

ヒトノロウイルス汚染カキ試料作製手順

宮城県水産技術総合センター

国立医薬品食品衛生研究所

国立感染症研究所

国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所

作製日：2023年3月19日

(最終更新日：2024年3月19日)

はじめに

ノロウイルスは、ヒトに感染し重度の腹痛、嘔吐、下痢を引き起こす食中毒原因ウイルスである。ノロウイルスを原因とする食中毒の患者数は、国内で発生した食中毒患者総数のうち最多であり、そのうちの1割以上がカキ中のノロウイルスを原因とした食中毒であると推察されている。また、カキはノロウイルスに汚染されていると消費者に広く知られていることにより、消費への影響が懸念されている。

カキなどの二枚貝は、海水中のノロウイルスを取り込んでおり、このことから一定の割合でノロウイルスに汚染されている。カキ生産者は、出荷前のカキを清浄海水等で畜養して、組織内に蓄積された大腸菌などの病原性微生物を排出させており、近年ではこの浄化処理によるノロウイルスの浄化も試みられている。しかし、浄化処理に関する温度や畜養条件は生産者がこれまでの経験から設定しており、生産者ごとに異なっている。さらに、浄化処理が実際にノロウイルスの低減につながっているか検証した試験はほとんど行われておらず、科学的に信頼できるデータの蓄積が必要になっている。

本手順書の内容は、令和2年度から4年度まで実施された農林水産省事業課題、安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業短期課題解決型研究「カキ中のノロウイルス低減対策に関する研究」の実施成果から、ヒトノロウイルス汚染カキ試料作製について手順をまとめたものである。本手順書の内容が、公設試験研究機関等における食中毒リスクの少ない安全なカキ生産技術の開発や、適切なカキの衛生対策の実施に活用されることが期待される。

構成

- 1 基本的な注意事項
- 2 使用する代表的な資材
- 3 ヒトノロウイルス汚染カキ試料作製
- 4 試料作製終了後の滅菌処置
- 5 汚染条件の検討
- 6 ノロウイルスの検出法
- 7 参考情報
- 8 チェックリスト

【別添資料】 ノロウイルスの感染性推定遺伝子検査法 操作手順

1 基本的な注意事項

- (1) 実験時は手袋、マスク、実験衣を着用し、作業者の安全を確保するよう適切な安全対策に留意する。
- (2) ウイルス液は微量のため、飛沫等が発生しないように取り扱いに注意する。
- (3) 作業台等にウイルス液が付着した場合は、速やかに次亜塩素酸ナトリウム液を噴霧してペーパー等でふき取る。

2 使用する代表的な資材（実験1回分）

(1) 試料の作製

- ア FRP製水槽 丸型（容量 3.3m³） 1台
- イ ポリカーボネイト円形水槽（容量 200L） 1台
- ウ 軟質ビニールチューブ 口径 4×6 mm
- エ エアストーン 50φ ホース口 4 mm 2個
（必要な場合：エアレーションポンプ(参考最大風量 7 L/min)
- オ サーモヒーター&サーモスタット 1000 W セット 1セット
- カ 園芸支柱（籠吊り下げ用）直径 11 mm×120 cm 2本
- キ 養殖籠 直径 上枠 39cm 下枠 45cm 2個
- ク 発泡スチロール（水槽の蓋用） 縦 1 m×横 1 m 1枚
- ケ 蓋つきバケツ 1個（15L）

(2) 実験機材の滅菌処理用の資材

- ア 次亜塩素酸ナトリウム溶液 濃度 12%
- イ チオ硫酸ナトリウム溶液 濃度 30%
- ウ オートクレーブバッグ
- エ オートクレーブ
- オ コンテナ（足踏消毒用）縦 359mm×横 259mm×高さ 140mm
- カ 霧吹き

3 ヒトノロウイルス汚染カキ試料作製

令和2-4年度包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業短期課題解決型研究「カキ中のノロウイルス低減対策に関する研究」において、カキがノロウイルスを取り込む条件を検討した。その結果、以下に示す条件が汚染カキ作製に好ましいと考えられた。

	基本条件
エアー	あり
水温	10-20℃*
pH	8.1 (調整なし)
餌	無
塩分濃度	30 (調整なし)
時間	48時間

*本手順書においては、20℃設定を提案する。

- (1) FRP水槽内や水槽の周囲に、次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素濃度1,000ppm)を入れた踏込消毒水槽や霧吹きを準備する。



踏込消毒水槽



霧吹

- (2) FRP製水槽内に200Lポリカーボネイト円形水槽を設置する。



水槽設置図

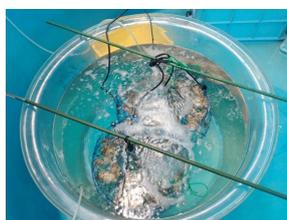
- (3) 設置した200L水槽に砂ろ過海水を175L貯め、エアーストーン2個で微通気を施し、サーモヒーターで20℃に調温する。

- (4) 養殖籠2つに殻付きカキを35個ずつ(計70個)入れ、(1)で準備した水槽にそ

それぞれの籠が上下段になるように園芸支柱に吊るして収容し、1日以上(1-3日間)馴致する。なお、上下の籠は重なる部分が少なくなるように配置する。



養殖籠収容図



水槽収容図（平面）



水槽収容図（側面）

(5) 馴致後、水槽にウイルスを添加し、発泡スチロールで蓋をする。添加するウイルス量は、作製したい汚染カキ濃度に応じて**5 汚染条件の検討**の表を参考に決定する。

* 添加時はウイルス飛散防止のため通気を止める。



蓋設置図

(6) ウイルスを添加した24時間後に、再度ウイルスを添加する。

* 添加時はウイルス飛散防止のため通気を止める。

(7) (6)でウイルスを添加した24時間後に、ヒーターを切り、通気を止めてから蓋を外し、カキを水槽から取り出し、蓋つきバケツに入れる。



平面図

(8) 以降のサンプル処理は別添【ノロウイルスの感染性推定遺伝子検査法操作手順】を参考に行う。

4 試料作製終了後の滅菌処置（汚染した不要なカキの処理を含む）

(1) 水槽にカキを入れた状態で、次亜塩素酸ナトリウムを終濃度が有効塩素濃度

- 1,000ppm になるように添加し、蓋をして 15 分間通気して止める。
- (2) 水槽の周囲、水槽の縁、水槽の蓋等を霧吹きに入れた有効塩濃度 1,000ppm の次亜塩素酸ナトリウム溶液を噴霧して滅菌する。
 - (3) 1 時間以上静置した後、水槽にチオ硫酸ナトリウム溶液（おおよそ塩素添加量の 2 分 1 量）を添加し、通気して塩素を中和する。
 - (4) 塩素の中和完了後、カキを水槽から取り出し、オートクレーブバッグに入れる。
* カキの突起により袋が破れるため、3 重にすると良い。
 - (5) 袋詰めしたものをオートクレーブして滅菌を完了する。
 - (6) オートクレーブ滅菌後は各種規制に従い、各施設の責任において処理する。

5 汚染条件の検討

令和 2 年度から 4 年度にかけて、ノロウイルス GII.4、GII.17、GI.7 の 3 つの型を用いてウイルス汚染カキを作製した。上記に記載した方法で、1 回の実験を 2～4 回反復した。

ウイルスの水槽中の終濃度と中腸腺中のウイルス取込量 (log copies/g、実験毎の平均値)、陽性率 (%、実験毎の陽性率) を表 1～6 に示した。検出は「定量下限値以下」、ND は「不検出」、横線は「実験未実施」の意味である。

- * カキによるウイルスの蓄積効率については、カキの産地やウイルスの遺伝子型及びロットにより影響され、季節変動の影響も考えられうる。特に、夏季における産卵直後のミズガキはウイルスを取り込まないことが明らかになっている。また、今回は試験的に個別に検出しているが、検査時には 3～10 個程の検体（中腸腺）を合わせて 1 検体として分析する。
- * 本実験方法で安定的にノロウイルス汚染カキを作成するには、ノロウイルス GII.4 では終濃度 7.2log copies/L 以上、ノロウイルス GII.17 では終濃度 4.8log copies/L 以上、ノロウイルス GI.7 では終濃度 6.8log copies/L 以上のウイルスを接種する必要がある。

表1 ノロウイルス GII.4 中腸腺中の平均ウイルス陽性率 (%)

終濃度 (log copies/L)	実験月								
	1月		2月		3月		4月	6月	9月
	下旬	上旬	上旬	下旬	下旬	下旬	下旬	上旬	
2.8	-	ND	-	-	-	-	-	-	
4.8	ND	ND	-	-	16.7	-	-	-	
5.8	25.0~50.0	-	-	-	-	25.0	6.7	-	
6.8	-	-	-	55.0~85.0	-	75.0	-	-	
7.2	-	-	94.4~100.0	88.9	-	-	-	-	

表2 ノロウイルス GII.4 中腸腺中の平均ウイルス取込量 (log copies/g)

終濃度 (log copies/L)	実験月								
	1月		2月		3月		4月	6月	9月
	下旬	上旬	上旬	下旬	下旬	下旬	下旬	上旬	
2.8	-	ND	-	-	-	-	-	-	
4.8	ND	ND	-	-	検出	-	-	-	
5.8	検出~4.8	-	-	-	-	3.8	検出	-	
6.8	-	-	-	4.8~5.6	-	4.7	-	-	
7.2	-	-	4.8~5.3	5.0	-	-	-	-	

表3 ノロウイルス GII.17 中腸腺中の平均ウイルス陽性率 (%)

終濃度 (log copies/L)	実験月			
	11月		12月	
	上旬	下旬	上旬	下旬
3.8	-	-	62.5	12.5
4.8	75.0	62.5	87.5	-
5.8	100.0	-	100.0	-

表4 ノロウイルス GII.17 中腸腺中の平均ウイルス取込量 (log copies/g)

終濃度 (log copies/L)	実験月			
	11月		12月	
	上旬	下旬	上旬	下旬
3.8	-	-	5.5	検出
4.8	4.5~5.0	5.7	5.5	-
5.8	5.8~5.9	-	5.8	-

表5 ノロウイルス G I.7 中腸腺中の平均ウイルス陽性率 (%)

終濃度 (log copies/L)	実験月		
	1月	2月	12月
	上旬	下旬	下旬
3.8	12.5	-	-
4.8	-	11.1~16.7	100
6.8	77.8	-	83.3~100.0

表6 ノロウイルス G I.7 中腸腺中の平均ウイルス取込量 (log copies/g)

終濃度 (log copies/L)	実験月		
	1月	2月	12月
	上旬	下旬	下旬
3.8	検出	-	-
4.8	-	検出	6.3~6.4
6.8	4.7	-	4.3~4.7

【参考】

25 L の海水に 13-25 個のカキを並べても汚染カキを作製することができる。このような小規模試験を実施した結果について、参考として掲載する。汚染カキの作製方法は、上記のとおりである。

表 7 ノロウイルス GI.7 中腸腺中の平均ウイルス陽性率(%)

終濃度 log copies/L	試験月									
	1月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	
3.5	-	-	-	-	-	-	11	-	-	
4.5	16.7	-	-	67	0	11	78	89-100	-	
5.5	-	100	100	-	0	29	89-100	-	100	

表 8 ノロウイルス GI.7 中腸腺中の平均ウイルス取込量(log copies/g)

終濃度 log copies/L	試験月									
	1月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	
3.5	-	-	-	-	-	-	5.4	-	-	
4.5	4.5	-	-	5.3	ND	ND-4.5	5.3	6.1	-	
5.5	-	5.6	6.7	-	ND	ND-6.3	5.7-6.8	-	7.1-7.8	

表 9 ノロウイルス GII.17 中腸腺中の平均ウイルス陽性率(%)

終濃度 log copies/L	試験月									
	1月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	
3.4	-	-	-	-	-	-	11	-	-	
4.1	-	-	-	-	-	-	-	89-100	-	
4.4	-	-	-	67	-	22	89	100	-	
5.1	83-100	-	-	-	-	-	-	-	88-100	
5.4	-	78	87	-	100	33-44	56-67	-	-	

表 10 ノロウイルス GII.17 中腸腺中の平均ウイルス取込量(log copies/g)

終濃度 log copies/L	試験月									
	1月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	
3.4	-	-	-	-	-	-	4.8	-	-	
4.1	-	-	-	-	-	-	-	6.0-7.0	-	
4.4	-	-	-	6.1	-	5.3	6.5	5.9	-	
5.1	5.4-5.6	-	-	-	-	-	-	-	6.1-6.3	
5.4	-	6	6.7	-	5.8	5.6	6.2	-	-	

6 ノロウイルスの検出法

カキ中のヒトノロウイルスの検査法には、感染性推定遺伝子検査法、厚生労働省の通知法、改良法、ISO 法等がある。本試験は感染性推定遺伝子検査法(別添)により行った。この試験を始める前に、本研究課題で用いる定量法による回収率を求めた。具体的には、未汚染カキの中腸腺を取り出してネコカリシウイルスを接種し感染性推定遺伝子検査法と同一の RNA 抽出、dT プライマーを用いた逆転写、リアルタイム PCR に供した。接種したネコカリシウイルス液からも、同様の条件で RNA を抽出し、逆転写反応とリアルタイム PCR に供した。リアルタイム PCR のプライマーは野田らの報告書に記載のものを使用した¹⁾。カキ中腸腺からの定量値と接種したウイルス検体の定量値の差から、本課題で用いる定量法の回収率を計算した。回収率はおよそ 20%であった。そのため、本報告データはカキ中腸腺中のノロウイルス量を定量する際に、回収率から数字を補正した。

本手順書に掲載されている試験結果は、ネコカリシウイルスを工程管理ウイルスとして用いて実施された。感染性遺伝子推定検査法(別添資料)の工程管理ウイルスとしてはネコカリシウイルスが使用されており、他の検査法において工程管理ウイルスとして使用されているマウスノロウイルス(MNV)や Mengo ウイルスを、同検査法の工程管理に適用できるかについての検証は実施されていない。

- 1) 食品のウイルス汚染のリスク評価のための遺伝子検査法の開発と応用に関する研究
研究成果報告書

<https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=cho99920131203&fileId=1203>

7 参考情報

包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業短期課題解決型研究「カキ中のノロウイルス低減対策に関する研究」最終年度報告書

ノロウイルスの検出法について：食安監発第 0514004 号（食安監発第 1105001 号）

<https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html>

別添 ノロウイルスの検出法：厚生労働省

<https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/dl/031105-1a.pdf>

食品のウイルス汚染のリスク評価のための遺伝子検査法の開発と応用に関する研究

<http://www.fsc.go.jp/fsciis/technicalResearch/show/cho99920131203>

ISO 15216 に準拠した検査法（ISO 法）に関する検討結果について

https://www.maff.go.jp/j/shokusan/hq/i-4/attach/pdf/yusyutu_shinsei_asia-375.pdf

ISO 15216-1 に基づくノロウイルス検査法の導入に向けた取組について

https://www.maff.go.jp/j/study/nov_oysters_survey_committee/attach/pdf/5th_time-3.pdf

カキのノロウイルスの国内及び国際的検査法(ISO 15216)に係る性能比較

日本食品微生物学会雑誌 Jpn. J. Food Microbiol., 39(2), 83–86, 2022

病原体検出マニュアル ノロウイルス（第 1 版）：国立感染症研究所

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Norovirus20190611.pdf>

8 チェックリスト

区分	No.	項 目	チェック	備考
水槽準備	1	FRP円形水槽に200L円形水槽を設置する。		
	2	200L円形水槽にろ過海水を175L貯める。		
	3	水槽にエアーストーンを2個設置し微通気する。		
	4	水温をサーモヒーターで20°Cに調温する。		
	5	養殖籠2つに殻付きカキを35個ずつ（計70個）収容する。		
	6	カキ収容籠を園芸支柱に吊るし、上下段で水槽に設置する。		
	7	設置したカキを1～3日間馴致する。		
ウイルス添加	8	ウイルス添加前に通気を止める。		
	9	ウイルスを水槽に添加し、発砲で蓋をする。		
	10	通気を開始する。		
	11	ウイルスを添加した24時間後に通気を止める。		
	12	再度ウイルスを水槽に添加し、発砲で蓋をする。		
	13	通気を開始する。		
サンプリング	14	再度ウイルスを添加した24時間後に通気を止める。		
	15	サーモヒーターの電源を切る。		
	16	蓋を外して、カキを水槽から静かに取り出す。		
	17	取り出したカキは蓋つきバケツに収容する。		
滅菌処置	18	水槽に次亜塩素酸ナトリウム溶液を終濃度が1000ppmになるように添加する。		
	19	蓋をして通気を15分間行う。		
	20	通気開始15分後、通気を止め1時間以上静置する。		
	21	水槽の周囲、水槽の縁、水槽の蓋等に次亜塩素酸ナトリウムを散布する。		
	22	静置後、チオ硫酸ナトリウム溶液を添加し、通気して塩素を中和する。		
	23	塩素の中和が完了後、水槽の水を捨てる。		
	24	水槽からカキを取り出し、オートクレーブバックに袋詰めする。		
	25	袋詰めしたものをオートクレーブして滅菌を完了する。		
	26	オートクレーブ滅菌後は各種規制に従い、各施設の責任において処理する。		

ノロウイルスの感染性推定遺伝子検査法 操作手順

1 各工程に必要な試薬

(1) 試料の調製・前処理

- ア α -Amylase
No. 017-26371 (Wako)
- イ Polyethylene Glycol 6,000
No. 169-22945 (Wako)
- ウ Sodium Chloride
No. 191-01665 (Wako)
- エ Zwittergent® 3-14 Detergent
No. 693017-5GM (Calbiochem)
- オ RNase ONE™ Ribonuclease
No. M426A (Promega)
- カ Distilled Water, Deionized, Sterile
No. 318-90105 (Nippon Gene)
- キ 10 x PBS Buffer
No. 314-90185 (Nippon Gene)
- ク Glycerine
No. 075-00616 (Wako)

(2) RNA 抽出・DNase 処理

- ア High Pure Viral RNA Kit
No.11858882001 (Roche)
- イ RTmate
No.315-05941 (Nippon Gene)
- ウ DNase I recombinant, RNase-free
No. 04716728001 (Roche)

(3) cDNA 合成 (逆転写反応)

- ア High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits
No. 4358814 (Appliedbiosystems)
もしくは
Prime script RT reagent kit (タカラバイオ)
No.RR037A
- イ Oligo (dT)12-18
No. 18418-012 (Appliedbiosystems)

2 使用する代表的な機材・用具

サンプリングバック
ヘラ
ハサミ
メス
フェザーナイフ
ピンセット
ろ紙
葉さじ
メスシリンダー
遠心管
エッペンドルフチューブ
孔径 0.22 μm の滅菌フィルター
チップ

3 試料の調製・前処理

- (1) 殻付きのカキはヘラ、メス等で貝柱を切り、殻を開く。
- (2) カキの外套膜を取り除き、中腸腺の周りに付いているグリコーゲンや脂質を含む白色部分をフェザーナイフ、ハサミ等で可能な限り取り除く。
- (3) カキから中腸腺を全部摘出し、試験に供する試料とする。この時できる限り周りの白色の組織を取り除く。
 - * 研究用にカキを個体別に分析することもあるが、検査時には3~10個程の検体（中腸腺）を合わせて1検体として分析する。
- (4) ホモジナイザーまたはストマッカー用のサンプリングバッグに中腸腺を入れ、9倍量のPBS(-)（例：中腸腺 1 g に 9 mL のPBS(-)）を加えホモジナイズする。この時、ストマッカーでは十分に懸濁できないことがあるため、ローラーなどを用いて十分に懸濁する。
- (5) ホモジナイズした試料を 15 mL 容の遠心管に移す。なお、上清が 15 mL 以上ある場合、10 mL を別の 15 mL 容の遠心管に採取する。その際、使用しなかった上清の容量も記録する。
- (6) ホモジナイズした試料に、 α -Amylase 溶液^{*1}の最終濃度が 0.25 mg/mL となるように添加し（例：ホモジナイズした試料 10 mL に対して α -Amylase

溶液 20 μL の割合で添加する)、よく混合後、恒温水槽で 1 時間、37 $^{\circ}\text{C}$ の温浴で反応させる。

- (7) 1 時間放置して反応させた懸濁液は、ボルテックスミキサーで攪拌し、均一にしてから、8,000 G で 20 分間 (4 $^{\circ}\text{C}$) 遠心分離する。
- (8) (7) の上清を新たな 15 mL 容の遠心管に採取する。
- (9) 採取した上清 1 mL に対して Polyethylene Glycol 溶液^{*2} を 0.4 mL 加え (例えば、上清が 10 mL ある場合、Polyethylene Glycol 溶液を 4 mL 加える。)、ボルテックスミキサーで十分に混合後、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩放置する。
- (10) 8,000 G で 20 分間 (4 $^{\circ}\text{C}$) 遠心分離し、上清を除去する。沈殿物に 0.5% Zwittergent 添加リン酸緩衝液^{*3} を 400 μL 加え、沈殿物を再浮遊させ、ボルテックスミキサーで十分に混合する。8,000 G で 5 分間 (4 $^{\circ}\text{C}$) 遠心分離した上清を濃縮ウイルス液とする。

※1 α -Amylase 溶液

α -Amylase (Wako 017-26371) 1 g を 15 mL 容の遠心管に入れる。リン酸緩衝液 (10 x PBS Buffer (Nippon Gene 314-90185)) を超純水 (Nippon Gene 318-90105) で 10 倍希釈したもの) 4 mL を加え、よく混合する。8,000 G で 20 分間 (4 $^{\circ}\text{C}$) 遠心分離した上清を別の 15 mL 容の遠心管に移し、孔径 0.22 μm の滅菌フィルターで濾過する。得られたろ液と等量の Glycerine (Wako 075-00616) を加えて混合する。最終溶液を 1.5 mL 容の遠心管に分注し、-80 $^{\circ}\text{C}$ で保管する。

※2 Polyethylene Glycol 溶液

Polyethylene Glycol 6,000 (Wako 169-22945) を 30 g、Sodium Chloride (Wako 191-01665) を 14.61 g それぞれ量りとり、超純水で溶解後 100 mL にメスアップし、高圧蒸気滅菌して常温で保管する。

※3 0.5% Zwittergent 添加リン酸緩衝液

Zwittergent[®] 3-14 Detergent (Calbiochem 693017) 0.5 g をリン酸緩衝液 (10 x PBS Buffer (Nippon Gene 314-90185)) を超純水 (Nippon Gene 318-90105) で 10 倍希釈したもので溶解後、100 mL にメスアップし、高圧蒸気滅菌して常温で保管する。

4 RNase 処理

- (1) 濃縮ウイルス液 70 μL に RNase ONE[™] ribonuclease (Promega M4261) 1.4 μL 、 $\times 10$ Reaction Buffer 10 μL 及び蒸留水 (Takara RNase-free Water 9012) 18.6 μL を加える。混合後、アルミブロック恒温槽で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間放置して反応させる。
- (2) 反応後の溶液にリン酸緩衝液を 100 μL 加えて 200 μL とし、その溶液を

RNA 抽出用検体とする。

5 RNA抽出

- (1) RNA 抽出用検体の全量 (200 μL) に HighPure Viral RNA Kit (Roche 11858882001) の Binding buffer に RTmate を添加したもの^{※1}を 400 μL 加えてボルテックスミキサーでよく混合する。
- (2) 軽くスピンドウンして泡を抜いた後、室温で 10 分間放置する。
- (3) 混合液の全量をカラムに移し、8,000 G で 15 秒遠心する。カラムを新しい 2 mL 容の遠心管に移す。DNase 処理液^{※2} 100 μL をカラムに添加後、室温で 15 分間放置する。
- (4) カラムに Inhibition removal buffer I を 500 μL 添加し、8,000 G で 1 分間遠心する。
- (5) カラムを新しい 2 mL 容の遠心管に移す。
- (6) カラムに Washing buffer を 450 μL 添加し、8,000 G で 1 分間遠心する。
- (7) カラムを新しい 2 mL 容の遠心管に移す。
- (8) カラムに Washing buffer を 450 μL を添加し、8,000 G で 1 分間遠心する。
- (9) 再度、13,000 G で、10 秒間遠心する。
- (10) カラムを新しい滅菌済み 1.5 mL 容の遠心管に移し、カラムフィルター上に Elution buffer を 50 μL 添加する。
- (11) 蓋をして 1 分間、室温放置した後、8,000 G で 1 分間遠心し、溶出液を精製 RNA 液として直ちに逆転写反応を行う。

※1 RTmate添加済みBinding buffer

Binding buffer 400 μL にRTmate (Nippon Gene 315-05941) を 8 μL 添加する。Binding bufferは粘性が高く混ざりにくいため、添加の際にはボルテックスミキサーでよく混合し、軽くスピンドウンして、泡を抜くこと。High Pure Viral RNA Kit(Roche 11858882001)に添付されているキャリアRNAは使用しない。なお、High Pure RNA Isolation Kit(Roche No. 11828665001)であれば、キャリアRNAは添付されていないため代用が可能。

※2 DNase処理液

DNase I recombinant, RNase-free (Roche 04716728001) 1 μL 、
10 \times Incubation buffer 10 μL 及び蒸留水
(Takara RNase-free Water 9012) 89 μL を混合したもの。

6 cDNA 合成 (逆転写反応)

(1)-1 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を

用いる場合

精製 RNA 液 25 μ L に High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems 4368814) の逆転写反応液 25 μ L (10 \times RT Buffer 5 μ L、25 \times dNTP Mix (100 mM) 2 μ L、Reverse Transcriptase 2.5 μ L、滅菌水 15 μ L、Oligo (dT) 12-18 Primer (Invitrogen 18418-012) 0.5 μ L を混合したもの) を加える。

10 \times RT Buffer	5 μ L
25 \times dNTP Mix (100 mM)	2 μ L
Reverse Transcriptase	2.5 μ L
Distilled water	15 μ L
Oligo (dT) 12-18 Primer (Invitrogen)	0.5 μ L
精製 RNA 液	25 μ L
計	50 μ L

(1)-2 Primescript RT reagent kit (タカラバイオ) を用いる場合

精製 RNA 液 25 μ L に Primescript RT reagent kit (タカラバイオ RR037A) の逆転写反応液 25 μ L (5 \times PrimeScript Buffer 10 μ L、PrimeScript RT Enzyme mix 2.5 μ L、Oligo (dT) 12-18 Primer (Invitrogen 18418-012) 0.5 μ L、滅菌水 12 μ L を混合したもの) を加える。

5 \times PrimeScript Buffer	10 μ L
PrimeScript RT Enzyme mix	2.5 μ L
Oligo (dT) 12-18 Primer (Invitrogen)	0.5 μ L
Distilled water	12 μ L
精製 RNA 液	25 μ L
計	50 μ L

- (2) タッピングにより攪拌し、軽くスピンドウンして遠心管壁面についた液体を落とす。
- (3) サーマルサイクラーにより逆転写反応を行う。その際、反応時間は37 $^{\circ}$ C、2時間とする。
- (4) 逆転写反応が終了した溶液を cDNA 溶液とし Realtime PCR による定量試験を行う。保管する場合は、-80 $^{\circ}$ Cとする。

7. Realtime PCRによる定量試験

- (1) Realtime PCR による定量試験

定量試験を実施する場合、「ノロウイルスの検出法について」厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課(平成15年11月5日付け食安監発第1105001号別添 最終改正:平成19年5月14日食安監発第0514004号)に基づく方法を利用することが可能である。その際、6で合成したcDNAを鋳型にすることができる。qPCR試薬には、Norovirus GI/GII typing kit Ver.2(タカラバイオ No. RR265A)もしくはPremix Ex Taq probe qPCR(タカラバイオ No. RR390A)が適している。Norovirus GI/GII typing kit Ver.2には上記方法用のプライマーおよびプローブが含まれている。また、検量線作成用の標準DNAには、*Norovirus* (GI/GII) Positive Control DNA(タカラバイオ No. RR251A)が精度および操作性で優れている。