

液により検量線の実濃度が異なっており、これが大きな影響を及ぼしている可能性が考えられた。さらに標準 cDNA 溶液についても共通の検査方法に比べて通常採用している検査方法で実施したほうが変動が大きかった。以上のことから、ノロウイルス検査を行ううえでは検査方法の共通化、検量線作成に使用する cDNA の濃度設定により検査結果が一様化する可能性が示唆された。

A. 研究目的

食品検査はその食品の安全性を担保するためのひとつの手段であるが、この検査結果をもって市場への流通の可否を判定することになることから、その結果の妥当性を明確にする必要がある。また、検査結果はどの検査機関で実施しても同等の検査結果が得られることが求められる。そのためにも結果の信頼性を確保する必要があり、食品検査については平成9年度より GLP が導入された。また、国際的な試験所認定でもある ISO/IEC17025 では定期的な技能試験への参加が求められている。現状において、一般的な微生物検査については国内においても技能試験が実施されているが、ノロウイルス検査については国内では導入されていない。また、これまでの検討結果からノロウイルス検査は比較的検査機関間のばらつきが大きいことが経験則から得られていることから、今後の外部精度管理の実施においてその評価方法を含めて決定することが必要となる。そのため、本研究では、共通試料を用いた外部精度管理を行うことにより、各機関での検査精度の実状を把握することに加え、その結果から考察される検査方法および検量線の測定値に及ぼす影響について検討することとした。

B. 研究方法

1. 調査試料

調査試料は糞便乳剤3種、標準 cDNA の合計4種とした。糞便乳剤の検体-1は陰性、検体-2および検体-3が陽性とし、これらの事前測定結果は以下のとおりであった。検体-2： $2.40 \times 10^5 \pm 1.47 \times 10^4$ コピー、検体-3： $1.03 \times 10^4 \pm 1.16 \times 10^3$ コピー（いずれも実測値）。

2. 外部精度管理の実施

協力機関である12機関を対象として、2013年10月23日に国立医薬品食品衛生研究所より調査試料の発送を行った。なお、検査方法については各検査機関で通常採用している方法（以下、方法Aとする）、あらかじめ指定した共通の検査方法（QIAamp Viral RNA Mini キットを用いた RNA の抽出、DNase 処理、逆転写反応およびリアルタイム PCR の実施）（以下、方法Bとする）の2種とした。また、検量線作成に使用する標準 cDNA 溶液については、通常検査で各検査機関が使用している cDNA 溶液（以下、機関 DNA とする）、共通で配布した cDNA 溶液（以下、配布 DNA とする）の2種とした。すなわち、各検査機関は各調査試料について2種の検査方法で検査を行い、2種の検量線で定量を行った。各検査機関から結果を回収し、得られた結果について統計解析を行った。なお、統計解析および作図は JMP を使用した。各検査方法間の平均値の群間比較

は Tukey-Kramer の HSD 検定により行い、 $p < 0.05$ のとき有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 外部精度管理結果

12 機関より回収した結果から基本統計量を求め、これを表 1 および表 2 に示した。このときの有効データ数は方法 A では 10 機関、方法 B では 12 機関とした。なお、解析は実数と対数変換値の 2 種により行い、それぞれ実測値と糞便乳剤 1mL あたりの換算量を算出した。実数で基本統計量を算出したところ、いずれの糞便乳剤試料においても変動係数が 0.6 を超えており、ばらつきが大きいことから、外部精度管理での評価を行うことは困難であると判断した。この傾向は 1mL あたりの換算量でより顕著であった。これに対して対数換算値を解析に用いることにより、変動係数はほとんどの試料で 0.1 以下となり、結果の評価を行うことが可能であるものと判断された。なお、対数換算値を解析に用いた場合、各検査手法間で得られた平均値に有意な差は認められなかった。

2. 検査手法および検量線作成用 cDNA 溶液の影響

対数換算値を採用することにより結果の評価を行うことは可能であると判断したが、一般的な細菌数測定において認められる対数変換値での変動係数と比較すると大きいことから、上記で得られた結果について、その詳細を解析するべく、

検査手法に着目した。すなわち、各報告値の分布を検査手法ごとに確認したところ、糞便乳剤の検体-2 および検体-3 において、方法 B で方法 A よりも低い測定値を報告した機関が認められた(図 1、図 2)。これは実測値と 1mL あたりの換算量のいずれにおいても同様の傾向が認められた。しかし、標準 cDNA 溶液では検査手法間での分布の相違は認められなかった(図 3)。同様に、検量線作成用 cDNA の種類の影響について確認したところ、標準 cDNA 溶液の測定値において、機関 DNA のほうが配布 DNA よりもデータ分布のばらつきは大きかった(図 6)。しかし、この傾向は糞便乳剤試料では認められなかった(図 4、図 5)。

また、陽性を示す全ての調査試料について Ct 値をプロットしたところ、一部の機関で検査手法ごとに大きな差異が認められたが、ほとんどの機関の Ct 値は検査方法間で差異はなかった(図 7)。そこで、検量線の影響も加味し、定量値について確認したところ、検量線作成用 cDNA 溶液を同じとした場合に、方法 A で高めの値が報告される傾向にあった。また、方法を同じとした場合には、機関 DNA で高めの値が報告される傾向にあった。なお、この傾向は実測値と換算量のいずれにも共通で認められた(図 8~11)。

3. 検量線の作成状況の比較

標準 cDNA 溶液という基材の影響がない試料において、検量線作成に使用する cDNA 溶液の種類により結果が異なったことから、機関 DNA と配布 DNA の測定結果をプロットした。各濃度の Ct 値を確認したところ、いずれの濃度においても高い

相関が認められた (図 12)。しかし、これを各標準 cDNA 溶液で作成した検量線を用いて濃度換算することにより、機関 DNA と配布 DNA 間で大きいところでは 1.5log 程度の差異が認められた (図 13)。また、それぞれの検量線で定量した cDNA 溶液の濃度、すなわち、機関 DNA で作成した検量線で定量した配布 DNA、または配布 DNA で作成した検量線で定量した機関 DNA の各濃度について図 14 および図 15 に示した。その結果、機関 DNA の濃度は 10^3 では機関間で最大 2log 程度のばらつきが存在することが明らかとなった。

4. 外部精度管理の評価方法の検討

本研究の最終的な目的は外部精度管理を実施することである。そのためにも得られた結果について各参加機関の評価を行う必要がある。そこで、今回得られた結果を用いて評価方法を検討することとした。今回は、3 回の繰り返し測定を実施していることから、測定値とばらつきの両者を評価するため、Xbar-R 管理図を用いることとした。このとき R 管理図における管理限界線は JIS に記載の係数表を用いて算出した値とした。各測定値を並べて観察すると、明らかに小さい値あるいは大きい値となる機関は限られていた。同様に R 管理図においても設定した管理限界線を超える機関はごく一部に限られていた (図 16~27)。

D. 考察

本研究では、糞便試料および標準 cDNA 溶液を配布することにより、外部精度管理を実施した。変動要因と考えられる検査方法および検量線作成用 cDNA の影響に

ついて検討したところ、いずれの試料においても平均値に有意差は認められなかった。しかし、対数変換値での変動係数が比較的大きいことから、変動がマスクされている可能性も考えられる。そのため、平均としての有意差は認められなかったが、データ分布等を確認することにより、さらなる変動要因の傾向分析を行うこととした。その結果、データの分布は糞便試料では共通法である方法 B ではばらつきが大きくなる傾向にあった。これは慣れていない検査方法により実施したことに伴い、回収率が低下した可能性が考えられた。データには示していないが、 $n=3$ での繰り返し測定時の Ct 値の範囲が方法 B で大きい傾向にあったこともこのことを指示しているものと考えられる。これに対して、標準 cDNA 溶液では方法ごとの差は認められず、検量線作成用 cDNA 溶液の種類ではばらつきが大きくなる傾向にあった。このことは、変動要因が少ない試験系の場合には検量線の作成方法による機関間のばらつきが大きい可能性を示唆した。そのため、実試料ではより一層のばらつきを生じる可能性も考えられた。これは検体-2 において同一の検査方法であっても機関 DNA ではばらつきが大きい傾向が認められたことと関係するかもしれない。また、検量線の作成状況について解析を行った。その結果、cDNA の種類間で Ct 値としては大きく変わらないが、濃度換算を行ったときに、機関 DNA のほうが配布 DNA よりも濃度が低い機関がいくつか認められた。すなわち、濃度としてのずれが生じていることが、最終的な定量検査結果に対しても影響してい

る可能性が考えられた。この cDNA 種間の差異は低濃度でより顕著に認められることから、試料中のノロウイルス濃度が低い場合にはより一層の濃度差として観察される可能性がある。そのためにも、検量線作成に使用する cDNA 溶液についても規定する必要があるかもしれない。さらに、外部精度管理を実施するためには評価方法を決定する必要があるが、ここでは Xbar-R 管理図を使用して解析を行った。3 回測定を行った際の機関内のばらつきは通常の R 管理図における管理限界線を採用することで問題ないと考えられた。一方、Xbar 管理図では並列でデータを観察した際に大きく外れたデータの出現頻度もそれほど高くないことから、対数変換値での z-スコア=2 または 3 の値を管理限界線と設定して、この範囲を超えた場合に異常値と見なすことが妥当であるとも考えられるが、今回の調査試料中の濃度が比較的高いことが各機関のデータのばらつきを小さくした可能性もあるので、Xbar 管理図の管理限界線については低濃度でのデータ分布を加味したうえで設定したほうがよいと考えられた。

E. 結論

糞便試料を用いたノロウイルス検査の

外部精度管理を 12 機関を対象に実施した。検査方法を 2 種、検量線作成用 cDNA を 2 種の 4 条件について 1 検体につき実施したところ、各機関で使用している検量線作成用 cDNA 溶液の濃度表示にばらつきがあり、これが原因で最終的な定量検査結果に影響を及ぼしている可能性が示唆された。一方、外部精度管理を実施するうえでの評価方法についても検討したところ、得られた測定値の対数変換値を用いて Xbar-R 管理図を採用することにより、評価ができるものと考えられた。なお、Xbar 管理図における管理限界線については、さらにデータを集積したうえで判断する必要があるものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
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
3. その他：なし

表1 ノロウイルス検査の外部精度管理結果（実数値での解析）

		方法 A	方法 B
実測値			
検体-2	機関 DNA	$8.519 \times 10^5 \pm 9.497 \times 10^5$	$3.759 \times 10^5 \pm 3.207 \times 10^5$
	配布 DNA	$3.677 \times 10^5 \pm 2.482 \times 10^5$	$1.921 \times 10^5 \pm 1.310 \times 10^5$
検体-3	機関 DNA	$6.653 \times 10^4 \pm 7.052 \times 10^4$	$3.013 \times 10^4 \pm 2.751 \times 10^4$
	配布 DNA	$4.128 \times 10^4 \pm 3.575 \times 10^4$	$2.321 \times 10^4 \pm 1.841 \times 10^4$
標準 cDNA	機関 DNA	$1.573 \times 10^5 \pm 1.182 \times 10^5$	$1.563 \times 10^5 \pm 1.208 \times 10^5$
	配布 DNA	$1.008 \times 10^5 \pm 4.388 \times 10^4$	$9.983 \times 10^4 \pm 2.615 \times 10^4$
換算量			
検体-2	機関 DNA	$9.142 \times 10^8 \pm 1.718 \times 10^8$	$4.136 \times 10^8 \pm 3.901 \times 10^8$
	配布 DNA	$1.553 \times 10^8 \pm 1.554 \times 10^8$	$2.013 \times 10^8 \pm 1.328 \times 10^8$
検体-3	機関 DNA	$7.280 \times 10^7 \pm 1.351 \times 10^8$	$3.319 \times 10^7 \pm 3.345 \times 10^7$
	配布 DNA	$3.332 \times 10^8 \pm 3.689 \times 10^8$	$2.321 \times 10^7 \pm 1.842 \times 10^7$
標準 cDNA	機関 DNA	$7.280 \times 10^7 \pm 1.351 \times 10^8$	$1.775 \times 10^8 \pm 1.515 \times 10^8$
	配布 DNA	$8.444 \times 10^7 \pm 3.802 \times 10^7$	$1.096 \times 10^8 \pm 3.757 \times 10^7$

単位：コピー（実測値）、コピー/mL（換算量）

表2 ノロウイルス検査の外部精度管理結果（対数値での解析）

		方法 A	方法 B
実測値			
検体-2	機関 DNA	5.667 ± 0.495	5.434 ± 0.499
	配布 DNA	5.469 ± 0.301	5.131 ± 0.434
検体-3	機関 DNA	4.569 ± 0.497	4.164 ± 0.729
	配布 DNA	4.450 ± 0.395	4.137 ± 0.564
標準 cDNA	機関 DNA	5.067 ± 0.325	5.055 ± 0.345
	配布 DNA	4.969 ± 0.163	4.982 ± 0.110
換算量			
検体-2	機関 DNA	8.561 ± 0.551	8.481 ± 0.482
	配布 DNA	8.363 ± 0.352	8.158 ± 0.423
検体-3	機関 DNA	7.463 ± 0.542	7.191 ± 0.721
	配布 DNA	7.345 ± 0.410	7.164 ± 0.529
標準 cDNA	機関 DNA	7.961 ± 0.437	8.082 ± 0.378
	配布 DNA	7.863 ± 0.257	8.009 ± 0.163

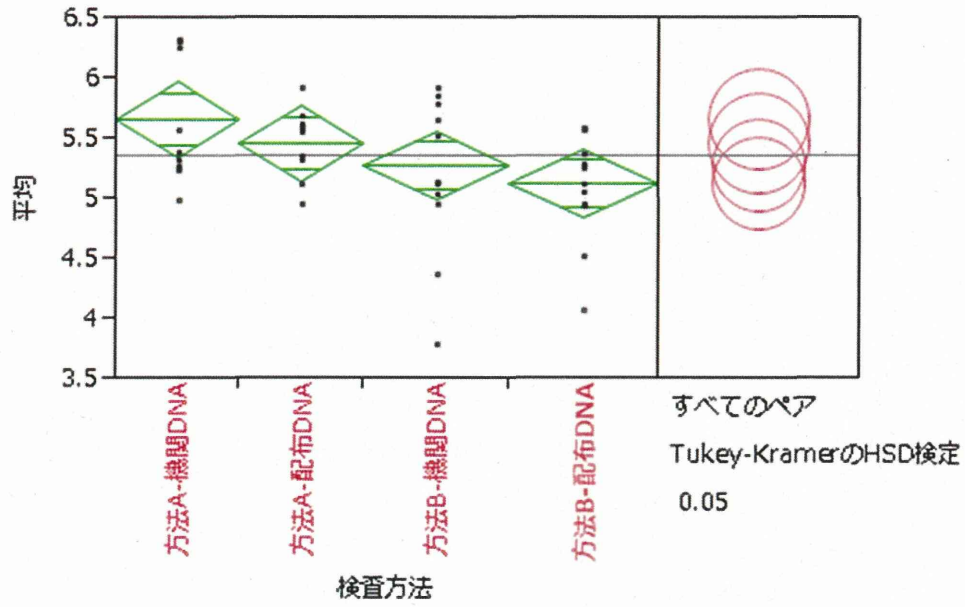


図1 検体-2における検査手法ごとのデータ分布（実測値）

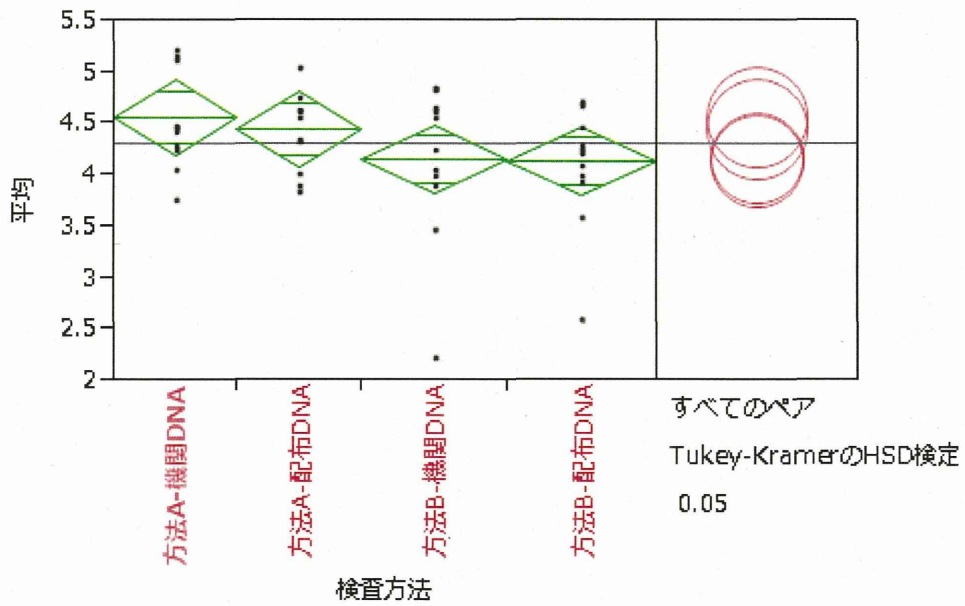


図2 検体-3における検査手法ごとのデータ分布（実測値）

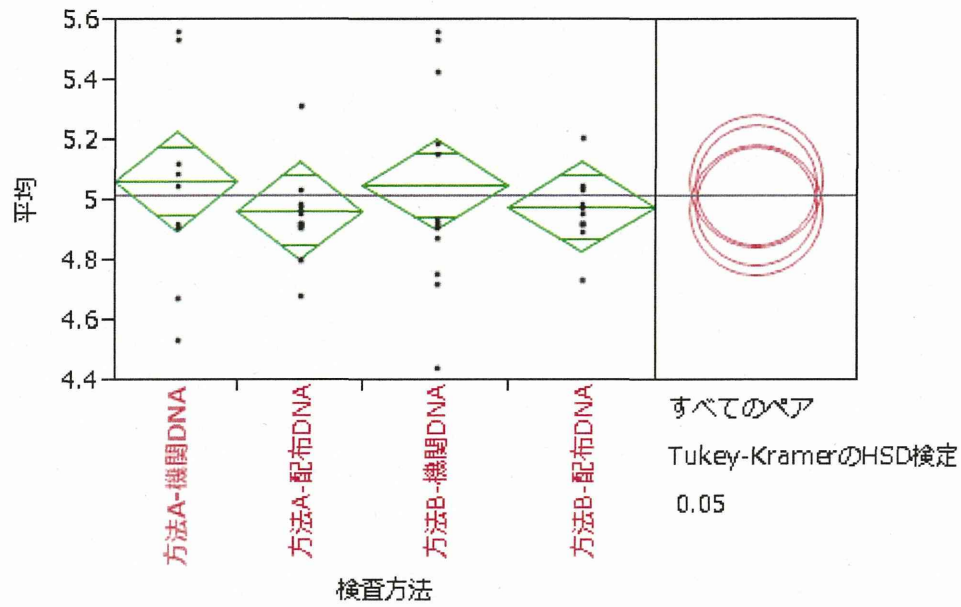


図3 標準 cDNA 溶液における検査手法ごとのデータ分布 (実測値)

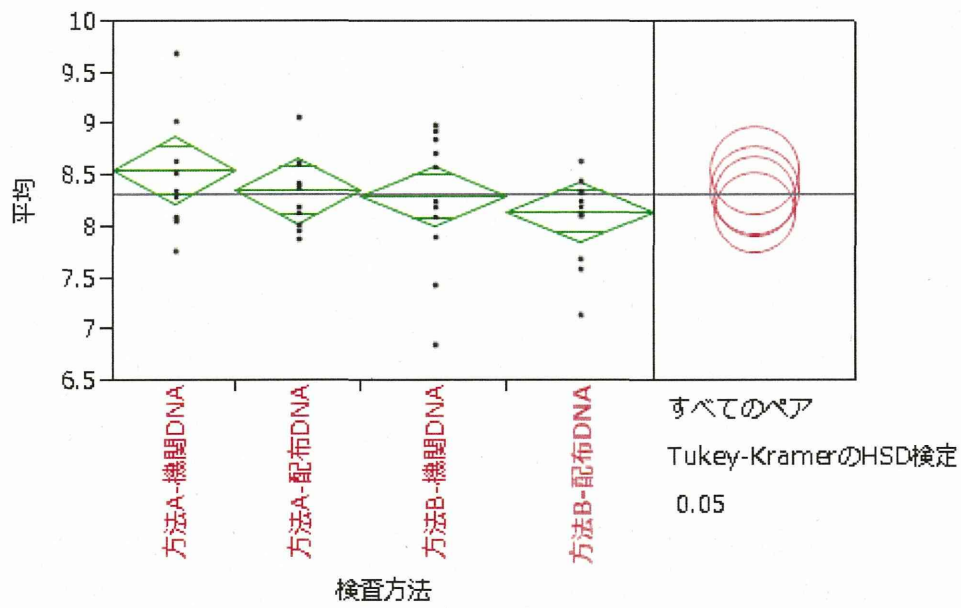


図4 検体-2 における検査手法ごとのデータ分布 (換算量)

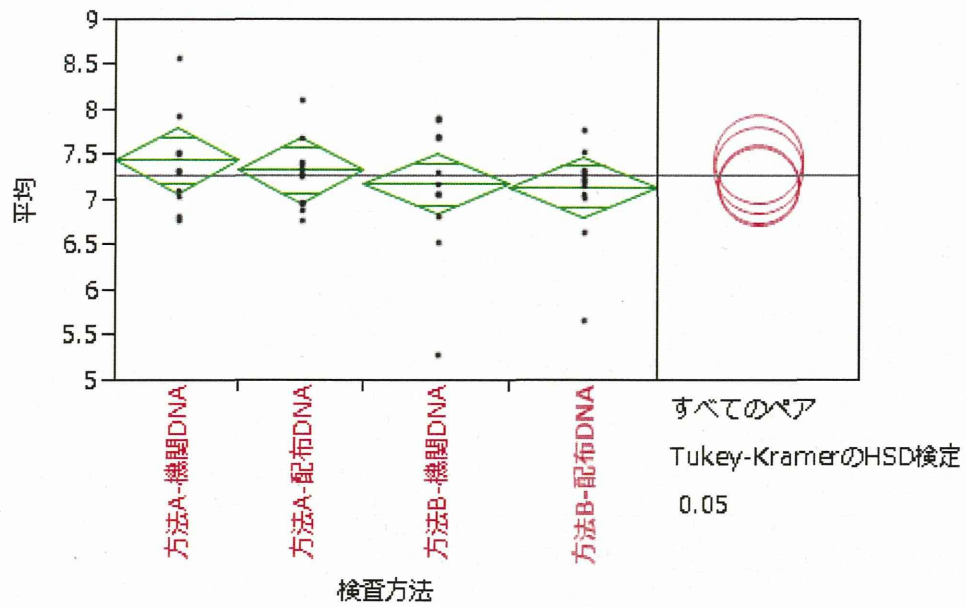


図5 検体-3における検査手法ごとのデータ分布（換算量）

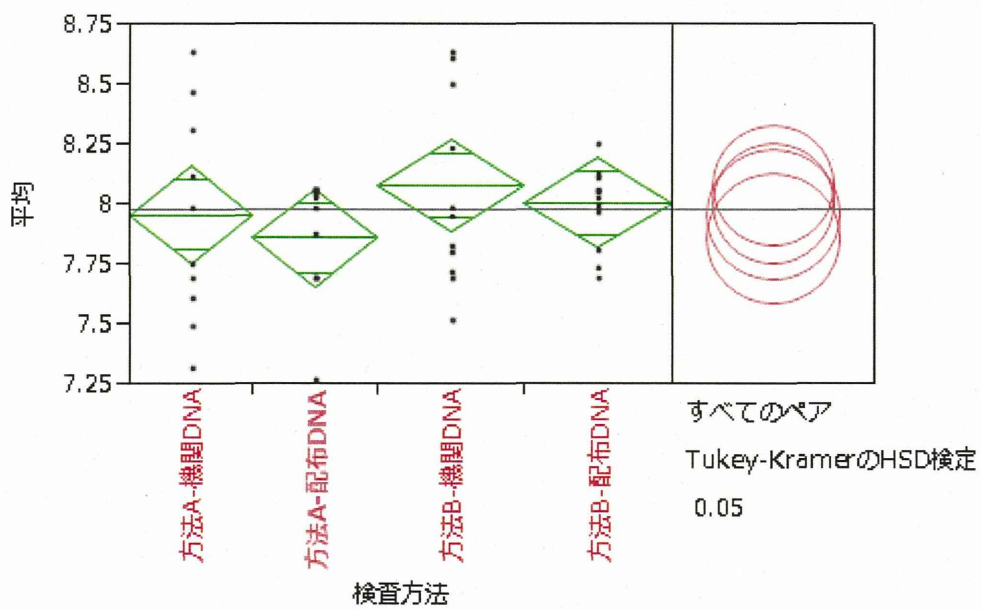


図6 標準 cDNA 溶液における検査手法ごとのデータ分布（換算量）

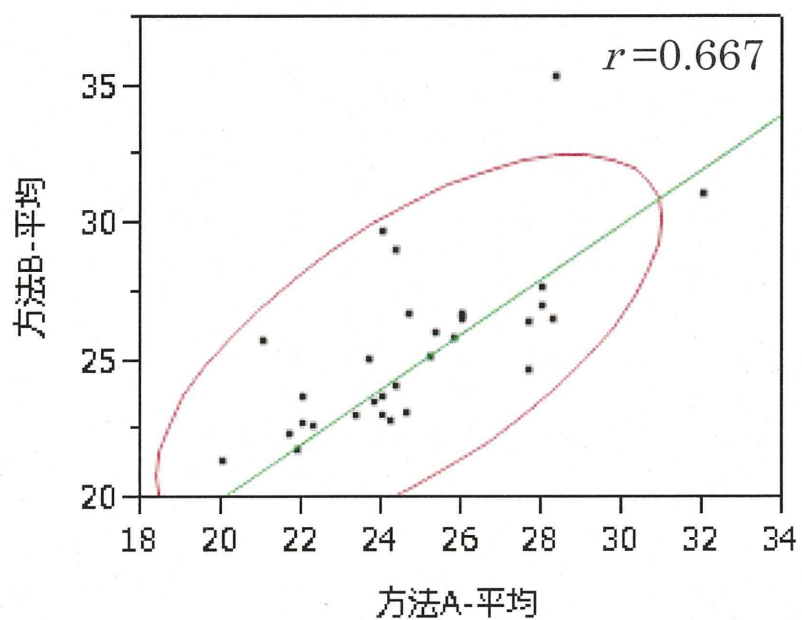


図7 方法Aと方法BのCt値の相関
 直線は $y=x$ を示す
 曲線は95%信頼区間の確率楕円を示す

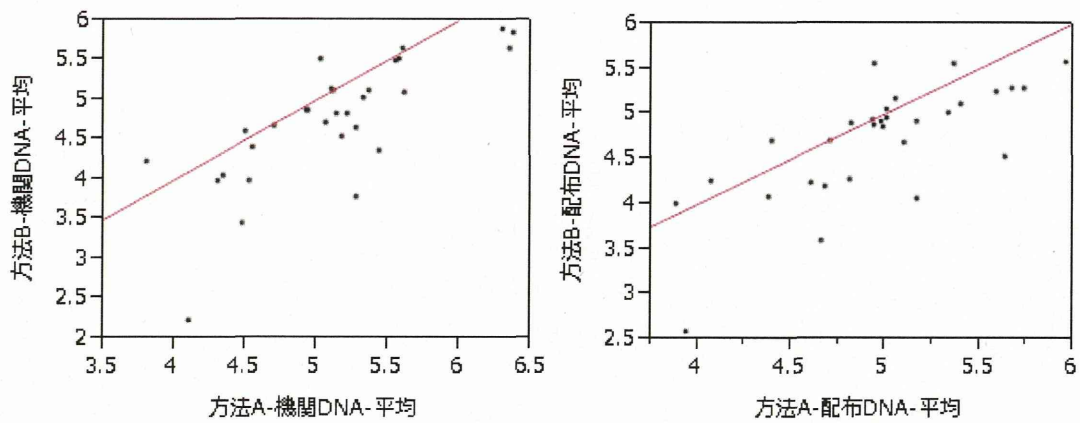


図8 方法Aと方法Bの検量線共通での定量データの分布（実測値）
直線は $y=x$ を示す

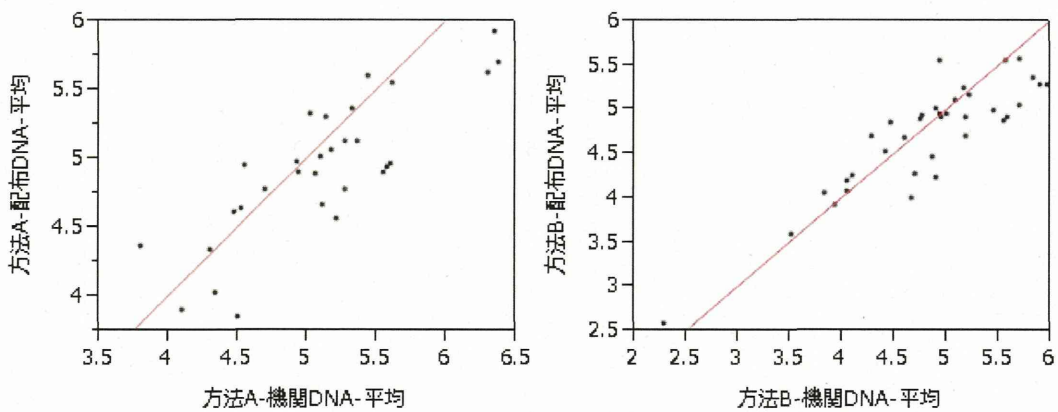


図9 機関DNAと配布DNAの検査方法共通での定量データの分布（実測値）
直線は $y=x$ を示す

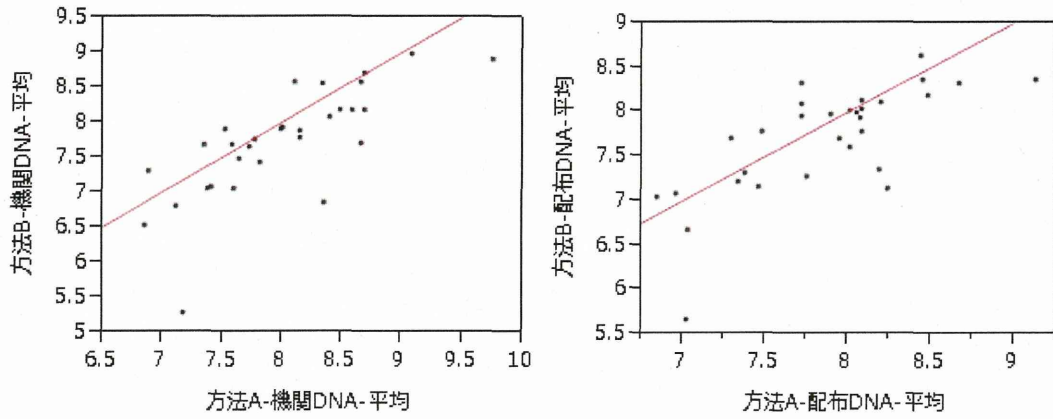


図 10 方法 A と方法 B の検量線共通での定量データの分布 (換算量)
直線は $y=x$ を示す

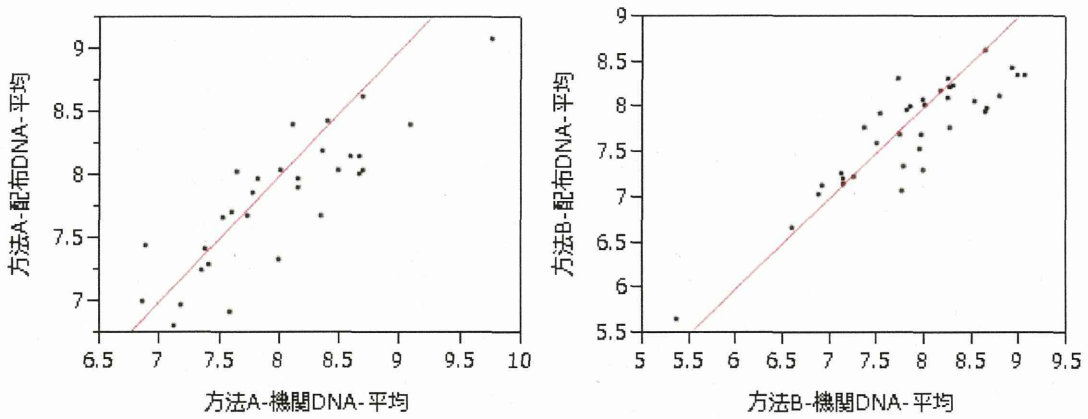


図 11 機関 DNA と配布 DNA の検査方法共通での定量データの分布 (換算量)
直線は $y=x$ を示す

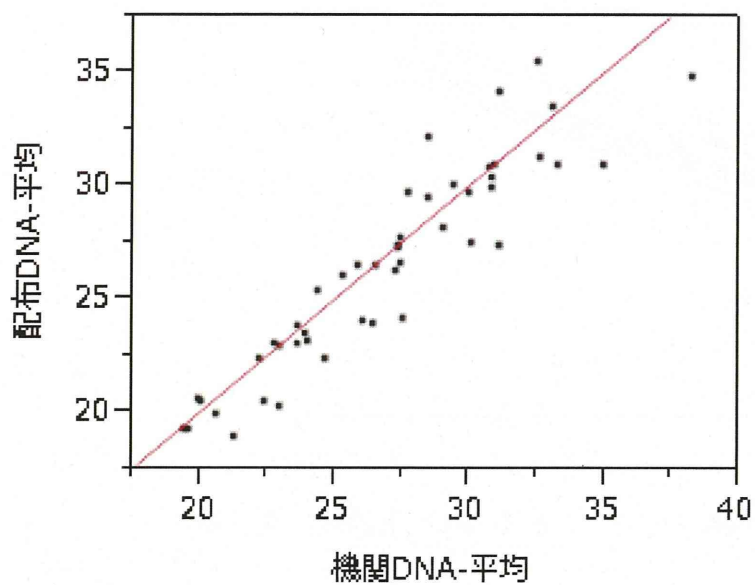


図 12 検量線作成用 cDNA 溶液の Ct 値
直線は $y=x$ を示す

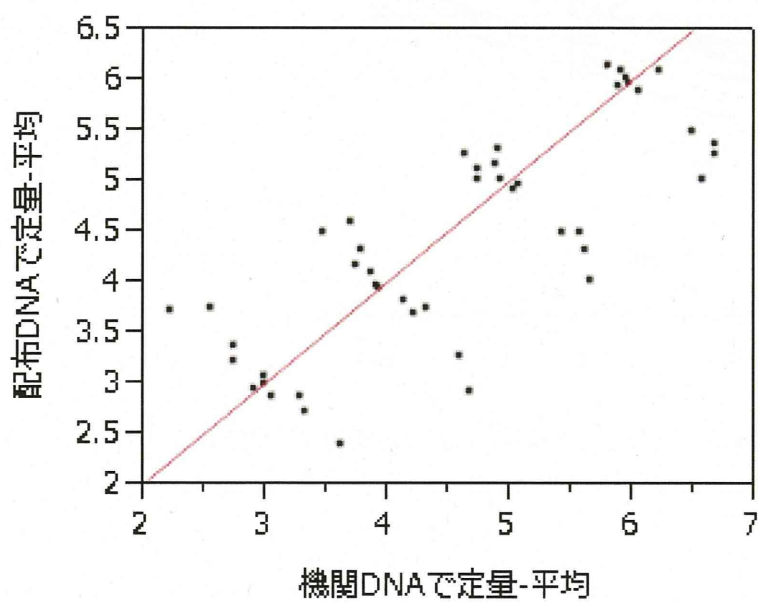


図 13 各 cDNA 溶液で検量線を作製した際の検量線作成用 cDNA 溶液の定量値
直線は $y=x$ を示す

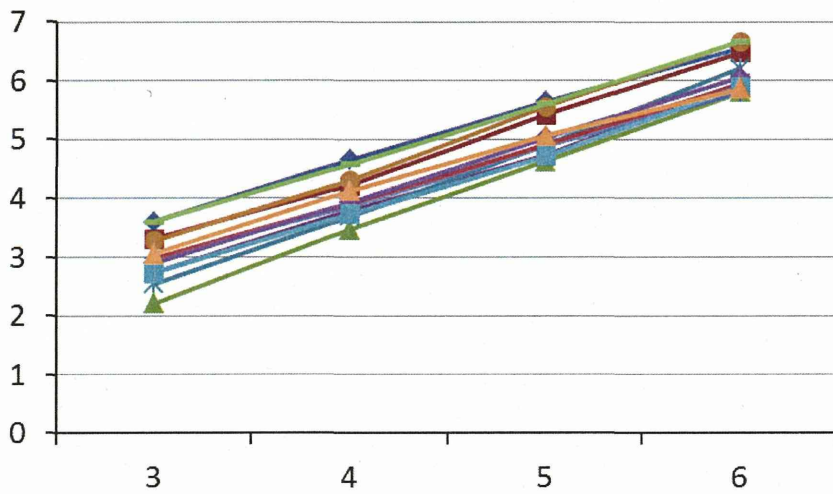


図 14 機関 DNA で作成した検量線で定量した配布 DNA の各濃度の測定値

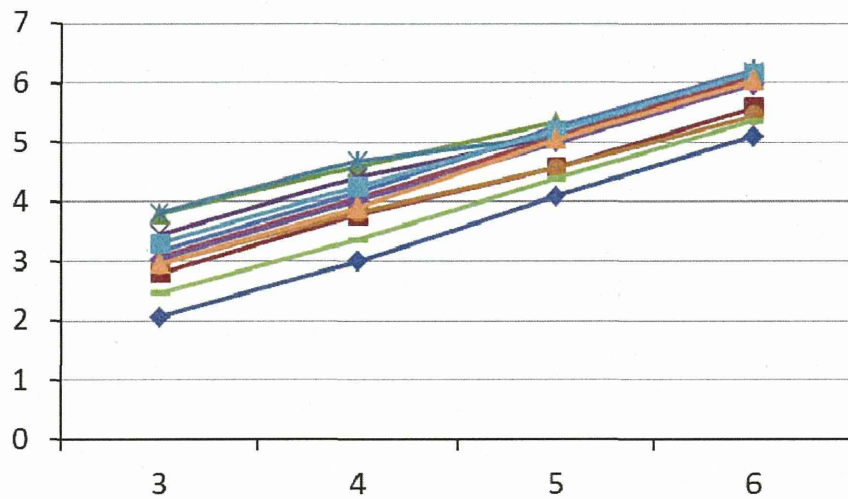


図 15 配布 DNA で作成した検量線で定量した機関 DNA の各濃度の測定値

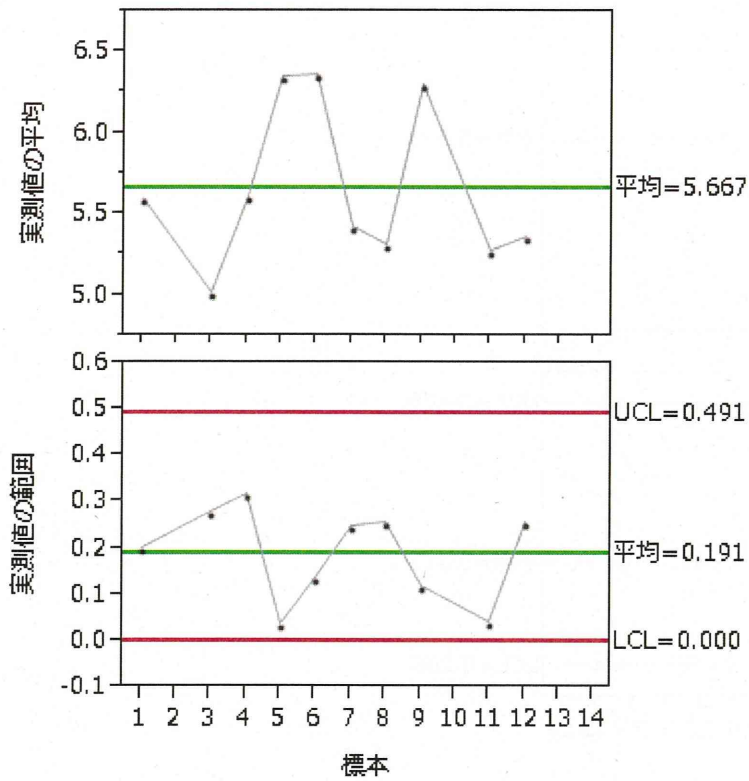


図 16 検体-2 における方法 A、機関 DNA 採用時の Xbar-R 管理図

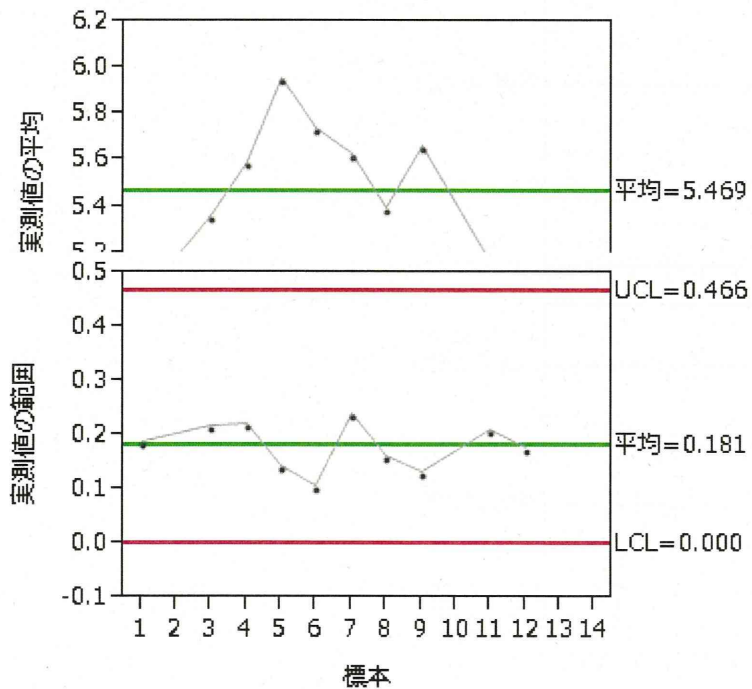


図 17 検体-2 における方法 A、配布 DNA 採用時の Xbar-R 管理図

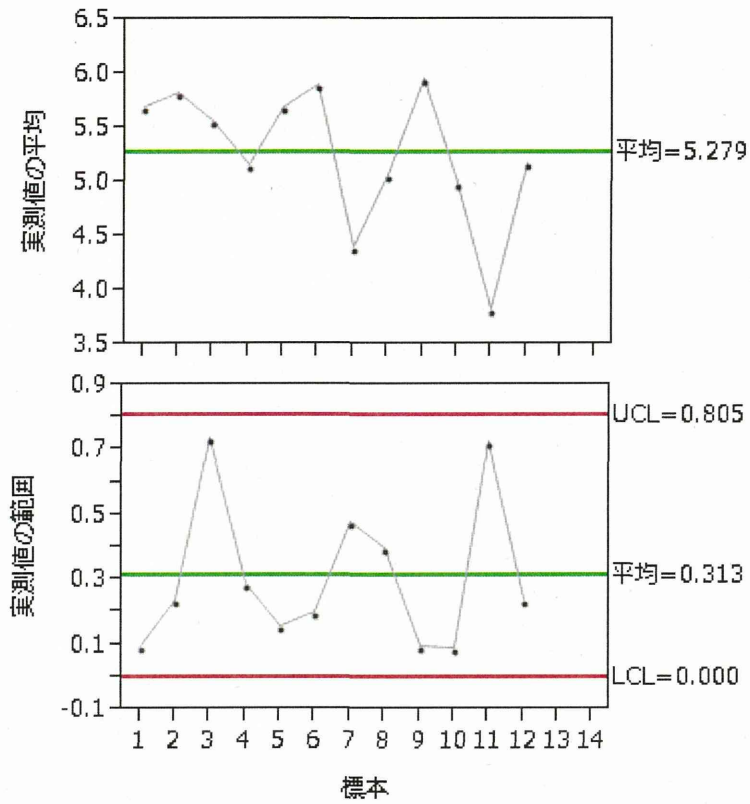


図 18 検体-2 における方法 B、機関 DNA 採用時の Xbar-R 管理図

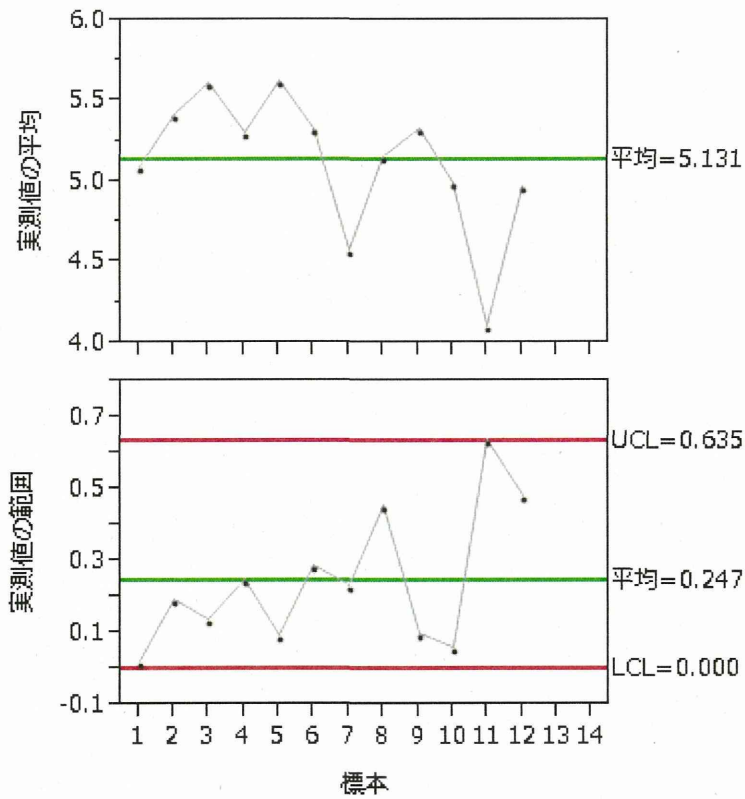


図 19 検体-2 における方法 B、配布 DNA 採用時の Xbar-R 管理図

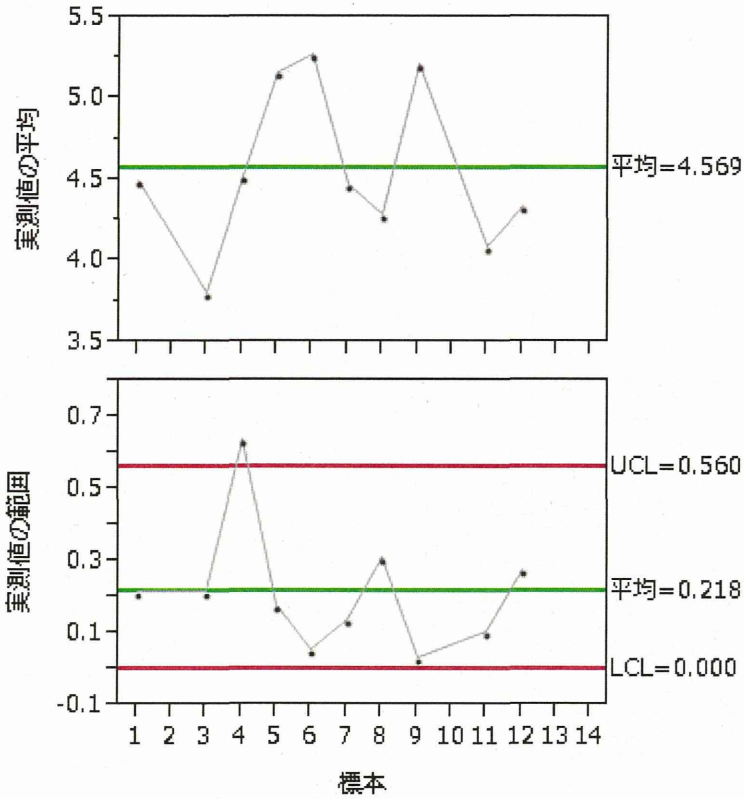


図 20 検体-3 における方法 A、機関 DNA 採用時の Xbar-R 管理図

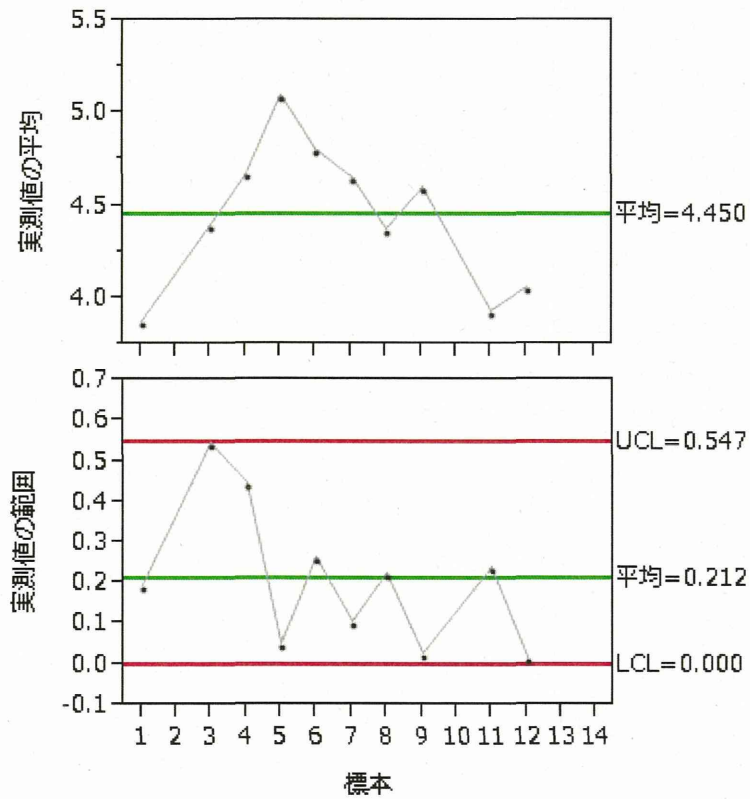


図 21 検体-3 における方法 A、配布 DNA 採用時の Xbar-R 管理図

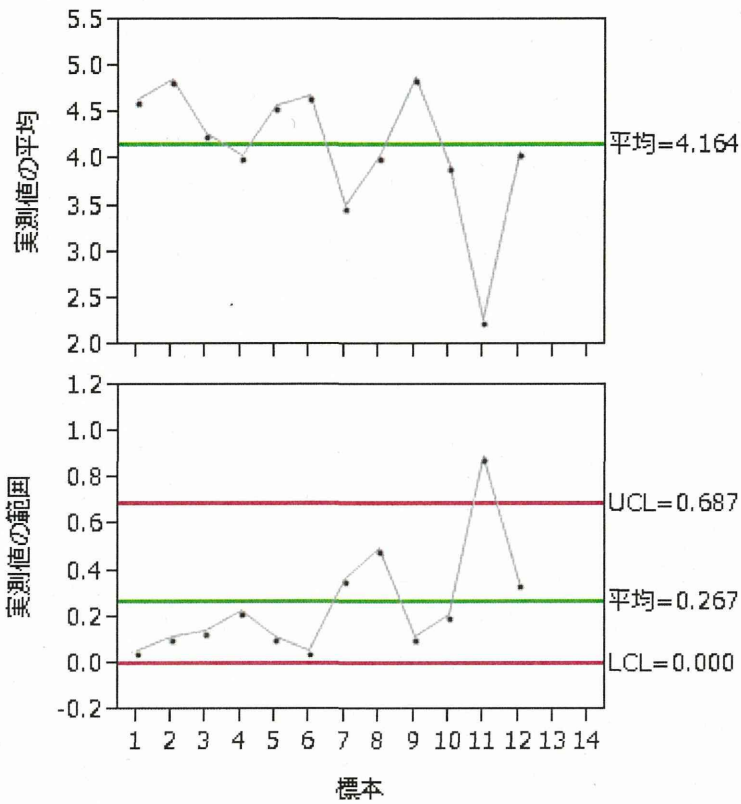


図 22 検体-3 における方法 B、機関 DNA 採用時の Xbar-R 管理図

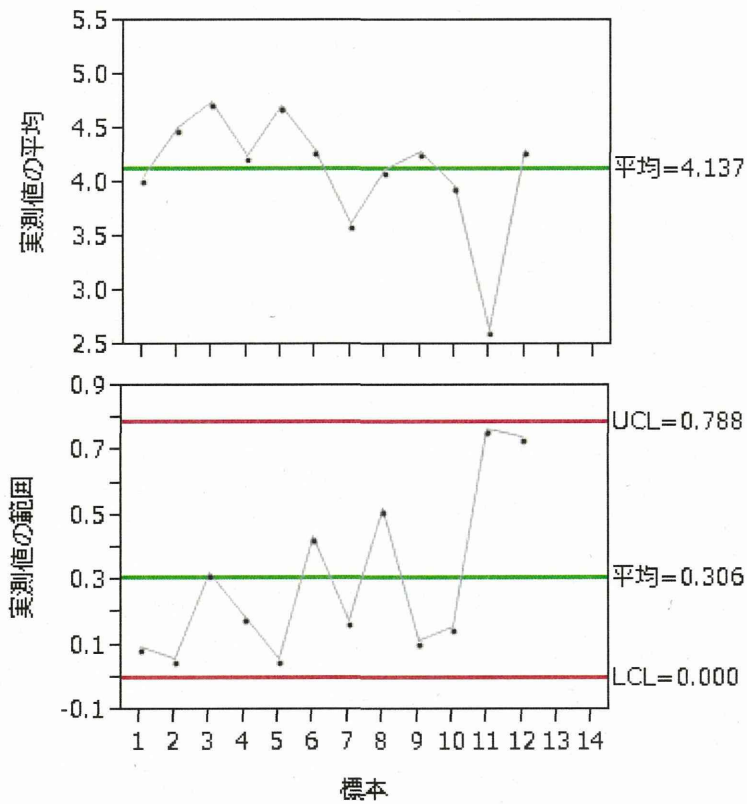


図 23 検体-3 における方法 B、配布 DNA 採用時の Xbar-R 管理図

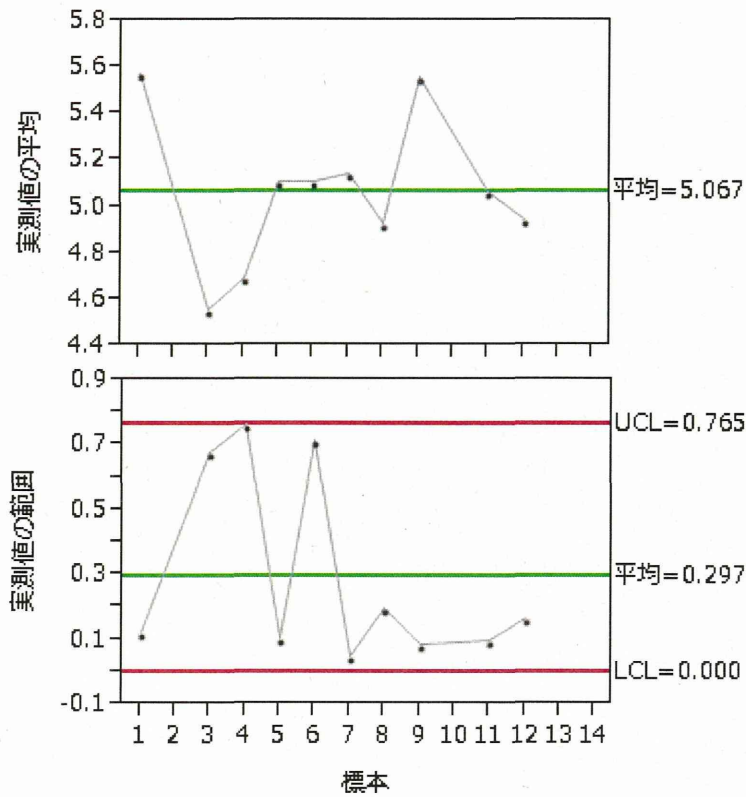


図 24 標準 cDNA 溶液における方法 A、機関 DNA 採用時の Xbar-R 管理図

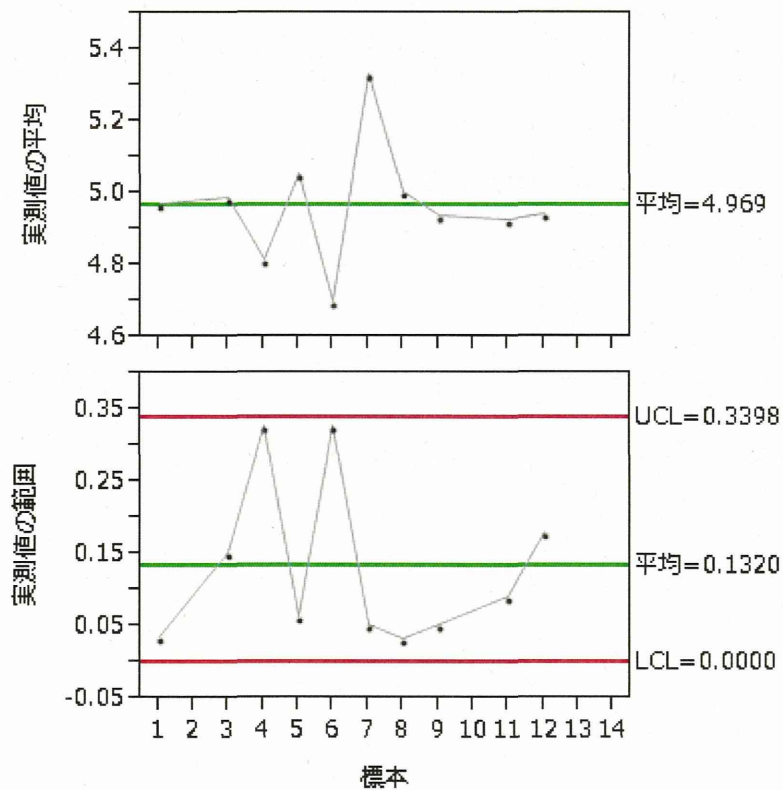


図 25 標準 cDNA 溶液における方法 A、配布 DNA 採用時の Xbar-R 管理図

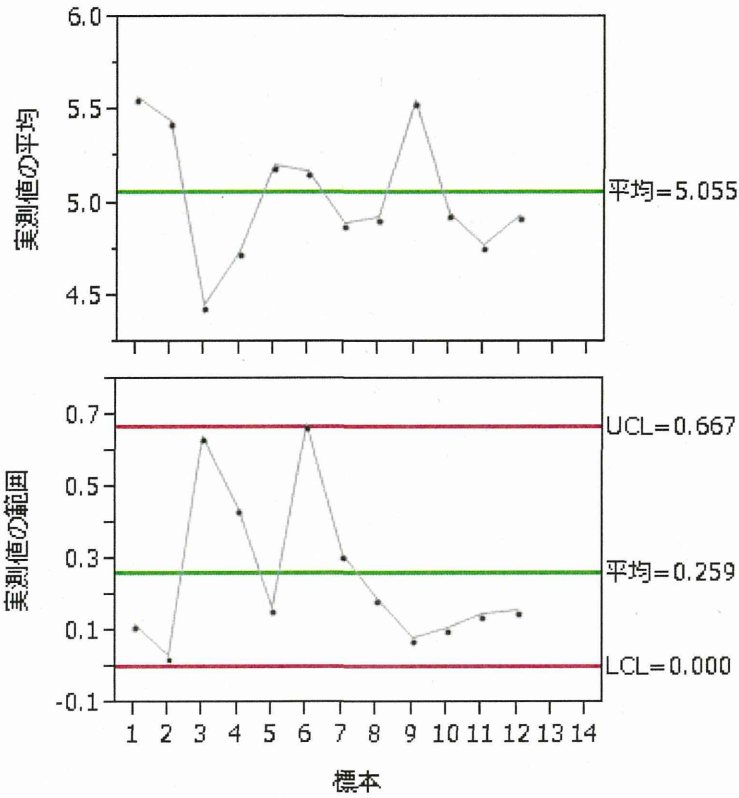


図 26 標準 cDNA 溶液の方法 B、機関 DNA 採用時の Xbar-R 管理図

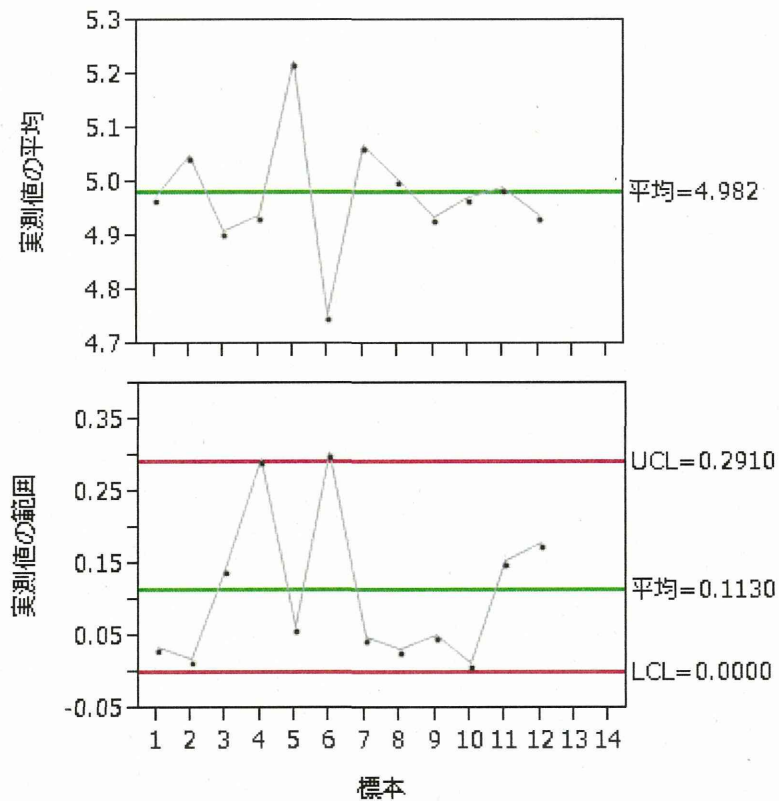


図 27 標準 cDNA 溶液の方法 B、配布 DNA 採用時の Xbar-R 管理図

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」

研究分担報告(研究協力報告総括)

市販カキの食品媒介性ウイルスの汚染調査および 検査法における課題の把握

研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
	重本 直樹	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	斎藤 博之	秋田県健康環境センター
	吉富 秀亮	福岡県保健環境研究所
	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
	筒井 理華	青森県環境保健センター
	山本 美和子	広島市衛生研究所
	小林 慎一	愛知県衛生研究所
	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所

研究要旨

カキの食品媒介性ウイルスの汚染状況および検査法の問題点の把握等を目的として、9自治体において2013年2月に採取された国産の市販生カキ等を対象に、ウイルス検出を試みた。ノロウイルスは73%(41/56)、サポウイルスは26%(13/49)のロットから検出され、A型肝炎ウイルスおよびE型肝炎ウイルスは陰性(それぞれ31, 28ロット検査)であった。加熱調理用カキは生食用カキと比較してノロウイルスの検出率、定量値とも高い値を示した。産地別のノロウイルス検出率は0%~100%で大きく異なった。ノロウイルス遺伝子群ごとの検体別検出率およびリアルタイムPCR法による平均定量値はGIが30%, 262コピー数/g, GIIが59%, 2,747コピー数/gで、GIIが高い検出率、定量値を示した。検出ウイルスの遺伝子型はノロウイルスGIが7種類, GIIが9種類に分類され、その42%はGII/4 2012変異株が占めた。サポウイルスはGI.2が大半を占めた。リアルタイムPCR法の定量値とnested PCR法の結果を比較すると、陽性基準である10コピー/g以上を示した検体は、nested PCR法陽性検体のうち、GIは6.9%(2/29), GIIは42.1%(24/57)に過ぎず、リアルタイムPCR法では偽陰性となる場合が多かった。以上の結果から、ノロウイルスの流行期における市販カキのノロウイルス汚染リスクは極めて高いことおよび現在の陽性基準に基づくリアルタイムPCR法ではカキの安全性の確保は困難であることが示された。

なお、本研究の詳細については、各研究協力報告に取りまとめられている。