

令和2-4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）
「食品微生物試験法の国際調和のための研究」
分担総合研究報告書

食品からのウイルス検出試験法に関する研究

研究分担者 上間 匡 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 室長

研究要旨

ノロウイルスや A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスに代表される食品媒介性ウイルスによる健康被害は世界的にも大きな課題の一つである。これらのウイルスの多くは、現時点では細胞や実験動物を用いた実験室内での培養が不可能、あるいは困難であるため、食品に対して汚染ウイルスの基準を設けることは難しい現状にある。一方でこれらのウイルスによる健康被害を抑制・防止するためには、汚染食品の流通を制御することが重要と考えられる。本分担研究では、欧米で現在用いられるウイルス標準試験法を確認し、国内試験法との比較を通じ、国際調和に向けて検討が必要と思われる事項を抽出した。抽出された課題として、果実野菜類からのウイルス検出法について、食品処理法、核酸抽出法、PCR による遺伝子検出法について、国内での機器および試薬の入手性、作業手順の確認、および使用試薬類の性能比較を行った。

その結果、ISO 15216-1 等、国際的に承認された試験法に基づく試験手順において、試薬入手性は大きな問題はないこと、また手順の実施についても特に困難な部分がないことが確認できた。一方で試験手順のうち、食品処理、核酸抽出には大きな課題はないものの、PCR による遺伝子検出において、試薬による検出性能に差がある可能性が確認できた。

標準的な食品からのウイルス試験法として整備するためには広く認知される ISO15216-1 等に基づく場合であっても、食品処理、核酸抽出、ウイルス遺伝子検出の各手順において国内で入手が容易な試薬を用い、その性能を評価する必要があることが示された。

A.研究目的

ノロウイルスや A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスは、世界的に食品媒介性病原ウイルスとして認識されている。なかでもノロウイルスは、国内で毎年発生する食中毒において、食中毒患者の半数の原因物質として報告される重要なウイルスである。これらのウイルスに汚染された食品の喫食は健康被害に繋がるおそれがあることから、汚染食品の流通制御は、健康被害低減に直結するといえる。すなわち、生産段階のみならず、食品製造加工段階においてもウイ

ルス汚染実態の把握は、食品の更なる安全性確保に向けて必要な課題であると考えられる。

多くの食品媒介性ウイルスは、現時点では実験室内での実用的な培養法が確立されていないため、食品からのウイルス検出には、リアルタイム PCR 法が採用されている。国内では、食品に対するノロウイルス検出法は、平成 19 年に最終改定され、厚生労働省から示される「ノロウイルスの検出法⁽¹⁾」および「食品衛生検査指針微生物編 2018」

において示されているが、これらは基本的に食中毒対応のために示されているものであり、流通食品を対象としたウイルス試験法は十分には整備されていない状況と思われる。更に、国内試験法については最終改訂から 10 年以上が経過していることを踏まえ、本研究では、欧米における現行のウイルス標準試験法に関する動向を収集・整理した上で、国際調和に向けて、国内試験法で今後検討すべきと思われる事項の抽出を図った。また検討すべき項目として、食品の処理法、核酸抽出法（シリカカラム、磁気ビーズ法）の比較、遺伝子検出のための RT-qPCR 試薬の性能比較を実施したので報告する。

B. 研究方法

1. ウイルス標準試験法に関する情報収集及び国内外比較

国内のウイルス試験法としては、厚生労働省より発出された、「ノロウイルスの検出法（平成 19 年）」「A 型肝炎ウイルスの検出法（平成 21 年）⁽²⁾」、及びこれらを収載している「食品衛生検査指針微生物編 2018」を参考とした。欧米のウイルス試験法については、欧州 ISO/TC34/SC9 及び米国 FDA で作成された ISO15216-1:2017⁽³⁾ 及び FDA Foods program^(4,5)、BAM(Bacteriological Analytical Manual)26B⁽⁶⁾を参照し、試験法間で差異の見られる事項の抽出を図った。

2. 試験法に関わる文献調査

国内で実施されている二枚貝のノロウイルス試験法を含めて、近年報告された学術文献のうち、試験法に関わるものを検索し、考察に用いた。

3. 果実野菜類からのウイルス試験法

3-1. 対象食品

食品のウイルス試験法の食品検体として、欧州 ISO/TC34/SC9 で作成された ISO15216-1:2017⁽²⁾を参考に、果実野菜類検体として一般的な小売店舗で購入可能な市販食品をいた。洗浄処理を実施する検体として冷凍ベリー、拭き取り検体として、ピーマン、パプリカを用いた。

3-2. 添加回収に用いたウイルス

食品検体への添加回収に用いたウイルスとして、A 型肝炎ウイルス(HAV; ATCC VR-1402)、および ISO15216-1 にて工程管理に用いる Mengovirus(ATCC 株 VR-1597、および市販 CeeramTools)、参考としてネコカリシウイルス(FCV; ATCC VR-782)を用いた。

3-3. 食品検体の処理

冷凍ベリー

25g に対してそれぞれのウイルス液を 5uL を添加してウイルス汚染させた。40mL の緩衝液を加え、洗浄操作を行った後、PEG/NaCl 沈殿にて得た沈渣に PBS を加えて、RNA 抽出に供した。

拭き取り

ピーマンまたはパプリカの表面にウイルス液 5uL を滴下したのち、PBS スワブにて拭き取り、RNA 抽出緩衝液にて直接でもみしたのち、RNA 抽出に供した。

3-4. 核酸抽出

ウイルス RNA の抽出は従来より国内で広く実施されているシリカカラム法および磁気ビーズ法にて実施した。RNA 抽出関連試薬および抽出装置を表 1、表 2 に示す。

シリカカラム法では、High Pure Viral RNA kit (Roche 社, 手動操作)、QIAamp

Viral RNA mini kit(QIAGEN, 手動操作) を用い、磁気ビーズ法は Maxwell RSC Virus Total Nucleic Acid Purification kit (Promega 社、機械自動抽出) および NucliSENS magnetic extraction reagents (BioMerieux 社、手動操作) を用いた。

3-5. 遺伝子検出

抽出 RNA を用いて、各ウイルスの遺伝子検出を 1 Step RT-qPCR にて実施し、ウイルス遺伝子が増幅/検知されるサイクル数(Ct 値)の比較を行った。

1 Step RT-qPCR 試薬として 2 種類、RNA UltraSens One-Step Quantitative RT-PCR system (Invitrogen)、TaqMan Fast virus 1-Step Master Mix (Thermofisher Scientific) を比較した。

C. 研究結果

1. 試験法の適用範囲及び対象ウイルス

国内、欧米で用いられる食品からのウイルス標準試験法の概要を表 1 に示した。

対象食品については、生食されるカキを始めとする二枚貝はノロウイルス等の健康被害リスクが高いことを踏まえ、国内、欧米ともに対象食品となっていた。この他、国内試験法では、「他の食品(食品表面)」及び「セミドライトマト」が含まれていたが、後者は A 型肝炎ウイルスの検出対象として示されていた。

欧州では、ISO15216-1:2017(2017 年最終改訂) が標準試験法として示されていた。同試験法では、ソフトフルーツ(ベリー類)、生鮮野菜、ボトル詰めミネラルウォーター、食品表面(食品が接触するハードサーフェスを含む) を適用範囲として、ノロウイルス及び A 型肝炎ウイルスの定量検出

を行う内容となっていた。

米国では、FDA Foods program 及び BAM 法(BAM26B) が標準試験法として採用されていた。前者の試験法は二枚貝及びソフトフルーツ、後者の試験法ではネギ類を対象食品として、ノロウイルス及び A 型肝炎ウイルスの定量検出を行う内容となっていた。

2. 試験法の実施手順

国内及び欧米における標準試験法は共に、①食品の前処理(ウイルス濃縮)、②ウイルス RNA の抽出、③遺伝子検出の 3 工程から構成されていた。以下に各工程の概要を記す。

① 食品の前処理

・二枚貝

国内では、3-10 個体の二枚貝中腸腺から 1.0-1.5g を取り出し、PBS を用いて 10% 乳剤を作成した上で、PEG/NaCl 沈殿を実施する方法が示されていた。

ISO15216-1:2017 では、最低 10 個体の二枚貝中腸腺から 2g を取り出し、ProteinaseK 処理後の遠心上清をウイルス抽出液として扱う方法が示されていた。

BAM 法では、12 個体の中腸腺から 4g を取り出し、蒸留水を用いて 10% 乳剤を作成した上で、超遠心分離によりウイルスを抽出する手法が示されていた。

以上より、試験法間で検体の個数、重量、希釈液組成等に差異が認められたほか、BAM 法では超遠心分離が必要であることが明らかとなった。

・他の食品

国内では、セミドライトマトからの A 型肝炎ウイルスの濃縮法として、同検体 7~10g に 5~10 倍量のリン酸緩衝生理食塩水

(PBS) を加え、15 分間の超音波処理を行った後、ポリエチレングリコール (PEG) を用いた濃度勾配遠心分離 (以下、PEG/NaCl 沈殿) に供する方法が示されていた。

ISO15216-1:2017 では、ソフトフルーツ 25g に対して 40mL の緩衝液を加え、洗浄を行った後、PEG/NaCl 沈殿に供する方法が示されていた。また、ボトル詰めミネラルウォーターについては濾過法が示されていた。

BAM 法では、ソフトフルーツ 50g に対して 50mM グリシン/トリス/6% beef extract 緩衝液 (pH9.5) 30mL、ネギ 50g に対しては同緩衝液 55mL を加え、15 分間 150rpm で振盪後、遠心分離 (12,000 x g, 15 分間) 及び超遠心分離 (170,000 x g, 45 分間) を行う方法が示されていた。

以上より、特に BAM 法については超遠心分離が不可欠であることが見出された。

・ハードサーフェス

国内試験法及び米国 BAM 法ではハードサーフェスを対象とした方法は示されていない状況であったが、ISO 15216-1:2017 では PBS スワブによる 10x10cm の拭き取り手順が示されており、拭き取り後スワブは RNA 抽出用緩衝液を用いて直接手揉みする手順が示されていた。

以上より、食品との接触が想定されるハードサーフェスからのウイルス検出にあたっては、ISO 法を参照する意義が確認された。

②ウイルス RNA の抽出

国内では、前処理後のウイルス抽出液について、シリカカラムを用いた RNA 抽出法が示されていた。

ISO 15216-1:2017 では、免疫磁気ビーズ

を用いた RNA 抽出法が示されていた。

BAM 法では、国内と同様にシリカカラムを用いた抽出法が示されていた。

以上より、国内試験法及び米国 BAM 法ではシリカカラムを用いた抽出法が共通していたのに対し、ISO 法では異なる方法が採用されていた。但し、後者の方法は第三者認証機関による妥当性評価が行われているものであり、国際標準的な手法として妥当であることも確認された。

③遺伝子検出

1) プライマー・プローブ

何れの試験法もリアルタイム PCR 法が示されており、同法の共通性が確認された。

国内及び米国では Kageyama らの報告⁽⁹⁾ にあるリアルタイム PCR 法が採用されていた。一方、ISO15216-1:2017 では、国内及び米国とは異なるプライマー・プローブが示されていた。但し、同法の検出対象領域は、国内及び米国の試験法の検出対象領域に含まれている状況を確認した。

2) 工程

米国 BAM 法および欧州 ISO 法では、1st step RT-qPCR を実施していたのに対し、国内では逆転写反応を実施し、その後合成された cDNA を鋳型とする 2 step RT-qPCR が示されていた。

3) コントロール

定量検出を目的とする ISO 15216-1:2017 では、工程管理コントロールが設定されていたが、国内試験法では同コントロールは設定されていない状況であった。また、BAM 法では、複数或いは単独の試験所での Validation を行う上で有用と思われる、複数のウイルス株が例示されていた。

4) 検証 (Verification)

米国 FDA では、「Guidelines for the detection of microbial pathogens in foods and feeds」⁽¹⁰⁾において、食品媒介性 RNA ウイルスを標的とした試験における検証方法が示されており、その中で使用者は試験所に初めて導入する際には、各 N=6 で被験ウイルスを接種した群と非接種群を用いて、擬陽性・偽陰性反応が出現しないことを検証するよう求めている状況を確認した。

3. RNA 抽出法の比較

3-1. HAV の添加回収結果

冷凍ベリーでの HAV 添加回収実験の結果、シリカカラム、磁気ビーズ法ともに、Ct 値 30 前後であった(図 1 上段)。PBS と HAV を混合して、直接 RNA 抽出を実施した対照群では、Ct 値 23-24 となり、冷凍ベリーでの HAV 添加回収実験は良好な結果を示した。

野菜表面に添加した場合は、Maxwell の自動 RNA 抽出の場合、Ct 値 28 となり、冷凍ベリーよりも良好な回収が可能だった(図 3)。

3-2. Mengovirus の添加回収結果

冷凍ベリーでの Mengovirus(ATCC 株)添加回収実験の結果、Roche 社シリカカラム(Roche)が Ct 値 36-37、QIAGEN 社シリカカラムが Ct 値 31、磁気ビーズ(Maxwell 自動抽出)が 31、磁気ビーズ(BioMerieux)自動抽出が 35、手動抽出が 32-34 となった(図 1 中段)。PBS と混合して、直接 RNA 抽出を実施した対照群では、Roche シリカカラムが 34-39 とばらつきが大きくなり、QIAGEN シリカカラムは 30-32、磁気ビーズ(Maxwell 自動抽出)が 29-34、磁気ビーズ(BioMerieux)自動抽出が 31-35、手動抽出が 32-35 となり、HAV と比較して対照群の回収は大きくばらついた(図 1 中段)。

野菜表面に Mengovirus (Ceeramtools 市販)を添加した場合は、磁気ビーズ(Maxwell 自動抽出)が 29-30、磁気ビーズ(BioMerieux)自動抽出が 28-29 となった(図 3)。

3-3. FCV の添加回収結果

冷凍ベリーでの FCV 添加回収実験の結果、シリカカラム(Roche)が Ct 値 24-28、QIAGEN シリカカラムが 26-28、磁気ビーズ(Maxwell 自動抽出)が 25-27、磁気ビーズ(BioMerieux)自動抽出が 27、手動抽出が 25-28 となった(図 1 下段)。PBS と混合して、直接 RNA 抽出を実施した対照群では、シリカカラム(Roche)が 25-26 となり、QIAGEN シリカカラムが 25、磁気ビーズ(Maxwell 自動抽出)が 22-25、磁気ビーズ(BioMerieux)自動抽出が 24-25、手動抽出が 25-28 となった。

野菜表面に FCV を添加した場合は、磁気ビーズ(Maxwell 自動抽出)が 28-29、磁気ビーズ(BioMerieux)自動抽出が 27-29 となった(図 3)。

4. 1 Step RT-qPCR 試薬の比較

Promega 社磁気ビーズ法、QIAGEN 社シリカカラムにて抽出した RNA を用いて、1 Step RT-qPCR 試薬の比較(RNA UltraSens, TaqMan)を実施した(図 2)。

4-1. HAV の検出性能

ウイルスを 1000 倍希釈して添加回収を実施した場合に、ウイルス検出率は TaqMan 使用時に Promega 社磁気ビーズ 6/16、QIAGEN 社シリカカラムが 4/4 となった。一方で UltraSens 使用時には検出不可(0/4)となった。100 倍希釈したウイルスを用いる場合、TaqMan は問題なくウイルス検出でき

たが、UltraSens は不検出 (0/4) となった。ウイルス液原液の野菜への添加回収および、PBS への混合した場合は、ともに検出される結果となった。

4-2. Mengovirus の検出性能

工程管理に用いる Mengovirus を添加回収した場合、ウイルス原液を用いたときに UltraSens では Promega 社磁気ビーズで 0/4、QIAGEN 社シリカカラムで 0/11 と検出できなかった。TaqMan では、ウイルス原液の添加回収で Promega 社磁気ビーズで 14/20、QIAGEN 社シリカカラムで 12/12 となった。

4-3. FCV の検出性能

FCV の添加回収では、UltraSens の検出率は QIAGEN シリカカラムでウイルス原液 2/3、その他の PBS との混合、100 倍、1000 倍希釈ともに未検出 (0/3、0/4、0/4) となった。

D. 考察

1. 国際比較

国内試験法は、食中毒対応を念頭においた試験法である一方、欧州の ISO や米国の FDA Foods program や BAM 等では、流通食品や製造施設環境を対象とした定量試験法が近年整備されている状況が確認された。

こうした欧米での動向の背景には、食品媒介性ウイルスによる健康被害低減に向けて、汚染食品の流通制御が重要な課題と捉えられているためと思われる。実際に、欧米では二枚貝のほか、生鮮野菜やソフトフルーツ等の流通食品を対象としたウイルス試験法が輸出入食品に対しても適用される状況となっている。従って、国際調和を果たすためには、国内での定量試験法の整備は今後検討すべき課題と考えられる。

ウイルスの培養法は平準化されていない

ため、現時点では欧米を含め、食品中のウイルスの基準値は設定されていない。しかしながら、定量試験では定量値が記録され、健康被害の発生データを基とした今後の解析を想定した場合には、将来的に何らかの基準提案が行われる可能性もあると思われる。

試験法として今後検討すべき項目について調査した結果として、食品マトリックスを捉えた場合、カキ等の二枚貝については、ISO 15216-1:2017 と国内通知法間での妥当性が最近になって確認されており⁽¹¹⁾、本研究での検討対象として優先的位置づけにはないものと考えられた。また、他の食品のうち、セミドライトマト表面からの試験は国内では A 型肝炎ウイルス検出に限定され、ノロウイルス等での利用実績は文献調査からは見出せなかったことから、ノロウイルスの濃縮効率や ISO 法との成績比較に関する検証は今後検討すべき項目であろう。

このほか、食品が接触する施設等の表面からのウイルス試験法は、国内では未整備であった。ISO 法を参考とした評価の実施は、食中毒事件の原因施設における調査等へ活用し得るものと推察される。但し、食中毒対応を主眼においた場合には、定量性を求めるよりも、検出感度及び精度の確保を重視した検討が必要と思われる。

ウイルス RNA 抽出工程では米国と国内の試験法では明確な差異は認められず、特段改良に向けた検討を進める必然性は想定し難い状況であることが確認された。

遺伝子検出工程では、プライマー/プローブを変更する必然性はないと判断されたが、定量検出を主眼においた場合には、1 step RT-qPCR やコントロールの設定等、幾つか

の課題が見出された。試験法の検証方法として、米国 FDA ガイドラインは参照に値するものと考えられた。

2. 食品からのウイルス検出法実施手順の検証

2-1. 核酸抽出法について

これまで、ウイルス RNA の抽出は主にシリカカラム法で実施されてきたが、新型コロナウイルスパンデミックの影響をうけて自動抽出装置が導入されていることも考慮し、シリカカラム法、磁気ビーズ法、自動抽出、手動抽出の比較を実施した。

IS015216-1 で例示される自動抽出装置 (BioMerieux MiniMAG) はすでに生産終了となり入手不可の状況であるが、IS015216-1 例示 RNA 抽出試薬である BioMerieux NucliSENS は入手可能で、手動抽出も可能であるほか、自動抽出装置として Maelstrom-8 (TANBead 社) が国内入手可能であったが、令和 5 年 3 月の時点で Maelstrom-8 は終売予定とアナウンスがあった。また、Promega 社の自動抽出装置および試薬 (Maxwell RSC) は、国内流通状況も良好であった。以上より、令和 5 年 3 月時点において、本研究で検証できた磁気ビーズによる自動抽出は Promega 社装置のみが国内入手可能と考えられた。他社からも同様の装置は販売されていることから、国内流通している装置について引き続き検証作業を行うことが有用である。

2-2. 1Step RT-qPCR 試薬について

1 Step RT-qPCR の試薬については、IS015261-1 に例示される UltraSens (invitrogen 社) は新型コロナウイルスパンデミックの影響で、世界的に供給不足となっているが、TaqMan Fast Virus

1 Step Master Mix (ThermoFisher 社) は同等の性能を示す試薬でありながら、供給も潤沢であり入手に問題はなかった。しかしながら、本研究の検証において両者の検出性能には大きな差があることが確認された。工程管理に用いる Mengovirus は基本的に希釈せずに添加回収することを想定しているが、UltraSens では磁気ビーズ、シリカカラムどちらの核酸抽出法でも Mengovirus 遺伝子を検出できなかった。また HAV、FCV の添加回収実験においても、UltraSens は TaqMan に比較して検出性能が大きく劣る結果となった。

添加回収に用いるウイルスとしては、HAV および Mengovirus (ATCC 株、CeeramTools 市販品) を想定しており、添加回収実験の結果も良好であった。一方で、Mengovirus (CeeramTools) は IS015216-1 準拠製品として欧州含めた海外では広く流通しているが、国内在庫はなく入手に時間を要するという課題があった。

現時点で国内入手できる試薬及び装置を利用し、HAV および工程管理用に Mengovirus をもちいることで、多機関参加によるラボ間再現性の確認は可能と考えられた。但し、シリカカラム法は磁気ビーズ法に比べて Ct 値が大きい傾向にあること、また、手動抽出が自動抽出に比べてばらつきが大きくなる可能性を示したことから、各ラボの定量値の単純比較については、平準化についてさらに検討が必要と考えられた。

IS015216 に例示される試薬で ISO プロトコルに従った場合でも期待される性能を得られない場合があること、標準化にあたって、試薬の性能評価は実施する必要

があることが明らかとなった。

E. 結論

本研究では、欧米における食品媒介性ウイルス標準試験法に関する情報を収集・整理し、国内の現行試験法との比較を通じ、現在国内では適用範囲として設定されていないマトリックスの存在や、前処理法、工程管理のためのコントロールの設定等について今後検討すべき項目を抽出することができた。

ウイルス試験法の標準化に向けて、添加回収実験による予備検討では、果実野菜検体からウイルスを問題なく回収でき、試薬の性能評価も可能であることが確認できた。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 上間匡、南村幸世、朝倉宏「食品からのウイルス検出における核酸抽出法の比較」第118回日本食品衛生学会学術講演会、2022年11月10日、長崎

H.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

I. 参考文献

- (1) 厚生労働省. ノロウイルスの検出法. <https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/dl/031105-1a.pdf>
- (2) 厚生労働省. A型肝炎ウイルスの検出法 https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/091201_01_01.pdf
- (3) International Organization for Standardization (ISO). 2017. ISO15216-1:2017. Microbiology of food chain-horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR-Part1: method for quantification <https://www.iso.org/standard/74263.html>
- (4) US Food and Drug Administration (US-FDA). 2014. FDA Foods program, Concentration, extraction, and detection of norovirus and hepatitis A virus in soft fruits. <https://www.fda.gov/media/114183/download>
- (5) US Food and Drug Administration (US-FDA). FDA Foods program, Concentration, extraction, and detection of norovirus and hepatitis A virus in molluscan shellfish. <https://www.fda.gov/media/114187/download>
- (6) US Food and Drug Administration (US-FDA). 2014. BAM26B, Detection of hepatitis A virus in foods. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods/bam-26b-detection-hepatitis-virus-foods>
- (7) Imamura et al. Interlaboratory evaluation of methods for quantification of norovirus RNA as an alternative use for ISO 15216-1:2017 to conduct Japan baseline survey of oysters. Foodborne pathogens and disease, <https://doi.org/10.1089/fpd.2020.2874>
- (8) Lowther et al. 2019. Validation of EN ISO method 15216-1 quantification of hepatitis A virus and norovirus in food matrices. Int. J. Food Microbiol. 288: 82-90.
- (9) Kageyama et al. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol. 41:1548-57.
- (10) US Food and Drug Administration (US-FDA). 2019. Methods for the detection of microbial pathogens in foods and feeds. Ed. 3.0. <https://www.fda.gov/media/83812/download>
- (11) Imamura S, Shibata S, Kishine M, Kushida A, Uema M, Noda M, Zou B, Kawasaki C, Miura T, Fukunaga Y. 2021. Interlaboratory evaluation of a method for quantification of Norovirus RNA as an alternative use for ISO 15216-1:2017 to conduct Japan baseline survey of oysters. Foodborne Pathog Dis. 18(5):331-6.