

ものの、GI/4 が患者数と比較して下水から多く検出されるなど、異なる傾向を示すことも認められた。アストロウイルス、アイチウイルスなどは、臨床検体からの検出と比較して、下水検体からは高頻度に検出された。また下水から A 型肝炎ウイルスが検出され、二枚貝への汚染リスクが示唆された。

### (3) 食品媒介事例等の疫学的研究および胃腸炎ウイルスのサーベイランス

2013/14 シーズンにおけるノロウイルスの主な流行株は GII/4 2012 変異株、次いで GII/6 であった。GII/6 は PoI 領域が GII.P3 のキメラウイルスであり、小児施設での集団発生が多くみられた。

2014 年はサポウイルスの流行遺伝子型がそれまでと異なり、GII が検出された。

### 3. 食品のウイルス検査の精度管理体制の確立

12 機関を対象として共通試料を配布することにより外部精度管理を行った。陽性試料については検量線作成時の cDNA 溶液の種類間で低濃度試料の換算量の平均に有意差が認められた。また、配布 cDNA は機関 cDNA より濃度のばらつきが少ないことが確認された。

### F. 健康危害情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. N Iritani, A Kaida, N Abe, H Kubo, J Sekiguchi, SP Yamamoto, K Goto, T Tanaka, M Noda: Detection and genetic characterization of human

enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks during 2001-2012 in Osaka City, Japan, Journal of Medical Virology 86, 2019-2025 (2014)

2. 三好龍也 内野清子 岡山文香 芝田有理 吉田永祥 小林和夫 左近直美 土生川洋 田中智之 野田衛: 臨床検体および下水検体を用いた堺市内の A 型肝炎の流行解析, 病原微生物検出情報, 36, 6-7 (2015)
3. 三好龍也 内野清子: 下水中ノロウイルス検出情報と流行解析, 臨床とウイルス, 42:237-241, 2014
4. 山元誠司, 入谷展弘, 改田 厚, 久保英幸, 長谷 篤, 藤森良子, 森宏美, 伯井紀隆, 辻本光広, 半羽宏之: 大阪市におけるロタウイルス感染症集団事例発生状況と流行株の特徴 (2009~2013 年), 病原微生物検出情報 月報 35(No.409), 67-68 (2014)
5. 上間 匡, 野田 衛: 食事・食品管理の具体的手法-患者・スタッフ・委託業者への啓発, 感染対策 ICT ジャーナル, 34(320-327) (2014)
6. 入谷展弘 山元誠司 改田 厚 阿部仁一郎 久保英幸 西尾孝之 伯井紀隆 大平真由 安井典子 榊田晴美 細井舞子 松本珠実 坂本徳裕 廣川秀徹 半羽宏之 野田 衛: 2014 年 9~11 月に発生したノロウイルスによる胃腸炎集団事例について-大阪府, 病原微生物検出情報, 12/26 (2014)

7. 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 西尾孝之, 伯井紀隆, 大平真由, 安井典子, 榎田晴美, 細井舞子, 松本珠美, 坂本徳裕, 廣川秀徹, 半羽宏之, 野田衛: 2014年9~11月に発生したノロウイルスによる胃腸炎集団事例について—大阪市, 病原微生物検出情報月報 2014/12/26 掲載 (インターネット版)
  8. 中根邦彦, 小林慎一: 岡崎市におけるノロウイルス遺伝子型の6年間の特徴—2007年4月~2013年3月—, 感染症学雑誌 88(6): 875-877 (2014)
  9. 野田 衛: ノロウイルス食中毒対策—調理従事者からの食品汚染はなぜ起こるのか?—, 月刊「食と健康」平成26年4月号 (日本食品衛生協会), 8-20 (2014)
  10. 野田 衛: ノロウイルス対策—予防と汚染時の対処法—, 月刊「食と健康」平成26年10月号 (日本食品衛生協会), 8-19 (2014)
2. 学会発表
    1. Hiroyuki Saito, Tomoyuki Tanaka, Miho Toho, Mamoru Noda, Tomoichiro Oka and Kazuhiko Katayama : Noroviruses RNA detection in contaminated foods by a PANtrap method, The 2nd. AFSA Conference on Food Safety and Security, 2014, Bien Hoa City, Vietnam.
    2. 佐藤裕徳, 横山勝, 本村和嗣, 中村浩美, 田村務, 吉澄志磨, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和, 野田衛, 田中智之, Norovirus Surveillance Group of Japan: ヒト集団におけるノロウイルス流行株の多様性と進化, 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜市, 11/11 (2014)
    3. 斎藤 博之, 秋野 和華子, 田中 智之, 野田 衛: 食中毒事例における食品のサポウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際のRNA検出系の最適化, 第108回日本食品衛生学会, 金沢市, 12/5 (2014)
    4. 斎藤博之, 秋野和華子, 田中智之, 野田 衛: 食品検体のノロウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の捕捉抗体供給源に関する検討, 第35回日本食品微生物学会学術総会, 堺市, 9/19 (2014)
    5. 斎藤博之, 秋野和華子, 田中智之, 野田衛: パンソルビン・トラップ法における捕捉抗体としての工業用ガンマグロブリンの有用性の検証, 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜市, 11/10 (2014)
    6. 斎藤博之, 秋野和華子, 田中智之, 野田衛: 食品のノロウイルス汚染を検出するパンソルビン・トラップ法の開発, あきた産学官連携
    7. 三元 昌美, 上間 匡, 堀内 百恵, 野田 衛: 感染性推定遺伝子検査法を用いたノロウイルスの加熱不活化における生存性の推定, 第108回日本食品衛生学会, 金沢市, 12/5 (2014)
    8. 三元昌美, 上間 匡, 野田 衛: 市

- 販洗剤添加エタノールのネコカリシウイルスに対する不活化効果, 第 36 回日本食品微生物学会学術総会, 堺市, 9/18 (2014)
9. 三好龍也, 内野清子, 岡山文香, 芝田有理, 左近直美, 田中智之, 野田衛, 小林和夫: 堺市内における下水サンプルを用いた A 型肝炎ウイルスの流行解析, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜市, 11/10 (2014)
  10. 山元誠司, 改田 厚, 久保英幸, 入谷展弘: ユニークな G3 型 VP7 遺伝子を有するロタウイルス DS-1 様 G3P[8] 株の遺伝子解析, 第 62 回日本ウイルス学会, 横浜 (2014. 11. 10-12)
  11. 山元誠司, 入谷展弘, 改田 厚, 久保英幸, 西尾孝之: 大阪市におけるロタウイルス遺伝子構成の変遷: Wa から DS-1, 平成 26 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会総会, 神戸 (2014. 10. 3)
  12. 山本美和子, 伊藤文明, 野田衛: 広島市で検出された A 型肝炎ウイルスの分子疫学的解析, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜市, 11/10 (2014)
  13. 宗村佳子, 森功次, 永野美由紀, 木本佳那, 林志直, 甲斐明美: 東京都内の小児施設におけるノロウイルス検出状況(2013/14). 平成 26 年度地方衛生研究所全国協議会第 29 回関東甲信越静ウイルス研究部会
  14. 秋野和華子, 斎藤博之, 田中智之, 野田 衛: 食品検体からのパンソルビン・トラップ法によりノロウイルス RNA を抽出する際の  $\alpha$ -Amylase 処理に関する検討, 第 35 回日本食品微生物学会学術総会, 堺市, 9/18 (2014)
  15. 照山 晏菜, 三元 昌美, 上間 匡, 野田 衛: 感染性推定遺伝子検査法を用いたノロウイルスの加熱不活化における生存性の推定, 第 108 回日本食品衛生学会, 金沢市, 12/5 (2014)
  16. 上間 匡, 野田 衛, 春名美香, 佐々木貴正: カキおよびムラサキイガイから検出されたノロウイルス遺伝子の次世代シーケンサーによる比較解析, 第 36 回日本食品微生物学会学術総会, 堺市, 9/18 (2014)
  17. 上間匡, 三元昌美, 青沼えり, 栗原慶隆, 照山晏菜, 堀内百恵, 溝口嘉範, 高橋肇, 木村 凡, 野田 衛: ノロウイルスの代替ウイルスとしてのネコカリシウイルスの評価, 第 108 回日本食品衛生学会, 金沢市, 12/5 (2014)
  18. 上間匡, 野田衛, 春名美香, 佐々木貴正: 二枚貝から検出されたノロウイルス遺伝子産物の網羅的解析, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜市, 11/10 (2014)
  19. 森功次ほか: ウイルス性胃腸炎検査における SPIA (Single Primer Isothermal Amplification) 法導入に関する検討. 第 35 回日本食品微生物学会学術総会, 2014, 堺市
  20. 中根邦彦, 小林慎一: 岡崎市におけるノロウイルス遺伝子型の 6 年間の特徴—2007 年 4 月~2013 年 3 月—, 感染症学雑誌 88(6): 875-877

(2014)

21. 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 久保英幸, 野田 衛: 2013/14 シーズンに大阪市において集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルス GII.6 株の分子疫学的解析, 第 62 回日本ウイルス学会, 横浜 (2014. 11. 10-12)
22. 入谷展弘, 山元誠司, 改田厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 野田衛: 2013 14 シーズンに大阪市において集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルス GII.6 株の分子疫学的解析, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜市, 11/10 (2014)
23. 野田 衛, 上間 匡, 三元昌美, 山下育孝, 青木里美, 小林慎一, 斎藤博之: パンソルビンを用いた抗体被覆/非被覆ウイルス粒子鑑別法の開発と応用, 第 36 回日本食品微生物学会学術総会, 堺市, 9/18 (2014)

#### H. 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検出法に関する研究

平成 26 年度 研究分担報告書

斎藤 博之  
滝澤 剛則  
渡辺 卓穂  
上間 匡  
野田 衛

平成 27 (2015) 年 3 月

平成 26 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検出法に関する研究」

研究分担報告書

## パンソルビン・トラップ法の普及段階における問題点の検討

研究分担者	斎藤博之	秋田県健康環境センター・保健衛生部
研究協力者	秋野和華子	秋田県健康環境センター・保健衛生部

### 研究要旨

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。その吸着のための「糊」の役割を果たす捕捉抗体として、これまでは医療用のガンマグロブリン製剤を用いてきた。しかし、医薬品であることから薬事法に伴う制約があり、普及段階においては一般の試薬として購入・使用できる捕捉抗体供給源が望まれた。本研究では、医薬品ではない工業用ガンマグロブリンの導入を検討することで根本的な問題解決を図った。NoV-GI.4、NoV-GI.6、NoV-GII.2、NoV-GII.4、及び NoV-GII.6 の各型を用いて、工業用と医療用のガンマグロブリンを用いた際の回収率の比較を行ったところ、全てにおいて両者は同等であった。

次に、普及に際して障害となる偽陽性の問題に対して対策を検討した。近年の遺伝子解析技術の高度化に伴い、実験室内で PCR 増幅産物が混入して判定結果に影響を及ぼすリスクが高まったことから、一層の対策強化が求められた。問題解決の方策として、dUTP と UNG (Uracil-N-Glycosylase) の組み合わせによる DNA 汚染の無効化と、2nd. PCR に real-time PCR を用いて、Ct 値をもって判別する方法が有効であることを示すことができた。

### 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、輸入食品等が原因と考えられる A 型肝炎ウイルス(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」(H22-食品-一般-013)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な方法として発展させることができた。これらの実績を踏まえて、平成25年10月22日付け「食安監発1022第1号」にて食品中のウイルス検査法として通知されるに至った。一方、本法の普及段階において、次のような問題点が浮上してきた。

①市販のガンマグロブリン製剤は医薬品であり、薬事法に規定される使用者義務が課せられるため、購入・使用が困難な場合がある。そのため、医薬品ではない試薬用のガンマグロブリンを検討する必要がある。

②遺伝子解析技術の高度化に伴い、現行のPCRプライマーによる増幅領域を全て含む遺伝子断片を扱う機会が増えることから、食品検査における偽陽性対策(コンタミ対策)を強化する必要がある。

③NoV以外の食中毒起因ウイルスに対しても検出系を最適化する必要がある。

④食品のウイルス検査に関して未経験の機関が導入することも考慮して、常に回収率を確認できるように内部標準物質を組み入れた方法を検討する必要がある。

⑤本法はあくまでも実験室内における検査法であり、食中毒対策全体の中での位置付けと運用面での検討を進める必要がある。

今年度は、①と②について解決策を検討し、③以降は次年度に引き継ぐこととした。

## B. 研究方法

### 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-GI.4 (AB685383)、NoV-GI.6 (AB448733)、NoV-GII.2 (AB685706)、NoV-GII.4 (AB293424)、NoV-GII.6 (AB685708)を含む糞便を用いた。

偽陽性対策の検討を行うための遺伝子断片としては、市販のブロッコリーから抽出したゲノムDNA (GQ891876)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) 医療用ガンマグロブリン製剤

米国 Baxter 社の5%静注用ガンマグロブリン製剤「Gammagard」を用いた。Alfresa Pharma 社から購入した。

#### 3) 工業用ガンマグロブリン

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。

#### 4) 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。

#### 5) フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (Life Technologies)を使用した。

#### 6) カラム方式の RNA 抽出キット

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

- 7) 再懸濁液  
6)の抽出キット添付の AVL 液を用いた。
- 8) DNase I (RT Grade) 及び RNase inhibitor  
ニッポンジーンの製品を使用した。
- 9) アミラーゼ  
枯草菌由来  $\alpha$ -Amylase 粉末(和光純薬)を液化調製して使用した。液化調製法は平成 25 年度報告書参照。
- 10) 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。
- 11) 逆転写酵素  
ReverTra Ace(東洋紡)を使用した。
- 12) conventional PCR 用酵素  
AptaTaq Fast PCR Master (ロシュ)、及び TaKaRa Ex-Taq Hot Start Version (タカラバイオ)を用いた。
- 13) 抗 Taq モノクローナル抗体  
12)の AptaTaq Fast PCR Master をホットスタート対応とするために、anti-Taq high (東洋紡)を使用した。
- 14) 植物異物同定用プライマーセット  
ブロッコリーの遺伝子断片を得るために、ファスマック社より購入した。
- 15) Uracil-N-Glycosylase (UNG)  
Antarctic Thermolabile UDG (New England BioLabs)を用いた。
- 16) 逆転写反応に用いたプライマー  
ガンマグロブリンの検討には COG1R、及び COG2R を用いた。カキ中腸腺からのウイルス検出にはランダムプライマー(9mer)を用いた。
- 17) conventional PCR に用いたプライマー  
NoV-GI に対しては COG1F / G1SKR、NoV-GII に対しては COG2F / G2SKR の

プライマーセットをそれぞれ用いた。ブロッコリー遺伝子に対しては、図 5 と表 4 に示したプライマーセットを用いた。

- 18) conventional PCR 装置  
アステック社製「PC-320」を用いた。
- 19) real-time PCR 装置  
ロシュ社製「LightCycler 320S」と「LightCycler 480」を用いた。
- 20) real-time PCR 用酵素  
ロシュ社製「LightCycler FastStart DNA Master PLUS Hybridization Probes」と「LightCycler 480 Probes Master」を用いた。
- 21) real-time PCR 反応系  
Kageyama らの方法 (J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003) に従った。

### 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。本研究では、工業用ガンマグロブリンの評価をするに当り、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 COG1R と COG2R を用いた。これは、次に続く real-time PCR 反応の直前に位置するため、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。

### 4. ガンマグロブリンの評価試験

工業用ガンマグロブリンを評価するに当たり、次の 3 段階からなる検討を行った。

- (1)パントラ法に用いる際の添加量の最適化
- (2)工業用と医療用ガンマグロブリンを用いた際の回収率の比較



### (3)食品を用いた添加回収試験

#### 5. 偽陽性対策に関する検討

日常の検査業務への影響を回避するため、ブロッコリーの遺伝子を用いた(業務では植物遺伝子を扱わない)。図 5 に示すとおり、NoV の検出系と同様の配置で、real-time PCR と nested PCR が行えるようにプライマー・プローブセットを設計した(表 4)。検討手順は図 6 に示したとおりである。最初に抽出したブロッコリーゲノム DNA を鋳型として、「植物異物同定用プライマーセット」を用いて 415bp の増幅産物を得た。この反応における酵素と基質として、Ex-Taq と通常の dNTP の組み合わせと、dUTP を含む AptaTaq Fast PCR Master を使用した。後者の反応系で得られた DNA 断片は T の塩基が U に置換されている。これらの断片を Broc-F2 / Broc-R2 / Broc-P を用いた real-time PCR で定量し、蒸留水で段階希釈することで、 $10^4 \sim 10^1$  コピー/ $5 \mu\text{L}$  のブロッコリー遺伝子由来増幅産物を含む被検体を調製した。ここでの定量コントロールは real-time PCR 増幅領域の部分で化学合成したものを用いた。この被検体を、食品検査においてキャリーオーバーによって混入した PCR 産物と仮定し、無効化、あるいは鑑別する方法を検討した。

1st. PCR プライマーセットである Broc-F1 / Broc-R1 と、被検体  $5 \mu\text{L}$  を含む AptaTaq Fast PCR Master (anti-Taq high によりホットスタート化したもの)の反応系  $20 \mu\text{L}$  を調製し次の条件でタッチダウン PCR を行った。この際、反応液に UNG を加えたものと加えないものの 2 系統を調製した。

#### 【タッチダウン PCR】

95°C 2 分 1 サイクル

95°C 30 秒 - (60→55°C) 30 秒 - 72°C 30 秒  
5 サイクル: 下線部がタッチダウン設定

95°C 30 秒 - 55°C 30 秒 - 72°C 30 秒 40 サイクル

72°C 7 分 1 サイクル

1st. PCR 終了後、反応液の一部を電気泳動で解析すると同時に、蒸留水で 10 倍希釈したものを、Broc-Fn / Broc-Rn を用いた 2nd. PCR で再増幅した。2nd. PCR の反応液には UNG を加えなかった(1st. PCR 産物が分解されるため)。同様に 1st. PCR 産物に対して real-time PCR による再増幅も行った。

#### C. 研究結果

1. 工業用ガンマグロブリンの有用性の検証  
食品洗滌液 50mL に NoV-GII.4 を投入し、ガンマグロブリンの添加量を変えて回収率を比較した結果を表 1 に示した。回収率は、5%ガンマグロブリンを  $150 \mu\text{L}$  添加する条件で最適化された。ここで最適化された添加量の工業用ガンマグロブリンを用いて、種々の遺伝子型の NoV への反応性を確認した(図 2A~2E、表 2)。その結果、本研究で用いた 5 種類の遺伝子型については、工業用ガンマグロブリンは医療用と比べて同等以上の反応性を有していることが明らかとなった。同様の結果は、実際の食品検体を用いた添加回収試験においても得られており(図 3A~3B、表 3)、工業用ガンマグロブリンの有用性が証明された。以上の結果を踏まえて、工業用ガンマグロブリンを試薬として包装されたものが一般に購入できるようになった(図 4)。

## 2. 偽陽性対策に関する検討

Tの塩基がUに置換されたPCR産物は、UNGで処理することで特異的に分解され、以後の結果判定に影響しなくなることが示された(図7)。また、2nd.PCRでreal-time PCRを用いた場合においても、UNG処理によってUを含んだ増幅産物が検出されなくなった(図8)。さらに、UNG処理を行わない場合には当然の帰結として増幅カーブが認められたが、10サイクル未満の非常に早い段階でカーブが立ち上がることがわかった(図8)。

## D. 考察

### 1. 試薬としてのガンマグロブリンの必要性

パントラ法の基本原理は、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・検出することである。開発段階においてはウイルス捕捉抗体の供給源として医療用ガンマグロブリン製剤を用いてきた。医薬品を試薬として用いること(オフラベルユース)については、組織培養における抗生物質のように従前より各方面で頻繁に行われており、何ら問題はない。ただし、地方衛生研究所等で少量を使用する段階を超えて、民間機関も含めてより大規模に普及した場合を想定すると、次の4点について対策を講じておく必要があった。

①医療用ガンマグロブリン製剤は、薬事法に定められている「特定生物由来製品」に該当するため、製造番号などの使用記録を20年間保管する義務が生じる。

②計画生産品であることから流通量に上限があり、医療目的が優先されるために試験検査目的の場合は安定供給されない可能

性がある。

③医薬品であることから、医師のいない環境系試験検査機関では購入が困難な場合がある。

④将来、試薬メーカーがパントラ法のキット化を企画しても、医薬品を組み入れることは難しい。

本研究では、これらの課題を根本的に解決し、食品のウイルス検査の円滑な普及に繋げるために、医薬品ではない、工業用ガンマグロブリンを用いることを検討した。表1に示したとおり、パントラ法における工業用ガンマグロブリンの添加量は150 $\mu$ Lで最適化された。医療用ガンマグロブリン製剤の添加量も150 $\mu$ Lであることから、プロトコルを改変することなしに、ガンマグロブリンの部分を置き換えるだけで済むことになる。次に食品洗滌液からのウイルスの回収率を、工業用と医療用のガンマグロブリンをそれぞれ用いた場合について比較した(図2A~2E、表2)。ここでは、食品を用いていないため、純粋に抗原抗体反応の比較となる。その結果、工業用ガンマグロブリンは医療用と比べて同等以上の効果を有することが明らかとなった。さらに、実際の食品を用いて回収率を比較した場合でも、工業用ガンマグロブリンの有用性は証明された(図3A~3B、表3)。これまで我が国では、ガンマグロブリンは医療用のものしか販売されていなかったが、本研究の実績を踏まえて、工業用のものを改めて試薬として包装したものが一般に購入できるようになった(図4)。このガンマグロブリンは、あくまでも試薬であって医薬品ではないことから、薬事法の適用を受けず、パントラ法の円滑な普及に寄与するものであると考えられる。

## 2. 偽陽性防止対策強化の必要性

パントラ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。近年の遺伝子解析技術の高度化に伴って NoV の PCR プライマーの配置部位を全て包含するような DNA 断片を扱う機会が増えるが、それ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。この問題対策の布石として平成 25 年度の研究により、最終的に得られる DNA 断片にウラシルが含まれるような反応系を構築することができた。今年度はさらに一歩進めて UNG (Uracil-N-Glycosylase) 処理による偽陽性防止策について評価を行った。

偽陽性の原因として考えられるコンタミ物質としては、

- ①糞便
- ②RNA
- ③cDNA
- ④ポジコン
- ⑤以前に実施した PCR 産物

の 5 つが考えられる。①～③は増幅前の段階であり、④も最大で  $10^6$  コピー/ $\mu$ L 程度の量であることから、これまでどおり封じ込めを

主体としたコンタミ対策で十分である。しかし、PCR 産物を遺伝子解析するために電気泳動ゲルから切り出し精製する操作では  $10^{12}$  ~  $10^{15}$  コピー/ $\mu$ L に相当する高濃度の DNA 断片を扱うことから、封じ込めだけでは限界がある。次に、コンタミ物質が混入する機会としては、

- ①RNA の抽出段階
- ②cDNA の合成段階
- ③1st.PCR の反応液調製段階
- ④2nd.PCR の反応液調製段階

が考えられる。本研究では、最初に最もリスクの高いケースとして、①～③の段階で以前に実施した PCR 産物が微量混入した場合を想定して対策を検討した(大量に混入した場合は陰性対照も陽性となることから判別可能)。図 7 に示されたとおり、塩基として T の代わりに U を含む DNA 断片は、UNG 処理を行うことで特異的に分解され、以後の判定には影響しないことが確認できた。UNG は 1st.PCR の反応液に添加するだけであるから特段の操作は必要とされない。塩基として T が含まれる通常の DNA 断片は UNG の影響を受けないため、真に陽性の場合だけ増幅反応が認められることになる。

次に 2nd. PCR の反応液調製段階で、コンタミ物質が混入した場合について対策を検討した。1st. PCR の増幅産物はすでに T が U に置換されているため、前述の UNG 処理は行うことができない(真に陽性であっても分解除去される)。しかし、2nd. PCR を real-time PCR で行うようにすれば、図 8 に示されたとおり、陽性ならば非常に早いサイクルで増幅カーブが立ち上がることから判別が可能である。図 8 では、1st. PCR で UNG 処理を行わなかった場合の増幅カーブが示

されているが、塩基が T である通常の DNA 断片も同様のパターンとなる。1st. PCR 産物を real-time PCR で再増幅する手法は、ハイブリによる確認試験に相当することから多くの局面で用いられており、図 9 と図 10 にはカキ中腸腺からの NoV 検出の場合を例示した。検出と不検出は明確に区別され、陽性の場合には非常に早いサイクルでカーブが立ち上がることが見て取れる。パントラ法においては、図 11 に示したとおり汚染度として 35 コピー/g と 10 コピー/g の間で検出・不検出が分かれるが、前者は 20 サイクル程度で立ち上がっており、後者は完全にフラットである。

以上の知見を総括し、偽陽性防止対策を構築すると図 12 のようになる。まず、日常の PCR は遺伝子解析も含めて全て dUTP を含んだ基質を用いるようにする必要がある。塩基の T を U に置き換えるには酵素の選択や、Mg 濃度の再調整が必須であるが、AptaTaq Fast PCR Master (ロシュ) を使用することで最初から U を含む PCR が可能である(平成 25 年度報告書参照)。一方、食品検体からパントラ法で抽出されたウイルス RNA を逆転写する際には通常の dNTP を用いるので、その塩基は T である。1st. PCR の反応液に UNG を添加しておく、仮に以前に行った PCR の産物が混入しても、その塩基には U が含まれていることから分解除去され、本来のウイルス由来の cDNA だけが鋳型となって反応することになる。2nd. PCR では UNG 処理が行えないが、real-time PCR の Ct 値に着目し、20 サイクル以上で増幅カーブが立ち上がるようならば、コンタミの可能性を考慮して再試験をするなど慎重に対応することで偽陽性は防止

できるものと考えられる。ただし、Ct 値による判別をどのように運用するかについては、機器や試薬によって差異を生じるため、各試験機関であらかじめ増幅パターンを把握しておく必要がある。なお、本研究で検討した偽陽性防止対策は、これまでの封じ込めを主体とした対策と合わせて実施することで効果が得られるものであることに留意しなければならない。

### 3. 今後の課題

NoV 以外の食中毒起因ウイルスについてもパントラ法が適用できることがすでに明らかとなっているが、本研究で導入した工業用ガンマグロブリンの反応性の確認や、PCR 反応系の最適化を進める必要がある。また、平成 15 年度の通知では、内部標準物質としてエコーウイルス 9 型(Hill 株)が用いられていたが、パントラ法における使用について検討する必要がある。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。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ふ。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。

### E. 結論

パントラ法の普及が拡大するにつれて浮上してきた諸問題について解決策を提示した。医療用ガンマグロブリン製剤の使用に関

しては薬事法を考慮に入れる必要があったが、本研究において最初から試薬用途のガンマグロブリンを調達することができたため、根本的な解決に至った。また、高度な遺伝子解析を実施する機会が増えていることから、偽陽性対策の強化が必要となった。本研究では、dUTPとUNGの組合せによるコンタミ物質の無効化と、Ct値による判別をもとにして対応できることを示した。

最後に補遺として、平成25年度に検討した $\alpha$ -Amylaseの液化調製法に関して、調製後1年間保存された酵素液が問題なく使用できたことを付け加えておく(図13)。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) Hiroyuki Saito, Tomoyuki Tanaka, Miho Toho, Mamoru Noda, Tomoichiro Oka and Kazuhiko Katayama : Noroviruses RNA detection in contaminated foods by a PANtrap method, The 2nd. AFSA Conference on Food Safety and Security, 2014, Bien Hoa City, Vietnam.

2) 斎藤博之、秋野和華子、田中智之、野田衛：食品検体のノロウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の捕捉抗体供給源に関する検討、第35回日本食品微生物学会学術総会、2014、堺

3) 秋野和華子、斎藤博之、田中智之、

野田衛：食品検体からパンソルビン・トラップ法によりノロウイルスRNAを抽出する際の $\alpha$ -Amylase処理に関する検討、第35回日本食品微生物学会学術総会、2014、大阪

4) 斎藤博之、秋野和華子、田中智之、野田衛：パンソルビン・トラップ法における捕捉抗体の供給源に関する検討、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014、横浜

5) 斎藤博之、秋野和華子、田中智之、野田衛：食中毒事例における食品のノロウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際のRNA検出系の最適化、第108回日本食品衛生学会学術講演会、2014、金沢

6) 斎藤博之、秋野和華子、田中智之、野田衛：食品のノロウイルス汚染を検出するパンソルビン・トラップ法の開発、あきた産学官連携フォーラム2014、2014、秋田

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

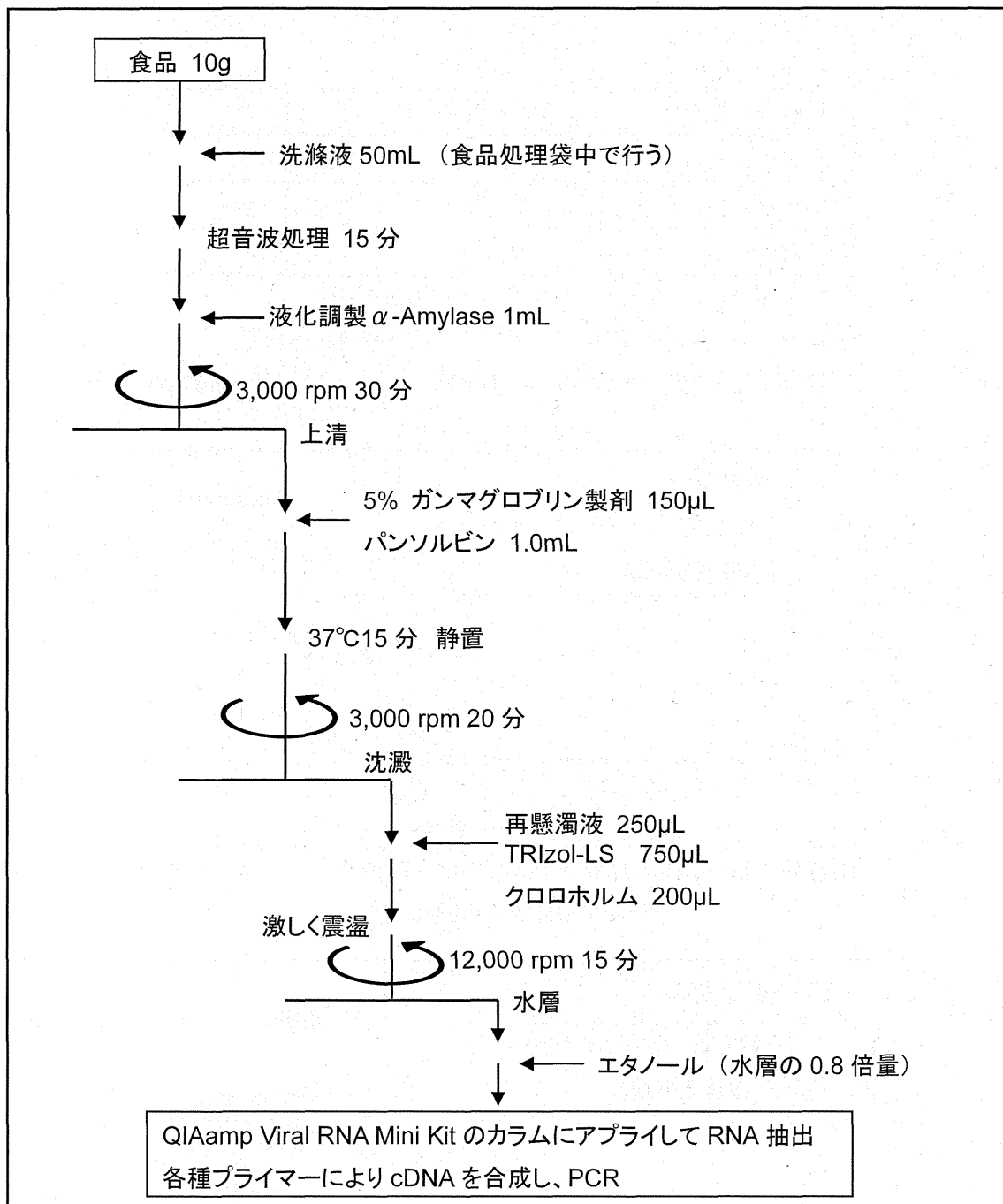


図1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

表 1 反応系におけるガンマグロブリン添加量の検討

添加抗体	回収量(機器表示値)	回収率(%)
Gammagard 150 $\mu$ L	$4.750 \times 10^3$	46.8
5%HDM 75 $\mu$ L	$4.819 \times 10^3$	47.4
5%HDM 150 $\mu$ L	$5.282 \times 10^3$	52.0
5%HDM 300 $\mu$ L	$3.537 \times 10^3$	34.8
抗体無し	$1.909 \times 10^2$	1.9

NoV GI.4 投入量:  $1.016 \times 10^4$  コピー (機器表示値)

Gammagard: 医療用ガンマグロブリン製剤 (Baxter 社)

HDM: 工業用ガンマグロブリン (HDM Labs 社, Advy Japan を通じて供給)

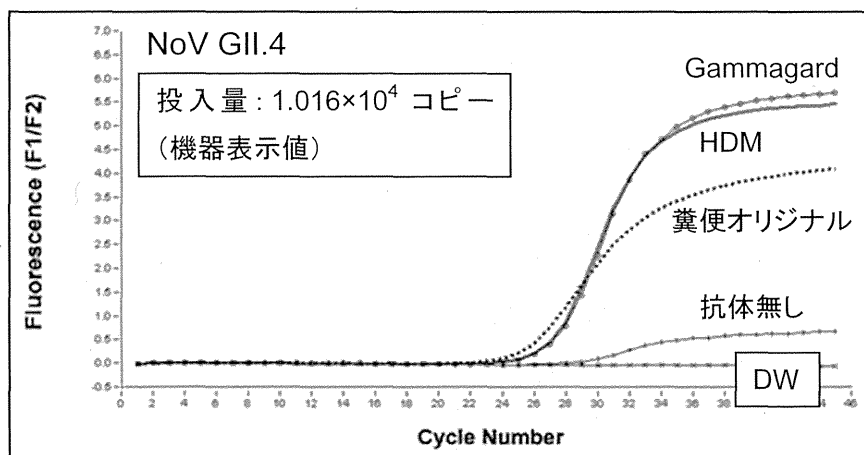


図 2A 回収率における工業用ガンマグロブリンと医療用ガンマグロブリンの比較  
(NoV GI.4 の増幅曲線)

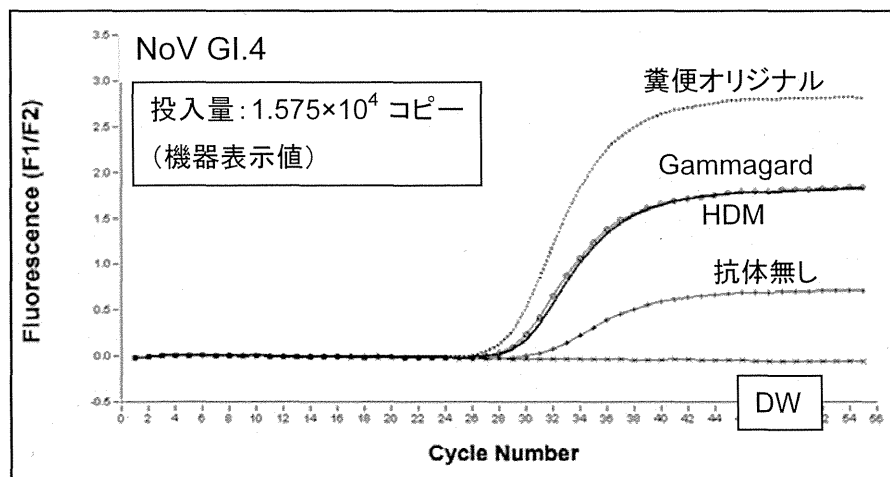


図 2B 回収率における工業用ガンマグロブリンと医療用ガンマグロブリンの比較  
(NoV GI.4 の増幅曲線)

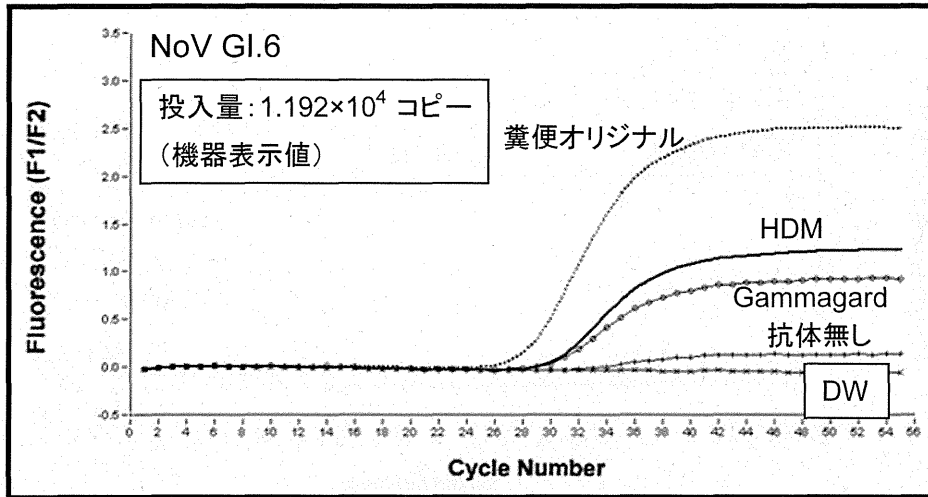


図 2C 回収率における工業用ガンマグロブリンと医療用ガンマグロブリンの比較  
(NoV GI.6 の増幅曲線)

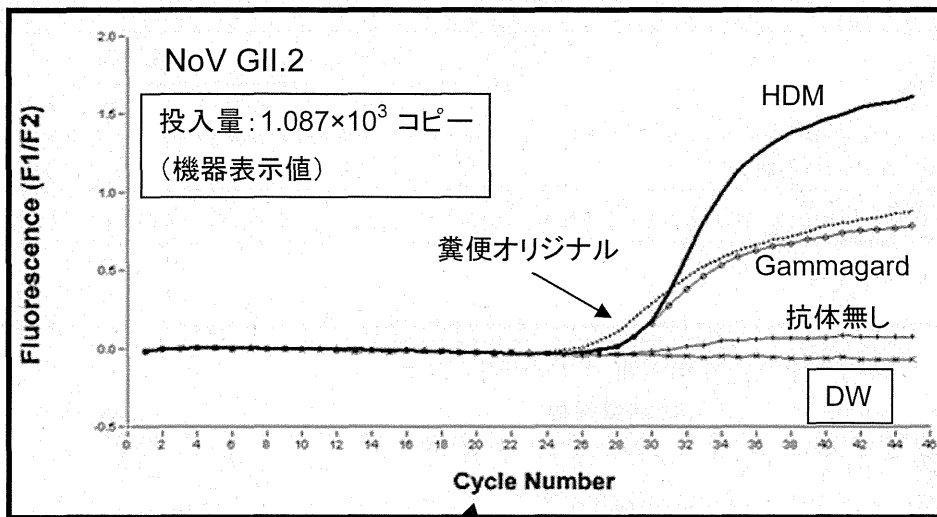


図 2D 回収率における工業用ガンマグロブリンと医療用ガンマグロブリンの比較  
(NoV GII.2 の増幅曲線)



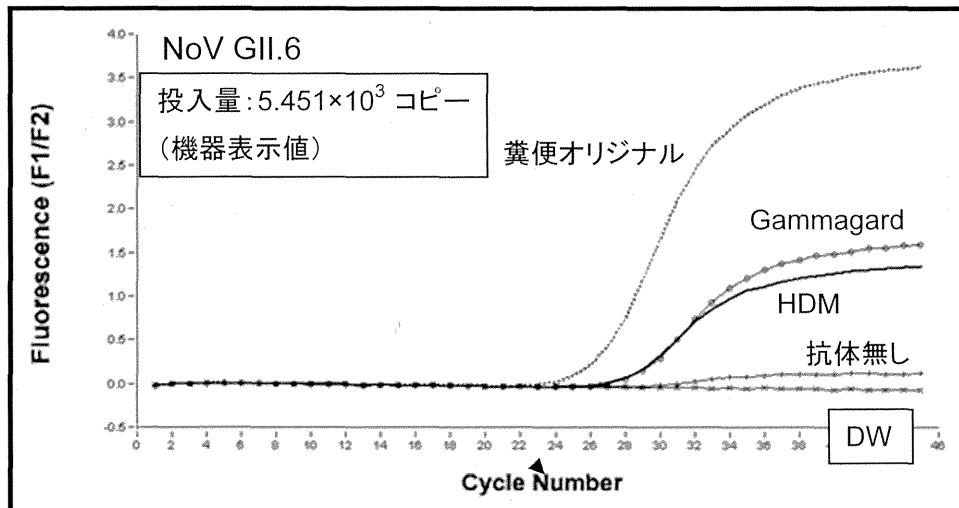


図 2E 回収率における工業用ガンマグロブリンと医療用ガンマグロブリンの比較  
(NoV GII.6 の増幅曲線)

表 2 回収率における工業用ガンマグロブリンと医療用ガンマグロブリンの比較 (総括)

添加抗体	NoV の遺伝子型と回収率 (%)				
	GI.4	GI.6	GII.2	GII.4	GII.6
Gammagard 150 $\mu$ L	37.6	6.1	38.2	46.8	13.3
5% HDM Gamma Globulin 150 $\mu$ L	35.7	12.1	38.6	52.0	15.5

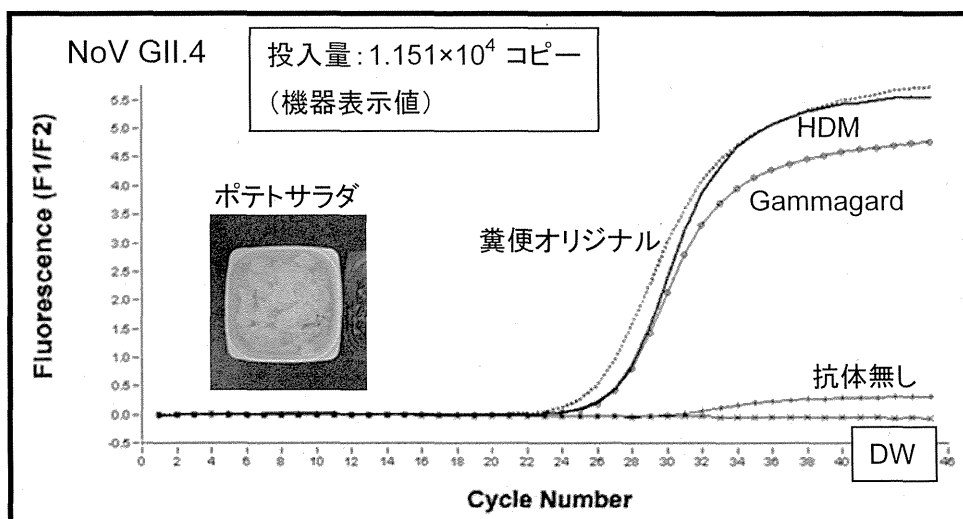


図 3A ポテトサラダにおける添加回収試験  
(NoV GII.4 の増幅曲線)

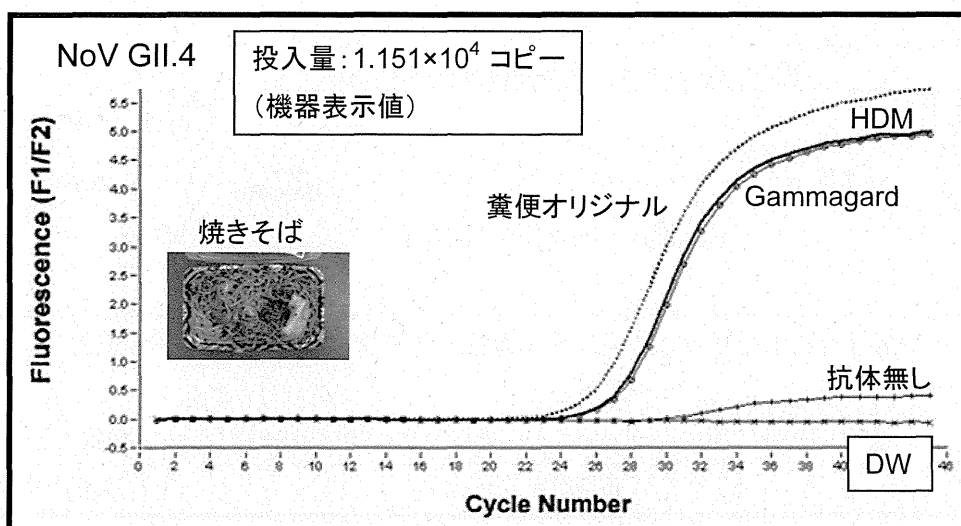


図 3B 焼きそばにおける添加回収試験  
(NoV GII.4 の増幅曲線)

表 3 添加回収試験における工業用ガンマグロブリンと医療用ガンマグロブリンの比較

添加抗体	食品の種類と回収率(%)	
	ポテトサラダ	焼きそば
Gammagard 150 $\mu$ L	34.7	32.4
5% HDM Gamma Globulin 150 $\mu$ L	40.6	33.5

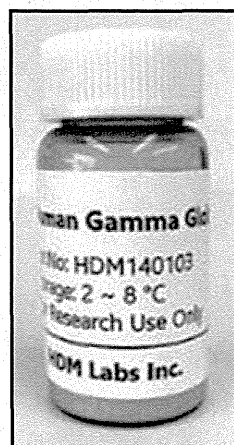
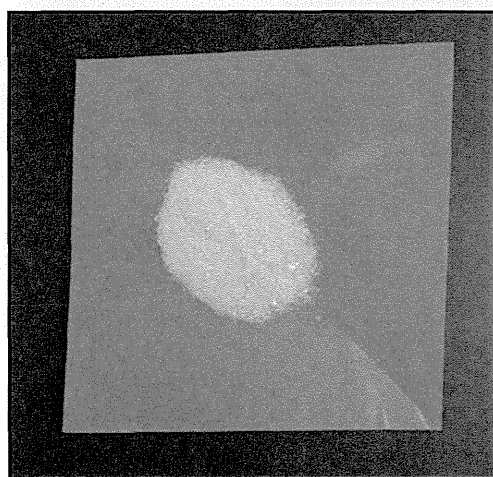


図 4 試薬用に包装されたガンマグロブリン(左: 工業用粉末、右: 試薬バイアル)

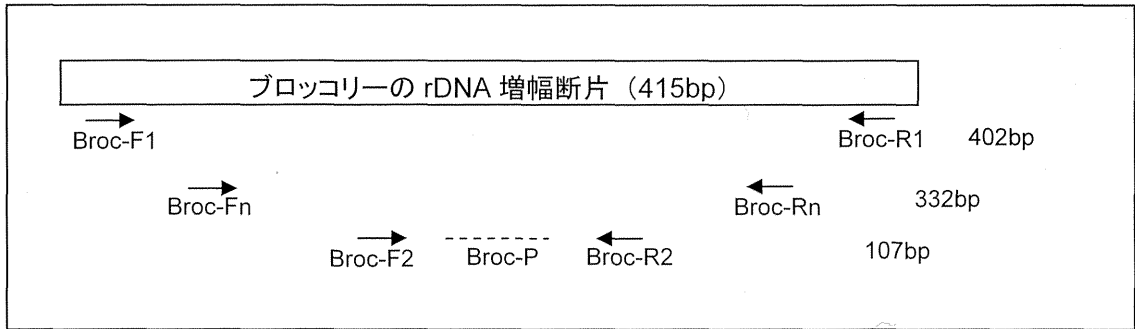


図 5 検討に用いたブロッコリー遺伝子とプライマー・プローブの配置

表 4 検討に用いたブロッコリー遺伝子のプライマー・プローブ配列

名称	配列(5' → 3')	増幅サイズ(bp)
Broc-F1	TCGCGAGAAGTCCATTGAAC	402
Broc-R1	TTTCGCTACGTTCTTCATCGA	
Broc-Fn	AGAGGAAGGAGAAGTCGTAAC	332
Broc-Rn	GTTGCCGAGAGTCGTTTTAGA	
Broc-F2	GCTGATTTTCGTGCCTACCGATTCC	107
Broc-R2	CTTTTCGTGCCGGGTTTGGTGATA	
Broc-P	FAM- ACCGGCCCAGTTTCGGTTGGATC -TAMRA	

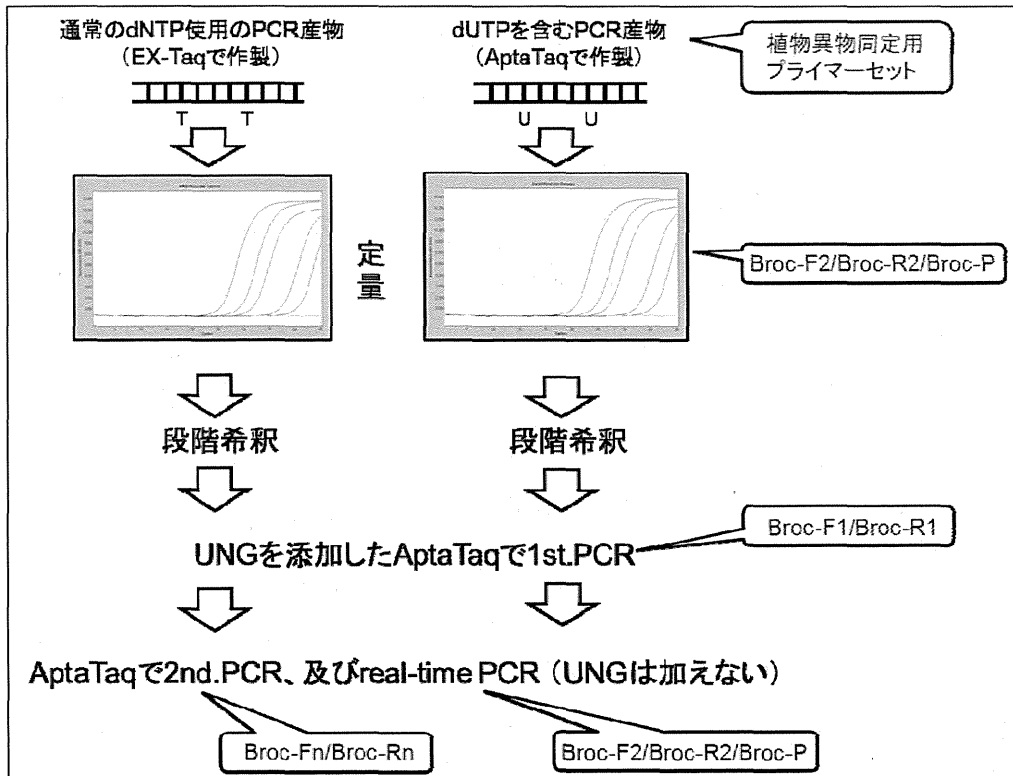


図 6 ブロッコリー遺伝子を用いた UNG 処理の評価試験方法

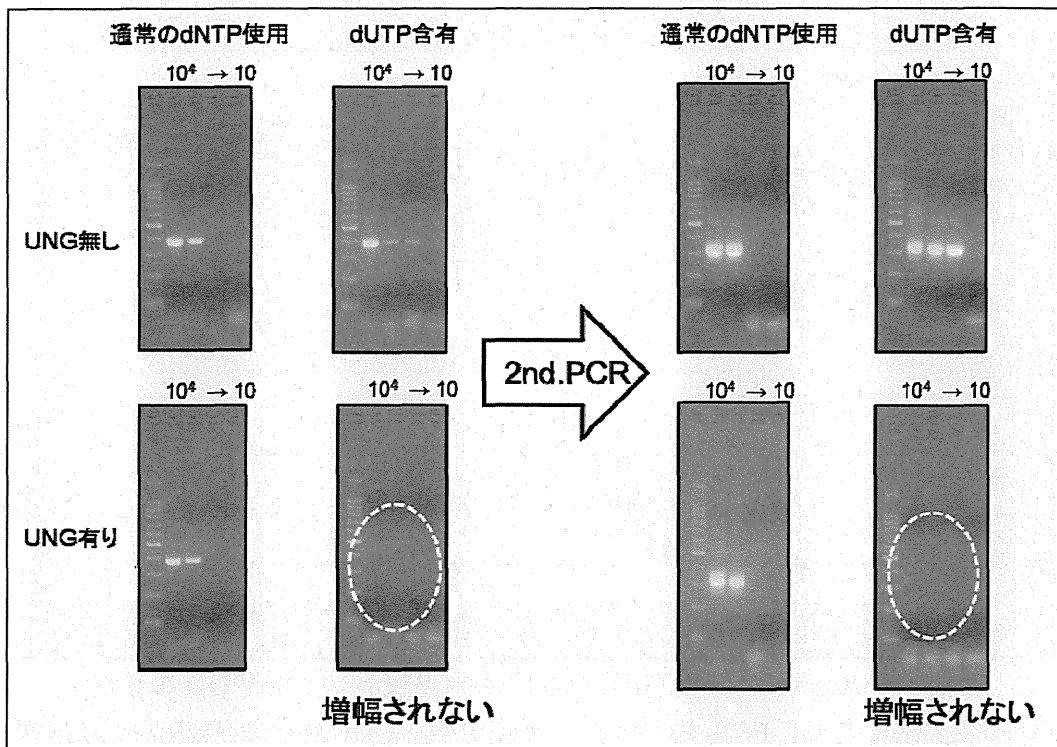


図7 ブロccoliー遺伝子を用いた UNG 処理の評価試験結果(電気泳動)  
段階希釈したブロccoliー遺伝子断片に対して 1st.PCR(左)→2nd.PCR(右)を行った。

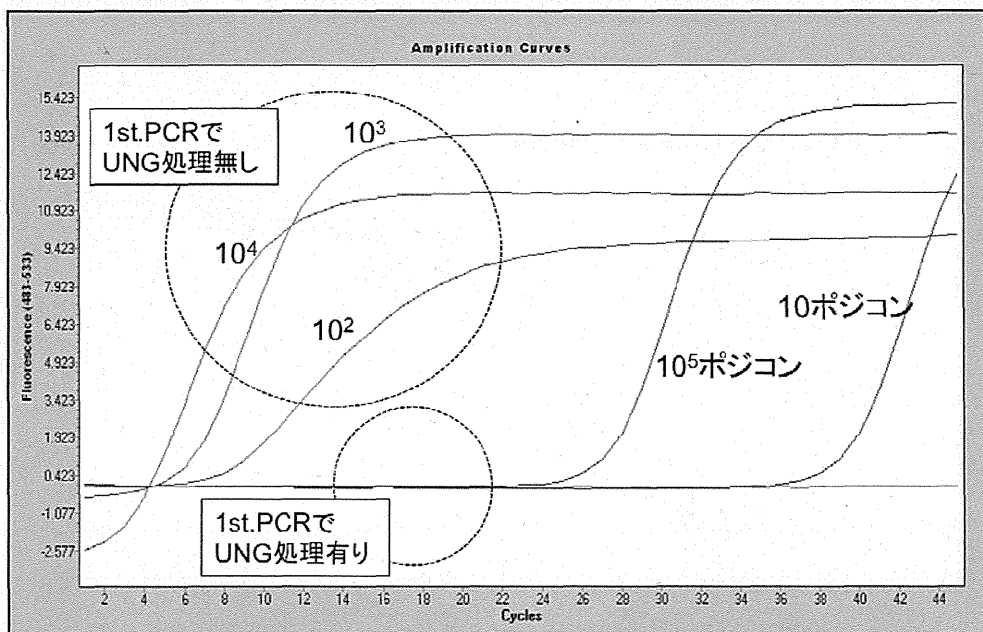


図8 ブロccoliー遺伝子を用いた UNG 処理の評価試験結果(nested real-time PCR)  
段階希釈したブロccoliー遺伝子断片に対して 1st.PCR を行い、その増幅産物をさらに  
real-time PCR で再増幅した。ポジコンは参考値として加えた。