シンポジウム1 食品からのノロウイルス検出法の最前線

● Symposium 1 Current Topics on Detection of Norovirus in Foods

食品のウイルス検査の現状と課題

Current Status and Problems of Virus Detection in Foods

野田 衛[†]

(国立医薬品食品衛生研究所)

Mamoru NODA

(National Institute of Health Sciences, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501)

1. はじめに

ノロウイルス (NoV) を主とするウイルスによる食中毒の患者数は全食中毒患者の約半数を占め、その制御は食品衛生上重要な課題となっている。食品からの病原体検出は、食中毒発生時における原因食品の特定、食品の汚染実態の把握およびそれに基づく食品のリスク評価など、食中毒予防対策上、また食品の安全性を確保するうえで重要な役割を担っている。現在、二枚貝を主な対象食品としたウイルス検査法として、NoV および A 型肝炎ウイルス (HAV) について厚生労働省から通知が出されている (通知法, NoV: <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html>, HAV: <http://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/hassyutu/2009/dl/091201-1.pdf>) が、検出感度、迅速性など改善の余地が残されている。また、近年の NoV 食中毒は調理従事者からの二次汚染を受けた食品を原因とする事例が多数を占め、二枚貝以外の多種・多様な食品からのウイルス検出法の開発が急務の研究課題となっている。これらの背景から、近年食品からのウイルス検出法の改良や開発が試みられている。本稿ではわれわれの検討結果を中心に食品のウイルス検査の現状と課題について概観する。

2. 現状の食品のウイルス検査

(1) 食品のウイルス検査の特徴

食品の微生物検査は、食品の成分規格に基づく規格検査、食中毒発生時の原因食品の特定のための検査および業者が食品の安全性を確保するために実施する自主検査に大別されるが、現在ウイルスに関する成分規格はなく、食品のウイルス検査は食中毒検査と自主検査が主体に行われている。カキに関しては NoV のリスクがあることから、規格検査に準じて行政が収去検査を実施する場合もある。

一方、食品の微生物検査は、生きた微生物を検出する

こと、すなわち培養検査に基づくことが基本であるが、NoV をはじめとする食品媒介性ウイルスの多くは培養が不可能なため、食品のウイルス検査は遺伝子検査に頼らざるをえないのが現状である。ウイルス遺伝子の検出は必ずしも感染性ウイルスの存在を示すものではないことから、食品のウイルス汚染のリスク評価や規格基準の策定の大きな障害となっている。

(2) 食品のウイルス検査の概要

食品のウイルス検査は、食品からウイルス粒子を分離し、濃縮する工程 (前処理) と、前処理で得られた試料 (濃縮液) から RNA を抽出後、DNase で処理し、逆転写反応により cDNA を合成したのち、nested PCR 法あるいは real-time PCR 法で検出する工程に大別される。細菌検査の場合は、雑菌の増殖を抑え、いかに目的とする細菌のみを分離培養するかということが検出の成否に重要であるが、ウイルス検査の場合は食品成分の混入を抑え、いかにウイルス粒子のみを分離濃縮するかという前処理の方法が重要となる。

例えば、二枚貝の NoV 検出法 (通知法) により、カキ、天ぷら粉、小麦粉、きな粉について添加回収試験を行った結果、それぞれの回収率は 4%, 18%, 8%, 17% 程度であった。また、同法によりカキ中腸線から濃縮して得た cDNA 液 ($N = 66$) に 16 コピー/反応液の GI NoV を添加して定量した結果、平均値 5.5, 最大値 14.8, 最小値 0.6 となり、cDNA 液中には PCR 反応を阻害する物質が存在していることがわかる。前処理の方法の違いにより回収率が変化することは言うまでもない。これらのように、前処理の方法や食品の種類によりウイルス回収率が変化することに加え、濃縮液に混入する食品由来成分が RNA 抽出効率や酵素反応に影響を与える。RNA 抽出以降の工程におけるプライマーやプローブあるいは使用する酵素、反応条件などにより検出感度は変化するが、検出感度に大きく影響するのは前処理の工程である。

(3) 通知法の概要

現在の NoV の通知法は、平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発第 1105001 号「ノーウォーク様ウイルス (NLV) の

[†] 連絡先

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

RT-PCR法について」として通知され、その後、ノロウイルスの名称変更（平成15年11月5日食安監発第1105001号「ノロウイルスの検出法について」）、大型貝の検査法の追加等（平成19年5月14日食安監発第0514004号）の改定が行われた。HAVの通知法は、平成14年8月16日食監発第0816001号「ふん便及び食品中のA型肝炎ウイルスの検査法について」として通知された後、セミドライマトの検査法の追加（平成21年12月1日食安監発1201第1号「A型肝炎ウイルスの検出法について」）に伴う改定が行われている。検査対象についてはNoVは貝類と糞便、HAVはそれらに加えセミドライマトの検査法が記載されている。それら以外の食品については、貝類やセミドライマトの方法が使用できる場合があると記載されているが、すべての食品に対応できるものではない。

3. 通知法における食品の前処理の改良と応用

1) セミドライマトの検査法の改良点

HAV通知法の中のセミドライマトの検査法は2009年にオーストラリアやヨーロッパでセミドライマトが関連したA型肝炎事例が発生し、それに対応するため、急遽追加されたものである。このセミドライマトの検査法は二枚貝の検査法を基本としているが、食品乳剤の作製工程、ポリエチレングリコール（PEG）沈殿の条件および沈渣の再浮遊の工程に改良が加えられている。

(1) 乳剤の作製工程

二枚貝は中腸腺などの消化管の内部にウイルス粒子が存在していることから、食品を乳剤化する必要があるが、セミドライマトの場合はウイルス汚染は食品の表面に起こっていると考えられる。その場合、食品の乳剤化は必ずしも必要ではなく、いかに効率よくウイルス粒子のみを食品から回収液に回収できるかが重要である。セミドライマトの表面にHAVを汚染させ、ストマッカー処理1分、超音波処理15分、手もみ50回の回収率を比較した結果、ストマッカー処理は回収率1%以下であったが、超音波処理は12%、手もみは8%であった。また、振とう30分と超音波処理15分を比較した結果同等の回収率であったことから、ストマッカーによる乳剤化は振とうや超音波処理に変更された。

(2) PEG沈殿

NoVおよびエコーウイルス9型を用いてPEG沈殿におけるPEGおよびNaClの濃度の最適化を試みたところ、PEGは12%、NaClは1 Mの場合の回収率が高かったことから、その条件に変更された。

(3) 沈渣の再浮遊工程

超遠心分離あるいはPEG沈殿で得られた沈渣は食品由来成分を含む。通知法には、蒸留水を用いた沈渣の再浮遊液に食品由来夾雑物が多い場合は遠心分離を行うように記載されている。この遠心分離を行うとウイルス粒子が食品成分とともに沈殿し回収率の低下が起こる一

方、遠心分離を行わないとその後のRNA抽出工程でフィルターが詰まるなどによる回収率の低下が起こる。そこで、沈渣を可溶化するために、SDS-トリスグリシン緩衝液を用いたところ蒸留水を用いた場合の回収率が10~20%であったものが、60~80%の回収率に上昇した。また、沈渣を蒸留水で再浮遊した場合、遠心の有無により回収率が変化するが、SDS-トリスグリシンを用いた場合には、その影響を受けなかった。以上の結果から、沈渣を再浮遊させる液体は蒸留水からSDS-トリスグリシンに変更された。SDS-トリスグリシンを用いる場合の注意点としては、SDSを含むためウイルス粒子は可溶化され再浮遊させた時点でウイルスRNAが放出され、RNaseが存在する場合RNAの分解が生じる危険性がある。そのため、速やかにRNA抽出操作に移るか、-80℃で凍結保存する必要がある。

2) セミドライマトの検査法の応用

現在のNoV食中毒は、調理従事者からの二次汚染を受けた食品を原因とする事例が多数を占めている。この場合、食品の汚染はセミドライマトと同様に食品の表面が汚染を受けている場合が多いと考えられる。静岡県ではセミドライマトの検査法を用いて食中毒の食品検査を実施しており、多くの食品からNoVの検出に成功している²⁷⁾（表1）。食中毒7事例における食品からの検出率は3/13（23%）、6/41（15%）、1/1（100%）、1/1（100%）、3/4（75%）、11/17（65%）、2/2（100%）と非常に高率で、ウイルスRNAコピー数は食品1g当たり数十から数百コピーが多く、高いもので2,000コピー/g（豆もやし）、低いものはnested PCR陽性、リアルタイムPCR陰性となっている。食品の種類についてみると、野菜類（レタス、キャベツ、豆もやし、切干大根の煮物、白菜の塩昆布和え）、穀物類（ご飯、パン、ジャガイモ、こんにゃくまんじゅう）、肉類（生ハンバーグ（3）、馬刺し、肉、鶏肉の甘辛揚げ）、魚類（しめ鯖、ホキのママレード焼き、キハダマグロ、魚のフライ、魚のみそ焼き、アジのしょうゆ焼き、ちくわの磯辺揚げ、佃煮）、混合食品（茶碗蒸し、ツナじゃが煮、春雨炒め、弁当（混合したもの））と多様な食品から検出されている。

4. 食品検査法の改良・開発の現状

通知法を含め多くの食品のウイルス検査における前処理は、食品を乳剤とし、低速遠心分離で食品成分を除去した後、遠心上清に含まれるウイルス粒子を超遠心分離あるいはPEG沈殿により沈殿させ、得られた沈渣を少量の液体で再浮遊することを基本としている。この操作においてウイルス粒子を食品成分から分離する役割を担っているのは、遠心分離による物理的な分離操作だけである（ウイルス粒子は非常に小さいため、10,000 rpm（15,000×g）低度の遠心条件では上清に残り、食品成分は沈殿する）。しかし、多くの場合食品成

表1. 食中毒事例における食品からのウイルス検出状況（静岡県）

事例	原因施設	検出数/検体数 (検出率)	食品名	コピー数		遺伝子型
				実測値	1 g 当たり (約)	
1	老人福祉施設 (集団給食)	3/13 (23%)	ホキのマーマレード焼き	9.2	60	GII/3
			白菜の塩昆布和え	1.3	10	GII/3
			アジのしょうゆ焼き	ND	ND	GII/3
2	病院給食	6/41 (15%)	パン	13.4	80	GII/2
			レタス	12.2	80	GII/2
			ご飯	12.9	80	GII/2
			肉	16.3	100	GII/2
			ジャガイモ	13.2	80	GII/2
			茶碗蒸し	0.7	4	GII/2
			馬刺し	91.9	600	GII/3
3	飲食店(食堂)	1/1	しめ鯖	39.1	200	GII
4	飲食店(食堂)	3/4 (75%)	生ハンバーグ	51	300	GII
			生ハンバーグ	40	300	GII/2
			生ハンバーグ	102.8	600	GII
6	飲食店 (仕出し屋)	11/17 (65%)	弁当(混合したもの)	7.7	50	GII/3
			鶏肉の甘辛揚げ	144.6	900	GII/3
			キャベツ	5.2	30	GII/3
			ツナじゃが煮	5.9	40	GII/3
			魚のみそ焼き	7.7	50	GII/3
			豆もやし	341.5	2000	GII/3
			切干大根の煮物	2.3	10	GII/3
			ちくわの磯辺揚げ	1.6	10	GII/3
			春雨炒め	ND	ND	GII/3
			魚のフライ	ND	ND	GII/3
			佃煮	3.3	20	GII/3
			キハダマグロ	ND	ND	GII/3
			こんにゃくまんじゅう	0.7	5	GII

ND: 検出限界以下

分の一部は上清に残り、また食品が牛乳などの液体の場合は分離することができない。食品によっては食品にウイルス粒子が吸着し食品とともに沈殿する場合も想定される。そのため、食品からウイルス粒子をより効率よく分離するために、さまざまな条件変更や別の新たな手法の導入が検討されている³⁸⁾。

1) 一般的な食品の処理方法

(1) 超音波処理等

調理従事者から食品が汚染される場合、ウイルス汚染は食品の内部ではなく表面を汚染することが多い。その際は、食品を乳剤とせず、上述のように超音波処理や振とうを行い、表面に付着したウイルスを食品から遊離させることで、食品の混入を減らすことができる。

(2) アルカリ溶出

食品からのウイルス溶出効率を上げるために、pH 9以上のグリシン緩衝液を用いてアルカリ条件下で食品の乳剤化あるいは浸透処理を行い、その後pHを中性に戻した後、PEG沈殿などで濃縮する方法も、カキ、レタス、イチゴ、ラズベリー、ハウレン草、ハムなどの食材で多く報告されている^{4, 5, 11, 17, 19, 34, 39, 40)}。用いられるグリシン緩衝液はグリシン濃度に加え、NaCl, Tris, ビーフエクストラクトの添加の有無および濃度はさまざまである。溶出液として3%ビーフエクストラクト¹⁵⁾やペプトン緩衝液³³⁾の有用性を示す報告もある。

(3) 食品成分の分解

NoVの汚染リスクの高いカキにはグリコーゲンが多く含まれ、中腸線を切り出しても完全には除去しきれない。このグリコーゲンはPCR反応を阻害するため、できるだけ混入を抑える必要がある。グリコーゲンは多糖であることから、アミラーゼによってオリゴ糖やデキストランに分解することができる。そのため、カキの乳剤をアミラーゼで消化すると回収率が向上する^{28, 29)}。12の地方衛生研究所で行ったコラボスタディによると、通知法に基づくPEG沈殿法、超遠心法では10~20%の検出率であったが、アミラーゼで処理すると50%程度に上昇し、その有用性が確認された³⁰⁾。カキはグリコーゲンだけでなく、脂肪や蛋白質など種々の成分からなる。奥村らは脂肪を分解するリパーゼ処理の有用性を示している³¹⁾。プロテアーゼによる蛋白質分解処理を導入した方法も報告されている^{6, 10)}。ラズベリーなどではペクチナーゼ処理が報告されている^{4, 34, 40)}。

これらの酵素では糖、脂肪、蛋白質など消化対象に特異性があり、食品の分解作用は限定的であることから、それぞれの成分が検出率に影響する場合はこれらの酵素を混合して処理する必要がある。そこで、食品成分を網羅的に分解する方法として、秋場らは¹⁾(本シンポジウム)は、細菌を添加し、培養することにより食品由来成分を分解・除去する方法を考案した。

(4) 食品乳剤、濃縮液の清浄化

従来からカキや糞便の脂質成分の除去に有機溶媒 (Freon など) が利用⁷⁾されてきたが、Mullendore らがクロロフォルムやクロロフォルム-ブタノールの処理は Freon 処理より有用であると報告²⁵⁾して以来、乳剤の清浄化にはそれらの有機溶媒が広く利用されている^{2, 11, 15, 17, 32, 34, 39, 40)}。乳剤の清浄化には antifoam や Cat-floc (a polydimethyldiallyl ammonium chloride) が添加されることもある^{2, 37)}。また、濃縮液を再度 PEG 沈殿することにより回収率が向上する場合がある¹⁹⁾。

(5) 濃縮液の可溶化、再処理

上述のように蒸留水の代わりに SDS-トリスグリシンで濃縮液を作製し、混入する食品成分を可溶化させることにより、回収率が向上する。SDS-トリスグリシンではウイルス粒子の破壊が起こるが、0.5% Zwittergent[®] 3-14 detergent を用いるとウイルス粒子を破壊せず、可溶化できる。ただし回収率は SDS-トリスグリシンのほうが一般的に高い。

(6) 濃縮方法

ウイルスの濃縮方法は、PEG 沈殿や起遠心分離が一般的であるが、限外ろ過や陽電荷フィルターや陰電荷フィルターを用いた濃縮法も報告されている^{3, 9, 13, 14, 16, 22, 23, 35)}。また、食品を乳剤化した後の遠心上清から TRIzol[®] などを用いて直接 RNA 抽出を行った後、濃縮を行う方法も試みられている^{2, 32, 41)}。カキでは濃縮操作を行わず、乳剤の遠心上清から RNA 抽出を行うことも可能であり^{6, 8, 10, 30, 44)}、検査に迅速化に有用な方法と言える。

2) ウイルス粒子を特異的に回収する方法

(1) 特異抗体を用いる方法

上記に述べた食品の物理的、化学的また生化学的な処理ではウイルス粒子のみを食品成分から分離することは容易ではなく、また、成分や性状が異なる多種・多様な食品や食材からの検出に汎用的に用いることは困難である。事実、それらの報告の多くはカキ以外では、レタス、青ネギ、ホウレンソウなどの野菜、ラズベリー、イチゴなどの果物、ハムなど、乳剤作製時の混入物が比較的少ない食品に限られている。多種・多様な食品からウイルス粒子を特異的に回収するためには、抗体などウイルスに特異的に反応する物質を導入する必要がある。ウイルスを特異的に濃縮する方法として、従来から特異抗体を磁気ビーズに結合させた、いわゆる免疫磁気ビーズ法があり、NoV や HAV においてもその応用が試みられている^{18, 20, 26, 32)}。しかし、NoV の場合は多種の遺伝子型が存在し、それらの抗血清を安定的に供給することが困難であることなどから、一般的な検査法として導入することは難しい状況にあった。斎藤らはパンソルビントラップ法 (パントラ法) という方法を考案した (本シンポジウム、第 58 回日本ウイルス学会学術集会抄録集、195 (2008))。本法は免疫磁気ビーズ法で使用されてい

る磁気ビーズの代わりにパンソルビン (PANSORBIN[®] Cells, 免疫グロブリン結合性蛋白質プロテイン A を持つ黄色ブドウ球菌菌体) を使用し、NoV 粒子-抗体-菌体の複合体を形成させ、NoV を特異的に濃縮するものである。本法の最大の課題は免疫磁気ビーズ法と同様に抗血清の安定した供給体制の確立にあったが、抗血清の代わりに市販のガンマグロブリンを使用することで、多くの検査機関での実施が可能になった。ガンマグロブリンの導入は、NoV 以外の種々のウイルスをも検出できるという、さらにもう一つの大きなメリットを生んだ (IUMS2011 抄録集 (2011))。

(2) その他の担体を用いる方法

NoV を特異的に検出する別のアプローチとして、特異抗体の代わりに NoV のレセプターと考えられている組織血液型抗原を利用する方法がある。用いる組織血液型抗原としては合成糖鎖²⁴⁾および組織血液型抗原を含み、豚腸管上皮細胞から分泌される粘液物質であるムチン^{42, 43)}が報告されており、それらを磁気ビーズに結合させたものを担体として用いる。また、赤血球表面には組織血液型抗原が発現していることから、赤血球を破壊してヘモグロビンを除き、赤血球膜だけにしたものを用いる方法も報告されている²¹⁾。本法の問題点としては、NoV 以外のウイルスには使用できないこと、また、組織血液型抗原への結合性は NoV の種類により異なる^{12, 36)}ことからすべての株への適応は難しいことが考えられる。

篠原ら (第 58 回日本ウイルス学会学術集会抄録集、333 (2010)) は、非晶性リン酸カルシウムを用いた食品からのウイルス検出法を開発した。本法は、ごく微細な網目構造を有する非晶性リン酸カルシウムの網目にウイルス粒子を捕捉し、リン酸カルシウム粉末とともにウイルス粒子を遠心濃縮した後、溶液を酸性にすることによりリン酸カルシウムを溶解しウイルスを回収することを基本原理とする。リン酸カルシウムとウイルス粒子との結合性は必ずしも特異的ではなく、また食品の種類により回収率が異なるため、食品の種類ごとに有効性の検証が必要であるが、今後の研究の進展が期待できる方法と言える。

5. 精度管理

食品の微生物検査は規格検査あるいは食中毒検査にかかわらず、検査の信頼性を確保する必要があることは言うまでもない。ウイルス検査において、内部精度管理は各検査機関で実施されていると思われるが、外部精度管理については現在体制が確立されていない。したがって、各検査機関で実施されている検査の検出感度、検査結果の信頼性あるいはばらつきなどについて客観的に評価することができないのが現状である。表 2 はわれわれが開発したカキからの NoV 検出におけるアミラーゼ処理法の有用性をコラボスタディにより検証した際の各検

表2. コラボスタディによるカキからのNoV 検出結果

検体	遺伝子群	検査機関											
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
(Nested PCR/PEG 沈殿通知法)													
A	GI	+	+	+	+	—	—	NT	+	++	+	+	+
	GII	+	+	+	+	—	+	NT	+	++	+	+	+
B	GI	—	—	—	+	+	—	+	—	+-	—	+	+
	GII	+	+	+	+	—	—	+	—	++	—	—	+
C	GI	+	+	+	+	+	—	+	+	++	+	+	—
	GII	+	+	+	+	—	—	+	+	++	—	—	—
陽性率		83.3	83.3	83.3	100	33.3	16.7	100	66.7	91.7	50	66.7	66.7
(Nested PCR/ 超遠心通知法)													
A	GI	+	+	+	+	+	+	+	—	---	—	+	NT
	GII	+	+	+	+	—	+	+	—	---	+	+	NT
B	GI	—	—	+	+	—	—	+	+	---	—	+	NT
	GII	+	—	+	+	+	—	+	+	---	—	—	NT
C	GI	—	—	—	+	—	—	+	—	---	—	—	NT
	GII	—	—	—	+	+	—	+	+	---	+	—	NT
陽性率		50	33.3	66.7	100	50	33.3	100	50	0	33.3	50	
(Real time PCR/PEG 沈殿通知法)													
A	GI	ND	289	154	2,125	ND	ND	NT	603	310	101	1,219	291
	GII	49	977	77	2,130	8	60	NT	952	2,708	2,117	5,358	3,142
B	GI	ND	10	ND	180	ND	ND	17	ND	9	ND	113	ND
	GII	18	45	4	151	ND	ND	414	ND	137	35	342	39
C	GI	ND	49	45	141	ND	ND	102	42	ND	24	859	16
	GII	5	97	ND	95	ND	ND	321	116	590	236	904	39
平均値*		24	244	70	804	8	60	214	428	751	503	1,466	705
(Real time PCR/ 超遠心通知法)													
A	GI	ND	8	129	1,080	25	208	66	ND	323	ND	404	NT
	GII	71	119	60	268	77	1,698	2,314	26	11,916	101	2,807	NT
B	GI	ND	ND	23	ND	ND	25	62	23	11	ND	1,001	NT
	GII	17	14	1	134	ND	193	112	64	546	5	125	NT
C	GI	ND	1	21	ND	ND	12	35	10	6	ND	231	NT
	GII	ND	20	2	42	ND	5	308	5	8	37	428	NT
平均値		44	32	39	381	51	357	483	25	2,135	48	833	

+: 陽性, —: 陰性, ND: 検出限界以下, NT: 検査せず
(文献30より)

*: 陽性例の平均値

査機関の通知法 (PEG 沈殿法および超遠心分離法) の検査結果を示したものである。GI および GII の NoV が陽性の3検体 (A, B, C) について12の地方衛生研究所で検査を行った結果³⁰⁾, nestedPCRによる検出率は0~100%, リアルタイムPCR法による定量値も検査機関で大きく異なった。電気泳動の結果についても特異的なバンドだけが検出されている機関や非特異的なバンドが多く検出されている機関も認められた。これらのことから、食品のウイルス検査の外部精度管理体制の確立が急務の課題であると考えられる。

6. 食品のウイルス標準試験法検討委員会

本稿でも述べてきたように、近年食品からのウイルス検査法の改良・開発が進められている。これらの新たに開発された試験法を地方衛生研究所などで導入するためには、複数の検査機関によるコラボスタディにより試験

法を評価し、標準化を行うことが重要であるが、わが国においてはそのことを実施する組織は存在していなかった。また、最近のNoV食中毒は二枚貝を原因とする事例が増加傾向にあるが、出荷前に自主検査で陰性となった二枚貝による食中毒事例も散見され、食品のウイルス検査に関する精度管理体制の確立が求められている。特に、上述のように外部精度管理体制の確立は重要な課題である。さらに、輸入食品に伴うウイルス性食中毒の発生への対応や輸入食品の安全性確保に関する国際的な取り決めの必要性から、国際的なウイルスの食品検査の標準化の動きも見られている。これらの背景から、わが国の食品のウイルス検査法の標準化を行い、今後の精度管理のあり方などを議論するために、平成22年6月に「食品のウイルス標準試験法検討委員会」(<http://www.nihs.go.jp/fhm/csvdf/index.htm>)を設立した。本委員会は主に以下の点に関して検討する予定としている。

- ①各種ウイルスの食品からの検出法の標準化に関する
こと
- ②検査に必要な標準品に関すること
- ③食品のウイルス検出法の精度管理に関すること
- ④その他、食品媒介性ウイルスの食品検査に関する
こと

7. ま と め

食品のウイルス検査は、検査法自体に加え、その評価体制、精度管理体制など、多くの面で開発途上にあり、細菌検査や理化学的検査として大きく立ち遅れているのが現状である。これらの直面する課題の解決に向けて、今後とも地方衛生研究所、登録検査機関など多くの関連する機関の関係各位のご支援、ご協力をお願いするとともに、忌憚のないご意見をいただければ幸いである。

謝 辞

食品のウイルス検査に関するデータ提供を賜りました静岡県環境衛生科学研究所の長岡宏美先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 秋場哲哉, 田中達也, 新井輝義, 林 志直, 森 功次, 野口やよい, 永野美由紀, 吉田靖子, 矢野一好: 細菌添加培養処理によるカキなどからのノロウイルス検出率の向上. 食衛誌, **49**, 407-410 (2008).
- 2) Atmar, R. L., Neill, F. H., Romalde, J. L., Le Guyader, F., Woodle, Y. C. M., Metcalf, T. G. and Estes, M. K.: Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 3014-3018 (1995).
- 3) Bidawid, S., Farber, J. M. and Sattar, S. A.: Rapid concentration and detection of hepatitis A virus from lettuce and strawberries. J. Virol. Methods, **88**, 175-185 (2000).
- 4) Butot, S., Putallaz, T. and Sánchez, G.: Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. Appl. Environ. Microbiol., **73**, 186-192 (2007).
- 5) Cheong, S., Lee, C., Choi, W. C., Lee, C. H. and Kim, S. J.: Concentration method for the detection of enteric viruses from large volumes of foods. J. Food Prot., **72**, 2001-2005 (2009).
- 6) Comelli, H. L., Rimstad, E., Larsen, S. and Myrmel, M.: Detection of norovirus genotype I3b and II4 in bioaccumulated blue mussels using different virus recovery methods. Int. J. Food Microbiol., **127**, 53-59 (2008).
- 7) Dix, A. B. and Jaykus, L. A.: Virion concentration method for the detection of human enteric viruses in extracts of hard-shelled clams. J. Food Prot., **61**, 458-465 (1998).
- 8) Fukuda, S., Sasaki, Y. and Seno, M.: Rapid and sensitive detection of norovirus genomes in oysters by a two-step isothermal amplification assay system combining nucleic acid sequence-based amplification and reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assays. Appl. Environ. Microbiol., **74**, 3912-3914 (2008).
- 9) Fumian, T. M., Leite, J. P., Marin, V. A. and Miagostovich, M. P.: A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. J. Virol. Methods, **155**, 39-43 (2009).
- 10) Gentry, J., Vinje, J. and Lipp, E. K.: A rapid and efficient method for quantitation of genogroups I and II norovirus from oysters and application in other complex environmental samples. J. Virol. Methods, **156**, 59-65 (2009).
- 11) Guevremont, E., Brassard, J., Houde, A., Simard, C. and Trottier, Y. L.: Development of an extraction and concentration procedure and comparison of RT-PCR primer systems for the detection of hepatitis A virus and norovirus GII in green onions. J. Virol. Methods, **134**, 130-135 (2006).
- 12) Huang, P., Farkas, T., Zhong, W., Tan, M., Thornton, S., Morrow, A. L. and Jiang, X.: Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. J. Virol., **79**, 6714-6722 (2005).
- 13) Hyeon, J. Y., Chon, J. W., Park, C., Lee, J. B., Choi, I. S., Kim, M. S. and Seo, K. H.: Rapid detection method for hepatitis A virus from lettuce by a combination of filtration and integrated cell culture-real-time reverse transcription PCR. J. Food Prot., **74**, 1756-1761 (2011).
- 14) Jones, T. H., Brassard, J., Johns, M. W. and Gagne, M. J.: The effect of pre-treatment and sonication of centrifugal ultrafiltration devices on virus recovery. J. Virol. Methods, **161**, 199-204 (2009).
- 15) Kim, H. Y., Kwak, I. S., Hwang, I. G. and Ko, G.: Optimization of methods for detecting norovirus on various fruit. J. Virol. Methods, **153**, 104-110 (2008).
- 16) Kim, H. Y., Park, H. J. and Ko, G.: Hollow-fiber ultrafiltration for the concentration and simultaneous recovery of multiple pathogens in contaminated foods. J. Food Prot., **72**, 2547-2552 (2009).
- 17) Kingsley, D. H. and Richards, G. P.: Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and Norwalk-like viruses in shellfish. Appl. Environ. Microbiol., **67**, 4152-4157 (2001).
- 18) Kobayashi, S., Natori, K., Takeda, N. and Sakae, K.: Immunomagnetic capture rt-PCR for detection of norovirus from foods implicated in a foodborne outbreak. Microbiol. Immunol., **48**, 201-204 (2004).
- 19) Leggitt, P. R. and Jaykus, L. A.: Detection methods for human enteric viruses in representative foods. J. Food Prot., **63**, 1738-1744 (2000).
- 20) López-Sabater, E. I., Deng, M. Y. and Cliver, D. O.: Magnetic immunoseparation PCR assay (MIPA) for detection of hepatitis A virus (HAV) in American oyster (*Crassostrea virginica*). Lett. Appl. Microbiol., **24**, 101-104 (1997).
- 21) 門間直太, 五十嵐郁美, 柏原尚子, 廣瀬昌子, 三川正秀, 大竹俊秀: ヒト赤血球を用いたノロウイルス濃縮に

- についての検討. 福島県衛生研究所年報, **26**, 41-44 (2009).
- 22) Morales-Rayas, R., Wolffs, P. F. and Griffiths, M. W.: Anion-exchange filtration and real-time PCR for the detection of a norovirus surrogate in food. *J. Food Prot.*, **72**, 2178-2183 (2009).
 - 23) Morales-Rayas, R., Wolffs, P. F. and Griffiths, M. W.: Simultaneous separation and detection of hepatitis A virus and norovirus in produce. *Int. J. Food Microbiol.*, **139**, 48-55 (2010).
 - 24) Morton, V., Jean, J., Farber, J. and Mattison, K.: Detection of noroviruses in ready-to-eat foods by using carbohydrate-coated magnetic beads. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 4641-4643 (2009).
 - 25) Mullendore, J. L., Sobsey, M. D. and Shieh, Y. C.: Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oysters. *J. Virol. Methods*, **94**, 25-35 (2001).
 - 26) Myrmel, M., Rimstad, E. and Wasteson, Y.: Immunomagnetic separation of a Norwalk-like virus (genogroup I) in artificially contaminated environmental water samples. *Int. J. Food Microbiol.*, **62**, 17-26 (2000).
 - 27) 長岡宏美, 湊 千壽, 山田俊博, 川森文彦, 杉山寛治, 野田 衛: 2009~2010年に静岡県で発生したノロウイルス集団胃腸炎事例について. 病原微生物検出情報, **31**, 320-321 (2010).
 - 28) 野田 衛, 西尾 治, 山本美和子, 伊東文明, 池田義文, 松本 勝, 荻野武雄: 混合カキ検体からのノロウイルス濃縮操作におけるアミラーゼ処理の有用性. 広島市衛生研究所年報, **25**, 35-43 (2006).
 - 29) 野田 衛, カキからの高感度ノロウイルス検出法の開発に関する研究 I検査法の改良・開発の検討, 内閣府食品安全委員会食品健康影響強化技術研究 生食用カキに起因するノロウイルスリスク評価に関する研究 平成18~20年度研究報告書, 1-25 (2009).
 - 30) 野田 衛, カキからの高感度ノロウイルス検出法の開発に関する研究 II新規開発法のコラボスタディによる評価, 内閣府食品安全委員会食品健康影響強化技術研究 生食用カキに起因するノロウイルスリスク評価に関する研究 平成18~20年度研究報告書, 26-49 (2009).
 - 31) 奥村千恵, 真砂佳史, 佐野大輔, 植木 洋, 大村達夫: Enzymatic Virus Elution法によるカキ中腸腺からのウイルス誘出技術の開発. 環境工学研究論文集, **45**, 179-186 (2008).
 - 32) Park, Y., Cho, Y. H., Jee, Y. and Ko, G.: Immunomagnetic separation combined with real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of norovirus in contaminated food. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4226-4230 (2008).
 - 33) Sanchez, G., Elizaquivel, P. and Aznar, R.: A single method for recovery and concentration of enteric viruses and bacteria from fresh-cut vegetables. *Int. J. Food Microbiol.*, **152**, 9-13 (2012).
 - 34) Scherer, K., Johne, R., Schrader, C., Ellerbroek, L., Schulenburg, J. and Klein, G.: Comparison of two extraction methods for viruses in food and application in a norovirus gastroenteritis outbreak. *J. Virol. Methods*, **169**, 22-27 (2010).
 - 35) Schultz, A. C., Perelle, S., Di Pasquale, S., Kovac, K., De Medici, D., Fach, P., Sommer, H. M. and Hoorfar, J.: Collaborative validation of a rapid method for efficient virus concentration in bottled water. *Int. J. Food Microbiol.*, **145**(Suppl. 1), S158-S166 (2011).
 - 36) Shirato-Horikoshi, H., Ogawa, S., Wakita, T., Takeda, N. and Hansman, G. S.: Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Arch. Virol.*, **152**, 457-461 (2007).
 - 37) Speirs, J. I., Pontefract, R. D. and Harwig, J.: Methods for recovering poliovirus and rotavirus from oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2666-2670 (1987).
 - 38) Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E. and Uyttendaele, M.: Extraction of food-borne viruses from food samples: A review. *Int. J. Food Microbiol.*, **153**, 1-9 (2012).
 - 39) Stals, A., Baert, L., Jasson, V., Van Coillie, E. and Uyttendaele, M.: Screening of fruit products for norovirus and the difficulty of interpreting positive PCR results. *J. Food Prot.*, **74**, 425-431 (2011).
 - 40) Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E. and Uyttendaele, M.: Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red fruits. *Food Microbiol.*, **28**, 52-58 (2011).
 - 41) Stals, A., Baert, L., De Keuckelaere, A., Van Coillie, E. and Uyttendaele, M.: Evaluation of a norovirus detection methodology for ready-to-eat foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **145**, 420-425 (2011).
 - 42) Tian, P., Engelbrektson, A. and Mandrell, R.: Two-log increase in sensitivity for detection of norovirus in complex samples by concentration with porcine gastric mucin conjugated to magnetic beads. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4271-4276 (2008).
 - 43) Tian, P., Yang, D., Jiang, X., Zhong, W., Cannon, J. L., Burkhardt, W. 3rd, Woods, J. W., Hartman, G., Lindsmith, L., Baric, R. S. and Mandrell, R.: Specificity and kinetics of norovirus binding to magnetic bead-conjugated histo-blood group antigens. *J. Appl. Microbiol.*, **109**, 1753-1762 (2010).
 - 44) Ueki, Y., Sano, D., Watanabe, T., Akiyama, K. and Omura, T.: Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Res.*, **39**, 4271-4280 (2005).