

RT-qPCR 法

微生物課 末吉 さおり

当法人は、臨床検査技師等に関する法律（昭和 33 年法律第 76 号）第 20 条の3の規定の下、沖縄県の衛生検査所（検査業務の内容：微生物学的検査・寄生虫学的検査）として登録されており、検便検査や新型コロナウイルスの検査業務を行っている。

1 検便検査におけるRT-qPCR 検査

検便検査の意義は、食中毒の発生を未然に防ぐことである。発熱や下痢などの自覚症状がなくても腸内に食中毒菌を持っている人のことを健康保菌者といい、定期的な検便検査の実施により保菌者を発見することで、食中毒の発生を未然に防ぐことができる。検便検査の主な対象者は、食品製造・加工業等における食品従事者、水道事業関係者などであり、対象者に応じて必要な検査項目（サルモネラ属菌・腸管出血性大腸菌 O157・赤痢菌の 3 項目など）を精査し対応している。当検査室におけるその他の検査項目として、チフス菌・パラチフス菌・ノロウイルス等が挙げられ、このうち特にノロウイルスに関しては発生率が高く（少量のウイルスでも感染する）かつ繰り返し感染しやすいため、定期的な検査が必要である。

2016 年からは PCR 装置(図1)を導入し、高感度かつ高精度な RT-qPCR 法（ポリメラーゼ連鎖反応）にて検査業務を行うことにより、生産性を大幅に向上することができた。RT-qPCR 法は、短時間で高感度な検出が可能という特性を有しており、特定の遺伝子領域を増幅することにより、検体中に存在する僅かな遺伝子を分光学的に検出することが可能である。また、後述するプール法（複数の検体試料を混ぜ合わせ 1 検体とする方法）等との併用は検体のスクリーニングにおいてより効果的である。



図 1 PCR 装置

前述の方法を用いて効率化を図ったこともあり、直近3年間では平均で毎年11万件以上の検便検査を行っている(表 1)。依頼者への迅速な対応や、依頼者からの各種要求にフレキシブルに対応することによって、多くの依頼者から繰り返し依頼を頂いている。

表 1 過去3年間の検便検査件数('21年9月時点)

	3項目(サルモネラ、O157、赤痢)	ノロウイルス
2021年度	57,432	110
2020年度	113,065	3,127
2019年度	113,622	3,280

2 新型コロナウイルス RT-qPCR 検査

検便検査にて蓄積した技術と経験を活かし、2021年2月からは新型コロナウイルスの RT-qPCR 検査業務を開始した(図2)。



図 2 新型コロナウイルス検査の様子

沖縄県や市町村と連携したエッセンシャルワーカーを対象としたPCR検査強化事業や、窓口受付によるPCR検査を行っており、最大で約1,000件/日の検体を処理している。表2に2021年9月末時点での検査総数を示した。

表2 新型コロナウイルス検査件数('21年9月時点)

	窓口受付	PCR検査強化事業	合計
陰性	14,532	32,195	46,727
陽性	742	17	759

3 カンピロバクター属菌

沖縄県内の食中毒について、カンピロバクター属菌が原因菌となる例が最も多く、平成28年(2016年)から30年(2018年)に発生した食中毒の4割以上を占めた(沖縄県HPより<https://www.pref.okinawa.jp/site/hoken/seikatsueisei/shokuhin/campylobacter.html>)。従来、厚生労働省は衛生管理の観点からカンピロバクター属菌の検便検査を推奨しているが、培養法での検査に要する時間は最長で10日程度必要となる。これに対し、PCR法を用いることによって2日程度まで納期を短縮することが可能となる。

4 プール法(複数検体集約法)の検証

検査の効率化のため、プール法(複数の検体試料を混ぜ合わせ1検体とする方法)の検証を行った。(※使用試薬:TaKaRa カンピロバクター/遺伝子検出キット RR191A、機器:TaKaRa Thermal Cycler Dice TP990)

陽性試料液(濃度: 1.0×10^4 copies/mL)を滅菌水にて段階的に希釈し、希釈率の異なる試料液各2 μ Lを調整した。その結果、表3

表3 陽性試料液の希釈内容

陽性試料液(μ L)	2.0	1.5	1.0	0.5
滅菌水(μ L)	0	0.5	1.0	1.5
測定結果	陽性	陽性	陽性	陽性

に示した全希釈率(1~4倍)において陽性となることを確認した。さらにPCR装置上で遺伝子の増幅曲線を確認したところ、すべての試料が閾値を超えており、理想的な増幅曲線となっていた。

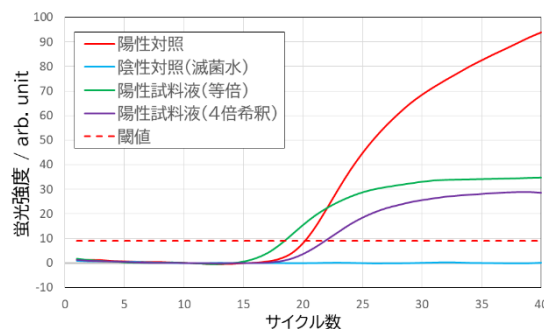


図3 陽性試料液2 μ L(等倍)、0.5 μ L(4倍希釈)の増幅曲線

次に、前処理を施した陰性検体を複数用意し、表4に示す割合で陽性試料液(リン酸緩衝食塩水で10倍希釈)と混合したものを測定した。なお、前処理については下記の処理を行った。

- ①950 μ Lのリン酸緩衝食塩水に50 μ gの陰性検体を混合し、95 $^{\circ}$ Cで5分熱処理。
- ②15,000 rpm/5 minで遠心分離後、上清を検査に使用。

結果は、10検体以上混合した処理検体においても陽性となり(表4)、プール法による検査効率化の可能性が示された。

表4 プール件数と測定結果

陽性試料液(件数)	1	1	1	1
陰性検体(件数)	1	3	5	10
測定結果	陽性	陽性	陽性	陽性

5 今後の展望

当検査室としては、今後も検査体制および検査項目の拡充に取り組んでいく。当面の目標としては新たな業務として、生化学的検査や遺伝子学的検査の分野に進出を検討している。引き続き、検査を通して県民の食の安全・安心へ貢献できるよう努力を継続していきたい。