

ISO 15216 に準拠した検査法（ISO 法）に関する検討結果について

1. 感度の高いノロウイルス検査法の検討（ISO 法と改良法との性能比較）

現在、国内におけるカキのノロウイルスの自主検査は、一般的に、食中毒検査として厚生労働省が地方自治体宛てに通知している検査法（食安監発第 1105001 号）（以下「通知法」という。）を参考にして実施されています。

一方、シンガポール等の輸入検疫においては、通知法よりも検出感度が高いとされている ISO 法に準拠した方法が実施されていることを踏まえ、これらの地域に向けた輸出前の検査として適切な方法を検討するべく、通知法よりも検出感度が優れていると期待されている 2 つの検査法（高感度遺伝子検査法（以下、「改良法」という。）¹と ISO 法²）との性能を比較しました。なお、通知法、改良法及び ISO 法の概要は表 1 のとおりです。

表 1 各検査法の概要

略称	通知法	改良法	ISO法
出典	厚労省通知 食安監発第1105001号	食品衛生検査指針 微生物編2015	ISO 15216-1
検体	中腸腺1 g以上 (1～3粒)	中腸腺1 g以上 (5粒)	中腸腺2 g以上 (10粒以上)
核酸抽出	カラム法 (マニュアル操作)		磁気ビーズ法 (半自動機器)
遺伝子検出	2-step RT-PCR (qPCR)		1-step RT-qPCR
工程管理	△工程管理ウイルス ×PCR阻害確認		○工程管理ウイルス ○PCR阻害確認

ISO 法及び改良法に対し、EU のリファレンス研究所が定めるガイダンス³に従ってカキ中のノロウイルスの検出限界（LOD₉₅）及び定量限界（LOQ）を調査したところ、結果は、表 2 に示すとおり、ノロウイルスの遺伝子群 GI についてはほぼ同等、GII については ISO 法が優れていることがわかりました。このことから、ISO 法が現時点で選択しうる検査法の中で最も検出感度が高いと結論づけました。

表 2 改良法及び ISO 法の LOD₉₅ 及び LOQ

GI	LOD ₉₅ (cpg)	LOQ (cpg)
改良法	152	283
ISO法	151	400

GII	LOD ₉₅ (cpg)	LOQ (cpg)
改良法	466	1,860
ISO法	331	637

2. ISO 法に沿った検査の国内実施のための適切な検査機器の検証

ISO 法の公式の検査手順では、RNA 抽出工程においてバイオメリュー社製の NucliSENS®試薬を用いた手法が例示されており、また、特に作業者の手技の影響を受けない自動化抽出装置 (NucliSENS® miniMAG®) と組み合わせて使用することが EU 等において一般的となっています。一方、当該機器が既に販売終了となっており、農林水産省は、販売終了となった NucliSENS® miniMAG®の代替機器の候補として使用できる可能性が示されている Taiwan Advanced Nanotech 社の Maelstrom 8 の性能の検証を行いました⁴。なお、両機器の概要は表 3 のとおりです。

表 3 miniMAG と Maelstrom 8 の概要

	miniMAG	Maelstrom 8
最大検体数	12	8
処理時間*	8 検体50分 (うち、30分手動操作)	8 検体50分 (うち、10分手動操作)
ピペッティング回数/検体*	15	10

両機器を用いて、カキの中腸腺上清にノロウイルスを添加した試料（高濃度試料及び低濃度試料それぞれ 10 点）を分析した結果、図 1 に示すとおり、検出されたノロウイルスのコピー数は、miniMAG より Maelstrom8 の方がやや高く、また、特に低濃度試料の定量値のバラツキが小さいことがわかりました。

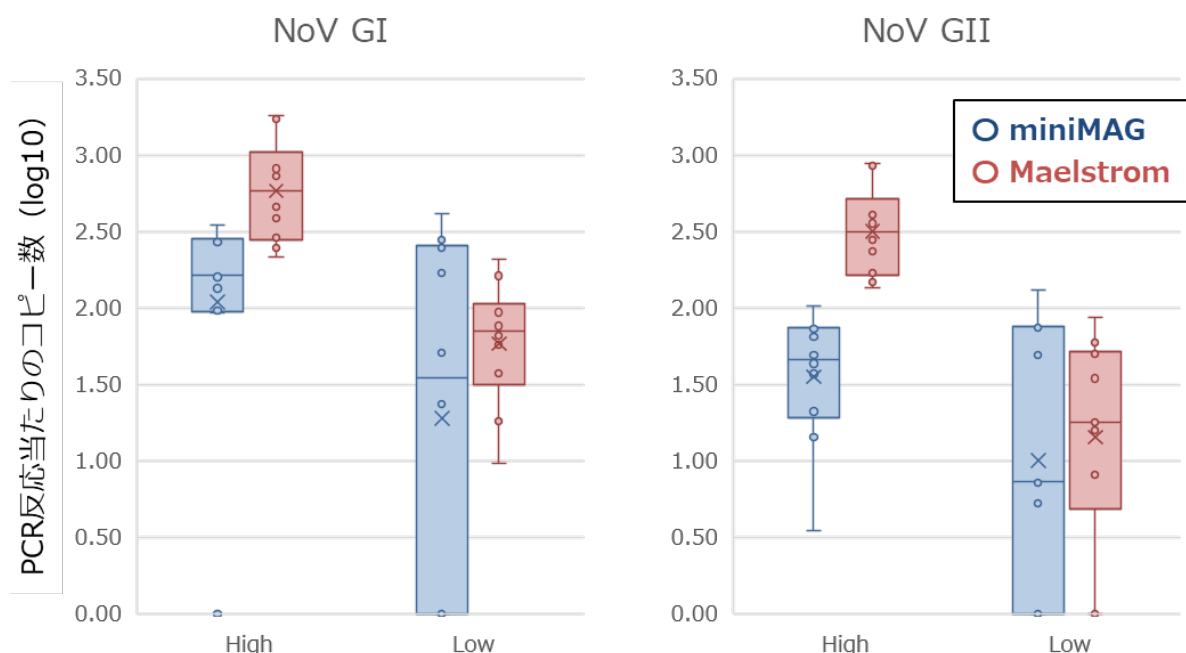


図 1 miniMAG と Maelstrom 8 の分析結果の比較

また、バッファにカキ試料と同量のウイルスを添加したコントロール（対照）との比較による回収率（つまり、カキに含まれる成分によるウイルス回収の低減の程度）については、図 2 に示すとおり、Maelstrom 8 は、miniMAG と同等かやや高く、カキ成分による抽出阻害等の影響をやや受けにくいことがわかりました。

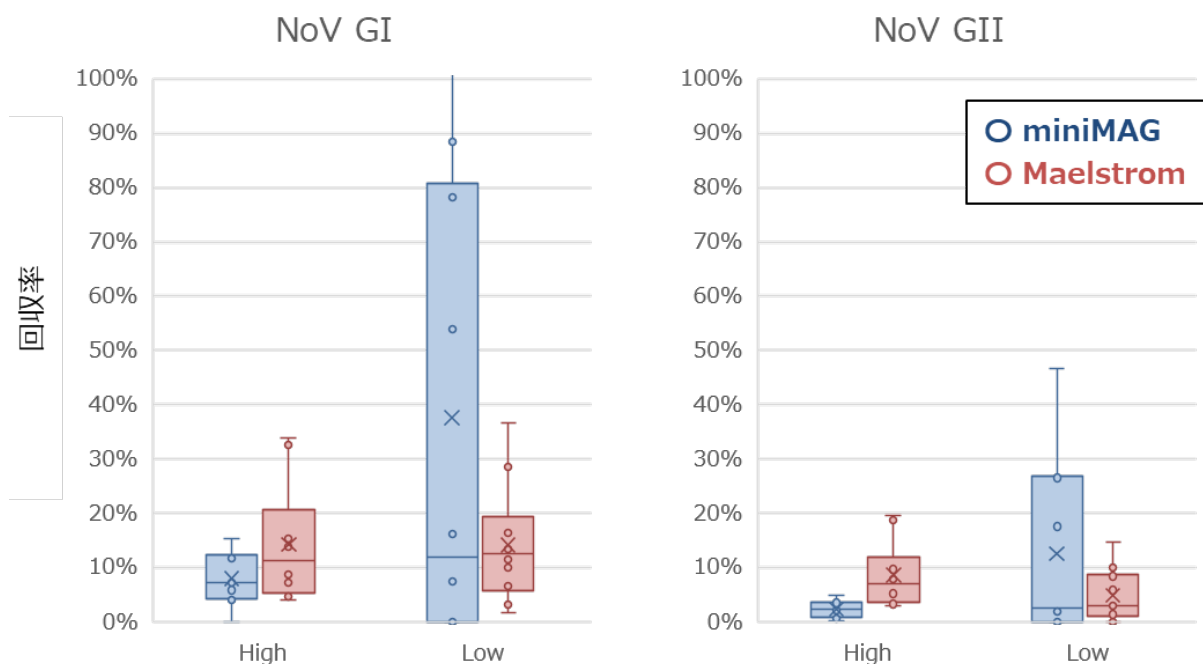


図 2 miniMAG と Maelstrom 8 の回収率の比較

これらのことから、Maelstrom 8 を miniMAG に替えて検査を実施したとしても、同等以上の検査が実施可能であることが分かりました。

以上の検討・検証結果を踏まえ、農林水産省としては、RNA 抽出工程に Maelstrom 8 を用いて ISO 法に準拠した方法を輸出前検査として用いることで、輸入検疫時にノロウイルスが検出されるといった事例が発生する頻度を少なくすることが期待できると考えています。

3. リアルタイム RT-PCR に用いる試薬について

ISO 法の公式の検査手順では、リアルタイム RT-PCR に用いる試薬として RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Thermo Fisher) が推奨されています。この試薬を基準として、欧州において ISO 法対応キットとして汎用されている CEERAMTOOLS® noroGI-GII@ceeramTools (バイオメリュー) 及び国内販売されているノロウイルス検査用 1-step RT-qPCR キット 2 製品 (Kit A 及び Kit B とする。ただし、プライマー及びプローブはキット付属のものではなく、ISO 法に準拠した配列のものを使用。) の代替可能性についても検証を行いました (表 4)。

表 4 PCR 試薬の概要

	UltraSense™	ceeram	Kit A	Kit B
製品情報	ISO 法推奨品 (米国)	ISO 法準拠 (フランス)	国内メーカー	国内メーカー
プライマー・ プローブ	付属しない	付属する	ISO 法指定の配列の ものは付属しない	ISO 法指定の配列の ものは付属しない

検証に当たっては、表 5 に記載の試薬、PCR 条件及び検量線用プラスミドの組合せ

(①～⑨) について検討を行いました。

RNA サンプルは、同一検体から抽出したサンプルを各組合せに対して4検体ずつ定量を行いました。定量時の検量線については、GI 及び GII それぞれについて、 $r^2 \geq 0.980$ かつ slope が $-3.10 \sim -3.60$ (増幅効率が 90～110%に相当) の範囲内であることを適切に定量できる基準としました。また、定量値については、GI 及び GII それぞれについて、4検体の平均値を求め、UltraSense™(表5のRef)の平均値に対して0.5～2.0の範囲内に収まっていることを代替可能である基準としました。

検証の結果、上記の全てが基準内に収まったものは組合せ①の CEERAMTOOLS® noroGI-GII@ceeramTools (バイオメリュウ) のみでした。この結果から、ISO 法に準拠した検査を行うに当たっては、CEERAMTOOLS® noroGI-GII@ceeramTools (バイオメリュウ) については、UltraSense™の代替可能品として用いることが可能であることが確認できました(グレーに塗り部分は基準外)。

表 5 試薬等の組合せと検証

試薬等の組合せ	PCR 試薬	PCR 条件	プラットフォーム	Ref									
				①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	
検量線	r2 (GI)	0.99	0.99	0.99	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.99	0.99	0.94
	slope (GI)	-3.60	-3.30	-3.34	-3.29	-3.18	-3.43	-3.59	-3.46	-2.99	1.00	1.00	-2.99
	r2 (GII)	0.99	0.99	0.99	1.00	0.99	1.00	1.00	1.00	0.97	1.00	1.00	1.00
	slope (GII)	-3.48	-3.43	-3.17	-3.76	-3.20	-3.59	-3.26	-3.91	-3.36	1.00	1.00	-3.36
定量値	GI	386.20	290.55	204.06	65.42	327.80	45.55	261.06	22815.71	233.42	17101.10	17101.10	
	/Ref (GI)	—	0.752	0.528	0.169	0.849	0.118	0.676	59.1	0.579	44.3	44.3	
	GII	193.12	206.89	91.46	14.21	134.58	8.90	94.235	44.23	144.89	38.46	38.46	
/Ref (GII)	—	1.071	0.474	0.074	0.697	0.046	0.488	0.229	0.750	0.199	0.199		

- 1 上間 匡. 食品からのウイルス検出法の現状と課題. *Jpn. J. Food Microbiol.* 2016; 33(3): 121-126;
- 2 ISO 15216-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR — Part 1: Method for quantification.
<https://www.iso.org/standard/65681.html>
- 3 CEFAS. Guidance note for the determination of limit of detection (LOD95) and limit of quantification (LOQ) characteristics for the method for quantification of norovirus in oysters.
- 4 Persson S, Nybogård L, Simonsson M, Eriksson R. Optimisation and evaluation of an automated system for extraction of viral RNA from oysters. *Int J Food Microbiol.* 2020; 315:108386;