平成29年度（第12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）

パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体供給源としての ガンマグロブリンの再評価

斎藤博之　秋野和華子　佐藤寛子　清水優子[*1]　牛島廣治[*1]　野田　衛[*2]

1. 背景と目的

2016年の食中毒統計によると，全国で1年間に20,253人が食中毒による健康被害を受けており，その内56%に相当する11,397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1,140例の約3割に相当する354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の実験室内における培養法は，2016年8月にベーラー医科大学（テキサス）のグループによって発表されたものの普及には至っていないため，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[1,2,3)]。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(IgG)が含まれているガンマグロブリンを用いることで, NoVのみならず, サポウイルス，A型肝炎ウイルス，アデノウイルス41型などの回収に汎用できる可能性がある。一方，2014～2015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.17による食中毒事例が多発した。ガンマグロブリン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った。具体的には次の点が危惧された。

①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混合物であるから，NoV GII.17に対する抗体は含まれていないのではないか？

②パントラ法は NoV GII.17 による事例に使用できるのか？

本研究では，これらの懸念を払拭し，食品のウイルス検査を円滑に実施するために，NoV GII.17に対するガンマグロブリンの有効性を再評価し，実事例に適用した場合の検討を行った。

2. 方法

ガンマグロブリンはヒトからの供血を原料として製造されるため，基礎的データとして，NoV に感染した際の免疫応答（抗体産生動態）について検討する必要がある。本研究で検討した症例は，現在 52 歳男性（血液型は A 型，分泌型）で，過去に NoV GI.4 に 1 度（2009 年 1 月 25 日），NoV GII.4 に 2 度（2006 年 12 月 6 日と 2012 年 12 月 14 日）の感染歴がある。2015 年 8 月 7 日に発症。症状は嘔吐 1 回，37℃台の発熱，後背痛，腹部膨満感，放屁。下痢はなし。翌 8 月 8 日症状軽快，固形便排泄（NoV GII.17，7.13×10^{11} コピー/g）。8 月 10 日，固形便排泄（5.49×10^{10} コピー/g）。8 月 12 日，固形便排泄（NoV 不検出）。8 月 24 日から 10 月 2 日にかけて 10 回血清を採取した。これらの血清と，2011 年 12 月 14 日と 2012 年 12 月 27 日に採取された保存血清について，NoV GI.3，GI.4，GII.3，GII.6，GII.17 で作製した VLP（人工抗原）を用いて ELISA を行い，IgG を測定した。

次に食品洗滌液 50 mL 中に 1.00×10^{4}～2.01×10^{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トラ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，各 10 g に NoV GII.17 を添加した模擬検体からの回収試験も

[*1]日本大学医学部微生物学教室　[*2]国立医薬品食品衛生研究所

合わせて行った。

さらに，ポテトサラダと焼きそばを様々な濃度の NoV GII.17 で汚染させた模擬検体について，実事例で用いられることが多い nested real-time PCR（2 重 PCR）による検出限界を求めた。

実事例として，2017年1月25～26日に和歌山県御坊市で発生した学校給食が原因の食中毒事例から，磯和え3検体を入手してNoVの検出を試みた。

3. 結果

症例検討では，2011 年に採取した血清の抗体価を基準にして，2015 年 8 月 24 日に採取した血清の抗 NoV GII.17 IgG は 8 倍以上の上昇が認められた。加えて，抗 GI.3，GII.3，GII.4 IgG についても 4 倍以上の上昇が認められた。逆のケースとして，2012 年 12 月 14 日に NoV GII.4 に感染した際に，GII.4 のみならず，GII.3 と GII.17 の抗体も上昇していた。

食品洗浄液 50 mL からの NoV GII.17 の回収率は，2.01×10^6 コピーを添加した場合で 3.61%，1.46×10^5 コピーを添加した場合で 5.34%，1.01×10^4 コピーを添加した場合で 10.6%であった。ポテトサラダ 10g に NoV GII.17 を 1.43×10^6 コピーを添加した場合の回収率は 7.35%，焼きそばに 1.32×10^6 コピーを添加した場合においては 5.04%であった。Nested real-time PCR を用いた場合，ポテトサラダと焼きそばともに，35 コピー/g の汚染まで検出することができた。

実事例で入手した磯和え 3 検体は，ホウレンソウ，モヤシ，チクワ，ノリを食材として調理されていたが，ノリの含有量が最も多いロットから本法を用いて NoV GII.17 を検出することができ，遺伝子配列は患者のものと一致した。

4. 考察

現在パントラ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。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，GII.3やGII.4に対する抗体も同時に上昇していた。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も検討したが，GII.3とGII.17に対しても抗体上昇が見られた。感染日は2012年12月14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，それはすで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。

ガンマグロブリン中にすでに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，パントラ法による添加回収試験を行ったところ，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った。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。低濃度汚染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NoV GII.17検出限界を検討したところ，ポテトサラダと焼きそばにおいて35コピー/gまで検出できた。この結果は，本法の原著[1,2]においてNoV GII.4を供試ウイルスとして用いて得られたものと同じであり，実事例のような微量の汚染検体に用いても差し支えないことを示している。

和歌山県御坊市の食中毒事例で入手した磯和え3検体中1検体から本法を用いてNoV GII.17を検出したが，その調理ロットはノリの含有量が最も多いものであった。その後，東京都立川市の別事例によって刻み海苔が原因であることが明らかとなったが，一連の事態解決の嚆矢となった事例で本法が用いられたことは意義深いものと考えられた。

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**, 1, 2012, 32-37.

2）Hiroyuki Saito et. al.: Development of a practical method to detect noroviruses contamination in composite meals, Food and Environmental Virology, **7**, 3, 2015, 239-248.

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），2015, 607-617.