

- Hiromi Moril, Tadahito Kanda, Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Mamoru Noda, Tomoyuki Tanaka, Naokazu Takeda, Hironori Sato, and the Norovirus Surveillance Group of Japan.
Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan. *J. Virol.*, 2010.
- (2) Yasutaka Yamashita, Yuka Ootsuka, Meiko Kondo, Mitsuaki Oseto, Mitsunori Doi, Takeshi Miyamoto, Tetsuroo Ueda, Hirokazu Kondo, Tomoyuki Tanaka, Takaji Wakita, Kazuhiko Katayama, Naokazu Takeda, and Tomoichiro Oka. Molecular Characterization of Sapovirus Detected in a Gastroenteritis Outbreak at a Wedding Hall. *J. Med. Virol.* 2010, 82:720-726
- (3) 田中智之. 院内感染予防におけるノロウイルス迅速診断法の活用 感染対策 ICT ジャーナル. 2010.5(4), 427-433
- (4) 田中智之. ノロウイルス食中毒. 食品微生物学辞典. 中央法規出版株式会社. P188-189, 2010年4月1日発行
- (5) 田中智之、位田 忍、浅利誠志、藤沢卓爾、鍵本聖一、牛島廣治、武田直和、田尻 仁. ノロウイルス感染症と予防指針. *臨床とウイルス* 39(3), 155-160, 2011
- (6) 田中智之. 消化器症候群 ノロウイルス ウイルス感染症の検査・診断スタンダード. 羊土社発行 P129-133, 2011
- (7) 田中智之. ノロウイルス院内感染防止 *M.P. Medical Practice* 2011, 28(12), 2237
- (8) 三好龍也 内野清子 西口智子 岡山文香 吉田永祥 田中智之 瀬尾宗治 辻本裕貴 大橋吾郎 藤井史敏 野田 衛 斎藤博之.
食品中からノロウイルス遺伝子が検出された食中毒事例—堺市
病原微生物検出情報 32 (12) 364-365: 2011
- (9) 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
- (10) Noritoshi Kitamoto, Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, Yoji Kato, Tatsuya Miyoshi and Tomoyuki Tanaka: Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. *Microbiol. Immunol.* 56; 760-770, 2012
- (11) 田中智之. 三好龍也、内野清子 吉田永祥. 感染症迅速診断キットの有用性と限界—ノロウイルス— *小児科* 53(4), 437-442, 2012
- (12) 田中智之、小林尚明、豊田 茂、佐藤雅久、佐野康子、竹田弘、柏井健作、家永信彦、中田修二、宇加江進、佐藤勇、原錬太郎、中野 徳、田中敏博、五十嵐隆夫、水澤一郎、田尻 仁. ノロウイルス抗原迅速診断試薬クイックナビ™ -ノロ2の評価. *医学と新薬* 68(6), 1033-1039, 2012

(13)本村和嗣, 横山勝, 岡智一郎, 片山和彦, 野田衛, 田中智之, 佐藤裕徳, Norovirus Surveillance Group of Japan. ノロウイルスのゲノム解析と流行発生のしくみ.

感染症学雑誌: 86: 563-568, 2012

(14)田中 智之.

新規に保険収載された検査法: ノロウイルス抗原迅速定性検査

モダンメディア: 58(11); 337-341, 2012

2. 学会発表

(1) 国際学会

1) Tomoyuki Tanaka, Noritoshi

Kitamoto, Tomoichiro Oka, Tatsuya Miyoshi, Kiyoko Uchino, Hisaaki Yoshida, Setsuko Iizuka, Yoshiharu Morino, Yasutaka Yamashita, Seiya Harada, Naokazu Takeda and Kazuhiko Katayama. Rapid Detection kit for norovirus and sapovirus with viruses specific monoclonal antibodies. The 5th China Medicinal Biotech Forum November 7-9, 2011, Beijing, China

2) Kazushi Motomura, Masaru Yokoyama, Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Mamoru Noda, Tomoyuki Tanaka, Hironori Sato: Structural dynamics of norovirus GII.4 genome in nature. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 札幌市, 9.13. 2011

3) Noritoshi Kitamoto, Tomoichiro Oka, Grant S. Hansman, Kazuhiko Katayama, Yoji Kato, Tomoyuki Tanaka. Brpadly reactive monoclonal antibodies with

several recombinant Sapovirus-like particles (SV-VLPs). International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 札幌市, 9.13. 2011

(2) 国内学会

1) 吉澄志磨, 後藤明子, 石田勢津子, 田中智之, 野田衛: 二枚貝の喫食のみられた食中毒疑い事例における各種胃腸炎ウイルスの関与について, 第32回日本食品微生物学会, 2011年10月, 東京

2) 野田 衛, 多田有希, 田中智之, 清原知子, 石井孝司: 2010年のA型肝炎の分子疫学的解析とA型肝炎サーベイランスシステムの構築. 衛生微生物協議会第32回研究会, 江戸川区, 6月30日, 2011

3) 本村和嗣, 横山 勝, 岡 智一郎, 片山和彦, 野田 衛, 田中智之, 佐藤裕徳. ゲノミクスと計算科学の手法によるノロウイルス GII.4 進化様式の解析. 第85回日本感染症学会総会 ワークショップ 2011年4月21-22日, 東京

4) 齋藤博之, 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, 秋田市, 9月29-30日, 2011

5) 齋藤博之, 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, 秋田市, 11月25日, 2011

- 6) 上間 匡、石井孝司、小原真弓、田中俊光、増本久人、入谷展弘、齋藤哲也、吉田 徹也、山下育孝、柴田伸一郎、田中智之、内野清子、野田 衛: A型肝炎ウイルス検出PCRの高感度化の検証: 第32回日本食品微生物学会学術総会、江戸川区、平成23年10月7日
- 7) 西村浩一、原田誠也、李 天成、石井孝司、田中智之、野田 衛: 熊本県におけるイノシシ、ブタ及びシカのE型肝炎ウイルス保有状況に関する実態調査、第32回日本食品微生物学会学術総会、江戸川区、平成23年10月7日
- 8) 三好龍也 内野清子 本村和嗣 佐藤裕徳 田中智之: 堺市におけるキメラ型ノロウイルスの検出状況. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012
- 9) 齋藤博之、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・トラップ法によって食品検体から検出されたノロウイルス遺伝子解析法の開発. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪市、2012年11月13-15日、
- 10) 飯塚節子、齋藤博之、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ノロウイルス遺伝子の検出 — 弁当屋を原因施設としたノロウイルス集団食中毒事例から — 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪市、2012年11月13-15日、
- 11) 北元憲利、岡 智一郎、片山和彦、三好龍也、田中智之. サポウイルスgenogroup に特異的な単クローン抗体の作製とその解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪市、2012年11月13-15日、
- 12) 原田誠也、西村浩一、李 天成、石井孝司、田中智之、野田 衛. 熊本県におけるイノシシ、シカ及びブタのE型肝炎ウイルス汚染実態調査と分子疫学解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪市、2012年11月13-15日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

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」

総合研究分担報告(平成 22～24 年度)

パンソルビン・トラップ法による食品中の病原ウイルス検査の実用化

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

平成 19～21 年度に実施された厚生労働科学研究事業において、ノロウイルス GII/4 型とそれに対するウサギ抗血清を用いた汚染回収モデルにより、固形・液状・練り物・油物など、どのような食品でもウイルス検査ができる、パンソルビン・トラップ法を開発した。本研究事業では、実際の食中毒事例に適用できるものとするために、パンソルビン・トラップ法に現実的な局面を想定した改良を加えた。第一に、本法において不可欠な添加抗体の供給源に関する検討を行い、ガンマグロブリン製剤を用いる汎用プロトコルを完成させた。これによって、抗体の量的な制約から解放されただけでなく、ノロウイルス、サポウイルス、A 型肝炎ウイルス、アデノウイルス 41 型といった多種類の食中毒起因ウイルスに同時対応可能となった。第二に、パンソルビンの自家調製プロトコルによって、試薬の在庫切れや製造中止といったリスクを回避できるようになり、コスト負担も低減された。第三に、本法の性質上、必然的に混入してくる大量の黄色ブドウ球菌由来の遺伝子をキャリアーとして利用しつつ、遺伝子解析に影響が及ばないようにする RT-PCR プロセスを考案した。逆転写反応時に PCR で用いるものとは異なる専用プライマーを使うことで、遺伝子解析可能な PCR 増幅産物を得ることに成功した。ノロウイルス GI/4 型、及びノロウイルス GII/4 型で汚染させたポテトサラダにおける本法の検出限界は、両者とも食品 1g 当たり 35 コピーであった。実事例としては、平成 23 年 9 月の大阪府堺市の食中毒事例の食品からノロウイルス GI 型を検出し、同様に平成 24 年 3 月の島根県浜田市の食中毒事例においても食品からノロウイルス GII 型を検出できた。以上のことから、パンソルビン・トラップ法を実際の食中毒事例に適用できる食品検査法に改良するという目的は達成された。

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。本研究事業ではその手法を発展させ、実際の食中毒事例に適用するための汎用化を実現することを目的とする。同時に、実用局面において不具合が生じる部分を洗い出して改良を加えるものとする。実用化に向けて検討すべき課題は次の 4 点に集約される。

①これまでの開発に用いてきたウサギ抗血清は、ノロウイルス様人工粒子 (VLP) を免疫して作製されたもので量的に限りがあり、全国の食中毒事例に用いるには全く足りていない。より現実的な抗体供給源の確保が望まれる。

②これまで、反応条件等の最適化を図るため実験系を単純化する必要があり、流行の主流を占める NoV-GII/4 をモデルとして扱った。しかし、NoV には他にも多くの型が存在し、さらには SaV、AdV41、

HAV などの食中毒起因ウイルスへの対応も必要である。

③本法の根幹をなすパンソルビン (ホルマリン固定された黄色ブドウ球菌 (ブ菌)) のメーカーが 1 社しかないため、品薄や在庫切れ、あるいは将来的な製造中止のリスクが存在する。また、試薬の中では高価な部類に入ることから、常用するにはコスト負担が大きい。

④本法はブ菌の表面にウイルス粒子を吸着させて回収することを基本原理とするため、抽出された RNA には大量のブ菌遺伝子が混入する性質がある。ブ菌遺伝子は極微量のウイルス RNA を安定的に保持するキャリアーとして働くことから、検出感度を高めるのに利用できる。その一方で、検出された遺伝子の配列を解析する際の障害となることが予想されるので、何らかの回避策が必要である。

研究のスケジュールとしては、平成 22 年度に課題①と②を、平成 23 年度に課題③を、平成 24 年度に課題④を解決するための検討を行う。

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、検出対象ウイルスである、NoV-GII/2、GII/3、GII/4、GII/5、GII/6、GII/12、GII/13、GII/18、GI/3、GI/4、GI/8、GI/9、GI/14、SaV-GI、GII、GIV、GV、及び AdV41 については秋田県内の集団感染事例とサーベイランス定点から得られた糞便を用いた。同じく検出対象とした HAV については不活化ワクチン (「エ

イムゲン」化血研)を用いた。

2. 試薬類

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。

2) 抗NoV血清

国立感染症研究所で VLP から作製したウサギ免疫血清 (抗 GI/3, 4, 8 GII/2, 3, 4, 5, 6, 12) を単味で用いた。

3) ヒトプール血清

Kojin Bio 社より別ロットで 10 種類を購入した。

4) 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。

5) 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。

6) 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)。Adv Chemical 社より購入した。

7) 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。

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AVL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

ニッポンジーンの製品を使用した。

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) 逆転写酵素

ReverTra Ace (東洋紡) を使用した。

16) 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。

17) 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)。

18) 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。

19) 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。

20) 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。

21) β -Glycerophosphate

メルク社 (カタログ番号 35675-50GM) より購入した。

22) Nicotinic Acid

メルク社 (カタログ番号 481918-100GM) より購入した。

23) Nicotinamide

メルク社 (カタログ番号 481907) より購入した。

24) Thiamine Hydrochloride

メルク社 (カタログ番号 5871) より購入した。

25) PBS

26) 1.5%ホルマリン含有 PBS

27) 0.1%アジ化ナトリウム含有 PBS

28) ノーマル PCR 用酵素

Taq DNA Polymerase High Yield (グライナー) を用いた。

29) ホットスタート&タッチダウン PCR 用酵素

KOD FX Neo (東洋紡) を用いた。

30) 逆転写反応に用いたプライマー

NoV に対しては、ランダムプライマー (9mer, タカラバイオ)、G1SKR と G2SKR (Kojima S., et. al., J. Virol. Method, **100**, 107-114, 2002)、及び新規開発の逆転写反応専用プライマー PANR-G1 と PANR-G2 を用いた。PANR-G1 は表 3 に示した PANR-G1a と PANR-G1b を 1:1 で混合したものである。PANR-G2 は表 3 に示した PANR-G2a、PANR-G2b、及び PANR-G2c を 2:1:1 で混合したものである。SaV と HAV に対しては、real-time PCR のリバース側プライマーを用いた。

3. パントラ法の手順

基本的な操作の流れを図 1 に示した。なお、ウイルスと抗体の反応性を確認するための試験 (表 1 と 2) では食品を含まない食品洗滌液のみであることから、超音波処理と α -Amyrase 前処理は省略した。

4. ウイルスの検出

Adv41 については図 1 の抽出液をそのまま用い、real-time PCR 検出系 (J. Clin. Microbiol. **44**, 3189-3195, 2006) でコピー数を測定した。NoV、SaV、及び HAV については、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、各ウイルス特異的プライマー (real-time PCR と同一のものか、逆転写反応専用プライマー)、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、NoV については Kageyama ら (J. Clin. Microbiol., **41**, 1548-1557, 2003)、SaV については Oka ら (J. Med. Virol. **78**, 1347-1353, 2006)、HAV については、国立感染症研究所病原体検出マニュアル (A 型肝炎、平成 18 年 8 月版) の real-time PCR によりウイルスを検出した。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。

さらに NoV に対しては、cDNA 溶液 5 μ L から、COG1F (Kageyama T., et. al., J. Clin. Microbiol., **41**, 1548-1557, 2003) / G1SKR、または COG2F (COG1F と同一文献) / G2SKR による 1st. PCR と、G1SKF/G1SKR または G2SKF/G2SKR による semi-nested RT-PCR を行った。この増幅反応において、通常用いられるノーマル PCR に加え、より特異性の高いホットスタ

ート&タッチダウン PCR を行った。それぞれの反応温度条件は、次のとおりである。

【ノーマル PCR】

94°C4分 1 サイクル

94°C30秒-50°C30秒-72°C30秒 40 サイクル

72°C7分 1 サイクル

【ホットスタート&タッチダウン PCR】

94°C4分 1 サイクル

94°C30秒- (55→50°C) 30秒-72°C30秒 5 サイクル：下線部がタッチダウン設定

94°C30秒-50°C30秒-72°C30秒 40 サイクル

72°C7分 1 サイクル

PCR 産物のゲル電気泳動で予想位置にバンドが認められた場合は切り出してシーケンスを試みた。また、1st. PCR 産物に対して前述の real-time PCR を行い、NoV 特異的な増幅の有無を検討した。

5. パンソルビン相当品の自家調製

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. 添加抗体供給源の検討

ウサギ抗血清に代わる添加抗体供給源として、ヒトプール血清とガンマグロブリン製剤を用いた場合の回収率を比較した。ヒトプール血清は 10~20 人の血清を混合したものであることから、製造ロットによって回収率にバラつきがあり、ウイルスの型によっては全く回収できないものも存在した (平成 22 年度報告書参照)。一方、ガンマグロブリン製剤は 1 万人単位の血漿プールから製造されることから、ロット間の差は問題にならないが、国産製造品と海外製造品には、供血制度の違いに由来すると思われる差が存在した (平成 22 年度報告書参照)。複数メーカーのガンマグロブリン製剤を比較したところ海外製造品の Gammagard が最も回収率が高かった。図 2 と図 3 に NoV-GII/4 によって汚染されたポテトサラダと焼きそばからの回収成績を示した。ウサギ抗血清を用いたパントラ法では約 80%、

Gammagard を用いた場合は約 25% の回収率で、PCR における 2 サイクル以内の差であった。

2. ガンマグロブリン製剤の、食中毒起因ウイルスに対する反応性の検討

ガンマグロブリン製剤は 1 万人単位の血漿を混合して製造されることから、多種類のウイルスに対する抗体を含んでいるものと予想される。そこで、様々な食中毒起因ウイルスに対する反応性を、ウイルス希釈液からの回収率を指標として比較した (表 1)。前述のとおり、各社製品の中で最も回収率の高かった Gammagard を用いたところ、NoV では 13 遺伝子型、SaV では人に感染する 4 遺伝子グループ、さらには HAV と AdV41 に対しても適用できることが確認された。

3. パンソルビン相当品の自家調製

図 4 に示した手順でパンソルビン相当品を自家調製したところ、図 5 のとおり外見上は市販品と全く同一のものが出来上がった。2L の培養スケールで得られた相当品は約 20mL (食品 20 検体分) であった。表 2 に示したとおり、NoV-GII/4 特異的ウサギ抗血清を用いた場合の回収率は、市販のパンソルビンで 56% であったのに対し、自家調製品で 94% と 1.7 倍であった。また、各種ガンマグロブリン製剤を用いた汎用化プロトコルにおいても、相当品は市販品に対して 2.2~3.1 倍の回収率を示した。この内、Gammagard を用いた場合が最も好成績であり、市販品による回収率 19% に対し、相当品は 57% (3.1 倍) であった。

4. 遺伝子解析への対応

実事例においては、汚染レベルが低いことが予想されるため、より感度の高い semi-nested real-time PCR による検出が現実的な選択となる。同様に遺伝子配列を確認する作業プロセスとして、semi-nested RT-PCT による増幅と電気泳動が必須である。様々なレベルで汚染させた焼きそばから、Gammagard を用いて NoV-GII/4 を回収し、COG2F / G2SKR による増幅の後、さらに real-time PCR を行った増幅曲線を図 6 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 semi-nested RT-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 7)。しかし、 1.0×10^2 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ケ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 近傍に位置する部分のゲルを切り出し、そこに含まれる DNA 断片のシーケンスを解析したところ黄色ブドウ球菌 (ブ菌) の 16s リボソームの塩基配列であった。

この問題に対処するために、逆転写反応専用プライマーとして、PANR-G1 と PANR-G2 を設計した (表 3)。逆転写反応専用プライマーを用いて cDNA を合成し、

semi-nested RT-PCR を行ったところ、NoV-GI/4 と NoV-GII/4 のいずれも 35 コピー/g の汚染レベルまで明瞭な増幅バンドが認められ、塩基配列は添加したウイルスと同一であることが確認された(図 8)。また、これらの結果は semi-nested real-time PCR の増幅曲線における判定とも一致した。

D. 考察

1. 抗体供給源としてのガンマグロブリン製剤

ヒトは成長する過程で、様々なウイルスの感染を受けてそれらに対する抗体を持つに至っている。NoV に対しても同様であることが抗体保有調査の結果から判明している。従って、本法における添加抗体として市販ヒト血清を用いれば量的制約を受けることなしに、多くの型の NoV や他の食中毒起因ウイルスにも対応できることが期待される。しかし一方で、保有抗体レベルの個人差をどのように平準化させるかという新たな問題が生ずる。そこで、1 万人単位でプールされた血漿から製造・販売されているガンマグロブリン製剤を利用することでこの問題を解決することができた。ガンマグロブリン製剤は多くの製薬メーカーで製造されているが、外国製の Gammagard (米 Baxter 社製) が、最も回収率が良好であることが判明している(平成 22 年度報告書参照)。図 2 と図 3 に示したとおり、Gammagard を用いることでポテトサラダと焼きそばのいずれからも 25%前後の回収率で検出できている。この数値はウサギ抗血清を用いた場合の 1/3 程度だが、PCR の反応サ

イクルとしては 2 サイクル以内(1 サイクルで数値が 2 倍)であることから、実質上の問題は少ないと考えられる。むしろ、量的制約がないことや、表 1 に示したとおり多種類のウイルスに同時対応できるなどメリットの方が大きい。日常的な試験には汎用性の高い Gammagard を用い、ウサギ抗血清は理論的な裏付けが強固であることから、精度管理に使うのが適切な運用と思われる。一方、患者の回復期血清を利用した場合も優れた回収率を示しており、将来ヒトに感染する未知のウイルスが出現した場合でも、確実にウイルスをトラップすることができる有効な手法であると考えられた。

2. 自家調製したパンソルビン相当品の検討

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講じておく必要があった。そこで、ブ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家調製するプロトコルについて検討した。ブ菌は株によって、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家調製したところ、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、表 2 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 検体当たり約 1,000 円が必要であるが、自家調製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。

3. 遺伝子解析可能な PCR プロセス

本法は食品乳剤にブ菌を投入して、菌体表面にウイルス粒子を吸着させて回収することを基本原理とするため、抽出された RNA にブ菌の遺伝子が大量に混入してくるという性質がある。ブ菌の遺伝子は、極微量のウイルス RNA を安定的に保持するキャリアーとして働くため、検出感度に対してはプラスの効果がある。その一方で、検出された遺伝子をさらに詳しく解析しようとする際に妨害物質になるという問題がある（図 7）。従って、ブ菌遺伝子のキャリアーとしての長所を活かしつつ、遺伝子解析の障害とならないような方法を考案する必要があった。

この問題を解決するために、表 3 に示す逆転写反応専用プライマーを設計した。これらを用いて cDNA を合成することで、図 8 に示したとおり、遺伝子解析可能な NoV の増幅断片が得られた。検出限界は、NoV-GI/4 と NoV-GII/4 のいずれも食品 1g 当たり 35 コピーであり、前年度の結果（図

6）が再現された。また、島根県浜田市の食中毒事例に適用されたことで、実用に耐えるものであることが証明された（平成 24 年度報告書参照）。

4. まとめと今後の課題

本研究事業で得られた知見を総括すると、図 1 に示したパントラ法によって抽出された RNA を、図 9 に示したプロセスで増幅・検出を試みるのが妥当と考えられる。本稿に記載した抗体供給源やプライマーは、将来の状況によって柔軟に変更し得る。特に PCR で用いるプライマーとは異なる逆転写反応専用プライマーを設定することが、検出後に遺伝子解析を実施するのに不可欠であり、ノロウイルス以外の食中毒起因ウイルスについても設計を進める必要がある。

一方で、本法が普及するにつれて、実験室内汚染による偽陽性の問題が浮上してくることが想定される。特に遺伝子解析は両刃の剣であることに留意する必要がある。すなわち、遺伝子解析を積極的に実施すれば、それだけ作業環境中の PCR 増幅産物汚染が蓄積されて、新規の食品検査において悪影響を及ぼすというジレンマである。これまでは、作業する実験室を分けて、器具や試薬を分別使用するなど、実験操作を慎重に行うということ以外に積極的な偽陽性対策は取られてこなかった。しかし、食品のウイルス検査が現実的なものとなった段階では、その社会的な影響に鑑みて、一層の偽陽性対策を講じる必要があるものと考えられる。

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。具体的には、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、事業者に周知する必要がある。

E. 結論

パントラ法における添加抗体の供給源としてガンマグロブリン製剤を用いることで、量的な制約がなく、多種類のウイルスに同時対応できる汎用プロトコルが完成した。また、パンソルビンのメーカーが1社しかないことからくるリスクに対応するために自家調製プロトコルを製作し、市販品と同等以上の回収率が得られることを確認した。さらに、逆転写反応専用プライマーを用いることで、検出された遺伝子の塩基配列を確認することが可能となった。この方法は島根県浜田市で発生した実際の食中毒事例で活用することができた。今後は、ノロウイルス以外の食中毒起因ウイルスへの対応と、実事例への適用例が増えるにつれて問題となることが予想される偽陽性の抑制が課題となる。

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、32(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、29(1)、32-37、2012

2. 学会発表

1) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛：食品検体のノロウイルス検査のためのパンソルビン・トラップ法の開発と拡大適用、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島

2) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛：食品検体のノロウイルス検査を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発、第31回日本食品微生物学会学術総会、2010年11月、大津

3) 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.

4) 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

5) 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

6) 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

7) 斎藤博之、須藤恒久、田中智之、野田衛：パンソルビン・トラップ法による食品中のウイルス遺伝子検出における血液製剤と感染者血清の利用、第53回日本臨床ウイルス学会、2012、大阪

8) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛：自家調製したパンソルビン相当品を用いた食品中の病原ウイルス検出法の検討、第33回日本食品微生物学会学術総会、2012、福岡

9) 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、第60回日本ウイルス学会学術集会、

2012、大阪

10) 飯塚節子、斎藤博之、田中智之、野田衛：パンソルビン・トラップ法による食品中からのノロウイルス遺伝子の検出—弁当屋を原因施設とした集団ノロウイルス食中毒事例から—、第60回日本ウイルス学会学術集会、2012、大阪

11) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛：黄色ブドウ球菌から自家調製したパンソルビン相当品による食品中の病原ウイルス検出法の検討、秋田応用生命科学研究会第21回講演会、2012、秋田

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

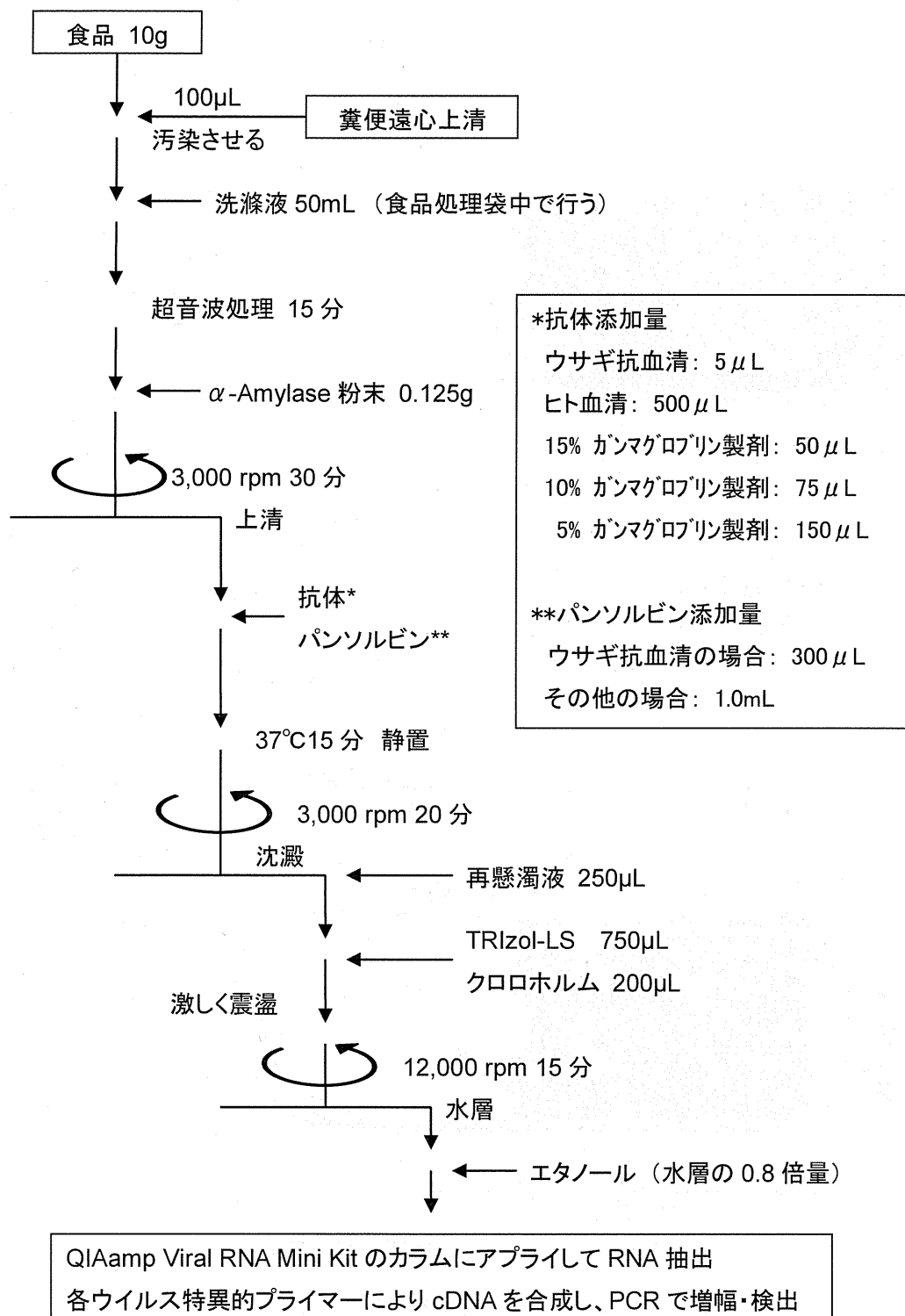


図 1 パンソルビン・トラップ法の操作手順 (Ver.4)

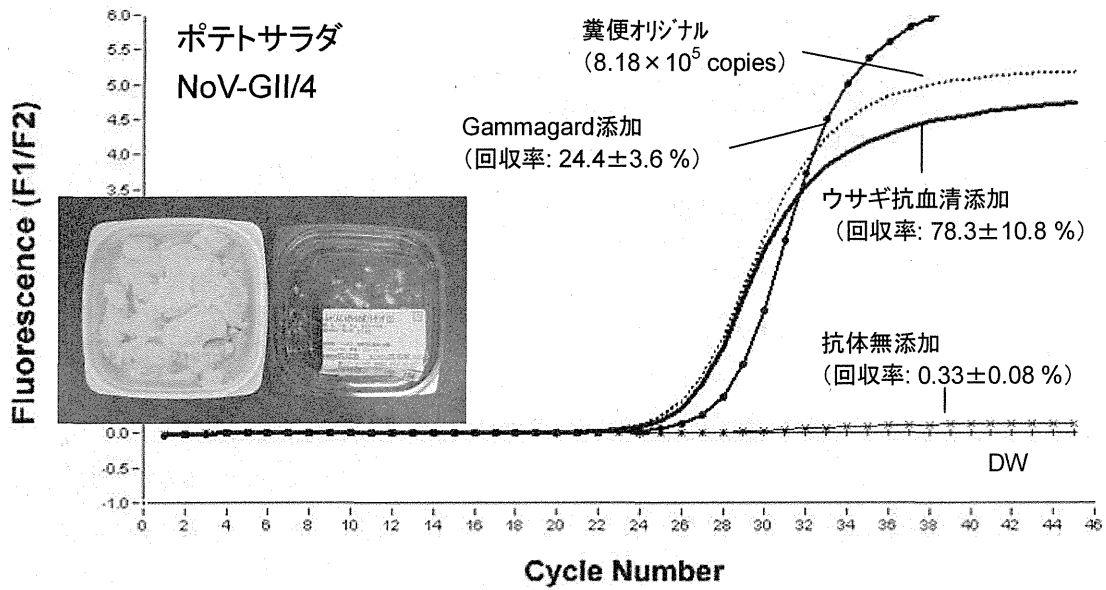


図2 パンソルビン・トラップ法によるポテトサラダからのNoV回収(増幅曲線)

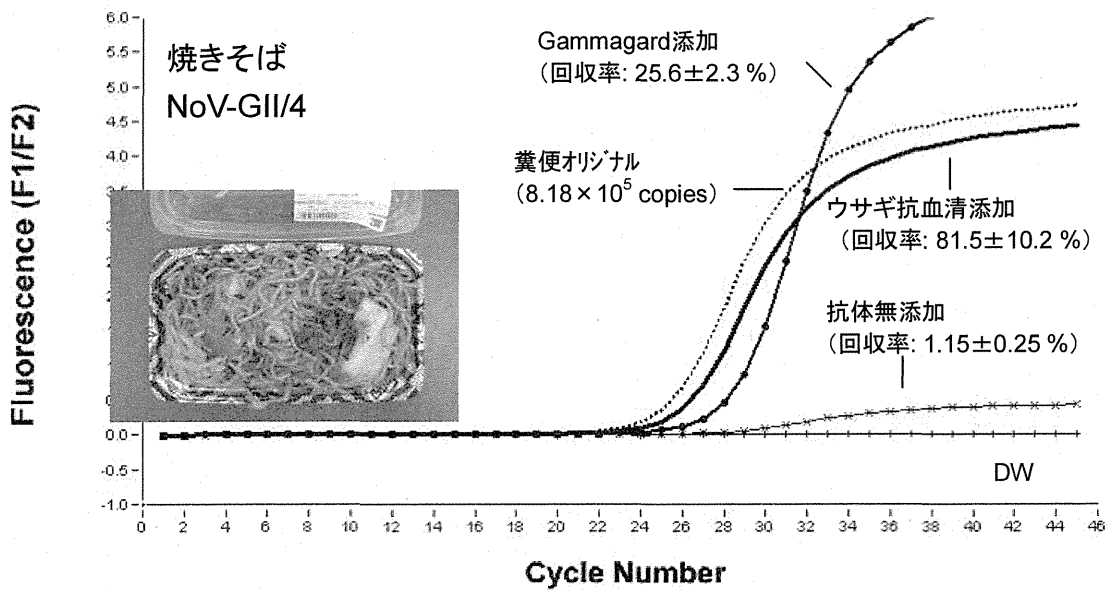


図3 パンソルビン・トラップ法による焼きそばからのNoV回収(増幅曲線)

表 1 ガンマグロブリン製剤「Gammagard」の食中毒起因ウイルスとの反応性

ウイルス	添加した抗体と回収率 (%)			
	Gammagard	ウサギ抗血清		
GI/3	12.6	50.4		
GI/4	26.2	65.6		
GI/8	2.7	13.0		
GI/9	7.0	N. T.		
GI/14	27.8	N. T.		
NoV	GII/2	45.1	93.4	
	GII/3	12.4	14.8	
	GII/4	45.7	77.3	
	GII/5	22.4	36.4	
	GII/6	11.9	18.4	
	GII/12	43.0	65.8	
	GII/13	55.5	N. T.	
	GII/18	9.4	N. T.	
	SaV	GI	8.0	N. T.
		GII	30.2	N. T.
GIV		16.9	N. T.	
GV		35.3	N. T.	
HAV	13.7	N. T.		
AdV41	38.4	N. T.		

50mL の食品洗滌液中に 10^5 コピーのウイルスを投入し、図 1 に示した手順で回収した。

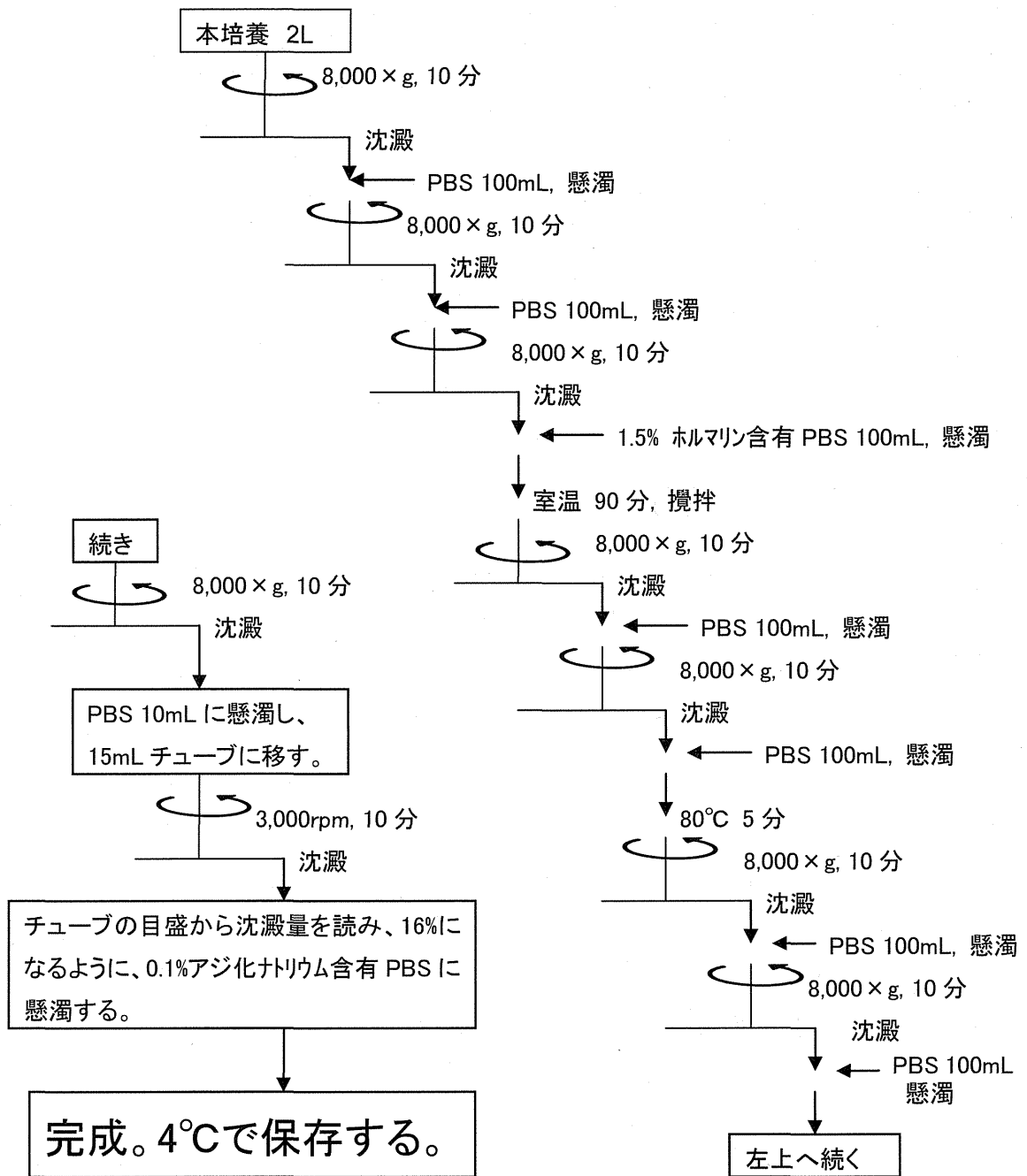
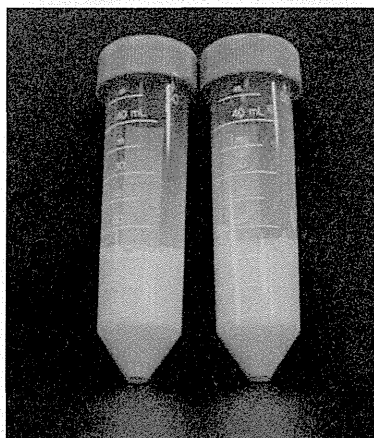


図4 パンソルビン相当品の自家調製手順



左：市販品
右：自家調製品



左：市販品（チューブ統一）
右：自家調製品

図5 パンソルビン市販品と自家調製品の外見比較

表2 パンソルビン市販品と自家調製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 (%)	自家調製品 (%)	相対比 (自家調製品 / 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	17	43	2.5
Gammagard	19	57	3.1

50mLの食品洗滌液中に 10^5 コピーの NoV-GII/4 を投入し、図1に示した手順で回収した。

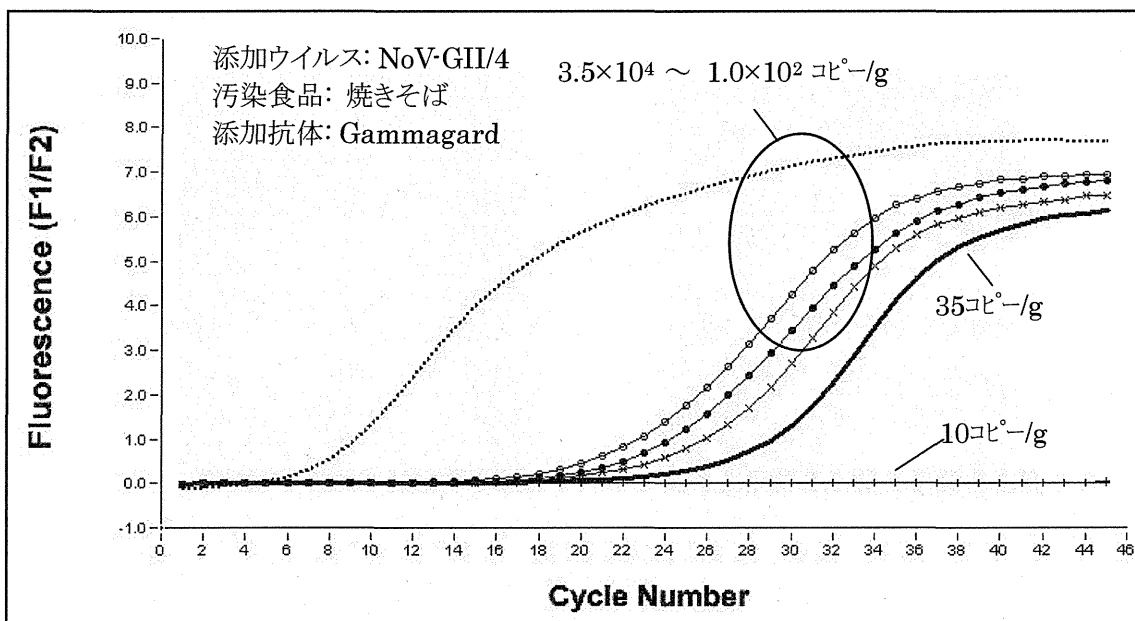


図 6 Nested real-time PCR の増幅曲線

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。

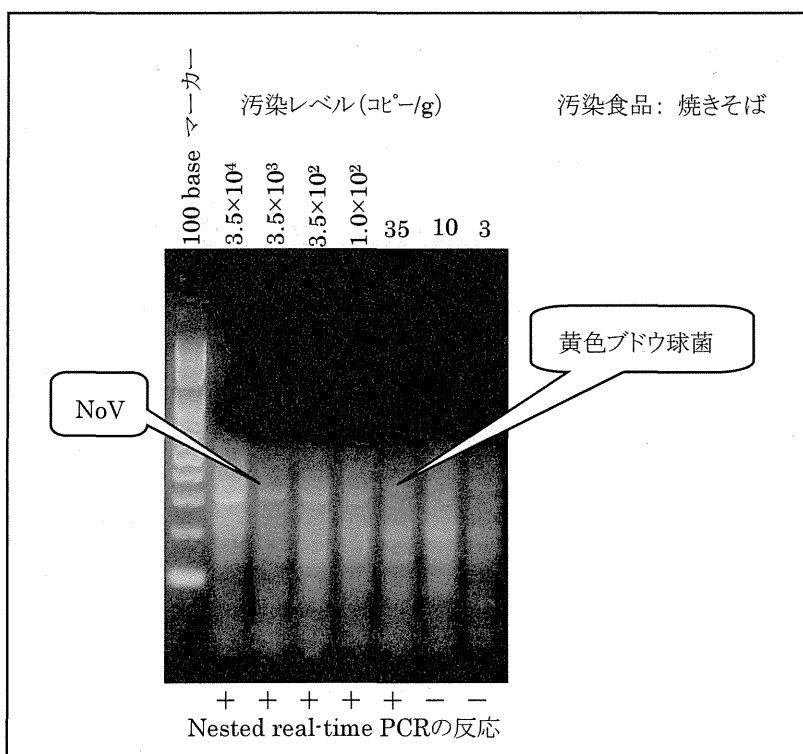


図 7 Semi-nested RT-PCR 増幅産物の電気泳動パターン

図 7 の 1st. PCR 産物を、プライマーG2SKF / G2SKR を用いた 2nd. PCR で再増幅した。PCR 反応系は「ノーマル PCR」を用いた。

表 3 逆転写反応専用プライマーの配列

名称	配列 (5'→3')	設定位置
PANR-G1a	GTBCKMAC <u>C</u> AT <u>C</u> AG <u>C</u> AATCA	5800←5818
PANR-G1b	GGKTCAAGSRYCCTAACATCWGCAATGA	5800←5827
PANR-G2a	TCYARWKKYCTWACATCTAYAATYAYRTGGGGGAACAT	5502←5539
PANR-G2b	ARDGTCCTAACATCWATAATYAYATGAGGGGAACAT	5502←5536
PANR-G2c	CTSACATCCACMAYYACRTGCGGRCACAT	5502←5530

PANR-G1a と PANR-G1b の設定位置は、Norwalk68 株の配列に相当する塩基番号で表記した。PANR-G2a、PANR-G2b、及び PANR-G2c の設定位置は、Camberwell 株の塩基番号で表記した。PANR-G1a の配列中のアンダーラインで示した塩基 (C) は LNA 修飾で合成した。

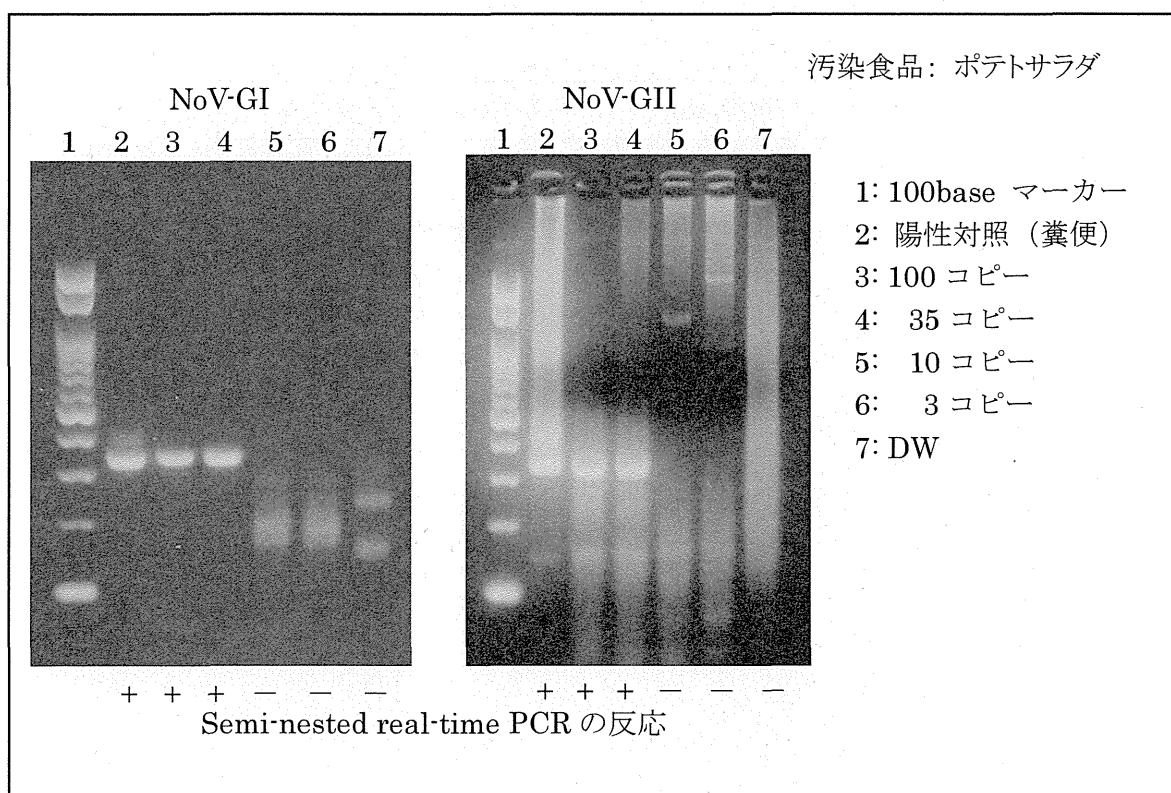


図 8 逆転写反応専用プライマーを用いた semi-nested RT-PCR
 PCR 反応系は「ホットスタート&タッチダウン PCR」を用いた。