

資料

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報)

上 村 晃 秀 濱 田 まどか 御供田 睦 代
 吉 國 謙一郎¹ 蓑 田 祥 子 湯 田 充 典²
 藤 崎 隆 司

1 はじめに

本県における食中毒の起原因菌としては、ノロウイルス(以下「NV」という。), サルモネラ, カンピロバクター等が主流となっている。

食中毒特定には、患者便と原因食品からの病原体検出が重要である。しかし、NVは培養方法がなく、遺伝子検査法により患者便からの検出はできているが、食品(二枚貝を除く)からの検出は、ウイルス量や夾雑物(増幅反応阻害剤)等の要因により検出できていない現状である。

食品の検査は、平成15年11月5日付け食安監発第1105001号の厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知により示されている方法(以下「通知法」という。)に準じて実施しているが、検出率が低いことから、新たな検査法の確立が必要である。

第Ⅰ報¹⁾では、当センターで実施している便検査法を応用し、食材ごとのNV回収率・検出感度等を報告した。

本報では、夾雑物除去を目的に腐敗細菌を利用した方法²⁾等について検討を行ったので報告する。

2 材料及び方法

2.1 材料

2.1.1 試料の作製

市販されている5食品(浅漬け、ポテトサラダ、キャベツの千切り、マグロの刺身及び鶏刺し)各10gにPBS 90mLを加え1分間ストマッカー処理を行い、10%乳剤を作製した。

添加用ウイルス液は、当センターにおいて、過去にNVを検出した感染性胃腸炎患者の便から、GⅡ6.4×10⁷ copies/mLになるよう調整した。

各食品10%乳剤7mLに添加用ウイルス液140μLずつ添

加したものを測定用試料とした。

2.1.2 腐敗細菌の作製

NBRC (NITE Biological Resource Center) より標準菌株 (*Proteus vulgaris*) を購入し、37℃で20時間培養増殖後、PBSでMcFarland4 (1.2×10⁹/mL) の菌浮遊液を作製した。

2.2 方法

次の3方法について、LightCycler 480 (Roche) を用い、検出されるウイルス量の比較検討を行った。

2.2.1 NV遺伝子検査法(食品)

当センターにおける検査法を図1に示す。

粗遠心 4℃ 10000rpm20分間

30%ショ糖重層

超遠心 4℃ 40000rpm2時間

沈渣物に滅菌蒸留水140μLを加える

RNA抽出 QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

DNase処理・逆転写反応

Quantitect Reverse Transcription Kit (QIAGEN)

Real time PCR LightCycler TaqMan Master (Roche)

GⅡ Primer COG2F / ALPF / COG2R
 GⅡ Probe RING2AL-TP

図1 NV遺伝子検査法(食品)

2.2.2 腐敗細菌を利用した夾雑物除去方法

図1の工程前に、腐敗細菌を10μLずつ各測定用試料に

1 鹿児島県北薩地域振興局保健福祉環境部
 2 医療法人 玉昌会 高田病院

〒895-0041 鹿児島県薩摩川内市隈之城町228-1
 〒892-0824 鹿児島県鹿児島市堀江町5番1号

添加し、20時間反応させ測定した。

2. 2. 3 エタノール沈殿法を利用したRNA濃縮法
検査法を図2に示す。

- 腐敗細菌 測定用試料に10μL添加
- | 20時間37°Cで培養
- 粗遠心 4°C 10000rpm20分間
- | 30%ショ糖重層
- 超遠心 4°C 40000rpm2時間
- | 沈渣物に滅菌蒸留水140μLを加える
- RNA抽出 QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- |
- エタノール沈殿法
- | RNA抽出液に1/10量の3M酢酸ナトリウムを添加
- | 100%エタノールを2.5倍量加え混合
- | 室温で10分間放置後、14000rpm20分間遠心
- | 沈渣物に80%エタノールを適量加え混合
- | 14000rpm5分間遠心
- | 沈渣物を乾燥
- | TE液5μLを加え溶解
- DNase処理・逆転写反応
- | Quantitect Reverse Transcription Kit (QIAGEN)
- Real time PCR LightCycler TaqMan Master (Roche)

図2 エタノール沈殿法を加えた方法

2. 2. 4 拭き取り検査における希釈液量の比較

拭き取り検査について、添加用ウイルス液1mLを床に落とし、保健所等で使用している拭き取り検査用容器(ふきふきチェックII)の綿棒で拭き取り、希釈液量を減らし検討した。

3 結果及び考察

NVのウイルス量については、CP値(Crossing Point: 反応が起こり始めた最大勾配ポイントのサイクル数)を用いて表示する。CP値が低いほど、ウイルス量が多いことを示す。

また、図表中では、2.2.1節の方法を「無添加」、2.2.2節の方法を「細菌添加」、2.2.3節の方法を「細菌+エタ沈」と表記する。

3. 1 3方法によるウイルス量の比較

夾雑物除去の目的で腐敗細菌を添加することにより、5食品すべてで検出するウイルス量を増やすことができ

た(表1, 図3)。これは、腐敗細菌の食食作用が働き、各食品が細かく分解されることにより、現在実施しているストマッカー処理及び超遠心法では、野菜等の繊維に絡みついて採取できなかったNVが検出できたためと考えられる。

このことによりNVの遺伝子検出においては、通知法に加え腐敗細菌を利用した方法が有用であると思われる。しかし、生きた細菌を活性化するために20時間、夾雑物除去に20時間要し、通知法の検査より日数がかかるため、他の夾雑物除去法(消化酵素や脂質分解酵素等)について検討する必要がある。

また、エタノール沈殿法を加えることにより、脂質を含む2食品(ポテトサラダ、鶏刺し)については、他の方法より良好な結果が得られた(表1, 図3)。

これらは、RNA抽出キットで抽出した遺伝子をエタノールで処理することにより、残存していた脂質成分が除去され、遺伝子が濃縮されたためと思われる。

表1 3方法毎のCP値及びコピー数

食品	無添加		細菌添加		細菌+エタ沈	
	CP	コピー数*	CP	コピー数*	CP	コピー数*
浅漬け	33.08	4.95E+02	32.69	6.47E+02	37.25	2.90E+01
ポテトサラダ	35.02	1.33E+02	30.60	2.33E+03	28.40	9.88E+03
キャベツの千切り	31.78	1.13E+03	29.89	3.72E+03	30.85	1.98E+03
マグロの刺身	35.60	8.90E+01	34.61	2.49E+02	34.74	1.54E+02
鶏刺し	34.56	1.89E+02	31.83	1.07E+03	30.84	1.99E+03

* 抽出RNA2μLあたりのコピー数

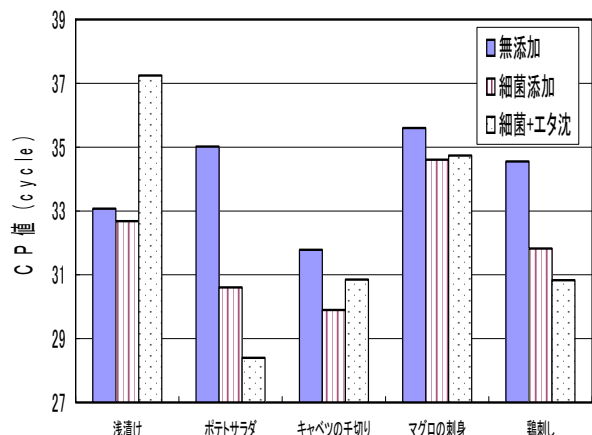


図3 3方法による各食品毎のウイルス量の比較

3. 2 拭き取り検査における希釈液量の比較

拭き取り検査においては、希釈液の量を減らすことでCP値を28.3から27.8に減らすことができた。すなわち、ウイルス量が多く検出でき、有用であると示唆された(図4)。

(第1報), 福井県衛生環境研究センター年報, 7, 69~72 (2008)

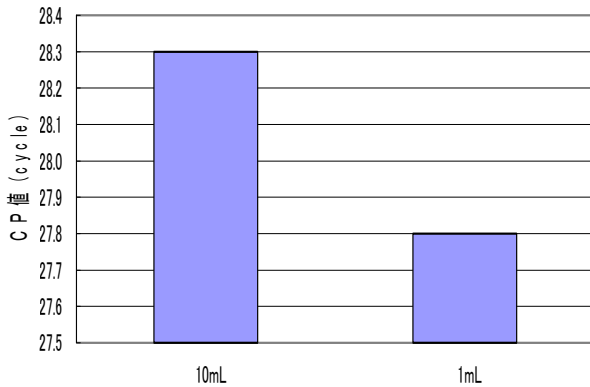


図4 希釈液量の違いによるCP値

4 まとめ

- 1) 前処理に腐敗細菌を添加したことにより、夾雑物が除去され、ウイルス量の検出率を上げることができた。
- 2) エタノール沈殿法を加えることにより、食品によっては遺伝子が濃縮され、良好な結果を得ることができた。
- 3) 拭き取り検査用容器の希釈液量が少ない程、ウイルスの検出量が多くなることが確認できた。
- 4) 今後も、短時間で検査できる新たな夾雑物除去法や、遺伝子濃縮法等の検討について更に継続していく必要があるため、現在研究が進んでいるパンソルビン・トラップ法³⁾を当センターにおいても検討を行い、食中毒原因食品からの迅速な検査法を確立できるよう努めていきたい。

参考文献

- 1) 上村晃秀, 上野伸広, 他; 食中毒原因食品からのノロウイルス遺伝子検査法の確立 (第I報), 本誌, 10, 52~54 (2009)
- 2) 秋場哲哉, 田中達也, 他; 細菌添加培養処理によるカキなどからのノロウイルス検出率の向上, 食衛誌, 49 (6), 407~410 (2008)
- 3) 東方美保, 川畑光政, 他; パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収検討