

## 2ndリアルタイムPCRを用いたノロウイルス陽性確認方法に関する検討

永野 美由紀<sup>a</sup>, 秋場 哲哉<sup>b</sup>, 森 功次<sup>a</sup>, 宗村 佳子<sup>a</sup>, 木本 佳那<sup>a</sup>,  
林 志直<sup>a</sup>, 甲斐 明美<sup>c</sup>

ノロウイルス (NoV) による食中毒の調査では, 食品や施設の拭き取り検体についてもNoV検査が行われるが, これらの検体に含まれるNoVは極めて微量であるため検出し難い. また, リアルタイムPCRの定量値が低い場合は精度の信頼性に欠けることも指摘されており, 得られた結果の確認検査法を含めてさらなる検討が求められている. 我々は, より効率的にNoVを検出するために, 食品や拭き取り検体の新たなNoV検査法を開発し, 2ndリアルタイムPCRを用いて確認検査を実施してきた. しかしながら, リアルタイムPCRによる実測値では陽性判定であっても, 確認検査では陰性となる検体も多く確認されてきた. そこで, 2ndリアルタイムPCRに適した試料の作製法について検討した. 試料A~D (試料Aは従来の試料であり, 35サイクルの増幅反応により得られた産物, 試料Bは試料Aを10倍に希釈したもの, 試料Cは20サイクルの増幅反応により得られた産物, 試料Dは試料Cを10倍に希釈したもの) を作製し, 2ndリアルタイムの結果を比較した. その結果, 試料Aを用いた場合には, 20検体中8検体のNoV陽性が確認されたのに対し, 試料Bでは18検体が陽性となった. また, 試料Bを用いて2nd PCRを行ったところ, すべての検体で増幅産物を得られ, 遺伝子解析を実施することが可能であった. 以上のことから, 2ndリアルタイムPCRによる確認検査や遺伝子解析を行うための2nd PCRでは, 増幅産物を希釈して用いることで, 安定した結果が得られることが示唆された.

**キーワード:** ノロウイルス, 2ndリアルタイムPCR, 食品, 拭き取り, 確認検査, 食中毒

### 緒 言

近年多発しているノロウイルス (NoV) による食中毒の調査では, 患者や調理従事者に加え, 食品や施設の拭き取り検体についてもNoV検査を実施し, 感染源および感染経路の究明が行われている. 食品からのNoV検出法は厚生労働省通知<sup>1)</sup>によって示されており, 同通知ではNoV陽性とする判定基準をリアルタイムPCRによる実測値10コピー以上としている. しかし, 食品に含まれるNoVは微量であるため検出し難いことや, 10コピー前後の低い定量値は信頼性に欠けることから, NoV検出法<sup>2-9)</sup>や得られた結果の確認方法<sup>10)</sup> については, 多くの検討がなされている.

我々は, 細菌を使用した検体処理法<sup>2)</sup>を用いて食品中のNoV検査を行っている. そして, リアルタイムPCRで10コピー以上の定量値を示した検体については, 新たに conventional PCR (1st PCR) で増幅させた産物を用いて再度リアルタイムPCRを行う2ndリアルタイムPCR<sup>5,10)</sup>による確認検査を実施してきた. しかし, 実測値10コピー以上であっても, 2ndリアルタイムPCRでは陰性となる例も多く, 確認検査の手法や判定基準についてのさらなる検討が必要であった.

NoV陽性が確定された場合においても, 1st PCR産物から遺伝子解析に用いるために実施する2nd PCRで増幅産物を得られない例が散見される. それらの原因として, 1st PCRや2nd PCRで使用するプライマーが不適合である以外

に, 1st PCRで得られる増幅産物が過剰であるために, 次の2ndリアルタイムPCRや2nd PCRを阻害していることが考えられた.

そこで, 2ndリアルタイムPCRの実施に最適な1st PCR試料の作製法について検討を行うと同時に, 同試料を用いたNV遺伝子の塩基配列解析を行った.

### 材料と方法

#### 1. 供試材料

2010年から2012年の間に食中毒関連調査として当研究室に搬入された検体の中から, NoV実測値が10コピー前後を示した食品15検体, 拭き取り5検体を検討材料とした.

#### 2. NoV検査法

食品検体については, 細菌 (*Proteus vulgaris* NBRC 3045株) を用いた検体処理<sup>1)</sup>を行った. すなわち, 各検体について滅菌PBS (-) を用いて作製した10%乳剤8 mLにトリブチケースブイオンで35°C, 20時間培養して得られた菌液 (10<sup>7</sup> cfu/mL) 20 µLを添加し, 35°Cで16時間培養した. 培養後は, 10,000 rpm, 20分間の冷却遠心分離した後, その上清を40,000 rpm, 2時間, 4°Cで超遠心分離し, 得られた沈殿物を140 µLの滅菌蒸留水で再浮遊させたものを核酸抽出に用いた.

拭き取り検体については, 10,000 rpm, 20分間冷却遠心

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター企画調整部健康危機管理情報課

<sup>c</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部

分離し、その上清を45,000 rpm, 2時間, 4°Cで超遠心分離した。得られた沈殿物を140 µLの滅菌蒸留水で再浮遊させ核酸抽出に用いた。

核酸抽出以後のNoV検査は、厚生労働省通知<sup>3)</sup>に準拠して実施した。すなわち、核酸抽出はQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて行った後、Random hexamer (Amersham Biosciences) およびSuperScript II (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行いcDNAを得た。

NV遺伝子の検出は、合成したcDNA 5 µLを鋳型とし、2 × Mastermix (Roche) 12.5 µL, プライマー各0.2 µL, プローブ0.3 µL, および蒸留水6.8 µLを用いて、ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems) によるリアルタイムPCRを行った。NoV遺伝子群I (GI) 検出用のプライマーおよびプローブとしてCOG1F/COG1R (100 pmol/µL), RING1-TP (a) (30 pmol/µL), 遺伝子群II (GII) 用としてCOG2F/COG2R (100 pmol/µL), RING2-TP (10 pmol/µL) を用い、50°C2分, 95°C10分を各1回した後、95°C15秒および56°C1分を45回繰り返した。

### 3. 2ndリアルタイムPCR用試料の作製

2ndリアルタイムPCRに用いる試料として、食品15検体、拭き取り5検体について、以下の4通りの1st PCR産物を作製した。PCRにはExTaq (TaKaRa) を用い、プライマーはGI用にCOG1F/G1SKR, GII用にはCOG2F/G2SKRを用いた。

#### 1) 試料A

cDNA 5 µLを鋳型とし、反応条件は従来どおり94°C3分の後、94°C1分, 50°C1分, 72°C2分を35回繰り返し、最終伸長反応は72°C15分として得られたPCR産物50 µLを試料とした。

#### 2) 試料B

PCRは試料Aと同様に行った後、PCR産物5 µLを滅菌蒸留水45 µLを加え10倍に希釈したものを試料とした。

#### 3) 試料C

反応条件は、94°C3分の後、94°C1分, 50°C1分, 72°C2分のサイクル数を20回に減らし、最終伸長反応は72°C15分として得られたPCR産物50 µLを試料とした。

#### 4) 試料D

PCRは試料Cと同様に行い、PCR産物5 µLを滅菌蒸留水45 µLを加え10倍に希釈したものを試料とした。

### 4. 2ndリアルタイムPCRによる検討

上記の方法で作製したA~Dの試料各5 µLを用い、前述のNoV検査法で記載した方法でリアルタイムPCRを実施した。

### 5. 遺伝子解析

試料A~Dを対象に、GI用にはG1SKF/G1SKR, GII用にはG2SKF/G2SKRのプライマーを用い、2nd PCRを行った。反応条件は、94°C3分の後、94°C1分, 50°C1分, 72°C2分を35回繰り返し、最終伸長反応を72°C15分とした。得られたPCR産物をNucleo Spin Extract II (MACHEREY-NAGEL)

を用いて精製し、Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) によるシークエンス反応を行った。反応産物を、Centri Sep Spin Columns (Applied Biosystems) を用いて精製し、ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列分析を行った。遺伝子解析はGENETYX version 10 を用いて行い、遺伝子型の分類は、国立感染症研究所の病原体検出情報<sup>11)</sup>の記載に準じて決定した。

## 結 果

### 1. 試料別の2ndリアルタイムPCRの比較

検討の結果をTable 1に示した。2ndリアルタイムPCRで陽性となったものは、遺伝子群別に試料AではGIが6検体、GIIが3検体であり、試料BはGIが8検体、GIIが16検体、試料CはGIが6検体、GIIが12検体、試料DはGIが7検体、GIIが14検体であった。この中には、リアルタイムPCRでは不検出であったが、いずれかの試料を用いた2ndリアルタイムPCRで、GIが陽性となった検体が4検体 (Food 1, 3, 12, 13), GIIが陽性となったものが1検体 (Food 10) 認められた。また、リアルタイムPCRで実測値10コピー前後であったが、2ndリアルタイムPCRではいずれの試料を用いても陰性であったものがGIIで4検体 (Food 3, 8, 14, Swab 1) 確認された。

### 2. 遺伝子型の比較

最も多くの検体で陽性が確認された試料Bを用いて2nd PCRを行ったところ、2ndリアルタイムPCRで陽性となったすべての検体で増幅産物が得られ、遺伝子解析を実施することが可能であった。その結果、GIはGI.3, 4, 5, 7, GIIはGII.2, 3, 4, 6, 14などの遺伝子型に分類された。食品検体は全て生カキなどの二枚貝またはその調理品であったため、複数の遺伝子型が混在しているものが多く認められた。また、拭き取り検体の2ndリアルタイムPCRで陽性が確認された4検体は、各事例の患者から検出されたNoVの遺伝子型と一致した。

## 考 察

これまで、我々は実測値10コピー前後の低い定量値を示した検体に対し、偽陽性反応による誤判定を避けるため、篠原らの報告<sup>10)</sup>に従い、2ndリアルタイムPCRによる確認検査を行ってきた。しかし、実測値10コピー以上であっても確認検査では陰性となる事例も多く、また、ウイルス量の多い検体であるにも関わらず、通常2nd PCRで増幅産物が得られず遺伝子解析が行えないこともしばしば経験している。これらの理由として1st PCR産物が過剰であることが、2nd PCRを阻害したと考えられた。そこで、1st PCR産物が過剰になることを防ぐ試料の作製法として、1st PCR産物を希釈する方法や反応回数を減少させる方法について検討を行った。その結果、いずれの試料を用いても、従来法<sup>10)</sup>と比較してより多くの検体で陽性が確認できたが、

1st PCR産物の希釈のみを行った試料を用いた場合に、最も多くの検体で陽性となった。なお、Table 1には10倍に希釈した試料の結果のみを示したが、100倍に希釈した試料を用いた場合にも、ほぼ同様の結果が得られた。

また、実測値が10コピー前後であったが、2ndリアルタイムPCRではいずれの試料を用いても陰性であったものがGIIで4検体 (Food 3, 8, 14, Swab 1) 確認されたが、これらは偽陽性反応であったと推定された。

以上の結果により、今後、NoV検査において、ウイルス量の少ない食品や拭き取り検体等で確認検査を行う必要がある際には、1st PCR産物を希釈した後、2ndリアルタイムPCRを実施する方法で、NoV陽性の判定を行うことが望ましいと考えられた。

一方、食中毒関連調査において、NoV陽性となった検体については、遺伝子解析を行うためのPCR増幅産物が安定して得られることが重要である。今回、NoV陽性確認のために作製した試料を用いることにより、陽性が確認された検体は、いずれも増幅産物を得ることが可能であった。ま

た、過去に従来の方法では2nd PCRの増幅産物を得られなかった糞便19検体について、1st PCR産物を同様に希釈して2nd PCRを行ったところ、すべての検体で増幅産物を得ることができ、ウイルス量の多い検体でも同法は有効であることが確認されている (未発表データ)。

## ま と め

今回の検討により、2ndリアルタイムPCRによる確認検査や遺伝子解析を行うための2nd PCRでは、得られた1st PCR産物を希釈して用いることで、安定した結果が得られることが明らかとなった。なお、10コピー未満であっても、2ndリアルタイムPCRでは陽性となる検体がGIで4検体 (Food 1, 3, 12, 13), GIIで1検体 (Food 10) 確認され、今後は、NoV陽性の判断基準についての検討がさらに必要であることが示唆された。

Table 1. Threshold cycles on Real-Time PCR and 2nd Real-Time PCR for detection of Norovirus in food and swab samples

Sample	Real-Time PCR		2nd Real-Time PCR							
			A		B		C		D	
	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII
Food 1	—	42.3	—	—	24.6	25.4	28.7	35.5	30.8	26.9
Food 2	—	41.7	—	—	—	21.1	—	—	—	—
Food 3	—	39.4	—	—	18.7	—	24.7	—	27.5	—
Food 4	—	42.9	—	—	—	31.2	—	—	—	—
Food 5	—	41.6	—	—	—	21.4	—	37.5	—	27.8
Food 6	—	41.6	—	—	—	28.2	—	—	—	35.6
Food 7	42.5	42.6	32.2	—	17.8	19.4	24.5	32.0	27.7	27.1
Food 8	—	39.8	—	—	—	—	—	—	—	—
Food 9	—	44.3	—	—	—	21.1	—	39.9	—	28.0
Food 10	44.2	—	21.6	—	16.3	20.1	22.5	40.1	25.0	28.2
Food 11	—	44.8	—	—	—	20.7	—	34.6	—	26.6
Food 12	—	43.4	20.2	—	15.7	17.5	22.6	34.2	26.1	26.2
Food 13	—	41.8	18.8	39.8	16.1	17.6	—	29.8	40.3	25.8
Food 14	43.3	41.9	18.5	—	15.7	—	—	—	—	—
Food 15	41.5	42.0	18.8	—	15.8	19.9	28.9	32.7	28.8	26.1
Swab 1	—	43.8	—	—	—	—	—	—	—	—
Swab 2	—	40.9	—	—	—	19.1	—	—	—	26.6
Swab 3	—	39.1	—	37.9	—	17.5	—	27.4	—	26.5
Swab 4	—	42.5	—	—	—	20.5	—	26.7	—	25.0
Swab 5	—	43.1	—	34.9	—	15.9	—	34.0	—	26.6

— : undetected

A : 1st PCR products obtained after 35 thermal cycles

B : Dilute (1:10) samples of A

C : 1st PCR products obtained after 20 thermal cycles

D : Dilute (1:10) samples of C

## 文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長（通知）：ノロウイルスの検出法について，平成19年5月14日食安監発第0514004号，2007.
- 2) 秋場哲哉，永野美由紀，田中達也，他：日食微誌，**28(2)**, 128-132, 2011.
- 3) 有田知子，木村博一，野田 衛，他：感染症誌，**82**, 473-475, 2008.
- 4) Morton, V., Jean, J., Farber, J., *et al.*: *Appl., Environ. Microbiol.*, **75**, 4641-4643, 2009.
- 5) 野田 衛，西尾 治，山本美和子，他：広島市衛研年報，**25**, 35-43, 2006.
- 6) Park, B. Y., Cho, H. Y., Jee, M. Y., *et al.*: *Appl., Environ. Microbiol.*, **74**, 4226-4230, 2008.
- 7) 齋藤博之，東方美保，田中智之，他：秋田県健康環境センター年報，**4**, 75-81, 2010.
- 8) Tian, P., Engelbrektsen, A., Mandrell, R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4271-4276, 2008.
- 9) Wang, D., Wu, Q., Yao, L., *et al.*: *Lett. Appl. Microbiol.*, **47**, 405-409, 2008.
- 10) 篠原美千代，西尾 治：厚生労働科学研究費補助金 食品・化学物質安全総合研究事業 食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究 平成14年度総括・分担研究報告書，2003.
- 11) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，**35(7)**, 173-175, 2014.

**Confirmation Method for Detection of Norovirus by Using 2nd Real-time PCR**

Miyuki NAGANO<sup>a</sup>, Tetsuya AKIBA<sup>a</sup>, Kohji MORI<sup>a</sup>, Yoshiko SOMURA<sup>a</sup>, Kana KIMOTO<sup>a</sup>,  
Yukinao HAYASHI<sup>a</sup> and Akemi KAI<sup>a</sup>

Methods for the detection norovirus (NoV) in food and swab samples have been studied to elucidate the route and source of NoV infection. For effective detection of NoV in food and swab samples, novel methods were developed. The results of these NoV detection methods were confirmed using a 2nd real-time PCR in which the PCR products from the 1st round were used as templates for the next round. Many samples found to be NoV-positive in the screening tests were, negative as per the confirmation tests. In these confirmation tests, four different preparations of PCR products were examined to be use in a 2nd real-time PCR method: a) original PCR products obtained after 35 thermal cycles; b) a dilution of products obtained after 35 thermal cycles; c) PCR products obtained after 20 thermal cycles; and d) a dilution of products obtained after 20 thermal cycles. Out of the total 20 food and swab samples, 18 were confirmed to be NoV-positive as per the diluted PCR reaction while 8 were confirmed to be NoV-positive as per undiluted PCR reaction. The samples identified as NoV-positive can be used for subsequent PCR amplifications to examine the genotype of NoV in these samples.

**Keywords:** *Norovirus*, 2nd real-time PCR, food, swab, confirmation test, food poisoning

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan