

(案)

生食用原料カキのノロウイルス検査の実施に関する留意事項（検査を実施される方へ）**1 検査方法の選択**

依頼者から自主検査の目的（国内出荷ロットのノロウイルス保有状況の把握、輸出適合性の確認等）を聴取の上、目的に応じた検査方法を依頼者に提案すること。生食用原料カキの主な検査方法として、以下に示す（１）及び（２）が知られるが、可能な限り（２）を選択するよう提案されたい。

（１）「ノロウイルスの検出法について」（平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発第 1105001 号）で定められた検査法（以下「通知法」という。）

厚生労働省が食中毒原因究明の行政検査を主目的として定めた検査法。通知法は、カキ 1 個体を検体として検査可能。他方、カキがノロウイルスを蓄積する量は、個体差により大きく変動することが知られているため、検体数が少ないとロットの実態とは異なる結果が得られるおそれがある。

（２）ISO 15216-1:2017 に準拠した検査法（以下「ISO 法」という。）

国際規格に準拠した方法であり、シンガポールにおいては、輸入カキのノロウイルス遺伝子検査に採用されている。複数のカキから中腸腺を集めて検体とするため、通知法に比べロットを代表した結果を得やすい。

2 精度管理

精度管理は、測定の信頼性を高め、品質を維持・向上させるための重要なプロセスであり、検査結果が常に一定の正確度（真の値にどれだけ近い）と精密度（繰り返し測定のばらつき）を保持するように、操作を管理することを指す。

カキの自主検査に当たっては、以下の（１）～（５）について留意されたい。なお、分析機関によって実施可能な検査法や検査手順が異なることから、具体的な手順を示すことは困難であるため、基本的な考え方として以下の留意事項を整理した。

（１）試料の前処理

カキ中腸腺成分に由来する検査妨害を避けるため、カキから中腸腺を摘出する際は、中腸腺周辺の白い結合組織等をできる限り除去すること。また、なるべく低温、短時間で処理を行うよう努めること。

（２）ウイルス抽出の工程管理

ウイルスの抽出が正しく実施されなければ、ノロウイルスの見逃し、すなわち偽陰性に直結するため、工程管理ウイルスを用いたウイルス回収率確認を検体毎に実施すること。

工程管理ウイルスには、市販されている Mengovirus vMC0（サーモフィッシュャーサイエンティフィック、ピオメリュー）等の既知量のウイルスを用いることとし、ウイルス抽出前の中腸腺試料を集めた検体毎に添加するとともに、中腸腺を含まない水を試料としたものに添加し、同様に操作すること。検体に添加した工程管理ウイルスのコピー数と水に添加した工

程管理ウイルスのコピー数からウイルス回収率を算出すること。

(3) PCR の工程管理

カキ中腸腺由来の酵素反応阻害物質によって PCR が阻害されている場合、試料中にノロウイルス遺伝子があっても増幅されないため、偽陰性に直結する。このため、内部コントロールを用いた PCR 阻害確認を実施すること。

内部コントロールには、合成 DNA (例: Internal positive control, ニッポンジーン) 等を用いることとし、PCR 反応液を調製する際に、各抽出 RNA 試料および抽出コントロール用の水試料に、内部コントロール用のプライマー、プローブおよびテンプレート DNA を添加すること。抽出 RNA 試料および水試料の PCR 結果を比較し、PCR 阻害の確認を行うこと。

なお、定量 PCR の閾値は、Cq 値の基準点であり、検査途中で変更すると、たとえ同じデータであっても Cq 値や定量値が変動し、検量線の妥当性・PCR 阻害判定・工程管理の比較など PCR の品質管理が成立しなくなる。このため、閾値については、自動設定または検査機関で設定する固定条件を用いることとし、検体ごとの変更は避けること。

(4) 装置・試薬の管理

検査機器の定期的な校正・点検を実施し、点検記録を作成すること。試薬について、ロット受け入れ時に性能確認を行うとともに、トレース可能な記録を作成すること。

(5) 検査の外部精度管理

可能な限り外部精度管理を実施し、検査能力の担保に努めること。

(参考)

カキのノロウイルス検査法については、英国環境・漁協・水産科学センター (Cefas) が外部精度管理のための技能試験を実施している。なお、Cefas に問い合わせを行ったところ、検査機関は、公的又は民間を問わず、日本からも当該技能試験に参加することが可能とのことであった。

○Cefas のウェブサイト

<https://www.cefas.co.uk/icoe/seafood-safety/designations/fao-reference-centre/proficiency-testing/>

3 検査の成立条件

以下の項目について検査成立条件を設定した標準手順書を試験法毎に作成すること。

- ・検体量 (例: 中腸腺 2 g/検体以上)
- ・検量線 (例: 直線性 $R^2 \geq 0.98$)
- ・ウイルス回収率

回収率による検査成立基準 (例: 1%以上) を事前に設定し、基準未達の場合は検査不成立とし、再抽出を行うこと。

- ・PCR 阻害

PCR 阻害による検査成立基準 (例: 試料とコントロールの Cq 値の差が 2 以下) を事前に設定し、基準未達の場合は検査不成立とし、再検査を行うこと。

4 検査結果の報告

検査結果の報告に当たっては、透明性及び信頼性を担保する観点から以下の（１）～（５）について明示すること。

（１）検査方法及び検出下限・定量下限

（２）１ロット当たりの検体数及び検体当たりのカキ数量（例：10 個体/検体）

（３）検査成立基準

- ・検体量（例：中腸腺 2 g/検体以上）
- ・検量線（例：直線性 $R^2 \geq 0.98$ ）
- ・ウイルス回収率（例：Mengovirus 回収率 $\geq 1\%$ ）
- ・PCR 阻害（例：抽出 RNA 試料と水試料の C_q 値の差が 2 以下）

（４）陽性判定基準

通知法の場合、PCR の実測値で 1 反応当たり 10 コピー以上とされているが、使用中腸腺量が厳格に定められていないため、試料中のウイルス量を正確に把握することが難しい。このため、検体毎に使用中腸腺量を手順書に定め、中腸腺 1 g あたりのコピー数（cpg）を併記すること。

ISO 法の場合、陽性基準の定義はないため、検査機関毎に設定される定量下限を上回る定量値が得られた検体について陽性として取扱うことが考えられる。なお、各検査機関における定量下限の算出方法は、以下に従うものとする。

○Cefas のガイダンスノート

<https://www.cefas.co.uk/media/ih5ivxhe/guidance-for-determination-of-lod-and-loq-for-virus-method.pdf>

また、科学的根拠の下、一定以上の定量値が得られた検体について陽性として取扱うことも考えられる。なお、英国におけるリスク評価では、200cpg 以下のカキによる食中毒リスクは「低～中程度（稀に発生）」とされている。

○英国食品基準庁のリスク評価書

<https://www.food.gov.uk/research/foodborne-pathogens/risk-assessment-to-support-guidance-for-norovirus-outbreaks-in-oysters>

（５）遺伝子群（GI / GII）別の分析結果

（６）検査で不検出になった場合の記載

また、「不検出」となった検査結果について報告する際には、検査結果の誤解を避けるため、「検査結果は、試料中のノロウイルス遺伝子量 (RNA) が検出限界未満であることを意味し、検査対象ロット全体についてノロウイルスが不在であることを保証するものではない」などとして、検査結果の不確実性に触れることが望ましい。