

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)
「食中毒原因ウイルス等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした失活法の
開発のための研究」
分担研究報告書

パンソルビン・トラップ法による食品からの
ウイルス検出法に関する検討

研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	斎藤 博之	秋田県健康環境センター
	秋野 和華子	秋田県健康環境センター

研究要旨

ノロウイルスによる食中毒事件発生時に、原因食品を特定することは汚染経路の解明など行政処分等の科学的な根拠となるほか、食中毒の未然防止のための具体的対策へ寄与することになる。

食中毒の原因となるウイルスは基本的に食品中で増殖しないため、食品に含まれるごく微量のウイルスを検出する必要があること、ノロウイルスをはじめとする食中毒にはさまざまな食品が関与することから、汎用性の高い食品検査法の整備は重要な課題である。

本研究では食中毒事件で実施される食品からのノロウイルス検出における汎用性の高い食品処理法としてパンソルビン・トラップ法について、現在の試薬入手性や、実施手順の確認を、冷凍ベリーや食パンなどいくつかの食品に対してウイルスの添加回収実験により確認した。

A. 研究目的

食中毒発生時の食品検査において、ノロウイルス等の原因ウイルスの検出率向上は、食中毒事件において行政処分等への科学的根拠となるほか、食中毒未然防止のための具体的対策へ寄与することが期待される。

一方で、ノロウイルス等による食中毒事件では、調理従事者からの汚染により、多種多様な食品が汚染される可能性があり、食品検査に供される食品のバリエーティ

が広く、食品処理には高い汎用性が求められる。

また、食品中に含まれる原因ウイルスは細菌と異なり食品中では増殖しないためごく微量のウイルスを回収、検出するという感度の高さも同時に求められる。

汎用性の高さ、高い検出感度の両者をそなえた食品の処理法として、パンソルビン・トラップ法(食品衛生検査指針 微生物編 2018年、Hiroyuki Saito, et al., Food and Environmental Virology, 7(3), 239-

248, 2015) を厚労省研究班にて開発したが、本法の現時点での試薬入手性や、さまざまな食品への対応を想定した添加回収実験を実施し、改善点の確認を行った。

また、秋田県にて 2019 (令和元年) 年から 2022 年 (令和 4 年) の間に発生したウイルス性食中毒事件においてパンソルビン・トラップ法にて食品からノロウイルスを検出した実績について調査した。

B. 研究方法

1. パンソルビン・トラップ法の手順等確認

1) 食品検体

市販の冷凍ベリー、塩おにぎり、食パン、刻みのりを用いた。

2) 添加ウイルス

ノロウイルス GI、GII、A 型肝炎ウイルス、および Mengovirus を添加回収用ウイルスとして用いた。各食品 10g に 10^5 コピー程度のウイルスを添加した。

3) 試薬類

- ・パンソルビン (メルク 507861-50ML)
- ・ヒトガンマグロブリン (HDM Labs 140103)
- ・RNA 抽出試薬 (QIAGEN QIAamp viral RNA mini kit 52906))
- ・1 Step RT-qPCR 試薬 (Thermofisher Scientific TaqMan™ Fast virus 1 step master mix 4444432)

2. パンソルビン・トラップ法の実績

秋田県健康環境センターにて令和 1-4 年に実施したウイルス性食中毒における食品検査での、パンソルビン・トラップ法によるノロウイルス検出の実績について情

報提供を受けた。

C. 研究結果

1. 食品への添加回収試験 (表 1)

1-1. 冷凍ベリー

合計 17 回の添加回収試験を実施した。うち 8 回は食品洗浄液を pH9.0 以上に調整して実施した。

Mengovirus および A 型肝炎ウイルスの回収成績はそれぞれ 4/17、12/17 であった。食品洗浄液が pH9.0 以上の場合、A 型肝炎ウイルスの回収成績は 8/8 となった。

食品洗浄液の pH が高いほうが回収成績が良かった。

GI ノロウイルスは 6 回、GII ノロウイルスは 8 回の添加回収試験 (すべて食品洗浄液 pH9.0) を実施し、回収成績は 6/6 8/8 であった。

1-2. 塩おにぎり

合計 11 回の添加回収試験を実施した。うち 2 回は食品洗浄液を pH9.0 以上に調整した。

GI ノロウイルス、GII ノロウイルス、A 型肝炎ウイルス、Mengovirus の回収成績はそれぞれ、11/11、11/11、11/11、5/11 となった。pH9.0 以上への調整を実施しなくても高い回収成績を示した。

1-3. 食パン

合計 10 回の添加回収を実施した。

A 型肝炎ウイルス、Mengovirus の回収成績はそれぞれ 10/10、5/10 となった。食品洗浄液 pH9.0 以上の場合、それぞれ 2/2、0/2 となった。

1-4. 刻みのり

1回のみ実施した。A型肝炎ウイルスは検出できたが、Mengovirusは検出できなかった。

2. 秋田県でのパンソルビン・トラップ法によるノロウイルス検出実績 (表2)

令和1-4年(2019-2022)に秋田県でウイルス性食中毒として立件された事件数は合計7件、うち食品検査を実施したのは4件、検査を実施した食品検体数は合計83検体であった。

83検体のうちノロウイルスが検出された食品は合計7検体であった。

また、食中毒事件の食品検体については含まれるウイルスがごく微量であることを考慮して、逆転写反応後に、PCRを1回実施してから nested real-time PCR を実施していた。

2-1. 令和元年

ウイルス性食中毒2件
食品検査実施1件
食品検体12検体
ノロウイルス検出3検体

2-2. 令和2年

ウイルス性食中毒2件
食品検査実施0件
食品検体0検体
ノロウイルス検出0検体

2-3. 令和3年

ウイルス性食中毒2件
食品検査実施2件
食品検体33検体
ノロウイルス検出3検体

2-4. 令和4年

ウイルス性食中毒1件
食品検査実施1件
食品検体38検体

ノロウイルス検出1検体

D. 考察

パンソルビン・トラップ法に用いる試薬について、現時点で入手困難なものはないことが確認できた。

さまざまな食品への添加回収試験において、ノロウイルス、A型肝炎ウイルスともに、パンソルビン・トラップ法で成績良く回収できること(10^4 コピー/g程度のウイルス量)が示されたが、冷凍ベリーに関しては食品洗浄液のpHが9.0以上の場合に回収成績が良くなることが示された。

また、ISO15216-1(食品からのノロウイルス、A型肝炎ウイルスの検出法)にて示されている工程管理用のMengovirusの添加回収については、ウイルスの検出成績が試行回数の半分以下であり、パンソルビン・トラップ法の工程管理ウイルスとしては不適と考えられた。

実際の食中毒事件におけるパンソルビン・トラップ法の実績は食品検査を実施した4事件すべてで食品からノロウイルスを検出しており、検出率が高いことが改めて示された。

E. 結論

当初の計画にそって、パンソルビン・トラップ法の使用試薬の入手性、および作業手順の確認を実施し、現状の課題を抽出できた。

また、実際の食中毒事件での実用にむけ、検出限界の検討およびrealtimePCRの感度向上策(nested realtimePCRの適用や、デジタルPCRやNGSの適用など)について検討を進める他、ラボ間再現性の確認を進める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

- 1) Masashi Uema, Kenzo Yonemitsu, Yoshimasa Sasaki, Hiroshi Asakura. Detection of hepatitis E virus RNA from pig bile collected at a slaughterhouse in Japan. AIMS Microbiology, 2022, 8(4): 566-574.

2. 学会発表：

- 1) 食品のノロウイルス汚染検出法としてのパンソルビン・トラップ法の有用性の検討 斎藤博之、秋野和華子、野田衛、上間匡. 日本ウイルス学会、2022. 11. 長崎

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

表 1 各種食品へのウイルス添加回収試験の検出成績

	GI NoV	GII NoV	HAV	Mengovirus	
冷凍ベリー	6/6 (6/6)	8/8 (8/8)	12/17 (8/8)	4/17 (1/12)	pH9.0 以上
塩おにぎり	11/11 (2/2)	11/11 (2/2)	11/11 (2/2)	5/11 (2/2)	pH9.0 以上
食パン			10/10 (2/2)	5/10 (0/2)	pH9.0 以上
刻みのり			1/1	0/1	

NoV: ノロウイルス

HAV: A 型肝炎ウイルス

添加ウイルス 10^5 コピー/10g 食品

Thermofisher TaqMan Fast virus 1-step master mix にて実施

表 2 秋田県健康環境センターでの食品検査実績

年度	ウイルス性 食中毒件数	食品検査実 施事件数	食品検体数	NoV 検出食 品検体数	備考
2019(R1)	2	1	12	3	1 事件は食 品検査なし
2020(R2)	2	0			
2021(R3)	2	2	10, 23	2, 1	検出成績 2/10、1/23
2022(R4)	1	1	38	1	