

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）

ノロウイルス GII.17 に対するパンソルビン・トラップ法の有効性

斎藤博之 秋野和華子 佐藤寛子 清水優子*¹ 早川 智*¹ 牛島廣治*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（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。その際に、ウイルスをブ菌に吸着させる“糊”の役目を果たす捕捉抗体としてガンマグロブリンが用いられている。一方、ガンマグロブリンは過去に流行したウイルスに対する抗体の集積であり、ノロウイルス GII.17 のような、これまで流行したことの無い型に対する抗体は含まれていないことが危惧された。本研究では、これまで何度も流行を繰り返しているノロウイルス GII.4 に感染した際に、GII.17 等の他の型に対する抗体も同時に誘導されてくることを見出し、ガンマグロブリンの有用性について再評価を行った。添加回収試験において、GII.17 の回収率は GII.4 のそれには及ばないものの、汚染濃度が低くなるにつれて高くなる傾向が認められた。さらに、低濃度領域の汚染を検出するために用いられる nested real-time PCR を用いた検討では、ポテトサラダと焼きそばにおいて、35 コピー/g まで検出可能であった。この成績は、すでに発表済の GII.4 におけるものと同等であった。実際の食中毒事例は微量の汚染に起因していることから、ガンマグロブリンを捕捉抗体として用いるパンソルビン・トラップ法は、GII.17 に対しても問題なく適用できることが示された。

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¹⁴⁻¹⁹⁾。一方、平成 26～27 年にかけて、これまでに流行の見られなかった遺伝子型である NoV GII.P17-GII.17（以降、GII.17 と表記）による食中毒事例が多発した。ガンマグロブリン製剤は過去の流行に由来する様々な抗体の集積であると考えらるならば、捕捉抗体としての有効性を再検討する必要があるため、本研究においてこれを実施した。

2. 方法

2.1 研究材料

ガンマグロブリンの検討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.17（2016 年 1 月 28 日、感染症発生動向調査にて採取）、を含む糞便を用いた。

血清中の IgG の推移を検討するため、感染年月日の明らかな患者の保存血清を、本人の同意の元に使用した。

2.2 試薬類

2.2.1 食品洗滌液

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

*¹ 日本大学医学部 *² 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、蒸留水にて5%溶液とした。

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 (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

ニッポンジーンの製品を使用した。

2.2.8 アミラーゼ

枯草菌由来 α -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 及び 2nd. PCR には AptaTaq Fast PCR Master (日本ジェネティクス) 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

回収率の検討には COG2R²⁰⁾、検出限界の検討には PANR-G2¹⁹⁾を用いた。

2.2.13 conventional PCR に用いたプライマー

1st. PCR では COG2F²⁰⁾ / G2SKR²¹⁾, 2nd.PCR では G2SKF²¹⁾ / G2SKR²¹⁾のプライマーセットをそれぞれ用いた。

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 320S」を用いた。

2.2.16 real-time PCR 用酵素

日本ジェネティクス社製「FastStart Essential DNA Probes Master」を用いた。

2.2.17 real-time PCR 反応系

Kageyama らの方法²⁰⁾に従った。

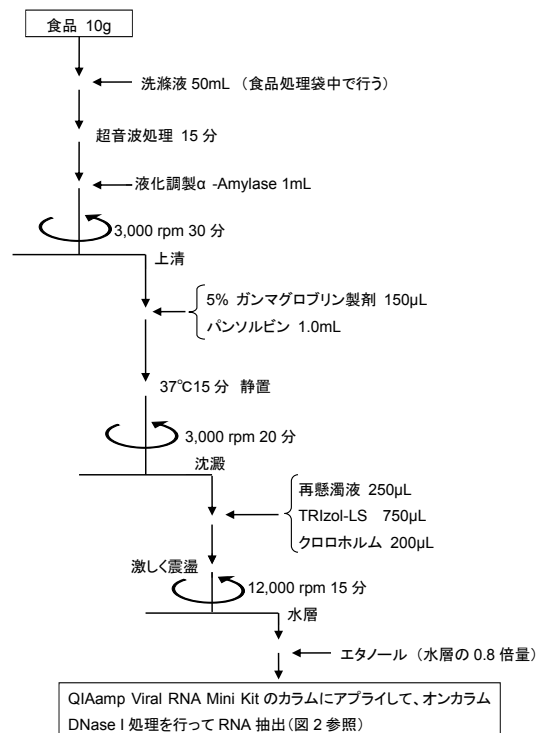


図1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

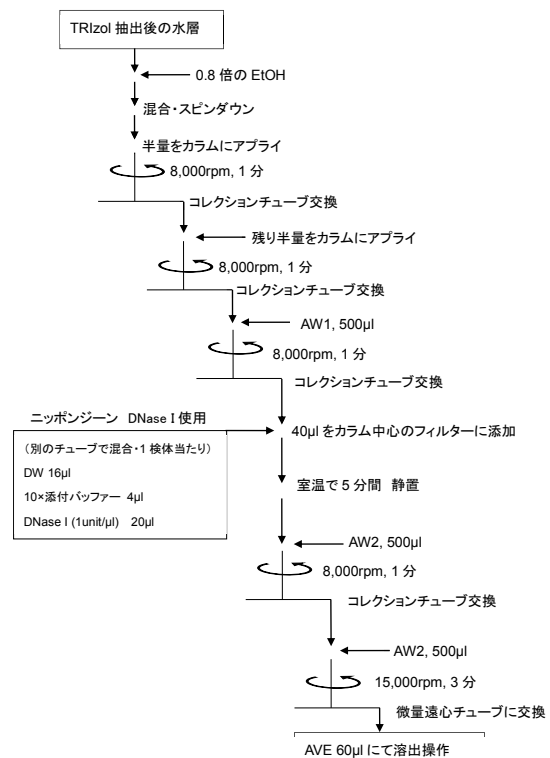


図2 QIAamp Viral RNA Mini Kit へのオンカラム DNase I 処理

2.2.18 抗体価の測定

NoV GII.3, GII.4, GII.3, GII.6, GII.17 で作製したウイルス様粒子 (VLP)を用いた ELISA により血清中の IgG を測定した。

2.3 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。この時、平成 25 年度に検討したオンカラム DNase I 処理 (図 2) を組み入れた。

2.4 NoV GII.17 の回収率に関する検討

食品洗滌液 50mL 中に $1.00 \times 10^4 \sim 2.01 \times 10^6$ コピーの NoV GII.17 を添加し、ガンマグロブリンを捕捉抗体としたパンソルビン・トラップ法による回収率を検討した。また、ポテトサラダと焼きそば、それぞれ 10 g を用いた添加回収試験も合わせて行った。ここでは純粋に抗原抗体反応を比較する必要から、逆転写反応には COG2R を用いた。このプライマーは、次に続く real-time PCR 反応の直近に位置するため、RNA の損傷度や逆転写反応効率等のファクターを排除することができるからである。

2.5 NoV GII.17 の検出限界に関する検討

ポテトサラダと焼きそばに様々な濃度で NoV GII.17 を添加し、COG2F / G2SKR で 1st. PCR を行った後、real-time PCR, または RT-PCR による 2nd. PCR により検出できる限界について検討した。ここでの逆転写反応は PANR-G2 を用いた。サーマルサイクラーの設定条件は、次のとおりである。

【タッチダウン PCR】

95°C2 分 1 サイクル

95°C30 秒ー (55→50°C) 30 秒ー72°C30 秒 5 サイクル：下線部がタッチダウン設定

95°C30 秒-50°C30 秒-72°C30 秒 40 サイクル

72°C7 分 1 サイクル

3. 結果

3.1 NoV 感染時の免疫応答

図 3 に示すとおり、NoV GII.17 に感染した場合、特に初感染時において GII.3 や GII.4 といった他の遺伝子型の IgG も上昇していることが見て取れた。逆に GII.4 に感染した場合においても、GII.3 と GII.17 の IgG の上昇が認められた (図 4)。

3.2 NoV GII.17 の回収率に関する検討

食品洗滌液 50mL からガンマグロブリンを用いて NoV GII.17 の回収を試みた結果を表 1 に示した。添加量が少なくなるにつれて回収率が高くなる傾向にあるのがわかる。また、実際に食品を用いて添加回収試験を行った結果については、食品洗滌液からの回収率 (10^5 コピー台) とほぼ同じであった (表 2)。

3.3 NoV GII.17 の検出限界に関する検討

図 5A, 5B に示したとおり、ポテトサラダと焼きそばの両方において、nested real-time PCR を用いることで、35 コピー/g まで検出可能であった。同様に RT-PCR 後のゲル電気泳動でも、35 コピー/g まで検出でき、PCR 産物をシーケンスしたところ正しく NoV GII.17 の配列であった (図 6)。

表 1 食品洗滌液 50mL からの NoV GII.17 の回収率

遺伝子型	添加量(copies /50mL)	回収量(copies /50mL)	回収率 (%)
GI.17	2.01×10^6	7.23×10^4	3.61
GI.17	1.46×10^5	7.80×10^3	5.34
GI.17	1.00×10^4	1.06×10^3	10.60
GI.4 (参考値)	1.16×10^5	2.90×10^4	25.10

表 2 食品 10g からの NoV GII.17 の回収率

食品	添加量(copies /g)	回収量(copies /g)	回収率 (%)
ポテトサラダ	1.43×10^5	1.05×10^4	7.35
焼きそば	1.32×10^5	6.67×10^3	5.04

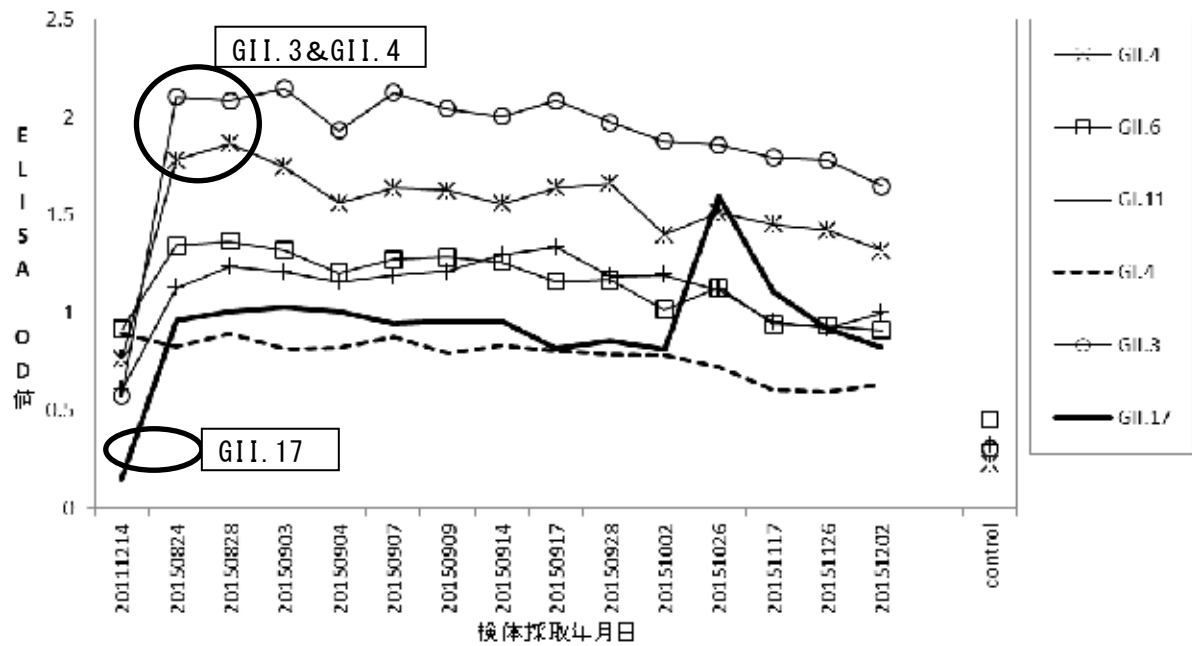


図3 NoV GII.17 感染時の血清 IgG の推移 (ELISA OD 値)
感染日: 2015 年 8 月 5 日 (初感染), 10 月 12 日 (再感染)

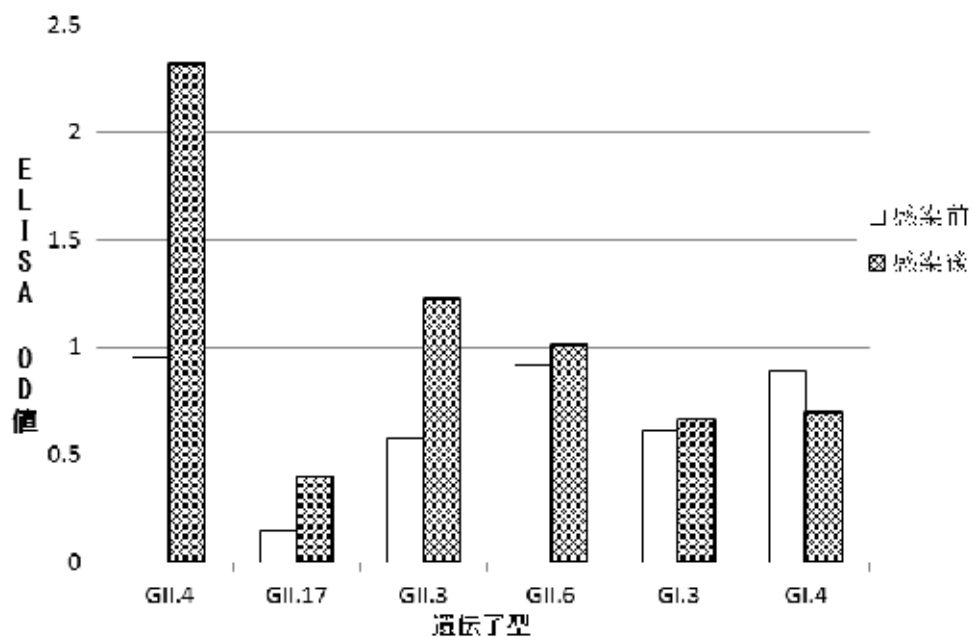


図4 NoV GII.4 感染時における血清 IgG の応答 (ELISA OD 値)
感染日: 2012 年 12 月 4 日

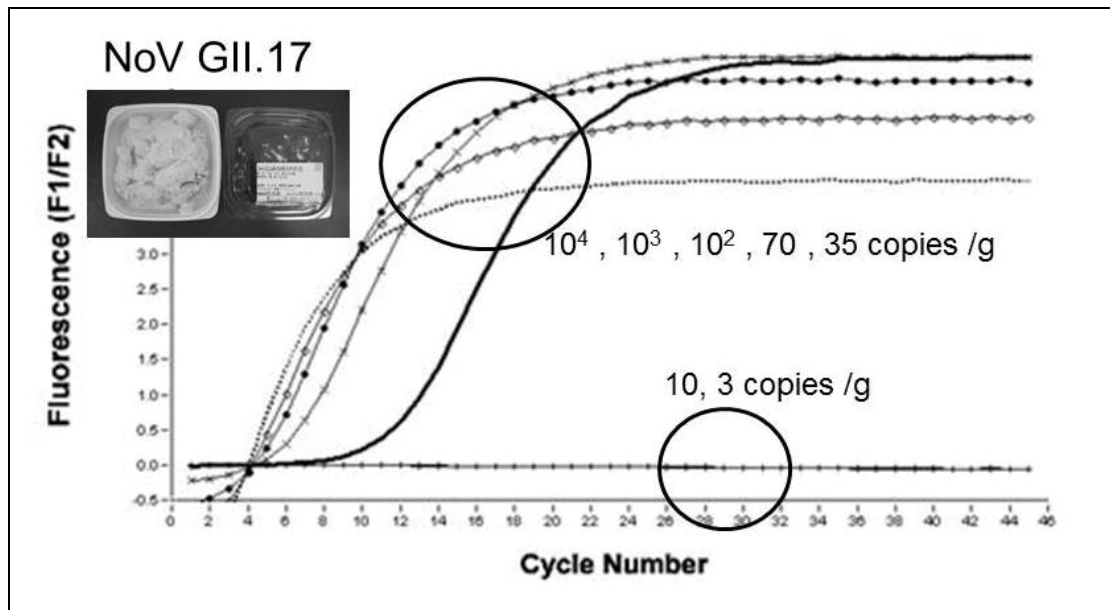


図 5A Nested real-time PCR による検出限界（ポテトサラダ）

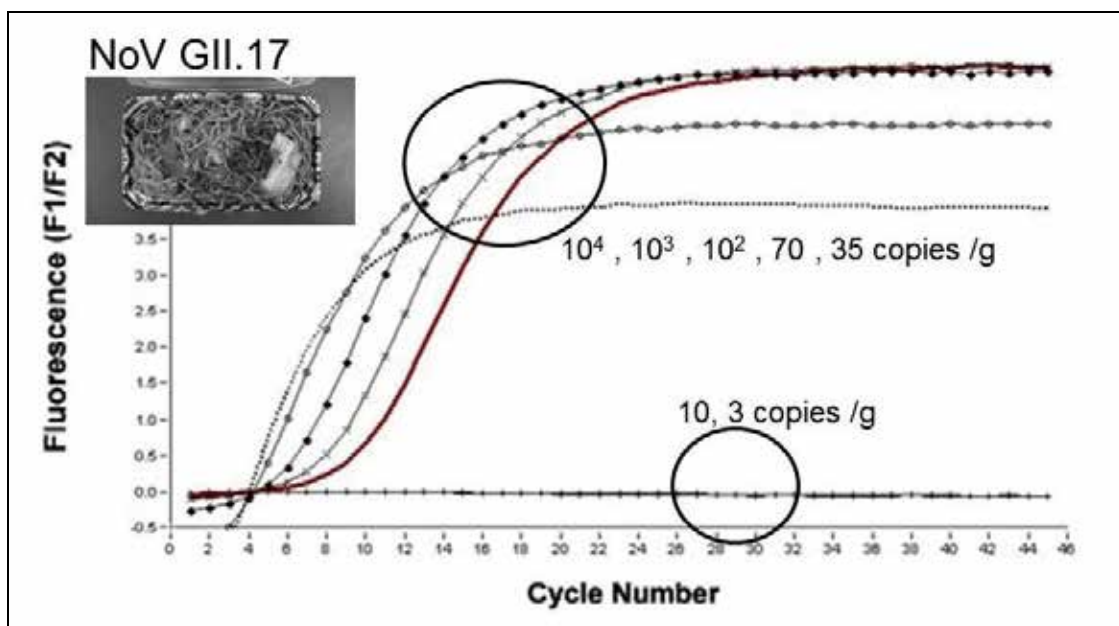


図 5B Nested real-time PCR による検出限界（焼きそば）

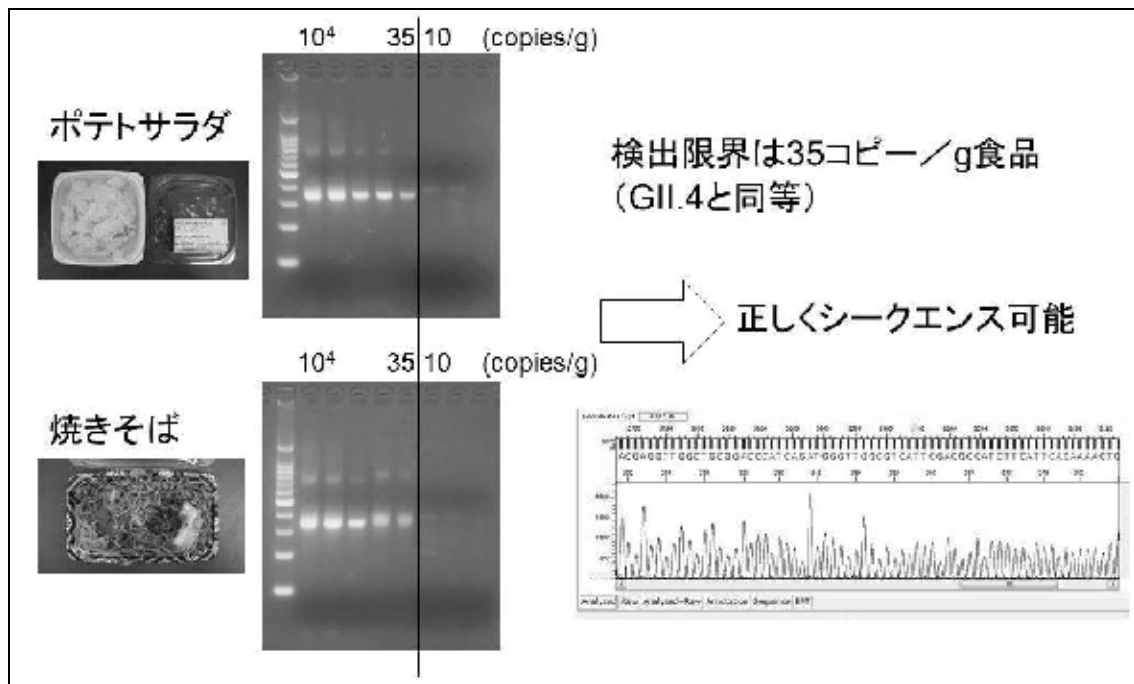


図6 Nested RT-PCRによる検出限界

4. 考察

4.1 NoV 感染時の免疫応答について

現在パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体として用いられているガンマグロブリンは、過去の流行ウイルスに対する抗体 (IgG) の集積であるものと考えられている。それゆえ、多くの種類のウイルスに対して汎用できることが期待されるが、NoV GII.17 のように突如として流行が拡大したウイルスに対しては、その抗体が含まれていないことが懸念された。また、将来的には同様の“新型”ウイルスに対する問題が繰り返し起こり得るものと想定される。本研究では、最初に感染者の保存血清を利用して、様々な遺伝子型の NoV に対する抗体の推移について検討した。NoV GII.17 に感染した場合、そのウイルスに対する抗体は当然のごとく上昇するが、図3によると、GII.3 や GII.4 に対する抗体も同時に上昇していることがわかる。次に逆のケースとして、NoV GII.4 に感染した際の免疫応答について検討した。図4に示したとおり、GII.3 と GII.17 に対しても感染前後の ELISA OD 値において2倍以上の抗体上昇が見られる。感染日は2012年12月4日であるから、GII.17 の流行が拡大した2014年よりも2年前の時点になる。以上のことから、過去に何度も大規模な流行が起こった GII.4 に感染した際に、同時に GII.17 の抗体も誘導され、それは既にガンマグロブリンにも

含まれているものと推察される。

4.2 NoV GII.17 の回収率について

ガンマグロブリン中に既に NoV GII.17 に対する抗体が含まれていることが期待できるため、パンソルビン・トラップ法による添加回収試験を行った (表1)。食品洗滌液 50mL 中に NoV GII.17 を 2.01×10^6 コピー添加した際の回収率は 3.61% であったが、 1.46×10^5 コピー添加の場合は 5.34%、 1.00×10^4 コピー添加の場合は 10.60% と、低濃度になるにつれて回収率が上昇傾向にあることがわかる。表2に示した食品から回収試験 (10^5 コピー台) においても、表1と同等の数値であった。参考値としてあげた GII.4 の回収率は、 1.16×10^5 コピー添加で 25.10% と明らかに高いが、これは図3に示された抗体の絶対量の違いを反映しているものと考えられる。しかしながら、多くのウイルス性食中毒事例は、微量のウイルスによる汚染に起因しているため、低濃度になるにつれて回収率が高くなるという結果は、ガンマグロブリンが有用であることを支持するものである。

4.3 NoV GII.17 の検出限界について

表1の検討において、NoV GII.17 の汚染濃度が低くなるほど回収率が高くなる傾向にあることが示されたが、さらに低濃度の汚染について調べる

ことは、リアルタイム PCR の機器表示値が 10 コピー/well 以下になることから無理がある。そこで、低濃度領域において一般的な検出手法とされる nested real-time PCR によって検出限界を検討した。ポテトサラダと焼きそばを様々な濃度の NoV GII.17 で汚染させて、nested real-time PCR での検出を試みた結果が図 5A, 5B である。いずれの食品検体においても 35 コピー/g の汚染濃度まで検出できていることがわかる。また、検出ウイルスの遺伝子配列を調べるために、real-time PCR に替えて conventional PCR を用いた場合でも 35 コピー/g まで検出可能で、この増幅産物は以後のシーケンス解析に用いることができた (図 6)。35 コピー/g という数値は、本法の原著¹⁹⁾において、GII.4 を用いて得られた成績と同等であることから、前述の低濃度汚染ほど回収率が高くなるという結果の延長と見なして差支えないものと考えられる。

4.4 得られた知見と今後に向けた課題

これまで流行したことの無い型に対する抗体はガンマグロブリンに含まれていないことが危惧されたが、実際に NoV に対する免疫応答を検討すると、感染した型とは別の型に対する抗体も同時に誘導されてくることがわかった。特に 2012 年に GII.4 に感染したケースでは、2 年後の 2014 年以降に流行する GII.17 に対する抗体も誘導されていた。このことから、新しい型に対する抗体といえども、ガンマグロブリンに含まれていることが期待できるようになり、添加回収試験等を行ったところそのことが証明された。また実際の事例として、平成 29 年 1 月 26 日に和歌山県御坊市で発生した学校給食による食中毒事例において、本法によって“磯和え”から NoV GII.17 を検出することができた^{22,23)}。将来的に、“新型”と称されるウイルスが流行したとしても、第一選択としてガンマグロブリンは有用であると考えられる。その際の検証方法としては、回収率の評価だけでなく、nested real-time PCR による検出限界も合わせて検討する必要がある。

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。

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

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、事業者にも周知する必要がある。また、ウイルスは食品中では増え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となってしまう。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

本研究では、パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体として用いられているガンマグロブリンが、これまで流行したことの無い型である NoV GII.17 に対しても適用できるかを検討した。これまでに何度も大流行した GII.4 に感染すると同時に GII.17 の抗体も誘導されるという結果を元に、ガンマグロブリンの再評価を行い、GII.17 に対しても問題なく使用できることを確認した。

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**, 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) 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.
 - 21) Kojima S., et. al.: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses, J. Virol. Method, **100**, 2002, 107-114.
 - 22) 永田文宏, 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, 第113回日本食品衛生学会学術講演会要旨集, 2017, 45.
 - 23) Noda M.: Lessons learned from a large and diffuse outbreak of gastroenteritis caused by consumption of Kizami-nori (chopped seaweed) contaminated with norovirus, Bull. Natl. Inst. Health. Sci., **135**, 2017, 6-12.