

野菜表面のウイルス検出法の検討

研究分担者 片山 浩之 東京大学大学院工学系研究科
研究協力者 関 瑛理子 東京大学大学院工学系研究科

研究要旨

昨年度の研究成果より、ビーフエキスによるウイルス抽出が最適手法であることが示された。本年度はビーフエキス誘出液からさらに濃度を高めてウイルスの検出感度を向上させるために、酸沈殿法を用いて濃縮する方法の開発を試みた。

新型コロナウイルスなどに関する関心が高まったことを受け、これまでの試験に用いていた MS2 に加えて、エンベロープウイルスの代替指標として Φ6 を用い、手法の妥当性の評価に用いた。

結果としては肉エキス（極東）3%、pH 9.0 を酸性条件 pH 3 程度にすることで、ウイルスの回収率を高くし、容易に少ない液量で回収操作を実施可能であることが示された。

A. 研究目的

日本国内のウイルスを原因とした食中毒事例は 7000 件ほどとなっており、食中毒患者数の半数を占めている¹。食中毒の原因となる食物は多岐にわたるが、野菜による例もある。途上国でも市場の野菜表面から大腸菌やノロウイルスが検出された報告がある²。ウイルス性食中毒を減らすためには各食物表面に存在するウイルスの検出が必要である。

従来表面上のウイルスは種々の拭き取り剤と誘出法が用いられてきた。しかし、最適手法についての統一した見解はなく、対象とするウイルスによってまちまちな結果が出ていた^{3,4,5}。

本研究では、野菜表面に付着したウイルス検出法の開発を目的として、種々の拭き取り剤および誘出法の比較検討を通じた最適手法の探求に取り組んだ。対象とするウイルスは、ウイルス性食中毒のほとんどを引き起こしているノロウイルスと物性が似ている F 特異大腸菌 RNA フェージの MS2 に加えて、新型コロナウイルスなどに関する関心が高まったことを受け、エンベロープウイルスの代替指標として Φ6 を用い、手法の妥当性の評価に用いた。

昨年度、ビーフエキスによる誘出が有効である

との研究成果を得たが、今年度は、それをさらに濃縮してウイルスの検出感度を高める手法として、酸沈殿法を適用することを試みた。

B. 研究方法

実験室内での検証ではウイルスを高濃度でスパイクした試料を使用したため、誘出液に対する濃縮を行わずしても検出、定量が可能である。しかし、現場試料の実際のウイルス濃度は低いと考えられ、測定を行う感度を得るには試料の濃縮が必要だと考えられる。ビーフエキスなどのタンパクが豊富な液体に対するウイルスの濃縮手法として、オーガニックフロキュレーション（酸沈殿法）が Katznelson らによって開発されている⁶。この手法は、高アルカリ条件下にあるビーフエキスを pH 3 程度にまで下げることでウイルスやタンパクのフロックを形成し、それを沈殿・再懸濁することで濃縮を行う。

3% および 10% ビーフエキス（Difco および HiMedia）と 3% および 10% 肉エキス（極東）を高圧蒸気滅菌し、1M NaOH の添加で pH 9.0 ± 0.1 に調整した。そこに MS2 と Φ6 を添加し、ボルテックスしてよく混合した。酸沈殿処理を行い、ウイルス濃縮液を得た。濃縮前・濃縮後それぞれのウ

ウイルス濃度を測定し、回収率を評価した。また、凝集性の悪いビーフエキスの場合は、FeCl₃ の添加により共沈が発生し、ペレットの形成を期待できるので、本実験では FeCl₃ を添加した場合と、しなかった場合で回収率を比較した（ビーフエキス・肉エキス 40ml に対して 2.5mM FeCl₃ 0.2ml）。各条件につき 2 回ずつ実験を行った。

C. 結果及び考察

全条件でペレットは形成されたが、10%のビーフエキスではペレットが小さかった。一方、極東肉エキス 3%ではしっかりとしたペレットの形成が認められた。FeCl₃ を添加した条件では、すべて多量の沈殿ができ、ペレット形成を促すことが確認できた。

次に各条件における MS2 並びに Φ6 の回収率を調べた。MS2 の回収率は Difco10%の時は 10%を超えたが、他条件ではそれより低い回収率で安定していた。一方、Φ6 は HiMedia3%と 10%及び極東 3%が回収率が高かった。特に極東 3%における回収率は約 100%であり、かなり高い回収率だった。この結果から FeCl₃ を添加しない場合、Φ6 においてはペレットの形成と回収率はある程度の整合性があることが示された。

E. 結論

昨年度に得られたビーフエキスをを用いたウイルスの誘出法に続き、その後の酸沈殿法の手法の最適化を行った結果、3%極東肉エキスを誘出液として実験を行うことが最適であると判断した。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む。）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

I. 参考文献

1. 厚生労働省. 食中毒統計資料. (2019). Available at: https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunit suite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html. (Accessed: 30th April 2020)
2. Van Ha, N. T. *et al.* Bacterial contamination of raw vegetables, vegetable-related water and river water in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Water Sci. Technol.* **58**, 2403-2411 (2008).
3. Julian, T. R., Tamayo, F. J., Leckie, J. O. & Boehm, A. B. Comparison of surface sampling methods for virus recovery from fomites. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 6918-6925 (2011).
4. Turnage, N. L. & Gibson, K. E. Sampling methods for recovery of human enteric viruses from environmental surfaces. *Journal of Virological Methods* **248**, 31-38 (2017).
5. Nelson, S. W. *et al.* Evaluation of nonwoven fabrics for nasal wipe sampling for influenza A virus in swine. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **30**, 920-923 (2018).
6. Katzenelson, E., *et al.*, Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 638-639. (1976)