

## B. 材料と方法

### 1) ネコカリシウイルス添加・回収実験

ネコカリシウイルス (カリシウイルス科 ペジウイルス属、FCV) F9 株を ATCC より購入し用いた。CRFK 細胞 (ネコ腎臓細胞) はダルベッコ変法 MEM (DMEM) にウシ胎児血清 (FBS) を 10% 加えたものを使用し培養・増殖させた。ウイルスの増殖およびウイルス感染価の測定に供した。

FCV 浮遊液を約  $10^6$  TCID<sub>50</sub> / 0.1 ml になるように調整後、10  $\mu$ l を 2.5g の市販各種食品に数箇所に分けて塗付し安全キャビネット内で風乾した。被検試料に 22.5ml (9 倍容) の溶出液を加え、各種溶出方法によりウイルスを再浮遊させた後 3,000 rpm、10 分間遠心し、上清 20 ml をセルストレーナー (70  $\mu$ m, Falcon) のフィルターでろ過後、遠心式限外ろ過ユニット (アミコンウルトラ 15・100K、ミリポア) を用いて 4000 x g にて遠心し、最終容量 0.2 ml に濃縮した。

### 2) ノロウイルス添加・回収実験

患者糞便由来ノロウイルス (GII・4、 $3.6 \times 10^6$  copy / 10  $\mu$ l, NV) およびその 1000 倍希釈ウイルス液を用いて FCV の添加回収実験と同様に行った。

### 3) 溶出液

食品からのウイルス溶出液として、0.85% 生理食塩水、1% 牛肉エキスを加えた Tris-Glycine buffer [100 mM Tris, 50 mM Glycine, 1.0% Beef extract powder (kyokuto), pH 9.5]、Tris-Glycine buffer (pH 9.5) および PBS を滅菌して用いた。

### 4) 食品からのウイルス溶出方法

食品からのウイルス溶出方法としてストマッカー処理 (30 秒)、もみ出し (30 秒)、強振 (30 秒)、振盪 (30 分)、転倒混和 (30 分) 超音波処理 (15 分) を用いた。ストマッカー処

理法は、フィルター付ストマッカー用袋に食品および溶出液を加え、ストマッカー (INSTUMENTS) を用いて 30 秒間ストマッカー処理後フィルター濾過液を回収した。もみ出し法は、フィルター付ストマッカー用袋に食品および溶出液を加え、食品を 30 秒間手でもみフィルター濾過液を回収した。強振法は、遠心管に食品および溶出液を加え 30 秒間上下に強く振った。振盪法は、遠心管に食品および溶出液を加え 70 回/分で、30 分、室温で処理した。転倒混和法は、遠心管に食品および溶出液を加え ROTATOR RT-5 (TAITEC) を用いて 5 回転/min、30 分、室温で処理した。超音波処理法は、遠心管に食品および溶出液を加えて超音波洗浄器 (BRANSONIC® Yamato) を用いて 120 W、15 分、室温で処理した。得られた各食品懸濁液を 4,600 rpm、5 分、室温で遠心し上清を食品溶出液とした。

### 5) リアルタイム PCR 法

食品溶出液および濃縮液から RNA を抽出し逆転写反応を行った後、リアルタイム PCR を行った。TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR は Kageyama らの方法に従って行った。SYBR Green を用いた方法では 25  $\mu$ l の 2xSYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) に 20 pmol のプライマー対と 5  $\mu$ l の cDNA を加え、50  $\mu$ l とした。TaqMan プローブを用いた方法では 25  $\mu$ l の 2xTaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) に 20 pmol のプライマー対、5 pmol の TaqMan プローブおよび 5  $\mu$ l の cDNA を加え、50  $\mu$ l とした。各反応液を ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR 法を行い、7300 System sds software を用いて解析した。PCR 反応は 50°C 2 分間、熱変性 95°C 10 分間の後 95°C 15 秒間、56°C 1 分間を 1 サイクルとして

40 サイクル行った。FCV 用プライマー対は F9-3R:5' -CGATCGGAAAAGTAACGAAGGA-3' および

F9-3F:5' -TGC GGTCGATTATTC CAAATG-3'、TaqMan プローブは F9-3 :FAM5' -TTGACCCCAATCGCCTCGTGTGAG-3' TAMRA を用いた。

### C. 研究結果

#### FCV 添加・回収実験

食品 2.5 g に  $1.0 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml に調整した精製ウイルス液を 10  $\mu$ l 接種したため、食品溶出液中の感染価 (TCID<sub>50</sub>) は計算上  $4.4 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml、濃縮液中の感染価 (TCID<sub>50</sub>) は  $4.4 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml となる。食品から食品溶出液中への接種ウイルスの溶出率は食品溶出液中の感染価および接種ウイルスの感染価から、食品溶出液中のウイルス濃度に対する濃縮液中のウイルス濃度の濃縮率は食品溶出液中の感染価および濃縮液中の感染価から、濃縮液からの接種ウイルスの回収率は濃縮液中の感染価および接種ウイルスの感染価から算出した。

#### 溶出液の検討

食品からのウイルス溶出液を比較するため、こんにゃくの煮物、コールスローサラダ、ちくわの煮物を用いた FCV の添加・回収実験を行った (Table. 1)。食品に各種溶出液を加え転倒混和法によりウイルスを溶出後、食品溶出液を遠心式限外濾過ユニットを用いて濃縮した。各溶出液の溶出率および濃縮率を比較したところ、食品による溶出率にばらつきが認められ、溶出液の溶出率には有意差は認められなかったものの、1% 牛肉エキス加 Tris-Glycine buffer (pH9.5) を用いたウイルス溶出率が最も高かった (8.59%)。各食品からのウイルス溶出率を比較すると Tris-Glycine buffer

(pH9.5) を除く 3 種類の溶出液を用いた場合、こんにゃくの煮物からのウイルス溶出率が他の食品に比べて高かった。また、濃縮率には食品ごとにばらつきが認められ、溶出液の濃縮率は Tris-Glycine buffer (pH9.5) 及び 1% 牛肉エキス加 Tris-Glycine buffer (pH9.5) が他の溶出液に比べ約 2.3~4.1 倍高かった。

#### 溶出方法の検討

食品からのウイルス溶出方法を比較するため、こんにゃくの煮物を用いて FCV の添加・回収実験を行った (Table. 2)。食品に溶出液として 1% 牛肉エキス加 Tris-Glycine buffer (pH9.5) を加え各種溶出方法によりウイルスを溶出後、食品溶出液を遠心式限外濾過ユニットを用いて濃縮した。各溶出方法によるウイルス溶出率および濃縮率を比較したところ、溶出率に有意な差は認められなかったが超音波処理法の溶出率が最も高かった (74.69%)。また濃縮率にも有意な差は認められなかったが転倒混和法、超音波処理法での濃縮率が高い値を示した。

超音波処理による処理時間とウイルス溶出量を比較するため、FCV を添加したもので、しいたけの煮物、ごぼういため、小松菜の煮物を 1% 牛肉エキス加 Tris-Glycine buffer (pH9.5) に加え超音波処理によりウイルスを溶出し、食品溶出液を経時的に回収した (Fig. 1)。各溶出時間の食品溶出液中のウイルス感染価に有意差は認められなかったが、15 分処理した食品溶出液中のウイルス感染価が最も高く ( $2.46$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml)、15 分以上溶出すると食品溶出液中のウイルス感染価は減少した。精製ウイルス液を 1% 牛肉エキス加 Tris-Glycine buffer (pH9.5) に接種し、対照として同様に各溶出時間の溶出液中の感染価 (TCID<sub>50</sub>) を比較したところ、有意差は



認められなかった。

#### 各種食品を用いた FCV の添加・回収実験

各種市販食品を用いた FCV の添加・回収実験を行った (Table. 3)。溶出・濃縮方法は食品に溶出液として 1% 牛肉エキス加 Tris-Glycine buffer (pH9.5) を加え超音波処理法によりウイルスを溶出後、遠心式限外濾過ユニットを用いて溶出液を濃縮した。食品は表面汚染の可能性が高いと考えられる (手で直接接する可能性がある) 食品 10 種類 (糸こんにゃくの煮物、厚揚げの煮物、サツマイモの煮付け、ごぼうの煮物、いんげんの煮物、ちくわの煮物、しいたけの煮物、生野菜サラダ、出し巻き、白菜の浅漬け) を用いた。各食品からのウイルス回収率および濃縮率には有意な差は認められず、糸こんにゃくの煮物 (回収率 2.80%)、厚揚げの煮物 (22.45%)、サツマイモの煮付け (12.07%)、ごぼうの煮物 (19.81%)、いんげんの煮物 (14.94%)、ちくわの煮物 (28.00%)、しいたけの煮物 (23.50%)、生野菜サラダ (10.56%)、出し巻き (12.48%)、白菜の浅漬け (27.10%) を用いて得た食品溶出液中のウイルスは 30 倍以上に濃縮されていた。

精製ウイルス液を PBS を用いて 10 倍段階希釈し、こんにゃくの煮物に接種し、添加・回収実験を行い検出限界を測定した。213.80 TCID<sub>50</sub> の希釈ウイルス液を接種し濃縮液中の感染価を測定したところ CPE は陽性であり、21.38 TCID<sub>50</sub> の希釈ウイルス液を接種し濃縮液中の感染価を測定したところ CPE は陰性であった。

#### リアルタイム PCR によるウイルスの検出

本実験で作出した食品溶出液および濃縮液 134 検体について FCV 検出用プライマーセット F9-3R/F9-3F を用いたリアルタイム

PCR 法を行った。SYBR Green を用いたリアルタイム PCR 法を行ったところ、全 134 検体中食品溶出液 1 検体および濃縮液 2 検体は陰性であったが 131 検体で FCV が検出された。TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法を行ったところ TaqMan プローブの反応が認められず全ての検体が陰性であったが、増幅産物を電気泳動したところ FCV と思われるサイズ (86bp) のバンドが検出された。FCV 液を 1% 牛肉エキス加 Tris-Glycine buffer (pH9.5) を用いて 10 倍段階希釈し、SYBR Green および TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法を行ったところ、TaqMan プローブを用いた場合でのみ TaqMan プローブの反応が認められなかった。NV 添加・回収実験においても TaqMan プローブを用いた場合でのみ TaqMan プローブの反応が認められなかった。

#### D. 考察

ウイルス性食中毒の主要な原因物質は NV であることが報告されている (1)。NV 食中毒において様々な食品や食材が推定原因食品とされており、その多くは食品取扱者による食品表面の直接的・間接的汚染が原因と考えられている (2)。食品を表面汚染している NV を検出するには一般的に用いられている検査法では非常に困難であることが報告されている (3)。また、Hepatitis A virus や Hepatitis E virus など他のウイルスも食中毒の原因物質として報告されている (4, 5)。食品を汚染しているウイルスを効率よく検出する方法はウイルス食中毒の原因究明や感染拡大を防ぐのに役立つと考えられる。本研究では NV を初めとした様々な食中毒の原因ウイルスに対応した食品からのウイルス検査法の検討を目的として、培養細胞での培養が可能な FCV を用いて食

品に表面汚染したウイルスを迅速かつ簡便に効率よく溶出、濃縮および検出する方法について検討した。

果実など表面の pH が低い食品からウイルスを溶出することは困難とされているが、牛肉エキス (pH9.5) を含む溶出液を用いると効率よく溶出できることが報告されている (6, 7)。本研究においてこんにゃくの煮物、コールスローサラダ、ちくわの煮物を用いて、食品からの溶出に一般的に用いられる 0.85% 生理食塩水、PBS、環境からのウイルス溶出に用いられる 1% 牛肉エキス加 Tris-Glycine buffer (pH9.5) および Tris-Glycine buffer (pH9.5) を比較したところ、食品による溶出率にばらつきは認められたが 1% 牛肉エキス加 Tris-Glycine buffer (pH9.5) を用いた場合、最も効率よく溶出できた (Table. 1)。1% 牛肉エキス加 Tris-Glycine buffer (pH9.5) は他の溶出液と比べ蛋白濃度が高いため、牛肉エキスに含まれる蛋白がウイルス溶出を促進している可能性が考えられる。1% 牛肉エキス加 Tris-Glycine buffer (pH9.5) および Tris-Glycine buffer (pH9.5) は 0.85% 生理食塩水および PBS に比べ高い濃縮率が得られたため、Tris-Glycine buffer (pH9.5) を含む溶出液を用いると食品溶出液を効率よく濃縮できると考えられた。

超音波処理は超音波の振動により食品表面に付着したウイルスを溶出させることを目的としている。今回比較した溶出方法の中では超音波処理法が最も溶出率が高く優れていると考えられた (Table. 2)。食品からのウイルス溶出に現在一般的に用いられているストマッカー処理法は食品破砕物が多く、食品破砕物に遺伝子診断を阻害する様々な物質が含まれることが懸念される。食品破砕物の少ない超音波処理法は遺伝子

診断における阻害物質が少ないと思われる。1% 牛肉エキス加 Tris-Glycine buffer (pH9.5) に浮遊した FCV は、0~60 分間超音波処理 (120W) 処理に耐性であった。食品の超音波処理時間を検討したところ、15 分間処理した食品溶出液中のウイルス感染価が最も高く 15 分以上溶出すると感染価が減少したため 15 分が最適溶出時間と考えられた (Fig. 1)。

今回の検査法 (Fig2) は、使用した 10 種類の食品には対応可能な検査法であると思われ、食品 2.5 g からのウイルス検出限界は約 200 個前後であった。

本実験に供した食品溶出液および濃縮液について SYBR Green を用いてリアルタイム PCR 法を行ったところ、ウイルス感染価を測定した結果 CPE 陽性であった食品溶出液 1 検体および濃縮液 2 検体では FCV が検出されなかったが、ほぼ全ての検体で FCV が検出されたため、今回検討した検査法は SYBR Green を用いたリアルタイム PCR 法にも応用可能であると考えられた。一方で、TaqMan プローブを用いた方法では全ての検体において増幅産物は得られたが TaqMan プローブの反応が認められなかったため、何らかの要因で TaqMan プローブの反応が阻害されたものと思われた。1% 牛肉エキス加 Tris-Glycine buffer (pH9.5) で希釈した精製ウイルス液を用いた場合でも TaqMan プローブの反応が認められなかったため、1% 牛肉エキス加 Tris-Glycine buffer (pH9.5) に TaqMan プローブの反応を阻害する物質が含まれている可能性が考えられた。このような TaqMan プローブ反応の阻害は NV 添加・回収実験においても認められた。今後 TaqMan プローブの反応の阻害物質を含まない溶出液、阻害物質を取り除く RNA 抽出方法および遺伝子診断法などにつ

いて検討が必要である。

本研究で検討したウイルス抽出・濃縮法により食品の表面を汚染しているウイルスを迅速かつ簡便に効率よく溶出、濃縮することが可能であると考えられた。今回用いた溶出液に含まれる牛肉エキスは入手困難であること、遺伝子診断を阻害する物質が含まれる可能性が考えられることから溶出液を再検討する必要がある。

## E. 結論

今回検討した検査法を用いて食品に表面汚染したウイルスを迅速かつ簡便に効率よく溶出、濃縮できたため、この検査法はウイルス性食中毒における原因究明に役立ち、食品衛生の向上に寄与するものと考えられる。

## F. 研究発表

### <発表論文>

Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Murakami T, Vennema H, Koopmans M, Takeda N, Ogura H, Seto Y. Genetic analysis of the capsid gene of genotype GII.2 noroviruses. *J Virol.* 82(15):7336-7345 (2008)

Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Murakami T, Vennema H, Koopmans M, Takeda N, Ogura H, Seto Y. Genetic analysis of the capsid gene of genotype GII.2 noroviruses. *J Clin Microbiol.* 46:2406-2409 (2008)

## G. 知的所有権の取得

なし

## 参考文献

1.Green, K. Y., R. M. Chanock, A. Z. Kapikian.

2007. *Caliciviridae: The*

*Noroviruses*, p. 949-979. *In* D. M. Knipe

and P. M. Howley (ed.), *Fields*

*virology*, vol. 1. Lippincott

Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa

2. 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 野田 衛 2006/07シーズンのノロウイルス食中毒事例の疫学的特徴 病原微生物検出情報(月報) 2007年10月 Vol.28 p 282-28

3. Rutjes, S. A., Lodder-Verschoor, F., van der Poel, W. H., van Duynhoven, Y. T., de Roda Husman, A. M., 2006. Detection of noroviruses in foods: a study on virus extraction procedures in foods implicated in outbreaks of human gastroenteritis. *J. Food Protect.* 69, 1949-1956.

4. Calder, L., G. Simmons, C. Thornley, P. Taylor, K. Pritchard, G. Greening, and J. Bishop. 2003. An outbreak of hepatitis A associated with consumption of raw blueberries. *Epidemiol. Infect.* 131:745-751.

5. Tei, S., N. Kitajima, S. Ohara, Y. Inoue, M. Miki, T. Yamatani, H. Yamabe, S. Mishiro, and Y. Kinoshita. 2004. Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: an age- and sex-matched case-control study. *J. Med. Virol.* 74:67-70

6. Butot, S., Putallaz, T., Sanchez, G., 2007. Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 186-192

7. Kim HY, Kwak IS, Hwang IG, Ko G., 2008

Optimization of methods for detecting  
norovirus on various fruit.

J. Virol. Methods 153 104-110



Table 1. 食品からのウイルス溶出液の比較

溶出液および食品	食品溶出液中感染価 ( $\log_{10} \text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$ )	濃縮液中感染価 ( $\log_{10} \text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$ )	溶出率(%)	濃縮率
0.85%生理食塩水*	1.61±0.35	2.50±0.50	2.43±1.71	13.15±16.01
こんにやくの煮物	2.00	2.50	4.28	3.16
コールスローサラダ	1.33	2.00	0.91	4.68
ちくわの煮物	1.50	3.00	2.10	31.62
Tris-Glycine buffer(pH9.5)*	1.67±0.29	3.33±0.58	2.59±1.51	54.42±39.48
こんにやくの煮物	1.50	3.00	1.35	31.62
コールスローサラダ	2.00	4.00	4.28	100.00
ちくわの煮物	1.50	3.00	2.14	31.62
1%牛肉エキスカ加Tris-Glycine buffer(pH9.5)*	2.17±0.44	3.83±0.44	8.59±5.22	52.36±26.40
こんにやくの煮物	2.50	4.33	13.52	67.61
コールスローサラダ	2.33	3.67	9.14	21.88
ちくわの煮物	1.67	3.50	3.12	67.61
PBS*	1.56±0.77	2.56±1.64	3.71±3.26	23.05±22.93
こんにやくの煮物	2.00	3.67	4.28	46.77
コールスローサラダ	0.67	0.67	0.20	1.00
ちくわの煮物	2.00	3.33	6.64	21.38

\* それぞれの食品を用いて実験を行い、平均値±標準偏差を示した。

Table 2. 食品からのウイルス溶出方法の比較

溶出方法	食品溶出液中感染価 (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /0.1ml)	濃縮液中感染価 (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /0.1ml)	溶出率(%)	濃縮率
ストマツカー処理(30 sec)	1.50±0.17*	3.33±0.58	29.98±31.08	97.40±101.09
もみ出し(30 sec)	1.50±0.50	2.83±0.58	21.20±0.20	24.42±12.48
強振(30 sec)	1.67±0.34	3.17±0.44	46.51±49.34	47.21±46.98
振盪(30 min)	1.39±0.35	2.89±0.54	28.74±35.39	41.46±29.17
転倒混和(30 min)	1.17±0.44	3.17±1.01	18.86±24.10	255.19±365.58
超音波処理(15 min)	1.95±0.63	3.83±0.76	74.69±45.64	135.07±34.04

\* 3回実験を行い、平均値±標準偏差を示した。

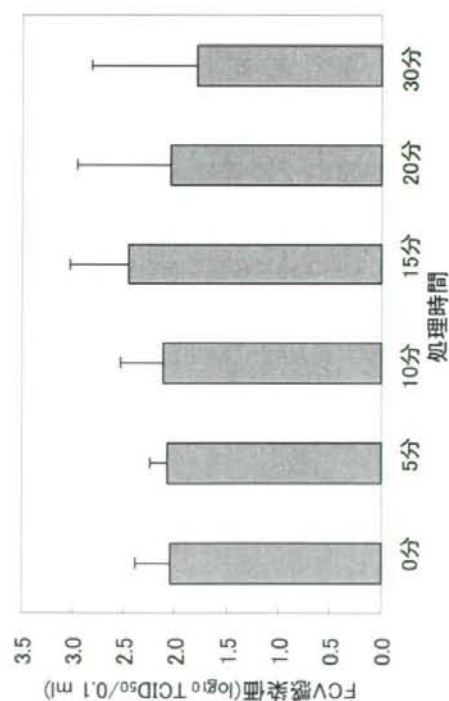
Fig 1.超音波処理法による食品からのウイルス溶出  
各実験は3回行い、平均値±標準偏差を示した。



Table 3. 各種市販食品を用いた FCV の添加・回収実験の結果

食品名	食品溶出液中感染価 ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /0.1 ml)	濃縮液中感染価 ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /0.1 ml)	回収率(%)	濃縮倍率(倍)
糸こんにゃくの煮物	0.50	2.67	2.80	147.91
厚揚げの煮物	0.50	3.50	22.45	1000.00
サツマイモの煮付け	0.67	3.33	12.07	457.09
ごぼうの煮物	2.00	3.50	19.81	31.62
いんげんの煮物	2.00	3.50	14.94	31.62
ちくわの煮物	2.00	3.67	28.00	46.77
しいたけの煮物	1.67	3.67	23.50	100.00
生野菜サラダ	1.67	3.33	10.56	45.71
出し巻き	1.67	3.33	12.48	45.71
白菜の浅漬け	1.50	3.67	27.10	147.91

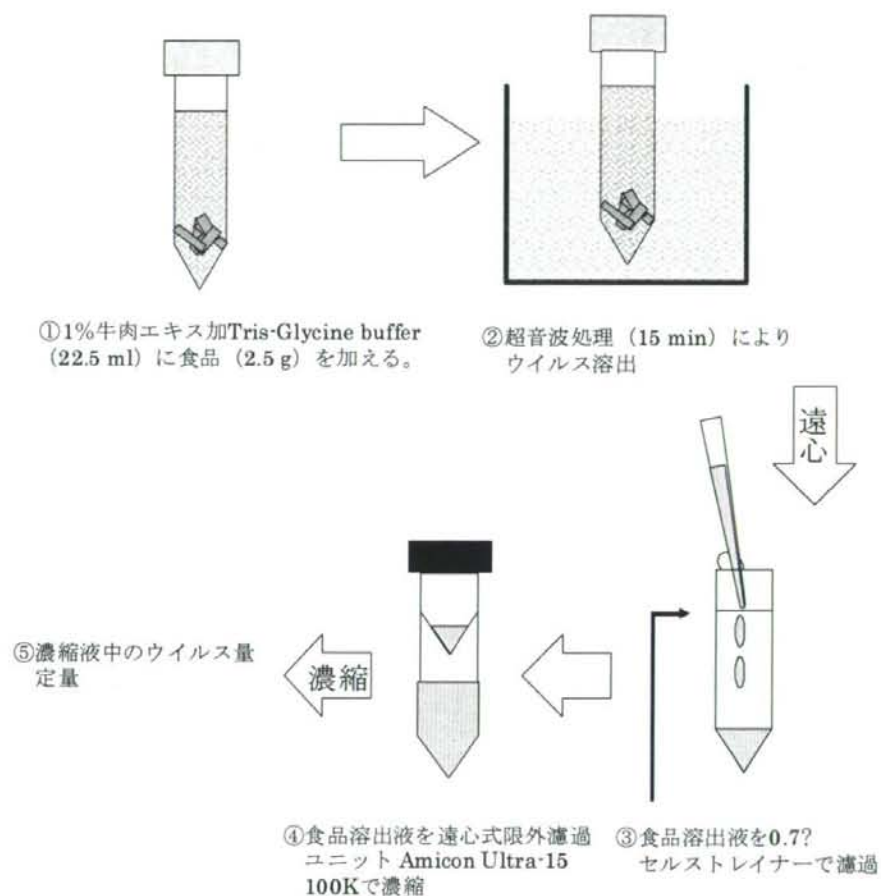


Fig. 食品からのウイルス抽出・濃縮法。

1%牛エキス加Tris-Glycine bufferを溶出液として超音波処理により溶出し、限外濾過法で濃縮し、ウイルス量を定量した。

食品における微生物迅速検査法の開発及びその精度評価システムに関する研究

細菌を利用したノロウイルス検査用検体処理方法の検討

研究分担者	仲真	晶子	東京都健康安全研究センター
研究協力者	秋場	哲哉	東京都健康安全研究センター
	林	志直	東京都健康安全研究センター
	森	功次	東京都健康安全研究センター
	永野	美由紀	東京都健康安全研究センター

研究要旨

食品からのノロウイルス検出を困難にしている要因の一つに、検査材料中に存在する食品成分由来の妨害物質が検査に影響していることが考えられた。我々はその除去方法として細菌の生物活性を利用した検体処理法を考案し、カキ乳剤を用いたノロウイルス添加回収実験を行った。厚生労働省通知による手法で得られた回収率の平均は、添加したノロウイルス GI /8、GII /4 とも 0.2%であったのに対し、*Proteus vulgaris* NBRC 3045 を用いてカキ乳剤を処理した場合にはそれぞれ 45.9%、21.3%に向上した。また、検体の濃縮からリアルタイム PCR 法を用いたノロウイルス検出までの一連の検査工程において、カキ由来成分が影響を及ぼす工程について検討した結果、カキ由来の成分は主に核酸抽出工程を妨害すると推察された。

A. 研究目的

ノロウイルス(NV)の検査は、平成 15 年 11 月 5 日付けの厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知、食安監発第 1105001 号に記載された方法（以下、通知法と記す）に基づき実施されている。しかし、NV が原因とされる食中毒事件において、推定原因食品から NV が検出される事例は非常に少ない。本研究では、ウイルス性食中毒の原因食品としての関与が大きいと考えられているカキからの NV 検出率を向上させることを目的に検討を行った。

B. 研究方法

食品から NV を検出することが難しい理由の一つとして、試料中に存在する食品成分が妨害物質として検査に影響していることが考えられたため、細菌の生物活性を利用して食品成分を除去する検体処理法（図 1）を考案した<sup>1)</sup>。実験 1 では、過去の実験<sup>2)</sup>で、細菌 10 菌種のうち最も良好な結果の得られた *Proteus vulgaris* NBRC 3045 を検体処理用菌株として用い、カキ乳剤に添加した NV の回収実験を行った。通

知法による検査を同時に行い、得られた結果を比較した。実験2では、NV 又はその核酸抽出液等をカキ乳剤の濃縮前、核酸抽出前、逆転写反応前及びリアルタイム PCR 反応前にそれぞれ添加し、妨害物質が影響を及ぼす工程について検討した。

#### 1. 供試カキ乳剤の作成

カキは産地、季節、種類、ロット等によってウイルスの蓄積状況等が異なることが報告されていることを考慮し、本実験では、産地の異なる殻付き生ガキ 4 検体、加熱調理用冷凍ガキ 6 検体の合計 10 検体を供試した。1 検体につき数個体より取り出した中腸腺を、PBS(-) (pH7.4; 日水製薬)を用いて 10%乳剤にした。各乳剤は 8mL ずつ遠心管に分注し供試カキ乳剤とした。

#### 2. 添加回収実験用ウイルス液の作成

リアルタイム PCR を用いた検査の結果 NV 陽性となり、凍結保存してあった糞便 2 検体を用いた。NV の遺伝子型の違いによって実験結果に差が生じる可能性を考慮し、異なる遺伝子型が検出された 2 検体を用いた。供試糞便 2 件のうち 1 件は、Kageyama らの方法によって、NV 遺伝子型 GI /8 (以下、GI /8 と記す) が検出された糞便であり、他の 1 件は NV 遺伝子型 GII /4 (以下、GII /4 と記す) が検出された糞便である。これら 2 検体の 10%乳剤を 10,000rpm、20 分間遠心した後、上清を 27,000rpm、3 時間超遠心し、得られた沈渣を 1mL の PBS(-) で再浮遊した。更に PBS(-) を用いて 1,000 倍に希釈後、直径 33mm、孔径 0.22  $\mu$ m のフィルターでろ過して糞便由来の夾雑物を排除した。それぞれの糞便から作成したウイルス液を 10mL ずつ混合し、添加用ウイルス液とした。

#### 3. 通知法による検体処理

供試材料を 4℃、10,000rpm、20 分間遠心し、

得られた上清を 30%しょ糖溶液 1 mL に重層して 4℃、40,000rpm、2 時間超遠心した。

#### 4. 今回検討した方法による検体処理

*P. vulgaris* NBRC 3045 株を 35℃、20 時間トリプチケースソイブイオンを用いて 2 代継代培養後、菌数が  $10^5$ /mL となるよう PBS(-)を用いて希釈し、10mL の供試菌液を作成した。この菌液 100  $\mu$ L を供試カキ乳剤に添加後 35℃で一晩 (16 時間) 培養した。培養後の材料は、通知法と同様に遠心処理を行った (以下、開発法と記す)。

#### 5. NV 検出方法

それぞれの検体処理後に得られた沈渣を、滅菌蒸留水 140  $\mu$ L を用いて再浮遊し、全量を RNA 抽出に用いた。RNA 抽出、DNase 処理、cDNA 合成及びリアルタイム PCR 法による NV の検出は、通知法に準拠して行った。RNA の抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用い、DNase I (TaKaRa)を用いて DNase 処理を行った。逆転写酵素は SuperScript II (Invitrogen)、プライマーは Random hexamer (Amersham Biosciences)を用いた。合成した cDNA 5  $\mu$ L を鋳型として、ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems)によるリアルタイム PCR を行い、添加した NV を検出した。プライマー及びプローブは GI 検出用に COG1F/COG1R、RING1-TP(a)、GII 用として COG2F/COG2R、RING2-TP を用い、50℃ 2 分、95℃ 10 分を 1 回、95℃ 15 秒、56℃ 1 分を 45 回繰り返した。

#### 6. 定量用標準曲線

国立感染症研究所より分与された NV コントロール DNA を用いて  $10^7$  copies/5  $\mu$ L から  $10^0$  copies/5  $\mu$ L まで 10 倍段階希釈した標準液を作成後、各濃度の標準液より得られたリアルタイム PCR の threshold cycle (Ct 値)から定量用標準曲線を作成した。



## <実験 1>

### 通知法と開発法との NV 回収率の比較

1 検体につき 2 本の供試カキ乳剤を準備し、それぞれの乳剤にウイルス液 140  $\mu$ L を加え供試材料とした。2 本の供試材料の内 1 本は通知法、他の 1 本は開発法によって検体処理を行った後、それぞれの NV 回収量(コピー数)をリアルタイム PCR 法で得られた Ct 値より求めた。また、ウイルス液 140  $\mu$ L を用いて同液中に含まれる NV を定量後、得られたコピー数を 100% としてそれぞれの検体及び手法ごとに NV の回収率(x)を  $x = (\text{供試材料中の NV 定量値} / \text{ウイルス液中の NV 定量値}) \times 100$  により求めた。なお、対照は PBS(-)8mL に添加したウイルス液とした。

## <実験 2>

### カキ由来物質が影響する検査工程の特定

加熱調理用冷凍ガキ 2 検体から作成した供試カキ乳剤をそれぞれ 3 本ずつ用いた。3 本の供試カキ乳剤の内、1 本目の乳剤にはウイルス液 70  $\mu$ L を添加後、通知法に従って逆転写反応までの操作を行い、得られた cDNA 液を A 液とした。2 本目の乳剤は通知法による遠心処理を行った後にウイルス液 70  $\mu$ L を添加し、逆転写反応までの操作を行った。得られた cDNA 液は B 液とした。3 本目の乳剤はウイルス液を添加せずに逆転写反応までの操作を行い C 液とした。ウイルス液 140  $\mu$ L を用いて核酸抽出を行った後に通知法による逆転写反応までの操作を行って F 液とし、さらに、C 液及び F 液を作成する過程で得られたそれぞれの核酸抽出液(RNA 液)を 6  $\mu$ L ずつ用いて逆転写反応させたものを D 液とし、C 液と F 液を 2.5  $\mu$ L ずつ混合した液を E 液とした(図 2)。これら A 液～F 液のそれぞれ 5  $\mu$ L を用いてリアルタイム PCR

法による NV の検出、定量を行い、カキ乳剤を用いた NV 添加回収実験において回収率低下の原因となる操作過程について検討した。A 液～E 液の NV 回収率は F 液の NV 定量値を 100% として求めた。また、同様の実験を開発法について実施した。1 本目の乳剤には菌液 100  $\mu$ L とウイルス液 70  $\mu$ L を同時に加えて培養した後、通知法に従って逆転写反応までの操作を行い、得られた cDNA 液を a 液とした。以降は同様に操作を行って B 液～F 液にあたる cDNA 液 b 液～f 液を得た後、f 液の NV 定量値を 100% として回収率を求めた。

## C. 研究結果

### <実験 1>

それぞれの検体及び手法ごとの Ct 値、コピー数及び回収率を添加した NV の遺伝子型別に表 1 に示した。GI / 8、GII / 4 とも、いずれのカキに添加した場合も開発法が通知法より高い回収率を示した。開発法による Ct 値の平均は GI / 8 で 9.8 サイクル、GII / 4 で 9.2 サイクル通知法より短縮し、NV 回収率の平均は通知法では GI / 8、GII / 4 とも 0.2% であったのに対し、開発法では GI / 8 で 45.9%、GII / 4 で 21.3% であった。

### <実験 2>

供試カキ乳剤 2 検体より得られた A 液～F 液について、リアルタイム PCR 法の Ct 値、コピー数及び回収率のそれぞれ平均値を求めた(表 2)。ウイルス液を添加しない C 液からは NV は検出されなかった。A 液、B 液、D 液、E 液の NV 回収率は、GI / 8、GII / 4 とも徐々に上昇したが、B 液と D 液間では GI / 8 で 0.1% から 15.4% (154 倍)、GII / 4 で 0.2% から 30.6% (153 倍) と最も大きく乖離した。開発法を用いて得られた a 液～f 液の結果では、b 液の NV 回収率は GI / 8 で 36.0%、GII / 4 で 46.5% に向上し、b 液と d 液間の NV 回収率の差は GI / 8、GII / 4 とも 2 倍程度にまで縮小した(表 3)。

## D. 考察

今回のカキ乳剤を用いた NV 添加回収実験において、添加用として用いた GI /8 と GII /4 では、いずれのカキに添加した場合も開発法は通知法より高い回収率を示した。この結果から、産地やロットが異なるカキや、GI /8、 GII /4 以外の遺伝子型においても開発法は通知法より高い回収率を示すものと推察された。定量値から求めた開発法の NV 回収率は、GI /8 では 9.8% から 71.2%、 GII /4 では 7.7% から 39.5% と検体により大きく変動したが、Ct 値で見た場合の差は最大でも GI /8 で 3.5 サイクル、 GII /4 で 3 サイクルであった。

実験 2 における A 液と B 液の NV 回収率の差は、試料を濃縮するために行った遠心処理過程で生じたものである。また、B 液と D 液の NV 回収率の差は核酸抽出時におけるカキ由来成分の妨害作用によるものと推察され、同様に D 液と E 液、E 液と F 液間の NV 回収率の差は、それぞれ逆転写反応、リアルタイム PCR 時における妨害作用によって生じたものと考えられた。この中で、B 液と D 液間の NV 回収率の差が最も大きかったことから、カキ由来の成分は主に核酸抽出を妨害すると推察された。開発法では、b 液と d 液間の NV 回収率の差が縮小したことから、添加した細菌がカキ由来の成分を分解、消化することで減少させ、核酸抽出時における妨害作用を低下させるものと考えられた。

## E. 結論

食品からのノロウイルス検査法の開発に向けて細菌の生物活性を利用した検体処理法を考案し、カキを用いたノロウイルス添加回収実験を行った。厚生労働省通知によるノロウイルス検査法では、今回添加用として用いたノロウイルス GI /8、 GII /4 の回収率はともに平均で 0.2% であったのに対し、*Proteus vulgaris*

NBRC 3045 を用いてカキ乳剤を処理した場合の回収率はそれぞれ 45.9%、21.3% に向上した。また、試料中に存在するカキ由来の成分は、主としてノロウイルスの核酸抽出を妨害するものと考えられた。今回検討した方法は特殊な器具や試薬類を必要とせず、カキを用いたノロウイルス添加回収実験で高い回収率を示したことから、一般的検査施設における食品からのノロウイルス検出に有効な手法となり得ると考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

<論文発表>

- 1) 秋場哲哉、田中達也、新井輝義、林志直、森功次、野口やよい、永野美由紀、吉田靖子、矢野一好：細菌添加培養処理によるカキ等からのノロウイルス検出率の向上。食品衛生学雑誌。2008, 49, 6, 407-410.
- 2) 秋場哲哉、尾畑浩魅、林志直、森功次、野口やよい、永野美由紀、仲真晶子、甲斐明美、矢野一好：細菌の生物活性を利用したカキからのノロウイルス検査法の改良。東京都健康安全研究センター年報。2008, 59, 57-61.

## H. 知的所有権の取得状況

なし

表1. カキ乳剤に添加したノロウイルスの回収実験結果

GI / 8

試料*	通知法			開発法		
	Ct値	コピー数	回収率 (%)	Ct値	コピー数	回収率 (%)
1	37.9	107	0.5	29.8	10,626	50.6
2	ud	0	0.0	29.2	14,935	71.2
3	44.2	3	0.0	30.1	8,963	42.7
4	36.9	189	0.9	32.7	2,051	9.8
5	40.3	28	0.1	29.2	14,935	71.2
6	40.5	25	0.1	31.4	4,287	20.4
7	39.9	35	0.2	29.5	12,598	60.0
8	40.0	33	0.2	30.0	9,487	45.2
9	40.5	25	0.1	29.7	11,246	53.6
10	40.1	31	0.1	30.5	7,144	34.0
平均	40.0	48	0.2	30.2	9,627	45.9
PBS	29.6	11,903	56.7			
ウイルス液	28.6	20,990	100.0			

GII / 4

試料*	通知法			開発法		
	Ct値	コピー数	回収率 (%)	Ct値	コピー数	回収率 (%)
1	39.2	125	0.4	31.6	7,943	25.5
2	ud	0	0.0	31.1	10,439	33.5
3	43.2	14	0.0	33.7	2,520	8.1
4	39.4	119	0.4	33.8	2,386	7.7
5	41.6	34	0.1	32.1	6,043	19.4
6	44.0	9	0.0	32.7	4,354	14.0
7	40.8	52	0.2	31.1	10,439	33.5
8	42.5	21	0.1	32.7	4,354	14.0
9	40.0	81	0.3	30.8	12,299	39.5
10	41.5	36	0.1	32.2	5,722	18.4
平均	41.4	49	0.2	32.2	6,650	21.3
PBS	30.1	18,032	57.9			
ウイルス液	29.1	31,148	100.0			

ud : undetected

\* 試料 1～4 は殻付き生ガキ、5～10は加熱調理用冷凍ガキ。

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧



## 研究成果の刊行に関する一覧

### 雑誌

- 1) 浅尾 努、河合高生 (2008) 特集 微生物検査の国際規格への対応 食品の衛生指標菌試験法の現状と今後、食品と開発、43 : 7-10.
- 2) 浅尾 努 (2008) 特集 検査態勢の無駄を見直す ～微生物検査とアレルギー管理～ 衛生指標菌と規格基準の現状と今後—国際動向を踏まえて～このままで良いのか、日本の食品細菌試験法～、月刊 HACCP、14 : 20-30
- 3) Y. Tanaka, B. Kimura, H. Takahashi, T. Watanabe, A. Kai, S. Morozumi, and T. Fujii. Lysine decarboxylase of *Vibrio parahaemolyticus*: kinetics of transcription and role in acid resistance. *J. Appl. Microbiol.* 104 (2008) 1283-1293.
- 4) B. Kimura, R. Kimura, T. Fukaya, K. Sakuma, S. Miya, and T. Fujii. Growth and toxin production of proteolytic *Clostridium botulinum* in aseptic steamed rice products at pH 4.6 - 6.8 packed under modified atmosphere using a deoxidant pack. *J. Food Prot.* 71 (2008) 468-72.
- 5) H. Takahashi, B. Kimura, Y. Tanaka, M. Mori, A. Yokoi, and T. Fujii. Use of single-strand conformation polymorphism of amplified 16S rDNA for grouping of bacteria isolated from foods. *J. Food Prot.* 71 (2008) 839-842.
- 6) B. Kimura, Y. Sekine, H. Takahashi, Y. Tanaka, H. Obata, A. Kai, S. Morozumi, and T. Fujii: Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis distinguishes *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3:K6 strains. *J. Microbiol. Meth.* 72 (2008) 313-320
- 7) B. Kimura, H. Takahashi, S. Hokimoto, Y. Tanaka, and T. Fujii. Induction of the histidine decarboxylase genes of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (formally *P. histaminum*) at low pH. *J. Appl. Microbiol.* In press (2009).
- 8) H. Takahashi, S. Miya, B. Kimura, K. Yamane, Y. Arakawa, and T. Fujii. Difference of Genotypic and Phenotypic Characteristics and Pathogenicity Potential of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* between Clinical and Environmental Isolates from Japan. *Microbial Pathogenesis*, 45 (2008) 150-158.
- 9) S. Miya, B. Kimura, M. Sato, H. Takahashi, T. Ishikawa, T. Suda, C. Takakura, T. Fujii and M. Wiedmann. Development of a multilocus variable-number of tandem repeat typing method for *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains. *International Journal of Food Microbiology*, 124 (2008) 239-249.
- 10) K. Honjoh, K. Fujihara, T. Haraguchi, Y. Ono, H. Kobayashi, H. Hiwaki, H. Kamikado, S. S. Jang, S. Ryu, and T. Miyamoto, (2008) Subtyping of *Listeria monocytogenes* based on nucleotide polymorphism in the *clpC*, *inlA*, *hlyA*, and *plcA* genes and rapid identification of *L. monocytogenes* genetically similar to clinical isolates. *Food Science and Technology Research*, 14(6): 557-564

- 11) Hansman GS, Oka T, Li TC, Nishio O, Noda M, Takeda N: Detection of Human Enteric Viruses in Japanese Clams, *J Food Protect*, 71, 1689-1695 (2008)
- 12) 有田知子、木村博一、野田 衛、西尾 治: パンに含まれるノロウイルスの回収法の検討, *感染症学雑誌*, 82, 473-475 (2008)
- 13) 野田 衛: ウイルス性食中毒の検査, *臨床と微生物*, 585-591 (2008)
- 14) 五十君静信: 微生物試験法の国際規格にどう対応していくか, *食品と開発*, 43, 4-6 (2008)
- 15) 五十君静信: 食品からの微生物検査標準法の検討～これまでの経緯とこれからの展望～, *月刊フードケミカル*, 24, 51-54 (2008)
- 16) 五十君静信: 食品の微生物試験法を国際規格にどの様に対応していくか, *月刊 HACCP*, 14, 20-29 (2008)
- 17) E. Araki, K. Takayama, M. Saito, H. Matsuoka, "Separation of Viable Histamine-Producing Bacteria from Yellowtail Meat Components by Density Gradient Centrifugation." *Biocontrol Sci.* 14, 31-34 (2009)
- 18) 斉藤美佳子、松岡英明 “微生物の迅速検出法” *日本防菌防黴学会誌* 36, 99-105 (2008)
- 19) 斉藤美佳子、松岡英明 “微生物の迅速検出法” *クリーンテクノロジー* 18 (11), 1-5 (2008)
- 20) 島北寛仁、斉藤美佳子、松岡英明 “微生物迅速検査装置「バイオブローラ」” *食品工業* 51(16), 34-42 (2008)
- 21) 荒川英二、甲斐明美: 腸炎ビブリオの標準試験法作成へ向けての検討, *月刊フードケミカル*, 2008-7, 2008.
- 22) Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Murakami T, Vennema H, Koopmans M, Takeda N, Ogura H, Seto Y. Genetic analysis of the capsid gene of genotype GII.2 noroviruses. *J Virol.* 82(15):7336-7345 (2008)
- 23) Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Murakami T, Vennema H, Koopmans M, Takeda N, Ogura H, Seto Y. Genetic analysis of the capsid gene of genotype GII.2 noroviruses. *J Clin Microbiol.* 46:2406-2409 (2008)
- 24) 秋場哲哉、田中達也、新井輝義、林志直、森功次、野口やよい、永野美由紀、吉田靖子、矢野一好: 細菌添加培養処理によるカキ等からのノロウイルス検出率の向上. *食品衛生学雑誌*. 2008, 49, 6, 407-410.
- 25) 秋場哲哉、尾畑浩魅、林志直、森功次、野口やよい、永野美由紀、仲真晶子、甲斐明美、矢野一好: 細菌の生物活性を利用したカキからのノロウイルス検査法の改良. *東京都健康安全研究センター年報*. 2008, 59, 57-61.

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

研究成果の刊行物に関する一覧表

平成 18 年度

- 1) B. Kimura: Recent advances in the study of the genotypic diversity and ecology of *Listeria monocytogenes*. Microbe. Environ., 21, 69-77(2006)
- 2) 丸山弓美, 木村 凡, 藤井建夫, 徳永宜則, 松林 潤, 相川保史: ドライアイスを用いた食卓用保冷器による魚介類の腸炎ビブリオの増殖抑制, 食品衛生学雑誌, 46, 213-217 (2006)
- 3) 藤川 浩・矢野一好・諸角 聖・木村凡・藤井建夫: 各種温度条件下における微生物増殖予測プログラムの開発, 食品衛生学雑誌, 47, 288-292 (2006)
- 4) 尾畑浩魅, 下島優香子, 小西典子, 門間千枝, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角聖, 福山正文: 腸炎ビブリオ食中毒事例における PCR 法を用いた食品からの耐熱性溶血毒 (TDH) 産生菌の分離, 感染症学雑誌, 80, 383-390 (2006)
- 5) T. Shimakita, Y. Tashiro, A. Katsuya, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid Separation and Count of Viable Microbial Cells in Foods by Non-culture Method with a Bioplorer, a Focusing-free Microscopic Apparatus with a Novel Cell Separation Unit. J. Food Protection, 69, 145-151 (2006).
- 6) K. Fujioka, I. Kozono, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid Evaluation of the Efficacy of Microbial Cell Removal from Fabrics. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 33, 995-1002 (2006).

平成 19 年度

- 1) K Seto, M Taguchi, K Kobayashi, S Kozaki. Biochemical and molecular characterization of minor serogroup of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans in Osaka prefecture. J. Vet. Med Sci., 69(12): 1215-1222, 2007
- 2) 浅尾 努 (2007) 食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法 (2) 大腸菌群、糞便系大腸菌群、大腸菌、日本防菌防黴学会誌, 35 : 401-410.
- 3) 浅尾 努、河合高生、久米田裕子、寺本忠司、石黒 厚、梅迫誠一、小笠原 準、高須一重、美野朋隆、日野亮一、齋藤利江、小崎俊司、山本茂貴 (2007) 食品の細菌学的試験法の現状と問題点 (日本食品微生物学会 食品の細菌検査法問題検討委員会報告) 日本食品微生物学雑誌, 24 : 134-143.
- 4) Y. Kasai, B. Kimura, Y. Tajima, and T. Fujii, Quantitative duplex PCR of *Clostridium botulinum* types A and B neurotoxin genes. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 48 (2007) 19-26.
- 5) S. Handa-Miya, B. Kimura, H. Takahashi, MSato, T. Ishikawa, K. Igarashi, T. Fujii.: Nonsense-mutated *inlA* and *prfA* not widely distributed in *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat seafood products in Japan, Int. J. Food Microbiol. 117 (2007) 312-318