

ノロウイルスGⅡ遺伝子系統樹解析結果

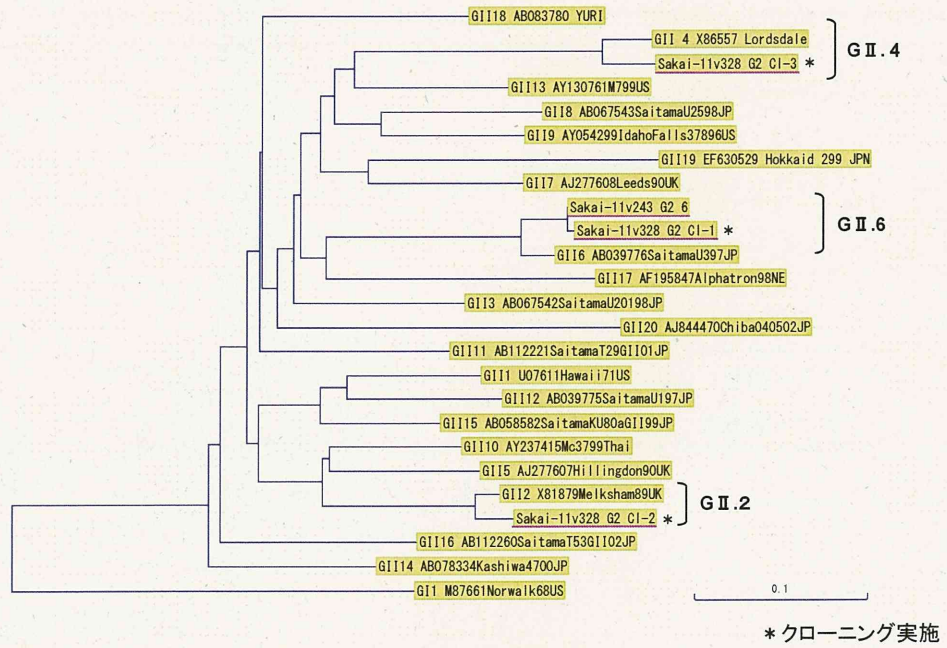


表 2 食品中からのノロウイルス遺伝子検出結果 (齋藤、秋田県衛生環境研究センター)

食材からのノロウイルス検出 (パンソルビン・トラップ法)

食材リスト

番号	検体記号	検体名	重量(g)	GI 1st. PCR	GI nested PCR	GII 1st. PCR	GII nested PCR
1	A11	チンジャオロース	7.61	-	-	-	-
2	A12	イカのから揚げ	2.86	-	-	-	-
3	A13	卵焼き	21.27	-	-	-	-
4	A14	煮物(そら豆)	7.33	-	-	-	+
5	A15	ほうれん草とにんじんのナムル	9.14	-	-	-	-
6	A16	一口ゼリー	8.51	-	-	-	-
7	A17	フルーツ(缶詰)	4.46	-	-	-	-
8	A31	中華ドレッシング(市販)	40	-	-	-	-
9	A32	大人用 ナムル(ほうれん草とにんじん)	6.18	-	-	-	-
10	A33	大人用 チンジャオロース	12.87	-	-	-	-
11	A34	大人用 卵焼き	23.13	-	-	-	-
12	A35	大人用 イカのから揚げ	7.56	-	-	-	-
13	A36	大人用 そら豆の煮物	6.11	102	+	46	+
14	A37	中華ドレッシング和え(子供用)	5.96	-	-	-	-
15	A38	中華ドレッシング和え(大人用)	27.87	-	-	-	-
16	A39	大人用 こんにゃくのキンピラ	32.02	-	-	-	+
17	A40	大人用 黄桃(缶詰)	3.65	-	-	-	-

平成 23 年度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」

研究分担報告書

パンソルビン・トラップ法の実用上の問題点解決に向けた検討

研究分担者 齋藤博之 秋田県健康環境センター・保健衛生部

研究要旨

前年度までに実施された厚生労働科学研究事業において、外国製ガンマグロブリン製剤である「Gammagard」を用いたパンソルビン・トラップ法の汎用プロトコルが完成し、ノロウイルスでは 13 遺伝子型 (GI/3、GI/4、GI/8、GI/9、GI/14、GII/2、GII/3、GII/4、GII/5、GII/6、GII/12、GII/13、GII/18)、サポウイルスでは 4 種類全ての型、他に A 型肝炎とアデノウイルス 41 型において有効であることを確認した。これにより、ガンマグロブリン製剤を常用試薬として準備しておくことで、食品中の下痢症ウイルス検査が一通り可能となった。今年度は、汎用プロトコルを実事例に適用して食品検体からノロウイルスを検出することに成功した。一方で、実用上の問題点がいくつか浮上したためその解決に向けた検討を行った。第 1 の問題点として、本法の根幹を成す試薬であるパンソルビンが品薄・在庫切れで入手困難となる局面にしばしば遭遇したことから、黄色ブドウ球菌を培養して相当品を自作するプロトコルを構築した。その結果、市販品と同等以上の品質のものが得られ、コスト面でも大幅に有利となった。問題点の 2 つ目は、これまで real-time PCR を用いて開発・評価を行ってきたことから、アガロースゲル電気泳動で増幅バンドを確認する conventional PCR との感度の乖離が顕在化してきたことである。この問題はシーケンス解析の成否に影響するため、黄色ブドウ球菌の菌体ペレットからノロウイルスを遊離する段階と、その後の PCR の段階においていくつかの解決策の候補を提示し次年度への課題とした。

A. 研究目的

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きている。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)が大部分を占めているが、他にもサポウイルス(SaV)やアデノウイルス41型(AdV41)に代表される腸管系アデノウイルスも含まれている。さらに、平成 22 年 3 月に我が国における A 型肝炎(HAV)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。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」(H19-食品-一般-016)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。その際に各種ウイルスに対する抗体の安定供給が課題となっていたが、平成 22 年度の本研究事業において、市販のガンマグロブリン製剤を利用することで汎用化に成功した。これまで NoV では 13 遺伝子型(GI/3、GI/4、GI/8、GI/9、GI/14、GII/2、GII/3、GII/4、GII/5、GII/6、GII/12、GII/13、GII/18)、SaV ではヒトに感染する 4 種類全ての型、さらには HAV と AdV41 について、ガンマグロブリン製剤を用いたパントラ法が有効であることが確認されている。パントラ法の汎用プロトコルが完成したことから、実事例への適用も可能となった。今年度は、実用に供した段階で新たに見つかった問題点への対応を中心に次の検討を行った。

- ①汎用プロトコルによる回収率の測定。
- ②実事例への適用。
- ③パンソルビン相当品の自作プロトコルの検討。
- ④パントラ法で抽出した遺伝子の conventional PCR による検出に関する検討。

B. 研究方法

1. 研究材料

汚染実験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/4 (AB293424)を含む糞便を用いた。

2. 試薬類

1) 抗 NoV 血清

国立感染症研究所でウイルス様粒子(VLP)から作製した抗 NoV-GII/4 ウサギ血清(Hansman, G. S., et. al., J. Gen. Virol. 87, 909-919, 2006)を用いた。

2) ヒトプール血清

Kojin Bio 社より購入した(Lot 番号: H15L03Z)。

3) ガンマグロブリン(化血研)

15%筋注用医薬品を Alfresa Pharma 社より購入した。

4) ガンマグロブリン(日本製薬)

15%筋注用医薬品を Alfresa Pharma 社より購入した。

5) Bharglob

インド Bharat Serum and Vaccine Limited 社の 10%筋注用ガンマグロブリン製剤(血液ソースは米国)。Advy Chemical 社より購入した。

6) Gammagard

米国 Baxter 社の 5%静注用ガンマグロブリン製剤。Alfresa Pharma 社より購入した。

7) 食品洗滌液

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

8) 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。

9) フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (invitrogen)を使用した。

10) カラム方式の RNA 抽出キット

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)を使用した。

11) 再懸濁液

10)の抽出キット添付のALV液を用いた。

12) 逆転写反応エンハンサー

RTmate(ニッポンジーン)を使用した。

13) DNase I (RT Grade) 及び RNase inhibitor

ニッポンジーンの商品を使用した。

14) アミラーゼ

前処理用: 枯草菌由来 α -Amylase 粉末(和光純薬)を使用した。

後処理用: α -Amylase Ultrapure(ニッポンジーン)を使用した。

15) 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。

16) 黄色ブドウ球菌(Cowan I株): 理化学研究所バイオリソースセンターより提供を受けた(JCM No.: 2179)。

17) 抗生物質培地 3: ベクトンディッキンソン社(カタログ番号 224320)より購入した。

18) Bacto Casitone: ベクトンディッキンソン社(カタログ番号 225930)より購入した。

19) Bacto Yeast Extract: ベクトンディッキンソン社(カタログ番号 212750)より購入した。

20) β -Glycerophosphate: メルク社(カタログ番号 35675-50GM)より購入した。

21) Nicotinic Acid: メルク社(カタログ番号 481918-100GM)より購入した。

22) Nicotinamide: メルク社(カタログ番号 481907)より購入した。

23) Thiamine Hydrochloride: メルク社(カタログ番号 5871)より購入した。

3. パントラ法の手順

平成 22 年度に完成した汎用プロトコル

(図 1)に従った。なお、ウイルスと抗体の反応性を確認するための試験(図 6A、図 6B、表 1)では、超音波処理と α -Amyrase 前処理は省略した。

4. ウイルスの検出

図 1 で得られた抽出液(60 μ L)から 8.5 μ L を取り、DNase I 及び α -Amylase Ultrapure を各 1 μ L、RNase inhibitor を 0.25 μ L、5 \times 逆転写 buffer (添付)を 4 μ L 加えた後、蒸留水で反応量を 15.5 μ L とし、37 $^{\circ}$ C 10 分、65 $^{\circ}$ C 5 分のインキュベーションを行った。その後、NoV 特異的プライマー(real-time PCR または、conventional PCR と同一のもの)、dNTP、RTmate、及び逆転写酵素を追加して cDNA を合成した(反応容量 20 μ L)。合成した cDNA 溶液を 5 μ L 取り、Kageyama ら (J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003) の real-time PCR によりコピー数を測定した。使用した機器はロシュ製「LightCycler 350S」、及び「LightCycler 480」で反応容量は 20 μ L である。また、検出限界確認のために、プライマー COG2F (J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003) と G2SKR (Kjima S., et. al., J. Virol. Method, 100, 107-114, 2002)による 1st. PCRを行い、387bps の増幅産物に対して、real-time PCR、または conventional PCR による再増幅(semi-nested PCR)を行った。

5. パンソルビン相当品の自作プロトコル

1) 培地

「抗生物質培地 3」 52.5g、「Bacto Casitone」 15g、「Bacto Yeast Extract」

7.5g、「 β -glycerophosphate」7.5g を蒸留水 3L に溶解し、121°C で 15 分間高圧滅菌した後冷却した。別に「Nicotinic Acid」0.1g、「Nicotinamide」0.1g、「Thiamine Hydrochloride」0.2g を蒸留水 100mL に溶解して、シリンジフィルターにて濾過滅菌したものを 3mL、上記の培地 3L に添加した。

2) 前培養

1) で調製した培地 5mL を試験管に入れ、黄色ブドウ球菌 Cowan I 株を接種したものを 2 本、37°C で一晩震盪培養した。

3) 本培養

三角フラスコに培地を 1L 入れ、そこに前培養液 5mL を加えたものを 2 本(合計 2L) 調製し、37°C フラン室内にてマグネティックスターラーで攪拌しながら 48 時間培養した。

4) 黄色ブドウ球菌の菌体処理

図 4 に示した手順に従って、菌体の回収・ホルマリン固定・熱処理を行った。

C. 研究結果

1. 汎用プロトコルの回収率の測定

完成した汎用プロトコルを評価するために、NoV-GII/4 で汚染させたポテトサラダと焼きそばからの回収試験を行った。1g あたり 8.18×10^4 コピーの NoV-GII/4 で汚染させた食品を 10g 用いて、図 1 で示した汎用プロトコルに従ってウイルス粒子を回収し、RNA 抽出と逆転写反応の後、real-time PCR でコピー数を測定した。投入したウイルスのコピー数 (8.18×10^5 コピー) を 100% として、回収したウイルスのコピー数から回収率を計算した。試験は 3 度繰り返して回収率の平均値と標準偏差を求めた。ポテトサラダからの

回収率は、抗 NoV-GII/4 ウサギ血清を添加した場合で 78.3 ± 10.8 %、Gammagard を添加した場合で 24.4 ± 3.6 % であり、抗体を添加しなかった場合の 0.33 ± 0.08 % と比べていずれも有意 ($p < 0.05$) に高い数値を示した(図 2A)。同様に焼きそばからの回収試験においても、抗 NoV-GII/4 ウサギ血清を添加した場合で 81.5 ± 10.2 %、Gammagard を添加した場合で 25.6 ± 2.3 % であり、抗体無添加の場合の 1.15 ± 0.25 % と比べて有意 ($p < 0.05$) に高い回収率を示した。

2. 実事例における NoV の検出

2011 年 9 月に大阪府堺市の保育園で発生した食中毒事例において、パントラ法 (Gammagard 使用) を適用したところ、「そら豆煮物」から NoV-GI (102 コピー/g) と NoV-GII (44 コピー/g) が検出された。また、別ロットの「そら豆の煮物」と「こんにゃくのキンピラ」から semi-nested PCR で NoV-GII が検出された。詳細は研究分担報告書(田中智之)を参照されたい。図 3 には代表例として「そら豆の煮物」から NoV-GI を検出した増幅曲線を示した。一方、conventional PCR での増幅バンド検出が困難であったため、シーケンス解析を行うには至っていない(理由と対策については後述する)。

3. パンソルビン相当品の自作プロトコルの検討

パントラ法の根幹を成すパンソルビンはメルク社でのみ製造されているため、品薄や在庫切れによって入手困難となる局面にしばしば遭遇した。また、将来的にメーカーの都合によって製造中止となるリスクも考慮しておく必要があった。そこで、黄色ブドウ球

菌を培養してホルマリン固定と熱処理を加えることで相当品を自作するプロトコルについて検討した。基本的な手順は「Kessler S. W., J. Immunol., 115, 1617-1624, 1975」に記載があるが、現在では入手不可能な培地もあるため同等の成分となるように市販品を調合した。例えば、原法に記載のある「Penassay Broth」は入手不可能であることから、「抗生物質培地 3」(耐性試験の基礎培地)で代用した。図 4 に示したプロトコルに従ってパンソルビン相当品を自作したところ、図 5 に示すとおり市販品と外見上は同一のものを得ることができた。この自作品を用いて 2.51×10^6 コピーの NoV を含む洗滌液 50mL からの回収試験を行ったところ、ウサギ抗血清、ヒトプール血清、各種ガンマグロブリン製剤のいずれを添加した場合でも、市販品と同等以上の回収率が得られた(図 5A、図 5B、表 1)。また、2L の培養スケールにおけるパンソルビン相当品の収量は約 20mL (20 検体分)であった。

4. パントラ法で抽出した遺伝子の検出限界

現在、NoV の capsid 領域を増幅するプライマーとしては、real-time PCR 用の COG 系(J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003)と conventional PCR 用の SK 系(J. Virol. Method, 100, 107-114, 2002)の 2 系統が多用されているが、最初から nested PCR 用として設計された反応系は未だ報告されていない。従って、より高い感度を求める場合は、これらの 2 系統のプライマーを適宜組み合わせる方法が用いられている。ポテトサラダと焼きそばを様々な量の NoV で汚染させたものから、semi-nested PCR による検出を試みた成績を表 2 に示した。プ

イマー COG2F / G2SKR で増幅した 387bps の 1st. PCR 産物に対して、COG2F / COG2R / RING2-TP からなるプライマー・プローブセットで再度 real-time PCR を行ったところ、いずれの食品においてもウサギ抗血清添加で 10 コピー/g、Gammagard 添加で 35 コピー/g の汚染レベルまで検出できた。焼きそばに Gammagard を添加して NoV 回収を行った際の増幅曲線を図 7 に示した。これによると、汚染度 35 コピー/g と 10 コピー/g で明確に陽性と陰性が分かれていることがわかる。一方、上記の 1st. PCR 産物をプライマー G2SKF / G2SKR による conventional PCR で再増幅し、アガロースゲル電気泳動で確認したところ、汚染度 3.5×10^2 コピー/g までは 344bps の増幅バンドが認められた(図 8)。しかし、 1.05×10^2 コピー/g 以下ではバンドが不明瞭であった。明確なバンドが認められた 3.5×10^3 コピー/g のレーンからバンドを切り出してシークエンスを解析したところ、汚染に用いた NoV の塩基配列であることが確認できた。同様に 35 コピー/g のレーンから 344bps に相当する部分のゲルを切り出し、そこに含まれる DNA 断片のシークエンスを解析したところ黄色ブドウ球菌の塩基配列であった。

D. 考察

1. 汎用プロトコルによる回収率

ポテトサラダと焼きそばにおいて、NoV-GII/4 の添加回収試験を行ったところ、図 2A、及び図 2B に示すとおり抗体を添加した場合としない場合では回収率において有意の差 ($p < 0.05$) が認められた。また、NoV-GII/4 特異的なウサギ抗血清と汎用的

なガンマグロブリン製剤（ここでは Gammagard）の比較では前者の回収率が有意 ($p < 0.05$) に高かった。しかし、その差は PCR では 3 サイクル以内であり、入手の容易さと各ウイルスに対して汎用的に用いることができる利点の方が上回るものと考えられる。従って、通常の検査対応としてはガンマグロブリン製剤を用い、精度管理を行う際に、理論上の裏付けが強固であるウサギ抗血清を用いれば、それぞれの特長を生かした活用法となるであろう。

2. 実事例への適用

2012 年 9 月に大阪府堺市で発生した食中毒事例において、「そら豆の煮物」と「こんにゃくのキンピラ」から NoV-GI と NoV-GII が検出された。詳細は研究分担報告書（田中智之）に記載があるが、患者集団からも NoV-GI と NoV-GII の両者が検出された事例であった。一方、real-time PCR では NoV を検出できたものの、アガロースゲル電気泳動では明瞭なバンドを観察できなかったため、塩基配列を解析するには至っていない。原因としては、図 7 と図 8 に示したとおり両手法における感度の乖離があげられる。Real-time PCR によって限界まで感度を高めたとしても、シーケンスを解析するためにはアガロースゲル上で増幅バンドを確認して、それを切り出すことが前提となるため、このような問題が顕在化したものと考えられる。対策としては conventional PCR の感度と特異性を上げることが必要であるが詳しくは 4. で後述する。

3. パンソルビン相当品の自作プロトコルの検討

本研究事業を進める過程において、パンソルビンが品薄・在庫切れの理由によって入手困難となる局面にしばしば遭遇した。また、この試薬はメルク社 1 社でのみ製造・販売されているため、将来的にメーカーの都合で製造中止となる可能性も否定できず、あらかじめ対応策を準備しておく必要があった。そこで、黄色ブドウ球菌を培養して菌体を回収し、ホルマリン固定と熱処理を加えて相当品を自作するプロトコルについて検討した。黄色ブドウ球菌は株によって、プロテイン A を産生しないか、含有量の非常に少ないものも存在するため、プロテイン A の生産用として確立している Cowan I 株を用いた。図 4 に示すプロトコルにてパンソルビン相当品を自作したところ、外見上、市販品と全く同一のものを得ることができた（図 5）。また、図 6A、図 6B、及び表 1 に示したとおり、パントラ法に使用した場合の回収率は市販品と同等以上であることが証明された。防腐剤であるアジ化ナトリウム存在下で 1 年間は保存可能であるため、時間的余裕のある時季（流行期外）に大量に作製しておくことで、在庫切れ等の問題に対応することができると考えられる。さらに、市販品のパンソルビンを用いると食品 1 検体あたり約 2,000 円が必要であるが、自作することで数十円にまでコストを圧縮することができるため費用対効果の面でも有利である。

4. パントラ法で抽出した遺伝子の検出限界と今後の対策

1st. PCR 産物を real-time PCR で再度増幅して検出する方法は、定量性は期待できないものの、ハイブリダイゼーションで確認試験を行ったのと同程度の効果があるため、

限られた時間内に何らかの結果を出さなければならぬ局面では有効な方法である。過去には簡易水道に NoV が混入した事例で用いられたことがある(斎藤博之、他、病原微生物検出情報、Vol.26、No.6、14-15、2005)。汚染されたポテトサラダと焼きそばに対してこの方法を用いて限界まで感度を高めたところ、ウサギ抗血清を用いた場合で 10 コピー/g、Gammagard を用いた場合で 35 コピー/g の汚染レベルまで検出することができた(表 2)。なお、ここで示した数値は、パントラ法の回収率だけでなく、逆転写反応効率や PCR の増幅効率までも包含した結果であると解釈する必要がある。その一方で、図 7 と同じ 1st. PCR 産物を conventional PCR で再増幅してアガロースゲル電気泳動で観察したところ、明瞭なバンドが観察できたのは 3.5×10^2 コピー/g (Gammagard の場合)までであった。ここに約 10 倍の感度差が存在し、シーケンス解析のための障害となっていることがわかった。具体的な原因としては、黄色ブドウ球菌の遺伝子が大量に混入するため、PCR において副反応が起こることが考えられる。黄色ブドウ球菌の遺伝子そのものは、微量の NoV 遺伝子を保持するキャリアーとして働くため、プロトコルの途中まではむしろプラスの影響を与える。そこで、最終的な PCR において影響を及ぼさない方法を考える必要がある。DNA については、逆転写反応に先立つ DNase I 処理で除去されているため、ここで問題となるのは RNA である可能性が高い。Real-time PCR においては、原理的に副反応産物は増幅曲線に反映されないため支障はないが、シーケンス解析のためにはアガロースゲル電気泳動で明瞭なバンドが観察できないと

増幅断片を回収できないという問題が生じる。図 8 のゲルをメンブレンに転写して、サザンブロットハイブリダイゼーションを行えば、図 7 と一致した結果が得られることが期待されるが、増幅バンドを切り出して回収するという目的のためには別の解決策が必要なため次年度の課題とする。

解決策の候補としては次の検討を予定している。

- 1) 黄色ブドウ球菌ペレットから pH1.0 の強酸でウイルスを遊離させる。
- 2) 黄色ブドウ球菌ペレットから両イオン性界面活性剤「Zwittergent 3-14 detergent」で NoV の RNA だけを溶出する。
- 3) 黄色ブドウ球菌ペレットから「Tris-Glycine-SDS」で NoV の RNA だけを溶出する。
- 4) 逆転写反応後に、RNase I と RNase H の混合液で処理して黄色ブドウ球菌の RNA を分解除去する。
- 5) PCR の特異性を上げるため、ホットスタート・タッチダウン・高温シャトル PCR を行う。
- 6) 5) に関連して、現行のプライマーの T_m を引き上げる工夫をする。具体的には、5'側への鎖長延長がコスト的に安価であるが、混合塩基が増えて縮重度が高くなると特異性が低下するため、LNA (Locked Nucleic Acid) 修飾による T_m 上昇効果(Elmén J., et. al., Nuc. Acid Res., 33, 439-447, 2005)も併用する。
- 7) プライマー G1SKR、及び G2SKR の下流にもう一箇所プライマーを設定し、semi-nested PCR ではなく、真の nested PCR が行えるように反応系をデザインする。この際、6)の LNA 修飾を用いる。

E. 結論

平成 22 年度までに完成させたパントラ法の汎用プロトコルを用いて実事例から NoV を検出することができた。この過程で、根幹となる試薬であるパンソルビンの品薄・在庫切れ・将来的な製造中止のリスクに備える必要があったことから、各試験研究機関で相当品を自作するためのプロトコルを構築した。自作された相当品をパントラ法に用いたところ、市販品と同等以上の回収率が得られ、十分に実用に耐えるものと考えられた。一方、シーケンス解析のためにアガロースゲル電気泳動で明瞭なバンドを得るための改良が必要であることがわかり、解決策としていくつかの候補を提示した上で次年度の課題とする。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛：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、Vol.32、No.12、4-6、2011

2) 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、Vol.1、No.1、2012 (印刷中)

2. 学会発表

1) Hiroyuki Saito, Miho Toho, Mamoru Noda, Tomoyuki Tanaka, Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama:

Development of PANtrap method to detect norovirus from contaminated food. The 15th International Congress of Virology, 2011, Sapporo.

2) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛：食品中のノロウイルス検出のためのパンソルビン・トラップ法の開発、第 102 回日本食品衛生学会学術講演会、2011、秋田

3) 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、第 32 回日本食品微生物学会学術総会、2011、東京

4) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛：病原ウイルスによる食品汚染を検出するパンソルビン・トラップ法の開発、第 19 回秋田応用生命科学研究会、2011、秋田

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

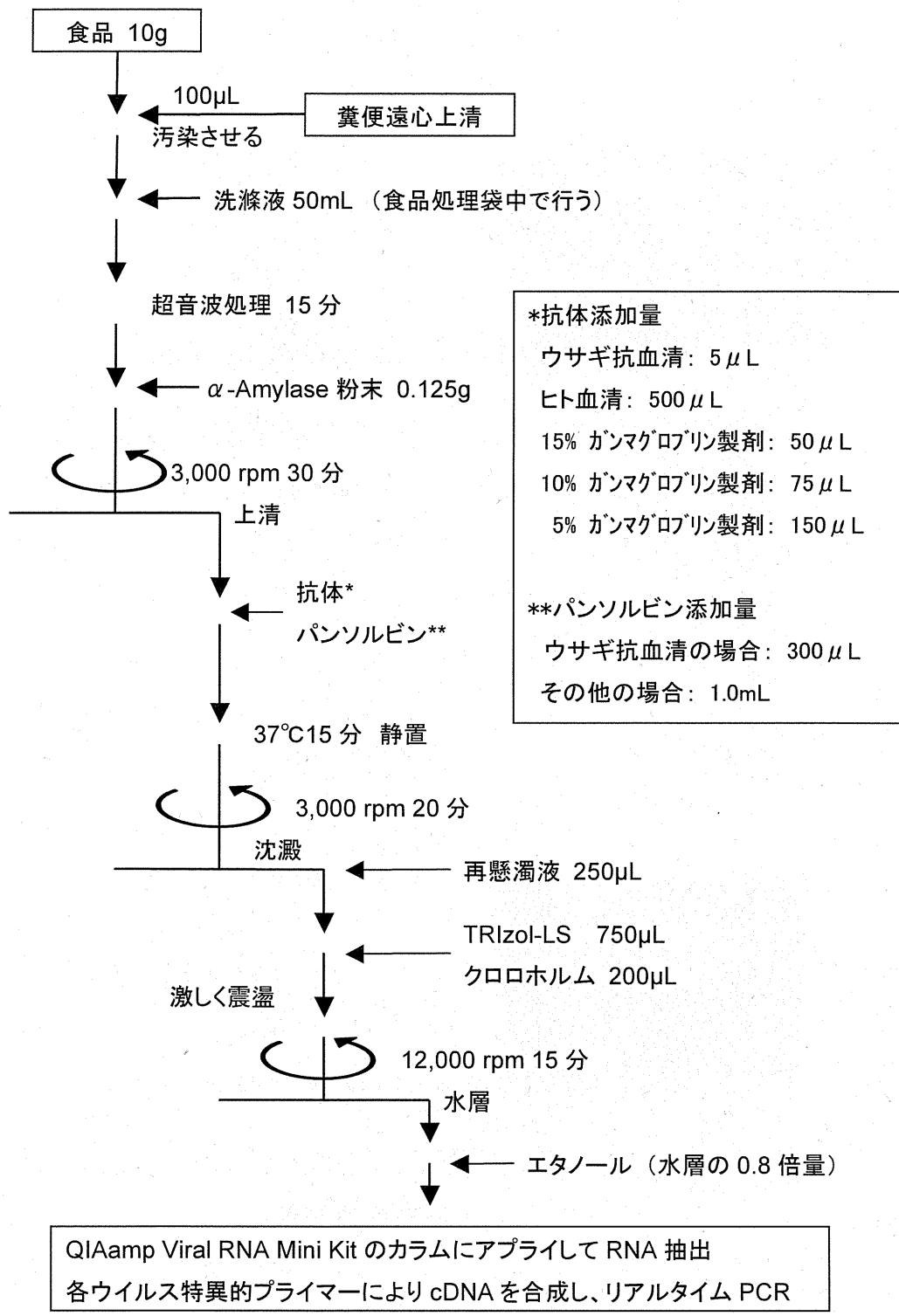


図 1 パンソルビン・トラップ法の操作手順 (Ver.4, H22 年報告書より抜粋)

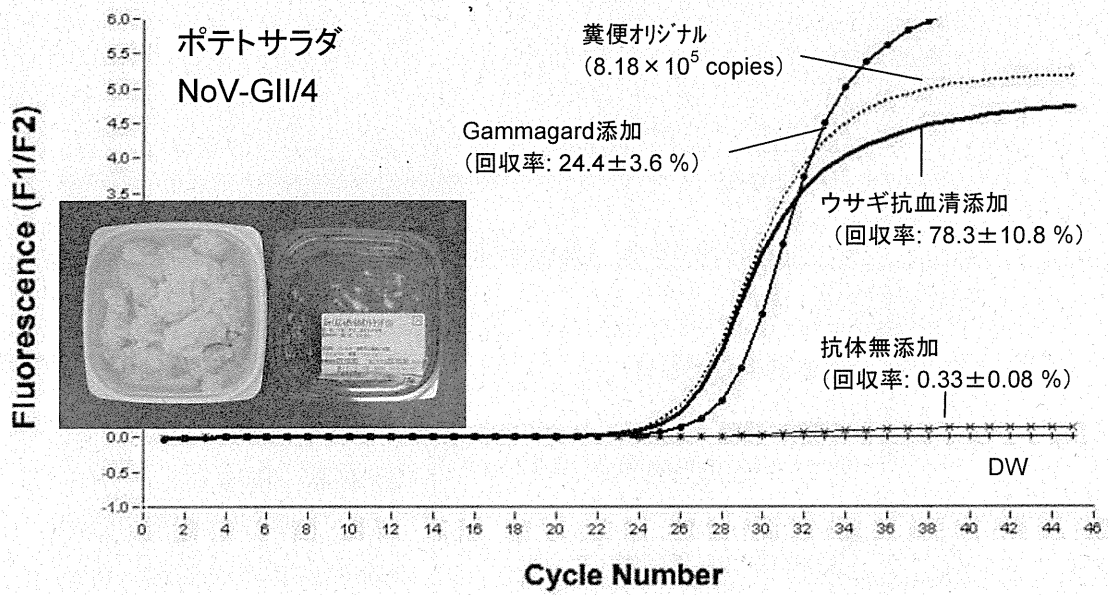


図 2A パンソルビン・トラップ法によるポテトサラダからの NoV 回収 (増幅曲線)

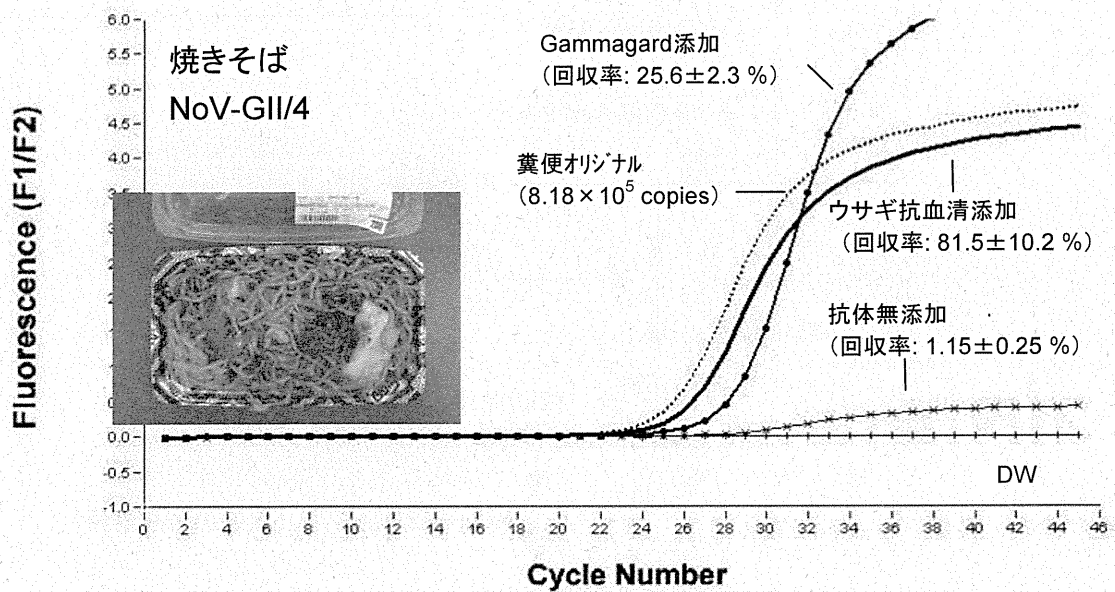


図 2B パンソルビン・トラップ法による焼きそばからの NoV 回収 (増幅曲線)

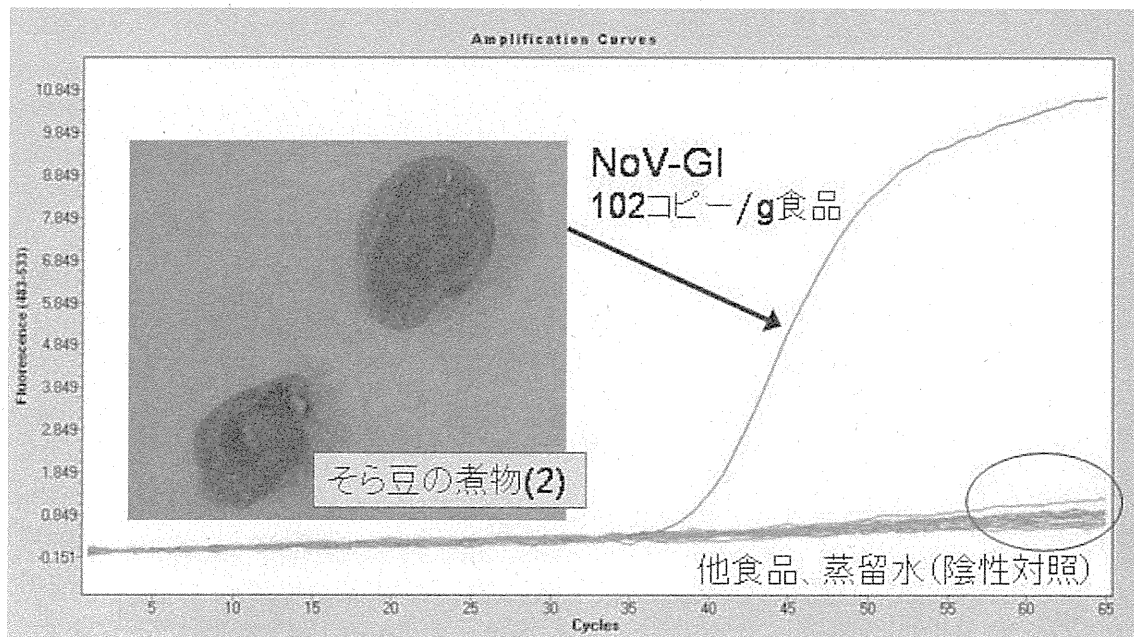


図 3 実事例におけるパンソルビン・トラップ法の適用例

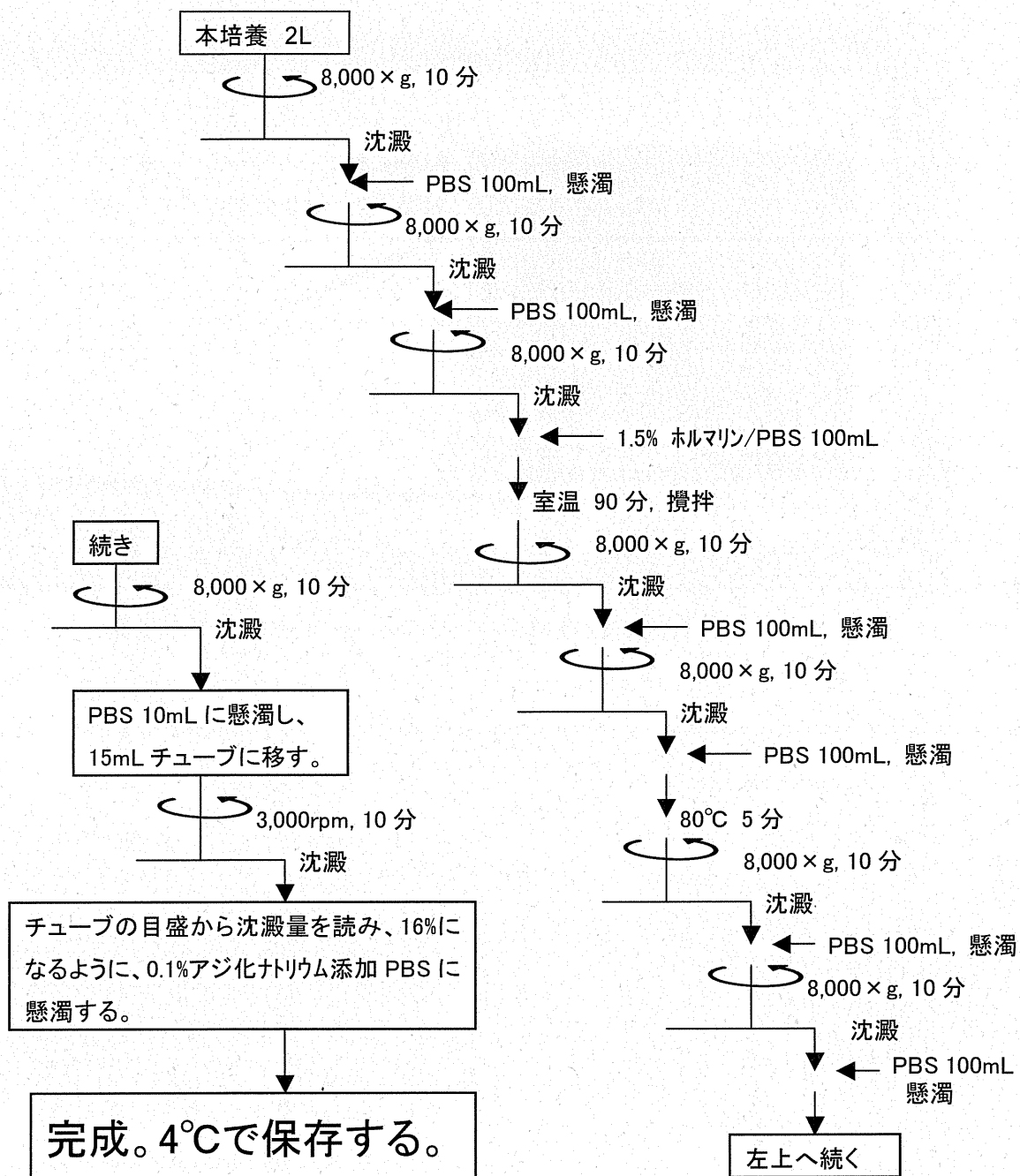
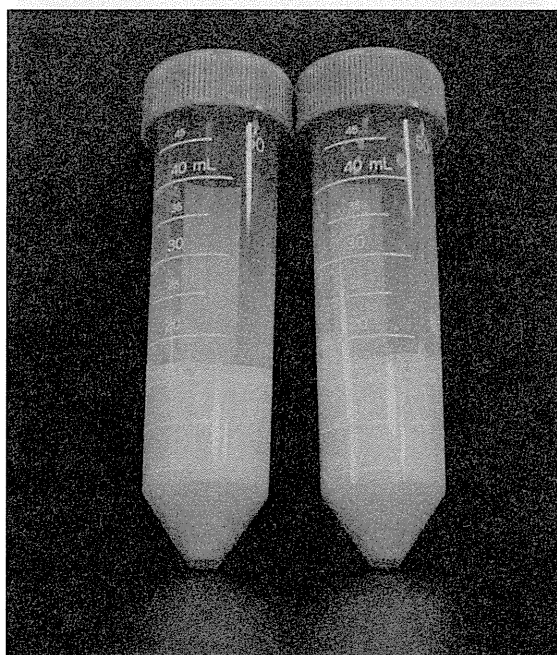


図 4 パンソルビン相当品の作製手順



左： 市販品
右： 自作品



左： 市販品（チューブ統一）
右： 自作品

図 5 パンソルビン市販品と自作品の外見比較

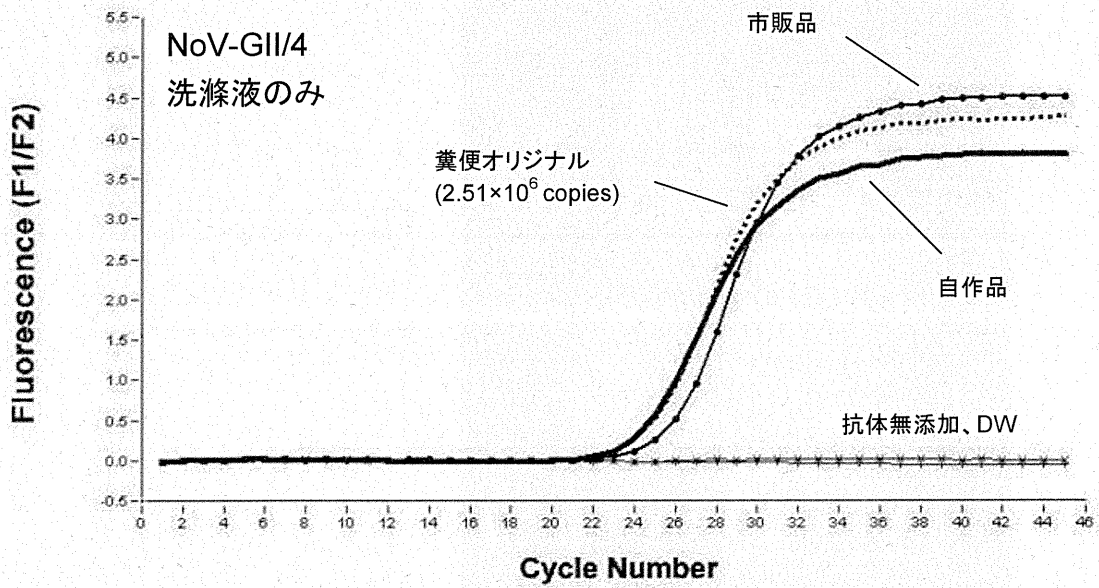


図 6A パンソルビン市販品と自作品を用いた増幅曲線（ウサギ抗血清添加）

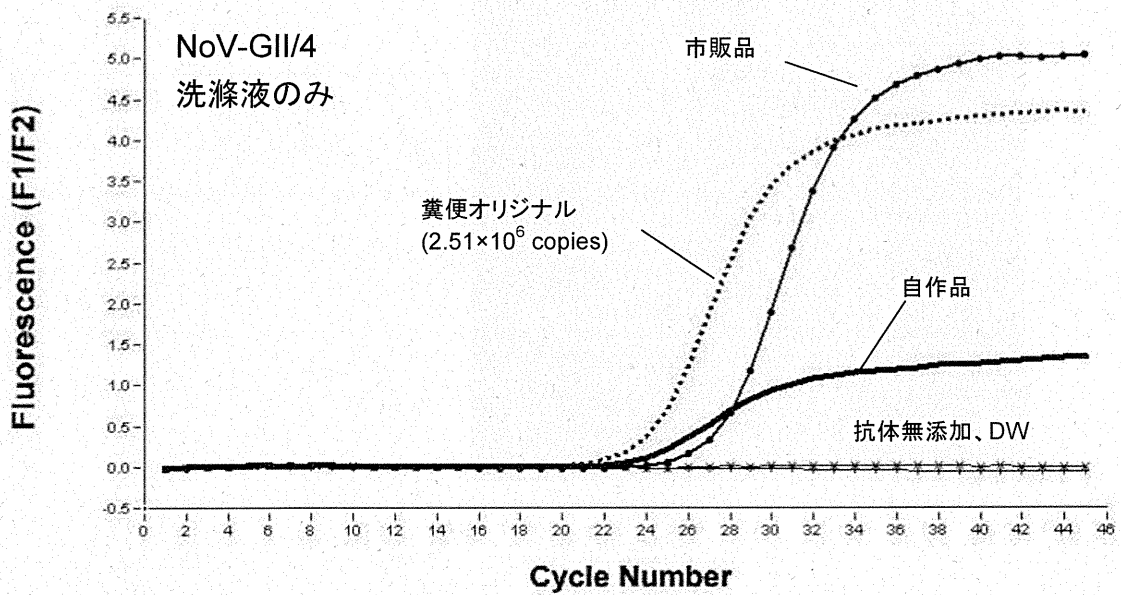


図 6B パンソルビン市販品と自作品を用いた増幅曲線（Gammagard 添加）

表 1 パンソルビン市販品と自作品を用いた場合の回収率の比較

添加抗体	ウイルスの回収率		
	市販品 (%)	自作品 (%)	相対比 (自作品/市販品)
ウサギ抗血清	56	94	1.7
ヒトプール血清	12	40	3.3
ガンマグロブリン「化血研」	16	39	2.4
ガンマグロブリン「日本製薬」	19	41	2.2
Bharglob (BSV Ltd.)	17	43	2.5
Gammagard (Baxter)	19	57	3.1

表 2 Semi-nested RT-PCR を用いた場合の検出限界

食品の種類	添加抗体	汚染レベル (copies / g · 食品)						
		3.50×10^4	3.50×10^3	3.50×10^2	1.05×10^2	35	10	3
ポテトサラダ	ウサギ抗血清	+	+	+	+	+	+	-
	Gammagard (Baxter)	+	+	+	+	+	-	-
焼きそば	ウサギ抗血清	+	+	+	+	+	+	-
	Gammagard (Baxter)	+	+	+	+	+	-	-

1st. PCR をプライマー COG2F / G2SKR にて実施し、その増幅産物をプライマー・プローブセット COG2F / COG2R / RING2-TP を用いた real-time PCR で検出した。

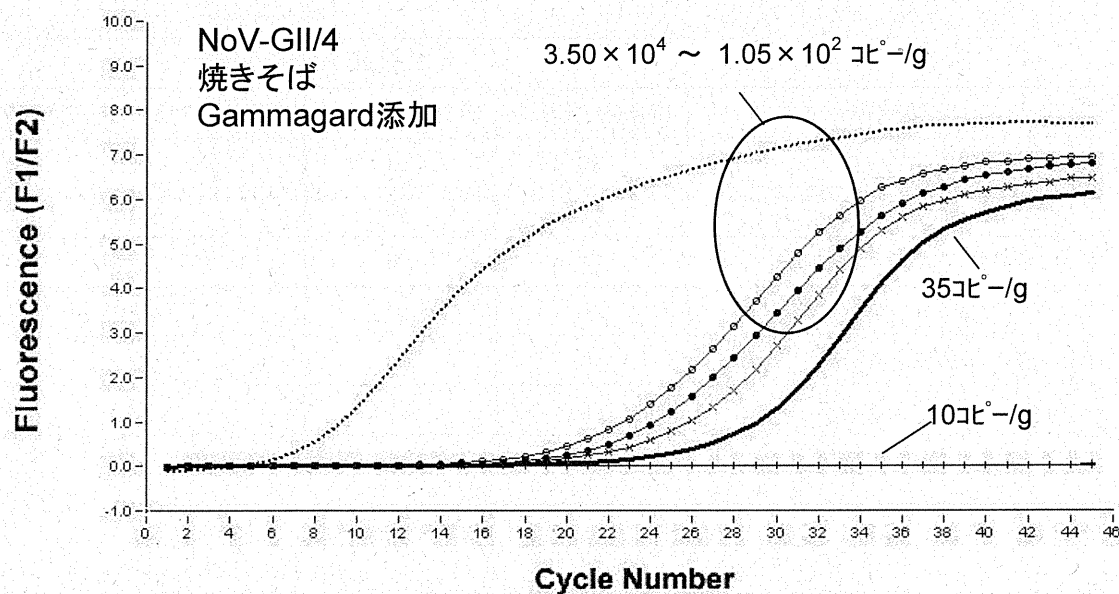


図 7 Semi-nested PCR の増幅曲線

1st. PCR をプライマーCOG2F/G2SKR にて実施し、その増幅産物をプライマー・プローブセット COG2F/COG2R/RING2-TP を用いた real-time PCR で検出した (表 2 の増幅曲線)。

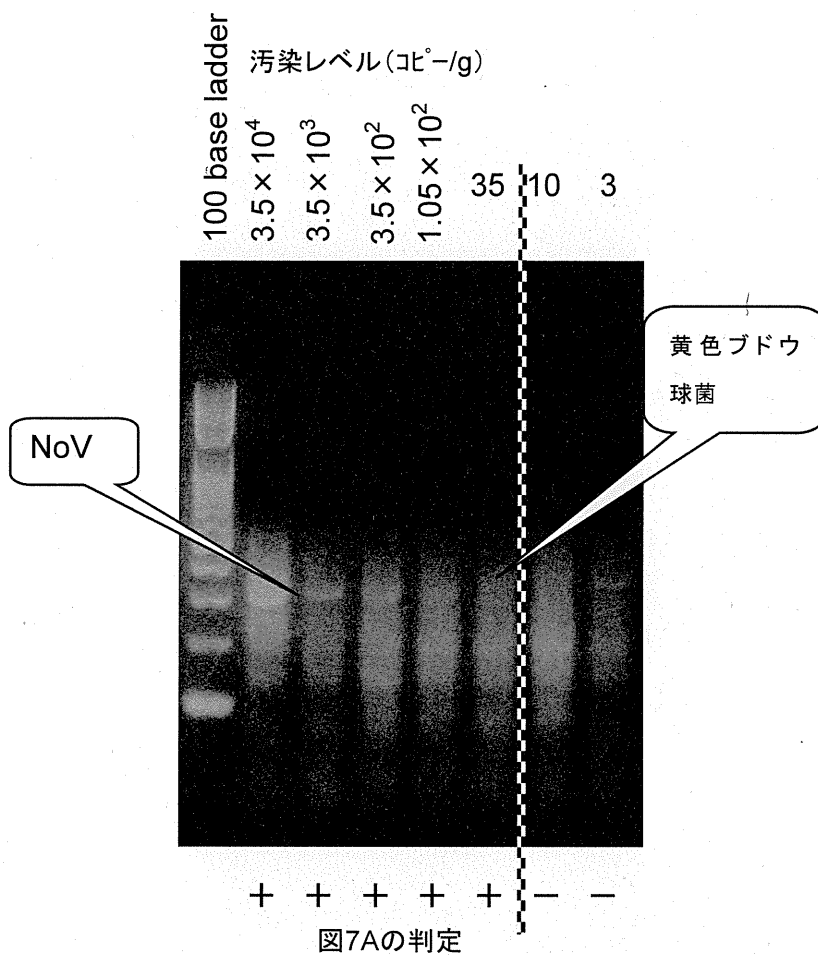


図 8 Semi-nested PCR 増幅産物の電気泳動パターン

1st. PCR をプライマーCOG2F / G2SKR にて実施し、その増幅産物をプライマーG2SKF / G2SKR を用いた 2nd. PCR で再増幅した。

平成 23 年度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」

研究分担報告書

ノロウイルス迅速遺伝子型分別システムの開発

研究分担者	鈴木 善幸	名古屋市立大学
研究協力者	小林 由紀	名古屋市立大学

研究要旨

ノロウイルスにおいては、構造遺伝子領域・非構造遺伝子領域それぞれの塩基配列・アミノ酸配列の多重整列において、ギャップが多く入ることが知られている。ギャップを正確に入れないと自然選択圧の検出にどのような影響が出るのかを明らかにするため、自然選択圧の検出においてしばしば行われる、アミノ酸配列で多重整列を作成してからそれをコドン配列に変換する、という方法の非同議置換速度/同議置換速度比推定にあたる影響を検討した。その結果、アミノ酸配列で多重整列を作成してからそれをコドン配列に変換する、という方法によりえられたコドン配列の多重整列を用いて非同議置換速度/同議置換速度比を推定すると、比が過大推定されることが明らかになった。この原因としては、アミノ酸配列の多重整列における誤り、3塩基を単位としない挿入・欠失によるアミノ酸配列と塩基配列の多重整列の不整合が考えられた。以上のことから、非同議置換速度/同議置換速度比推定にはアミノ酸配列で多重整列を作成してからそれをコドン配列に変換する、という方法は推奨されないと考えられた。

A. 研究目的

「ノロウイルス迅速遺伝子型分別システムの開発」という研究項目名のもと、(1) ノロウイルスゲノム配列について、構造遺伝子領域・非構造遺伝子領域それぞれで系統樹を作成することによる、領域間でゲノム組み換えのないクラスターとしての遺伝子型分類体系の確立、(2) 構造遺伝子領域・非構造遺伝子領域それぞれのノロウイルスゲノムに働く自然選択圧の検出、を主な目的として研究を

行う。

ノロウイルスにおいては、構造遺伝子領域・非構造遺伝子領域それぞれの塩基配列・アミノ酸配列の多重整列において、ギャップが多く入ることが知られている。ギャップを正確に入れないと自然選択圧の検出にどのような影響が出るのかを明らかにするため、自然選択圧の検出においてしばしば行われる、アミノ酸配列で多重整列を作成してからそれをコドン配列に変換する、という方法の非