

図4. 抗体パネルの構築

GI.5:Yokotel, GI.6:Nichinan, GII.4:Kumamoto6, GII.7:20072248, GIV:Yakumo8, GV:NK24, Cocktail:616+1803+Y1A8+1496

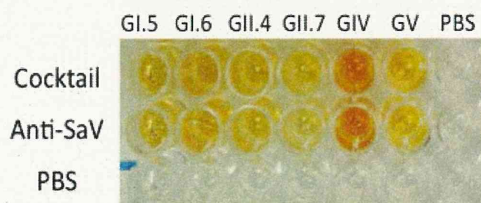


図5. サンドウィッチ法

GI.5:Yokotel, GI.6:Nichinan, GII.4:Kumamoto6, GII.7:20072248, GIV:Yakumo8, GV:NK24, Cocktail:616+1803+Y1A8+1496  
 Cocktail 抗体および Anti-SaV 抗血清を固相化抗体とし、各 VLPs を反応後、捕捉抗体としてビオチン化抗体 Y2A4 を添加した。

## II 検査法マニュアル

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」(平成 22～24 年度)

検査法マニュアル

## 一般的な食品検体からのウイルスの回収・濃縮法

### 1. 適用範囲

#### 1) 対象ウイルス

ノロウイルス, サポウイルス, A 型肝炎ウイルス等の食品媒介性ウイルス。

#### 2) 対象食品

食材および調理済の食品一般。

#### 3) 本プロトコールの範囲

食品一般から洗滌液にて遊離させたウイルス粒子を, 抗原抗体複合体の形で黄色ブドウ球菌の表面に吸着させることによって回収し, RNA を抽出した後, RT-PCR の鋳型となる cDNA を合成するまでの工程。

### 2. 必要な器具・試薬

#### 1) 器具

マイクロピペットおよびチップ (1000  $\mu$ l, 200  $\mu$ l)

ディスポーザブル微量遠心管 (1.5ml, 0.2ml あるいは 0.5ml)

ディスポーザブル遠心管 (50ml 程度)

フィルター付き滅菌バッグ(アズワン サニスペックテストバッグ 2-6391-03 等)

ディスポーザブルスポイト (2.0ml および 5.0ml 程度)

1.5ml 微量遠心管用遠心分離機

低速遠心分離機 (50ml ディスポーザブル遠心管を 1,870 $\times$ g(3,000rpm 程度)で遠心できる機器)

ペーパータオル

超音波洗浄器\*1 (ガラス器具洗浄に用いる水槽タイプのもの, 40kHz 程度)

ボルテックスミキサー

37°Cフラン器 (恒温槽でも可)

\*1 無くても実施可能だが、油物の食品検体の場合は使用した方がよい。

## 2) 試薬

下記の試薬のうち、アンダーラインを付したものについては、本プロトコルでの使用において同等以上の性能を有することが確認された場合は、他社メーカーの試薬を使用しても差し支えない。

食品洗滌液 (0.1M Tris・HCl - 0.5M NaCl - 0.1% Tween20 (pH8.4))

10×食品洗滌液\*2 (1M Tris・HCl - 1% Tween20 (pH8.4))

塩化ナトリウム\*2

ウイルス捕捉用抗体(ガンマグロブリン製剤\*3 (静注用または筋注用医薬品)、ヒト血清\*4,5  
またはウイルス特異的抗血清\*5)

αアミラーゼ粉末 (和光純薬, 013-03732)

黄色ブドウ球菌加工試薬 (「PANSORBIN® Cells」, Calbiochem 507861-25ML または  
507861-50ML) \*6

TRIzol®-LS (invitrogen)

クロロホルム

エタノール

QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)

Recombinant RNase inhibitor (TaKaRa, 2313A)

dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP を各 10mM になるように混合)

Super Script®II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014)

逆転写反応専用プライマー\*7

遺伝子解析用蒸留水(高圧滅菌済, DNase フリー, RNase フリー)

\*2 液状の食品の場合に使用する。

\*3 ガンマガード静注用 2.5g (Baxter, 1501891) などがある。患者便等由来のウイルスを用いて、本法でウイルスが回収できること(抗体陽性である)を確認して使用する。

\*4 抗体保有者のものを用いる場合。

\*5 保有しているか、入手可能な場合。

\*6 凍結乾燥品 (Calbiochem, 507862-5GM) に 0.1% アジ化ナトリウム添加 PBS を 31ml 加えたものを用いてもよい。また、黄色ブドウ球菌 (CowanI 株) を用いて、自家調製することができる<sup>1)</sup>。

\*7 本プロトコールにおいて抽出された RNA には黄色ブドウ球菌由来のものが含まれているため、cDNA 合成において、Random primer や Oligo(dT) primer は使用できず、ウイルス特異的プライマーを用いる必要がある。特に、現在ノロウイルス検出に汎用されているカプシド領域の semi-nested PCR 法 (GI:COG1F/G1SKR ⇒ G1SKF/G1SKR, GII:COG2F/G2SKR ⇒ G2SKF/G2SKR) はリバーズ側プライマーが共通であることなどから、黄色ブドウ球菌由来 RNA の非特異的増幅が起こるため、逆転写反応専用のプライマーを使用する必要がある。その場合の逆転写反応専用プライマーを次のとおり例示する。他の RNA ウイルスにおいても、逆転写反应用プライマーと PCR 用プライマーが同じ場合は非特異的増幅が起こりやすいので、原則として逆転写反応専用プライマーを使用する。

・ノロウイルス GI 用 (PANR-G1)

PANR-G1a: 5' GTBCKMACATCAGCAATCA 3'

下線部は LNA (Locked Nucleic Acid) 修飾で合成する。

PANR-G1b: 5' GGTKCAAGSRYCCTAACATCWGCAATGA 3'

100 μM PANR-G1a と 100 μM PANR-G1b を 1:1 で混合したものを、PANR-G1 とする。

・ノロウイルス GII 用 (PANR-G2)

PANR-G2a: 5' TCYARWKYCTWACATCTAYAATYAYRTGGGGGAACAT 3'

PANR-G2b: 5' ARDGCCTAACATCWATAATYAYATGAGGGGAACAT 3'

PANR-G2c: 5' CTSACATCCACMAYYACRTGCGGRCACAT 3'

100 μM PANR-G2a, 100 μM PANR-G2b, および 100 μM PANR-G2c を 2:1:1 で混合したものを、PANR-G2 とする。

### 3. 操作法

1) 固形食品は 10g を量り取るか、それに満たない場合は重量を記録してフィルター

付き滅菌バッグに採取する。液状食品は 45ml を分取するか、それに満たない場合は容量を記録して滅菌バッグに採取する。固形・液状混合食品の場合は固形食品として扱う。

- 2) 固形食品に対しては、食品洗滌液 50ml を加えてよく混ぜる。液状食品に対しては、10×食品洗滌液 5ml と塩化ナトリウム 1.5g を加えてよく混ぜる(45ml 分取の場合)。液状食品の容量が 45ml に満たない場合は、その容量に応じて 10×食品洗滌液と塩化ナトリウムの添加量を調整する。
- 3) 食品検体と食品洗滌液の入ったフィルター付き滅菌バッグを食品浮遊液が水浴に沈むように超音波洗浄器に着けて、15 分間処理する。超音波洗浄器を用いない場合は、バッグの上から手でよく揉みほぐして食品に付着しているウイルス粒子を洗い出す。
- 4) 空の 50ml ディスポーザブル遠心管に  $\alpha$  アミラーゼ粉末 125mg を量り取る(検体の数だけ準備する)。
- 5) 超音波処理後のフィルター付き滅菌バッグからフィルター濾液約 45ml を、 $\alpha$  アミラーゼ粉末の入った遠心管に採取してよく混合する( $\alpha$  アミラーゼ粉末は不溶性成分を含むため完全には溶けない)。
- 6) 1,870×g(3,000rpm)、室温(25℃に設定)で 30 分間遠心する。この段階で、食品残渣と  $\alpha$  アミラーゼ粉末の不溶性成分が沈澱する。
- 7) ディスポーザブルスポイトを用いて、上清を別の 50ml ディスポーザブル遠心管に移す。多くの食品検体の場合、この上清は濁っているがそのまま問題はない。
- 8) ガンマグロブリン製剤、ヒト血清またはウイルス特異的抗血清を添加してよく混ぜる。添加量は、5%ガンマグロブリン製剤を用いる場合は 150  $\mu$  l、10%同製剤の場合は 75  $\mu$  l、15%同製剤の場合は 50  $\mu$  l、ヒト血清の場合は 500  $\mu$  l、ウイルス特異的抗血清の場合は 5  $\mu$  l とする。過剰量の添加は検出感度低下の原因となるため注意すること。
- 9) 黄色ブドウ球菌加工試薬 (PANSORBIN<sup>®</sup> Cells) 1.0ml (ウイルス特異的抗血清を用いる場合は 300  $\mu$  l) を添加してよく混合し、37℃ (フラン器か恒温槽) で 15 分間静置する。
- 10) 1,870×g(3,000rpm) で 20 分間遠心する。この段階で、ウイルス粒子を吸着した黄色ブドウ球菌が沈澱する。この遠心条件で沈澱する食品残渣はすでに除去済みであるから、上清が濁っていたとしてもここで沈澱してくることはない。
- 11) 50ml ディスポーザブル遠心管をデカントして、上清を別の遠心管に移して冷蔵保存

- する（他の原理による回収法を試みる場合に備える）。
- 12) 黄色ブドウ球菌が沈澱している遠心管をペーパータオルの上で逆さにして、わずかに残った上清を吸い取る。
  - 13) AVLBuffer (QIAamp® Viral RNA Mini Kit に添付されているもの) 0.25ml と TRIzol®-LS 0.75ml を遠心管に入れて黄色ブドウ球菌の沈澱を完全に均一になるまで懸濁し、1.5ml ディスポーザブル微量遠心管に移す。懸濁と微量遠心管に移す操作はディスポーザブルスポイトを使う（マイクロピペットの汚染を避けるため）。
  - 14) クロロホルム 0.2ml を加えて、ボルテックスミキサーでよく混ぜた後 13,000×g(12,000rpm)で15分間遠心する。
  - 15) 水層を別の微量遠心管に移し、0.8倍量のエタノール（水層が650μlの場合は、エタノールを520μl添加する）を加えてボルテックスミキサーでよく混合する。この段階でわずかに白濁が認められる場合があるが、そのまま先に進んで問題はない。
  - 16) 得られた液630μlをQIAamp スピнкаラム(2ml コレクションチューブの中にスピнкаラムが装着されている。)に入れ、6,000×g(8,100 rpm), 1分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい2mlのチューブに移し、残りの液(630μlより少量。多い場合は再度同様の操作を繰り返す)をカラム入れ、同様に遠心する。
  - 17) 以降はQIAamp® Viral RNA Mini Kitの説明書に従い、AW1の添加、遠心、AW2の添加、遠心、AVEへの回収等を行うことで、RNA抽出液が得られる。AVEは説明書どおり、60μl用いるが、スピнкаラムのフィルターに完全に浸み込んだこと（2～3分かかる場合がある）を確認してから遠心すること。
  - 18) 抽出したRNAは-80℃以下で凍結保存する。cDNAを合成する場合は次に進む。
  - 19) DNase処理から逆転写反応は、厚生労働省から通知されている「ノロウイルスの検出法(食安監発第1105001号)」に準じた方法等で実施する。DNase処理を行うと一般的に検出感度は低下する。本プロトコールでは逆転写反応専用プライマーを用いるので、DNase処理を省略しても構わないが、その場合は、増幅産物が目的とするウイルス由来であることをシーケンス検査等で確認するとともに、クロスコンタミネーションの防止には最大限の注意を払う必要がある。以下、逆転写反応について通知法に準じたSuper Script®II RNase H- Reverse Transcriptaseを用いた場合について例示する。

表1 逆転写反応液 (Super Script®II RNase H- Reverse Transcriptase を用いる場合)

試薬等	1 検体当たりの使用量 (μl)			
	15 μl 系	20 μl 系	30 μl 系	50 μl 系
抽出 RNA	7.5 μl	10.0 μl	15.0 μl	25.0 μl
5X SSII Buffer* <sup>8</sup>	3.0 μl	4.0 μl	6.0 μl	10.0 μl
10mM dNTPs	0.75 μl	1.0 μl	1.5 μl	2.5 μl
逆転写反応専用プライマー (100 μM)* <sup>9</sup>	0.375 μl	0.5 μl	0.75 μl	1.25 μl
Recombinant RNase inhibitor	0.5 μl	0.67 μl	1.0 μl	1.67 μl
100mM DTT* <sup>8</sup>	0.75 μl	1.0 μl	1.5 μl	2.5 μl
Super Script II RT (200u/μl)	0.75 μl	1.0 μl	1.5 μl	2.5 μl
遺伝子解析用蒸留水	1.375 μl	1.83 μl	2.75 μl	4.58 μl

\*<sup>8</sup> Super Script II RT に添付のものを用いる。

\*<sup>9</sup> ノロウイルスの場合, GI 用と GII 用の逆転写反応専用プライマーを混合してもよい (その場合は, プライマーの容量が 2 倍になるため, 表 1 の遺伝子解析用蒸留水を相当量だけ少なくする) が, 別々に逆転写反応を行うほうが感度は高い。

20) 表 1 のとおり, 0.2ml あるいは 0.5ml の微量遠心管を用いて処理混合液の調製を行う。

21) 42℃で 60 分間(30 分~2 時間), 逆転写反応を行い, 95℃, 5 分加熱後速やかに冷却する。これで cDNA 合成が完了する。

22) 以降は, 各ウイルスに対応した nested RT-PCR 法等による検出を試みる。

#### 4. 備考

本プロトコールにおいて合成された cDNA から PCR 法によって増幅された DNA 断片はシーケンス解析に用いることが可能であるが, 非特異的増幅反応を抑制するためにホットスタート・タッチダウン PCR (通知法の増幅サイクルの直前に 55℃から 51℃まで 1℃ずつ下げてアリーリングを行う 5 サイクルを挿入する)を行うことが望ましい。

リアルタイム PCR 法は, 使用する耐熱性 DNA 合成酵素や PCR 増幅装置の違いなどにより



結果が大きく異なる場合がある。食品から安定的にウイルス遺伝子を検出するためには、通常の nested PCR 法で遺伝子増幅を行った後、シーケンス解析を実施するか、あるいは、COG1F/G1SKR または COG2F/G2SKR で PCR 反応を行った後リアルタイム PCR を行う、nested リアルタイム PCR 法を実施することが推奨される。

通常のリアルタイム PCR 法で遺伝子検出を行う場合は、事前にリアルタイム PCR 用のマスターミックス液等について検討を行い、検出感度に問題がないことを確認する。比較的安定的な結果が得られるマスターミックス液としては LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS HybProbe (Roche, 3752178) または EagleTaq Master Mix with ROX (Roche, 6427022) がある。

本プロトコールにおいて、遠心分離における条件は、最大遠心加速度( $\times g$ )で記載してある。

#### 参考文献

- 1) Kessler, S. W.: Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A-antibody absorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. J. Immunol., 115, 1617-1624 (1975).

#### 連絡先

秋田県健康保健環境センター 斎藤博之

作成日：平成 25 年 1 月 13 日

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」(平成 22～24 年度)

検査法マニュアル

食品検体からのウイルス回収・濃縮に使用する  
黄色ブドウ球菌加工試薬の自家調製法

1. 適用範囲

1) 対象ウイルス

ノロウイルス, サポウイルス, A 型肝炎ウイルス等の食品媒介性ウイルス。

2) 対象検体

パンソルビン・トラップ法を適用する食材及び調理済の食品一般

3) 本プロトコールの範囲

黄色ブドウ球菌を培養・固定・熱処理して, 市販のパンソルビンに相当する試薬を調製するまでの工程。

2. 必要な器具・試薬

1) 器具

高速冷却遠心分離機(250～500ml のボトル型遠心管を,  $8,000 \times g$  で遠心できる機器)\*<sup>1</sup>

250～500ml ボトル型遠心管\*<sup>1</sup>

低速遠心分離機 (15ml と 50ml ディスポーザブル遠心管を  $1,870 \times g$ (3,000rpm 程度)で遠心できる機器)

振盪器付き恒温水槽

37°C フラン室\*<sup>2</sup>

マグネチックスターラー\*<sup>2</sup> (2 台準備)

マグネチックスターラー用攪拌子

温浴, またはホットプレート(使用時 80°C に設定)

20ml ガラス試験管, 及びそれに適合するシリコン栓(2 本準備)

2l 三角フラスコ(2本準備)

1l 三角フラスコ(1本準備)

200ml 三角フラスコ(中にマグネチックスターラー用攪拌子を入れたものを1本準備)

ディスポーザブル遠心管(50ml, 及び 15ml)

10ml 駒込ピペット

ディスポーザブルスポイト(2.0ml 程度)

10~20ml シリンジ

シリンジ用滅菌フィルターカートリッジ

アルミホイル

ペーパータオル

\*1 50ml 遠心管に分割しても実施可能だが、大容量のものの方が、作業が容易である。

\*2 フラン器でもよいが、その場合はマグネチックスターラーの電源を確保しなければならない(電池駆動型ならば可能)。

## 試薬

黄色ブドウ球菌(Cowan I株)<sup>\*3</sup>

抗生物質培地 3(ベクトンディッキンソン, 224320)

Bacto Casitone(ベクトンディッキンソン, 225930)

Bacto Yeast Extract(ベクトンディッキンソン, 212750)

$\beta$ -Glycerophosphate(Calbiochem, 35675-50GM)

Nicotinic Acid(Calbiochem, 481918-100GM)

Nicotinamide(Calbiochem, 481907)

Thiamine Hydrochloride(Calbiochem, 5871)

PBS-Azide(0.1%アジ化ナトリウム含有 PBS(-))

ホルマリン

<sup>\*3</sup> 菌株によってプロテイン A を産生しないか、含有量の低いものがあるので、臨床分離株は用いない。プロテイン A 生産用の Cowan I 株は、理化学研究所バイオリソースセンター([http://www.jcm.riken.jp/JCM/JCM\\_Home\\_J.shtml](http://www.jcm.riken.jp/JCM/JCM_Home_J.shtml))から入手することができる(JCM No.: 2179)。

### 3. 操作法

- 1) 「抗生物質培地 3」 17.5g, 「Bacto Casitone」 5g, 「Bacto Yeast Extract」 2.5g, 「 $\beta$ -glycerophosphate」 2.5g を 2l 三角フラスコに量り取り, 蒸留水 1l に溶解してアルミホイルでふたをし, 121°C で 15 分間高圧滅菌した後冷却する。同じものを 2 本調製する(合計で 2l)。
- 2) 「Nicotinic Acid」 0.1g, 「Nicotinamide」 0.1g, 「Thiamine Hydrochloride」 0.2g を蒸留水 100mL に溶解して, シリンジフィルターで濾過滅菌する。
- 3) 1) で調製した培地 1l につき, 2) で調製した添加物 1ml を加える。培地は使用時まで 4°C で保存する。
- 4) 3) で調製した培地を 5ml, 20ml 試験管に分取する(2 本準備)。
- 5) 黄色ブドウ球菌 Cowan I 株を 4) の試験管に入った培地に接種し, 37°C に設定した恒温水槽で振盪しながらオーバーナイト培養する。好気性菌であることから, 培地と空気が混じり合うように十分に振盪する必要がある。
- 6) 3) で調製した三角フラスコに入った培地に, 5) の培養液を全量加え(一部取ったものを戻す), 37°C のフラン室内で, マグネチックスターラーで攪拌しながら 48 時間培養する。
- 7) 培養液 2l をボトル型遠心管に分割して移し, 8,000×g で 10 分間遠心する。全ての培養液が入りきらないときは, 遠心操作を繰り返す。
- 8) 上清の培地をデカンテーションで捨て, 遠心管をペーパータオルの上で逆さにして, わずかに残った上清を吸い取る。
- 9) 菌体ペレットを 100ml の PBS-Azide に懸濁する。ペレットが複数の遠心管に分かれているので 10ml の駒込ピペットを使って, 1 本の遠心管にまとめる。
- 10) 8,000×g で 10 分間遠心する。
- 11) 上清の PBS-Azide をデカンテーションで捨て, 遠心管をペーパータオルの上で逆さにして, わずかに残った上清を吸い取る。
- 12) 菌体ペレットを 100ml の PBS-Azide に懸濁する。
- 13) 8,000×g で 10 分間遠心する。
- 14) 上清の PBS-Azide をデカンテーションで捨て, 遠心管をペーパータオルの上で逆さにして, わずかに残った上清を吸い取る。
- 15) 菌体ペレットを, 1.5%ホルマリンを含む PBS-Azide 100ml に懸濁し, 200ml 三角フラスコに移す。マグネチックスターラーで攪拌しながら室温で 90 分間処理する。

- 16) ホルマリン処理後の菌体懸濁液をボトル型遠心管に移す。
- 17) 8,000×g で 10 分間遠心する。
- 18) 上清の PBS-Azide をデカンテーションで捨て、遠心管をペーパータオルの上で逆さにして、わずかに残った上清を吸い取る。
- 19) 菌体ペレットを 100ml の PBS-Azide に懸濁する。
- 20) 17)-19)をもう一度繰り返す。
- 21) 菌体懸濁液を 1l 三角フラスコに移し、80℃に加温した温浴、またはホットプレートで 5 分間加熱する。液量に対して大きめのフラスコを使用するのは、熱源に接する面積を大きくするためである。
- 22) 加熱処理後の菌体懸濁液をボトル型遠心管に移す。
- 23) 8,000×g で 10 分間遠心する。
- 24) 上清の PBS-Azide をデカンテーションで捨て、遠心管をペーパータオルの上で逆さにして、わずかに残った上清を吸い取る。
- 25) 菌体ペレットを 100ml の PBS-Azide に懸濁する。
- 26) 23)-25)をもう一度繰り返す。
- 27) 8,000×g で 10 分間遠心する。
- 28) 菌体ペレットを 10ml の PBS-Azide に懸濁し、15ml ディスポーザブル遠心管に移す。
- 29) 1,870×g(3,000rpm 程度)で 10 分間遠心する。
- 30) 上清の PBS-Azide をディスポーザブルスポイトで吸い取って捨てる。
- 31) 菌体ペレットの量を 15ml 遠心管の目盛から読み取り、最終的に 16%となるように、PBS-Azide に懸濁しながら、50ml ディスポーザブル遠心管に移す。例えば、菌体ペレットの量が 5ml であったならば、PBS-Azide 26.25ml に懸濁することで、全量が 31.25ml の 16%懸濁液が出来上がる。
- 32) このまま 4℃で 1 年間保存できる。市販のパンソルビン(PANSORBIN® Cells: Calbiochem 507861-25ML または 507861-50ML)と同様に用いることができる。

#### 4. 備考

本プロトコールは原著<sup>1)</sup>に準拠しているが、現在では入手できない培地(Penassay Broth)については、同じ組成の「抗生物質培地 3」(抗生物質試験の基礎培地)で代替している。黄色ブドウ球菌を十分に培養できる他の液体培地を用いても差し支えない。

本プロトコールにおいて、遠心分離における条件は、最大遠心加速度( $\times g$ )で記載してある。

#### 参考文献

- 1) Kessler, S. W.: Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A-antibody absorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J. Immunol.*, **115**, 1617-1624 (1975).

#### 連絡先

秋田県健康環境センター 斎藤博之

作成日:平成 25 年 3 月 5 日

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」(平成 22～24 年度)

検査法マニュアル

## 一般的な食品検体および水検体からのウイルス回収・濃縮法

### 1. 適用範囲

#### 1) 対象ウイルス

ノロウイルス、サポウイルス、エンテロウイルス、A 型肝炎ウイルス等 RNA ウィルス

#### 2) 対象検体

食材、調理済み食品、河川水、海水、飲料水、

#### 3) 本プロトコールの範囲

食品検体から洗浄液によって遊離させたウイルス粒子を非晶性リン酸カルシウム (ACP) 微粒子に吸着させることによって回収し、ACP 微粒子をクエン酸で溶解した後、RNA を抽出するまでの行程。

### 2. 必要な器具・試薬

#### 1) 器具

- ・ストマッカーバッグ (フィルター無またはフィルター付)
- ・ストマッカーバッグ用ラック (ラック 400 ; アズワン)
- ・振とう装置 (100rpm 程度の振とうが可能な機種)
- ・200ml ディスポカップ (ニューディスポカップ ; アズワン、等 フィルター付ストマッカーバッグを使用する場合は不要)
- ・テトロン網 (ボルディングクロス テトロン 100 メッシュ、等 フィルター付ストマッカーバッグを使用する場合は不要)
- ・ディスポーザブルスポイト (5ml フィルター付ストマッカーバッグを使用する場合に必要)

- ・ 50ml デイスポーザブル遠心管
- ・ フラスコ (平底、100ml or 125ml) (BD Falcon、等 蓋がない場合はシリコン栓も)
- ・ 攪拌子 (泡立ちにくいものが良い)
- ・ スターラー (泡立ちにくいもの良い) (スリムスターラー ; アズワンがお勧め!)
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 冷却遠心機 (50ml チューブを 1,880xg、3,000rpm 程度で遠心可能な機種)
- ・ 冷却遠心機 (50ml チューブを 13,420xg、10,000rpm 程度で遠心可能な機種)

多くの食品は 3,000rpm の遠心機で処理が可能だが、10,000rpm を用いた方が回収率が高い。

- ・ 1.5ml マイクロチューブ
- ・ マイクロピペットおよびチップ (1000 $\mu$ l、200 $\mu$ l、10 $\mu$ l)
- ・ 3ml を量ることができるピペット

## 2) 試薬

- ・ 非晶性リン酸カルシウム微粒子 (アパミクロン、積水化成工業)

通常の購入単位は大きいですが、サンプル品として 1kg 単位での購入可能

- ・ 3.3M クエン酸
- ・ Tris-glycine pH9.5

トリス	12.1g	}	1L
グリシン	3.75g		

- ・ PBS(-)
- ・ 3%ビーフエキス加 Tris-glycine

トリス	12.1g	}	1L
グリシン	3.75g		
ビーフエキス	30g		

- ・ 3%ビーフエキス加 PBS(-)
- ・ イソアミルアルコール
- ・ アスコルビン酸
- ・ QIAamp Viral RNA Mini Kit (キアゲン)
- ・ エタノール



・ DEPC 処理水

### 3. 操作法

#### 食品検体からのウイルス濃縮

- 1) ストマッカーバッグに食品検体 10g、洗浄液 40ml を入れ、ラックに立てて、シェイカーにセットし、約 100rpm で 10 分間振とうする。この時、食品全体に洗浄液が行き渡る必要があるが、必要以上の強い振とうは避ける（食品の損傷を招き、内容物が溶出され、その後の操作や酵素反応に支障が出る）。レタス等かさばる検体は必要に応じて洗浄液量を増量する。

#### <使用する洗浄液と添加試薬>

食品	洗浄液	添加試薬
野菜類（漬物、和え物含む） 果実類（冷凍・生鮮）	ビーフエキス加 PBS	なし
油脂含有食品 （ミートソーススパゲティ、 キンピラゴボウ、焼鮭等）	ビーフエキス加 Tris-glycine	イソアミルアルコール （動物性油脂の時必須）
ハム	ビーフエキス加 PBS*、PBS	アスコルビン酸
白飯、うどん、パン	PBS*	なし
マカロニサラダ、ポテトサラ ダ等マヨネーズ使用食品	ビーフエキス加 PBS*	イソアミルアルコール を添加するとマヨネーズ を除去しやすい

\* どの洗浄液が適しているかは検討中だが、油脂含有食品以外はビーフエキス加 PBS が適していると思われる。

- 2) ディスポカップにテトロンメッシュをセットし、振とう後の液をろ過する。野菜等のように振とう後の液に残渣が少ない場合にはろ過を省略することも可能である。また、フィルター付ストマッカーバッグを使用した場合にはここでのろ過を省略し、ストマッカーバッグから直接ろ液を遠心管に移す。
- 3) ろ液を 50ml 遠心管に移し、1,880xg (3,000rpm)、30 分間、4℃で遠心する。マヨネー

ズ使用食品のように食品洗浄後に乳剤様になっている場合には 13,420xg (10,000rpm) で遠心を行う。その他の場合も 13,420xg (10,000rpm) での遠心により収率が良くなる。油脂を多く含有する食品は、この時に 5ml のイソアミルアルコールをチューブに加え、10 回程度上下に振って混和した後に遠心する。

- 4) 遠心上清をフラスコに移し (デカントが良い)、ACP 微粒子 0.3g を加える。  
3) でイソアミルアルコールを加えた場合には、まずイソアミルアルコール層および脂質の膜を除去してから、水層部分をフラスコに移し、ACP 微粒子 0.3g を添加する。ロースハムの場合には、ACP 微粒子を加える前にアスコルビン酸 1.0g を添加し良く溶かしてから ACP 微粒子を加える。
- 5) 4) をスターラーにセットし、1 時間、激しく攪拌する。この時、泡立たないようにすることが重要である。
- 6) 攪拌後の液を 50ml 遠心管に移し、1,880xg (3,000rpm)、10 分間、4°C で遠心する
- 7) 上清を捨てる (良く水を切る)。すぐに RNA 抽出を行わない時にはこの状態で冷蔵庫に保管する (数時間なら保管可能)。
- 8) 3.3M クエン酸を 3ml 添加し、ボルテックスで攪拌して ACP 微粒子を溶解する。
- 9) スピンドアウン後、溶解液をマイクロチューブに移す。定量する場合には溶解液の容量を測っておく。溶解後は速やかに RNA 抽出を行う。冷蔵すると難溶解性のクエン酸カルシウムが沈殿し、RNA 抽出ができなくなる。また、溶解液は強酸性なので、これに耐えうる抽出方法を用いる。QIAamp Viral RNA Mini Kit は使用可能である。
- 10) ACP 微粒子溶解液 140 $\mu$ l から、QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて使用説明書に従って RNA を抽出する。検体をキットに添付されている AVL buffer に添加すると、液の色が赤っぽく変化するが、支障はない。

### 水検体からのウイルス濃縮

- 1) 水検体 300ml をフラスコに入れ、ACP 微粒子 0.3g を加える。  
ACP 微粒子添加量は水検体 100ml あたり 0.1g が適当である。  
水検体にゴミ等の混入が多い場合には、ろ過または遠心によりある程度取り除いておく。
- 2) 1) をスターラーにセットし、1 時間、激しく攪拌する。水検体の量に合わせた適当なスターラーを用いること。

- 3) 攪拌後の液を 50ml 遠心管に移し、1,880xg (3,000rpm) で 10 分間、4℃で遠心する。
- 4) 上清を捨てる（良く水を切る）。すぐに RNA 抽出に移らない時にはこの状態で冷蔵庫に保管する（数時間）。
- 5) 3.3M クエン酸を 3ml 添加し（ACP 微粒子 0.1g あたり 1ml のクエン酸を添加する）、ボルテックスで攪拌して ACP 微粒子を溶解する。
- 6) スピンドアウン後、溶解液をマイクロチューブに移す。溶解液の容量を測っておく。溶解後は速やかに RNA 抽出を行う。冷蔵すると難溶性クエン酸カルシウムが沈殿し、RNA 抽出ができなくなる。また、溶解液は強酸性なので、これに耐えうる抽出方法を用いる。QIAamp Viral RNA Mini Kit は使用可能である。

#### 4. 備考

- ・泡立ちにくいスターラーおよび攪拌子を用いることが重要である。泡立ってしまうと、ACP 微粒子とウイルス粒子の吸着が効率良く行われず、その後の ACP 微粒子収集にも支障をきたすことになり、ウイルス回収率が非常に低くなる。
- ・現時点でウイルス回収率 10%以上を確認済みの食品は、千切りキャベツ、レタス、ポテトサラダ、マカロニサラダ、ハルサメサラダ、中華風きゅうりの和え物、つぼ漬、キンピラゴボウ、冷凍ラズベリー、冷凍ストロベリー、冷凍ブルーベリー、生鮮ストベリー、生鮮ラズベリー、生鮮パイナップル、ミートソーススパゲティ、白飯、ゆでうどん、ソース焼きそば、うずら豆の煮物、焼鮭、ロースハム、皮なしウインナー、つくね、肉団子の甘酢あん、マグロの刺身である。
- ・現時点でウイルス回収が困難となっている食品は、小豆あん、シュークリーム、ひじきの煮物、卵の花、白和え、タマゴフィリング、ツナフィリング、ハムカツである。

#### 参考文献

- 1) Shinohara, M. et al.: Novel concentration method for detection of norovirus and sapovirus from water using minute particles of amorphous calcium phosphate. J. Med. Microbiol, 60, 780 - 786 (2011) .
- 2) Shinohara, M. et al.: Application of a simple method using minute particles of amorphous calcium phosphate for recovery of norovirus from cabbage, lettuce, and

ham. J. Virol. Methods, 187, 153 - 158 (2013) .

連絡先

埼玉県衛生研究所 篠原美千代

作成日：平成 25 年 2 月 22 日