

厚生労働科学研究費補助金「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」（平成 22～24 年度）

自家調製したパンソルビン相当品による 食品中のノロウイルス検出法の検討

齋藤博之 東方美保*¹ 岡智一郎*² 片山和彦*² 田中智之*³ 野田 衛*⁴

これまでの研究において、ガンマグロブリン製剤を用いたパンソルビン・トラップ法の汎用プロトコルが完成し、ノロウイルスでは 13 遺伝子型 (GI/3, GI/4, GI/8, GI/9, GI/14, GII/2, GII/3, GII/4, GII/5, GII/6, GII/12, GII/13, GII/18), サポウイルスでは 4 種類全ての型, 他に A 型肝炎とアデノウイルス 41 型において有効であることを確認した (当センター年報第 7 号参照)。これにより、ガンマグロブリン製剤を常用試薬として準備しておくことで、食品中の下痢症ウイルス検査が一通り可能となった。一方で、本法の根幹を成す試薬であるパンソルビンが品薄・在庫切れで入手困難となる局面にしばしば遭遇したことから、その対応が必要となった。本研究では、パンソルビンの原材料である黄色ブドウ球菌を培養して相当品を自家調製するプロトコルを構築した。その結果、市販品と同等以上の品質のものが得られ、コスト面でも大幅に有利となった。

1. はじめに

ウイルス性食中毒の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^{1,2)}。しかしながら、原因として疑われる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。原因物質としてはノロウイルス (NoV) が大部分を占めているが、他にもサポウイルス (SaV) やアデノウイルス 41 型 (Ad41) に代表される腸管系アデノウイルスも含まれている。更に、2010 年 3 月に我が国における A 型肝炎 (HAV) 感染者の報告が急増するなど、食品中のウイルスを検出する方法の確立は急務となっている³⁾。平成 19～21 年度に実施された厚生労働科学研究費補助金「食品中のウイルスの制御に関する研究」において、固形、液状、練り物、油物などの一般的な食品から NoV 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⁴⁻¹³⁾。その際に各種ウイルスに対する抗体の安定供給が課題となっていたが、平成 22 年度の本研究事業において、市販のガンマグロブリン製剤を利用することで汎用化に成功した¹⁴⁻¹⁸⁾。これまで NoV では 13 遺伝子型 (GI/3,

GI/4, GI/8, GI/9, GI/14, GII/2, GII/3, GII/4, GII/5, GII/6, GII/12, GII/13, GII/18), SaV でヒトに感染する 4 種類全ての型, さらには HAV と AdV41 について、ガンマグロブリン製剤を用いたパントラ法が有効であることが確認されている。パントラ法の汎用プロトコルが完成したことから、実事例への適用も可能となったが、本法の根幹を成す試薬であるパンソルビン (ホルマリン固定された黄色ブドウ球菌) が品薄・在庫切れで入手困難となる局面にしばしば遭遇した。そこで、本研究では原材料の黄色ブドウ球菌を培養して市販試薬の相当品を自家調製し、実用性について検討した。

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きそばを用いた。また、検出対象となるウイルスとして、NoV-GII/4 (AB293424) を含む糞便を用いた。

2.2.2 ヒトプール血清

Kojin Bio 社より購入した。

2.2.3 ガンマグロブリン (化血研)

15%筋注用医薬品を Alfresa Pharma 社より購入した。

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

*4 国立医薬品食品衛生研究所

2.2.4 ガンマグロブリン（日本製薬）

15%筋注用医薬品を Alfresa Pharma 社より購入した。

2.2.5 Bharglob

インド Bharat Serum and Vaccine Limited 社の10%筋注用ガンマグロブリン製剤（血液ソースは米国）。Advy Chemical 社より購入した。

2.2.6 Gammagard

米国 Baxter 社の5%静注用ガンマグロブリン製剤。Alfresa Pharma 社より購入した。

2.2.7 食品洗滌液

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

2.2.8 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の懸濁液で、メルク社から購入した。

2.2.9 フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (invitrogen)を使用した。

2.2.10 カラム方式の RNA 抽出キット

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

2.2.11 再懸濁液

2.2.12 の抽出キット添付の AVL 液を用いた。

2.2.12 逆転写反応エンハンサー

RTmate (ニッポンジーン) を使用した。

2.2.13 DNase I (RT Grade) 及び RNase inhibitor

ニッポンジーンの製品を使用した。

2.2.14 アミラーゼ

前処理用：枯草菌由来 α -Amylase 粉末（和光純薬）を使用した。

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

2.2.15 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。

2.2.16 黄色ブドウ球菌（Cowan I 株）

理化学研究所バイオリソースセンターより提供を受けた（JCM No.: 2179）。

2.2.17 抗生物質培地 3

ベクトンディッキンソン社（カタログ番号 224320）より購入した。

2.2.18 Bacto Casitone

ベクトンディッキンソン社（カタログ番号 225930）より購入した。

2.2.19 Bacto Yeast Extract

ベクトンディッキンソン社（カタログ番号 212750）より購入した。

2.2.20 β -Glycerophosphate

メルク社（カタログ番号 35675-50GM）より購入した。

2.2.21 Nicotinic Acid

メルク社（カタログ番号 481918-100GM）より購入した。

2.2.22 Nicotinamide

メルク社（カタログ番号 481907）より購入した。

2.2.23 Thiamine Hydrochloride

メルク社（カタログ番号 5871）より購入した。

2.3 パンソルビン相当品の自家調製プロトコル

Kessler の方法²⁰を参照したが、現在では入手不可能な試薬については代替品を用いた。

2.3.1 培地

「抗生物質培地 3」 52.5 g, 「Bacto Casitone」 15 g, 「Bacto Yeast Extract」 7.5 g, 「 β -glycerophosphate」 7.5 g を蒸留水 3 L に溶解し、121°C で 15 分間高圧滅菌した後冷却した。別に「Nicotinic Acid」 0.1 g, 「Nicotinamide」 0.1 g, 「Thiamine Hydrochloride」 0.2 g を蒸留水 100 mL に溶解して、シリンジフィルターにて濾過滅菌したものを 3 mL, 上記の培地 3 L に添加した。

2.3.2 前培養

2.3.1 で調製した培地 5 mL を試験管に入れ、黄色ブドウ球菌 Cowan I 株を接種したものを 2 本、37°C で一晩震盪培養した。

2.3.3 本培養

三角フラスコに培地を 1 L 入れ、そこに前培養液 5 mL を加えたものを 2 本（合計 2 L）調製し、37°C フラン室内にてマグネティックスターラーで攪拌しながら 48 時間培養した。

2.3.4 黄色ブドウ球菌の菌体処理

図 1 に示した手順に従って、菌体の回収・ホルマリン固定・熱処理を行った。

2.4 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 2 に示した。なお、ウイルスと抗体の反応性を確認するための試験（表 1）では、超音波処理と α -Amyrase 前処理は省略した。

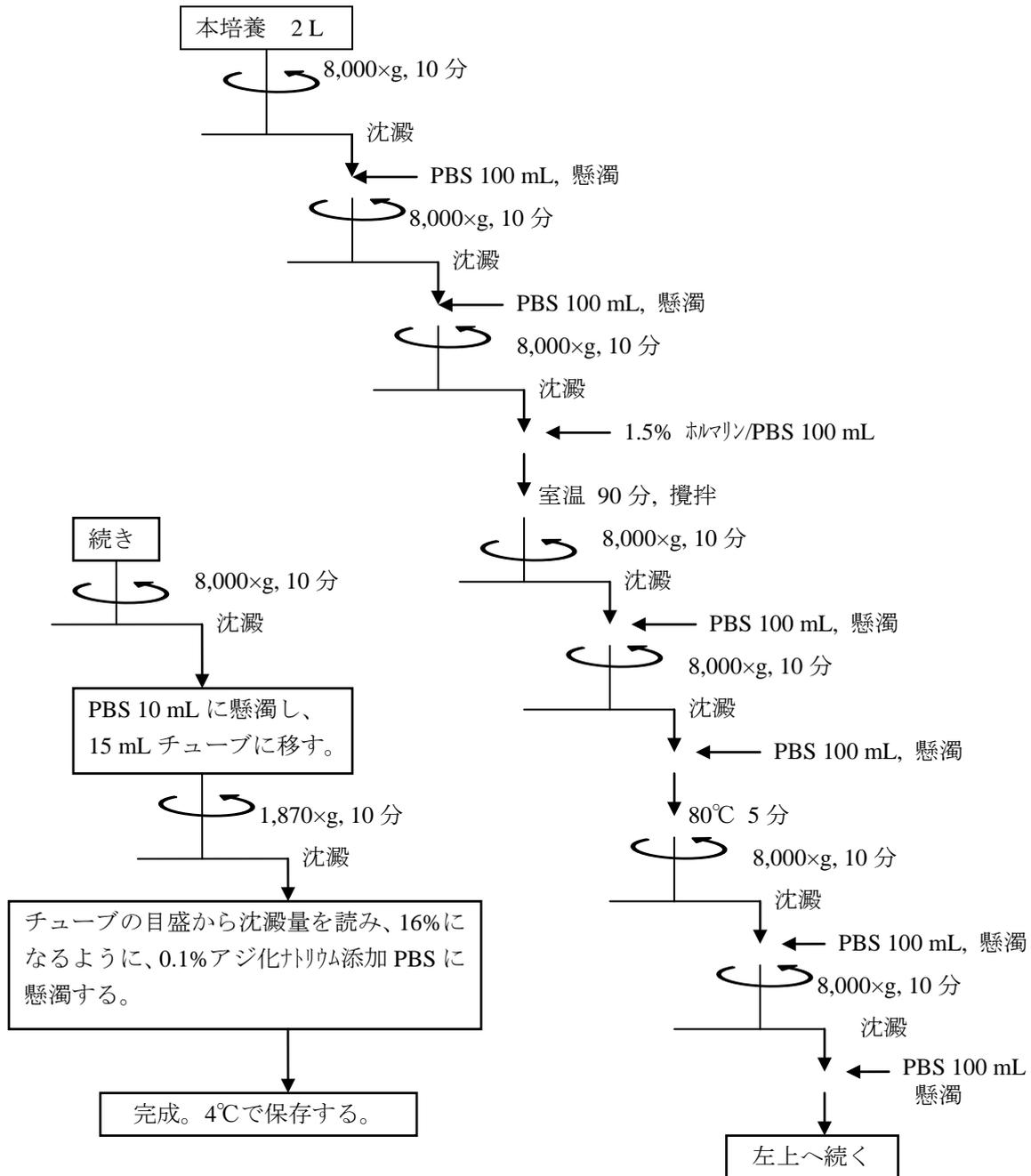


図1 パンソルビン相当品の自家調製手順

2.5 ウイルスの検出

図2で得られた抽出液(60 μL)から8.5 μLを取り、DNase I及びα-Amylase Ultrapureを各1 μL, RNase inhibitorを0.25 μL, 5×逆転写 buffer(添付)を4 μL加えた後、蒸留水で反応量を15.5 μLとし、37°C 10分、65°C 5分のインキュベーションを行った。その後、ウイルス特異的プライマー(後述のReal-time PCRと同一のもの)、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)。合成したcDNA溶液を5 μL取り、Kageyamaらの方法²¹⁾によるReal-time PCRによりウイルスを検出した。使用した機器はロシュ製「LightCycler 350S」、及び「LightCycler 480」で反応容量は20 μLである。

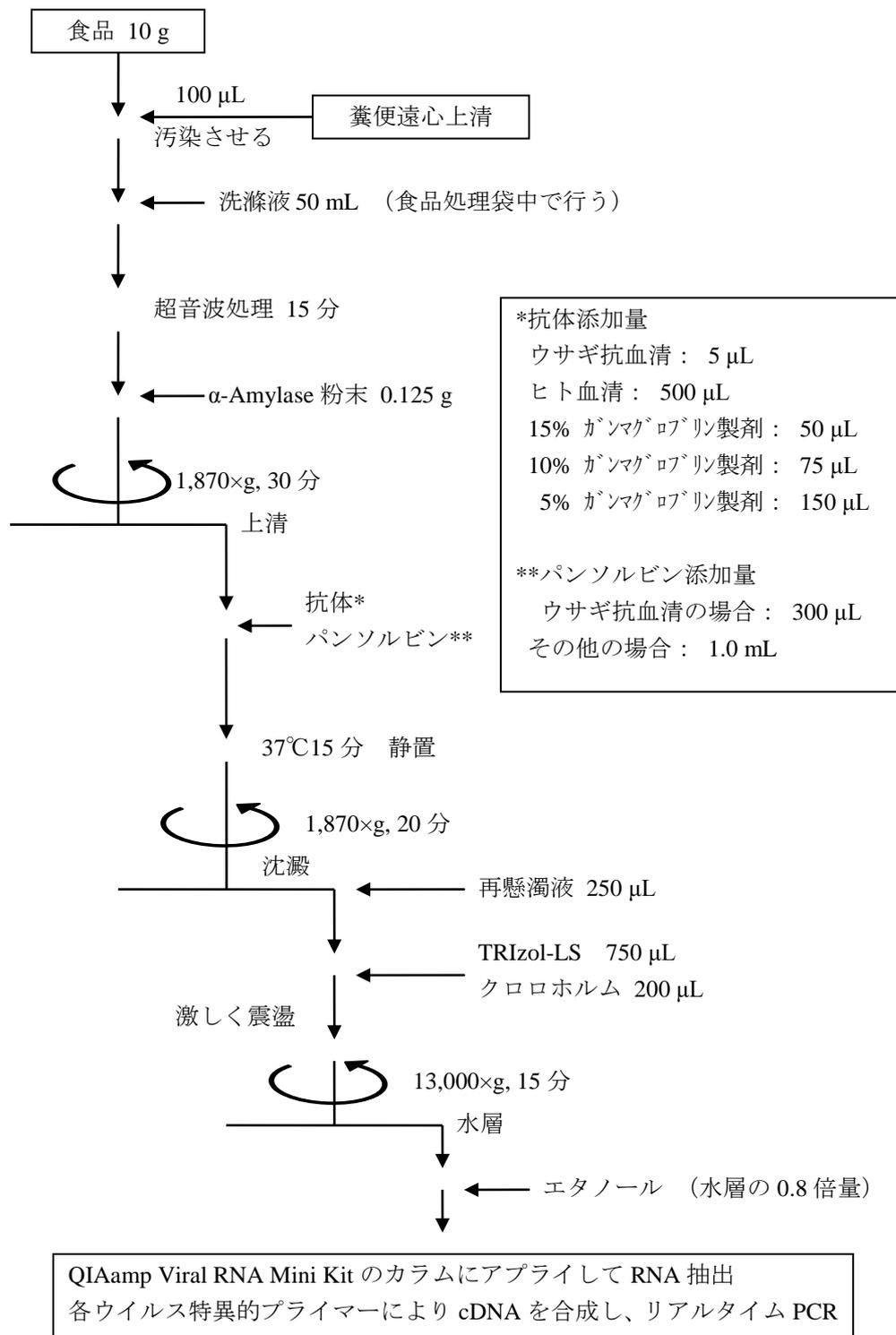


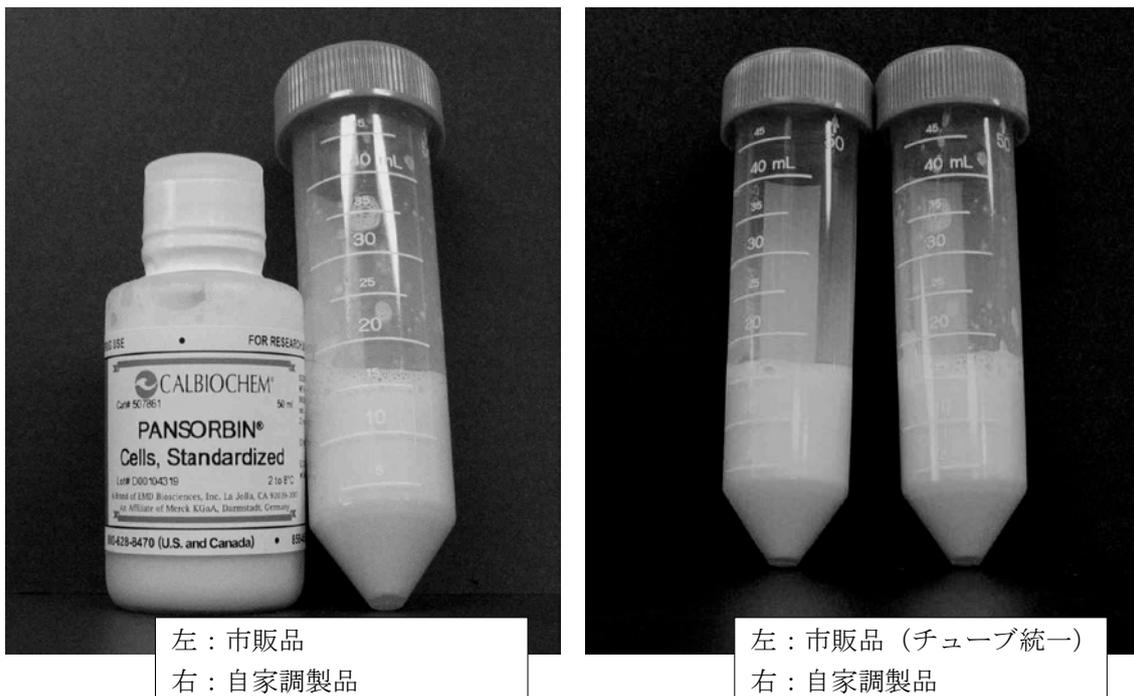
図 2 パンソルビン・トラップ法の操作手順

3. 結果

3.1 自家調製したパンソルビン相当品と市販品との比較

パントラ法の根幹を成すパンソルビンのメーカーはメルク社のみであるため、品薄や在庫切れによって入手困難となる局面にしばしば遭遇した。

また、将来的にメーカーの都合によって製造中止となるリスクも考慮しておく必要があった。そこで、黄色ブドウ球菌を培養してホルマリン固定と熱処理を加えることで相当品を自家調製するプロトコルについて検討した。基本的な手順は Kessler の文献²⁰⁾に記載があるが、現在では入手不可能な



左：市販品
右：自家調製品

左：市販品（チューブ統一）
右：自家調製品

図3 パンソルビン市販品と自家調製品の外見比較

培地もあるため同等の成分となるように市販品を調査した。例えば、原法に記載のある「Penassay Broth」は入手不可能であることから、「抗生物質培地 3」（耐性試験の基礎培地）で代用した。図1に示したプロトコルに従ってパンソルビン相当品を自作したところ、図3に示すとおり市販品と外見上は同一のものを得ることができた。この自家調製品を用いて 2.51×10^6 コピーの NoV を含む洗滌液 50 mL からの回収試験を行ったところ、ウサギ抗血清、ヒトプール血清、各種ガンマグロブリン製剤のいずれを添加した場合でも、市販品と同等以上の回収率が得られた（表1）。また、2Lの培養スケール

におけるパンソルビン相当品の収量は約 20 mL（20 検体分）であった。

3.2 自家調製したパンソルビン相当品を用いた食品からの NoV の回収

NoV で汚染させたポテトサラダと焼きそばから、自家調製したパンソルビン相当品を用いてウイルス検出を試みた結果を図4Aと図4Bに示した。ポテトサラダにおける回収率はウサギ抗血清を添加した場合で、55.2%、Gammagard を添加した場合で 22.9%であった。同様に焼きそばにおける回収率は、それぞれ 71.7%と 31.8%であった。

表1 パンソルビン市販品と自家調製品を用いた場合の回収率の比較

添加抗体	ウイルスの回収率		
	市販品 (%)	自家調製品 (%)	相対比 (自家調製品/市販品)
ウサギ抗血清	56	94	1.7
ヒトプール血清	12	40	3.3
ガンマグロブリン「化血研」	16	39	2.4
ガンマグロブリン「日本製薬」	19	41	2.2
Bharglob (BSV Ltd.)	17	43	2.5
Gammagard (Baxter)	19	57	3.1

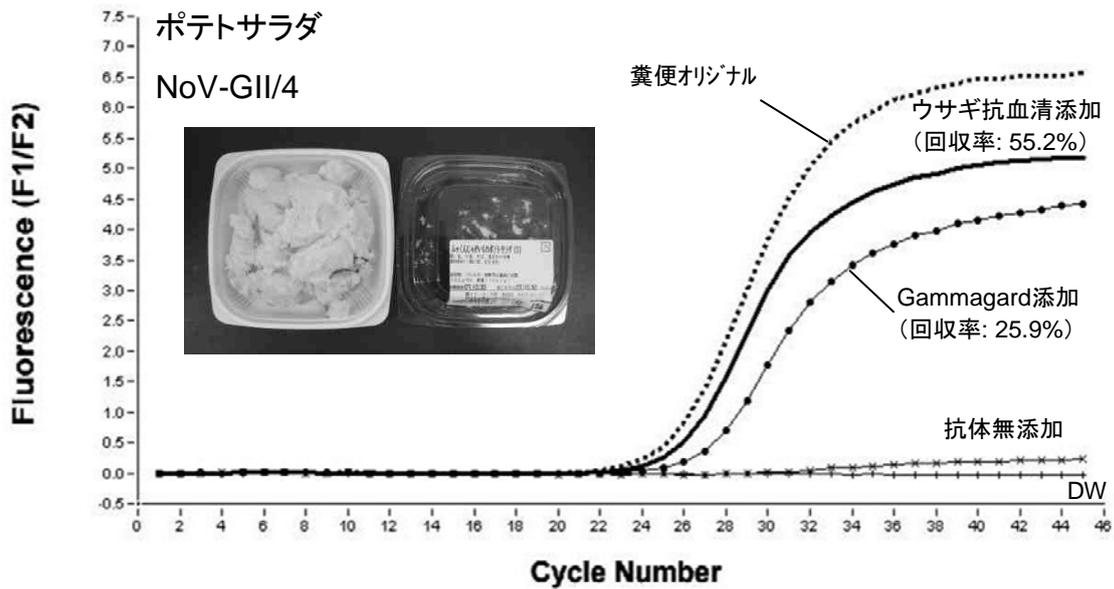


図 4A 自家調製したパンソルビン相当品を用いたポテトサラダからの NoV 回収

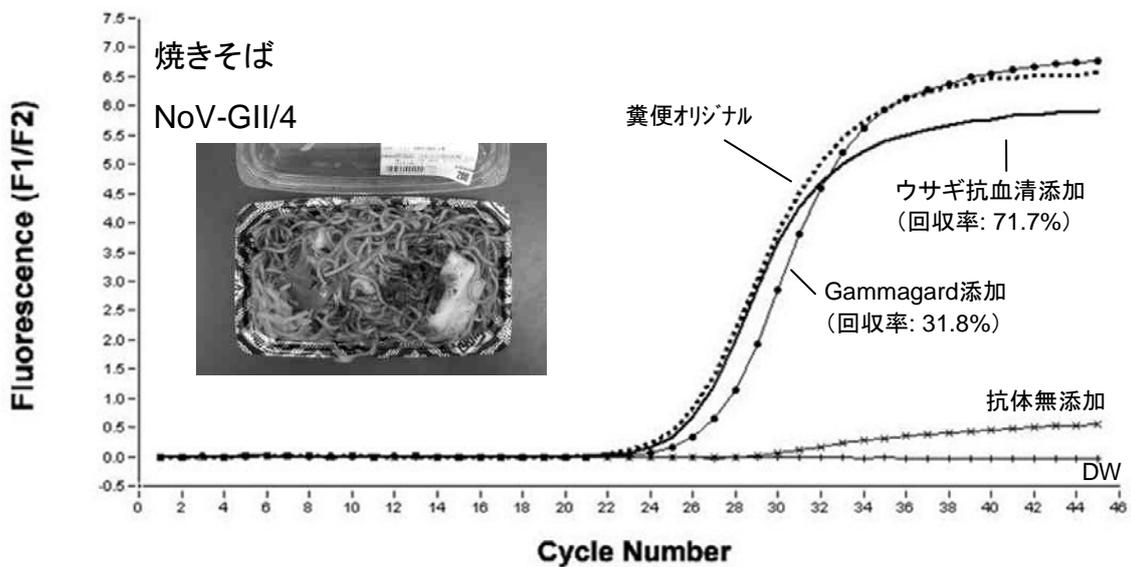


図 4B 自家調製したパンソルビン相当品を用いた焼きそばからの NoV 回収

4. 考察

本研究事業を進める過程において、パンソルビンが品薄・在庫切れの理由によって入手困難となる局面にしばしば遭遇した。また、この試薬はメルク社 1 社でのみ製造・販売されているため、将来的にメーカーの都合で製造中止となる可能性も否定できず、あらかじめ対応策を準備しておく必要があった。そこで、黄色ブドウ球菌を培養して菌体を回収し、ホルマリン固定と熱処理を加えて

相当品を自家調製するプロトコルについて検討した。黄色ブドウ球菌は株によって、プロテイン A を産生しないか、含有量の非常に少ないものも存在するため、プロテイン A の生産用として確立している Cowan I 株を用いた。図 1 に示すプロトコルにてパンソルビン相当品を自家調製したところ、外見上、市販品と全く同一のものを得ることができた (図 3)。また、表 1 に示したとおり、パントラ法に使用した場合の回収率は市販品と同等以上

であることが証明された。実際の食品検体を用いた回収試験では、ウサギ抗血清と Gammagard とともに良好な増幅曲線が認められた (図 4A, 図 4B)。回収率の数値としてはウサギ抗血清を添加したもののの方が高いが、ガンマグロブリン製剤の汎用性はそれを上回るメリットを有していることはすでに確認されている¹⁴⁻¹⁸⁾。また、防腐剤であるアジ化ナトリウム存在下で1年間は保存可能であるため、時間的余裕のある時季(流行期外)に大量に調整しておくことで、在庫切れ等の問題に対応することができると考えられる。さらに、市販品のパンソルビンを用いると食品1検体あたり約1,500円が必要であるが、自家調製することで数十円にまでコストを圧縮することができるため費用対効果の面でも有利である。また、実際の事例に適用する場合に備えて食品衛生検査指針への収載が予定されている。

5. まとめ

パントラ法の根幹となる試薬であるパンソルビンの品薄・在庫切れ・将来的な製造中止のリスクに対応するため、各試験研究機関で相当品を自家調製するプロトコルを構築した。自家調製された相当品をパントラ法に用いたところ、市販品と同等以上の回収率が得られ、十分に実用に耐えるものと考えられた。また、市販品では一検体当たり1,500円のコストを要していたが、自家調製することで数十円まで圧縮できることから経費節減に役立つものと考えられた。

参考文献

- 1) 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
- 2) 丸山務 (監修) : 改訂 ノロウイルス現場対策, 2007, 35-36
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 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(第1報), 福井県衛生環境研究センター年報, 7, 2008, 69-72
- 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) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 斎藤博之, 他: 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, 秋田

県健康環境センター年報, **6**, 2010, 59-69

- 14) 斎藤博之, 他: 食品検体の病原ウイルス検出を可能にした汎用型パンソルビン・トラップ法の開発, 秋田県健康環境センター年報, **7**, 2011, 43-53
- 15) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法による食品からのウイルス検出法, 病原微生物検出情報, **32**, No.12, 2011, 4-5.
- 16) 斎藤博之, 他: 食品中のウイルス検査に向けてのパンソルビントラップ法の汎用化, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究 平成 22 年度 総括・分担研究報告書, 2011, 45-57
- 17) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法の実用上の問題点解決に向けた検討, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究 平成 23 年度 総括・分担研究報告書 2012, 43-60
- 18) 斎藤博之: 食品のノロウイルス検査の汎用化を目指したパンソルビン・トラップ法の開発, 日本食品微生物学会雑誌, **29**, No.1, 2012, 32-37.
- 19) Hansman GS et al.: Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J. Gen. Virol.*, **87**, 2006, 909-919.
- 20) Kessler, SW.: Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A-antibody absorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J. Immunol.*, **115**, 1975, 1617-1624.
- 21) Kageyama T, 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