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

田村務，昆美也子，渡邉香奈子，田澤崇，渡部香

Recovery of Norovirus by Aqueous Two-phase System Using Polyethylene Glycol and Bovine Serum Albumin

Tsutomu Tamura, Miyako Kon, Kanako Watanabe, Takashi Tazawa and Kaori Watanabe

要　旨

ノロウイルスによる手指汚染が食品の表面汚染につながり，食中毒が発生する事例が多いことから，食品や手指，環境等の表面のノロウイルス汚染のリスク評価のため，比較的清浄な検体からのノロウイルスの検出法を検討した．牛血清アルブミン，ポリエチレングリコール6000，及びNaClを使用した水性二相分配法により，ノロウイルスはBSA層に濃縮でき，BSA層から核酸抽出して，リアルタイムRT-PCR法により検出することができた．本法による，８mL又は35mLのリン酸緩衝生理食塩水への 10^4～10^5 個のノロウイルスの添加回収試験では，37～85%の回収率が得られ，ポリエチレングリコール沈殿法よりも高い回収率が得られた．ふきとり検査検体等からのノロウイルス検出法に利用できると思われる．

Keywords：ノロウイルス，水性二相分配法，ポリエチレングリコール，牛血清アルブミン

１　はじめに

ノロウイルスによる調理従事者の手指汚染が，食品の表面を汚染し，食中毒につながっている事例が多く報告されている．そのため，手指，食品，調理環境の表面等のノロウイルス汚染を調べるため，比較的清浄な検体からノロウイルスを検出する必要がある．

しかし，平成15年11月5日付け食安監発第1105001号厚生労働省医薬品食品局食品安全部監視安全課長通知（通知法）で示されているポリエチレングリコール6000（PEG）を用いた沈殿法は，主な検査対象はカキの中腸腺であり，夾雑物が少ない検体からの回収率が低くなることが経験される．また，同通知中には，超遠心機を使用したウイルスを濃縮する方法もあるが，検体量や数が多い場合は，大型の超遠心機が必要となる．

そこで，タンパク質やウイルスの濃縮法として使用されている水性二相分配法[1)]を利用して，比較的清浄な検体からノロウイルスを濃縮する方法について検討した．

２　材料と方法

水性二相分配を起こす物質として，PEG，NaCl及び牛血清アルブミン（BSA）を使用し，タンパク質粒子であるノロウイルスをBSA層に濃縮する方法について検討した．二相分配を起こすPEG，NaCl及びBSAの各濃度条件を設定後，ノロウイルスの添加回収試験を実施した．

2.1　PEG濃度の検討

pH7.2 リン酸緩衝生理食塩水（PBS(-)）に結晶BSA（Albumin from bovine serum，A3659-100G，Sigma）を３％添加して，45℃のウォーターバスで加温溶解後，NaClを１M添加して溶解した．PEGを８％と12%の２条件として同様に加温溶解して混和後，冷蔵庫で一晩静置して二相分配の有無を観察した．

2.2　NaClの濃度の検討

８mLのPBS(-)に，BSA濃度を３％，PEGを12%とし，NaClを0.5～２Mの７段階の条件で2.1と同様に加温溶解して冷蔵庫で一晩静置し，二相分配後のBSA層を回収してその重量を測定した．

2.3　BSAの濃度の検討

検体となるPBS(-)の量を，食品検体を想定した35mL，環境ふきとり検体を想定した８mLの２つの容量設定として検討した．35mL系ではBSAを0.5～３％の６段階の条件で，８mL系では１～３％の３段階の条件で溶解し，それぞれの管にPEGを12%，NaClを１Mの濃度で加温溶解して一晩静置し，二相分配の有無を観察した．

2.4　BSA-PEG水性二相分配法による添加回収試験
－PEG沈殿法との比較－

添加回収試験で使用する添加用のノロウイルスは，GII.4ノロウイルスが陽性となった便から，BSA沈殿法と超遠心法により濃縮・精製して，約 1.7×10^6 個/100μLの濃度としてストックし，これを約 10^4～10^5 個/100μLに希釈して添加用ノロウイルス液とした．

ノロウイルスの添加回収試験を，BSA-PEG水性二相分配法とPEG沈殿法（PEG濃度12%，NaCl濃度１M）につい

て実施し，比較した．35mL 系では，PBS(-)35mL にノロウイルスを約 1.7×10^4個(100μL)を添加して BSA を 1.75%加え，８mL 系では PBS(-)８mL にノロウイルスを約 1.7×10^4個(100μL)を添加して BSA を３%加え，それぞれ PEG 試験の 10 倍量のノロウイルスを添加した８mL の PBS(-)に BSA を３%濃度に溶解後，PEG を 12%，１Mの NaCl を溶解後，１時間後と 15 時間後に遠心して BSA 層を分離し，ノロウイルスの回収率を比較した．

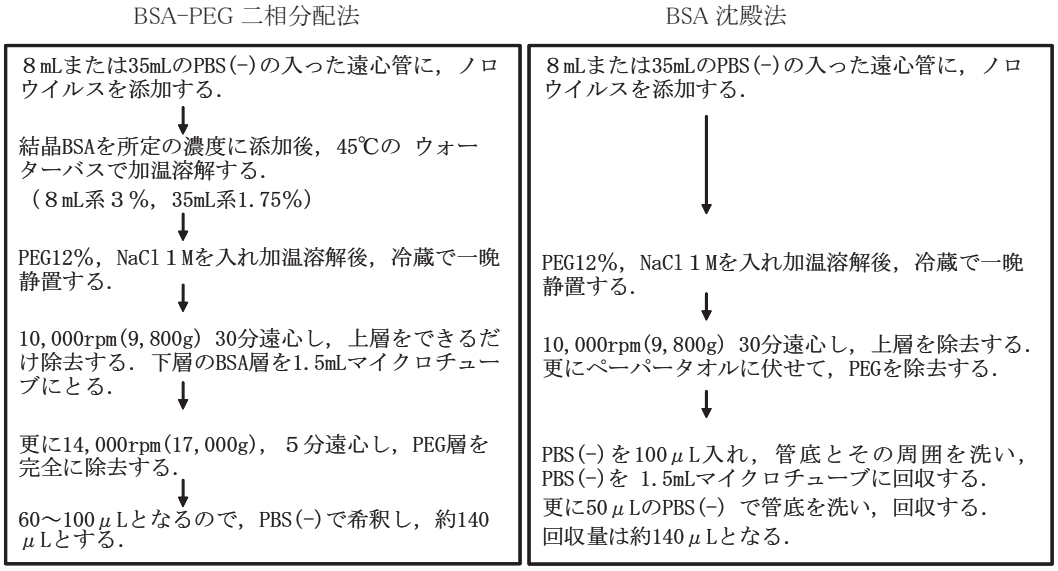

図１　添加回収試験におけるノロウイルス濃縮工程

を 12%，NaCl１Mの条件で実施した．これらの濃縮工程を図１に示す.調整した濃縮サンプルを核酸抽出検体として，QIA viral RNA mini kit(QIAGEN)で抽出した．検体の PBS(-)が８mL 系の場合は，濃縮された BSA が 100μL 未満となることから，PBS(-)を加えて抽出用原液を QIA viral RNA mini kit の被抽出サンプルの標準容量 140μL に調整し，自動核酸抽出装置 QIA cube(QIAGEN)を用いてウイルス RNA を抽出した．

抽出 RNA を TURBO DNA-free kit(Applied Biosystems)により DNase 処理後，High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems)により逆転写し，通知法と同様にリアルタイム PCR 法で定量した．

実際に添加されたノロウイルス量から回収率を算出するため，添加用ノロウイルス液 100μL(約 1.7×10^4個)に 40μL の PBS(-)を加えて 140μL に調整し，試験検体と同様に抽出・逆転写・定量した．回収率の算出は，この添加ノロウイルス液で定量したコピー数を 100 として算出した．

2.5　静置時間による添加回収率の変動

BSA，NaCl，PEG を溶解後，静置することで溶解していた BSA の分離が起こり，自然に BSA 層の形成が起こる．BSA 層は静置時間が長くなるにつれて増加し，そのまま放置すると上層は透明となり，完全に二つの層に分離する．しかし，これらの溶媒を溶解した直後からミセル状に混濁することから，粒子状の分配が起こり始めていると考えられた．

そこで，検査時間の短縮の可能性を検討するため，静置時間によるノロウイルスの回収率の差を検討した．2.4 の

３　結　果

3.1　PEG の濃度の検討

通知法で使用される PEG の濃度８%では，二相分配は起こらず，12%の条件で二相分配が起こった(図２)．

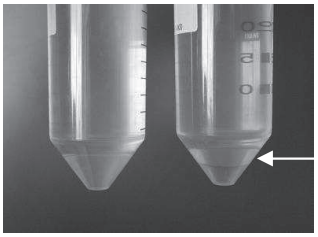

図２　PEG 濃度による二相分配の違い
左は PEG８%，右は PEG12%で，右の管底に BSA 層が確認できる．

3.2　NaCl の濃度の検討

NaCl 無しでは二相分配は起こらず，0.75Mまで上昇させると，濃度勾配に従って回収される BSA 量が増加した（図３）．更に NaCl の濃度を上げると，回収される BSA 量は減少し，0.75Mで 0.118ｇ回収できた BSA が２Mの濃度では 0.018ｇまで低下した．NaCl が 0.5Mから１Mの間の濃度で BSA の回収量が多かった．

3.3　BSA の濃度の検討（表１）

検体となる PBS 量が８mL では，BSA 濃度１%で二相分配は起こらず，２%及び３%で二相分配が起こり，回収できた BSA の量は，２%で 20μL，３%で 85μL と３%のほうが多かった．

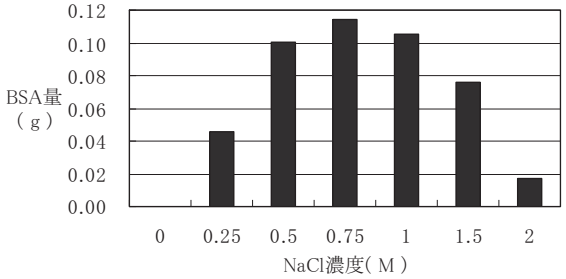

図３　NaCl の濃度による BSA の回収量の比較
※PEG：12%，BSA：３%，PBS(-)：８mL

表１　BSA の濃度による BSA の回収量

PBS(-)検体量	8mL	35mL
BSA濃度(%)	BSAの回収量(μL)	BSAの回収量(μL)
0.50	－	0
1.00	0	0
1.50	－	微量
1.75	－	60
2.00	20	100
3.00	85	420

※PEG：12%，NaCl：１M

検体 PBS 量 35mL では，BSA 濃度 0.5%，１%では二相分配が起こらず，1.5%から３%で二相分配が起こったが，1.5%濃度では，回収 BSA 量が少なく，二相分配の形成が不安定であった．BSA 濃度 1.75%では 60μL の BSA が回収でき，２%，３%となるにつれて回収量は増加した．

3.4　BSA-PEG 水性二相分配法による添加回収試験
－沈殿法との比較－（表２）

二相分配で回収できた BSA を直接核酸抽出キットの溶解液に溶解すると，タンパク濃度が高すぎて固化することがある．そこで，回収できた BSA 層を２倍程度に希釈することとした．3.1 から 3.3 の予備試験の結果から，二相分配が起こり，BSA がある程度の量回収でき，かつ 140μL の量に希釈できる条件として，８mL 系での添加回収試験の条件を，BSA；３%，PEG；12%，NaCl；１Mの条件とした．35mL 系では，BSA；1.75%，PEG；12%，NaCl；１Mに設定した．

これらの条件で，添加回収試験を実施したところ，添加ノロウイルス量は 5.7×10^4 個となり，この添加試料のコピー数を 100 として回収率を比較した．BSA-PEG 法の８mL 系では 53%，35mL 系では 37%の回収率が得られた．

沈殿法では，８mL 系，35mL 系それぞれ 12%，19%となり，BSA-PEG 法のほうが，回収率が高い結果となった．また，35mL 系で BSA の濃度を 1.75%と２%で比較した場合，BSA 濃度 1.75%に比べ２%のほうが回収率が低くなった．

表２　ノロウイルス添加回収試験結果

PBS(-):8mL

条件				結果			
方法	BSA濃度(%)	PEG濃度(%)	繰り返し数	実測値平均(コピー数)	標準偏差	変動係数	回収率(%)
BSA-PEG	3	12	5	379	140	0.37	53
PEG沈殿法	－	12	5	85	36	0.42	12
添加試料			2	717			100

PBS(-):35mL

条件				結果			
方法	BSA濃度(%)	PEG濃度(%)	繰り返し数	実測値平均(コピー数)	標準偏差	変動係数	回収率(%)
1.75BSA-PEG	1.75	12	3	252	36	0.14	37
2.0BSA-PEG	2	12	3	204	52	0.25	30
PEG沈殿法	－	12	3	129	48	0.37	19
添加試料			2	684			100

3.5 静置時間による添加回収率の変動（表３）

静置時間１時間と 15 時間の BSA の回収量はそれぞれ，75mg，99mg となり，時間が長いと BSA の回収量は多くなった．ノロウイルスの添加回収試験では，添加ノロウイルス量は 6.4×10^5 個で，15 時間後の回収率が 45%となったのに対し，１時間後は 85%と BSA の回収量とは逆にノロウイルスの回収率が高くなった．

表３　静置時間によるノロウイルスの添加回収率の変化

静置時間	回収BSA量(mg)	繰り返し数	実測値平均(コピー数)	標準偏差	変動係数	回収率(%)
1時間	75	5	6,776	843.7	0.1	85
15時間	99	5	3,578	325.5	0.1	45
添加試料		2	7,975			

４　考　察

水性二相分配法によるウイルスの濃縮は，通常 PEG とデキストランの系で行われている．ウイルスはデキストラン層に移行し，デキストランを除去して，ウイルスを回収する方法が常用されている[2,3]．今回は，タンパク質の濃縮法を応用し，BSA 層にノロウイルスを濃縮し，BSA 層から直接核酸抽出キットにより，核酸を抽出することができた．

また，PBS(-)に添加されたノロウイルスの濃縮法として，BSA と PEG による水性二相分配法が，PEG による沈殿法より，ノロウイルスの回収率が向上することがわかった．

PEG と NaCl を溶解後，15 時間の静置時間を１時間に短縮しても高い回収率が得られた．この際，15 時間静置よりも１時間の静置のほうが，BSA の回収量が少なかったことから，回収できた BSA のタンパク量が多すぎて，核酸抽出効率が低下しているものと推測された．また，35mL 系のノロウイルスの添加回収試験では，BSA 濃度２%より 1.75%のほうが，回収率が高くなったことも，抽出効率の低下によるものと考えられた．このことから，静置時間は１時間でも十分であること，抽出キットの溶解液を多くして，抽出効率を上げることが必要であると思われた．

ノロウイルスの濃縮法には様々な方法が検討されているが，BSA はウイルスの培養を行っている施設では常用さ

れている試薬でもあり,器具や施設のふきとり検体などの比較的清浄な検体の不意の検査依頼があった際にこの方法は有効に活用できると思われる.

5　まとめ

牛血清アルブミン(BSA),ポリエチレングリコール6000,及びNaClを使用した水性二相分配法により,PBS(-)に添加したノロウイルスをBSA層に濃縮することができた.本法を使用した,8mL又は35mLのPBS(-)へのノロウイルス10^4～10^5個の添加回収試験により,ノロウイルスの回収率37～85%のとなり,通知法で示されているポリエチレングリコール6000 (PEG)を用いた沈殿法の回収率12～19%に比べて高い回収率が得られた.

本研究の一部は,厚生労働科学研究費補助金　食品の安全確保推進研究事業「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」(研究代表者:国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部　野田衛)として行われた.

文　献

1) Asenjo J.A., Andrews B.A.: J. Chromatogr. A., **1238**, 1(2012).
2) Shichijo A.: Trop. Med., **18**, 1(1976).
3) Grindrod J., Cliver D.O.: Arch. Gesamte. Virusforsch., **31**, 365(1976).