

E 型肝炎ウイルスの濃縮法の検討

研究代表者	鈴木亮介	国立感染症研究所ウイルス第二部	室長
研究協力者	李 天成	国立感染症研究所ウイルス第二部	主任研究官
研究協力者	清原知子	国立感染症研究所ウイルス第二部	主任研究官
研究協力者	杉山隆一	国立感染症研究所ウイルス第二部	主任研究官

研究要旨

E 型肝炎ウイルスを含む培養液から、組換えウイルス様粒子を免疫したウサギ血清を用いて、濃縮法の条件検討を行った。パンソルビンの使用および界面活性剤処理により、数十倍のウイルスの濃縮が認められた。並行して検出感度を向上させるため、リアルタイム PCR の反応条件の検討を行い、数コピーレベルのゲノムの検出を確認した。2桁程度の検出感度の向上を実現させる事により、食中毒原因ウイルスの感染制御に向けて有益な基盤を提供するものと期待される。

A. 研究目的

ウイルス性食中毒の原因となるウイルスの中で、肝機能障害の原因として A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスの感染が疑われる。いずれもウイルスに汚染された水や食物を介した経口感染により伝播する。E 型肝炎は、かつては発展途上国で常時散发的に発生する、衛生環境の整っていない地域の疾患と考えられていた。しかしながら、現在ではブタやイノシシなどの動物にも感染する人獣共通感染症であることが判明し、先進国内での主な感染源と考えられている。日本の E 型肝炎報告者数は 2012 年以降、年々増加しており、年間数 100 例の感染が報告されている。加熱不十分の肉の喫食が主な原因と考えられているものの、

原因が明らかでないケースも多い。

ヒト検体から同定されたウイルスの遺伝子情報は、地方衛生研究所と国立感染症研究所の連携により蓄積されているものの、食中毒の原因と疑われる食材からのウイルスの検出や同定は、食材を汚染しているウイルス量が少ない事や、食品に含まれる夾雑物が検出を妨げる事、また潜伏期間が長いことなどから困難であり、原因食材や汚染経路が特定されることは稀である。そのため効果的な対策を取るための知見も不足している。

今年度は、食中毒原因ウイルスの 1 つである E 型肝炎ウイルスについて、高感度検出法の確立のための抗体を用いた E 型肝炎ウイルスの濃縮条件の検討を行なった。

B. 研究方法

E 型肝炎ウイルスの組換えウイルス様粒子を免疫したウサギの血清を用い、国内で報告の多い遺伝子型3のE型肝炎ウイルスの濃縮について、抗体結合試薬や界面活性剤の条件検討を行った。培養細胞で増殖させたE型肝炎ウイルスを10mLの培養液にスパイクし、抗血清と抗体結合試薬、界面活性剤等を添加し、140 μ Lまで濃縮した。濃縮サンプルからRNAを抽出し、リアルタイムPCRによりウイルスのゲノムコピー数を評価した。またリアルタイムPCRについても、マスターミックス試薬等の検討を行った。

C. 研究結果

抗体結合試薬は、プロテインA磁気ビーズよりもパンソルビンを用いた方が、ウイルス濃縮効率が良い結果であった。またNP-40の添加により、添加したウイルスを高い収率で捕捉する事が出来、数十倍のウイルス濃縮が可能となった。並行して検出感度を向上させるため、リアルタイムPCRの試薬や反応条件の検討を行ったところ、病原体マニュアルに記載のプロトコルで、数コピーまで検出する事が確認できた。しかしながら、陰性コントロールで低コピーレベルの増幅が確認される事も明らかになり、この頻度はマスターミックス試薬により異なっていた。

D. 考察

本研究では、培養細胞由来のE型肝炎ウイルスを、培養液にスパイクし、そこからウサギ血清を用いた濃縮を試みた。培養細胞由来のE型肝炎ウイルスは部分的に宿主細胞由来の膜を被っている事が近年明らかにされている。抗血清によるウイルスの濃縮に、界面活性剤処理が有効であったのは、この膜が除かれ、抗体が結合しやすくなったと考えられる。一方で糞便由来のウイルスは膜を被っていないと考えられる事から、界面活性剤処理は必ずしも抗体による濃縮に影響しない可能性も考えられる。今後は糞便由来のウイルスについても検討が必要と考えられる。食材・食品や環境水からのウイルスの濃縮を考えると、ウイルスの由来は両者のケースの可能性が考えられる事から、どちらのウイルスにも有効な条件である事が望ましいと思われる。また他の遺伝子についても検討が必要と思われる。各種ウイルスの食品等への汚染経路、感染パターン

の解明がすすめば、今後の予防対策に貢献できると期待される

リアルタイムPCRによる検出感度向上の検討においては、現行の病原体マニュアルの方法で、数コピーレベルのゲノムの検出を確認した。しかしながら、陰性コントロールにおいても、10コピー以下の低レベルであるものの、増幅されるケースがあった。コンタミネーションの可能性を完全には否定できないが、用いるマスターミックス試薬によって、その頻度が異なった事から、改良の必要があると考えられた。

E. 結論

E型肝炎ウイルスを含む培養上清から、抗体を用いて濃縮可能な試薬および界面活性剤の条件検討を行った。NP-40の添加により、数十倍のウイルス濃縮が可能となった。検出感度を向上させるため、リアルタイムPCR

の反応条件の検討を行ない、数コピーのゲノムを検出した。今後の食中毒原因ウイルスの感染制御に向け、検査法をさらに一般化し、地衛研等にも提供可能なものにする事が期待される。

G. 研究発表

論文発表

(英文)

1. Jpn J Infect Dis. 73:89-95, 2020. Comparison of clinical features of hepatitis A in people living with HIV between pandemic in 1999-2000 and that in 2017-2018 in a metropolitan area of Japan. Koga M, Lim LA, Ogishi M, Satoh H, Kikuchi T, Adachi E, Sugiyama R, Kiyohara T, Suzuki R, Muramatsu M, Koibuchi T, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H.
2. Virology. 536, 119-124, 2019. Integrin $\alpha 3$ is involved in non-enveloped hepatitis E virus infection. Shiota T, Li TC, Nishimura Y, Yoshizaki S, Sugiyama R, Shimojima M, Saijo M, Shimizu H, Suzuki R, Wakita T, Muramatsu M, Ishii K.
3. Nature Microbiology. s41564-019-0425-6, 2019. Basal expression of interferon regulatory factor 1 drives intrinsic hepatocyte resistance to multiple RNA viruses. Yamane D, Feng H, Rivera-

Serrano EE, Selitsky SR, Hirai-Yuki A, Das A, McKnight KL, Misumi I, Hensley L, Lovell W, Gonzalez-Lopez O, Suzuki R, Matsuda M, Nakanishi H, Ohto-Nakanishi T, Hishiki T, Wauthier E, Oikawa T, Morita K, Reid LM, Sethupathy P, Kohara M, Whitmire JK, Lemon SM.

(和文)

1. 小児科診療 特集 小児の食中毒 2019 Vol.82 A型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス 鈴木亮介
2. 病原微生物検出情報 (IASR)、2019、Vol.40、No.9、2018年のA型肝炎流行状況について杉山隆一、清原知子、鈴木亮介、石井孝司、村松正道、砂川富正
3. 病原微生物検出情報 (IASR)、2019、Vol.40、No.9、A型肝炎ワクチン 清原知子、鈴木亮介、村松正道

学会発表

1. 2018年に日本で発生したA型肝炎アウトブレイクの疫学的及び遺伝学的分析. 杉山隆一、砂川富正、清原知子、鈴木亮介、石井孝司、村松正道. 第67回日本ウイルス学会、船堀 2019年10月29-31日.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
該当なし

食材、食中毒関連情報の収集、地方衛生研究所における検証

研究分担者 四宮博人 愛媛県立衛生環境研究所長

研究要旨

食中毒原因ウイルスの食材・食品からの検出や同定は、食材を汚染しているウイルス量が少ない事や食品に含まれる夾雑物が検出を妨げる事などから困難な場合が多い。そのため原因食品や汚染経路の特定に至らず、効果的な対策を取るための知見も不足している。当分担任は、食材や食中毒関連情報の収集及び本研究班で開発される高感度検出法の地方衛生研究所（以下、地衛研）における検証を担当しており、各種ウイルスの食品等への汚染経路、感染パターンの解明がすすめば、今後の予防対策に貢献できると考えられる。今年度は、食材や環境水の収集と提供及び食中毒事例や関連情報の収集と情報提供等に関する地衛研の状況を把握するため、①当該自治体における食中毒検査体制、②食中毒（疑）発生事例が起こった場合の検査方法、検体種類、検査手順、前処理及び濃縮・精製方法、③遺伝子検査の判定基準等、④食中毒の行政処分等におけるウイルス検査結果の利用、⑤環境中の食中毒原因ウイルスサーベイランス、⑥食中毒調査支援システム(NESFD)の活用などについて調査を行い、情報を収集した。これらは今後の食中毒原因ウイルスの感染制御に向け、地衛研からの貢献において有益な基盤を提供するものと期待される。

A. 研究目的

食中毒の原因となるウイルスは、ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス、レオウイルス、アイチウイルス、A 型・E 型肝炎ウイルス、アデノウイルス等、多くのウイルスが知られている。これらによる食中毒は、事件数にして全体の 2 割、患者数にして全体の 5 割を占める。

ヒト検体から同定されたウイルスの遺伝子情報は、地方衛生研究所（以下、地衛研）と国立感染症研究所（以下、感染研）の連携により蓄積されているものの、食中毒の原因と疑われる食材からのウイルスの検出や同定は、食材を汚染してい

るウイルス量が少ない事や、食品に含まれる夾雑物が検出を妨げる事などから困難な場合が多い。そのため原因食品や汚染経路の特定に至らず、効果的な対策を取るための知見も不足している。

このことから、様々な食中毒原因ウイルスについて効果的な予防策を検討するための知見を収集し、ガイダンス案を提示することが、本研究班としての目的である。

当分担任は、食材、食中毒関連情報の収集、地衛研における検証を担当し、各種ウイルスの食品等への汚染経路、感染パターンの解明がすすめば、今後の予防対策に貢献できると考えられる。さら

には、地方自治体及び国レベルの関係部局の連携、情報共有、遺伝子検査手法の統一化等により、広域的な食中毒事案に共通する発生要因が明らかになる事が期待される。

今年度は、食材や環境水の収集と提供及び食中毒事例や関連情報の収集と情報提供等に関する地衛研の状況を把握するため、検査体制、検査項目、検体種類、検査方法等について、全国の地衛研を対象に調査を実施した。

B. 研究方法

地衛研の現場における食材や食中毒事例情報等を収集し提供を得ることに先だて、地衛研の状況を把握する目的で、末尾に示す調査を実施した。回答は愛媛県立衛生環境研究所に送付され、調査項目毎に集計された。

調査項目の概要は以下である。①当該自治体における食中毒検査体制、②食中毒（疑）発生事例が起こった場合の、検査方法、検体種類、検査手順、検査の前処理及び濃縮・精製方法、③遺伝子検査の判定基準等、④食中毒の行政処分等に検査結果がどのように用いられているか、⑤環境中の食中毒原因ウイルスサーベイランスについて、⑥食中毒調査支援システム(NESFD)の活用について、⑦食中毒原因ウイルス検査に関する要望等について。

倫理面への配慮

本研究課題は、研究代表者及び研究分担者を研究者として、国立感染症研究所倫理審査委員会で審査され、承認された。また、当分担者を研究代表者、協力地衛研担当者を研究協力者として、愛媛県立衛生環境研究所倫理審査委員会で審査され、承認された。

C. 研究結果

全国 83 か所の地衛研のすべてから回答があっ

た（回答率 100%）。内訳は、都道府県型 47 施設（大阪健康安全基盤研究所の天王寺センターと森ノ宮センターからはそれぞれ回答があり、合計 48 施設）、政令指定都市型（以下、政令市）19 施設、中核市・特別区型（以下、中核市等）17 施設である。調査結果について、項目別に以下に記す。

1. 所属自治体における食中毒検査体制について

所属自治体における食中毒検査（ウイルス検査）をすべて地衛研で実施しているか否かについては、都道府県の 79%、政令市の 100%、中核市等の 71%では地衛研ですべて実施していたが、都道府県の 21%では保健所及び中核市保健所も検査を実施し、中核市等の 29%では近隣の地衛研で実施していた（図 1）。

2. 食中毒（疑）集団発生事例が起こった場合の検査について

各種食中毒原因ウイルスについて、地衛研で検査できるか否か（所属自治体や当該地衛研の方針として検査する・しない場合も含む）については、図 2 に示すように、ノロウイルスは地衛研のタイプに関わらずほとんどの施設で検査でき、サポウイルス、ロタウイルス、A 型肝炎ウイルスは中核市等以外では大部分で検査でき、アストロウイルス、E 型肝炎ウイルスは検査できる地衛研がやや減少し、アイチウイルスは検査できる施設は約半数であった。その他のウイルスとしては、アデノウイルスをあげた施設が最も多く（13 施設）、それ以外のウイルス種は少数であった（エンテロウイルス、パレコウイルス）。

検査方法としては、ノロウイルスでは従来からの通知法（厚労省食品安全部）と最近整備された病原体検出マニュアル（感染研）に基づく方法が多く、サポウイルスとアストロウイルスでは食品衛生検査指針（日本食品衛生協会）、病原体検出

マニュアル、その他（論文等）のいずれも用いられていた（図 3）。他方、ロタウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスでは、主として病原体検出マニュアルが用いられていた（図 3, 4）。

検査検体については、患者と調理従事者の糞便は全ての施設で検査され、患者吐物はほとんどの施設で検査される一方、食品・食材、拭き取り、水については多くの施設で必要に応じて検査されていた（図 5）。また、患者検体（便・吐物）が搬入された場合、同時に複数の原因ウイルスについて検査されるのではなく、まずノロウイルスの検査を実施する施設が多かった（図 6）。

ウイルス量が少ない、食品・食材、ふき取り材料の前処理については、「実施していない」が最も多く、実施している中では、アミラーゼ処理が多かった。一方、濃縮・精製法については、超遠心法が最も多く、次いで、PEG 沈殿法、パンソルビントラップ法の順に多く、「実施していない」は少数であった（データは示していない）。

3. ウイルス遺伝子検査の判定や操作対照について

リアルタイム PCR で実測値が 10 コピー以下の場合、多くの施設では陰性と判断されるが、一部施設では Nested PCR により検出感度を高めた検査を実施していた（図 7）。また、ウイルス核酸抽出や RT-PCR などの操作が妥当であることを確認するために用いる、プロセスコントロールについては過半数の施設で使用していなかった（図 8）。

4. 食中毒の判定・処分等に関して、ウイルス検査結果がどのように用いられているかについて

食中毒（疑）事例等の判定（行政処分）において、84%の施設ではウイルス検査結果が用いられていた（図 9）。また、行政からノロウイルスの遺

伝子型（GI.4 等）や遺伝子解析に基づく系統樹解析等について提供を依頼されるかについては、ほとんどの施設で、依頼される、または、依頼されることがある、という回答であった（図 10）。その際、データを求められるタイミングは、行政処分時、または、行政処分後の取りまとめ時が大部分であった（図 11）。

5. 環境中の食中毒原因ウイルスサーベイランスについて

県の事業や研究班などで、環境水（河川水、海水など）やカキなどの二枚貝等のウイルスサーベイランスを実施しているかについては、都道府県型の 63%、政令市型の 42%が実施していた（図 12）。検査対象の検体としては、カキ等の二枚貝と下水が多かった（図 13）。

6. 食中毒調査支援システム(NESFD)について

NESFD を食中毒対策に使用しているかについては、都道府県型の 23%、政令市型の 16%が使用していると回答した（図 14）。使用目的としては、他自治体での食中毒発生状況の把握、広域食中毒時の情報収集、遺伝子型情報の収集などがあげられた。

D. 考察

食中毒原因ウイルスの汚染が疑われる食材や環境水の収集と提供、及び食中毒事例や関連情報の収集と情報提供に関する地衛研の状況を把握するため、検査体制、検査項目、検体種類、検査方法、検査結果の行政処分における利用、環境サーベイランス、食中毒調査支援システム(NESFD)の利用等について調査を実施した。

所属自治体での食中毒検査体制において、地衛研が主要な役割を担っていることが明らかにされた。地衛研で検査可能なウイルス種としては、

ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、A型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルスがあげられ、アイチウイルスとアデノウイルスについては検査可能な施設が少なかった。なお、「検査できる・できない」には、所属自治体や当該地衛研の方針として検査する・しない場合も含まれる。

検査方法としては、通知法（厚労省食品安全部）、食品衛生検査指針（日本食品衛生協会）、病原体検出マニュアル（感染研）、その他（論文等）に基づいて行われているが、ウイルス種によって参考になっている指針・マニュアル等が異なっていた。また、多くの方法は糞便等のヒト由来検体からの検出に関するもので、食材や食品からの検出に関する記載は充分ではなく、この点について改訂を希望する意見が寄せられた。実際の検査においても、患者及び調理従事者の便検体は全ての施設で検査を実施しているが、食材・食品やふき取り検体については必要に応じて実施する施設が多い状況であることが明らかにされた。しかし、感染原や感染経路に対する関心は高く、過半数の施設でカキ等の二枚貝や下水等の環境水のウイルスサーベイランスを実施していた。

今回の調査で、自治体での食中毒ウイルス検査において、地衛研が中心的な役割を担っていることが明らかにされた。糞便等のヒト由来検体の検

査に比べ、食材・食品や汚染水に対する検査方法は十分に確立しておらず、この点に関する要望が寄せられた。本研究班で予定されている、食材・食品や環境水からの食中毒原因ウイルスの高感度検出方法の開発が望まれ、各種ウイルスの食品等への汚染経路、感染パターンの解明がすすめば、今後の予防対策に貢献できると期待される。

E. 結論

地衛研は所属自治体の食中毒原因ウイルス検査において中核的な役割を担っており、各種ウイルスの食品等への汚染経路、感染パターンの解明がすすめば、今後の予防対策に貢献できると考えられる。当分担任は、食材・食品や環境水の収集と提供及び食中毒事例に関する情報の収集と提供に関する地衛研の現状を把握するための調査を行った。これらは今後の食中毒原因ウイルスの感染制御に向け、地衛研からの貢献において有益な基盤を提供するものと期待される。

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当なし

厚生労働科学研究「食中毒原因ウイルスの不活化および高感度検出法に関する研究」
「食材・食中毒関連情報の収集、及び新規検査法の検証」分担班アンケート 2019.12.12-26

(質問・提出先: 愛媛県立衛生環境研究所)

地衛研名(正式名):	
記入者職・氏名 :	
連絡先メールアドレス:	
連絡先電話番号 :	

※ 次の各問について、

- の回答欄は、プルダウンから該当する番号を選択してください。
 の回答欄は、言葉でご記入ください。

問1 . 貴所が属する自治体での食中毒検査体制についてお聞きます。

- (1) 食中毒検査のうちウイルス検査については、すべて地方衛生研究所(地衛研)で実施していますか。

①はい ②いいえ

- (2) (1)で「いいえ」と答えた方、地衛研以外で実施している行政機関を記入ください(例: 保健所)。

問2 . 食中毒(疑)集団発生事例が起こった場合の検査についてお聞きます。

- (1) 検査できるか、検査できないか、を選び、どの検査方法に基づいて検査しているかを、左の①～④から選んでく(複数選択可)。また、その他の検査できるウイルス名、その他の方法の内容を空欄にご記入ください。

検査方法	ウイルス名	検査できるか	検査方法	その他の方法の内容
①通知法	ノロウイルス			
②食品衛生検査指針	サポウイルス			
③病原体検出マニュアル	ロタウイルス			
④その他の方法	アストロウイルス			
	アイチウイルス			
	A型肝炎ウイルス			
	E型肝炎ウイルス			
	他)	検査できる		
	他)	検査できる		

- (2) 想定される原因施設が当該自治体内にある場合、通常以下の検体について検査を実施しますか。

- ・患者糞便 : ①はい ②いいえ
- ・患者吐物 : ①はい ②いいえ
- ・従事者糞便 : ①はい ②いいえ
- ・食品・食材 : ①はい ②いいえ ③必要に応じて実施する
- ・ふき取り(施設、従事者手指等) : ①はい ②いいえ ③必要に応じて実施する
- ・水(井戸、タンク等) : ①はい ②いいえ ③必要に応じて実施する

- (3) 患者検体(便・吐物)が搬入された場合、どのウイルスの検査から始めますか。

(A型肝炎、E型肝炎がすでに疑われている場合を除く。)

①ノロウイルス ②マルチプレックスPCR法で一度に多数を実施 ③その他

- (4) (3)で①を選択した方は、病原体が検出されなかった場合、どういう順番で他のウイルス検査を実施しますか。

例) ノロウイルス→サポウイルス→ロタウイルス→アストロウイルス

- (5) (3)で②を選択した方は、検出できるウイルス名をご記入ください。

野菜表面のウイルス検出法の検討

研究分担者 片山 浩之 東京大学大学院工学系研究科
研究協力者 関 瑛理子 東京大学大学院工学系研究科

研究要旨

野菜表面のウイルス測定のためのふき取り材の選定を目的として、基礎的検討を行った。ガーゼ、ガラスフィルター、ガラスウールを用いて、ウイルスの吸着効率ならびにそこからの誘出効率を調べた。大腸菌ファージ MS2 を含む水溶液中にこれらの担体を入れ、一定時間後に回収して、ビーフエキス、硫酸溶液および水酸化ナトリウム溶液を様々に組み合わせ、ウイルス回収率が最も高い方法を選定した。

結果として吸着材としてガラスウールを用い、硫酸による酸洗浄を行ってからビーフエキスで誘出を行う方法において最も高い回収率を得られた。また、ウイルス溶液に 5 分も浸せば吸着飽和に達するということが、サンプル回収後長時間ウイルスが保持できること、そして幅広いウイルス濃度にこの手法が対応可能であることが判明した。

以上より、ガラスウールとビーフエキスによる誘出は、野菜の表面からのウイルス検出法として有力な手法であると期待される。

A. 研究目的

日本国内のウイルスを原因とした食中毒事例は 7000 件ほどとなっており、食中毒患者数の半数を占めている¹。食中毒の原因となる食物は多岐にわたるが、野菜による例もある。途上国でも市場の野菜表面から大腸菌やノロウイルスが検出された報告がある²。ウイルス性食中毒を減らすためには各食物表面に存在するウイルスの検出が必要である。

従来表面上のウイルスは種々の拭き取り剤と誘出法が用いられてきた。しかし、最適手法についての統一した見解はなく、対象とするウイルスによってまちまちな結果が出ていた^{3,4,5}。

本研究では、野菜表面に付着したウイルス検出法の開発を目的として、種々の拭き取り剤および誘出法の比較検討を通じた最適手法の探求に取り組んだ。対象とするウイルスは、ウイルス性食中毒のほとんどを引き起こしているノロウイルスと物性が似ている F 特異大腸菌 RNA ファージの MS2 とした。

B. 研究方法

1. 最適吸着・誘出条件の探求

拭き取り剤・誘出方法の文献調査から、拭き取り剤としてガーゼ・ガラスフィルター・ガラスウールの 3 つを選定した。また、拭き取り剤からの回収率を向上するために、硫酸による酸洗浄、水酸化ナトリウムの使用、ビーフエキスの pH 調整等様々な誘出条件を検討した。

拭き取り剤としての適性を評価するため、MS2 溶液に各素材を一定時間浸水し、吸着したウイルス量を評価した。

2. 吸着特性の解明

上記最適条件の探求により得られた手法における吸着速度・脱着速度・感度を検討するため、溶液中の MS2 濃度や浸水条件を変更して実験を行った。

C. 結果及び考察

1. 最適吸着・誘出条件の探求

実験に用いたガーゼ・ガラスフィルター・ガラスウールの素材 3 種の MS2 回収量においては、ガラスフィルター・ガラスウールがガーゼに勝るとい

う結果が得られた。これはコットン表面が負に帯電している一方、ガラス繊維はほぼ中性であり、表面電荷が負であるウイルスとの間に静電的反発力が生じなかったためだと考えられる。

各誘出条件の比較においては、pH3 程度の硫酸による酸洗浄を経た後に pH9 程度の 3%ビーフェキス溶液 (HiMedia 製) による誘出がもっとも回収量が多かった。また、誘出時間は 2 分と 30 分で差が出なかったことから短時間で十分である可能性が示唆された。

また、この手法における MS2 回収率は 66-68% であり、吸着・誘出効率が十分であることを示している。

2. 吸着特性の解明

吸着特性を解明するため、吸着速度・脱着速度・測定感度を調査した。

MS2 溶液の濃度によらず、ガラスウール担体は溶液投入後 5 分以内に吸着飽和に至ることが示された。このことから、この手法では短時間で環境中のウイルス濃度を反映できることが示唆される。

脱着速度は吸着速度より遅く、時間が経つにすれウイルス回収量は減るものの、MS2 溶液から取り出した 24 時間後でもガラスウール担体から MS2 が検出された。定量性を確保するにはサンプル回収後速やかな測定が望ましいが、陽性・陰性だけを判断する場合においては回収後長時間が経過しても対応可能であることが推察された。

ガラスウール担体への MS2 飽和吸着量は 10^1 PFU/mL- 10^6 PFU/mL という濃度幅において各溶液濃度を反映したものとなり、広い濃度域においてこの手法の測定感度が高いことが見られた。よって、ウイルス回収量から溶液濃度を逆算することができる可能性が示されている。

E. 結論

水中の MS2 測定にはガラスウールに吸着させ、硫酸による酸洗浄の後に 3%ビーフェキスによって 2 分の誘出を行う方法が適しているとわかった。吸着飽和には 5 分以内に至り、ほぼ瞬間的に MS2 がガラスウールに吸着していることが推察される。また、幅広いウイルス濃度を反映できることが示された。以上からガラスウールを用いたウイ

ルス測定法は野菜表面のウイルス検出への適用が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

I. 参考文献

1. 厚生労働省. 食中毒統計資料. (2019). Available at: https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunit suite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html. (Accessed: 30th April 2020)
2. Van Ha, N. T. *et al.* Bacterial contamination of raw vegetables, vegetable-related water and river water in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Water Sci. Technol.* **58**, 2403-2411 (2008).
3. Julian, T. R., Tamayo, F. J., Leckie, J. O. & Boehm, A. B. Comparison of surface sampling methods for virus recovery from fomites. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 6918-6925 (2011).
4. Turnage, N. L. & Gibson, K. E. Sampling methods for recovery of human enteric viruses from environmental surfaces. *Journal of Virological Methods* **248**, 31-38 (2017).
5. Nelson, S. W. *et al.* Evaluation of nonwoven fabrics for nasal wipe sampling for influenza A virus in swine. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **30**, 920-923 (2018).

アイチウイルス検出法の開発・検討

研究分担者 佐々木 潤 藤田医科大学医学部講師

研究要旨

アイチウイルスは胃腸炎患者や、二枚貝および河川水から検出されている。食品や環境水中のウイルス定量は、感染経路の理解に必要である。本研究では、高感度、簡便なアイチウイルス検出法を開発し、食品や環境水中のウイルス検出、定量を行う。今年度は、アイチウイルス検出リアルタイム PCR 法の検出感度を検討した。

A. 研究目的

アイチウイルスは、胃腸炎関連のピコルナウイルスであり、集団発生および散发発生の胃腸炎患者から検出されるほか、二枚貝および下水、河川水などの環境中からも検出されている。食品や環境水中のウイルス定量は、感染経路の理解に必要である。本研究では、本ウイルスの高感度検出法の開発および既報の検出法の評価を行う。加えて、食品や環境水中のウイルス検出、定量を行い、本ウイルスの環境中の分布の理解を深めることを目的とする。今年度は、アイチウイルス検出リアルタイム PCR 法の検出感度を検討した。

B. 研究方法

以下の既報のリアルタイム RT-PCR によるアイチウイルス RNA 検出法 (Kitajima et al., Appl Environ Microbiol 2013 ; Coudray-Meunier et al., PLOS One 2016; Drexler et al., Emerg Infect Dis 2011) を当研究室で行った場合の検出感度を比較した。DNA の鋳型は、Genotype A については、すでに作成していたアイチウイルス A846/88 株 cDNA クローンを用い、Genotype B は、Accession No.

DQ028632 (Oh et al., 2006) をもとに人工合成した。Genotype A については、cDNA クローンから *in vitro* 転写により合成した RNA も、鋳型として使用した。逆転写は、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher)、リアルタイム PCR は、TaqPath qPCR Master Mix (Thermo Fisher) および QuantStudio 7 リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher) を用いて行った。

C. 研究結果

DNA が鋳型の場合、Kitajima et al. および Coudray-Meunier et al. の方法で、 10^1 コピーを検出した。RNA から逆転写後リアルタイム PCR を行った場合（ツーステップ）、DNA より 5 倍程度かそれ以上感度が低くなる傾向がみられた。

D. 考察

当研究室でも、既報の方法により、高感度に DNA を検出することができた。しかし、RNA を鋳型にした場合には、高感度検出のために、逆転写の条件検討の必要性が明らかとなった。今後、逆転写の検討を行いつつ、我々自身でも

プライマーやプローブの設計を行い、より良い方法の開発を目指す。

E. 結論

当研究室において、既報と同程度で高感度にアイチウイルスcDNAを検出することができた。

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

ロタウイルスの検出方法の開発・改良

分担研究者 藤井克樹 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

研究要旨

リアルタイム PCR によるロタウイルス遺伝子の検出法について、最適なプライマー・プローブや反応条件の検討を行った。プライマー・プローブセットは世界的に広く利用されている 2 種類のセット（Freeman らのセットおよび Jothikumar らのセット）について比較検討を行った。両者のリアルタイム PCR による増幅効率を検証したところ、両者の増幅効率はほぼ同等であった。ただし、ややマイナーな T3 型に関しては Jothikumar らのセットでは検出できなかった。また、ワクチン株（ロタテック）である T6 型についても Jothikumar らのセットでは検出感度が大幅に低下することが明らかとなった。従って、幅広い遺伝子型を確実に検出するためには、Freeman らが設計したプライマー・プローブセットの方が優れていると考えられた。

A. 研究目的

ロタウイルスはヒトに急性胃腸炎を引き起こす代表的なウイルスであり、稀に食中毒の原因ウイルスとして検出されることがある。しかし、食品からのロタウイルス検出例は少なく、知見が限られている。本研究では、食品を代表とする不純物の多いサンプルからのロタウイルスの高感度検出方法の開発を試みる。

B. 研究方法

ロタウイルスのリアルタイム PCR 法としては、NSP3 遺伝子をターゲットとした 2 種類のプライマー・プローブセットが世界的に広く利用されている。（Freeman *et*

al., J Med Virol. 2008, 80(8):1489-96 および Jothikumar *et al.*, J Virol Methods. 2009, 155(2):126-31)。そこで、まず両者のプライマー・プローブセットの性能について比較検証を行った。検証には代表的な G1P[8]株である Wa 株の NSP3 遺伝子全長を p-GEM-T Easy Vector (Promega) に組み込んだ標準品と、ロタウイルス胃腸炎患者から採取された便検体から抽出した RNA を使用した。RNA 検体の逆転写反応には PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ) を、リアルタイム PCR 反応には Premix Ex Taq (Probe qPCR) (タカラバイオ) を使用した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来の検体を使用する際には実験計画書を提出して、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得た上で研究を行った。

C. 研究結果

世界的に利用されているプライマー・プローブセットのうち、Freeman らの設計したプローブはサイズが大きいため、蛍光色素とクエンチャーを 5' 末端および 3' 末端に付加させた通常のプローブではバックグラウンドが高く検出に支障が出ることがあった。そこで Integrated DNA Technologies (IDT) 社のダブルクエンチャープローブを使用したところ、バックグラウンドを低く抑えることに成功した。次に Freeman らのプライマー・プローブセットと Jothikumar らのプライマー・プローブセットの増幅効率を検証したところ、両者の増幅効率はほぼ同等であった。ただし、ヒトロタウイルスの主要な流行型 (NSP3 の遺伝子型) である T1 型と T2 型については問題なく検出できたものの、ややマイナーな T3 型に関しては Jothikumar らのプライマー・プローブセットでは検出できなかった。また、ワクチン株 (ロタテック) の T6 型に関しても、Freeman らのプライマー・プローブセットと比較して Jothikumar らのプライマー・プローブセットでは検出感度が 1/1000 程度まで低下した。

D. 考察

本研究により、Jothikumar らのプライマー・プローブセットでは、T3 型および T6 型の検出に支障が出ることが明らかとなった。これは、T3 型のプローブ結合部位の塩

基配列がプローブの配列と 25 塩基中 4 塩基異なっている、また、T6 型のプローブ結合部位の塩基配列がプローブの配列と 25 塩基中 2 塩基異なっているためであると考えられた。従って、幅広い遺伝子型を確実に検出するためには、Freeman らのプライマー・プローブセットの方が優れていると考えられた。

今後は Freeman らのプライマー・プローブセットを用いて、サンプルに含まれる不純物の検出感度への影響について検証を行う予定である。

E. 結論

ロタウイルスのリアルタイム PCR による検出法としては、Freeman らが設計したプライマー・プローブセットを用いるのが適当であると考えられた。

G. 研究発表

論文発表

(英文)

1. Jpn J Infect Dis. 2020 Jan 23;73(1):26-35. Molecular characteristics of novel mono-reassortant G9P[8] rotavirus A strains possessing the NSP4 gene of the E2 genotype detected in Tokyo, Japan. Fujii Y, Oda M, Somura Y, Shinkai T
2. Front Microbiol. 2019, 10:940. Molecular Epidemiology and Clinical Features of Rotavirus Infection Among Pediatric Patients in East Java, Indonesia During 2015-2018: Dynamic Changes in Rotavirus Genotypes From Equine-Like G3 to Typical Human G1/G3. Athiyyah AF, Utsumi T, Wahyuni RM, Dinana Z,

Yamani LN, Soetjipto, Sudarmo SM, Ranuh RG, Darma A, Juniastuti, Raharjo D, Matsui C, Deng L, Abe T, Doan YH, Fujii Y, Shimizu H, Katayama K, Lusida MI, Shoji I.

3. Front Microbiol. 2019, 10:647. Improvement of Rotavirus Genotyping Method by Using the Semi-Nested Multiplex-PCR With New Primer Set. Fujii Y, Doan YH, Wahyuni RM, Lusida MI, Utsumi T, Shoji I, Katayama K.

(和文)

4. 病原微生物検出情報 (IASR)、2019、Vol.40、No.12、ロタウイルスワクチン導入後の流行株の変化 藤井克樹

5. 病原微生物検出情報 (IASR)、2019、Vol.40、No.12、マルチプレックス PCR によるロタウイルスの VP7 遺伝子型判定法 藤井克樹

学会発表

1. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 (東京)2019 年 10 月 29-31 日 Whole genome analysis of G12P [8] rotavirus strains from hospitalized children in Surabaya, Indonesia (インドネシアスラバヤの小児入院症例から採取された G12P[8]株の全ゲノム解析) Laura Navika Yamani, Takako Utsumi, Yen Hai Doan, Yoshiki Fujii, Zayyin Dinana, Rury Mega Wahyuni, Soegeng Soegijanto, Alpha Fardah

Athiyah, Soetjipto Soetjipto, Juniastuti Juniastuti, Yujia Liang, Chieko Matsui, Lin Deng, Takayuki Abe, Hiroyuki Shimizu, Koji Ishii, Kazuhiko Katayama, Maria Inge Lusida, Ikuo Shoji

2. 第 31 回ウイルス性下痢症研究会学術集会 (神奈川) 2019 年 10 月 28 日 最近のヒト由来ロタウイルスに見られる遺伝的特徴の変化 藤井克樹

3. 第 60 回日本臨床ウイルス学会 (愛知) 2019 年 5 月 25-26 日 2017-2018 年の東京都におけるロタウイルス流行株の全ゲノム解析 藤井克樹、小田真悠子、宗村佳子、新開敬行

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特願 2018-188665 (2018 年 10 月 3 日出願) ロタウイルスの遺伝子型検出方法と、これに用いる遺伝子増幅用プライマーセット 藤井克樹、株式会社島津製作所 (出願中)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

シジミを用いたノロウイルス陽性サンプルモデルの検討

研究分担者 村上 耕介 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

ノロウイルスは近年まで感受性細胞がなかったことから、不活化条件等の知見はノロウイルスの近縁ウイルスを用いた研究に依存していた。本研究では、腸管オルガノイドを用いたノロウイルス培養系を用いることで直接的に不活化条件を特定することを目指した。それに先立ち、ノロウイルス汚染食品として正確な陽性サンプルを準備するため、本年度はシジミをモデルとしたサンプル作製の検討を行った。

A. 研究目的

陽性コントロールとしてのノロウイルス汚染二枚貝を正確に作製するため、本年度は、二枚貝を透明化することでノロウイルス蓄積部位の特定を目指した。

B. 研究方法

モデル二枚貝として、食中毒事例が報告されており、かつ小規模アッセイが可能なシジミを用いた。市販の透明化試薬を用いてシジミの透明化を検討した。

C. 研究成果

市販の透明化試薬 (SCALEVIEW、Fuji Film) によりシジミ組織の大部分が透明化されたが、中腸腺を含む腸管の透明化は不完全であった。一方で、飼育開始日と 2 日目のシジミを比較すると、中腸腺の色が薄くなっていた。無給餌飼育による腸管内容物の減少が期待されたことから、一定期間飼育するための情報収拾を行なった。

D. 考察

シジミの飼育に希釈海水が有効であるとの情報を得たことから、次回は希釈海水を用いて無給餌飼育を行う。また 2 日の無給餌飼育で中腸腺の内容物減少が見られたことから、1 週間程度の飼育を目指す。続けて、蛍光色素標識 VLP を用いた実験も行いたい。

E. 結論

これまでに二枚貝の透明化は行われたことがなかったが、今回おおよその効果が認められたことから、着実に研究が進んでいると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Estes KM., Ettayebi K., Tenge VR., Murakami K., Karandikar U., Lin SC., Ayyar BV., Cortes-Penfield WC-P., Haga K., Neill FH., Opekun AR., Broughman JR., Zeng XL., Blutt SE., Crawford SE., Ramani S., Graham DY., Atmar RL. Human Norovirus Cultivation in Nontransformed

Stem Cell-Derived Human Intestinal Enteroid Cultures: Success and Challenges. *Viruses*. 2019, 11.

2) Murakami K, Tenge VR, Karandikar U, Lin SC, Ramani S, Ettayebi K, Crawford SE, Zeng XL, Neill FH, Ayyar BV, Katayama K, Graham DY, Bieberich E, Atmar RL and Estes MK. Bile acids and ceramide overcome the entry restriction for GII.3 human norovirus replication in human intestinal enteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Jan 2. pii: 201910138

2. 学会発表

1) 村上 耕介、片山 和彦
小腸オルガノイドにおける胆汁要求性ヒト

ノロウイルス GII.3 の複製機序の解析、第 60 回日本臨床ウイルス学会、2019 年 5 月 26-27 日 ウィンクあいち

2) Murakami K., Tenge VR., Karandikar U., Lin SC., Ramani S., Ayyar BV., Atmar RL., Estes KM. Bile acids and ceramide are critical to allow GII.3 human norovirus entry into human intestinal enteroids

Calicivirus 2019 Conference. October 13-17 2019, Sydney, Australia

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし