

超遠心法による食品を用いたノロウイルスの添加回収実験

米澤 武志、有川 健太郎、野本 竜平

神戸市環境保健研究所感染症部

1 はじめに

ノロウイルスは冬季を中心に流行し、ウイルス性の感染性胃腸炎を引き起こす主要な病原体として知られており、嘔吐や下痢、発熱等の症状を呈する。昨年、ノロウイルスによる食中毒事例は全国で 212 件報告されている¹⁾。近年では、2017 年に刻み海苔を原因とする広域な大規模食中毒事例が発生した。海苔のような乾物を含め、あらゆる食品において広範囲、長期間にわたってノロウイルスによる食中毒が発生することが改めて証明された。このようなノロウイルスによる食中毒が発生した場合には、患者便及び原因食品からノロウイルスの検出が重要となる。食品からノロウイルスを検出する方法は平成 15 年 11 月 5 日食安監発第 1105001 号(以下、通知法)に準じて実施されるが、食品に含まれるノロウイルスは微量であるため検出は極めて困難である。

そこで、食品からのノロウイルス検出の最適化を目的とし、ウイルス添加による回収率の比較及び Real Time PCR におけるノロウイルスの検出限界を検討したので報告する。

2 方法

今回の検討で使用する食品は、ノロウイルスによる食中毒の原因となり得る、購入後に加熱処理をせずに喫食する機会の多い食品として、市販されている伊達巻きと食パンとした。

また、添加用ウイルス液を調製するために、過去にノロウイルスを原因とする食中毒事例で当所に搬入された糞便検体のうち、Ct 値から比較的ウイルス量が多いと推定されたノロウイルス GII 陽性検体を選定した。選定した糞便検体を PBS で懸濁し、 2.06×10^7 copies/mL となるようにウイルス液を調製した。

以下に、それぞれの検討について、方法を記載する。

2.1 ウイルス添加による回収率の比較検討

食品(伊達巻き) 10 g を細切したものに添加用ウイルス液(2.06×10^7 copies/mL)を 1 mL 添加した。そこへ PBS 90 mL を加え、1 分間ストマッカー処理した。この 10 %乳剤 25 mL を遠心(3500 rpm、10 min)し、食品残渣を沈殿させた。上清 10 mL を 30 %ショ糖溶液 2.25 mL へ重層し、超

遠心機(himac、日立)で 40000 rpm、2 時間遠心した。同様に、ショ糖溶液への重層の有無による回収率を比較するために、ショ糖溶液を用いずに、上清 10 mL のみを遠心した。それぞれ試行回数は 3 回ずつとした。遠心後、上清を廃棄し、沈渣に対して PBS 500 μ L で懸濁したものをウイルス RNA の抽出に用いた。QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を使用して、RNA 抽出を行った。抽出後、TaKaRa qPCR Norovirus (GI/GII) Typing Kit (TaKaRa Bio)を用いて、逆転写反応及び Real Time PCR を行った。このとき、回収率を算出するために、食品に添加したウイルス液についても同様に、抽出以後の操作を上記方法のとおりに行った。

また、濃度既知の添加用ウイルス液を用いて検量線を作成した。検量線から回帰直線を求め、得られた Ct 値より Real Time PCR に用いた 2.5 μ L 中のコピー数を求めた。食品 10 g 中及び添加したウイルス液 1 mL 中に含まれるコピー数を決定するため、求めたコピー数を用いて、Real Time PCR までの工程、すなわち、RNA 抽出や逆転写反応及び超遠心による処理工程等に従って逆算し、それぞれコピー数を算出した。

なお、回収率の計算方法は、以下の通りとした。

$$\frac{\text{食品 10 g 中のコピー数}}{\text{添加したウイルス液 1 mL 中のコピー数}} \times 100 = \text{回収率 (\%)}$$

2.2 Real Time PCR におけるノロウイルスの検出限界の検討

食品(伊達巻き、食パン)各 10 g に対して、添加用ウイルス液を段階希釈して調製した 3 系列(2.06×10^4 copies/mL、 2.06×10^3 copies/mL、 2.06×10^2 copies/mL)を 1 mL ずつ添加した。そこへ PBS 90 mL または 40 mL を加え、1 分間ストマッカー処理した。この 10 %乳剤 25 mL を遠心(3500 rpm、10 min)し、食品残渣を沈殿させた。上清 19 mL を超遠心機(himac、日立)で 40000 rpm、2 時間遠心した。このとき、上記の 2.1 で述べた回収率の比較検討においてショ糖溶液層の有無で回収率に有意な差が認められなかったため、30 %ショ糖溶液は用いなかった。遠心後、上清を廃棄し、2.1 で述べた方法と同様に RNA 抽出を行った。その後、ノロウイルスの検出は「ノロウイルスの検出法について」

(食安監発第0514004号)を参考にNestedリアルタイムRT-PCR法にて実施した。すなわち、抽出したRNAをTaKaRa qPCR Norovirus (GI/GII) Typing Kit (TaKaRa Bio)を用いて逆転写反応を行い、合成したcDNAを鋳型としてCOG2F/G2-SKRのプライマーセットで1st PCRを行った。続いて、1st PCRの増幅産物を10倍希釈したものを鋳型として上記同キットを用いてReal Time PCRを実施し、増幅が確認されたサンプルをノロウイルス陽性とした。

3 結果

3.1 ウイルス添加による回収率の比較検討

シヨ糖溶液への重層の有無で回収率に有意な差は認められなかった(表1)。また、それぞれ1施行ずつではあるが、ウイルス添加量を 2.06×10^6 copiesで実施した試験区や、試験食品として食パンを用いた試験区でも回収率は約15~40%程度となった。

表1:シヨ糖溶液の有無による回収率の比較

食品	ウイルス添加量 (copies)	PBS量 (mL)	シヨ糖溶液	回収率 (%)
伊達巻き	2.06×10^7	90	無	34.0 ± 14.3
			有	36.2 ± 11.9

3.2 Real Time PCRにおけるノロウイルスの検出限界の検討

食品として伊達巻きを用いた場合、ウイルス添加量が 2.06×10^4 copiesのとき、使用するPBS量に関わらずノロウイルスを検出した(表2)。また、PBS量を40 mLにして処理を行った場合、ウイルス添加量が 2.06×10^3 copiesの条件においてノロウイルスを検出した。しかし、PBS量を90 mLにして処理した場合には、ノロウイルスを検出できなかった。

一方、食品として食パンを用いた場合においては、すべてノロウイルスは検出できなかった。

表2:検出限界の検討

食品	ウイルス添加量 (copies)	PBS量 (mL)	Real Time PCR [※]
伊達巻き	2.06×10^4	90	+
		40	+
	2.06×10^3	90	-
		40	+
	2.06×10^2	90	-
		40	-
食パン	2.06×10^4	90	-
		40	-
	2.06×10^3	90	-
		40	-
	2.06×10^2	90	-
		40	-

※ノロウイルス陽性: +、陰性: -

4 考察

通知法では超遠心用遠心管に30%シヨ糖溶液を遠心管量の10%を加える記載がある。しかし、シヨ糖溶液へ検体を重層することは技術的な問題もあり、手間を要する。更に遠心処理できる検体量がシヨ糖溶液の分だけ減少してしまう。今回の検討では、シヨ糖溶液層の有無による影響は大きくないと考えられたため、実際のノロウイルスの食品検査においてもシヨ糖溶液を用いない手法を検討すべきであろう。

また、表1における回収率のばらつきは、手技による影響が大きいと推測される。その中でも、超遠心後の上清を廃棄する過程で沈渣に微量ながら水分が残存することや上清を完全に排除できていないといったことが原因として考えられた。回収率のばらつきを最小限に抑えるためには、この工程で上清の除去を正確に実行することが重要となる。または、沈渣に添加するPBS量を増加させれば、それだけ残存する液滴が回収率のばらつきに与える影響を減少させることができると考えられるが、検査の感度も低下してしまう恐れがある。

一方、表2では、食品がノロウイルスの検出に影響を及ぼす可能性が示唆された。食パンのような水分を吸収しやすい食品は、一定量以上のPBSを加える必要がある。しかし、加えるPBS量を増やせば、その分だけ食品に含ま

れるウイルス量が希釈されてしまい、検査の感度の低下を招くと考えられるので注意しなければならない。

以上より、食品からノロウイルスを効率的に検出するには、Real Time PCR 以前の工程において課題がある。食品の性質、加える PBS 量の調整、超遠心後の上清をできる限り排除することなど考慮すべき検討項目が多い。

冒頭で述べたように、食品に含まれるノロウイルスは微量であり、検出には困難を極める。今回の検討では、検査の安定性と感度はトレードオフの関係にあり、高感度の検査を安定的に実施することは非常に難しいと考えられる。今後、実際にノロウイルスによる食中毒が疑われる事例が発生し、食品からノロウイルスの検出を行う場合には、上記の事象を踏まえ、食品残品の種類、残存量等も加味してどのように検査を実施するか、臨機応変に対応する必要があると思われる。

5 参考文献

- 1) 厚生労働省ホームページ：食中毒統計資料、
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuchu/04.html