

2ndPCRにRealtimePCRを応用した ノロウイルス検査法の検討

一般財団法人 宮城県公衆衛生協会
阿部弘美 及川明香 伊東淳子 高橋栄美

背景

- 宮城県のカキ養殖量は全国2位で主要な産業
- カキはノロウイルス食中毒の原因の一つであり、出荷前や水揚げ直前の養殖カキについてノロウイルス検査を実施している

ノロウイルス検査法：RT-PCR法

抽出⇒逆転写⇒1stPCR⇒2ndPCR⇒電気泳動 ☞結果報告まで4営業日程度
⇒確認試験(Southern hybridization法) ☞さらに3日間程度を要する

カキの食の安全と安心のため、迅速かつ精度の高い検査が必要

目的

RT-PCR法の2ndPCRをRealtimePCR法に置き換える

2nd-RealtimePCR (Nested RealtimePCR)



遺伝子増幅と確認試験が同一反応系

検査日数の短縮

対象力キ検体

1stPCR 産物：235件* (平成27年4月～同28年3月)

【内訳】

RT-PCR陽性：33件 (G1型：12件・G2型：21件)

RT-PCR陰性：202件

2ndPCR・電気泳動・確認試験 (Southern hybridization法)

2nd-RealtimePCR (Nested RealtimePCR)

* - 20℃保存

プライマー・プローブ

RT-PCR	1stPCR Primer	2ndPCR Primer	Southern hybridization法 Probe	
G1型	COG1F	G1SKF	IshikoG1-1	IshikoG1-2
	G1SKR	G1SKR	IshikoG1-3	IshikoG1-4
G2型	COG2F	G2SKF	IshikoG2-1	IshikoG2-2
	G2SKR	G2SKR	IshikoG2-3	

RealtimePCR

	Primer	Probe
G1型	COG1F	RING1-TP(a)
	COG1R	RING1-TP(b)
G2型	COG2F	RING2-TP
	COG2R	

平成15年（平成19年改正）
厚生労働省通知より

1stPCR産物の凍結保存(-20°C)による影響

保存前RT-PCR (+)		保存後RT-PCR	確認試験
33(件)	G1型 : 12	(+) : 12	(+) : 10
		(-) : 0	(-) : 2
	G2型 : 21	(+) : 19	(+) : 16
		(-) : 2	(-) : 5

確認試験陽性検体との比較 (G1型)

RT-PCR	確認試験	2nd-RealtimePCR (copy/tube)
(+)	(+)	9.9E+10
(+)	(+)	3.0E+10
(+)	(+)	(-)
(+)	(+)	1.1E+10
(+)	(+)	9.9E+10
(+)	(+)	2.0E+08
(+)	(+)	2.3E+05
(+)	(+)	1.4E+10
(+)	(+)	9.5E+08
(+)	(+)	9.9E+10

確認試験陽性検体との比較 (G2型)

RT-PCR	確認試験	2nd-RealtimePCR (copy/tube)	RT-PCR	確認試験	2nd-RealtimePCR (copy/tube)
(+)	(+)	2.3E+06	(+)	(+)	2.4E+05
(+)	(+)	1.4E+09	(+)	(+)	5.7E+08
(+)	(+)	2.2E+10	(+)	(+)	5.5E+09
(+)	(+)	2.6E+07	(+)	(+)	5.3E+04
(+)	(+)	1.2E+10	(+)	(+)	2.4E+09
(+)	(+)	1.9E+07	(+)	(+)	5.3E+07
(+)	(+)	1.2E+06	(+)	(+)	9.9E+10
(+)	(+)	5.5E+06	(+)	(+)	2.4E+08

確認試験陽性検体との一致率

確認試験(+)	2nd-RealtimePCR	一致率(%)
G1型 : 10	⇒ (+) 9 (-) 1	90
G2型 : 16	⇒ (+) 16 (-) 0	100
合計 : 26	⇒ (+) 25 (-) 1	

一致率 : 96.1%

RT-PCR法陰性検体との比較

型	RT-PCR	2nd-RealtimePCR (copy/tube)	確認試験
G1	(-)	0.2	(-)
G2	(-)	(-)	(-)
G1	(-)	1.4	(-)
G2	(-)	(-)	(-)
G1	(-)	(-)	(-)
G2	(-)	0.1	(-)
G1	(-)	(-)	(-)
G2	(-)	0.09	(-)

平成15年(平成19年改正)厚生労働省通知 : 10 copy以上で陽性

確認試験陰性検体との比較

型	RT-PCR	確認試験	2nd-RealtimePCR (copy/tube)
G1	(+)	(-)	(-)
G2	(-)	(-)	(-)
G1	(+)	(-)	(-)
G2	(-)	(-)	(-)
G1	(-)	(-)	(-)
G2	(+)	(-)	(-)
G1	(-)	(-)	(-)
G2	(+)	(-)	7.2E+05
G1	(-)	(-)	(-)
G2	(+)	(-)	(-)
G1	(-)	(-)	(-)
G2	(+)	(-)	2.8E+06
G1	(-)	(-)	(-)
G2	(+)	(-)	(-)

陰性検体との一致率

	陰性検体		2nd-RealtimePCR(定性)	
RT-PCR (-)	202	⇒	(-) 202	(+) 0
RT-PCR (+)	7	⇒	(-) 5	(+) 2
確認試験(-)				
合計	209	⇒	(-) 207	(+) 2

一致率：99.0%

まとめ

- 2nd-RealtimePCR(Nested-RealtimePCR)を用いてノロウイルス検査を実施した結果、RT-PCR法の確認試験陽性との一致率は96.1%、陰性との一致率は99.0%であった。
- 2nd-RealtimePCR(Nested-RealtimePCR)は定性的な確認試験として、RT-PCR法と同等の検査精度が確認され、しかも大幅な検査日数の短縮が可能であり、有用な検査方法と考えられる。