

抗原を調整し Western Blot (WB) を行った。また、シカの陽性血清を得るために、組換え精製ウイルス粒子様抗原をエゾシカに免疫し標準陽性血清を得た。この血清は牛の血清の ELISA においても標準陽性血清として使用した。また、家畜ブタに組換え精製ウイルス粒子様抗原を免疫し標準陽性血清を得た。PCR Primer は李博士より分与されたセット、Okamoto らのセット (BBRC 2001)、さらに兵庫県の日本シカの肉より増幅された配列をもとに設計したセットを用いた。

(倫理面からの配慮について) 用いた患者血清は国立感染症研究所の李天成博士から分与されたものである。当該研究所ですでに研究目的で使用が認められているものであり、さらに無記名で分与されたものであることから、倫理面からの問題は無い。各種免疫血清の採血はいずれも深麻酔後全採血、安楽死処分を行ったものであり、動物福祉の観点からも問題は無いと判断された。

C. 研究成果

組換え精製ウイルス粒子様抗原をエゾシカおよびブタに免疫して作成した標準陽性血清は同抗原を用いた ELISA および WB で強く反応した。シカ陽性血清の WB のパターンはヒト患者血清で得られるパターンと同一で、しかも予想される分子量を示したことから、組換え精製ウイルス粒子様抗原を用いる ELISA と WB は、HEV 特異的抗体を検出していると考えられた。ブタの陽性血清もシカ、ヒトの陽性血清と同じ分子量のバンド

と反応した。しかしながら、これよりも小さい分子量の位置に泳動されるバンドとの反応も見られた。これは免疫前血清でも見られたことから、抗原として用いたバキュロウイルス・昆虫細胞ライセートと結合する、HEV との特異的反応ではないと考えられた。

本州の日本シカを 2 地点 175 検体、北海道のエゾシカを 5 地点 199 検体調べたところ、明らかな陽性例は認められなかった。抗シカ 2 次抗体 (KPL 社) を 500 倍希釈で用いた時に強く反応する血清が見つかったが、それらはすべて WB では陰性であった。この血清では、2 次抗体の希釈倍率を高くするに伴い、ELISA 吸光度が急速に低下したことから、非特異反応によるものと考えられ、抗 HEV 抗体陰性と判断された。また、肝臓・糞・少数例の胆汁について PCR を行ったが増幅される検体は無かった。

北海道の家畜ブタ全 14 支庁のうち 2 支庁を除く 12 支庁 (1998~2003 年度) の家畜保健衛生所から分与された 計 1,274 検体について ELISA を行ったところ、その ELISA 吸光度の分布は、陰性例と考えられる多数の検体による分布と高い吸光度を示す少数例のピークの二峰性となった。ELISA 吸光度の高い 120 検体について WB 試験を行ったところ、8 例が陽性となった。この WB を基準にカットオフを設定するのであれば、二次抗体 (KPL 社アルカリフォスファターゼ標識) を 500 倍希釈で使用した場合 ELISA 吸光度 2.0 となると考えられた。

ブタと同様の解析を全 14 支庁 (1998~2003 年度) (各支庁約 100 検体づつ) 新得畜産試験場 (514

検体 (2005年度のみ) の計 2,190 検体について行ったところ、ELISA 吸光度の分布はブタと類したものになった。しかしながら吸光度の高い方のピークはさらにさらに少数検体であり、吸光度の比較的高い102検体についてWB試験を行ったが、陽性例は得られなかった。

D. 考察

現在までの結果では、北海道のシカ・ウシにおけるHEV抗体保有頻度は低いものと考えられる。また、ブタの陽性率も3.6%にとどまった。また、1次スクリーニングであるELISA後の2次スクリーニングとしてWBが有効であることが明らかとなった。

E. 結論

本研究では、昨年度までの研究にさらに例数と動物種を増やして疫学調査を拡大した。その結果、北海道・本州ともにシカのHEV保有頻度は大変低いことが確認された。さらに北海道のブタでは3.6%の陽性率とこれまでの調査に比べて著しく低い陽性率であった。また、ウシでは陽性例は見つからなかった。昨年度報告した齧歯類での調査でも120検体中に陽性例は見つからなかった。しかしながら、この齧歯類に関する調査においては検体数、ポイント数ともに不十分である。今後、北海道のHEVの感染ルートを明らかにするために、家畜のみならず、齧歯類ヒトにおいても疫学的調査を拡大してゆく必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Matsuura Y, Yoshimatsu K, Suzuki M, Yokoyama M, Igota H, Arikawa J, "Prevalence of antibodies to the hepatitis e virus in wild sika deer in Japan." The 1st Scientific Meeting of the Asian Zoo & Wildlife Medicine. Bangkok, Thailand (October 2005).

Matsuura Y: "Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in wild sika deer in Japan." 2006 Joint Workshop between Laboratory of Wildlife Biology, Department of Environmental Veterinary Sciences, The Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University and Conservation Genome Resource Bank for Korean Wildlife (CGRB), Seoul National University College of Veterinary Medicine. "Wildlife Research, Conservation and Veterinary Science" Seoul, Korea (January 2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

共同研究者

松浦友紀子 食品の安全性高度化推進研究推進事業 リサーチ・レジデント

吉松組子 北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設 助手

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」
分担研究報告書

食品のウイルス汚染状況に関する研究

分担研究者	西尾 治	(国立感染症研究所感染症情報センター)
研究協力者	杉枝正明	(静岡県環境衛生科学研究所微生物部)
	古屋由美子、片山 丘	(神奈川県衛生研究所微生物部)
	山下育孝	(愛媛県立衛生環境研究所衛生研究課)
	西田知子	(山口県環境保健研究センター生物部)
	福田伸治	(広島県保健環境センター微生物第 2 部)
	吉澄志磨	(北海道立衛生研究所感染症センター微生物部)
	田中俊光	(千葉市環境保健研究所医科学課)
	篠原美千代	(埼玉県衛生研究所)
	森下高行	(愛知県北部市場食品衛生検査所)
	秋山美穂、愛木智香子	(国立感染症研究所感染症情報センター)

研究要旨

わが国の生食用カキ、輸入食品のウイルス汚染状況を把握し、安全性の評価を行うため、RT-PCR 法とリアルタイム PCR 法でノロウイルス (NV) と A 型肝炎ウイルス (HAV) の検出を実施した。2005 年 10 月～2006 年 2 月の間に市販された生食用カキ 146 件中 47 件、32%から NV が検出された。2005 年 4 月～2006 年 1 月に輸入された輸入魚介類 129 件中 24 件、19%から NV が検出された。HAV は全ての食品で汚染が認められなかった。

A. 研究目的

わが国の生食用カキおよび主にアジアからの輸入生鮮魚介類のウイルス汚染状況を調査し、食品の安全性を確保するための基礎データの蓄積を目的とした。

B. 研究方法

1. 調査対象

生食用カキは 2005 年 10 月～2006 年 2 月の間に市販された 146 パックを買い上げて行った。輸入生鮮魚介類は 2005 年 4

月～2006 年 1 月に愛知県と千葉市に輸入された生鮮魚介類 129 検体を検査対象とした。

2. 検査方法

貝類からのウイルスの濃縮、RNA 抽出：

検査材料は 1 検体につき 3 個を用い各々検査を行った。

貝類は中腸腺、エビ類は腸管を取り出しホモジナイズした後、10%乳剤とし、10,000rpm20min 遠心後の上清を超速心

法またはポリエチレングリコールによる濃縮方法にて濃縮し、RNA抽出に用いた。RNA抽出はQIAamp Viral RNA Miniキット(QIAGEN)を用い、抽出RNAはDNase I処理後、random hexamer (Amersham Biosciences)を用いて Super Script II RT(Invitrogen)で逆転写し、cDNAを合成した。

NVの検出：

リアルタイムPCR法およびRT-PCR法でNVの検出を行った。リアルタイムPCR法のプライマーは、G1ではCOG1F/COG1R、G2ではCOG2F/ALPF/COG2Rを用い、プローブはTaq Man プローブ(ABI)で、G1はRING1-TP(a)とRING1-TP(b)、G2はRING2AL-TPを用いた。RT-PCRは、カプシド領域のプライマーを用いて行った。

HAVの検出：

リアルタイムPCR法およびRT-PCR法でHAVの検出を行った。リアルタイムPCR法のプライマーは、HAV+449プライマーとHAV-557プライマーを用い、プローブはTaq Man プローブ(ABI)で、HAV+482-P-FAMを用いた。RT-PCRは、HAV+2799/-3273、およびHAV+2907/-3162プライマーを用いて実施した。

シーケンス：

RT-PCR法で増幅されたPCR産物は、ダイレクトシーケンスで塩基配列を決定した。塩基配列が決定できたものは、標準株を用いて系統樹解析を行った。

C. 研究結果

1. 生食用カキにおけるNVおよびHAV汚染状況

2005年10月～2006年2月の間に市販

された生食用カキ146件中47件、32%からNVが検出された。月別では、10月に47%と高率に認められ、11月では3%、12月は12%と低く、1月では54%、2月では77%で1月以降再び高率に認められた。(表1)。

リアルタイムPCRでは実測値10コピー以上(1個あたりの換算値125コピー)で陽性とし、カキから検出されたNV量は、 $125 \leq \sim < 300$ コピーが1件、 $500 \leq \sim < 1000$ コピーが5件、 $1000 \leq$ が3件であった。

カキから検出された遺伝子型はG1では、GI/12(代表株:SaitamaKU19aG1/01/JP)のC-1[AY641755]が11件と多くみられ、次いで、GI/4(Valetta/95/MT)のC-6[AY641745]が6件から検出された。GI/5(Musgrove/89/UK)のC-22[AY641746]、GI/1(Norwalk/69/US)のC-30[AY641758]、GI/11(SaitamaKU8G1/99/JP)のC-33[AY641759]、GI/10(Boxer/2001/US)のC-35[AY356547]は各1件検出された。

G2では、GII/3(Mexico/89/MX)のC-10[AY641761]が19件と多く検出され、次いで、GII/4(Lordsdale/93/UK)のC-9[AY641748]が5件、GII/8(Amsterdam/98/NE)のC-18[AY641765]が2件から検出され、GII/12(SaitamaU1GII/97/JP)のC-13[AY641754]、GII/2(Snow Mountain/76/US)のC-15[AY353923]、GII/6(Miami/94/US)のC-20[AY641749]は各1件から検出された。

HAVの検出は、114検体を実施し全て陰性であった(表2)。

表1 生食用カキの月別 NV 汚染状況

月	検査数	陽性数	陽性率	定量値（カキ中腸腺1個あたりのコピー数）							PCR陽性	遺伝子型 （検出件数）
				0	0< <60	60≦ <125	125≦ <300	300≦ <500	500≦ <1000	1000≦		
10	15	7	47%	14	0	0	0	0	1	0	7	G1: C-1(1) G2: C-9(1)
11	34	1	3%	24	9	1	0	0	0	0	1	
12	41	5	12%	25	15	1	0	0	0	0	5	G2: C-10(4), C-13(1)
1	39	21	54%	23	14	0	0	0	2	0	21	G1: C-1(8), C-6(1) G2: C-9(2), C-10(8), C-18(1), C-20(1)
2	17	13	77%	8	3	0	1	0	2	3	13	G1: C-1(2), C-6(4), C-22(1), C-30(3), C-33(1), C-35(1), G2 C-9(2), C-10(7), C-15(1), C-18(1)
計	146	47	32%	94	41	2	1	0	5	3	47	G1: C-1(11), C-6(5), C-22(1), C-30(3), C-33(1), C-35(1) G2: C-9(5), C-10(19), C-13(1), C-15(1), C-18(2), C-20(1)

表2 生食用カキの HAV 汚染状況

月	検査数	陽性数
10	6	0
11	26	0
12	35	0
1	36	0
2	11	0
計	114	0

2. 輸入魚介類における NV および HAV 汚染状況

輸入魚介類 129 件中から NV が 24 件 (19%) 検出され、HAV は全て陰性であった。

輸入魚介類の月別 NV および HAV 汚染状況を表 3 に示した。NV の汚染状況は、4 月から 9 月の間に採取した検体では、4、5、7、8 月では検出されず、6 月では 14%、9 月では 8% と汚染状況が低率であったが、10 月以降では 4 月から 9 月に比べると高率に検出され、20%~33% であった。

種類別の NV 汚染状況は、アカガイが 21%、ハマグリが 18%、ブラックタイガーが 14% から NV が検出された (表 4)。

国別の NV 汚染状況は、中国産が 20% の NV 汚染率で、アカガイで 22%、ハマグリで 17% が NV に汚染されていた。韓国産は 14% の NV 汚染率で、アカガイで 17% の汚染が認められた。北朝鮮産は検査件数が 5 件と少なく、60% の NV 汚染が認められ、アカガイで 100%、ハマグリで 33% であった。フィリピン産はブラックタイガーで 33% の NV 汚染率であった。ロシア、インドネシア、サウジアラビア、ベトナム、マレーシア産の各 1 件は陰性であった (表 5、表 6)。

輸入魚介類から検出された NV 遺伝子型を表 7 に示した。G1 では、中国産のアカガイから C-23、ハマグリから GI/3 (代表株: Birmingham/93A/UK) の C-27 が検出された。G2 では GII/4 (Lordsdale/93/UK) の C-9 が 10 件からと多く検出され、中国産アカガイとハマグリ、韓国産アカガイ、北朝鮮産ハマグリ、フィリピン産ブラックタイガーからであった。次いで多く検出された型は、GII/6 (Miami/94/US) の C-20 が 6 件で中国産アカガイとハマグリ、韓国産アカガイ、フィリピン産ブラックタイガーからであった。GII/5 (Hillingdom/90/UK) の C-16 が 4 件で中国産、韓国産、北朝鮮産のアカガイからであった。GII/3 (Mexico/89/MX) の C-10 は 2 件から検出され、中国産ハマグリと韓国産アカガイであった。

D. 考察

生食用カキの NV 汚染は 32% に認められ、例年に比べ高率であった。月別の NV 汚染傾向は、10 月から NV 陽性が認められ、10 月に NV 汚染が高率に認められ、その後、11 月、12 月と低率で、1 月以降に再び高率となり、例年とは異なった傾向を示した。これは、今年度夏季、秋季に、台風等で降水量が多く、下水処理場での処理能力を超え、NV が除去しきれず、NV 汚染された放流水が海域を汚染してしまったと推測される。

リアルタイム PCR により検出されたカキ 1 個あたりの NV コピー数は、 $500 \leq < 1000$ コピーが 5 件、 $1000 \leq$ が 3 件で、NV 量が 500 コピー以上の高濃度に汚染されたカキが 5% に認められ、カキ 1 個で感染発病させる十分な NV 量が含まれていた。

表3 輸入食品の月別 NV および HAV 汚染状況

月	検査数	NV		HAV	
		陽性数	陽性率	陽性数	陽性率
4	6	0	0%	0	0%
5	0	0	0%	0	0%
6	7	1	14%	0	0%
7	9	0	0%	0	0%
8	9	0	0%	0	0%
9	26	2	8%	0	0%
10	15	3	20%	0	0%
11	15	5	33%	0	0%
12	18	5	28%	0	0%
1	24	8	33%	0	0%
計	129	24	19%	0	0%

表4 輸入食品の種類別 NV および HAV 汚染状況

種類	検査数	NV		HAV	
		陽性数	陽性率	陽性数	陽性率
アカガイ	81	17	21%	0	0%
ハマグリ	33	6	18%	0	0%
タイラギ	8	0	0%	0	0%
ブラックタイガー	7	1	14%	0	0%
計	129	24	19%	0	0%

表5 輸入食品の国別 NV および HAV 汚染状況

国	検査数	NV		HAV	
		陽性数	陽性率	陽性数	陽性率
中国	66	13	20%	0	0%
韓国	50	7	14%	0	0%
北朝鮮	5	3	60%	0	0%
フィリピン	3	1	33%	0	0%
インドネシア	1	0	0%	0	0%
サウジアラビア	1	0	0%	0	0%
ベトナム	1	0	0%	0	0%
マレーシア	1	0	0%	0	0%
ロシア	1	0	0%	0	0%
計	129	24	19%	0	0%

表 6 輸入食品の国および種類別 NV 汚染状況

国	種類	検査数	陽性数	陽性率
中国	アカガイ	36	8	22%
	ハマグリ	30	5	17%
韓国	アカガイ	42	7	17%
	タイラギ	8	0	0%
北朝鮮	ハマグリ	3	1	33%
	アカガイ	2	2	100%
ロシア	アカガイ	1	0	0%
フィリピン	ブラックタイガー	3	1	33%
インドネシア	ブラックタイガー	1	0	0%
サウジアラビア	ブラックタイガー	1	0	0%
ベトナム	ブラックタイガー	1	0	0%
マレーシア	ブラックタイガー	1	0	0%
計		129	24	19%

表 7 輸入食品から検出された NV の遺伝子型

遺伝子群	遺伝子型	検出件数	国	種類	検出件数
G1	C-23 [AY356543]	1	中国	アカガイ	1
	C-27 [AY641753]	1	中国	ハマグリ	1
G2	C-9 [AY641748]	10	中国	アカガイ	1
				ハマグリ	3
			韓国	アカガイ	4
			北朝鮮	ハマグリ	1
			フィリピン	ブラックタイガー	1
	C-10 [AY641761]	2	中国	ハマグリ	1
			韓国	アカガイ	1
	C-16 [AY641751]	4	中国	アカガイ	2
			韓国	アカガイ	1
			北朝鮮	アカガイ	1
	C-20 [AY641749]	6	中国	アカガイ	3
				ハマグリ	1
韓国			アカガイ	1	
フィリピン			ブラックタイガー	1	

生食用カキから検出された NV の遺伝子型は、G1 および G2 共に 6 種類の計 12 種類の遺伝子型が検出され、カキが多様なタイプの遺伝子型を蓄積することが示された。また、これら 12 種類の遺伝子型は、これまでのわれわれの研究でカキ関連食中毒事件から検出された遺伝子型であり、今後もこれらの遺伝子型でカキ関連食中毒事件が発生し得ることが予測され、引き続き国内における市販カキの監視が必要である。

輸入魚介類の NV 汚染は 19% に認められ、例年とほぼ同様の汚染率であった。アカガイおよびハマグリはアジア地域では産地にかかわらず高率に NV 汚染が認められた。輸入食品から検出された遺伝子型は、G2 では国内で多く検出される Lordsdale 類似株、Mexico 類似株等が多く検出された。Lordsdale 類似株は NV が検出された多くの産地で検出されており、Lordsdale 類似株がアジアでも広くいきわたっていることが示された。一方、G1 では、国内での検出がみられない C-23 類似株が検出され、輸入魚介類を通して、海外から NV の新しい株が侵入することが示された。

E. 結論

2005 年 10 月～2006 年 2 月の間に市販された生食用カキ 146 件中 47 件 (32%) から NV が検出された。2005 年 4 月～2006 年 1 月に輸入された輸入魚介類 129 件中 24 件 (19%) から NV が検出された。HAV は全ての食品で汚染は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hirakata Y, Arisawa K, Nishio O, Nakagomi O. Multifunctional spread of gastroenteritis outbreaks attributable to a single genogroup II norovirus strain from a tourist restaurant in Nagasaki, Japan. *J Clin Microbiol.* 43:1093-1098, 2005.

Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H. Genetic of Sapovirus in fecal specimens from infants and children with acute gastroenteritis in Pakistan. *Arch Virol.* 150:371-377, 2005.

Seto Y, Iritani N, Kudo H, Kaida A, Murakami T, Haruki K, Nishio O, Ayata M, Ogura H. Genotyping of norovirus strains detected in outbreaks between April 2002 And March 2003 in Osaka City, Japan. *Microbiol Immunol.* 49:275-283, 2005.

入谷展弘, 勢戸祥介, 春木孝祐, 西尾治, 久保英幸, 改田厚, 村上司, 綾田稔, 小倉壽. 市販生カキからのノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルスの検出. *生活衛生.* 49:279-287, 2005.

西尾治, 古屋由美子, 大瀬戸光明. ウイルス性食中毒の予防—ノロウイルス, A 型肝炎ウイルス—. *食品衛生研究.* 55(4):19-24, 2005.

西尾治, 山下育孝, 宇宿秀三. ノロウイルスによる食中毒, 感染症. *食品衛生研究.* 55(10):7-16, 2005.

西田知子, 岡本玲子, 中尾利器, 松村健道, 大瀬戸光明, 西尾治. 山口県内におけるノロウイルス胃腸炎集団発生事例および市販生食カキの汚染状況. 獣医公衆衛生研究. 7:24-25, 2005.

西尾治, 山下育孝, 宇宿秀三. ノロウイルスによる食中毒, 感染症. 食品衛生研究. 55(10):7-16, 2005.

田中俊光, 西尾治. 輸入生鮮魚介類からのノロウイルス遺伝子検出状況. 日本獣医公衆衛生学会誌. 58:627-630, 2005.

西尾治, 秋山美穂, 愛木智香子, 杉枝正明, 福田伸治, 西田知子, 植木洋, 入谷展弘, 篠原美千代, 木村博一. ノロウイルスによる食中毒について. 食品衛生学雑誌. 46:235-245, 2005.

2. 学会発表

西尾治: 食品を介するノロウイルスによる食中毒の現状と対策、第46回日本臨床ウイルス学会、福岡市、2005年6月3-4日

杉枝正明、愛木智香子、秋山美穂、西尾治: *Norovirus* による集団発生事例について、第46回日本臨床ウイルス学会、福岡市、2005年6月3-4日

杉枝正明、稲吉恵、足立聡、三輪好伸、増田高志、愛木智香子、秋山美穂、西尾治: *Norovirus* による集団発生事例について、平成17年度地方衛生研究所全国協議会 第20回関東甲信静支部ウイルス研究部会、前橋市、2005年9月29-30日

原俊吉、大石陽子、山上隆也、小澤茂、西尾治: 2004年度冬季に山梨県内の高齢者施設で発生したノロウイルス急性胃腸炎集団事例、平成17年度地方衛生研究所全国協議会 第20回関東甲信静支部ウイルス研究部会、前橋市、2005年9月29-30日

秋山美穂、愛木智香子、西尾治、山下育孝、大瀬戸光明、杉枝正明、古屋由美子、田中俊光、宇宿秀三: 輸入食品のノロウイルス汚染状況について、日本食品衛生学会第90回学術講演会、さいたま市、2005年10月20-21日

西尾治: ノロウイルスによる感染症、食中毒の現状と予防、平成17年度獣医公衆衛生講習会、山口市、2005年11月5日

山下育孝、豊嶋千俊、近藤玲子、大瀬戸光明、杉枝正明、古屋由美子、田中俊光、愛木智香子、秋山美穂、西尾治: 輸入生鮮魚介類及び急性胃腸炎患者から検出されたノロウイルス (NV) の分子疫学的解析、第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜市、2005年11月20-22日

西田知子、中尾利器、岩田祐之、秋山美穂、愛木智香子、西尾治: 山口県内で発生したノロウイルスによる胃腸炎、第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜市、2005年11月20-22日

秋山美穂、愛木智香子、杉枝正明、入谷展弘、吉澄志磨、西田知子、田中俊光、中込治、岡部信彦、西尾治: ノロウイルスの Mexico 株類似リコンビナント株の国内での検出状況、第53回日本ウイルス

学会学術集会、横浜市、2005年11月20-22日

愛木智香子、杉枝正明、山下育孝、福田伸治、吉澄志磨、西田知子、田中俊光、岩切章、田村務、大矢英紀、秋山美穂、岡部信彦、西尾治：欧米で流行しているG2/4変異型ノロウイルスの国内での検出状況、第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜市、2005年11月20-22日

松岡由美子、平野敬之、小河正雄、愛木智香子、秋山美穂、西尾治：熊本市、佐賀県、大分県で検出されたノロウイルス(NV)の分子疫学について、第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜市、2005年11月20-22日

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」
分担研究報告書

カキのノロウイルス定量検査の改良，標準化に関する研究
—混合カキ検体からのノロウイルス濃縮操作におけるアミラーゼ処理の有用性—

分担研究者 西尾 治(国立感染症研究所 感染症情報センター)
研究協力者 野田 衛(広島市衛生研究所 生物科学部)

研究要旨

カキ混合検体からのノロウイルス(NV)濃縮操作におけるアミラーゼ(AM)によるグリコーゲンの消化の有用性を，AM消化を行わない場合およびカキを個別別に検査する場合(個別法)と比較し検討した。AM消化は，ポリエチレングリコールによる沈殿操作時に，1混合検体当たり50mgの α AMを加え，室温にてスターラーで攪拌して一夜行い，他の工程はこれまで当所で実施しているカキ混合検体からの濃縮操作(混合法)に準じた(AM-混合法)。AM-混合法は他の2法と比較して，セカンドリアルタイムPCR法で高いNV検出率を示し，各濃縮法で得られたcDNA検体にG1陽性コントロールcDNAを添加してリアルタイムPCR法で定量した結果，検体のPCR阻害作用を受けにくく，添加量に近い定量値を示した。さらに， >0 コピー/系を陽性としたリアルタイムPCR法の結果とセカンドリアルタイムPCR法の結果の一致率はAM-混合法が最も高かった。以上の結果から，AM-混合法は混合法，個別法と比較し，検体のPCR阻害作用が少なく実際のコピー数に近い定量値が得られ，検出率も高い上，従来の操作とほぼ同じ手順で実施できることから，カキ混合検体からのNV濃縮法として有用と考えられた。

A. 研究目的

ノロウイルス(NV)による食中毒および食中毒様胃腸炎集団発生はカキを原因食品とする事例が多くを占めることから，本ウイルスによる食中毒の予防にはカキの対策が極めて重要であり，そのためには，カキからの迅速・簡便・確実なNV 検出・定量法の確立が前提となる。カキからのNV検出には現在 nestedPCR法(定性PCR法)による定性遺伝子検査およびリアルタイムPCR法(定

量PCR法)による定量的遺伝子検査が行われているが，定性PCR法と定量PCR法との検査結果の乖離，前処理法の違いによる定量値のバラツキ，インヒビターによる定量値の信頼性，定量PCR法における陽性(陰性)限界値の問題など幾つかの問題点が指摘されている。これらに加え，厚生労働省のNV検査指針でカキの個別別の検査が推奨されている一方，同一ロットのカキのNV定量値に個体差があることから個別別の検査で

は検出率が低くロットの安全性確保ができない場合があり、複数のカキを混合した検体からの簡便・確実な濃縮法の開発が望まれている。

一方、カキの検査には中腸腺の切り出しが行われるが、この操作はNVが含まれる中腸腺部分(黒色部分)のみを取り出す目的以外に、検体中に含まれるPCR阻害物質の混入を極力減らすために不要部分(白色部分)を物理的に取り除く目的を持っている。しかし、白色部分を完全に除去することは不可能であり、また、カキを混合した場合、その混入量が増加し定量PCR法による定量値への影響が多いと考えられている。この白色部分の主成分であるグリコーゲンは分子量100万～1000万の多糖類で、アミラーゼ(AM)によってオリゴ糖やデキストランに分解される。従って、AM消化により化学的にグリコーゲンを除去することで、濃縮検体の精製度が増加し、PCR阻害物質の混入が減少する可能性が考えられる。そこで今回我々はカキ混合検体からのNV濃縮操作におけるAMの有用性をAM処理を行わない場合およびカキを個別別に検査する場合と比較した。その結果、AM処理を行うと検出率が増加するとともに、検体のPCR阻害作用が減少し定量値の信頼性が増加することを認めたので報告する。

B. 研究方法

1. 供試カキ

カキ加工業者等から採取された原料用カキおよびNVの食中毒原因究明等のため搬入されたカキを検査材料とした。多くのカキ検体は保冷下で搬入され、直接検査に供した。一部のカキ検体は

-30℃以下に凍結保存されたものを用いた。

2. カキ中腸腺からのウイルスの濃縮

(1)アミラーゼ-混合法(AM-混合法)

1検体について10個体程度のカキから中腸腺部分(10g～25g程度)を切り出し、ストマッキングによりPBS(-)で10%乳剤にした後、10,000rpm, 30分, 4℃で遠心分離を行った。その遠心上清に1/4量の×5ポリエチレングルコール(PEG)溶液(40%PEG6000, 2.5M NaCl)と50mgの α -AM(和光純薬)を添加し、室温にて一夜スターラーで攪拌しPEGによる沈殿とAMによる消化を行った。その後、3,000rpm, 15分粗遠心分離を行った上清を40%ショ糖液3mlに重層し、27,000rpm, 3時間, 4℃で超遠心分離を行い、沈渣を少量の蒸留水に再浮遊した。

なお、混合法との比較実験では中腸腺10%乳剤の遠心分離後の上清を等量に2分し、個別法との比較実験では切り出した各中腸腺を等量に2分し、それぞれの試験に供した。

(2)混合法

AM-混合法のPEG沈殿操作において、AMの添加を行わず、4℃で一夜静置したことを除き、すべてAM-混合法と同じ操作で実施した。

(3)個別法

各カキから切り出した中腸腺の半分を個別別に検査した。1/2量の中腸腺が1gに満たない場合は2個体を混合し1検体とした。各中腸腺をPBS(-)10mlでストマッキングにより乳剤を作製し、10,000rpm, 30分, 4℃で遠心分離を行った。その遠心上清を40%ショ糖液3ml

に重層し、27,000rpm, 3時間, 4°Cで超遠心分離を行い、沈渣を少量の蒸留水に再浮遊した。

3. 濃縮材料からのウイルスRNA抽出とcDNA合成

濃縮材料からのウイルスRNA抽出・DNase処理は、100 μ lを抽出材料としSV total RNA Isolation System(Promega)を用いて行った。Lysis bufferは1 μ gのキャリアRNA(Qiagen)を添加したものを使用し、精製RNAは40 μ lの溶出液に回収した。逆転写反応は厚生労働省のNV検査指針に準じ、精製RNA液30 μ lをSuperscript II (GibcoBRL)を用いて、50 μ lの反応液量で42°C, 60分反応し、cDNAを合成した。プライマーはランダムヘキサマー(Amersham Pharmacia)とオリゴdT(Amersham Pharmacia)を用いた。

4. NV検出定量PCR法

NV検出定量PCR法はcDNA検体5 μ lを鋳型としてKageyamaらの方法によるリアルタイムPCR法でNV遺伝子1群(G1)およびNV遺伝子2群(G2)に属するウイルスをそれぞれ特異的に増幅し、検出・定量した。すなわち、G1はCOG1F/COG1Rのプライマー組と、RING1-TP(a), RING1-TP(b)のプロープ、G2はCOG2F/COG2Rのプライマー組とRING2AL-TPのプロープを用い、54°C, 15分の初期反応後、94°C, 30分, 56°C, 1分のシャトルPCR反応を45回繰り返した。定量値は原則として実測値(cDNA検体5 μ lに含まれるコピー数)で示した。

5. NV検出定性PCR法

(セカンドリアルタイムPCR法)

NV検出定性PCR法はnestedPCR法の2回目のPCR反応をリアルタイムPCR法で検出するセカンドリアルタイムPCR法で行った。すなわち、cDNA検体5 μ lを鋳型としてCOG1F/G1SKRあるいはCOG2F/G2SKRのプライマー組でExTaq®(宝酒造)を用いPCR反応(反応条件は、初期変性反応95°C, 5分, PCR反応95°C, 30秒, 50°C, 30秒, 72°C, 1分を35回, 最終伸長反応72°C, 10分)を行った後、それぞれのPCR産物1 μ lを鋳型DNAとして上述のリアルタイムPCR法を行い、G1, G2を特異的に検出した。

6. 陽性コントロールおよび陽性コントロール添加実験

G1あるいはG2のNV遺伝子挿入プラスミド(COG1F/G1SKRで増幅したG1株DNA断片あるいはCOG2F/G2SKRで増幅したG2株DNA断片をTAクローニング法により導入したもの)を持つ大腸菌から、プラスミドを抽出し、OD値からコピー数を算出後、DWで10倍階段希釈し、 10^8 コピー/5 μ l~ 10^0 コピー/5 μ lの標準DNAを得た(検量線はR=0.99以上)。定量PCR法には、 10^6 コピー/5 μ l, 10^4 コピー/5 μ l, 10^2 コピー/5 μ lの希釈標準DNAを逆転写反応液(逆転写酵素以外の試薬類を至適濃度含む緩衝液)で10倍希釈した 10^5 コピー/5 μ l, 10^3 コピー/5 μ l, 10^1 コピー/5 μ lのDNA希釈液をスタンダードとして使用した。

検体中のPCR阻害物質の影響を調べるために、AM-混合法, 混合法あるいは個別法で得たcDNA検体5 μ lにG1 PC DNA(100 コピー/5 μ l)1 μ lを加えたも

のを鋳型DNAとして定量PCR法を行った。PC添加時の定量値から未添加時の定量値(検体中のG1定量値)を引いた値を各cDNA検体における添加PCの定量値(コピー数)とした。また、逆転写反応液5 μ lに標準DNA1 μ lを加えたものを鋳型DNAとして定量PCRを行い、得られた定量値を実際の添加PCのコピー数とした。

C. 研究結果

1. AM-混合法と混合法の比較

47 検体について定性 PCR 法で NV 検出を行い(表 1), 検出率を比較した(表 3)。G1 検出率は AM-混合法 40.4% (19/47), 混合法 21.3% (10/47), G2 検出率は AM 混合法 51.1% (24/47), 混合法 38.3% (18/47)で, G1, G2 とも AM-混合法の検出率が高かった。

37 検体について定量 PCR 法で G1, G2 別の定量を行った(表 1)。定量値 0 コピー/反応系を超える値(>0)を示したものは, G1 が AM-混合法 16 検体, 混合法 12 検体, G2 が AM-混合法 26 検体, 混合法 23 検体であり, AM-混合法が>0 の定量値を示したものが多かった。また, >0 の定量値を示したものの平均値は G1 が AM-混合法 1.47, 混合法 1.38, G2 が AM-混合法 4.96, 混合法 3.39 で, G1, G2 とも AM-混合法の定量値が高かった。AM-混合法あるいは混合法の少なくとも一方が定性 PCR 法で陽性となったものについて定量値をみると, G1 (N=14) が AM-混合法 1.41, 混合法 1.05, G2 (N=21) が AM-混合法 5.91, 混合法 3.57 で, G1, G2 とも AM-混合法が高い定量値を示した(表 3)。

AM-混合法あるいは混合法で得られた cDNA 検体中の PCR 阻害効果を調べる

ために, 28 検体について G1 PC を添加し, その定量値を調べた(表 1)。PC の添加量は 16 コピー/反応系であった。PC 定量値の平均値 \pm 標準偏差, 最大値, 最小値は, AM-混合法では 8.97 ± 2.92 , 14.97, 4.37, 混合法では 7.69 ± 2.56 , 11.79, 2.60 で, AM-混合法で得た cDNA 検体は PCR 阻害作用が少なく, 実際の添加量に近い定量値を示した(表 3)。

2. AM-混合法と個別法の比較

10個を1プールとした6検体(60個体), 6個を1プールとした1検体(6個体), 計7検体(66個体)についてAM-混合法と個別法を比較した(表2)。なお, カキから超遠心分離で濃縮した検体を再浮遊した蒸留水の液量の違いから, AM-混合法の検体番号4は10倍, 検体番号5~7は5倍濃縮されているため, それぞれ得られた定量値を10あるいは5で除した値を定量値の平均値(1個体当たり)とした。

定性 PCR 法による検出率は(表 4), G1 が AM-混合法 71.4% (5/7), 個別法 14.3% (1/7), G2 が AM-混合法 100% (7/7), 個別法 28.6% (2/7)であり, G1, G2 とも AM-混合法の検出率が高かった。個別法において個体別の検出率をみると, G1 は 1.5% (1/66), G2 は 3.0% (2/66)で, 検出率は極めて低かった。

カキ 1 個体当たりの平均定量値(表 4)は, AM-混合法では G1 が 0.001~8.665, G2 が 0.111~24.68 であり, G1, G2 ともすべて>0 の定量値を示した。一方, 個別法の平均定量値は, G1 では 4 検体が 0, 他の 3 検体は 0.00506~0.035766, G2 では 1 検体が 0, 他の 6 検体が 0.0721~0.3275 であった。平均

定量値を比較すると、7 検体すべてで AM-混合法が高い値を示した。個別法の定量値を個体別にみると、63 個体は定量値 0 を示し、>0 の定量値を示した 3 個体の定量値はいずれも 1 以下であった。

cDNA 検体の PCR 阻害効果を比較するために、AM-混合法の 7 検体、個別法の 66 検体に G1 PC を添加 (16 コピー/反応系) し、G1 を定量した (表 1)。PC 定量値の平均値±標準偏差、最大値、最小値は、AM-混合法では 11.39±4.08, 15.96, 6.39, 個別法では 5.30±3.34, 14.76, 0.70 で、AM-混合法で得た cDNA 検体が PCR 阻害作用を受けにくく、実際の添加量に近い定量値を示した (表 4)。

3. 定性PCR法の結果と定量値の関連性

AM-混合法、混合法、個別法において定性PCR法の結果と定量PCR法での定量値の関連を調べた (表 5)。定量値 0 を陰性、>0 を陽性とした場合、定性PCR法と定量PCR法の結果の一致率 (両法で陰性あるいは両法で陽性になった検体数の全検体数の割合) は、AM-混合法 80.7%、混合法 71.6%、個別法 83.3%、全体では 79.6% であった。個別法は大半が陰性の結果であり、両法で陽性となった検体はなかった。

定量値を 0, >0~<1, 1~<10, 10~<100 に区分し、それぞれの定量値区分での両法での結果を比較した。定量値 0 での陰性一致率 (両法で陰性となった検体数の当該定量値区分の検体数に対する割合) は、AM-混合法 96.7%、混合法 89.7%、個別法 97.3%、全体で 95.6% であった。定量値 >0 について両法の陽

性一致率をみると、定量値 >0~<1 では AM-混合法 48.0%、混合法 38.9%、個別法 0%、全体で 33.9%、定量値 >1~<10 では AM-混合法 88.9%、混合法 64.3%、個別法 0%、全体で 70.2%、定量値 10~<100 では AM-混合法 100%、混合法 66.7%、全体で 88.9% であった。これらの結果から、定量PCR法と定性PCR法の結果は AM-混合法が最もよく一致した。また、定量値 >0 の場合、定量値が高くなるに従い両法の一致率が高くなること AM-混合法、混合法で認められたが、いずれの定量値区分においても、AM-混合法の一致率が高かった。

D. 考察

現在、厚生労働省の NV 検査指針には「貝 1 ロットに付き 3 検体から 10 検体 (中腸腺としての合計 12g から 24g 程度を目途とする。) の検査を行う。」と記載されている。3 個の検査と 10 個の検査ではコスト的また労力的に大きく異なり、実際には、3 個程度の個体についての検査が一般的であると推測される。カキを個体別に検査するのは、多くのカキ個体を混合して検査を行った場合、PCR 反応を阻害する物質の混入が増えることなどから検査結果の信頼性が下がることが最大の理由とされている。一方、同一ロットに含まれるカキには、その中に含まれる NV の有無およびその定量値に個体差があり、3 個程度の検査では検出率が低いことが指摘されている。そのため、10 個程度のカキを混合した検体のインヒビターの影響を受けない簡便な濃縮法の開発が望まれている。今回我々は、カキ混合検体の濃縮時に、カキの主成分であるグリコー

ゲンをAMによって消化する操作を導入し、その有用性をAM処理を行わない場合あるいは個別別に検査する場合と比較し検討した。その結果、AM-混合法は、他の2法と比較して、定性PCR法によるNV検出率が高く、定量PCR法でPCR阻害作用を受けにくく実際のコピー数に近い定量値を示し、定量PCR法と定性PCR法の結果の一致率が高かった。また、AM消化はPEG沈殿操作と同時に実施できることから、従来の混合法と比較してもほぼ同様の操作で実施可能であった。以上のことから、AM-混合法は混合したカキ検体からのNV濃縮に有用な方法であると考えられた。さらに、一部の検体に凍結保存されていたものを使用し冷蔵品と同様の結果が得られたことから、食中毒原因究明などの凍結保存品に対しても使用できると考えられる。

今回我々はNV検出に定量PCR法と通常のPCR産物を鋳型DNAとしてリアルタイムPCR法でnestedPCRを行うセカンダリアルタイムPCR法による定性PCR法を併用した。その結果、10コピー/系以下の定量値でも定性PCR法陽性となる例が多く認められ、特に定量値1~<10では70% (AM-混合法濃縮検体では約90%)が定性PCR法で陽性であった。また、定性PCR法と定量PCR法の一致率をみると、定量PCR法における定量値が低いほど両法の結果が一致せず、定量値が高くなるにつれ一致率が増加した。このことは、検体に含まれるコピー数が少なくなるにつれPCR反応液にNV cDNAが入る確率が減少することによる必然的な結果として理解することができる。さらに今回の結果からも示され

たようにカキから精製したcDNA検体にはPCR阻害物質が含まれ、定量PCR法で実際のコピー数より少なく定量されるため、実際には得られた定量値より多くのNVが含まれていると考えられる。以上のことから、定量PCR法で実測値>0~<10コピーの定量値の場合、実際にNVが含まれる可能性が極めて高いと考えられる。現在、厚生労働省の検査指針に基づくと定量PCR法は実測値10コピー以上を陽性とする記載されており、定量PCR法のみで検査した場合、実測値10コピー以下の低汚染量は陰性と判定されるため、検査法としての実用性が極めて低い。事実今回の食中毒事例の原因と推定されるカキと同一日に加工された2検体についても、実測値10コピー以下であり陰性と判断される汚染量であった。これらのことから、定量PCR法による陽性限界の見直しが早急に必要である。当面の対応策として、検査結果を(陽性、陰性と記載せず)定量値で示すことが有効であると考えられ、少なくとも実測値10コピー以下の場合「陰性」と表記するのではなく、「10コピー/系以下」と表記し必ずしもNV陰性でないことを示す必要がある。一方、定性PCR法陽性・定量PCR法陰性の検体より、定性PCR法陰性・定量PCR法陽性の検体が多い傾向にあった。この理由として、定性PCR法の1回目のPCRに使用しているG1SFR (G2SKR)プライマーのミスマッチにより増幅されない場合がある(偽陰性)の可能性のほか、定量PCR法が偽陽性を示した可能性も否定できず、今後詳細に検討する必要がある。

今回我々は、AM消化をPEG沈殿時に、室温で一夜、スターラーで攪拌するこ

とにより行った。これは、当所においては検体搬入が午後になることが多くPEG沈殿を一夜行っていたことから、検査の簡便化のためその工程に合わせたことによる。反応温度については、予備実験において37℃、室温、4℃で比較した結果、37℃の消化が最も効率的であったが、細菌の繁殖およびPEG沈殿によるウイルス濃縮に対する影響が不明であったことから室温での反応とした。短時間で行う場合は、37℃でのAM消化後、PEG沈殿を4℃で行うことが考えられるがその条件は改めて設定する必要がある。

E. 結論

カキ混合検体からのNV濃縮法としてAMによるグリコーゲンの消化を行うAM-混合法を開発した。この方法はAM処理を行わない場合および個別別検査と

比較して、NV検出率が高い上、検体中のPCR阻害物質の影響が少なく実際のコピー数に近い定量値が得られることから、カキ混合検体のNV濃縮法として有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

野田衛，藤井彰人，山本美和子，池田義文，松本勝，荻野武雄：平成16年度の胃腸炎集団発生のウイルス学的検査結果，広島市衛生研究所年報，24，33-38，2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 アミラーゼ-混合法と混合法の比較

検体番号	採取日	回収液量(μl)*1	G1								G2					
			混合法				アミラーゼ-混合法				混合法		アミラーゼ-混合法			
			2nd Real-Time PCR *2	定量値(A)*3	PC添加後の定量値(B)*4	PCの定量値(B-A)	2nd Real-Time PCR	定量値(A)	PC添加後の定量値(B)	PCの定量値(B-A)	2nd Real-Time PCR	定量値(A)	2nd Real-Time PCR	定量値(A)		
1	05.03.01	400	-	NT*5	NT			+	NT	NT			-	NT	+	NT
2	05.03.01	400	-	NT	NT			-	NT	NT			-	NT	-	NT
3	05.03.01	400	-	NT	NT			-	NT	NT			-	NT	-	NT
4	05.03.01	400	-	NT	NT			-	NT	NT			-	NT	-	NT
5	05.03.01	400	-	NT	NT			-	NT	NT			-	NT	-	NT
6	05.03.14	400	+	NT	NT			+	NT	NT			-	NT	+	NT
7	05.03.14	400	-	NT	NT			+	NT	NT			-	NT	+	NT
8	05.03.14	400	+	NT	NT			+	NT	NT			-	NT	+	NT
9	05.03.23	400	+	NT	NT			+	NT	NT			+	NT	+	NT
10	05.03.23	400	+	NT	NT			+	NT	NT			+	NT	+	NT
11	05.04.12	400	+	4.92	NT			+	3.44	NT			-	1.26	-	0.43
12	05.04.12	400	-	1.34	NT			-	1.84	NT			-	0.86	-	0.72
13	05.04.12	400	-	0	NT			-	0	NT			-	0	-	0
14	05.05.10	400	-	0	NT			+	0.3	NT			-	0	-	0
15	05.05.10	400	-	0	NT			-	0.97	NT			-	0	-	0
16	05.05.10	400	+	0	NT			-	0	NT			-	0	-	0
17	05.10.18	400	-	0	NT			-	0	NT			-	0.2	-	0
18	05.10.18	400	-	0	NT			-	0	NT			-	0	-	0
19	05.10.18	400	-	0	NT			-	0	NT			-	0	-	0
20	05.11.15	400	-	0	6.29	6.29		-	0	6.54	6.54		+	0.96	+	1.74
21	05.11.15	400	-	0	7.59	7.59		-	0	11.25	11.25		+	0	-	1.35
22	05.11.15	400	-	0	4.01	4.01		-	0	9.27	9.27		-	0.73	+	1.06
23	05.12.05	400	-	0	5.64	5.64		+	0	8.62	8.62		+	0.77	+	1.54
24	05.12.05	400	-	0	8.43	8.43		-	0	5.85	5.85		-	0	+	1.5
25	05.12.05	400	-	0	6.72	6.72		-	0	8.26	8.26		-	0	-	0.63
26	05.12.06	400	-	0	9.68	9.68		-	0	5.56	5.56		-	0.11	+	1.32
27	05.12.06	400	-	0	3.61	3.61		-	0	4.37	4.37		-	0	-	0
28	05.12.06	400	-	0	5.85	5.85		-	0	11.13	11.13		+	0.24	+	0.44
29	05.12.19	400	-	0	5.2	5.2		-	0	11.81	11.81		+	1.62	+	2.68
30	05.12.19	400	-	0	7.2	7.2		-	0	6.7	6.7		-	0	-	0
31	06.01.11	400	-	0.866	12.11	11.244		+	0.593	14.22	13.627		-	2.27	+	5.26
32	06.01.11	400	-	1.43	10.41	8.98		+	2.93	10.56	7.63		+	3.3	+	9.72
33	06.01.11	400	-	0.222	11.22	10.998		-	0	9	9		+	0	-	0.26
34	06.01.17	400	+	0.686	11.38	10.694		+	0.73	11.15	10.42		+	21.95	+	17.53
35	06.01.17	400	-	2.34	12.67	10.33		+	5.16	20.13	14.97		+	19.54	+	34.94
36	06.01.17	400	-	0.653	10.1	9.447		+	1.34	13.9	12.56		-	10.01	+	22.23
37*6	06.01.18	400	-	0	4.98	4.98		+	1.16	8.55	7.39		+	2.26	+	5.7
38*6	06.01.19	400	-	0.734	9.08	8.346		+	1.8	11.23	9.43		+	2.65	+	13.57
39	06.01.24	400	-	0	8.29	8.29		+	0.608	10.02	9.412		+	3.27	-	0.509
40	06.01.24	400	-	0	5.88	5.88		-	0	9.69	9.69		-	0.486	+	0.636
41	06.01.24	400	+	0.44	8.28	7.84		+	0.492	8.18	7.688		+	1.63	+	1.78
42	06.01.31	400	-	0	10.89	10.89		-	0	14.24	14.24		+	0.412	-	0.29
43	06.01.31	400	+	2.64	14.43	11.79		-	1.06	5.6	4.54		+	2.64	+	1.06
44	06.01.31	400	-	0	10.75	10.75		-	0	11.44	11.44		-	0	-	0.553
45	06.02.14	400	+	0	4.95	4.95		+	0.148	4.61	4.462		-	0.677	-	0.994
46	06.02.14	400	-	0	7.11	7.11		-	0	8.73	8.73		-	0	-	0.217
47	06.02.14	400	-	0.286	2.89	2.604		-	0.893	7.58	6.687		+	0.2	+	0.296

*1: 超遠心分離により濃縮したカキ材料を再浮遊した蒸留水の液量。

*2: COG1F/G1SKR(COG2F/G2SKR)で増幅したPCR産物をCOG1F/COG1R(COG2F/COG2R)でリアルタイムPCR増幅した結果。-は陰性、+は陽性を示す。

*3: 実測値を示す。

*4: 検体5μlに陽性コントロール(PC)16コピー/μlを1μl添加してリアルタイムPCRで定量した結果。

*5: 検査せず。

*6: 食中毒事例の原因カキと同一日に加工されたカキ(凍結保存品)。採取日は加工日を示す。

表2 アミラーゼ-混合法と個別法の比較

検体番号	回収液量 (ul) *1	2nd Real-Time PCR *2	G1			G2		備考	
			定量値 (A)*3	PC添加後の定量値(B)*4	PCの定量値 (B-A)	2nd Real-Time PCR	定量値		
1	1-AM混合*5	1000	+	1.85	17.51	15.66	+	9.13	凍結保存品
	1-1	100	-	0	1.42	1.42	-	0	
	1-2	100	-	0	1.36	1.36	-	0.721	
	1-3	100	-	0	1.97	1.97	-	0	
	1-4	100	-	0	3.88	3.88	-	0	
	1-5	100	-	0	3.26	3.26	-	0	
	1-6	100	-	0	0.949	0.949	-	0	
	1-7	100	-	0	1.45	1.45	-	0	
	1-8	100	-	0	2.1	2.1	-	0	
	1-9	100	-	0	2.76	2.76	-	0	
	1-10	100	-	0	1.83	1.83	-	0	
個別法の平均値				0	2.0979	2.0979		0.0721	
2	2-AM混合	1000	+	6.18	20.99	14.81	+	16.66	凍結保存品
	2-1	100	-	0	2.87	2.87	-	0	
	2-2	100	-	0	1.36	1.36	-	0	
	2-3	100	-	0	1.49	1.49	-	0	
	2-4	100	-	0	3.31	3.31	-	0	
	2-5	100	-	0	3.13	3.13	-	0	
	2-6	100	-	0	6.04	6.04	+	0	
	2-7	100	-	0	8.86	8.86	-	1.04	
	2-8	100	-	0	1.87	1.87	-	0	
	2-9	100	-	0	4.07	4.07	-	1.32	
	2-10	100	-	0.357	4.58	4.223	-	0.915	
個別法の平均値				0.0357	3.758	3.722		0.3275	
3	3-AM混合	1000	+	8.665	19.955	11.29	+	24.68	凍結保存品
	3-1	100	-	0	9.43	9.43	-	0	
	3-2	100	-	0	7.11	7.11	-	0	
	3-3	100	-	0.0506	7.91	7.8594	-	1.03	
	3-4	100	-	0	4.21	4.21	-	0	
	3-5	100	-	0	12.79	12.79	-	0	
	3-6	100	-	0	5.48	5.48	-	0.206	
	3-7	100	-	0	11.42	11.42	-	1	
	3-8	100	-	0	1.32	1.32	-	0.604	
	3-9	100	-	0	13.68	13.68	-	0	
	3-10	100	-	0	1.64	1.64	-	0	
個別法の平均値				0.00506	7.499	7.494		0.284	
4	4-AM混合	200	+	0.587(0.098)	9.6	9.013	+	7.48(1.25)	06.01.31 採取
	4-1	200	-	0	4.09	4.09	-	0	
	4-2	200	-	0	7.85	7.85	-	0	
	4-3	200	-	0	5.95	5.95	-	0	
	4-4	200	-	0	5.35	5.35	-	0	
	4-5	200	+	0	5.63	5.63	-	0	
	4-6	200	-	0.165	1.3	1.135	-	0	
個別法の平均値				0.0275	5.028	5.001		0	
5	5-AM混合	400	+	0.202(0.040)	6.8	6.598	+	3.69(0.738)	06.02.09 採取
	5-1	200	-	0	5.16	5.16	-	1.75	
	5-2	200	-	0	2.36	2.36	-	0.395	
	5-3	200	-	0	5.09	5.09	-	0	
	5-4	200	-	0	7.18	7.18	-	0.351	
	5-5	200	-	0	1.44	1.44	-	0	
	5-6	200	-	0	0.568	0.568	-	0	
	5-7	200	-	0	2.09	2.09	-	0	
	5-8	200	-	0	7.66	7.66	-	0	
	5-9	200	-	0	8.26	8.26	-	0.113	
	5-10	200	-	0	8.92	8.92	-	0	
個別法の平均値				0	4.873	4.873		0.2609	
6	6-AM混合	400	-	0.00438(0.001)	6.39	6.38562	+	0.555(0.111)	06.02.09 採取
	6-1	200	-	0	6.22	6.22	-	0.222	
	6-2	200	-	0	6.49	6.49	-	0	
	6-3	200	-	0	7.49	7.49	-	0	
	6-4	200	-	0	4.35	4.35	-	0.865	
	6-5	200	-	0	14.76	14.76	-	0	
	6-6	200	-	0	9.25	9.25	-	0	
	6-7	200	-	0	6.68	6.68	-	0	
	6-8	200	-	0	10.5	10.5	-	0	
	6-9	200	-	0	6.51	6.51	-	0	
	6-10	200	-	0	7.43	7.43	-	0.447	
個別法の平均値				0	7.968	7.968		0.1534	
7	7-AM混合	400	-	0.21(0.042)	16.17	15.96	+	1.35(0.27)	06.02.09 採取
	7-1	200	-	0	6.08	6.08	+	0	
	7-2	200	-	0	6.68	6.68	-	0	
	7-3	200	-	0	6.39	6.39	-	0	
	7-4	200	-	0	5.61	5.61	-	0	
	7-5	200	-	0	4.26	4.26	-	0	
	7-6	200	-	0	3.6	3.6	-	0	
	7-7	200	-	0	9.86	9.86	-	0	
	7-8	200	-	0	7.49	7.49	-	0	
	7-9	200	-	0	0.699	0.699	-	0	
	7-10	200	-	0	7.41	7.41	-	1.07	
個別法の平均値				0	5.808	5.808		0.107	

*1: 超遠心分離により濃縮したカキ材料を再浮遊した蒸留水の液量。

*2: COG1F/G1SKR(COG2F/G2SKR)で増幅したPCR産物をCOG1F/COG1R(COG2F/COG2R)でリアルタイムPCR増幅した結果。-は陰性、+は陽性を示す。

*3: 実測値を示す。()内は個別法の1反応系当たりの実測値に相当する値。

*4: 検体5μlに陽性コントロール16コピー/μlを1μl添加してリアルタイムPCRで定量した結果。

*5: AM混合はアミラーゼ-混合法、1-1~7-10は個別法を示す。