量できることである。遺伝子コピー数の定量値そのものが食品に含まれる微生物学的リスクをそのまま評価する指標とはならないが、ノロウイルスをはじめとした培養が困難な病原体の汚染指標として利用されることが今後十分考えられる。

現在主に用いられる qPCR では検量線を作成するために  $10^2 \sim 10^7$  copies/ $\mu$ L 程度の希釈列を、qPCR の実施ごとに作成する必要がある、検査実施者の手間がかかるうえに、遺伝子コンタミネーションのリスク要因ともなっている。 $10^7$  copies/ $\mu$ L 程度の標準検体を

作成するためには、標準検体のストックの濃度は  $10^9$  copies/ $\mu$ L 程度が必要となり、qPCR 検査の実施のたびに非常に高濃度の標準検体を扱う必要がある。PCR 自体の検出感度が非常に高いため、標準検体による実験系の汚染は、検査室への影響が深刻なものとなるため、標準検体が不要な dPCR は特に微量な遺伝子検出が必要とされる食品の検査にはおおきなメリットがあると考えられる。

一方で、C.3)dPCR の基本性能の検証で示されたように、すでに qPCR 検査として広く用いられているノロウイルスの検出系において、qPCR が  $0.0 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L のレンジの遺伝子を安定的に検出するのに対して、dPCR は  $4.0 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L と検出可能なレンジは小さいことが示されたほか、プライマーとプローブについても ISO15216-1 に記載のノロウイルスを対象としたプライマーとプローブが dPCR でも qPCR と同様に利用できるのに対して、国内の検査で広く用いられている通知法のプライマー・プローブでは dPCR では利用が難しいことが示された。このようにすでに確立されている qPCR のプロトコルが dPCR でそのまま利用できるかどうかは、実際に検証する必要があることから、検査への導入までにはプライマー、プローブの設計を新たに行い、その特異性や検出感度についての検証が必要になる。

また、dPCR で定量値が得られるのが qPCR の Ct 値として 23 から 30 未満となったが、食品に含まれる病原体が微量である場合は dPCR で検出困難となる可能性を示唆している。今後のリスク評価でたとえば qPCR での Ct 値が 30 より大きい場合（検体中の遺伝子コピー数がある程度小さい場合）の健康

リスクは許容できる、などの知見が得られた場合は dPCR の利用も促進されることが期待できる。

食品媒介ウイルスについては現在、感染性ウイルスの定量的評価による健康リスクに基づいた規格基準が存在しないことから、細菌など定量的リスク評価の面で先行している検査対象について dPCR の利用導入を検証する必要もあると考えられる。

## E. 結論

dPCR は検査室、実験系の深刻な汚染原因となる標準検体を必要とせずに定量値が得られることは、検査法として優れた点であるが、既存の qPCR のプロトコルがそのまま適用できない可能性もあるほか、遺伝子検出感度のレンジも qPCR に比較して小さいという大きな課題があり、検査導入に向けて検討すべき項目が多いと考えられる。

定量的なリスク評価の面で先行する病原体に対する検査法として検討することで、より実践的な導入に向けたガイドラインの策定が行えると思われる。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## G. 知的財産権の出願・登録

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

参考文献など

1. 食中毒統計資料  
[https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryoushokuhin/syokuchu/04.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoushokuhin/syokuchu/04.html)
2. ISO15216-1:2017 <https://www.iso.org/standard/65681.html>
3. Codex CCFH 54 REP 24/FH [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcode-x%252FMeetings%252FCX-712-54%252FFINAL%2BREPORT%252FREP24\\_FHe.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcode-x%252FMeetings%252FCX-712-54%252FFINAL%2BREPORT%252FREP24_FHe.pdf)
4. シンガポールにおけるカキの輸入検疫について  
<https://www.maff.go.jp/j/shokusan/export/singapore.html>
5. Ripellino P, Pianezzi E, et al., Control of Raw Pork Liver Sausage Production Can Reduce the Prevalence of HEV Infection. Pathogens. 2021 Jan 22;10(2):107. doi: 10.3390/pathogens10020107.
6. ThermoFisher <https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/digitalpcr1/>
7. QIAGEN <https://www.qiagen.com/ja-jp/applications/digital-pcr/beginners>
8. Eurofins <https://www.eurofins.co.jp/clinical-testing/%E3%82%B5%E3%83%BC%E3%83%93%E3%82%B9/geneticlab/%E6%8A%80%E8%A1%93%E3%82%B3%E3%83%A9%E3%83%A0/%E7%AC%AC3%E4%B8%96%E4%BB%A3%E3%81%AEpcr-%E3%83%87%E3%82%B8%E3%82%BF%E3%83%ABpcr-%E3%81%AF%E3%81%93%E3%81%93%E3%81%8C%E3%81%99%E3%81%94%E3%81%84-%E3%81%93%E3%82%8C%E3%81%A3%E3%81%A6%E4%BD%95-%E3%83%90%E3%82%A4%E3%82%AA%E3%82%B3%E3%83%A9%E3%83%A0-%E7%AC%AC4%E5%9B%9E/>
9. アズサイエンス <https://azscience.jp/column/category/top06-sub18/>
10. Overview and recommendation for the application of digital PCR, European Network of GMO Laboratories (ENGL)  
<https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/WG-dPCR-Report.pdf&ved=2ahUKEwjpjNjWxJuGAxWXbfUHHdIFDgEQFnoECAkQAQ&usq=AOvVaw2-Go-rTfI0sxlmwI9nw43>

図1 dPCR の原理

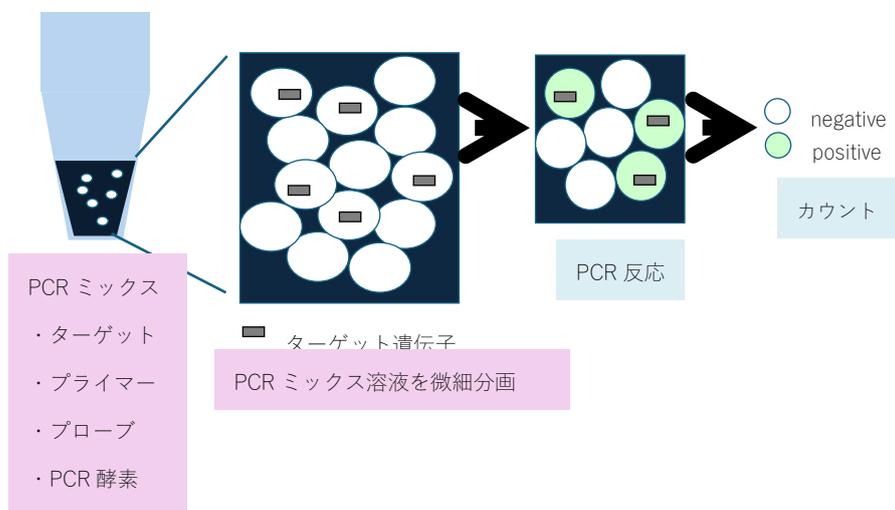
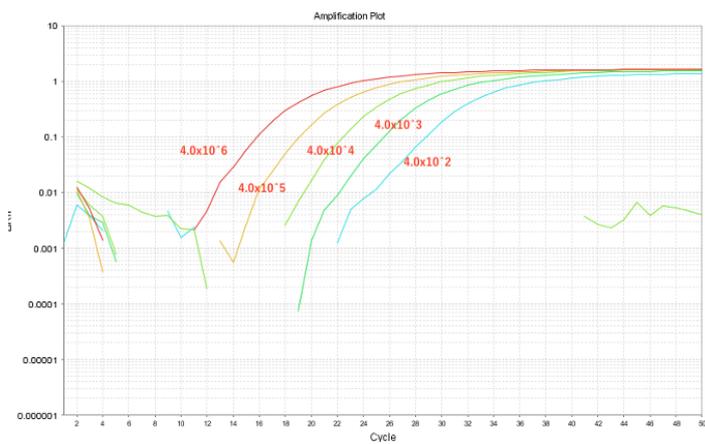


図2:GI ノロウイルス陽性コントロールプラスミドを用いた遺伝子検出レンジの比較  
A; qPCR



B; dPCR (上部の青いプロットが陽性カウント、下部のグレーのプロットが陰性カウント)

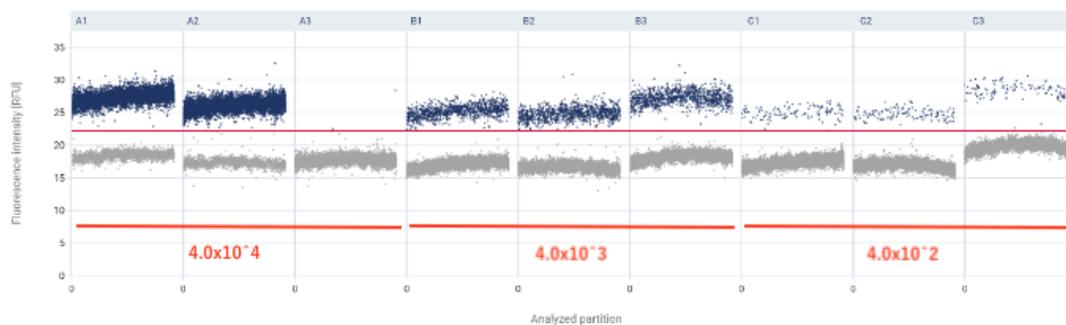
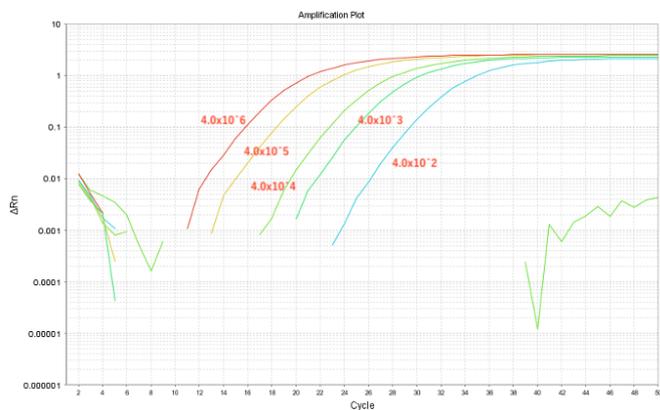


図3：GII ノロウイルス陽性コントロールプラスミドを用いた遺伝子検出レンジの比較  
A; qPCR



B; dPCR(上部の青いプロットが陽性カウント、下部のグレーのプロットが陰性カウント)

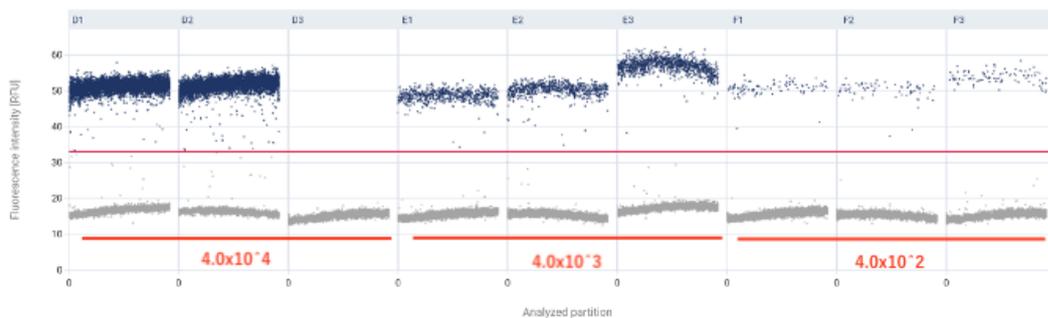


図4：GI ノロウイルス陽性コントロールプラスミド（通知法プライマー、プローブ）  
陽性カウントと陰性カウントが分離せずにカウント不能となった

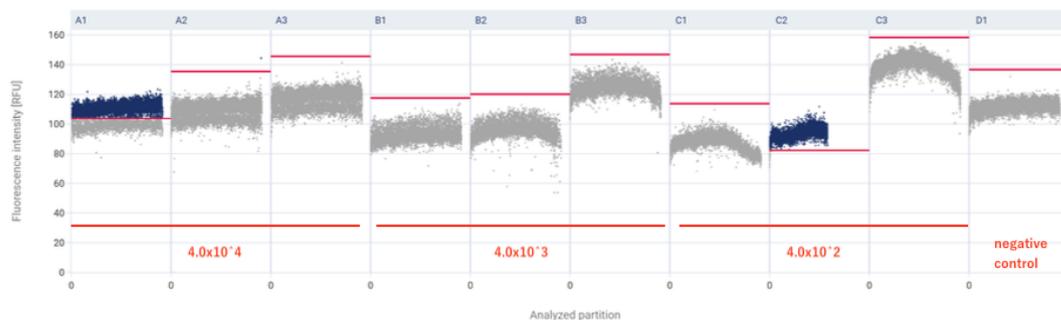


図5：GII ノロウイルス陽性コントロールプラスミド（通知法プライマー、プローブ）  
陽性カウントと陰性カウントが分離せずにかウント不能となった  
陽性シグナルの強度に大きなばらつきが生じている

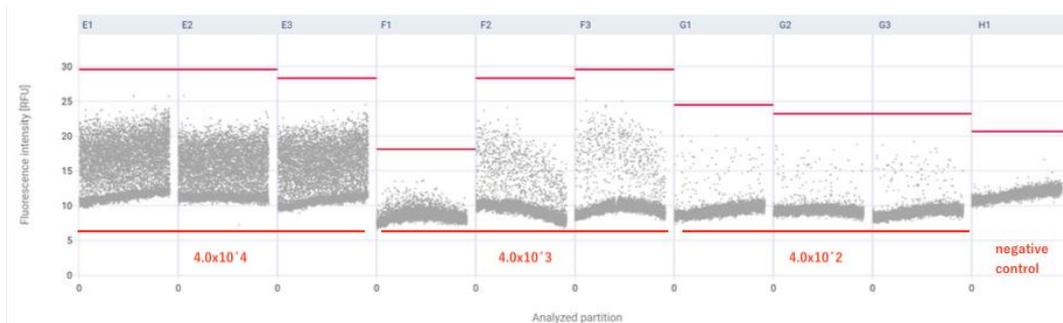


図6：qPCRのCt値（x軸）と、dPCRの陽性カウント（y軸）の比較

