

ISO 15216-1に基づくノロウイルス検査法の 導入に向けた取組について



消費・安全局食品安全政策課

令和3年3月15日

農林水産省

背景と今年度実施中の取組

- ✓ シンガポールへのカキ輸出において、出荷前にノロウイルス（NoV）の自主検査（通知法準拠）を受けたにもかかわらず、着地検疫（ISO法準拠）においてNoVが検出され、シップバック・廃棄を受ける事例が多発
- ✓ 輸出前の検査については、相手国の手法を用いるべきだが、現在国内でISO法を実施できる検査機関はない

→ISO法の国内導入に向けて、以下を検証

- ①ISO法の推奨機器・試薬を用いた国内での検証
- ②水準調査に用いている改良法とISO法の性能比較
- ③推奨機器を代替可能な機器の検証

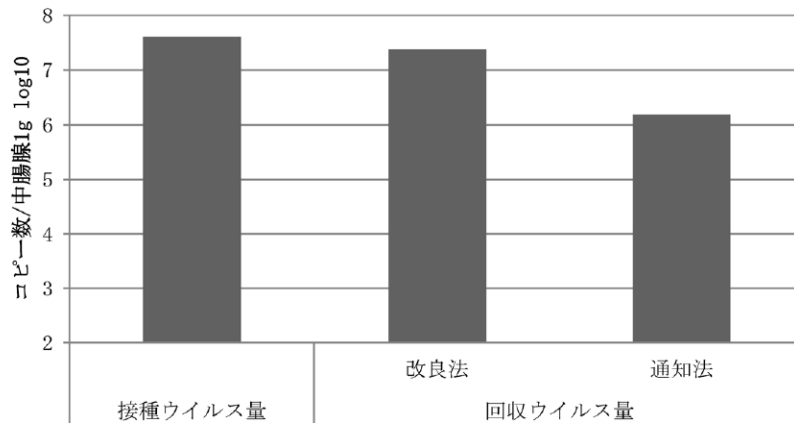


カキのノロウイルス（NoV）遺伝子検査法

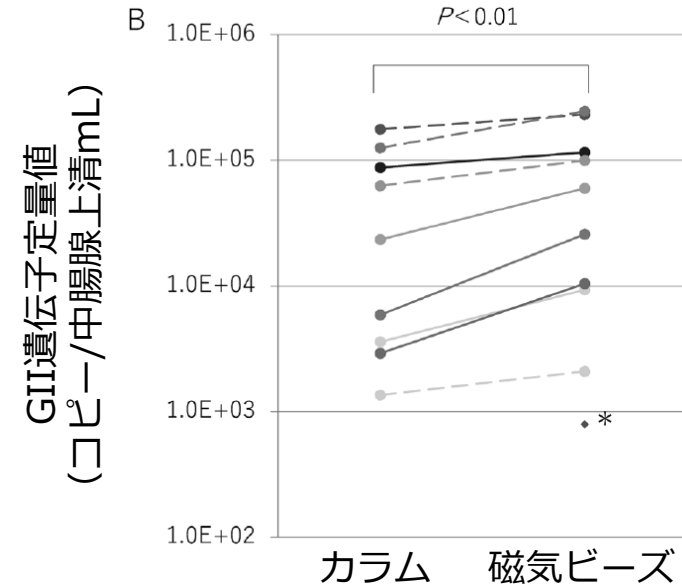
農林水産省
消費・安全局

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
利用	国内の 食中毒検査/自主検査 〔現在一般的な検査〕	同左 R1~2水準調査 〔通知法を高感 度化した方法〕	EU水準調査 シンガポール着地検査 〔輸出前検査に 有用と期待〕
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

(参考) 各手法の比較



▲ 通知法と改良法では定量値に10倍以上の差
(上間, 日食微誌, 33: 121-126, 2016)



▲ 磁気ビーズ法はカラム法に比べ定量値が有意に高い
(坂上ら, 日食微誌37: 10-13, 2020)

ISO法の検証と改良法との比較

ISO法の推奨手順

1. サンプルング



カキ10粒以上から少なくとも
2グラム以上の中腸腺をプール

2. ウイルス抽出

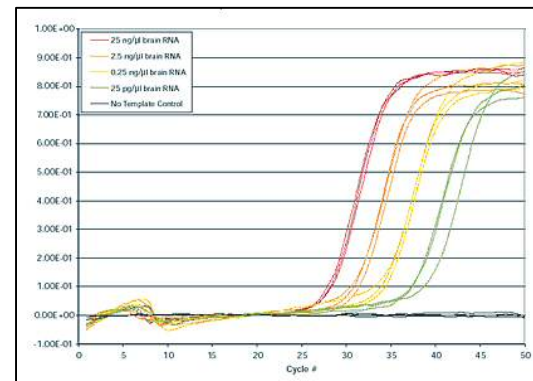


3. RNA抽出 (磁気ビーズ法)



miniMAG+NucliSens試薬 (バイオメリュー)

4. 1-step RT-qPCR

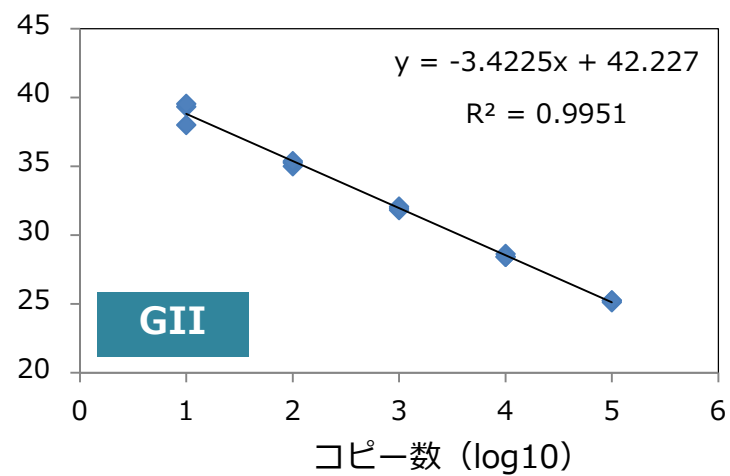
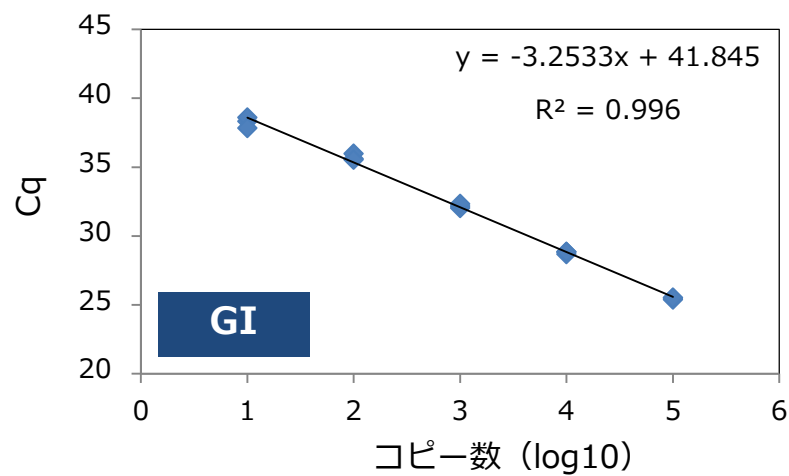


RNA UltraSense One-step qRT-PCR system
(サーモフィッシャー)



推奨試薬を用いたISO法の再現

プラスミドDNA (n=3) を用いたPCRの直線性と増幅効率



		GI	GII
相関係数R2	1 回目	0.997	0.998
	2 回目	0.996	0.995
PCR増幅効率	1 回目	93.4%	104.6%
	2 回目	103.0%	96.0%

10¹~5コピーの範囲で直線性/PCR効率に問題なし

ISO法と改良法の比較（１） LOD/LOQ

汚染力キの中腸腺試料を陰性力キ中腸腺で、2, 4, 8, ..., 128, 256倍に希釈
→希釈試料をそれぞれ10点分析し、EURLのガイダンス*に従いLOD/LOQを決定

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

(参考) European BS**	LOD ₉₅ (cpg)	LOQ (cpg)
GI	13~264	40~298
GII	20~196	75~389

**欧州のベースラインサーベイに参加した13ラボ（11NRLと2 non-NRL）

ISO法と改良法の比較では、GIはほぼ同等、GIIはISO法が優れている。

*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 (EURL)

ISO法と改良法の比較（2）

人為汚染力キの中腸腺と陰性力キ中腸腺を混合し、3濃度の試料を作製
→別の日（2日間）に、それぞれ2回ずつ（計4回）NoVを抽出・定量

GI	ISO法（再掲）			改良法		
	cpg*(平均)	cpg (log)	SD (log)	cpg*(平均)	cpg (log)	SD (log)
高濃度	134,461	5.12	0.06	78,029	4.89	0.04
中濃度	24,403	4.38	0.10	18,074	4.26	0.02
低濃度	4,600	3.65	0.12	4,898	3.69	0.01

*中腸腺 1 グラムあたりのコピー数

GII	ISO法（再掲）			改良法		
	cpg*(平均)	cpg (log)	SD (log)	cpg*(平均)	cpg (log)	SD (log)
高濃度	57,531	4.75	0.07	50,302	4.70	0.03
中濃度	12,414	4.09	0.02	13,417	4.12	0.07
低濃度	2,049	3.30	0.09	2,375	3.36	0.10

今回の用いた濃度では、ISO法と改良法は定量値、SDともほぼ同等の結果

核酸抽出機器の代替機の検証

miniMAGとMaelstrom 8の比較

miniMAG ▶
(バイオメリュース社)
販売終了により
入手不可。



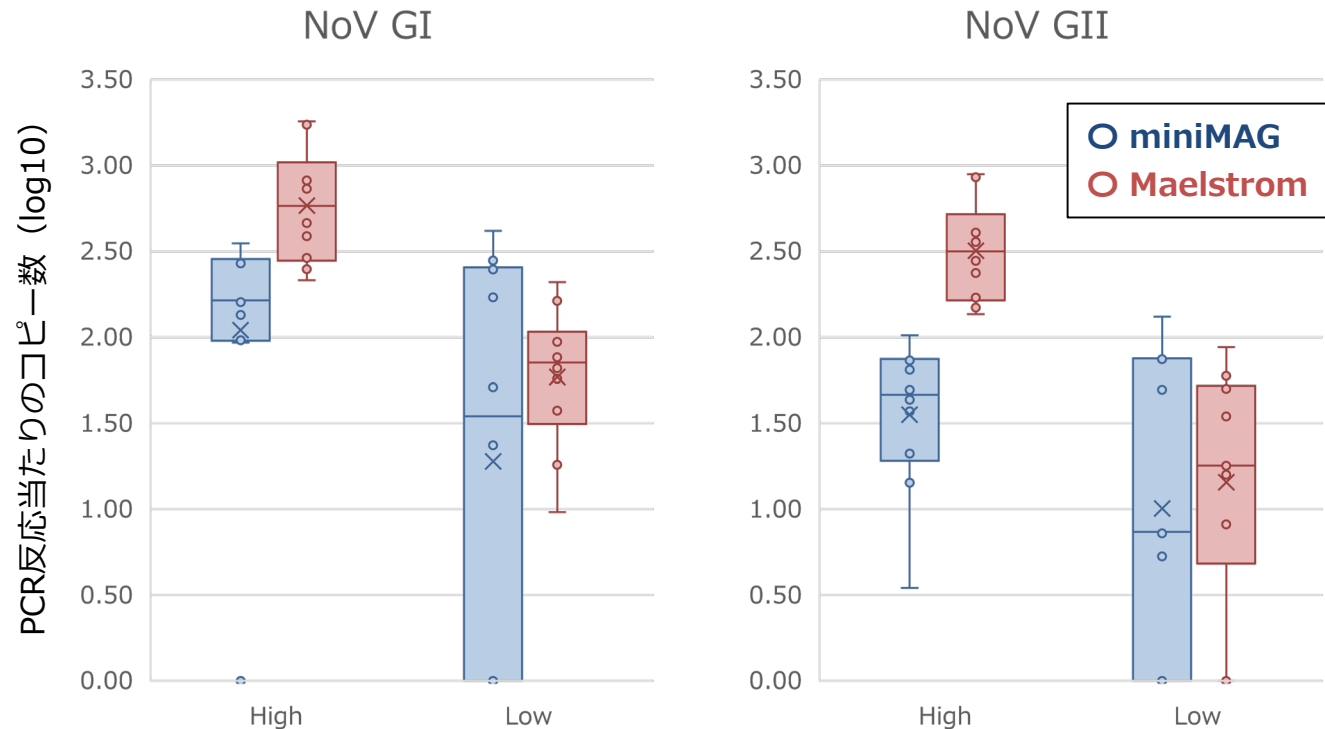
◀ Maelstrom 8
(Taiwan Advanced
Nanotech社)
EURLにおいて
代替可能性を報告。
国内で入手可能。

	miniMAG	Maelstrom 8
試薬	NucliSENS試薬	TANBeads試薬 (今回はNucliSENSを使用)
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

*Persson et al., **Int. J. Food Microbiol.** 315 (2020)

Maelstrom 8の検証（１）NoVコピー数

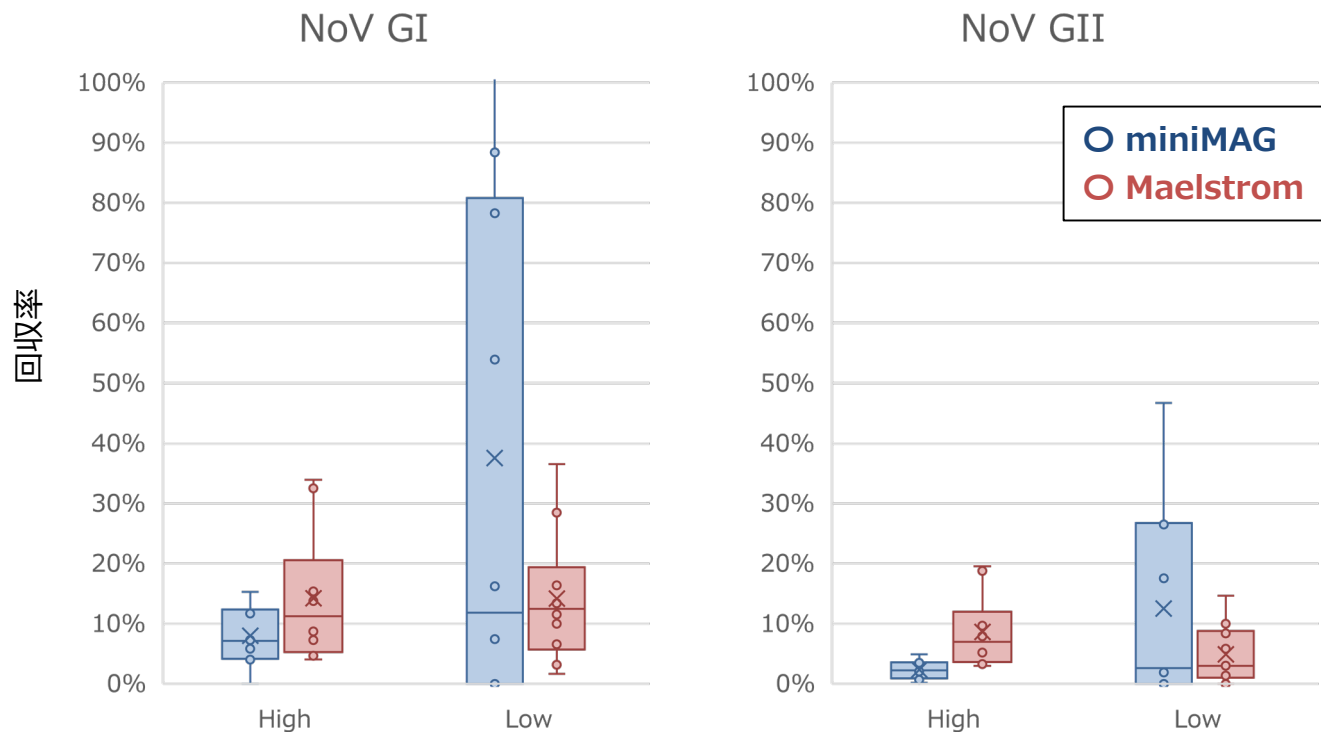
カキの中腸腺上清にウイルスを添加した試料10点を抽出機器を替えて分析
(High試料：8,000 cpg、Low試料：800 cpg)



検出されたコピー数は、miniMAGよりMaelstromの方が高く、
また、特に低濃度試料の定量値のバラツキも小さい。

Maelstrom 8の検証（2）回収率

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との比較による回収率
（=カキに含まれる成分によるウイルス回収の低減効果）



Maelstromは、miniMAGと同等かやや高く、低濃度試料のバラツキも小さい
→Maelstromの方がカキ成分による抽出阻害等の影響を受けにくい

現時点での取組結果のまとめ

1. ISO法の国内実施と改良法との性能比較

- ✓ 推奨試薬・機器を用いてISO法を再現できた。
→ 今後は外部精度管理、技能試験の必要性
- ✓ ISO法は改良法に比べ、NoV GII検出の性能が優れていた。
→ 次年度の水準調査ではISO法を採用予定

2. ISO法の推奨核酸抽出機器の代替可能性の検討

- ✓ 推奨機器（miniMAG）に比べ、国内入手可能なMaelstrom 8の方が優れていた。
→ 次年度の水準調査ではMaelstromを採用予定

今後の予定

1. ISO法の国内推奨条件の確立

- ✓ 今回報告した代替抽出機器のほか、定量に用いるプラスミドや工程管理ウイルスの検証やそれらの提供体制を整備し、国内におけるISO法の推奨条件を確立。

2. ISO法の国内導入に向けた取組

- ✓ 国内検査機関向けに今回のデータとあわせてISO法の操作手順を周知。
 - ISO法に関心の高い検査機関への速やかな導入を推進
- ✓ 国内検査機関や都道府県等における輸出前検査体制の整備に向け、1. を普及させるための研修を来年度実施予定。
 - 多くの検査機関に導入を検討してもらう