

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）

「食中毒原因ウイルス等の汎用性を備えた検査法と

制御を目的とした失活法の開発のための研究」

分担報告書

下水試料を用いたウイルス検出法に関する検討

研究分担者 遠矢真理 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食中毒事件発生時に、原因究明を迅速かつ精確に行うことは極めて重要であり、次に起こりうる食中毒を防止することにも寄与する。しかしながら、食品中に含まれるウイルスは微量であることが多く、ウイルス性食中毒事例における原因食品の特定は難しい。さらに、食品から検出されたウイルスと患者検体から検出されたウイルスの遺伝子配列を比較することは、科学的根拠としてより精確な情報を提示できるが、現在はウイルスの核酸検出のみが基本的に行われており、遺伝子配列の解析まではまだ整備されていない。

有効なウイルス検出法としてパンソルビントラップ法が挙げられるが、本方法は黄色ブドウ球菌の DNA が混入する為、将来的に導入される次世代シーケンサー（NGS）を用いた遺伝子配列解析では不適とされている。

本研究では、NGS への応用もふまえたウイルス検出法の検討を行うことにした。効率的なウイルスの検出法として知られているポリエチレングリコール（PEG）沈殿法に注目し検討を行った。また新たにウイルス検出法として提唱された方法についても PEG 沈殿法と比較し、どの方法が効率的にウイルスを検出できるか明らかにすることを目標とした検討を行うことにした。

A. 研究目的

食中毒の原因となった病原体を食品や環境サンプルから迅速かつ精確に検出することは、食中毒事件解決のための科学的根拠となり重要である。さらに将来に向けた食中毒防止に向けた対策へ寄与する。

食品中に含まれるウイルスは微量であることが多く、ウイルス性食中毒事例における原因食品の特定は難しい。有効なウイルス検出法としてパンソルビントラップ法が挙げられるが、本方法は黄色ブドウ球菌の DNA が混入する為、将来的に導入される次世代シーケンサー（NGS）を用いた遺伝子配列解析では不

適とされている。

ウイルス濃縮方法の検討は、昨今の下水疫学手法の発展から様々な新規手法が提唱されている。下水試料からのウイルスの検出法では、ポリエチレングリコール（PEG）沈殿法が多く検査機関で導入されている。PEG 沈殿法は簡便で特別な機械の導入の必要性がない長所がある一方で、オーバーナイトでの沈殿処理が必要で時間がかかる短所を持つとされる。近年 PEG 沈殿法の短所を補う新たな代替法である COPMAN 法や Pegcision 法が開発、発表された。しかしながら、新たな代替法と従来の PEG 沈殿法の比較については、逆

転写酵素の統一やリアルタイム PCR 用試薬を統一するなどの十分な検討が行われていない。

そこで本研究では、PEG 沈殿法の短所を補うために、沈殿処理時間の短縮を検討する。さらに、新たな代替法と PEG 沈殿法で用いるリアルタイム用試薬を統一させた水試料からのウイルス検出について比較を行った。

B. 研究方法

1) 試料検体の調整

秋田県の下水处理施設で採水し、ノロウイルス (Nov) 陰性と確認された流入水と処理水にノロウイルス G1 (Nov G1), ノロウイルス G2 (Nov G2), メンゴウイルスおよびネコカリシウイルスを添加し、試料検体を調整し、10ml ずつに分注し、本研究に用いた。

2) ウイルスの濃縮および核酸抽出

PEG 沈殿法では試料 10ml に PEG6000 および NaCl を 0.8g ずつ添加し、沈殿時間を 0 時間、3 時間、24 時間 (オーバーナイト, 0/N) の 3 条件を設けて試験した。沈殿処理後、10,000g で 30 分間の遠心を行った。沈渣を収集後、自動核酸抽出機器 Maxwell (Promega 社) と抽出試薬 Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid (Promega 社) を用いて核酸抽出を行った。COPMAN 法では試料 10ml を用いて、COPMAN DNA/RNA extraction kit for wastewater (AdvanSentinel 社) を用いて、ウイルスの濃縮および核酸抽出を行った。Pegcision 法では試料 10ml を用いて、Pegcision キット (SEGNOS 社) を用いてウイルスの濃縮を行い、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて核酸抽出を行った。

3) リアルタイム PCR

核酸抽出後、TaqMan Fast Virus 1-Step Master mix (Thermofisher 社) にて 1 Step RT-qPCR を実施し、各濃縮条件での CT 値を比較した。

C. 研究結果

各条件における CT 値の変化を試料の種類 (放流水および流入水) とウイルスごとに分けて比較を行った (図 1)。

1) 沈殿時間の条件比較

PEG 沈殿法において、沈殿時間を 0 時間、3 時間、0/N で比較したところ、沈殿作用時間が長いほど CT 値が減少し、検出されるウイルスの増加が認められた。また沈殿時間を取らずに遠心作業に移ると、一部の検体からはウイルスの検出はされなかった。一方で、沈殿時間 3 時間と 0/N で比較をすると CT 値の差は減少されており、3 時間の条件で安定的に検出できた。

2) PEG 沈殿法とその他の濃縮法の比較

COPMAN 法で濃縮および核酸抽出をした際に、放流水では Nov G1 の検出において 11 検体中 4 検体で、メンゴウイルスでは 11 検体中 1 検体で検出できなかった。流入水でも同様に Nov G1 およびメンゴウイルスにおいて 1 検体から検出できなかった。一方で Pegcision 法ではどの検体からもウイルスは安定的に検出された。

0/N 条件での PEG 沈殿法と比較をすると、COPMAN 法および Pegcision 法は CT 値が高く、3 時間の沈殿処理条件の PEG 沈殿法とは同程度であった。

D. 考察

PEG 沈殿法において様々な沈殿時間の条件を比較したところ、0/N の条件が今回用いたウ

ウイルスの検出において一番検出効率がよかった。また3時間の沈殿条件の場合、0/NとのCT値の差は減少しており、0時間の沈殿条件でウイルス検出が出来なかった検体でもウイルスが検出された。本データは、3時間の沈殿条件でもウイルス検出における定性的な結果が変わらないことを明らかにし、従来のPEG沈殿法の短所をカバーできる結果となり、PEG沈殿法の改良の提案に有用な情報となった。

二つの代替法について、本研究では数検体においてウイルスの検出が出来なかった。これは代替法で推奨されている逆転写酵素やリアルタイムPCR酵素試薬を用いなかったことが影響していると考えられる。つまり濃縮液の中に残る阻害物質の影響を考慮する必要性を示している。そのため、代替法で推奨されている製品やその他の製品も含めて、逆転写酵素やリアルタイムPCR試薬についても同様の試験を実施し比較する必要性を示唆している。

E. 結論

本研究結果から、PEG沈殿法における沈殿時間の短縮について有用な知見が得られた。また逆転写酵素やリアルタイムPCR酵素試薬についても比較検討を行う必要性も明らかとなった。本成績は食品検体からのより効率的なウイルス検出法の確立、さらに将来的なNGSを用いた遺伝子配列解析への応用にもつながるため、今後は、同様の試験を食品サンプルでも試験し比較について検討を進めたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表：

1) 下水試料からのウイルス検出法の比較

遠矢真理，南村幸世，上間匡．第45回日本食品微生物学会，2024.9/5,6．青森．

H. 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

図 1. 試料水ごとの各ウイルスの CT 値

