

ブレアを用いたノロウイルスの拭き取り検査構築の試み

○下村力斗¹⁾, 清水大輔¹⁾, 中川 弘¹⁾

1) 株式会社BMLフード・サイエンス

【目的】ノロウイルス(以下、NV)による感染様式は様々であるが、調理従事者を介した食品の二次汚染を原因とする事例が多く報告されており、汚染経路の解明や施設環境の汚染状況の把握を行うには拭き取り検査が有用と考えられる。そこで、操作も簡便かつ高感度に大量処理が可能である生物発光酵素免疫測定法(以下、BLEIA法)を用い、環境中からのNVの拭き取りを材料として、BLEIA法を用いた拭き取り検査の確立を試みたので報告する。

【方法】当検査センターで保存された糞便検体でNV陽性となったもの4件(G I :2件、G II :2件)それぞれを1000 μ lの滅菌超純水に約2~3%濃度になるように溶解し、遠心後の上清を用いて 10^{-5} までの段階希釈系列を作製して試料とした。この試料100 μ lをABS樹脂(5cm \times 5cm)にそれぞれ滴下し、コンラージ棒で均一になるように塗抹し、30分間自然乾燥させた。その後、滅菌超純水を湿らせた綿棒で縦、横、斜めに十分に拭き取り、1000 μ lの滅菌超純水に溶解させた。それを用いてBLEIA法およびリアルタイムPCR法のそれぞれで測定を行った。

●BLEIA法：試料500 μ lをBL-NV調整液500 μ lと混合し、遠心後の上清をBLEIA[®]-1200を用いてNVの検出を行い、COI値が1.0以上のものを陽性とした。

●リアルタイムPCR法：8mlのPBS(pH7.2)に3%濃度となるように牛血清アルブミンを添加し

て45℃で加温溶解後、調整した試料100 μ lを添加し、ポリエチレングリコールを12%、NaClを1M濃度となるように順次添加し加温溶解後、冷蔵で1時間静置して遠心した。上清を完全除去した後、下層を採取して1.5mlチューブへ移し、濃縮および抽出を行った。RNA抽出、Dnase処理、逆転写PCRおよびリアルタイムPCRは市販キットに記載された方法で行った。

【結果および考察】糞便の希釈液を用いてBLEIA法とリアルタイムPCRでのNVの検出感度の差を比較すると、同等だったものが4件中3件、BLEIA法で検出感度が10倍が4件中1件であった。そのリアルタイムPCRにおけるNVのコピー数は 1.1×10^3 から 4.2×10^7 コピー/500 μ lであった。一方、拭き取りの希釈液を用いての比較では、同等の検出感度であったものが4件中1件、BLEIA法で検出感度が10倍が4件中2件、100倍が4件中1件であった。そのNVのコピー数は 2.3×10^3 から 3.7×10^4 コピー/500 μ lであった。また、遺伝子タイプG I、G IIにおいてBLEIA法における特異的な差は認められなかった。

以上の結果から拭き取り検査においてBLEIA法がリアルタイムPCR法と同等もしくはそれ以上の検出感度が得られたことから、NVの拭き取り検査においてBLEIA法は有効であると考えられた。さらに、一度に大量検体処理が可能なる為、NVの拭き取り検査でのBLEIA法の有用性が示唆された。