

平成 29 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

パンソルビンの品質に関する課題への対応

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(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、問題発生前に購入したパンソルビンと同等以上の回収率が得られるようになった。再固定はパンソルビンを購入後に 1 回だけ行えばよく、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。

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やアデノウイルス 41 型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 型肝炎ウイルスや、野生動物に由来する E 型肝炎ウイルス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、本法の普及と合わせてパンソルビンの生産ラインが急拡大したこともあり、近年になってホルマリン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。今年度は、その対策に関する検討を行った。

B. 研究方法

1. 研究材料

市場供給されているパンソルビン(メルク社)を検討するに当たり、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. 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) フェノール系 RNA 抽出キット

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

4) カラム方式の RNA 抽出キット

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

5) 再懸濁液

4)の抽出キット添付の AVL 液を用いた。

6) 逆転写酵素

ReverTraAce (東洋紡) を使用した。

7) 逆転写反応に用いたプライマー

PANR-G2 (Food Environ. Virol., 7, 239-248, 2015)を用いた。

8) Real-time PCR 装置

ロシュ社製「LightCycler320S」を用いた。

9) 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。

10) Real-time PCR 反応系

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

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。

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。 α -Amylase 添加とオンカラム DNase I 処理は今回の検討では不要のため省略した。

4. NoV GII.17 の回収率に関する検討

食品洗滌液 50mL 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。

5. パンソルビンの再固定

図 6 の手順によりパンソルビンの再固定を行った(詳細は末尾マニュアル参照)。再固定したパンソルビンについて、4 と同様に回収率を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. パンソルビンのロットによる回収率の違い

図 2 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・有機層に分かれてロット差は認められなかった。しかし、水層に 0.8 倍量のエタノールを添加した段階で、2015 年以降に購入したパンソルビンでは白濁が生じた。さらに、これを遠心することで沈澱が確認された。

Real-time PCR で NoV の遺伝子を増幅したところ、2014 年に購入したパンソルビンと比較して、2015 年に購入したそれは明らかに効率が低下していた(図 3)。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。

2. 再固定の効果に関する検討

1.において問題が生じた 2015 年購入のパンソルビンを図 6 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らなくなり(図 7)、増幅曲線も改善された(図 8)。回収率は 2014 年購入分と同等以上になった(表 1)。

D. 考察

1. パンソルビンのロット差について

本法の開発がスタートしたのは 2007 年であり、2014 年まではパンソルビンに不都合は認められなかった。しかし、2015 年以降に購入したパンソルビンは、操作中に黄色ブドウ球菌(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 2)。RNA 抽出キットの説明書(図 4)には、「沈澱物が生じた場合は再懸濁して操作を進める」と書かれているが、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 3)。この問題は、本法の普及に伴って生産サインが拡大したと無関係ではないと推察される。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、出荷基準は図 5 に示したとおり、試薬 1mL 当たりヒト IgG を 2mg 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、パンソルビンを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。

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再固定したところ、図 7、図 8、及び表 1 に示したとおり、問題は解決された。また、本研究では白濁の原因が生産過程における固定不足であることを想定したが、結果としてそのことが証明されたことになる。再固定はパンソルビン購入後に 1 回だけ行えばよく、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 ヶ月後に使用した場合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ている。

3. 補遺

今回の問題は、RNA 抽出キットとして、QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いた場合に発生したものであって、操作中のエタノール添加を要しないキットでは顕現しない可能性がある。エタノールを用いない核酸自動抽出機「MagNA Pure LC (ロシュ)」を用いている機関からは、特段の問題はないという情報を得ている。

4. まとめと今後の課題

パントラ法の根幹となる試薬であるパンソルビンは、ブ菌を原材料としてホルマリン固定したものであるが、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、蛋白質の分析に用いる際には問題ないが、PCR 等の核酸分析の場合には、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。次年度以降の研究課題については、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

で多くの機関で食中毒検査に用いられていることから、再固定マニュアルについて「食品衛生検査指針・微生物編 2015 年版（第 2 版）」に記述し、「http://www.nihs.go.jp/fhm/csvdf/sttest/fixing_of_pansorbin.pdf」よりダウンロードできるように手配した。

今後の課題として、ウイルスの回収効率を客観的に評価する必要性が生じてくることから、内部標準物質の使用について検討を進める必要がある。また、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う。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

パントラ法の根幹をなす試薬である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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hiroko Sato, Chihiro Shibata, Yoko Fujiya, Wakako Akino and Saito H: Epidemiology of scrub typhus in Akita Prefecture, 2007-2016. *Infectious Agents Surveillance Report*, **38** (6), 5-6 (2017)

2) Hiroyuki Saito, Wakako Akino, Hiroko Sato, Yoko Fujiya, Chihiro Shibata, Ryoetsu Sato and Hiroyuki Shimizu: Isolation of enterovirus D68 using suckling mice. *Infectious Agents Surveillance Report*, **38** (10), 11-12 (2017)

2. 学会発表

1) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治、野田衛: 生カキが原因でノロウイルスに感染した症例におけるノロウイルス排泄状況と抗体価の推移、第 29 回秋田応用生命科学研究会講演会、2017、秋田

2) 斎藤博之、佐藤寛子、早川智、牛島廣治: 生カキ喫食後の胃腸炎症例におけるノロウイルス排泄状況と免疫応答、第 58 回日本臨床ウイルス学会、2017、長崎

3) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治、野田衛: 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、第 38 回日本食品微生物学会学術総会、2017、徳島

4) 秋野和華子、斎藤博之、野田衛: 市販生カキにおけるノロウイルス汚染の定量的調査、第 38 回日本食品微生物学会学術総会、2017、徳島

5) Hiroyuki Saito, Yuko Shimizu, Hiroko Sato, Wakako Akino, Satoshi Hayakawa and Hiroshi Usijima : Immunological response in a patient of noroviruses infection associated with raw oyster. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017、大阪

6) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治、野田衛: ノロウイルス GII.17 に対するパンソルビン・トラップ法の有効性に関する検討、第 113 回日本食品衛生学会学術講演会、2017、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

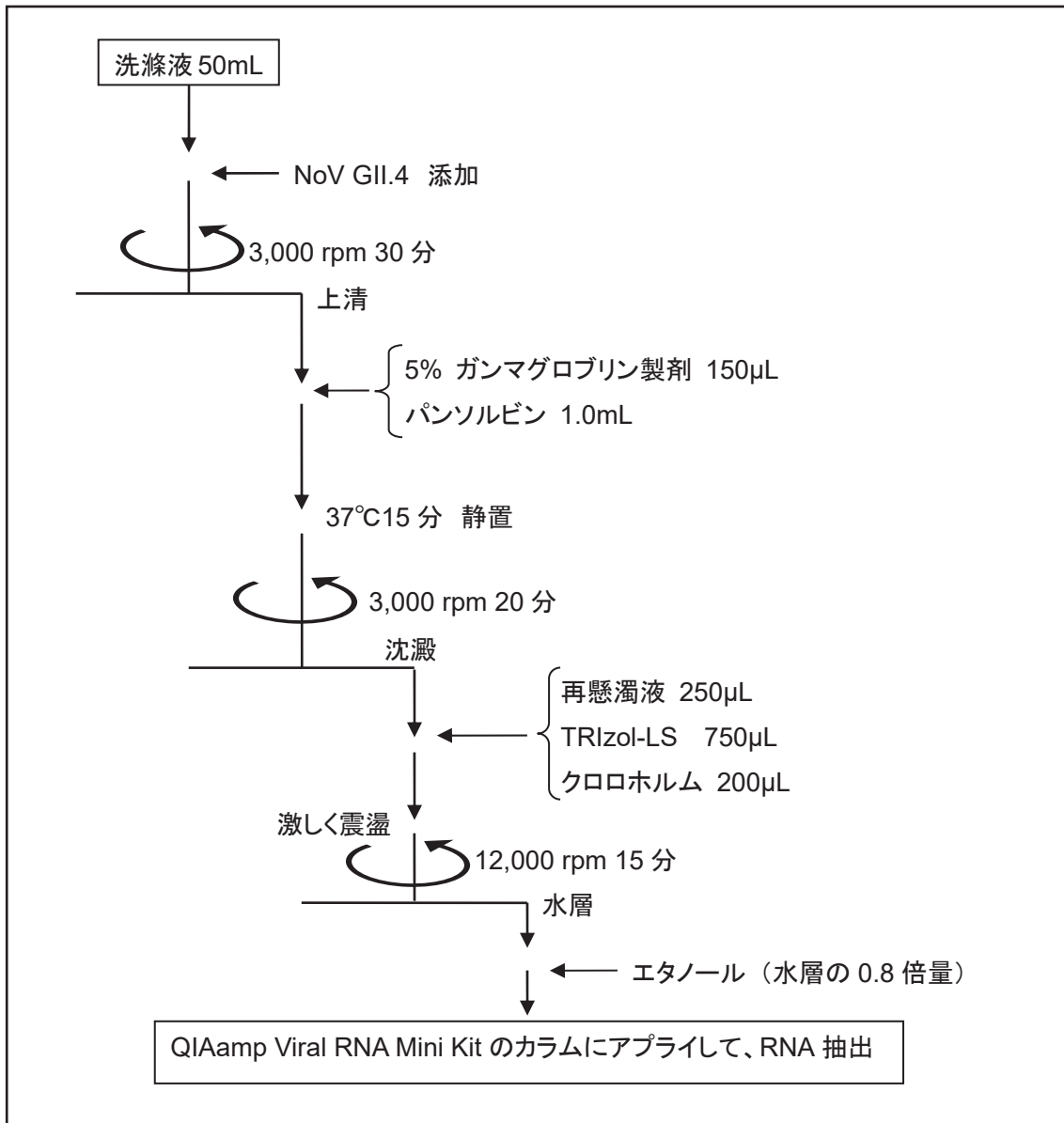


図1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

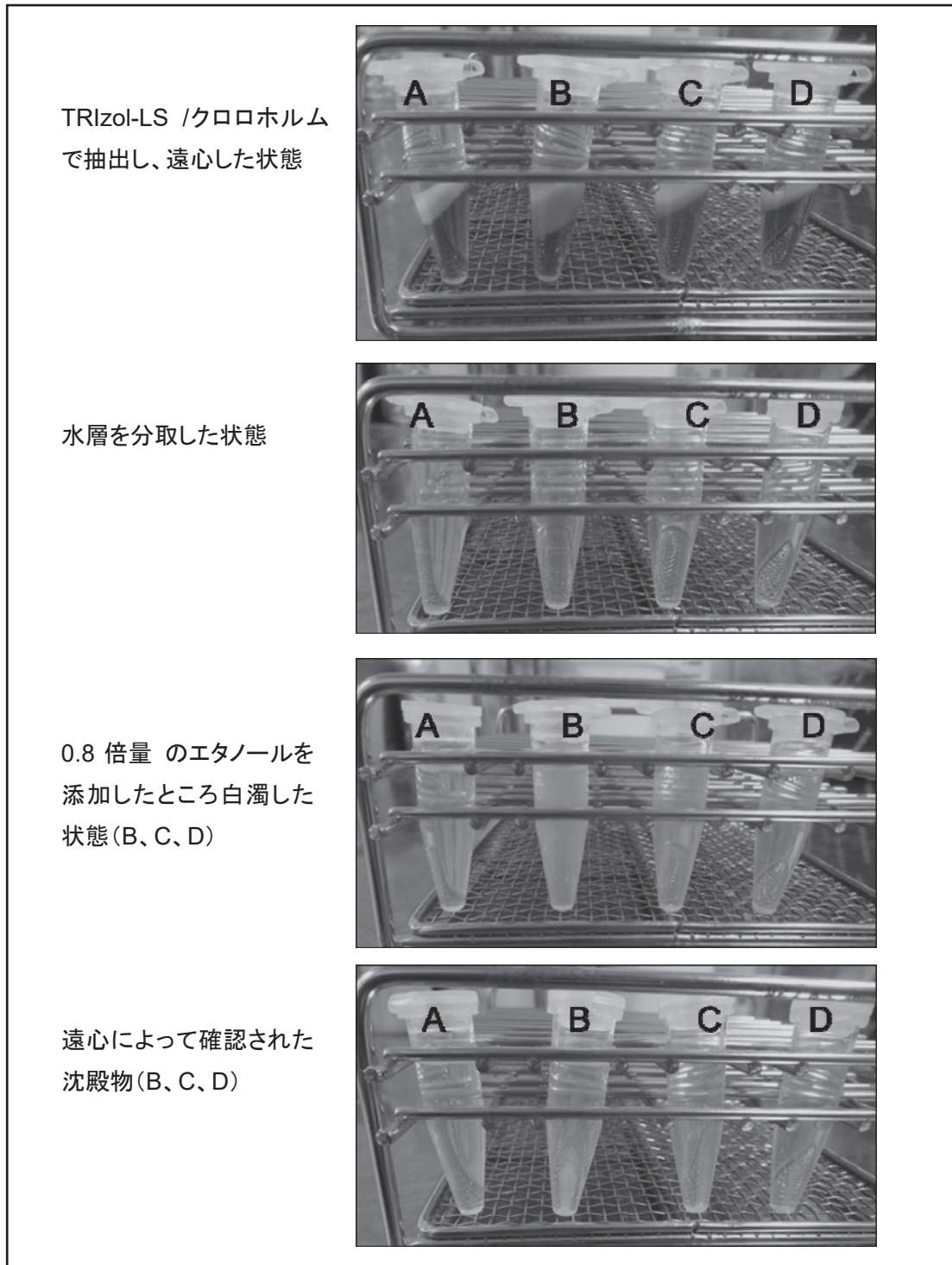


図2 パンソルビンのロット差の比較

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

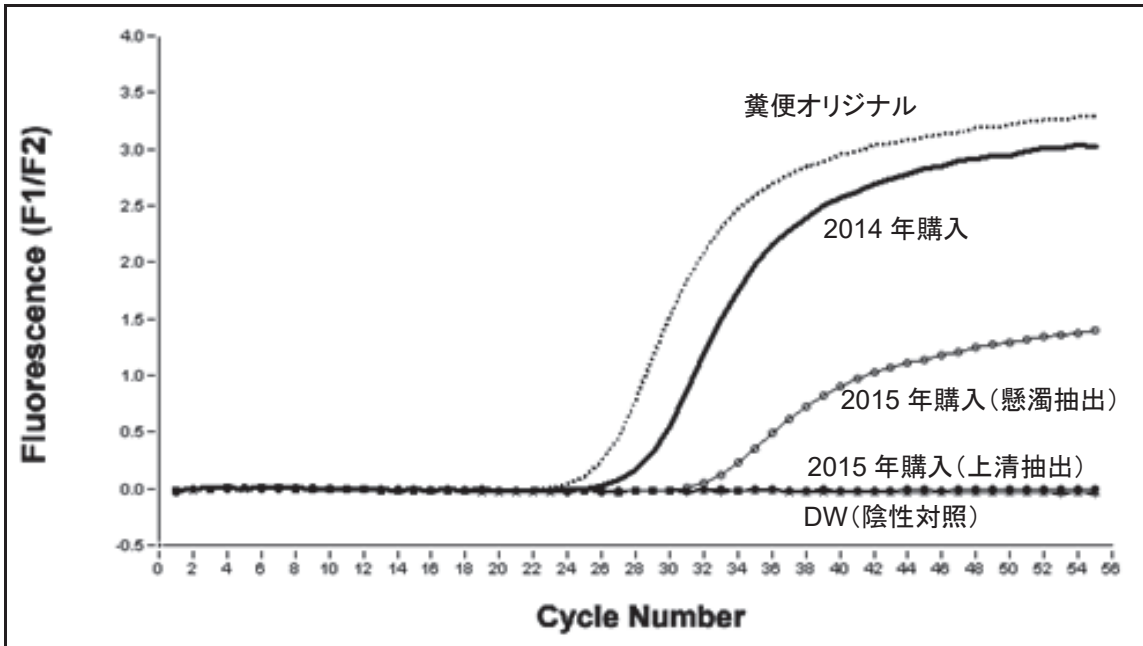


図3 白濁による回収率の低下(増幅曲線)

10. 1容量の70%エタノール(通常600 μ l)を添加し、ピペットによる吸排出を繰り返して完全に混和する。遠心操作は行なわない。すぐにステップ11に進む。
 注: ホモジナイゼーションと遠心操作中のロスにより、ライセートは600 μ lよりも少ないことがあります。
 エタノールの添加後、沈殿物が観察されることがあります。沈殿物を激しく振盪させて完全に再懸濁し、すぐにステップ11に進みます。

図4 抽出キットの添付説明書

	to be loaded onto a polyacrylamide gel, the sample buffer, boiled for 10 min, centrifuged, and supernatant onto the gel. If a high background is observed with clear lysates, prebind the antibody to PAN (e.g. RIPA). This protocol is meant to serve specific applications.
Activity	Binding capacity: ≥ 2 mg/ml
Preservative	0.1% sodium azide
Storage	+2°C to +8°C

図5 パンソルピンの出荷基準

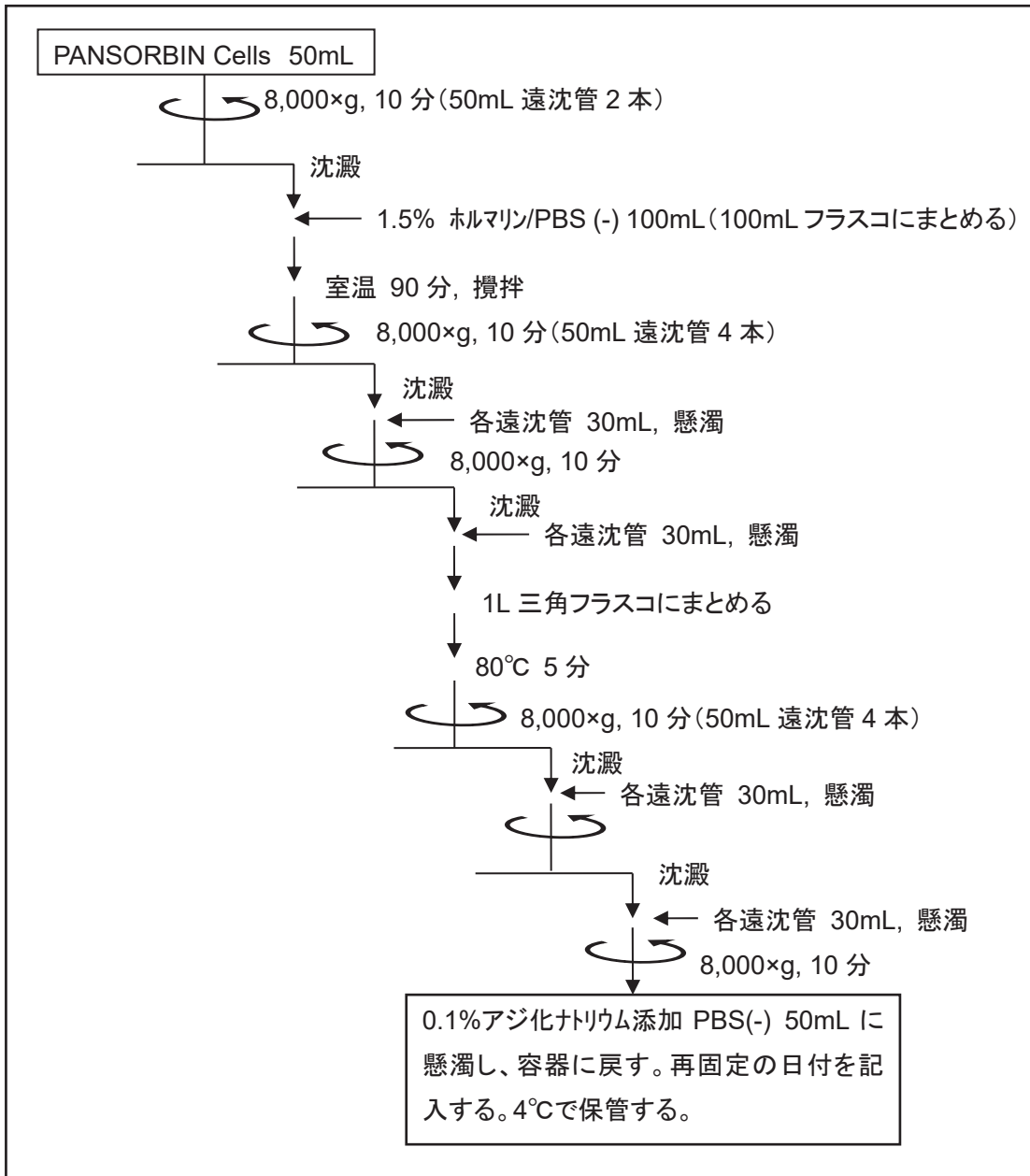


図6 パンソルビン再固定の手順

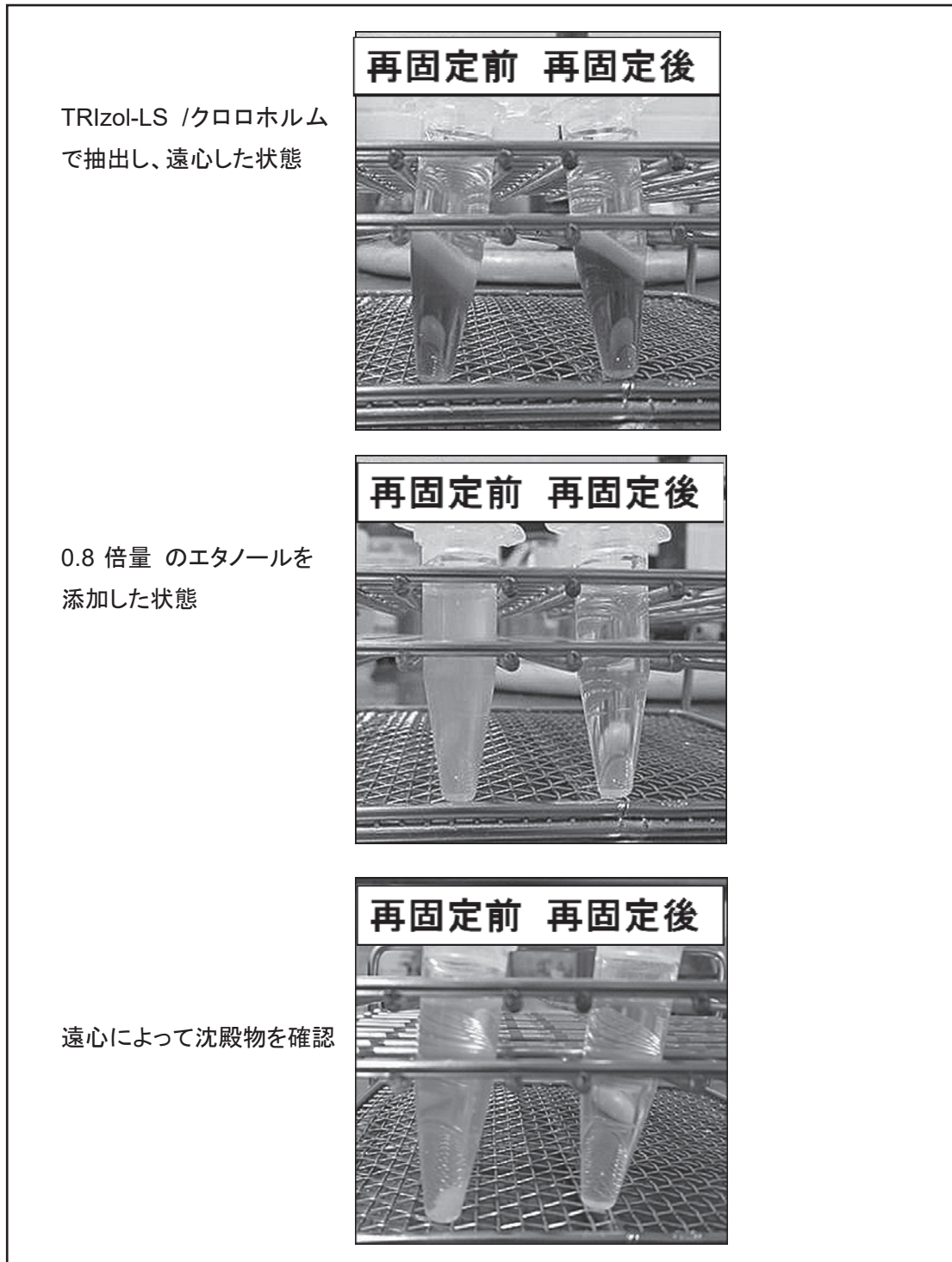


図 7 パンソルビン再固定の効果(抽出操作時の観察)

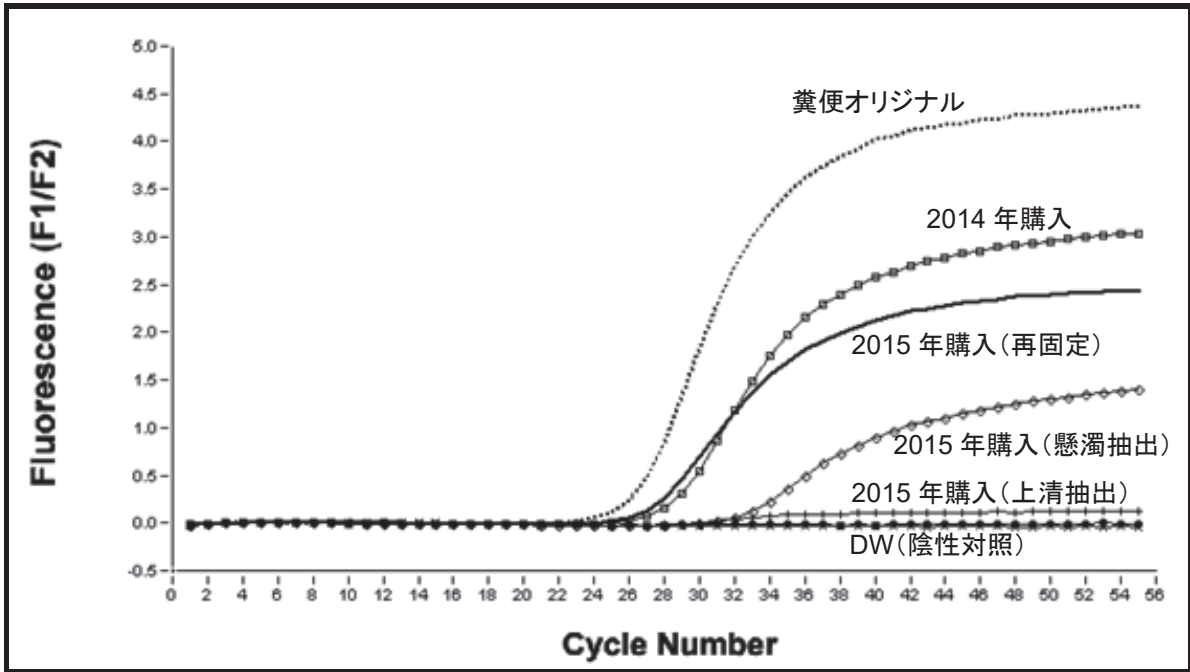


図8 パンソルビン再固定の効果(増幅曲線)

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	18.0
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	0.68
2015年購入(再固定後)	4.49×10^4	30.4

投入量 : 1.45×10^5 copies /50mL

【パンソルビン再固定法マニュアル】

1. 購入した PANSORBIN® Cells、PBS(-)、0.1% アジ化ナトリウム、50mL 遠沈管を準備する。



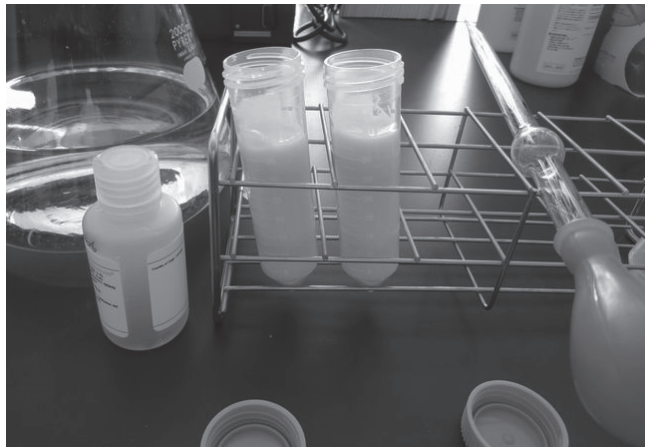
2. PANSORBIN® Cells 全量を 50mL 遠沈管に移し、チューブの目盛で量を確認して記録しておく（重要）。新規開封の場合は 50mL だが、一部使用後に再固定を行う場合は、その量を記録する。



3. 遠沈管をもう 1 本用意して、半分に分ける。PANSORBIN® Cells の容器は捨てないで保管する。



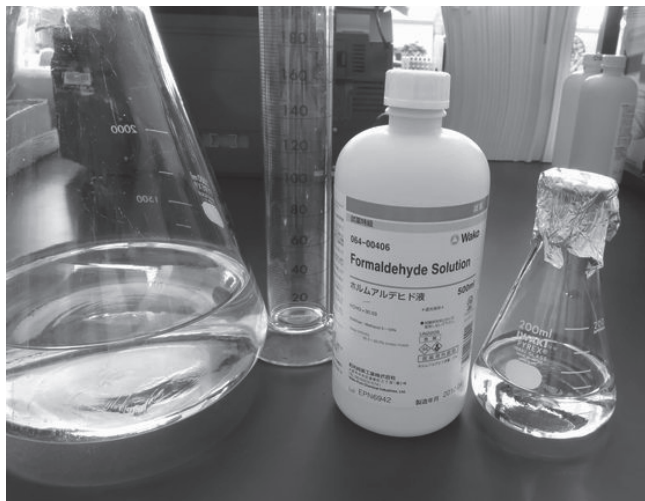
4. PBS(-)を各遠沈管の目盛で 40mL くらいまで追加混合する。遠心機を使う前にバランスを調整する。遠心ローターによっては専用チューブを用いてもよい。駒込ピペットはステップ15までは、同じものを使い続けて差支えない。



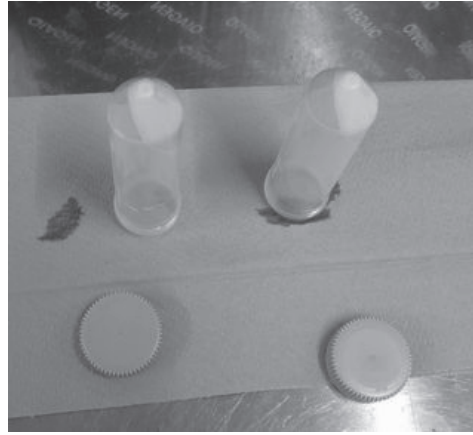
5. $8,000 \times g$ で 10分遠心する (4°C)。



6. 遠心の待ち時間に固定液を調製する。100mL 三角フラスコに PBS(-) を 96mL 取り、ホルマリン原液 4mL を加えて混合する。



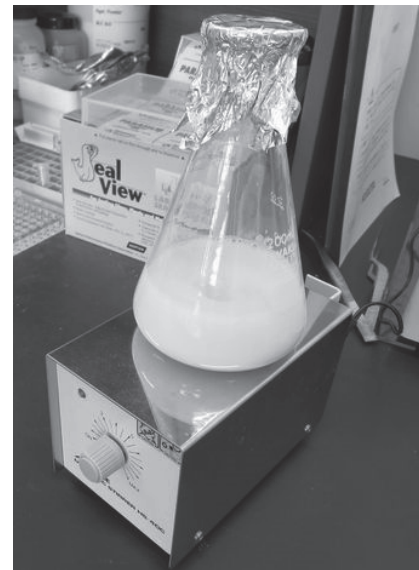
7. 遠心が終わったら、上清をデカントして捨て、吸い取り紙の上に遠沈管を逆さに立てる。上清の残りを完全に吸い取らせる。



8. PANSORBIN® Cells のペレットに、6で調製した固定液を加えて、駒込ピペットでよく懸濁しながら全量を 100mL 三角フラスコに戻す。



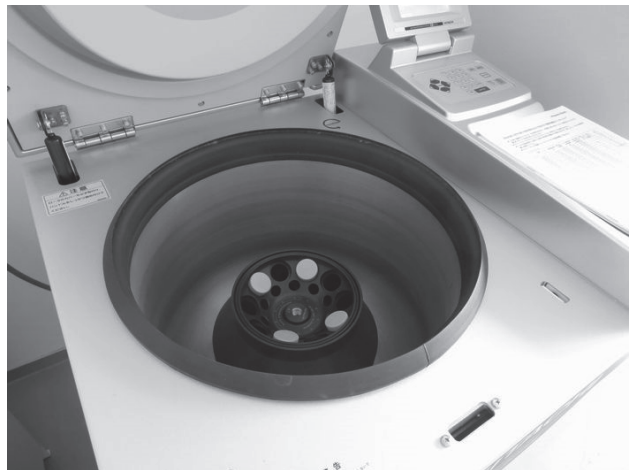
9. 回転子を入れて、マグネチックスターラーで攪拌しながら、室温で 90 分処理する（再固定）。



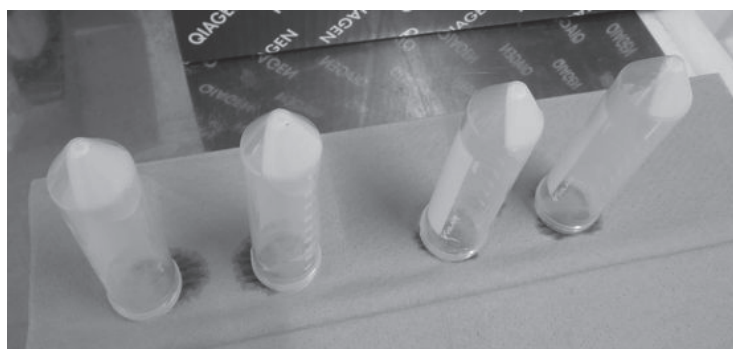
10. 50mL 遠沈管を4本用意し、駒込ピペットで、固定後の PANSORBIN® Cells を4等分する。専用の遠心チューブを用いても差し支えないが、遠心機にセットしやすいように適宜等分する。



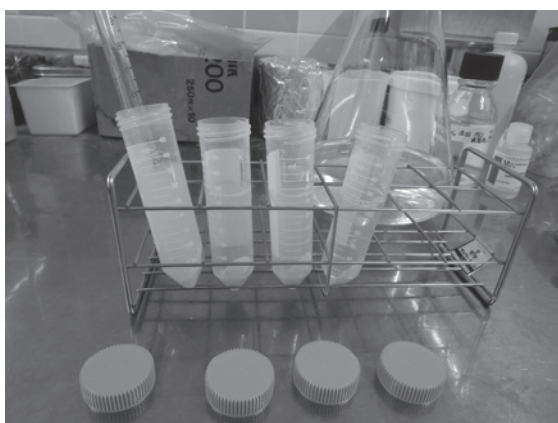
11. $8,000 \times g$ で10分遠心する (4°C)



12. 遠心が終わったら、上清をデカントして捨て、吸い取り紙の上に遠沈管を逆さに立てる。上清の残りを完全に吸い取らせる。

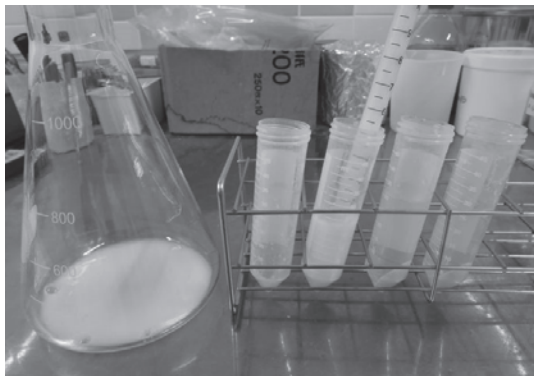


13. 遠沈管1本につき PBS(-)を 30mL 加え、ペレットを駒込ピペットでよく懸濁する。固定直後のペレットは均一になりにくい、多少の凝集塊があっても問題はない。



14. 11～12と同様に遠心とデカントを行う。

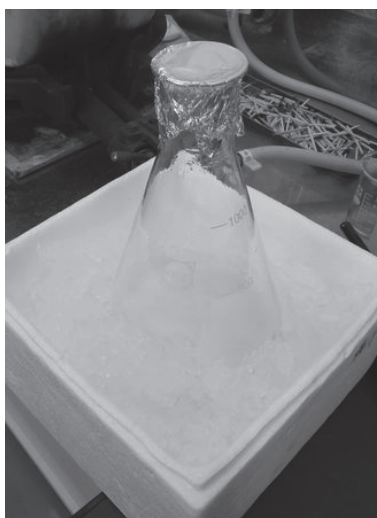
15. 遠沈管1本につきPBS(-)を30mL加え、ペレットを駒込ピペットでよく懸濁し、1L三角フラスコにまとめて入れる。この段階でペレットは均一に懸濁できる。



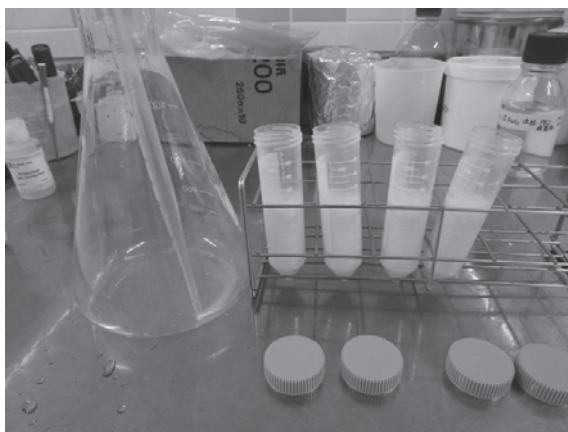
16. 80℃に設定したホットプレートか、およそ80℃に保たれた湯煎で三角フラスコを5分間加熱する。残っている微量のホルマリンを蒸散させるため、液面の面積を大きくすること（小さなフラスコではうまく蒸散しない）。



17. 氷冷する。



18. 新しい駒込ピペットを用いて、加熱後の PANSORBIN® Cells を 4 等分する。専用の遠心チューブを用いる場合は、遠心機にセットしやすいように適宜等分する。駒込ピペットは、以降のステップで同じものを使い続けて差支えない。



19. 11～12と同様に遠心とデカントを行う。

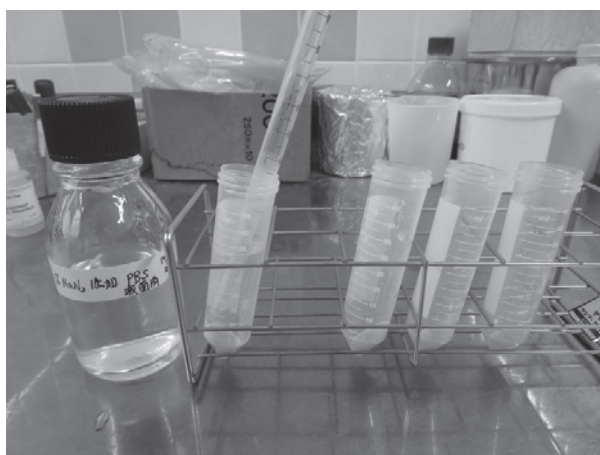
20. 13と同様に遠沈管 1 本につき PBS(-)を 30mL 加え、ペレットを駒込ピペットでよく懸濁する。ペレットは均一に懸濁できる。

21. 11～12と同様に遠心とデカントを行う。

22. 13と同様に遠沈管 1 本につき PBS(-)を 30mL 加え、ペレットを駒込ピペットでよく懸濁する。

23. 11～12と同様に遠心とデカントを行う。

24. 4本の遠沈管の内1本に、0.1% アジ化ナトリウムを含む PBS(-)を 50mL 加える。2 で記録した PANSORBIN® Cells の量が 50mL に満たないときは、記録した量を加える。



25. 駒込ピペットで懸濁しながら、4本の遠沈管のペレットを1本にまとめる。



26. 3で保管しておいた容器に再固定した PANSORBIN® Cells を戻す。



27. 容器に再固定を行った年月日を記入する。以降は、4℃に保管しておき、パンソルビン・トラップ法に用いることができる。

