

# 酵素を用いたカキからのノロウイルス抽出法の検討

## Study on enzymatic method for Norovirus from oysters

菅原 直子 木村 俊介\*<sup>1</sup> 鈴木 優子\*<sup>2</sup> 佐々木 美江  
植木 洋 渡邊 節 三浦 尚之\*<sup>3</sup> 真砂 佳史\*<sup>4</sup>  
沖村 容子\*<sup>3</sup> 大村 達夫\*<sup>3</sup> 野田 衛\*<sup>5</sup>

Naoko SUGAWARA, Shunsuke KIMURA, Yuko SUZUKI, Mie SASAKI  
Yo UEKI, Setsu WATANABE, Naoyuki MIURA, Yoshifumi MASAGO  
Yoko OKIMURA, Tatsuo OMURA, Mamoru NODA

リアルタイム PCR 法によるかきのノロウイルス (NoV) 検査について、カキ中腸腺からの NoV 抽出に用いる細胞破砕法の最適化の検討と、細胞破砕法と酵素処理を組み合わせた方法の抽出効果を比較した。破砕条件については 4,500rpm・60 秒で破砕を行う方法 (従来法) で抽出を行った場合の NoV 遺伝子の検出率は 20%であったのに対し、3,500rpm・15 秒で抽出を行った場合は 60%と高い検出率を示した。また、従来法の細胞破砕後に proteinaseK (PK) 及び  $\alpha$ -Amylase (AM) の 2 種の酵素処理をそれぞれ組み合わせるウイルス抽出を行った結果、中腸腺 1g あたりの遺伝子数は AM 処理が最も高く、1,900~28,000 コピー、次いで PK 処理が 0~8,000 コピー、従来法の 200~3,000 コピーの順となり、カキ中腸腺からのウイルス抽出は、AMによる酵素処理を加えた細胞破砕法による抽出効果が最も高かった。

キーワード：カキ；細胞破砕法； $\alpha$ -アミラーゼ

key words : oysters ; digestive tissue homogenization ;  $\alpha$ -Amylase

### 1 はじめに

厚生労働省の食中毒統計調査によると、ノロウイルス (以下「NoV」) による食中毒事例の原因物質として、貝類が約1割を占めている。なかでも生食の機会が多いカキはNoV食中毒の主要な原因食品の一つとされている。

食品中からのNoV検出法は厚生労働省通知法<sup>1)</sup> (以下「通知法」) で超遠心法やポリエチレングリコール法が採用されているが、多検体処理が難しいことや食品中に含まれるウイルス量が少ないことなどからも、精度の高いウイルス抽出法の確立が求められている。

このことから、我々は通知法の超遠心法と同等以上の効果が確認され、かつ短時間で多検体の処理が可能な細胞破砕法 (以下「破砕法」) によるカキ中腸腺からのウイルス抽出法<sup>2)</sup>を確立し、現在カキのNoV検査法に採用している (図1)。

カキからのウイルスの検出の際には、カキ由来の有機物により、核酸の検出が阻害され<sup>3,4)</sup>、特にカキ中腸腺からのウイルス粒子の放出とRNA抽出時における阻害作用により、実際よりも過小評価されるとの報告がある<sup>5)</sup>。

また、破砕法は破砕機で使用するローターによりチューブ容量が制限され、中腸腺乳剤濃度が50%以上になることが多く、遠心処理後の上清にウイルスが遊離されにくくなる。

これらのカキからウイルス抽出の際に生じる問題点を解決するために破砕法の破砕条件の最適化と、近年国内外で報告のある酵素を用いたカキからのウイルス抽出について、破砕法と組み合わせ検討した。

### 2 材料および方法

#### 2.1 材料

平成 25 年 3 月及び平成 26 年 2 月に県内の同一海域で採取した畜養カキの各個体より無菌的に中腸腺を切り出し使用した。なお、同一実験区分で抽出の比較を行う際には、NoV 汚染が均一のカキを用いるようにするために同一日に同一海域で採取したカキを材料とした。

#### 2.2 方法

##### 2.2.1 破砕条件の検討

中腸腺はあらかじめ直径 3mm のステンレスビーズを入れた 5mL 容量の破砕用チューブに入れ、滅菌蒸留水 (以下 DDW ニッポンジーン) 2mL を加え、細胞破砕機 (Micro Smash SM-100 TOMY) で破砕した。中腸腺の破砕条件は A (従来法):4,500rpm・60 秒、B:4,500rpm・30 秒、C:4,500rpm・15 秒、D:3,500rpm・15

\*1 現 仙台保健福祉事務所黒川支所

\*2 現 仙台保健福祉事務所

\*3 東北大学未来科学技術共同研究センター

\*4 国際連合大学サステイナビリティ高等研究所

\*5 国立医薬品食品衛生研究所

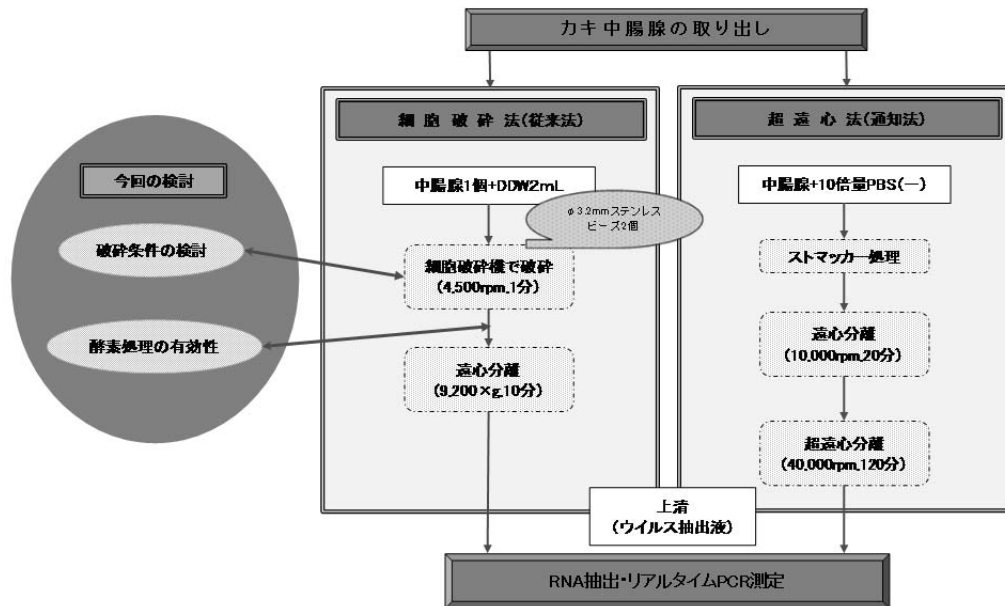


図1 細胞破砕法の検査フロー

秒の4条件とし、破砕後、 $9,200 \times g$  で10分間遠心した。上清から、通知法に基づきRNA抽出を行い、NoV遺伝子をリアルタイムPCRで測定、各破砕条件でのNoV遺伝子検出率を比較することにより、最適破砕条件を検討した。

今回の検討では、リアルタイムPCR測定で増幅曲線が一定の増幅産物が得られるまでのサイクル数 (thresholds cycle: Ct値) を超えた検体をNoV遺伝子陽性と判定した。

## 2.2.2 破砕液の検討と酵素処理

2.2.1で検出率が高かった破砕条件で、PBS (pH7.0, 和光純薬), proteinaseK液 (以下「PK」), (30units/mL, Roche) および  $\alpha$ -Amylase液 (以下「AM」), (6.3mg/mL, 和光純薬) 各2mLを破砕用乳剤作製液とし、中腸腺を破砕した後、恒温水槽で振とう加温し、方法1と同様にRNA抽出、NoV遺伝子を測定し、それぞれの破砕液での検出率及び検出遺伝子数を比較した。

なお酵素反応条件は、PKは $37^{\circ}\text{C}$ 60分後 $60^{\circ}\text{C}$ 15分の加温、AMは $37^{\circ}\text{C}$ 60分とした。加えて、酵素処理時間の短縮を目的として、AM液を使用し、反応時間を30分および15分として、同様にNoV遺伝子を測定、検出遺伝子数を比較した。

## 3 結果

### 3.1 破砕条件の検討

DDWで抽出した場合、条件D ( $3,500\text{rpm} \cdot 15$ 秒)の検出率が60%と最も高く、低速・短時間で破砕した群ほど検出率が高い傾向を示した。(図2)

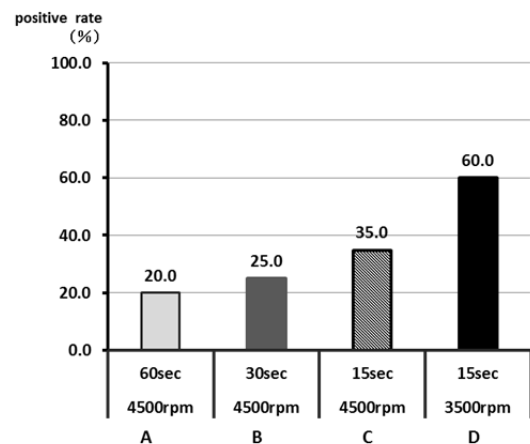


図2 破砕条件の違いによる検出率(n=20)

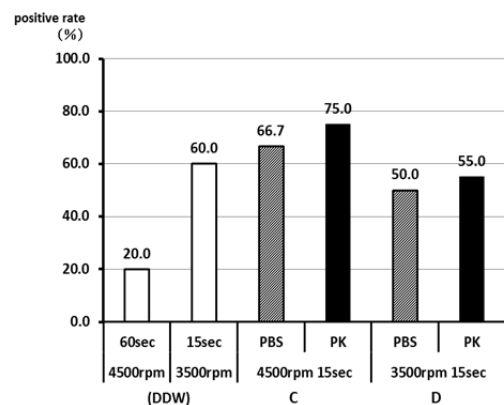


図3 破砕条件と破砕液の違いによる検出率(n=20)

### 3.2 破砕液に PK 液と PBS を用いた場合の比較

DDW 抽出で最も検出率が高かった条件 D (3,500rpm・15 秒) と次に高かった条件 C (4,500rpm・15 秒) について、破砕液に PBS と PK 液を用いた場合の NoV 遺伝子検出率を比較した。どちらの破砕液を用いた場合においても、条件 C の検出率が高く、それぞれ 67%、75%であった。条件 D の検出率は 3,500rpm・15 秒の条件下での DDW 抽出とほぼ同程度であった。(図 3)

### 3.3 破砕液に AM 液と PK 液を用いた場合の比較

条件 C(4,500rpm・15 秒)で破砕後に PK 及び AM の酵素処理を行い抽出した方法で検出された NoV 遺伝子数 (GII 群) を比較した結果、AM 液を使用した方法が最も多い傾向を示した (図 4)。

また、AM 液を使用した方法と他の方法で抽出した NoV 遺伝子の定量値について Mann-Whitney の U 検定を行ったところ、有意水準 1% ( $p < 0.01$ ) 帰無仮説は棄却され有意差が認められた。

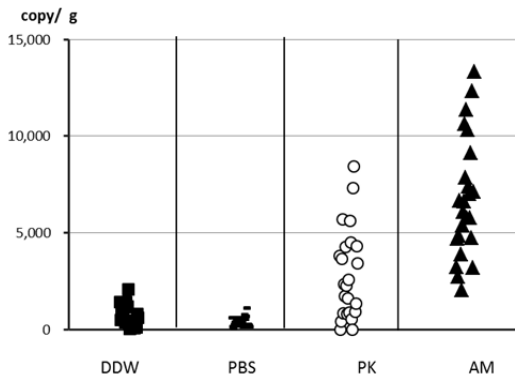


図 4 破砕液の違いによる NoV GIIGII 群遺伝子数 (n=24)

さらに、AM 液を使用した方法と他の方法で酵素処理時間の短縮について検討した結果、酵素処理時間の短縮に伴い、検出される遺伝子数の顕著な減少が認められた。(図 5)

## 4 考 察

破砕法で破砕液として DDW を使用した場合は、従来法より低速・短時間の条件で処理した群の NoV 遺伝子の検出率が高かった。これは、従来法では中腸腺組織がより細かく破砕され組織が RNA 抽出カラムに詰まり、抽出に影響した可能性が推測された。今回の結果より DDW 抽出では、3,500rpm・15 秒での破砕が最適条件と考えられた。

酵素と破砕法を組み合わせた抽出方法の検討では、AM 液を破砕液として 4,500rpm・15 秒で破砕後に、37°C・60 分間の消化で抽出を行った群の定量値が他の群よりも高い定量値を示し有意差が確認された。カキからの NoV 抽出の際にはグリコーゲンなどの多糖類が阻害

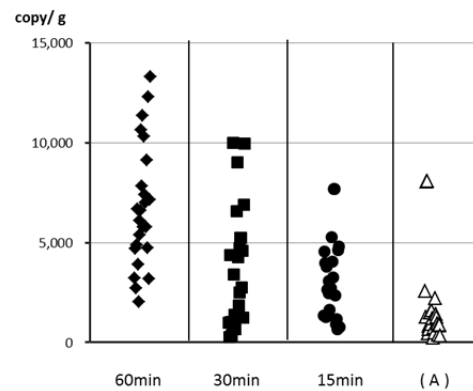


図 5  $\alpha$ -Amylase 処理での処理時間と検出された NoVGIIGII 群遺伝子数 (n=24)

物質として働くことが知られており<sup>6)</sup>、AM の作用でこれらが分解され、その結果、抽出阻害が抑制され、効果的にウイルスが抽出できたと考えられた。

一方、ISO で二枚貝からのウイルス抽出に採用している PK 処理に破砕法を組み合わせた抽出は、破砕液に DDW と PBS を用いた場合よりも、NoV 遺伝子の検出率は高い傾向を示した。しかし、定量値を比較すると AM 処理での抽出よりも低い値となった。酵素処理では、DDW を用いた時とは逆に、中腸腺組織をより細かく破砕することにより酵素処理の効果が高まり、さらに PK 処理の場合には、抽出を阻害する蛋白質の分解やヌクレアーゼ活性の失活などが影響している可能性が推定された。

さらに、AM 処理での時間短縮については、処理時間の短縮に伴い、検出される遺伝子数の減少が認められ、カキ中腸腺からのウイルス抽出を行う場合には少なくとも 60 分間の消化時間は必要であると考えられた。

今回の検討により、カキ中腸腺からのウイルス抽出時の最適な破砕条件の設定と酵素処理の有用性を確認することができた。すなわち本研究では、AM 液を使用しカキ中腸腺を 4,500rpm・15 秒で破砕後、37°C・60 分間の加温による酵素処理を行うことが抽出条件として最適であることが確認された。

カキの NoV 汚染を正確に把握する上で、AM 法を用いた細胞破砕法は非常に有効であり、今後カキの NoV 汚染実態の把握や浄化効果の評価を行う上でも非常に有用であると考えられる。

## 参考文献

- 1) 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 1105001 号 (2003)
- 2) 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 Research*, 39, 4721-4280(2005)
- 3) Costafreda M.I., Bosch A. and Pinto R.M.:  
Development, Evaluation, and Standardization of a Real-Time TaqMan Reverse Transcription PCR Assay for Quantification of Hepatitis A Virus in Clinical and Shellfish Samples, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, No.6, 3846-3855(2006)
  - 4) Atmar R.L., Neill F.H., Romalde J.L., Guyader F.L., Woodley C.M., Metcalf T.G. and Estes M.K.:  
Detection of Norwalk Virus and Hepatitis A Virus in Shellfish Tissues with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, No.8, 3014-3018(1995).
  - 5) 奥村千恵, 真砂佳史, 佐野大輔, 植木洋, 大村達夫:  
Enzymatic Virus Elution 法によるカキ中腸腺からのウイルス誘出技術の開発. *環境工学論文集*, 45, 179-186(2008)
  - 6) 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. *広島市衛生研究所年報*, 25, 35-43(2006)