

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)

1 器具・機器

- ・ マイクロピペット、チップ（コンタミ防止のためフィルター付きが望ましい）
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ カキ剥き用刀等（中腸腺を傷つけずにカキの殻を開けられるもの）
- ・ メス、ピンセット、ハサミ等（カキから中腸腺を採取し、細かく切り刻めるもの）
- ・ 滅菌シャーレ
- ・ 15 mL、50 mL 遠心チューブ、マイクロチューブ
- ・ 振盪インキュベーター等（37℃で 320 rpm 振盪できるもの）
- ・ ウォーターバス等（60℃で保温できるもの）
- ・ Maelstrom 8 マグネティックロータリーミキサー（型番：M8-H）
- ・ オートステージ（型番：M8H-Autostage）
- ・ Maelstrom 8 チャンネルハンディ用スピンチップセット
- ・ 2.2 mL ディープウェルプレート
- ・ リアルタイム PCR 装置
- ・ PCR プレート、シール等（リアルタイム PCR に対応した 8 連や 12 連チューブも可）
- ・ グローブ

2 試薬

- ・ 工程管理ウイルス液
- ・ 分子生物学グレードの水
- ・ プロテイナーゼ K 溶液（3 U/mL）
市販の溶液または固体を水で 3 U/mL となるよう溶解して使用。最大 6 カ月まで-15℃以下で保存可能。一度溶解すると 1 週間以内であれば 4℃保存可能。
- ・ NucliSENS Lysis Buffer（ビオメリュー）
- ・ NucliSENS Magnetic Silica（ビオメリュー）
- ・ NucliSENS Extraction Buffer 1（ビオメリュー）
- ・ NucliSENS Extraction Buffer 2（ビオメリュー）
- ・ NucliSENS Extraction Buffer 3（ビオメリュー）
- ・ プラスミド DNA（ノロウイルス GI 及び GII）

- TE バッファー (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA)
- Internal positive control (IPC, ニッポンジーン)
- プライマー・プローブ (ノロウイルス GI, GII、工程管理ウイルス、IPC の 4 セット)
- RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Thermo Fisher)

3 手順

サンプル抽出とリアルタイム PCR は異なる作業場所もしくは部屋で実施する。

3. 1 ウイルス抽出

- (1) 殻付きカキ 2 kg (20 粒程度、活もしくは冷凍) を 1 検体とし、それらの殻を開き、メス、ピンセット等を用いて中腸腺をシャーレに回収する (**写真 1、2 参照** 脂肪等を含む白い組織を極力除去するのが望ましい)。1 検体の処理の間は、器具を取り換える必要はない。少なくとも 2 g の中腸腺を採取する ((2) で 2 g を 15 mL 遠心チューブに移せるようロスを考えて少し多めに採取すると良い)。
- (2) メス、ピンセット等を用いて、中腸腺がペースト状に近くなるまで切り刻み (**写真 3 参照**、中腸腺は完全につぶさない)、2 g を 15 mL 遠心チューブに移す。すぐに次の工程に移らない場合は、24 時間以内であれば 4℃、6 カ月までは -15℃ 以下、それより長い場合は -70℃ 以下で保存する。残りの中腸腺試料を 2 mL のマイクロチューブに 2 g ずつ分注し冷凍保存しておく、再試験が必要な際に便利である。
- (3) 工程管理ウイルス 10 µL を中腸腺試料に直接加える。2 mL のプロテインゼ K 溶液を加えよく混合する。
- (4) 振盪インキュベーター等を用いて、37℃、320 rpm で 1 時間振盪保温する。
- (5) ウォーターバス等を用いて、60℃ で 15 分間保温する。
- (6) 室温、3,000×g、5 分間遠心し、別の 15 mL 遠心チューブに上清を移す。この際、浮遊物になるべく取らないようにしつつ、ピペットマン等で可能な限り上清を回収する (※定量値を求める場合は、回収した上清の液量 (通常 2.0 から 3.0 mL) を記録する)。すぐに次の工程に移らない場合は、24 時間以内であれば 4℃、6 カ月までは -15℃ 以下、それより長い場合は -70℃ 以下で保存する。



写真1 カキ1個体から脂肪等をラフに取り除き中腸腺が露出したところ



写真2 摘出した中腸腺
シャーレを氷上に置き、作業中も低温に保つ。



写真3 ピンセットとメスで細切した中腸腺
完全なペースト状にはしない。

3. 2 RNA 抽出

RNA 抽出操作毎に、3. 1 の操作で得た試料に加えて、①水 490 μL に工程管理ウイルス 10 μL を加えた試料（工程管理ウイルスの抽出コントロール試料）、②水 500 μL （抽出の陰性コントロール）も並行して操作を行う（※工程管理ウイルスについては、3. 3 における原液の測定結果が、 C_q 値（増幅曲線と閾値（Threshold）が交差するサイクル数）22～25 となることを目安とする）。

（1）2.2 mL ディープウェルプレートの 1～7 列に図 1 のレイアウトを参照し、表 1 に従い NucliSENS 試薬を加える。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Lysis Buffer	Ext. Buffer 1 + silica	Ext. Buffer 1	Ext. Buffer 2	Ext. Buffer 2	Ext. Buffer 3	Ext. Buffer 3	←A：抽出コントロール				
B								←B：陰性コントロール				
C								←C～H：試料				
D												
E												
F												
G												
H												

図 1 2.2mL ディープウェルプレートのレイアウト例

表 1 2.2 mL ディープウェルプレートに加える試薬と操作

列	試薬(/well)	操作
1	Lysis Buffer, 1 mL	混合 10 分 2 列目から Magnetic silica を移し、 混合 10 分
2	Extraction Buffer 1, 1.5 mL + magnetic silica, 50 μL	洗浄（混合 30 秒）
3	Extraction Buffer 1, 1.5 mL	洗浄（混合 30 秒）
4	Extraction Buffer 2, 1.5 mL	洗浄（混合 30 秒）
5	Extraction Buffer 2, 1.5 mL	洗浄（混合 30 秒）
6	Extraction Buffer 3, 1.5 mL	洗浄（混合 15 秒）
7	Extraction Buffer 3, 100 μL	65℃へ加温 溶出（混合 5 分） magnetic silica の除去

- (2) 1 列目の A-H の各ウェルにサンプル 500 μ L を加える。
- (3) オートステージにセットした Maelstrom 8 マグネティックロータリーミキサーに表 1 の操作をプログラムする。プログラムの詳細については、以下の論文のサプリメントファイル 1 を参照のこと。

Persson, S., Nybogård, L., Simonsson, M., Eriksson, R. (2020) Optimisation and evaluation of an automated system for extraction of viral RNA from oysters. International journal of food microbiology. 315. 108386.
- (4) 試薬・サンプルを添加したディープウェルプレートをおートステージにセットして抽出操作を実施する。オートステージ使用により列 1 から 7 まですマグネティックロータリーミキサーが自動的に移動しながら抽出作業が進行する。
- (5) 抽出操作終了後、7 列目の溶出液をマイクロチューブに移し、抽出 RNA サンプルとする。サンプルは、24 時間以内であれば 4°C、6 ヶ月までであれば -15°C 以下、それ以上の場合は -70°C 以下で保存する。

3. 3 リアルタイム RT-PCR

- (1) 工程管理ウイルスの抽出コントロールを、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 倍に水で希釈する。抽出 RNA サンプルに対して、(4) 以降で用いる 10 倍希釈サンプルを作製する。希釈は水で行う。
- (2) 以下の表 2 に示す終濃度で使用可能となるよう、反応ごとに 5x プライマー・プローブミックスを作製する。工程管理ウイルスの検出用についても、用いるウイルスを検出するためのプライマー・プローブをミックスして同様に作製する。

表2 ノロウイルス GI 及び GII 並びにインターナルコントロール（IPC）用のプライマー及びプローブの配列と終濃度

GI 用	配列 (5' → 3')	終濃度
QNIF4	CGCTGGATGCGNTTCCAT	0.5 pmol/μL
NV1LCR	CCTTAGACGCCATCATCATTTAC	0.9 pmol/μL
TM9	FAM-TGGACAGGAGATCGC-MGB	0.25 pmol/μL

GI I 用	配列 (5' → 3')	終濃度
QNIF2d	ATGTTTCAAGTGGATGAGRTTCTCWGA	0.5 pmol/μL
COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	0.9 pmol/μL
QNIFs	FAM-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-TAMRA	0.25 pmol/μL

IPC 用	配列 (5' → 3')	終濃度
IPC1-5'	CCGAGCTTACAAGGCAGGTT	0.5 pmol/μL
IPC1-3'	TGGCTCGTACACCAGCATACTAG	0.5 pmol/μL
IPC1-Taq	FAM-TAGCTTCAAGCATCTGGCTGTCGGC-TAMRA	0.1 pmol/μL
IPC	(テンプレート DNA)	1 μL/reaction

IPC のプライマー・プローブミックスには、IPC（テンプレート DNA）も混合する。

出典：GI 用及び GII 用のプライマー及びプローブの配列及び終濃度については、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 の Annex C 及び Annex D から引用した。

(3) 以下の表 3 に示す量で必要本数分作製したミックス 20 μ L を反応に使用する各ウェルに分注する。

表 3 PCR 反応液の組成

溶液	終濃度	Vol./reaction (μ L)
5x UltraSense reaction mix	1x	5
5x Primer Probe mix	1x	5
ROX dye (50x)	1x	必要に応じて*
RNA UltraSense enzyme mix	–	1.25
水	–	必要量
総量	–	20

*ABI のリアルタイム PCR 装置など、ROX 補正を必要とする場合は添加

出典：表 3 については、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 の Annex C から引用した。

(4) 以下の図 2 に示すレイアウト例を参考に、RNA サンプル 5 μ L を加える。

サンプル (原液)	サンプル (原液)	サンプル (原液)	サンプル (-1)	サンプル (-1)	サンプル (-1)	抽出 NC	抽出 NC	水	水	Plasmid	Plasmid
サンプル (原液)	サンプル (原液)	サンプル (原液)	サンプル (-1)	サンプル (-1)	サンプル (-1)	抽出 NC	抽出 NC	水	水	Plasmid	Plasmid
サンプル (原液)	サンプル (-1)	PC (原液)	PC (-1)	PC (-2)	PC (-3)	抽出 NC	水				
サンプル (原液) +IPC	サンプル (-1) +IPC	水 +IPC									

図 2 PCR 反応用プレートのレイアウト例

ウェルの色は以下の検出反応を示す。

ノロウイルス GI	ノロウイルス GII	工程管理ウイルス	IPC
-----------	------------	----------	-----

なお、レイアウトに記載の通り、GI 及び GII 検出については 1 検体につき各 3 ウェル、工程管理ウイルス及び IPC 検出については 1 検体につき各 1 ウェルを基本とする。また、10 倍希釈サンプル（レイアウト図ではサンプル（-1）と記載）の結果は、PCR 阻害が確認された場合にのみ活用されるため、最初の分析では原液サンプルのみを分析し、PCR 阻害が確認された試料のみ、後ほど 10 倍希釈サンプルを分析しても良い。

また、GI 及び GII の陽性コントロールとして用いるプラスミド DNA については、GI および GII それぞれに対して少なくとも 2 ウェル（本分析条件において、確実に増幅が見込める濃度＝ $10^4 \sim 10^3$ copies/well）を置く。

（5）以下の反応条件で、PCR を実施する。

工程		時間と温度	サイクル数
逆転写		55℃, 1 時間	1
初期熱変性		95℃, 5 分	1
増幅	熱変性	95℃, 15 秒	45
	アニーリング	60℃, 1 分	
	伸長反応	65℃, 1 分	

出典：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 の Annex C から引用した。

備考：リアルタイム RT-PCR に用いる試薬については、ISO 15216 に記載の RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Thermo Fisher) を用いたものを記載したが、プライマー・プローブを含む試薬キットである CEERAMTOOLS® noroGI-GII@ceeramTools（バイオメリュー）を用いることも可能である。

3. 4 結果判定

- （1）増幅プロットは、使用する機器で推奨される方法を用いて解析を行い、各試料の C_q 値を決定する。手動で閾値を設定する場合には、対数増幅期となるようにする。偽陽性（高いバックグラウンド等）の増幅が認められた場合には陰性として取り扱う。
- （2）水及び抽出の陰性コントロールの結果は常に陰性となるべきで、これらに陽性の結果が得られた場合には、再検査とする。

3. 4. 1 PCR 阻害の確認

分析サンプルの IPC 検出の C_q 値と水（陽性コントロール）の IPC 検出の C_q 値との差（ ΔC_q ）が 2 以下（PCR 阻害を受けた定量値が本来のものの 1/4 を下回らない）であることを確認する。 ΔC_q が 2 よりも大きい検体については、RNA の 10 倍希釈試料の PCR 阻害を確認し、2 以下であれば、対象サンプルについてはいずれも 10 倍希釈試料の結果を採用する。RNA の 10 倍希釈検体を用いても ΔC_q が 2 よりも大きい場合には結果を無効とし、試験を最初からやり直す。

3. 4. 2 ウイルス回収率の確認

- (1) 段階希釈した工程管理ウイルス（原液、 10^{-1} 、 10^{-2} 及び 10^{-3} 希釈）の結果を用いて、 $\log_{10}$ 濃度に対して得られた C_q 値をプロットすることにより検量線を作成し、相関係数の 2 乗 r^2 、検量線の傾きおよび切片を決定する。検量線は、 $r^2 \geq 0.980$ かつ傾きが $-3.10 \sim -3.60$ （増幅効率が 90～110% に相当）の範囲内であることを確認する。この条件に満たない場合には、検量線作成に用いた C_q 値に外れ値がないかチェックし、外れ値を除いた r^2 、傾き及び切片を再度決定し、上記条件を満たせば検量線として採用する。この際、外れ値の除外は 1 点までとし、それでもなお条件を満たさない場合には、検量線の作成を再度実施する。
- (2) 工程管理ウイルスの回収率は、以下の式を用いて計算する。

$$\text{回収率 (p)} = 10^{(\Delta C_q/m)} \times 100\%$$

ここで、 ΔC_q は分析サンプルの工程管理ウイルス検出の C_q 値から工程管理ウイルスの抽出コントロール試料の C_q 値を引いた値、 m は工程管理ウイルスの検量線の傾きを表す。

また、ウイルスの抽出効率については、以下の式を用いて計算する。

$$\text{抽出効率} = (p/0.5) \times v$$

ここで、 p は工程管理ウイルスの回収率、 v は 3. 1 (6) における上清の液量[mL]とする。抽出効率が 1% より小さい場合には、結果を無効とし、試験を最初からやり直す。

3. 4. 3 判定基準

- (1) RNA サンプルを加えて GI 及び GII のプライマー及びプローブで反応させたウェルに対して、得られた C_q 値が 40 未満であった場合、当該ウェルは陽性と判定する。
- (2) 1 検体に対し PCR 反応を行った GI 及び GII それぞれ 3 ウェル（計 6 ウェル）について、少なくとも 1 ウェルで陽性と判定された場合、当該検体はノロウイルス陽性と判定する。

(参考 1) 定量値を求める場合

上記に以下の手順を加えることで、カキの中腸腺 1 グラムあたりに含まれるノロウイルスの RNA コピー数を定量することができる。

1. 検量線の作成

- (1) GI 及び GII のプラスミド DNA を TE で段階希釈し、希釈系列（原液、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 及び 10^{-4} 希釈液）を作製する（原液を 2×10^4 copies/ μ L とすると、PCR 反応当たり $10^5 \sim 10^1$ copies となる）。3. 3 (4) に各 2 ウェルずつ加え、PCR を実施する。
- (2) GI 及び GII の陽性コントロール DNA の結果を用いて、 $\log_{10}$ 濃度に対して得られた C_q 値をプロットすることにより検量線を作成し、相関係数の 2 乗 r^2 、検量線の傾きおよび切片を決定する。検量線は、 $r^2 \geq 0.980$ かつ傾きが $-3.10 \sim -3.60$ （増幅効率が 90～110%に相当）の範囲内であることを確認する。この条件に満たない場合には、検量線作成に用いた C_q 値に外れ値がないかチェックし、外れ値を除いた r^2 、傾き及び切片を再度決定し、上記条件を満たせば検量線として採用する。この際、外れ値の除外は GI 及び GII それぞれ 2 点までとし、それでもなお条件を満たさない場合には、検量線の作成を再度実施する。

2. 検体の定量

検体の GI および GII 検出の C_q 値を、それぞれの検量線に当てはめて 1 ウェル当たりのコピー数を算出し、3 ウェルの平均値を計算する。なお、 C_q 値が得られなかったウェルは、コピー数を 0 として平均値を計算する。また、以下の式を用いて、中腸腺 1 グラム当たりのコピー数 (cpg) を算出する。

$$\text{Copies per gram} = 3 \text{ ウェルの平均コピー数} \times v \times 20$$

ここで、 v は 3. 1 (6) における上清の液量とする。また、RNA の 10 倍希釈試料の結果を採用した場合には以下の式とする。

$$\text{Copies per gram} = 3 \text{ ウェルの平均コピー数} \times v \times 200$$

(参考2) 工程管理ウイルスについて

工程管理ウイルスとして一般に用いられているウイルスの1つにマウスノロウイルス（以下、「MNV」という。）がある。以下にMNVを使用して工程管理を行う場合の条件等を示す。

1. プライマー及びプローブの配列と終濃度について

3. 3の工程で工程管理ウイルスとしてマウスノロウイルスを用いる場合のプライマー及びプローブの配列と終濃度を表4に示す。

表4 MNV用のプライマー及びプローブの配列と終濃度

MNV用	配列(5' →3')	終濃度
MNV-S	CCGCAGGAACGCTCAGCAG	0.5 pmol/μL
MNV-AS	GGYTGAATGGGGACGGCCTG	0.9 pmol/μL
MNV-TP	FAM-ATGAGTGATGGCGCA-MGB	0.25 pmol/μL

※YはC又はTを示す。

出典：Kitajima M, Oka T, Takagi H, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K. (2010) Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses. Journal of Virological Methods. 169(2):269-73

2. MNVの分与について

(1) 農林水産省は、令和3年度輸出環境整備推進委託事業において、工程管理ウイルスとして用いるMNVの培養を行った。このMNVの分与を希望する機関は、農林水産省食品安全政策課（以下、「食品安全政策課」という。）の了承を得た後、食品安全政策課が指定する機関に対し譲渡申請を行うこと。なお、MNVの在庫が尽きた場合には分与できないことがある。

(2) 申請に当たっては、以下を遵守すること。

- ① ノロウイルスの検査・分析の実績のある機関であることを食品安全政策課に提示すること。
- ② 1回の申請当たり1 mL×5本を上限とすること（ただし、農林水産省が行う委託事業において使用するために必要な場合は上限を設けない）。
- ③ 2回目以降の申請を行う場合は、前回までの譲渡分の使用記録を食品安全政策課に提示すること。
- ④ 第三者（輸送を伴う、同一機関他支所を含む）に再分与しないこと。
- ⑤ 分与したMNVをノロウイルス遺伝子検出検査の工程管理以外の目的で

使用しないこと。

- ⑥ 分与した MNV を、分与先において培養し増殖させないこと（ただし、上記の使用目的に用いるために培養し増殖させる場合を除く）。
- ⑦ 分与した MNV を用いた調査等を発表する場合は、事前に連絡すること。
- ⑧ 送付にかかる費用については申請者が負担すること。

（参考 3）検査の外部精度管理について

カキのノロウイルス検査法について、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.cefass.co.uk/icoe/seafood-safety/designations/fao-reference-centre-for-bivalve-mollusc-sanitation/>

（参考 4）検査機器の導入支援について

民間検査機関が、本検査手順に使用する検査機器等を整備する場合、令和 3 年度輸出環境整備推進事業（自治体や民間検査機関等による証明書発給等の体制強化支援事業）の支援の対象となる（補助率 1 / 2 以内、補助金額の上限 15,000 千円、下限 1,000 千円）。

本事業への申請窓口は、一般社団法人食品衛生登録検査機関協会となります。申請に関する情報は、以下 web ページをご確認ください。

<http://www.ariafh.or.jp/>

留意点

本書は、農林水産省が、国内で入手可能な機器・試薬を踏まえ、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 を参考に作成したものであるが、本書に記載の方法が当該規格に適合することを保証するものではない。本書が参考とした規格は以下より参照されたい。<https://www.iso.org/standard/65681.html>

連絡先

農林水産省消費・安全局食品安全政策課

微生物管理班

TEL： 03-6744-0490

(検査機器の導入支援について)

連絡先

一般社団法人 食品衛生登録検査機関協会

TEL： 03-3403-9668

農林水産省 輸出・国際局 輸出支援課

TEL： 03-3501-4079