食品検体のノロウイルス検査に向けた パンソルビン・トラップ法の実用性向上に関する研究

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・トラップ法の開発を平成 19 年度から着手した。平成 21 年度は実用化に向けた問題点を洗い出し，それを解決するためのプロトコル改良を行った。その結果，全国的に汎用されているカラム方式の RNA 抽出キットに適用させることができ操作性が向上した。また，検出効率の再現性に影響を及ぼす主因となっている炭水化物の混入を抑える方法を取り入れることができた。さらに，低濃度汚染の検体であっても検出効率を維持することができるようになった。実際の検査局面を視野に入れて Nested PCR と組み合わせたところ，食品 1 g 当たり焼ソバで 13 コピー，ポテトサラダで 44 コピーまで検出が可能であった。本法を用いることでこれまで困難とされてきた一般的な食品から NV を検出することが可能となれば，食中毒事例発生時の原因食品解明に大きく寄与するものと考えられる。また，食品中のウイルスを検査する方法が広く普及することで調理従事者の衛生管理意識の一層の向上を促すことに繋がり，食中毒の抑止効果が期待できる。

1. はじめに

ウイルス性食中毒の大部分を占めるのがノロウイルス（NV）であり，対策として二枚貝の汚染実態調査や，調理従事者への衛生教育等が進められてきている[1-3]。しかしながら，一部に飲用水からの検出例が報告されているものの[4, 5]，一般的な食品からのウイルス検出は，その作業の困難さからこれまでほとんど検討されてこなかったため，具体的な汚染ルートの解明に決め手を欠いているのが実状である。こうした状況に対応するために，平成 19 年度より厚生労働科学研究班（食品の安心・安全確保推進研究事業）において検査法の開発が進められている[6-11]。平成 20 年度の本研究事業において，固形，液状，練り物，油物などの一般的な食品から NV を検出する手法としてパンソルビン・トラップ法を開発し，この問題を解決するための方向性を見出すことができた[6-9]。一方で，開発初期であるがゆえの課題も存在したため，今年度はより実用性を向上させるためのプロトコル改良を行った。

平成 20 年度の時点で残された課題は次の 4 つである。

①全国的に汎用されているカラムによる精製方式に合わせること。

②炭水化物の混入を抑えること。

③低濃度汚染検体での検出効率を向上させること。

④GⅡ/4 以外の血清型へ対応させること。

本稿では①～③について改良策を報告することとし，④については引き続き今後の研究課題とした。

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と焼ソバを用いた。また，検出対象となる NV として，平成 18 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）[12]を用いた。

2.2.2. 洗滌液

平成 20 年度は 0.1%の Tween20 を含む PBS を用いたが，本稿では改良の一環として 0.1%の Tween20 を含む Tris-HCl (pH 8.4) を用いた。

[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

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 再懸濁液

0.1% Na-Citrate (pH 4.2) を用いた。

2.2.5 フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (invitrogen) を使用した。

2.2.6 カラム方式の RNA 抽出キット

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を使用した。

2.2.7 逆転写反応エンハンサー

RTmate（ニッポンジーン）を使用した。

2.2.8 DNase I(RT Grade)及び RNase inhibitor

ニッポンジーンの製品を使用した。

2.2.9 アミラーゼ

α-Amylase Ultrapure（ニッポンジーン）を使用した。

2.2.10 食品処理袋

サニスペックテストバッグ（アズワン）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。平成 20 年度のプロトコルからの主な改良点は，次の通りである。本稿では，これらの改良に至った経緯について順次考察を加えていく。

①汚染食品を洗滌液で処理する際に，食品処理袋を使用し,その後の遠心を 30 分行うことで残渣を効率的に除去できるようにしたこと。

②TRIzol-LS によるフェノール抽出の後で，水層にエタノールを添加してそのまま QIAamp Viral RNA Mini Kit に移行できるようにしたこと。

③逆転写反応の前に DNase I と α-Amylase 処理を加えたこと。

④逆転写反応のプライマーを特異的プライマー（COG2F/R）に変更したこと。

2.4 NV の検出

cDNA の合成の前に,最終的に得られた RNA 抽出液（60 μL）から 8.5 μL を取り，DNase I 及び α-Amylase を各 1 μL，RNase inhibitor を 0.25 μL ，5×逆転写 buffer （逆転写酵素製品に添付されているもの）を 4 μL 加えた後，蒸留水で反応量を 15.5 μL とし，37℃ 10 分，65℃ 5 分のインキュベーションを行った。その後，特異的プライマー（COG2F/R），dNTP，RTmate，及び逆転写酵素を追加して cDNA を合成した（反応容量 20 μL）。特異的プライマーとして COG2F と COG2R の両方を加えたのは, 引き続いて行われる PCR の際にプライマーの非対称化を避けるためである。合成した cDNA 溶液を 5 μL 取り，Kageyama らのリアルタイム PCR 法 [13] で NV を検出した。使用した機器はロシュ製「LightCycler 350S」で反応容量は 20 μL である。

2.5 Nested PCR への応用

検出感度の向上策として，Nested PCR への応用の可能性を検討した。2.4 で示した方法の内，特異的プライマーを COG2F/G2-SKR に変更して逆転写を行い，cDNA 溶液を 5 μL 取って COG2F/G2-SKR を用いた通常の RT-PCR で予備増幅を行った。予備増幅産物を 5 μL 取り，リアルタイム PCR による判定を行った。この場合，機器にはコピー数が表示されるものの，定量性はないため定性と見なした（ゲル電気泳動後にハイブリダイゼーションによる確認を行ったのと同意義）。

3. 結果

3.1 RNA 抽出キットの比較

汎用されている RNA 抽出キットを糞便検査に用いた場合の増幅曲線を図2Aにおいて比較した。カーブの立ち上がりサイクル数はいずれもほぼ同じである。蛍光強度は糞便検体をそのままカラム精製した場合が最も高く，通常の糞便検査においては適切であることがわかった。一方，汚染されたポテトサラダを PBS で洗滌した後パントラ法を用いて回収した場合の増幅曲線を図 2B に示した。黄色ブドウ球菌の沈澱をキット添付の AVL buffer に懸濁した上清をカラムにそのままアプライしても増幅がほとんど認められず，何らかの改良が必要であることが見て取れる。平成 20 年度のプロトコルで用いたイソプロピルアルコール沈澱

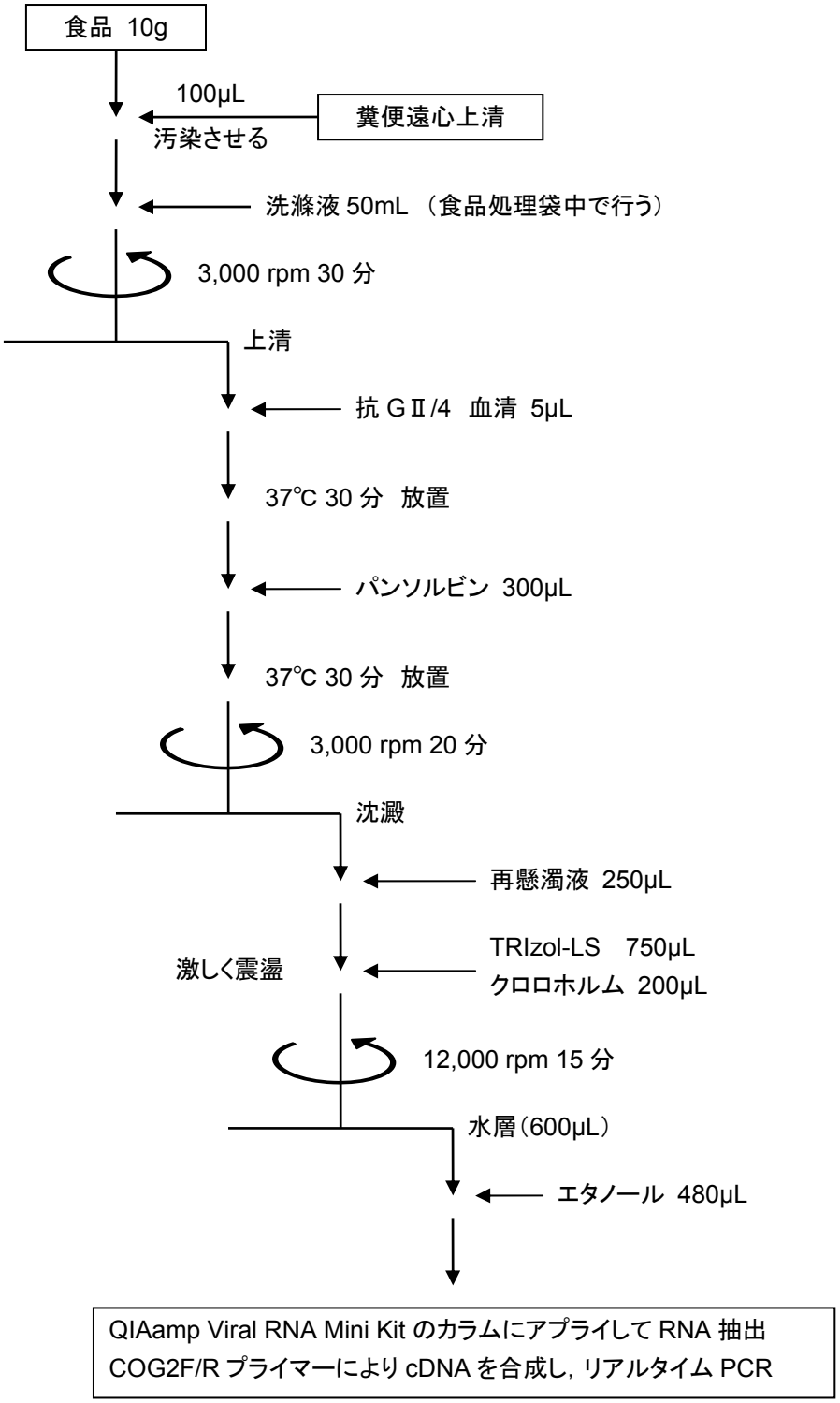

図１　パンソルビン・トラップ法の操作手順（Ver. 2）

による RNA 回収は蛍光強度が高いものの，立ち上がりサイクルに注目すると，TRIzol-LS で抽出した水層をカラムにアプライする方が早いのがわかる。コピー数として反映されるのは立ち上がりサイクルであるため，感度としては後者が優れている。ただし，蛍光強度が低いままでは低濃度汚染検体において不利になるため，その部分の改良を引き続き行った。

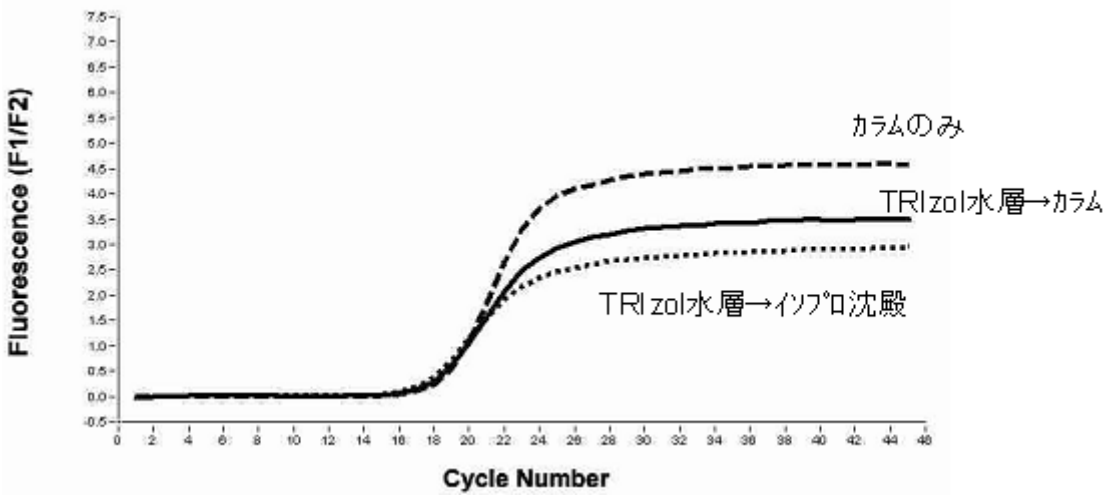

図 2A　糞便検体からの RNA 抽出方法の比較（増幅曲線）

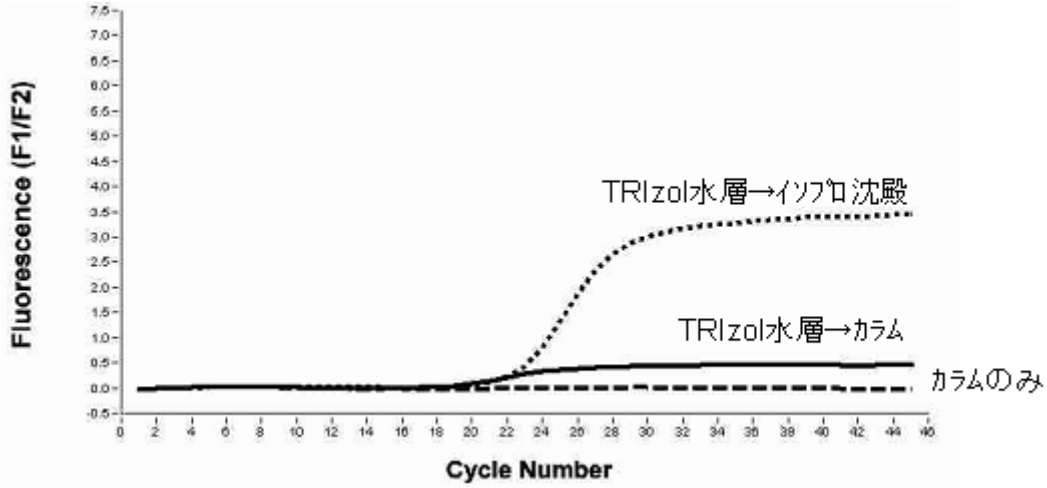

図 2B　パンソルビン沈殿（ポテトサラダ）からの RNA 抽出方法の比較（増幅曲線）

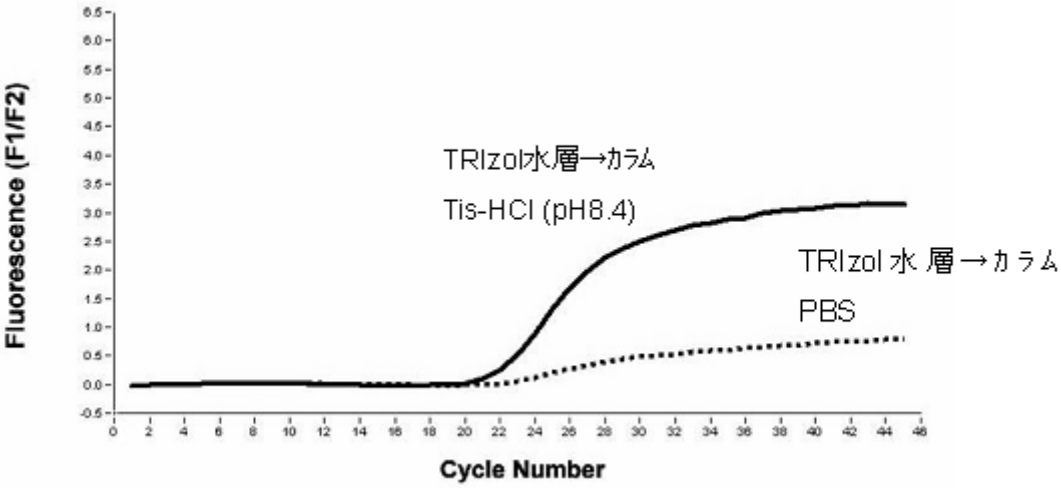

図 3A　食品洗滌液の比較（増幅曲線）

3.2 蛍光強度向上へ向けた改良

IgG とパンソルビン（Protein A）との親和性は pH に依存するため，最適条件である pH 8.4 の食品洗滌液を用いてポテトサラダからの回収実験を行ったのが図 3A である。PBS で洗滌した場合と比べて明らかに増幅曲線が改善されているのがわかる。次に逆転写反応の際に添加することで反応効率を向上させるエンハンサー（商品名：RTmate）を使用したのが図 3B である（食品洗滌液は pH 8.4 の Tris-HCl）。結果と

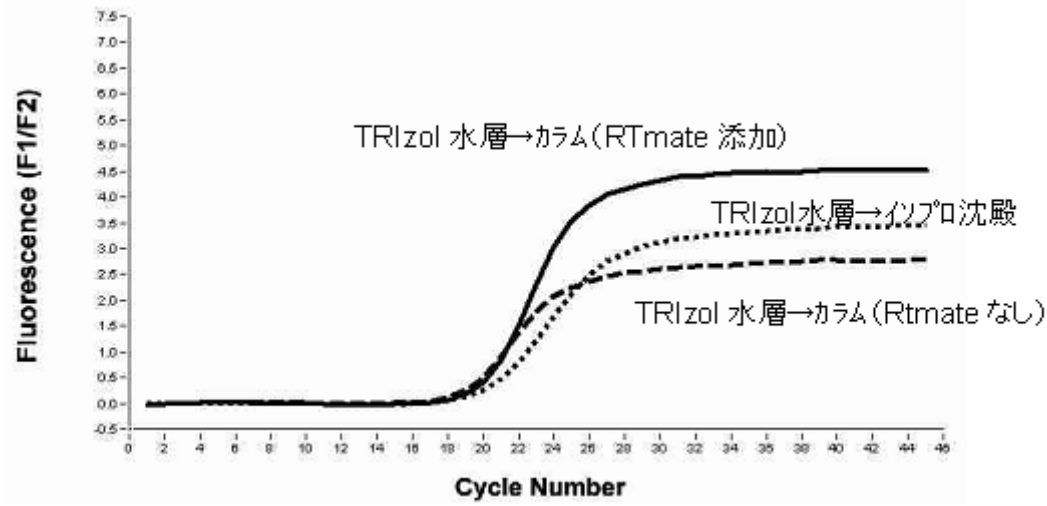

図 3B　逆転写反応エンハンサーの効果（増幅曲線）

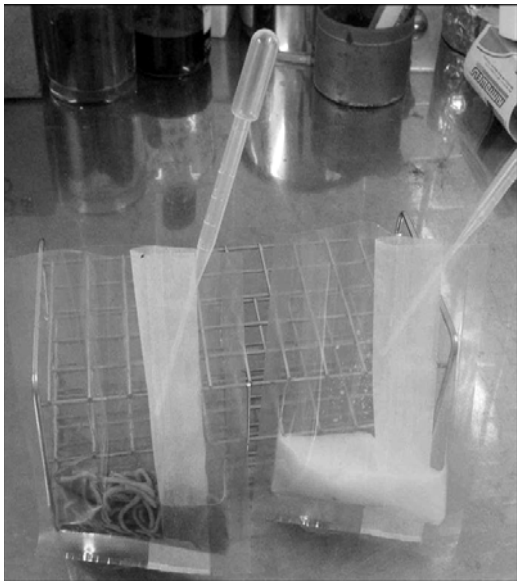

図 4A　食品処理袋による処理
（左：焼ソバ，右：ポテトサラダ）

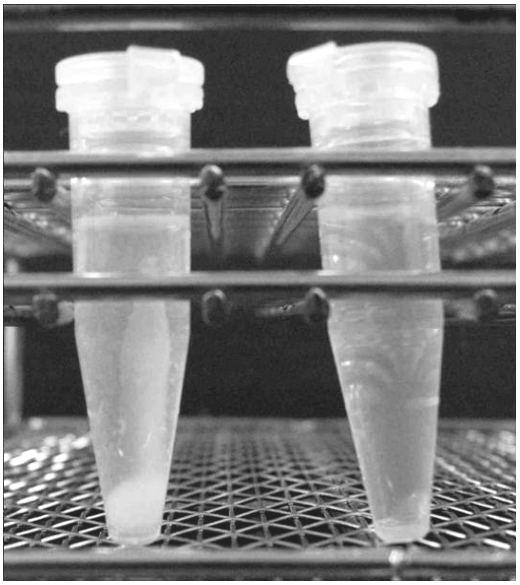

図 4B　食品処理袋使用による炭水化物除去試験

して蛍光強度がさらに増強され，図 2B と比較すると，イソプロピルアルコール沈澱の増幅曲線を上回っているのがわかる。以上のように，食品洗滌液を pH 8.4 の Tris-HCl に替え，逆転写時に RTmate を使用することで立ち上がりサイクルと蛍光強度の両方に優れた抽出法とすることができた。

3.3 炭水化物の混入対策

平成 20 年度からの検討において，同じ食品であるにもかかわらず，著しく検出効率が悪い場合があり，再現性の問題を解決する必要があった。原因として，食品に多く含まれる炭水化物は物理化学的挙動が核酸（ポリリボースが骨格となった複合多糖類）と同じであるため，精製過程で最後まで混入してくることが考えられる。そこで，次の 2 点において改良を加えた。

3.3.1 食品処理袋の使用

最初の洗滌過程で遠心とスポイト等による分取だけでは，食品残渣を除去しきれないため，その程度によっては検出効率に影響が及ぶ。そこで，食品を洗滌液で処理する際に専用の処理袋（図 4A）を用いることで，残渣の混入を最小限に抑えることとした。この袋は内部にフィルターが付いており，濾過された洗滌液だけをスポイトで取り出すことができるようにデザインされている。こうして回収した洗滌液を改めて 3,000 rpm 30 分遠心することで残渣を完全に除去できる。図 1 に示したプロトコルにおいて，

カラムにアプライする直前にエタノールを添加するステップがあるが，炭水化物の混入があるとここで沈澱が生じてしまう（図 4B）。この沈澱には核酸が共沈してくるため，安易に除去すると検出効率が落ちることになる。また，懸濁液のままカラムにアプライすると目詰まりを起こすことになる。カラムの説明書に記載されている条件（8,000，rpm 1 分）よりも強い条件（15,000，rpm 1 分）で遠心すると，とりあえずは最後まで精製作業を継続できるが，最終的な RNA 抽出液に大量の炭水化物が混入することにかわりはなく，その後の逆転写反応等に影響が出る。図 4C に示すとおり処理袋を使用することで蛍光強度が増大し，増幅効率向上に寄与しているのがわかる。

3.3.2 アミラーゼ処理

食品処理袋の使用により炭水化物を物理的に除去することが可能であるが，より完全な効果を得るため，逆転写反応直前に α-アミラーゼ処理を行った。この処理は，DNase I 処理と同時に行うことができるため，より精製度の高い RNA を得ることが期待できる。図 5A では効果を確認するために食品処理袋を使わない条件で（大量の炭水化物が混入している）アミラーゼ処理の有無による増幅曲線比較した。これによると，アミラーゼ処理によって増幅曲線が改善されているのがわかる。図 5B は食品処理袋を使用した場合におけるアミラーゼ処理の効果を見たものであるが，処理袋使用の段階で炭水化物のかなりの部分が除去できているため図 5A と比べるとその差は小さい。

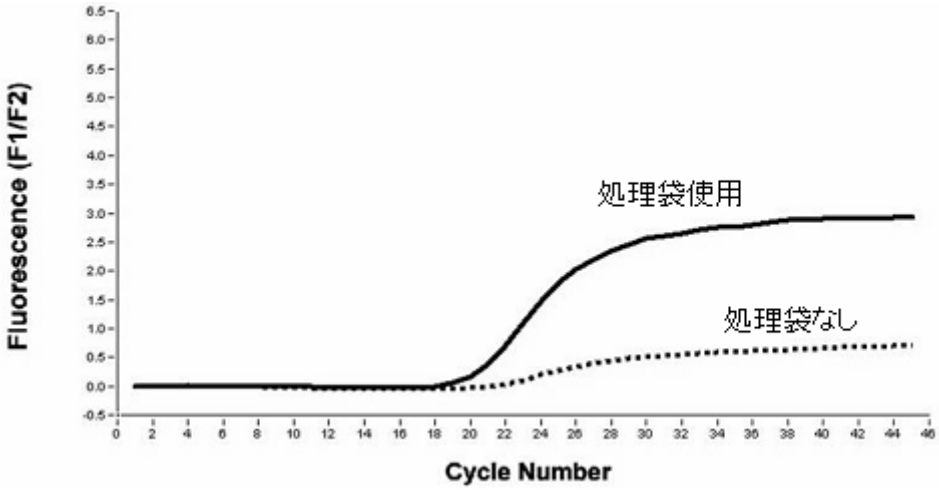

図 4C　食品処理袋の効果（ポテトサラダ）

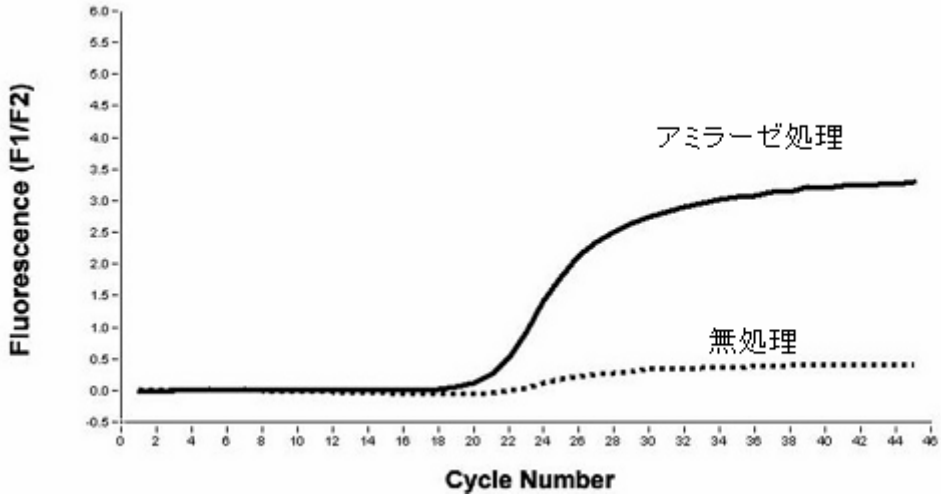

図 5A　アミラーゼ処理の効果（ポテトサラダ：処理袋なし）

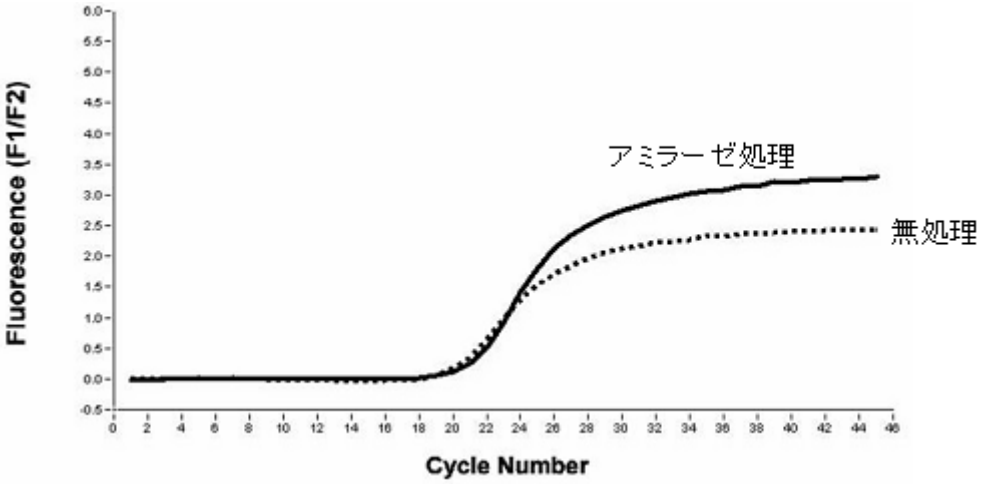

図 5B　アミラーゼ処理の効果（ポテトサラダ：処理袋使用）

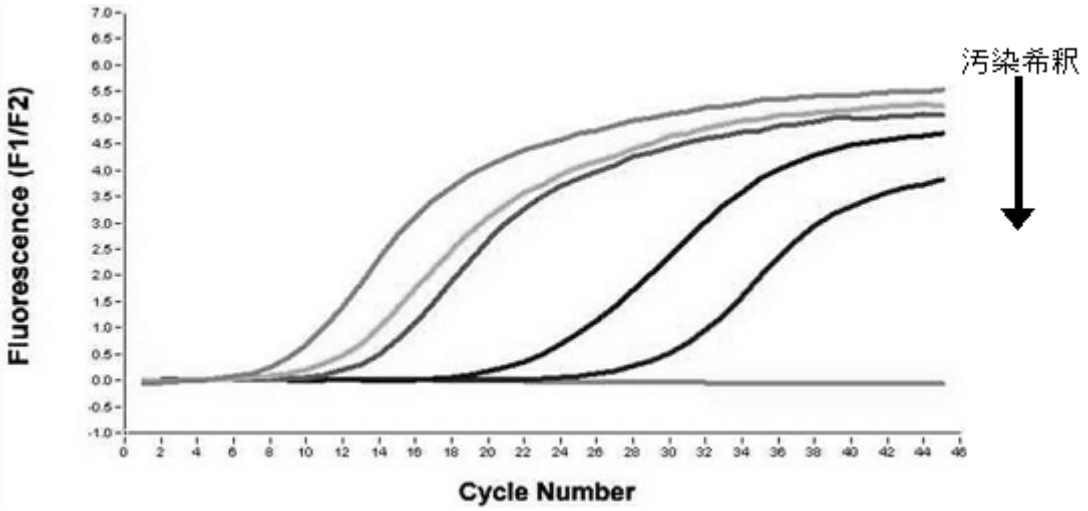

図 6　Nested PCR の例（焼ソバ）

3.4 Nested PCR への応用

パントラ法の開発段階では検出効率等を比較検討する必要があるために，抽出した RNA をそのままリアルタイム PCR で解析している。しかし，実際の検査に用いるようになれば，限界まで感度を高めるために Nested PCR を用いることも視野にいれておく必要がある。図 6 は汚染度を段階的に下げた焼ソバからパントラ法で抽出した RNA に対して Nested PCR を行った増幅曲線である。機器に表示されるコピー数そのものは定性と見なすものの，オリジナルの糞便に含まれる NV のコピー数と希釈率から計算した理論上の検出限界は，焼ソバで 13 コピー/g 食品，ポテトサラダで 44 コピー/g 食品であった。

4. 考察

4.1 昨年度における課題とその改良

4.1.1 カラムによる抽出方式への対応

開発の初期段階では黄色ブドウ球菌の沈澱から NV の RNA を抽出する際に TRIzol-LS 等のフェノール抽出系の試薬で処理し，最後にイソプロピルアルコール沈澱によって回収する方法を用いていた。この方法でも一定の効果は認められたが，作業をより簡便化するために全国的に汎用されているカラム方式のキットへの対応を検討した。図 2A と図 2B を比較すると，糞便検体で最適な方法がパントラ法でも最適とは限らないことがわかる。また，評価すべきファクターとしてこれまではコピー数のみに注目してきたが，それは増幅曲線の立ち上がりサイクル数のことであり，見かけ上のコピー数が多くとも蛍光強度が低い場合もあることが図 2B から見て取れる。高濃度汚染では検出効率が高くとも，少し汚染度を下げるだけで検出できなくなるケ

ースはここに原因があるものと考えられる。図3A と図 3B に示したとおり，食品洗滌液の pH を Protein A の最適条件である 8.4 とし，さらに逆転写反応のエンハンサーを用いることで，検出効率を落とすことなくカラム方式に適合させることができた。

4.1.2 炭水化物の混入対策

炭水化物は核酸と同じ挙動を示すため,除去が困難で結果に影響を及ぼすことは以前から知られていた。したがって，同じ食品であっても炭水化物混入の程度によって再現性に問題が生じることとなる。本研究では，最初の洗滌段階で専用の食品処理袋を使用することで食品残渣を取り除く方法（図 4A，4B，4C）と逆転写反応直前にα-アミラーゼによって混入した炭水化物を分解する方法（図 5A ，5B）について検討した。両者とも効果が認められたが,実用化にあたっては併用することでさらなる検出効率の向上が期待できるものと考えられる。

4.1.3 低濃度汚染検体への対応

平成 20 年度の研究では，汚染度が下がるほどパントラ法における検出効率が漸減し，従来の PEG 沈澱法の方が良い成績となる場面があった。逆転写時のプライマーをランダムプライマーから特異的プライマーに変更することでこの問題を解決することができた [11)]。

本稿では,別の視点から Nested PCR に相当する手法について検討を行った（図 6）。あらかじめ，通常の PCR で予備増幅（1st. PCR）を行って,その産物をリアルタイム PCR で解析する方法で，定性試験と割り切ることで，ゲル電気泳動をハイブリダイゼーションで確認したのと同等の効果が見込めるものと考えられる。コピー数が既知の糞便を段階希釈して検出限界を調べたところ食品 1 g 当たりに換算して，焼ソバで 13 コピー，ポテトサラダで 44 コピーの汚染まで検出可能であった。平成 19 年 7 月 18 日付けで，薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会へ提出するための資料としてのアンケート調査が実施されたが，その中で定量値が回答されていたものもあり,生カキで 36.4, 38.8, 64.6 コピー/g となっている。したがって，パントラ法と Nested PCR を併用することで一般の食品であっても生カキに相当する検出効率が期待できるものと考えられる。

4.1.4 GⅡ/4 以外の血清型へ対応

開発段階においては状況を単純化するためにGⅡ/4 型に的を絞ったが，実用化のためには他の血清型にも幅広く対応させる必要がある。この場合,糞便検査で型を決定してから食品を検査するといったプロセスは時間がかかり過ぎるため行政対応としては現実的ではない。最初の段階で多くの血清型の NV に対応するためには次の 2 通りの方法が考えられる。

①ブロードバンドのモノクローナル抗体を用いる方法:生産と安定供給は比較的容易であるため第一に検討すべき方法である。ただし，Rabbit IgG に比べて Mouse IgG はパンソルビンに対する親和性が弱いため処理条件等を調整する必要がある。

②現在のところ感染研で準備している 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。理論上はこれらの 19 種類の抗血清を混合使用すれば目的は達成できる。Rabbit IgG であるため，処理条件等は現行のままで問題ないが，全国的な普及を視野に入れた場合，安定供給に不安が残るのも事実である。

4.2 パントラ法の今後の展開

残された課題としては他の血清型への対応が主眼となり，今後は基本的にはブロードバンド・モノクローナル抗体の使用を検討してゆく。本法は添加する抗体さえあれば NV 以外にも適用可能であるため，サポウイルスや HAV などにも用いることができると考えられる。また，実際に食品検査に用いるようになった場合の効果として，出荷前検査はいかに本法をもってしても限界があり現実的ではない。しかし，食品中のウイルスを検査する本法が広く普及することは，調理従事者の衛生管理意識の一層の向上を促すことに繋がり，食中毒の抑止効果が期待できると考えられる。

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**, 2, 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**, 6, 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: 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, 秋田県健康環境センター年報, **4**, 2008, 75-81.

9) 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（第 1 報）, 福井県衛生環境研究センター年報, **7,** 2008,　69-72.

10) 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.

11) 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.

12) G.S.Hansman, et al.: Genetic and antigenic diversity among noroviruses,　J. Gen. Virol., **87**, 4, 2006, 909-919.

13) T. Kageyama et. al.: Broady reactive and highly sensitive assay for Norwalk-lile viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR, J. Clin. Microbiol., **41**, 4, 2003, 1548-1577.