

Ⅲ 報告

食品中のウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究（平成28～30年度）

ノロウイルスの回収率向上のためのパンソルビン再固定法の検討

斎藤博之 秋野和華子 野田 衛*¹ 上間 匡*¹

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。原材料であるブ菌はホルマリン固定された製品（パンソルビン）として流通しているが、2015年以降に購入したロットについて固定の程度が弱くなっていることが判明した。このことは、本法の操作過程でブ菌の核酸成分の漏出を招き、ウイルスの回収率を低下させることから看過し得ない問題となった。パンソルビンの出荷基準は、一定量以上のIgGを吸着できるかどうかであり、核酸漏出については規定されていない。製品としては正常であることから、メーカー側に対応を求めることは困難であり、使用者側で問題解決を図る必要が生じた。本研究では、パンソルビンからブ菌由来核酸の漏出が起らないように再固定プロトコルを考案した。再固定を行うことで、2014年以前のロットと同等以上の回収率が得られるようになった。再固定は購入後に1度行えばよく、以後は長期保存してこれまでどおり使用できることから、試験検査機関における負荷も最小限で済ませられるものと考えられた。

1. はじめに

2018年の食中毒統計によると、全国で1年間に17,282人が食中毒による健康被害を受けており、その内49%に相当する8,475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1,330例の19%に相当する256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3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。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検出法の開発を進めてきた。その結果、ホルマリン固定した黄色ブドウ球菌（ブ菌）を用いるパンソルビン・トラップ法（パントラ法）が完成し、この問題を解決するための糸口を見出した¹⁻¹⁰⁾。さらに、添加抗体の安定供給を図るため市販のガンマグロブリン製剤を利用できるようにした他、検出した遺伝子の塩基配列解析も可能な方法へと発展させた¹¹⁻¹⁶⁾。一方、本法が普及するにつれ、試薬であるパンソルビン（ホルマリン固定したブ

菌）の生産ラインが急拡大したこともあり、近年になって固定の程度の弱い製品が販売されていることが判明した。このことは、ブ菌由来の核酸漏出によるウイルス回収率の低下を招くため、本研究においてその対策を検討した。

2. 方法

2.1 研究材料

市場供給されているパンソルビン（メルク社）を検討するにあたり、2014年購入品（ロットNo.: D00160008）、2015年購入品（ロットNo.: D00173442）、2016年購入品（ロットNo.: 2706036）、2017年購入品（ロットNo.: 2799115）を用いた。また、検出対象となるウイルスとして、NoV GII.4（AB293424）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) – 0.5M NaCl – 0.1% Tween 20を調製して使用した。

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 フェノール系RNA抽出キット

TRIzol-LS (Thermo Fischer Scientific)を用いた。

2.2.4 カラム方式のRNA抽出キット

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用いた。

2.2.5 再懸濁液

2.2.4 の抽出キット添付の AVL 液を用いた。

2.2.6 逆転写酵素

ReverTra Ace (東洋紡) を用いた。

2.2.7 逆転写反応に用いたプライマー

PANR-G2¹⁶⁾ を用いた。

2.2.8 Real-time PCR 装置

LightCycler320S (Roche diagnostics) を用いた。

2.2.9 Real-time PCR 用酵素

FastStart Essential DNA Probes Master (日本ジェネティクス) を用いた。

2.2.10 Real-time PCR 反応系

Kageyama らの方法¹⁷⁾ に従った。

2.2.11 再固定処理用緩衝液

洗浄用に PBS (-), 固定用に 1.5%ホルマリン/ PBS (-), 保存用に 0.1%アジ化ナトリウム/ PBS (-) を用いた。

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ール(図 1) に従った。

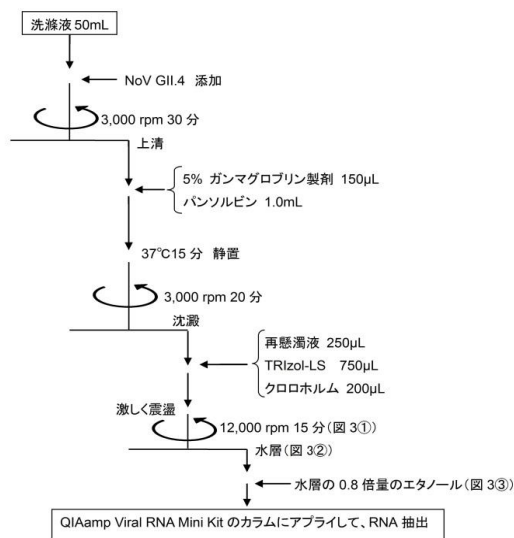


図 1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

①～③は図 3 における観察ポイントを示す。

2.4 NoV GII.4 の回収率に関する検討

食品洗滌液 50 mL 中に 1.45×10^5 コピーの NoV

GII.4 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。この際、TRIzol-LS /クロロホルム抽出後における検体の状態を観察した。

2.5 パンソルビンの再固定に関する検討

図 2 の手順によりパンソルビンの再固定を行った。再固定したパンソルビンについて、2.4 と同様に回収率を比較した。

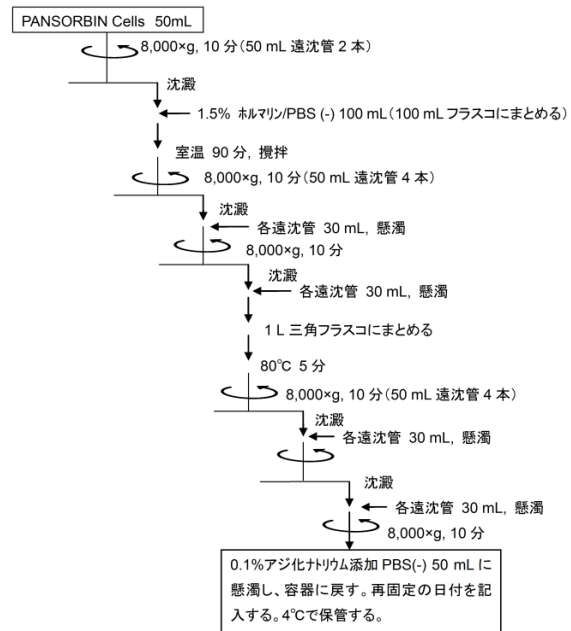


図 2 パンソルビン再固定の手順

3. 結果

3.1 パンソルビンのロットによる回収率の違い

図 3 に示すとおり、TRIzol-LS /クロロホルム抽出後の検体の状態を比較すると、遠心直後は水層・中間層・有機層に分かれて目視でロット差は認められなかった(①)。しかし、水層(②)に 0.8 倍量のエタノールを添加すると、2015 年以降(B～D)に購入したパンソルビンでは白濁が生じ(③)、これを遠心したところ沈殿物であることが確認された(④)。

抽出した RNA から cDNA を合成し、real-time PCR で NoV の遺伝子を増幅したところ、2014 年購入ロットと比較して、2015 年ロットでは明らかに増幅効率が低下していた(図 4)。特にエタノール添加時の白濁を遠心除去した場合には、全く検出できなくなった。

3.2 再固定の効果

3.1. において問題が生じた 2015 年購入のパンソルビンを図 2 の手順に従って再固定したところ、抽出工程における白濁が起こらなくなり(図 5)、増幅曲線も改善された(図 6)。回収率は 2014 年購入分と同等以上になった(表 1)。

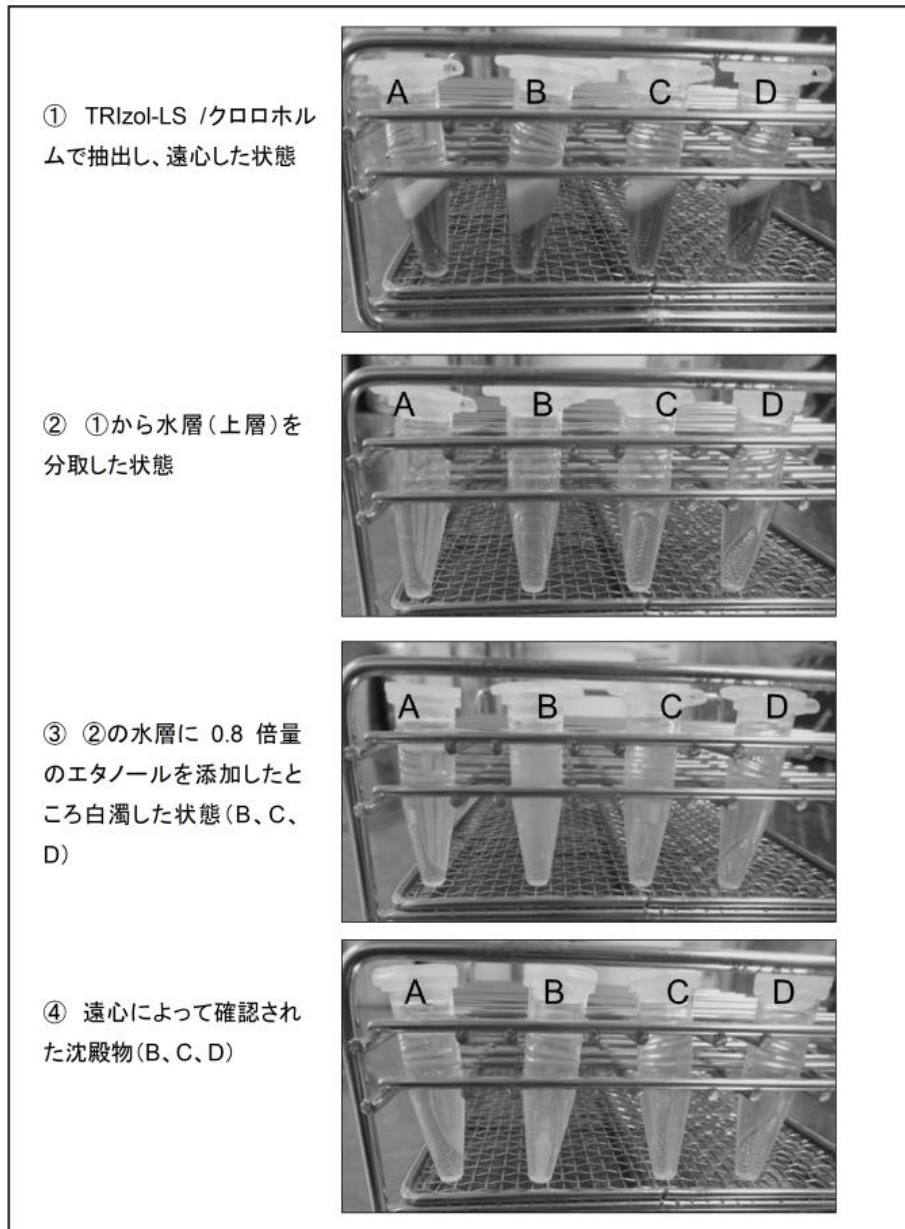


図3 パンソルビンのロット差の比較（抽出操作時の観察）

A: 2014 年購入, B: 2015 年購入, C: 2016 年購入, D: 2017 年購入

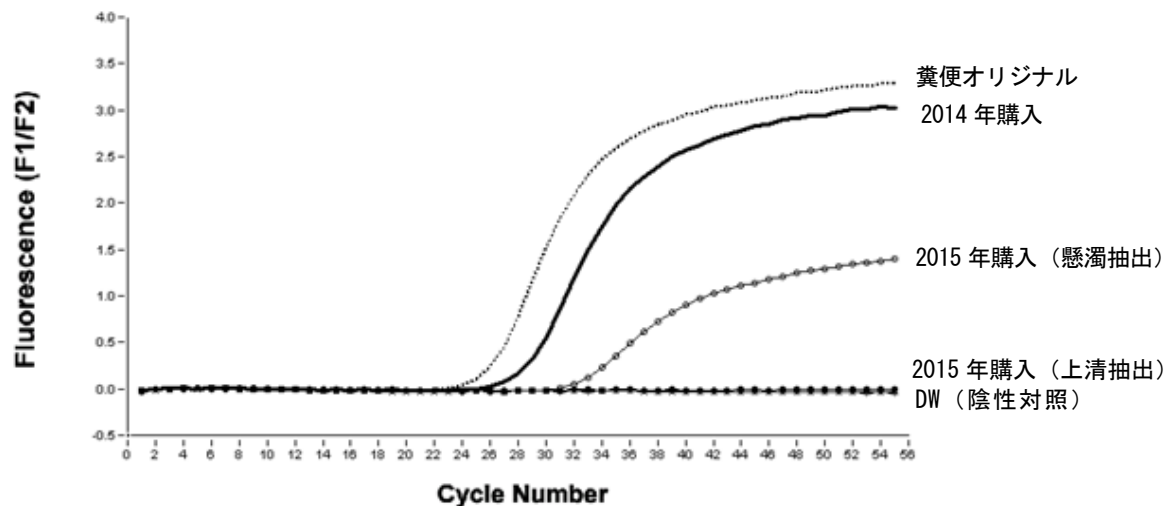


図4 白濁による回収率の低下（増幅曲線）：2014 年購入ロットと 2015 年購入ロットを比較

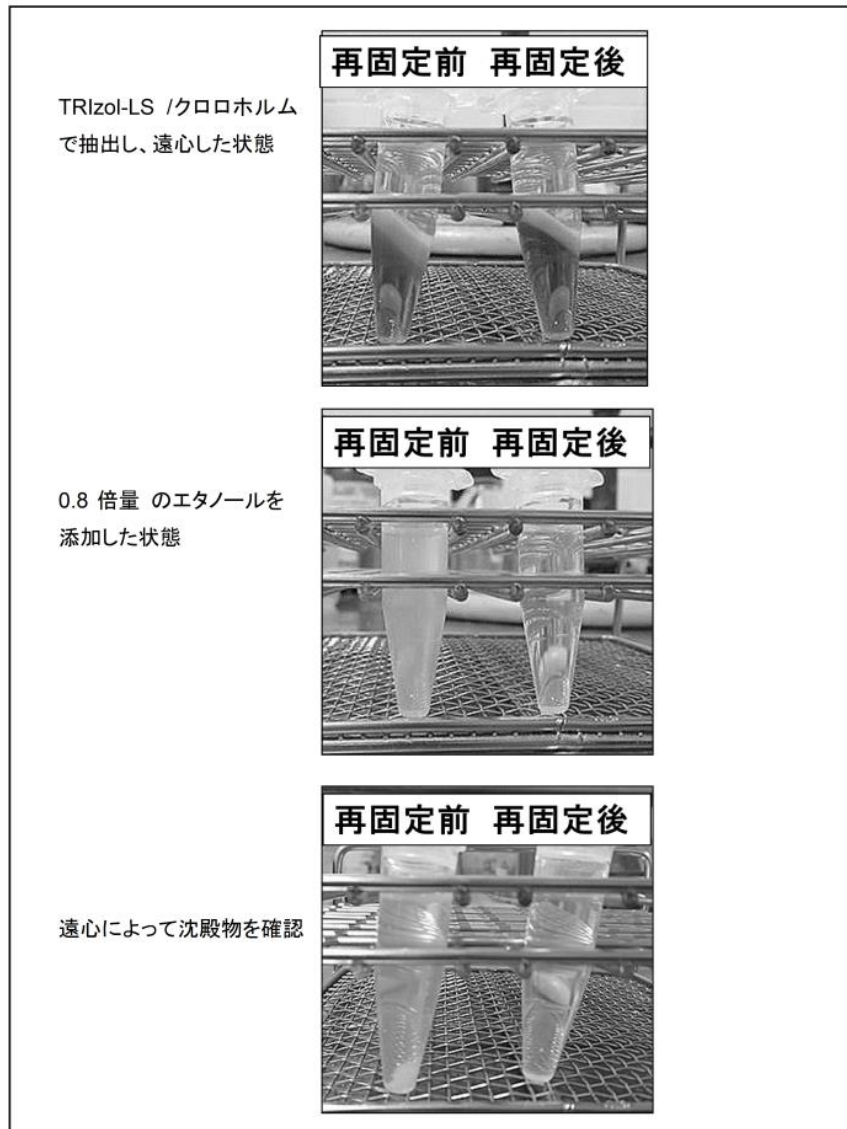


図5 パンソルビン再固定の効果（抽出操作時の観察）2015年購入ロットを使用

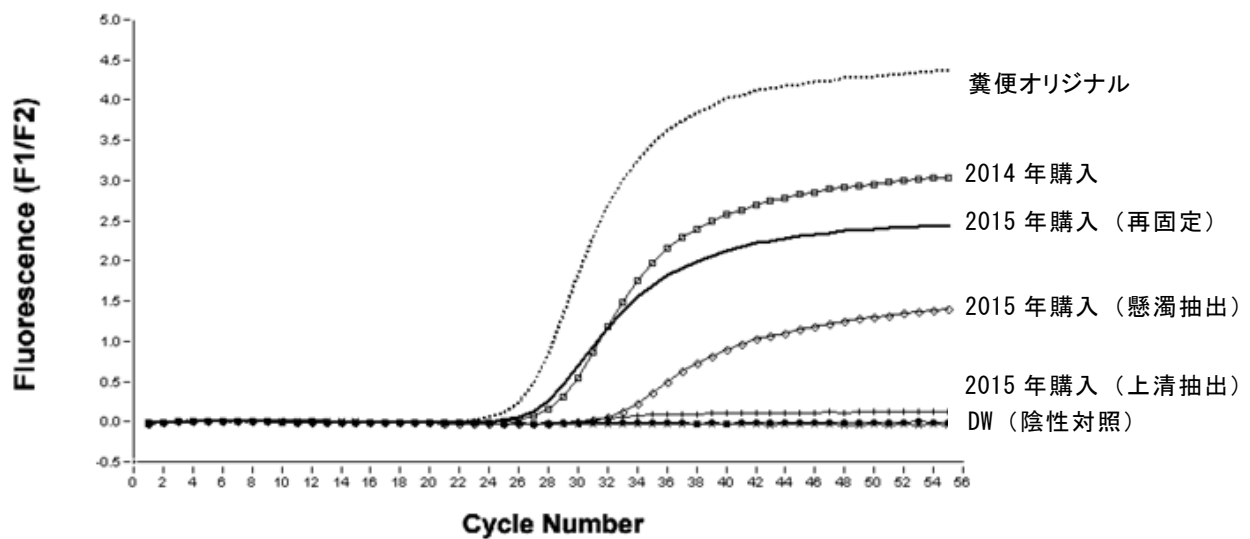


図6 パンソルビン再固定の効果（増幅曲線）

表1 パンソルビン再固定の効果（回収率の比較）

パンソルビン	回収量(copies /50mL)	回収率 (%)
2014 年購入	2.66×10 ⁴	18.3
2015 年購入（遠心上清）	検出できない	—
2015 年購入（懸濁状態）	1.01×10 ³	0.70
2015 年購入（再固定後）	4.49×10 ⁴	31.0

投入量： 1.45×10⁵ copies /50mL

4. 考察

4.1 パンソルビンのロット差について

2007 年に本法の開発がスタートし、2014 年までは不都合は認められなかったが、2015 年以降に購入したロットは、操作中にブ菌の成分に由来した白濁・沈澱が生じる等の問題が発生した（図3）。RNA 抽出キットの説明書には、沈殿物が生じた場合は再懸濁して操作を進めるように記載されているが、それに従っても NoV 検出系における悪影響は排除できなかった（図4）。一方、パンソルビンの試薬そのものは、PCR 登場以前から蛋白質の免疫沈降法のために用いられており、出荷基準は試薬 1 mL 当たりヒト IgG を 2 mg 以上結合するというものである。従って、固定の程度が弱まり、原材料であるブ菌の核酸成分が漏出・沈澱することは想定されていない。製品としては正常である（不良品ではない）ことから、メーカー側に対応を求めることは困難である。以上のことから、この問題を解決するためには、購入後にホルマリンを用いて再固定するのが現実的であると考えられた。

4.2 再固定の効果について

抽出工程において白濁が生じていたパンソルビンを再固定したところ、図5、図6、及び表1に示したとおり、問題は解決された。再固定はパンソルビン購入後に1度行えばよく、以後は0.1 %アジ化ナトリウム添加 PBS (-) に懸濁して保存しておくことで、これまでどおり使用できる。固定後10ヶ月でも回収率に変化は認められなかったことから、保存性に問題はないと考えられる。再固定には高速冷却遠心機を用いる

が、多くの試験検査機関では常備されているものであり、実施における負荷は最小限に抑えられる。

4.3 今後に向けた課題

パントラ法の根幹となるパンソルビンは、ブ菌を原材料としてホルマリン固定したものであり、従前は蛋白質の免疫沈降法に用いられていたことから、出荷基準として核酸の漏出は想定されていなかった。近年、市場で流通している製品は、蛋白質の分析には問題ないが、PCR 等の核酸分析には、漏出したブ菌の核酸成分のために不具合をきたすことが判明した。この問題を解決するために、再固定プロトコルを考案した。実際に再固定を行ったところ、問題発生以前に購入したパンソルビンと同等以上の回収率となった。今後は、再固定したパンソルビンを用いることで安定したデータが得られるものと期待される。また、本法はすでに多くの機関で食中毒検査に用いられていることから¹⁸⁻²²⁾、食品衛生検査指針²³⁾に記述し、http://www.nihs.go.jp/fhm/csvdf/sttest/fixing_of_pansorbin.pdf からダウンロードできるように手配した。

今後の課題として、試薬の品質劣化や検査ミス等による偽陰性を察知できるようなしくみを取り入れる必要がある。また、数多く存在する食品の種類によっては本法が有効に機能しないものがあるかもしれない。ウイルスの回収効率を客観的に評価できるようにしなければならない。この問題に対処するために、内部標準物質の使用について検討を進める予定である。

5. まとめ

パントラ法の根幹をなすパンソルビンの品質において、固定の程度が弱い製品が流通していることが判明したが、再固定プロトコルを付加することで、これまでどおり使用することができ、問題は解決した。

参考文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) Saito H., et. al.: Development of a practical method to detect noroviruses contamination in composite meals. Food Environ. Virol., 7, 2015, 239-248.
- 17) 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.

- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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, p45.

- 21) 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.
- 22) Sakon N.: Foodborne outbreaks caused by humannorovirus GII.P17-GII.17-contaminated nori, Japan, 2017, Emerging Infectious Diseases, **24**, 2018, 920-923.
- 23) 斎藤博之, 他: 食品・臨床材料・ふき取りの前処理法, 食品衛生検査指針 微生物編 改訂第 2 版 2018, 2018, 607-618.