

短報

ふきとり検体におけるノロウイルスの検出について

鈴木理恵子, 高橋淳子, 金城恵子, 近藤真規子,
黒木俊郎

Detection of Norovirus in environmental swab samples

Rieko SUZUKI, Junko TAKAHASHI,
Keiko KINJO, Makiko KONDO
and Toshiro KUROKI

はじめに

ノロウイルスによる食中毒事例は、近年、ノロウイルスに汚染された二枚貝を原因とする事例よりも、調理従事者を介して汚染された食品による事例が多い傾向にある。調理従事者を介した食品汚染を疑う場合には、施設環境等の汚染状況を調査する目的で、施設内のふきとり検査を実施することがあるが、ふきとり方法や処理方法が確立されておらず、ふきとり検体からのウイルス検出は難しい状況にある。2015年3月に食品衛生検査指針微生物編¹⁾が改訂され、はじめて食中毒発生時におけるウイルス用ふきとり検体の採取法および検査法が示されたが、操作が複雑なため緊急検査への導入が困難である。そこで、簡便で効率的なふきとり及び処理方法を検討するため、指針で示された方法と従来から当所で実施している方法との比較を行った。

材料および方法

ノロウイルスGⅠおよびGⅡの陽性検体を用いて添加回収用検体を作製し、ふきとり方法とその回収率の検討を行った。

1. ふきとり検体

ノロウイルスGⅠ (9.0×10^3 コピー/100 μ l) およびノロウイルスGⅡ (8.9×10^3 コピー/100 μ l) 混合液を原液とし10段階希釈系列を作製した。原液から1,000倍までの4段階の希釈液100 μ lを滅菌ステンレスバット10 $\times$ 10cm²区画に塗布後、乾燥させ模擬汚染区画(以下、

汚染区画とする)とし、ウイルス濃度別回収率について検討した。

また、同様に原液100 μ lを塗布し、20 $\times$ 20 cm², 30 $\times$ 30 cm²の汚染区画を作製し、ふきとり範囲について検討した。汚染区画は希釈系列、ふきとり範囲ごとに各3検体を作製し、測定を実施した。

2. ふきとり方法

汚染区画それぞれについて、下記の3つのふきとり方法を実施した(図1)。

1) A法(食品衛生検査指針に記載された方法)

滅菌カット綿(5 $\times$ 5cm 1枚)にPBS(-) 2mlを添加し、裏返したサンプルバック(滅菌袋)に手を入れてカット綿を持ち、汚染区画を縦と横に2回ふきとった。同じ場所をもう1枚の滅菌カット綿で拭き上げ、2枚をサンプルバックに入れ検体とした。

2) B法(食品衛生検査指針に記載された方法)

細菌検査用ふきとり検査キット(ふきふきチェック: 栄研化学)を用い、汚染区画をキット添付の綿棒で縦と横に2回ふきとり、キット容器に綿棒を戻し検体とした。

3) C法(当所で実施している方法)

B法と同様に、細菌検査用ふきとり検査キットを用い、汚染区画をキット添付の綿棒で縦と横に2回ふきとった後、キット容器内の緩衝液を捨て、容器内に綿棒を戻し検体とした。

3. ふきとり検体の処理方法

ふきとり検体の処理を図1に従い実施した。

1) A法

サンプルバックにPBS(-) 8mlを添加しもみほぐした後、添加したPBS(-)を50ml遠沈管に回収した。サンプルバックにさらにPBS(-) 10mlを添加し、同様の操作を行った。遠沈管に回収した液にPBS(-)を添加し、20mlになるように調整した。得られた溶液についてポリエチレングリコール濃縮を次のように実施した。2.5% Beef Extract加PBS(-)5ml, ポリエチレングリコール6000 3g, NaCl 1.45gを添加溶解後、4 $^{\circ}$ Cに一晩放置した。10,000rpm 4 $^{\circ}$ C 20分遠心後、上清を取り除き、沈渣をSDS-Tris Glycine緩衝液200 μ lに再溶解し、全量を核酸抽出材料とした。

2) B法

容器内の綿棒と緩衝液をよく混和し、緩衝液を50ml遠沈管に回収した。さらに容器内にPBS(-)10mlを添加し綿棒とよく混和し、遠沈管に回収後、PBS(-)で20mlにメスアップした。A法と同様にポリエチレングリコール濃縮を実施した。

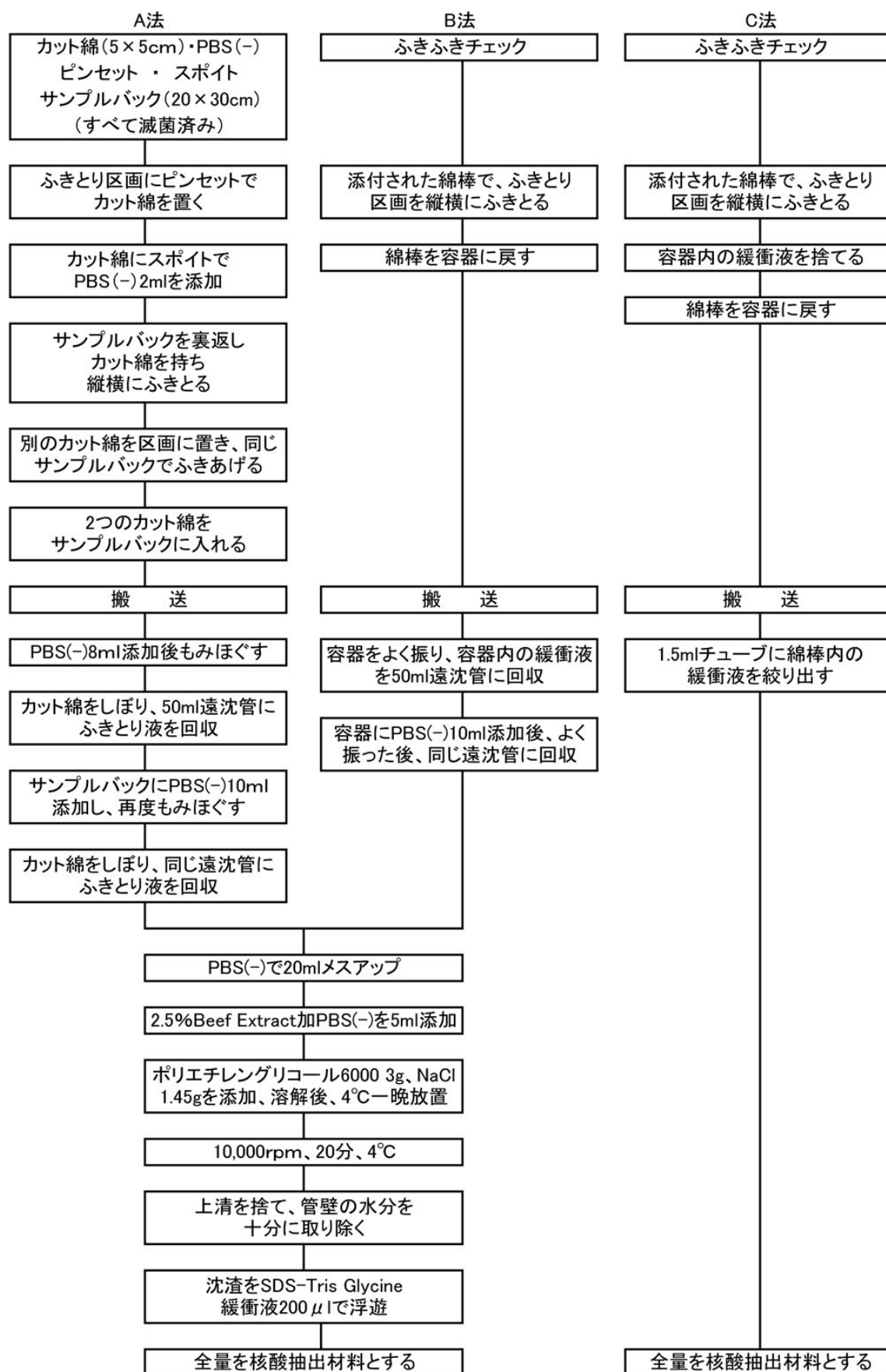


図1 ふきとり方法および検体の処理

表 1 ふきとり方法別のノロウイルスG I・G IIコピー数と回収率

方法		G I				G II			
		Control*	A 法	B 法	C 法	Control*	A 法	B 法	C 法
希釈倍率	原液	9000	4300 (47.8)	1733 (19.3)	3200 (35.6)	8933	3400 (38.1)	1933 (21.6)	2833 (31.7)
	10倍	2267	527 (23.2)	357 (15.7)	760 (33.5)	1057	407 (38.5)	427 (40.4)	737 (69.7)
	100倍	150	110 (73.3)	107 (71.3)	72 (48.0)	87	56 (64.4)	76 (87.4)	84 (96.6)
	1000倍	14	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)	11	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)

*：模擬検体作製に使用したノロウイルス混合液100 μ lをControlとして測定上段：各汚染区画 (n=3) の平均コピー数 下段：回収率 (%) , ふきとり面積10 $\times$ 10cm²

表 2 検体別ウイルス検出状況

方法		G I				G II			
		Control*	A 法	B 法	C 法	Control*	A 法	B 法	C 法
ふきとり面積	100cm ²	9000	4300 (47.8)	1733 (19.3)	3200 (35.6)	8933	3400 (38.1)	1933 (21.6)	2833 (31.7)
	400cm ²		1103 (12.3)	1057 (11.7)	2300 (25.6)		1350 (15.1)	963 (10.8)	1733 (19.4)
	900cm ²		1650 (18.3)	583 (6.5)	2650 (29.4)		1733 (19.4)	360 (4.0)	2067 (23.1)

*：模擬検体作製に使用したノロウイルス混合液100 μ lをControlとして測定

上段：各汚染区画 (n=3) の平均コピー数 下段：回収率 (%)

3) C 法

綿棒に含まれる緩衝液を1.5mlエッペンドルフチューブ内に絞り出し、全量を核酸抽出材料とした。

4. ノロウイルス検出法

「ノロウイルスの検査法について」食安監発第0514004号(平成19年5月14日)²⁾に準じ、ノロウイルス遺伝子検出を行った。ウイルスRNAの抽出には、市販のウイルスRNA抽出キット(QIAamp Viral RNA mini kit, QIAGEN)を用いた。抽出RNA24 μ lに、DNase処理液6 μ l(RNase Free dH₂O 2.6 μ l, 5 $\times$ SSII Buffer 3.0 μ l, DNase I (5U/ μ l)0.4 μ l)を添加し、37 $^{\circ}$ C 30分, 75 $^{\circ}$ C 5分反応させDNase処理を行った。DNase処理後のRNA液15 μ lに、RT処理液15 μ l(RNase Free dH₂O 3.25 μ l, 5 $\times$ SSII Buffer 4.5 μ l, 10mM dNTPs 1.5 μ l, Random Primer(invitrogen) (1.0 μ g/ μ l) 0.75 μ l, 100mM DTT 1.5 μ l, RNase inhibitor (Applied Biosystems) (20U/ μ l) 2.0 μ l, Super Script II RT(invitrogen) (200U/ μ l) 1.5 μ l)を添加し、42 $^{\circ}$ C 60分, 99 $^{\circ}$ C 5分反応させcDNAを作製した。リアルタイムPCRのG I, G II各々の反応液量を1チューブ当たり20 μ lとし、各検体につ

き2ウェルを測定した。反応試薬は、G I プライマー(COG1F, COG1R 各100pmol/ μ l), G I プローブ(RING1-TPa, RIHG1-TPb 各4pmol/ μ l), G II プライマー(COG2F, COG2R 各100pmol/ μ l), G II プローブ(RING2-plateAL-TP 4pmol/ μ l), TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems)を混合し、cDNAまたはコントロールDNAを2 μ l添加した。リアルタイムPCR反応条件は、50 $^{\circ}$ C 2分, 95 $^{\circ}$ C 10分 1cycle, 95 $^{\circ}$ C 15秒, 56 $^{\circ}$ C 1分45cyclesとした。「ノロウイルスの検査法について」に従い、2ウェルともに実測値10コピー以上をノロウイルス陽性と判定した。

結果および考察

ふきとり方法別にノロウイルスG IおよびG IIの3回測定の平均コピー数と回収率を表1に示した。ウイルス原液, 10倍および100倍希釈ウイルス液添加後の回収率は、G IはA法で23.2%~73.3%, B法で15.7%~71.3%, C法で33.5%~48.0%, G IIはA法で38.1%~64.4%, B法で21.6%~87.4%, C法で31.7%~96.6%であった。G IおよびG IIは1,000倍希釈では3方法とも検出限界値以下であり、検出感度は10~100コピー/100 μ l程度であると考えられる。回収率は、3方法と

もに100倍希釈が最も高かった。原液および10倍希釈の回収率が低い要因として、ノロウイルス混合液に含まれる夾雑物の影響が考えられ、今後は精製したノロウイルス混合液による検討を行う必要がある。

汚染区画10×10cm²、20×20 cm²、30×30 cm²をふき取った検体の測定値及び回収率を表2に示した。G IおよびG IIは3方法とも、ふき取り面積10×10cm²の回収率が最も高く、ふきとり面積が大きくなると回収率が減少する傾向にあった。

ふきとり採取器材を比較すると、A法は試薬が自家調製であることや、使用期限の設定等の問題の他、現場での操作に熟練が必要であり導入が困難である。B法とC法は市販品であるため必要に応じて購入でき、使用期限内の品質は保証されており、現場での操作も簡便である。A法とB法は検出感度を確保するため濃縮作業が必要であるが、C法は濃縮操作が不要である。ふき取り面積10×10cm²における希釈段階ごとの回収率をみると、3方法で大きな差は認められなかった。他機関で行ったふきとり方法の検討でも、カット綿と綿棒での回収率に、大きな差は認められていない³⁾。また、細菌検査用ふきとりキット内の緩衝液量は10mlよりも1mlの方が回収率が高い⁴⁾との報告もある。検体の濃縮方法には、50,000回転2時間による超遠心分離濃縮法がよく用いられ、その回収率は、58.7%から85.7%であると報告されている⁵⁾。しかし、超遠心分離機による濃縮は特別な機器を要し、処理数の制約を受けることから、今回の検討では、比較的簡便なポリエチレングリコール濃縮法を用いた。回収率は検体希釈倍数により異なり、超遠心濃縮法より低い値を示す検体もあったが、ポリエチレングリコール濃縮法でも、ふきとり検体中に10~100コピー/100μl程度のノロウイルスが存在する場合、検出が可能であった。

ふきとり検査で採取面積を拡大することは、回収率の低下に繋がることが今回の結果で示された。市販の細菌検査用ふきとりキットの適切な採取面積は10×10cm²であり、広範囲にふきとる場合には、採取場所を適切な面

積に区画し、複数の容器で採取する等の工夫が必要である。

2015年3月に食品衛生検査指針 微生物編により、初めて食中毒発生時のふきとり検体の検査方法が示された。食品衛生検査指針に示されたA法、B法と当所で従来から採用している方法であるC法を比較した。細菌検査用ふきとりキットを用いて、面積10×10cm²をふきとり、容器内の緩衝液を捨てた容器に採取後の綿棒を入れ搬送、検体処理を行うC法が、準備、採取、処理工程、処理時間ともに簡便で良好な結果が得られることが確認できた。このことから、今後もC法で検体処理を行うことにより、食中毒発生時には迅速で信頼性の高い結果を提供が可能となり、食中毒事例調査に貢献することが期待できる。

謝 辞

本調査を実施するにあたり、多大なご協力を頂きました保健福祉事務所職員の皆様に深謝いたします。

本研究の一部は、平成27年度神奈川県公衆衛生協会調査研究助成金を受けて実施しました。

文 献

- 1) 公益社団法人日本食品衛生協会：食品衛生検査指針 微生物編 2015, pp.607-622, 東京(2015)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全監視安全課長通知：食安監発第0514004号（平成19年5月14日）「ノロウイルスの検出法について」
- 3) 溝口嘉範, 木田浩二, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男ほか：ふきとり検体のノロウイルス検査法の改良, 病原体検出情報(IASR), **32**, 358-359 (2011)
- 4) 上村晃秀, 濱田まどか, 御供田睦代, 吉國謙一郎, 蓑田祥子ほか：食中毒原因食品からのノロウイルス遺伝子検出法の確立（第Ⅱ法）, 鹿児島県環境保健センター所報, **12**, 65-67 (2011)
- 5) 東京都健康安全センター：「ノロウイルス対策緊急タスクフォース」最終報告, pp.30, (2010)