

食品中の病原ウイルスの検出方法に関する研究

パンソルビン・トラップ法によって食品検体から検出された ノロウイルスの遺伝子解析法の開発

斎藤博之 田中智之*¹ 野田 衛*²

パンソルビン・トラップ法は、食品検体に含まれるウイルス粒子を黄色ブドウ球菌の表面に吸着させて回収することを基本原理としている。その性質上、抽出された RNA には大量の黄色ブドウ球菌由来の遺伝子が混入し、遺伝子解析の障害となることがこれまでの研究で明らかとなった。黄色ブドウ球菌の遺伝子そのものは、極微量のウイルス RNA を安定的に保持するキャリアーとして働くため、検出感度に対してはプラスの効果が見込める。従って、それを排除するのではなく、遺伝子解析に影響が及ばないようにする解決策が求められた。本研究では、逆転写反応時に PCR で用いるものとは異なる専用プライマーを使うことで、遺伝子解析可能な PCR 増幅産物を得ることに成功した。さらに、増幅プロセスにホットスタート&タッチダウン PCR を用いることで一層の改善が認められた。また、ノロウイルス GI.4、及びノロウイルス GII.4 で汚染させたポテトサラダにおける本法の検出限界は、両者とも食品 1 g 当たり 35 コピーであった。以上のことにより、黄色ブドウ球菌のキャリアーとしての長所を活かし、遺伝子解析の障害という短所を顕現させないようにするという目的が達成された。

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た^{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手手欠いていた。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 (AdV41) に代表される腸管系アデノウイルスも含まれている。さらに、平成 22 年 3 月に我が国における A 型肝炎ウイルス (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が急務となっている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」(H19-食品-一般-016) 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、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¹⁴⁻¹⁷⁾。普及にあたって、本法の根幹をなすパンソルビンを製造・販売しているメーカーが 1 社しかないことから、在庫切れや製造中止などのリスクが問題となったが、自家調製プロトコルが完成したことで払拭された^{18, 19)}。一方で、実際の食中毒事例に用いられ、食品からのウイルス検出に成功したケースもあったが、非特異反応が多すぎるにより遺伝子解析が困難であるという問題が指摘された²⁰⁾。そこで本研究では、パントラ法で抽出された RNA に対して遺伝子解析が可能となるような反応系の開発を行った。

2. 方法

2.1 研究材料

実験に用いる食品として、市販されている焼きそばとポテトサラダを用いた。また、検出対象となるウイルスとして、NoV-GI.4 (AB685383)、及び NoV-GII.4 (AB293424) を用いた。

2.2 試薬類

2.2.1 食品洗滌液

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

*1 堺市衛生研究 *2 国立医薬品食品衛生研究所

を調製して使用した。

2.2.2 5%ガンマグロブリン製剤

米国 Baxter 社の 5% 静注用ガンマグロブリン製剤「Gammagard」を用いた。Alfresa Pharma 社から購入した。

2.2.3 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。

2.2.4 フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (invitrogen)を使用した。

2.2.5 カラム方式の RNA 抽出キット

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

2.2.6 再懸濁液

2.2.5 の抽出キット添付の AVL 液を用いた。

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

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。

2.2.10 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。

2.2.11 逆転写酵素

ReverTra Ace (東洋紡)を使用した。

2.2.12 ノーマル PCR 用酵素

Taq DNA Polymerase High Yield (グライナー)を用いた。

2.2.13 ホットスタート&タッチダウン PCR 用酵素

KOD FX Neo (東洋紡)を用いた。

2.2.14 逆転写反応に用いたプライマー

ランダムプライマー (9 mer, タカラバイオ), G1SKR と G2SKR²¹⁾, 及び新規開発の逆転写反応専用プライマー PANR-G1 と PANR-G2 を用いた。PANR-G1 は表 1 に示した PANR-G1a と PANR-G1b を 1:1 で混合したものである。PANR-G2 は表 1 に示した PANR-G2a, PANR-G2b, 及び PANR-G2c を 2:1:1 で混合したものである。

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。

2.4 ウイルスの検出

図 1 で得られた抽出液 (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 (酵素に添付) 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, プライマー (前述のもの), 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 μ L)。合成した cDNA 溶液を 5 μ L 取り, COG1F²²⁾ / G1SKR²¹⁾, または COG2F²²⁾ / G2SKR²¹⁾ による 1st. PCR と, G1SKF/G1SKR または G2SKF/G2SKR による semi-nested RT-PCR を行った。この増幅反応において, 通常用いられるノーマル PCR と, より特異性の高いホットスタート&タッチダウン PCR の比較を行った。反応温度条件は, 次のとおりである。

【ノーマル PCR】

94 $^{\circ}$ C 4 分 1 サイクル

94 $^{\circ}$ C 30 秒 – 50 $^{\circ}$ C 30 秒 – 72 $^{\circ}$ C 30 秒 40 サイクル

72 $^{\circ}$ C 7 分 1 サイクル

表 1 逆転写反応専用プライマーの配列

名称	配列 (5'→3')	設定位置
PANR-G1a	GTBCKMACATCAGCAATCA	5800←5818
PANR-G1b	GGKTCAAGSRYCCTAACATCWGCAATGA	5800←5827
PANR-G2a	TCYARWKKYCTWACATCTAYAATYAYRTGGGGGAACAT	5502←5539
PANR-G2b	ARDGTCCTAACATCWATAATYAYATGAGGGGAACAT	5502←5536
PANR-G2c	CTSACATCCACMAYYACRTGCGGRCACAT	5502←5530

- ・PANR-G1a と PANR-G1b の設定位置は, Norwalk68 株の配列に相当する塩基番号で表記した。
- ・PANR-G2a, PANR-G2b, 及び PANR-G2c の設定位置は, Camberwell 株の塩基番号で表記した。
- ・PANR-G1a の配列中のアンダーラインで示した塩基 (C) は LNA 修飾で合成した。

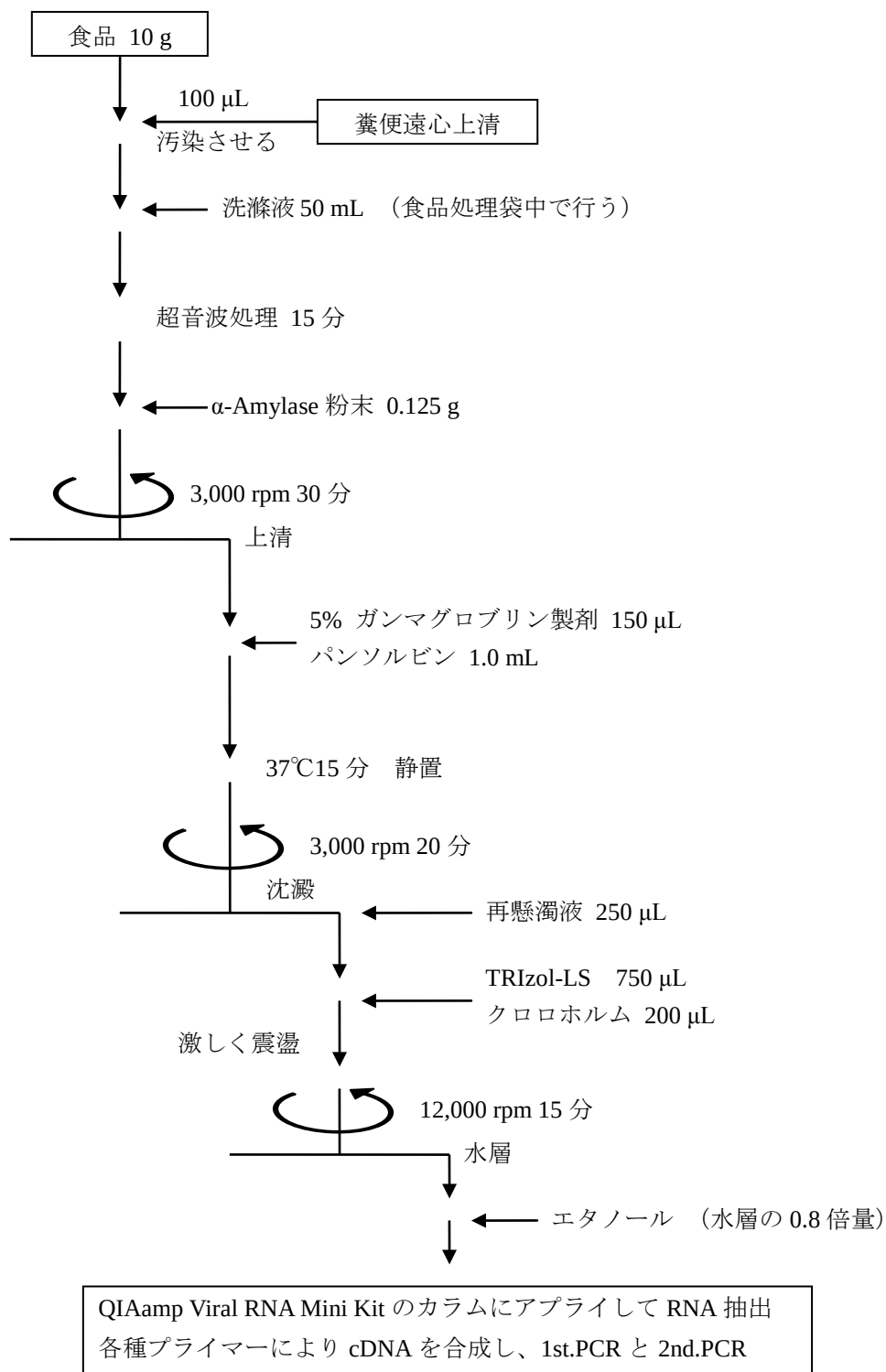


図1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

【ホットスタート&タッチダウン PCR】

94°C 4 分 1 サイクル

94°C 30 秒 - (55→50°C) 30 秒 - 72°C 30 秒 5 サイクル：下線部がタッチダウン設定

94°C 30 秒 - 50°C 30 秒 - 72°C 30 秒 40 サイクル

72°C 7 分 1 サイクル

PCR 産物のゲル電気泳動で予想位置にバンドが認められた場合は切り出してシーケンスを試みた。また、1st. PCR 産物に対して real-time PCR²²⁾を行い、NoV 特異的な増幅の有無を検討した。使用した real-time PCR 装置はロシュ製「LightCycler 350S」で、反応容量は 20 μ L である。

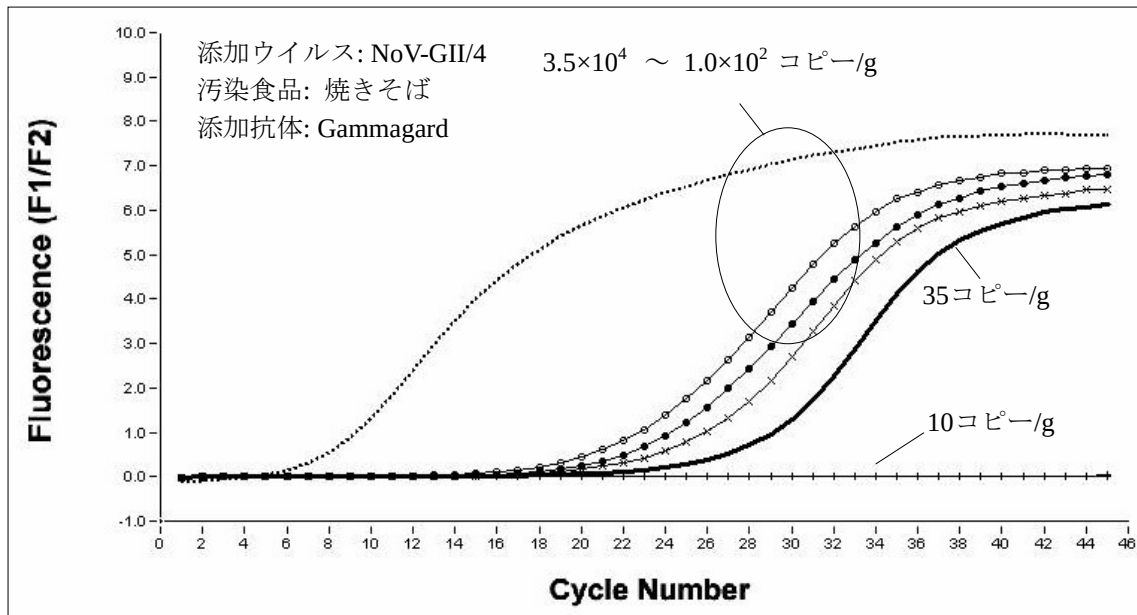


図2 Nested real-time PCRの増幅曲線

- ・ 1st. PCR をプライマーCOG2F / G2SKR にて実施し、その増幅産物をプライマー・プローブセット COG2F / COG2R / RING2-TP を用いた real-time PCR で検出した。

3. 結果

3.1 遺伝子解析における問題点の把握

問題点を把握するための予備試験としてさまざまなレベルで汚染させた焼きそばから、Gammagard を用いて NoV 回収を行った際の増幅曲線を図 2 に示した。これによると、汚染度 35 コピー/g と 10 コピー/g で明確に陽性と陰性が分かれていることがわかる。一方、1st. PCR 産物をプライマー G2SKF / G2SKR による semi-nested RT-PCR で再増幅し、アガロースゲル電気泳動で確認したところ、汚染度 3.5×10^2 コピー/g までは 344 bps の増幅バンドが認められた (図 3)。しかし、 1.0×10^2 コピー/g 以下ではバンドが不明瞭であった。明確なバンドが認められた 3.5×10^3 コピー/g のレーンからバンドを切り出してシーケンスを解析したところ、汚染に用いた NoV の塩基配列であることが確認できた。同様に 35 コピー/g のレーンから 344 bps 近傍に位置する部分のゲルを切り出し、そこに含まれる DNA 断片のシーケンスを解析したところ黄色ブドウ球菌 (ブ菌) の 16s リボソームの塩基配列であった。

3.2 問題点の理論的検討

逆転写反応も PCR も、起点はハイブリダイゼーションであることから、反応系を単純すると 2 種類の分子の会合ということになる。従って、

そこには会合定数 (K) というものが存在し、さらにはそれぞれの分子の濃度が関係するため、質量作用の法則から、

$$K = \frac{[PT]}{[P][T]}$$

で表される。ここでは、[P]と[T]はそれぞれプライマーとテンプレートが反応系中で独立して存在している濃度、[PT]はそれらが会合して生じたハイブリダイゼーション分子の濃度とする。この式から、ハイブリダイゼーションが成立した分子の濃度を求めると、

$$[PT] = K[P][T]$$

となる。実際の反応に当てはめると、K がプライマーの特異性に相当し、理想的な特異反応ならば K が大きくなり、非特異反応ならば小さくなる。ところが、非特異反応において K が小さかったとしても、[T]が圧倒的に大きければ、結果として[PT]も大きくなる。本研究で直面している問題は、NoV の[PT]よりもブ菌の[PT]はるかに大きいということに帰結する。食品汚染の NoV は「何コピー・・・」といった数字で論じられているのに対して、パントラ法で投入されるブ菌は肉眼で見える量であることから天文学的なコピー数になることが当然のごとく予想される。従って、個々のプライマーの特異性や

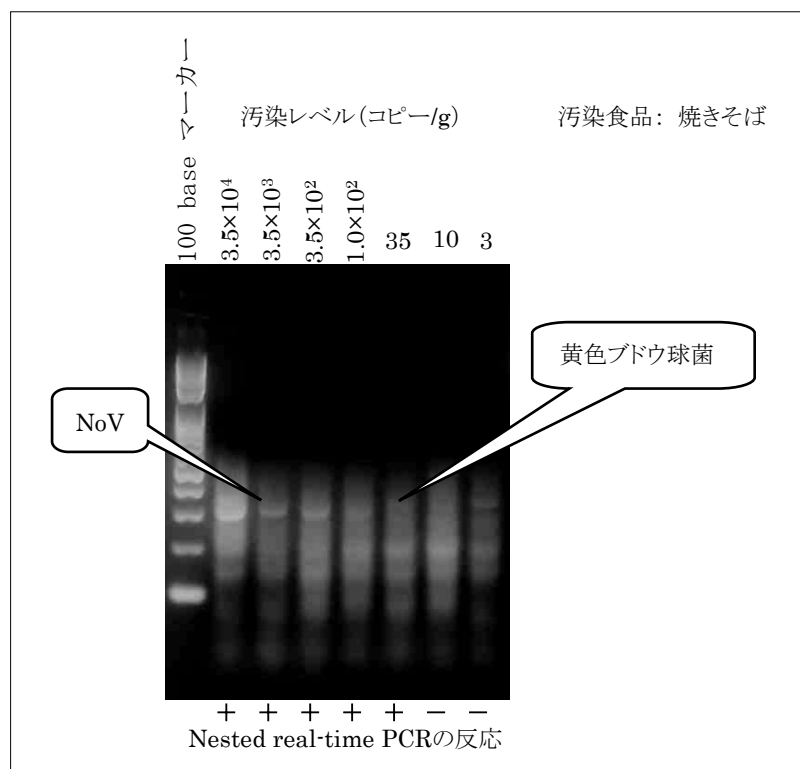


図3 Semi-nested RT-PCR 増幅産物の電気泳動パターン

・図2の1st. PCR産物を、プライマーG2SKF / G2SKRを用いた2nd. PCRで再増幅した。

PCRの反応条件(いずれもKに影響)にのみ着目しても解決には至らない。例えば、非特異反応の割合が1万分の1(Kに相当)である一方で、量的な差が1億倍([T]に相当)あったならば、プライマーの特異性が容易に相殺されてしまうことになる(NoVとブ菌の量的な差はもっと大きい)。

3.3 逆転写反応専用プライマーの設計

個々のプライマーの特異性やPCRの反応条件の改良では問題に対応できないことから、逆転写反応→1st. PCR→2nd. PCRの3段階の反応を一つのものとして俯瞰することで解決の糸口を見出した。すなわち、非特異反応にも種類があり、本来ならばそれぞれの反応段階における非特異反応の内容が違はずである。ところが、実際にはNoVとブ菌の圧倒的な初期濃度差が解消されることなく最後まで反映されていた。そこで、逆転写反応に用いるプライマーの影響を比較しながら、最終的にNoVの遺伝子のみが検出される方法を模索した。

ランダムプライマーで逆転写反応を行うと、 10^5 コピー/gのような高濃度汚染サンプルでは

高い回収率が得られるものの、低濃度汚染になるにつれ急激に回収率が落ちて、PEG沈澱法の方が好成績になるという逆転現象がすでに観察されている⁹⁾。図4のレーン3～6に示したとおり、ポテトサラダをベースとした100 コピー/g以下の低濃度汚染サンプルでは、semi-nested RT-PCRを行ってもバンドが観察されず、semi-nested real-time PCRでも増幅が認められなかった。

G2SKRのようなPCRと同じNoV特異的プライマーを使うと、ブ菌の遺伝子が最後まで混入することは予備試験の結果(図3)と同様であった。ランダムプライマーで逆転写反応を行った場合と比べて、semi-nested real-time PCRでは増幅が認められたが、電気泳動で明瞭なバンドが観察できず、遺伝子解析は困難であった(図4レーン8～11)。ゲル上で薄く見えるバンドを切り出してシーケンスしたところ、レーン8と9はノイズが多すぎて判読不能であり、レーン10と11からはブ菌の16Sリボソームの配列が検出された。

以上の結果から、逆転写反応の段階でPCRとは異なる専用プライマーを用いることが重要と

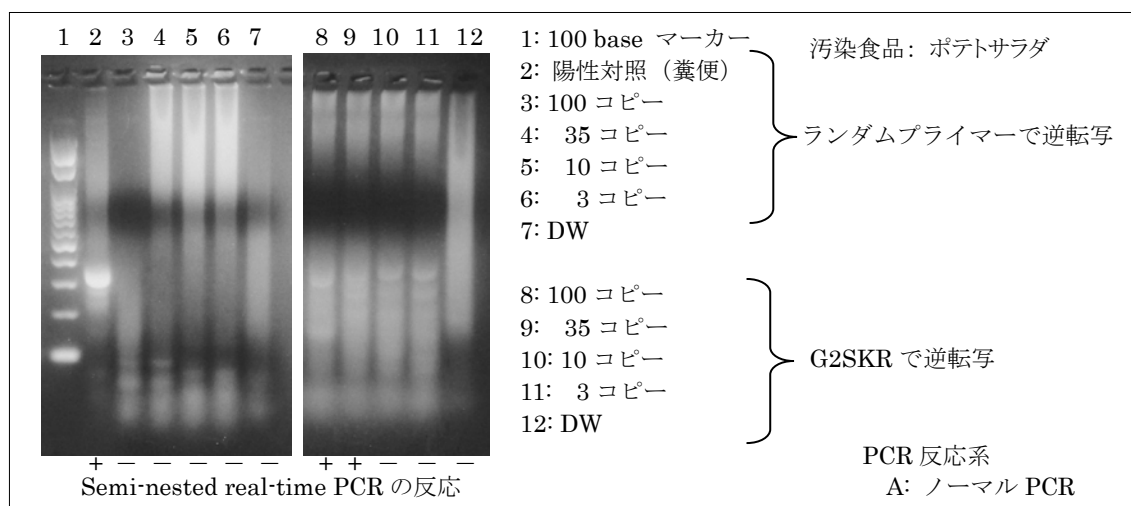


図4 従来の逆転写方法による semi-nested RT-PCR (NoV-GII.4)

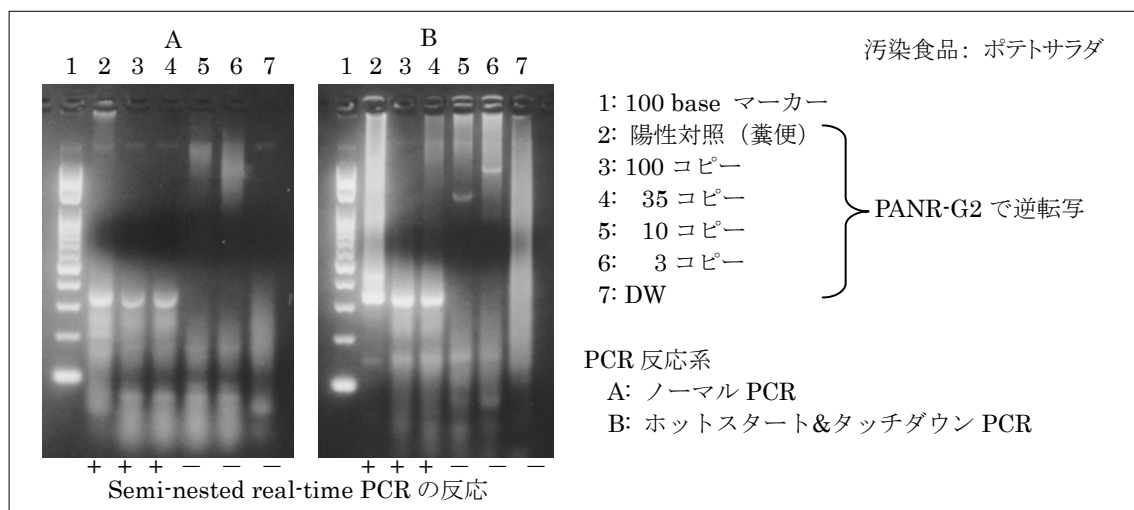


図5 逆転写反応専用プライマーを用いた semi-nested RT-PCR (NoV-GII.4)

考えられたため、表 1 に示すと通りの逆転写反応専用プライマーを設計した。設計にあたっては現行の real-time PCR の原著²²⁾に記載のあるウイルス株の配列を参照し、G1SKR や G2SKR より 3'側に保存領域を求めたが、全てのウイルス株をカバーできる領域は見つからなかった。そこで、ウイルス株を部分的な相同性を指標に 2~3 のグループに分割し、それぞれに対応するプライマーを混合使用する方針をとった。次にこうして得られたプライマー配列が AT-rich で Tm が低く、そのままでは反応効率に影響するため改良を加えた。PANR-G2 では塩基長を長くすることで十分な Tm を確保することができた。PANR-G1 は、塩基長を長くすると縮重度 (特異性に影響する) がランダムプライマーと変わらなくなることから、LNA (Locked Nucleic Acid)

修飾^{23,24)} を使って強制的に Tm を上昇させた。このような方針で設計された逆転写反応専用プライマーを用いて cDNA を合成し、semi-nested RT-PCR を行ったところ、図 5A に示すとおり 35 コピー/g の汚染レベルまで明瞭な増幅バンドが観察され、それをシークエンスしたところ最初に添加した NoV のものであることが確認された。また、2nd.PCR を real-time PCR で行った結果とも一致した。

3.4 PCR の反応系の検討

逆転写反応専用プライマーを用いることで、ブ菌遺伝子の混入を抑制し、遺伝子解析可能な NoV 増幅断片を得ることが可能になった。一方で、現在用いられている PCR の反応系は 10 年以上前のプロトコルを踏襲しており、より高度

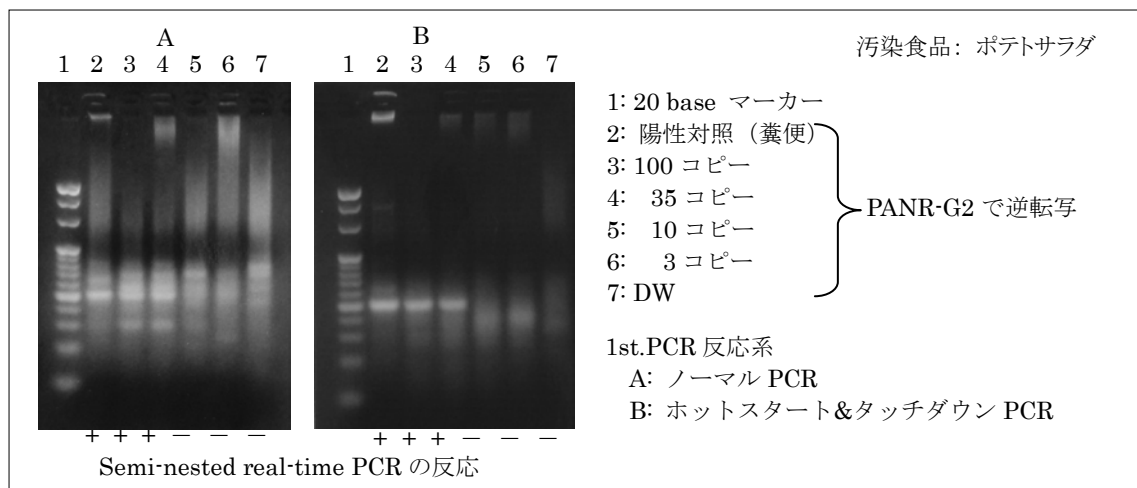


図 6 1st. PCR 反応系の semi-nested real-time PCR への影響 (NoV-GII.4)

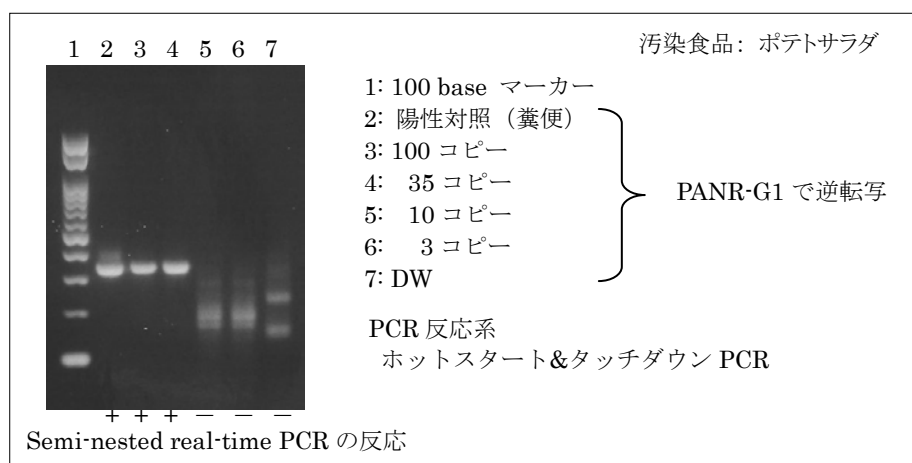


図 7 逆転写反応専用プライマーを用いた semi-nested RT-PCR (NoV-GI.4)

な機能を付加された最新の酵素を活用できていない。そこで、パントラ法の開発を機に PCR 反応系の改良を試みた。図 5B にはホットスタート機能を備えた酵素を用いたタッチダウン PCR による semi-nested RT-PCR の効果を示した。従来の反応系 (ノーマル PCR) である図 5A と比べると増幅バンドがより明瞭になっているのがわかる。そのバンドをシーケンスしたところ、添加したウイルスのものであることが確認できた。また、semi-nested real-time PCR の結果とも一致している。図 5A と図 5B の semi-nested real-time PCR の反応液を回収して電気泳動を行ったものが図 6 である。1st. PCR をノーマル PCR で行った図 6A と比べて、ホットスタート&タッチダウン PCR を行った図 6B の方が非特異的なバンドが少ないのがわかる。この差は、real-time PCR の機器画面における蛍光強度 (増幅カーブ

の高さ) の違いとなって現れる。

3.5 NoV-GI への対応

これまでの検討で、逆転写反応専用プライマーによる cDNA 合成と、ホットスタート&タッチダウン PCR が有効であることが判明したため、引き続き NoV-GI に対する検討を行った。逆転写反応専用プライマーは表 1 に示したとおりである。ポテトサラダを用いた検討では、35 コピー/g の汚染レベルまで semi-nested RT-PCR により明瞭なバンドが認められた (図 7)。このバンドをシーケンスしたところ、添加ウイルスのものであることが確認された。また、semi-nested real-time PCR の結果とも一致した。一方で、逆転写反応専用プライマーである PANR-G1a は、十分な Tm を確保するために LNA 修飾を用いていることから、図 8 においてその効果を検証し

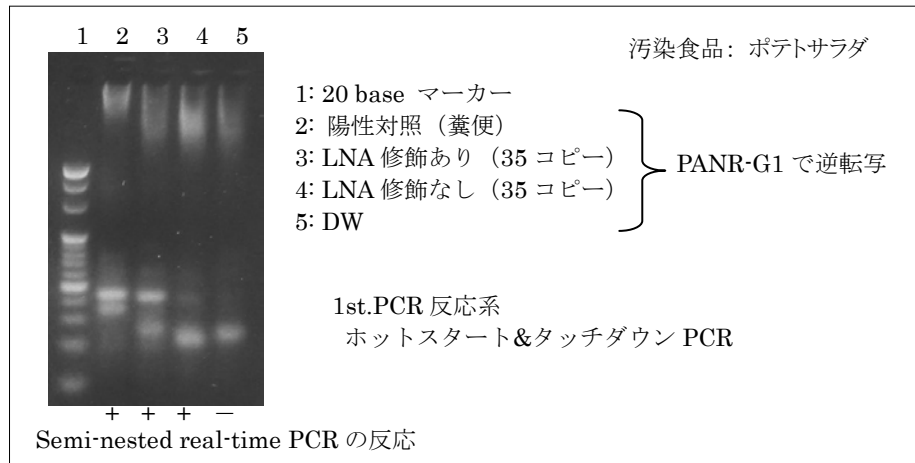


図8 Semi-nested real-time における LNA 修飾塩基の効果 (NoV-GI. 4)

た。LNA 修飾をしていない PANR-G1a の配列で合成したプライマーでは増幅が弱いことがわかる (図8 レーン4)。

4. 考察

4.1 混入するブ菌遺伝子の功罪

本法は食品乳剤にブ菌を投入して、菌体表面にウイルス粒子を吸着させて回収することを基本原理とするため、抽出された RNA にブ菌の遺伝子が大量に混入してくるという性質がある。ブ菌の遺伝子は、極微量のウイルス RNA を安定的に保持するキャリアーとして働くため、検出感度に対してはプラスの効果がある。このことは、サザンブロットハイブリダイゼーション等において、極微量のプローブに大量のサケ精子 DNA を添加するのと同じ理由である。その一方で、検出された遺伝子をさらに詳しく解析しようとする際に妨害物質になるという問題が明らかとなった。しかし、純粋な Protein A を固定化したビーズを使用すると、上記のキャリアー効果が得られなくなることに加えて、単位体積当たりの表面積が小さい (粒子径が大きい) ことから、十分な感度が得られないことがわかっている。従って、ブ菌遺伝子のキャリアーとしての長所を活かしつつ、遺伝子解析の障害とならないような方法を考案する必要があった。

4.2 逆転写反応と PCR で使用するプライマーと、検出プロセスで起こり得る反応

逆転写反応や PCR には多くの種類のプライマーが用いられるが、本研究の課題においては個々のプライマーの特異性を検討しても有効な策が

打ち出せないことは、

$$[PT]=K[P][T]$$

の式から明らかである (K のみを最適化しても、圧倒的に大量に存在するブ菌の [T] には抗し得ない)。そこで、逆転写反応→1st. PCR→2nd. PCR の3段階の反応を一つのものと見なして、どのような反応が起こっているかを理論的に検討し、実験で確認する作業を行った。ランダムプライマーで逆転写反応を行うと、100 コピー/g 以下の低濃度汚染サンプルでは、全く増幅が起らなかった (図4 レーン3~6)。この場合は、NoV もブ菌も含めて反応系に存在する全ての RNA が基質となるため、逆転写酵素の能力をはるかに超えてしまった (酵素反応速度が飽和した) 状態になっているものと考えられる。オリゴ (dT) を用いた逆転写反応も同様と予測される。

G2SKR のような PCR と同じ NoV 特異的プライマーを使うと、ランダムプライマーよりはブ菌に対する K が小さくなるため、相対的に NoV の RNA を逆転写する割合は増えることが予想される。しかし、ブ菌に対する非特異反応もゼロではなく、元々ブ菌の [T] が圧倒的に大きいため、無視できないくらいのブ菌由来 cDNA が生じることになる。その cDNA は末端が G2SKR の配列になっているため、1st. PCR ではホモロジー100%で効率よく増幅される。最初から多かったブ菌の遺伝子がこの段階でさらに増えるため、NoV の PCR 産物に混入して解析の障害となる (図4 レーン8~11)。

本研究で設計した逆転写反応専用プライマーで cDNA を合成した場合、上記のごとく非特異

反応はゼロではないためブ菌の cDNA が生じるところまでは同じである。しかし、それに続く 1st. PCR でもブ菌の非特異増幅反応は起こるものの、それは逆転写反応時の非特異反応とは異なる、新しい種類の反応が 1 からやり直しとなる。2nd. PCR に移行した際も、ブ菌由来の非特異増幅反応は別の種類のものになる。ここまでを総括すると逆転写反応→1st. PCR→2nd. PCR の 3 段階の反応において、NoV 遺伝子だけが連続したプロセスで効率よく増幅をはたし、ブ菌の非特異反応は 2 か所の矢印の部分でリセットされるため、結果として天文学的な初期濃度の差を超えることが可能になるものと考えられた。このことは、図 5 と図 7 において、遺伝子解析可能な NoV の増幅断片が得られたことで確認できた。検出限界は、NoV-GI と NoV-GII のいずれも食品 1 g 当たり 35 コピーであり、予備試験の結果（図 2, 3）が再現された。

4.3 PCR 反応系の見直し

現在 NoV 検出のために常用されている PCR 反応系は、10 年以上前に作成されたプロトコルを踏襲しており、最新の生命工学の成果を享受できていない部分もある。かつては、PCR に用いる耐熱性 DNA ポリメラーゼに関して選択の余地はほとんど無かったが、近年は反応速度・正確性・阻害物質耐性などの機能を付加した酵素を目的に応じて使い分けることが可能となっている。本研究の目的が、ブ菌の遺伝子に由来する非特異反応の抑制であることから、ホットスタート機能を備えた酵素によるタッチダウン PCR を用いることでさらなる改善が見込めるものと期待された。こうした改善は、図 5B に示すとおり、増幅バンドの明瞭化として観察することができた。また、real-time PCR においてコピー数算定に直接関与する Ct 値（増幅曲線の横軸）のみが着目され、蛍光強度（縦軸）はあまり重視されてこなかったという問題がある。しかし、蛍光強度が低い状態での運用は、実事例の大部分を占めると想定される低レベル汚染サンプルにおいて、検出結果が不安定になるため看過し得るものではない。蛍光強度低下の原因には様々な要素があるが、非特異反応によって

1st. PCR の段階で COG2F と G2SKR が "初めて" 反応系に加えられるところに意義が見出される。DNA ポリメラーゼの活性が NoV 遺伝子以外の増幅に奪われる（競合阻害）ことが大きく影響している。図 6 に示すとおり、ホットスタート & タッチダウン PCR によって、増幅時の非特異反応は大幅に抑制されており、real-time PCR における蛍光強度を確保することに寄与するものと考えられた。

4.4 LNA 修飾塩基導入の効果

NoV-GI に対応した逆転写反応専用プライマーである PANR-G1 を構成するオリゴヌクレオチド PANR-G1a には LNA 修飾塩基が用いられた。この措置は、PANR-G2 のように塩基長を延ばすことでは Tm を確保できない事情（変異が多すぎてランダムプライマーと同じになる）によるものである。LNA 修飾の効果を検証するために、修飾を施していないオリゴヌクレオチドと比較したものが図 8 であり、レーン 3 と 4 を比較すると増幅効率の違いは明らかである。

4.5 実事例へ適用と今後の課題

本研究で得られた知見を総括すると、パントラ法によって抽出された RNA については、図 9 に示したプロセスで検出を試みるのが妥当と考えられる。ここで構築されたプロトコルは、島根県浜田市の仕出し弁当による食中毒事例²⁵⁾や、静岡県浜松市の学校給食パンによる食中毒事例²⁶⁾に実際に適用されたことで、十分実用に耐えるものであることが証明された。また、厚生労働省通知²⁷⁾に記載されたことで、今後導入を進める機関が拡大するものと予想される。表 1 に記載したプライマーは、将来の状況によって柔軟に変更し得るが、PCR で用いるプライマーとは異なる逆転写反応専用プライマーを設定することが、検出後に遺伝子解析を実施するのに不可欠である。NoV 以外の食中毒起因ウイルスについてもパントラ法が適用できることがすでに明らかとなっているが、遺伝子解析まで踏み込むためには逆転写反応専用プライマーの設計を進める必要がある。

一方で、本法が普及するにつれて、実験室内

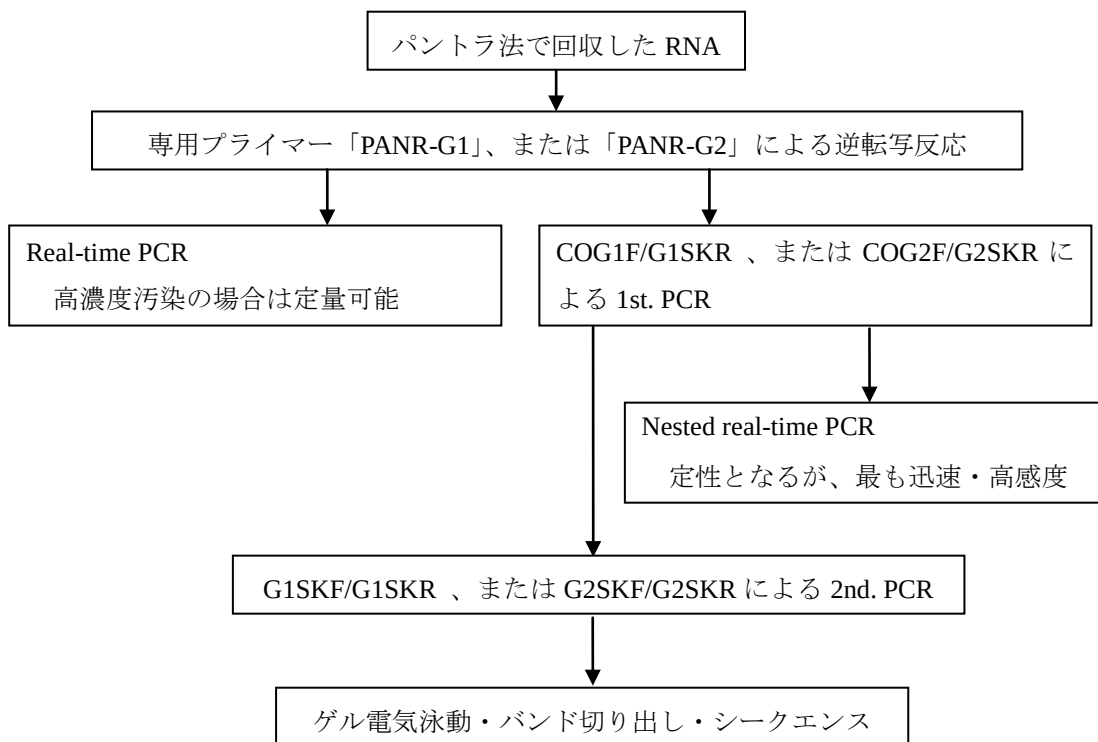


図9 パントラ法による RNA 抽出後のプロセス

汚染による偽陽性の問題が浮上してくることが想定される。本研究では遺伝子解析可能な RNA を得る手法を開発することができたが、それは両刃の剣であることに留意する必要がある。すなわち、遺伝子解析を積極的に実施すれば、それだけ作業環境中の PCR 増幅産物汚染が蓄積されて、新規の食品検査において悪影響を及ぼすというジレンマである。これまでは、作業する実験室を分けて、器具や試薬を分別使用するなど、実験操作を慎重に行うということ以外に積極的な偽陽性対策は取られてこなかった。しかし、食品のウイルス検査が現実的なものとなった段階では、その社会的な影響に鑑みて、一層の偽陽性対策を講じる必要があるものと考えられる。

さらに、本法が有効に活用されるためには、適切な食品サンプルの確保が重要である。具体的には、実際に食卓に供せられる段階の検食（調理から盛り付けのプロセスを経たもの）を保存するという原則を、事業者に周知する必要がある。

5. まとめ

開発途中で浮上した、抽出 RNA の遺伝子解析が困難であるという問題に対して解決策を見出した。PCR で用いるものとは異なる専用プライマーを用いて逆転写反応を行うことで、検出された遺伝子のシーケンスを確認することが可能となった。この方法は島根県浜田市や静岡県浜松市で発生した実際の食中毒事例で活用することができた。今後は、ノロウイルス以外の食中毒起因ウイルスへの対応と、実事例への適用例が増えるにつれて問題となることが予想される偽陽性の抑制が課題となる。

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, 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: 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, 1, 2012, 32-37.
- 18) 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.
- 19) 斎藤博之, 他: 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, 秋田県健康環境センター年報, 8, 2012, 71-78.
- 20) 三好龍也, 他: 食品中からノロウイルス遺伝子が検出された食中毒事例, 病原微生物検出情報, 32, 12, 2011, 13-14.
- 21) Kojima S., et. al.: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. J. Virol. Method, 100, 2002, 107-114.
- 22) Kageyama T., et. al.: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol., 41, 2003, 1548-1577.

- 23) Michael P., et. al.: LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *TRENDS in Biotechnology* **21**, 2003, 74-81.
- 24) Latorra D., et. al.: Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *J. Mol. Cell Probes* **17**, 2003, 253-259.
- 25) 飯塚節子, 他: パンソルビン・トラップ法による食品からのノロウイルス遺伝子の検出ー弁当屋を原因施設としたノロウイルス集団食中毒事例ー, 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 24 年度総括・分担研究報告書, 2013, 175-180.
- 26) 古田敏彦, 他: 浜松市内におけるノロウイルス集団食中毒事例, 病原微生物検出情報, **35**, 7, 2014, 4-5.
- 27) 厚生労働省通知: 「ノロウイルスの検出法について」の一部改正について, 食安監発 1022 第 1 号, 平成 25 年 10 月 22 日.