

## ノート

細菌添加培養処理によるカキなどからの  
ノロウイルス検出率の向上

(平成20年3月3日受理)

秋場哲哉\*<sup>1</sup> 田中達也<sup>2</sup> 新井輝義<sup>1</sup> 林志直<sup>1</sup> 森 功次<sup>1</sup>  
野口やよい<sup>1</sup> 永野美由紀<sup>1</sup> 吉田靖子<sup>1</sup> 矢野一好<sup>1</sup>Enhancement of Norovirus Detection Rates in Oysters and  
Other Food Samples by Using Bacterial TreatmentTetsuya AKIBA\*<sup>1</sup>, Tatsuya TANAKA<sup>2</sup>, Teruyoshi ARAI<sup>1</sup>, Yukinao HAYASHI<sup>1</sup>, Kohji MORI<sup>1</sup>,  
Yayoi NOGUCHI<sup>1</sup>, Miyuki NAGANO<sup>1</sup>, Yasuko YOSHIDA<sup>1</sup> and Kazuyoshi YANO<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health:  
3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan;<sup>2</sup>Graduate School of Marine Science & Technology, Tokai University: 3-20-1 Orido,  
Shimizu-ku, Shizuoka 424-8610, Japan; \* Corresponding author

Factors such as low recovery rate and food contaminants may be responsible for the difficulty of detecting Norovirus (NV) by PCR in foodborne outbreaks. To detect NV more efficiently, we introduced a bacterial treatment, in which concentrated samples were incubated overnight with *Klebsiella oxytoca* at 35°C before RNA extraction using the standard protocol. Recovery rates of NVs (G I/8 or G II/13) added to food suspensions in the modified method were compared with those in the standard method by quantification of NV RNAs using real-time PCR. Recovery rates in the modified method were 8.6% for G I/8 and 11.6% for G II/13 in 18 oyster samples and 13.9% for G I/8 and 19.6% for G II/13 in 15 other food samples, while those in the standard method were 0.3% for G I/8 and 0.5% for G II/13 in the oyster samples and 1.9% for G I/8 and 7.9% for G II/13 in the other food samples. These results indicate that the bacterial treatment increase the recovery of NV from foods such as oysters, suggesting that the modified method will be useful for NV detection in food samples.

(Received March 3, 2008)

Key words: ノロウイルス Norovirus; 食品 food sample; 細菌 bacteria; 回収率 recovery rate

## 緒 言

食品からのノロウイルス (NV) 検出は、食中毒原因物質の特定および感染経路の究明を行い、新たな感染の拡大や発生を未然に防止する上で重要な検査である。しかし、実際に食品から NV が検出される事例は非常に少なく、東京都では2006年に1,108件の食中毒関連食品の検査を行ったが、NVは全く検出されなかった。これは食品成分由来の夾雑物が検査に影響することや、食品中に含まれる微量な NV を効率よく回収することが難しいためと考えられる。NVの検出は平成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\*<sup>1</sup>に記載された方法(以下、通知法とする)により実施されているが、その後もカキなどからの検出感度を高めるための検討が行われている<sup>1,2)</sup>。筆者らは食品由来夾雑物の除去法に焦点を絞って検討を行い、細菌を利用してカキやその他の食品中に含まれる食品由来夾雑物を分解あるいは消化させる前処理法を考案した。今回 NV 添加回収実験において回収率が向上する結果を得たので、以下にその概要を報告する。

## 材料および方法

## 1. 供試食品

2007年10月から12月に東京都内で市販された生食用マガキ18検体、同時期に東京都内で市販または調理され

\* 連絡先

<sup>1</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部: 〒169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1<sup>2</sup> 東海大学大学院海洋学研究所: 〒424-8610 静岡県清水区折戸3-20-1\*<sup>1</sup> 厚生労働省ホームページ: ノロウイルスの検査法について  
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokucyu/kanren/kanshi/031105-1.html>

た食品 15 検体を用いた。カキは 1 検体につき 2~4 個体から取り出した中腸腺に PBS (-) (pH 7.4: 日水製薬) を加えてホモジナイズし 10% 乳剤を作製した<sup>24)</sup>。他の食品は 4~5 g を秤量後、5~10 倍量の PBS (-) を加えたフィルター付き細菌検査用ポリ袋中で 1 分間ストマッカー処理を行った。

## 2. 供試材料の作製

過去に東京都健康安全研究センターで食中毒患者の糞便から検出され、Kageyama らの方法<sup>25)</sup>により遺伝子型を決定した NV 遺伝子型 G I/8 株 (以下、G I/8 とする)、G II/13 株 (以下、G II/13 とする) を添加用 NV とした。それぞれの NV が検出された糞便乳剤を PBS (-) で 1,000 倍に希釈後等量混合し、孔径 0.22  $\mu$ m のフィルターでろ過して添加用ウイルス浮遊液を作製した。この添加用ウイルス浮遊液 140  $\mu$ L を各食品乳剤 6 mL に添加したものを供試材料、PBS (-) 6 mL に添加したものを対照材料とした。

## 3. 前処理用菌浮遊液の作製

東京都健康安全研究センターにおいて、食品から分離同定された *Klebsiella oxytoca* を 35°C、20 時間培養した普通斜面培地から、PBS (-) を用いて McFarland 4 (1.2  $\times$  10<sup>8</sup>/mL) の菌浮遊液を作製した。

## 4. 通知法による前処理

通知法に従い、供試材料および対照材料を 4°C、10,000 rpm、20 分間遠心後、上清を 30% ショ糖溶液 1 mL に重層し、40,000 rpm、2 時間 (HITACHI himac CP80 WX) 超遠心した (以下、標準法とする)。得られた沈渣を滅菌蒸留水 140  $\mu$ L で再浮遊し、全量を RNA 抽出に用いた。

## 5. 細菌を用いた前処理

供試材料および対照材料に、上記の前処理用菌浮遊液 10  $\mu$ L を添加後 35°C で一晚培養した。培養後の材料は標準法と同様に遠心処理した (以下、A3T 法とする) 後、沈渣を滅菌蒸留水 140  $\mu$ L で再浮遊した全量を RNA 抽出に用いた。

## 6. NV 検出方法

RNA 抽出、DNase 処理、cDNA 合成およびリアルタイム PCR による NV の検出は、通知法に準拠して行った。RNA の抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用い、DNase 処理には DNase I (TaKaRa) を用いた。逆転写酵素は MMLV (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、定量した。プライマーおよびプローブは G I 検出用に COG1F/COG1R、RING1-TP (a)、G II 用として COG2F/COG2R、RING2-TP を用い、50°C 2 分、95°C 10 分を 1 回、95°C 15 秒、56°C 1 分を 45 回繰り返した。

## 7. 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 10 倍段階希釈した標準液を作製し、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製した。

## 結 果

標準法および A3T 法による前処理後に得られたリアルタイム PCR の Ct 値、Ct 値と定量用標準曲線から求めたウイルス RNA コピー数を Table 1 に示した。標準法では 29 検体中 G I/8 で 4 検体、G II/13 で 1 検体が NV 不検出となった。検出できなかった検体はいずれもカキであった。NV 不検出の検体を除いて Ct 値を比較した場合、A3T 法は標準法に比べ、カキでは G I/8 で 2.9~10.5 (平均 6.8) サイクル、G II/13 で 2.6~8.8 (平均 6.4) サイクルの短縮が見られた。得られた Ct 値を用いて t 検定を行った結果、両前処理法には  $p < 0.001$  (両側) で有意差が認められた。他の食品においても G I/8 で 0.5~6.7 (平均 3.4) サイクル、G II/13 で 0~4.4 (平均 1.9) サイクル Ct 値は短縮 ( $p = 0.002$ ) したが、対照材料では有意差は見られなかった ( $p = 0.796$ )。

添加用ウイルス浮遊液 140  $\mu$ L を直接 RNA 抽出した場合の Ct 値は G I/8 が 28.6 サイクル、G II/13 が 25.1 サイクルであり、この NV RNA 定量値は、定量用標準曲線から G I/8 では 201,071 copies/test、G II/13 では 504,045 copies/test と算出された。この濃度を 100% とし、供試材料に添加した NV の回収率 (x) を  $x = (\text{供試材料中の NV 定量値} / \text{添加用ウイルス浮遊液中の NV 定量値}) \times 100$  により求めた (Fig. 1)。標準法の回収率の平均は、カキでは G I/8 で 0.3%、G II/13 で 0.5%、他の食品では G I/8 で 1.9%、G II/13 で 7.9% であった。これに対し A3T 法の回収率の平均は、カキでは G I/8 で 8.6%、G II/13 で 11.6%、他の食品では G I/8 で 13.9%、G II/13 で 19.6% であった。標準法による対照材料の回収率は G I/8 で 21.9%、G II/13 で 31.2% であった。なお、菌浮遊液のみから核酸抽出し、DNase 処理を行わずにリアルタイム PCR で検査した結果、添加した *K. oxytoca* の DNA によると思われる偽陽性反応は見られなかった。また、カキ乳剤を用いた事前実験で、菌浮遊液を添加せずに 35°C で一晚培養した場合の NV 回収率は、標準法との間に大きな差は認められなかった。

## 考 察

今回筆者は、食品からの NV 検出率の改善を目的に細菌を利用した前処理 A3T 法を試み、一定の効果が認められる結果を得た。これまでの遠心分離による方法では、遠心濃縮後の沈渣、沈渣物中に残存する食品由来雑物の除去が不十分であり、その後の核酸抽出から PCR 反応に至る過程に影響を与えたと考えられた。A3T 法は、遠心濃縮前に細菌を添加し培養処理を行うことで食品由来雑物

Table I. Threshold cycles and NV RNA copies (/test) of standard method and modified method with bacterial treatment

Samples	G I/8				G II/13					
	Standard		A3T		Standard		A3T			
	Ct	Copies	Ct	Copies	Ct	Copies	Ct	Copies		
Oyster 1	ud	0	33.8	9,259	(-)*	ud	0	29.6	49,632	(-)
Oyster 2	41.2	116	34.7	5,435	(46.9)	35.9	1,934	30.4	32,869	(17.0)
Oyster 3	37.7	921	34.8	5,123	(5.6)	33.8	5,704	31.0	24,130	(4.2)
Oyster 4	ud	0	34.3	6,887	(-)	37.8	727	30.3	34,607	(47.6)
Oyster 5	ud	0	33.1	14,013	(-)	36.6	1,348	28.8	74,943	(55.6)
Oyster 6	44.4	17	33.9	8,727	(513.4)	37.8	727	29.4	55,018	(75.7)
Oyster 7	ud	0	36.4	1,987	(-)	39.0	392	30.9	25,406	(64.8)
Oyster 8	42.5	54	34.4	6,492	(120.2)	36.3	1,574	29.0	67,606	(43.0)
Oyster 9	40.6	165	36.9	1,478	(9.0)	35.8	2,036	31.3	20,675	(10.2)
Oyster 10	42.9	42	33.6	10,423	(248.2)	36.5	1,420	29.9	42,525	(29.9)
Oyster 11	40.5	176	34.9	4,828	(27.4)	33.9	5,417	31.3	20,675	(3.8)
Oyster 12	41.4	103	32.6	18,839	(182.9)	37.9	690	29.1	64,212	(93.1)
Oyster 13	41.2	116	32.2	23,872	(205.8)	35.9	1,934	29.6	49,632	(25.7)
Oyster 14	40.7	156	30.8	54,676	(350.5)	36.4	1,495	27.6	139,055	(93.0)
Oyster 15	34.8	5,123	30.6	61,547	(12.0)	32.1	13,692	27.9	119,144	(8.7)
Oyster 16	36.0	2,518	31.0	48,571	(19.3)	33.7	6,005	28.1	107,480	(17.9)
Oyster 17	39.2	379	32.3	22,500	(59.4)	35.9	1,934	28.9	71,180	(36.8)
Oyster 18	41.8	81	34.9	4,828	(59.6)	36.2	1,657	29.3	57,926	(35.0)
Mean	40.4	554	33.6	17,194	(31.1)	36.0	2,705	29.6	58,706	(21.7)
Sashimi	36.8	1,568	33.2	13,208	(8.4)	31.2	21,768	28.2	102,084	(4.7)
Steamed chicken	34.7	5,435	30.6	61,547	(11.3)	29.6	49,632	27.0	189,415	(3.8)
Rice	35.2	4,043	30.7	58,010	(14.3)	29.3	57,926	27.5	146,405	(2.5)
Pear	38.6	540	34.2	7,307	(13.5)	33.3	7,379	31.6	17,715	(2.4)
Tofu	36.9	1,478	32.4	21,207	(14.3)	32.7	10,052	28.3	96,959	(9.6)
Tsukemono	35.7	3,007	34.7	5,435	(1.8)	31.6	17,715	31.6	17,715	(1.0)
Bread	33.1	14,013	31.3	40,669	(2.9)	29.1	64,212	28.5	87,467	(1.4)
Fried chicken	34.0	8,226	31.3	40,669	(4.9)	29.2	60,988	27.6	139,055	(2.3)
Salad	40.8	147	40.3	198	(1.3)	34.5	3,977	32.1	13,692	(3.4)
Cake	35.0	4,551	31.4	38,331	(8.4)	29.4	55,018	26.9	199,428	(3.6)
Stew	40.5	176	33.8	9,259	(52.6)	34.1	4,887	30.7	28,163	(5.8)
Gyoza	35.7	3,007	32.0	26,873	(8.9)	29.3	57,926	27.4	154,145	(2.7)
Scrambled eggs	34.5	6,118	30.9	51,533	(8.4)	28.1	107,480	27.5	146,405	(1.4)
Cookie	35.9	2,671	31.3	40,669	(15.2)	29.2	60,988	27.9	119,144	(2.0)
Hamburger	37.2	1,238	35.5	3,385	(2.7)	32.1	13,692	30.8	26,749	(2.0)
Mean	36.3	3,748	32.9	27,887	(7.4)	30.8	39,576	28.9	98,969	(2.5)
PBS 1	31.2	43,147	30.6	61,547	(1.4)	27.1	179,905	27.0	189,415	(1.1)
PBS 2	30.9	51,533	30.7	58,010	(1.1)	27.3	162,293	27.0	189,415	(1.2)
PBS 3	31.3	40,668	30.1	82,745	(2.0)	27.4	154,145	27.2	170,872	(1.1)
PBS 4	31.3	40,668	30.6	61,547	(1.5)	27.7	132,073	27.6	139,055	(1.1)
Mean	31.2	44,004	30.5	65,962	(1.5)	27.4	157,104	27.2	172,189	(1.1)
Viral fluid	28.6	201,071				25.1	504,045			

ud: undetected

\* Ratio of copy numbers in the case of A3T treatment to copy numbers in the case of standard treatment

の分解、消化を図るものである。通知法では、超遠心後の浮遊液に不純物が多いと判断された場合のみ 10,000 rpm、20 分間遠心処理し、不純物との分離を行うとされている。しかし、この遠心処理は NV 回収率が一定程度向上する場合と逆に低下する場合の両方が見られ、不純物が多いと判断する基準、あるいは行ったほうが良いと判断する基準が明確でない、このことから、今回の検討では標準法、A3T 法とも超遠心後の遠心処理は省略することとした。

*Escherichia coli* など 10 種の細菌とカキ乳剤を用いた事前実験の結果において、最も高い回収率を示した *K. ox-*

*ytoca* を今回の前処理用細菌として用いた。高い回収率を示した理由として、*K. oxytoca* は比較的多くの糖類やアミノ酸類に対して分解能を有しているためと推察された。標準法と比較して A3T 法の有用性が認められなかった食品では、*K. oxytoca* による処理がこれらの食品由来雑物には不足、または不相当であったものと考えられた。添加する菌数を 10 倍量あるいは 1/10 量とした場合や、培養時間を 48 時間まで延長した場合の回収率にはほとんど変化は見られなかった。したがって、今後はより分解能の高い細菌や複数種の細菌を添加する、あるいは食品群別に適当

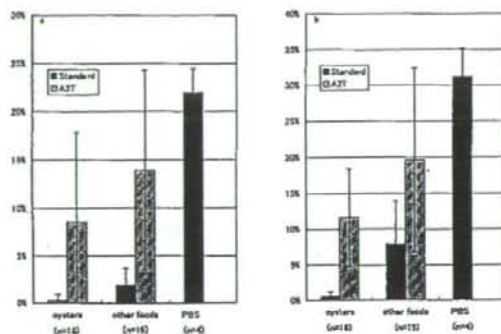


Fig. 1. Recovery of NV from oysters, other foods, and PBS. a: GI/8, b: GI/13. Data indicates % recovery rate with standard deviation

な細菌を選択して使用することなどを検討することで、さらに回収率が高まることに期待する。PCR反応を用いるための夾雑物の除去法として、酵素や化学反応、フィルターを利用した処理方法<sup>23, 24)</sup>が試みられているが、細菌を用いた方法は特殊な器具や試薬類を必要とせず、添加した細菌とNVを分離することが比較的容易であることから、食品からのNV検出法に1つの方向性を示唆するものであると考えられた。

#### 文 献

- 1) Noda, M., Nishio, O., Akiyama, M., Kunii, E., Yamamoto, M., Fujii, A., Ikeda, Y., Hirasaki, K., Matsumoto, M., Ogino, T. Norovirus kensyutsuritsu no oyobosu kaki kensa kosu no eikyou. Hiroshimashi Eiken Nempo (Annual Report of Hiroshima City Institute of Public Health), 23, 70-73 (2004)
- 2) Noda, M., Nishio, O., Yamamoto, M., Ito, H., Ikeda, Y., Matsumoto, M., Ogino, T. Kongou kaki kentai karano Norovirus nousyukusousa ni okeru amylase syori no yuyousei. Hiroshimashi Eiken Nempo (Annual Report of Hiroshima City Institute of Public Health), 25, 35-43 (2006)
- 3) Tanaka, T., Akiba, T., Mori, K., Noguchi, Y., Hayashi, Y., Konuma, H., Yoshida, Y., Yamada, S. Comparison and evaluation of methods for RNA extraction of Norovirus from oyster. Jpn. J. Food Microbiol., 24, 157-162 (2007).
- 4) Yamaki, N., Ueki, Y., Suto, A., Sakai, K., Kikuchi, N., Goto, I., Okimura, Y., Akiyama, K., Tohya, Y. Histochemical virus observation in the oyster digestion diverticulum with *in situ* hybridization method. Jpn. J. Food Microbiol., 23, 21-26 (2006).
- 5) Kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, B. F., Kojima, S., Takai, R., Oka, T., Takeda, N., Katayama, K. Coexistence of multiple genotype, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in Japan. Clin. Microbiol., 42, 2988-2995 (2004).
- 6) Queiroz, A. P. S., Santos, F. M., Sassaroli, A., Harsi, C. M., Monezi, T. A., Mehner, D. U. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. Appl. Environ. Microbiol., 67, 4614-4618 (2001).