

食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の開発

斎藤博之 東方美保^{*1} 田中智之^{*2} 武田直和^{*3}

食品検体からノロウイルス（NV）を検出するための実践的な手法としてパンソルビン・トラップ法（パントラ法）を新規に開発し、将来的な実用化の可能性を探るための検討を行った。本研究は新規開発段階であることから最近の流行で主流を占めている GⅡ/4 型に的を絞り、糞便で汚染させた食品からの NV 検出を試みた。本法を用いることで、50 ml の食品乳剤から簡便に 50 µl の RNA 抽出液を得ることができた。NV の回収率はポテトサラダで 78.04%、焼ソバで 15.17%、牛乳で 10.16%であった。実用化のためには改善すべき点が多々あるものの、これまでほとんど手が付けられてこなかった「カキ以外の一般的な食品」からの NV 検出法としての方向性を見出すことができた。

1. はじめに

ウイルス性食中毒の大部分をノロウイルス（NV）が占めることがわかっているにもかかわらず、原因として疑われる食品からウイルスを検出できた例はカキを除けば極めて稀少である¹⁻³⁾。その稀少な例においても、表面が平滑でウイルスの洗滌回収が容易な固形食品検体に限られているのが実情である。また、飲料水からウイルスが検出された集団感染事例は近年増えつつあるが^{4,5)}、これは、純粋な水の濃縮作業が比較的容易に行えるからである。一方で、食品検体を洗滌することによりウイルスを含む乳剤を得たとしても、多くの夾雑物のため PCR で用いる量まで減量濃縮するには多大な労力と時間とコストを要し、多検体を取り扱うのは事実上不可能である。

本研究は、こうした困難な状況を打開するために、固形、液状、練り物、油物などの一般的な食品から NV を検出する手法の開発を目的として、平成 19 年度より厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）「食品中のウイルスの制御に関する研究」において進められている^{6,9)}。さらに本研究では、単に検出することだけを追求するのではなく、できるだけ簡便で安価となるように工夫し、真に“使える”手法となることを目指している。

2. 方法

2.1 研究材料

汚染実験に用いる食品として、市販されているポテトサラダ、焼ソバ、及び牛乳を用いた。また、検出対象となる NV として、2006 年 12 月に秋田市で発生した食中毒事例で搬入された糞便（GⅡ/4

型、Accession No.: AB293424）を用いた。

2.2 試薬類

2.2.1 抗 GⅡ/4 血清

国立感染症研究所ウイルス第二部において、組み替えバキュロウイルスによって作成した NV 様中空粒子（VLP）をウサギに免疫したもの（ロット No.: 抗 104 ウサギ 971222、ホモ抗体価: 100 万倍）¹⁰⁾を用いた。

2.2.2 洗滌液

0.1%の Tween20 を含む PBS を用いた。

2.2.3 パンソルビン

黄色ブドウ球菌を熱処理後、ホルマリン固定して懸濁したもの（和光純薬）を使用した。

2.2.4 フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (invitrogen)を使用した。

2.2.5 RNA 共沈剤

エタ沈メイト（ニッポンジーン）を使用した。

2.3 パンソルビン・トラップ法の手順

基本的な操作の流れを図 1 に示した。糞便を DW で乳剤としたものの遠心上清で各種食品を汚染させ、同時に一部をオリジナルとして残した。汚染させた食品を洗滌液に懸濁させた後、3,000 rpm 20 分で固形物を除去した（このとき、上清が濁っていても問題は無い）。食品の遠心上清に抗血清を

*¹ 福井県衛生環境研究センター、*² 堺市衛生研究所、*³ 元国立感染症研究所

加えて NV と抗体の複合体を形成させ、そこにパンソルビンを加えることで、黄色ブドウ球菌表面に存在するプロテイン A に吸着した NV を回収した。NV を吸着した菌体を少量の DW で再懸濁したものを TRIzol-LS でフェノール抽出し、水層にエタ沈メイトを添加してイソプロピルアルコール

沈澱により RNA を回収した。回収した RNA は DW 50 μ l に溶解してリアルタイム PCR によって NV のコピー数を測定した。

食品のうち牛乳については、50 ml に糞便遠心上清を加え以後の操作を行った。抗血清添加量の検討のためには、PBS 50 ml に糞便遠心上清を加

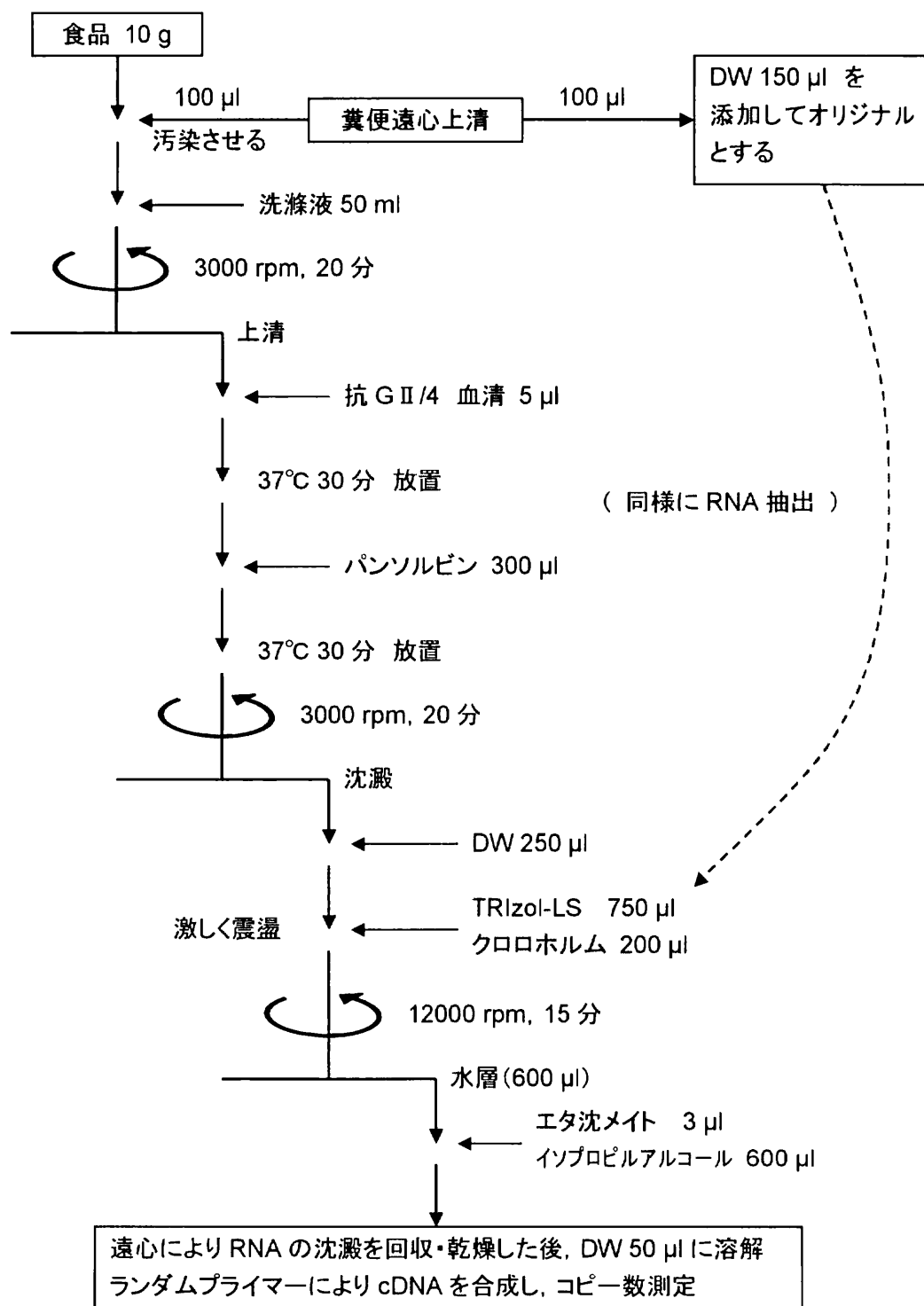


図1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

え、その後に添加する抗血清の量を1～50 μl の範囲で変化させて検討した。

2.4 コピー数の測定

cDNA の合成は、最終的に得られた RNA 抽出液 (50 μl) から 8.5 μl を取り、Random 9mer による逆転写により行った (反応容量 20 μl)。cDNA 溶液を 5 μl 取り、リアルタイム PCR¹¹⁾ で NV のコピー数を測定した。使用した機器はロシュ製「LightCycler 350S」

で反応容量は 20 μl である。

3. 結果

3.1 抗血清添加量の検討

図2及び表1に示したとおり、50 ml の PBS に対して、抗血清 2～50 μl を添加しても回収率に顕著な差は見られなかったが、1 μl を境に半減した。抗血清を加えなかった場合には NV を検出できなかった。

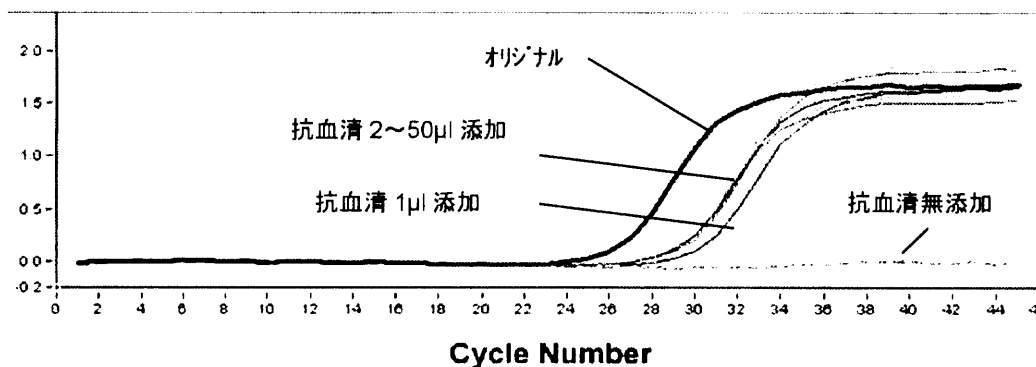


図2 抗血清添加量と回収率の関係 (増幅曲線)

表1 抗血清添加量と回収率の関係 (実測値)

添加量 (μl)	コピー/ μl *	回収率 (%)
0	N. D.	-
1	6.369E+02	8.78
2	1.377E+03	18.99
5	1.290E+03	17.79
10	1.461E+03	20.15
20	1.506E+03	20.77
50	1.426E+03	19.67
オリジナル	7.252E+03	

*図1の最終抽出物 (イソプロピルアルコール沈澱を DW 50 μl に溶解したもの) のコピー数

3.2 食品からの回収実験

固形食品については基本的に表面を洗滌した PBS を検査することになるため、ここでは処理がより困難と思われるポテトサラダ (練り物)、焼きそば (油物)、及び牛乳 (液状) について NV で汚染させてからの回収を試みた。結果は図3～5

(増幅曲線)、及び表2 (実測値) に示したとおり、ポテトサラダでは 78.04%、焼きそばでは 15.17%、牛乳では 10.16% の回収率であった。それぞれ、抗血清を加えないブランクを設定したが、いずれも非特異吸着の範囲と考えられる数値であった。

4. 考察

4.1 これまでの問題点の整理

これまで、カキ以外の一般的な食品検体からの NV 検出が困難であった主な理由には次のことがあげられる。

4.1.1 検体数の問題

1 食当たりの品目は 10～20 種類存在し、1 日 3 食 3 日分と想定すると、100 検体を超える場合もある。さらに、検便と違って一部を代表検体として検査して、他を省略するといった“間引き”は原則としてできない。一定範囲の食品をプールして検査するにしても、次で示す“検体量”の問題に直面する。

4.1.2 検体量の問題

食品検体を PBS 等で洗滌,あるいは懸濁して乳剤とした場合,その量は少なくとも 50 ml 程度に

なる。一方,PCR で用いる検体 (RNA 抽出液) は 50 μ l 程度であり,1,000 倍に相当する減量濃縮が必要である。

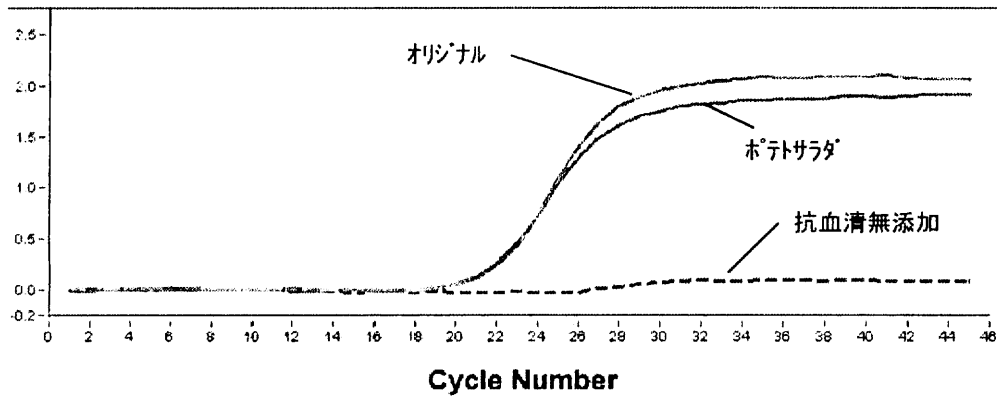


図3 ポテトサラダからの NV 回収実験 (増幅曲線)

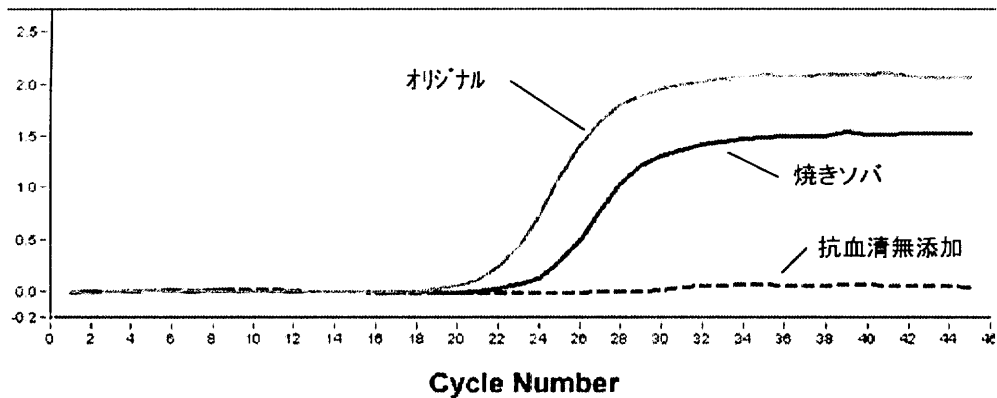


図4 焼ソバからの NV 回収実験 (増幅曲線)

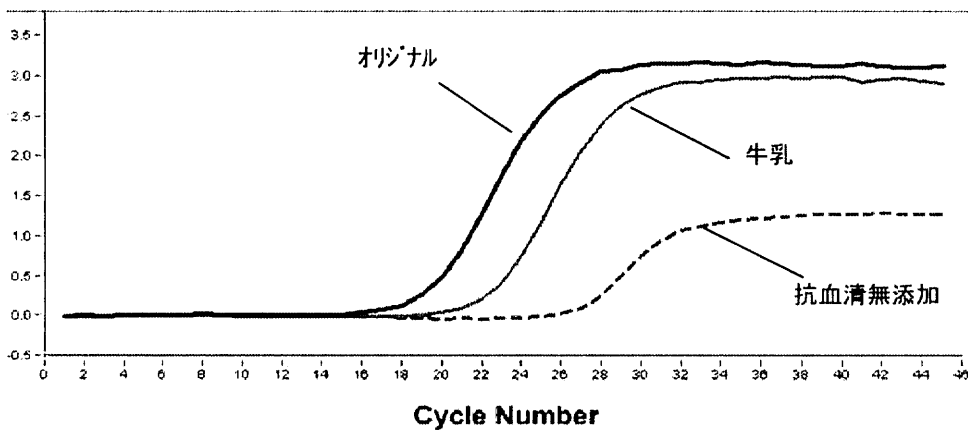


図5 牛乳からの NV 回収実験 (増幅曲線)

表2 食品からの回収率の比較（実測値）

食品	コピー/μl*	回収率 (%)
ポテサラダ [†]	1.418E+05	78.04
ブランク**	3.633E+02	0.20
焼きソバ	2.757E+04	15.17
ブランク**	1.519E+02	0.84
牛乳	7.351E+04	10.16
ブランク**	2.197E+03	0.30
オジナル	1.817E+05 (ポテサラダ, 焼きソバ)	
	7.236E+05 (牛乳)	

*図1の最終抽出物（イソプロピルアルコール沈澱をDW 50 μlに溶解したもの）のコピー数

**抗血清無添加

4.1.3 検体の質の問題

表面が平滑な固形食品では、PBS等で洗滌することで、比較的濁質の少ない形でNVを回収できる可能性がある。しかし、練り物や油物等をPBSに懸濁した場合は、遠心を繰り返しても上清は濁ったままであり、フィルターでろ過しても目詰まりを起こしてうまくいかない。また、現在のところ一応のスタンダードとされているPEG沈澱法を用いるとNVとは無関係の大量の沈澱が生じて困難をきたすことも多い。特に牛乳にPEGを添加した場合にはヨーグルト状に凝固するため、その後の操作はほぼ不可能になる。

4.1.4 労力・時間・コストの問題

PEG沈澱法は、原則としてオーバーナイトの処理が必要とされており、さらに10,000 rpm程度の遠心によって沈澱を回収しなければならない。しかし、50 mlの容量を10,000 rpmで遠心するには高速冷却遠心機のような大型機器を必要とし、遠心チューブも専用品を用いるようになっていくことが多い。こうした専用遠心チューブはディスポ使用を前提としていないため高価であるが、再利用することはPCRを行う関係上不安が残る。また、一般に“抽出キット”として市販されている試薬は、1 ml程度の検体量を想定して作られているため、

50 mlの食品乳剤に適用させるのは困難である。仮に適用した場合、1検体にかかる費用は高額となり、1事例当たり多数の検体が搬入される状況下での抽出キットの使用は現実的ではない。

4.2 パンソルビン・トラップ法の開発

パンソルビン・トラップ法（パントラ法）は、食品乳剤中にNVに特異的な抗体を添加することにより、抗原抗体複合体を形成させ、それを黄色ブドウ球菌表面のプロテインAに吸着させることで、菌体と共にNVを沈殿・回収しようという原理である。最大の特長は、食品乳剤が濁ったままでよいという点にある。図1において食品を懸濁した後で3,000 rpm 20分の遠心を行っているが、このとき用いる遠心機は一般の検査室にある常量のものであり、チューブもプラスチックのディスポ製品である。この遠心条件で沈澱する固形物だけを除去しておけば、上清は濁っていてもかまわない。その後の処理を進めていくとパンソルビンを添加した後に再び3,000 rpm 20分の遠心が行われるが、この条件で沈澱する食品由来の固形成分はすでに最初の遠心の際に除去されているため、NVを吸着した黄色ブドウ球菌だけが沈澱してくる。この段階で上清は濁ったままであるが、NVは菌体と一緒に沈澱の方に移行しているため、上清は捨ててよいことになる。菌体の沈澱を少量のDWで再懸濁してからRNA抽出を行えば、50 mlの食品乳剤から50 μlのPCRサイズのRNA溶液まで、効率良く減量濃縮できることになる。所要時間は10検体程度ならば約4時間（待ち時間、作業時間合計）であり、PEG沈澱法と比べてはるかに簡便である。リアルタイムPCRにより回収率を測定したところ、ポテサラダで78.04%、焼きソバで15.17%、牛乳で10.16%とバラつきが見られたが、食品の物理的形状によって最初の洗滌効率が異なるためある差が生じたと考えられる。回収率10%でリアルタイムPCRの検出感度を反応チューブ当たり10コピー/μlと仮定し、最終的に得られたRNA溶液の10分の1をPCRに用いた場合、理論上は食品1 g当たり100コピーのNVが存在すれば検出できることになる。Nested PCRを用いるならばもっと希薄な汚染でも検出できる可能性がある。また、操作が簡便であるため多検体を検査することができ、結果として事例ごとの検出効率は向上することが期待できる。

4.3 今後の検討課題

前述のとおり、パントラ法はこれまでのスタンダードであった PEG 沈澱法と比べて優れた簡便性を備えているため、食品からの NV 検出法として有望と考えられる。しかし、開発初期段階であるがゆえに改善すべき点も多くある。

4.3.1 検出精度の向上

同じ食品でも回収率がかなりバラつくため安定した検出条件を検討すること。

4.3.2 低濃度汚染への対応

開発当初の実験であるため数値評価の関係上、反応チューブ当たり $1.817 \times 10^5 \sim 7.236 \times 10^5$ コピー/ μl (食品 1 g 当たり $9.085 \times 10^5 \sim 3.618 \times 10^6$ コピーに相当) といった、現実の食中毒では考えにくい程の高濃度汚染検体を使用したため (表 2)、汚染度を下げた場合の評価が必要である。これまでにを行った検討では、汚染度が下がると回収率が悪くなる傾向がある^{7,12)}。前項の問題も含めて考えると、回収率には食品の洗浄液の組成、沈澱させた黄色ブドウ球菌からの RNA 抽出、さらには逆転写反応やリアルタイム PCR の条件まで多くの要因が関係しているため今後時間をかけて解決してゆく必要がある。

4.3.3 他の血清型への適用拡大

開発に着手した時点では検討事項を簡略化するために、流行の主流である GII/4 型を実験材料として用いたが、最終的には他の血清型へ適用拡大する必要がある。現在のところ国立感染症研究所で準備している NV に対する抗血清は、GI については 1, 2, 3, 4, 8, 11 型の 6 種で、GII については 1-8, 10, 12, 14, 15, 17 型の 13 種である。理論上はこれら 19 種類の抗血清をあらかじめ混合しておき、各々 100 倍になるように食品乳剤に加えれば目的は達成できると考えられる。ただし、添加する血清の量が増えるとパンソルビンのキャパシティを超える可能性もあるため、この点は改めてプロトコルを見直す必要がある。カタログデータではパンソルビン 1 μl 当たり 2.46 μg の Human IgG を結合する能力があるため、計算上は 300 μl の添加で 738 μg の Human IgG を結合させることができる。本法で用いている Rabbit IgG については Human IgG とほぼ同程度の親和性があるとされて

いるが、実際に確認する作業が必要である。

4.3.4 抗血清の安定供給

本法を用いるに当たって NV に対する抗血清が不可欠であるが、現在は研究目的で若干量が国立感染症研究所に保管されているに過ぎない。従って、行政検査等で本格的に利用するためには、必要なときに必要なだけの抗血清を入手できるような体制を整備する必要がある。また、抗血清の代わりにブロードバンドのモノクローナル抗体を利用することで、安定供給が容易になる可能性も考えられる。いずれの方法を取るにせよ、多くの研究機関の共同作業が必要のため、密接に連携した取り組みが必要になるであろう。

参考文献

- 1) 薬事・食品衛生審議会 食品衛生分科会食中毒部会：ノロウイルス食中毒対策について（提言），2007, 1-2.
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター，国立感染症研究所ウイルス第二部：ノロウイルス集団発生事例に対して感染症および食品部局が共同で実施する初期実地疫学調査および微生物学的検査のポイント（第 1 版：平成 19 年 11 月 18 日付け），2007, 16-17.
- 3) 丸山務（監修）：改訂 ノロウイルス現場対策，2007, 35-36.
- 4) M. A. Borchardt et al.: Incidence of enteric viruses in ground-water from Household Wells in Wisconsin. Appl. Env. Microbiol., **69**, 2003, 1172-1180.
- 5) 斎藤博之, 他：簡易水道が原因と考えられたノロウイルスの流行，病原微生物検出情報，**26**, 2005, 150.
- 6) 斎藤博之, 他：パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収，厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成 19 年度 総括・分担研究報告書，2008, 103-111.
- 7) 東方美保, 他：パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収（検討 2），厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に

関する研究 平成 19 年度 総括・分担研究報告書, 2008, 125-133.

- 8) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良(検討 1), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成 20 年度 総括・分担研究報告書, 2009, 27-38.
- 9) 東方美保, 他: パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良(検討 2), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成 20 年度 総括・分担研究報告書, 2009, 181-190.

10) Hansman GS et al.: Genetic and antigenic diversity among noroviruses. J. Gen. Virol., **87**, 2006, 909-919.

11) T. Kageyama et al.: Broady reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol., **41**, 2003, 1548-1577.

12) 東方美保, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収検討(1), 福井県衛生環境研究センター年報, 7, (in press) .