

後述のように、検査法に問題が認められたことから、その原因追究等を実施した後、再試験の実施協力が得られた 8 地研において、再試験を実施した。再試験は、本試験で得た RNA を用いて、新たに指示した方法に従い、逆転写反応およびリアルタイム PCR, nested PCR, nested リアルタイム PCR を実施した。nested PCR の判定はアガロースゲル電気泳動による増幅 DNA の有無の確認のみで実施した。

C. 研究結果

1. 検体の保存状態

送付した検体は、すべて良好な状態で、輸送中の温度上昇も認められなかった。

2. 検査結果

(1) 結果の概要

11 機関における検査結果の概要を表 1 に示した。またその詳細および各検査機関での検査の概要について資料 1 に取りまとめた。高濃度汚染検体(3 検体)については nested PCR では全機関ですべて陽性(33/33), nested リアルタイム PCR では、1 機関で 3 検体ともに陰性であった以外、10 機関ですべて陽性(30/33)であった。一方、リアルタイム PCR では、実測値 10 以上を陽性とした場合、3 検体とも陽性は 4 機関、3 検体とも陰性は 5 機関、2 機関は 1 検体または 2 検体が陽性であった。実測値で 0 を超える値が得られたものを陽性とした場合、3 検体とも陽性は 8 機関、3 検体とも陰性は 2 機関、1 機関は 1 検体のみ陽性であった。以上のように、高濃度汚染検体では、nested PCR および nested リアルタイム PCR では概ね良好な結果であったが、リアルタイム PCR では、陰性

となる場合が少なくなかった。

低濃度汚染検体では、nested PCR で 3 検体とも陽性は 2 機関、3 検体とも陰性は 3 機関、1 検体または 2 検体が陽性は 6 機関であった。nested リアルタイム PCR では 3 検体とも陽性は 1 機関、3 検体とも陰性は 2 機関、1 検体または 2 検体が陽性は 8 機関であった。リアルタイム PCR では、実測値 10 以上を陽性とした場合、陽性となった機関はなく、実測値で 0 を超える値が得られたものを陽性とした場合は 1 機関で 3 検体が陽性となった以外、他の 10 機関はすべて陰性であった。以上のように、低濃度汚染検体では、nested PCR および nested リアルタイム PCR での検出率は全体で約 40%程度であったが、リアルタイム PCR での検出率は極めて低かった。

陰性の 3 検体を陽性と判定した機関はなかった。

PCR 増幅産物のシーケンス解析は 36 検体について行われた。N となった 7 塩基を除き、全株について比較可能であった 188 ベースの塩基配列はすべて一致し、遺伝子型 GII/4 と正しく同定された。

(2) 検査機関におけるデータのバラつき

各検査機関における定量値のバラつきを把握するために、高濃度汚染検体の CT 値、実測値、回収量および各機関に配布した基準 DNA について、算術平均および幾何平均で平均値、標準偏差、CV 値、最大値および最小値をまとめた(表 2)。高濃度汚染検体の回収量についてみると、平均値 5,771、標準偏差 6,144(CV1.06)、最大値 17,120、最小値 1.35 で、大きなバラ

つきがみられた。また、基準 DNA においても、実測値 108,053、標準偏差 121,029(CV1.12)、最大値 361,000、最小値 10,619 と大きなバラつきがみられた。

さらに、各機関で使用している検量線作成のための標準 DNA の CT 値(図 1)においても、最も立ち上がり早い機関と遅い機関の CT 値には約 9 程度の違いが認められた。

(3) 問題点の検討

1) PCR マスターミックスの検討

結果の概要で述べたように、特にリアルタイム PCR による検出率が低かったことから、リアルタイム PCR に使用する PCR マスターミックスについて、現在一般的に使用されている Taqman® Universal PCR Master Mix (life technologies)、同社から市販され食品や環境検体用に改良された TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 および EagleTaq Master Mix with ROX (Roche) について比較した(表 3)。国立衛研でコラボ用検体から抽出した RNA および今回コラボスダディにおいて最も良好の結果であった A 機関で抽出した RNA について各マスターミックスを用いて定量した結果、EagleTaq Master Mix with ROX (Roche) を用いた場合の定量値が最も高く、A 機関で実施した定量値に近い値を示した。なお、A 機関においてはキャピラリー型の PCR 装置を使用し、マスターミックス液は LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS HybProbe を使用していた。

2) 逆転写反応

F 機関においては、nested PCR では高濃度汚染 3 検体および低濃度汚染 3 検体がすべて陽性であった(表 1)が、リアルタ

イム PCR および nested リアルタイム PCR ではすべて陰性であった。そのため、F 機関では厚生労働省から通知されているノロウイルスの検出法に準じた逆転写反応(DNase 処理は省いた)で合成した cDNA でリアルタイム PCR を再試験した結果、高濃度汚染検体は 3 検体すべて、低濃度汚染検体では 3 検中 2 検体が陽性となり、ほぼ満足できる結果になった(表 4)。

(4) 検討結果等を受けての再試験

以上の検討から、リアルタイム PCR に使用するマスターミックス液および逆転写反応が結果(特に、リアルタイム PCR)に影響を及ぼす可能性があることが示唆されたことから、各機関で抽出して保存されていた RNA について、再試験を依頼した。再試験では、DNase 処理は行わず、通知法に準じた逆転写反応で cDNA を合成後、リアルタイム PCR、nested リアルタイム PCR、nested PCR を実施した。リアルタイム PCR および nested リアルタイム PCR はマスターミックス液として、EagleTaq Master Mix with ROX (Roche) を用いた。

8 機関で再試験が行われた結果、高濃度汚染検体では、いずれの方法でも 3 検体とも陽性となり、低濃度汚染検体では nested PCR および nested リアルタイム PCR で 5 機関で 3 検体とも陽性となる、リアルタイム PCR で 0 を超える場合を陽性とした場合 4 機関で 3 検体とも陽性となるなど、8 機関中 6 機関で本試験と比較して結果の改善が認められた(表 5)。

D. 考察

今回、一般食品からのウイルス検出法

として開発されたパンソルビントラップ法について多機関評価試験を実施した。その結果、本法の開発を行った A 機関においては高濃度汚染検体および低濃度汚染検体とも汚染検体はすべて陽性となったが、それ以外の検査機関の結果は必ずしも満足できるものではなかった。特に、リアルタイム PCR の結果は、高濃度汚染検体で 3 検体とも実測値 10 以上となった機関は 4 機関に過ぎなかった。この原因を把握するために、リアルタイム PCR に使用するマスターミックス液について検討した結果、供試したものの中では EagleTaq Master Mix with ROX (Roche) が優れていることが判明した。また、F 機関では、nested PCR では高濃度汚染 3 検体および低濃度汚染 3 検体のすべてが陽性であったにも関わらずリアルタイム PCR ではすべて陰性であったことから、DNase 処理を省いた厚生労働省から通知されているノロウイルスの検出法に準じた方法で得た cDNA を用いて再検査を実施した。その結果、リアルタイム PCR で多くが陽性となり、大幅な改善が認められた。以上の結果を踏まえ、逆転写反応およびリアルタイム PCR に使用する試薬に変更を加え、8 機関で再試験を実施した結果、6 機関で検査結果の改善が認められた。これらのことから、パンソルビントラップ法で得た RNA は、逆転写反応およびリアルタイム PCR に使用する試薬等に大きく影響を受けことが示された。

一方、逆転写反応およびリアルタイム PCR に使用する試薬の、結果に及ぼす影響の割合等は現時点で不明であり、また、これら以外にも検査結果の改善をもたら

す要因が存在する可能性もある。A 機関においては検査法の開発当初から現在に至るまで、一貫して同じキャピラリー型のリアルタイム PCR 装置(およびその装置用の試薬類)を使用している。しかし、他の検査機関ではそれとは異なるプレート型の装置を使用しており、このことも結果が異なった要因となっている可能性がある。そのため、本法を各検査機関で食品からの検出に応用する場合は、各検査機関で使用している装置や試薬類を用いて検出感度等を確認し、必要に応じて使用する試薬類の変更も考えなければならない。

F 機関の検討結果を受け、再試験は DNase 処理を省略した形で実施した。以前から、通知法に準じた DNase 処理を行うと検出感度が低下することが明らかとなっている。一方、DNase 処理は、食品由来の DNA や DNase 処理以前に汚染した DNA の分解に加え、本法では大量のブドウ球菌由来 DNA を分解し、非特異的増幅反応を抑制する役割も担っている。しかし、逆転写反応に逆転写専用のプライマーを使用することで、非特異的な増幅は大幅に軽減しており、事実、増幅 DNA の電気泳動像をみても、DNase 処理を行わなくても非特異的な増幅がほとんどみられない検査機関も少なくなかった(資料 1 参照)。一方で、非特異的増幅が増えている機関もみられた。そのため、DNase 処理を省略する場合は、シーケンス検査により増幅 DNA が目的とするウイルス由来であることを確認するとともに、非特異的増幅を軽減するため、ホットスタートやアニーリング温度を徐々に下げて PCR 反応を

行うタッチダウン PCR 等の導入が望ましいと考えられた。

増幅 DNA の塩基配列を 36 検体について決定した結果、解読結果が N(塩基配列未決定)となった部位を除き、配列は 100% 一致した。このことから、ダイレクトシークエンス法においては DNA 増幅中の読み間違いはほとんど問題にならないものと考えられた。

今回、リアルタイム PCR で得られる定量値のバラつきを把握することを目的として高濃度汚染検体での CT 値、実測値、回収率および基準 DNA の CT 値、実測値を比較した結果、機関間で大きなバラつきがみられた。特に、基準 DNA の定量値自体にも機関間で大きなバラつきがあったことは、検査の精度管理上大きな問題である。今後、食品のウイルス検査の信頼性を確保するために各検査機関での精度管理を強化するとともに、外部精度管理体制の確立が早急に求められると考えられた。また、汚染食品としては、①実際の食中毒事例がある(扱う時に手で触れる)、②保存性が高い、③均一な食品検体を作りやすい、④食品の 3 大栄養素等が含まれる(100gあたりの含有量:タンパク質 35.3g, 脂質 19.9g, 炭水化物 37.6g, Na 16mg, Ca 190mg, 程度)、⑤濃縮材料に阻害作用がある、などの理由から、市販のきな粉を検体とした。今後精度管理を行う場合に使用する食品についても、検討が必要である。

E. 結論

ノロウイルス GII/4 を汚染させたきな粉を汚染食品として 11 機関による評価試

験を実施した。

検査法の開発を行った機関を除き、他の機関の検査結果は必ずしも満足できる結果ではなく、特にリアルタイム PCR 法の結果に問題があった。

逆転写反応の方法およびリアルタイム PCR に使用するマスターミックス液を変更することにより、検査結果の改善が認められた。

本法を各検査機関で導入するためには、各機関での検出感度の確認等が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 口頭発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

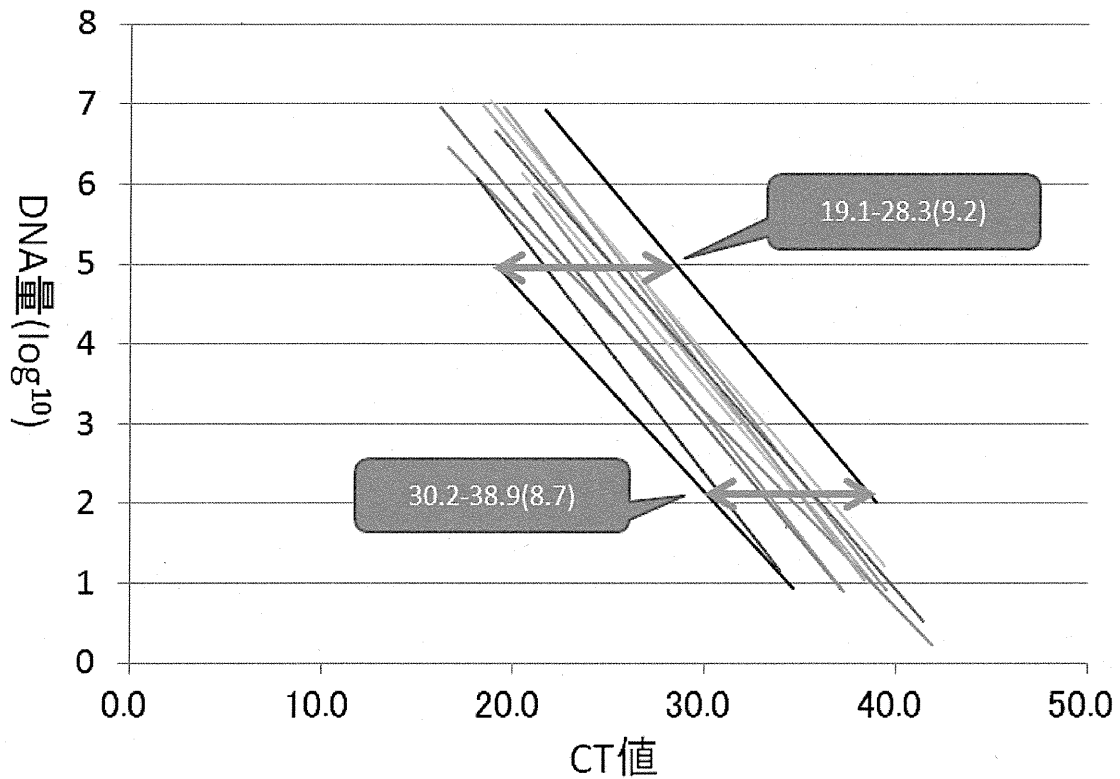
表 1 検査結果(本試験)

検体	検査方法()内は陽性基準	機関別陽性数											陽性数	陽性率(%)
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K		
高濃度 汚染検体 (N=3)	リアルタイム PCR (0<)	3	3	0	3	3	0	1	3	3	3	3	25	76%
	リアルタイム PCR(10≤)	3	0	0	3	0	0	1	0	2	3	3	15	45%
	nested リアルタイム PCR	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3	30	91%
	nested PCR	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	33	100%
低濃度 汚染検体 (N=3)	リアルタイム PCR (0<)	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	9%
	リアルタイム PCR(10≤)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
	nested リアルタイム PCR	3	2	2	1	1	0	2	1	1	0	1	14	42%
	nested PCR	3	2	0	1	1	3	2	1	1	0	0	14	42%
陰性(N=3)	すべての検査法*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%

*: リアルタイム PCR (0<), nested リアルタイム PCR, nested PCR

表 2 検査機関ごとの定量値のバラつき

検体	指標	平均値	標準偏差	変動係数	最大値	最小値
高濃度汚染検体	CT 値	36.75	3.97	0.11	42.09	28.66
	CT 値(log)	1.56	0.05	0.03	1.62	1.46
	実測値	144.65	163.86	1.13	399.00	0.04
	実測値(log)	1.34	1.34	1.00	2.60	-1.39
	回収量	5771.54	6144.16	1.06	17119.69	1.35
	回収量(log)	2.97	1.36	0.46	4.15	0.12
基準 DNA	CT 値	25.25	2.21	0.09	28.70	21.77
	CT 値(log)	1.40	0.04	0.03	1.46	1.34
	実測値	108052.59	121029.43	1.12	361000.00	10618.50
	実測値(log)	4.77	0.51	0.11	5.56	4.03



グラフは各検査機関における標準 cDNA の検量線を示した。数値は実測値 10^2 および 10^5 の cDNA の CT 値の最も低い値と高い値、およびその差を示した。

図 1 各検査機関における標準 DNA の検量線

表 3 3 種類のマスターミックスによるリアルタイム PCR による定量結果

検体	国立衛研の事前結果	国立衛研抽出 RNA (2 μ l)			A 機関抽出 RNA (2 μ l)			A 機関のラボ結果
		U-MM*1	E-MM*2	E-MM*3	U-MM	E-MM	E-MM	
きな粉-6(高)*4	15.6	1.2	5.5	91	1.4	19	277.5	376.3
きな粉-8(高)	15.6	1.2	4.3	117	0.1	21.5	229	310.7
きな粉-4(低)	-	-	-	-	-	0.1	4.5	7.5
きな粉-7(低)	-	-	-	2.3	0.007	0.1	2.1	4.2
高濃度液 [AVL 溶解済]	328.4	120.1	68.3	2128.7	107.7	238.9	2230	1267
低濃度液 [AVL 溶解済]	2.9	0.9	1.3	15.6	0.5	1.9	24	28.1

*1:Taqman® Universal PCR Master Mix

*2:TaqMan® Environmental Master Mix 2.0

*3:EagleTaq Master Mix with ROX

*4:()内は汚染量(-:汚染なし, 高:高濃度汚染, 低:低濃度汚染)

表 4 F 機関における検査結果

検体	コラボ本試験の結果		通知法による再試験 (DNase 処理なし)
	nested PCR	リアルタイム PCR 定量値	
きな粉-1(-)*	-	0	0
きな粉-2(高)	+	0	197
きな粉-3(低)	+	0	2
きな粉-4(低)	+	0	0
きな粉-5(-)	-	0	0
きな粉-6(高)	+	0	124
きな粉-7(低)	+	0	2
きな粉-8(高)	+	0	122
きな粉-9(-)	-	0	0
高濃度ウイルス液	+	27	9605
高濃度ウイルス液[AVL 溶解済]	+	0	8250
低濃度ウイルス液	+	4	124
低濃度ウイルス液[AVL 溶解済]	+	0	60
cDNA (10 ⁵ /5ul)	+	125500	ND

*: ()内は汚染量(-:汚染なし, 高:高濃度汚染, 低:低濃度汚染)

表 5 検査結果(再試験)

検体	検査方法 ()内は陽性基準	機関別陽性数								陽性数	陽性率 (%)
		B	C	D	E	G	H	J	K		
高濃度汚染 (N=3)	リアルタイム PCR (0<)	3	3	3	3	3	3	3	3	24	100%
	リアルタイム PCR (10≤)	3	3	3	3	3	3	3	3	24	100%
	nested リアルタイム PCR	3	3	3	3	3	3	3	3	24	100%
	nested PCR	3	3	3	3	3	3	3	3	24	100%
低濃度汚染 (N=3)	リアルタイム PCR (0<)	0	0	0	3	3	3	0	3	12	50%
	リアルタイム PCR (10≤)	0	0	0	0	3	0	0	1	4	17%
	nested リアルタイム PCR	0	3	1	2	3	3	3	3	18	75%
	nested PCR	0	3	1	2	3	3	3	3	18	75%
陰性 (N=3)	すべての検査法*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%

*: リアルタイム PCR (0<), nested リアルタイム PCR, nested PCR

資料 1

表1 検査結果一覧

区分	No	汚染	検体	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
リアルタイム PCR:CT値	1	-	きな粉-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	高	きな粉-2	29.1	38.8	-	37.9	39.9	-	33.4	42.4	37.5	34.6	38.8
	3	低	きな粉-3	36.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	低	きな粉-4	34.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	きな粉-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	高	きな粉-6	28.3	39.2	-	35.1	40.0	-	-	42.2	39.0	36.2	38.4
	7	低	きな粉-7	35.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	高	きな粉-8	28.6	39.1	-	36.1	38.2	-	-	41.7	38.8	34.7	37.8
	9	-	きな粉-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10		高濃度ウイルス液	26.8	34.7	-	32.4	39.5	35.8	27.9	35.0	37.6	31.7	34.9
	11		高濃度ウイルス液(AVL)	26.3	34.1	-	32.9	38.5	-	27.8	34.1	35.8	30.3	35.1
	12		低濃度ウイルス液	32.4	43.6	-	38.5	-	38.1	41.7	45.2	45.3	33.6	41.5
	13		低濃度ウイルス液(AVL)	32.4	42.3	-	38.1	41.7	-	-	44.2	45.8	36.6	40.4
	14		cDNA(10 ⁵ /5ul)	21.8	28.7	24.0	25.8	26.5	22.3	25.1	23.1	26.4	27.4	26.7
リアルタイム PCR:実測値	1	-	きな粉-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	高	きな粉-2	283.5	5.7	-	18.9	1.0	-	399.0	0.0	23.1	546.5	118.4
	3	低	きな粉-3	2.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	低	きな粉-4	7.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	きな粉-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	高	きな粉-6	376.3	4.5	-	121.6	1.0	-	-	0.0	9.1	116.0	145.4
	7	低	きな粉-7	4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	高	きな粉-8	310.7	4.6	-	61.4	3.7	-	-	0.1	10.9	325.1	221.0
	9	-	きな粉-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10		高濃度ウイルス液	906.5	128.6	-	762.2	1.4	27.1	20548.0	6.1	21.9	2529.5	1466.7
	11		高濃度ウイルス液(AVL)	1267.0	186.7	-	547.2	3.0	0.0	22782.5	11.8	74.0	6871.2	1287.1
	12		低濃度ウイルス液	27.9	0.2	-	6.2	-	4.2	0.8	0.0050	0.1	758.5	20.1
	13		低濃度ウイルス液(AVL)	28.1	0.4	-	15.8	0.3	-	-	0.010	0.1	85.5	41.4
	14		cDNA(10 ⁵ /5ul)	19160.0	10618.5	361000.0	66716.1	15938.8	125500.0	161572.0	33200.0	40804.6	50347.5	303720.9

表1のつづき

区分	No	汚染	検体	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
リアルタイム PCR:回収量	1	-	きな粉-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	高	きな粉-2	7371.0	148.2	-	1226.2	53.1	-	10374.0	1.1	1504.3	28418.3	7695.6
	3	低	きな粉-3	71.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	低	きな粉-4	194.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	きな粉-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	高	きな粉-6	9782.5	115.7	-	7906.3	52.0	-	-	1.1	589.2	6034.1	9448.6
	7	低	きな粉-7	108.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	高	きな粉-8	8076.9	119.6	-	3990.5	191.3	-	-	1.8	707.5	16906.6	14368.0
	9	-	きな粉-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10		高濃度ウイルス液	23569.0	3343.6	-	49543.6	72.5	705.3	534248.0	-	1423.6	131533.0	95336.1
	11		高濃度ウイルス液(AVL)	32942.0	4854.2	-	35570.7	154.5	-	592345.0	-	4810.6	357303.3	83662.3
	12		低濃度ウイルス液	724.2	3.9	-	406.1	-	110.0	21.8	-	4.2	39440.4	1309.2
	13		低濃度ウイルス液(AVL)	730.1	10.4	-	1027.6	15.1	-	-	-	7.0	4443.6	2690.4
nestedリアル タイム	1	-	きな粉-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	高	きな粉-2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	3	低	きな粉-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	低	きな粉-4	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
	5	-	きな粉-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	高	きな粉-6	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	7	低	きな粉-7	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
	8	高	きな粉-8	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	9	-	きな粉-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10		高濃度ウイルス液	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	11		高濃度ウイルス液(AVL)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	12		低濃度ウイルス液	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	13		低濃度ウイルス液(AVL)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	14		cDNA(10 ⁵ /5ul)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		高濃度陽性率	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
		低濃度陽性率	3/3	2/3	2/3	1/3	1/3	0/3	2/3	1/3	1/3	0/3	1/3	

表1のつづき

区分	No	汚染	検体	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Semi-nested PCR	1	-	きな粉-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	高	きな粉-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	低	きな粉-3	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	4	低	きな粉-4	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	5	-	きな粉-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	高	きな粉-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	低	きな粉-7	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
	8	高	きな粉-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9	-	きな粉-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10		高濃度ウイルス液	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	11		高濃度ウイルス液(AVL)	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+
	12		低濃度ウイルス液	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	13		低濃度ウイルス液(AVL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	14		cDNA(10 ⁵ /5ul)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		高濃度陽性率	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	
		低濃度陽性率	3/3	2/3	0/3	1/3	1/3	3/3	2/3	1/3	1/3	0/3	0/3	
シーケンス	1	-	きな粉-1											
	2	高	きな粉-2	GII.4		GII.4	GII.4	GII.4			GII.4	GII.4	GII.4	GII.4
	3	低	きな粉-3	GII.4	GII.4				GII.4					
	4	低	きな粉-4	GII.4			GII.4	GII.4	GII.4	GII.4				
	5	-	きな粉-5											
	6	高	きな粉-6			GII.4	GII.4	GII.4			GII.4	GII.4		GII.4
	7	低	きな粉-7	GII.4	GII.4		GII.4			GII.4		GII.4		
	8	高	きな粉-8			GII.4		GII.4			GII.4	GII.4		GII.4
	9	-	きな粉-9											
各検査機関保有			陰性対照	-	0.0	-	-	0.0	0.0	-		0.0		-
			標準DNA(10 ¹)	34.6	39.5	39.4	39.0	37.2	41.9	38.3	33.9	41.4		-
			標準DNA(10 ²)	30.2	35.9	37.4	35.4	33.5	31.8	35.5	31.4	35.1	34.6	38.9
			標準DNA(10 ³)	26.6	32.5	33.0	31.8	30.4	28.2	32.0	28.3	31.2	31.8	35.7
			標準DNA(10 ⁴)	22.9	28.9	29.6	28.5	27.0	25.0	29.4	24.8	27.7	28.7	31.9
			標準DNA(10 ⁵)	19.1	26.6	26.1	25.0	23.6	22.4	24.7	21.5	24.2	24.8	28.3
			標準DNA(10 ⁶)	NT	NT	22.4	21.9	21.0	19.8	23.1	18.1	22.3	20.4	24.6
		標準DNA(10 ⁷)	NT	NT	18.8	18.4	NT	16.6	19.5	NT	19.0	NT	21.6	

図1 nested PCRによる電気泳動の結果

本試験

再試験

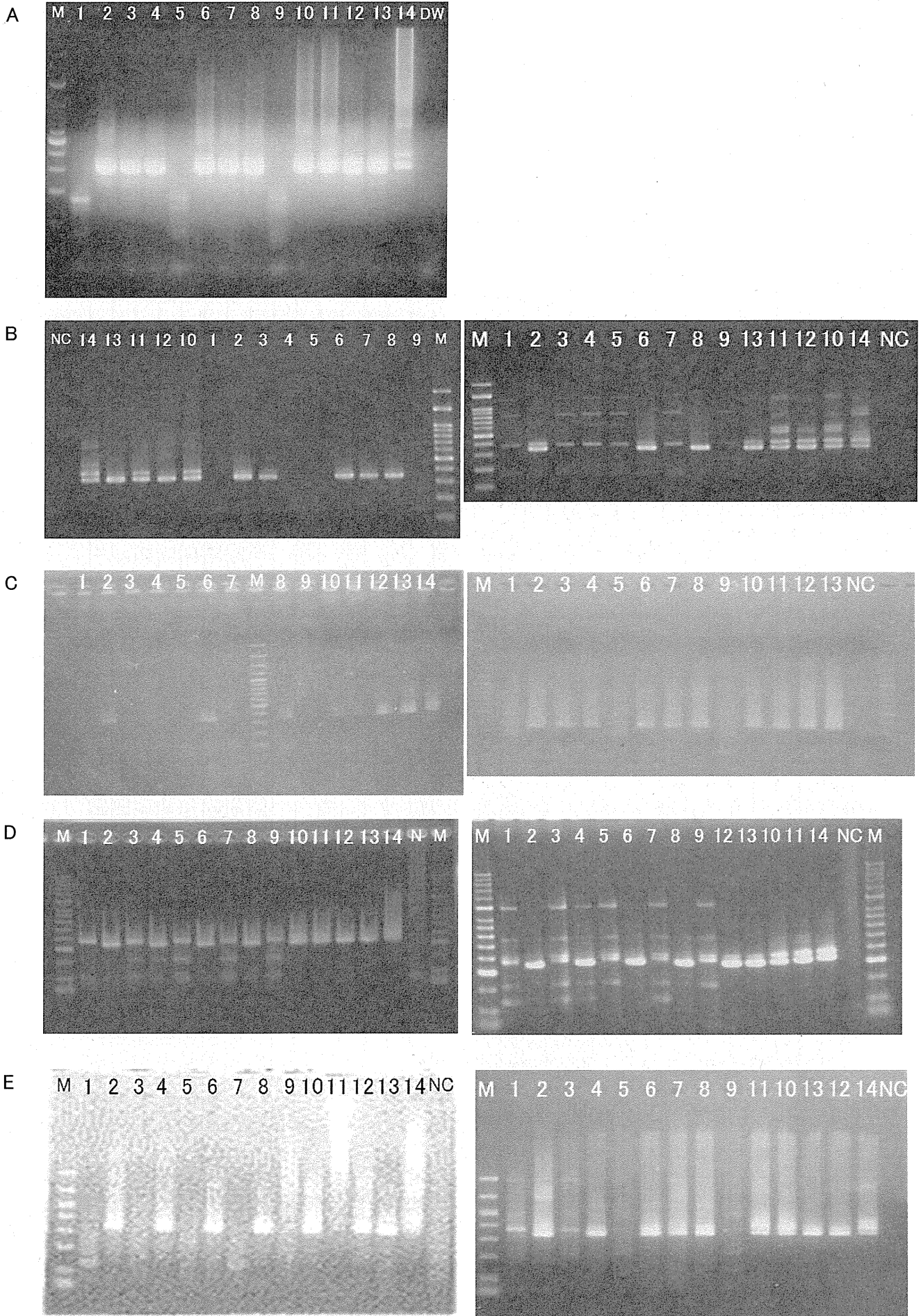


図1のつづき

本試験

再試験

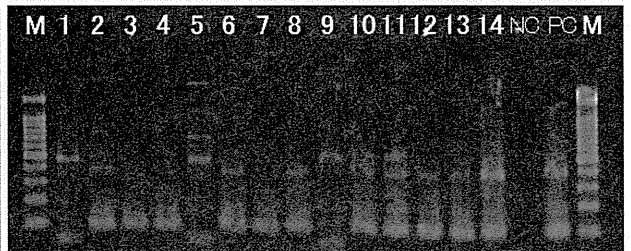
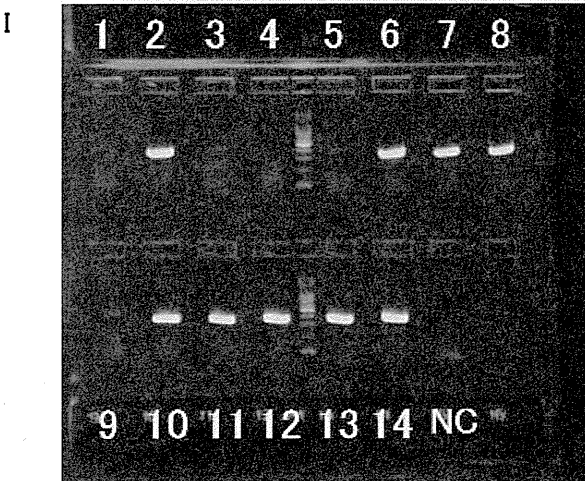
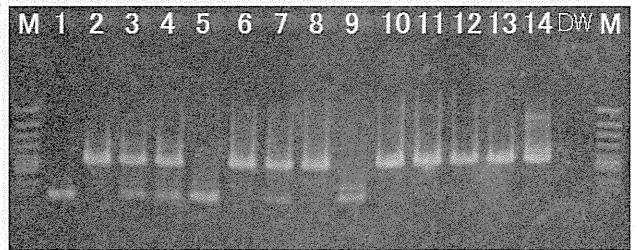
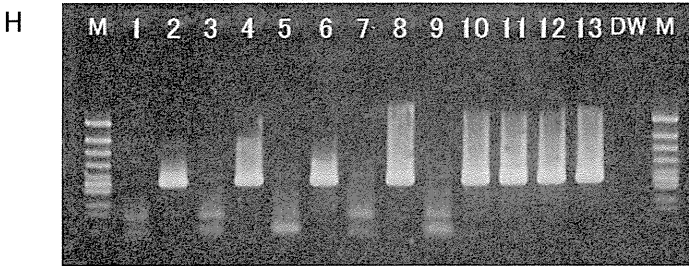
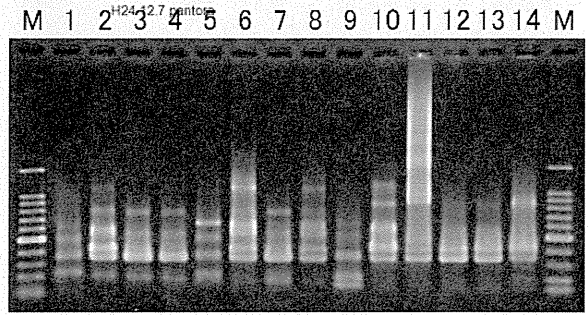
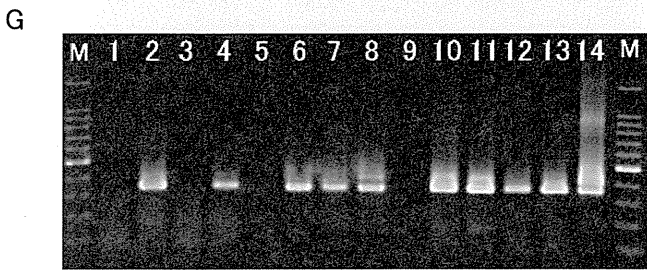
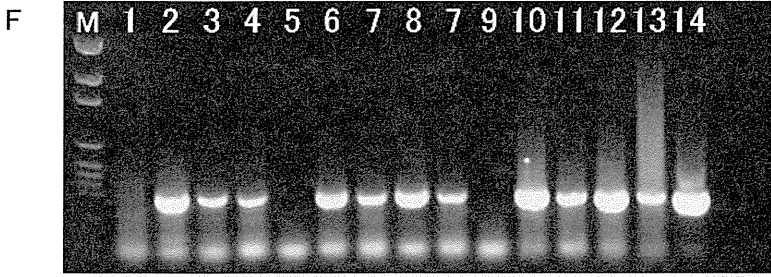


図1のつづき

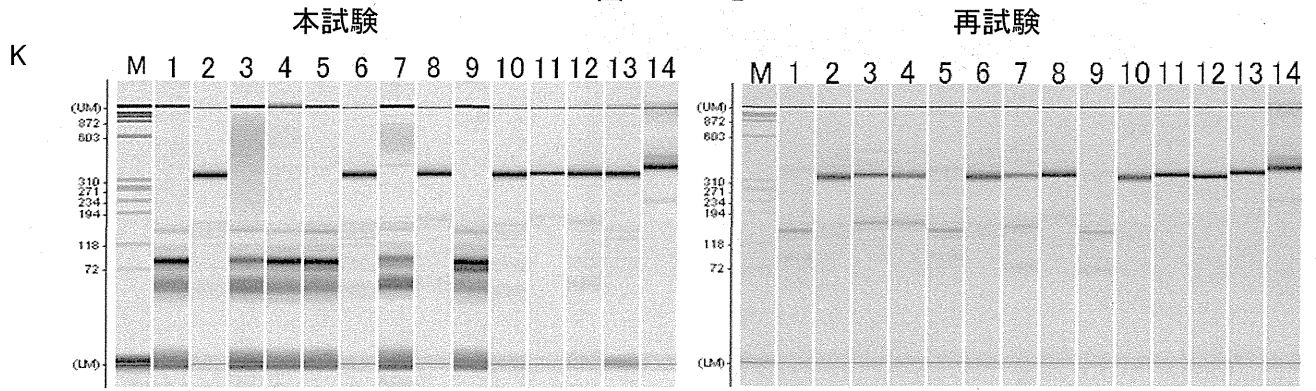
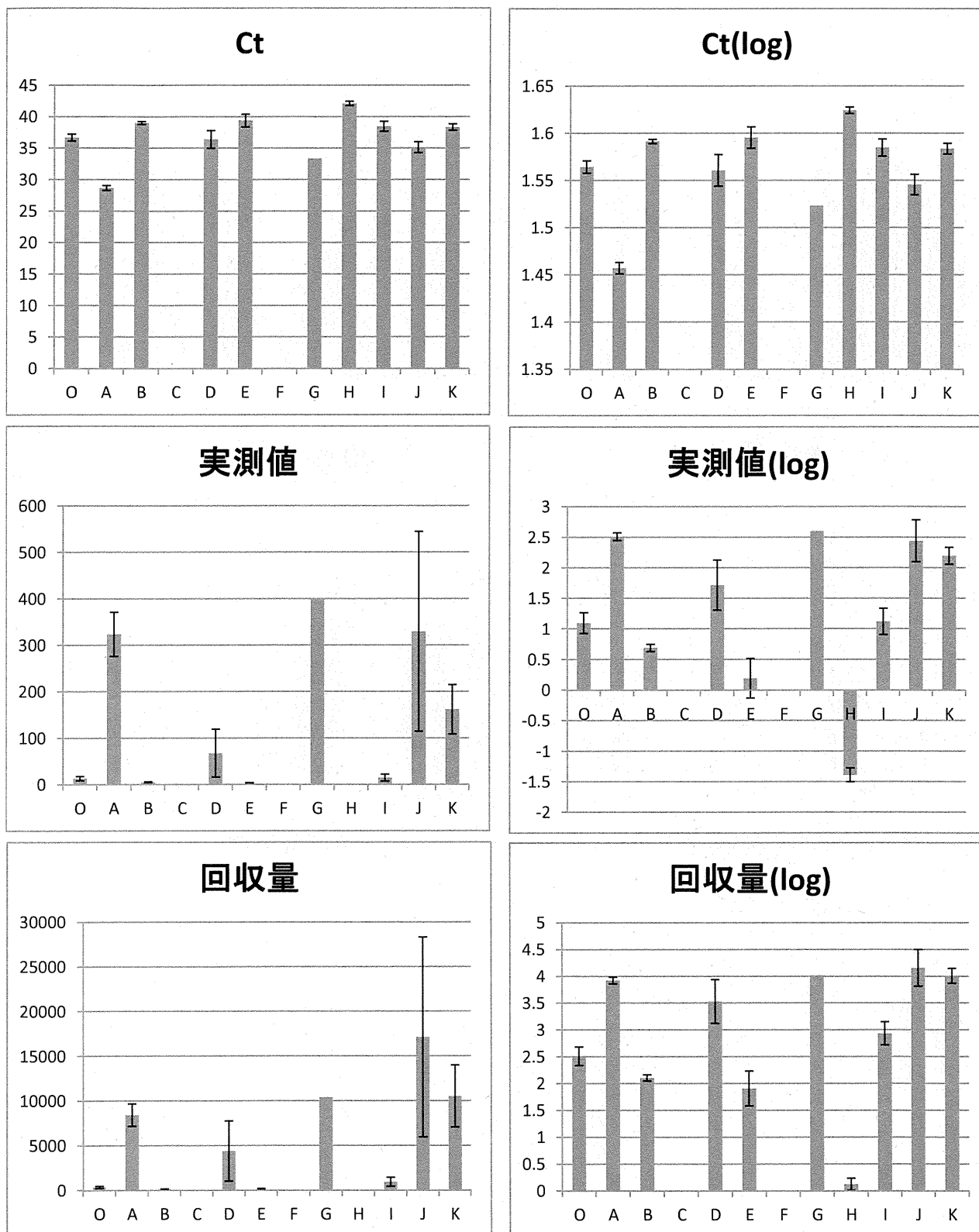
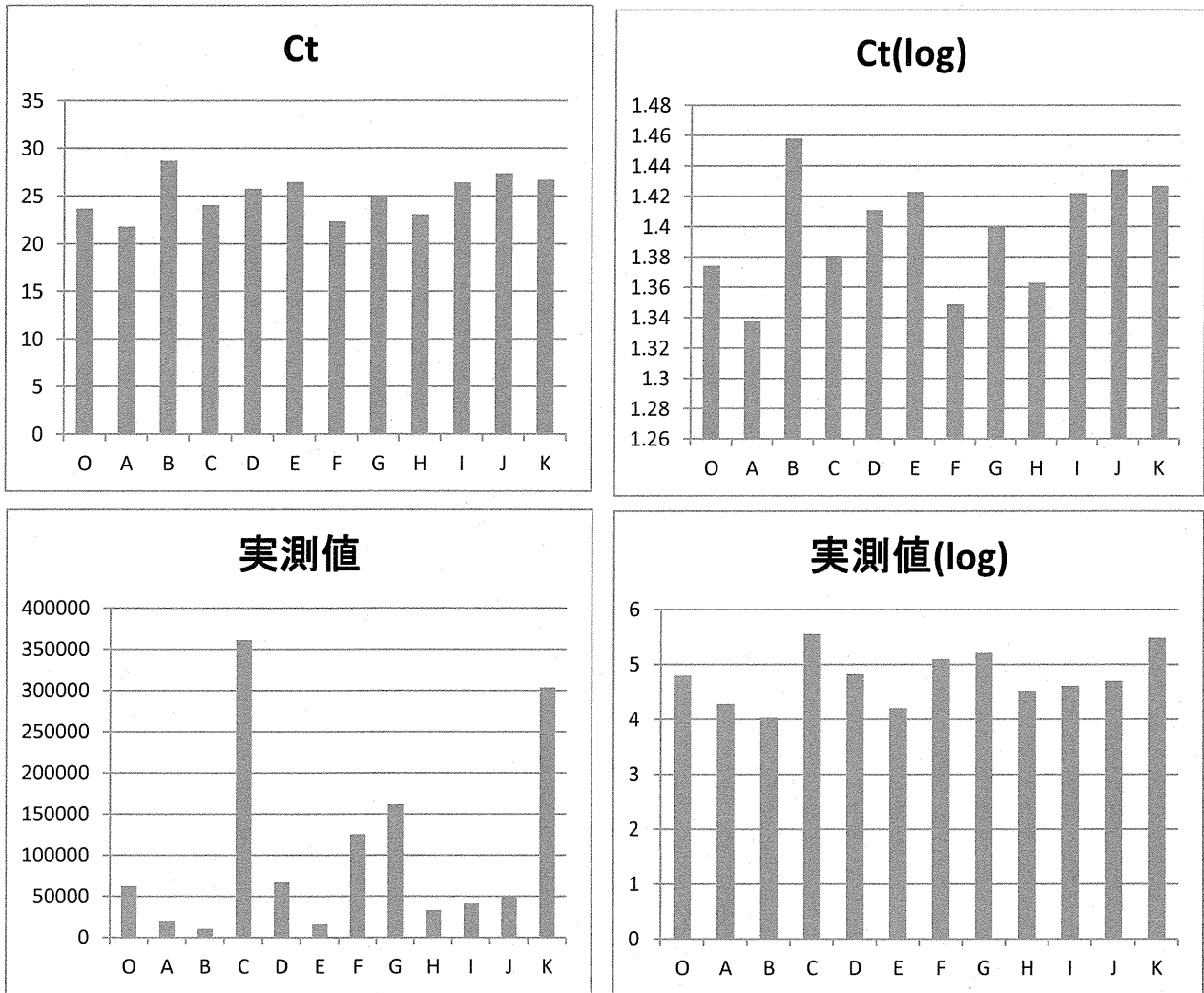


図2 高濃度汚染検体のリアルタイムPCRの定量結果



図中の検査機関Oは国立医薬品食品衛生研究所、A~Kはコラボスタディ参加機関の検査結果を示す。

図3 基準DNAのリアルタイムPCRの定量結果



図中の検査機関Oは国立医薬品食品衛生研究所、A~Kはコラボスタディ参加機関の検査結果を示す。

表2 検査実施記録書のとりまとめ

検査機関ID	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
--------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

検体の受領											
検体受領日	平成24年9月5日	平成24年9月5日	平成24年9月5日	平成24年9月6日	平成24年9月5日	平成24年9月5日	平成24年9月6日	平成24年9月6日	平成24年9月5日	平成24年9月5日	平成24年9月5日
検体受領日	午後1時10分	午後3時20分	午後3時0分	午前11時0分	午後13時35分	午前11時0分	午前11時30分	午後0時35分	午後5時30分	午後6時0分	午後1時50分
検体の状態	良好	良好	良好	良好	良好	良好	良好	良好	良好	良好	良好
問題点											

検査の実施											
時期	当日検査を実施	後日検査を実施	後日検査を実施	後日検査を実施	後日検査を実施	後日検査を実施	後日検査を実施	後日検査を実施	後日検査を実施	後日検査を実施	後日検査を実施
後日検査の場合		-80℃に保存	-80℃に保存	-30℃に保存	-75℃に保存	-80℃に保存 (食品検体) 4℃で保存(接種ウイルス)	-70℃に保存	-30℃に保存	-80℃に保存	-30℃に保存	-40℃に保存

検査開始日時	平成24年9月5日 午後1時45分	平成24年9月13日 午前9時30分	平成24年9月11日 午前9時0分	平成24年9月12日 午前10時50分	平成24年9月19日 午前9時30分	平成24年10月4日 午前10時0分	平成24年9月28日 午前10時30分	平成24年10月11日 午前9時0分	平成24年10月27日 午前9時25分	平成24年9月19日 午前10時50分	平成24年10月4日 午前10時0分
検査終了日時	平成24年9月11日 午後12時30分	平成24年9月16日 午後3時30分	平成24年9月14日 午後16時0分	平成24年9月20日 午後2時30分	平成24年10月3日 午前11時30分	平成24年10月10日 午後5時0分	平成24年10月18日 午後19時30分	平成24年10月29日 午前11時50分	平成24年9月28日 午後3時0分	平成24年9月24日 午後8時30分	平成24年11月9日 午後7時0分

超音波洗浄器の使用の有無	使用	使用	使用	使用	使用	使用	使用	使用	使用	使用	未使用
使用した超音波洗浄器											
メーカー名	EYELA	アズワン	IWAKI	東京理化器械	BRANSON	SHARP	本田電子株式会社	yamato	株式会社エヌエヌデイ	NIHONSEIKI	
機器名	AU-301C	US-1R	USC-600Z38S	EYELA MUS-20	MODEL DNA 1000-R	UT-605	W-231	BRANSON 5510(5510J-	型名US-1	NS-605	
周波数	28KHz	40KHz	38KHz	38KHz	40KHz	38KHz	40KHz	42KHz	38KHz	28KHz	

検査機関ID	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
--------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

採取量

フィルター濾液の採取量

検体No1	45ml	40ml	41ml	40ml	40ml	40ml	41.2ml	43.7ml	42.5ml	39ml	44ml
検体No2	45ml	40ml	41ml	40ml	40ml	42.5ml	42.5ml	43.1ml	42ml	39ml	43ml
検体No3	45ml	40ml	41ml	40ml	40ml	42ml	43ml	43ml	42ml	38ml	44ml
検体No4	45ml	40ml	42ml	40ml	40ml	42ml	42.5ml	44.3ml	42.5ml	38ml	44ml
検体No5	45ml	40ml	41ml	39.5ml	40ml	42.5ml	42.6ml	43.1ml	41.6ml	38ml	43ml
検体No6	45ml	40ml	42ml	40ml	40ml	41ml	43ml	42.8ml	43.2ml	39ml	43ml
検体No7	45ml	40ml	43ml	40ml	40ml	42.5ml	42.7ml	44.8ml	41.5ml	37ml	44ml
検体No8	45ml	40ml	44ml	40ml	40ml	42.5ml	42.4ml	44.1ml	41.5ml	38ml	44ml
検体No9	45ml	40ml	43ml	40ml	40ml	42.5ml	42.5ml	42.7ml	43ml	38ml	44ml

遠心上清の採取量

検体No1	40ml	34ml	36ml	35.5ml	35.5ml	35ml	36.25ml	36ml	33ml	37ml	38.5ml
検体No2	40ml	34ml	36ml	37.2ml	34.2ml	35ml	37ml	33.5ml	30ml	34ml	36.5ml
検体No3	40ml	34ml	36ml	35.7ml	35.2ml	35ml	37.6ml	35ml	32ml	34ml	37ml
検体No4	40ml	34ml	36ml	36.1ml	36ml	35ml	37ml	38ml	31ml	35ml	37ml
検体No5	40ml	34ml	36ml	35.5ml	35.2ml	35ml	37.5ml	39ml	31ml	34ml	36.5ml
検体No6	40ml	34ml	37ml	35.8ml	35.5ml	35ml	37.5ml	37ml	32.5ml	34ml	36.5ml
検体No7	40ml	34ml	37ml	36.1ml	35.5ml	35ml	37.5ml	37ml	32.5ml	32ml	38ml
検体No8	40ml	34ml	38ml	36ml	36ml	35ml	36.2ml	37ml	36ml	34ml	37.5ml
検体No9	40ml	34ml	36ml	36.2ml	34.5ml	35ml	36.5ml	34ml	37ml	33ml	38ml

検査機関ID	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
DNase-Amylaze処理、逆転写反応の条件											
使用チューブ	1.5ml遠心管	0.5ml遠心管	0.2ml遠心管	0.2ml遠心管	0.2ml遠心管	0.2ml遠心管	0.2ml遠心管	0.2ml遠心管	0.2ml遠心管	0.2ml遠心管	0.5ml遠心管
DNase処理 (37°C、10min)	温浴使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温浴使用
逆転写反応の条件											
42°C、30min	温浴中使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温浴中使用
95°C、5分	煮沸水中使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用	温度コントロール使用
冷却	氷水中使用	氷水中使用	氷水中使用	氷水中使用	氷水中使用	氷水中使用	氷水中使用	氷水中使用	氷水中使用	氷水中使用	氷水中使用

リアルタイムPCR、nestedリアルタイムPCRの条件											
使用機器											
メーカー名	Roche Diagnostics	Life technologies(旧ABI)	Life technologies(旧ABI)	Life technologies(旧ABI)	Life technologies(旧ABI)	Life technologies(旧ABI)	Life technologies(旧ABI)	Life technologies(旧ABI)	Life technologies(旧ABI)	Roche	Life technologies(旧ABI)
機器名	LightCycler® 320S	7500	7500 Fast Real-Time PCR System	StepOnePlus	7500 Fast Real-Time PCR System	7500FAST	7500 Fast Real-Time PCR	7500Fast	7500 FAST	Light cycler2.0	StepOnePlus
使用キット(試薬)											
メーカー名	Roche Diagnostics	Life technologies(旧ABI)	ABI	QIAGEN	Life technologies(旧ABI)	ABI	Life technologies(旧ABI)	ABI	Life technologies	TaKaRa	Life technologies(旧ABI)
キット名	LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS HybProbe	Taqman® Universal PCR Master Mix	TaqMan® Universal PCR Master Mix	QuantiTect Probe PCR Master Mix	Taqman® Universal PCR Master Mix	Taqman® Universal PCR Master Mix	Taqman® Fast Universal PCR Master Mix	Taqman® Universal PCR Master Mix	Taqman® Universal PCR Master Mix	Premix ExTaq(Prefect Real Time)	Taqman® Gene Expression Master Mix

検査機関ID	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
--------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

鋳型DNA量と反応液量

リアルタイムPCR

鋳型DNA量	5 μ l	5 μ l	5 μ l	2 μ l	2.5 μ l	5 μ l	5 μ l	4 μ l	2 μ l	2.5 μ l	2 μ l
反応液量	20 μ l	50 μ l	25 μ l	20 μ l	25 μ l	25 μ l	20 μ l	30 μ l	20 μ l	17.5 μ l	18 μ l

nested リアルタイムPCR

鋳型DNA量	0.05 μ l	5 μ l	5 μ l	2 μ l	2.5 μ l	2 μ l	5 μ l	4 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	
反応液量	20 μ l	50 μ l	25 μ l	20 μ l	25 μ l	25 μ l	20 μ l	30 μ l	20 μ l	18 μ l	18 μ l	
反応条件	95°C:10分⇒ (95°C:10秒)⇒ 56°C:30秒)× 55回	50°C:2分⇒ 95°C:10分⇒ (95°C:15秒)⇒ 56°C:1分)× 50回	50°C:2分⇒ 95°C:10分⇒ (95°C:15秒)⇒ 56°C:1分)×45 回		50°C:2分⇒ 95°C:10分⇒ (95°C:15秒)⇒ 56°C:1分)× 45回	50°C:2分⇒ 95°C:10分⇒ (95°C:15秒)⇒ 56°C:1分)× 45回	95°C:20秒⇒ (95°C:1秒)⇒ 60°C:30秒)× 45回	50°C:2分⇒ 95°C:10分⇒ (95°C:15秒)⇒ 56°C:1分)× 50回	50°C:2分⇒ 95°C:10分⇒ (95°C:15秒)⇒ 56°C:1分)× 50回	95°C:1分⇒ (95°C:10秒)⇒ 60°C:25秒)× 45回	50°C:2分⇒ 95°C:10分⇒ (95°C:15秒)⇒ 56°C:1分)× 45回	

使用プライマー・プローブ

F-primer	COG2F	COG2F	COG2Fと ALPF	COG2F(と ALPF)	COG2F	COG2F,ALPF	COG2F	COG2F	COG2F	COG2F	COG2Fと ALPF
R-primer	COG2R	COG2R	COG2R	COG2R	COG2F(と ALPF)	COG2R	COG2F(と ALPF)	COG2R	COG2Rと ALPR	COG2R	COG2R
Probe	RING2-TP	RING2-TP	RING2AL-TP	RING2 AL-TP	RING2-TP	RINGAL-TP	RINGAL-TP	RING2-FAM TAMRA	RING2AL-TP	RING2AL-TP	RING2AL-TP- N4
Probeの標識	5'FAM 3'TAMRA	5' FAM, 3' TAMRA	5'FAM, 3'TAMRA	5' FAM, 3' TAMRA	5' FAM, 3' TAMRA	5' FAM, 3' TAMRA	5' FAM, 3' TAMRA	5' FAM, 3' TAMRA	5' FAM, 3' TAMRA	5' FAM, 3' TAMRA	5' FAM, 3' MGB

使用機器

メーカー名	ASTECC	Life technologies(IBABI)	TECHNE	Life technologies(IBABI)	Life technologies(IBABI)	ABI	ASTECC	ABI	Life Technologies	Applied Biosystems	Life technologies(IBABI)
機器名	PC320	2720	TC-412	GeneAmp PCR System 9700	Gene Amp® PCR System 9700	7500FAST	PC818	GeneAmp PCR 9700	2720 thermal cyclcr	Veriti 96well Thermal Cycler	Veriti 96Well Thermal Cycler

使用キット(試薬)

メーカー名	TOYOBO	TaKaRa	TaKaRa	TaKaRa	TaKaRa	TaKaRa	TaKaRa	TaKaRa	Takara	TaKaRa	TaKaRa
酵素名	KOD FX Neo	TaKaRa EX Taq HS	TaKaRa Ex Taq	TaKaRa EX Taq	TaKaRa EX Taq	TaKaRa EX Taq	TaKaRa EX Taq	TaKaRa EX Taq HS	EmeraldAmp® PCR Master Mix	TaKaRa Ex Taq	TaKaRa EX Taq Hot Start Version