

平成 28 年度（第 11 回）秋田県健康環境センター研究発表会抄録

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）

食品のウイルス検査法としてのパンソルビン・トラップ法に用いる
捕捉抗体の供給源に関する検討斎藤 博之 秋野 和華子 田中 智之*¹ 野田 衛*²

1. 背景と目的

平成 27 年の食中毒統計によると、全国で 1 年間に 22,718 人が食中毒による健康被害を受けており、その内 65%に相当する 14,876 人がノロウイルス（NoV）の感染によるものである（原因物質別患者数の第 1 位）。同様に事例数においても、全食中毒事例 1,202 例の約 4 割に相当する 481 事例が NoV によって引き起こされている（原因物質別事例数の第 1 位）。このように、食中毒事例の大きな部分を占める原因物質が NoV であることが判明しているにもかかわらずカキ以外の一般的な食品からウイルスを検出することは技術的に困難であった。NoV は、未だ実験室内で培養する技術が確立していないため、それを検出するためには検体に含まれるウイルスの遺伝子を PCR 法により直接増幅する必要がある。我々はこれまでに、固形・液状・練り物・油物等、どのような種類の食品においても NoV 検査を可能とすることを目指し、抗体によるウイルス粒子の特異的捕獲を基本原理とするパンソルビン・トラップ法（パントラ法）を開発した^{1,2)}。本法は、黄色ブドウ球菌の表面に、捕捉抗体を介してウイルス粒子を吸着させて回収・検出するという性質上、添加する抗体の選択が重要となる。捕捉抗体の供給源として、多種類のウイルスの抗体が含まれている医療用ガンマグロブリン製剤を用いていることで、NoV のみならず、サポウイルス（SaV）、A 型肝炎ウイルス（HAV）、アデノウイルス 41 型（AdV41）などの回収に汎用できる可能性がある。一方、ガンマグロブリン製剤は、医薬品であることから普及に当たって障害となる部分もあった。具体的には次の 4 点が懸念されている。

- ①薬機法に定められている「特定生物由来製品」に該当するため、製造番号などの使用記録を 20 年間保管する義務が生じる。
- ②計画生産品であることから流通量に上限があり、医療目的が優先されるために試験検査目的の場合は安定供給されない可能性がある。

③医薬品であることから、医師のいない環境系試験検査機関では購入が困難である。

④将来、試薬メーカーが本法を元に検査キットを開発しようとしても、医薬品を組み入れるのは難しい。

本研究では、これらの懸念を払拭し、食品のウイルス検査の円滑な普及に繋げるために、医薬品以外で安定的に使用できる捕捉抗体供給源を検討し、安定供給ルートの開拓を行った。

2. 方法

医薬品ではないガンマグロブリンは、製品として流通していなかった（平成 25 年度時点）ことから、インド Bharat Serums & Vaccines グループ傘下の Advy Chemical 社と交渉し、同グループの HDM Laboratories 社（ニューヨーク）で製造された工業用ガンマグロブリン粉末を入手した。続いて、工業用ガンマグロブリンが、医療用ガンマグロブリン製剤（米国 Baxter 社製「Gammagard」）と同等に用いることができるかを次の手順で比較検討した。

最初に予備実験として食品洗滌液（0.1M Tris・HCl-0.5M NaCl-0.1%Tween20, pH8.4）50 mL 中に 1.33×10^6 コピーの NoV-GII.4 型を投入し、さらに工業用ガンマグロブリンの添加量を変えてパントラ法によるウイルス粒子の回収を試み、real-time PCR による定量値をもとに最適添加量を検討した。次に NoV の GI.4, GI.6, GII.2, GII.4, GII.6 と SaV の GI.1, GII.3, GIV.1, GV.1, さらに HAV と AdV41 を用いて、医療用ガンマグロブリン製剤との回収率の比較を行った。さらに、NoV-GII.4 型で汚染させたポテトサラダと焼きそばを用いて、回収率を比較した。

3. 結果

NoV-GII.4 を含む 50 mL の食品洗滌液への工業用ガンマグロブリン添加量の検討では、5%溶液を 150 μ L 加えた条件が最も高い回収率を示した。ここで最適化された添加量を用いて、上記の 11 種類

*¹堺市衛生研究所 *²国立医薬品食品衛生研究所

の病原ウイルスについて食品洗滌液からの回収を試みたところ、食中毒の原因ウイルスとして最多の NoV-GII.4 に対して工業用ガンマグロブリンを用いた場合の回収率は 52.0%で、医療用ガンマグロブリン製剤を用いた場合は 46.8%であった。以下、NoV-GII.2 に対しては 38.6%/38.2%（工業用/医療用）、NoV-GII.6: 15.5%/13.3%、NoV-GI.4: 35.7%/37.6%、NoV-GI.6: 12.1%/6.1%、SaV-GI.1: 24.3% /23.7%、SaV-GII.3: 18.1% /17.0%、SaV-GIV.1: 29.7%/25.0%、SaV-GV.1: 29.5%/24.8%、HAV: 17.8%/13.1%、AdV41: 33.0%/32.7%であり、比較した全てにおいて両者は同等であった。また、実際の汚染食品をモデルとした比較試験においても、工業用ガンマグロブリンを用いた系はポテトサラダで 40.6%、焼きそばで 33.5%と、医療用のそれ（ポテトサラダで 34.7%、焼きそばで 32.4%）と同等以上の回収率を示した。

4. 考察

本研究では、食品のウイルス検査の円滑な普及に繋げるために、医薬品ではない、工業用ガンマグロブリンを用いることを検討した。パントラ法における工業用ガンマグロブリンの添加量は 150 μ L で最適化された。医療用ガンマグロブリン製剤の最適添加量も 150 μ L であることから、汎用プロトコルを改変することなしに、ガンマグロブリンの部分置き換えだけで済むことになる。次に食品洗滌液からのウイルスの回収率を、工業用と医療用のガンマグロブリンをそれぞれ用いた場合について比較した。ここでは、食品を用いていないため、純粋に抗原抗体反応の比較となる。その結果、工業用ガンマグロブリンは医療用と比べて同等以上の効果を有することが明らかとなった。さらに、実際の食品を用いて回収率を比較した場合でも、工業用ガンマグロブリンの有用性は証明された。これらのことから、使用において特段の制約の無い工業用ガンマグロブリンを試薬としてパントラ法に導入することは大変合理的であり、汎用性を担保する意味でも積極的な活用と流通ルートの整備が望まれた。

これまで我が国では、ガンマグロブリンは医療用のものしか販売されていなかったが、本研究の実績を踏まえて、工業用のものを改めて試薬として包装したものが一般に購入できるようになった。具体的には、HDM Laboratories 社のニューヨーク工場で製造されたガンマグロブリン粉末を、Adv Chemical 社日本法人（東京・神田）が輸入し、各地の納入業者を通じて販売している。このガンマグロブリンは、あくまでも試薬であって医薬品ではないことから、薬機法の適用を受けないという特長がある。さらに、試薬購入の利便性を考慮して、パンソルビン®を製造しているメルク社（ドイツ・ダルムシュタット）から、ガンマグロブリンとの試薬セットが販売された。

こうした普及のための取り組みを経て、本法は「食品衛生検査指針・2015（微生物編）」に収載され³⁾、日本食品衛生協会の受託検査項目に加えられた。また、平成 26 年 1 月 16 日に浜松市で発生した学校給食による大規模食中毒事例（患者数 1,271 人）において、原因食品がパンであることを突き止めるのに用いられた⁴⁾。今後は平成 32 年の東京オリンピックが視野に入る他、TPP 等の枠組みで輸入・輸出にかかる食品の安全管理にも活用できるものと期待される。

参考文献

- 1) 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.1，32-37，2012.
- 2) Hiroyuki Saito et. al.: Development of a practical method to detect noroviruses contamination in composite meals. *Food and Environmental Virology*, **7**, No.3, 239-248, 2015.
- 3) 斎藤博之，他：食品・臨床材料・拭き取りの前処理法，*食品衛生検査指針 2015（微生物編）*，607-617，2015.
- 4) 土屋祐司，他：パンを原因としたノロウイルス食中毒事例，*日本食品微生物学会雑誌*，**32**，No.3，153-158，2015.