

細菌の生物活性を利用したカキからのノロウイルス検査法の改良

秋場哲哉，尾畑浩魅，林志直，森功次，野口やよい，永野美由紀，仲真晶子，甲斐明美，矢野一好

細菌の生物活性を利用したカキからのノロウイルス検査法の改良

秋場哲哉*, 尾畑浩魁**, 林志直*, 森功次*, 野口やよい*, 永野美由紀*, 仲真晶子*, 甲斐明美**, 矢野一好***

ウイルス性食中毒事件関連の検査において、推定原因食品からのノロウイルス検出が困難である要因の一つに、検査対象食品に含まれている食品由来の物質が、目的遺伝子の抽出あるいはPCR反応に対する妨害作用を及ぼしている可能性が考えられる。我々はこのような妨害物質の除去方法として細菌の生物活性を利用した前処理法を検討した。その結果、カキ乳剤に添加したノロウイルスの回収には、*Proteus vulgaris*を用いてカキ乳剤を処理した場合に最も高いウイルス回収率が得られた。厚生労働省通知による手法で得られた回収率の平均は、添加したノロウイルス GI/8, GII/4とも0.2%であったのに対し、*P. vulgaris*を用いて処理を行った場合にはそれぞれ45.9%, 21.3%に向上した。

キーワード：ノロウイルス，カキ，妨害物質，細菌，回収率，検出法

はじめに

ノロウイルス (NV) に起因する食中毒事例は近年増加する傾向にあり、その予防や拡大防止対策が急がれている。

一方NVの検査は、平成15年11月5日付けの厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知、食安監発第1105001号¹⁾に記載された方法(以下、通知法と記す)に基づき実施されており、当センターにおいても通知法によって食品や糞便を対象にNV遺伝子の検索を行っている。カキをはじめとする食品に蓄積あるいは付着したNVの検出は、食中毒原因物質の特定及び感染経路の究明を行う上で重要であるが、推定原因食品からNVが検出される食中毒事例は非常に少ない。食品からのNV検出を困難にしている原因には、①食品からのウイルス誘出が困難である、②食品から誘出させたウイルス分画からのウイルス遺伝子の抽出が困難である、③抽出したウイルス遺伝子のPCR反応が、食品由来成分によって阻害される等が考えられる。PCR反応における妨害物質の除去には、酵素を用いてグリコゲンを消化する方法²⁾や、陽性に荷電したフィルターを利用した処理方法³⁾等が試みられている。我々は、ウイルス遺伝子の抽出時に二段階の精製処理を行い、検査妨害物質の除去効率を高める方法⁴⁾を考案し検討を行ってきた。カキ乳剤を用いたNV添加回収実験では、我々が検討した手法は通知法に比べ、添加したNVの回収率が向上することが確認できた。ところが、実験に用いるカキ乳剤を一週間程度冷蔵保存した場合通知法による回収率が向上し、我々が検討した手法による回収率との差が縮小する結果となるものが見られた。この現象は、もともとカキ乳剤に含まれていた細菌による腐敗や、カキの自己融解が冷蔵保存中に進んだことによって検査妨害物質が減少したためと考えられた。そこでカキや魚等の食品を腐敗させた後、得られた腐敗液をNV添加回収実験用のカキ乳剤に加えて一晚培養後、通知法を用いて添加したNVの回収率を見たところ、それまで検討してきた手法よりも高い回収率を得ることができた。その後、食品の腐敗液から数種の細菌を分離同定し、それぞれの菌を用いて実験を行った結果、最も高い回収率を示す細菌、*Klebsiella oxytoca*を得るに至った。そこで今回は、*K. oxytoca*を含めて腐敗細菌を主とした10種の標準菌株を用いてNV添加回収実験を行った。また、最も高い回収率が得られた細菌を用いて、カキの産地やロットの違いによる回収率の変化について検討した。

材料と方法

1. 供試カキ乳剤の作成

カキには産地、季節、種類、ロット等によってウイルスの蓄積状況等が異なることが報告されている⁵⁾。本実験は、ウイルス性食中毒の原因食品としての関与が大きいと考えられているカキからのウイルス検出効率を向上させることが目的であるので、市販の冷凍ガキ1検体、産地の異なる殻付き生ガキ2検体の合計3検体を供試した。1検体につき8~10個体より取り出した中腸腺を、PBS(-)(pH7.4:日本水製薬)を用いて10%濃度の乳剤にした。各乳剤をそれぞれ11本の遠心管に8 mLずつ分注し供試用カキ乳剤とした。

2. 添加回収実験用ウイルス液の作成

過去の食中毒事例において、リアルタイムPCRを用いた検査の結果NV陽性となり、凍結保存してあった患者糞便2検体を用いた。糞便由来の夾雑物が実験に及ぼす影響を排除するため、これら2検体の10%乳剤を10,000 rpm, 20分間遠心した後、上清を27,000 rpm, 3時間超遠心した。得られた沈渣を1 mLのPBS(-)で再浮遊し、更にPBS(-)を用いて1,000倍に希釈した。希釈後の乳剤20 mLを直径33 mm, 孔径0.22 μmのフィルターでろ過し、乳剤中に残存する細菌等を取り除いて添加用ウイルス液とした。NV陽性の糞便はNVを多く含む検体を選出した。また、NVの遺伝子型の違いによって実験結果に差が生じる可能性を考慮し、異なる遺伝子型が検出された2検体を用いた。供試糞便2件のうち1件は、Kageyamaらの方法⁶⁾によってNV遺伝子型GI/8(以下、GI/8と記す)が検出された糞便であり、他の1件はNV遺伝子型 GII/4 (以下、GII/4と記す)が検出された糞便である。これらウイルス液を供試用カキ乳剤に70 μLずつ添加して回収実験を行った。なお、対照はPBS(-)8 mLに添加したウイルス液とした。

3. 供試菌株

腐敗菌から単離した細菌を使用した予備実験の結果から推測して、再現性、普遍性を確認するために標準菌株を準備して菌液を調製した。菌株は*Bacillus pumilus* NBRC 12092, *Enterobacter aerogenes* NBRC 13534, *Sphingomonas macrogoltabidus* NBRC 15033, *Klebsiella oxytoca* NBRC 102593, *Proteus vulgaris* NBRC 3045, *Micrococcus luteus* NBRC 3333, *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 12689, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NBRC 13719, *Escherichia coli* NBRC 102203, *Serratia marcescens* NBRC 102204の10株を選出し供試した。選出にあたり食品腐敗能を有すること、ヒトに対する病原性が無いか低いこと、好気性または通性嫌気性であり比較的培養が容易であること等を考慮した。

* 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

** 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科

*** 東京都健康安全研究センター微生物部

4. 供試菌液の作成

上記10種の菌株をそれぞれ35°C, 20時間トリブチケースソイブイオンを用いて2代継代培養後, 菌数が $10^5/\text{mL}$ となるようPBS(-)を用いて10,000倍に希釈し, 10 mLの供試菌液を作成した。

5. 今回検討した方法による前処理

10種の供試菌液100 μL を, あらかじめ調製しておいた供試カキ乳剤10本に添加し35°Cで一晩(16時間)培養した。培養後の供試材料は4°C, 10,000 rpm, 20分間遠心後, 上清を30%ショ糖溶液1 mLに重層して4°C, 40,000 rpm, 2時間(HITACHI himac CP80WX)超遠心し, この沈渣をNV検出試料とした(以下, 開発法と記す, Scheme 1)。

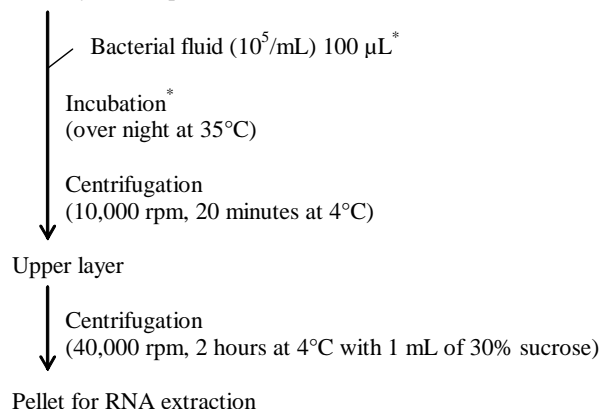
6. 通知法による前処理

細菌を添加していないカキ乳剤の実験管は通知法¹⁾による前処理(以下, 標準法と記す)を行った。

7. NV検出方法

それぞれの前処理によって得られた沈渣を, 滅菌蒸留水140 μL を用いて再浮遊し, 全量をRNA抽出に用いた。RNA抽出, DNase処理, cDNA合成及びリアルタイムPCRによるNVの検出は, 通知法に準拠して行った。すなわち, QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNA抽出を行い, DNase処理にはDNase I(TaKaRa)を用いた。逆転写酵素はSuperScript II(invitrogen), プライマーはRandom hexamer (Amersham Biosciences)を用いた。合成したcDNA 5 μL を鋳

10% Oyster sample 8 mL



* These steps were added in the standard protocol.

Scheme 1. Flowchart of modified NV collection method

型として, ABIPRISM7900(Applied Biosystems)によるリアルタイムPCRを行い, 添加したNVを検出, 定量した。プライマー及びプローブはGI検出用にCOG1F/COG1R, RING1-TP(a), GII用としてCOG2F/COG2R, RING2-TPを用い, 50°C 2分, 95°C 10分を1回, 95°C 15秒, 56°C 1分を45回繰り返した。

8. 定量用標準曲線

国立感染症研究所より分与されたNVコントロールDNAを用いて 10^7 copies/ $5\mu\text{L}$ から 10^0 copies/ $5\mu\text{L}$ まで10倍段階希釈した標準液を作成後, 各濃度の標準液より得られたリアルタイムPCRのthreshold cycle(Ct値)から定量用標準曲線を作成した。

結果及び考察

実験は異なるカキ検体を用いて3回行った。標準法及び各菌株を用いた開発法のリアルタイムPCRのCt値, Ct値の平均と定量用標準曲線から求めたNV遺伝子量をTable 1に示した。今回の実験では, 過去の実験結果から主に食品腐敗細菌を供試したが, いずれの菌株を用いた開発法も標準法によるNV回収量を上回った。また, 添加したNVの遺伝子型別の結果では, 今回用いたGI/8とGII/4で回収量が大きく乖離する傾向は見られなかった。開発法に用いた菌株のうち*K. oxytoca*よりも高いNV回収量を示した株は, GI/8では *E. aerogenes*, *P. vulgaris*, *E. coli*, *S. marcescens*の4株であり, GII/4では*E. aerogenes*, *P. vulgaris*, *E. coli*の3株であったが, Ct値で比較すると*K. oxytoca*を用いて得られたCt値との差はいずれも1サイクル以内であった。GI/8, GII/4ともに最も高い回収量を示したのは*P. vulgaris*を用いた開発法であった。その理由として, カキの成分であるグリコーゲンや蛋白質, アミノ酸等に対し, *P. vulgaris*の生物活性が最も適していたと推察された。なお, それぞれの菌液を核酸抽出して検査を行った結果, 添加した細菌の核酸等による偽陽性反応は見られなかった。

Table 1. Threshold cycles and copies (/test) of bacterial treatment with each strains.

GI / 8					
Strain	Ct		Ct (mean)	Copies	
<i>Bacillus pumilus</i> NBRC 12092	36.9	33.9	34.4	35.1	526
<i>Enterobacter aerogenes</i> NBRC 13534	30.0	29.4	28.9	29.4	13,333
<i>Sphingomonas macrogoltabidus</i> NBRC 15033	30.1	34.6	32.0	32.2	2,723
<i>Klebsiella oxytoca</i> NBRC 102593	30.0	31.7	29.0	30.2	8,469
<i>Proteus vulgaris</i> NBRC 3045	29.8	29.2	29.2	29.4	13,333
<i>Micrococcus luteus</i> NBRC 3333	29.4	35.3	30.5	31.7	3,616
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC 12689	29.7	32.4	30.0	30.7	6,378
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NBRC 13719	30.9	31.2	30.8	31.0	5,379
<i>Escherichia coli</i> NBRC 102203	30.0	29.4	29.6	29.6	11,903
<i>Serratia marcescens</i> NBRC 102204	29.5	29.6	30.3	29.8	10,626
standard	37.9	45.0	40.3	41.1	45
PBS	30.2	29.6	29.1	29.6	11,903
GII / 4					
Strain	Ct		Ct (mean)	Copies	
<i>Bacillus pumilus</i> NBRC 12092	37.6	34.8	38.4	36.9	438
<i>Enterobacter aerogenes</i> NBRC 13534	31.3	31.4	32.3	31.7	7,520
<i>Sphingomonas macrogoltabidus</i> NBRC 15033	31.0	36.1	34.6	33.9	2,259
<i>Klebsiella oxytoca</i> NBRC 102593	31.8	32.8	32.2	32.3	5,418
<i>Proteus vulgaris</i> NBRC 3045	31.6	31.1	32.1	31.6	7,943
<i>Micrococcus luteus</i> NBRC 3333	30.9	36.0	32.8	33.2	3,313
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC 12689	31.0	33.9	32.3	32.4	5,129
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NBRC 13719	32.5	32.6	32.9	32.7	4,354
<i>Escherichia coli</i> NBRC 102203	31.6	31.8	32.7	32.0	6,383
<i>Serratia marcescens</i> NBRC 102204	31.9	32.0	33.2	32.4	5,129
standard	39.2	45.0	41.6	41.9	53
PBS	30.1	30.1	30.2	30.1	18,032

*P. vulgaris*を用いた開発法について妨害物質の除去効果を検証するため、産地やロットが異なる冷凍ガキ5検体、殻付き生ガキ2検体を追加して10%乳剤を作成し、標準法と*P. vulgaris*を用いた開発法の二法を用いてNV添加回収実験を行った。また、GI/8及び GII/4ウイルス液それぞれ70 μ Lを用いて核酸抽出を行い同液中に含まれるNVの定量値を求めた。その結果から、供試材料中に添加したNV量を、GI/8は20,990 copies/test, GII/4は31,148 copies/testとし、このNV量を100%としてそれぞれの検体及び手法ごとにNVの回収率(x)を $x = (\text{供試材料中のNV定量値} / \text{ウイルス液中のNV定量値}) \times 100$ により求めた (Table 2)。回収率に差は見られたものの、いずれのカキを用いた場合も*P. vulgaris*を用いた開発法は標準法より高い回収率を示し、産地やロットが異なるカキからのNV検出においてもその有効性を示唆するものであった。*P. vulgaris*を用いた開発法は、Ct値の平均ではGI/8で9.8サイクル、GII/4で9.2サイクル標準法より短縮した。NV回収率の平均は標準法ではGI/8、GII/4とも0.2%であったのに対し、*P. vulgaris*を用いた開発法ではGI/8で45.9%、GII/4では21.3%であった。回収率はNV定量値から求めたため、*P. vulgaris*を用いた開発法の回収率は、GI/8では9.8%から71.2%、GII/4では7.7%から39.5%と大きな幅が見られたが、Ct値の差で見た場合GI/8では3.5サイクル、GII/4では3サイクルであったことから、これら

の差の原因はカキの産地の違い等によるもの以外に、検査時の誤差である可能性も考えられた。今後は、これらの差が生じた原因について検討するほか、今回使用した菌が有効性を発揮したウイルス回収段階の究明を行い、その作用機序や有効成分を特定する必要がある。今回検討した方法は特殊な器具や試薬類を必要とせず、カキを用いたNV添加回収実験で高い回収率を示したことから、食品からのNV検出に有効な手法となり得ると考えられた。

まとめ

カキからのノロウイルス(NV)検出において、細菌の生物活性を利用した食品成分由来の検査妨害物質の除去法について検討した。今回カキを用いたNV添加回収実験を行い、以下の実験結果を得た。

1. 検討に用いた10種の菌株の内、*Proteus vulgaris*を用いた場合に最も高いNV回収率を示した。
 2. 種類や産地が異なるカキ10検体を用いた実験において、厚生労働省通知による前処理法ではNV回収率の平均がGI/8、GII/4とも0.2%であったのに対し、*P. vulgaris*を用いた手法ではそれぞれ45.9%、21.3%であった。
- これらのことから、細菌の生物活性を利用した検査妨害物質の除去法は、食品からのNV検出に有効な手法となり得ると考えられた。

Table 2. Comparison of results between standard and modified method with *Proteus vulgaris*.

GI / 8						
Sample*	Standard			Modified method with <i>P. vulgaris</i>		
	Ct	Copies	Recovery rate (%)	Ct	Copies	Recovery rate (%)
1	37.9	107	0.5	29.8	10,626	50.6
2	ud	0	0.0	29.2	14,935	71.2
3	44.2	3	0.0	30.1	8,963	42.7
4	36.9	189	0.9	32.7	2,051	9.8
5	40.3	28	0.1	29.2	14,935	71.2
6	40.5	25	0.1	31.4	4,287	20.4
7	39.9	35	0.2	29.5	12,598	60.0
8	40.0	33	0.2	30.0	9,487	45.2
9	40.5	25	0.1	29.7	11,246	53.6
10	40.1	31	0.1	30.5	7,144	34.0
mean	40.0	48	0.2	30.2	9,627	45.9
PBS	29.6	11,903	56.7			
viral fluid	28.6	20,990	100.0			

GII / 4						
Sample*	Standard			Modified method with <i>P. vulgaris</i>		
	Ct	Copies	Recovery rate (%)	Ct	Copies	Recovery rate (%)
1	39.2	125	0.4	31.6	7,943	25.5
2	ud	0	0.0	31.1	10,439	33.5
3	43.2	14	0.0	33.7	2,520	8.1
4	39.4	119	0.4	33.8	2,386	7.7
5	41.6	34	0.1	32.1	6,043	19.4
6	44.0	9	0.0	32.7	4,354	14.0
7	40.8	52	0.2	31.1	10,439	33.5
8	42.5	21	0.1	32.7	4,354	14.0
9	40.0	81	0.3	30.8	12,299	39.5
10	41.5	36	0.1	32.2	5,722	18.4
mean	41.4	49	0.2	32.2	6,650	21.3
PBS	30.1	18,032	57.9			
viral fluid	29.1	31,148	100.0			

ud : undetected

* Samples 1~4 were raw , other samples were frozen oysters.

文 献

- 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：食安監 発第1105001号，ノロウイルスの検査法について，2003.
- 野田衛，西尾治，山本美和子，他：広島市衛研年報，**25**， 35-43，2006.
- Queiroz, A.P.S., Santos, F.M., Sassaroli, A., *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(10), 4614-4618, 2001.
- 田中達也，秋場哲哉，森功次，他：日食微誌，**24**，157-162， 2007.
- 福田伸治，田中智之：厚生労働科学研究費補助金食品の 安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御 に関する研究 平成19年度総括・分担研究報告書， 151-155，2008.
- kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 2988-2995, 2004.

Improvement of Norovirus Detection Method by using Bacteria from Oysters

Tetsuya AKIBA*, Hiromi OBATA*, Yukinao HAYASHI*, Kohji MORI*, Yayoi NOGUCHI*,
Miyuki NAGANO*, Akiko NAKAMA*, Akemi KAI*, Kazuyoshi YANO*

Inhibitors in food samples may be responsible for the difficulty in detecting norovirus (NV) by PCR. To detect NV more efficiently, we employed additional bacterial treatment before RNA extraction in the standard protocol. Ten strains of bacteria were examined with the modified method using oyster samples, and *Proteus vulgaris* was found to be the most effective. By quantification of NV RNAs using real-time PCR, recovery rates of NVs (GI/8 or GII/4) added to oyster suspensions using the modified method were compared with those recovered using the standard method. Recovery rates using the modified method with *P. vulgaris* were 45.9% for GI/8 and 21.3% for GII/4, while those using the standard method were 0.2% for GI/8 and GII/4.

Keywords: Norovirus, oyster, inhibitor, bacteria, recovery rate, detection method

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health 3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan