

平成 29 年度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)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

カキからのノロウイルス検出法の検討について

研究協力者	山本 美和子	広島市衛生研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	則常 浩太	広島市衛生研究所
研究協力者	兼重 泰弘	広島市衛生研究所
研究協力者	藤井 慶樹	広島市衛生研究所
研究協力者	松室 信宏	広島市衛生研究所

研究要旨

二枚貝中には遺伝子検査を阻害する物質等が存在し、ノロウイルス等の検出感度を低下させている可能性がある。カキからのノロウイルス添加回収試験を行うとともに、阻害物質の影響を軽減させるため、アセトンを追加する方法の検討及びアミラーゼ溶液の至適添加量の検討を行った。カキからのノロウイルス添加回収試験の結果、ポリエチレングリコールによる濃縮方法(PEG 沈殿法)でカキを濃縮した場合、回収率は約 1%であった。また、アセトン添加法において、中腸腺 1g に対し 250 μ l のアセトンを添加した場合に実測値コピー数が高い結果となった。アミラーゼ溶液の添加量により検出感度に違いはみられなかった。一方、PEG 沈殿法でカキを濃縮した場合は、中腸腺 1g に対し 10 μ l のアミラーゼ溶液を追加した場合に実測値コピー数が高かった。

A. 研究目的

二枚貝は、中腸腺にノロウイルス等のウイルスを蓄積する。ノロウイルスによる胃腸炎事例の中には、二枚貝を喫食したケースもあり、生食用カキの安全性確保や胃腸炎事例の原因究明のためには高感度なノロウイルスの検査が必要である。

現在、二枚貝からのノロウイルス検査は、主に通知(平成 15 年 11 月 5 日付け

食安監発第 1105001 号)による検査法で実施されている。通知法のリアルタイム PCR 法による定量的検出法の陽性判定基準は、実測値 10 コピー以上である。ノロウイルス胃腸炎を起こす二枚貝の中腸腺には、多くのノロウイルスが含まれていると推測されるが、陽性の判定基準である実測値 10 コピー以上となるケースは少ない。この原因の一つとして二枚貝中の遺伝子検査を阻害する物質等の影響が考

えられる。そこで、カキからのノロウイルスの検出感度を調べるため、カキへノロウイルスを添加し、回収試験を行った。また、阻害物質の影響を軽減させるため、昨年に引き続きアセトンを添加することによるカキからのノロウイルス検出法の改良及びアミラーゼ溶液の至適添加量を検討した。

B. 研究方法

1. カキからの PEG 沈殿法によるノロウイルス添加回収試験

ノロウイルス陰性のカキ中腸腺 1g に、ノロウイルス GII 陽性便乳剤 20 μ l を添加し、PBS(-)9ml を加え 10 倍乳剤とした。PEG 沈殿法で濃縮し、1ml の DDW で再浮遊させた。対照として、ノロウイルス GII 陽性便乳剤 20 μ l を 1ml の DDW に溶解させたものを使用した。これらを RNA 抽出材料とした。QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)で RNA を抽出し、Reverse Transcription Kit(ライフテクノロジーズジャパン)及び Oligo(dT)Primer(ライフテクノロジーズジャパン)で逆転写反応を行った。ノロウイルスの検出はリアルタイム PCR 法 (primer : COG2F/ALPF, COG2R, probe : RINGAL-TP-N4) で行い、それぞれ 2 ウェルの実測値コピー数を比較した。

2. アセトン添加法の改良についての検討

ノロウイルス陰性のカキ中腸腺 1g に、ノロウイルス GII 陽性便乳剤 20 μ l 及び PBS(-)を表 1 のとおり添加し、アミラーゼ 125 mg を添加し、37°C、1hr インキュベートした。アセトンを表 1 のとおり添加

し、10 秒間ボルテックスを行い、3,000rpm、4°C、5min 遠心した上清 250 μ l を微量遠心チューブに回収し、さらに 12,000rpm、5min 遠心し、上清を RNA 抽出材料とした。対照として、「1. カキからの PEG 沈殿法によるノロウイルス添加回収試験」と同様に、ノロウイルス GII 陽性便乳剤 20 μ l を 1ml の DDW に溶解させたものを使用した。RNA 抽出以降は同様に検査を行った。

3. アミラーゼ至適添加量の検討

ノロウイルス陽性カキ中腸腺 1g に、アセトン添加法の改良についての検討により至適濃度であると確認できたアセトン 250 μ l を添加する方法でアミラーゼ至適添加量の検討を行った。PBS(-)750 μ l を添加し、アミラーゼ溶液をそれぞれ 0、10、50、100、200 μ l 添加し、37°C、1hr インキュベートを行った。「2. アセトン添加法の改良についての検討」と同様にアセトン 250 μ l を添加し、比較検討を行った。さらに、PEG 沈殿法でも同様に実施し、アセトン添加法と PEG 沈殿法でのアミラーゼ溶液の効果について比較した。アミラーゼ(和光純薬)溶液は、50ml の遠心管に 5g の α -アミラーゼ粉末、PBS(-)20ml を添加・混合し、8,000g、4°C、20min 遠心した。上清を別の遠心管に採取し、孔径 0.22 μ l の滅菌フィルターでろ過し、ろ液と等量のグリセリンを添加し、-20°C で保存しているものを使用した。

(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. カキからの PEG 沈殿法によるノロウイルス添加回収試験

ノロウイルス GII 陽性便乳剤を添加したカキからのリアルタイム PCR の 2 ウェルの実測値コピー数は 0.38 コピー/ $5\mu\text{l}$ と不検出 (平均は 0.19 コピー/ $5\mu\text{l}$) であった。一方、対照として実施した検体のリアルタイム PCR の実測値コピー数は 21.48 コピー/ $5\mu\text{l}$ と 26.90 コピー/ $5\mu\text{l}$ (平均 24.19 コピー/ $5\mu\text{l}$) であった。カキ中腸腺にノロウイルスを添加した場合は、対照として行った DDW にノロウイルスを添加した場合の 0.79% の回収率であり、約 100 分の 1 以下の検出感度であった。

2. アセトン添加法の改良についての検討(図 1)

昨年はアセトンと PBS(-) を等量添加した結果を報告した。今年度は、アセトンの添加割合を変えて至適アセトン濃度を検討した。同一色が同一ロットのカキの結果を示した。コピー数が少なく回収率にばらつきが生じているが、アセトン添加割合 10~30% で回収率が高くなった。特に中腸腺 1g に $250\mu\text{l}$ のアセトンを添加した場合に、最も良好な結果であった。

3. アミラーゼ至適量の検討

1) アセトン添加法による検討(図 2)

「2. アセトン添加法の改良についての検討」における結果から、添加割合として最適であった中腸腺 1g に $250\mu\text{l}$ のアセトンを添加し、アミラーゼ溶液の至適添加量を検討した。中腸腺 1g に対し 10~ $100\mu\text{l}$ のアミラーゼ溶液を添加した場合には、ほとんど違いはみられなかった

が、 $200\mu\text{l}$ 添加した場合には、若干コピー数が低い結果となった。

2) PEG 沈殿法による検討(図 3)

同様に PEG 沈殿法でのアミラーゼ溶液の至適量を検討した。PEG 沈殿法では中腸腺 1g あたり $10\mu\text{l}$ を添加した場合に最も検出コピー数が高く、 $50\mu\text{l}$ 及び $100\mu\text{l}$ を添加した場合は $10\mu\text{l}$ 添加した場合の約半分程度の実測値コピー数であった。 $0\mu\text{l}$ 及び $200\mu\text{l}$ を添加した場合は、ほとんど検出されなかった。

アセトン添加法と PEG 沈殿法によるアミラーゼ溶液の検討結果を同じグラフ上にプロットした(図 4)。中腸腺 1g に対し、アミラーゼ溶液を $10\mu\text{l}$ 添加した場合は、両法とも同等程度の回収率であったが、アミラーゼ溶液を添加しない場合や、過剰なアミラーゼ溶液を添加した場合は、アセトン添加法の実測値コピー数が高い結果となった。

D. 考察

カキからの PEG 沈殿法によるノロウイルス添加回収試験により、カキからのノロウイルスの検出は、検査の過程で約 100 分の 1 程度検出感度が低下していることが考えられた。しかし、実際のカキでは中腸腺にノロウイルスが取り込まれている状況であるため、さらに検出されにくいことが推測される。このように、カキには遺伝子検査を阻害する物質が含まれているため、それらの阻害物質の影響を減らす必要がある。今回、アセトン添加法の改良とアミラーゼ溶液の至適添加量の検討を行った。アセトン添加法では、中腸腺 1g に対し $250\mu\text{l}$ を添加した場合

に最も高い実測値コピー数が得られた。

アミラーゼ溶液の至適添加量の検討結果から、アセトン添加法では、アミラーゼ溶液の添加により実測値コピー数に変化がないことが考えられた。PEG 沈殿法では、中腸腺 1g あたり 10 μ l を添加した場合が最も実測値コピー数が高い結果となった。PEG 沈殿法では、添加しない場合や、200 μ l など多い量のアミラーゼ溶液を添加した場合は、実測値コピー数が低い結果となった。しかし、アセトン至適濃度、アミラーゼ至適量で検査を行っても、若干の検出感度が良くなる程度にとどまった。今後も引き続き検査法の検討を行う必要があると思われる。

E. 結論

今年度は、昨年度に引き続きアセトン添加法によるカキからのノロウイルス検出法の改良と、アミラーゼ溶液の至適量

の検討を行った。アセトン添加法では、中腸腺 1g に対し 250 μ l のアセトンを添加することで実測値コピー数が若干高い結果となったが、アミラーゼ溶液添加量による検出感度に違いはみられなかった。一方、PEG 沈殿法では、アミラーゼ溶液を中腸腺 1g あたり 10 μ l 添加した場合に実測値コピー数が高いことが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

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 PBS(-)及びアセトン添加量

PBS(-)	0	950	900	800	750	700	600	500	400	250
アセトン	0	50	100	200	250	300	400	500	600	750

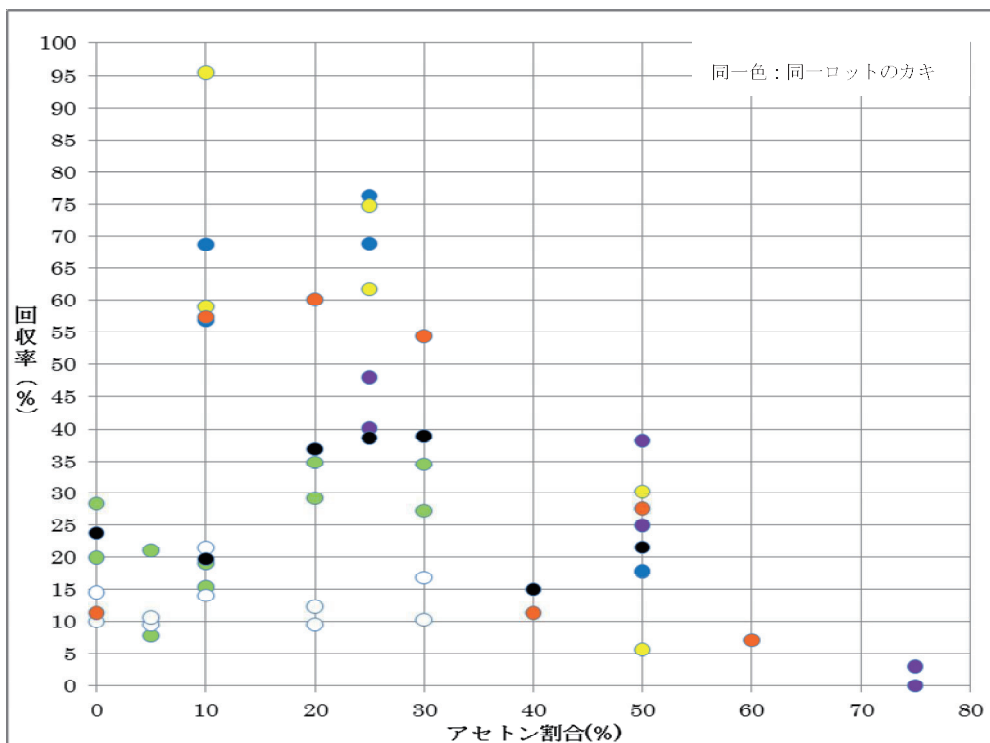


図1 アセトン添加割合によるノロウイルス回収率

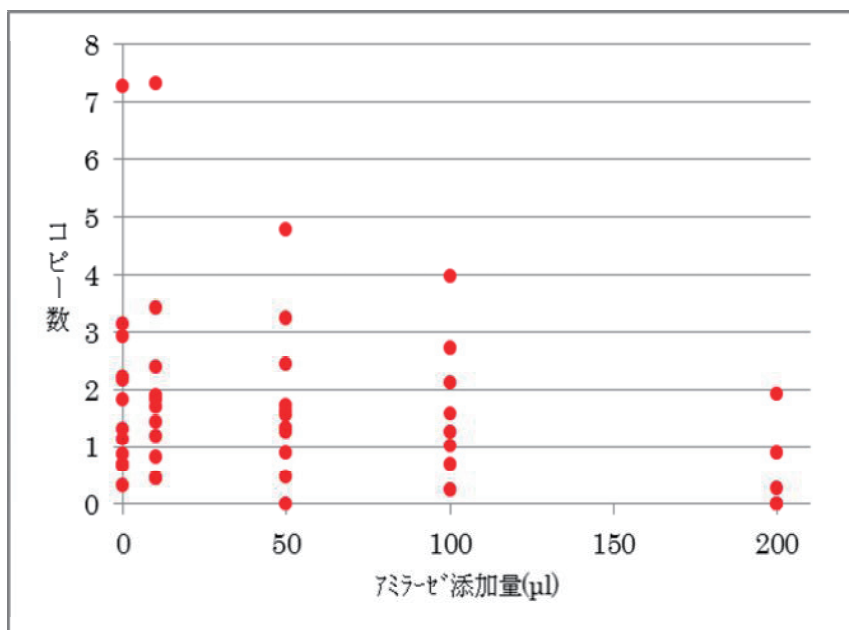


図2 アミラーゼ添加量によるノロウイルス検出コピー数(25%アセトン)

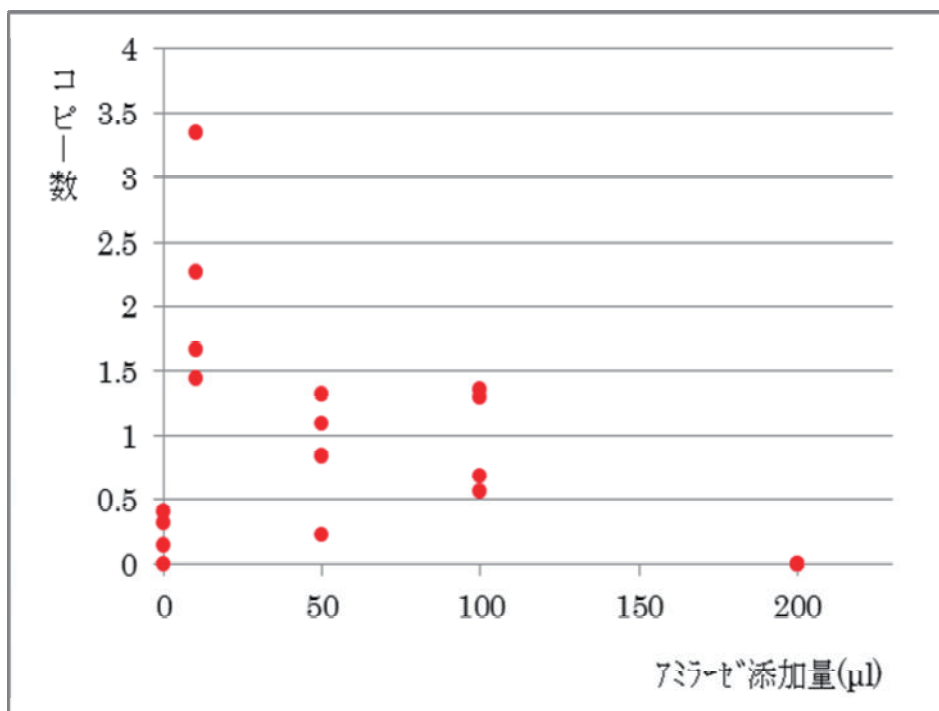


図3 アミラーゼ添加量によるノロウイルス検出コピー数(PEG 沈殿法)

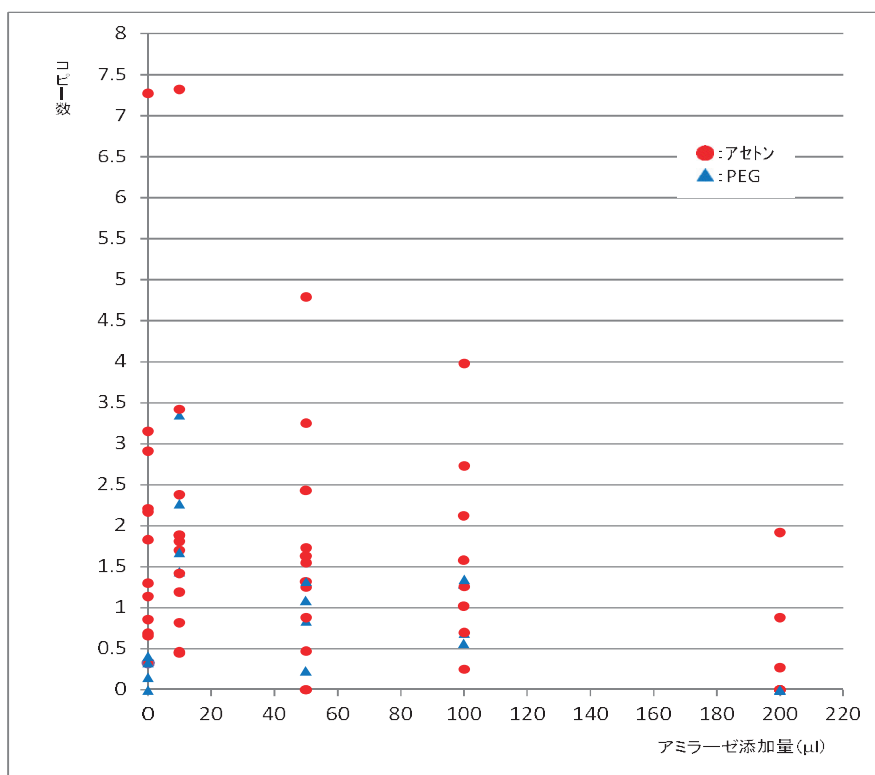


図4 アセトン添加法と PEG 沈殿法の検出コピー数の比較