

平成 28 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)
「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」
研究分担報告書

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

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
研究協力者	佐藤寛子	秋田県健康環境センター・保健衛生部
研究協力者	清水優子	日本大学・医学部・微生物学教室
研究協力者	牛島廣治	日本大学・医学部・微生物学教室

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(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。その際に、ウイルスをブ菌に吸着させる”糊”の役目を果たす捕捉抗体としてガンマグロブリンが用いられている。一方、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集積であり、ノロウイルス GII.17 のような、これまで流行したことのない型に対する抗体は含まれていないことが危惧された。本研究では、これまで何度も流行を繰り返しているノロウイルス GII.4 に感染した際に、GII.17 等の他の型に対する抗体も同時に誘導されてくることを見出し、ガンマグロブリンの有用性について再評価を行った。添加回収試験において、GII.17 の回収率は GII.4 のそれには及ばないものの、汚染濃度が低くなるにつれて高くなる傾向が認められた。さらに、低濃度領域の汚染を検出するために用いられる nested real-time PCR を用いた検討では、ポテトサラダと焼きそばにおいて、35 コピー/g まで検出可能であった。この成績は、すでに発表済の GII.4 におけるものと同等であった。実際の食中毒事例は微量の汚染に起因していることから、ガンマグロブリンを捕捉抗体として用いるパンソルビン・トラップ法は、GII.17 に対しても問題なく適用できることが示された。

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、近年

では輸入食品等が原因と考えられる A 型肝炎ウイルス(HAV)や、野生動物に由来する E 型肝炎ウイルス(HEV)の感染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。一方、平成 26~27 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.P17-GII.17(以降、GII.17 と標記)による食中毒事例が多発した。ガンマグロブリン製剤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られるならば、捕捉抗体としての有効性を再検討する必要があったため、今年度の研究としてこれを実施した。

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 GII.17(2016 年 1 月 28 日、感染症発生動向調査にて採取)、及び GII.2(2016 年

12 月 26 日、集団感染事例における積極的疫学調査で採取)を含む糞便を用いた。

血清中の IgG の推移を検討するため、感染年月日の明らかな患者の保存血清を、本人の同意の元に使用した。

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) 5%ガンマグロブリン製剤

米国 HDM Labs Inc 社の試薬用 5%ガンマグロブリン製剤を用いた。Advy Japan 社から購入した。

3) パンソルビン

黄色ブドウ球菌(ブ菌)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。

4) フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (Thermo Fischer Scientific) を使用した。

5) カラム方式の RNA 抽出キット

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

6) 再懸濁液

5)の抽出キット添付の AVL 液を用いた。

7) DNase I (RT Grade) 及び RNase inhibitor

ニッポンジーンの製品を使用した。

8) アミラーゼ

枯草菌由来 α -Amylase 粉末(和光純薬)を液化調製(平成 25 年度報告書参照)して使用した。

9) 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。

10) 逆転写酵素

ReverTraAce(東洋紡)を使用した。

11) conventional PCR 用酵素

1st.PCR、及び 2nd. PCR には AptaTaq Fast PCR Master(日本ジェネティクス)を用いた。このとき酵素をホットスタート化するため、anti-Taq high(東洋紡)を添加した。

12) 逆転写反応に用いたプライマー

回収率の検討には COG2R (J. Clin. Microbiol., **41**, 1548-1557, 2003)を、検出限界の検討には PANR-G2 (Food Environ. Virol., **7**, 239-248, 2015)用いた。

13) conventional PCR に用いたプライマー

1st. PCR では COG2F / G2SKR (J. Virol. Methods, **100**, 107-114, 2002)、2nd.PCR では G2SKF / G2SKR のプライマーセットをそれぞれ用いた。

14) conventional PCR 装置

アステック社製「PC-320」を用いた。

15) real-time PCR 装置

ロシュ社製「LightCycler320S」を用いた。

16) real-time PCR 用酵素

日本ジェネティクス社製「FastStart Essential DNA Probes Master」を用いた。

17) real-time PCR 反応系

Kageyama らの方法 (J. Clin. Microbiol., **41**, 1548-1557, 2003) に従った。

18) ELISA 抗原

NoV GI.3、GI.4、GII.3、GII.6、GII.17 で作製したウイルス様粒子 (VLP)を用いた。

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。この時、平成 25 年に検討

したオンカラム DNase I 処理(図 2)を組み入れた。

4. NoV GII.17 の回収率に関する検討

食品洗滌液 50mL 中に $1.00 \times 10^4 \sim 2.01 \times 10^6$ 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ソルビン・トラップ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、それぞれ 10g を用いた添加回収試験も合わせて行った。ここでは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 COG2R を用いた。このプライマーは、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。

5. NoV GII.17 の検出限界に関する検討

ポテトサラダと焼きそばに様々な濃度で NoV GII.17 を添加し、COG2F / G2SKR で 1st. PCR を行った後、real-time PCR、または RT-PCR による 2nd. PCR により検出できる限界について検討した。ここでの逆転写反応は PANR-G2 を用いた。サーマルサイクラーの設定条件は、次のとおりである。

【タッチダウン PCR】

95°C 2 分 1 サイクル

95°C 30 秒 - (55→50°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 - 50°C 30 秒 - 72°C 30 秒 40 サイクル

72°C 7 分 1 サイクル

C. 研究結果

1. NoV 感染時の免疫応答

図 3 に示すとおり、NoV GII.17 に感染した場合、特に初感染時において GII.3 や GII.4 といった、他の遺伝子型の IgG も上昇していることが見て取れる。逆に GII.4 に感染した場合においても、GII.3 と GII.17 の IgG の上昇が認められた(図 4A、4B)。

2. NoV GII.17 の回収率に関する検討

食品洗滌液 50mL からガンマグロブリンを用いて NoV GII.17 の回収を試みた結果を表 1 に示した。添加量が少なくなるにつれて回収率が高くなる傾向にあるのがわかる。また、実際に食品を用いて添加回収試験を行った結果については、食品洗滌液からの回収率(10^5 コピー/台)とほぼ同じであった(表 2)。

3. NoV GII.17 の検出限界に関する検討

図 5A、5B に示したとおり、ポテトサラダと焼きそばの両方において、nested real-time PCR を用いることで、35 コピー/g まで検出可能であった。同様に RT-PCR 後のゲル電気泳動でも、35 コピー/g までの検出でき、PCR 産物をシークエンスしたところ正しく NoV GII.17 の配列であった(図 6)。

D. 考察

1. NoV 感染時の免疫応答について

現在パンソルビン・トラップ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(IgG)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。また、将来的には同様の”新型”ウイルスに対する問題が繰り返し起こり得るものと想定される。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、図 3 によると、GII.3 や GII.4 に対する抗体も同時に上昇していることがわかる。次に逆のケースとして、NoV GII.4 に感染した際の免疫応答について検討した。図 4A、4B に示したとおり、GII.3 と GII.17 に対しても感染前後の ELISA OD 値において 2 倍以上の抗体上昇が見られる。感染日は 2012 年 12 月 4 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。

2. NoV GII.17 の回収率について

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、パンソルビン・トラップ法による添加回収試験を行った(表 1)。食品洗滌液 50mL 中に NoV GII.17 を 2.01×10^6 コピー添加した際の回収率は 3.61% であったが、 1.46×10^5 コピー添加の場合は 5.34%、 1.00×10^4 コピー添加の場合は 10.60% と、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る。表 2 に示した食品から回収試験(10^5 コピー/台)においても、表 1 と同等の数値であった。参考値としてあげた GII.4 の回収率は、 1.16×10^5 コピー添加で 25.10% と明らかに高いが、これは図 3 に示

された抗体の絶対量の違いを反映しているものと考えられる。しかしながら、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。

3. NoV GII.17 の検出限界について

表1の検討において、NoV GII.17の汚染濃度が低くなるほど回収率が高くなる傾向にあることが示されたが、さらに低濃度の汚染について調べることは、リアルタイム PCR の機器表示値が 10 コピー/well 以下になることから無理がある。そこで、低濃度領域において一般的な検出手法とされる **nested real-time PCR** によって検出限界を検討した。ポテトサラダと焼きそばを様々な濃度の NoV GII.17 で汚染させて、**nested real-time PCR**での検出を試みた結果が図5A、5Bである。いずれの食品検体においても 35 コピー/g の汚染濃度まで検出できていることがわかる。また、検出ウイルスの遺伝子配列を調べるために、**real-time PCR** に替えて **conventional PCR** を用いた場合でも 35 コピー/g まで検出可能で、この増幅産物は今後のシーケンス解析用いることができた(図6)。35 コピー/g という数値は、本法の原著(*Food Environ. Virol.*, **7**, 239-248, 2015)において、GII.4 を用いて得られた成績と同等であることから、前述の低濃度汚染ほど回収率が高くなるという結果の延長と見なして差支えないものと考えられる。

4. 補遺

今シーズンに保育園等での大規模な流行

が見られた NoV GII.2 に関して、一部報道機関において”変異型 GII.2”との標記が用いられたが、図7に示したとおり、ガンマグロブリンを捕捉抗体としたパンソルビン・トラップ法で問題なく回収できることを確認している。

5. まとめと今後の課題

昨年度までの「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究(H25-食品-一般-012)」で残された課題の一つとして、新たな型に対する捕捉抗体の見直しが挙げられたが、本研究においてガンマグロブリンの有用性が再評価された。これまで流行したことの無い型に対する抗体はガンマグロブリンに含まれていないことが危惧されたが、実際に NoV に対する免疫応答を検討すると、感染した型とは別の型に対する抗体も同時に誘導されてくることがわかった。特に 2012 年に GII.4 に感染したケースでは、2 年後の 2014 年以降に流行する GII.17 に対する抗体も誘導されていた。このことから、新しい型に対する抗体といえども、ガンマグロブリンに含まれていることが期待できるようになり、添加回収試験等を行ったところそのことが証明された。将来的に、“新型”と称されるウイルスが流行したとしても、第一選択としてガンマグロブリンは有用であると考えられる。その際の検証方法としては、回収率の評価だけではなく、**nested real-time PCR** による検出限界も合わせて検討する必要がある。

他の食中毒起因ウイルスとしては、近年報告が増加しつつある E 型肝炎ウイルス等への適用を進める必要があるが、捕捉抗体の供給源を確保することが重要である。

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。加えて、今後はウイルスの回収効率を客観的に評価する必要性も生じてくることから、内部標準物質の使用についても検討を進める必要がある。

E. 結論

パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体として用いられているガンマグロブリンが、これまで流行したことの無い型である NoV GII.17 に対しても適用できるかを検討した。これまでに何度も大流行した GII.4 に感染すると同時に GII.17 の抗体も誘導されるという結果を元に、ガンマグロブリンの再評価を行い、GII.17 に対しても問題なく使用できることを確認した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hiroyuki Saito, Miho Toho, Tomoyuki Tanaka and Mamoru Noda: Development of a practical method to detect noroviruses contamination in composite meals.

World Biomedical Frontiers, <http://biomedfrontiers.org/inf-2016-3-5/> (2016)

2) Hiroyuki Saito, Chihiro Shibata, Wakako Akino, Hiroyuki Saito, Shihoko Saito, Naota Monma, Akira Toukairin, Mamoru Takahashi, Hiromi Fujita, Teruki Kadosaka, Nobuhiro Takada, Hiroki Kawabata and Shuji Ando: Survey of Leptotrombidium akamushi in Omono river basin in Akita Prefecture, Japan in 2011~2014. *Med. Entomol. Zool.*, **67** (3), 167-175 (2016)

3) Hiroyuki Saito, Miho Toho, Tomoyuki Tanaka and Mamoru Noda: "PANtrap": A Novel Detection Method for General Food Samples. In Paul K. S. Chan, Hoi ShanKwan and Martin C. W. Chan (Eds.) *THE NOROVIRUS*. New York: Academic Press, pp145-153 (2016)

2. 学会発表

1) 今野貴之、高橋志保、熊谷優子、斎藤博之: サルモネラの血清型別への遺伝子検査法からのアプローチ、第 27 回秋田応用生命科学研究会講演会、2016、秋田

2) 斎藤博之、佐藤寛子、早川智、牛島廣治: ノロウイルス GII.P17-GII.17 に再感染した症例における免疫応答、第 57 回日本臨床ウイルス学会、2016、郡山

3) Hiroyuki Saito, Miho Toho, Mamoru Noda, Tomoyuki Tanaka: Noroviruses RNA detection in contaminated foods by a PANtrap method. 第 11 回日中国際ウイルス学会、2016、観音寺

- 4) 齋藤博之、秋野和華子、野田衛: ノロウイルス遺伝子型別の効率化に関する検討、第 37 回日本食品微生物学会学術総会、2016、東京
- 5) 秋野和華子、齋藤博之、野田衛: 市販生カキからのノロウイルス・サポウイルスの検出と秋田県内における流行状況の推移、第 37 回日本食品微生物学会学術総会、2016、東京
- 5) Ushijima H., Saito H., Shimizu Y., Sato H., Thongprachum A., Khamrin P., Okitsu S., Takanashi S., Maneekarn N. and Hayakawa S.: Immune response against different genotypes of noroviruses in two adults with the recurrent infection. 第 6 回国際カリシウイルス学会、2016, Savannah
- 6) Hiroyuki Saito, Yuko Shimizu, Hiroko Sato, Wakako Akino, Satoshi Hayakawa and Hiroshi Usijima : Immunological response in a patient of norovirus GII.P17-GII.17 infection. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016、札幌
- 7) 齋藤博之、秋野和華子、野田衛: 疫学的視点から見たノロウイルス GII.P17-GII.17 型の病原性に関する一考察、第 112 回日本食品衛生学会学術講演会、2016、函館
- 8) 齋藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治: ノロウイルス GII.17 感染に伴う免疫応答と病原性に関する一考察、秋田応用生命科学研究会第 28 回講演会、2016、秋田

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

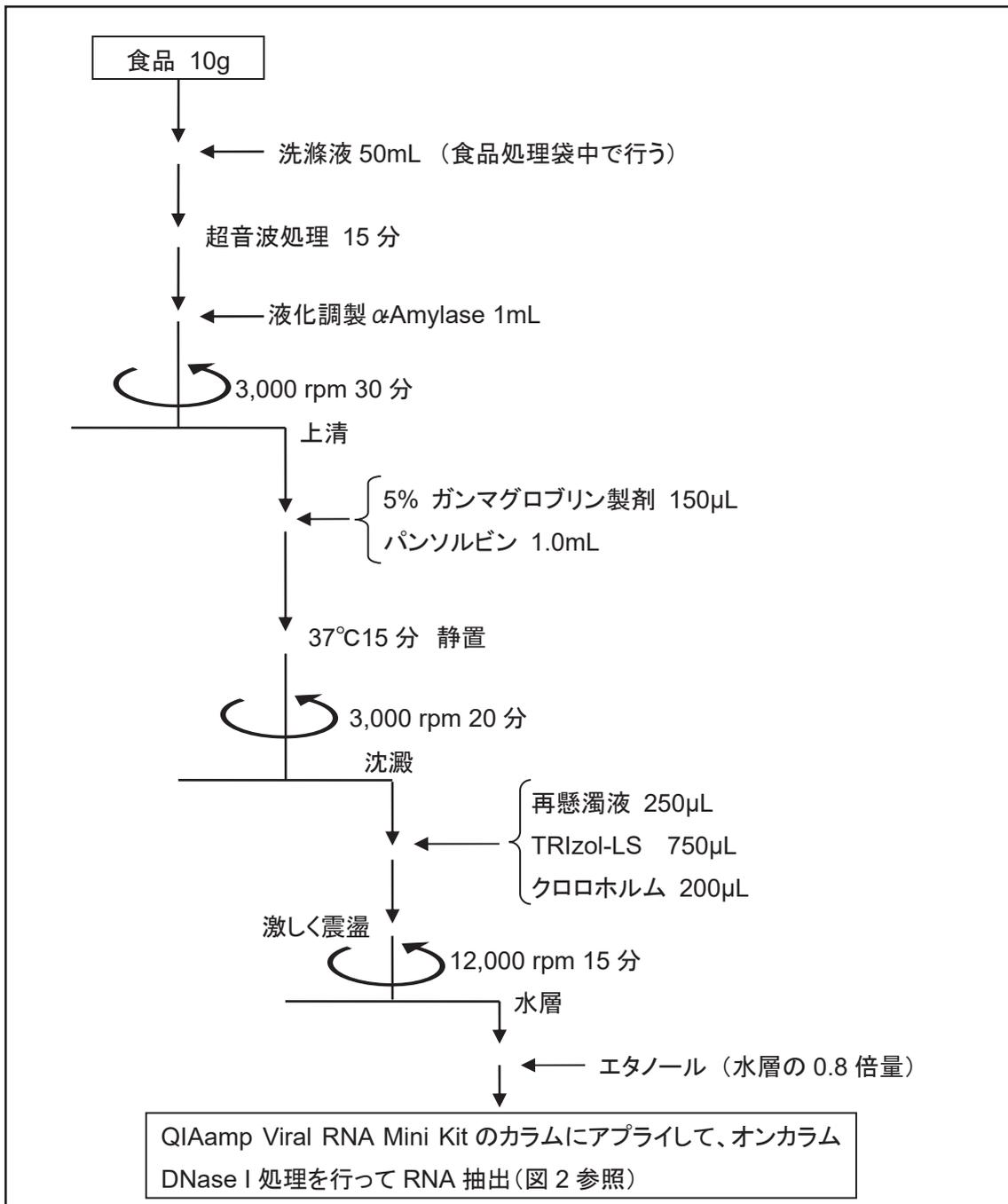


図 1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

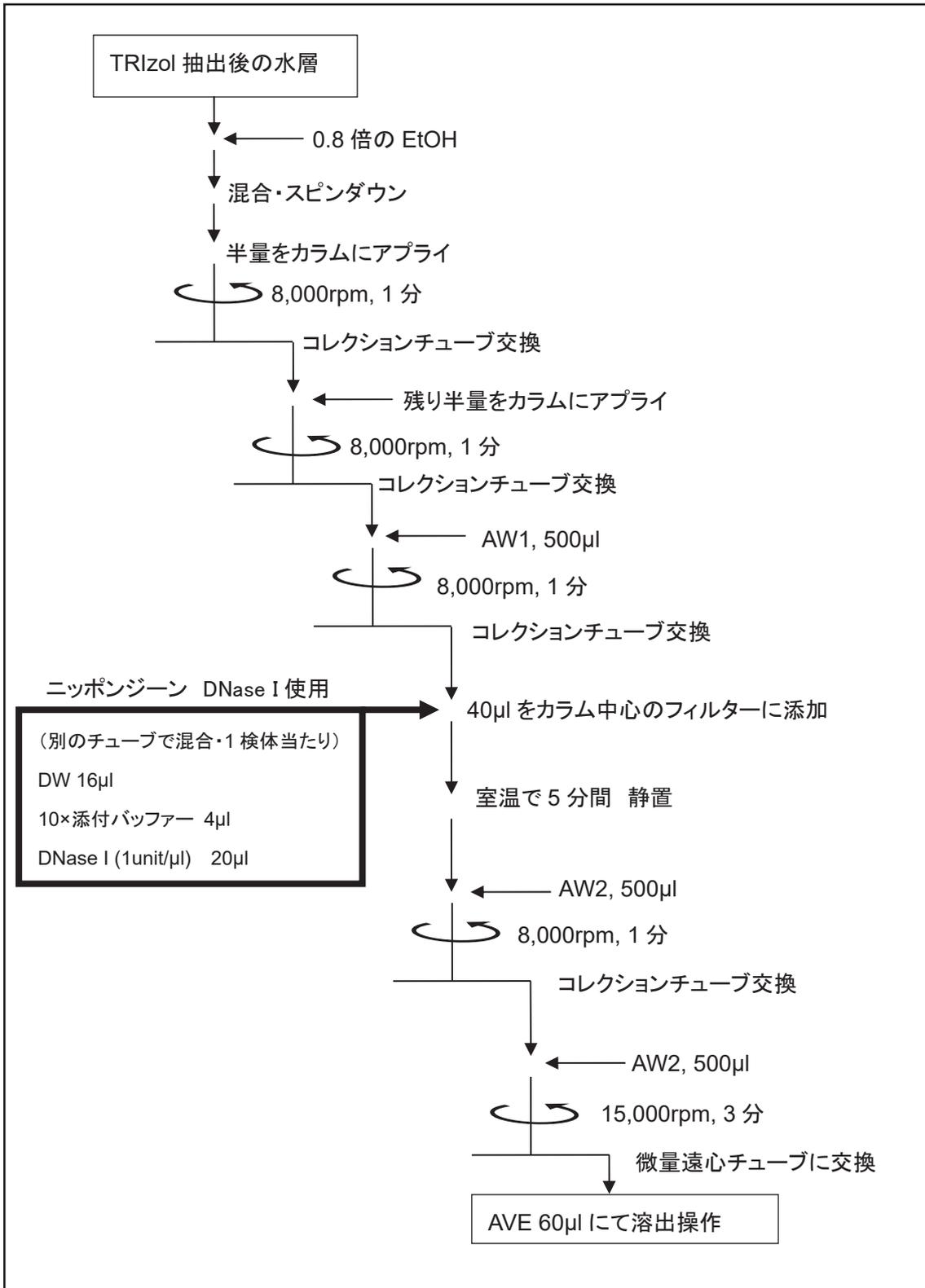


図2 QIAamp Viral RNA Mini Kit へのオンカラム DNase I 処理

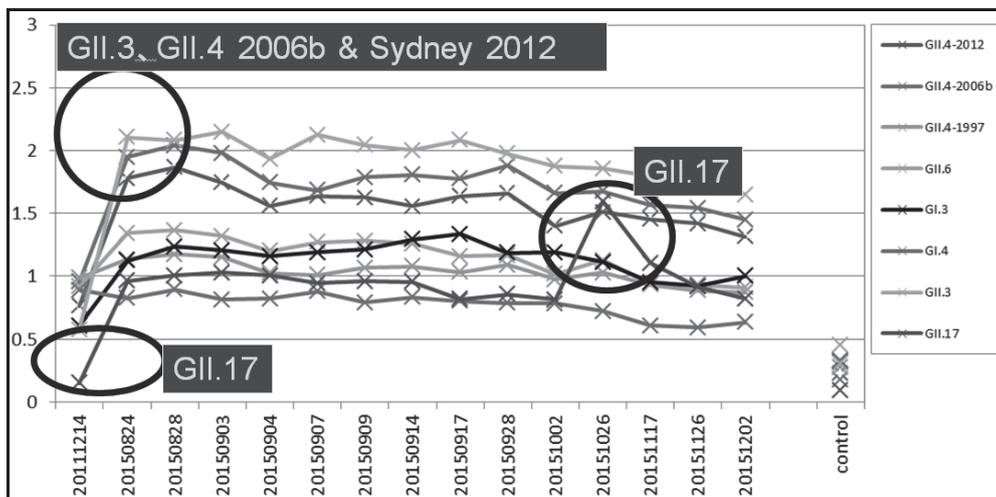


図3 NoV GII.17 感染時の血清 IgG の推移
 感染日： 2015 年 8 月 5 日 (初感染), 10 月 12 日 (再感染)

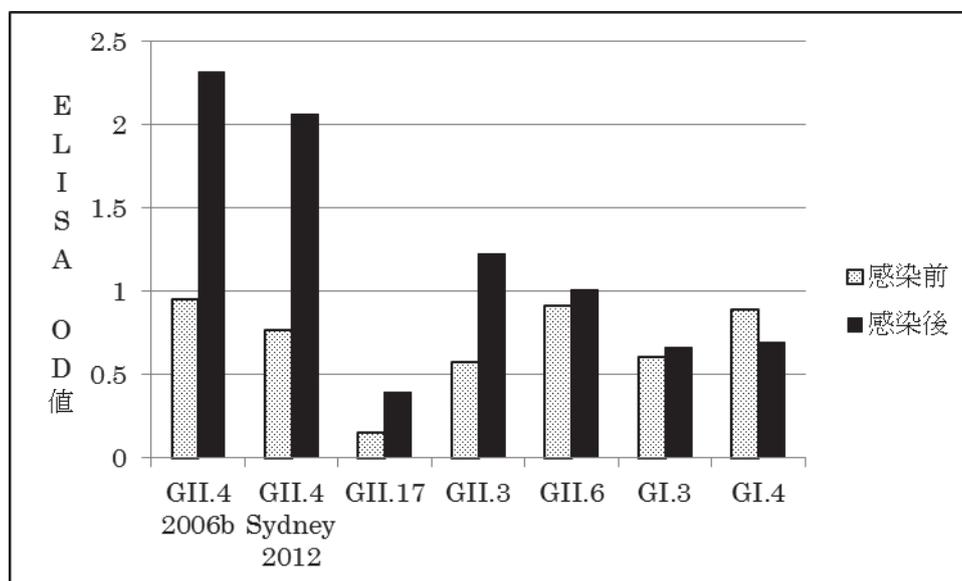


図4A NoV GII.4 感染時における血清 IgG の応答 (ELISA OD 値)
 感染日： 2012 年 12 月 4 日

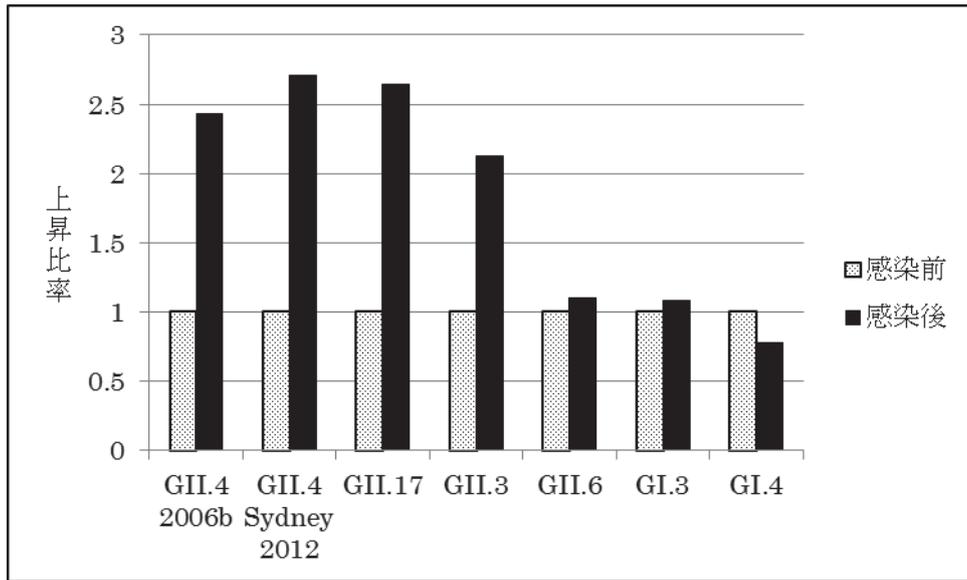


図 4B NoV GII.4 感染時における血清 IgG の応答(上昇比率)

感染日： 2012 年 12 月 4 日

表 1 食品洗滌液 50mL からの NoV GII.17 の回収率

遺伝子型	添加量(copies /50mL)	回収量(copies /50mL)	回収率(%)
GII.17	2.01×10^6	7.23×10^4	3.61
GII.17	1.46×10^5	7.80×10^3	5.34
GII.17	1.00×10^4	1.06×10^3	10.60
GII.4(参考値)	1.16×10^5	2.90×10^4	25.10

表 2 食品 10g からの NoV GII.17 の回収率

食品	添加量(copies /g)	回収量(copies /g)	回収率(%)
ポテトサラダ	1.43×10^5	1.05×10^4	7.35
焼きそば	1.32×10^5	6.67×10^3	5.04

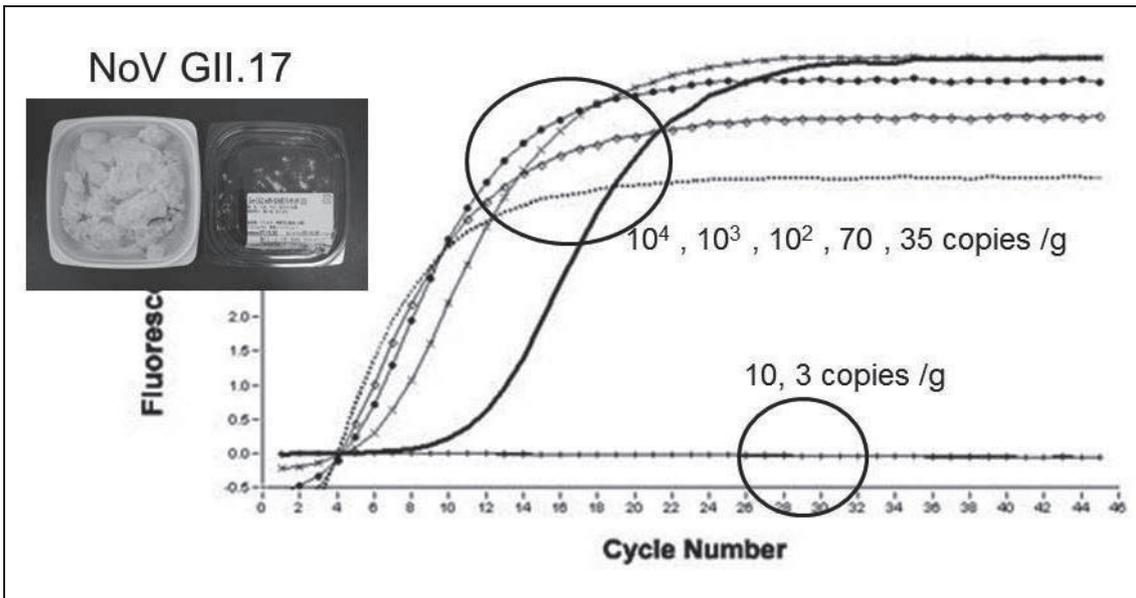


図 5A Nested real-time PCR による検出限界(ポテトサラダ)

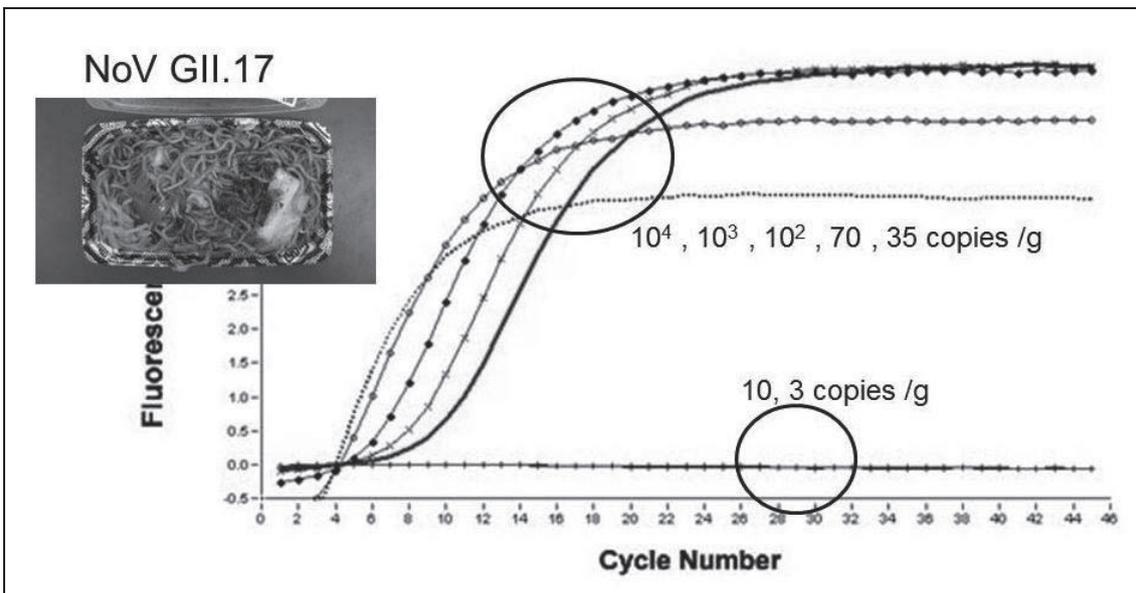


図 5B Nested real-time PCR による検出限界(焼きそば)

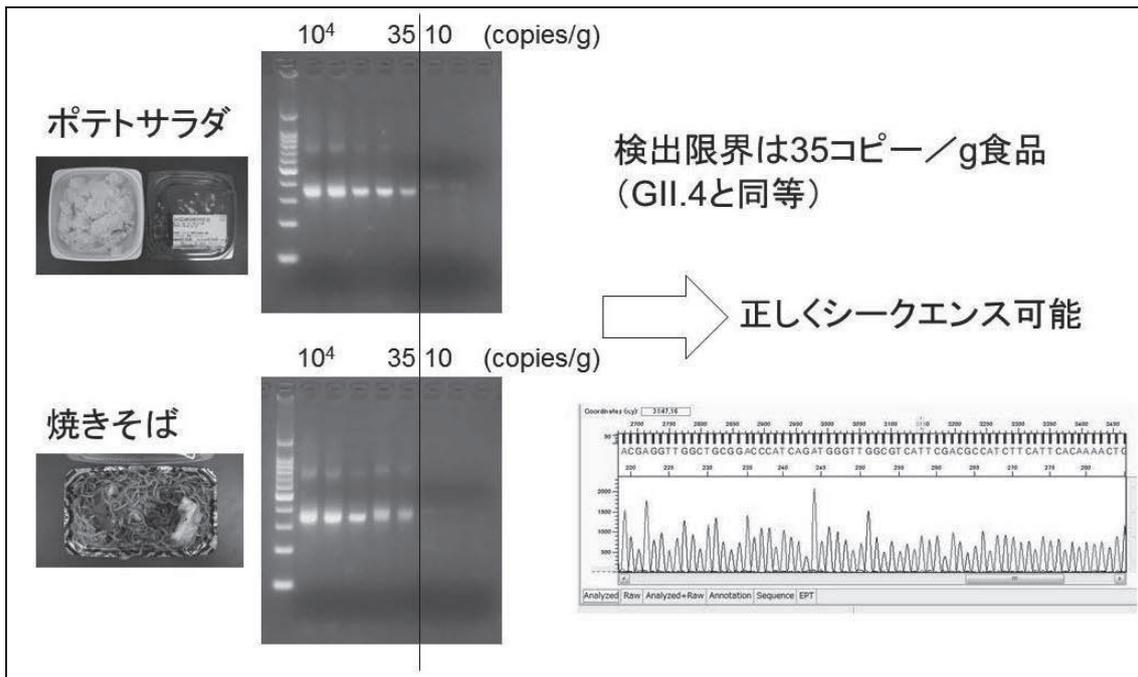


図 6 Nested RT-PCR による検出限界

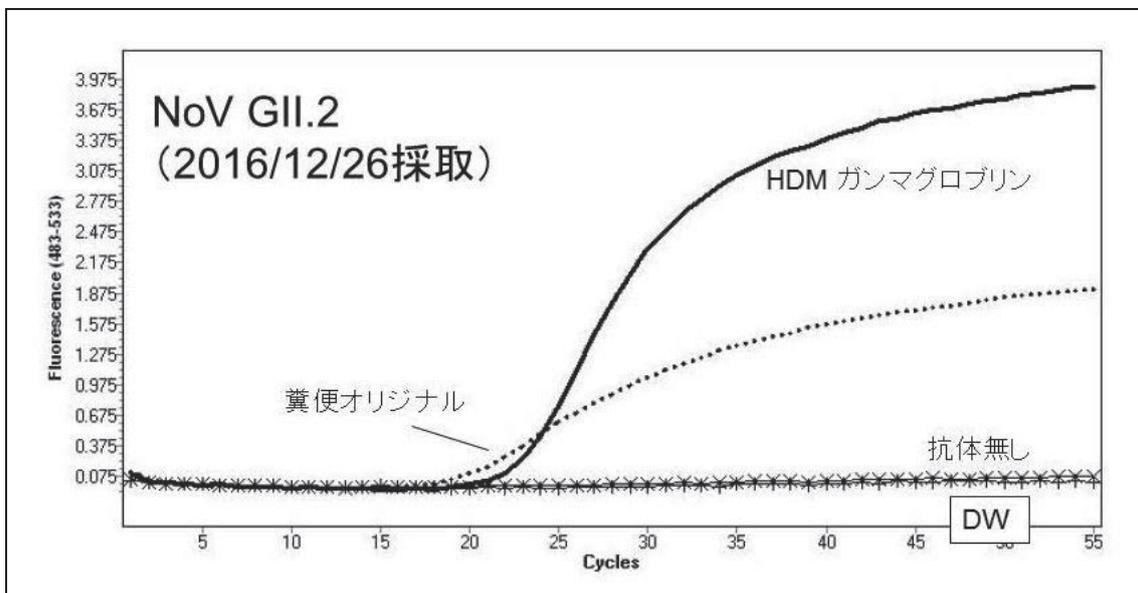


図 7 食品洗滌液 50mL からの NoV GII.2 (2016/2017 シーズン) の回収率

添加量: 3.94×10^5 コピー

回収量: 1.48×10^5 コピー

回収率: 37.5 %