

ノロウイルス検便検査（リアルタイムRT-PCR法）において 試験成立を担保する新規内在性コントロールの開発

○齋藤 憲介¹⁾、左近 直美²⁾

1) タカラバイオ株式会社、2) 大阪健康安全基盤研究所

第44回日本食品微生物学会学術総会

本研究の背景および目的

背景1. <PCR法を用いた検査での留意事項>

- ①試料は正しく調製されたか
 - ②PCR反応液への試料の添加量は十分であったか
 - ③作業者の手技に問題はなかったか（試料の添加ミス等）
- ⇒「**偽陰性**」のリスクに直結、試験全体の信頼性に関わる。

背景2. <内在性コントロール (Endogenous Control: EC)の活用>

- ◆ COVID-19検査では、試料中の**ターゲット以外の特定遺伝子**を検出するECを利用し、試験精度の管理が求められた。
- ⇒ 遺伝子検査におけるECの必要性・重要性は今後益々高まるだろう。

本研究の背景および目的

目的

- ノロウイルス検便検査用ECとして、ヒト腸内で優勢な菌種をターゲットとするEC反応系を構築する。
 - 検体によらず安定した結果が得られること
 - 環境細菌由来の非特異的増幅を極力抑えること

- 上記を満たすEC反応系の構築により、以下のことが可能になる。
 - PCR反応系への試料添加有無の正確な判別
 - 偽陰性判定リスクの低減

材料

< NoV遺伝子型既知の検体（10%便懸濁液）より得られた核酸 >

- 抽出法①： NucleoSpin® Virus（製品コード U0983B）
 - GI陽性 6検体 ●GII陽性 8検体 ●陰性 14検体
- 抽出法②： MagLEAD 12gC (PSS社)および専用試薬
 - GI陽性 4検体 ●GII陽性 29検体 ●陰性 4検体
- 陰性対照として、検体の代わりにH₂Oを核酸抽出操作に供したものを。

< 検量線作成のための標準物質 >

- NoV定量用鋳型： *Norovirus* (GI/GII) Positive Control DNA（製品コード RR251A）
⇒ 1反応当り10~1×10⁷コピーとなるよう希釈・添加した。
- EC鋳型： 標的配列を有するゲノムDNA ⇒ 一定量（1×10⁴コピー）を添加した。

方法

<cDNA作製>

- ▶ 10%便懸濁液より得られた核酸について、TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit Ver.2 (製品コード RR265A) のコンポーネントを用いて、取説に従い反応を行った。

<リアルタイムPCR>

抽出法①由来cDNA

抽出法②由来cDNA

試験①：EC単独の反応系の実検体評価

試験③：NoV + EC マルチプレックス反応系の実検体評価

試験②：NoV反応系とEC反応系の反応干渉の確認

⇒ 前述の標準物質を用いた検量線作成による評価

試験①: EC単独の反応系の実検体評価 - 方法 -

PCR反応液調製

< EC単独反応系 >

qPCR Mix	12.5 μ l
EC検出用Primer/Probe Mix	2.5 μ l
RNase Free H ₂ O	8.0 μ l
cDNA	2.0 μ l
Total	25.0 μ l

- NoV反応系には、TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit Ver.2 (製品コード RR265A) のコンポーネントを使用した。

リアルタイムPCR

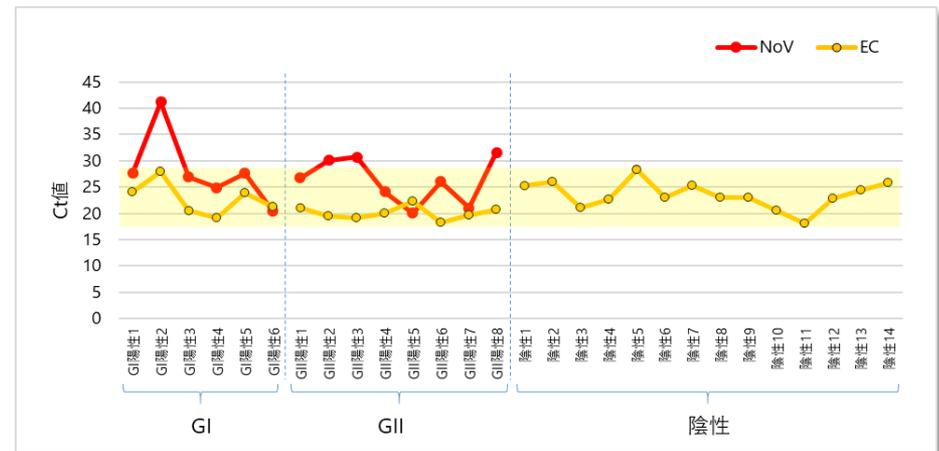
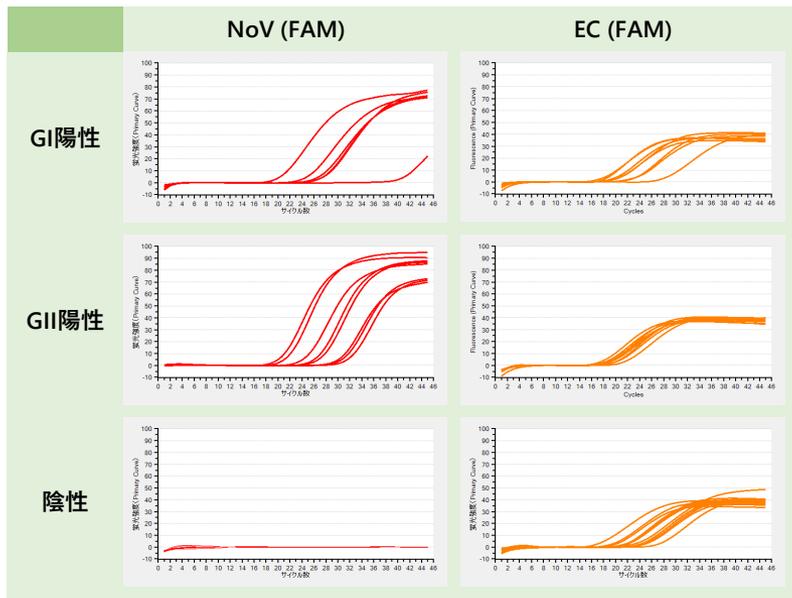
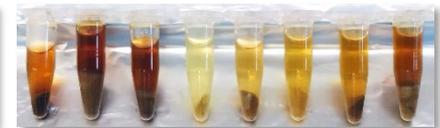
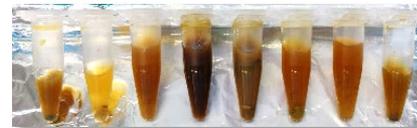
95°C	10秒	} 45サイクル
95°C	5秒	
56°C	30秒	

- PCR条件は、TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit Ver.2 (製品コード RR265A) の反応条件を設定した。
- Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950) を使用した。

試験①: EC単独の反応系の実検体評価 - 結果 -

➤ GII陽性検体（便懸濁液）

➤ 陰性検体（便懸濁液）



- NoV・GI陽性8検体、GII陽性8検体、NoV陰性14検体のすべてにおいて、安定してECが検出された。
- なお、核酸抽出操作の陰性対象やNo Template Controlでは、非特異的増幅は確認されなかった。

試験②: NoV反応系とEC反応系の反応干渉の確認 - 方法 -

PCR反応液調製

< GI or GII単独反応系 >

qPCR Mix	12.5 μ l
GI*2 or GII*3検出用Primer/Probe Mix	2.5 μ l
RNase Free H ₂ O	8.0 μ l
鋳型DNA (NoV)	2.0 μ l
Total	25.0 μ l

*2 GI primer: COG1F, COG1R
GI probe: RING1-TP(a), RING1-TP(b)
*3 GII primer: COG2F, ALPF, COG2R
GII probe: RING2AL-TP

< NoV+ECマルチプレックス反応系 >

qPCR Mix	12.5 μ l
GI*2 or GII*3検出用Primer/Probe Mix	2.5 μ l
EC検出用Primer/Probe Mix	2.5 μ l
RNase Free H ₂ O	3.5 μ l
鋳型DNA (NoV)	2.0 μ l
鋳型DNA (EC)	2.0 μ l
Total	25.0 μ l

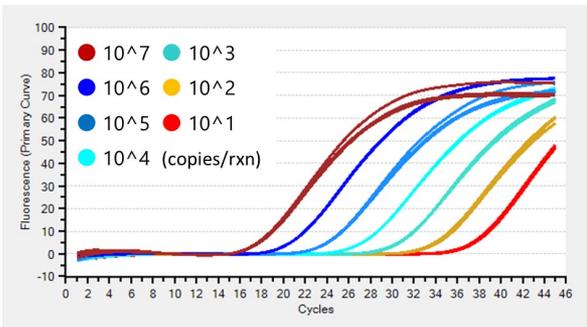
リアルタイムPCR

95°C	10秒	} 45サイクル
95°C	5秒	
56°C	30秒	

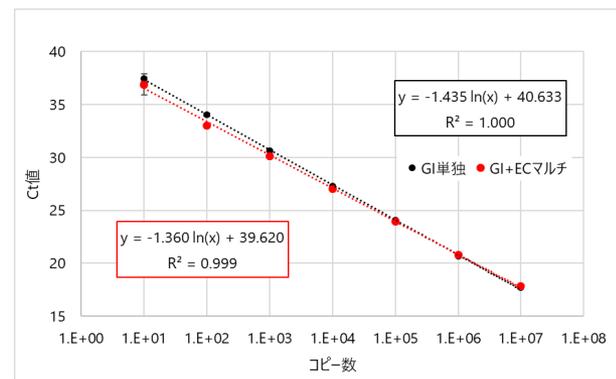
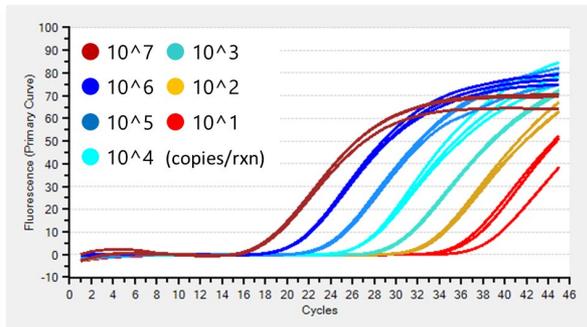
- PCR条件は、TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit Ver.2 (製品コード RR265A) の反応条件を設定した。
- Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950) を使用した。

試験②: NoV反応系とEC反応系の反応干渉の確認 - 結果 -

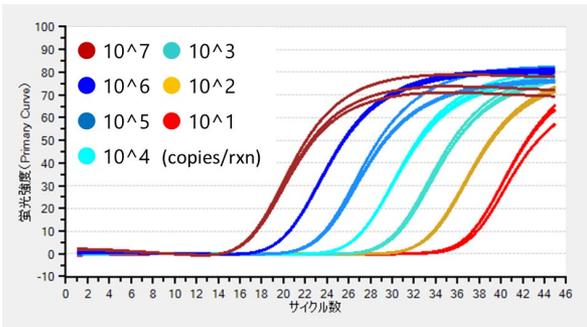
< GI単独反応系 >



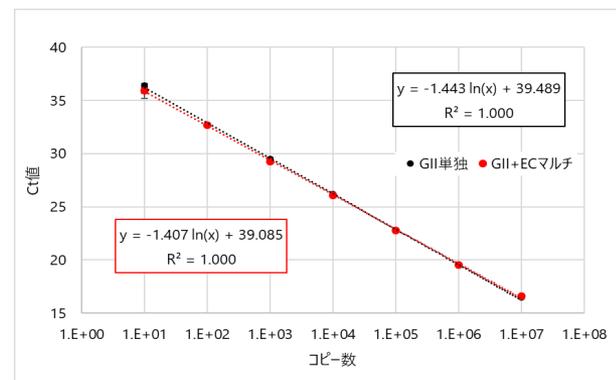
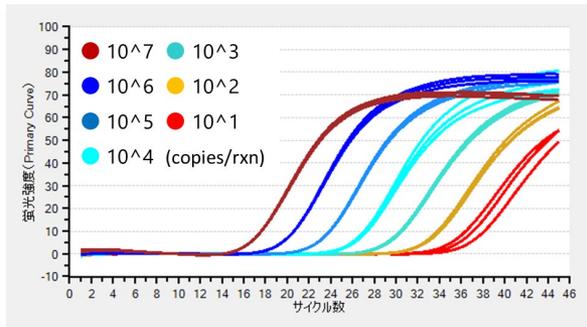
< GI+ECマルチプレックス反応系 >



< GII単独反応系 >

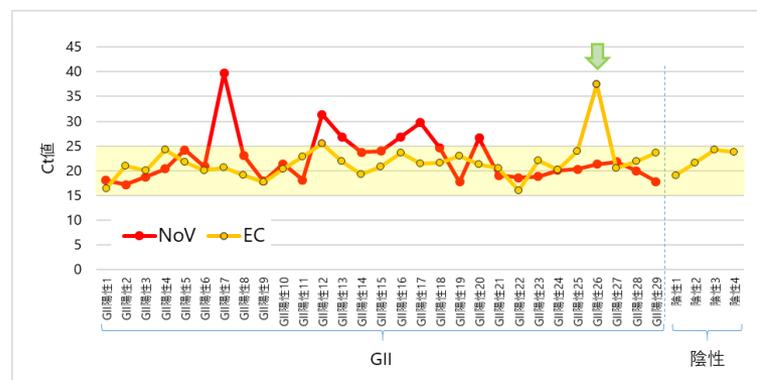
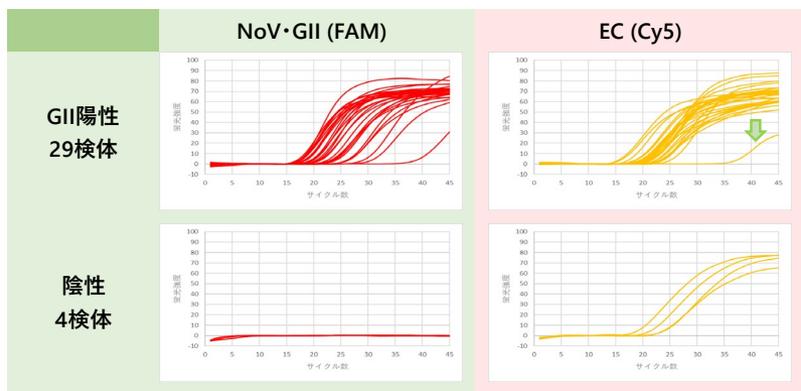
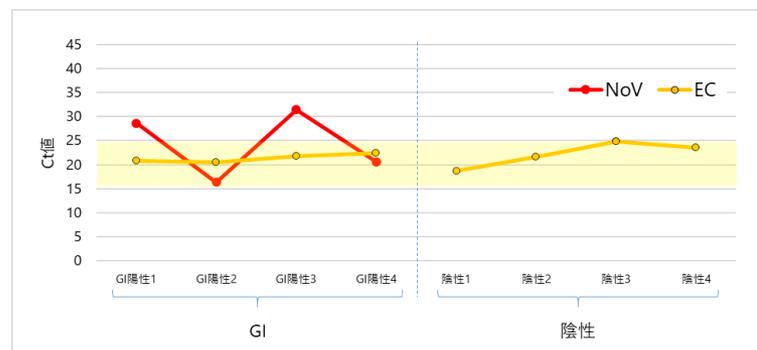
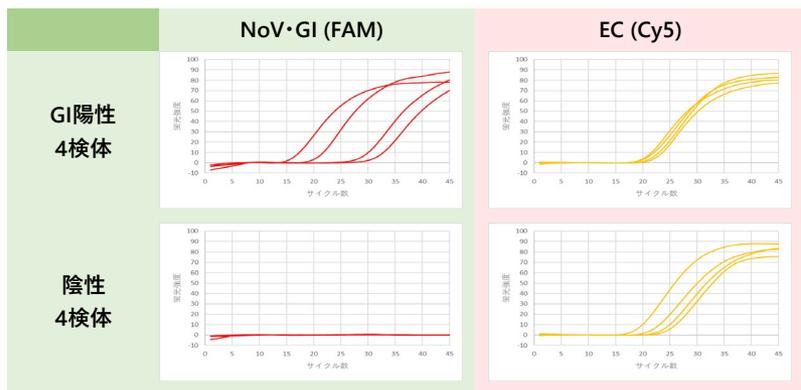


< GII+ECマルチプレックス反応系 >



- NoV反応系とEC反応系を組み合わせ、NoV定量用鋳型を用いて検量線を作成した。
- EC反応系およびEC鋳型存在下でも、直線性の高いNoV検量線を作成可能であった。

試験③: NoV+EC マルチプレックス反応系の実検体評価 - 結果 -



- 実検体においても、NoV陽性/陰性検体によらず、概ね安定してECが検出された。
- なお、核酸抽出操作の陰性対象やNo Template Controlでは、非特異的増幅は確認されなかった。

考察・まとめ

考察

- 前項にて顕著にCt値が遅れた1検体は、0歳児の検便であった。
⇒ 乳児の腸内細菌叢は成人と異なっており、本系で標的とした菌種の存在比が低かったと推測される。

まとめ

- ノロウイルス検便検査用ECとして、ヒト腸内で優勢な菌種をターゲットとするEC反応系を構築した。
- 本系は、NoV陽性/陰性検体によらず安定して検出されながら、環境細菌由来の非特異的増幅が生じにくい。
- 本系の活用により、試料添加の有無が正確に判別可能となり、偽陰性判定リスクの低減が期待される。



that's
GOOD
science!™

- Best-in-Class Tools
- Expert Support
- Value Pricing

ご清聴ありがとうございました。タカラバイオブースにもぜひお立ち寄りください。