

1. 拭取り素材に重点をおいたノロウイルス回収法の改良

○大久保 和洋（北海道立衛生研究所）
吉澄 志磨（北海道立衛生研究所）
後藤 明子（北海道立衛生研究所）
石田 勢津子（北海道立衛生研究所）
三好 正浩（北海道立衛生研究所）

【研究目的】

ノロウイルスによる食中毒事例や集団感染事例において、汚染経路の解明や汚染状況の調査のために拭き取り検査が行われる。しかし、環境中に存在するノロウイルスの量は極端に少ないため、拭き取り検体からノロウイルスを検出することは非常に難しい。本研究では拭き取りに用いる素材に重点を置き、環境中からのウイルスの捕捉と、その後のウイルスの遊離と検査が簡便・高効率に行える方法について検討した。

【研究の必要性】

ノロウイルスは食中毒の原因や、ヒトーヒト感染による集団胃腸炎を引き起こすことから公衆衛生上重要なウイルスの1つである。ノロウイルスは感染力が高く、感染者が触れたドアノブや、便器等に付着した少量のウイルスでも接触拡散し、二次汚染が拡大する。

ノロウイルスによる食中毒や集団感染が起こった場合、感染経路の解明や感染拡大防止のために環境中に存在するノロウイルスの拭き取り検査が行われることがある。しかし、環境中には少量のウイルスしか存在しないこと、拭き取ったウイルスを溶液に遊離させる際に多くのウイルスを喪失してしまうこと等、多くの障害があり、拭き取り検体からのウイルス検出は難しい。

また、現在「食品衛生検査指針」で示されている拭き取り検体からのウイルス検出法¹⁾では、煩雑な操作が必要な上、結果を得るまでに2日程度かかり、緊急な対策が必要な場合に検査が間に合わない恐れがある。

さらにノロウイルスの拭き取り検査専用のキットも市販されているが、費用面などの問題からすべての自治体の検査機関が導入することは困難であり、積極的な拭き取り検査の実施を難しくしている。

以上のことから、より簡便・迅速・高効率で、なおかつ安価なノロウイルスの拭き取り検査法が必要とされている。

【研究計画】

拭き取り検査は、汚染区域の拭き取り、拭き取った素材から溶液へのウイルスの遊離、

ウイルスの濃縮、ウイルス遺伝子の抽出、ウイルス遺伝子の増幅という段階を経て行われる。このうち、ウイルス遺伝子の抽出とその増幅のステップについては、便や嘔吐物の検査法と同様の全国的に共通化された方法があることから²⁾、今回の研究対象としてのステップから除外した。

さらに、ウイルスの濃縮に関しては、これまで様々な方法が報告されているが³⁻⁵⁾、いずれも高額な機器や試薬が必要であり、加えて濃縮のステップを挟むことにより結果を得るまでに更に時間がかかってしまう。そこで本研究ではウイルス濃縮のステップを省略することを前提とし、濃縮を必要としない拭き取り方法とウイルスの遊離方法を検討することとした。

ウイルス遺伝子の抽出は 140 μ l のウイルス汚染溶液を用いて行われる。したがって、この 140 μ l の溶液中にどれだけ多くの環境中のウイルスを回収できるかが、効率の向上につながる。このことから、できるだけ少量の溶液を用いて拭き取り、かつ可能な限り拭き取り溶液を回収することが重要となる。

以上のことを踏まえ、本研究では拭き取り時に水を全く使用しないセロハンテープと、吸水性はカット綿にやや劣るが、吸収した水の回収性に優れた天然植物繊維であるセルローズを新しい拭き取り素材として使用できないか検討を行った。

	1g 当たりの吸水量 (ml)	吸収した水の回収率 (%)
カット綿	13.3	80.8
セルローズ	9.5	96.5

【実施内容・結果】

5 x 10⁵ - 6 x 10⁵ 個のノロウイルス（遺伝子型 GII. Pe_GII.4）を含んだ汚染溶液をステンレス板に 1 x 1 cm の範囲（スポット）、もしくは 10 x 10 cm の範囲に塗布し、乾燥させて汚染区域とした。その後以下の方法で汚染区域を拭き取った。

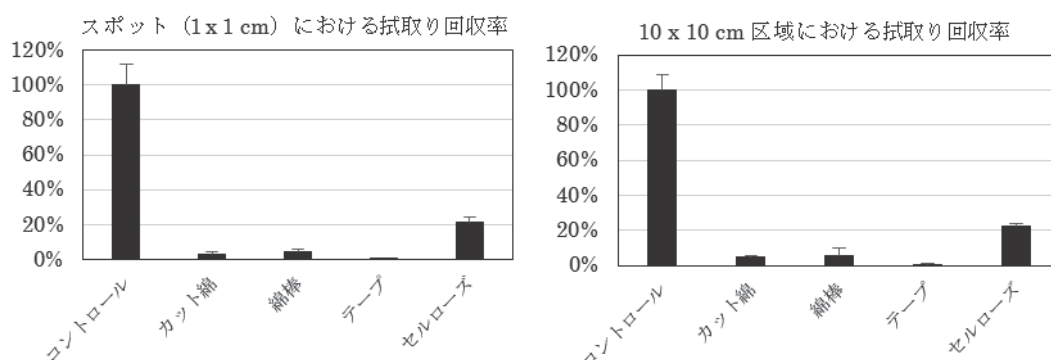
- (1) カット綿 (5 x 5 cm) に蒸留水 2 ml を含ませ、汚染区域を拭き取った後にカット綿を絞り、溶液を回収する。
- (2) 市販の拭き取り用綿棒（ふきふきチェック II、栄研化学）を用いて拭き取り、そのまま直接綿の部分絞り、溶液を回収する。
- (3) 市販のセロハンテープを用いて汚染区域をまんべんなく接着させ（接着面 1 x 1 cm）その後、接着面を 200 μ l の蒸留水でピペッティングを行い、その溶液を回収する。
- (4) 市販のセルローズのクロス（お役立ちクロス吸ちゃん、オカザキ）を切り取り (3 x 3 x 0.8 cm) 蒸留水 700 μ l を含ませ、拭き取った後に絞り、溶液を回収する。

その他、汚染溶液を直接蒸留水に添加して合計 140 μ l とし、コントロールとした。各拭き取り方法で得られたサンプルとコントロールについて 4 検体ずつ実験を行った。

回収した溶液から 140 μ l を使用して RNA 抽出を行った。RNA 抽出、cDNA 合成、Real Time PCR は厚生労働省通知の方法²⁾に準じた。

コントロールのウイルス回収率を 100% とし、各方法による拭き取りウイルス回収率を下図に示した。スポットにおける拭き取り回収率は、カット綿 3.1%、綿棒 4.5%、テープ 0.04%、

セルローズ 21.5%であった。また、10 x 10 cm の区域における拭き取り回収率は、カット綿 5.1%、綿棒 6.0%、テープ 0.83%、セルローズ 22.8%であった。



【考察と今後の課題】

今回の研究において、新たな拭き取り素材として、セロハンテープとセルローズを取り上げた。この他にも、ガムテープやビニールテープなどの各種テープ、スポンジなども考えられたが、拭き取り作業のしやすさや、拭き取り溶液の回収効率を比較して、セロハンテープとセルローズがもっとも良いと判断した。

また、今回の実験に使用した市販の拭き取り用綿棒には、綿棒の入った容器に 10 ml の溶液が入っており、拭き取った綿棒をこの溶液に浸漬し、ウイルスを遊離させて使用するが、事前に行った予備試験において回収率が極めて低かったため、本実験では拭き取った後、綿部分を直接絞って溶液を回収した。この拭き取り用綿棒は、実際に使用されることが多く、現状のウイルス検出率の低さの一因ではないかと考えられる。

今回セロハンテープを使用して水を全く用いないウイルスの拭き取りが可能か検討したが、ウイルスの回収率は極めて低かった。狭い範囲での回収の可能性について、スポットでの実験も行ったが、結果は予想に反してスポットの方が回収率は低かった。このことからウイルスの回収には水を用いてウイルスを遊離させることが効率的であると考えられた。

今回検討したセルローズは最もウイルス回収率が高く、従来拭き取り検査に使用されてきたカット綿や綿棒よりも 4~5 倍回収率が高かった。カット綿では拭き取りの際に、セルローズより多い 2 ml の蒸留水を使用した。これは 2 ml 以下になると、カット綿に蒸留水がいきわたらず、拭き取り作業が行えないためである。セルローズは吸水性が高く、少量の水で拭き取ることが可能な上、絞ったときに、保持している大部分の水が回収できる。このため、拭き取り素材としてはカット綿や綿棒よりも理想的な素材と言える。また、本研究で使用したセルローズは 100 円程度で購入できる非常に安価なものである。今後この素材を実際の検査に応用するには、拭き取り用綿棒のように、使用の際にコンタミネーションを起こさない形状にし、拭き取った後すぐに、拭き取り溶液を簡単に回収できる仕組みにする必要がある。

本研究に助成いただきました、大同生命厚生事業団に深く感謝いたします。

【参考文献】

- 1) 食品衛生検査指針微生物編 改訂第2版(2018) 公益社団法人日本食品衛生協会
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知 食安監発第 0514004 号「ノロウイルスの検出法について」平成 19 年 5 月 14 日
- 3) 田村務、田中智之「牛血清アルブミンとポリエチレングリコールを使用した水性二相分配法によるノロウイルスの濃縮法の検討」平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」研究協力報告書
- 4) 篠原美千代 他「非晶性リン酸カルシウム微粒子を用いたウイルス濃縮法の検討」厚生労働省科学研究費補助金「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」総合研究協力報告(平成 22~24 年度)
- 5) 谷澤由枝、重本直樹、野田衛「ふき取り検体からのハイドロキシアパタイトによるノロウイルスの濃縮法の検討」平成 27 年厚生労働科学研究費補助金「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」研究協力報告

【経費使途明細】

使 途	金 額
TaqMan Universal PCR Master Mix	136,944 円
TaqMan プローブキット	116,640 円
PCR 用試薬 (KOD Plus Ver2 等)	27,840 円
E-MEM	6,750 円
TAKARA Cell Banker 1 Plus	10,530 円
振込手数料	1,296 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円