

令和2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）
「食品微生物試験法の国際調和のための研究」
分担研究報告書

食品からのノロウイルス検出試験法に関する研究

研究分担者 上間 匡 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 室長
研究協力者 三浦 尚之 国立保健医療科学院
楠原 一 三重県保健環境研究所

研究要旨

ノロウイルスや A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスに代表される食品媒介性ウイルスによる健康被害は世界的にも大きな課題の一つである。これらのウイルスの多くは、現時点では細胞や実験動物を用いた実験室内での培養が不可能、あるいは困難であるため、食品に対して汚染ウイルスの基準を設けることは難しい現状にある。一方でこれらのウイルスによる健康被害を抑制・防止するためには、汚染食品の流通を制御することが重要と考えられる。本分担研究では、欧米で現在用いられるウイルス標準試験法を確認し、国内試験法との比較を通じ、国際調和に向けて検討が必要と思われる事項の抽出を図った。特に、国内試験法では食品表面拭取り検体に対する試験法が十分に整備されていない実態を把握した。今後、抽出された課題について、検討を進めるべきと思われる。

A.研究目的

ノロウイルスや A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスは、世界的に食品媒介性病原ウイルスとして認識されている。なかでもノロウイルスは、国内で毎年発生する食中毒において、食中毒患者の半数の原因物質として報告される重要なウイルスである。これらのウイルスに汚染された食品の喫食は健康被害に繋がるおそれがあることから、汚染食品の流通制御は、健康被害低減に直結するといえる。すなわち、生産段階のみならず、食品製造加工段階においてもウイルス汚染実態の把握は、食品の更なる安全性確保に向けて必要な課題であると考えられる。

多くの食品媒介性ウイルスは、現時点では実験室内での実用的な培養法が確立され

ていないため、食品からのウイルス検出には、リアルタイム PCR 法が採用されている。国内では、食品に対するノロウイルス検出法は、平成 19 年に最終改定され、厚生労働省から示される「ノロウイルスの検出法⁽¹⁾」および「食品衛生検査指針微生物編 2018」において示されているが、これらは基本的に食中毒対応のために示されているものであり、流通食品を対象としたウイルス試験法は十分には整備されていない状況と思われた。更に、国内試験法については最終改訂から 10 年以上が経過していることを踏まえ、本研究では、欧米における現行のウイルス標準試験法に関する動向を収集・整理した上で、国際調和に向けて、国内試験法で今後検討すべきと思われる事項の抽出を図ったので報告する。

B. 研究方法

1. ウイルス標準試験法に関する情報収集及び国内外比較

国内のウイルス試験法としては、厚生労働省より発出された、「ノロウイルスの検出法（平成 19 年）、「A 型肝炎ウイルスの検出法（平成 21 年）⁽²⁾」、及びこれらを収載している「食品衛生検査指針微生物編 2018」を参考とした。欧米のウイルス試験法については、欧州 ISO/TC34/SC9 及び米国 FDA で作成された ISO15216-1:2017⁽³⁾ 及び FDA Foods program^(4,5)、BAM(Bacteriological Analytical Manual)26B⁽⁶⁾を参照し、試験法間で差異の見られる事項の抽出を図った。

2. 試験法に関わる文献調査

国内で実施されている二枚貝のノロウイルス試験法を含めて、近年報告された学術文献のうち、試験法に関わるものを検索し、考察に用いた。

C. 研究結果

1. 試験法の適用範囲及び対象ウイルス

国内、欧米で用いられる食品からのウイルス標準試験法の概要を表 1 に示した。

対象食品については、生食されるカキを始めとする二枚貝はノロウイルス等の健康被害リスクが高いことを踏まえ、国内、欧米ともに対象食品となっていた。この他、国内試験法では、「他の食品（食品表面）」及び「セミドライトマト」が含まれていたが、後者は A 型肝炎ウイルスの検出対象として示されていた。

欧州では、ISO15216-1:2017（2017 年最終改訂）が標準試験法として示されていた。同試験法では、ソフトフルーツ（ベリー

類）、生鮮野菜、ボトル詰めミネラルウォーター、食品表面（食品が接触するハードサーフェスを含む）を適用範囲として、ノロウイルス及び A 型肝炎ウイルスの定量検出を行う内容となっていた。

米国では、FDA Foods program 及び BAM 法（BAM26B）が標準試験法として採用されていた。前者の試験法は二枚貝及びソフトフルーツ、後者の試験法ではネギ類を対象食品として、ノロウイルス及び A 型肝炎ウイルスの定量検出を行う内容となっていた。

2. 試験法の実施手順

国内及び欧米における標準試験法は共に、①食品の前処理（ウイルス濃縮）、②ウイルス RNA の抽出、③遺伝子検出の 3 工程から構成されていた。以下に各工程の概要を記す。

① 食品の前処理

・二枚貝

国内では、3-10 個体の二枚貝中腸腺から 1.0-1.5g を取り出し、PBS を用いて 10% 乳剤を作成した上で、PEG/NaCl 沈殿を実施する方法が示されていた。

ISO15216-1:2017 では、最低 10 個体の二枚貝中腸腺から 2g を取り出し、ProteinaseK 処理後の遠心上清をウイルス抽出液として扱う方法が示されていた。

BAM 法では、12 個体の中腸腺から 4g を取り出し、蒸留水を用いて 10% 乳剤を作成した上で、超遠心分離によりウイルスを抽出する手法が示されていた。

以上より、試験法間で検体の個数、重量、希釈液組成等に差異が認められたほか、BAM 法では超遠心分離が必要であること

が明らかとなった。

・他の食品

国内では、セミドライトマトからの A 型肝炎ウイルスの濃縮法として、同検体 7~10g に 5~10 倍量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加え、15 分間の超音波処理を行った後、ポリエチレングリコール (PEG) を用いた濃度勾配遠心分離 (以下、PEG/NaCl 沈殿) に供する方法が示されていた。

ISO15216-1:2017 では、ソフトフルーツ 25g に対して 40mL の緩衝液を加え、洗浄を行った後、PEG/NaCl 沈殿に供する方法が示されていた。また、ボトル詰めミネラルウォーターについては濾過法が示されていた。

BAM 法では、ソフトフルーツ 50g に対して 50mM グリシン/トリス/6% beef extract 緩衝液 (pH9.5) 30mL、ネギ 50g に対しては同緩衝液 55mL を加え、15 分間 150rpm で振盪後、遠心分離 (12,000 x g, 15 分間) 及び超遠心分離 (170,000 x g, 45 分間) を行う方法が示されていた。

以上より、特に BAM 法については超遠心分離が不可欠であることが見出された。

・ハードサーフェス

国内試験法及び米国 BAM 法ではハードサーフェスを対象とした方法は示されていない状況であったが、ISO 15216-1:2017 では PBS スワブによる 10x10cm の拭き取り手順が示されており、拭き取り後スワブは RNA 抽出用緩衝液を用いて直接手揉みする手順が示されていた。

以上より、食品との接触が想定されるハードサーフェスからのウイルス検出にあ

っては、ISO 法を参照する意義が確認された。

②ウイルス RNA の抽出

国内では、前処理後のウイルス抽出液について、シリカカラムを用いた RNA 抽出法が示されていた。

ISO 15216-1:2017 では、免疫磁気ビーズを用いた RNA 抽出法が示されていた。

BAM 法では、国内と同様にシリカカラムを用いた抽出法が示されていた。

以上より、国内試験法及び米国 BAM 法ではシリカカラムを用いた抽出法が共通していたのに対し、ISO 法では異なる方法が採用されていた。但し、後者の方法は第三者認証機関による妥当性評価が行われているものであり、国際標準的な手法として妥当であることも確認された。

③遺伝子検出

1) プライマー・プローブ

何れの試験法もリアルタイム PCR 法が示されており、同法の共通性が確認された。

国内及び米国では Kageyama らの報告⁽⁹⁾にあるリアルタイム PCR 法が採用されていた。一方、ISO15216-1:2017 では、国内及び米国とは異なるプライマー・プローブが示されていた。但し、同法の検出対象領域は、国内及び米国の試験法の検出対象領域に含まれている状況を確認した。

2) 工程

米国 BAM 法および欧州 ISO 法では、1st step RT-qPCR を実施していたのに対し、国内では逆転写反応を実施し、その後合成された cDNA を鋳型とする 2 step RT-

qPCR が示されていた。

3) コントロール

定量検出を目的とする ISO 15216-1:2017 では、工程管理コントロールが設定されていたが、国内試験法では同コントロールは設定されていない状況であった。また、BAM 法では、複数或いは単独の試験所での Validation を行う上で有用と思われる、複数のウイルス株が例示されていた。

4) 検証 (Verification)

米国 FDA では、「Guidelines for the detection of microbial pathogens in foods and feeds」⁽¹⁰⁾において、食品媒介性 RNA ウイルスを標的とした試験における検証方法が示されており、その中で使用者は試験所に初めて導入する際には、各 N=6 で被験ウイルスを接種した群と非接種群を用いて、擬陽性・偽陰性反応が出現しないことを検証するよう求めている状況を確認した。

D. 考察

国内試験法は、食中毒対応を念頭においた試験法である一方、欧州の ISO や米国の FDA Foods program や BAM 等では、流通食品や製造施設環境を対象とした定量試験法が近年整備されている状況が確認された。

こうした欧米での動向の背景には、食品媒介性ウイルスによる健康被害低減に向けて、汚染食品の流通制御が重要な課題と捉えられているためと思われる。実際に、欧米では二枚貝のほか、生鮮野菜やソフトフルーツ等の流通食品を対象としたウイルス試験法が輸出入食品に対しても適用される状況となっている。従って、国際調和を果

たすためには、国内での定量試験法の整備は今後検討すべき課題と考えられる。

ウイルスの培養法は平準化されていないため、現時点では欧米を含め、食品中のウイルスの基準値は設定されていない。しかしながら、定量試験では定量値が記録され、健康被害の発生データを基とした今後の解析を想定した場合には、将来的に何らかの基準提案が行われる可能性もあると思われる。

試験法として今後検討すべき項目について調査した結果として、食品マトリックスを捉えた場合、カキ等の二枚貝については、ISO 15216-1:2017 と国内通知法間での妥当性が最近になって確認されており⁽¹¹⁾、本研究での検討対象として優先的位置づけにはないものと考えられた。また、他の食品のうち、セミドライトマト表面からの試験は国内では A 型肝炎ウイルス検出に限定され、ノロウイルス等での利用実績は文献調査からは見出せなかったことから、ノロウイルスの濃縮効率や ISO 法との成績比較に関する検証は今後検討すべき項目であろう。

このほか、食品が接触する施設等の表面からのウイルス試験法は、国内では未整備であった。ISO 法を参考とした評価の実施は、食中毒事件の原因施設における調査等へ活用し得るものと推察される。但し、食中毒対応を主眼においた場合には、定量性を求めるよりも、検出感度及び精度の確保を重視した検討が必要と思われる。

ウイルス RNA 抽出工程では米国と国内の試験法では明確な差異は認められず、特段改良に向けた検討を進める必然性は想定し難い状況であることが確認された。

遺伝子検出工程では、プライマー/プロー

ブを変更する必然性はないと判断されたが、定量検出を主眼においた場合には、1 step RT-qPCR やコントロールの設定等、幾つかの課題が見出された。試験法の検証方法として、米国 FDA ガイドラインは参照に値するものと考えられた。

E. 結論

本研究では、欧米における現行の食品媒介性ウイルス標準試験法に関する情報を収集・整理し、国内の現行試験法との比較を通じて、現在国内では適用範囲として設定されていないマトリックスの存在や、前処理法、工程管理のためのコントロールの設定等について今後検討すべき項目を抽出することができた。

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
なし

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

I. 参考文献

(1) 厚生労働省. ノロウイルスの検出法.

<https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/dl/031105-1a.pdf>

(2) 厚生労働省. A 型肝炎ウイルスの検出法

https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/091201_01_01.pdf

(3) International Organization for Standardization (ISO). 2017. ISO15216-1:2017. Microbiology of food chain-horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR-Part1: method for quantification <https://www.iso.org/standard/74263.html>

(4) US Food and Drug Administration (US-FDA). 2014. FDA Foods program, Concentration, extraction, and detection of norovirus and hepatitis A virus in soft fruits.

<https://www.fda.gov/media/114183/download>

(5) US Food and Drug Administration (US-FDA). FDA Foods program, Concentration, extraction, and detection of norovirus and hepatitis A virus in molluscan shellfish.

<https://www.fda.gov/media/114187/download>

(6) US Food and Drug Administration (US-FDA). 2014. BAM26B, Detection of hepatitis A virus in foods.

<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods/bam-26b-detection-hepatitis-virus-foods>

(7) Imamura et al. Interlaboratory evaluation of methods for quantification of norovirus RNA as an alternative use for ISO 15216-1:2017 to conduct Japan baseline survey of oysters. Foodborne pathogens and disease, <https://doi.org/10.1089/fpd.2020.2874>

(8) Lowther et al. 2019. Validation of EN ISO method 15216-1 quantification of hepatitis A virus and norovirus in food matrices. Int. J. Food

Microbiol. 288: 82-90.

(9) Kageyama et al. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41:1548-57.

(10) US Food and Drug Administration (US-FDA). 2019. Methods for the detection of microbial pathogens in foods and feeds. Ed. 3.0.

<https://www.fda.gov/media/83812/download>

(11) Imamura S, Shibata S, Kishine M, Kushida A, Uema M, Noda M, Zou B, Kawasaki C, Miura T, Fukunaga Y. 2021. Interlaboratory evaluation of a method for quantification of Norovirus RNA as an alternative use for ISO 15216-1:2017 to conduct Japan baseline survey of oysters. *Foodborne Pathog Dis.* 18(5):331-6.

表 1. 食品等からのRNAウイルス試験法の概要

適用範囲	通知			ISO 15216-1:2017			FDA Foods program	BAM 26B	FDA Foods program	
	カキ等二枚貝	セミドライトマト (A型肝炎ウイルスのみ)	他の食品 (表面)	カキ等二枚貝	ソフトフルーツ、 生鮮野菜	ボトル詰ミネラル ウォーター	食品表面(含 ハードサーフェ ス)	カキ等二枚貝	ネギ	ソフトフルーツ
前処理	<ul style="list-style-type: none"> 3-10個より中腸腺切り出し 1.0-1.5gを使用 PBSにて10%乳剤作成 	<ul style="list-style-type: none"> 7-10gを使用 5-10倍量のPBSを用いて超音波処理15分 		<ul style="list-style-type: none"> 最低10個より中腸腺切り出し 2gを使用 ProtanaseKを含む滅菌蒸留水 2mLにて乳剤作成 	<ul style="list-style-type: none"> 25gを使用 (2.5x2.5x2.5cm) Glycine/Tris/beef extract緩衝液40mLで洗浄20分 	<ul style="list-style-type: none"> 0.3-5Lを電化膜ろ過 Glycine/tris/beef extractバッファで溶出 	<ul style="list-style-type: none"> PBS拭取リスアップ (10x10cm) RNA抽出用の溶解溶液490uLで抽出 	<ul style="list-style-type: none"> 50gを使用 2-5インチに切断 グリシンバッファ-55mLを用いて洗浄15分 	<ul style="list-style-type: none"> 50gを使用 Glycine/tris/beef extract緩衝液30mLで洗浄15分 	
前処理	<ul style="list-style-type: none"> 10,000rpm x 20分 PEG/NaCl沈殿 	<ul style="list-style-type: none"> PEG/NaCl沈殿 	<ul style="list-style-type: none"> PEG/NaCl沈殿 	<ul style="list-style-type: none"> 3,000 x g, 5分 	<ul style="list-style-type: none"> PEG/NaCl沈殿 	<ul style="list-style-type: none"> 4,000 x g, 15分 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> 低速心(9,000-12,000 x g, 15-30分) 超速心 (170,000 x g, 45-60分) 		
RNA抽出	シリカカラム			シリカカラム			シリカカラム			
遺伝子検出	逆転写にてcDNA合成			1step RT-qPCR			1step RT-qPCR			

