

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の不活化および高感度検出法に関する研究

令和2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 亮介

令和3（2021）年 3月

## 目 次

I. 総括研究報告	
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 鈴木亮介	----- 3
II. 分担研究報告	
1. E経口肝炎ウイルスの濃縮法の検討と環境調査 鈴木亮介	----- 14
2. 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 四宮博人 (資料) アンケート調査用紙	---- 17
3. 野菜表面のウイルス検出法の検討 片山浩之	----- 23
4. アイチウイルス検出法の開発・検討 佐々木潤	----- 25
5. ロタウイルスの検出方法の開発・改良 藤井克樹	----- 27
6. シジミを用いたノロウイルス汚染食品モデル作製と不活化法の検討	- 31
村上耕介	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 34

## 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

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

### 研究要旨

本研究では、食中毒の原因ウイルスを迅速・確実に検出するために、食材やその洗浄水からのウイルス濃縮／精製法および高感度検出法を開発する事を目標とし、以下の研究を実施した。

E型肝炎の原因食材と疑われるイノシシ肉から HEV の検出を試みた。イノシシ 86 頭の血清から HEV IgG 抗体および HEV ゲノムを測定した。便検体からの検出方法について検討を行った。抗 A 型肝炎ウイルスウサギ血清を作製した。

アイチウイルス検出リアルタイムに関しては、高感度、簡便な検出法を開発し、食品や環境水中のウイルス検出、定量を行うために、リアルタイム PCR 法の検出感度の検討、ウイルス濃縮法の検討、RT-LAMP 法の開発を行った。

ロタウイルスの検出法に関しては、リアルタイム PCR 用の Freeman らのプライマー・プローブセットは、幅広いロタウイルス株を検出可能であるが、便検体からの検出においては、しばしば非特異反応が認められた。これらの非特異反応は、多くの場合  $10^2$  コピー未満として検出されるため、 $10^2$  コピー以上を閾値として陽性判定すれば、問題は起こらないと考えられた。

食品中のノロウイルスの不活化条件の探索を目的として、スモールスケールでの解析が可能で且つ食中毒事例のあるシジミをノロウイルス汚染食品モデルとした検証を行った。シジミにおけるノロウイルスの存在部位の視覚的解析のためシジミを無給餌飼育したところ、中腸腺の色が淡くなったことから透明化が改善された。

野菜表面や水中のウイルス検出を目的として、ビーフエキス誘出液からの検出感度を向上させるために、酸沈殿法を用いて濃縮する方法を開発した。エンベロープウイルスの代替指標として  $\Phi 6$  を用い、手法の妥当性の評価に用いた。ウイルスの回収率を高くし、容易に少ない液量で回収操作を実施可能であることが示された。

原因ウイルスの追求が難しい食品・食材やふき取り検体について、地衛研で行われている前処理および濃縮・精製法について現状調査するとともに、食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等について情報を収集した。デジタル PCR による高感度検出を試行した。

#### 研究分担者

四宮博人・愛媛県立衛生環境研究所・所長  
片山浩之・東京大学大学院工学系研究科・教授

佐々木潤・藤田医科大学医学部・講師  
藤井克樹・国立感染症研究所ウイルス第二部・主任研究官  
村上耕介・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

吉澄志磨・北海道立衛生研究所  
坂上亜希恵・宮城県保健環境センター  
植木 洋・宮城県保健環境センター  
岸本 剛・埼玉県衛生研究所  
貞升健志・東京都健康安全研究センター  
皆川洋子・愛知県衛生研究所  
白井達哉・大阪健康安全基盤研究所  
西嶋駿弥・大阪健康安全基盤研究所  
左近直美・大阪健康安全基盤研究所  
岡本玲子・山口県環境保健センター  
調 恒明・山口県環境保健センター  
田中義人・福岡県保健環境研究所  
豊嶋千俊・愛媛県立衛生環境研究所  
岩城洋己・愛媛県立衛生環境研究所  
山下育孝・愛媛県立衛生環境研究所  
青木紀子・愛媛県立衛生環境研究所  
関瑛理子・東京大学大学院工学系研究科  
小宮智義・北陸大学 医療保健学部  
阿部冬樹・静岡県環境衛生科学研究所  
李 天成・国立感染症研究所  
清原知子・国立感染症研究所  
杉山隆一・国立感染症研究所  
林 豪士・国立感染症研究所  
小林さくら・国立感染症研究所

#### A. 研究目的

ヒト検体由来の食中毒原因ウイルスの遺伝子情報は、地方衛生研究所と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検出は、汚染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であり、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為の知見も不足している。そこで本研究では以下に挙げる各課題を実施し、各食中毒の原因ウイルスを迅速・確実に検出するために、食材やその洗浄水からのウイルス濃縮／精製法および高感度検出法を開発する事を目的とした。

(1) A型およびE型肝炎ウイルスは、患者由来のウイルス遺伝子情報は蓄積されているものの、原因と疑われる食材からのウイルス検出は困難である。ウイルスの遺伝子型に関わらず濃縮が可能な抗体を探索し、その抗体を利用して検査の高感度化を図る。

(2) 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り、申請者らのグループはその検出に成功している(Kitajima ら, *Appl, Environ Microbiol*, 2013)。本研究では、高感度、簡便な検出法を開発し、食品や環境水中のウイルス検出、定量を行う。

(3) ヒトに胃腸炎をもたらす胃腸炎ウイルスのうち、ロタウイルスの高感度検出法の開発・改良を行う。特に不純物の多い食品等からの適切な検出法について検討を行う。これにより、食中毒が疑われる事例におけ

る検査方法を適正化する。

(4) ノロウイルスは食中毒の主要原因であるが、近年まで感受性細胞がなかった。そのため、不活化条件等の知見は培養細胞に感染可能な近縁ウイルス（マウスノロウイルス等）の研究に依存していた。申請者らのグループは、腸管オルガノイドを用いることでノロウイルスを増殖させることに成功した（Ettayebiら, *Science*, 2016）。この独自の系を利用することで、食品中のノロウイルス不活化条件の特定を目指す。

(5) 海外からの輸入も多いカット野菜は、洗浄水が野菜表面のウイルスを不活化しているか明らかでなく、ウイルス学的安全性に疑問が残る。野菜表面のウイルスが一定程度以下であることを保証する安全スキームを提案するため、洗浄水のウイルス測定と野菜表面の残存ウイルス量の関係を定量的に把握する。

(6) 各食中毒の原因ウイルスを迅速・確実に検出するために、食材やその洗浄水からのウイルス濃縮／精製法および高感度検出法を開発し、確立された検査法は地方衛生研究所（以下、地衛研）において実用性を検証し、汎用性を高める。また食材の検査を通じ、各ウイルスの食品等への汚染経路、感染パターンを解明する。

## B. 研究方法

(1) 積極的疫学調査により E 型肝炎の原因として疑われたイノシシ肉が得られた。この肉汁約 25mL から、抗 HEV ウサギ血清およびパンソルビンを用い、ウイルス濃縮操作を行った。濃縮サンプルから RNA を抽出し、リアルタイム PCR を行った。イノシシ 86 頭の血清について HEV IgG および HEV ゲノム

の測定を行った。便検体からの HEV 遺伝子抽出方法について、使用するキットによって抽出効率に違いがあるかどうかを確認した。A 型肝炎ウイルスの濃縮が可能な抗血清を得るために、異なる免疫プロトコルでウサギを免疫し、血清の感染中和活性を評価した。

(2) アイチウイルスのリアルタイム RT-PCR は、TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix (Thermo Fisher) および QuantStudio 7 リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher)、あるいは StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher) を用いて行った。鋳型として、アイチウイルス cDNA クローンより *in vitro* で合成した RNA を用いた。環境水からのウイルス検出の検討として、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法を用い、試料からの回収率を調べた。蒸留水 40 ml にウイルス希釈液 10  $\mu$ l、8% PEG 6000、2.3% NaCl を加え、遠心によりウイルスを回収し、QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen) を用いてウイルス RNA を精製した。同時に、同量同濃度のウイルス希釈液からも直接ウイルス RNA を精製し、両者のウイルス RNA コピー数をリアルタイム RT-PCR 法で比較した。RT-LAMP 法については、Genotype A, B ともに検出可能なプライマーセットを、ソフトウェア Primer Explorer を利用して設計した。鋳型としては、アイチウイルス cDNA クローンより *in vitro* で合成した RNA を用いた。Loopamp 遺伝子検査 RNA 増幅試薬キット (栄研化学) を用い、63°C、60 分反応した。

(3) 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

たプライマー・プローブセットのうち、基本的に Freeman らが報告したセット (Freeman et al., J Med Virol. 2008, 80(8):1489-96) を利用した。検体は、ロタウイルス胃腸炎患者から採取された糞便を PBS で 10%乳剤としたものを使用した。

(4) ノロウイルスの不活化条件探索を目的とした食品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市販のシジミを用いた。殻から取り出したシジミ (約 350 mg) を、GII.4 ノロウイルス  $6.9 \times 10^6$  コピー含有培地 (250  $\mu$ L) に浸し、ホモジナイズしてから遠心分離を行った。上清を腸管オルガノイドに接種し、24 時間後のウイルスコピー数を COG2F/R 及び RING2-TP を用いたリアルタイム PCR で解析した。また、GII.4 ノロウイルス添加シジミ懸濁液を 90°C で 5 分間加熱した後に腸管オルガノイドに感染させたサンプルも同様に解析した。シジミにおけるノロウイルスの存在部位の視覚的解析のため、中腸腺の可視化を目指した検討を行なった。瀬戸内海区水産研究所及びシジミ資源研究会からの情報提供を得てシジミを 5 日間まで無給餌飼育し、殻からシジミを取り出し、市販の透明化試薬 (SCALEVIEW、Fuji Film) で処理した。さらに擬似ウイルスとして FITC 標識デキストランをシジミに取り込ませたのち、透明化処理を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

(5) 野菜表面のウイルス検出におけるウイルスの濃縮手法として、ビーフエキスなどのタンパクが豊富な液体に対するオーガニックフロキュレーション (酸沈殿法) を採用し、高アルカリ条件下にあるビーフエキスを pH3 程度にまで下げることでウイルスやタンパクのフロックを形成し、それを沈

殿・再懸濁することで濃縮を行う。3% および 10%ビーフエキス (Difco および HiMedia) と 3% および 10%肉エキス (極東) を高圧蒸気滅菌し、1MNaOH の添加で pH 9.0  $\pm$  0.1 に調整した。そこに MS2 と  $\Phi$ 6 を添加し、ボルテックスしてよく混合した。酸沈殿処理を行い、ウイルス濃縮液を得た。濃縮前・濃縮後それぞれのウイルス濃度を測定し、回収率を評価した。また、凝集性の悪いビーフエキスの場合は、FeCl<sub>3</sub> の添加により共沈が発生し、ペレットの形成を期待できるので、本実験では FeCl<sub>3</sub> を添加した場合と、しなかった場合で回収率を比較した (ビーフエキス・肉エキス 40ml に対して 2.5mM FeCl<sub>3</sub> 0.2ml)。各条件につき 2 回ずつ実験を行った。

(6) 地衛研の状況を把握する目的で、原因ウイルスの追求が難しい場合が多く、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、どのような前処理および濃縮・精製法を実施しているか、について現状調査し、食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等 (マニュアル、研修、情報還元、検体保管等) について情報を収集した。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。

## C. 研究結果

(1) E 型肝炎の原因食材と疑われるイノシシ肉の肉汁に界面活性剤存在下で抗 HEV ウサギ血清およびパンソルビンを加えて HEV の濃縮操作を行い、RNA を抽出し、リアルタイム PCR を行ったが、ウイルス核酸は検出されなかった。2017-2019 年に捕獲されたイノシシ 86 頭の血清の HEV IgG を測定した。22 頭 (26%) が陽性で、性別

での陽性率はオスの 31%に対し、メスは 17%であった。また体重 20kg 未満の幼獣で 30%、成獣の 24%が陽性であり、抗体価の高い個体は幼獣に多く認められた。一方で HEV 核酸の検出も試みたが、ウイルス核酸は検出されなかった。便検体からの検出方法には、使用するキットによって抽出効率に違いがあるという報告（分担研究者 藤井克樹の報告書参照）があったため、HEV 患者の便検体 24 例から、Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) と QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN) を用いて核酸を抽出し、リアルタイム PCR を行った。今回用いた検体については両キットの抽出によるコピー数は高い相関が認められた。異なる免疫プロトコルでウサギに HAV 抗原を免疫し、血清の感染中和活性を評価した。一方のプロトコルで、高い中和活性が認められた。

(2) アイチウイルスのリアルタイム RT-PCR 法について、昨年度は 2-step 法でリアルタイム PCR を行っていたが、今年度は 1-step 法について検出感度の検討を行った。Kitajima et al. (Appl Environ Microbiol, 2013) のプライマー/プローブを用いた場合、Genotype A, B ともに  $10^1$  コピーの RNA を検出した。今回新たに VP1 領域にプライマー/プローブをデザインしたが、Kitajima et al.の方法ほどの感度は得られなかった。試料水からのウイルス回収についての検討は、高濃度のウイルス ( $10^4$  コピー以上) の場合は 15~20%以上の回収率であったが、低濃度の場合は、5%前後まで回収率が低下した。RT-LAMP 法の検討については、現時点で、プライマー 1 セットしか試みていないが、Genotype A, B ともに  $10^3$  コピーの

ウイルス RNA から、目視で増幅を確認した。

(3) ロタウイルス RNA の抽出方法の最適化を図るため、汎用されているキットとして Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) と QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN) を利用した。QIAGEN のキットにはキャリア RNA が付属しているため、キャリア RNA 使用の有無による差も検討した。その結果、QIAGEN のキットでは、キャリア RNA 使用の有無による抽出効率の差はほとんど見られなかった。一方、ZYMO Research のキットでは、QIAGEN のキットで抽出した場合より 10-1000 倍程度高く検出される例が見られた。キット間の差がほとんど無い検体もあり、検体による差が非常に大きかった。大きな差が見られた検体について、便乳剤を 10-1000 倍まで希釈してから同様の RNA 抽出を行ったところ、キット間の差が軽減される傾向が見られた。この現象の原因は特定できていないが、抽出キットによる PCR 阻害物質の除去効率などが影響しているのではないかと考えられる。以降の検証では、ロタウイルス遺伝子を一貫して高感度で検出できる ZYMO Research のキットを使用した。また ZYMO Research のキットに付属している DNase の使用の影響を検証した。DNase 処理は RNA 抽出時に混入する DNA を分解除去して非特異反応を軽減させる効果が期待されるが、ロタウイルス胃腸炎患者の便検体について DNase 処理を行ったところ、行わなかった場合と比較して抽出効率が 1/10 から 1/100 程度に低下した。ロタウイルスのゲノムは 2 本鎖 RNA であるため、DNase による非

特異的な分解を受けてしまうと考えられる。従って、ロタウイルス遺伝子の検出を目的として RNA 抽出を行う場合には、DNase 処理は行うべきではない。次に、より多くの臨床検体を用いて qPCR 試薬間の検出効率の比較検討を行った。使用した試薬は、Thermo Fisher Scientific 社の SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit および TaqMan Universal PCR Master Mix、タカラバイオ社の PrimeScript RT reagent Kit および Premix Ex Taq (Probe qPCR)、New England Biolabs 社の LunaScript RT SuperMix Kit および Luna Universal Probe qPCR Master Mix である。急性胃腸炎患者の場合、一度に複数の胃腸炎原因ウイルスを調べる機会が多いため、いずれも 2-step 法を用いて検討した。その結果、いずれの試薬でもほとんど遜色なくウイルスを検出できることが確認できた。ただし、検体によっては非特異反応が現れやすいものがあり、ロタウイルス陰性であっても 35-40 サイクル付近でシグナルの上昇が見られることがあった。非特異反応の原因を調べるため、どの試薬でも非特異反応が見られた検体について、同じ反応条件で RT-PCR 反応を行い、その PCR 増幅産物のシーケンス解析を行った。その結果、得られた配列には、ヒトゲノム (Human chromosome 14)、腸内細菌 (Bacteroides fragilis)、アストロウイルス (Astrovirus 4) 等があり、様々な原因で非特異反応が現れることが判明した。現状より非特異反応の少ないプライマー・プローブセットの作製を試みているが、現時点では Freeman らのセット以上の良好な結果は得られていない。

(4) GII.4 ノロウイルスを添加したシジミの

懸濁液上清を腸管オルガノイドに接種したところ、24 時間後のウイルス量が 43~191 倍の範囲で増加した。一方で、GII.4 ノロウイルスを添加したシジミを、90°C で 5 分間加熱した後に腸管オルガノイドに感染させたところ、24 時間後のウイルス増殖は認められなかった。なお、不活化法に関する検討において、シジミ懸濁液上清の添加量を増やすと細胞毒性が生じることが示された。二枚貝の主要成分であるグリコーゲンが原因であると考え、シジミ懸濁液をアミラーゼ処理したところ、細胞毒性が低減された。シジミにおける存在部位の視覚的解析に向け、今年度は中腸腺の透明化に取り組んだ。希釈天然海水中で 5 日間無給餌飼育したシジミでは中腸腺の色が淡くなったことから、透明化処理の改善が見られた。しかし、FITC 標識デキストランを擬似ウイルスとしてシジミに添加したところ、特異的なシグナルを観察することができなかった。

(5) 野菜表面のウイルス検出におけるウイルスの濃縮手法の検討の結果、全条件でペレットは形成されたが、10%のビーフエキスではペレットが小さかった。一方、極東肉エキス 3%ではしっかりとしたペレットの形成が認められた。FeCl<sub>3</sub>を添加した条件では、すべて多量の沈殿ができ、ペレット形成を促すことが確認できた。次に各条件における MS2 並びに Φ6 の回収率を調べた。MS2 の回収率は Difco10%の時は 10%を超えたが、他条件ではそれより低い回収率で安定していた。一方、Φ6 は HiMedia3%と 10%及び極東 3%が回収率が高かった。特に極東 3%における回収率は約 100%であり、かなり高い回収率だった。

(6) 地衛研の現状調査については、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。ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について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、細菌添加法、リパーゼ処理の順に多かった。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」は少数であり、何らかの方法でウイルス検出効率を高めようとしていることが明らかになった。食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等については、ノロウイルス以外の食中毒原因ウイルスについての検査マニュアルの整備、陽性コントロールの配布、食品からのウイルス検出法の改良、各種検査についての研修、食中毒事例の対応についての情報交換などがあげられた。食中毒原因ウイルスの高感度検出法の試みとして、ノロウイルスを用いて、デジタル PCR による高感度検出を試行した。5~5,000 copies/ $\mu$  L のレンジで検出可能であった。

#### D. 考察

(1) E 型肝炎の原因食材と疑われるイノシシ肉の肉汁より抗 HEV ウサギ血清およびパンソルビンを用い、濃縮操作を行った。RNA 抽出し、1 step リアルタイム RT-PCR を行ったが、ウイルス核酸は検出されなかった。今回の事例だけでは、濃縮が適切に行われなかったのか、食材中のウイルス量

が十分でなかったのかについて明らかでないため、濃縮法の可否を検証するには、さらに多くの事例で検討する必要がある。イノシシ 86 頭の血清のうち、22 頭 (26%) が HEV IgG 陽性であった。したがって、野生のイノシシは一過性に感染するケースは少なくないと考えられる。一方で HEV 核酸は検出されなかった。野生動物において HEV がどのように伝播しているのか、今後調査が必要と思われる。異なる免疫プロトコルでウサギに HAV 抗原を免疫したところ、一方の個体で HAV に対する感染中和活性を示した。今後、この血清を用いて感染性のウイルスが濃縮されるかどうかを、次年度に検討する。

(2) アイチウイルスのリアルタイム RT-PCR 法に関しては、1-step 法により、Kitajima et al. (2013)のプライマー/プローブで高感度検出が可能であった。昨年度、2-step 法では  $10^1$  コピーのウイルス cDNA を検出したが、RNA の検出を行う場合、逆転写のステップを加えることで感度の低下がみられたことから、感度、簡便さから当研究室では 1-step 法で行う方が良いと考える。一方で、Kitajima et al. (2013)の方法を上回る感度の独自のプライマー/プローブはデザインできていない。試料水からのウイルス回収、および RT-LAMP 法についても、準備段階として当研究室での実施が可能であることが確認できたが、それぞれ回収率と感度の改善が必要である。特に、アイチウイルスの LAMP 法による検出報告はごく限られるため、検出法の開発は有意義であると考えるが、市販のノロウイルス検出キット(栄研化学)の感度は、60 (GI)および 200 (GII) コピーである。今後、感度

向上を目指して検討を加える必要がある

(3) ロタウイルス胃腸炎患者の便検体には大量のウイルスが存在している事が多く、qPCR において高コピーが検出される例が多い。本研究において観察された非特異反応は  $10^2$  コピー未満として検出される事が多いため、 $10^2$  コピー以上を陽性判定の閾値として設定すれば、ほとんど問題は起こらないと考えられる。食品からロタウイルスを検出する目的では、低コピーの検体を検査するケースも多いと考えられるが、検体に混入する夾雑物の種類も便検体とは大きく異なるため、別途の検証が必要である。今後は更なるプライマー・プローブセットの改良および食品サンプルからの検出方法とその検出感度について検証を進める予定である。

(4) シジミ懸濁液による腸管オルガノイドへの細胞毒性が示されたことから、アミラーゼ処理が本法の安定性に寄与すると考えられた。しかし、アミラーゼがノロウイルスの感染性に影響する可能性も考えられたことから引き続き検証を行う。今回、GII.4 ノロウイルス含有培地に浸したシジミを用いて検討を実施したが、より実際の食事に近づけるため、シジミ内部にウイルスを接種した上で感染実験及び不活化実験を行う。また加熱温度や時間などの条件検討も併せて実施する。存在部位の視覚的解析においては、FITC 標識デキストランが非特異的に吸着していることが考えられたことから、擬似ウイルスとして FITC 標識ウイルス様中空粒子を用いることも検討する。

(5) 野菜表面のウイルス検出におけるウイルスの濃縮条件として、 $\text{FeCl}_3$  を添加しない場合、 $\Phi 6$  においてはペレットの形成と回

収率はある程度の整合性があることが示された。

(6) 原因ウイルスの追求が難しい場合が多く、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、どのような前処理および濃縮・精製法を実施しているか、について現状調査したところ、特に濃縮・精製法において様々な工夫がなされており、原因追及を求める姿勢やその過程での苦慮がうかがわれた。今後さらなる検出法の開発が望まれる。食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等(マニュアル、研修、情報還元、検体保管等)については、ノロウイルス以外の食中毒原因ウイルスについての検査マニュアルの整備、陽性コントロールの配布、食品からのウイルス検出法の改良、各種検査についての研修、食中毒事例の対応についての情報交換などがあげられており、このような現場の声を今後の参考にしていく必要性が感じられた。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、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

(1) 昨年度に条件検討を行った HEV 濃縮法を用い、原因食材と疑われるイノシン肉から HEV の検出を試みたが、検出には至らなかった。引き続き疑い食材を集め、濃縮法の検証を行う必要がある。イノシン 86 頭

の血清から HEV IgG 抗体および HEV ゲノムの検出を試みたが、ウイルス遺伝子は検出されなかった。便検体からの検出方法の検討を行い、現行の抽出法に問題はないと考えられた。A 型肝炎ウイルスについて濃縮が可能な抗血清を得るためにウサギに免疫し、HAV に対して感染中和活性を持つ血清を得た。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。

(2) アイチウイルスのリアルタイム RT-PCR 法に関しては、1-step 法で高感度にウイルス RNA を検出できた。感度、簡便さの点から、2-step 法より 1-step 法で行う方が良いと考える。試料水からの PEG 沈殿法により、5~20% 程度の回収率でウイルス濃縮できた。加えて、RT-LAMP 法のためのプライマーセットを設計し、 $10^3$  コピーのウイルス RNA を検出した。ウイルス濃縮、RT-LAMP 法については、効率の改善が必要であった。

(3) Freeman らが設計したロタウイルス検出用のプライマー・プローブセットは幅広い流行株を高感度で検出可能であるが、便検体からの検出においては非特異反応が見られることがある。ただし、 $10^2$  コピー以上を閾値として陽性判定すれば、偽陽性となる懸念はほとんど無いと考えられる。

(4) シジミ懸濁液中の GII.4 ノロウイルスが腸管オルガノイドに感染することが示された。また GII.4 ノロウイルスを含むシジミ懸濁液を  $90^{\circ}\text{C}$  で 5 分間加熱すると感染性が失われることも示された。シジミ懸濁液による腸管オルガノイドへの細胞毒性が認められたが、アミラーゼ処理により改善可能であることが示唆された。

(5) 昨年度に得られたビーフエキスをを用いたウイルスの誘出法に続き、その後の酸沈殿法の手法の最適化を行った結果、3% 極東肉エキスを誘出液として実験を行うことが最適であると判断した。

(6) 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。ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、地衛研で行われている前処理および濃縮・精製法について現状調査し、食中毒における下痢症ウイルス検査に関する要望等について情報を収集した。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。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

論文発表

(英文)

1. 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. 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. *Jpn J Infect Dis.* 2020.

- 73:89-95.
2. Murakami K, Fujii Y, Someya Y: Effects of the thermal denaturation of Sabin-derived inactivated polio vaccines on the D-antigenicity and the immunogenicity in rats. *Vaccine*. 2020, 38(17):3295-3299.
  3. Akane Y, Tsugawa T, Fujii Y, Honjo S, Kondo K, Nakata S, Fujibayashi S, Ohara T, Mori T, Higashidate Y, Nagai K, Kikuchi M, Sato T, Kato S, Tahara Y, Kubo N, Katayama K, Kimura H, Tsutsumi H, Kawasaki Y.: Molecular and clinical characterization of the equine-like G3 rotavirus that caused the first outbreak in Japan, 2016. *J Gen Virol*. 2021 Mar;102(3).
  4. Tsugawa T, Fujii Y, Akane Y, Honjo S, Kondo K, Nihira H, Kimura H, Kawasaki Y.: Molecular characterization of the first human G15 rotavirus strain of bovine origin. *J Gen Virol*. (in press)
- (和文)
1. 山下信子、鈴木亮介: ウイルス性食中毒. *小児科*. 2020. Vol.61. p363-368.
  2. 村上耕介, 小腸オルガノイドへの GII.3 ノロウイルスの侵入と胆汁酸の役割, *アグリバイオ* 2020年5月号, 研究者の広場, 2020年5月2日, 北隆館
- 学会発表
1. 廣瀬翔子、千野梓、早田衣里、藤森誠、濱田洋通、高梨潤一、藤井克樹: 当院入院患者におけるロタウイルス遺伝子型の検討 (2019年) 第52回日本小児感染症学会学術集会(オンライン)2020年11月7-8日
  2. Murakami K, Tenge VR, Karandikar U, Lin SC, Ramani S, Ettayebi K, Crawford SE, Zeng XL, Neill FH, Ayyar BV, Atmar RL and Estes MK. GII.3 human norovirus hijacks bile acid-driven cellular dynamic changes to entry human intestinal enteroids. *American Society for Virology 39th Annual Meeting*, June 13-17, 2020 at Colorado State University in Fort Collins, Colorado (American Society for Virology Abstract Accepted as Oral Presentation. Meeting canceled due to COVID-19 pandemic).
  3. Lewis MA, Cortes-Penfield NW, Tenge VR, Murakami K, Ettayebi K, Ayyar BV, Neill FH, Ramani S, Estes MK, Atmar RL. Evaluating Antiviral Agents for Human Noroviruses Using a Human Intestinal Enteroid Model. *American Society for Virology 39th Annual Meeting*, June 13-17, 2020 at Colorado State University in Fort Collins, Colorado. (Meeting canceled due to COVID-19 pandemic).
  4. Murakami K, Tenge VR, Karandikar U, Lin SC, Ramani S, Ettayebi K, Crawford SE, Zeng XL, Neill FH, Ayyar BV, Atmar RL and Estes MK. GII.3 human norovirus hijacks bile acid-driven cellular dynamic changes to entry human intestinal enteroids. *Virtual ASV Calicivirus & Astrovirus*

Workshop Presentation、June 18, 2020.

5. 村上耕介、片山和彦. 胆汁酸により誘発される細胞内ダイナミクス変化を用いて GII.3 ヒトノロウイルスは小腸オルガノイドに侵入する. 第 61 回日本臨床ウイルス学会 2020 年 10 月 Web 開催

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

特許取得

特願 2018-188665 (2018 年 10 月 3 日出願)、PCT/JP2019/038893 (2019 年 10 月 2 日 PCT 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

## 経口肝炎ウイルスの濃縮法の検討と環境調査

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  
研究協力者 小林さくら 国立感染症研究所ウイルス第二部 協力研究員  
研究協力者 小宮智義 北陸大学医療保健学部 教授  
研究協力者 阿部冬樹 静岡県環境衛生科学研究所

### 研究要旨

昨年度に条件検討を行った抗 HEV ウサギ血清およびパンソルビンを用いた HEV 濃縮法を用い、E 型肝炎の原因食材と疑われるイノシシ肉から HEV の検出を試みたが、検出には至らなかった。捕獲された野生イノシシ 86 頭の血清から HEV IgG 抗体および HEV ゲノムの検出を試みた。抗体陽性の個体はあったものの、ウイルス遺伝子は検出されなかった。便検体からの検出方法について 2 種類のキットを用いた検討を行った。A 型肝炎ウイルスについてもウイルスの濃縮が可能な抗血清を得るために、異なる免疫プロトコルでウサギを免疫し、HAV に対して感染中和活性を持つ血清を作製した。

### 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、年々増加している。2020 年は新型コロナウイルスの流行による行動様式の変化に伴い、多くの感染症の報告数が減少したが、E 型肝炎の報告数は例年と変わらなかった事は興味深い。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。

昨年度は、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。今年度はこの方法を用い、原因食材と疑われたイノシシ肉からのHEV検出を行った。また捕獲された野生イノシシ86頭の血清からHEV IgG抗体およびHEVゲノムの検出を試みた。さらに便検体からの検出方法について2種類のキットを用いた検討を行った。A型肝炎ウイルスを濃縮するための抗血清を作製した。

## B. 研究方法

積極的疫学調査によりE型肝炎の原因として疑われたイノシシ肉が得られた。この肉汁約25mLから、抗HEVウサギ血清およびパンソルビンを用い、濃縮操作を行った。濃縮サンプルからRNAを抽出し、リアルタイムPCRを行った。

イノシシ86頭の血清について、HEV IgGおよびHEVゲノムの測定を行った。

便検体からのHEV遺伝子抽出方法について、使用するキットによって抽出効率に違いがあるかどうかを確認した。

A型肝炎ウイルスの濃縮が可能な抗血清を得るために、異なる免疫プロトコルでウサギを免疫し、血清の感染中和活性を評価した。

## C. 研究結果

E型肝炎の原因食材と疑われるイノシシ肉の肉汁に界面活性剤存在下で抗HEVウサギ血清およびパンソルビンを加えてHEVの濃縮操作を行い、RNAを抽出し、リアルタイムPCRを行ったが、ウイルス核酸は検出されなかった。

2017-2019年に捕獲されたイノシシ86頭の血清のHEV IgGを測定した。22頭(26%)が陽性で、性別での陽性率はオスの31%に対し、メスは17%であった。また体重20kg未満の幼獣で30%、成獣の24%が陽性であり、抗体価の高い個体は幼獣に多く認められた。一方でHEV核酸の検出も試みたが、ウイルス核酸は検出されなかった。

便検体からの検出方法には、使用するキットによって抽出効率に違いがあるという報告(分担研究者 藤井克樹の報告書参照)があったため、HEV患者の便検体24例から、Direct-zol RNA kit (ZYMO Research)とQIAamp Viral RNA kit (QIAGEN)を用いて核酸を抽出し、リアルタイムPCRを行った。今回用いた検体については両キットの抽出によるコピー数は高い相関が認められた。

異なる免疫プロトコルでウサギにHAV抗原を免疫し、血清の感染中和活性を評価した。一方のプロトコルで、高い中和活性が認められた。

## D. 考察

E型肝炎の原因食材と疑われるイノシシ肉の肉汁より抗HEVウサギ血清およびパンソルビンを用い、濃縮操作を行った。RNA抽出し、1 stepリアルタイムRT-PCRを行ったが、ウイルス核酸は検出されなかった。今回の事例だけでは、濃縮が適切に

行われなかったのか、食材中のウイルス量が十分でなかったのかについて明らかでないため、抽出法の可否を検証するには、さらに多くの事例で検証する必要がある。

イノシシ 86 頭の血清のうち、22 頭(26%) が HEV IgG 陽性であった。したがって、過去に一過性に感染するケースは少なくないと考えられる。一方で HEV 核酸は検出されなかった。野生動物において HEV がどのように伝播しているのか、今後も調査が必要と思われる。

異なる免疫プロトコルでウサギに HAV 抗原を免疫したところ、一方の個体で HAV に対する感染中和活性を示した。今後、この血清を用いて感染性のウイルスが濃縮されるかどうかを、次年度に検討する。

#### E. 結論

昨年度に条件検討を行った HEV 濃縮法を用い、原因食材と疑われるイノシシ肉から HEV の検出を試みたが、検出には至らなかった。引き続き疑い食材を集め、濃縮法の検証を行う必要がある。イノシシ 86 頭の血清から HEV IgG 抗体および HEV ゲノムの検出を試みたが、ウイルス遺伝子は検出されなかった。便検体からの検出方法の検討を行い、現行の抽出法に問題はないと考えられた。A 型肝炎ウイルスについて濃縮が可能な抗血清を得るためにウサギに免疫し、HAV に対して感染中和活性を持つ血清を得た。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。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表

論文発表

(英文)

1. 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. 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. Jpn J Infect Dis. 2020. 73:89-95.

(和文)

2. 山下信子、鈴木亮介: ウイルス性食中毒. 小児科. 2020. Vol.61. p363-368.

学会発表

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



## 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

愛媛県立衛生環境研究所 四宮博人

### 研究協力者

北海道立衛生研究所 吉澄志磨

宮城県保健環境センター 坂上亜希恵、植木 洋

埼玉県衛生研究所 岸本 剛

東京都健康安全研究センター 貞升健志

愛知県衛生研究所 皆川洋子

大阪健康安全基盤研究所 白井達哉、西嶋駿弥、左近直美

山口県環境保健センター 岡本玲子、調 恒明

福岡県保健環境研究所 田中義人

愛媛県立衛生環境研究所 豊嶋千俊、岩城洋己、山下育孝、青木紀子

### 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、原因ウイルスの追求が難しい場合が多く、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、地衛研で行われている前処理および濃縮・精製法について現状調査するとともに、食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等について情報を収集した。さらに、ノロウイルスを用いて、デジタル PCR による高感度検出を試行した。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、原因ウイルスの追求が難しい場合が多く、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、地衛研で行われている前処理および濃縮・精製法について現状調査するとともに、食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等について情報を収集した。さらに、ノロウイルスを用いて、デジタル PCR による高感度検出を試行した。

## B. 研究方法

地衛研の状況を把握する目的で、原因ウイルスの追求が難しい場合が多く、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、どのような前処理および濃縮・精製法を実施しているか、について現状調査し、食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等（マニュアル、研修、情報還元、検体保管等）について情報を収集した。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。

### 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. ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、どのような前処理および濃縮・精製法を実施しているか

ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体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、細菌添加法、リパーゼ処理の順に多かった（図 1）。

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」は少数であり（図 2）、何らかの方法でウイルス検出感度を高めようとしていることが明らかになった。

2. 食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等（マニュアル、研修、情報還元、検体保管等）

記載意見として情報収集し、末尾にまとめた。ノロウイルス以外の食中毒原因ウイルスについての検査マニュアルの整備、陽性コントロールの配布、食品からのウイルス検出法の改良、各種検査についての研修、食中毒事例の対応についての情報交換などがあげられた。

3. 食中毒原因ウイルスの高感度検出法の試み

ノロウイルスを用いて、デジタル PCR による高感度検出を試行した。5~5,000 copies/ $\mu$ L のレンジで検出可能であり、今後さらに検討を要する。

#### D. 考察

当分担当は、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てきた。

昨年度の調査で、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。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 型肝炎ウイルスなどである。

今回、原因ウイルスの追求が難しい場合が多く、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、どのような前処理および濃縮・精製法を実施しているか、について現状調査したところ、特に濃縮・精製法において様々な工夫がなされており、原因追及を求める姿勢やその過程での苦慮がうかがわれた。今後さらなる検出法の開発が望まれる。

食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等 (マニュアル、研修、情報還元、検体保管等) については、ノロウイルス以外の食中毒原因ウイルスについての検査マニュアルの整備、陽性コントロールの配布、食品からのウイルス検出法の改良、各種検査についての研修、食中毒事例

の対応についての情報交換などがあげられており、このような現場の声を今後の参考にしていく必要性が感じられた。

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、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。ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、地衛研で行われている前処理および濃縮・精製法について現状調査し、食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等について情報を収集した。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。

#### F. 健康危機情報

該当なし

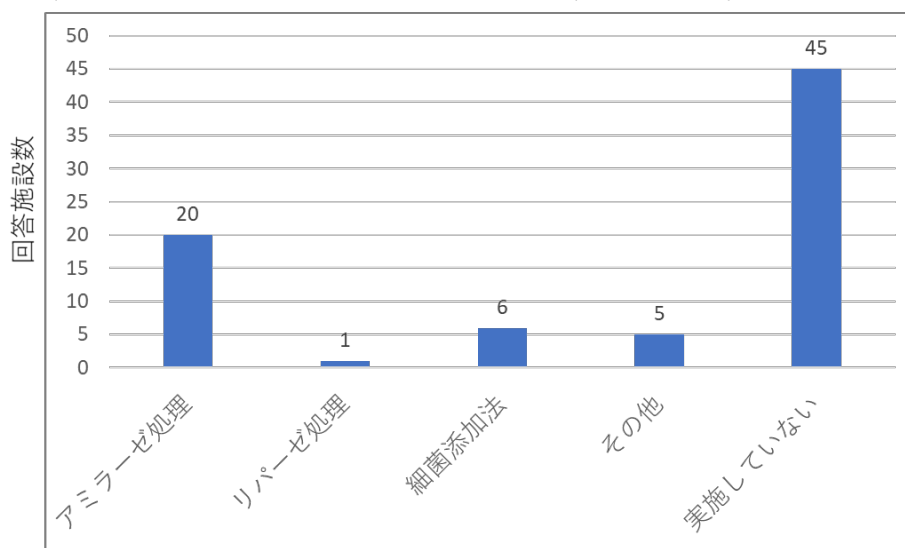
#### G. 研究発表

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

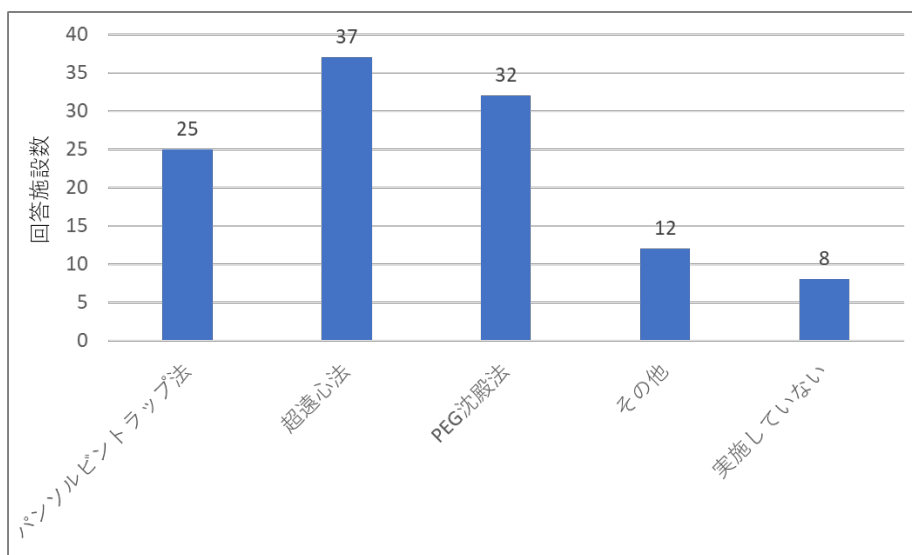
図1. 食中毒原因ウイルスに関して、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、どのような前処置を実施しているか（複数回答可）



その他の内容（記載）：

- ・ふき取りは採取法を変更してもらう
- ・食品・食材の種類によっては、必要に応じて代替フロン処理
- ・スワブはキット内の液を全部捨てた後、ふき取りを行う
- ・キット（ふきとり）の使用
- ・ノロウイルスふき取り検査用キットを使用

図2. 食中毒原因ウイルスに関して、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、どのような濃縮・精製法を実施しているか（複数回答可）



その他の内容（記載）：

- ・細胞粉碎法（カキ）
- ・ふき取りは1mlに浮遊させ全量をHigh Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kitで核酸抽出
- ・ハイドロキシアパタイトに吸着
- ・グリコーゲン添加エタノール沈殿法
- ・遠心濃縮（Centriprep）
- ・浮遊液を捨てた容器で、採取した綿棒を搬送する
- ・ふき取り綿棒を少量のPBSに懸濁し絞り液からRNA抽出
- ・ふき取りはあらかじめ生食を減量している
- ・ふき取り検査用試薬キットの使用

## 食中毒における下痢症ウイルス検査に関する要望等(マニュアル、研修、情報還元、検体保管等)について(記載意見)(・は1地衛研分を示す)

### 都道府県

- ・ 検査は過熱直後に保存されたものが多く、有効な検体にはなりにくいので、盛り付け後の料理を保存するしくみがあればよい。
- ・ 感染症または食中毒の初動時対応の判断について他の地衛研ではどうしているのか知りたい。食中毒発生時の食品を検査する際のコツについて知りたい。
- ・ 通知法の早期の改訂が望まれる。
- ・ 食品からのウイルス検出もいくつか方法が示されているが、検査の安定性などに疑問があることから改良が望まれる。
- ・ ノロウイルス以外の検査マニュアルの整備
- ・ 研修(食中毒等集団発生時のノロウイルスの検査は、通知法はあるが、自治体によっては工夫をした独自の方法を実施しているところが多いため、情報交換をしたい)。外部精度管理。
- ・ 食中毒関連ウイルスの高感度・高精度かつ迅速なマルチプレックスリアルタイム PCR 法のマニュアルを開発してもらいたい。実習を含めた研修を国や研究班にて企画願いたい。(ブロック単位)
- ・ 現在、食品やふき取り検体からのノロウイルス検出をおこなっていないので、前処理方法や濃縮方法を含んだ検査法の研修を開催してほしい。食品検査と糞便検査それぞれの陽性判定基準や検査設備要件を統一的に著した食中毒検査マニュアルを作成してほしい。
- ・ 検査法に関する研修の開催を要望します。
- ・ 研修をやっていただけるとありがたい。系統樹解析やノロウイルス以外の食中毒事例への対応など。特に、担当者が頻繁に変更になるためこれまでの流れを理解しにくいところがあるので、流行株の推移や変異部分等を教えていただきたい。
- ・ 原因食品別の検出下限が整理してあれば、有用だと思います。
- ・ NESFD を活用しておりませんが、活用方法などを教えていただければと思います。広域食中毒についての早期探知にいかされるのでしょうか？ パンソルピントラップ法について通知法として残っているので、研修の実施や遺伝子型反応性が確認されたグロブリンの配布を必要時に送付してほしい。
- ・ 一つの窓口で、遺伝子検査が必要となる主要な下痢症ウイルスすべてのポジティブコントロールを配布して貰えるようなシステムになるとありがたいと思います。また、ホームページ等で利用可能なポジティブコントロールの種類が見れると助かります。
- ・ 病原体検出マニュアル「ノロウイルス」と厚生労働省通知「ノロウイルスの検出法」に記載される酵素・試薬等は統一されていればありがたいです。また、サポウイルス等とのマルチプレックスリアルタイム PCR 化をご検討いただきたいです。
- ・ サポウイルスの病原体検出マニュアルを作成していただきますとうれしいです。
- ・ 感染症法の検査マニュアルは改訂されているが、食品衛生法の検査法(通知法や食品衛生検査指針)は長い間更新されていない部分もあるため、最新の知見に基づき試薬等を含めて全体的に見直して頂きたい。
- ・ 病原体検出マニュアルの整備

### 政令市・中核市・特別区

- ノロウイルスの検査法について、ヒトを対象とした検査法（感染症発生動向事業）は病原体検出マニュアルとして整備されたが、食品等を対象とした検査法の最終改正は H25 年となっているため更新してほしい。また、ノロウイルスのみならず食中毒の原因となるウイルス全般のマニュアルを整備してほしい。
- サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス等の検出マニュアルの整備をしてほしい。業務効率化のため下痢性ウイルスのマルチプレックスPCR方法について知見を共有してほしい。
- アストロウイルスやアイチウイルス等についても陽性コントロールの配布を希望します。
- 食中毒における下痢症ウイルス検査に関して、短時間で結果を求められるため、対応に困難を極めている。特に土日祝日。現在年末年始の休日に入っているが、このところ連日複数検査を抱え、なおかつ感染症の検査も入っており、対応が厳しい状況である。
- 食品検査についてのマニュアルの作成をお願いします。ノロウイルス以外の下痢症ウイルスのマニュアル改訂をお願いします。
- ノロウイルス以外のウイルスについては、マニュアル等が充実していない。また、定量リアルタイム PCR 系があっても、低コピー数の検体（従事者便や拭き取り等）の判定をどうすべきか苦慮している。A 型肝炎ウイルス等の分子疫学的解析結果について、NESFD では情報共有・還元が行われていない。
- 現在、レファレンスセンター未設置のウイルスについても、陽性コントロールの配布や情報提供等、今後の体制整備を希望します。
- ノロウイルス以外のマニュアルを更新してほしい。スタンダードやコントロールの分与の依頼先を示してほしい。
- 陽性コントロールの分与をお願いしたい。
- 本市では、検査室や安全キャビネット数の問題から、「食品・食材」と「便」の検査室や安全キャビネットを共有せざるを得ない。通常、食中毒が発生した場合は原因究明ために便・吐物から搬入されるため、コンタミネーションを懸念し食品・食材のウイルス検査は行っていない。このため、他の地研とのコンタミネーションに関する情報共有をお願いしたい。
- 本市でも、今後、ノロウイルス以外の食中毒原因ウイルスについて、検査を実施できるかどうか検討したいと考えています。同ウイルスの検査マニュアルの作成や研修等の実施があれば、よいと思います。

## 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

昨年度の研究成果より、ビーフエキスによるウイルス抽出が最適手法であることが示された。本年度はビーフエキス誘出液からさらに濃度を高めてウイルスの検出感度を向上させるために、酸沈殿法を用いて濃縮する方法の開発を試みた。

新型コロナウイルスなどに関する関心が高まったことを受け、これまでの試験に用いていた MS2 に加えて、エンベロープウイルスの代替指標として Φ6 を用い、手法の妥当性の評価に用いた。

結果としては肉エキス（極東）3%、pH 9.0 を酸性条件 pH 3 程度にすることで、ウイルスの回収率を高くし、容易に少ない液量で回収操作を実施可能であることが示された。

### 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<sup>1</sup>。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<sup>2</sup>。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<sup>3,4,5</sup>。

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 フェージの MS2 に加えて、新型コロナウイルスなどに関する関心が高まったことを受け、エンベロープウイルスの代替指標として Φ6 を用い、手法の妥当性の評価に用いた。

昨年度、ビーフエキスによる誘出が有効である

との研究成果を得たが、今年度は、それをさらに濃縮してウイルスの検出感度を高める手法として、酸沈殿法を適用することを試みた。

### B. 研究方法

実験室内での検証ではウイルスを高濃度でスパイクした試料を使用したため、誘出液に対する濃縮を行わずしても検出、定量が可能である。しかし、現場試料の実際のウイルス濃度は低いと考えられ、測定を行う感度を得るには試料の濃縮が必要だと考えられる。ビーフエキスなどのタンパクが豊富な液体に対するウイルスの濃縮手法として、オーガニックフロキュレーション（酸沈殿法）が Katznelson らによって開発されている<sup>6</sup>。この手法は、高アルカリ条件下にあるビーフエキスを pH 3 程度にまで下げることでウイルスやタンパクのフロックを形成し、それを沈殿・再懸濁することで濃縮を行う。

3% および 10% ビーフエキス（Difco および HiMedia）と 3% および 10% 肉エキス（極東）を高圧蒸気滅菌し、1M NaOH の添加で pH 9.0 ± 0.1 に調整した。そこに MS2 と Φ6 を添加し、ボルテックスしてよく混合した。酸沈殿処理を行い、ウイルス濃縮液を得た。濃縮前・濃縮後それぞれのウ

ウイルス濃度を測定し、回収率を評価した。また、凝集性の悪いビーフエキスの場合は、FeCl<sub>3</sub> の添加により共沈が発生し、ペレットの形成を期待できるので、本実験では FeCl<sub>3</sub> を添加した場合と、しなかった場合で回収率を比較した（ビーフエキス・肉エキス 40ml に対して 2.5mM FeCl<sub>3</sub> 0.2ml）。各条件につき 2 回ずつ実験を行った。

#### C. 結果及び考察

全条件でペレットは形成されたが、10%のビーフエキスではペレットが小さかった。一方、極東肉エキス 3%ではしっかりとしたペレットの形成が認められた。FeCl<sub>3</sub> を添加した条件では、すべて多量の沈殿ができ、ペレット形成を促すことが確認できた。

次に各条件における MS2 並びに Φ6 の回収率を調べた。MS2 の回収率は Difco10%の時は 10%を超えたが、他条件ではそれより低い回収率で安定していた。一方、Φ6 は HiMedia3%と 10%及び極東 3%が回収率が高かった。特に極東 3%における回収率は約 100%であり、かなり高い回収率だった。この結果から FeCl<sub>3</sub> を添加しない場合、Φ6 においてはペレットの形成と回収率はある程度の整合性があることが示された。

#### E. 結論

昨年度に得られたビーフエキスをを用いたウイルスの誘出法に続き、その後の酸沈殿法の手法の最適化を行った結果、3%極東肉エキスを誘出液として実験を行うことが最適であると判断した。

#### 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](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).
6. Katzenelson, E., *et al.*, Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 638-639. (1976)



## 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 法の検出感度の検討、ウイルス濃縮法の検討、RT-LAMP 法の開発を行った。

### 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 法の検出感度の検討、ウイルス濃縮法の検討、RT-LAMP 法の開発を行った。

### B. 研究方法

1) リアルタイム RT-PCR 法。リアルタイム RT-PCR は、TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix (Thermo Fisher) および QuantStudio 7 リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher)、あるいは StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher) を用いて行った。鋳型として、アイチウイルス cDNA クローンより *in vitro* で合成した RNA を用いた。

2) 試料水からのウイルス回収。環境水からのウイルス検出の準備として、試料からの回収率を調べた。方法として、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法を用いた。蒸留水 40 ml にウイルス希釈液 10  $\mu$ l、8% PEG 6000、2.3% NaCl を加え、遠心によりウイルスを回収し、QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen) を用いてウイルス RNA を精製した。同時に、同量同濃度のウイルス希釈液からも直接ウイルス RNA を精製し、両者のウイルス RNA コピー数をリアルタイム RT-PCR 法で比較した。

3) Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) 法。Genotype A, B ともに検出可能なプライマーセットを、ソフトウェア Primer Explorer を利用して設計した。鋳型としては、アイチウイルス cDNA クローンより *in vitro* で合成した RNA を用いた。Loopamp 遺伝子検査 RNA 増幅試薬キット (栄研化学) を用い、63°C、60 分反応した。

### C. 研究結果

1) リアルタイム RT-PCR 法。昨年度は 2-step 法でリアルタイム PCR を行っていたが、班会議

で 1-step 法の利用を助言された。そこで今年度は 1-step 法について検出感度の検討を行った。Kitajima et al. (Appl Environ Microbiol, 2013) のプライマー/プローブを用いた場合、Genotype A, B ともに  $10^1$  コピーの RNA を検出した。今回新たに VP1 領域にプライマー/プローブをデザインしたが、Kitajima et al.の方法ほどの感度は得られなかった。

2) 試料水からのウイルス回収。高濃度のウイルス ( $10^4$  コピー以上) の場合は 15~20%以上の回収率であったが、低濃度の場合は、5%前後まで回収率が低下した。

3) RT-LAMP 法。現時点で、プライマー 1 セットしか試みていないが、Genotype A, B ともに  $10^3$  コピーのウイルス RNA から、目視で増幅を確認した。

#### D. 考察

リアルタイム RT-PCR 法に関しては、1-step 法により、Kitajima et al. (2013)のプライマー/プローブで高感度検出が可能であった。昨年度、2-step 法では  $10^1$  コピーのウイルス cDNA を検出したが、RNA の検出を行う場合、逆転写のステップを加えることで感度の低下がみられたことから、感度、簡便さから当研究室では 1-step 法で行う方が良いと考える。一方で、Kitajima et al. (2013)の方法を上回る感度の独自のプライマー/プローブはデザインできていない。

試料水からのウイルス回収、および RT-LAMP

法についても、準備段階として当研究室での実施が可能であることが確認できたが、それぞれ回収率と感度の改善が必要である。特に、アイチウイルスの LAMP 法による検出報告はごく限られるため、検出法の開発は有意義であると考え、市販のノロウイルス検出キット(栄研化学)の感度は、60 (GI)および 200 (GII) コピーである。今後、感度向上を目指して検討を加える必要がある。

#### E. 結論

リアルタイム RT-PCR法に関しては、1-step法で高感度にウイルスRNAを検出できた。感度、簡便さの点から、2-step法より1-step法で行う方が良いと考える。試料水からのPEG沈殿法により、5~20%程度の回収率でウイルス濃縮できた。加えて、RT-LAMP法のためのプライマーセットを設計し、 $10^3$ コピーのウイルスRNAを検出した。ウイルス濃縮、RT-LAMP法については、効率の改善が必要であった。

#### 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の検出法について、最適な RNA 抽出方法の検討および Freeman らが報告したプライマー・プローブセットの性能について評価を行った。RNA 抽出に関しては ZYMO Research 社の Direct-zol RNA kit を用いることで安定して高感度な検出が可能であった。また、DNase 処理はロタウイルスゲノム (dsRNA) が分解されるため、実施しない事が望ましいと考えられた。Freeman らのプライマー・プローブセットは、幅広いロタウイルス株を検出可能であるが、便検体からの検出においては、しばしば非特異反応が認められた。この非特異的増幅の原因としては、ヒトゲノムや腸内細菌、アストロウイルスなど様々な要因が関与し得ると考えられた。これらの非特異反応は、多くの場合  $10^2$  コピー未満として検出されるため、 $10^2$  コピー以上を閾値として陽性判定すれば、ほとんど問題は起こらないと考えられた。

### A. 研究目的

本研究では昨年度、ロタウイルスのリアルタイム qPCR 法に関して、世界的に広く利用されている 2 種類のプライマー・プローブセット (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ところ、Freeman らのセットの方が幅広いウイルス株を検出可能であることを明らかにした。本年度はこのプライマー・プローブセットを用いて、RNA 抽出方法や qPCR 試薬間の検出効率の比較検討を行った。

### 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プライマー・プローブセットのうち、基本的に Freeman らが報告したセット (Freeman *et al.*, J Med Virol. 2008, 80(8):1489-96) を利用した。検体は、ロタウイルス胃腸炎患者から採取された糞便を PBS で 10%乳剤としたものを使用した。  
(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

まず RNA 抽出方法の最適化を図るため、

よく汎用されているキットとして Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) と QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN) を利用した。QIAGEN のキットにはキャリア RNA が付属しているため、キャリア RNA 使用の有無による差も検討した。その結果、QIAGEN のキットでは、キャリア RNA 使用の有無による抽出効率の差はほとんど見られなかった。一方、ZYMO Research のキットでは、QIAGEN のキットで抽出した場合より 10-1000 倍程度高く検出される例が見られた。キット間の差がほとんど無い検体もあれば 1000 倍以上の差が現れる検体もあり、検体による差が非常に大きかった。大きな差が見られた検体について、便乳剤を 10-1000 倍まで希釈してから同様の RNA 抽出を行ったところ、キット間の差が軽減される傾向が見られた。この現象の原因は特定できていないが、抽出キットによる PCR 阻害物質の除去効率などが影響しているのではないかと考えられる。以降の検証では、ロタウイルス遺伝子を一貫して高感度で検出できる ZYMO Research のキットを使用した。

続いて、ZYMO Research のキットに付属している DNase の使用の影響を検証した。DNase 処理は RNA 抽出時に混入する DNA を分解除去して非特異反応を軽減させる効果が期待されるが、ロタウイルス胃腸炎患者の便検体について DNase 処理を行ったところ、行わなかった場合と比較して検出効率が 1/10 から 1/100 程度に低下した。ロタウイルスのゲノムは 2 本鎖 RNA であるため、DNase による非特異的な分解を受けてしまうと考えられる。従って、ロタウイルス遺伝子の検出を目的として RNA

抽出を行う場合には、DNase 処理は行うべきではない。

次に、より多くの臨床検体を用いて qPCR 試薬間の検出効率の比較検討を行った。使用した試薬は、Thermo Fisher Scientific 社の SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit および TaqMan Universal PCR Master Mix、タカラバイオ社の PrimeScript RT reagent Kit および Premix Ex Taq (Probe qPCR)、New England Biolabs 社の LunaScript RT SuperMix Kit および Luna Universal Probe qPCR Master Mix である。急性胃腸炎患者の場合、一度に複数の胃腸炎原因ウイルスを調べる機会が多いため、いずれも 2-step 法を用いて検討した。その結果、いずれの試薬でもほとんど遜色なくウイルスを検出できることが確認できた。ただし、検体によっては非特異反応が現れやすいものがあり、ロタウイルス陰性であっても 35-40 サイクル付近でシグナルの上昇が見られることがあった。非特異反応の原因を調べるため、どの試薬でも非特異反応が見られた検体について、同じ反応条件で RT-PCR 反応を行い、その PCR 増幅産物のシーケンス解析を行った。その結果、得られた配列には、ヒトゲノム (Human chromosome 14)、腸内細菌 (Bacteroides fragilis)、アストロウイルス (Astrovirus 4) 等があり、様々な原因で非特異反応が現れることが判明した。

現状より非特異反応の少ないプライマー・プローブセットの作製を試みているが、現時点では Freeman らのセット以上の良好な結果は得られていない。

#### D. 考察

通常、ロタウイルス胃腸炎患者の便検体には大量のウイルスが存在している事が多く、qPCR において高コピーが検出される例が多い。本研究において観察された非特異反応は  $10^2$  コピー未満として検出される事が多いため、 $10^2$  コピー以上を陽性判定の閾値として設定すれば、ほとんど問題は起こらないと考えられる。食品からロタウイルスを検出する目的では、低コピーの検体を検査するケースも多いと考えられるが、検体に混入する夾雑物の種類も便検体とは大きく異なるため、別途の検証が必要である。今後は更なるプライマー・プローブセットの改良および食品サンプルからの検出方法とその検出感度について検証を進める予定である。

#### E. 結論

Freeman らが設計したロタウイルス検出用のプライマー・プローブセットは幅広い流行株を高感度で検出可能であるが、便検体からの検出においては非特異反応が見られることがある。ただし、 $10^2$  コピー以上を閾値として陽性判定すれば、偽陽性となる懸念はほとんど無いと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

(英文)

1. Murakami K, Fujii Y, Someya Y: Effects of the thermal denaturation of Sabin-derived inactivated polio vaccines on the

D-antigenicity and the immunogenicity in rats. *Vaccine*. 2020, 38(17):3295-3299.

2. Akane Y, Tsugawa T, Fujii Y, Honjo S, Kondo K, Nakata S, Fujibayashi S, Ohara T, Mori T, Higashidate Y, Nagai K, Kikuchi M, Sato T, Kato S, Tahara Y, Kubo N, Katayama K, Kimura H, Tsutsumi H, Kawasaki Y: Molecular and clinical characterization of the equine-like G3 rotavirus that caused the first outbreak in Japan, 2016. *J Gen Virol*. 2021 Mar;102(3).

3. Tsugawa T, Fujii Y, Akane Y, Honjo S, Kondo K, Nihira H, Kimura H, Kawasaki Y: Molecular characterization of the first human G15 rotavirus strain of bovine origin. *J Gen Virol*. (in press)

(和文)  
なし

学会発表

1. 廣瀬翔子、千野梓、早田衣里、藤森誠、濱田洋通、高梨潤一、藤井克樹：当院入院患者におけるロタウイルス遺伝子型の検討 (2019 年) 第 52 回日本小児感染症学会学術集会 (オンライン) 2020 年 11 月 7-8 日

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)、PCT/JP2019/038893 (2019 年 10 月 2 日 PCT 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

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汚染食品モデル作製と不活化法の検討

研究分担者 村上 耕介 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 林 豪士 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

### 研究要旨

食品中ノロウイルスの不活化条件の探索を目的として、スモールスケールでの解析が可能で且つ食中毒事例のあるシジミをノロウイルス汚染食品モデルとした検証を行った。

シジミ懸濁液によるノロウイルス培養増殖系への影響を評価するため、殻から取り出したシジミを GII.4 ノロウイルス含有培地に浸し、ホモジナイズしてから遠心分離を行った。上清を腸管オルガノイドに接種したところ、24 時間後にウイルス量が 43～191 倍の範囲で増加した。一方で、ウイルス添加シジミ懸濁液を 90℃で 5 分間加熱したところ、腸管オルガノイドにおけるウイルス増殖が認められなくなった。シジミにおけるノロウイルスの存在部位の視覚的解析のためシジミを 5 日間まで無給餌飼育したところ、中腸腺の色が淡くなったことから透明化が改善された。

### A. 研究目的

本研究は、食品に混入したノロウイルスの不活化条件探索を目的とし、食品モデルとしてシジミを用いた研究を実施している。本年度は、シジミに含まれるノロウイルスを腸管オルガノイドに感染させるため、シジミ懸濁液によるノロウイルス培養増殖系への影響を評価した。また前年度に引き続き、シジミ中のノロウイルスの存在部位の視覚的解析を目指した検討も実施した。

### B. 研究方法

本研究に供するシジミは市販のものを購入した。殻から取り出したシジミ（約 350 mg）を、GII.4 ノロウイルス  $6.9 \times 10^6$  コピー含有培地（250  $\mu$ L）に浸し、ホモジナイズしてから遠心分離を行った。上清を腸管オルガノイドに接種し、24 時間後のウイル

スコピー数を COG2F/R 及び RING2-TP を用いたリアルタイム PCR で解析した。また、GII.4 ノロウイルス添加シジミ懸濁液を 90℃で 5 分間加熱した後に腸管オルガノイドに感染させたサンプルも同様に解析した。

シジミにおけるノロウイルスの存在部位の視覚的解析のため、中腸腺の可視化を目指した検討を行なった。瀬戸内海区水産研究所及びシジミ資源研究会からの情報提供を得てシジミを 5 日間まで無給餌飼育し、殻からシジミを取り出し、市販の透明化試薬 (SCALEVIEW、Fuji Film) で処理した。さらに擬似ウイルスとして FITC 標識デキストランをシジミに取り込ませたのち、透明化処理を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

### C. 研究成果

GII.4 ノロウイルスを添加したシジミの懸

濁液上清を腸管オルガノイドに接種したところ、24時間後のウイルス量が43~191倍の範囲で増加した。一方で、GII.4 ノロウイルスを添加したシジミを、90℃で5分間加熱した後に腸管オルガノイドに感染させたところ、24時間後のウイルス増殖は認められなかった。なお、不活化法に関する検討において、シジミ懸濁液上清の添加量を増やすと細胞毒性が生じることが示された。二枚貝の主要成分であるグリコーゲンが原因であると考え、シジミ懸濁液をアミラーゼ処理したところ、細胞毒性が低減された。シジミにおける存在部位の視覚的解析に向け、今年度は中腸腺の透明化に取り組んだ。希釈天然海水中で5日間無給餌飼育したシジミでは中腸腺の色が淡くなったことから、透明化処理の改善が見られた。しかし、FITC 標識デキストランを擬似ウイルスとしてシジミに添加したところ、特異的なシグナルを観察することができなかった。

#### D. 考察

シジミ懸濁液による腸管オルガノイドへの細胞毒性が示されたことから、アミラーゼ処理が本法の安定性に寄与すると考えられた。しかし、アミラーゼがノロウイルスの感染性に影響する可能性も考えられたことから引き続き検証を行う。今回、GII.4 ノロウイルス含有培地に浸したシジミを用いて検討を実施したが、より実際の食事に近づけるため、シジミ内部にウイルスを接種した上で感染実験及び不活化実験を行う。また加熱温度や時間などの条件検討も併せて実施する。

存在部位の視覚的解析においては、FITC 標識デキストランが非特異的に吸着

していることが考えられたことから、擬似ウイルスとして FITC 標識ウイルス様中空粒子を用いることも検討する。

#### E. 結論

シジミ懸濁液中の GII.4 ノロウイルスが腸管オルガノイドに感染することが示された。また GII.4 ノロウイルスを含むシジミ懸濁液を90℃で5分間加熱すると感染性が失われることも示された。シジミ懸濁液による腸管オルガノイドへの細胞毒性が認められたが、アミラーゼ処理により改善可能であることが示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(和文)

村上 耕介, 小腸オルガノイドへの GII.3 ノロウイルスの侵入と胆汁酸の役割, アグリバイオ 2020 年 5 月号, 研究者の広場, 2020 年 5 月 2 日, 北隆館

##### 2. 学会発表

- (1) Murakami K, Tenge VR, Karandikar U, Lin SC, Ramani S, Ettayebi K, Crawford SE, Zeng XL, Neill FH, Ayyar BV, Atmar RL and Estes MK. GII.3 human norovirus hijacks bile acid-driven cellular dynamic changes to entry human intestinal enteroids. American Society for Virology 39th Annual Meeting, June 13-17, 2020 at Colorado State University in Fort Collins, Colorado (American Society for Virology Abstract Accepted as Oral Presentation. Meeting canceled due to COVID-19 pandemic).
- (2) Lewis MA, Cortes-Penfield NW, Tenge VR, Murakami K, Ettayebi K, Ayyar BV, Neill FH, Ramani S, Estes MK, Atmar RL. Evaluating Antiviral Agents for Human Noroviruses Using



a Human Intestinal Enteroid Model. American Society for Virology 39th Annual Meeting, June 13-17, 2020 at Colorado State University in Fort Collins, Colorado. (Meeting canceled due to COVID-19 pandemic).

- (3) Murakami K, Tenge VR, Karandikar U, Lin SC, Ramani S, Ettayebi K, Crawford SE, Zeng XL, Neill FH, Ayyar BV, Atmar RL and Estes MK. GII.3 human norovirus hijacks bile acid-driven cellular dynamic changes to entry human intestinal enteroids.

Virtual ASV Calicivirus & Astrovirus Workshop Presentation, June 18, 2020.

- (4) 村上耕介、片山和彦. 胆汁酸により誘発される細胞内ダイナミクス変化を用いて GII.3 ヒトノロウイルスは小腸オルガノイドに侵入する. 第 61 回日本臨床ウイルス学会 2020 年 10 月 Web 開催

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

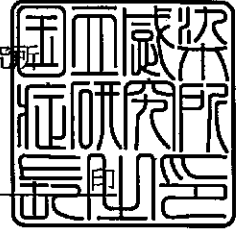
研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	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.	Jpn J Infect Dis.	73	89-95	2020
Murakami K, Fujii Y, Someya Y	Effects of the thermal denaturation of Sab-in-derived inactivated polio vaccines on the D-antigenicity and the immunogenicity in rats.	Vaccine	38	3295-3299	2020
Akane Y, Tsugawa T, Fujii Y, Honjo S, Kondo K, Nakakata S, Fujibayashi S, Ohara T, Mori T, Higashi date Y, Nagai K, Kikuchi M, Sato T, Kato S, Tahara Y, Kubo N, Katayama K, Kimura H, Tsutsumi H, Kawasaki Y	Molecular and clinical characterization of the equine-like G3 rotavirus that caused the first outbreak in Japan, 2016.	J Gen Virol	102		2021
Tsugawa T, Fujii Y, Akane Y, Honjo S, Kondo K, Nishihira H, Kimura H, Kawasaki Y	Molecular characterization of the first human G15 rotavirus strain of bovine origin.	J Gen Virol			In press
山下信子、鈴木亮介	ウイルス性食中毒	小児科	61	363-368	2020
村上耕介	小腸オルガノイドへのGII.3ノロウイルスの侵入と胆汁酸の役割	アグリバイオ	5月号		2020

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所  
 所属研究機関長 職名 所長  
 氏名 脇田 隆字



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部・職名) ウイルス第二部・室長  
 (氏名・フリガナ) 鈴木 亮介・スズキ リョウスケ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立感染症研究所	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。  
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

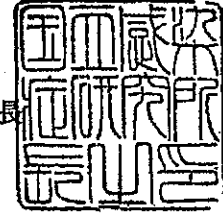
様式2

国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査結果通知書

令和元年10月9日

鈴木 亮介 殿

国立感染症研究所長



受付番号：1053

研究課題名：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

研究者名：鈴木 亮介・藤井 克樹・村上 耕介・杉山 隆一・林 豪士・四宮  
博人・片山 浩之・佐々木 潤

研究期間：2019年承認日～2022年3月末日

上記課題名の研究計画・公表予定は、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会において審議され、下記のとおり判定したので通知します。

記

判定	非該当 変更の勧告	<input checked="" type="checkbox"/> 承認 <input type="checkbox"/> 不承認	条件付承認
勧告 ある いは 条件 ・ 理由			

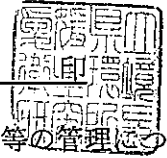
令和3年4月13日

厚生労働大臣 殿

機関名 愛媛県立衛生環境研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 四宮 博人



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 所長  
(氏名・フリガナ) 四宮 博人 (シノミヤ ヒロト)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	愛媛県立衛生環境研究所倫理審査委員会	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

写 印

(様式第7号)

研究計画決定通知書

元衛環第709-1号  
令和2年2月12日

研究責任者  
愛媛県立衛生環境研究所  
所長 四宮博人 様

愛媛県立衛生環境研究所長



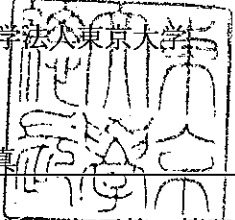
令和2年2月6日付けで依頼のあった下記の研究計画について、次のとおり決定したので通知します。

研究課題名	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 ※厚生労働省科学研究費（食品の安全確保推進研究事業） 「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」 の分担研究
研究責任者 (所属・職・氏名)	愛媛県立衛生環境研究所 所長 四宮博人
判定	① 承認 <del>② 条件付承認</del> <del>③ 計画の変更</del> <del>④ 不承認</del> <del>⑤ 研究の停止又は中止</del> <del>⑥ その他 ( )</del>
判定理由	(承認の場合は不要)
条件、変更の内容、意見等	(承認の場合は不要)
その他	

注 判定欄は、いずれかに○印をつけること。6 その他の場合は、具体的に記載すること。

令和3年3月23日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人東京大学  
所属研究機関長 職名 総長  
氏名 五神 真  印

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 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
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院工学系研究科・教授  
(氏名・フリガナ) 片山 浩之・カタヤマ ヒロユキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。  
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

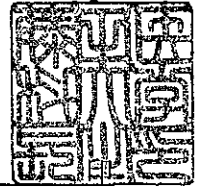
当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和 3年 4月 6日

厚生労働大臣  
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿  
(国立保健医療科学院長)

機関名 藤田医科大学  
所属研究機関長 職名 学長  
氏名 才藤 栄一



次の職員の令和 2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 医学部・講師  
(氏名・フリガナ) 佐々木潤・ササキジュン

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

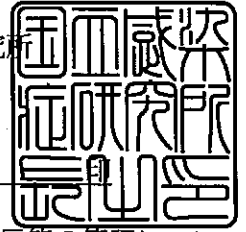


厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部・職名) ウイルス第二部・主任研究官  
(氏名・フリガナ) 藤井 克樹 ・ フジイ ヨシキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立感染症研究所	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

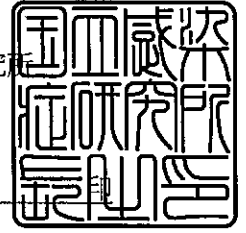
- (留意事項)
- ・該当する□にチェックを入れること。
  - ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部・職名) ウイルス第二部・主任研究官  
(氏名・フリガナ) 村上 耕介・ムラカミ コウスケ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立感染症研究所	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。