

(4)

|             |  |
|-------------|--|
| 氏名(本(国)籍)   | 秋 場 哲 哉(神奈川県)  |
| 推 薦 教 員     | 東京農工大学 教授 藤 川 浩  |
| 学 位 の 種 類   | 博士(獣医)   |
| 学 位 記 番 号   | 獣医博乙第112号  |
| 学位授与年月日     | 平成24年3月13日   |
| 学位授与の要件     | 学位規則第3条第2項該当   |
| 学 位 論 文 題 目 | カキに蓄積されたノロウイルス検出法とその汚染実態に関する研究   |
| 審 査 委 員     | 主査 東京農工大学 教授 藤 川 浩<br>副査 帯広畜産大学 教授 武 士 甲 一<br>副査 岩手大学 教授 原 澤 亮<br>副査 東京農工大学 教授 竹 原 一 明<br>副査 岐阜大学 教授 杉 山 誠 |

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

ノロウイルス(Norovirus)は、冬季に発生する食中毒や小児の感染性胃腸炎等の主要原因物質である。近年、ノロウイルスを原因とする食中毒事件は増加傾向を示し、その検出法としてリアルタイムPCRを用いた検査法(通知法)が厚生労働省通知に記載されている。しかし、それら高感度な遺伝子検査法を用いても食品からノロウイルスが検出される事例は少なく、食中毒原因食品や感染経路の究明は困難を極めていた。そのような現状に対し、従来からノロウイルス食中毒と関係が深いとされているカキを対象として、より高感度なノロウイルス検出法の開発、実用化を目的に研究を行った。

### 第一章 ノロウイルス遺伝子検査におけるカキ由来成分の影響

カキに蓄積されたノロウイルスが検出され難い要因の一つとして、検査用乳剤中に含まれるカキ由来成分の影響が考えられたため、ノロウイルスまたはその核酸抽出液等をカキ乳剤の遠心処理、核酸抽出、逆転写反応及びリアルタイムPCRの各ノロウイルス検出工程直前にそれぞれ添加し回収検査を実施した。その結果、核酸抽出前の試料と核酸抽出後の試料との間で最も大きな回収率の差が見られたことから、カキ由来成分は主に本ウイルスの核酸抽出工程を妨害すると推察された。したがってノロウイルス検出率向上のためにはカキ由来成分の影響を受けない新たな抽出方法の構築、または核酸抽出以前のカキ由来成分の分離、除去が必要と考えられた。

## 第二章 細菌添加培養処理法（A3T 法）の開発

検査用試料中のカキ由来成分を除去する手法として、細菌添加培養処理法（A3T 法）を考案した。A3T 法は、検査用カキ乳剤に添加した細菌が乳剤中の様々なカキ由来成分を栄養源として増殖することを利用し、それら成分を核酸抽出前に分解及び減少させることでノロウイルス検出率の向上を図る手法である。カキ乳剤を用いたノロウイルス添加回収実験の結果、*Klebsiella oxytoca* (07A-004 株)を用いた A3T 法では通知法の 20 倍以上の回収率が得られた。

## 第三章 細菌添加培養処理法（A3T 法）の実用化・高感度化に向けての検討

A3T 法の実用化および高感度化に向けて、添加用菌液の濃度及び培養時間に関する実験や冷凍保存菌液を添加用として用いる実験を行った。また、*K. oxytoca* を含む食品腐敗細菌の標準菌株 10 株の中から、より検体由来成分除去効果の高い細菌の検索を実施した。その結果、菌液添加後 16 時間培養を行う場合には  $10^3$  cfu / ml から  $10^9$  cfu / ml 濃度のいずれの菌液を用いても同様の結果が得られることおよび、A3T 法に用いる添加用菌液は 15%グリセリン加混合液として  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存することで、少なくとも作製後 1 年間は結果に影響を与えないことが確認された。

10 種の標準菌株を用いた実験では、いずれの菌株を用いても A3T 法は通知法に比べ良好な回収率を示したが、*Proteus vulgaris* (NBRC 3045) および *K. oxytoca* (NBRC 102593) を用いた場合、特に高い回収率を示す結果が得られた。

## 第四章 細菌添加培養処理法（A3T 法）の有用性の検証とカキのノロウイルス汚染実態

国内 8 県（九州地方 1 県、中国地方 1 県、近畿地方 2 県、中部地方 2 県、東北地方 2 県）で採取された市販生カキを対象に A3T 法を用いたノロウイルス検査を実施し、同時に行った通知法による検査結果と比較した。通知法ではいずれの検体からもノロウイルスは検出されなかったが、A3T 法を用いた場合には 102 検体中 19 検体（18.6%）がノロウイルス陽性と判定された。また、ノロウイルスが検出された生カキはすべて国内 6 県で採取されたものであり、カキのノロウイルス汚染は特定の海域に限られたものではないものと推察された。これらの結果は、カキを対象としたノロウイルス検査における A3T 法の有用性に加え、国内におけるカキのノロウイルス汚染はこれまで報告されていた以上に存在している可能性を示すものであった。

A3T 法は、技術やコスト面等でほとんど新たな負担を必要とせず高いノロウイルス検出率が得られる検査法である。カキを原因とする新たな食中毒の発生やノロウイルス感染拡大の未然防止には、本法のような高感度検査法を早期に導入し新たな食品管理体制の構築を急ぐ必要があると考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

ノロウイルスは、冬季に発生する食中毒の主要原因物質であり公衆衛生上の重要性も高いが、厚生労働省通知による検出法（通知法）では食品からノロウイルスが検出される事例は少なく、食中毒原因食品を特定することは困難な状況にあった。本研究は、ノロウイルス食中毒と最も関係が深いカキを対象に、より高感度なノロウイルス検出法を開発し実用化を試みたものである。

リアルタイム PCR を用いた検査工程のうち、検査用乳剤中に含まれるカキ由来成分は核酸抽出工程を妨害することが確認されたため、その除去方法として細菌の生物活性を利用した検体処理法(A3T 法)を考案した。同法は、乳剤中に添加した細菌が様々なカキ由来成分を栄養源として増殖することを利用し、核酸抽出前にそれらを減少させることでノロウイルス検出率の向上を図る手法である。

カキ乳剤に添加したノロウイルスの回収実験で、同法は通知法に比べ 20 倍以上の回収率を示した。また、添加用とする菌液は  $10^3$  cfu / ml から  $10^9$  cfu / ml のいずれの濃度を用いることも可能であり、15%グリセリン加混合液として $-80^{\circ}\text{C}$ で保存することで作製後 1 年間は結果に影響を与えないことが確認された。さらに、*Proteus vulgaris* および *Klebsiella oxytoca* の標準菌株を用いた場合に高いノロウイルス回収率を示す結果を得た。

以上の検討結果を基に、市販生カキを対象としたノロウイルス検査を実施した。通知法ではいずれの検体からもノロウイルスは検出されなかったが、A3T 法では 102 検体中 19 検体 (18.6%) がノロウイルス陽性となり、それらは国内 6 県で採取されたものであった。この結果は、カキを対象とした ノロウイルス 検査における A3T 法の有用性に加え、国内におけるカキのノロウイルス汚染はこれまでの報告以上に存在している可能性を示したものである。

本研究で考案した A3T 法は、まったく新しい発想を基に開発した独自の手法であり、技術やコスト面等でほとんど新たな負担を必要としない実用的手法である。また、同法によりカキのノロウイルス汚染実態を明らかにしたことは、ノロウイルスによる新たな食中毒の発生や感染拡大の未然防止に対し貴重な知見を与えたと考えられる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

1) 題 目：細菌添加培養処理によるカキなどからのノロウイルス検出率の向上

著者名：秋場哲哉，田中達也，新井輝義，林志直，森功次，野口やよい，  
永野美由紀，吉田靖子，矢野一好

学術雑誌名：食品衛生学雑誌

巻・号・頁・発行年：49（6）：407－410，2008

2) 題目：細菌培養処理法(A3T法)による二枚貝からのノロウイルス遺伝子の検出

著者名：秋場哲哉，田中達也，永野美由紀，森功次，林志直，尾畑浩魅，  
千葉隆司，幾田泰久，神谷順子，仲真晶子，保坂三継，甲斐明美

学術雑誌名：食品衛生学雑誌

巻・号・頁・発行年：51（5）：237－241，2010

3) 題目：ノロウイルス検査における細菌培養処理法(A3T法)の市販カキを用いた  
実用化に向けた検討

著者名：秋場哲哉，永野美由紀，田中達也，森功次，林志直，甲斐明美

学術雑誌名：日本食品微生物学会雑誌

巻・号・頁・発行年：28（2）：128－132，2011

#### 既発表学術論文

1) 題目：比色法を用いたセレウス菌嘔吐毒のバイオアッセイ法に関する検討

著者名：秋場哲哉，千葉隆司，新井輝義，柴田幹良，井部明広，柳川義勢，  
甲斐明美，矢野一好，諸角 聖

学術雑誌名：日本食品微生物学会雑誌

巻・号・頁・発行年：22（3）：112－115，2005

2) 題目：LC-MSを用いたセレウス菌嘔吐毒産生試験に関する検討

著者名：千葉隆司，秋場哲哉，井部明広，新井輝義，池内容子，柴田幹良  
柳川義勢，矢野一好，諸角 聖

学術雑誌名：日本食品微生物学会雑誌

巻・号・頁・発行年：23（3）：137－142，2006

3) 題目：セレウス菌嘔吐毒検査法の比較検討

著者名：秋場哲哉，千葉隆司，新井輝義，池内容子，井部明広，柳川義勢  
甲斐明美，矢野一好，諸角 聖

学術雑誌名：日本食品微生物学会雑誌

巻・号・頁・発行年：23（4）：213－216，2006