

## Ⅲ 報告



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(平成 28～30 年度)

## サポウイルスに対してパンソルビン・トラップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化

斎藤博之 秋野和華子 野田 衛<sup>\*1</sup>

パンソルビン・トラップ法（パントラ法）は、食品検体に含まれるウイルス粒子を黄色ブドウ球菌（ブ菌）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 には大量のブ菌由来の遺伝子が混入することになるが、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。その一方で、大量のブ菌の遺伝子の中に含まれるウイルス遺伝子を検出するという特異な条件を課されることから、試験機関によって検出精度がバラつくという問題が指摘された。これまでにノロウイルス RNA の検出系に関しては、ブ菌の影響を最小限にする反応条件が確立されたことから、引き続きサポウイルス（SaV）についても RNA 検出系の最適化を図った。糞便検体からの SaV の検出系は RT-PCR, real-time PCR 共にすでに報告されているが、これらの方法をパントラ法に適用した場合には、ブ菌遺伝子に対する副反応によって検出感度の低下が見られた。特異性向上のために PCR のアニーリング温度を高く設定したところ、ブ菌遺伝子に対する副反応は抑制されたものの、プライマーの Tm 値が低いことから感度の改善には至らなかった。LNA（Locked Nucleic Acid）修飾塩基を導入して Tm 値を上げる手法を用いることで、逆転写, 1st. PCR, 2nd. PCR, 及び real-time PCR の各反応系において SaV 遺伝子の検出効率を最適化することができた。

### 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いる<sup>1,2)</sup>。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た。原因物質としてはノロウイルス（NoV）が大部分を占めるが、他にもサポウイルス（SaV）や腸管系アデノウイルスも含まれている。さらに、輸入食品等が原因と考えられる A 型肝炎ウイルス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<sup>3)</sup>。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<sup>4-13)</sup>。その後、平成 22～24 年度に実施された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」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添加抗体の安定供給が図られた他、検出した遺伝子の塩基配列解析も可能となった<sup>14-19)</sup>。さらに、共通試薬とノロウイルスを含む共通検体を用いたコラボ・スタディにおいて、試験機関ごとの結果にバラツキが生じたことから、反応系等の最適化を行った<sup>20)</sup>。今回は、NoV と並んで食中毒原因物質となり得る SaV の RNA 検出系の最適化を図ったので報告する。

### 2. 方法

#### 2.1 研究材料

実験には市販きな粉を用いた。また、検出対象となるウイルスとして、SaV-GI.1（Accession No: AB685711）を含む糞便を用いた。

#### 2.2 試薬類

##### 2.2.1 食品洗滌液

Tris-HCl（pH8.4）－0.5 M NaCl－0.1% Tween20 を調製して使用した。

<sup>\*1</sup> 国立医薬品食品衛生研究所

## 2.2.2 ガンマグロブリン

米国 HDM Labs Inc.社の工業用ガンマグロブリン粉末を、アドビー・ジャパン社を通じて購入し、蒸留水（DW）にて5%溶液とした。

## 2.2.3 パンソルビン

黄色ブドウ球菌（ブ菌）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（Thermo Fischer Scientific）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 DNase I（RT Grade）及び RNase inhibitor

ニッポンジーン製の製品を使用した。

## 2.2.8 アミラーゼ

枯草菌由来  $\alpha$ -Amylase 粉末（和光純薬）を使用した。

## 2.2.9 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。

## 2.2.10 conventional PCR 用酵素

1st.PCR には KAPA2G Robust HotStart PCR Kit（KAPA BIOSYSTEMS）を用いた。反応は添付 buffer A を使用し、 $Mg^{2+}$ を4.5 mMに増量し、基質として dUTP を添加した系<sup>20)</sup>により行った。

2nd. PCR には AptaTaq Fast PCR Master（Roche Diagnostics）を用いた。このとき酵素をホットスタート化するため、anti-Taq high（東洋紡）を添加した。

## 2.2.11 逆転写酵素

ReverTra Ace（東洋紡）を使用した。

## 2.2.12 逆転写反応に用いたプライマー

ランダム 9 mer（タカラバイオ），及び、逆転写反応専用プライマー PANR-SV（表 4）を用いた。

## 2.2.13 conventional PCR に用いたプライマー

Kitajima らの方法<sup>21)</sup>に記載のあるプライマー，及びそれらを元に LNA（Locked Nucleic Acid）修飾<sup>22)</sup>を加えたプライマーを用いた（表 1，表 2）。

## 2.2.14 conventional PCR 装置

アステック社製「PC-320」を用いた。

## 2.2.15 real-time PCR 装置

ロシュ社製「LightCycler 480」を用いた。

## 2.2.16 real-time PCR 用酵素

ロシュ社製「LightCycler 480 Probe Master」を用いた。

## 2.2.17 real-time PCR 反応系

Oka らの方法<sup>23)</sup>に従った。プライマーについては一部に LNA 修飾を加えた（表 3）。

## 2.3 検討の順番

次の 2 項目について反応条件の最適化を行った。

（1）逆転写反応系の最適化

（2）PCR 反応系の最適化

なおプロトコル上の順番は（1）→（2）であるが、最適化にあたっては逐次結果を観察しながら行う必要があるため、検討の順番は（2）→（1）とした。すなわち、最初に（2）の検討と最適化を行い、次に（1）を検討する（最適化済みの（2）を用いて結果を観察する）という順になる。

## 2.4 パンソルビン・トラップ法の手順

平成 22 年度に完成した汎用プロトコル（図 1）に従った。本研究では、反応条件の最適化のために、「パントラ抽出物」による負荷試験を行った。

「パントラ抽出物」は、ウイルスを含まない市販のきな粉からパントラ法のプロトコルを用いて調製した。この時、平成 25 年に検討したオンカラム DNase I 処理（図 2）を組み入れた。

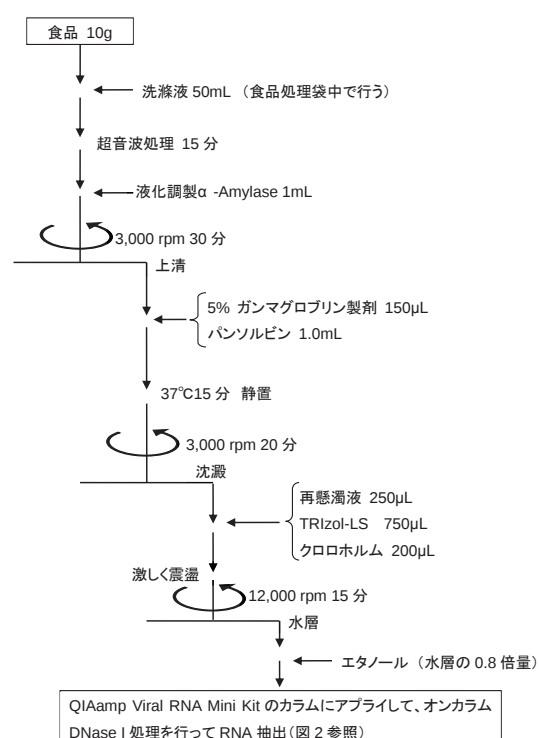


図 1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

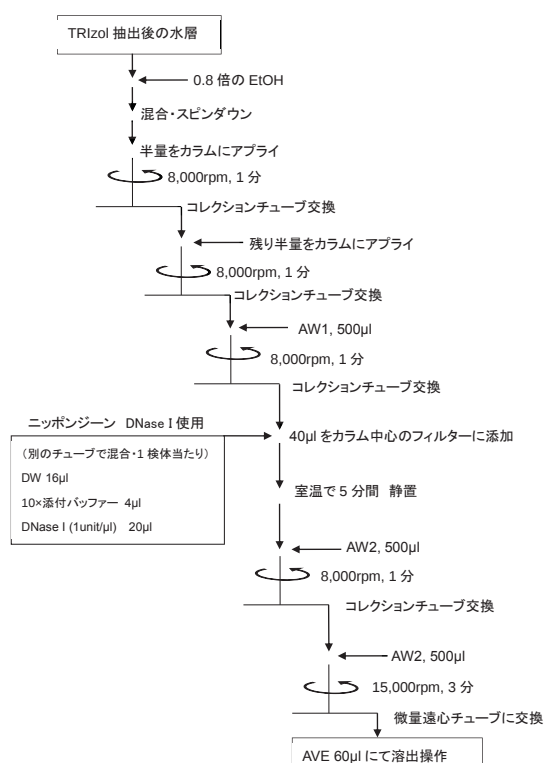


図2 QIAamp Viral RNA Mini Kit へのオンカラム DNase I 処理

## 2.5 PCR の反応条件に関する検討

$5 \times 10^5$  コピー/ $\mu\text{L}$  の SaV GI.1 cDNA を DW、及びパントラ抽出物で段階希釈することで、被検体を調製した。これらを、表 1 に示した Kitajima 法の 1st. PCR プライマー、及びそれらに LNA 修飾を加えたプライマーを用いた反応系で増幅を行い、検出効率を比較した。反応容量  $25 \mu\text{L}$  中に上記被検体が  $5 \mu\text{L}$  含まれるようにした。PCR の設定条件は、原法のアニーリング温度に従って、

95°C 2 分 : 1 サイクル

95°C 30 秒—50°C 30 秒—72°C 60 秒 : 40 サイクル

72°C 7 分 : 1 サイクル

を行った。

また、検討条件としてアニーリング温度を 60°C に設定し、

95°C 2 分 : 1 サイクル

95°C 30 秒—60°C 30 秒—72°C 60 秒 : 40 サイクル

72°C 7 分 : 1 サイクル

を行った。

次に、 $5 \times 10^3$  コピー/ $\mu\text{L}$  の SaV GI.1 cDNA を DW とパントラ抽出物で段階希釈したものを被検体とし、表 2 に示した Kitajima 法の 2nd. PCR プライマ

ー、及びそれらに LNA 修飾を加えたプライマーを用いた反応系について検討した。反応プログラムは、アニーリング温度を 60°C に設定し、

95°C 2 分 : 1 サイクル

95°C 30 秒—60°C 30 秒—72°C 30 秒 : 40 サイクル

72°C 7 分 : 1 サイクル

を行った。

さらに、SaV GI.1 cDNA を  $10^1 \sim 10^3$  コピー投入した反応系において、表 3 に示した real-time PCR に用いるプライマー・プローブセットの内、 $T_m$  値が低い SaV1245R に LNA 修飾を加えたものについて検討した。

## 2.6 逆転写反応に関する検討

$2 \times 10^6$  コピー/ $\mu\text{L}$  の SaV GI.1 RNA を DW、及びパントラ抽出物で段階希釈した被検体を調製した。ランダムプライマー、または表 4 に示した逆転写反応専用プライマー PANR-SV を用いて cDNA を合成した。PANR-SV は PANR-SVa, PANR-SVb, PANR-SVc を縮重度に応じて 6:3:1 で混合して調製した。反応温度は、42°C にて行った。反応容量は  $20 \mu\text{L}$  で、上記被検体が  $10 \mu\text{L}$  含まれるようにした。30 分の逆転写反応後、DW を  $20 \mu\text{L}$  加えたもの (2 倍希釈) を  $5 \mu\text{L}$  取り、先に最適化を済ませた conventional PCR と real-time PCR の反応系により増幅効率を比較した。

## 3. 結果

### 3.1 PCR の反応条件に関する検討

図 3 に示したとおり、原法に従いアニーリング温度を 50°C に設定した場合は、DW による希釈系列では  $10^{-4}$  希釈まで増幅バンドが検出されたが、パントラ抽出物による段階希釈系列では  $10^2$  希釈までしか検出されなかった。一方で、ブ菌 16s リボソーム由来のバンドが検出された (シーケンスにより確認)。アニーリング温度を 60°C まで高めたところ、ブ菌由来のバンドは消失したものの、SaV のバンドもほとんど認められなくなった。表 1 に示したプライマーの中で、特に  $T_m$  値が低い R13 と R14 について、LNA 修飾を加えて  $T_m$  値を向上させたところ (R13-L5、及び R14-L4)、アニーリング温度 60°C の設定であっても  $10^{-4}$  希釈まで SaV のバンドを検出できるようになった。

$T_m$  値の低い SaV1245Rfwd に LNA 修飾プライマーを用いた反応系では、パントラ抽出物存在下でも  $10^{-4}$  希釈までバンドを検出できた (図 4)。

T<sub>m</sub> 値の低い SaV1245R に LNA 修飾プライマーを用いることで、real-time PCR の感度が全体的に向上し、パントラ抽出物存在下でも 10<sup>1</sup> コピーまで検出できた (図 5)。

### 3.2 逆転写反応に関する検討

図 6 に示したとおり、ランダムプライマーを用いた逆転写反応においては、DW による段階希釈系列では 10<sup>-5</sup> 希釈まで増幅バンドが認められたが、パントラ抽出物による段階希釈系列では 10<sup>-3</sup> まで

しか検出できなかった。一方で、ブ菌由来のバンドが観察された。PANR-SV による逆転写反応を行ったところ、パントラ抽出物存在下でも 10<sup>-5</sup> 希釈まで SaV のバンドが検出できた。ブ菌由来のバンドも残存したが、1st.PCR 産物に対して 2nd. PCR を行うことで SaV の遺伝子のみを増幅できた。また、real-time PCR を用いた反応系でも、PANR-SV を用いた逆転写反応で 10<sup>-5</sup> 希釈まで検出できることが確認された (図 7)。

表 1 SaV の 1st. PCR 用プライマーの配列と T<sub>m</sub> 値

| 使用目的    | 名称      | 塩基配列 (5'→3')                                     | T <sub>m</sub> 値 (°C) | 参考文献 |
|---------|---------|--------------------------------------------------|-----------------------|------|
| Forward | SaV124F | GAYCASGCTCTCGCYACCTAC                            | 65~69                 | 23   |
|         | SaV1F   | TTGGCCCTCGCCACCTAC                               | 67                    | 23   |
|         | SaV5F   | TTTGAACAAGCTGTGGCATGCTAC                         | 66                    | 23   |
| Reverse | R13     | GGTGANAYNCCATTCTCCAT                             | 56~65                 | 21   |
|         | R14     | GGTGAGMMYCCATTCTCCAT                             | 59~67                 | 21   |
| Reverse | R13-L5  | G <u>G</u> TGANAYNC <u>C</u> ATT <u>T</u> KTCCAT | 66~77                 | 本研究  |
|         | R14-L4  | G <u>G</u> TGAGMMYCCAT <u>T</u> CTCCAT           | 66~74                 | 本研究  |

G, C, T: LNA 修飾

表 2 SaV の 2nd. PCR 用プライマーの配列と T<sub>m</sub> 値

| 使用目的    | 名称             | 塩基配列 (5'→3')                          | T <sub>m</sub> 値 (°C) | 参考文献 |
|---------|----------------|---------------------------------------|-----------------------|------|
| Forward | SaV1245Rfwd    | TAGTGTTTGARATGGAGGG                   | 57~59                 | 21   |
| Reverse | R2             | GWGGGRTCAACMCCWGGTGG                  | 65~70                 | 21   |
| Forward | SaV1245Rfwd-L3 | TAG <u>T</u> GTTT <u>G</u> ARATGGAGGG | 63~64                 | 本研究  |

G: LNA 修飾

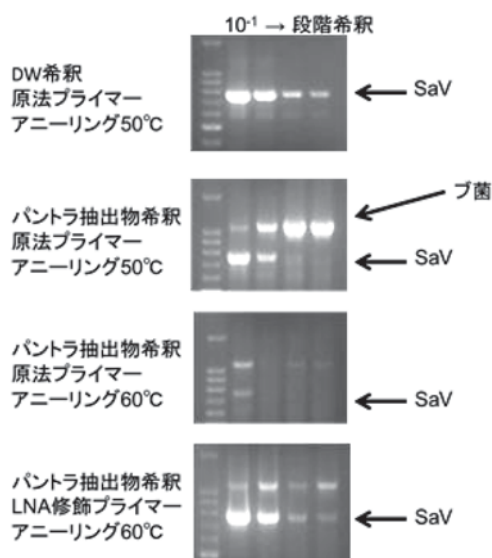


図 3 SaV の 1st. PCR における LNA 修飾プライマーの効果

5×10<sup>5</sup> コピー/μL の cDNA を段階希釈したもの を 5μL 投入 (25μL 反応系)

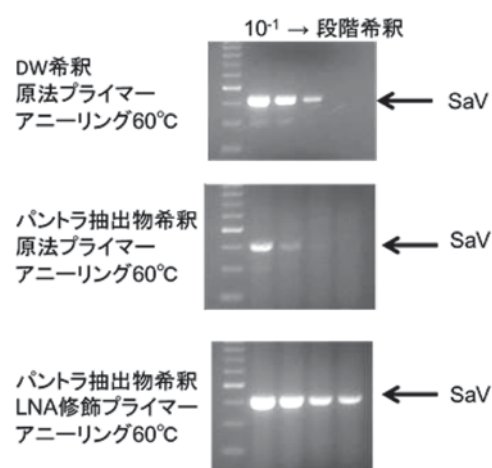


図 4 SaV の 2nd. PCR における LNA 修飾プライマーの効果

5×10<sup>3</sup> コピー/μL の cDNA を段階希釈したもの を 5μL 投入 (25μL 反応系)

表3 SaV の real-time PCR 用プライマー・プローブセットの配列と Tm 値

| 使用目的    | 名称          | 塩基配列 (5'→3')                                  | Tm 値 (°C) | 参考文献 |
|---------|-------------|-----------------------------------------------|-----------|------|
| Forward | SaV124F     | GAYCASGCTCTCGCYACCTAC                         | 65~69     | 23   |
|         | SaV1F       | TTGGCCCTCGCCACCTAC                            | 67        | 23   |
|         | SaV5F       | TTGAACAAGCTGTGGCATGCTAC                       | 66        | 23   |
| Reverse | SaV1245R    | CCCTCCATYTCAAACACTA                           | 57~59     | 23   |
| Probe   | SaV124TP    | FAM-CCRCCTATRAACCA-TAMRA-MGB                  | *1        | 23   |
|         | SaV5TP      | FAM-TGCCACCAATGTACCA-TAMRA-MGB                | *2        | 23   |
| Reverse | SaV1245R-L3 | <u>C</u> CCTC <u>C</u> ATYT <u>C</u> AAACACTA | 65~66     | 本研究  |

C: LNA 修飾

\*1: オリゴ DNA の Tm 値は 47~55°Cだが, MGB 修飾により親和性を上昇させている。

\*2: オリゴ DNA の Tm 値は 58°Cだが, MGB 修飾により親和性を上昇させている。

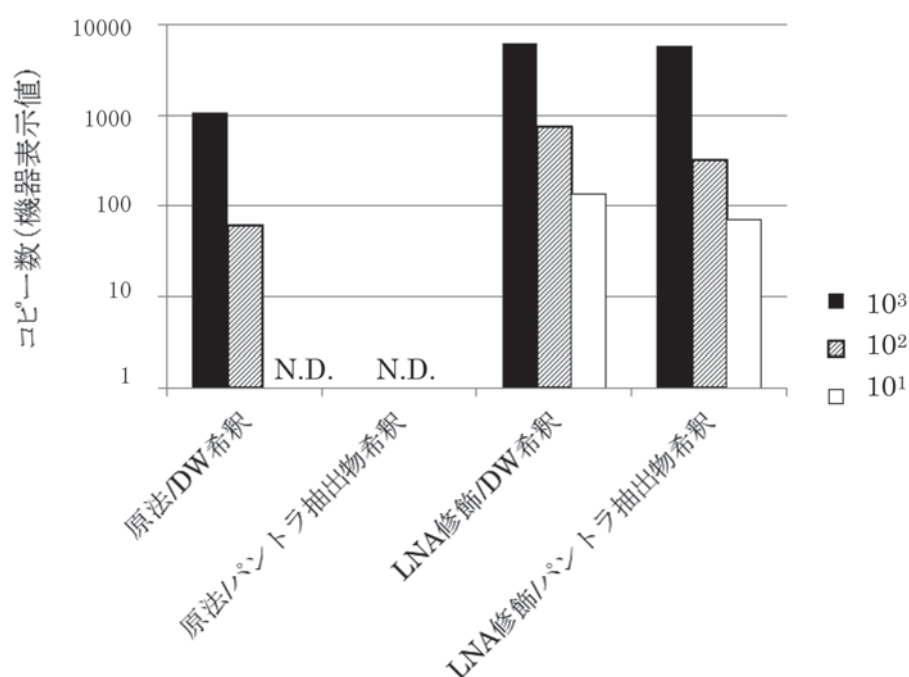


図5 SaV の real-time PCR における LNA 修飾プライマーの効果

10<sup>1</sup>~10<sup>3</sup>コピーの cDNA を投入 (20μL 反応系)

N.D.: 不検出。

表4 SaV の逆転写反応専用プライマーの配列と Tm 値

| 名称       | 塩基配列 (5'→3')                                                | Tm 値 (°C) | 縮重度  |
|----------|-------------------------------------------------------------|-----------|------|
| PANR-SVa | G <u>C</u> VNYRA <u>A</u> RT <u>G</u> KT <u>G</u> RTTVACYTG | 61~83     | 1536 |
| PANR-SVb | GMR <u>T</u> TR <u>A</u> RT <u>G</u> K <u>C</u> KRTTVACYTG  | 60~82     | 768  |
| PANR-SVc | GYGGWRRRAATGGYGGTTTRACYTG                                   | 61~73     | 128  |

A, G, C, T: LNA 修飾

PANR-SV: PANR-SVa, PANR-SVb, PANR-SVc を 6:3:1 で混合した。

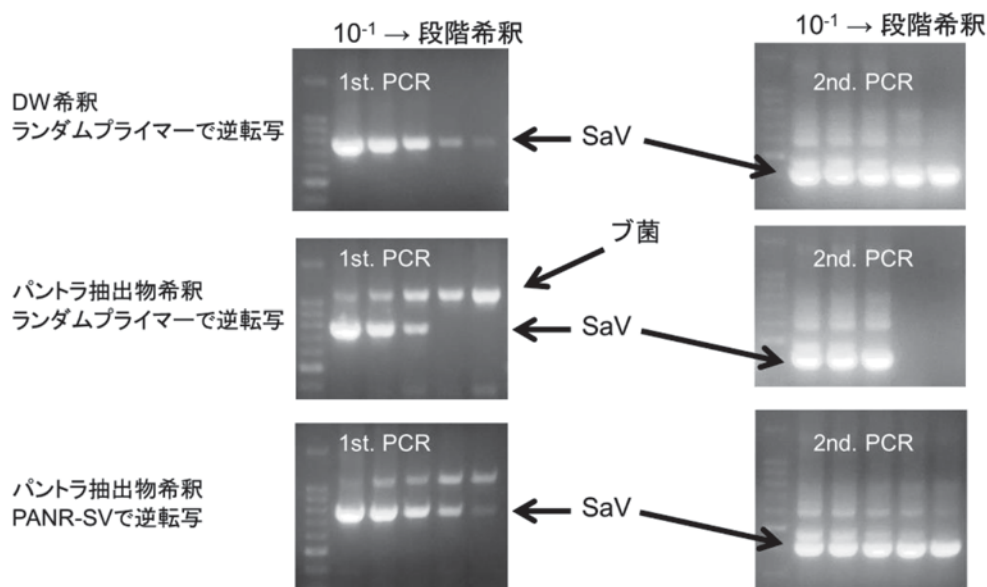


図6 SaV の RT-PCR における逆転写反応専用プライマー (PANR-SV) の効果  
 $2 \times 10^6$  コピー/ $\mu\text{L}$  の RNA を段階希釈したものを逆転写反応の後, RT-PCR で増幅した。

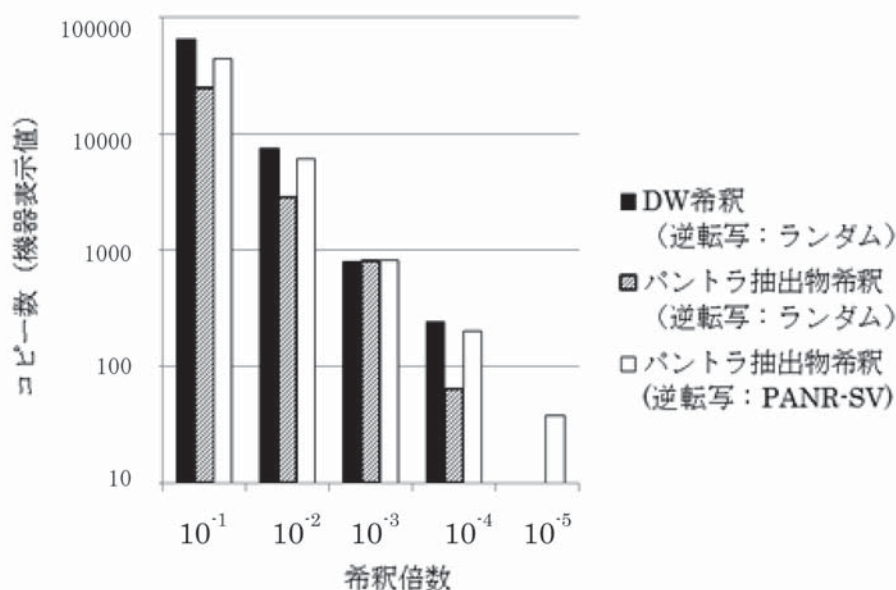


図7 SaV の Real-time PCR における逆転写反応専用プライマー (PANR-SV) の効果  
 $2 \times 10^6$  コピー/ $\mu\text{L}$  の RNA を段階希釈したものを逆転写反応の後, real-time PCR で定量した。

## 4. 考察

### 4.1 検討の順番

本法はすでに複数の実事例において食品からの NoV の検出に成功していることから, プロトコルとしては完成の域にあるものと考えられる<sup>24-26)</sup>。しかし, 実施する機関が増えるにつれて, 検出精度にバラつきが生じることもあるため, あらかじ

め対策を講じておく必要がある。NoV については, すでに RNA 検出系を最適化しており, その際にアミラーゼ粉末の液化調製やオンカラム DNase I 処理などの改良も実施した。本研究では NoV の場合と同様に, パントラ抽出物による負荷試験を中心に SaV の RNA 検出系に対して最適化を図った。酵素の選定については NoV における研

究で結果を示していることから、次の2点に関してプライマー設計の視点から検討した。

#### (1) 逆転写反応系の最適化

#### (2) PCR 反応系の最適化

検討の順番はプロトコルとは逆に(2)→(1)とした。これは、(1)→(2)の検討では、最適化されていないプロセスを経た結果を見ることになり不正確であるという理由による。

### 4.2 PCR 反応条件に関する検討

検討にあたっては、PCRを行う直前の段階であるcDNA合成までは問題がないことを前提としなければならなかった。そこで、結果に影響が及ぶ要因を排除するために、ウイルスを含まない食品から調製したパントラ抽出物をベースとし、そこにSaVの遺伝子配列由来のcDNAを加えた被検体を用いた。検出感度の検討のために段階希釈試験が一般的に行われているが、ここではDWで希釈する代わりにパントラ抽出物を使うことで、大量のブ菌遺伝子の存在下という負荷的条件を設定している。

表1に示したKitajima法の1st.PCRプライマーの中で、R13とR14のTmが特に低くなっている。PCRのアニーリング温度は最もTm値の低いプライマーに合わせて設定されるため、原法では50℃となっている。この条件下では、SaV cDNAをDWで段階希釈した場合には十分な感度が得られているものの、パントラ抽出物存在下ではブ菌の遺伝子にも非特異的な反応が起こり、SaV遺伝子の増幅が阻害されている(図3)。一般的に、PCRの特異性を高めるためには、アニーリング温度を高く設定するのがよいとされているが、60℃のアニーリングでは、ブ菌の非特異バンドは抑制されたものの、SaVに対する検出感度も低下した。そこで、高いアニーリング温度と検出感度を両立させるためには、プライマーのTm値そのものを高めてやればよいことになる。その方法の一つとしてLNA修飾があり、表1ではR13とR14に対して導入することで、Tm値を高めている。このような改良を加えたR13-L5とR14-L4を用いた上で、アニーリング温度を60℃に設定したPCRを行うと、図3に示したように、パントラ抽出物存在下でも十分な検出感度が得られた。

表2に示したKitajima法の2nd. PCRで用いるプライマーの内、SaV1245RfwdのTm値が低いため、LNA修飾を加えることで、もう一方のプライマー

であるR2とTm値をそろえることができた。原法では、2nd.PCRのアニーリング温度も50℃に設定されていたが、こうした改良を加えることで、60℃のアニーリングが可能となり、パントラ抽出物存在下でも十分な感度が得られた(図4)。

表3にはOkaらの方法で用いられているreal-time PCRのプライマー・プローブセットを示したが、この中でSaV1245Rだけが他のプライマーよりもTm値が低くなっている。原法の反応条件におけるアニーリング温度が62℃に設定されていることから、それよりもTm値が低いことで不都合が生じる可能性がある。プローブに使われているオリゴDNAもTm値が低い、MGB修飾によって鋳型に対する親和性が高められているため問題は無い。図5を見ると、原法の条件では低濃度領域で検出感度が低下し、パントラ抽出物存在下では、その傾向が著しい(検出できない)ことがわかる。そこで、SaV1245RにLNA修飾を加えて、他のプライマーと同等のTm値まで向上させたSaV1245R-L3を用いて、同じ被検体からの検出を試みたところ、全体的に感度が高められ、パントラ抽出物存在下でも十分な検出感度が得られた。

### 4.3 逆転写反応に関する検討

PCR反応系の最適化の場合と同様に、逆転写反応直前の段階までは問題がないことを前提として検討を行う必要があることから、SaV RNAをパントラ抽出物で段階希釈した被検体を用いた。表4に示したプライマーを用いて逆転写反応を行った後は、最適化の済んだconventional PCR、またはreal-time PCRで結果を比較検討した。

図6に示したとおり、DWによる段階希釈系列では、ランダムプライマーでも $10^{-5}$ 希釈までバンドが認められるが、パントラ抽出物存在下では、 $10^{-3}$ 希釈までしか検出できず、ブ菌による非特異増幅バンドが目立つ結果となった。逆転写反応専用プライマーPANR-SVを用いることで、 $10^{-5}$ 希釈まで検出できるようになり、2nd. PCRを行うことで確実にSaV遺伝子を増幅することができた。同じ希釈系列の被検体をreal-time PCRで比較したところ、PANR-SVを用いることで $10^{-5}$ 希釈まで検出できた。

### 4.4 今後に向けた課題

本研究では、各種プライマーのTm値を調整するためにLNA修飾を多用している。プライマー設

計に当たっては、Forward 側と Reverse 側のプライマーの Tm 値をそろえることが基本となるが、SaV のように塩基配列が多様性に富んでいるウイルスの場合は、配列の保存領域が優先されるため、Tm 値に関して最適化するのは難しかった。LNA 修飾を導入することで、塩基配列はそのまま高い Tm 値を得ることが可能となるため、他のプライマー設計の際にも役立つものと考えられる。また、図 5 に示されたように、感度が全面的に向上することから、パントラ法以外の日常的な糞便検査に取り入れることにも意義がある。なお、本稿では SaV GI.1 を試験材料としたが、GI.2, GII.3, GIV.1, GV.1 についても同様の結果が得られることを確認している。

他の食中毒起因ウイルスとしては、近年報告が増加しつつある E 型肝炎ウイルス等への適用を進める必要があるが、捕捉抗体の供給源を確保することが重要である。同様に NoV や SaV であっても、新たな型に対応するためには、疫学調査と並行して捕捉抗体の見直しを継続していかなければならない。

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。また、ウイルスは食品中では増殖せず付着するのみであることから、分取した食品サンプルに付着していなければ陰性になってしまう。そのため、サンプリングプランや、スケールアップの方法についても検討する余地が残されている。加えて、今後はウイルスの回収効率を客観的に評価する必要性も生じてくることから、内部標準物質の使用についても検討を進める必要がある。

## 5. まとめ

パントラ抽出物は多くのブ菌遺伝子を含むことから、その中に微量に存在するウイルス RNA を検出するには、逆転写や PCR の反応系を工夫する必要がある。糞便検体では問題なく実施できていた反応系であっても、パントラ抽出物存在下では不都合を起こす場合があることから、最適化は重要である。これまでに NoV RNA 検出系に関しては最適化の検討を行ってきたが、次の課題として SaV について実施した。逆転写反応, 1st. PCR, 2nd.

PCR, real-time PCR の各反応系について、弱点となる Tm の低いプライマーに LNA 修飾を加えることで、高温での反応を可能にし、SaV 遺伝子の検出効率を最適化させることができた。

## 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: 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.

18) 斎藤博之, 他: 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, 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, 35-48.

19) Saito H., et. al.: Development of a practical method to detect noroviruses contamination in composite meals. Food Environ. Virol., 7, 2015, 239-248.

20) 斎藤博之, 他: 食品からのウイルス検出法としてのパンソルビン・トラップ法の精度向上に関する研究, 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検出法に関する研究 平成 25 年度 総括・分担研究報告書, 2014, 31-58.

21) Kitajima M., et. al.: Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan. Appl. Environ. Microbiol., 76, 2010, 2461-2467.

22) Latorra D., et. al.: Design considerations and effects of LNA in PCR primers. Mol. Cell. Probes, 17, 2003, 253-259.

23) Oka T., et. al.: Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. J. Med. Virol., 78, 2006, 1347-1353.

24) 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, 2011, 13-14.

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～弁当屋を原因施設としたノロウイルス集団食中毒事例～, 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) 土屋祐司, 他: パンを原因としたノロウイルス集団食中毒事例, 日本食品微生物学会雑誌, 32, 2015, 153-158.