

# アミラーゼを用いたカキからのノロウイルス濃縮法の検討

## A New method using Amylase to recover Norovirus from Oysters

庄司 美加 植木 洋 佐藤千鶴子\*<sup>1</sup>  
佐藤 由紀 沖村 容子 上村 弘  
齋藤 紀行\*<sup>2</sup>

Mika SHOJI, Yo UEKI, Chizuko SATO  
Yuki SATO, Yoko OKIMURA, Hiroshi UEMURA  
Noriyuki SAITO

カキからの Norovirus (NoV) 抽出法である破碎法に、前処理としてアミラーゼ (AM) 処理を加え、NoV の抽出効果についてカキ 1g 当たりの copy 数の平均値や検定を用いて検討した。その結果、抽出された NoV 遺伝子数は AM 処理群が非処理群と比較して数値が高かった。さらに、Mann-Whitney の *U* 検定を用いた統計的解析でも 2 群間に有意差が認められ、AM 法がカキからのウイルス濃縮法として有効であることが明らかとなった。

キーワード： $\alpha$ -アミラーゼ；カキ；ノロウイルス

**Key words** :  $\alpha$ -amylase ; oysters ; Norovirus

### 1 はじめに

カキ生産県である本県では、安全なカキを提供するため NoV について様々な対策が取られている。その一つとしてカキからの迅速で高感度な NoV 検出法の開発に取り組んでいる。

カキからの NoV 遺伝子の検出法は、ウイルスの濃縮の工程と、濃縮したウイルスから遺伝子を抽出し、増幅する工程に大きく分けられる。後者の工程については定量 PCR 法など方法が確立されているのに対し、前者は多くの方法が報告されている。特に養殖カキを対象とした NoV 遺伝子検査では、カキに取り込まれているウイルス量は少量であることが多いため検出に困難を要する。

一方 NoV は、10 個～100 個程度でヒトに対して感染が成立することが報告されており<sup>1)</sup>、少量のウイルスを確実に検出することは重要である。

これまでに我々は、カキからの NoV 濃縮法の一つとして細胞破碎法<sup>2)</sup>を開発した。この方法は公定法である超遠心法<sup>3)</sup>と比較すると、短時間で多検体の処理が可能であり、濃縮効果も高いことを確認している。今回、さらに濃縮効果の向上を目的に、細胞破碎法に野田<sup>4)</sup>らが開発した AM 処理を加え、カキからのウイルス濃縮法について検討したので報告する。

### 2 方法

#### 2.1 対象材料

2007 年 10 月下旬より、下水処理施設が処理水を放流している県内 S 川にカキを垂下し、2007 年 11 月、12 月

にそれぞれ 1 回、2008 年 1 月に 2 回、計 4 回、合計 77 個体をサンプリングした。

#### 2.2 NoV の濃縮

カキは採取後、ただちに 1 個体ずつ中腸腺を摘出し、中腸腺を  $\phi$  3.2mm ステンレスビーズ入りの 5ml アシストチューブに入れ、AM 処理群は 1 個体に対し  $\alpha$ -アミラーゼ (枯草菌由来、和光純薬) 2.5mg/ml 加 DW を作製し 1ml 加えた。また対照 (AM 非処理群) は DW のみ 1ml 加えたものとした。その後、AM 処理群、非処理群とも 37℃ 2 時間静置し、細胞破碎装置 Micro Smash<sup>TM</sup> (TOMY) を用いて 4,500rpm60 秒間破碎後、9,200 × g 10 分間遠心し、上清をウイルス濃縮液とした。

#### 2.3 ウイルス抽出・定量

ウイルス濃縮液 140 $\mu$ l を QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) により RNA を抽出し、DNase I (Invitrogen) で処理後、Super Script II (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行った。その後、cDNA は、影山ら<sup>5)</sup>の方法で PRISM7900 (Applied Biosystems) を用いて定量 PCR 法を実施した。

### 3 結果および考察

#### 3.1 AM 処理の有無による平均値の比較

AM 処理と非処理について、サンプリング毎の中腸腺 1g 当たりの NoV 遺伝子数の平均値を図 1 に示す。AM 処理群と非処理群の平均値は、11 月は処理群 (n=5) 832 copies, 非処理群 (n=4) 514copies, 12 月は処理群 (n=8) 4,454copies, 非処理群 (n=8) 856copies, 1 月 1 回目は処理群 (n=18) 6,807copies, 非処理群 (n=18) 5,362copies, 1 月 2 回目は処理群 (n=8) 5,616copies, 非処理群 (n=8) 4,831copies であった。各月とも AM 処理群が非処理群と比較して、高い値が確認された。

\* 1 現 拓桃医療療育センター

\* 2 現 東北生活文化大学

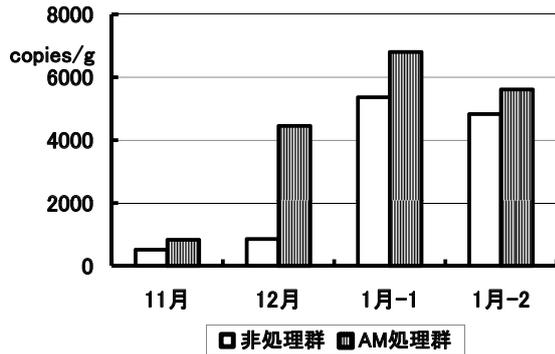


図1 サンプルング毎のAM処理の有無によるNoV遺伝子数の比較

次に、AM処理群 (n=38)、非処理群 (n=39) 全体の場合について検討した。その結果を図2に示す。AM処理の有無による中腸腺1g当たりのNoV遺伝子数の平均値はAM処理群で5,432copies、非処理群は3,707copiesでありAM処理群の方が高い値を示した。

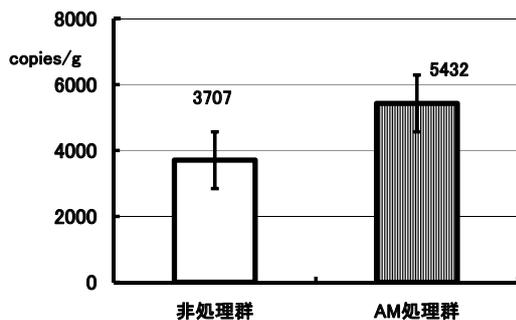


図2 サンプル全体でのAM処理の有無によるNoV遺伝子数の比較

さらに遺伝子群別にAM処理効果について調べた結果を図3に示す。同様にGI群ではAM処理群で中腸腺1gあたり4,519copies、非処理群で3,195copies、GII群ではAM処理群で913copies、非処理群で512copiesであった。平均値で比較すると全体ではAM処理群が非処理群に対し、1.5倍の値であった。遺伝子群別で見るとGI群で約1.4倍、GII群で約1.8倍の値だった。

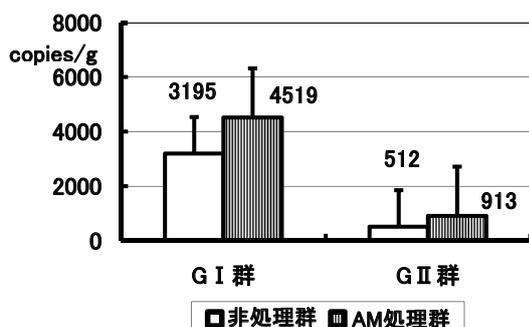


図3 遺伝子型別でのAM処理の有無によるNoV遺伝子数の比較

### 3.2 Mann-WhitneyのU検定

AM処理の有効性をMann-WhitneyのU検定を用いて検討した。AM処理効果について帰無仮説： $H_0$  AM処理と非処理ではカキからのNoV遺伝子の濃縮に差がないと仮定した。その結果、 $p=0.055$ で帰無仮説 $H_0$ は棄却され、対立仮説が採択された。すなわちAM処理は有効であることが確認された。遺伝子群別にみるとGI群では $p=0.10$ で差が認められなかったが、GII群では $p<0.01$ でAM処理は有効と確認された。GI群についてAM処理効果が確認されなかったが、野田らによると公定法であるポリエチレングリコール法によるウイルス濃縮法との併用ではGI群、GII群ともにAM処理が有効であったと報告している<sup>4)</sup>。

一般に、カキを対象としたNoV遺伝子検出検査においてはグリコーゲンを多く含む白色部分に含まれた中腸腺をハサミで取り出すことが多い。グリコーゲンは定量PCR法に負の影響があると言われているが白色部分を完全に除去することは不可能である。グリコーゲンは多数の $\alpha$ -D-グルコース分子がグリコシド結合した高分子であるが、アミラーゼ処理をすることで $\alpha$ -1,4-結合を切断し加水分解させ、白色部分を除去することが可能である。この化学的処理が我々の実験でも有効であることが確認された。今回はAM処理を2時間と設定したが、今後は反応時間の短縮、適正な温度やpHの問題も含めて検討していく必要がある。

### 4 まとめ

今回、我々が用いている簡易で迅速性に優れている破碎法にAM処理を加えることで、濃縮効率が高くなることが確認された。今後、AM処理の設定について追加実験をしていくことで、カキからのNoV濃縮効果が高まることが期待されると考える。

### 参考文献

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Norwalk-like viruses. Public health consequences and outbreak management. 2001. Morb. Mortal. Wkly. Rep.50 (RR09) : 1-18
- Yo UEKI, Daisuke S, Toru W, Kazuo A, Tatsuo O. : Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. Water Reserch 39 4721-4280(2005)
- 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知 “ノロウイルスの検出法について” 平成15年11月5日, 食安監発 1105001号 (2003)
- 野田衛, 西尾治, 山本美和子, 伊藤文明, 池田義文, 松本勝, 萩野武雄: 混合カキ検体からのノロウイルス濃縮操作におけるアミラーゼ処理の有用性: 広島市衛研年報 25 35-43 (2006)
- kageyama.S, Kojima.M, Shinohara.K, Uchida.S, Fukushi.F, B.Hoshino, N.Takeda, K.Katayama : *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1548 (2003)