

## 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 門屋 俊祐 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、酸沈殿法を適用しビーフェキスを用いたウイルス検出手法の検出感度の向上に成功した。本年度は、野菜表面上に存在するウイルスのより効率的な手法の探索を目的とし、ふきとり法及びパウダリング法によるウイルス検出感度のさらなる効率化を図った。ヒトノロウイルス及び新型コロナウイルスの代替としてマウスノロウイルス及びマウス肝炎ウイルスをカット野菜（キャベツ）に吸着させ、4種のふきとり剤を用いて野菜表面を拭き取り、ふきとり剤からウイルスを回収した。パウダリング法においては、ウイルス吸着野菜を液体窒素存在下ですり潰し、得られた野菜粉末からウイルス RNA を回収した。また、ウイルス吸着野菜を消毒・洗浄し、洗浄後の野菜からのウイルス検出も試みた。その結果、液体窒素を用いたパウダリング法において最もウイルス検出量が高く、また、誤差が小さいことから安定した検出能力を有していることも示された。

### 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。野菜の摂取による食中毒の例も報告されており、途上国では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との報告もなされている。我が国では、キャベツなどの野菜の供給を海外からの輸入に強く依存しており、ウイルスに汚染された輸入食品を摂取することで輸入感染症が国内で蔓延する可能性がある。ウイルス性食中毒による被害を防ぐためには、食品表面あるいは内部に存在するウイルスを適切に検出する手法が必要である。野菜表面上のウイルス検出として、拭き取り剤及び誘出法が広く適用されているが、対象とするウイルスによっては検出感度の多様性が見られる。

そこで本研究では、野菜表面に付着したウイルス検出法の開発及び検出感度の向上を目的として、種々のふきとり剤とその誘出法、野菜表面からの直接検出法の比較検討を行い、最適な検出手法の決定を目指した。

昨年度は、ビーフェキス誘出法に酸沈殿法を組み合わせることで検出感度の向上に成功したが、

今年度は、野菜表面上からより効率的なウイルス検出手法を決定するために、ふきとり法及びパウダリング法によるウイルス検出量の比較を行なった。検出対象としてノロウイルスの代替であるマウスノロウイルス（MNV）及びエンベロープウイルスの代替指標としてマウス肝炎ウイルス（MHV）を採用し、これら二種のウイルスを野菜表面上に付着させることで、各手法の検出感度を評価した。さらに、カット野菜生産プロセスにおける野菜の消毒・洗浄過程を想定し、消毒・洗浄後のウイルス検出感度の評価も行った。

### B. 研究方法

#### 1) ウイルス吸着野菜の準備

MNV 及び MHV を滅菌蒸留水に添加し、両ウイルス濃度が  $10^6$  及び  $10^3$  copis/mL となるように高濃度及び低濃度条件のウイルス懸濁液を準備した。このウイルス懸濁液 20 mL に対してカットキャベツ 20 g を添加し、10 分おきに攪拌しながら 1 時間浸漬させた。浸漬後、ウイルス懸濁液を排除し、野菜から水気をよく切った。

#### 2) ふきとり法

拭き取り剤としてレーヨン、コットン、ガラス

繊維、酸化アルミニウム繊維の5種類の素材を採用した。各拭き取り剤をピンセットで掴める程度のサイズに調整し（レーヨン 0.17 g、コットン 0.23 g、ガラス繊維 0.50 g、酸化アルミニウム繊維 0.50 g）、ウイルス吸着野菜を満遍なくこすり、拭き取り剤に吸着させた。RNeasy PowerMicrobiome Kit (QIAGEN 社) を用いて拭き取り剤から RNA を回収した後、RT-qPCR を行なった。

### 3) パウダリング法

乳鉢内でウイルス吸着野菜を液体窒素により急速に冷凍させ、液体窒素（約 100 mL）を適宜加えながらパウダー上になるまですり潰した。この手法により野菜表面上ウイルスの自然減衰及び野菜由来の有害な酵素活性を抑制することが可能となる。RNA 抽出及び RT-qPCR はふきとり法と同様である。

### 4) 消毒・洗浄後の野菜表面上ウイルスの検出

カット野菜プロセスにおいて水道水あるいは希釈次亜塩素酸ナトリウム溶液で洗浄されることを想定し、2 mg/L に調整した次亜塩素酸ナトリウム溶液を洗浄水とした。ウイルス吸着野菜をフィルタホルダーにセットし、1L の洗浄水を用いて5分かけて洗浄・消毒処理を行なった。ふきとり法及びパウダリング法を用いて、消毒・洗浄後の野菜からウイルス RNA の回収・定量を行なった。

## C. 結果及び考察

ふきとり法及びパウダリング法を用いて野菜表面からのウイルス検出量を比較した。高濃度のウイルス懸濁液に浸漬させた野菜に関して、MNV 及び MHV の検出量は手法間及び素材間で有意な差は見られなかったものの、パウダリング法によって得られた検出量が最も高かった（3.55 及び 6.61  $\log_{10}$  copy/g-野菜）。低濃度条件下では、ふきとり法における MHV の検出量の標準偏差が大き一方で、パウダリング法では高い定量値及び小さい標準偏差が確認された（ $2.62 \pm 0.2 \log_{10}$  copy/g-野菜）。MNV に関しては高濃度条件と類似した結果が見られた。

洗浄・消毒処理を施した野菜からはパウダリング法において MHV の検出感度が最も高かった（5.13  $\log_{10}$  copy/g-野菜）。一方、MNV の検出感度はレーヨンによるふきとり法及びパウダリング法が高い値を示した（4.30 及び 4.13  $\log_{10}$  copy/g-野菜）。

本実験系は全て3回試行したが、ふきとり法ではカット野菜の拭き取り残しによる偶然誤差の影響が強く、安定した定量値を得るためにはより多くの試行回数が必要になると考えられる。一方、パウダリング法では、野菜からの直接回収により偶然誤差の影響が低減され、パウダー化による表面積の増加によって RNA 抽出溶液への接触機会が増加し、高い検出感度が得られたと考えられる。

## E. 結論

野菜表面上からの効率的なウイルス検出手法の探索を行ったところ、最も誤差が小さく且つ高い検出感度を示したパウダリング法が適した手法であることが示された。

## 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

### 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