

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」

分担報告書

食品からのウイルス検出法における食品処理法の汎用性に関する研究

研究分担者	上間匡	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	南村幸世	国立医薬品食品衛生研究所
	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

研究概要

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食品処理法としてパンソルビン・トラップ法と、ISO15216-1:2017 に示される PEG/NaCl 沈殿法について、さまざまな食品を対象にウイルスの添加回収試験を実施し、それぞれの食品処理法の汎用性について比較を行った。塩むすび、冷凍ベリー、野菜スティック、味付きとろろなど、両方法ともにある程度の汎用性の高さを示したが、実際の食中毒検体では食品中のウイルス量はごく微量であることから、今後は検出限界等について詳細な検証が必要である。

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ションが広く、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。

汎用性の高い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) について、令和4年度本研究班にて、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ところ、冷凍ベリーなど一部の食品において、パンソルビン・トラップ法が苦手とする食材が存在することが示されたことから、パンソルビン・トラップ法に加えて、ISO15216-1:2017にて示されるPEG/NaClを食品洗浄液に加えて遠心、沈殿させてウイルスを分離回収する手順(PEG/NaCl沈殿)と、パンソルビン・トラップ法で、複数の食品を対象に、両方法の汎用性について検討した。

また、福島県にて2019(令和元年)年から2022年(令和4年)の間に実施されたパンソルビン・トラップ法と細菌培養処理法の比較検証に関する報告書を入手し、両者の比較について調査した。

B. 研究方法

1) 検体に供した食品

冷凍ベリー

野菜スティック

レタスサラダ

ネバネバサラダ(オクラ、メカブなど)

味付きとろろ

塩むすび

卵の花

ひじきの煮物

ポテトサラダ

食パン

ホットケーキ

刻みのり

2) 添加回収試験に用いたウイルス液

ノロウイルス GII (4.5×10^4 copies/5uL)

A型肝炎ウイルス (6.0×10^4 copies/5uL)

Mengovirus (10^5 copies/5uL 程度)

MS2 (12.5×10^6 copies/5uL)

ウイルスのコピー数はQIAcuity ONE(QIAGEN社)デジタルPCRにて定量した数値より算出した。

ノロウイルスおよびA型肝炎ウイルスは原液あるいは、1000倍希釈したウイルス液を各5uL食品に添加した。

Mengovirus およびMS2は工程管理ウイルスとして希釈せずに5uL添加した。

3) 食品処理手順

パンソルビントラップ法、およびPEG/NaCl沈殿の両法の概要を表1に示した。

4) RNA抽出

食品処理後の核酸抽出は磁気ビーズ法により実施した。

5) リアルタイムPCR

核酸抽出後のRNAは、TaqMan Fast Virus 1-Step Master mix (ThermoFisher社)にて1 Step RT-qPCRを実施した。

6) 細菌培養処理法とパンソルビントラップ法の比較

令和元年、令和4年に福島県衛生研究所にて実施された「食品等からのウイルス濃縮法の検討」について、福島県衛生研究所年報の当該報告書を入手し分析した。

C. 研究結果

1) パンソルビントラップ法(高濃度ウイルス液添加)

高濃度のウイルス液（原液）を添加した場合の、試験回数と、陽性数、平均 Ct 値を表 2 に示した。

高濃度のウイルス液の添加回収試験ではノロウイルス、A 型肝炎ウイルスともにウイルスが回収されることが示されたが、A 型肝炎ウイルスを冷凍ベリーに添加した場合に、陽性率が 36/55 となったほか、ノロウイルスでも 41/44 と検出できない場合があることが示された。工程管理のために添加した Mengovirus は陽性率が低い結果となった。

2) パンソルビントラップ法（低濃度ウイルス液添加）

表 3 に 1000 倍希釈した低濃度ウイルス液による添加回収試験の結果を示した。

ノロウイルスが 45copies/5uL、A 型肝炎ウイルスが 60copies/5uL の添加となる。陽性率は冷凍ベリーでノロウイルス 63.2%、A 型肝炎ウイルス 36.8%と低下した。また、ネバネバサラダ、ポテトサラダ、ひじきの煮物、卵の花などの陽性率も低い結果となった。

3) ISO 法 ; PEG/NaCl 沈殿（高濃度ウイルス液添加）

パンソルビントラップ法との比較のために PEG/NaCl 沈殿を利用する ISO 法の手順で添加回収試験を実施した（表 4）。

パンソルビントラップ法では陽性率が低かった A 型肝炎ウイルスの陽性率も高い結果となった。工程管理のために添加した Mengovirus、MS2 ともに高い陽性率を示した。

4) ISO 法 ; PEG/NaCl 沈殿（低濃度ウイルス液添加）

添加回収試験の結果を表 5 に示した。

冷凍ベリーへの添加回収ではノロウイルス、A 型肝炎ウイルスともにパンソルビントラップ法より陽性率が高い結果となった。一方でネバネバサラダではウイルスを検出することができなかったが、塩むすびではすべての試行でウイルスを検出することが可能であった。

5) 福島県衛生研究所による細菌培養処理法とパンソルビントラップ法の比較

添加回収試験をノロウイルス（令和元年）、サポウイルス（令和 4 年）を用いて実施していた。模擬食品として表 6 に示す 10 品目を用いていた。福島県衛生研究所年報より、細菌培養処理法とパンソルビントラップ法による各食品からの検出状況について抜粋し、表 6 に示した。

ノロウイルスについては、パンソルビントラップ法では 10 品目のうち 4 品目からウイルス検出がされたのに対して、細菌培養処理法では 6 品目からウイルスが検出されていた。Ct 値については両方法で大きな差はないと思われた。

サポウイルスについては、パンソルビントラップ法で 10 品目のうち 1 品目でのみウイルス検出されたのに対して、細菌培養処理法では 10 検体でウイルス検出がされ、細菌培養処理法が優れていることが示唆された。

D. 考察

本研究では、パンソルビントラップ法と ISO 法 (PEG/NaCl 沈殿) の食品処理方法の比較のみに焦点をあてるために、核酸抽出や RT-qPCR については手順を統一した。パンソルビントラップ法と ISO 法 (PEG/NaCl 沈殿

法)を比較したところ、両方法ともにさまざまな食品への処理法として利用できる可能性が示された。

食中毒事件における食品検査の際には、食品検体に含まれるウイルス量が微量であることが想定されるため、低濃度のウイルスの添加回収試験を実施した。ISO法が冷凍ベリー、塩むすびにおいて高い陽性率を示したのに対して、試行回数はまだ十分ではないが、とろろやネバネバサラダといった粘性の高い食材でウイルス検出がむずかしかった。

パンソルビントラップ法でも粘性の高い食品については陽性率は低いことから、今後これら粘性の高い食品への対応策を考慮する必要がある。

工程管理に用いるウイルスについては、IS015216-1に示される Mengovirus は市販品も存在するが、パンソルビントラップ法では一貫して陽性率が低く工程管理に用いることが難しいと考えられた。代替のウイルスとして、大腸菌ファージの一種で、水質検査のISO法などで利用されるMS2を用いたところ、パンソルビントラップ法で工程管理に用いることが可能と示唆された。

ISO法(PEG/NaCl沈殿)では、Mengovirus、MS2ともにパンソルビントラップ法よりも良好に回収された。パンソルビントラップ法によるウイルス回収が使用するガンマグロブリンの性能に依存するためと考えられたが、流通する製品ロットが1ロットとなっており、ロット間の差を比較することが不可能となっている。今後国内で試験研究目的での使用可能な他のガンマグロブリン試薬について検討することも新たな課題となった。

福島県衛生研究所にて実施された研究報告によるとパンソルビントラップ法よりも細菌培養処理法のほうがノロウイルス、サポウイルスともにウイルス検出の成績に優れていることが報告されている。令和5年度本研究で実施した検討と、福島県衛生研究所で実施した検討に用いたウイルス、核酸抽出試薬、PCR試薬等が同一でないため単純な比較はできないが、細菌培養処理法も汎用性の高い処理法の一つとして有用な処理法であると考えられる。

E. 結論

パンソルビントラップ法はその原理から汎用性の高さ、検出感度の高さが期待されるが、冷凍ベリーや葉物野菜を対象としてISO法(PEG/NaCl沈殿)も、パンソルビントラップ法と同様に汎用性が高い可能性が示された。

とろろや、オクラ・メカブ等が材料となる粘性の高いネバネバサラダなどの食品については、ISO法、パンソルビントラップ法ともにウイルス検出率が低くなるため、改良が必要と思われる。

現時点ではあらゆる食品に対応するにはいくつかの処理法を実施できるほうが食中毒検査に柔軟に対応できると考えられる。

貴重なデータ報告の情報を提供いただいた福島県衛生研究所の齋藤先生に感謝いたします。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

- 1) Recent situation of foodborne viruses in Japan. Mari Tohya, Masashi Uema. UJNR 55th Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting (2023. 08. 08), 米国
- 2) パンソルビン・トラップ法により給食材料からノロウイルスが検出された食中毒の一例. 斎藤博之, 秋野和華子*, 野田衛、上間匡. 第44回日本食品微生物学会学術総会 (2023. 09. 21)
- 3) 冷凍ベリーからのウイルス検出法の検討. 上間匡, 南村幸世, 斎藤博之, 秋野和華

子 第44回日本食品微生物学会学術総会 (2023. 09. 21)

- 4) 近年の試薬の供給状況を反映したパンソルビン・トラップ法プロトコールのアップデート. 斎藤博之, 秋野和華子*, 野田衛、上間匡. 第70回日本ウイルス学会学術集会 (2023. 09. 26)

G. 知的財産権の出願・登録

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表 1. 食品処理方法の概要

	パンソルビントラップ法	ISO15216-1 (PEG/NaCl 沈殿)
食品検体量	10g	25g
食品洗浄液	50mL (Tris-HCl/NaCl/Tween20)、 ガンマグロブリン、 パンソルビン	40mL (Glycine/Tris/beef extract buffer) PEG NaCl
遠心条件	3,000 rpm, 20min	10,000xg, 30min, 4°C

表 2. ウイルス検出率 (パンソルビントラップ法、高濃度)

ノロウイルス GII (4.5×10^4 copies/5uL)、A 型肝炎ウイルス (HAV (6.0×10^4 /5uL)), Mengovirus (10^5 copies/5uL 程度), MS2 (12.5×10^6 copies/5uL)

	ノロウイルス	A 型肝炎ウイルス	Mengo	MS2
冷凍ベリー	41/44 (93.2%) Ct 値 29.0	36/50 (72.0%) Ct 値 29.3	10/50 (20.0%) Ct 値 37.6	30/34 (88.2%) Ct 値 33.7
塩むすび	33/34(97.1%) Ct 値 29.1	34/34 Ct 値 29.5	10/34 (29.4%) Ct 値 35.5	21/21 Ct 値 32.3
野菜スティック	23/23 Ct 値 29.1	23/23 Ct 値 26.9	9/23 (39.3%) 36.4	16/16 Ct 値 33.2
刻みのり	Not tested	3/3 Ct 値 30.6	0/3	Not tested
食パン	Not tested	9/9 Ct 値 29.1	5/9 (55.6%) Ct 値 33.8	Not tested
ひじきの煮物	3/3 Ct 値 35.1	4/4 Ct 値 32.8	0/4	Not tested
ホットケーキ	3/4(75.0%) CT 値 24.7	4/4 Ct 値 32.3	0/4	Not tested
卵の花	2/2 Ct 値 31.8	4/4 Ct 値 30.5	0/4	Not tested
ネパネバサラダ	4/4 Ct 値 36.8	Not tested	Not tested	Not tested

表3. ウイルス検出率（パンソルビントラップ法、低濃度）

ノロウイルス GII(45 copies/5uL)、A 型肝炎ウイルス (HAV(60 copies/5uL)), Mengovirus (10⁵copies/5uL 程度), MS2 (12.5x10⁶ copies/5uL)

	ノロウイルス	A型肝炎ウイルス	Mengo	MS2
冷凍ベリー	12/19 (63.2%) Ct値 37.1	9/17 (36.8%) Ct値 36.9	3/15 39.3	Not tested
ネバネバサラダ	3/25(12%) Ct値 37.7	1/25 (4%) Ct値 37.9	0/25	Not tested
ポテトサラダ	1/3 (33.3%) Ct値 37.0	2/3 (66.7%) Ct値 35.5	1/3 36.7	Not tested
ひじきの煮物	0/4 (0%)	1/4 (25.0%) Ct値 38.9	0/4	Not tested
卵の花	1/4 (25.0%) Ct値 37.0	1/4 (25.0%) Ct値 36.9	0/4	Not tested

表4. ウイルス検出率（ISO 法、高濃度）

ノロウイルス GII(4.5x10⁴copies/5uL)、A 型肝炎ウイルス (HAV(6.0x10⁴/5uL)), Mengovirus (10⁵copies/5uL 程度), MS2 (12.5x10⁶ copies/5uL)

	ノロウイルス	A型肝炎ウイルス	Mengo	MS2
冷凍ベリー	21/21 (100%) Ct値 29.0	30/31 (96.8%) Ct値 28.0	39/39 Ct値 31.6	17/17 Ct値 26.9
野菜スティック	8/8 Ct値 27.9	8/8 Ct値 28.4	8/8 Ct値 30.5	
茄子		8/8 Ct値 29.0	8/8 Ct値 33.7	
レタスサラダ	7/7 Ct値 25.5	7/7 Ct値 27.5	7/7 Ct値 29.8	3/3 Ct値 23.9

表 5. 表 3. ウイルス検出率 (ISO 法、低濃度)

ノロウイルス GII(45 copies/5uL)、A 型肝炎ウイルス (HAV(60 copies/5uL)), Mengovirus (10⁵copies/5uL 程度), MS2 (12.5x10⁶ copies/5uL)

	ノロウイルス	A 型肝炎ウイルス	Mengo	MS2
冷凍ベリー	36/48 (75.0%) Ct 値 32.9	32/52 (61.5%) Ct 値 34.2	52/52 Ct 値 32.9	36/36 Ct 値 26.6
ネバネバサラダ	0/2	0/2	0/2	2/2 Ct 値 37.8
味付きとろろ	0/4	1/4 (25.0%) Ct 値 35.2	4/4 Ct 値 36.0	4/4 Ct 値 29.9
塩むすび	4/4 Ct 値 36.1	4/4 Ct 値 34.5	4/4 Ct 値 33.4	4/4 Ct 値 23.7

表 6. 細菌培養処理法とパンソルビントラップ法の比較 (福島県衛生研究所年報より抜粋して作成) 数値は Ct 値

	細菌増殖処理法		パンソルビントラップ法	
	GII ノロウイルス	サポウイルス	GII ノロウイルス	サポウイルス
焼きそば	37.1	36.2	38.7	40.4
食パン	36.6	39.9	ND	ND
メンチカツ	39.4	36.7	39.7	ND
刺身 (マグロ、サーモン) まぐろすき身	ND	39.7	ND	ND
ミックスサラダ	ND	36.5	ND	ND
加熱調理済みカット野菜	38.4	38.9	38.7	ND
ワラビとゼンマイの煮物	38.5	37	ND	ND
サバの水煮	39	38.6	39.6	ND
おかゆ	ND	37.7	ND	ND
焼き海苔	ND	36.7	ND	ND