

形状と特性から、これまでに検討した改良操作を応用することにより、回収率を上げることが可能ではないかと推測されるため、早急に検討を行いたい。一方、ほとんど回収ができていない小豆あん、シュークリーム、ひじきの煮物、卵の花、白和えについては、改良操作の適応を試みることに加え、全く異なるアプローチを考える必要があると思われる。

#### E. 結論

ACP 微粒子を用いた簡便で迅速なウイルス回収・濃縮方法の構築を検討した。食品洗浄にBE加PBSおよびTris-glycine液を使用することで、ウイルス回収が困難とされる冷凍果実類や油脂含有食品を含む多くの諸君品から効率よくウイルスを回収・濃縮できることが判明した。一方、食品洗浄液に均一に混ざってしまうような食品（小豆あんやシュークリーム）、強力な酵素阻害物質を含有すると考えられる食品（ひじき）等からはウイルスの

回収が困難であることも示された。このような食品の処理方法については今後もさらに検討をする必要がある。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表

篠原美千代、富岡恭子、峯岸俊貴、鈴木典子、内田和江、島田慎一、河橋幸恵、岸本剛、吉川悠子、大橋典男、野田衛：非晶性リン酸カルシウム微粒子を用いた食品からのウイルス検出法、第32回日本食品微生物学会学術集会、2011年10月、東京

#### 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 キャベツ、レタス、ハムを用いた洗浄液別 FCV 回収状況

食品検体	洗浄液	検体数	FCV 添加量 (copy)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
キャベツ	PBS	10	4.5x10 <sup>4</sup>	18-65	32
	Tris-glycine	3	4.5x10 <sup>4</sup>	15-31	21
レタス	PBS	4	7.5x10 <sup>4</sup>	26-91	50
	Tris-glycine	3	7.5x10 <sup>4</sup>	71-104	85
ハム	PBS	4	4.5x10 <sup>4</sup>	0	0
	Tris-glycine	4	4.5 - 7.5x10 <sup>4</sup>	0	0
	PBS/0.2gAA	3	4.5 - 7.5x10 <sup>4</sup>	9-17	13
	PBS/0.5gAA	3	4.5 - 7.5x10 <sup>4</sup>	17-24	20
	PBS/1.0gAA	8	4.5x10 <sup>4</sup>	26-59	46

AA: アスコルビン酸

表2 キャベツ、レタス、ハムからの FCV 検出感度 (洗浄液: PBS、)

食品検体	FCV 添加量 (copy)	陽性検体数/検査検体数	平均回収率 (%)
キャベツ	4.5x10 <sup>3</sup>	4/4	33
	4.5x10 <sup>2</sup>	0/4	
レタス	4.5x10 <sup>3</sup>	4/4	55
	4.5x10 <sup>2</sup>	0/4	
ハム	4.5x10 <sup>3</sup>	4/4	37
	4.5x10 <sup>2</sup>	0/4	

ハムにはアスコルビン酸 1.0g 添加

表3 キャベツ、レタス、ハムからのNV回収状況（洗浄液：PBS）

食品検体	検体数	NV添加量(copy)	回収率(%)	平均回収率(%)
キャベツ	4	1.1x10 <sup>5</sup>	30-44	36
	2	3.1x10 <sup>4</sup>	12-13	12
	2	1.9x10 <sup>3</sup>	30-52	41
	2	1.0x10 <sup>2</sup>	0	0
レタス	3	6.4x10 <sup>4</sup>	42-69	57
	2	3.1x10 <sup>4</sup>	43-59	51
	3	6.0x10 <sup>3</sup>	12-51	30
	2	1.0x10 <sup>2</sup>	0	0
ハム	2	1.1x10 <sup>5</sup>	23-29	26
	2	9.6x10 <sup>4</sup>	22-27	24
	2	3.1x10 <sup>4</sup>	15-24	20
	2	1.9x10 <sup>3</sup>	0	0

表4 ミートソーススパゲティからの処理方法別FCV回収状況

洗浄液	イソアミル アルコール処理	酵素の添加	検体 数	FCV添加量 (コピー)	回収率 (%)	平均 回収率 (%)
PBS	無	無	6	4.5-7.5×10 <sup>4</sup>	0.1-2	1
蒸留水 pH3	無	無	5	7.5×10 <sup>4</sup>	3-10	6
蒸留水 pH9	無	無	3	7.5×10 <sup>4</sup>	1-7	3
Tris-glycine	無	無	7	7.5×10 <sup>4</sup>	1-5	3
PBS	有	無	4	1.8×10 <sup>5</sup>	32-87	65
PBS	有	無	3	1.8×10 <sup>4</sup>	9-44	28
Tris-glycine	有	無	4	1.8×10 <sup>5</sup>	37-160	98
Tris-glycine	有	無	3	1.8×10 <sup>4</sup>	47-129	80
PBS	無	リパーゼ	4	6.9x10 <sup>3</sup>	7-23	16
PBS	無	アミラーゼ	4	6.9x10 <sup>3</sup>	13-37	24
Tris-glycine	無	リパーゼ	4	6.9x10 <sup>3</sup>	19-56	40
Tris-glycine	無	アミラーゼ	3	6.9x10 <sup>3</sup>	11-48	26
PBS	無	アスコルビン酸	4	4.5x10 <sup>4</sup>	0.2-4	2

表5 キンピラゴボウからのFCV回収状況

食品洗浄液	検体数	イソアミルアルコール処理	FCV添加量 (コピー)	回収率(%)	平均回収率 (%)
PBS	2	無	$2.8 \times 10^3$	4-5	5
PBS	2	有	$2.8 \times 10^3$	16-19	17
Tris-glycine	4	無	$6.9 \times 10^3$	32-68	52
Tris-glycine	3	有	$6.9 \times 10^3$	48-69	60

表6 冷凍ラズベリーからの処理方法別FCV回収状況

洗浄液	検体数	FCV添加量 (コピー)	FCV回収率	平均回収率 (%)
PBS	4	$1.1-7.5 \times 10^4$	0.4-4	2
Tris	4	$9.2 \times 10^3$	0.4-3	2
PBS+ペクチナーゼ処理	10	$7.5 \times 10^4$	5-11	8
Tris+ペクチナーゼ処理	8	$6.4-9.2 \times 10^3$	2-6	3
3%BE加PBS	4	$1.1 \times 10^4$	44-68	56
3%BE加Tris	8	$9.3 \times 10^3-1.9 \times 10^4$	2-6	4

BE: ビーフエキス Tris: Tris-glycine 液 (pH9.5)

表7 冷凍および生鮮果実からのFCV回収状況 (洗浄液: 3%BE加PBS)

食品名	検体数	FCV添加量 (コピー)	FCV回収率 (%)	平均回収率 (%)
冷凍ブルーベリー	2	$1.1 \times 10^4$	34-89	61
冷凍ストロベリー	3	$2.0 \times 10^4$	11-80	38
生鮮ブルーベリー	2	$1.1 \times 10^4$	182-188	185
生鮮ストロベリー	2	$1.1 \times 10^4$	20-26	23
生鮮パイナップル	2	$2.0 \times 10^4$	36-38	37

表8 ACP 微粒子濃縮法による種々の食品からのFCV回収状況

食品	ウイルス回収率 ( )内の数値は平均回収率		
	5%以下	6-10%	11%以上
野菜・果実			千切りキャベツ(32)a カットレタス(50)a ポテトサラダ(16)a ハルサメサラダ(17)a 中華風きゅうりの和え物(73)a つぼ漬(17)a キンピラゴボウ(60)ce 冷凍果実(38-61)b 生鮮果実(23-185)b
穀物		ロールパン(9)a フライドポテト(7)c	白飯(14)a ゆでうどん(29)a ソース焼きそば(33)a うずら豆の煮物(11)a ミートソーススパゲティ(80)ce マカロニサラダ(192)beg
食肉・魚肉			スライスハム(45)ae 皮なしウインナー(16)a つくね(19)a 肉団子の甘酢あん(25)a マグロ刺身(52)d 焼鮭(37)b
その他	小豆あん(<1)a シュークリーム(<1)a ひじきの煮物(0)a 卵の花(0)a 白和え(0)a タマゴフィリング (<1) a ツナフィリング (2) a ハムカツ (<1) a		

a: 洗浄液 PBS b: 洗浄液 3%BE 加 PBS c: 洗浄液 Tris-glycine  
d: 洗浄液 pH3 に調整した蒸留水 e: イソアミルアルコール処理

f : アスコルビン酸添加 g : 食品残渣除去において  $13,420 \times g$  で遠心

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リスク管理に関する研究」  
総合研究分担報告(平成 22～24 年度)

カキ中腸腺からのノロウイルス (NoV) 濃縮・抽出法の検討

研究協力者	植木 洋	宮城県保健環境センター
研究分担者	田中智之	堺市衛生研究所
研究協力者	川端淑子	宮城県保健環境センター
研究協力者	高橋由理	宮城県保健環境センター

研究要旨

カキからの効率の高いノロウイルス (NoV) 濃縮・抽出法を検討するためにカキ中腸腺を細胞破碎後にアミラーゼ (AM) とリパーゼ (LP) で処理した方法(以下それぞれ AM 直接法、LP 直接法)、中腸腺に所定濃度の AM よび LP を添加(以下それぞれ AM 処理、LP 処理)消化後、ストマッカーで粉碎し遠心上清にポリエチレングリコール (PEG) 処理を加えた方法、さらには酵素を用いない細胞破碎法を改良した方法(改良細胞破碎法)で中腸腺から NoV 濃縮・抽出後に、定量 PCR 法で遺伝子の検出を行い NoV の濃縮・抽出効果を評価した。

その結果、検出率は AM を用いた方法が高い傾向を示したが、カキの採取時期によっては LP が有効であることも確認された。一方 AM 直接法と改良細胞破碎法の比較では AM 直接法の検出率が高かったが、それぞれの方法で中腸腺 1g から検出された NoV 遺伝子を統計学的に解析した結果、抽出・濃縮効果に有意差は確認されなかった。

A. 研究目的

効率の高いカキからのノロウイルス (NoV) 濃縮・抽出法の開発は NoV による食中毒発生リスク軽減対策を構築する上で重要である。そこでカキ中腸腺からの NoV 濃縮・抽出方法について検討を行った。

に出荷された県内産市販カキ計 130 個体を対象とした。

1-2. AM 処理と LP 処理に PEG を加えた方法の比較

2010 年 9 月に県内の下水処理施設処理水受容河川に垂下したカキ 39 個体を用いた。

B. 研究方法

1. 材料

1-1. AM 直接法と LP 直接法の比較

2009 年 12 月から 2010 年 3 月の期間

1-3. AM 直接法と改良細胞破碎法の比較

2012 年 2 月に県内で採取した浄化前のカキ 40 個体を対象とした。

2. 方法

## 2-1. AM 直接法と LP 直接法の比較

奥村ら (2008) の方法に準じて行った。すなわち、AM 溶液はリン酸緩衝液 (pH7.45) を、LP 溶液は酢酸緩衝液 (pH4.40) をそれぞれ用い、カキ中腸腺 1 個体に対し濃度 10mg/ml の酵素溶液を 1ml 添加した。その後、細胞破碎法 (4,500rpm・1分) で破碎し、37°C、1 時間の消化後、9,200×g で 10 分間遠心した上清を NoV 濃縮液とした。NoV 濃縮液からのウイルス RNA の抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) で行った。なお、NoV 遺伝子の定量は平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発第 0514004 号の通知 (以下 通知法) に準じて実施した。

検体数は AM 直接法および LP 直接法ともに、それぞれ 65 個体ずつとした。

## 2-2. AM 処理と LP 処理に PEG を加えた方法の比較

食品のウイルス標準試験法検討委員会で検討した方法を改変して行った。すなわち、AM 処理はカキ中腸腺 1 個体をリン酸緩衝液で 10% とし最終濃度 2.5mg/ml になるように AM を加えた。同様に、LP 処理は酢酸緩衝液で 10% とし最終濃度 10mg/ml になるように LP を加えた。それぞれの酵素を添加後ストマッカーを用いて中腸腺試料を粉碎した。

37.0°C で 1 時間消化後 8,000×g で 20 分間遠心した上清を PEG 処理し、さらに 8,000×g で 30 分遠心した沈渣を SDS-トリスグリシン緩衝液 (pH8.3) で 10% から 20% に再浮遊した溶液を NoV 濃縮液とした。NoV 濃縮液からのウイルス RNA の抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いた。その後通知法

に従い定量 PCR 法で NoV 遺伝子の検出を行った。

## 2-3. AM 直接法と改良細胞破碎法の比較

改良細胞破碎法はカキ中腸腺 1 個につき蒸留水 2.5ml を添加し 3,500rpm・10 秒破碎後、10,000rpm・10 分遠心した上清を NoV 抽出液とした。

一方 AM 直接法は、食品のウイルス標準試験法検討委員会の方法に準じて行った。

それぞれの方法で濃縮・抽出した NoV からのウイルス RNA は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出後、通知法に準じて遺伝子の定量を行った。

これら二方法で得られた定量値より中腸腺 1g あたりに含まれる NoV (NoV 遺伝子) を算出し換算値を用いて、独立した 2 群の差を検定する Mann-Whitney U test により統計学的に解析し、抽出・濃縮効果を検討した。

(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

### 3. 結果

#### 3-1. AM 直接法と LP 直接法の比較 (表-1)

本研究では、定量の際に蛍光強度が閾値を超えた場合に、定量値に関わらず陽性とした。

酵素別 NoV 遺伝子検出率は、AM 直接法は 13.8% (9/65) に対し LP 直接法は 20.0% (13/65) であった。月別では 2009 年 12 月に採取したカキの検出率は AM 直接法が LP 直接法より高かったが (AM



直接法 6.9%、LP 直接法 3.4%)、2010 年 1 月から 3 月にかけて採取したカキの陽性率は LP 直接法で処理した群が高い傾向を示した(1 月 AM 直接法 20.0%、LP 直接法 40.0%、同じく 2 月 28.6%、57.1%、3 月 16.7%、25.0%)。

### 3-2. AM 処理と LP 処理に PEG を加えた方法の比較 (表-2)

AM 処理後 PEG 沈を行った 19 検体と LP 処理後 PEG 沈を行った 20 検体について NoV 遺伝子の検出率を比較した。その結果、前者の検出率が 26.3% (5/19) であったのに対し後者は 5.0% (1/20) であった。

### 3-3. AM 直接法と改良細胞破碎法の比較 (表-3)

AM 直接法で 20 検体、改良細胞破碎法で 20 検体 NoV 濃縮・抽出処理を行い NoV 遺伝子の検出率を比較した結果、AM 直接法の検出率が 65.0% (13/20) であったのに対し、改良細胞破碎法の検出率は 35.0% (7/20) であった。

それぞれの方法で得られた中腸腺 1g に含まれる NoV (NoV 遺伝子) の平均値を図-1 に示す。AM 直接法が 9.0 コピー/g であったのに対し細胞破碎法は 3.1 コピー/g であった。さらに各々の方法で得られた平均値について Mann-Whitney U test を行い統計学的に解析した。帰無仮説  $H_0$  を「改良細胞破碎法と AM 直接法にはカキ中腸腺からの NoV 抽出・濃縮に差がある。」として解析した結果、危険率 5% ( $P=0.05$ ) で棄却された。その結果、これら二方法を用いた抽出・濃縮効果には、有意差はないことが確認された。

## D. 考察

### 1. AM 直接法と LP 直接法の比較

カキ体内の構成成分は、放卵放精後および性成熟開始前 (10 月から 3 月) と性成熟過程 (4 月から 6 月) で異なり、性成熟過程には中腸腺の脂肪分が増加することが知られている。奥村ら (2008) は春季に採取したカキと冬季に採取したカキを対象にウイルスを添加し AM 直接法と LP 直接法でそれぞれ回収実験を行った結果、AM 直接法を用いた場合、春季のカキからのウイルスの回収が低下したが、LP 直接法ではそのような低下はみられなかったと報告している。本研究においても 12 月に採取したカキでは AM 直接法の検出率が高かったが、春季に向かう時期のカキについては LP 直接法の検出率が高い傾向が認められた。これは AM 直接法において春季のカキからの NoV 検出率が低下したためと考えられる。

### 2. AM 処理と LP 処理に PEG を加えた方法の比較

比較した二方法において NoV 遺伝子の検出率に 5 倍以上の違いが確認された。一般に PEG 法は pH 酸性下で濃縮効果が低下する傾向にあるのは、緩衝液として pH4.5 の酢酸緩衝液を用いたためであると考えられた。

### 3. AM 直接法と改良細胞破碎法の比較

酵素を用いたカキ中腸腺からの NoV 濃縮は、操作の過程において煩瑣なことが多いために、多検体の処理には適していないこともある。そこで細胞破碎法に改良を加え AM 直接法と比較した

結果、AM 直接法の検出率が高かったが、抽出・濃縮効果に統計学的な有意差は確認されなかった。カキ中腸腺には PCR 阻害物質が含まれていることが報告されており、乳剤濃度が高い場合は NoV の検出にこのことも大きな影響を及ぼす要因になる。現行の細胞破碎法は中腸腺乳剤の濃度が 50%以上であることが多く、中腸腺からウイルスがリリースされにくいため、改良法では乳剤濃度を従来の 2.5 倍低くなるようにした。細胞破碎法でカキ中腸腺から NoV を抽出する際は、乳剤濃度をある程度低くすることにより抽出効果が高くなると推測された。

#### E. 結論

カキ中腸腺からの NoV の濃縮には、AM や LP を用いた方法は有効であることが確認された。特に AM を用いた方法はカキの成熟に関係なく効果があった。一方 LP は中腸腺の脂肪分が増加する時期のカキからの NoV 濃縮には有効性が確認された。しかし、AM や LP 等の酵素を用いた濃縮法は操作が煩雑であり多検体を処理するには適していない場合もある。そこで AM 直接法と酵素を用いない改良細胞破碎法による NoV 濃縮・抽出について検討した結果、検出率と中腸腺 1g に含まれる NoV 遺伝子の平均値は AM 直接法が高い値を示したが、二つの方法には、抽出・濃縮効果に有意差は確認されなかった。

#### F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表  
第 58 回日本ウイルス学会学術集会  
「酵素を用いたカキからのノロウイルス濃縮法の検討」  
高橋由理、植木 洋、阿部美和、  
佐藤由紀、菅原優子、沖村容子、  
野田 衛、真砂佳史、大村達夫

#### 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. AM直接法とLP直接法のNoV遺伝子検出率

	AM直接法(%)	LP直接法(%)
12月	6.9	3.4
1月	20.0	40.0
2月	28.6	57.1
3月	16.7	25.0
全期間	13.8	20.0

表-2. AM処理とLP処理にPEGを加えた方法のNoV遺伝子検出率

	検体数	検出数	検出率(%)
AM+PEG法	19	5	26.3
LP+PEG法	20	1	5.0

表-3. 改良細胞破碎法とAM直接法のNoV検出率

	検体数	検出数	検出率(%)
改良細胞破碎法	20	7	35.0
AM直接法	20	13	65.0

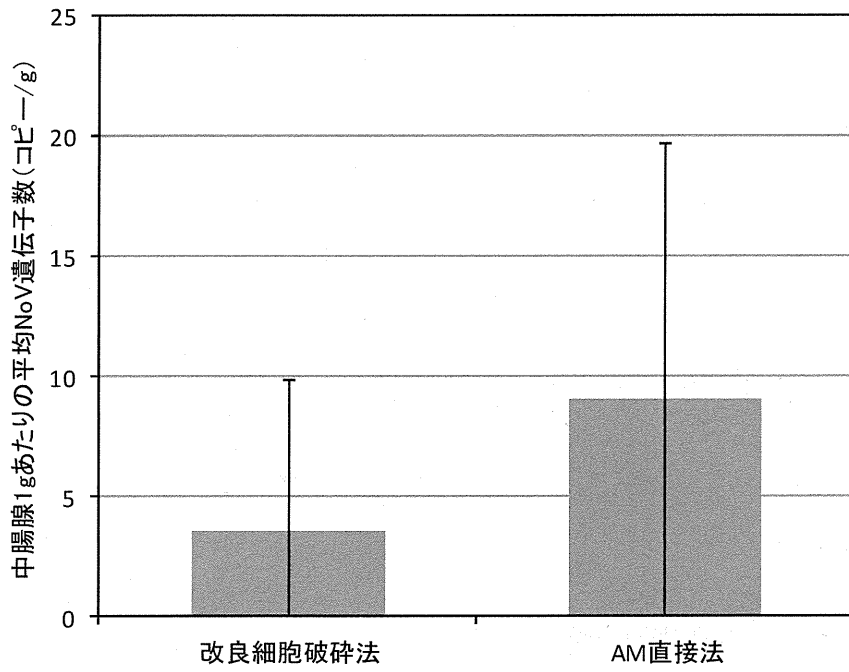


図-1. AM 直接法と改良細胞破碎法でカキ中腸腺から検出された NoV 遺伝子の平均値  
 (中腸腺 1g あたりの平均値)  
 エラーバーは標準偏差を示す

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リスク管理に関する研究」  
総合研究分担報告(平成 22~24 年度)

ノロウイルスによる環境の表面汚染検出法の検討

研究協力者 田村 務 新潟県保健環境科学研究所  
研究分担者 田中 智之 堺市衛生研究所

研究要旨

ノロウイルスによる手指汚染が食品の表面汚染につながり、食中毒が発生する事例が多い。そこで、環境等の表面におけるノロウイルス汚染のリスク評価のため、比較的清浄な検体からノロウイルスの濃縮法として、牛血清アルブミン (BSA)、ポリエチレングリコール 6000 (PEG)、及び NaCl を使用した水性二相分配法 (BSA-PEG ATPS 法) を構築した。更に、実験的に作成したノロウイルス汚染ステンレス板から、ふきとり法によってどの程度ノロウイルスが回収できるか検討した。

BSA-PEG ATPS 法により、ノロウイルスは BSA 層に濃縮でき、BSA 層から核酸抽出して、リアルタイム RT-PCR 法により検出することができた。本法によるリン酸緩衝生理食塩水への  $10^4 \sim 10^5$  個のノロウイルス添加回収試験では、37~85%の回収率が得られ、濃縮法として使用できると思われた。

$10^4 \sim 10^5$  個のノロウイルスと BSA、サラダ油が含まれる汚染試料で、ステンレス板を汚染し、乾燥後にふきとりした検体から、BSA-PEG ATPS 法によりノロウイルスの検出を行った。滅菌ガーゼを使用したふきとり法では、4%と回収率が低かった。ガーゼへ直接汚染試料を添加して回収した結果、75%の回収率が得られたことから、汚染ステンレス板の作成過程で、ノロウイルスが壊れる可能性が示唆された。汚染ステンレス板を使用したノロウイルスの回収率の測定は今回の実験系では難しく、更に検討が必要と思われた。

A. 研究目的

ノロウイルスによる調理従事者の手指汚染が、食品の表面を汚染し、食中毒につながっている事例が多く報告されている。そのため、手指、食品、調理環境の表面等のノロウイルス汚染を調べるた

め、比較的清浄な検体からノロウイルスを検出する必要がある。

しかし、平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発第 1105001 号厚生労働省医薬品食品局食品安全部監視安全課長通知 (通知法) で示されているポリエチレングリコール

6000 (PEG)を用いた沈殿法は、主な検査対象はカキの中腸腺であり、夾雑物が少ない検体からの回収率が低くなることが経験される。また、同通知中には、超遠心機を使用したウイルスを濃縮する方法もあるが、検体量や数が多い場合は、大型の超遠心機が必要となる。

そこで、タンパク質やウイルスの濃縮法として使用されている水性二相分配法<sup>1)</sup>を利用して、比較的清浄な検体からノロウイルスを濃縮する方法を構築した。

更に、この方法を使用して、ノロウイルス汚染ステンレス板からのふきとり法により、どの程度ノロウイルスを回収できるか検討した。

## B. 研究方法

### 1. 牛血清アルブミン (BSA) とポリエチレングリコール (PEG) による水性二相分配法を用いたノロウイルスの添加回収試験

#### (1)材料

添加回収試験で使用する添加用のノロウイルスは、GII.4 陽性便から、BSA 沈殿法と超遠心法により濃縮・精製して、約  $1.7 \times 10^6$  個/100  $\mu$ l 濃度としてストックし、これを約  $10^4 \sim 10^5$  個/100  $\mu$ l に希釈して添加用ノロウイルス液とした。

BSA は結晶 BSA (Albumin from bovine serum、A3659-100G、Sigma) を使用し、PEG はポリエチレングリコール 6000 (Wako) を使用した。

#### (2)方法

8ml または 35ml の pH7.2 リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に添加用ノロウイルス液を加えた。

BSA を 8ml の場合は 3%、35ml の場合は 1.75% 添加し、45°C の温浴中で溶解した。次に、PEG を 12%、NaCl を 1M 濃度となるように添加し、同様に加温溶解した。

冷蔵で 8 時間静置した後、10,000rpm (9800g) で 30 分遠心し、BSA 層を分離した。上層の PEG 層をスポイトで除去し、下層を 1.5ml のマイクロチューブにうつした。

更に、14,000rpm (17000g) で遠心し、上層の PEG 層を完全に除去した。60~70  $\mu$ l 程度となることから、140  $\mu$ l になるよう PBS で希釈し、これを RNA 抽出用原液とした。

QIA viral RNA mini kit (QIAGEN) で RNA を抽出した。

抽出 RNA を TURBO DNA-free kit (Applied Biosystems) により DNase 処理後、High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems) により逆転写し、通知法 (ノロウイルスの検出法について、平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発第 0514004 号) と同様にリアルタイム PCR 法でノロウイルス遺伝子量を定量した。

実際に添加されたノロウイルス量から回収率を算出するため、添加用ノロウイルス液 100  $\mu$ l (約  $1.7 \times 10^4$  個) に 40  $\mu$ l の PBS (-) を加えて 140  $\mu$ l に調整し、試験検体と同様に抽出・逆転写・定量した。回収率の算出は、この添加ノロウイルス液で定量したコピー数を 100 として算出した。

### 2. 静置時間による添加回収率の変動

BSA、NaCl、PEG を溶解後、静置することで溶解していた BSA の分離が起こり、自然に BSA 層の形成が起こる。BSA 層は静

置時間が長くなるにつれて増加し、そのまま放置すると上層は透明となり、完全に二つの層に分離する。しかし、これらの溶媒を溶解した直後からミセル状に混濁することから、粒子状の分配が起こり始めていると考えられた。

そこで、検査時間の短縮の可能性を検討するため、静置時間によるノロウイルスの回収率の差を検討した。2.4の試験の10倍量のノロウイルスを添加した8mLのPBS(-)にBSAを3%濃度に溶解後、PEGを12%、1MのNaClを溶解後、1時間後と15時間後に遠心してBSA層を分離し、ノロウイルスの回収率を比較した。

### 3. ノロウイルス汚染ステンレス板のふきとり法による回収試験

#### (1) 汚染ステンレス板の作成とふきとり方法並びにノロウイルスの遺伝子検出法

調理室や手指のふきとりを想定して、タンパク質としてBSA、油脂としてサラダ油を添加した。2%BSA、0.2%サラダ油入りリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に、約 $10^4$ 個～ $10^5$ 個/ $50\mu\text{l}$ となるようにノロウイルスを添加してよく混和し、これを汚染試料とした。

30cm×22cmのステンレス板を、10cm×10cmに6区画した。70%エタノールとペーパータオルで清拭し、30分間安全キャビネット内でUV照射した。これに、ノロウイルス汚染試料を、1区画 $50\mu\text{l}$ ずつ、2%BSAに浸漬した綿棒で塗布した後、安全キャビネット内で30分間乾燥させて、ノロウイルス汚染ステンレス板を作成した。1つの条件で3回ふきとり(3区画使用)した。

ふきとり作業は縦横10往復実施し、縦

と横は別の面でふきとりした。

抽出用の緩衝液として、中性洗剤(チャーミークイック、ライオン株式会社)を0.05%添加したPBSを使用した。

緩衝液からのノロウイルスの濃縮法は、BSA-PEG水性二相分配法で行い、RNAの抽出はQIA Viral RNA mini Kit(QIAGEN)を使用した。抽出したRNAはHigh capacity RNA-to-cDNA Kit(Applied Biosystems)により逆転写したのち、通知法(ノロウイルスの検出法について、平成19年5月14日付け食安監発第0514004号)に従ってリアルタイムPCR法でノロウイルス遺伝子量を定量した。

#### (2) ガーゼによるふきとり法の検討

5cm×5cmの滅菌ガーゼを2分割し、折りたたんだものを、抽出用緩衝液 $500\mu\text{l}$ で濡らしてふきとりした。

通常、70%エタノールを使用すると、油脂やタンパク質をきれいに清拭することができる。そこで、滅菌ガーゼに70%エタノールを染みこませて清拭し、エタノールを使用しない場合と比較した。

#### (3) ガーゼからのノロウイルスの溶出効率の検討

ふきとりでは、ガーゼや綿棒など、ふきとりする物へウイルスが吸着された後、緩衝液へ入れた場合には、容易に溶出されなければならない。そこで、ガーゼへ直接ノロウイルスを添加し、ガーゼからの溶出効率について検討した。

#### (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. 牛血清アルブミン (BSA) とポリエチレングリコール (PEG) による水性二相分配法によるノロウイルスの添加回収試験

添加ノロウイルス量は  $5.7 \times 10^4$  個となり、この添加試料のコピー数を 100 として回収率を算出した。BSA-PEG 法の 8ml 系では 53%、35ml 系では 37% の回収率が得られた (表 1)。

### 2. 静置時間による添加回収率の変動

静置時間 1 時間と 15 時間の BSA の回収量はそれぞれ、75mg、99mg となり、時間が長くと BSA の回収量は多くなった。ノロウイルスの添加回収試験では、添加ノロウイルス量は  $6.4 \times 10^5$  個で、15 時間後の回収率が 45% となったのに対し、1 時間後は 85% と BSA の回収量とは逆にノロウイルスの回収率が高くなった (表 2)。

### 3. ノロウイルス汚染ステンレス板からのガーゼふきとり法によるノロウイルスの回収

#### (1) ガーゼふき取り法によるノロウイルスの回収率

滅菌ガーゼによるふきとり法では回収率は 4% となり、70% エタノールを併用したふきとり法では回収率は 0.1% と、エタノールを使用しない場合よりも低くなった。(表 3)。

#### (2) ガーゼからのノロウイルスの溶出効率の検討

ガーゼからの溶出効率は、汚染試料を緩衝液に直接添加した場合と比較して 75% と十分高い溶出効率となった (表 4)。

## D. 考察

水性二相分配法によるウイルスの濃縮は、通常 PEG とデキストランの系で行われている。ウイルスはデキストラン層に移行し、デキストランを除去して、ウイルスを回収する方法が常用されている。今回、タンパク質の濃縮法を応用し、BSA 層にノロウイルスを濃縮し、BSA 層から直接核酸抽出キットにより、核酸を抽出する方法を構築した。この方法を用いて、ノロウイルス  $10^4 \sim 10^5$  個の添加回収試験により、ノロウイルスの回収率 37~85% を得ることができた。

PEG と NaCl を溶解後、15 時間の静置時間を 1 時間に短縮しても高い回収率が得られた。この際、15 時間静置よりも 1 時間の静置のほうが、BSA の回収量が少なかったことから、回収できた BSA のタンパク量が多すぎて、核酸抽出効率が低下しているものと推測された。このことから、静置時間は 1 時間でも十分であること、抽出キットの溶解液を多くして、抽出効率を上げることが必要であると思われる。

ノロウイルスの濃縮法には様々な方法が検討されているが、器具や施設のふきとり検体などの比較的清浄な検体の不意の検査依頼があった際にこの方法は有効に活用できると思われる。

この濃縮方法を応用して、ノロウイルス汚染ステンレス板からガーゼによるふきとり法でノロウイルスの回収を行った。ガーゼによるふきとりでは、 $10^4$  個の汚染量で、4% の回収率と低かった。また、エタノールを併用すると、見た目ではきれいに清拭できるものの、ノロウイルスの回収率はさらに低下した。エタノールによるウイルス粒子の変性がある程度起こ



るものと推測された。

滅菌ガーゼによる回収率が低かったことから、ふきとり後にガーゼに吸着したノロウイルスが容易に緩衝液に溶出できない可能性が考えられた。そこで、ガーゼに直接汚染試料を添加して溶出効率を確認したところ、75%回収することができ、溶出性は良好であった。

これらのことから、ステンレス板を汚染試料で塗布し、乾燥させた状態ではウイルス粒子が壊れていることが推測され、回収率の低下につながったと思われる。汚染ステンレス板を使用した今回の実験系で、ノロウイルスの回収率の測定は難しく、更に検討が必要と思われる。

#### E. 結論

1. 牛血清アルブミン (BSA)、ポリエチレングリコール 6000、及び NaCl を使用した水性二相分配法により、PBS に添加したノロウイルスを BSA 層に濃縮することができた。本法を使用した、8ml 又は 35ml の PBS(-) へのノロウイルス  $10^4 \sim 10^5$  個の添加回収試験により、ノロウイルスの回収率は 37~85% のとなった。本法は、ふきとり検体などの比較的清浄な検体からのノロウイルスの濃縮に適用できると思われる。

2. アルブミンとサラダ油が含まれるノロウイルス液によって汚染したステンレス板から、滅菌ガーゼを用いたふきとり法と水性二相分配法による濃縮法を使用して、ノロウイルスを回収した。 $10^4$  個の汚染量で、回収率は 4% と低かった。汚染ステンレス板の作成過程でウイルス粒子が壊れる可能性が示唆され、汚染ステンレス板を使用したふきとりによる回収率の確認はできなかった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

田村 務, 渡邊香奈子, 田澤 崇, 渡部 香, 昆美也子, 野田 衛: 牛血清アルブミンとポリエチレングリコールを使用した二相分配法によるノロウイルスの濃縮, 第 32 回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 10/7(2011)

#### 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 ノロウイルス添加回収試験結果

PBS(-):8mL							
条 件				結 果			
方法	BSA 濃度 (%)	PEG 濃度 (%)	繰り返 し数	実測値平 均 (コピー数)	標準 偏差	変動 係数	回収率 (%)
BSA-PEG	3	12	5	379	140	0.37	53
PEG沈殿法	—	12	5	85	36	0.42	12
添加試料			2	717			100

PBS(-):35mL							
条 件				結 果			
方法	BSA 濃度 (%)	PEG 濃度 (%)	繰り返 し数	実測値平 均 (コピー数)	標準 偏差	変動 係数	回収率 (%)
1.75%BSA-PEG	1.75	12	3	252	36	0.14	37
2.0%BSA-PEG	2	12	3	204	52	0.25	30
PEG沈殿法	—	12	3	129	48	0.37	19
添加試料			2	684			100

表 2 静置時間によるノロウイルスの添加回収率の変化

静置時間	回収BSA量 (mg)	繰り返し 数	実測値平均 (コピー数)	標準 偏差	変動 係数	回収率 (%)
1時間	75	5	6,776	843.7	0.1	85
15時間	99	5	3,578	325.5	0.1	45
添加試料		2	7,975			

表 3 ガーゼを用いたふきとり検査結果

	繰り返 し数	実測値平均 (コピー数)	標準 偏差	変動 係数	回収率A (%)	回収率B (%)
ガーゼ拭き取り	3	35.1	20.3	0.58	5.40	4.05
ガーゼ+エタノール拭き取り	3	0.7	1.3	1.73	0.11	0.08
汚染試料をPBSに添加して回収	2	650.1	119.1	0.18	100.000	75.0
汚染試料から直接QIA抽出	2	866.8	6.1	0.01		100.0

※回収率 A は、汚染試料を PBS に添加し、サンプルと同様に濃縮工程を行ったものとの比較。回収率 B は、サンプルに加えた汚染試料から直接 RNA 抽出したものとの比較。

表 4 ガーゼへの汚染試料の直接添加回収試験

	繰り返 し数	実測値平均 (コピー数)	標準 偏差	変動 係数	回収率 (%)
ガーゼへ汚染試料を直接添加	3	124.3	27.2	0.22	74.73
汚染試料を緩衝液に添加して回収	3	166.4	53.0	0.32	100.00

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リスク管理に関する研究」  
総合研究協力報告(平成 22～24 年度)

集団胃腸炎事例を対象とした胃腸炎ウイルスの検索

研究協力者	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	後藤 明子	北海道立衛生研究所
研究協力者	石田勢津子	北海道立衛生研究所

研究要旨

食中毒起因ウイルスとしてのリスクが高いウイルスを検索することにより適切なウイルス検査体制を確立することを目的として、食中毒疑い事例および感染症疑い事例を対象に、胃腸炎ウイルス感染の実態調査を行った。二枚貝の喫食のみられた食中毒疑い事例では、ウイルスが検出された 49 事例のうち、ノロウイルス (NoV) のみ検出された事例が 28 事例 (57%)、NoV と他のウイルスの組み合わせで複数のウイルスが検出された事例が 20 事例 (41%) あり、合わせて 98% から NoV が検出された。NoV に次いで多く検出されたウイルスは、アイチウイルス (AiV)、サポウイルス (SaV)、アストロウイルス (AstV)、エンテロウイルス (EntV) の順であった。また、原因疑い食品として検査を実施した二枚貝からは、NoV, SaV, AiV, AstV, A 群ロタウイルス (RV-A) が検出された。非二枚貝関連の食中毒疑い事例では、NoV のみまたは主に NoV が検出された事例が 96% を占めていたが、NoV 以外のウイルスとして SaV と RV-A の単独感染事例が 1 事例ずつ認められた。SaV と RV-A は、中学生以上の年齢層の感染症疑い事例においても NoV に次いで多く検出された。以上の結果から、食中毒が疑われる事例のウイルス検査においては、まず NoV 検査を実施し、NoV の検出率が低かった場合は、二枚貝喫食事例では AiV, SaV, AstV, RV-A などを、非二枚貝関連事例では SaV と RV-A を第 2 の選択肢とするのが適切と考えられた。これらのウイルスについては食品検査にも対応できるよう、早急に検査体制を整えておく必要がある。

A. 研究目的

食中毒が疑われる事例の原因究明にあたり、ウイルス検索の第 1 の選択肢は NoV である。NoV 以外の胃腸炎ウイルスについ

ては、通常、NoV が検出されないか検出率が低い場合に検査が実施されているに過ぎず、食中毒起因ウイルスとしての情報蓄積は NoV に比べて大幅に遅れている。

また、NoVのように成人を含む幅広い年齢層に感染し発症を引き起こすウイルスでは、①調理従事者によるウイルス持ち込みのリスクが高く、②汚染食品の喫食者における感染率や発症率が高い、と推測される。しかし、NoV以外の胃腸炎ウイルスの感染状況については、乳幼児に関する情報は比較的豊富だが、それ以上の年齢層についての情報は非常に乏しい。そこで本研究では、各種胃腸炎ウイルスの食中毒及び感染症事例への関与の実態について調査を行い、食品媒介による感染リスクの高いウイルスを推定することと、その情報を基に適切なウイルス検査体制を確立し、食中毒予防対策に寄与することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 調査対象

(1) 二枚貝の喫食がみられた食中毒疑い事例：2000年7月から2012年8月までに発生した50事例の患者糞便366検体、二枚貝6ロット。

(2) 非二枚貝関連の食中毒疑い事例：2007年10月から2012年8月までに発生した80事例の患者糞便541検体。

(3) 感染症疑い事例：2007年10月から2012年8月までの間に発生した157事例の患者糞便812検体。

### 2. 検索ウイルス

糞便についてはNoV、SaV、AstV、AiV、RV-A、C群ロタウイルス(RV-C)、アデノウイルス(AdV)、パレコウイルス(PeV)、ボカウイルス(BoV)の9種類を対象とし、二枚貝喫食事例の患者糞便についてのみEntVについても検索を行った。二枚貝に

ついては、10種類のウイルス：NoV、SaV、AstV、AiV、RV-A、RV-C、AdV、PeV、A型肝炎ウイルス(HAV)、E型肝炎ウイルス(HEV)についての検索を行った。

### 3. 糞便検体からのウイルス遺伝子の検出

10%糞便乳剤からQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて核酸を抽出し、DNaseI (TaKaRa)で処理した後、random hexamer 及び SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen)を用いてcDNA合成を行った。

NoVの検出は、厚生労働省通知の方法(食安監発第0514004号、平成19年5月14日)に準じて行った。また、EntVの検出は、SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen)とEVP4 (Ishiko et al, J Infect Dis, 185:744-754, 2002) /OL68-1 (Olive et al, J Gen Virol, 71:1990)のプライマーセットを用いたOne Step PCRにより行った。他の8種類のウイルスの検出にはマルチプレックスPCR法を用いた。

#### (1) SaV、AstV、AiV、PeVの検出

Multiplex PCR Assay Kit (TaKaRa)を使用した。プライマーは、SaV ; SaV124F, 1F, 5F/SaV1245R (Oka et al, J Med Virol, 78 : 2006)、AstV ; PreCAP1/AC230 (Sakamoto et al, J Med Virol, 61:2000、Sakon et al, J Med Virol, 61 : 2000)、AiV ; C(+)/C(-) (Yamashita et al, J Clin Microbiol, 38 : 2000)、PeV ; ev22+/ev22- (Joki-Korpela et al, Clin Infect Dis, 26 : 1998)を用いた。

#### (2) AdV、BoVの検出

Multiplex PCR Assay Kitを使用した。