

平成29年度・衛生研究所研究費事業報告

ノロウイルスとヒトヘルペスウイルス6 遺伝子の定量測定における

精度管理に関する研究

(計画年度：平成28年度～29年度)

研究代表者

ウイルス担当 中川佳子*1

共同研究者

ウイルス担当 貫洞里美*2 青沼えり 篠原美千代 富岡恭子 鈴木典子 峯岸俊貴 小川泰卓 内田和江
副所長 岸本剛

はじめに

食中毒検査におけるノロウイルス遺伝子検査（リアルタイムPCR法）では、反応時間が短縮できる同等以上の性能を持つとされる試薬があるとしても、精度保証の観点から厚生労働省通知に例示される試薬を用いた検査法（通知法）を実施している。また、遺伝子検査の陽性コントロール（PC）は、国から配布されているPC用プラスミドを希釈して使用しているが、保存中あるいは調整後の劣化により検査に使用できなくなることがあり、精度管理上問題となっている。

そこで、ノロウイルスの遺伝子検査に関して、通知法公表後に発売された試薬等を用い、検査の精度を落とすことなく迅速性の向上が図れるか検討し、さらに遺伝子検査のPC用プラスミドの取扱方法について検討した。

また、現在定量用PCがないヒトヘルペスウイルス6（以下HHV6）の定量測定のためのPC用プラスミドを作成した。

材料および方法

1 遺伝子検査試薬の検討

平成25-26年度にノロウイルス検査が実施された糞便検体80検体を使用した。通知法（現行法）と別法（DNA分解酵素処理無、新規逆転写酵素を使用）（追加法）を実施してデータを比較し、追加法が妥当であるか検討した。

2 PC用プラスミドの保存方法等の検討

クローニングにより、ノロウイルスGIの遺伝子を組み込んだプラスミドを作製した。TE buffer（pH8.0）（TE）を用いて 10^7 コピー/ $4\mu\text{l}$ となるよう調整し、以下の(1)-(3)の検討に用いた。

(1) 10^7 コピー/ $4\mu\text{l}$ を 37°C 、室温（ $18-25^\circ\text{C}$ ）、 4°C 、 -23°C 、 -80°C で20週間保存した。保存1日、3日、1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20週間後に取出し、リアルタイムPCRを行い、Ct値を比較した。

(2) 10^7 コピー/ $4\mu\text{l}$ を $10^7\sim 10^0$ コピー/ $4\mu\text{l}$ に調整したものを -80°C に保管し、凍結融解を20回繰り返した。各回の凍結融解後にリアルタイムPCRを行い、Ct値を比較した。凍結融解方法は、保存時のラックに入れたまま① 4°C 1

時間、②室温30分、③ 37°C 30分と④室温のラックに入れ替え室温10分の4通りを実施した。

(3) 10^7 コピー/ $4\mu\text{l}$ から希釈系列を作成する際に、①PBS、②DEPC処理水、③生理食塩水を希釈液として使用した。これらの希釈系列を10回凍結融解し、各回のCt値の推移を比較した。対照はTEのデータを用いた。

3 HHV6 遺伝子検査における定量用PCの作製

クローニングによりHHV6遺伝子を組み込んだプラスミドを、 $10^7\sim 10^0$ コピー/ $5\mu\text{l}$ となるようにTEで希釈した。リアルタイムPCRを実施して検量線を確認した。

結果及び考察

1 現行法で陽性だった検体は追加法でも全て陽性であった。また、現行法で陰性、追加法で陽性を示した検体については、シーケンスによりノロウイルス陽性であることが確認されたことから、非特異的反応により偽陽性となった検体は認めなかった。よって追加法は感度、特異性共に現行法に劣らないと考えられた。このことより、追加法は現行法と共に、検査法として妥当であると判断できた。

2 (1) 37°C と室温保存では、保存期間が長くなるほどCt値が小さくなる傾向を示した。 -23°C 保存は測定開始日と終了日のCt値の差が大きく、 -80°C が最も差が小さかった。PC用プラスミドの保存条件としては、 -80°C が適していることが示唆された。

(2) 凍結融解の回数に依存したCt値の顕著な変化は認められなかった。凍結融解方法としては、④の方法が、 10^7 におけるCt値の変動が最も小さく、凍結融解方法として適していると考えられた。

(3) 3条件ともCt値の変動が大きく、対照としたTEはCt値の変動が最も小さかった。PC用プラスミドの希釈液としてTEが適していることが示唆された。

3 リアルタイムPCRの結果、検量線は県が策定しているノロウイルス検査標準作業書のリアルタイムPCRにおける判定基準を満たす結果となった。よって、今回作成したプラスミドは、HHV6遺伝子検査のPCとして使用可能とした。

*1 現 食品微生物担当 *2 現 川口市保健所