

# カキのノロウイルス検査の 国際的標準法であるISO法について

国立環境研究所 環境リスク・健康領域  
三浦 尚之

# 自己紹介

## 略歴

2010年3月 東北大学 大学院工学研究科土木工学専攻 博士課程後期修了

2010年4月 北海道大学 大学院工学研究院環境創成工学部門 博士研究員

2012年7月 フランス海洋開発研究所（Ifremer） 博士研究員

Ifremer

2015年7月 東北大学 未来科学技術共同研究センター 准教授

2016年10月 国立保健医療科学院 生活環境研究部 主任研究官

2025年4月 国立環境研究所 環境リスク・健康領域 主幹研究員



Ifremer, Centre de Nantes

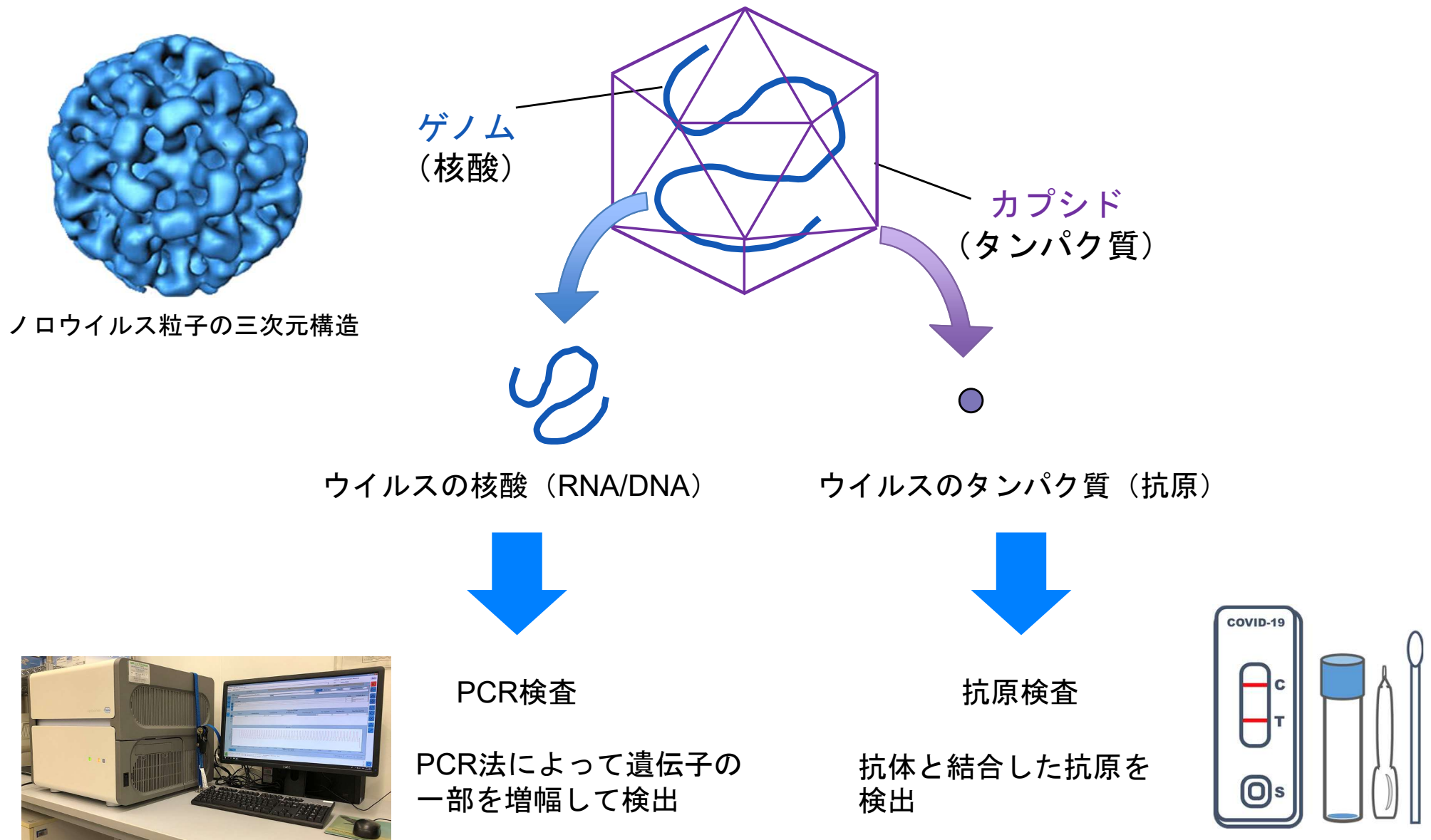
Ifremer 健康・環境・微生物学研究室

**Dr. Françoise Le Guyader**

- ・ EUにおけるカキのノロウイルス水準調査に関して科学的・技術的助言
- ・ 開発したノロウイルスのリアルタイムPCRアッセイ（2005年）は、ISO/TS 15216-1に採用
- ・ カキ消化組織（中腸腺）上のA型類似糖鎖にノロウイルスが特異的に結合することを世界で初めて報告（2006年）

# ウイルスの検査法に関する基本事項

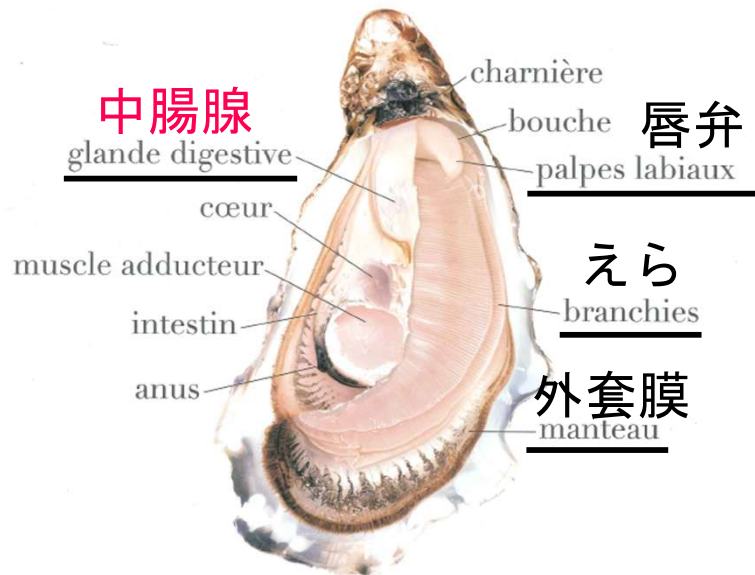
## ウイルスの遺伝子検査



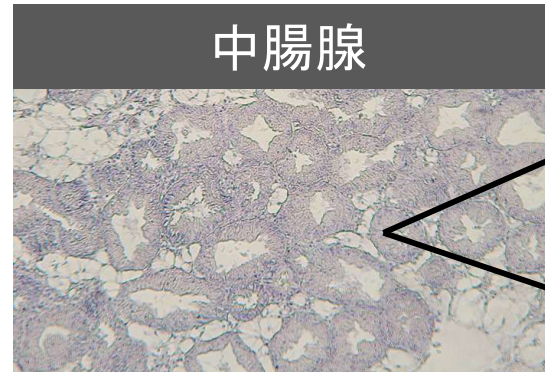
- 感染者のふん便や唾液、咽頭拭い液などの臨床検体には、高濃度で病原体が含まれるため、迅速な抗原検査と検出の感度と特異性が高い遺伝子検査の両方が用いられる

# カキのノロウイルス汚染に関する基本事項①

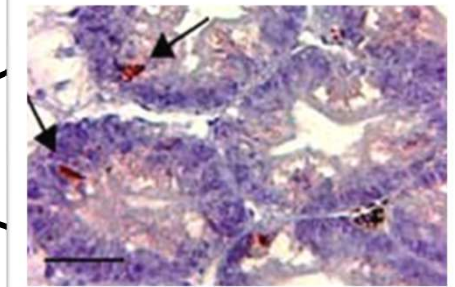
## ノロウイルスが蓄積するカキの部位



中腸腺

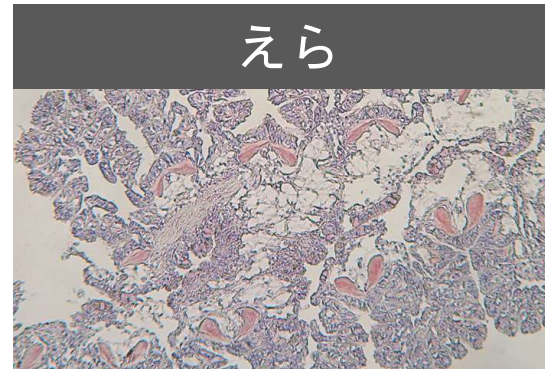


中腸腺組織に  
特異的に結合する

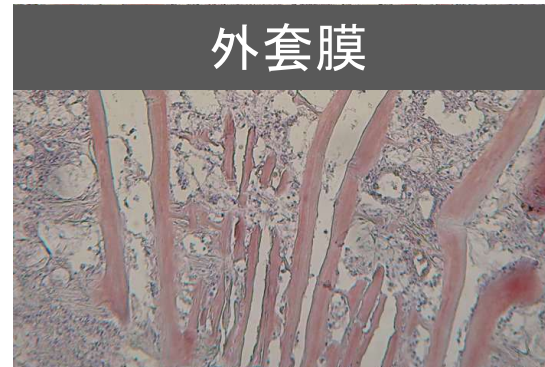


Le Guyader et al. 2006

えら



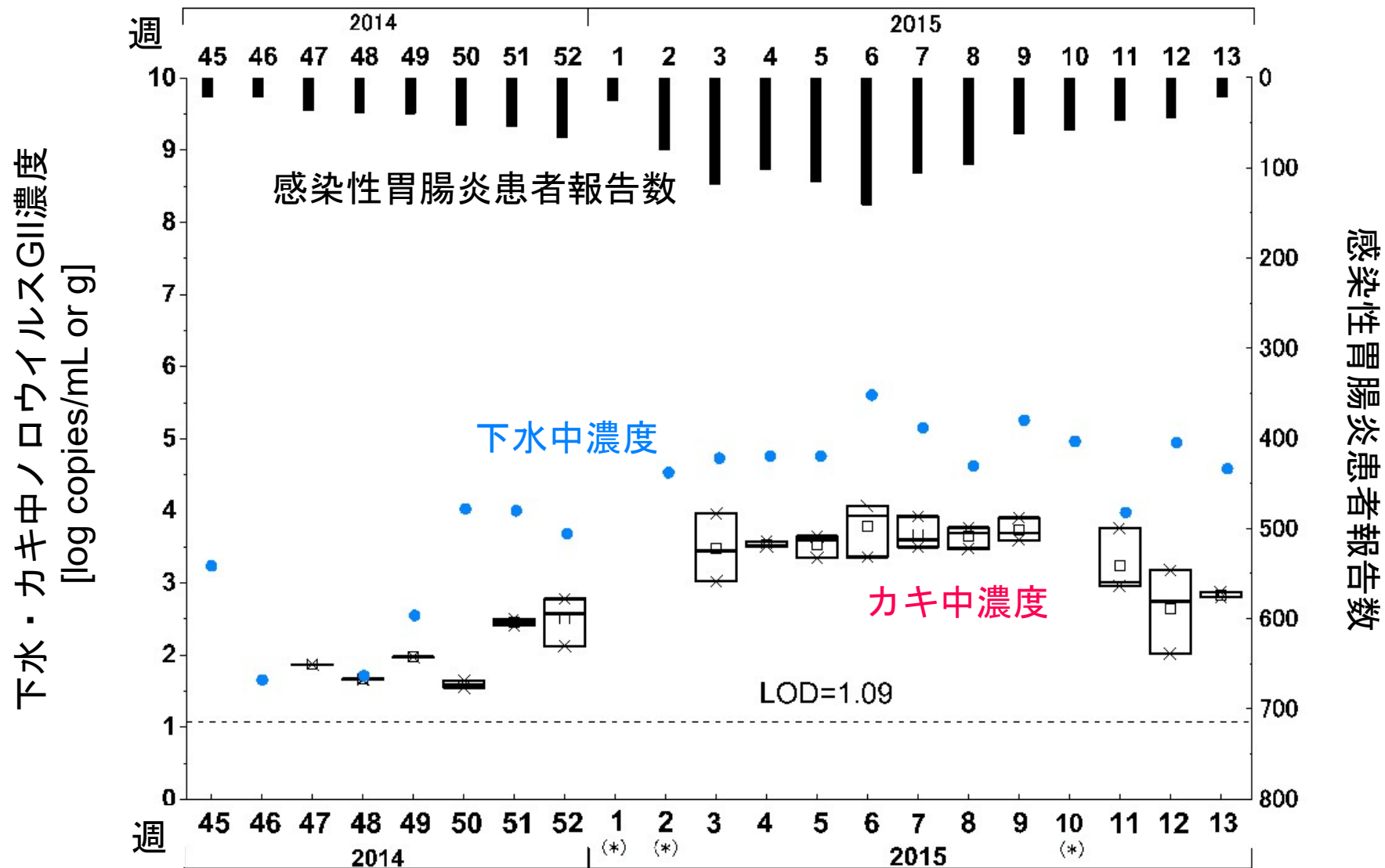
外套膜



- ノロウイルスは、中腸腺に最も高い濃度で蓄積することが知られている

# カキのノロウイルス汚染に関する基本事項②

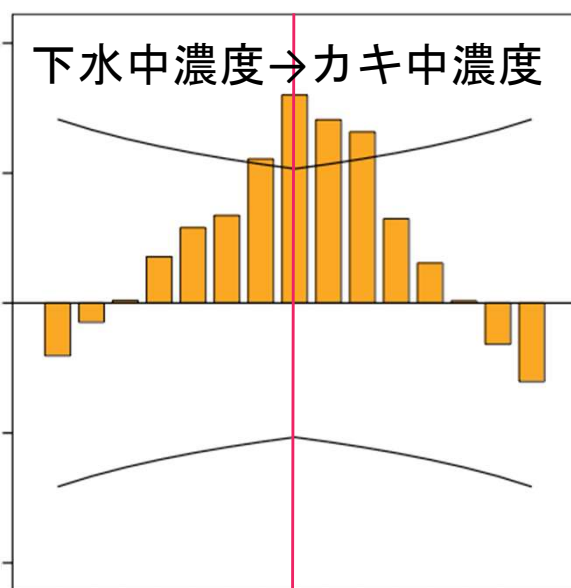
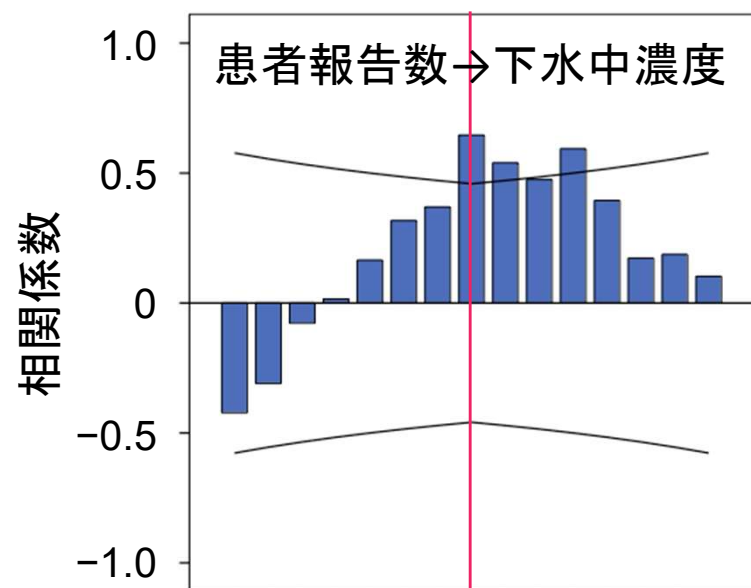
## カキ中のノロウイルス濃度の変動



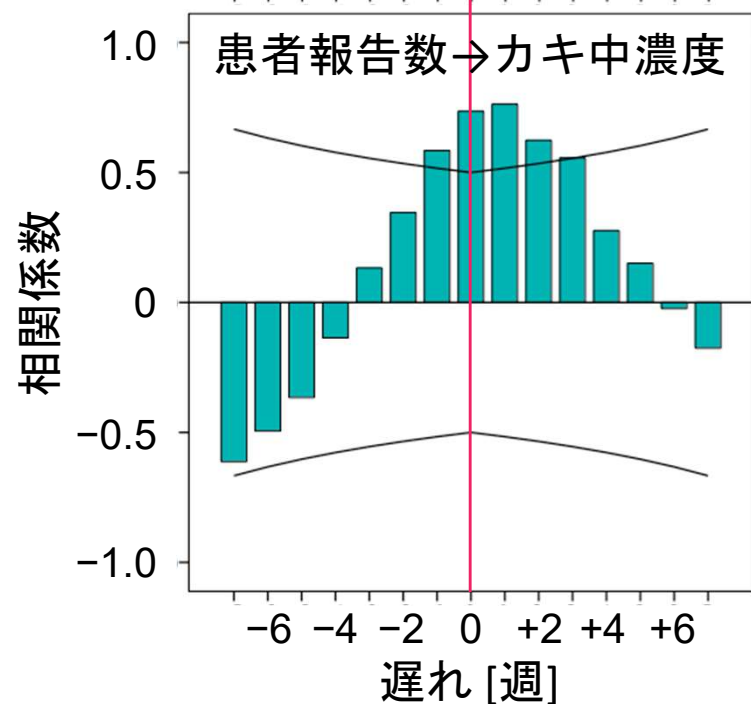
Pu et al. 2018

- カキ中ノロウイルスGII濃度は、上流域の感染者の発生状況に応じて（季節性があり）、下水中濃度と共にオーダーレベルで変動する

# 患者報告数と下水・カキ中NoV GII濃度の相互相関分析



- 下水中濃度に対して、カキ中濃度は0～+2週の遅れにおいて有意に相関
- 0週において相関係数が最大

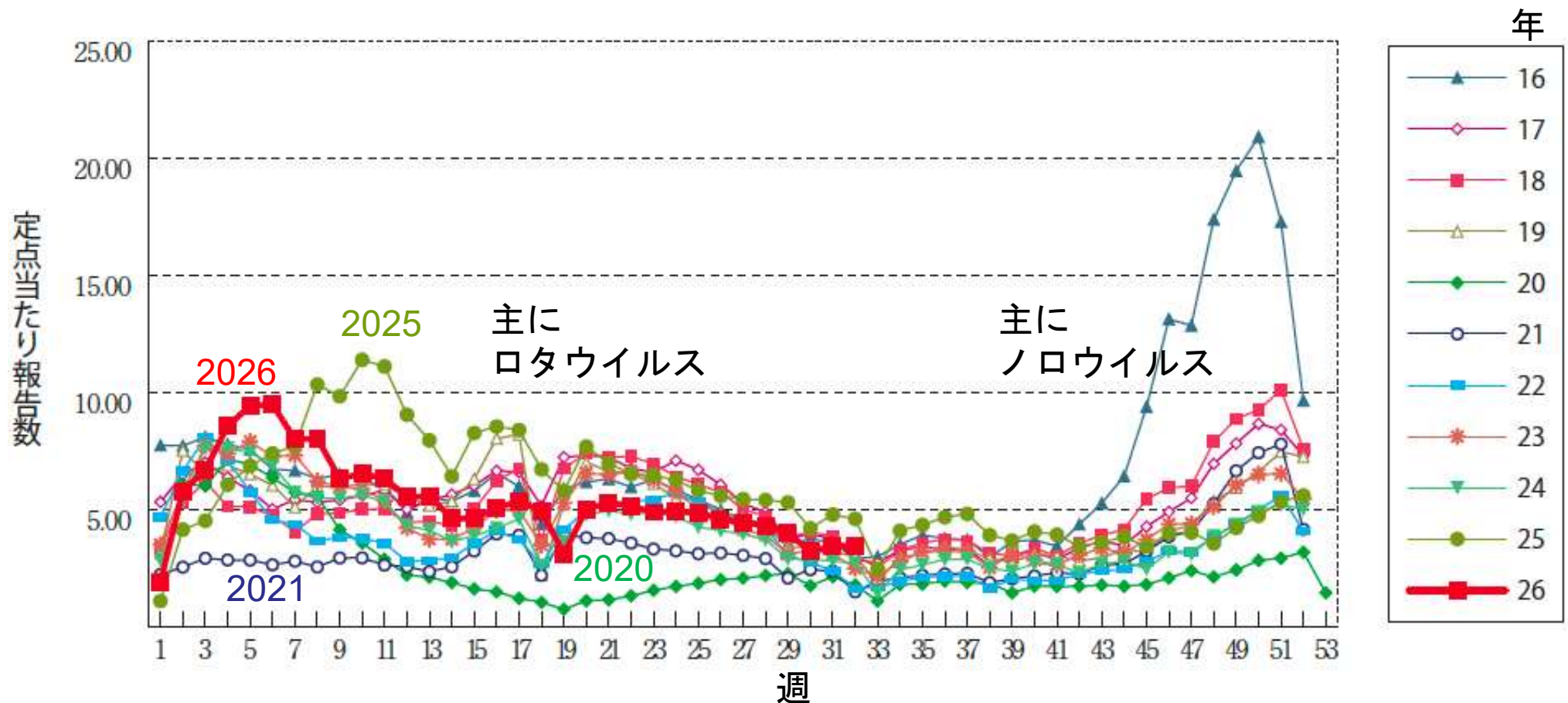


- 患者報告数に対して、カキ中濃度は-1～+2週の遅れにおいて有意に相関
- +1週の遅れにおいて相関係数が最大 (R=0.76)

Pu et al. 2018

➡ 流域の感染者の発生状況に応じて、カキのノロウイルス汚染レベルが変化する

# 日本における感染性胃腸炎の流行

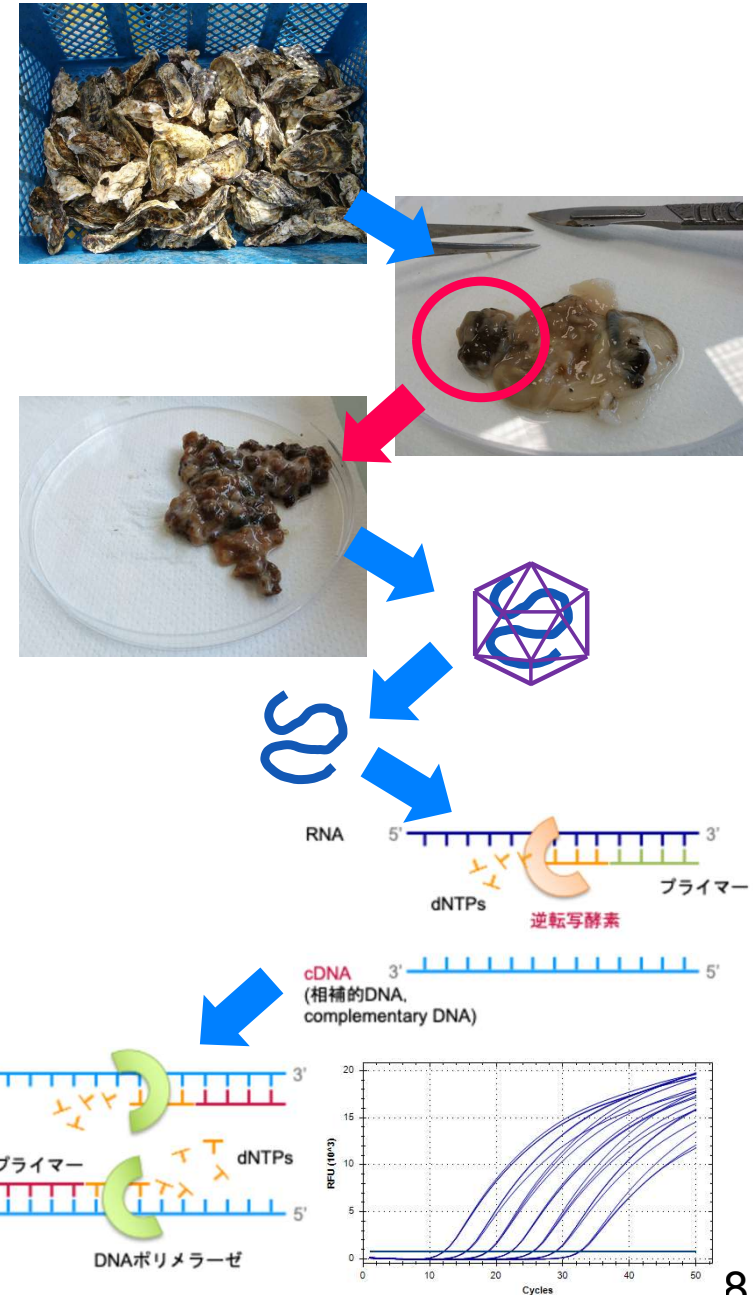


国立感染症研究所 感染症疫学センター，感染症発生動向調査週報，2026年第31・32週

- ノロウイルスやロタウイルスが主要な原因，秋～春にかけて毎年流行
- 春先（4～5月）の流行は，主にロタウイルスが原因
- 2020～2021年冬季は，新型コロナ感染症対策の影響で流行なし

# カキのノロウイルス検査の流れ

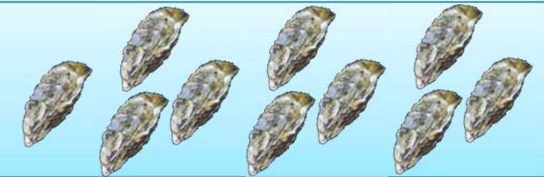
1. カキ試料の採取
2. 解剖し中腸腺を取り出す  
(最も高濃度に蓄積する消化組織)
3. 中腸腺からウイルス粒子を回収
4. 核酸 (RNA) 抽出・精製  
(ノロウイルスはRNAをゲノムとする)
5. 逆転写 (RT) 反応  
(RNAからcDNAを合成)
6. リアルタイムPCRによる遺伝子検出  
(cDNAのある遺伝子領域を増幅し、蛍光で検出)



# カキのノロウイルス検査の流れ

## 検査の感度や精度を高めるためには

1. カキ試料の採取  
→多くの個体を検査する



2. 解剖し中腸腺を取り出す

3. 中腸腺からウイルス粒子を回収

4. 核酸（RNA）抽出・精製

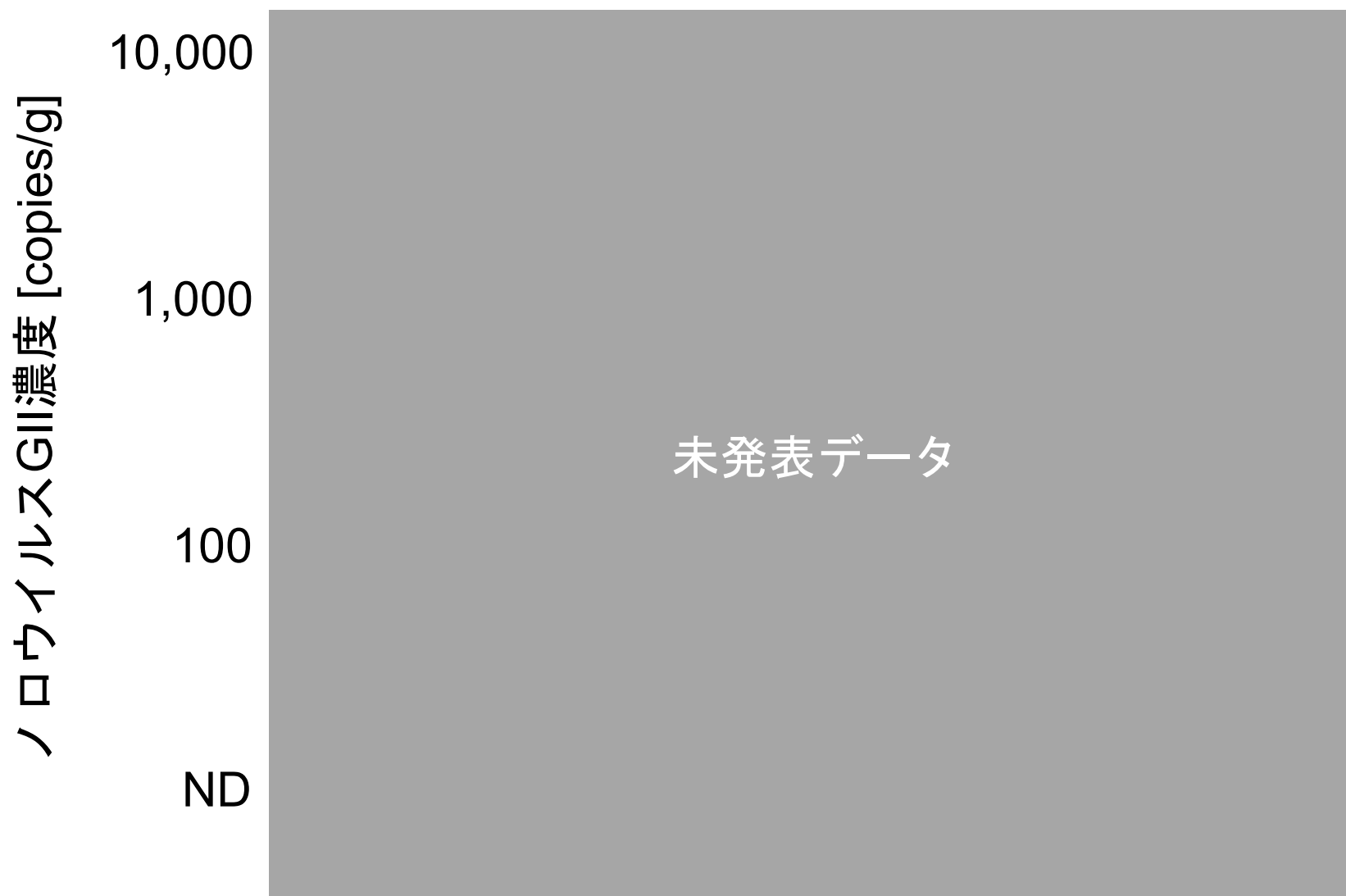
5. 逆転写（RT）反応

6. リアルタイムPCRによる遺伝子検出

なぜ複数個体の中腸腺を調べるのか？

カキにおけるノロウイルス濃度の個体差

河口付近に設置した同じカキ棚から採取したカキ7個体のノロウイルスGII濃度



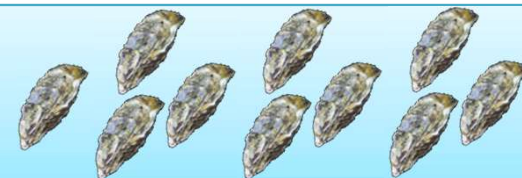
- カキ個体によってノロウイルスGII濃度は大きく異なる（不検出～3,000 copies/g）

# カキのノロウイルス検査の流れ

## 検査の感度や精度を高めるためには

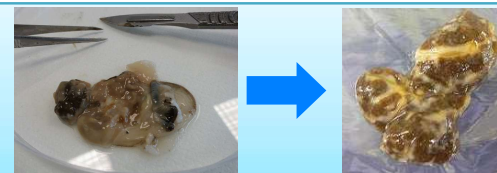
### 1. カキ試料の採取

→多くの個体を検査する



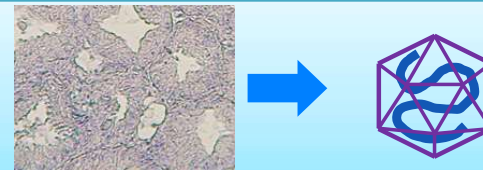
### 2. 解剖し中腸腺を取り出す

→中腸腺まわりの脂肪分をできるだけ取り除く



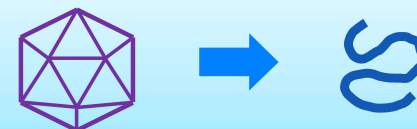
### 3. 中腸腺からウイルス粒子を回収

→組織に結合したウイルス粒子を効率良く回収する



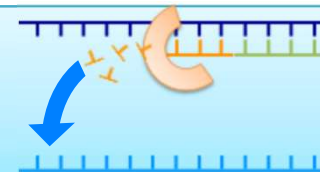
### 4. 核酸（RNA）抽出・精製

→RNAを効率良く回収・精製する



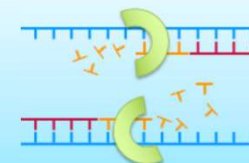
### 5. 逆転写（RT）反応

→PCRで検出する遺伝子領域のcDNAを効率良く合成する



### 6. リアルタイムPCRによる遺伝子検出

→遺伝子領域を効率良く増幅する



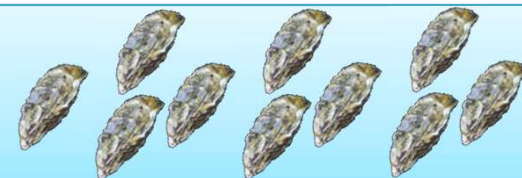
# カキのノロウイルス検査の流れ

## 検査の感度や精度を高めるためには

特に重要なステップ

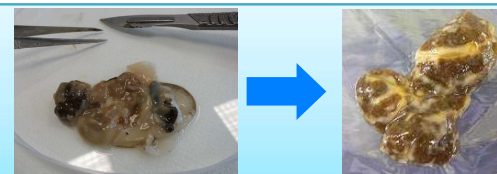
### 1. カキ試料の採取

→多くの個体を検査する



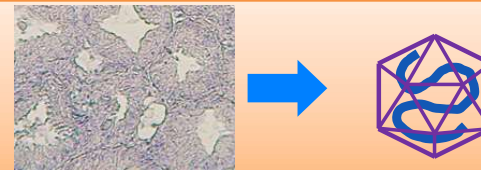
### 2. 解剖し中腸腺を取り出す

→中腸腺まわりの脂肪分をできるだけ取り除く



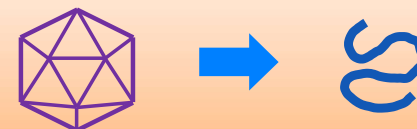
### 3. 中腸腺からウイルス粒子を回収

→組織に結合したウイルス粒子を効率良く回収する



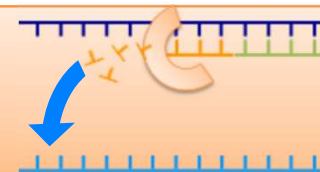
### 4. 核酸（RNA）抽出・精製

→RNAを効率良く回収・精製する



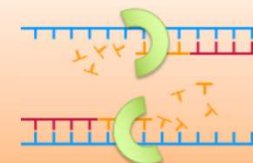
### 5. 逆転写（RT）反応

→PCRで検出する遺伝子領域のcDNAを効率良く合成する



### 6. リアルタイムPCRによる遺伝子検出

→遺伝子領域を効率良く増幅する



- 特に重要なステップ3～6は、ウイルス粒子の回収率や試料由来の阻害影響を目視では確認できないため、**工程管理（プロセスコントロール）が必要**

# 国内の検査法と国際的標準法

## 通知法とISO法の違い：検査方法

|                   | 通知法 <sup>a)</sup>                                                                                     | ISO法 <sup>b)</sup>                                                                                                                                   |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. カキ試料の採取        | 1または2個体を1検体<br>1ロットにつき3から10検体                                                                         | 10個体以上を1検体                                                                                                                                           |
| 2. 解剖し中腸腺を取り出す    | 1または2個体の中腸腺を集める                                                                                       | 10個体以上の中腸腺を集めて切り刻む                                                                                                                                   |
| 3. 中腸腺からウイルス粒子を回収 | 試料1 g → 200 $\mu$ L<br>1) リン酸緩衝液を加え<br>ホモジナイザー or<br>ストマッカーで乳剤化<br>2) 超遠心 or PEG沈殿法で濃縮                | 試料2 g → 2.5 mL<br>※プロセスコントロールの添加<br>プロテイナーゼK<br>(タンパク質分解酵素) 処理                                                                                       |
| 4. 核酸 (RNA) 抽出・精製 | 140 $\mu$ L → RNA 60 $\mu$ L<br>※RNA抽出コントロールの添加<br>例示：Qiagen Viral RNA Mini<br>(シリカメンブレンカラム)          | 500 $\mu$ L → RNA 100 $\mu$ L<br>例示：BioMerieux NucliSENS<br>(磁性シリカビーズ)                                                                               |
| 5. 逆転写 (RT) 反応    | ※DNase処理推奨<br>(12 $\mu$ L/反応液15 $\mu$ L)<br>RNA 30 $\mu$ L/反応液 50 $\mu$ L                             | ワンステップ法<br>RNA 5 $\mu$ L/反応液25 $\mu$ L<br>GI: QNIF4, NV1LCR, TM9<br>GII: QNIF2d, COG2R, QNIFs<br>(中腸腺0.02 g分を検査)<br>プロセスコントロール回収率,<br>酵素反応阻害の評価を行い判定 |
| 6. リアルタイムPCR      | cDNA 5 $\mu$ L/反応液50 $\mu$ L<br>GI: COG1F/R, RING1-TP<br>GII: COG2F/R, RING2AL-TP<br>(中腸腺0.028 g分を検査) |                                                                                                                                                      |

# ISO法における検出下限値・定量下限値の考え方

## 用語の定義

### - 検出下限値 (limit of detection, LOD)

規定された分析条件下において、再現性をもって検出可能な、試料中の標的物質（ウイルス遺伝子）の最低濃度（95%信頼区間）

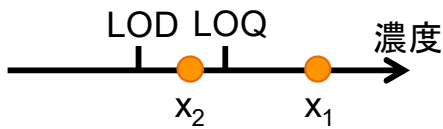
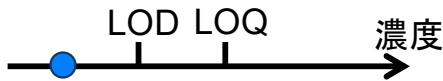
### - 定量下限値 (limit of quantification, LOQ)

規定された分析条件下において、許容できるレベルの精度および正確さをもって定量可能な、試料中の標的物質（ウイルス遺伝子）の最低濃度

→ 検出下限値と定量下限値は、**検査に供するカキ試料および抽出RNAの品質に影響を受ける**

したがって、検出下限値・定量下限値の情報は検査結果を解釈する上で重要であり、明示することとされている

# 通知法とISO法の違い：結果の判定・報告方法

|                                                                                                  | 通知法 <sup>a)</sup>                                                                                      | ISO法 <sup>b)</sup>                                                                                                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 結果の判定                                                                                            | 1) RNA抽出コントロール 検出<br>2) 陽性コントロール 検出<br>3) 陰性コントロール 不検出<br>→ 2つのウェルにおいて、実測値<br>10 コピー以上で陽性とする           | 1) プロセスコントロール回収率 >1%<br>2) 陽性コントロール (dsDNA) 検出<br>3) 外部コントロール (EC RNA)<br>→ RT-PCRの酵素反応阻害 <75%<br>4) 陰性コントロール 不検出       |
| 定量に使用して良い<br>検量線の条件                                                                              | $R^2 : 0.990 \sim 1$                                                                                   | $R^2 \geq 0.980$<br>傾き : $-3.10 \sim -3.60$ (増幅効率90~110%)                                                               |
| 陽性結果の報告方法<br>   | 記載なし<br>(検査機関の判断)                                                                                      | $x_1 > LOQ$ の場合 → $x_1$ copies/g<br>$x_2 < LOQ$ の場合 → 定量下限値未満の陽性<br>(定量下限値 $y$ copies/g)<br>※検査法のLOQを明示する               |
| 陰性結果の報告方法<br> | 記載なし<br>(検査機関の判断)                                                                                      | 不検出<br>(検出下限値 $z$ copies/g未満)<br>※検査法のLODを明示する                                                                          |
| 例えば、低濃度の汚<br>染試料の場合                                                                              | 1ウェル目 :<br>10 copies/well → 357 copies/g<br>2ウェル目 :<br>5 copies/well → 179 copies/g<br>の場合は,<br>→ 「陰性」 | 定量下限値が500 copies/gで,<br>1ウェル目 : 357 copies/g<br>2ウェル目 : 179 copies/g<br>の場合は,<br>→ 「定量下限値未満の陽性」<br>(定量下限値 500 copies/g) |

# まとめ

- カキのノロウイルス検査においては,
  - ・ 中腸腺からのウイルス粒子の回収
  - ・ RNA抽出・精製
  - ・ 逆転写反応
  - ・ リアルタイムPCRによる遺伝子検出

の4つのステップが重要であり、工程管理（プロセスコントロール）が必要

- 工程管理ウイルスの回収率，逆転写反応とリアルタイムPCRの酵素反応阻害の評価を行い，不検出の結果が偽陰性でないことを確認する必要がある
- ISO法（15216-1:2017）は，上記のすべてに対応する精度管理が含まれており，カキのノロウイルス検査における国際的な標準法となっている
- ISO法は，機器（磁気ビーズプロセッサ）の導入，工程管理ウイルス，内部コントロール，高感度試薬等のコストと手間がかかることから，通知法と比較して検査費用が高くなるため，検査依頼者への丁寧な説明が求められる。