

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」

総合研究分担報告（令和4～6年度）

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

齋藤博之 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行政処分等の科学的な根拠となるほか、汚染経路の解明、特定は、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、特に食品から原因ウイルスを効率よく精製、抽出する食品処理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等に示されるPEG/NaCl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、食品中に数十コピー程度のウイルスが含まれていれば検出可能であることを示した。しかし、実際の食中毒では1事件で多数（数十種類）の食品検体のうちわずか1検体からのみ検出されるなど、作業量と成果には乖離があり、人員が限られる中効率よく検査を進めるために、汚染頻度の高い食品に関するデータの整備なども今後必要と考えられた。

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、汚染食品の特定により、食品へのウイルス汚染経路が明らかになるなど、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。

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

戻しわかめ（乾燥わかめを水で戻したもの）

味付きめかぶ

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，100 倍，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図に示した。

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。

C. 研究結果

1) パンソルビントラップ法（100 倍希釈ウイルス液添加）（表 1）

100 倍に希釈したウイルス液を添加した場合の，試験回数と，陽性数，平均 Ct 値を表 1 に示した。ノロウイルスが 450copies/ μ L，HAV が 600copies/ μ L 程度の添加となる。

冷凍ベリー，野菜スティック，塩むすび，食パン，レタスサラダ，味付きめかぶにおいて，パンソルビン・トラップ法は高い検出率を示した．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（1000 倍希釈ウイルス液添加）（表 2）

表 2 に 1000 倍希釈した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．冷凍ベリーでのノロウイルス検出率が 15/25，HAV が 12/25 と検出できない場合が増加した．他の食材においても検出が難しくなった．

3) PEG/NaCl 沈殿（100 倍希釈ウイルス液添加）（表 3）

パンソルビントラップ法との比較のために PEG/NaCl 法による添加回収試験を実施した（表 3）．

パンソルビントラップ法でと比較して，食パンからの検出率が非常に悪くなったほか，味付きめかぶでもウイルスの検出が難しくなった．

味付きとろろや冷凍とろろは粘性が高いが，添加したノロウイルス，HAV 共によく検出された．

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) PEG/NaCl 沈殿（1000 倍希釈ウイルス液添加）（表 4）

添加回収試験の結果を表 4 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．塩むすびについては，パンソルビン・トラップ法ではノロウイルスが検出できなかったのに対して，PEG/NaCl 法では 8/16 の検出率となった．戻しわかめ，ネバネバサラダ，ひじきの煮物などはパンソルビン・トラップ法と同程度の低い検出率となった．

D. 考察

本研究では，パンソルビントラップ法と 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 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．表 4，5 の検出率から，パンソルビン・トラップ法，PEG/NaCl 法共に，食品からの検出限界は，食品処理に用いる食品中に存在するウイルスが，数十コピー程度であることが示唆された．

非加熱でかつ，食品取扱時に直接手で扱うことも想定されるとろろなどの粘性の高い食材でウイルス検出が難しく，粘性の原因となる成分への対処が今後解決すべき課題として残った．

工程管理に用いるウイルスについては，ISO15216-1 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やPEG/NaCl法で工程管理に用いることが可能と示唆された。

PEG/NaCl法では、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に使用するガンマグロブリンの性能に依存すると考えられたが、国内で流通する製品ロットが1ロットとなっており、ガンマグロブリンの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。

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PEG/NaCl沈殿も、汎用性が高い可能性が示された。

とろろや、オクラ・めかぶ等が材料となる粘性の高い食品については、パンソルビントラップ法、PEG/NaCl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。粘性の原因となるムチンなどの処理法について対処法は新たな課題となった。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uema M, Yonemitsu K, Sasaki Y, Asakura H. 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) Mari Tohya, Masashi Uema. Is Hepatitis E virus emerging in Japan? 8th international Society for Food and Environmental Virology conference, 2024. June 9-14. Tokyo.
- 2) Masashi Uema, Mari Tohya. Detection of Norovirus from food related to food poisoning incidents in Japan. 13th International Symposium on Toxic Microorganisms, UJNR. Sep 17, 18. Tokyo.
- 3) Mari Tohya, Masashi Uema. Update on epidemiology and research of HEV in Japan. 13th International Symposium on Toxic Microorganisms, UJNR. Sep 17, 18. Tokyo.
- 4) 上間匡, 南村幸世, 遠矢真理, 斎藤博之. 多様な食品からのウイルス検出のための食品処理方法の検討. 第45回日本食品微生物学会, 2024. 9/5, 6. 青森.
- 5) 遠矢真理, 南村幸世, 上間匡. 下水試料からのウイルス検出法の比較. 第45回日本食品微生物学会, 2024. 9/5, 6. 青森.
- 6) 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛, 上間匡. パンソルビン・トラップ法プロトコルのアップデートに関する検討. 第45回日本食品微生物学会, 2024. 9/5, 6. 青森.
- 7) 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛, 上間匡. 病院給食の調理品からパンソルビン・トラップ法によりノロウイルスを検出した食中毒の一例. 第71回日本

ウイルス学会学術集. 2024. 11/4-6. 愛知県.

- 8) 齋藤博之, 秋野和華子, 野田衛, 上間匡. 食品中のウイルスを検出すパンソルビン・トラップ法の開発と実事例への適用. 第76回日本細菌学会東北支部総会・学術集会. 2024. 8/19, 20. 秋田県.
- 9) 齋藤博之, 秋野和華子, 野田衛, 上間匡. 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. 第44回日本食品微生物学会学術総会. 2023. 9/21, 22, 大阪府.
- 10) 上間匡, 南村幸世, 齋藤博之, 秋野和華子. 冷凍ベリーからのウイルス検出法の検討. 第44回日本食品微生物学会学術総会. 2023. 9/21, 22, 大阪府.
- 11) 齋藤博之, 秋野和華子*, 野田衛, 上間匡. 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. 第70回日本ウイルス学会学術集会. 2023. 9/26-28, 宮城県.
- 12) 遠矢真理, 南村幸世, 國吉杏子, 秋野和華子, 齋藤博之, 上間匡. NGSを活用した下水疫学調査によるノロウイルスの流行状況の把握. 日本食品衛生学会. 2023. 10/12, 13, 東京都.
- 13) 齋藤博之, 秋野和華子, 野田衛, 上間匡. 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. 日本ウイルス学会, 2022. 11/13-15, 長崎県.

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

☒ 食品処理手順

パンソルビン・トラップ法による食品処理手順

1. 食品 10g
フィルター付きストマッカー袋に入れる
↓
2. 50mL の食品洗浄液を加える
↓
3. 室温 15分 超音波洗浄あるいは手で揉む
↓
4. フィルター濾過液 45mL を遠心チューブへ移す
↓
5. 室温 30分 3,000 RPM で遠心する
↓
6. 遠心上清を新しいチューブへ移す
↓
7. ガンマグロブリン, パンソルビンを添加, 混合
↓
8. 37度 15分 静置
↓
9. 室温 20分 3,000RPM で遠心する
↓
10. 沈渣に RNA 抽出キットの Lysis Buffer 等を加えて懸濁する

- ・食品洗浄液 0.1M Tris/HCl, 0.5% NaCl, 0.1% Tween 20, pH8.4)
- ・パンソルビン・トラップ法 Hiroyuki Saito, et al., Food and Environmental Virology, 7(3), 239-248, 2015 DOI: 10.1007/s12560-015-9191-7
- ・乾燥食品の場合は, 滅菌水などを加えてから食品洗浄液を加える
- ・検体が 10g に満たない場合は全量を用いる

PEG/NaCl 法による食品処理手順

1. 食品 25g
フィルター付きストマッカー袋に入れる
↓
2. 40mL の食品洗浄液を加える
↓
3. 室温 20分 60RPM で振盪
↓
4. フィルター濾過液 45mL を遠心チューブへ移す
↓
5. 4度 30分 10,000 g で遠心する
↓
6. 遠心上清を新しいチューブへ移す
↓
7. 5x PEG/NaCl 溶液 10mL 加える
↓
8. 室温 1分 60RPM で振盪してよく混和する
5度 60分 60RPM で振盪
↓
9. 4度 30分 10,000 g で遠心, 上清は捨てる
↓
10. ペーパータオル上に逆さに静置するなどしてチューブ内の水分を除く
↓
11. PBS 500 μ L で懸濁する
↓
12. クロロホルム/ブタノールを加える
↓
13. 4度 10,000 g で15分遠心して水相を新しいチューブへ移す

・ 5x PEG/NaCl 溶液 (PEG 500g/L, 1.5M NaCl)

・ ベリー類など食品洗浄液の pH が低下する食品は、あらかじめ pH9 以上に食品洗浄液を調整する

表1. ウイルス検出率 (パンソルビントラップ法, 100 倍希釈ウイルス液添加)

	GII (450copies/5 μ l)	HAV (600copies/5 μ l)	Mengovirus	MS2 (12.5 \times 10 ⁶ /5 μ l)
冷凍ベリー	2/4	4/4	0/4	実施せず
	Ct 値: 35.0	Ct 値: 32.4		
野菜スティック	6/6	6/6	4/6	6/6
	Ct 値: 33.0	Ct 値: 32.6	Ct 値: 37.7	Ct 値: 32.2
塩むすび	21/33	33/33	9/33	33/33
	Ct 値: 33.9	Ct 値: 33.4	Ct 値: 37.5	Ct 値: 33.1
食パン	5/9	9/9	2/9	9/9
	Ct 値: 33.6	Ct 値: 33.0	Ct 値: 37.8	Ct 値: 32.2
レタスサラダ	4/6	6/6	1/6	6/6
	Ct 値: 32.2	Ct 値: 31.1	Ct 値: 36.8	Ct 値: 32.4
戻しわかめ	8/8	8/8	2/8	8/8
	Ct 値: 34.8	Ct 値: 34.2	Ct 値: 40.9	Ct 値: 34.0
味付きめかぶ	7/18	12/18	1/18	18/18
	Ct 値: 36.4	Ct 値: 37.0	Ct 値: 39.9	Ct 値: 38.7

表2. ウイルス検出率 (パンソルビントラップ法, 1000 倍希釈ウイルス液添加)

	GII (45copies/5 μ l)	HAV (60copies/5 μ l)	Mengovirus	MS2 (12.5 \times 10 ⁵ /5 μ l)
冷凍ベリー	15/25	12/25	5/21	8/8
	Ct 値: 37.3	Ct 値: 36.4	Ct 値: 38.2	Ct 値: 33.4
塩むすび	0/15	12/15	4/15	15/15
		Ct 値: 36.1	Ct 値: 37.7	Ct 値: 32.5
食パン	0/6	1/6	2/6	6/6
	Ct 値: 33.9	Ct 値: 36.0	Ct 値: 36.2	Ct 値: 31.3
レタスサラダ	1/3	3/3	3/3	3/3
	Ct 値: 36.6	Ct 値: 35.7	Ct 値: 37.7	Ct 値: 31.8
戻しわかめ	1/7	2/7	3/7	7/7
	Ct 値: 37.9	Ct 値: 37.3	Ct 値: 36.8	Ct 値: 37.7
ネバネバサラダ	3/25	1/25	0/25	
	Ct 値: 37.7	Ct 値: 37.9		
ひじきの煮物	0/4	1/4	0/4	
		Ct 値: 38.9		
卵の花	1/4	1/4	0/4	
	Ct 値: 37.0	Ct 値: 36.9		
ポテトサラダ	1/3	2/3	1/3	
	Ct 値: 37.0	Ct 値: 36.3	Ct 値: 36.7	

表 3. ウイルス検出率 (PEG/NaCl 法, 100 倍希釈ウイルス液添加)

	GII (450copies/5 μ l)	HAV (600copies/5 μ l)	Mengovirus	MS2 (12.5 \times 10 ⁶ /5 μ l)
冷凍ベリー	30/30	33/34	32/34	24/24
	Ct 値: 31.5	Ct 値: 33.2	Ct 値: 33.8	Ct 値: 27.2
野菜スティック	6/6	6/6	6/6	6/6
	Ct 値: 31.6	Ct 値: 32.8	Ct 値: 29.3	Ct 値: 24.9
塩むすび	10/10	9/10	10/10	10/10
	Ct 値: 33.3	Ct 値: 35.3	Ct 値: 34.6	Ct 値: 26.4
食パン	3/21	0/21	16/21	21/21
	Ct 値: 37.3		Ct 値: 35.4	Ct 値: 30.7
レタスサラダ	10/21	12/12	12/12	12/12
	Ct 値: 30.6	Ct 値: 29.7	Ct 値: 30.1	Ct 値: 24.5
戻しわかめ	7/9	7/9	6/9	9/9
	Ct 値: 36.0	Ct 値: 36.3	Ct 値: 38.4	Ct 値: 32.4
味付きめかぶ	0/13	0/13	0/13	0/13
ネバネバサラダ	3/15	3/15	1/15	14/15
	Ct 値: 36.2	Ct 値: 37.2	Ct 値: 39.0	Ct 値: 37.7
味付きとろろ	19/22	18/22	20/22	22/22
	Ct 値: 34.6	Ct 値: 35.0	Ct 値: 36.1	Ct 値: 29.8
冷凍とろろ	5/7	6/7	7/7	7/7
	Ct 値: 33.5	Ct 値: 34.5	Ct 値: 36.7	Ct 値: 29.8
ひじきの煮物	2/3	1/3	0/3	3/3
	Ct 値: 36.5	Ct 値: 36.7		Ct 値: 30.0
ポテトサラダ	3/3	2/3	3/3	3/3
	Ct 値: 35.6	Ct 値: 37.0	Ct 値: 35.7	Ct 値: 26.1

表 4. ウイルス検出率 (PEG/NaCl 法, 1000 倍希釈ウイルス液添加)

	GII (45copies/5 μ l)	HAV (60copies/5 μ l)	Mengovirus	MS2 (12.5 \times 10 ⁵ /5 μ l)
冷凍ベリー	36/48	32/52	52/52	36/36
	Ct 値: 32.9	Ct 値: 34.2	Ct 値: 32.9	Ct 値: 26.6
塩むすび	8/16	13/16	16/16	16/16
	Ct 値: 37.0	Ct 値: 36.6	Ct 値: 33.5	Ct 値: 26.4
食パン	0/11	1/11	6/11	11/11
		Ct 値: 42.1	Ct 値: 35.1	Ct 値: 31.9
レタスサラダ	3/3	2/3	3/3	3/3
	Ct 値: 34.7	Ct 値: 36.6	Ct 値: 31.3	Ct 値: 24.6
戻しわかめ	0/7	2/7	4/7	7/7
		Ct 値: 37.8	Ct 値: 38.1	Ct 値: 33.0
ネバネバサラダ	0/2	0/2	0/2	2/2
				Ct 値: 37.8
ひじきの煮物	0/3	0/3	0/3	3/3
				Ct 値: 32.2
味付きとろろ	0/4	1/4	4/4	4/4
		Ct 値: 35.2	Ct 値: 36.0	Ct 値: 29.9
ポテトサラダ	0/3	0/3	3/3	3/3
			Ct 値: 35.3	Ct 値: 26.3