

シンガポール向けカキ輸出時のノロウイルス検査法 (ISO 15216に準拠した検査法) の 代替試薬の検証

消費・安全局食品安全政策課

令和5年2月14日

農林水産省

1

代替試薬検証の目的

農林水産省
消費・安全局

【背景】

- ISO法における推奨試薬は新型コロナウイルスの遺伝子検査に用いられ
ており、令和3年度のNoV保有状況調査では、新型コロナウイルス感
染症の感染拡大の影響により、試薬の入手が困難となった
- ISO法に準拠した検査法の手順書において、現在、リアルタイムRT-
PCRに用いる試薬は以下2種類を記載
 - RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System
(Thermo Fisher)
 - CEERAMTOOLS® noroGI-GII@ceeramTools (bioMérieux)

【目的】

- 安定して検査を実施できる環境を整備するため、国内で入手可能な複数
の1-step RT-PCR試薬について、代替可能性を検証する

2

代替試薬検証の方法

農林水産省
消費・安全局

- R4年度事業として2022年6月～10月に実施
 - ノロウイルス陰性カキの中腸腺にウイルス液を添加して、高濃度試料と低濃度試料を調製し、各5検体のRT-PCR定量値の平均値を求めた
(GI.4とGII.17を混合したウイルス液を中腸腺に添加し、高濃度試料は約1700 cpq、低濃度試料は約400 cpqとなるように調製)
 - 以下の基準※で判定を行った
 - 1.検量線について、 $r^2 \geq 0.980$ かつ **傾きが-3.10～-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た ($10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$ copies各2反復)
 - 2.定量値について、UltraSense™の平均値に対して **0.5～2.0倍** 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た (PCRにおいて ± 1 サイクル)
- ※ 「カキのノロウイルス定量におけるRNA抽出機器およびワンステップRT-PCR試薬の比較」(岸根ら, 日本食品微生物学会雑誌, 39(1), 23-28, 2022)と同一基準を使用

農林水産省 消費・安全局 / Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.

3

3

代替試薬検証の方法

農林水産省
消費・安全局

- 3種類の1-step RT-PCR試薬を検証
- PCR反応液の組成は各試薬のマニュアルに従い、プライマー・プローブはISO法に記載の濃度となるよう調製
- 全ての検証を一台のABI7500リアルタイムPCRシステム(Thermo Fisher Scientific)で実施
- プラスミドはTakara Norovirus Positive control DNA(RR251A)を使用
- 3条件で検証：① ISO法同一条件

② ISO法準拠条件(逆転写ステップは試薬マニュアルに準拠)

③ 各試薬推奨条件(各試薬のマニュアルに準拠)

試薬	UltraSense™	TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix			試薬A			試薬B		
メーカー	Thermo Fisher	Thermo Fisher			メーカーA			メーカーB		
	①ISO法	②ISO準拠	③推奨	マニュアル	②ISO準拠	③推奨	マニュアル	②ISO準拠	③推奨	マニュアル
逆転写	55℃ 1時間	50℃ 5分	50℃ 5分	50℃ 5分	45℃ 10分	45℃ 10分	45℃ 10分	60℃ 15分	60℃ 15分	60℃ 15分
初期変性	95℃ 5分	95℃ 20秒	95℃ 20秒	95℃ 20秒	95℃ 10分	95℃ 10分	95℃ 10分	95℃ 10分	95℃ 10分	95℃ 10分
変性	95℃ 15秒	95℃ 15秒	95℃ 15秒	95℃ 15秒	95℃ 15秒	95℃ 15秒	95℃ 15秒	95℃ 15秒	95℃ 15秒	95℃ 15秒
アニール	60℃ 1分	60℃ 1分	60℃ 1分	60℃ 1分	60℃ 1分	60℃ 45秒	60℃ 45秒	60℃ 1分	60℃ 30秒	60℃ 30秒
伸長	65℃ 1分	65℃ 1分			65℃ 1分			65℃ 1分		
サイクル数	45	45	45	40	45	45	40	45	45	40～45

4

結果

農林水産省
消費・安全局

	TaqMan® Fast Virus 1- Step Master Mix	試薬A	試薬B
① ISO法同一条件	本検証における 判定基準に適合せず	本検証における 判定基準に適合せず	本検証における 判定基準に適合せず
② ISO法準拠条件 (一部各試薬のマニュアルに準拠)	本検証における 判定基準に適合せず	本検証における 判定基準に適合せず	—※
③ 各試薬推奨条件 (各試薬のマニュアルに準拠)	本検証における 判定基準すべてに 適合	本検証における 判定基準に適合せず	本検証における 判定基準に適合せず

※ 試薬Bの②ISO法準拠条件については実施せず



TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mixを試薬推奨条件で実施した場合、
全ての基準を満たしていたため、代替可能と判断

農林水産省 消費・安全局 / Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.

5

5

まとめ

農林水産省
消費・安全局

- **RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Thermo Fisher)**

ISO 15216に記載

- **CEERAMTOOLS® noroGI-GII@ceeramTools (bioMérieux)**

試薬推奨条件で代替可能性を検証済み（手順書記載済み）

- **TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher)**

今回、試薬推奨条件での使用で代替可能であることを確認

→ 手順書に代替試薬として追記予定

農林水産省 消費・安全局 / Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.

6

6