

パンソルビン・トラップ法による食品検体からの ノロウイルスの回収検討(第1報)

東方 美保・川畑 光政*1・斎藤 博之*2・田中 智之*3・武田 直和*4

Examination of Pansorbin Trapping Method
as Concentration Detection of Norovirus from Food Samples (1)

Miho TOHO, Mitsumasa KAWABATA*1, Hiroyuki SAITO*2, Tomoyuki TANAKA*3, Naokazu TAKEDA*4

1. はじめに

ノロウイルス(NV)を原因物質とする食中毒検査において、推定原因食品からのウイルス検出が切望されている。しかし、効率的な濃縮法が存在しない現状では、多大な労力と時間をかけても、検出可能なケースが二枚貝・表面汚染・高濃度汚染等に限られ、偽陰性のまま原因食品の汚染が見逃されている可能性が高い^{1),2)}。

このような事態を打開するべく、平成19年度から、厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)「食品中のウイルスの制御に関する研究」班では、斎藤らによって開発されたパンソルビン・トラップ法(以下、パントラ法)を用いて、汚染させたモデル食品からのNV検出を試み、実用化に向けて検討を行っている^{3)~7)}。

その検討の一環として、現行の食品検査で汎用されているポリエチレングリコール(PEG)沈殿法による濃縮を並行して行い、これを比較対象として検出効率を評価した^{4),6)}。また、プロトコルの改良により検出効率の向上が確認できた^{5),6)}ので、その一部を併せて報告する。

2. 方法

2. 1 NV陽性糞便による食品の汚染

2. 1. 1 汚染実験に用いる食品

市販の10種の総菜(ナポリタン、マカロニサラダ、ポテトサラダ、まぐろ刺身、切り干し大根煮付、もやし和え物、鶏五目煮、れんこんの金平、きのこの白和え、ゴボウサラダ)を用いた。

2. 1. 2 汚染実験に用いる検出対象NV

2006年12月に福井市で発生した急性胃腸炎集団感染事例⁸⁾で搬入されたNV陽性糞便(Genogroup II/4型)を用いた。

2. 1. 3 NV陽性糞便による食品の汚染方法

NV陽性糞便をDWで10%乳剤とし、その遠心上清を汚染用NV原液とした。さらに10倍階段希釈で、10、100、1,000、10,000、100,000倍希釈液を作成した。

これらの汚染用NV原液または希釈液を各食品10gあた

り70 μ L加えて汚染させた。

2. 2 汚染食品からのウイルス濃縮

汚染させた食品10gに対して、PBS・0.1% Tween20を食品洗滌液として50mL加え懸濁させ、粗遠心(3,000rpmで20分、プロトコル改良後は3,000rpmで30分)を行った後の上清を分取し、パントラ法またはPEG沈殿法で濃縮した。

2. 2. 1 パンソルビン・トラップ法

汚染食品の粗遠心後の上清液50mLに、抗Genogroup II/4血清[国立感染症研究所より分与]⁹⁾を5 μ L加え、37°Cで30分反応させてNV-抗体複合体を作らせた。そこに黄色ブドウ球菌の菌体であるパンソルビン(PANSORBIN Cells [和光純薬; #501-43261])を300 μ L加え、さらに37°Cで30分反応させることでNV-抗体-パンソルビン複合体を形成させた。その後3,000rpmで20分遠心した沈殿を回収し、100 μ LのDWで懸濁してRNA抽出用サンプルとした。

2. 2. 2 PEG沈殿法

汚染食品の粗遠心後の上清液50mLに、PEG6000を4.00g、NaClを1.05g加え、振とうして完全に溶解させた後、4°Cで一晩放置し、遠心操作(8,500 $\times$ gで90分、または9,500 $\times$ gで20分)後の沈殿を、100 μ LのDWで懸濁してRNA抽出用サンプルとした。

2. 3 RNA抽出およびDNase処理

改良前のプロトコルでは、TRIzol-LS[invitrogen]を用いて抽出したRNAを、RNeasy Mini kit[QIAGEN]で精製した。

改良後のプロトコルでは、TRIzol-LSを用いてフェノール抽出した段階で分取した水層に、0.8容のエタノールを加え、RNeasy カラム(RNeasy Mini Kit [QIAGEN]の構成成分)で精製した。

DNase処理は、いずれの場合も、RNase-Free DNase Set [QIAGEN]を適用してRNeasy カラム上で処理した。

2. 4 NV遺伝子の定量測定

2. 4. 1 逆転写反応

10 μ L分のRNAをテンプレートとして、ランダムプライマー(Nona-deoxyribonucleotide mixture [TaKaRa])およびSuper Script III Reverse Transcriptase[invitrogen]を用いた逆転写反応により、20 μ LのcDNAを合成した。

2. 4. 2 コピー数の測定

厚生労働省通知¹⁰⁾に準じてNVのコピー数を測定した。すなわち2.4.1で得たcDNAの2 μ L分をテンプレートと

*1) 元福井県衛生環境研究センター

*2) 秋田県健康環境センター

*3) 堺市衛生研究所

*4) 元国立感染症研究所

して、TaqMan Universal PCR MASTER MIX[ABI]を用いてABI PRIZM 7900HT (384well version)[ABI]によりリアルタイム PCR 定量反応 (反応容量 20 μ L) を行った。陽性コントロールには国立感染症研究所より分与された陽性コントロール用プラスミドを用いた。陽性コントロールは3ウェル、他は2ウェルずつ反応を行い、平均を実測値とした。

3. 結果

3.1 汚染用 NV 原液で汚染した食品 (6 種) からの回収実験

6 種の総菜 (ナポリタン、マカロニサラダ、ポテトサラダ、まぐろ刺身、切り干し大根煮付、もやし和え物) を汚染用 NV 原液で汚染し、パントラ法および PEG 沈殿法で濃縮後、TRIzol-LS で抽出した RNA を RNeasy Mini Kit で精製して検査に用いた場合の回収実験結果を、図 1 および表 1 に示す。

RNA1 μ L あたりの実測値は、パントラ法の場合、 $3.8\text{E}+04 \sim 1.9\text{E}+05$ コピー/ μ L と安定しており、増幅曲線も「ポテトサラダ」以外の食品 5 種 (ナポリタン、マカロニサラダ、まぐろ刺身、切り干し大根煮付、もやし和え物) ではほとんど一致していた。

それに対し、PEG 沈殿法の場合、増幅曲線が食品の品目によりばらついており、測定値においても $4.6\text{E}+01 \sim$

$1.6\text{E}+05$ コピー/ μ L と差が大きかった。これにより、食品の種類や状態が、NV 遺伝子定量値に大きく影響することが改めて確認された。

また、PEG 沈殿法での測定値を基準とすると、パントラ法での測定値は食品の品目ごとにそれぞれ 0.33～830 倍に相当した (表 1)。

3.2 汚染用 NV 原液で汚染した食品 (8 種) からの回収実験 (プロトコル改良後)

8 種の総菜 (ナポリタン、マカロニサラダ、ポテトサラダ、まぐろ刺身、鶏五目煮、れんこんの金平、きのこの白和え、ゴボウサラダ) を汚染用 NV 原液で汚染し、汚染食品からのウイルス洗い出し後の遠心条件をより厳しく変更した (3,000rpm で 20 分 → 3,000rpm で 30 分) 改良プロトコルにより、パントラ法および PEG 沈殿法で濃縮後、TRIzol-LS+RNeasy の系で RNA 抽出を行った場合の回収実験結果を、図 2 および表 2 に示す。

3.1 と同様に、PEG 沈殿法では品目ごとにばらつきが大きかったのに対し、パントラ法では品目によらず一定の回収を見込むことができた (図 2)。

汚染食品からのウイルス洗い出し後の遠心条件をより厳しく変更したことで夾雑物の混入が抑えられ、プロトコル改良前と比べ、パントラ法で $2.6\text{E}+05 \sim 2.4\text{E}+06$ コピー/ μ L、PEG 沈殿法で $1.2\text{E}+03 \sim 2.0\text{E}+05$ コピー/ μ L と

表2. 食品種類別のNV測定値 (プロトコル改良後)

食品 (汚染用NV液には 原液使用)	測定値 (抽出RNA1 μ L あたりのコピー数)		PEG 沈殿法を 1とした ときの 効率 (倍)
	パンソルビン・ トラップ法	PEG沈殿法	
ナポリタン	3.9E+05	1.5E+05	2.70
マカロニサラダ	8.9E+05	2.5E+03	360.00
ポテトサラダ	1.5E+06	2.0E+05	7.60
まぐろ刺身	2.6E+05	6.8E+04	3.90
鶏五目煮	7.7E+05	4.9E+04	16.00
れんこんの金平	5.8E+05	6.6E+03	87.00
きのこの白和え	5.1E+05	1.3E+05	3.80
ゴボウサラダ	1.2E+06	1.2E+03	1000.00
食品なし	2.4E+06	1.3E+04	190.00

表1. 食品種類別のNV測定値

食品 (汚染用NV液には 原液使用)	測定値 (抽出RNA1 μ L あたりのコピー数)		PEG 沈殿法を 1とした ときの 効率 (倍)
	パンソルビン・ トラップ法	PEG沈殿法	
ナポリタン	4.2E+04	1.6E+04	2.60
マカロニサラダ	5.3E+04	1.6E+05	0.33
ポテトサラダ	1.9E+05	9.0E+04	2.10
まぐろ刺身	4.6E+04	1.7E+02	270.00
切り干し大根煮付	4.9E+04	7.8E+04	0.63
もやし和え物	3.8E+04	4.6E+01	830.00
食品なし	5.4E+04	1.3E+02	420.00

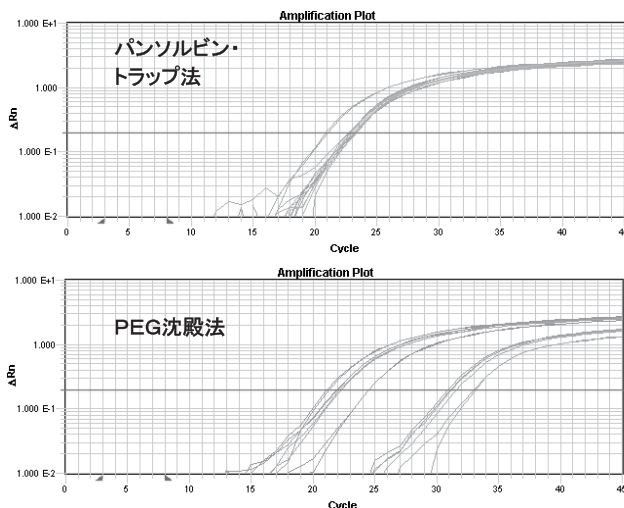


図1. 汚染モデル食品からのNV回収実験の増幅曲線 (濃縮法別)

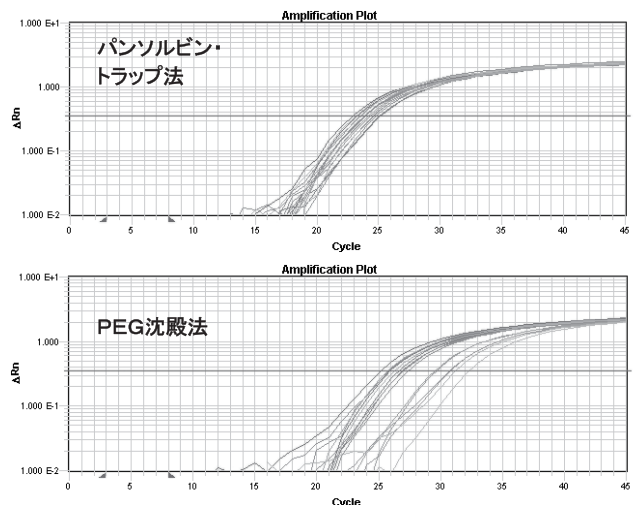


図2. 汚染モデル食品からのNV回収実験の増幅曲線 (濃縮法別, プロトコル改良後)

表3. 汚染用NV液希釈濃度別でのNV測定値(プロトコル改良後)

食品	汚染用NV液希釈濃度	測定値 (抽出RNA1μLあたりのコピー数)		PEG沈殿法を1としたときの効率(倍)
		パンソルビン・トラップ法	PEG沈殿法	
ナポリタン	原液*	3.9E+05	1.5E+05	2.70
	10倍希釈	9.9E+03	2.3E+03	4.30
	100倍希釈	1.4E+03	9.6E+01	15.00
	1,000倍希釈	1.2E+02	2.1E+01	5.70
マカロニサラダ	原液*	8.9E+05	2.5E+03	360.00
	10倍希釈	1.7E+05	7.2E+02	230.00
	100倍希釈	4.9E+03	2.0E+01	250.00
	1,000倍希釈	1.3E+02	7.1E+00	18.00
食品なし	原液*	2.4E+06	1.3E+04	190.00
	10倍希釈	2.4E+05	7.0E+02	340.00
	100倍希釈	2.3E+04	1.1E+02	200.00
	1,000倍希釈	1.3E+03	1.7E+00	750.00

*表2の再掲

高いレベルの測定値が得られた。

なお、全ての品目でパントラ法が PEG 沈殿法より高い値を示し、PEG 沈殿法での測定値を基準とすると、パントラ法での測定値は食品の品目ごとにそれぞれ 2.7～1000 倍に相当した。(表 2)。

3. 3 汚染用 NV 液で段階希釈的に汚染した食品(2 種)からの回収実験(プロトコル改良後)

3. 1 において、パントラ法の方がより測定値の高かった食品 4 種(ナポリタン、ポテトサラダ、まぐろ刺身、もやし和え物)の代表として「ナポリタン」を、PEG 沈殿法の方がより測定値の高かった食品 2 種(マカロニサラダ、切り干し大根煮付)の代表として「マカロニサラダ」を、それぞれ選択し、汚染レベルを低くした場合(原液、10・100・1,000 倍希釈)の回収実験結果を表 3 に示す。いずれの場合においても、パントラ法が PEG 沈殿法より高い測定値を示した。

4. 考察

4. 1 パントラ法の特長

これまでカキ等の二枚貝を除く食品検体からの NV の検出例は少ない。これは、食品中では NV は増殖せず汚染量は必ずしも多くないと考えられること、NV は 10～100 個程度の極少量のウイルス粒子が摂取されても感染が成立すると考えられていること、食品からの効率的な濃縮方法が確立されていないことなどが大きな理由である。さらに食品の形態や食品汚染の経路により NV の食品汚染部位が異なるため、各食品に応じた検体処理を行う必要がある。従って、食品をやみくもに検査しても NV を検出することは極めて難しい²⁾という状況であった。

これまで食品表面のウイルス洗滌液を濃縮する方法として利用されてきたのは、今回の回収実験で比較対照とした PEG 沈殿法や超遠心機を利用して精製する方法などであった。それらと比べ、パントラ法は、操作の簡便さ、必要機材の少なさ、所要時間・作業時間の短さ、など数多くの利点が挙げられる。何よりも、パンソルビン-抗体-NV 複合体を回収する遠心操作後の沈殿状態は、PEG 沈殿法で得ら

れる沈殿状態と比較して格段に扱いやすく、ストレスなく処理を進めることが可能であるという有利さは大きい。

4. 2 食品種類別での検出効率

表 2、3 によると、改良プロトコルを適用した場合には全ての食品において、パントラ法の方が高い測定値を示した。

しかし、「まぐろ刺身」や「きのこの白和え」では、その差はわずかだった。このような表面的な汚染にとどまると考えられる食品では、食品洗滌液で NV を洗い出し遠心上清として回収した時点で比較的夾雑物が少ないため、PEG 沈殿法との差も小さいのであろう。パントラ法がより効果を発揮するのは、練り物や油物といった夾雑物が多く混入する食品の場合だと考えられる。

また、「ナポリタン」や「ポテトサラダ」についても、比較的差が小さかった。このような食品洗滌液の pH を酸性側に傾ける性質のある食品では、むしろ夾雑物を取り除けていないと思われる状態において、増幅曲線の立ち上がり方がより早まる傾向がみられた。抽出 RNA に混入して持ち込まれた夾雑物がリアルタイム PCR 反応系に増幅曲線の立ち上がり方を早める影響を及ぼすことで、見かけ上高い測定値がはじきだされる現象が想定される。夾雑物が多い PEG 沈殿法でその影響がより大きく、結果として差が小さくなった可能性が考えられる。

なお、全く夾雑物のない「食品なし」の検体において、低汚染レベルで PEG 沈殿法による回収がうまくいかなかったのは、RNA 抽出のエタノールを加えた段階で共沈する物質(少量の夾雑物)が存在しない場合に沈殿形成が困難であることを示している。

以上のことから、夾雑物が NV 検出での測定値に及ぼす影響は、その種類や混入の程度によって増減いずれの方向にも作用する。そのことが特に PEG 沈殿法において、食品の種類により検出効率に大きな差を生む要因となっていると考えられる。それに対しパントラ法では、どの食品においても安定した検出効率を得られており、こうした夾雑物の影響を受けにくい方法といえる。すなわち、パントラ法を用いる場合には食品の種類によらず共通の工程で作業できることを意味しており、高い検出効率に加え、パントラ法の有用性が示された。

5. まとめ

新規に開発されたパントラ法は、食品からの NV の濃縮検出をより簡便かつ効果的に行える特長を備えている。そこで、NV 陽性糞便で汚染させたモデル食品に本法を適用したところ、実用化につながる可能性が確認された。PEG 沈殿法では食品の種類によってばらついた回収結果となったのに対し、パントラ法では比較的安定した回収結果が得られた。パントラ法は実用化の可能性の高い有望な濃縮法と期待される。

なおこの研究は、平成 19～21 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)「食品中のウイルスの制御に関する研究」により実施されている。

参考文献

- 1) 薬事・食品衛生審議会 食品衛生分科会食中毒部会：ノロウイルス食中毒対策について（提言）（2007）
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センターおよび国立感染症研究所ウイルス第二部：ノロウイルス集団発生事例に対して感染症および食品部局が共同で実施する初期実地疫学調査および微生物学検査のポイント（第1版：平成19年11月18日版）（2007）
- 3) 斎藤博之他：パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収，厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成19年度 総括・分担研究報告書,103-111(2008)
- 4) 東方美保他：パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収(検討2)，厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成19年度 総括・分担研究報告書,125-133(2008)
- 5) 斎藤博之：パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良（検討1），厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成20年度 総括・分担研究報告書,27-38(2009)
- 6) 東方美保他：パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良（検討2），厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成20年度 総括・分担研究報告書,181-190(2009)
- 7) 斎藤博之：食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の開発,秋田県健康環境センター年報, 4 (in press)
- 8) 東方美保他：平成14～18年度に福井県で検出されたノロウイルスの遺伝子解析,福井県衛生環境研究センター年報,5,60-72(2007)
- 9) Hansman GS et al. : Genetic and antigenic diversity among noroviruses, J.Gen.Virol., 87, 909-919 (2006)
- 10) 厚生労働省医薬局食品安全部監視安全課長通知：ノロウイルスの検出法について,食安監発第1105001号,平成15年11月5日(2003)