

酵素を用いたカキからのノロウイルス濃縮法の検討

Recovery of *Norovirus* from oysters utilizing enzymatic digestion

高橋 由理 阿部 美和 植木 洋
佐藤 由紀 菅原 優子 沖村 容子
野田 衛*1 真砂 佳史*2 大村 達夫*2

Yuri TAKAHASHI, Miwa ABE, Yo UEKI
Yuki SATO, Yuko SUGAWARA, Yoko OKIMURA
Mamoru NODA, Yoshifumi MASAGO, Tatsuo OMURA

カキを対象としたノロウイルス (NoV) 検査では、カキ中腸腺やその周辺に付着しているグリコーゲンや脂肪などが、ウイルス濃縮や RNA 抽出を阻害すると報告されており、遺伝子の定量結果が過小評価されることがある。そこで、我々は高感度な NoV 検出法の開発を目的として、ウイルス濃縮行程において α -アミラーゼ (AM), リパーゼ (LP), パンクレリパーゼ (PL) を用いた酵素による消化及び乳剤調製用緩衝液の pH の違いによる NoV 遺伝子検出効果の比較検討を行った。その結果、AM によるカキ中腸腺の酵素処理と、従来のポリエチレングリコール (PEG) 濃縮法を組み合わせた系が他の系と比較し NoV 遺伝子の検出率、検出値 (実測値) 共に良好な結果が認められた。一方、LP 及び PL 処理群の検出率は酵素処理を行わなかった系よりも低かった。

キーワード：ノロウイルス； α -アミラーゼ；リパーゼ；パンクレリパーゼ；カキ

Key words: Norovirus; α -amylase; Lipase; Pancrelipase; oyster

1 はじめに

2009 年度生食用カキが原因と推定される食中毒が、宮城県をはじめ全国的に増加した。当センターでは、2003 年 11 月に定量 PCR によるノロウイルス (NoV) 遺伝子検出が公定法に追加されて以来、同法で市販生食用カキを対象に NoV 遺伝子検出検査を行っている。

公定法である定量 PCR 法では実測値 10 コピーを超える、すなわちカキ 1 個あたりのウイルス量が 214 個以上存在する場合を陽性と判定する。また NoV は、10~100 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いる。これらのことから、定量 PCR 検査において陰性とされたカキであっても、健康被害を起こす可能性が危惧される²⁾。NoV 遺伝子の検出感度を向上させることは、カキを原因とする食中毒のリスクを低減させる上で重要である。

カキを対象とした NoV 検査では、カキ中腸腺に含まれるグリコーゲン及び脂肪などが、ウイルス濃縮や RNA 抽出を阻害すると報告されている。野田ら³⁾は α -アミラーゼ (AM) を用いてカキからのウイルス濃縮を行い、従来法よりも濃縮効果が高かったことを報告している。一方、奥村ら⁴⁾はリパーゼ (LP) に着目し、LP を用いた濃縮がその他の酵素よりも効果があったことを確認している。今回、我々は高感度な NoV 検出法の開発を目的として、ウイルス濃縮行程において、AM と LP さらにパンクレリパーゼ (PL) も加えて、カキ中腸腺からのウイルス濃縮を検討したので報告する。

2 対象および検査方法

2.1 対象

他県産冷凍カキ 69 個 (ロット 1: 35 個, ロット 2: 34 個) 及び県内産加熱用カキ 40 個を使用した。

2.2 試薬

2.2.1 酵素の違いによる比較

糖質を分解する AM (枯草菌由来, 20units/mg 以上, 和光純薬), 脂質を分解する LP (ブタ膵臓由来, 25.9USP units/mg, 和光純薬) 及び糖質, たん白質, 脂質を分解する PL (ブタ膵臓由来, 和光純薬) を用いた。PL はアミラーゼ, リパーゼ, プロテアーゼを含有する酵素であり, 各々の酵素活性はアミラーゼ: 100units/mg, リパーゼ: 24units/mg, プロテアーゼ: 100units/mg である。

2.2.2 乳剤調製用緩衝液の pH の違いによる比較

AM の至適 pH7.45 リン酸緩衝液, LP と PL の至適 pH9.0 グリシン緩衝液を作製し, それぞれの緩衝液と供試酵素を加え比較検討した。

2.3 操作

カキは 1 個体ずつ無菌的にハサミで中腸腺を摘出し, 中腸腺 2 個を 1 検体とした。検体重量の 9 倍量の緩衝液を加え, ストマッキングにより 10% 乳剤を作製した。AM は 2.5mg/ml, LP と PL は 10mg/ml となるように酵素を添加した。37°C, 1 時間消化後, 8,000×g, 20 分遠心した上清を分取し, ポリエチレングリコール (PEG) と NaCl をそれぞれ最終濃度 0.12g/ml, 0.058g/ml となるように加え完全に溶解させた。次に, 8,000×g, 30

*1 国立医薬品食品衛生研究所

*2 東北大学大学院工学研究科

分遠心分離後、沈渣を 400 μ l の 0.5% Zwittergent で再浮遊させ RNA 抽出材料とした。遺伝子検査は、公定法に従い定量 PCR 法により行った。すなわち、1 検体に付き G1 群 2 穴、G2 群 2 穴を用いて定量を行った。

3 結果および考察

3.1 他県産冷凍カキ

表 1-1 に他県産冷凍カキの NoV 遺伝子検出結果を、表 1-2 にカキ中腸腺 1g あたりの NoV 遺伝子数を示した。乳剤調製用緩衝液は、pH9.0 グリシン緩衝液及び AM 処理においてのみ pH7.45 リン酸緩衝液を使用した。網掛けは、2 穴共に遺伝子が検出されたことを示す。

AM 処理では、ロット 1 及び 2 において 13 件中 NoV 遺伝子 G1 群が 5 件(38%)、G2 群が 5 件(38%)検出された。

緩衝液の pH の違いによる比較では、pH9.0 グリシン緩衝液で 8 件中 G1 群が 3 件(38%)、G2 群が 2 件(25%)、pH7.45 リン酸緩衝液 5 件中 G1 群が 2 件(40%)、G2 群が 3 件(60%) 検出された。また、pH7.45 においては 2 穴共に遺伝子が検出された検体が 2 件あった。

酵素非処理、LP 処理、PL 処理では NoV 遺伝子が検出されなかった。

表 1-1 NoV 遺伝子検出結果 (実測値)

ロット	検体番号	pH	酵素処理なし (copies/ μ l)		AM処理 (copies/ μ l)		LP処理 (copies/ μ l)		PL処理 (copies/ μ l)	
			G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
			1	2	9.0	-	-	0.52	1.5	-
1	3	9.0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	4	9.0	-	-	0.53	-	-	-	-	-
1	5	7.45			-	-				
1	6	7.45			0.58	1.1				
1	7	7.45			-	0.24				
2	1	9.0	-	-	-	-	-	-	-	-
2	2	9.0	-	-	-	-	-	-	-	-
2	3	9.0	-	-	0.43	1.2	-	-	-	-
2	4	9.0	-	-	-	-	-	-	-	-
2	5	7.45			-	0.36				
2	6	7.45			0.46	-				

表 1-2 中腸腺 1g あたりの NoV 遺伝子数

ロット	検体番号	pH	酵素処理なし (copies/g)		AM処理 (copies/g)		LP処理 (copies/g)		PL処理 (copies/g)	
			G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
			1	2	9.0	-	-	63	183	-
1	3	9.0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	4	9.0	-	-	68	-	-	-	-	-
1	5	7.45			-	-				
1	6	7.45			88	167				
1	7	7.45			-	36				
2	1	9.0	-	-	-	-	-	-	-	-
2	2	9.0	-	-	-	-	-	-	-	-
2	3	9.0	-	-	53	149	-	-	-	-
2	4	9.0	-	-	-	-	-	-	-	-
2	5	7.45			-	53				
2	6	7.45			69	-				

3.2 県内産加熱用カキ

表 2-1 に県内産加熱用カキの NoV 遺伝子検出結果を示した。網掛けは 2 穴共に遺伝子が検出されたことを示す。乳剤調製用緩衝液は pH7.45 リン酸緩衝液を使用した。AM 処理では、NoV 遺伝子 G1 群は 5 件中 2 件(40%)、G2 群が 5 件(100%)全てで検出された。酵素非処理では、NoV 遺伝子 G1 群は 5 件とも検出されなかったが、G2

群は AM 処理と同様 5 件 (100%) 全てで検出された。

LP 処理、PL 処理では G1 群遺伝子は検出されなかったが、LP 処理では 5 件中 1 件 (20%) から G2 群が検出された。

表 2-1 NoV 遺伝子検出結果 (実測値)

検体番号	pH	酵素処理なし (copies/ μ l)		AM処理 (copies/ μ l)		LP処理 (copies/ μ l)		PL処理 (copies/ μ l)	
		G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
		1	7.45	-	3.7	-	19	-	-
2	7.45	-	1.6	-	13	-	-	-	-
3	7.45	-	2.8	-	17	-	-	-	-
4	7.45	-	1.3	13	30	-	0.77	-	-
5	7.45	-	1.2	15	23	-	-	-	-

さらに、表 2-2 にカキ中腸腺 1g あたりの NoV 遺伝子数を示した。G2 群において、酵素非処理で中腸腺 1g あたりの平均遺伝子数は 248 コピー、AM 処理で 2496 コピーであった。平均値で比較すると AM 処理が酵素非処理に対して約 10 倍の値であった。

表 2-2 中腸腺 1g あたりの NoV 遺伝子数

検体番号	pH	酵素処理なし (copies/g)		AM処理 (copies/g)		LP処理 (copies/g)		PL処理 (copies/g)	
		G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
		1	7.45	-	436	-	2278	-	-
2	7.45	-	178	-	1615	-	-	-	-
3	7.45	-	318	-	2039	-	-	-	-
4	7.45	-	170	1642	3790	-	106	-	-
5	7.45	-	139	1799	2758	-	-	-	-

4 まとめ

今回の実験の結果、使用した緩衝液の pH に依存せず、NoV 遺伝子の検出率、検出値 (実測値) 共に AM 処理が最も高かった。一方、LP 処理、PL 処理は酵素非処理と比較しても検出率が低く、LP 処理、PL 処理が PEG による濃縮もしくは RNA 抽出にマイナスの影響を与えたことが示唆された。また、NoV 粒子はアルカリ側 pH 下において急速に粒子が崩壊するため、そのことが影響した可能性が考えられる。

一方、奥村ら⁴⁾は pH4.4 酢酸緩衝液を使用し LP 処理を行ったところ、カキからのウイルス濃縮に効果的であったこと、及び pH4.4 酢酸緩衝液を使用した場合、非酵素処理でも良好なウイルス回収率が得られたことを報告している。特に受精放卵期の夏季に向けて脂肪が蓄積傾向にある春季のカキでは、効果が高いことを確認している。

今回の実験では、AM 処理と LP 処理及び PL 処理の間に、顕著な検出率の差が出たことについては不明である。今後これらの原因を解明し、検出感度の向上に繋げたい。

5 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、

食安監発 1105001号 (2003)

- 2) 食品安全委員会：食品健康影響評価のためのリスクプロファイル及び今後の課題～食品中のノロウイルス～，(2010)
- 3) 野田衛，岡本玲子，有田知子，伊藤文明，池田義文，西尾治：第55回日本ウイルス学会学術集会抄録，161 (2007)
- 4) 奥村千恵，真砂佳史，佐野大輔，植木洋，大村達夫：環境工学研究論文集，45，179-186 (2008)