

パンソルビン・トラップ法による食品中のノロウイルス検査法の構築

斎藤博之 東方美保*¹ 田中智之*² 野田 衛*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）の開発を平成 19 年度から進めている。本稿では利便性向上に加えて GⅡ/4 以外の血清型への対応を視野に入れ、それに必要なプロトコル改良を行ったので報告する。食品を超音波処理することで、NV を洗い出す操作に一定の基準を設けることができ、特に油を多く含む食品に対して有効であった。また、 α -Amylase による前処理を行うことで RNA 抽出液の凍結保存中に炭水化物の沈澱が生じるという問題を解決できた。食品洗滌液を改良することで、パンソルビンの結合性が向上し、プール血清やブロードバンド・モノクローナル抗体の使用が可能となった。今後はこれらの抗体の生産・安定供給体制の確立が新たな課題となった。本法を用いることで一般的な食品から NV を検出することが可能となれば、食中毒発生時の原因究明のみならず、汚染経路に関するデータの蓄積を通して予防対策にも貢献できるものと考えられた。

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。平成 19 年度から取り組んでいる本研究では⁶⁻¹³⁾、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（パントラ法）を開発し、この問題を解決するための糸口を見出すことができた。平成 20 年度までの研究でパントラ法の基本プロトコルはほぼ完成したが、平成 21 年度はより汎用性を向上させるために、GⅡ/4 以外の血清型に対する適用を中心に改良を行った。本稿における改良点は次の 4 点に集約される。

- ①油を多く含む食品では油滴に NV が包埋されて検出効率が落ちる可能性があるため、その対策。
- ②炭水化物混入対策の強化。
- ③ブロードバンド・モノクローナル抗体使用のための条件検討。
- ④プール血清を使用することによる、様々な血清型への対応。

①②は利便性向上、③④は多種類の血清型への対応に関する検討である。

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と焼ソバを用いた。また、検出対象となる NV として、秋田県内の集団感染事例において搬入された保存糞便検体を用いた。次のとおり Accession No. と採取年月を示す。

GⅡ/4 型: AB293424, 2006 年 12 月

GⅡ/5 型: AB448707, 1993 年 3 月

GⅡ/18 型: AB083780, 1995 年 11 月

GⅠ/8 型: AB448734, 2008 年 6 月

2.2 試薬類

2.2.1 抗 NV 血清

国立感染症研究所において、ウイルス様人工粒子（VLP）から作製したウサギ免疫血清 19 種（抗 GI/1, 2, 3, 4, 8, 11 GⅡ/1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 17）¹⁵⁾を単味、またはプール血清として用いた。

2.2.2 抗 NV ブロードバンド・モノクローナル抗体

堺市衛生研究所で樹立したハイブリドーマから得られたマウス腹水 4 種類（MAb#22 : broad, MAb#23 : broad, MAb#14 : GⅡ specific, MAb#3912 : GⅠ specific）を混合して用いた。

*¹ 福井県衛生環境研究センター、*² 堺市衛生研究所、*³ 国立医薬品食品衛生研究所

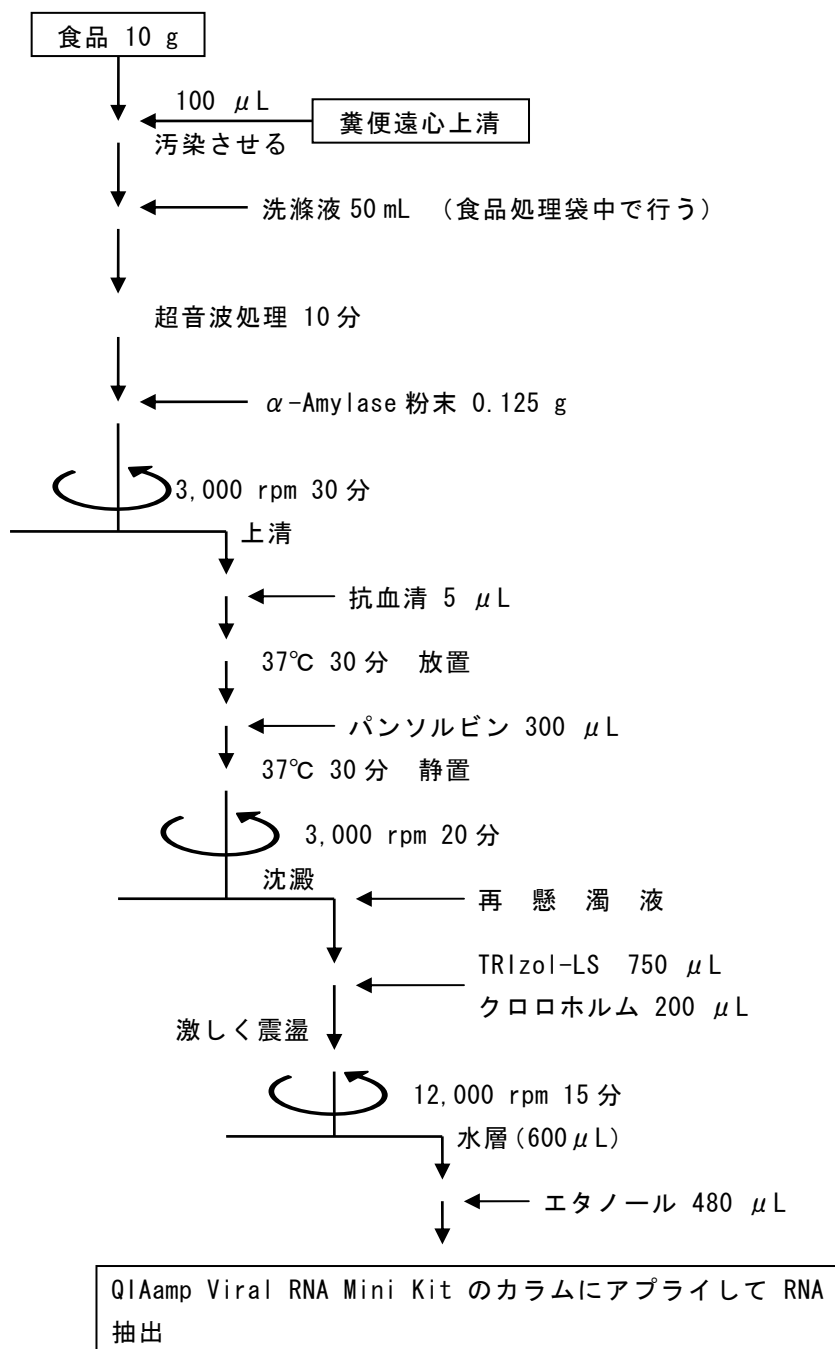


図1 パンソルビン・トラップ法の操作手順 (Ver. 3)

2.2.3 食品洗滌液

Tris-HCl (pH8.4) - 0.5M NaCl - 0.1% Tween20

2.2.4 パンソルビン

黄色ブドウ球菌を熱処理してホルマリン固定したものゝ懸濁液で、メルク社から購入

2.2.5 再懸濁液

0.1% Na-Citrate (pH4.2)

2.2.6 フェノール系 RNA 抽出キット

TRIZOL-LS (invitrogen)を使用

2.2.7 カラム方式の RNA 抽出キット

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を使用

2.2.8 逆転写反応エンハンサー

RTmate (ニッポンジーン) を使用

2.2.9 DNase I (RT Grade) 及び RNase inhibitor

ニッポンジーンの製品を使用

2.2.10 アミラーゼ

前処理用：枯草菌由来 α-Amylase 粉末 (和光純薬) を使用

後処理用：α-Amylase Ultrapure (ニッポンジーン) を使用

2.2.11 食品処理袋

サニスペックテストバッグ (アズワン) を使用



図 2A 超音波処理の実際



図 2B 超音波処理後の乳化
(左から無処理・3分・10分)

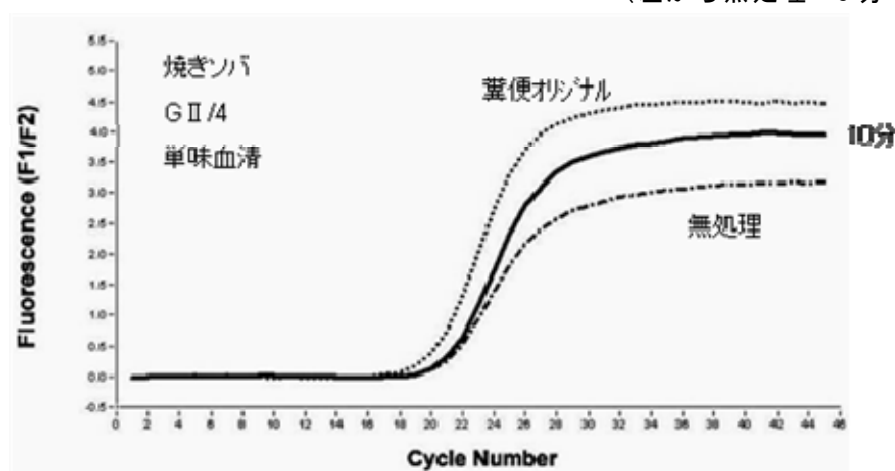


図 2C 超音波処理による回収率の比較 (増幅曲線)

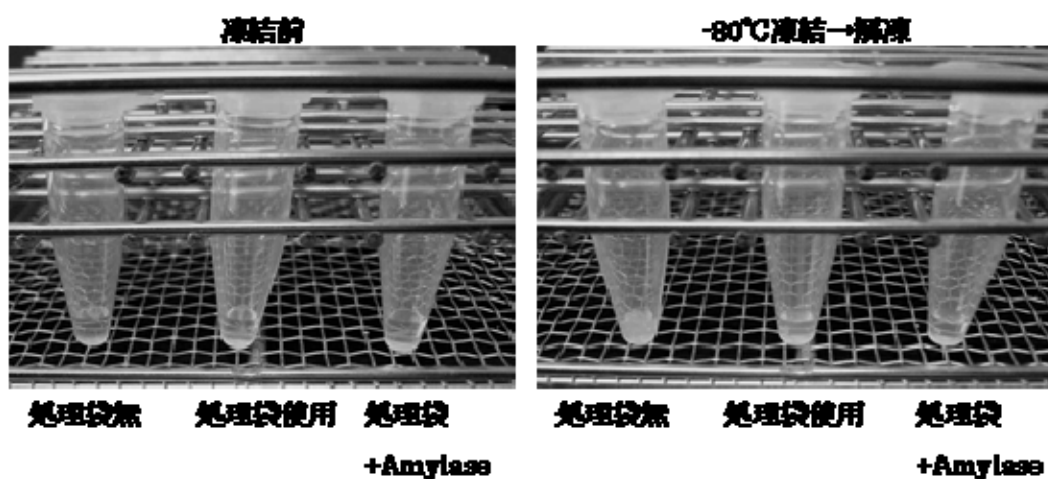


図 3A 凍結保存後の炭水化物の沈澱

2.3 パンソルビン・トラップ法の全体の手順

基本的な操作の流れを図1に示した。なお、プール血清とモノクローナル抗体使用時にはプロトコル全体を 1/10 にスケールダウンして検討を行った(再懸濁以降は通常スケール)。前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食品から NV を効率的に遊離させることができるように超音波処理を加えた(図 2A)。
- ②前年度の研究では、フィルター付きの食品処理袋を用いて PCR の阻害物質である炭水化物を

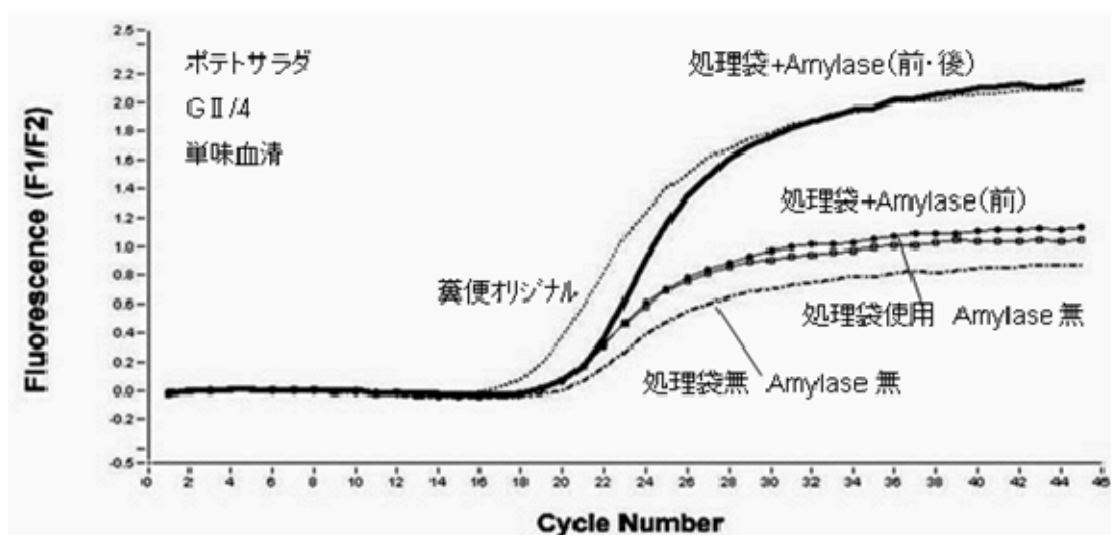
図 3B α -Amylase 処理の効果（増幅曲線）

表 1 IgG の Protein A への結合性（生化学データブック（東京化学同人）より抜粋）

動物種	サブクラス	生理的条件下での結合性
ウサギ	IgG (1 種類)	+++
マウス	IgG ₁	+
	IgG _{2a}	+++
	IgG _{2b}	+++
	IgG ₃	+++
ヒト	IgG ₁	+++
	IgG ₂	+++
	IgG ₃	+
	IgG ₄	+++
モルモット	IgG (1 種類)	+++
ラット	IgG ₁	++
	IgG _{2a}	—
	IgG _{2b}	—
	IgG _{2c}	+++
ニワトリ	IgG (1 種類)	—
ヤギ	IgG ₁	—
	IgG ₂	+++

効率的に除去できるようになった^{10,12)}が、最終的に得られた抽出 RNA を凍結保存してから解凍すると沈澱が生じることがわかった(図 3A)。混入対策を強化するため、処理途中で粉末の α -Amylase を添加した。途中から添加するのは、 α -Amylase 粉末には不溶性成分が含まれていることと、超音波処理による失活を避けるためである。

③モノクローナル抗体の実体を成すマウス IgG はいくつかのサブクラスに分かれており、その大半を占める IgG1 は Protein A（パンソルビン）への親和性が弱いことがわかっている(表 1)。抗血清の成分であるウサギ IgG についても、プール血清使用時には大量の IgG を結合させる必要がある。この問題の解決のため食品洗滌液に 0.5M となるように NaCl を添加した。

2.4 NV の検出

cDNA 合成の前に、最終的に得られた RNA 抽出液 (60 μ L) から 8.5 μ L を取り、DNase I 及び α -Amylase Ultrapure を各 1 μ L, RNase inhibitor を 0.25 μ L, 5 $\times$ 逆転写 buffer (添付) を 4 μ L 加えた後、蒸留水で反応量を 15.5 μ L とし、37 $^{\circ}$ C 10 分、65 $^{\circ}$ C 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 μ L)。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 μ L 取り、Kageyama らの Real-time PCR 法¹⁶⁾で NV を検出した。使用した機器はロシュ製「LightCycler 350S」、及び「LightCycler 480」で反応容量は 20 μ L である。

3. 結果

3.1 超音波処理の効果

油の多い食品の代表として焼きそばを用いて、図 2A に示すとおり食品処理袋を超音波洗浄機に浸漬した。処理後の食品検体の状態を図 2B に示したが、処理時間が 3 分、10 分と延びるに従って、油成分が洗滌液と混じりあい、機械的乳化に至っているのがわかる。図 2C に示した Real-time PCR の増幅曲線のコピー数から算出した回収率は、無処理の場合で 37%、10 分処理で 46%と改善された。

3.2 α -Amylase による前処理の効果

平成 20 年度の本研究において、抽出した RNA から cDNA を合成する段階で α -Amylase 処理を行うことにより、検出効率が向上することがわかった^{10,12)} (便宜上 “後処理” と呼ぶ)。しかし、抽出した RNA を -80 $^{\circ}$ C で凍結保存し、後日検査を再開しようとした際に、炭水化物の沈澱が新たに生じてくるという問題があった。食品処理袋を使用することで、一定の改善は見込めたが、精製カラムの目詰まりを防止し RNA を適切に保存するために、プロトコルの早い段階での α -Amylase 処理 (便宜上 “前処理” と呼ぶ) を検討した。プロトコルの最初に用いるという性格上、処理量が多く (50 mL) なるため、枯草菌由来の廉価な粉末を使用し、超音波処理で

酵素活性が失われないように、途中で添加するようにした。また、この粉末は不溶性成分を含むため完全には溶解しないが、3,000 rpm 30 分の遠心で食品残渣を除去する段階で一緒に沈澱するため問題はない。図 3A では α -Amylase 前処理の効果を比較するため凍結保存した RNA の濁りを観察した。凍結前の RNA 抽出液は処理袋や α -Amylase 前処理の有無に関わらず透明であった。処理袋を使わなかった場合には、大量の炭水化物が混入し、たとえ一部が精製カラムで除去されたとしても最後まで残留し、凍結後にはそれが顕著に現れた (沈澱が生じた)。食品処理袋を使用すると、相当な改善が認められたが、それでも凍結後の濁りは少し残っていた。 α -Amylase 前処理を行った場合には凍結後も濁りは観察されなかった。

図 3B には増幅曲線を示したが、ここでの回収率は、処理袋も α -Amylase も一切用いなかった場合が 13%、処理袋を用いた場合が 23%、処理袋を用いて α -Amylase 前処理を行った場合が 25%であった。cDNA 合成時に α -Amylase 後処理を追加すると、回収率は 30%となり、同時に蛍光強度も約 2 倍になった。

3.3 NaCl 添加による IgG とパンソルビンの結合性向上

パントラ法を用いるためには抗血清の安定供給が不可欠であるが、将来的にはブロードバンド・モノクローナル抗体の使用も視野に入れておく必要がある。表 1 には動物種ごとの IgG と Protein A との結合性を示した。抗血清を用いる場合はウサギ IgG であるため、結合性そのものには大きな問題は生じない。しかし、モノクローナル抗体はマウス IgG であり、サブクラスが IgG1 (割合が最も高い) であった場合には結合性が弱いことが問題となる。ハイブリドーマ選択の際に IgG2a や IgG2b 等の他のサブクラスのもののが得られればよいが、スクリーニングの優先順位がブロードバンドでの反応性であることから、それを望むのは難しい。本研究で用いたモノクローナル抗体も 4 種類全てが IgG1 である。そこで、マウス IgG1 であっても Protein A へ結合するような条件を検討したところ、「免疫グロブリン G のプロテイン A への結合方法」という発明名称で Bio-Rad 社が特許を保有して

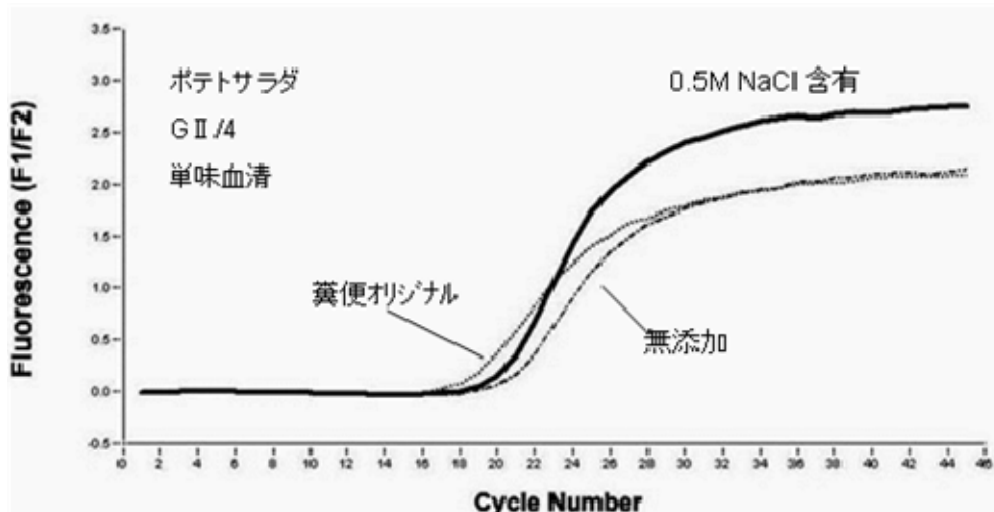


図4 食品洗滌液へのNaCl添加の効果（増幅曲線）

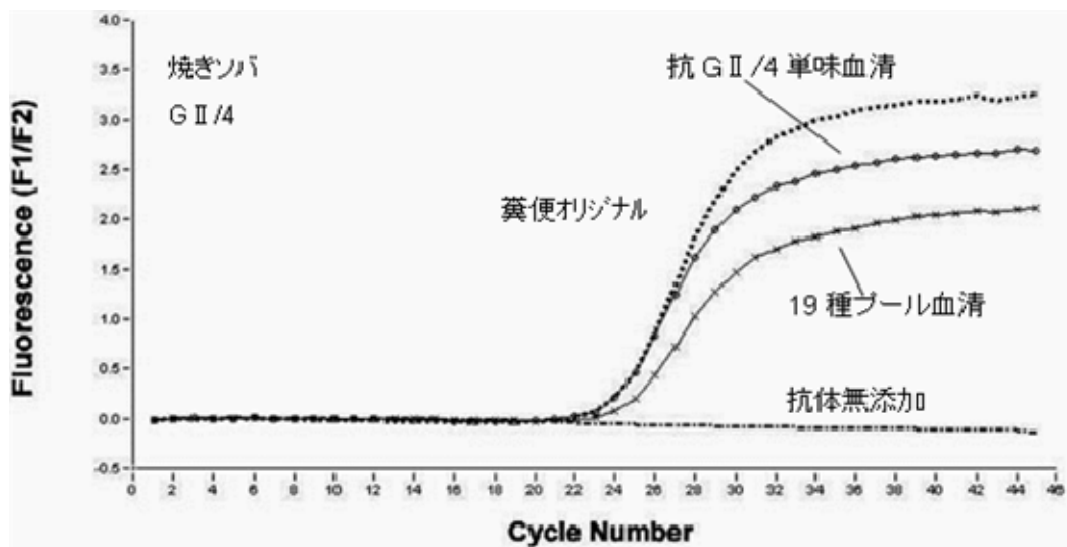


図5A GII/4型による汚染食品からのNV回収（増幅曲線）

いることがわかった（公開特許公報 昭61-12631）。ただし、この特許は期限が切れているため現在では自由に使用できることになっている。特許の記載内容はNaClを添加することでマウスIgG1であってもProtein Aと結合させることができるというものであった。また、ウサギIgGであっても結合性が増すため、プール血清等を用いる際のパンソルビンのキャパシティ向上も期待できる。一方で、この特許は、IgGとProtein Aの結合に関してのみ記述されており、パンソルビンという菌体を用いることは考慮されていない。従って、NaClの濃度を高くすることでIgGとProtein Aの結合性は増すにせよ、食品洗滌液の比重が高くなり遠心してもパンソルビンが沈澱しないという事態が起こり得た。本研究ではNaClを終濃度0.5 Mで用いるようにしているが、1.0 Mを用いたところ 3,000

rpm 20分の遠心ではパンソルビンの沈澱が不十分であった。

図4はこれまでの検討に用いてきた抗 GII/4 単味血清を使った実験系において、NaClの効果と比較したものである。食品洗滌液にNaClを加えない状態での回収率は29%であったが、0.5M NaCl存在下では42%に向上し、蛍光強度も増大した。

3.4 プール血清への応用

NaClを食品洗滌液に添加することで、パンソルビンのキャパシティ向上が期待できたため、19種類の抗血清を各5 μLずつプールして回収実験を行った結果を図5Aに示した。焼きソーバを GII/4 型の NV で汚染させたものを被検体とした場合の回収率は抗 GII/4 単味血清では92%、19種プール血清では55%であった。同様に GII

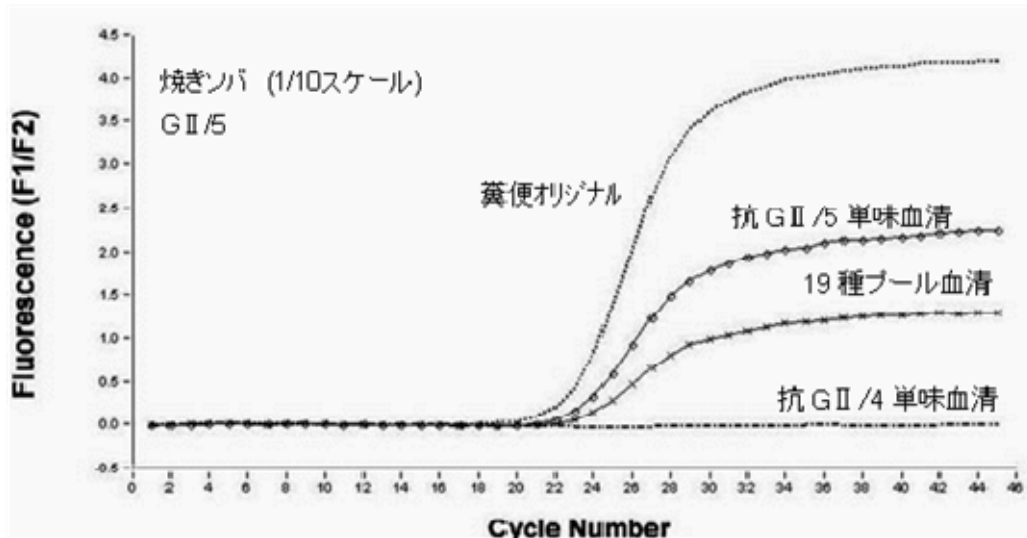


図 5B GII/5 型による汚染食品からの NV 回収（増幅曲線）

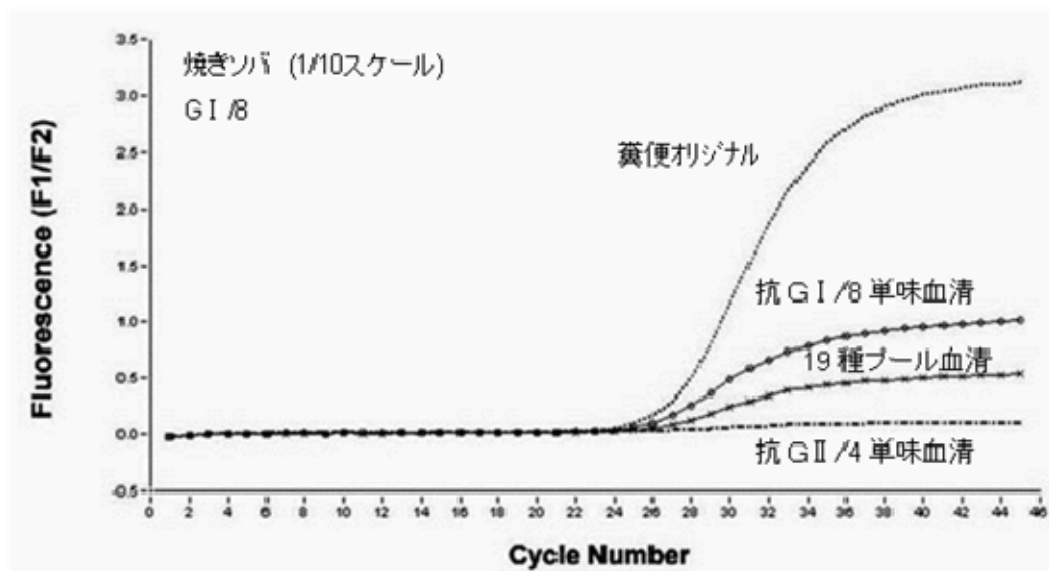


図 5C GI/8 型による汚染食品からの NV 回収（増幅曲線）

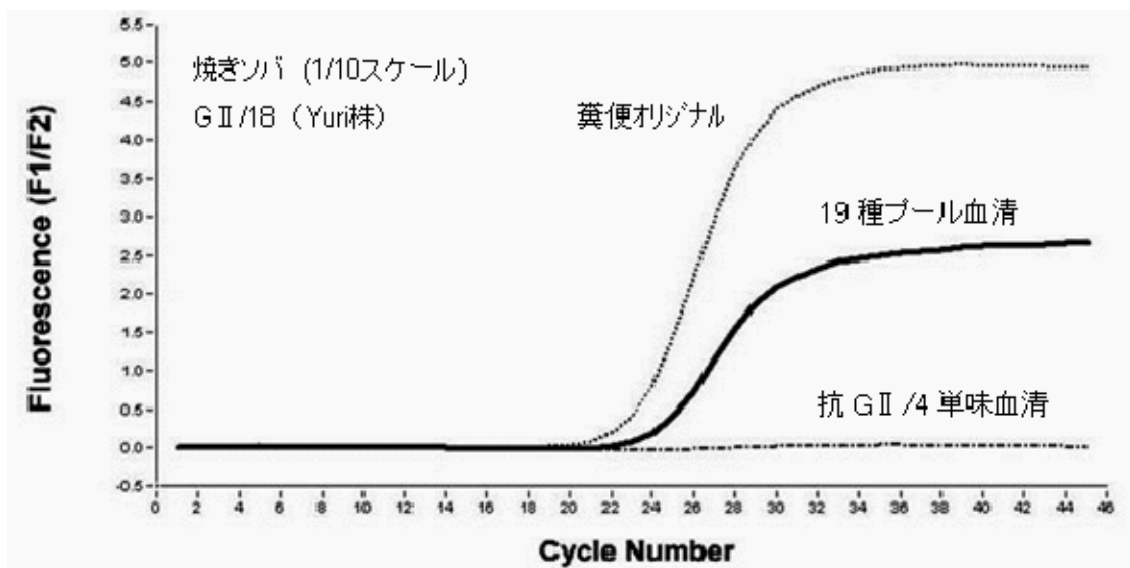


図 5D GII/18 型（Yuri 株）による汚染食品からの NV 回収（増幅曲線）

表 2 プール血清による NV の回収率 (%)

NV	抗血清	抗 G II /4 単味	抗 G II /5 単味	抗 G I /8 単味	19 種プール
G II /4		92			55
G II /5		N.D.	35		18
G I /8		N.D.		41	13
G II /18 (Yuri 株)		N.D.			27

・図 5A～図 5D の増幅曲線から算出した。G II /4 は通常スケール (図 1), 他は 1/10 スケールによる検討を行った。

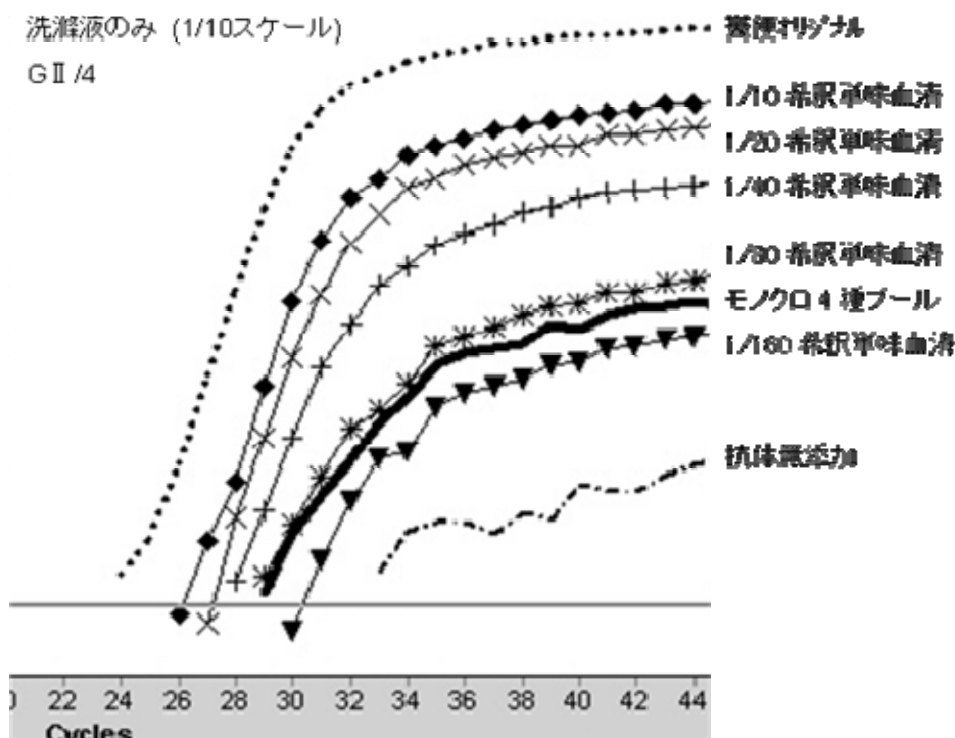


図 6 段階希釈した単味血清とモノクローナル抗体の比較 (増幅曲線)

・実験スケールは 1/10 (全量 5 mL) で行った。単味血清は各希釈液を 5 μ L, モノクローナル抗体は腹水を 4 種類とも 50 μ L 添加した。

/5 型と G I /8 型, 及び抗血清プールには含まれないが G II /18 型 (Yuri 株) を用いた回収実験結果を図 5B～5D に示した。この 3 株については, 抗血清を節約するため 1/10 スケール (洗滌液 5 mL, 抗血清各 0.5 μ L, パンソルビン 30 μ L) で行った。表 2 に回収率を比較したが, 単味血清と比べるとプール血清では半分～1/3 程度の数値となった。G II /18 についてはプール血清に含まれていないものの 27% の回収率が得られた。

3.5 モノクローナル抗体の実用可能性の検討

モノクローナル抗体の反応性を評価するため, これまで様々な検討に用いてきた抗 G II /4 単味

血清の段階希釈系列と比較した結果を図 6 及び表 3 に示した。単味血清を希釈するほど回収率は下がるが, 1/40 希釈から 1/80 希釈の間にモノクローナル抗体の回収率と等価になる領域があるのが見て取れる。抗 G II /4 単味血清のホモ抗体価は国立感染症研究所における ELISA での測定により, およそ 1,000 万倍であることがわかっているため, モノクローナル抗体 (マウス腹水) の見かけ上の抗体価を回収率と添加量から逆算すると, 12,500～25,000 倍と見積もられた。このことから, 理論上は添加量を増やせばモノクローナル抗体でも抗血清と同等の回収率が期待できることになる。

表3 段階希釈した単味血清とモノクローナル抗体の比較（回収率）

添加抗体	抗体価（終濃度）	回収率（％）
1/10 希釈単味血清	×1,000	33
1/20 希釈単味血清	×500	18
1/40 希釈単味血清	×250	11
モノクロ4種プール	(×125～250)	9.1
1/80 希釈単味血清	×125	7.8
1/160 希釈単味血清	×62.5	2.3
抗体無添加	—	N.D.

- ・回収率は図6の増幅曲線から算出した。単味血清のホモ抗体価については、ELISAによる測定でおよそ10,000,000倍であることがわかっている。モノクローナル抗体（マウス腹水）の見かけ上の抗体価は回収率と添加量から逆算すると12,500～25,000倍となる。

4. 考察

4.1 利便性の向上に関する改良

4.1.1 超音波処理によるNV粒子の遊離

食品に付着しているNVを洗滌液中に効果的に遊離させるためには、処理袋を念入りに揉みほぐす必要があるが、その程度に関して一定の基準を設けることは難しいのが実状である。また、焼ソバなどの油を多用した食品の場合は油滴中にNVが包埋されて、その後の処理がうまくいかない可能性もある。油に対する解決法の一つとして洗滌液にLipase（ブタ膵臓由来：和光純薬）を添加する方法も検討したが、黄色ブドウ球菌の表面脂質も分解されて構造が壊れるため本法に用いることは不可能であった。ただし、Lipase処理によって油と洗滌液が均一になるため、PEG沈澱法でNV回収を試みる場合には有効と考えられる。次に検討したのは超音波による機械的乳化であり、図2Aに示すとおりガラス器具洗浄用の超音波洗浄機に処理袋を浸漬することで、油滴を細かく分散させてNV粒子を遊離させることを目的としている。図2Bでは、超音波処理によって油と洗滌液が均一に混じり合っているのがわかる。また、水中で超音波を発すると微細な泡の消長に伴う衝撃波が持続的に発生し（キャビテーション効果）、部分的かつ瞬間的な圧力は1,000 kg/cm²に達する。このことは、油物に限らず食品に付着したNVを効率良く洗滌液中に遊離させるのに利用することができる。図2Cでは超音波処理によって回収率

が約3割向上しているが、食品の種類によってはさらに改善される可能性もある。超音波洗浄機はほとんどの試験研究機関において常備されている機器であり、また廉価で入手できるため、NVの洗い出し作業に一定の基準を設定する意味でも用いることが望ましいと考えられた。

4.1.2 α -Amylaseによる前処理

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。平成20年度の研究では、食品処理袋を使用することで食品残渣を取り除く方法と逆転写反応直前に α -Amylaseによって混入した炭水化物を分解する方法（後処理）について検討し、両者とも効果が認められた^{10,12)}。しかしながら、図3Aに示すとおり、食品処理袋を使用して良好な結果が得られたと思われるRNA抽出液であっても、-80℃で凍結保存後に解凍すると炭水化物の沈澱が生じてくる場合があった（RNAも共沈する）。この問題を解決するために、食品洗滌液に α -Amylase粉末を加えて、その後の抗原抗体反応中に炭水化物の分解処理を並行して行うようにした（前処理）。その結果、凍結保存後も沈澱は生じなくなった（図3A）。図3Bの増幅曲線では、食品処理袋のみの場合と比べてあまり差は認められないが、プロトコル上での作業負担にはならないことと、炭水化物の沈澱によりRNAをロスするリスクを避けるために、 α -Amylaseによる前処理をプロトコルに加えることは意義があるものと思われる。

また、図 3B によると cDNA 合成時に再度 α -Amylase 処理を行うことで回収率の更なる向上が見込めるため、前処理と後処理は併用するのが現実的である。

4.2 多種類の血清型への対応

4.2.1 食品洗滌液の改良

多くの血清型がある NV に普遍的に対応するためにはブロードバンドのモノクローナル抗体の利用が望ましく、抗体の安定供給といった面からも有利である。しかしながら、表 1 に示すとおり、モノクローナル抗体のサブクラスの中で最も割合の高いマウス IgG1 は、ウサギ IgG と比べて ProteinA との結合が弱いという問題を抱えている。本稿ではその解決策として、食品洗滌液に NaCl を 0.5 M になるように添加した。この手法は Bio-Rad 社が検討を加えて特許を保有していたが、平成 18 年に期限をむかえたため現在は自由に用いてよいことになっている。NaCl 添加の効果はこれまで用いてきたウサギ IgG に対しても認められ（図 4）、パンソルビンに対する結合能の向上が期待できた。プール血清を用いた場合には、IgG の量が単味血清の場合と比べて最大 19 倍（19 種混合）に増える計算になるため、パンソルビンのキャパシティを増やす意味でも NaCl 添加は意義があるものと考えられた。

4.2.2 プール血清を用いた検討

食品洗滌液への NaCl 添加によってパンソルビンのキャパシティが向上したため、19 種類の抗血清を混合したプール血清を用いた NV 回収実験を行った。図 5A～図 5D にはそれぞれ G II/4, G II/5, G I/8, G II/18 についての増幅曲線を示した。表 2 にはそれぞれの回収率を示したが、単味血清と比べてプール血清では半分～1/3 程度の数値であった。プール血清を用いた場合には、無関係の血清型に対する大量の IgG が競合してパンソルビンに結合するため回収率への影響は避けられない。むしろ、あらかじめ NaCl 添加によってキャパシティを向上させていたため、この程度の影響で済んだという見方もできる。Real-time PCR では 2 サイクル以内の差であり、また実際の検査局面では Nested PCR を行うことが想定されるため、深刻な問題にはならないと考えられる。また、参考までに G II/18 型の

reference strain である Yuri 株を用いた回収実験も行ったが、プール血清の中に対応する血清が含まれていないにもかかわらず回収することができた（図 5D）。いずれかの血清成分が交差反応を起こしている可能性が高いが、本法の目的（ウイルス粒子の回収）からすれば好ましい結果である。

4.2.3 ブロードバンド・モノクローナル抗体の実用可能性

食品洗滌液への NaCl 添加によってマウス IgG1 であってもパンソルビンへ結合させることができるようになったが、抗体価が実用的なレベルに達しているかどうかが不明であった。そこで、抗 G II/4 単味血清の段階希釈系列を作り、モノクローナル抗体がどの段階に相当するかを検討した（図 6）。回収率と添加量から逆算するとモノクローナル抗体の抗体価は 12,500～25,000 倍相当と見積もられた（表 3）。理論上は抗体添加量を増やすことで抗血清を用いた場合と同等の回収率が得られると考えられるが、そのためには 1 検体（50 mL）当たり 2 mL 程度のマウス腹水が必要な計算となるため現実的とは言えない。そこで次なる可能性として、ハイブリドーマを回転ボトル等で大量培養（10 L 程度）して培地から IgG を濃縮・精製する方法がある。NV に対する特異性は、Real-time PCR で担保されているため、IgG の精製に当たってはアフィニティクロマトのような煩雑なプロセスは不要で、硫酸沈澱による粗精製で十分と考えられる。

4.3 パントラ法の総括と今後の展開

安定供給という面で課題は残るものの、プール血清を用いることで、多くの血清型に対応させることが可能となり、食品からの NV 検出という目標を達成することができた。今後は抗血清の生産・供給体制を作りつつ、引き続きモノクローナル抗体の利用を検討することになる。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 A 型肝炎ウイルス等にも用いることが可能である。本法によって食品からの NV 検出が可能となれば、食中毒発生時の原因究明のみならず、汚染経路のデータが蓄積されることによって予防対策にも貢献できるものと考えられた。

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: 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) 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・トラップ法の実用性向上に関する研究, 秋田県健康環境センター年報, **5**, 2009, 54-62.
- 13) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検査法の構築（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21年度 総括・分担研究報告書, 2010, 45-60.
- 14) 東方美保, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検査法の構築（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21年度 総括・分担研究報告書, 2010, 187-197.
- 15) Hansman GS et al.: Genetic and antigenic diversity among noroviruses, J. Gen. Virol., **87**, 2006, 909-919.
- 16) 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**, 2003, 1548-1577