

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

野田 衛 西尾 治^{*1} 山本美和子 伊藤 文明
池田 義文 松本 勝 荻野 武雄^{*2}

カキ混合検体からのノロウイルス(NV)濃縮操作におけるアミラーゼ(AM)によるグリコーゲンの消化の有用性を、AM消化を行わない場合およびカキを個別に検査する場合(個別法)と比較し検討した。AM消化は、ポリエチレングリコールによる沈殿操作時に、1混合検体当り50mgのAMを加え、スターラーで攪拌して室温にて一夜行い、他の工程はこれまで当所で実施しているカキ混合検体からの濃縮操作(混合法)に準じた(AM-混合法)。AM-混合法は他の2法と比較して、セカンドリアルタイムPCR法で高いNV検出率を示し、各濃縮法で得られたcDNA検体にG1陽性コントロールcDNAを添加してリアルタイムPCR法で定量した結果、検体のPCR阻害作用を受けにくく、添加量に近い定量値を示した。さらに、 >0 コピー/系を陽性としたリアルタイムPCR法の結果とセカンドリアルタイムPCR法の結果の一致率はAM-混合法が最も高かった。以上の結果から、AM-混合法は混合法、個別法と比較し、検体のPCR阻害作用が少なく実際のコピー数に近い定量値が得られ、検出率も高い上、従来の操作とほぼ同じ手順で実施できることから、カキ混合検体からのNV濃縮法として有用と考えられた。

キーワード： ノロウイルス，カキ，アミラーゼ処理，PCR法，定量PCR法

はじめに

ノロウイルス(NV)による食中毒および食中毒様胃腸炎集団発生はカキを原因食品とする事例が多くを占めることから、本ウイルスによる食中毒の予防にはカキの対策が極めて重要であり、そのためには、カキからの迅速・簡便・確実なNV検出・定量法の確立が前提となる。カキからのNV検出には現在nestedPCR法(定性PCR法)による定性遺伝子検査およびリアルタイムPCR法(定量PCR法)による定量的遺伝子検査が行われている¹⁾が、定性PCR法と定量PCR法との検査結果の乖離、前処理法の違いによる定量値のバラツキ、インヒビターによる定量値の信頼性、定量PCR法における陽性(陰性)限界値の問題など幾つかの問題点が指摘されている²⁾。これらに加え、厚生労働省のNV検査指針でカキの個別別の検査が推奨されている一方、同一ロットのカキのNV定量値に個体差があることから個別別の検査では検出率が低くロットの安全性確保ができない場合があり³⁾、複

数のカキを混合した検体からの簡便・確実な濃縮法の開発が望まれている。

一方、カキの検査には中腸腺の切り出しが行われるが、この操作はNVが含まれる中腸腺部分(黒色部分)のみを取り出す目的以外に、検体中に含まれるPCR阻害物質の混入を極力減らすために不要部分(白色部分)を物理的に取り除く目的を持っている。しかし、白色部分を完全に除去することは不可能であり、また、カキを混合した場合、その混入量が増加し定量PCR法による定量値への影響が多いと考えられている。この白色部分の主成分であるグリコーゲンは分子量100万~1000万の多糖類で、アミラーゼ(AM)によってオリゴ糖やデキストランに分解される。従って、AM消化により化学的にグリコーゲンを除去することで、濃縮検体の精製度が増加し、PCR阻害物質の混入が減少する可能性が考えられる。そこで今回我々はカキ混合検体からのNV濃縮操作におけるAMの有用性をAM処理を行わない場合およびカキを個別に検査する場合と比較した。その結果、AM処理を行うと検出率が増加するとともに、検体のPCR阻害作用が減少し定量値の信頼性が増加する

*1：国立感染症研究所

*2：退職

ことを認めたので報告する

方 法

1 供試カキ

カキ加工業者等から採取された原料用カキおよび NV の食中毒原因究明等のため搬入されたカキを検査材料とした。多くのカキ検体は保冷下で搬入され、直接検査に供した。一部のカキ検体は -30℃ 以下に凍結保存されたものを用いた。

2 カキ中腸腺からのウイルスの濃縮

(1) AM-混合法

1 検体について 10 個体程度のカキから中腸腺部分(10g~25g 程度)を切り出し、ストマッキングにより PBS(-)で 10%乳剤にした後、10,000rpm、30分、4℃ で遠心分離を行った。その遠心上清に 1/4 量の ×5 ポリエチレングルコール(PEG)溶液(40% PEG6000, 2.5M NaCl)と 50mg の AM(和光純薬)を添加し、室温にて一夜スターラーで攪拌し PEG による沈殿と AM による消化を行った。その後、3,000rpm、15分粗遠心分離を行った上清を 40%シヨ糖液 3ml に重層し、27,000rpm、3 時間、4℃ で超遠心分離を行い、沈渣を少量の蒸留水に再浮遊した。

なお、混合法との比較実験では中腸腺 10%乳剤の遠心分離後の上清を 2 等分し、個別法との比較実験では切り出した各中腸腺を 2 等分し、それぞれの試験に供した。

(2) 混合法

AM-混合法の PEG 沈殿操作において、AM の添加を行わず、4℃ で一夜静置したことを除き、すべて AM-混合法と同じ操作で実施した。

(3) 個別法

各カキから切り出した中腸腺の半分を個別別に検査した。1/2 量の中腸腺が 1g に満たない場合は 2 個体を混合し 1 検体とした。各中腸腺を PBS(-)10ml でストマッキングにより乳剤を作製し、10,000rpm、30分、4℃ で遠心分離を行った。その遠心上清を 40%シヨ糖液 3ml に重層し、27,000rpm、3 時間、4℃ で超遠心分離を行い、沈渣を少量の蒸留水に再浮遊した。

3 濃縮材料からのウイルス RNA 抽出と cDNA 合成

濃縮材料からのウイルス RNA 抽出・DNase 処理は、100 μl を抽出材料とし SV total RNA Isolation System(Promega)を用いて行った。Lysis buffer は 1 μg のキャリア RNA(Qiagen)を添加したものを使

用し、精製 RNA は 40 μl の溶出液に回収した。逆転写反応は厚生労働省の NV 検査指針¹⁾に準じ、精製 RNA 液 30 μl を Superscript (GibcoBRL)を用いて 50 μl の反応液量で 42℃、60 分反応し cDNA を合成した。プライマーはランダムヘキサマー(Amersham Pharmacia)と オリゴ dT(Amersham Pharmacia)を用いた。

4 NV 検出定量 PCR 法

NV 検出定量 PCR 法は cDNA 検体 5 μl を鋳型として Kageyama らの方法⁴⁾によるリアルタイム PCR 法で NV 遺伝子 1 群(G1)および NV 遺伝子 2 群(G2)に属するウイルスをそれぞれ特異的に増幅し、検出・定量した。すなわち、G1 は COG1F/COG1R のプライマー組と、RING1-TP(a)、RING1-TP(b)のプロープ、G2 は COG2F/COG2R のプライマー組と RING2AL-TP のプロープを用い、54℃、15 分の初期反応後、94℃、30 分、56℃、1 分のシャトル PCR 反応を 45 回繰り返した。定量値は原則として実測値(cDNA 検体 5 μl に含まれるコピー数)で示した。

5 NV 検出定性 PCR 法(セカンドリアルタイム PCR 法)

NV 検出定性 PCR 法は nested PCR 法の 2 回目の PCR 反応をリアルタイム PCR 法で検出するセカンドリアルタイム PCR 法⁵⁾で行った。すなわち、cDNA 検体 5 μl を鋳型として COG1F/G1SKR あるいは COG2F/G2SKR のプライマー組で ExTaqR(宝酒造)を用い PCR 反応(反応条件は、初期変性反応 95℃、5 分、PCR 反応 95℃、30 秒、50℃、30 秒、72℃、1 分を 35 回、最終伸長反応 72℃、10 分)を行った後、それぞれの PCR 産物 1 μl を鋳型 DNA として上述のリアルタイム PCR 法を行い、G1、G2 を特異的に検出した。

6 陽性コントロールおよび陽性コントロール添加実験

西尾によって作製された G1 あるいは G2 の NV 遺伝子挿入プラスミド(COG1F/G1SKR で増幅した G1 株 DNA 断片あるいは COG2F/G2SKR で増幅した G2 株 DNA 断片を TA クローニング法により導入したもの)を持つ大腸菌から、プラスミドを抽出し、OD 値からコピー数を算出後、DW で 10 倍階段希釈し、 10^8 コピー/5 μl ~ 10^0 コピー/5 μl の標準 DNA を得た(検量線は R = 0.99 以上)。定量 PCR 法には、 10^6 コピー/5 μl、 10^4 コピー/5 μl、 10^2 コピー/5 μl の希釈標準 DNA を逆転写反応液(逆転写酵素以外の試薬類を至適濃度含む緩衝液)

表1 アミラーゼ-混合法と混合法の比較

検体 番号	採取日	回収 液量 (μ l) *1	G1							G2						
			混合法				アミラーゼ-混合法			混合法		アミラーゼ- 混合法				
			2nd Real- Time PCR *2	定量 値 (A)*3	PC 添 加後 の定 量値 (B) *4	PC の 定量 値 (B-A)	2nd Real- Time PCR	定量 値(A)	PC 添 加後 の定 量値 (B)	PC の 定量 値 (B-A)	2nd Real- Time PCR	定量 値(A)	2nd Real- Time PCR	定量 値(A)		
1	05.03.01	400	-	NT*5	NT			+	NT	NT			-	NT	+	NT
2	05.03.01	400	-	NT	NT			-	NT	NT			-	NT	-	NT
3	05.03.01	400	-	NT	NT			-	NT	NT			-	NT	-	NT
4	05.03.01	400	-	NT	NT			-	NT	NT			-	NT	-	NT
5	05.03.01	400	-	NT	NT			-	NT	NT			-	NT	-	NT
6	05.03.14	400	+	NT	NT			+	NT	NT			-	NT	+	NT
7	05.03.14	400	-	NT	NT			+	NT	NT			-	NT	+	NT
8	05.03.14	400	+	NT	NT			+	NT	NT			-	NT	+	NT
9	05.03.23	400	+	NT	NT			+	NT	NT			+	NT	+	NT
10	05.03.23	400	+	NT	NT			+	NT	NT			+	NT	+	NT
11	05.04.12	400	+	4.92	NT			+	3.44	NT			-	1.26	-	0.43
12	05.04.12	400	-	1.34	NT			-	1.84	NT			-	0.86	-	0.72
13	05.04.12	400	-	0	NT			-	0	NT			-	0	-	0
14	05.05.10	400	-	0	NT			+	0.3	NT			-	0	-	0
15	05.05.10	400	-	0	NT			-	0.97	NT			-	0	-	0
16	05.05.10	400	+	0	NT			-	0	NT			-	0	-	0
17	05.10.18	400	-	0	NT			-	0	NT			-	0.2	-	0
18	05.10.18	400	-	0	NT			-	0	NT			-	0	-	0
19	05.10.18	400	-	0	NT			-	0	NT			-	0	-	0
20	05.11.15	400	-	0	6.29	6.29		-	0	6.54	6.54		+	0.96	+	1.74
21	05.11.15	400	-	0	7.59	7.59		-	0	11.25	11.25		+	0	-	1.35
22	05.11.15	400	-	0	4.01	4.01		-	0	9.27	9.27		-	0.73	+	1.06
23	05.12.05	400	-	0	5.64	5.64		+	0	8.62	8.62		+	0.77	+	1.54
24	05.12.05	400	-	0	8.43	8.43		-	0	5.85	5.85		-	0	+	1.5
25	05.12.05	400	-	0	6.72	6.72		-	0	8.26	8.26		-	0	-	0.63
26	05.12.06	400	-	0	9.68	9.68		-	0	5.56	5.56		-	0.11	+	1.32
27	05.12.06	400	-	0	3.61	3.61		-	0	4.37	4.37		-	0	-	0
28	05.12.06	400	-	0	5.85	5.85		-	0	11.13	11.13		+	0.24	+	0.44
29	05.12.19	400	-	0	5.2	5.2		-	0	11.81	11.81		+	1.62	+	2.68
30	05.12.19	400	-	0	7.2	7.2		-	0	6.7	6.7		-	0	-	0
31	06.01.11	400	-	0.866	12.11	11.24		+	0.593	14.22	13.627		-	2.27	+	5.26
32	06.01.11	400	-	1.43	10.41	8.98		+	2.93	10.56	7.63		+	3.3	+	9.72
33	06.01.11	400	-	0.222	11.22	11		-	0	9	9		+	0	-	0.26
34	06.01.17	400	+	0.686	11.38	10.69		+	0.73	11.15	10.42		+	21.95	+	17.53
35	06.01.17	400	-	2.34	12.67	10.33		+	5.16	20.13	14.97		+	19.54	+	34.94
36	06.01.17	400	-	0.653	10.1	9.447		+	1.34	13.9	12.56		-	10.01	+	22.23
37*6	06.01.18	400	-	0	4.98	4.98		+	1.16	8.55	7.39		+	2.26	+	5.7
38*6	06.01.19	400	-	0.734	9.08	8.346		+	1.8	11.23	9.43		+	2.65	+	13.57
39	06.01.24	400	-	0	8.29	8.29		+	0.608	10.02	9.412		+	3.27	-	0.509
40	06.01.24	400	-	0	5.88	5.88		-	0	9.69	9.69		-	0.486	+	0.636
41	06.01.24	400	+	0.44	8.28	7.84		+	0.492	8.18	7.688		+	1.63	+	1.78
42	06.01.31	400	-	0	10.89	10.89		-	0	14.24	14.24		+	0.412	-	0.29
43	06.01.31	400	+	2.64	14.43	11.79		-	1.06	5.6	4.54		+	2.64	+	1.06
44	06.01.31	400	-	0	10.75	10.75		-	0	11.44	11.44		-	0	-	0.553
45	06.02.14	400	+	0	4.95	4.95		+	0.148	4.61	4.462		-	0.677	-	0.994
46	06.02.14	400	-	0	7.11	7.11		-	0	8.73	8.73		-	0	-	0.217
47	06.02.14	400	-	0.286	2.89	2.604		-	0.893	7.58	6.687		+	0.2	+	0.296

*1 超遠心分離により濃縮したカキ材料を再浮遊した蒸留水の液量。
 *2 :COG1F/G1SKR(COG2F/G2SKR)で増幅した PCR 産物を COG1F/COG1R(COG2F/COG2R)でリアルタイム PCR 増幅した。結果。- は陰性, + は陽性を示す。
 *3 :実測値を示す。
 *4 :検体 5 μ l に陽性コントロール(PC)16 コピー/ μ l を 1 μ l 添加してリアルタイム PCR で定量した結果。
 *5 :検査せず。
 *6 :食中毒事例の原因カキと同一日に加工されたカキ(凍結保存品)。採取日は加工日を示す。

表2 アミラーゼ-混合法と個別法の比較

検体番号	回収 液量 (μ l) *1	G1				G2		備考
		2nd Real- Time PCR *2	定量値 (A)*3	PC 添加後 の 定量値 (B)*4	PC の定 量値 (B-A)	2nd Real- Time PCR	定量値	
1-AM 混合*5	1000	+	1.85	17.51	15.66	+	9.13	
1-1	100	-	0	1.42	1.42	-	0	
1-2	100	-	0	1.36	1.36	-	0.721	
1-3	100	-	0	1.97	1.97	-	0	
1-4	100	-	0	3.88	3.88	-	0	
1-5	100	-	0	3.26	3.26	-	0	凍結保 存品
1-6	100	-	0	0.949	0.949	-	0	
1-7	100	-	0	1.45	1.45	-	0	
1-8	100	-	0	2.1	2.1	-	0	
1-9	100	-	0	2.76	2.76	-	0	
1-10	100	-	0	1.83	1.83	-	0	
個別法の平均値			0	2.0979	2.0979		0.0721	
2-AM 混合	1000	+	6.18	20.99	14.81	+	16.66	
2-1	100	-	0	2.87	2.87	-	0	
2-2	100	-	0	1.36	1.36	-	0	
2-3	100	-	0	1.49	1.49	-	0	
2-4	100	-	0	3.31	3.31	-	0	
2-5	100	-	0	3.13	3.13	-	0	凍結保 存品
2-6	100	-	0	6.04	6.04	+	0	
2-7	100	-	0	8.86	8.86	-	1.04	
2-8	100	-	0	1.87	1.87	-	0	
2-9	100	-	0	4.07	4.07	-	1.32	
2-10	100	-	0.357	4.58	4.223	-	0.915	
個別法の平均値			0.0357	3.758	3.722		0.3275	
3-AM 混合	1000	+	8.665	19.955	11.29	+	24.68	
3-1	100	-	0	9.43	9.43	-	0	
3-2	100	-	0	7.11	7.11	-	0	
3-3	100	-	0.0506	7.91	7.8594	-	1.03	
3-4	100	-	0	4.21	4.21	-	0	
3-5	100	-	0	12.79	12.79	-	0	凍結保 存品
3-6	100	-	0	5.48	5.48	-	0.206	
3-7	100	-	0	11.42	11.42	-	1	
3-8	100	-	0	1.32	1.32	-	0.604	
3-9	100	-	0	13.68	13.68	-	0	
3-10	100	-	0	1.64	1.64	-	0	
個別法の平均値			0.00506	7.499	7.494		0.284	
4-AM 混合	200	+	0.587(0.098)	9.6	9.013	+	7.48(1.25)	
4-1	200	-	0	4.09	4.09	-	0	
4-2	200	-	0	7.85	7.85	-	0	
4-3	200	-	0	5.95	5.95	-	0	06.01.31 採取
4-4	200	-	0	5.35	5.35	-	0	
4-5	200	+	0	5.63	5.63	-	0	
4-6	200	-	0.165	1.3	1.135	-	0	
個別法の平均値			0.0275	5.028	5.001		0	

(次項に続く)

で 10 倍希釈した 10^5 コピー/ 5μ l, 10^3 コピー/ 5μ l, 10^1 コピー/ 5μ l の DNA 希釈液をスタンダードとして使用した。

検体中の PCR 阻害物質の影響を調べるために,

AM-混合法, 混合法あるいは個別法で得た cDNA 検体 5μ l に G1 PC DNA(100 コピー/ 5μ l) 1μ l を加えたものを鋳型 DNA として定量 PCR 法を行った。PC 添加時の定量値から未添加時の定量値(検体中

(表 2 の続き)

5	5-AM 混合	400	+	0.202(0.040)	6.8	6.598	+	3.69(0.738)	
	5-1	200	-	0	5.16	5.16	-	1.75	
	5-2	200	-	0	2.36	2.36	-	0.395	
	5-3	200	-	0	5.09	5.09	-	0	
	5-4	200	-	0	7.18	7.18	-	0.351	
	5-5	200	-	0	1.44	1.44	-	0	06.02.09
	5-6	200	-	0	0.568	0.568	-	0	採取
	5-7	200	-	0	2.09	2.09	-	0	
	5-8	200	-	0	7.66	7.66	-	0	
	5-9	200	-	0	8.26	8.26	-	0.113	
5-10	200	-	0	8.92	8.92	-	0		
個別法の平均値				0	4.873	4.873		0.2609	
6	6-AM 混合	400	-	0.00438 (0.001)	6.39	6.38562	+	0.555(0.111)	
	6-1	200	-	0	6.22	6.22	-	0.222	
	6-2	200	-	0	6.49	6.49	-	0	
	6-3	200	-	0	7.49	7.49	-	0	
	6-4	200	-	0	4.35	4.35	-	0.865	
	6-5	200	-	0	14.76	14.76	-	0	06.02.09
	6-6	200	-	0	9.25	9.25	-	0	採取
	6-7	200	-	0	6.68	6.68	-	0	
	6-8	200	-	0	10.5	10.5	-	0	
	6-9	200	-	0	6.51	6.51	-	0	
6-10	200	-	0	7.43	7.43	-	0.447		
個別法の平均値				0	7.968	7.968		0.1534	
7	7-AM 混合	400	-	0.21(0.042)	16.17	15.96	+	1.35(0.27)	
	7-1	200	-	0	6.08	6.08	+	0	
	7-2	200	-	0	6.68	6.68	-	0	
	7-3	200	-	0	6.39	6.39	-	0	
	7-4	200	-	0	5.61	5.61	-	0	
	7-5	200	-	0	4.26	4.26	-	0	06.02.09
	7-6	200	-	0	3.6	3.6	-	0	採取
	7-7	200	-	0	9.86	9.86	-	0	
	7-8	200	-	0	7.49	7.49	-	0	
	7-9	200	-	0	0.699	0.699	-	0	
7-10	200	-	0	7.41	7.41	-	1.07		
個別法の平均値				0	5.808	5.808		0.107	

*1 超遠心分離により濃縮したカキ材料を再浮遊した蒸留水の液量。

*2 .COG1F/G1SKR(COG2F/G2SKR) で増幅したPCR産物をCOG1F/COG1R(COG2F/COG2R) でリアルタイムPCR増幅した結果。- は陰性, + は陽性を示す。

*3 実測値を示す。()内は個別法の1 反応系当たりの実測値に相当する値。

*4 検体 5µl に陽性コントロール16 コピー/µl を1µl 添加してリアルタイムPCR で定量した結果。

*5 AM 混合はアミラーゼ混合法, 1-1 ~ 7-10 は個別法を示す。

の G1 定量値)を引いた値を各 cDNA 検体における添加 PC の定量値(コピー数)とした。また、逆転写反応液 5µl に標準 DNA1µl を加えたものを鋳型 DNA として定量 PCR を行い、得られた定量値を実際の添加 PC のコピー数とした。

結 果

1 AM-混合法と混合法の比較

47 検体について定性 PCR 法で NV 検出を行い(表 1), 検出率を比較した(表 3)。G1 検出率は AM-混合法 40.4%(19/47), 混合法 21.3%(10/47), G2

検出率は AM 混合法 51.1%(24/47), 混合法 38.3%(18/47)で, G1, G2 とも AM-混合法の検出率が高かった。

37 検体について定量 PCR 法で G1, G2 別の定量を行った(表 1)。定量値 0 コピー/反応系を超える値(>0)を示したものは, G1 が AM-混合法 16 検体, 混合法 12 検体, G2 が AM-混合法 26 検体, 混合法 23 検体であり, AM-混合法が>0 の定量値を示したものが多かった。また, >0 の定量値を示したものの平均値は G1 が AM-混合法 1.47, 混合法 1.38, G2 が AM-混合法 4.96, 混合法 3.39 で,

表3 アミラーゼ-混合法と混合法との比較のまとめ

比較項目		アミラーゼ-混合法	混合法	
2ndRealTimePCR の結果 N=47	G1	陽性	19	10
		陰性	28	37
		陽性率(%)	40.4	21.3
	G2	陽性	24	18
		陰性	23	29
		陽性率(%)	51.1	38.3
定量値の分布 (実測値)	G1	0	21	25
		>0 ~ <1	8	7
		1 ~ <10	8	5
	G2	10 ~ <100	0	0
		0	11	14
		>0 ~ <1	12	11
		1 ~ <10	11	9
		10 ~ <100	3	3
定量値>0 の平均値 (実測値)	G1	1.47(N=16)	1.38(N=12)	
	G2	4.96 (N=26)	3.39(N=23)	
AM-混合法または混合法で2ndRealTimePCR 陽性となった検体の定量値の平均値 (実測値)	G1 N=14	1.41	1.05	
	G2 N=21	5.91	3.57	
PC 添加実験 (添加量 16) (実測値) N=28	平均値 ± SD		8.97 ± 2.92	7.69 ± 2.56
	最大値		14.97	11.79
	最小値		4.37	2.60

G1 ,G2 とも AM-混合法の定量値が高かった。AM-混合法あるいは混合法の少なくとも一方が定性 PCR法で陽性となったものについて定量値をみると、G1(N=14)が AM-混合法 1.41、混合法 1.05、G2(N=21)が AM-混合法 5.91、混合法 3.57 で、G1、G2 とも AM-混合法が高い定量値を示した(表 3)。

AM-混合法あるいは混合法で得られた cDNA 検体中の PCR 阻害効果を調べるために、28 検体について G1 PC を添加し、その定量値を調べた(表 1)。PC の添加量は 16 コピー / 反応系であった。PC 定量値の平均値 ± 標準偏差、最大値、最小値は、AM-混合法では 8.97 ± 2.92、14.97、4.37、混合法では 7.69 ± 2.56、11.79、2.60 で、AM-混合法で得た cDNA 検体が PCR 阻害作用が少なく、実際の添加量に近い定量値を示した(表 3)。

2 AM-混合法と個別法の比較

10 個を 1 プールとした 6 検体(60 個体)、6 個を 1 プールとした 1 検体(6 個体)、計 7 検体(66 個体)について AM-混合法と個別法を比較した(表 2)。なお、カキから超遠心分離で濃縮した検体を再浮遊した蒸留水の液量の違いから、AM-混合法の検体番号 4 は 10 倍、検体番号 5 ~ 7 は 5 倍濃縮され

ているため、それぞれ得られた定量値を 10 あるいは 5 で除した値を定量値の平均値(1 個体当たり)とした。

定性 PCR 法による検出率は(表 4)、G1 が AM-混合法 71.4%(5/7)、個別法 14.3%(1/7)、G2 が AM-混合法 100%(7/7)、個別法 28.6%(2/7)であり、G1、G2 とも AM-混合法の検出率が高かった。個別法において個体別の検出率をみると、G1 は 1.5%(1/66)、G2 は 3.0%(2/66)で、検出率は極めて低かった。

カキ 1 個体当たりの平均定量値(表 4)は、AM-混合法では G1 が 0.001 ~ 8.665、G2 が 0.111 ~ 24.68 であり、G1、G2 ともすべて >0 の定量値を示した。一方、個別法の平均定量値は、G1 では 4 検体が 0、他の 3 検体は 0.00506 ~ 0.035766、G2 では 1 検体が 0、他の 6 検体が 0.0721 ~ 0.3275 であった。平均定量値を比較すると、7 検体すべてで AM-混合法が高い値を示した。個別法の定量値を個体別にみると、63 個体は定量値 0 を示し、>0 の定量値を示した 3 個体の定量値はいずれも 1 以下であった。

cDNA 検体の PCR 阻害効果を比較するために、AM-混合法の 7 検体、個別法の 66 検体に G1 PC を

表4 アミラーゼ-混合法と個別法との比較のまとめ

比較項目		アミラーゼ-混合法	個別法	
2ndRealTimePCR の結果	G1	陽性	5	1[1]*1
		陰性	2	6[65]
		陽性率(%)	71.4	14.3[1.5]
	G2	陽性	7	2[2]
		陰性	0	5[64]
		陽性率(%)	100	28.6[3.0]
1個体当たりの平均定量値 (実測値)*2	G1	検体 1	1.85	0
		検体 2	6.18	0.0357
		検体 3	8.665	0.00506
		検体 4	0.098	0.0275
		検体 5	0.04	0
		検体 6	0.001	0
		検体 7	0.042	0
	G2	検体 1	9.13	0.0721
		検体 2	16.66	0.3275
		検体 3	24.68	0.284
		検体 4	1.25	0
		検体 5	0.738	0.2609
		検体 6	0.111	0.1534
		検体 7	0.27	0.107
定量値の分布 (実測値)*2	G1	0	0	[63]
		>0 ~ <1	4	[3]
		1 ~ <10	3	[0]
		10 ~ <100	0	[0]
	G2	0	0	[51]
		>0 ~ <1	3	[10]
		1 ~ <10	2	[5]
		10 ~ <100	2	[0]
PC 添加実験 (添加量 16) (実測値) N=7(AM-混合法) ,N=66(個別法)	平均値±SD	11.39±4.08	5.30±3.34	
	最大値	15.96	14.76	
	最小値	6.39	0.70	

*1 []内は個体別の結果

*2 :アミラーゼ-混合法は1個当たりの値に計算して示した。

添加(16 コピー/反応系)し,G1 を定量した(表 4)。PC 定量値の平均値±標準偏差,最大値,最小値は,AM-混合法では 11.39±4.08,15.96,6.39,個別法では 5.30±3.34,14.76,0.70 で,AM-混合法で得た cDNA 検体が PCR 阻害作用を受けにくく,実際の添加量に近い定量値を示した(表 4)。

3 定性 PCR 法の結果と定量値の関連性

AM-混合法,混合法,個別法において定性 PCR 法の結果と定量 PCR 法での定量値の関連を調べた(表 5)。定量値 0 を陰性,>0 を陽性とした場合,定性 PCR 法と定量 PCR 法の結果の一致率(両法で陰性あるいは両法で陽性になった検体数の全検体数の割合)は,AM-混合法 80.7%,混合法 71.6%,

個別法 83.3%,全体では 79.6%であった。個別法は大半が陰性の結果であり,両法で陽性となった検体はなかった。

定量値を 0,>0~<1,1~<10,10~<100 に区分し,それぞれの定量値区分での両法での結果を比較した。定量値 0 での陰性一致率(両法で陰性となった検体数の当該定量値区分の検体数に対する割合)は,AM-混合法 96.7%,混合法 89.7%,個別法 97.3%,全体で 95.6%であった。定量値>0 について両法の陽性一致率をみると,定量値>0~<1 では AM-混合法 48.0%,混合法 38.9%,個別法 0%,全体で 33.9%,定量値>1~<10 では AM-混合法 88.9%,混合法 64.3%,個別法 0%,全体で 70.2%,

表5 各濃縮法における2ndRealTimePCR法とRealTimePCR法の比較と両法の一一致率

区分	2ndRealTime PCR 結果	アミラーゼ 混合法		混合法		個別法		全体	
		-	+	-	+	-	+	-	+
定量値	0	29	1	35	4	110	3	174	8
	>0	16	42	17	18	19	0	52	60
>0の定量 値の分布	>0~<1	13	12	11	7	13	0	37	19
	1~<10	3	24	5	9	6	0	14	33
	10~<100	0	6	1	2	0	0	1	8
0を陰性 ,>0を陽性とした場合の全体の一一致率(%)*1		80.7 (N=88)		71.6 (N=74)		83.3 (N=132)		79.6 (N=294)	
定量値0の陰性一一致率(%)*2		96.7 (N=30)		89.7 (N=39)		97.3 (N=113)		95.6 (N=182)	
定量値>0~<1の陽性一一致率(%)*3		48.0 (N=25)		38.9 (N=18)		0 (N=13)		33.9 (N=56)	
定量値1~<10の陽性一一致率(%)*3		88.9 (N=27)		64.3 (N=14)		0 (N=6)		70.2 (N=47)	
定量値10~<100の陽性一一致率(%)*3		100 (N=6)		66.7 (N=3)		-		88.9 (N=9)	

*1 両法で陰性あるいは陽性となった検体数の全検体数に対する割合。

*2 定量値0を示した検体のうち ,2ndRealTimePCR法で陰性となった検体数の割合。

*3 :それぞれの定量値を示した検体のうち ,2ndRealTimePCR法で陽性となった検体数の割合。

定量値 10~<100 では AM-混合法 100% ,混合法 66.7% ,全体で 88.9%であった。これらの結果から ,定量 PCR法と定性 PCR法の結果は AM-混合法が最もよく一致した。また ,定量値>0の場合 ,定量値が高くなるに従い両法の一一致率が高くなること AM-混合法 ,混合法で認められたが ,いずれの定量値区分においても ,AM-混合法の一一致率が高かった。

考 察

現在 ,厚生労働省の NV 検査指針¹⁾には「貝 1ロットに付き 3検体から 10検体(中腸腺としての合計 12gから 24g程度を目途とする。)の検査を行う。」と記載されている。3個の検査と 10個の検査ではコストのまた労力的に大きく異なり ,実際には ,3個程度の個体についての検査が一般的であると推測される。カキを個別に検査するのは ,多くのカキ個体を混合して検査を行った場合 ,PCR反応を阻害する物質の混入が増えることなどから検査結果の信頼性が下がることが最大の理由とされている。一方 ,同一ロットに含まれるカキ

には ,その中に含まれる NVの有無およびその定量値に個体差があり ,3個程度の検査では検出率が低いことが指摘されている³⁾。そのため ,10個程度のカキを混合した検体のインヒビターの影響を受けない簡便な濃縮法の開発が望まれている。今回我々は ,カキ混合検体の濃縮時に ,カキの主成分であるグリコーゲンを AMによって消化する操作を導入し ,その有用性を AM処理を行わない場合あるいは個別に検査する場合と比較し検討した。その結果 ,AM-混合法は ,他の 2法と比較して ,定性 PCR法による NV検出率が高く ,定量 PCR法で PCR阻害作用を受けにくく実際のコピー数に近い定量値を示し ,定量 PCR法と定性 PCR法の結果の一一致率が高かった。また ,AM消化は PEG沈殿操作と同時に実施できることから ,従来の混合法と比較してもほぼ同様の操作で実施可能であった。以上のことから ,AM-混合法は混合したカキ検体からの NV濃縮に有用な方法であると考えられた。さらに ,一部の検体に凍結保存されていたものを使用し冷蔵品と同様の結果が得られたことから ,食中毒原因究明などの凍結保存品に

対しても使用できると考えられる。

今回我々は NV 検出に定量 PCR 法と通常の PCR 産物を鋳型 DNA としてリアルタイム PCR 法で nestedPCR を行うセカンドリアルタイム PCR 法による定性 PCR 法を併用した。その結果、厚生労働省の NV 検査指針で陰性と判定される 10 コピー/系未満の定量値でも定性 PCR 法陽性となる例が多く認められ、特に定量値 $1 \sim <10$ では 70% (AM-混合法濃縮検体では約 90%) が定性 PCR 法で陽性であった。また、定性 PCR 法と定量 PCR 法の一致率をみると、定量 PCR 法における定量値が低いほど両法の結果が一致せず、定量値が高くなるにつれ一致率が増加した。このことは、検体に含まれるコピー数が少なくなるにつれ PCR 反応液に NV cDNA が入る確率が減少することによる必然的な結果として理解することができる。さらに今回の結果からも示されたようにカキから精製した cDNA 検体には PCR 阻害物質が含まれ、定量 PCR 法で実際のコピー数より少なく定量されるため、実際には得られた定量値より多くの NV が含まれていると考えられる。以上のことから、定量 PCR 法で実測値 $>0 \sim <10$ コピーの定量値の場合、実際に NV が含まれる可能性が極めて高いと考えられる。さらに今回の食中毒事例の原因と推定されるカキと同一日に加工された 2 検体についても、実測値 10 コピー以下であり陰性と判断される汚染量であった。これらのことから、現在、厚生労働省の検査指針の基準では定量 PCR 法の実用性が極めて低く、陽性限界値の見直しが早急に必要と考えられる。当面の対応策として、検査結果を(陽性、陰性と記載せず)定量値で示すことが有効であると考えられ、少なくとも実測値 10 コピー以下の場合には「陰性」と表記するのではなく、「10 コピー/系以下」と表記し必ずしも NV 陰性でないことを示す必要がある。一方、定性 PCR 法陽性・定量 PCR 法陰性の検体より、定性 PCR 法陰性・定量 PCR 法陽性の検体が多い傾向にあった。この理由として、定性 PCR 法の 1 回目の PCR に使用している G1SFR(G2SKR)プライマーのミスマッチにより増幅されない場合がある(偽陰性)可能性のほか、定量 PCR 法が偽陽性を示した可能性も否定できず、今後詳細に検討する必要がある。

今回我々は、AM 消化を PEG 沈殿時に、室温で

一夜、スターラーで攪拌することにより行った。これは、当所においては検体搬入が午後になることが多く PEG 沈殿を一夜行っていたことから、検査の簡便化のためその工程に合わせたことによる。反応温度については、予備実験において 37℃、室温、4℃ で比較した結果、37℃ の消化が最も効率的であったが、細菌の繁殖および PEG 沈殿によるウイルス濃縮に対する影響が不明であったことから室温での反応とした。短時間でを行う場合は、37℃での AM 消化後、PEG 沈殿を 4℃で行うことが考えられるがその条件は改めて設定する必要がある。

本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 ウイルス性食中毒の予防に関する研究(主任研究者 武田直和)によって行われた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、検体採取にご協力いただきました広島市社会局保健部食品保健課の関係各位に深謝します。

文 献

- 1) 厚生労働省ホームページ: ノロウイルスの検出法について, <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html>
- 2) 西尾 治: 厚生労働科学研究費補助金生活安全総合研究事業 食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究 平成 14 年度総括・分担研究報告書(2003)
- 3) 野田 衛 他: ノロウイルス検出率の及ぼすカキ検査個数の影響, 広島市衛研年報, 23, 70~73(2004)
- 4) Kageyama T et al: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR, J Clin Microbiol, 41, 1548~1557(2003)
- 5) 篠原美千代 他: リアルタイム PCR 法で得られた低い値の信頼性について, 厚生労働科学研究費補助金生活安全総合研究事業 食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究 平成 14 年度総括・分担研究報告書, 56~59(2003)