

## 第27回麻布環境科学研究会 一般講演3

## ふきとり材料からのノロウイルス検出に関する検討

森 功次

東京都健康安全研究センター微生物部

## 1. はじめに

現在、食中毒発生時におけるふきとり検体からの病原体検索は、調理施設や調理従事者手指などの汚染状況の確認や感染経路の推定のため、主として細菌検査で広く実施されている。近年のノロウイルス (Norovirus: NV) による集団胃腸炎の割合が増加している背景から、ふきとり材料からのウイルスの回収・濃縮法について検討を行った。

## 2. 材料および方法

供試ウイルス：NVの代替指標として同じカリシウイルス科に属するネコカリシウイルス (Feline Calicivirus: FCV) F9株を含むウイルス液を試料として用いた。

被検材料の調整とふきとり方法：樹脂製のまな板 25 cm<sup>2</sup>にウイルス液  $1.58 \times 10^{10}$  TCID<sub>50</sub>/100 μl を 100 μl 塗布し、室温に 60 分間放置した。次いで、ふきとり棒によるふきとりを 30 秒間行い、内溶液 20 ml とともにボルテックススミキサーで 1 分振とう後、内溶液を回収した。

ふきとり後のウイルスの定量：回収液を Proteinase K および CTAB を用いて RNA を抽出し、逆転写反応後 FCV の polymerase 領域に設定した realtime-PCR 法によりウイルス遺伝子量を定量した。

## 3. 結果および考察

容器内溶液の安定性の検討：通常使用されている PBS (-) のほかに、1% FCS 加 MEM 培地、1.6% beef extract、ホウ酸緩衝液 (pH9)、0.1% tween20 加 PBS (-) 各 20 ml をふきとり容器内溶液とし、ふき

とり操作後、温室および 4℃ で 0, 3, 6, 24 時間経過後のウイルス量の変化を比較したところ、容器内溶液による測定値に有意差はみられなかった。

通常のふきとりによる検出限界：前記の FCV ウイルス液を 10<sup>2</sup> ~ 10<sup>8</sup> 倍に段階希釈し、各 100 μl を樹脂製のまな板 25 cm<sup>2</sup> に塗布および放置後、PBS (-) および 0.1% tween20 加 PBS (-) 容器内溶液によるふきとりを実施し、回収液のうち 100 μl からウイルス回収を試みた。その結果、ウイルスが検出可能であったのは 10<sup>3</sup> 倍希釈 ( $1.58 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/25 cm<sup>2</sup>) までであり、それ以上の希釈段階では検出できなかった。濃縮効果の検討：直接ウイルスが検出できなかった 10<sup>4</sup> ~ 10<sup>8</sup> 倍希釈段階のふきとり回収液 20 ml を用い、1) 27000 rpm, 3 時間の超遠心、2) 塩濃度を 8% PEG, 0.4M NaCl とした凝集、および 3) 限外ろ過膜 (Centricon Plus-20) の 3 法による濃縮を試みた。内溶液が PBS (-) の場合、超遠心および PEG で 10<sup>6</sup> 倍、限外ろ過膜で 10<sup>7</sup> 倍希釈まで検出できた。一方、0.1% tween20 加 PBS (-) の場合は、超遠心で 10<sup>6</sup> 倍、PEG で 10<sup>4</sup> 倍、限外ろ過膜で 10<sup>8</sup> 倍 ( $1.58 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/25 cm<sup>2</sup>) まで検出でき、限外ろ過膜を組み合わせる方法が他の濃縮方法と比較して濃縮効率が低い傾向がみられた。

以上の結果から、現在、細菌検査で実施されているふきとり操作を日常ウイルス検査に導入可能であることが示唆されたと思われる。また、ふきとる対象によりウイルスの回収効果に差がみられる傾向から、対象の素材により除去効果が異なることが推察された。