

調查研究

I 研究報告・資料

パンソルビン・トラップ法による食品からのノロウイルス検出事例

西川 和佳子、水村 綾乃、坂本 美砂子

(環境保健研究所 健康科学課)

要旨 一般食品からのウイルス濃縮法であるパンソルビン・トラップ法を平成25年度から導入し、食中毒(疑い)事例の食品検体6事例120検体に適用した。その結果、4事例9検体からノロウイルス遺伝子が検出され、そのうち8検体のPCR産物について、遺伝子型の決定が可能であった。以上の結果から、パンソルビン・トラップ法は、様々な形状の食品から一定の検査手順によって効率良くノロウイルスを濃縮できることが明らかとなり、実際の食中毒検査に有用であることが示唆された。

Key Words : パンソルビン・トラップ法, ノロウイルス, ウイルス濃縮法

1. はじめに

現在、ノロウイルス(以下、NoV)による食中毒事例は、調理従事者からの二次汚染を受けた調理済み食品に起因するものが多く、原因食品の形状によってNoVの汚染量や汚染部位が異なるために食品の形状に応じた検体処理が必要である。しかしながら、従来の食品検査法は、主にカキ等の二枚貝、表面汚染または高濃度汚染を受けた食品を検査対象としたもので、これら以外の食品からNoVが検出される事例は少なかった。このような背景から、様々な形状の食品からウイルスを効率良く濃縮するためにパンソルビン・トラップ法(以下、パントラ法)が開発され、平成25年10月に厚生労働省通知¹⁾により、NoVの検出法に追記された。

パントラ法の原理は、食品乳剤にNoVに特異的な抗体を添加し、抗原抗体複合体を形成させ、さらにそれを黄色ブドウ球菌表面のプロテインAに吸着させ、菌体とともにNoVを沈殿、回収することである。これにより、固形、液状、練り物、油物など様々な形状の食品からNoV遺伝子を検出することが可能となったが²⁾、実際の食中毒事例にパントラ法を適用した報告は少ない。当所では、平成25年度から食中毒検査にパントラ法を導入した結果、一部の食中毒(疑い)事例において食品検体からNoV遺伝子が検出され、パントラ法の有用性が示されたことから、その概要について報告する。

2. 材料と方法

2.1 検査材料

平成25年から27年度までに本市保健所から搬入された食中毒(疑い)事例の食品238検体のうち、120検体(6事例分)をパントラ法によるウイルス濃縮の検査材料とした。

2.2 パンソルビン・トラップ法によるNoVの濃縮

図1の操作手順に示すとおり、厚生労働省通知¹⁾に基づいてパントラ法によるウイルス濃縮及びRNA抽出を行った。なお、RNA抽出には、TRIzol-LS(Invitrogen)を使用し、High Pure Viral RNA Kit(Roche)を用いて抽出RNAを精製した。

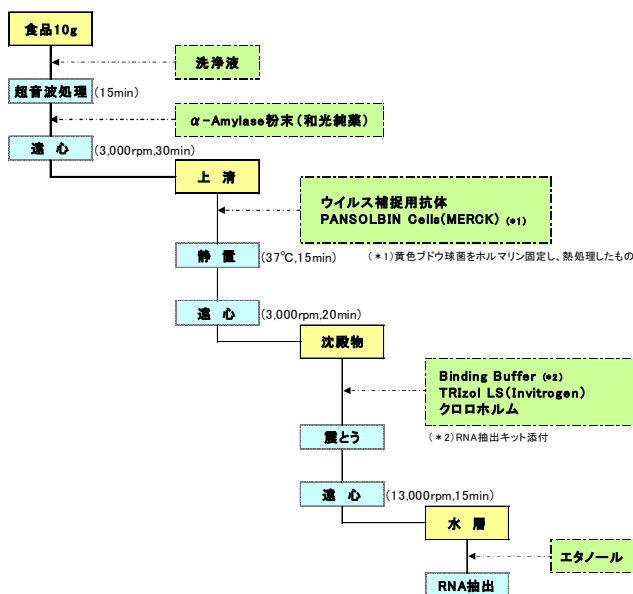


図1 パンソルビン・トラップ法 操作手順

2.3 NoV 遺伝子の検出

操作手順を図 2 に示すとおり、厚生労働省通知¹⁾に基づいて Super Script III(Invitrogen)を用いた逆転写反応による cDNA の作成、1st PCR(conventional PCR)による予備増幅、及び 1st PCR 産物をテンプレートとした Nested real-time PCR を実施した。なお、非特異反応を抑制するため、逆転写反応では専用プライマー (PANR-G1 及び PANR-G2) を用い、1st PCR ではホットスタート・タッチダウンによる反応を行った。

2.4 分子系統樹による NoV 遺伝子の解析

Nested real-time PCR により NoV 遺伝子が検出された検体については、1st PCR 産物をテンプレートとして、2nd PCR(conventional PCR)を行い、得られた増幅産物の塩基配列を決定した。また、NoV の遺伝子型については、Capsid 領域 (G I :291bp、G II :278 bp) の塩基配列に基づく分子系統樹解析 (Neighbor joining 法) により決定した。

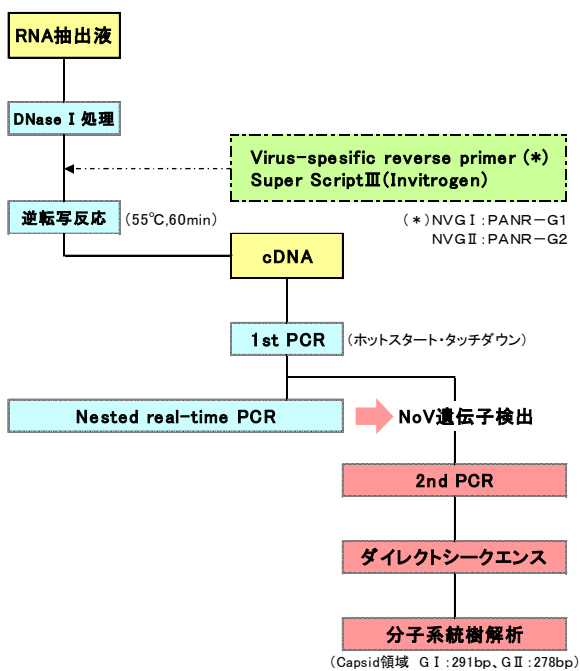


図 2 遺伝子検出及び解析 操作手順

3. 結果

パントラ法によるウイルス濃縮、Nested real-time PCR による遺伝子検出及び分子系統樹による塩基配列の解析を行った。その結果、4 事例 9 検体の食品から NoV 遺伝子が検出され、そのうち 8 検体の PCR 産物について、遺伝子型の決定が可能であった (表 1)。

事例 1 では、当初、食中毒と感染症の両者が疑われたが、患者便、調理従事者便、検食から同一の遺伝子型の NoV が検出され、塩基配列も 100%一致したことから、食中毒と断定し行政処分となった。

事例 2 では、患者便及び喫食残品 (豆腐サラダ) から同一遺伝子型の NoV が検出されたが、調理従事者便からは検出されず、有症苦情として処理された。なお、喫食残品 (ビーフシチュー) の遺伝子型は、本事例の患者便とは異なるものであった。また、豆腐サラダ及びビーフシチューは、それぞれ過去 6 ヶ月以内に本市で発生した別の集団感染事例と塩基配列が 100%一致した (図 3、4)。

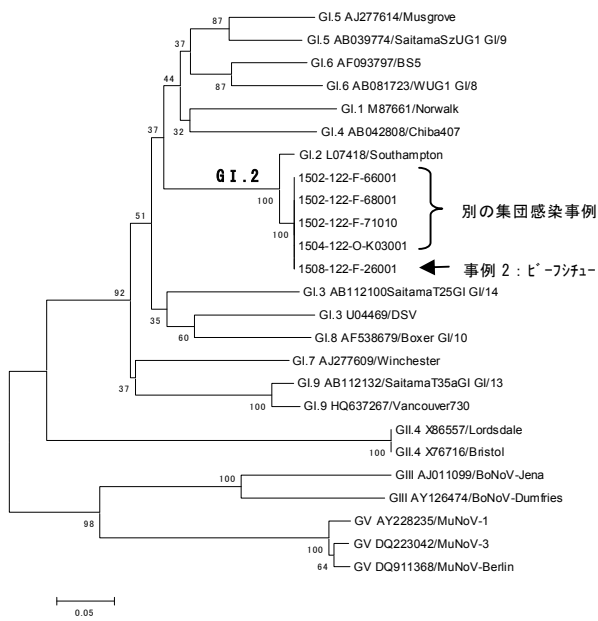
事例 3 では、患者便から NoV が検出されたが、調理従事者便からは検出されず、さらに、検食からは患者便とは異なる遺伝子型が検出され、食中毒と断定するには至らなかった。

事例 4 では、患者便、調理従事者便、食材同ロット品で同一の遺伝子型の NoV が検出された。しかし、調理従事者は患者が喫食した食品の調理等に直接関与しておらず、さらに、食材同ロット品の塩基配列が患者便及び調理従事者便の塩基配列と 100%一致せず、調理従事者を介して食品を汚染する経路を特定できないことから、有症苦情として処理された。なお、食材同ロット品から検出された NoV は、その 2 ヶ月前に発生した事例 3 の患者便及び市内で発生した別の集団感染事例と塩基配列が 100%一致した (図 4)。

事例 5 及び事例 6 では、患者便から NoV が検出されたが、食品及び調理従事者便からは検出されず、有症苦情として処理された。

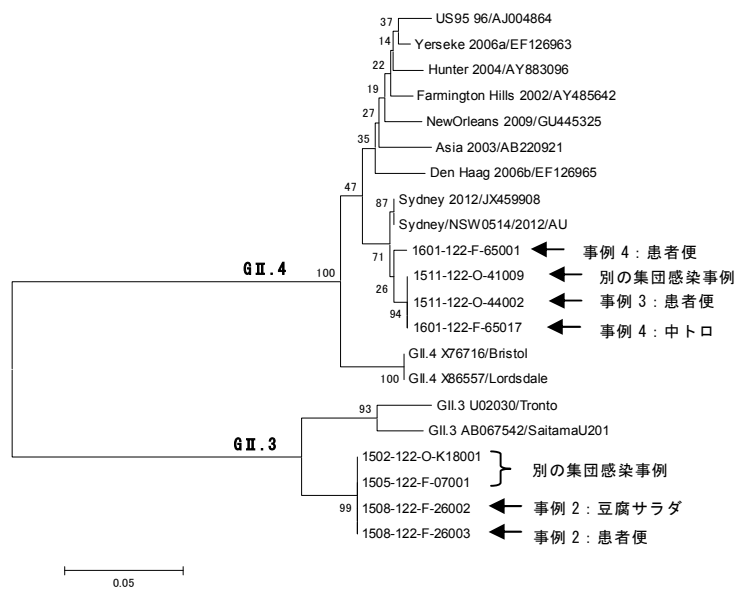
表 1 パントラ法によるノロウイルス検出事例

事例	食 品			糞 便		食品と糞便の塩基配列の相同性	
	検出数 / 検体数	検 出 検 体	遺 伝 子 型	患者の遺伝子型	従事者の遺伝子型		
1	5 / 28	検 食	刺身	G II .4	G II .4	G II .4	100%
			メロン	G II .4			100%
			前菜	G II .4			98%
			蒸しパン	G II .4			98%
			フルーツ	型別不能			-
2	2 / 2	喫食残品	ビーフシチュー	G I .2	G II .3	不検出	-
			豆腐サラダ	G II .3			100%
3	1 / 38	検 食	カットオレンジ	G II .3	G II .4	不検出	-
4	1 / 1	食材同ロット品	中トロ	G II .4	G II .4	G II .4	98%
5	0 / 33	-	-	-	G II .4	不検出	-
6	0 / 18	-	-	-	G II .17	不検出	-



* 株名の先頭 4 桁は、西暦年下 2 桁・月数 2 桁を示す

図 3 事例 2 におけるノロウイルス GI Capsid 領域 (291bp) 系統樹



* 株名の先頭 4 桁は、西暦年下 2 桁・月数 2 桁を示す

図 4 事例 2, 4 におけるノロウイルス GII Capsid 領域 (278bp) 系統樹

4. 考察

パントラ法を適用して NoV が検出された食品として、食パン³⁾や弁当^{4,5)}の事例報告があるが、今回、刺身、サラダ、ビーフシチュー等から NoV が検出され、パントラ法が様々な食品に対応できることが改めて示された。事例 1 では、当初、食中毒と感染症の両者が疑われた。5 検体の検食から NoV が検出され、そのうち 2 検体の検食から検出された NoV の遺伝子型は、患者及び従事者便から検出された NoV と一致（塩基配列も 100%一致）した。この検査結果から、事例 1 は食中毒と決定し行政処分に至り、実際の食中毒調査におけるパントラ法の有用性が明らかとなった事例でもある。また、事例 2（ビーフシチュー）及び事例 3 は、喫食残品や検食から患者便と異なる遺伝子型の NoV が検出されたため、食中毒との関連性を特定するには至らなかったが、普段から NoV が付着するような状況下で食品が扱われている可能性が強く示唆された。さらに、事例 2（ビーフシチュー及び豆腐サラダ）と事例 4 では、喫食残品や食材同ロット品から検出された NoV と 2~6 ヶ月以前に市内で発生した別の集団感染事例の患者から検出された NoV の塩基配列が 100%一致していた。このことは、市内で流行している NoV が食品の汚染に関与している可能性を示唆するものである。

以上のことから、パントラ法は、様々な形状の食品

から一定の検査手順によって効率良く NoV を濃縮できることが明らかとなり、本法による食品検査の結果を蓄積することで原因食品の特定や汚染経路の解明が期待できるものと思われる。

パントラ法の導入により様々な食品から NoV の検出が可能となったが、これまでの検査実績を踏まえ、以下 2 点の課題が明確となった。

1 点目は、検体の相互汚染や実験室内の PCR 産物汚染による偽陽性の問題である。パントラ法は、微量のウイルスを効率良く濃縮できる一方、遠心上清の除去といった操作が多く、陽性コントロールや検体の相互汚染の問題が常につきまとう。また、検査を重ねることで PCR 産物による実験室内汚染が蓄積する恐れが出てくることである⁶⁾。食品に含まれるウイルス量は極めて少なく⁷⁾、パントラ法では食品から安定的に NoV を検出するために 1st PCR による予備増幅を行った上で Nested real-time PCR を実施することが推奨されている¹⁾ ことから、一層の偽陽性防止対策が必要となる。試薬、器具、検査室等の分別使用、及び慎重な実験操作はもとより、今後は予備増幅を行う必要のない高感度な Conventional PCR または real-time PCR 反応系を検討し、これに Uracil-N-Glycosylase 処理を組み込むことにより、PCR 産物の混入による偽陽性を防止することも対策の一つとして検討する価値があるも

のと思われる。

2点目は、検体数の増加に伴う作業効率の低下である。パントラ法は日常業務に取り入れることを前提に設計されたものであり、超遠心機や高速冷却遠心機を用いることなく実施できることがメリットであるが²⁾、実際の食中毒事例で多数の食品検体が搬入され、遠心機のキャパシティーを超えた場合、作業効率が低下し、限られた時間で結果を出すことが困難になる。さらに、糞便検体と比較し、RNA抽出に要する工程が多いことも作業効率低下の一因であると考えられる。従って、作業効率の低下を防ぎ、限られた時間で迅速に検査結果を得るためには、検査対象とする食品検体の精査(調理工程や喫食状況に応じて)、または、優先順位付けが必要不可欠であると思われる。

謝 辞

本稿を執筆するにあたり、資料の提供をいただいた千葉市保健所食品安全課の方々に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長、「ノロウイルスの検出法について」の一部改正について,平成25年10月22日,食安監発1022第1号
- 2) 斎藤博之,食品のノロウイルス検査の汎用化を目指したパンソルビン・トラップ法の開発,日本食品微生物学会雑誌,29(1),32-37,2012
- 3) 土屋祐司,パンを原因としたノロウイルス集団食中毒事例,日本食品微生物学会雑誌,32(3),153-158,2015
- 4) 三好龍也,食品中からノロウイルス遺伝子が検出された食中毒事例-堺市,病原微生物検出情報(IASR),32,364-365,2011
- 5) 飯塚節子,パンソルビン・トラップ法による食品からのノロウイルス遺伝子の検出-弁当屋を原因施設としたノロウイルス集団食中毒事例-,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 食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究 平成24年度総括・研究分担報告書,175-180,2013
- 6) 斎藤博之,パンソルビン・トラップ法によって食品検体から検出されたノロウイルスの遺伝子解析法の開発,秋田県健康環境センター年報,第9号,61-72,2013

- 7) 斎藤博之,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,病原微生物検出情報(IASR),32,355-357,2011