

平成 24 年度・衛生研究所研究費事業報告

非晶性リン酸カルシウム微粒子を用いた食品からのウイルス検出法の構築

—生鮮果実及び冷凍果実からの処理方法の検討—

(計画年度：平成 24 年度)

研究代表者

ウイルス担当 篠原美千代

共同研究者

ウイルス担当 富岡恭子 内田和江 島田慎一 鈴木典子 小川泰卓 貫洞里美
微生物・ウイルス感染症担当室長 岸本剛

はじめに

我々は水中や食品中のウイルスを短時間で簡便に濃縮でき、かつ特殊な試薬や装置を必要としない方法の構築を目的として、非晶性リン酸カルシウム (Amorphous calcium phosphate : ACP) 微粒子を用いたウイルス濃縮方法 (ACP 微粒子濃縮法) を構築した。この方法を用いて、キャベツ、レタス、ハム等、種々の食品へのネコカリシウイルス (FCV) の添加回収実験を行い、本法で効率良くウイルスが回収できる食品群と、ウイルス回収が困難な食品群があることを明らかにした。そこで本研究では、ウイルス回収困難食品群のうち、ウイルス回収困難な食品のひとつであるペクチン等ウイルス濃縮及び遺伝子検出を阻害する物質を多く含む生鮮果実、冷凍果実等について、前処理方法の検討を行った。

材料および方法

1 冷凍ラズベリー、冷凍ストロベリー、冷凍ブルーベリー、生鮮ストロベリー、生鮮ブルーベリー、生鮮パイナップルを検討の対象とした。
2 生鮮パイナップルは小片に切り、冷凍果実は解凍した後、検体 10 g に FCV 6.4×10^3 - 2.7×10^5 コピーを添加した。ウイルス汚染検体をストマッカーバッグに移し、食品洗浄液 40 ml を添加して 10 分間振とうした。冷凍ラズベリーを用いた検討では、食品洗浄液に PBS (-) (以下 PBS と記載)、3% ビーフエキス加 PBS (-) (以下 BE 加 PBS と記載)、Tris-glycine 液 (pH9.5) (100mM Tris, 50mM glycine)、3% ビーフエキス加 Tris-glycine 液 (pH9.5) (以下 BE 加 Tris-glycine 液と記載) を用い、他の果実には BE 加 PBS を用いた。冷凍ラズベリーでは、ACP 微粒子を加えて攪拌する際に、ペクチナーゼ (マセラーゼ) 0.04g を添加する方法も検討した。ろ過後、ろ液を $1880 \times g$ で 30 分遠心し、遠心上清に ACP 粒子 (積水化成工業) 0.3 g を添加し 1 時間攪拌した。遠心で集めた ACP 粒子を 3.3 M クエン酸 3 ml で溶解し、溶解液 140 μ l から、QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用いて、ウイルス RNA を抽出した。逆転写

反応実施後、リアルタイム PCR によるウイルスゲノムコピー数の測定をおこなった。

結果及び考察

1 冷凍ラズベリーについての検討結果

種々の洗浄液を用いた場合およびペクチナーゼを添加した場合の冷凍ラズベリーからのウイルス回収結果では、PBS、Tris-glycine 液で洗浄した場合にはともに 2% の回収率であった。ペクチナーゼ処理を追加すると、Tris-glycine 液では 3%、PBS では 8% となった。一方、BE 加 PBS を洗浄液に用いると 56% の回収率となったが、BE 加 Tris-glycine 液の場合には、回収率は改善されなかった。

2 冷凍果実および生鮮果実からのウイルス回収結果

冷凍ラズベリーでウイルス回収率の改善が認められた BE 加 PBS を用いて他の果実から添加回収を行ったところ、いずれの果実からも平均回収率 23—185% と、BE 加 PBS を用いて効率よくウイルスが回収された。

BE 加 Tris-glycine 液が冷凍ブルーベリーの処理に適していると報告されていることから、Tris-glycine 液を用いてビーフエキスの添加とペクチナーゼ処理を試みたところ、回収率の改善は見られなかった。この結果は、高 pH の洗浄液を使用することにより、果実の損傷が PBS に比べて激しく、内容液の流出も多いためではないかと考えられた。高 pH 洗浄液の効果が認められなかったため、細胞損傷が少ないと思われる PBS を用いて、ビーフエキス添加とペクチナーゼ処理を実施した。ペクチナーゼ処理では回収率に若干の改善が認められたが、回収率は 10% 未満であり、効果的な方法とはならなかった。これに対し、BE 加 PBS を用いた場合、回収率は平均で 56% と大きく改善された。また、冷凍ラズベリーで検証した方法を、他の冷凍果実および生鮮果実に応用したところ、いずれの果実からも効率良くウイルスを回収することができた。以上の結果から、冷凍ラズベリーでは、BE 加 PBS を用いることで、その他の手順を変更することなく効率的にウイルスを回収できることが判明した。