

消費者庁食品衛生基準科学研究費補助金
令和 6 年度分担研究報告書

デジタル PCR の反応条件最適化に関する研究
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。

多くの検査現場では、迅速検査を目的に、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、ノロウイルス及び A 型肝炎ウイルスを材料に、ウイルス検出のためのデジタル PCR の最適化に向けた検証を実施した。その結果デジタル PCR の利用に向けてはリアルタイム PCR とは異なる条件を設定する必要があることが示された。

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。食品由来病原微生物は主に細菌を対象に培養法を基本として検査法が整備されてきた。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。

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のほか、Codex 委員会において食品中の病原ウイルス（ノロウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスなど）に対する衛生管理ガイドラインの改訂作業が開始されるなど、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

のある動きが見られる。

昨年度本研究では、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 と比較を行い、これまで利用されてきた qPCR とは異なる条件設定が必要であることを示した。

今年度は、ノロウイルスと A 型肝炎ウイルスを材料に、dPCR を実施する際のプライマー濃度等の条件設定について最適化について検討した。

B. 研究方法

1) 定量に用いた検体

GII ノロウイルス懸濁液及び A 型肝炎ウイルス (HAV, ATCC VR-1402) 懸濁液を用いた。ゲノムコピー数は GII 約 2500 コピー/5uL、HAV 約 5000 コピー/5uL となるよう調整した。

2) RNA 抽出

1) のウイルス懸濁液と Nuclease free water を合計 300μL となるように混合して、磁気ビーズによる自動核酸抽出 (Maxwell RSC viral total RNA kit, Promega) により RNA を抽出し、1 Step RT-dPCR に供した。

3) プライマー及びプローブ

ノロウイルス: ISO15216-1(ISO) 及び通知法に示される配列。

A 型肝炎ウイルス: ISO15216-1(ISO) に示される配列。

4) dPCR

使用機器

QIAcuity ONE (QIAGEN)

使用試薬

QIAcuity OneStep Advanced Probe Kit (QIAGEN) QIAGEN 社の 1 step RT-dPCR キット試薬を用いた。

5) qPCR

使用機器

7500 realtime PCR システム (Thermofisher)

使用試薬

TaqMan Fast Virus 1 Step Mastre Mix (Thermofisher)

C. 研究結果

1) GII ノロウイルスの検出条件

令和 5 (2023) 年度本報告書にて、食品からのノロウイルス検出法 (国内通知法) で示されるプライマー、プローブと、50°C40 分、95°C2 分、(95°C5 秒、60°C30 秒) x40 サイクルの温度サイクルを用いた dPCR では、陽性と陰性のプロットが分離できずに定量不可となることを報告した。今年度は、PCR 工程を (95°C5 秒、50°C15 秒、72°C15 秒) x40 サイクルの 3 段階サイクルに変更した結果、陽性と陰性反応のプロットを分離することが可能となった。プライマー、プローブの組合せについては、ノロウイルスについては ISO15216-1 に示されるプライマー、プローブを用いる方が通知法のプライマー、プローブを用いるよりも陽性と陰性のプロットが明確に分離された (図 1)。

ISO プライマー、プローブを用いた GII ノロウイルスの RT-dPCR について、HAV

での検討と同様にプライマー、プローブの濃度を2倍にして2段階及び3段階サイクルの検出コピー数の比較を行った結果、GII ノロウイルスについては、ISO プライマー、プローブを用いた場合は検出コピー数に差は見られなかった（結果示さず）。

2) HAV の検出条件

ISO15216-1 の手順に従い、プライマー濃度 0.4 μ M, プローブ 0.2 μ M、温度サイクルを 50°C40 分、95°C2 分、(95°C5 秒、60°C30 秒) x40 サイクルに設定して HAV の検出を試みた。HAV 懸濁液を合計 300 μ L となるように HAV 懸濁液 1、10、100 μ と Nuclease free water を混合し、RNA 抽出後に、RT-qPCR 及び RT-RT-dPCR を実施した。表 1 に示すように、RT-qPCR ではそれぞれ Ct 値が 25.0、21.5、18.0 となり問題なく検出された。RT-dPCR では検出されない結果となった（表 1. 各濃度 3well で実施）。

次に、プライマーとプローブの反応液中の濃度を2倍にして、同様に RT-dPCR を実施した（表 2）。HAV のコピー数は HAV 1, 10, 100 μ L がそれぞれ 1628.5, 12704.2, 12387.6 となった(表 2)。

また、温度サイクルを GII ノロウイルスの条件検討と同様に 50°C40 分、95°C2 分、(95°C5 秒、50°C15 秒、72°C15 秒) x40 サイクルの3段階温度サイクルにしたところ、陰性と陽性のプロットが明確に分離される傾向が見られた（結果示さず）。

3) HAV の定量性の検討

C. 2)で検証した条件（ISO プライマー 0.8 μ M, プローブ 0.4 μ M, 3 段階 PCR サイクル）にて、RT-dPCR で定量性できるコピー

数の範囲を検討した（図 2）。

HAV ウイルス液を2倍階段希釈で 1x から 1/128x まで7段階の希釈列を作成し、各希釈 3well ずつ、2 日間を2回試行し、定量した結果を表に示した。4 回の試行の平均値は、希釈倍率 1x が 4796.3 コピーから希釈倍率 1/128x が 44.4 コピー、希釈と定量値の相関係数は $R^2=0.9654$ となった。試行 1、2 回目の平均値は希釈倍率 1x が 6188.1 コピーから希釈倍率 1/128x が 27.5 コピー、希釈と定量値の相関係数は $R^2=0.9979$ となった。試行 3、4 回目の平均値は希釈倍率 1x が 3404.6 コピーから希釈倍率 1/128x が 61.3 コピー、希釈と定量値の相関係数は $R^2=0.8711$ となった。4 回の試行の平均値に関して、各希釈倍率における標準偏差は表に示すように希釈倍率 1x、1/32x, 1/64x, 1/128x の標準偏差が大きかった。

4 回の試行から、100 コピーから 3000 コピー程度が定量値として信頼性が高いと考えられた。

4) GII ノロウイルスの定量性の検討

GII ノロウイルスについては ISO プライマーを用いて、HAV と同様の条件で3回の試行を行った（図 3）。平均値は、希釈倍率 1x が 2377.8 コピーから希釈倍率 1/128x が 11.2 コピー、希釈と定量値の相関係数は $R^2=0.9997$ となった。HAV と異なり、標準偏差は小さい傾向にあった。HAV と同様に、100 コピーから 3000 コピー程度が定量値として信頼性が高いと考えられた。

D. 考察

本研究では、すでに広く用いられるリアルタイム PCR(qPCR)のプライマー、プローブを用いて、デジタル PCR(dPCR)を行う場合の条件と、定量性について検討した。

qPCR では、検量線として $10^2 \sim 10^7$ copies/ μ L 程度の幅広いレンジのコピー数の測定が可能であるが、dPCR での定量範囲は、本研究で試行した GII ノロウイルス及び HAV に関しては $10^2 \sim 10^3$ copies/ μ L 程度と、qPCR と比較して非常に小さかった。これは、今回利用した dPCR の反応プレート(Nanoplate 8.5K 24-well, QIAGEN)が 1 反応あたり約 8500 個のプロットが計測できるプレートであり、理論的に最大 8500 コピー程度までしか陽性コピー数を測定できなかったためと考えられる。

Nanoplate 26K 24-well, QIAGEN などの 26,000 個のプロットを計測できるプレートを用いれば測定範囲をさらに 10^4 copies/ μ L 程度までは拡大できる可能性があるが、使用する試薬の量も増えるため(8.5k プレート ; 12 μ L, 26k プレート ; 40 μ L) 1 反応あたりのコストが高くなることが懸念される。

BIO-RAD 社の機器の場合は、反応液中に 20,000 個程度の液滴を形成させて PCR 反応を行うため、測定範囲は 26k プレートと同程度と考えられる。

dPCR の定量範囲は qPCR と比較して小さいものの、検出限界については、今回 HAV が 45 copies/ μ L 程度、GII ノロウイルスが 11 copies/ μ L 程度であれば確実に検出されており、qPCR に近い感度を持っていることが示唆された。

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ため、実験室内の遺伝子汚染に強いと考えられる。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、本研究で示したようなプライマー、プローブの濃度や、PCR サイクル条件などをターゲットごとに検証することで、dPCR を食品からの微生物検出に利用可能となることが示された。

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り、利用には、既存の qPCR のプロトコルを改良する必要があることを示した。また、高濃度の遺伝子測定範囲は qPCR に劣るものの、低濃度の遺伝子検出感度は qPCR と同程度であると考えられた。検査導入に向けては、食品への添加回収試験により、遺伝子検出感度がどの程度影響を受けるかなど、さらに検討すべき項目が載る。

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

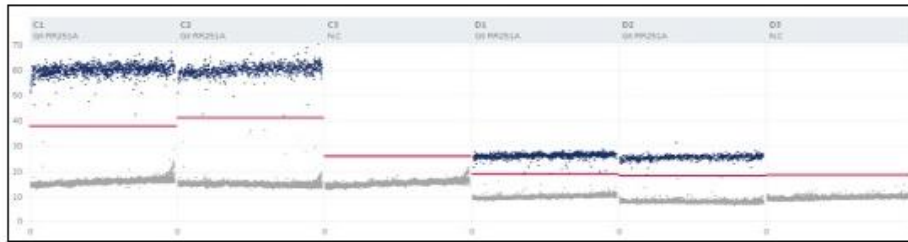
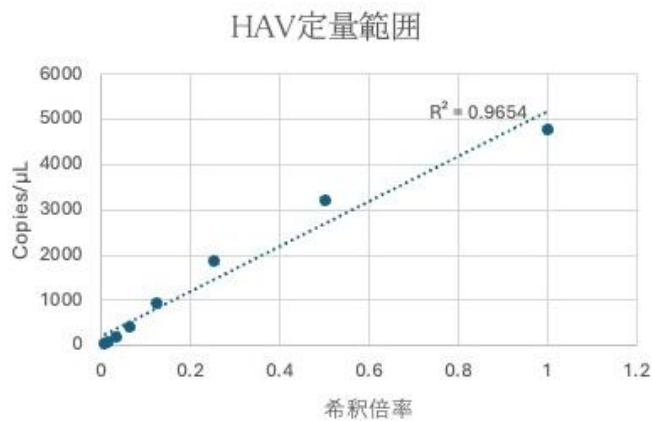
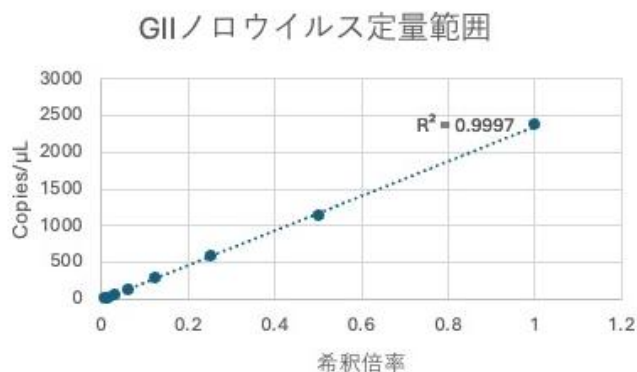


図1. GIIノロウイルスのRT-dPCR 反応 プロット
C1, C2, C3; ISOプライマー、プローブ
D1, D2, D3; 通知法プライマー、プローブ
C3, D3; 陰性コントロール、
RT-dPCRのPCRサイクルは50℃40分、95℃2分、(95℃5秒、50℃15秒、72℃15秒)x40サイクル
ISOプライマー、プローブの方が陰性、陽性プロットの分離が明確であった。



HAV希釈	平均値	標準偏差
原液	4796.3	1659.7
1/2	3231.4	240.4
1/4	1865.3	272.8
1/8	938.8	192.3
1/16	430.2	167.4
1/32	192.0	114.9
1/64	92.4	61.2
1/128	44.4	23.9

図2. HAVの定量性の検討
2倍階段希釈のウイルス液をRT-dPCRにて定量した。



GIIN希釈	平均値	標準偏差
原液	2377.8	26.9
1/2	1143.6	34.9
1/4	585.8	30.3
1/8	293.0	19.8
1/16	144.2	20.1
1/32	60.0	20.0
1/64	26.7	11.1
1/128	11.2	4.6

図3. GIIノロウイルスの定量性の検討
2倍階段希釈のウイルス液をRT-dPCRにて定量した。

表1. RT-dPCRとRT-qPCRによるHAV遺伝子の検出 (ISOプライマー0.4μM, プローブ0.2μM)

		RT-dPCR (copies/μL)			RT-qPCR
		Well 1	Well 2	Well 3	Ct値
HAV	100uL	0	0	0	18.0
	10uL	0	0	0	21.5
	1uL	0	0	0	25.0

表2. RT-dPCRとRT-qPCRによるHAV遺伝子の検出 (ISOプライマー0.8μM, プローブ0.4μM)

		RT-dPCR (copies/μL)			RT-qPCR
		Well 1	Well 2	Well 3	Ct値
HAV	100uL	12787.2	13088	11287.7	18.0
	10uL	11537.5	13287.2	13287.9	21.5
	1uL	1557.7	1606.4	1721.3	25.0

