

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3年度 総括研究報告書

研究代表者 鈴木 亮介

令和4（2022）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	-----	3
鈴木亮介		
II. 分担研究報告		
1. 経口肝炎ウイルスのウイルス分離と分子疫学調査	-----	14
鈴木亮介		
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	-----	18
四宮博人		
3. 野菜表面のウイルス検出法の検討	-----	22
片山浩之		
4. アイチウイルス検出法の開発・検討	-----	24
佐々木潤		
5. ロタウイルスの検出方法の開発・改良	-----	27
藤井克樹		
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	-	30
村上耕介		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	32

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。

今年度は国内での報告が稀な遺伝子型 1 の E 型肝炎ウイルスに感染した患者の検体からウイルス分離を試み、感染性ウイルスの全長塩基配列情報を決定した。また分子疫学調査により 2021 年には A 型肝炎ウイルスと E 型肝炎ウイルスの塩基配列情報がそれぞれ 12 件および 37 件が収集され、系統樹解析を行った。

アイチウイルスの検出に関しては、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、定量を行うために、アイチウイルス検出 RT-LAMP 法の開発、および河川水からのアイチウイルス RNA 検出を行った。

ロタウイルスの検出法に関しては、リアルタイム PCR 用のプライマー・プローブの濃度の検討を行い、フォワードプライマー 0.4 μ M、リバースプライマー 0.2 μ M、プローブ 0.2 μ M とすることで、従来の方法と比較して、非特異反応の発生頻度がおよそ半減することが判明した。

食品中ノロウイルスの不活化条件の探索を目的として、シジミにノロウイルスを接種した後、90°C の熱湯中で加熱し、ウイルスを抽出して腸管オルガノイドに接種した。感染 24 時間後のウイルスコピー数をリアルタイム PCR で解析したところ、1 分間の加熱でウイルスが検出限界以下となった。

野菜表面上のウイルスの効率的な回収法の探索を目的とし、ふきとり法及びパウダリング法によるウイルス検出感度のさらなる効率化を図った。液体窒素を用いたパウダリング法において最もウイルス検出量が高く、また、誤差が小さいことから安定した検出能力を有していることが示された。

ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキの中腸腺抽出液に段階希釈したノロウイルス懸濁液を添加する実験系を構築し、その試料中のウイルスを qPCR および droplet digital PCR (ddPCR) によって定量した結果、ddPCR 法、特に RT 反応から ddPCR まで One-Step で行う方法が最も検出感度が高いことを明らかにした。

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
中西千尋・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
門屋俊祐・東京大学大学院工学系研究科
岩本朋忠 神戸市健康科学研究所
森 愛 神戸市健康科学研究所
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

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り、効果的な対策を取るための知見も不足している状況にある。したがって、原因が疑われる食材のみならず、幅広く環境中のウイルスの存在を調査する必要がある。今年度は、国内での報告が稀な遺伝子型1のHEVのウイルス分離を試み、感染性ウイルスの全長塩基配列情報を決定した。一方で分子疫学調査により2021年にHAVとHEVの塩基配列情報がそれぞれ32件および15件収集され、それらについて系統樹解析を行った。

(2) 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、集団発生および散発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して、アイチウイルス検出 RT-LAMP 法の開発、実際に河川水からのアイチウイルス RNA の検出を行った。

(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。この系を利用し、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モデル食品として用いることで、加熱によるウイルス不活化条件の特定を目指した。

(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、野菜表面に付着したウイルス検出法の開発及び検出感度の向上を目的として、種々のふきとり剤とその誘出法、野菜表面からの直接検出法の比較検討を行い、最適な検出手法の決定を目指した。

(6) 食品からのウイルス検出において、デジタル PCR (dPCR) 法による高感度検出法は有望な方法の候補である。リアルタイム PCR (qPCR) 法による定量には、ノロウイルス

等の標準物質が不可欠であるが、dPCR ではサンプルを標的遺伝子コピー1 個または全く含まない数千個の個々の PCR に分割するため、増幅後にコピー数の総数が算出され、標準物質を必要としない。また、サンプルを多数のサブサンプルに分割することで、食品のマトリックスタイプの成分等に由来する酵素阻害物質の影響を低減できる可能性がある。昨年度ノロウイルス遺伝子を含むプラスミドを用いて試行した dPCR による高感度検出を実際の検体を用いて検討した。検体としては、ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキを用いた。

B. 研究方法

(1) 積極的疫学調査により E 型肝炎と診断された患者の血清および便 (10%乳剤) から QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。HEV ゲノムの一部 (ORF2 領域) を RT-PCR により増幅した後に、得られた断片の塩基配列を決定し、遺伝子型を同定した。そのうち遺伝子型 1 と確定された便および血清検体を HEV 感染感受性細胞に添加し、長期間培養を行った。継時的に培地を交換するとともに、その培地から RNA を抽出し、HEV genome の定量を行った。また抽出 RNA からほぼ全長のウイルスゲノムを RT-PCR で増幅し、遺伝子配列を決定した。

積極的疫学調査により得られた HAV および HEV の遺伝子情報については、MEGA (version 10.1.8) を用いて系統樹解析を行った。

(2) アイチウイルスの Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) 法では、Genotype A, B ともに検出可能なプライマーセットおよび Genotype A のみを検出可能なプライマ

一セットを設計した。コントロールの鋳型としては、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 RNA 増幅試薬キットを用い、62°C、60 分反応した。白濁の有無を目視で確認し、陽性、陰性を判定した。河川水からのウイルス RNA 回収は、愛知県豊明市の河川 2 か所において、2021 年 9 月から 2022 年 3 月にかけて毎月 1 回、河川水を採集した。河川水 1 リットルに 8% PEG 6000、2.3% NaCl を加え、4°C、16 時間攪拌した後、4°C で 9000×g、30 分遠心し、沈殿を滅菌蒸留水に懸濁した。この懸濁液からウイルス RNA を精製した。ウイルス RNA の検出は、リアルタイム RT-PCR および RT-PCR により行った。

(3) ロタウイルスのリアルタイム qPCR 法は NEB 社の LunaScript RT SuperMix Kit および Luna Universal Probe qPCR Master Mix を使用した。プライマー・プローブは ThermoFisher Scientific 社および Integrated DNA Technologies (IDT) 社に依頼して合成した。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、Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) を用いて DNase 処理をせずに RNA を抽出した。

(4) ノロウイルスの不活化条件を明らかにするために、シジミを 90°C の熱湯中で加熱することを想定した試験を実施した。あらかじめ温浴およびシジミ内部の温度変化を 5 分間まで 15 秒ずつ測定した。加熱試験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 (290 ± 70 mg) を 1.5 mL チューブに入れ、GII.4 ノロウイルス 1.06 × 10⁸ コピー/30 μL をマイクロシリンジで接

種した後、90°C の温浴で 1、2、3、4 分間加熱処理した。加熱前のウイルス接種シジミを 0 分間加熱処理サンプルとした。各シジミを培地中でホモジナイズした後、遠心分離 (9,100 xg、3 分間) により残渣を取り除いた。上清をウイルス抽出液として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リアルタイム PCR で解析した。また、ウイルス抽出液に含まれるノロウイルスを同様にリアルタイム PCR で解析することでウイルス回収率を算出した。

(5) 野菜表面のウイルス検出法については、マウスノロウイルス及びマウス肝炎ウイルスの 10⁶ 及び 10³ copis/mL のウイルス懸濁液 20 mL に対してカットキャベツ 20 g を添加し、10 分おきに攪拌しながら 1 時間浸漬させた。浸漬後、ウイルス懸濁液を排除し、野菜から水気をよく切った。拭き取り剤としてレーヨン、コットン、ガラス繊維、酸化アルミニウム繊維の 5 種類の素材を採用し、各拭き取り剤をピンセットで掴める程度のサイズに調整し、ウイルス吸着野菜を満遍なくこすり、拭き取り剤に吸着させた。拭き取り剤から RNA を回収した後、RT-qPCR を行なった。パウダリング法は、乳鉢内でウイルス吸着野菜を液体窒素により急速に冷凍させ、液体窒素を適宜加えながらパウダー上になるまですり潰した。消毒・洗浄後の野菜表面上ウイルスの検出については、2 mg/L に調整した次亜塩素酸ナトリウム溶液を洗浄水とした。ウイルス吸着野菜をフィルタホルダーにセットし、1L の洗浄水を用いて 5 分かけて洗浄・消毒処理を行なった。ふきとり法及びパウダリング法を用いて、消毒・洗浄後の野菜からウイルス RNA の回収・定量を行なった。

(6) 食品検体としてカキを用い、ノロウイルス検査の常法にしたがって、カキ中腸線の抽出液を調製した（以下、中腸線抽出液）。ノロウイルスとして患者由来糞便懸濁液（qPCRによりコピー数を概算済み）を用いた（以下、ノロウイルス懸濁液）。中腸線抽出液に変量のコピー数を含むノロウイルス懸濁液を加え、QIAcube（QIAGEN社）またはmagLEAD 12gC（Precision System Science社）を用いてRNAを抽出した。常法にしたがい、RNA抽出液をDNase処理後、逆転写（RT）反応を行った。RT産物中のノロウイルスcDNAをqPCR（7900HT Fast, Applied Biosystems社）またはdPCRの一種であるdroplet dPCR（ddPCR）（QX200 ddPCRシステム、BIO-RAD社）により増幅して検出した。qPCRは3ウェル測定し、平均値を得た。ddPCRでは、RT産物の増幅以外に、RNA抽出液からOne-Stepで逆転写反応からddPCRを行う方法も実施した。

（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。ヒト由来検体の検体情報について、これらの倫理審査に基づき、適切に取り扱った。

腸管オルガノイドはベイラー医科大学が樹立したものを、国立感染症研究所の人を対象とする生命科学・医学系研究倫理審査委員会からの承認を受け、MTAを締結した上でウイルス第二部に譲渡されたものを使用した。

C. 研究結果

(1) 遺伝子型1のE型肝炎ウイルス（HEV）に感染した患者の血清および便（10%乳剤）のHEV RNAコピー数は、それぞれ 4.1×10^6 copies/mL および 1.1×10^8 copies/mL であった。検体を PLC/PRF/5 細胞のサブクローンである 4-21 細胞に添加し、数日ごとに培地を置換しながら長期間培養し、培養上清中の HEV RNA を測定したところ、血清検体を感染させた細胞の培養上清中からは HEV RNA は検出されなかったが、便乳剤を感染させた細胞では感染後 17 日目に培養上清の RNA が陽性となった。その後 RNA コピー数は徐々に増加し、感染後 73 日目でピークとなった。コピー数が上昇した上清から RNA を抽出し、ほぼ全長に相当する領域の塩基配列を決定した。

感染症発生動向調査において 2021 年の E 型肝炎の報告数は 452 例であった。このうち、ウイルス遺伝子情報が明らかになったものは、遺伝子型 3 が 32 件、遺伝子型 4 が 5 件であった。食中毒が関連したと考えられる 7 件を除き、配列や地域、発生時期について集中した事例はなかった。一方で遺伝子型 4 の 4 検体は配列の相同性が高く、同一クラスターに分類されたものの、共通する感染源情報はなく、関連については不明であった。

A 型肝炎については 2021 年の報告数はわずかに 71 例で、過去最少となった。このうちウイルスの配列情報が得られたのは 12 例で、10 例は比較的近い配列を示したことから、共通した汚染源の存在が示唆されたが、同定には至らなかった。

(2) アイチウイルスの RT-LAMP 法開発のために、合計 11 のプライマーセットをデザインした。その際、イヌコブウイルスやネココブウイルスなど、身近な動物のコブウイルスの

配列と比較し、これらの動物ウイルスを検出しにくいようにプライマーのデザインに留意した。結果として、 10^3 コピーのウイルス RNA を検出可能なプライマーセットが複数得られた。しかし、 10^2 コピーのウイルス RNA の検出はできなかつた。河川水からのウイルス RNA 検出については、愛知県豊明市の河川 2 か所で採集したサンプルについて、リアルタイム PCR および RT-PCR の 2 方法により、アイチウイルス RNA の検出を試みた。リアルタイム PCR により、皆瀬川の 11 月と 1 月、境川の 9~12 月で約 200-450 copies/リットルのアイチウイルス RNA が検出された。RT-PCR の結果、皆瀬川からは、10 月および 12 から 3 月まで検出された。一方、境川からは一度も検出されなかつた。Nested PCR 産物の塩基配列を解析した結果、いずれも Genotype A であった。また、検出されたのは、いずれも Takara のキットで RT-PCR を行った場合であった。

(3) ロタウイルスのリアルタイム qPCR 法の検討で、NSP3 セグメントの 3' 末端付近にある非常に保存性の高い領域 (90 bp 程度) について、フォワードプライマー 3 種、リバープライマー 3 種、プローブ 6 種を作製してその組み合わせによる非特異反応の発生率を検証したが、いずれも非特異反応が大幅に抑えられることはなかつた。

続いて NSP5 および NSP6 領域のフォワードプライマー 5 種、リバープライマー 4 種、プローブ 2 種を作成してその組み合わせによる非特異反応の発生率を検証したところ、非特異反応が若干抑えられる組み合わせがあつたが、検出感度が若干落ちる傾向が見られた。プライマー・プローブの濃度

の検討では、リバープライマーとプローブの濃度を $0.2 \mu\text{M}$ 、フォワードプライマー濃度を 2 倍の $0.4 \mu\text{M}$ とすることで、非特異反応の発生が大幅に軽減される傾向が見られた。また、アニーリング+伸長反応は、 60°C より 56°C で行った方が、非特異反応が軽減された。

(4) ノロウイルスの不活化条件の検討において、 90°C に設定した温浴およびシジミ内部の温度を継時的に測定したところ、シジミ内部が 90°C に達するまで 2 分間を要した。この結果を考慮し、GII.4 ノロウイルスを接種したシジミを 90°C で 0、1、2、3、4 分間加熱した。各シジミから調製したウイルス抽出液を腸管オルガノイドに接種したところ、未加熱サンプルでは感染 24 時間後に 42.5 倍のウイルス増殖が見られた。一方、1-4 分間加熱サンプルでは全てでウイルス増殖が認められなかつた。ウイルス回収率は、未加熱サンプルで $62.0 \pm 7.3\%$ 、1 分間加熱サンプルで $27.7 \pm 15.9\%$ であつたが、2-4 分間加熱サンプルでは 11~12% であつた。

(5) ふきとり法及びパウダリング法を用いて野菜表面からのウイルス検出量を比較した。高濃度のウイルス懸濁液に浸漬させた野菜に関して、マウスノロウイルス (MNV) 及びマウス肝炎ウイルス (MHV) の検出量は手法間及び素材間で有意な差は見られなかつたものの、パウダリング法によって得られた検出量が最も高かつた。低濃度条件下では、ふきとり法における MHV の検出量の標準偏差が大きい一方で、パウダリング法では高い定量値及び小さい標準偏差が確認された ($2.62 \pm 0.2 \log_{10} \text{ copy/g-野菜}$)。MNV に関しては高濃度条件と類似した結果が見られた。洗浄・消毒処理を施した野菜からはパウダリング法において MHV の検出感度が最も高かつた。一方、MNV の検出感度はレーヨンによるふき

とり法及びパウダリング法が高い値を示した。

(6) ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキの抽出液を用い、そこへ段階希釈したノロウイルス懸濁液を添加する実験系を構築した。中腸線抽出液中に変量のノロウイルスを添加した試料から RNA を抽出し、RT 反応後、qPCR および ddPCR によって検出した。RNA 抽出液から One-Step で RT 反応から ddPCR を行う測定系も実施した。それぞれの測定値から RNA 抽出液中のターゲット配列のコピー数結果を表 1 に示す。RNA の抽出方法 (QIAcube, magLEAD 200, 400) によらず、ddPCR が qPCR よりも検出感度が高かった。ddPCR 測定系中では、RNA 抽出液からの One-Step 反応系が最も検出感度が高い結果であった。

D. 考察

(1) 遺伝子型 1 の E 型肝炎ウイルス (HEV) が国内で報告されることは稀である。本研究でウイルス分離の由来となった E 型肝炎患者はインドから日本に移動して約 3 週間後に発病したため、国内ではなくインドで感染した可能性が強く疑われる。全長の塩基配列を用いた系統樹解析により、遺伝子型 1 の中でも比較的新しく分類されたサブタイプ g である事が判明した。また ORF の 1 つである ORF4 が、これまで報告されているものより短い特徴を持つ事が明らかになった。分離された遺伝子型 1 の HEV は培養細胞で効率的に感染、増殖が可能であるため、今後の HEV 研究に利用される事が期待される。

一方で 2021 年の国内の E 型肝炎の届け出数は 452 人と例年並みであったのに比べ、A 型肝炎はわずかに 71 例と減少した。同じ経

口肝炎ウイルスでも、コロナ禍での人々の生活様式の変容による影響は異なることは興味深く、感染経路の違いを示唆している可能性が考えられた。

(2) アイチウイルスの RT-LAMP 法による検出に関して、Genotype A, B 両方検出できるプライマーセットのデザインは、様々な株に対応してすべてを検出しようとするデザインであることに加え、動物コブウイルスを検出しないようなデザインも考えた場合、かなりプライマー設定領域が限られてくることが分かった。結果として本研究でデザインした複数のプライマーセットで、 10^3 コピーのウイルス RNA まで検出できた。アイチウイルスの RT-LAMP 法による検出に関する論文 (Lee et al., Indian J Microbiol, 59:375-378, 2019) で発表されているプライマーセットを利用した RT-LAMP を本研究で行った場合、 10^4 コピーまでしか検出できなかったため、それよりは感度は高かった。しかし、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) コピーであることを考えると、まだ、感度向上にむけた検討の必要があるものと考えられた。

河川水からのウイルス RNA の検出の試みでは、リアルタイム PCR の結果と RT-PCR の結果は一致しなかった (リアルタイム PCR では検出されなかったサンプルから RT-PCR で検出された例も認められた)。この違いに関しては今後検討が必要である。

One-Step RT-PCR でウイルス RNA が検出されたのは、いずれも Takara の PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit で RT-PCR を行った場合であった。このことから、今回用いた One Step RT-

PCR 2 キットのうちでは、Takara のキットが検出に適しているものと考えられた。

河川水サンプルを採集した 9 月から 3 月にかけては、感染性胃腸炎症例の増加する冬季を含む。下水調査で、アイチウイルスは、冬季から春季にかけて多くなるとの報告がある (Kitajima et al., Applied Environ Microbiol. 3952-58. 2013)。今回の結果ではそのような傾向は認められなかった。SARS CoV-2 の流行に対する感染対策により、感染性胃腸炎症例が減少していることが関係しているのかもしれない。アイチウイルスの環境中の増減を把握するためには、長期的な調査の継続が必要である。

(3) ロタウイルスのリアルタイム qPCR 法の検討で、プライマー・プローブの濃度を変更することで非特異反応の発生が軽減されるメカニズムについては詳細には解明されていない。Freeman らのオリジナルのプライマー・プローブセットの場合は、ウイルス遺伝子におけるフォワードプライマー結合部位の配列が遺伝子型によって異なるため、フォワードプライマー 20 塩基中に混合塩基が 3 つ入っている (8 番目に W、12 番目に R、14 番目に R)。つまり、ウイルスの塩基配列に対して 100%相補的なプライマーは、理論的には添加されたフォワードプライマーの内の $1/8$ ($1/2 \times 1/2 \times 1/2$) に過ぎない。従って、フォワードプライマーの濃度をリバースプライマーおよびプローブの倍量添加することで、PCR 反応の特異性や増幅効率が改善している可能性が考えられる。しかし、フォワードプライマーの濃度を $0.6 \mu\text{M}$ 、 $0.8 \mu\text{M}$ と増加させても、非特異反応が軽減されることはなく、 $0.4 \mu\text{M}$ が至適濃度であると考えられた。

本研究により、ロタウイルスのリアルタイム qPCR 検出法において現行法よりも非特異反応を軽減させる方法が見いだされた。新たに作製したプライマー・プローブセットの中には Freeman らのプライマー・プローブセットよりわずかに良い結果が得られたものもあるが、大きな差ではないため、地方衛生研究所等における検査業務に混乱を来たさないためには、従来から広く利用されている Freeman らのプライマー・プローブセットの利用を続けるのが無難であると考えられる。今後、各地方衛生研究所でも「濃度を変更することにより非特異反応が軽減される」現象の再現性が確認できれば、検査マニュアル等に反映させていく予定である。

(4) ノロウイルスの不活化条件について、 90°C で温度を固定した検証を行ったが、例えば 60°C など異なる温度での加熱を含めた条件についても検証が必要である。本研究ではシジミをモデル食材とした試験を実施したが、得られた技術及び知見を応用させることにより、生食が行われるカキを対象とする検証が行われることが期待される。一方で、実際の汚染食品中には数コピー程度のウイルス量しか含まれないことが多いが、本研究では検出限界値を 20 コピー/反応溶液として設定していることから、本系を実用化するためには検出感度の改善が求められる。

(5) ふきとり法及びパウダリング法を用いた野菜表面からのウイルス検出の検討は全て 3 回試行したが、ふきとり法ではカット野菜の拭き取り残しによる偶然誤差の影響が強く、安定した定量値を得るためにはより多くの試行回数が必要になると考えられる。一方、パウダリング法では、野菜からの直接回収により偶然誤差の影響が低減され、パウダ

一化による表面積の増加によって RNA 抽出溶液への接触機会が増加し、高い検出感度が得られたと考えられる。

(6) 糞便等のヒト由来検体の検査に比べ、ウイルス量が少ない食材・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、これらの検体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ている。

通常の PCR は、最終増幅産物をアガロースゲル電気泳動で検出するエンドポイント解析であり、定量性がなく、qPCR では、蛍光を用いた検出により反応進行中の増幅産物を測定することができるものの、陽性コントロールによる標準曲線に対して正規化する必要がある、増幅効率のばらつきが結果に影響を与える可能性もある。一方、dPCR では、PCR 増幅と蛍光プローブによる検出方法を基礎としながら、標準曲線を用いることなくサンプル中のターゲット DNA コピー数を高感度に絶対定量することが可能である。さらに、dPCR の一種である droplet dPCR (ddPCR) では、サンプル DNA は 20,000 個の液滴に分割された後、それぞれの液滴で独立して PCR 増幅が行われ、陽性と陰性の液滴の数をポアソン統計解析することで、正確な絶対定量が可能である。

今回、ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキを用い、その中腸腺抽出液に段階希釈したノロウイルス懸濁液を添加する実験系を構築した。その試料から実際の検査で行われる操作によってウイルス RNA を抽出し、qPCR および ddPCR によって検出・定量を行った。これまでに得られた結果では、ddPCR 法、特に RT 反応から ddPCR まで One-Step で行う方法が最も検出感度が高かった。今後さらなる検討を要するが、食品、拭き取

り検体、環境水などからの食中毒原因ウイルスの高感度検出方法が確立すれば、各種ウイルスの汚染経路や感染パターンの解明に繋がり、今後の予防対策に貢献できると期待される。

E. 結論

(1) 国内での報告が稀な遺伝子型 1 の E 型肝炎ウイルス (HEV) のウイルス分離を行い、感染性ウイルスの全長塩基配列情報を決定した。このウイルスはサブタイプ g に分類され、またインド由来である可能性が考えられた。培養細胞で感染増殖が可能な株であるため、今後の HEV 研究への利用が期待される。

2021 年の A 型肝炎の報告数が過去最少であった一方で、E 型肝炎の報告数は例年並みであった。またその遺伝子型は 3 および 4 で占められていた。今後の食中毒原因ウイルスの感染制御に向け、継続的な分子疫学調査が必要であるとともに、環境調査の重要性が認識された。

(2) アイチウイルスの RT-LAMP 法による検出に関して、 10^3 コピーのウイルス RNA まで検出できるプライマーセットを得た。ただし、市販のノロウイルスの検出感度と比較すると劣ることから、感度向上に関する検討の余地が残された。

(3) ロタウイルスのリアルタイム qPCR 検出法において、幅広い遺伝子型を高い特異性で検出する最適な方法は、Freeman らが設計したプライマー・プローブセットを用い、それぞれの終濃度を $0.4 \mu\text{M}$ 、 $0.2 \mu\text{M}$ 、 $0.2 \mu\text{M}$ とし、アニーリング+伸長反応は 56°C で行うものである。

(4) シジミから抽出したノロウイルスが腸

管オルガノイドに感染すること、90℃・1分間の加熱で感染性が失われることを「直接的」に示した。得られた技術及び知見は、二枚貝中ノロウイルスの不活化方法の開発に活用されることが期待される。

(5) 野菜表面上からの効率的なウイルス検出手法の探索を行ったところ、最も誤差が小さく且つ高い検出感度を示したパウダリング法が適した手法であることが示された。

(6) ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキの中腸腺抽出液に段階希釈したノロウイルス懸濁液を添加する実験系を構築し、その試料中のウイルスを qPCR および ddPCR によって定量した結果、ddPCR 法、特に RT 反応から ddPCR まで One-Step で行う方法が最も検出感度が高いことを明らかにした。これらの結果は、今後の食中毒原因ウイルスの感染制御に向け、有益な方法論を提供するものと期待される。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

論文発表 (英文)

1. Sun L, Li Y, Misumi I, González-López O, Hensley L, Cullen JM, McGivern DR, Matsuda M, Suzuki R, Sen GC, Hirai-Yuki A, Whitmire JK, Lemon SM. IRF3-mediated pathogenicity in a murine model of human hepatitis A. *PLoS Pathog.* 2021 17(9):e1009960.
2. 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.* 2021 Apr;102(4).

3. Hayashi T, Murakami K, Hirano J, Fujii Y, Yamaoka Y, Ohashi H, Watashi K, Estes MK, Muramatsu M: Dasabuvir Inhibits Human Norovirus Infection in Human Intestinal Enteroids. *mSphere.* 2021 Nov 3; 6(6):e0062321.
4. Hayashi T, Yamaoka Y, Ito A, Kamaishi T, Sugiyama R, Estes MK, Muramatsu M, Murakami K. Evaluation of heat inactivation of human norovirus in fresh-water clams using human intestinal enteroids. *Viruses.* Accepted (2022).

(和文)

1. 鈴木亮介、李天成、塩田智之：「創薬研究者がこれだけは知っておきたい最新のウイルス学」第1章 第3節「E型肝炎ウイルスの感染増殖系」。2021. 8月 p25-31.
2. 杉山隆一、李天成、鈴木亮介、石井孝司、村松正道. 病原微生物検出情報 (IASR)、2021、Vol. 42、No. 12、わが国のE型肝炎分子疫学情報 (2016~2021年第42週)
3. 藤井克樹：特集 ウイルス研究に進歩をもたらした新しい技術 ウイルス遺伝子の網羅的解析：1) 次世代シーケンサー 臨床とウイルス 2022, 50(1), 30-36

学会発表

1. レポーター遺伝子を持つ組換えA型肝炎ウイルスを用いた抗ウイルス低分子化合物の探索、鈴木亮介、松田麻未、西山直子、小林さくら、鈴木祐成、結城(平井)

- 明香、山根大典、村松正道. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 2021/11/16-18, 国内, 口頭.
2. A 型肝炎ウイルスにおける新規抑制剤の開発、鄭シン, 史紹春, 鈴木亮介, 結城(平井)明香, 若江 亨祥, 劉慶博, 宋少江, 村松正道、第 68 回日本ウイルス学会学術集会 2021/11/16-18, 国内, ポスター.
 3. 低分子化合物ライブラリーを用いた HEV 増殖阻害物質の探索. 杉山隆一、石井孝司、鈴木亮介、脇田隆字、村松正道. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 2021/11/16-18, 国内, ポスター.
 4. 藤井克樹、津川毅、中田修二、村松正道：札幌市において小規模な流行を起こしたロタウイルス G12 株の全遺伝子解析 (Full-genome analysis of rotavirus G12 strains that caused a small epidemic in Sapporo) 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2021 年 11 月 16-18 日
 5. 津川毅、藤井克樹、赤根祐介、本庄紗帆、近藤謙次：ウシ由来ロタウイルス G15 株のヒト初感染例の分子的特徴 (Molecular characterization of the first human G15 rotavirus strain of zoonotic origin from the bovine species) 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2021 年 11 月 16-18 日
 6. 林豪士、村上耕介、平野順紀、藤井克樹、山岡曜子、大橋啓史、渡士幸一、Mary Estes、村松正道：Screening of an antiviral compound library identifies dasabuvir as a novel anti-human norovirus inhibitor 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2021 年 11 月 16-18 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
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
該当なし
 3. その他
該当なし

経口肝炎ウイルスのウイルス分離と分子疫学調査

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	岩本朋忠	神戸市健康科学研究所	感染症部	部長
研究協力者	森 愛	神戸市健康科学研究所	感染症部	副部長

研究要旨

地方衛生研究所と国立感染症研究所はA型肝炎ウイルス（HAV）とE型肝炎ウイルス（HEV）の分子疫学調査について連携し、国内で流行しているウイルスのサーベイランスを行なっている。国内で検出されるHEVは、遺伝子型3および4で占められているが、稀に海外で感染した事が疑われる遺伝子型1の報告もある。本研究では、国内での報告が稀な遺伝子型1のHEVに感染した患者の検体からウイルス分離を試み、感染性ウイルスの全長塩基配列情報を決定した。また分子疫学調査により2021年にはHAVとHEVの塩基配列情報がそれぞれ12件および37件収集され、系統樹解析を行った。

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（HAV）およびE型肝炎ウイルス（HEV）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発的に発生する、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 および 2021 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比して減少し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。したがって、原因が疑われる食材のみならず、幅広く環境中のウイルスを調査する事は、感染経路を理解する上で重要である。

今年度は、国内での報告が稀な遺伝子型 1 の HEV のウイルス分離を試み、感染性ウイルスの全長塩基配列情報を決定した。一方で分子疫学調査により 2021 年に HAV と HEV の塩基配列情報がそれぞれ 12 件および 374 件収集され、それらについて系統樹解析を行った。

B. 研究方法

積極的疫学調査により E 型肝炎と診断された患者の血清および便（10%乳剤）から QIAamp Viral RNA kit（QIAGEN）を用いて RNA を抽出した。HEV ゲノムの一部（ORF2 領域）を RT-PCR により増幅した後に、得られた断片の塩基配列を決定し、遺伝子型を同定した。そのうち遺伝子型 1 と確定された便および血清検体を HEV 感染感受性細胞に添加し、長期間培養を行った。継時的に培地を交換するとともに、その培地から RNA を抽出し、HEV RNA の定量を行った。

また積極的疫学調査により得られた HAV および HEV の遺伝子情報については、MEGA（version 10.1.8）を用いて系統樹解析を行った。

C. 研究結果

E 型肝炎の ORF2 の一部の塩基配列から、遺伝子型 1 の HEV 感染が明らかとなった患者検体について、血清および便（10%乳剤）

の HEV RNA コピー数を qPCR で測定したところ、それぞれ 4.1×10^6 copies/mL および 1.1×10^8 copies/mL であった。検体それぞれについて $100 \mu\text{L}$ を、6 well plate に播種した PLC/PRF/5 細胞のサブクローンである 4-21 細胞に添加し、数日ごとに培地を置換しながら長期間培養した。培養上清中の HEV RNA を測定したところ、血清検体を感染させた細胞の培養上清中からは HEV RNA は検出されなかったが、便乳剤を感染させた細胞では感染後 17 日目に培養上清の RNA が陽性となった。その後 RNA コピー数は徐々に増加し、感染後 73 日目でピークとなり、コピー数は 3.1×10^8 copies/mL となった。コピー数が上昇した上清から RNA を抽出し、ほぼ全長に相当する領域を 9 断片に分割して nested-RT-PCR で増幅し、塩基配列を決定した。

感染症発生動向調査において 2021 年の E 型肝炎の報告数は 452 例であった。このうち、ウイルス遺伝子情報が明らかになったものは、遺伝子型 3 が 32 件、遺伝子型 4 が 5 件であった。食中毒が関連したと考えられる 7 件を除き、配列や地域、発生時期について集中した事例はなかった。一方で遺伝子型 4 の 4 検体は配列の相同性が高く、同一クラスターに分類されたものの、共通する感染源情報はなく、関連については不明であった。

A 型肝炎については 2021 年の報告数はわずかに 71 例で、過去最少となった。このうちウイルスの配列情報が得られたのは 12 例で、10 例は比較的近い配列を示した事から、共通した汚染源の存在が示唆されたが、同定には至らなかった。

D. 考察

遺伝子型 1 の HEV が国内で報告されることは稀である。本研究でウイルス分離の由来となった E 型肝炎患者はインドから日本に移動して約 3 週間後に発病したため、国内ではなくインドで感染した可能性が強く疑われる。全長の塩基配列を用いた系統樹解析により、遺伝子型 1 の中でも比較的新しく分類されたサブタイプ g である事が判明した。また ORF の 1 つである ORF4 が、これまで報告されているものより短い特徴を持つ事が明らかになった。分離された遺伝子型 1 の HEV は培養細胞で効率的に感染、増殖が可能であるため、今後の HEV 研究に利用される事が期待される。

一方で 2021 年の国内の E 型肝炎の届け出数は 452 人と例年並みであったのに比べ、A 型肝炎はわずかに 71 例と減少した。同じ経口肝炎ウイルスでも、コロナ禍での人々の生活様式の変容による影響は異なることは興味深く、感染経路の違いを示唆している可能性が考えられた。

E. 結論

国内で報告が稀な遺伝子型 1 の HEV のウイルス分離を行い、感染性ウイルスの全長塩基配列情報を決定した。このウイルスはサブタイプ g に分類され、またインド由来である可能性が考えられた。培養細胞で感染増殖が可能な株であるため、今後の HEV 研究への利用が期待される。

2021 年の A 型肝炎の報告数が過去最少であった一方で、E 型肝炎の報告数は例年並みであった。またその遺伝子型は 3 および 4 で占められていた。今後の食中毒原因ウイルスの感染制御に向け、継続的な分子疫学

調査が必要であるとともに、環境調査の重要性が認識された。

G. 研究発表

論文発表

(英文)

1. Sun L, Li Y, Misumi I, González-López O, Hensley L, Cullen JM, McGivern DR, Matsuda M, Suzuki R, Sen GC, Hirai-Yuki A, Whitmire JK, Lemon SM. IRF3-mediated pathogenicity in a murine model of human hepatitis A. *PLoS Pathog.* 2021 17(9):e1009960.

(和文)

1. 鈴木亮介、李天成、塩田智之：「創薬研究者がこれだけは知っておきたい最新のウイルス学」第 1 章 第 3 節「E 型肝炎ウイルスの感染増殖系」。2021. 8 月 p25-31.
2. 杉山隆一、李天成、鈴木亮介、石井孝司、村松正道. 病原微生物検出情報 (IASR)、2021、Vol. 42、No. 12、わが国の E 型肝炎分子疫学情報 (2016~2021 年第 42 週)

学会発表

1. レポーター遺伝子を持つ組換え A 型肝炎ウイルスを用いた抗ウイルス低分子化合物の探索、鈴木亮介、松田麻未、西山直子、小林さくら、鈴木祐成、結城(平井)明香、山根大典、村松正道. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 2021/11/16-18, 国内, 口頭.
2. A 型肝炎ウイルスにおける新規抑制剤の開発、鄭シン, 史紹春, 鈴木亮介, 結城(平井)明香, 若江 亨祥, 劉慶博,

- | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 宋少江, 村松正道、第 68 回日本ウイルス学会学術集会 2021/11/16-18, 国内, ポスター. | 1. 特許取得
該当なし |
| 3. 低分子化合物ライブラリーを用いた HEV 増殖阻害物質の探索. 杉山隆一、石井孝司、鈴木亮介、脇田隆字、村松正道. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 2021/11/16-18, 国内, ポスター. | 2. 実用新案登録
該当なし |
| | 3. その他
該当なし |

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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、中西千尋、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品からの検出や同定は、食品を汚染しているウイルス量が少ないことや食品に含まれる夾雑物が検出を妨げること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。高感度検出系の開発により、原因ウイルスの食品等への汚染経路の解明がすすめば、今後の予防対策に貢献できると考えられる。今回、我々は、ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキの中腸腺抽出液に段階希釈したノロウイルス懸濁液を添加する実験系を構築し、その試料中のウイルスをリアルタイム PCR およびデジタル PCR によって定量した結果、逆転写反応からデジタル PCR までを **One-Step** で行う方法が最も検出感度が高いことが判明した。デジタル PCR ではサンプルを標的遺伝子コピー1個または全く含まない多数の個別の PCR に分割するため、増幅後にコピー数の総数が算出され、標準物質を必要とせず、またサンプルを多数のサブサンプルに分割することで、食品中の夾雑物成分に由来する酵素阻害物質の影響を低減できる可能性がある。これらの結果は、食中毒原因ウイルスの高感度検出系の開発、延いては同ウイルスの感染制御に向け、有益な方法論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品からのウイルスの検出や同定は、食品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。

食品からのウイルス検出において、デジタルPCR(dPCR)法による高感度検出法は有望な方法の候補である。リアルタイムPCR(qPCR)法による定量には、ノロウイルス等の標準物質が不可欠であるが、dPCRではサンプルを標的遺伝子コピー1個または全く含まない数千個の個々のPCRに分割するため、増幅後にコピー数の総数が算出され、標準物質を必要としない。また、サンプルを多数のサブサンプルに分割することで、食品のマトリックタイプの成分等に由来する酵素阻害物質の影響を低減できる可能性がある。

今回、当分担任は、昨年度ノロウイルス遺伝子を含むプラスミドを用いて試行したdPCRによる高感度検出を実際の検体を用いて検討した。検体としては、ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキを用いた。

B. 研究方法

1. 検体：食品検体としてカキを用い、ノロウイルス検査の常法にしたがって、カキ中腸腺の抽出液を調製した（以下、中腸線抽出液）。ノロウイルスとして患者由来糞便懸濁液（qPCRによりコピー数を概算済み）をもちいた（以下、ノロウイルス懸濁液）。

2. RNA抽出と逆転写反応：食品検体としての中腸線抽出液に変量のコピー数を含むノロウイルス懸濁液を加え、QIACube（QIAGEN社）またはmagLEAD 12gC（Precision System Science社）を用いてRNAを抽出した。常法にしたがい、RNA抽出液をDNase処理後、逆転写(RT)反応

を行った。

3. 遺伝子増幅法：RT産物中のノロウイルスcDNAをqPCR（7900HT Fast, Applied Biosystems社）またはdPCRの一種であるdroplet dPCR(ddPCR)（QX200 ddPCRシステム、BIO-RAD社）により増幅して検出した。qPCRは3ウェル測定し、平均値を得た。ddPCRでは、RT産物の増幅以外に、RNA抽出液からOne-Stepで逆転写反応からddPCRを行う方法も実施した。

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も審査され、承認された。ヒト由来検体の検体情報について、これらの倫理審査に基づき、適切に取り扱った。

C. 研究結果

ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキの抽出液を用い、そこへ段階希釈したノロウイルス懸濁液を添加する実験系を構築した。中腸線抽出液中に変量のノロウイルスを添加した試料からRNAを抽出し、RT反応後、qPCRおよびddPCRによって検出した。RNA抽出液からOne-StepでRT反応からddPCRを行う測定系も実施した。それぞれの測定値からRNA抽出液中のターゲット配列のコピー数結果を表1に示す。RNAの抽出方法（QIACube, magLEAD 200, 400）によらず、ddPCRがqPCRよりも検出感度が高かった。ddPCR測定系中では、RNA抽出液からのOne-Step反応系が最も検出感度が高い結果であった。

D. 考察

糞便等のヒト由来検体の検査に比べ、ウイルス

量が少ない食材・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、これらの検体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ている。

通常の PCR は、最終増幅産物をアガロースゲル電気泳動で検出するエンドポイント解析であり、定量性がなく、qPCR では、蛍光を用いた検出により反応進行中の増幅産物を測定することができるものの、陽性コントロールによる標準曲線に対して正規化する必要があり、増幅効率のばらつきが結果に影響を与える可能性もある。一方、dPCR では、PCR 増幅と蛍光プローブによる検出方法を基礎としながら、標準曲線を用いることなくサンプル中のターゲット DNA コピー数を高感度に絶対定量することが可能である。さらに、dPCR の一種である droplet dPCR (ddPCR) では、サンプル DNA は 20,000 個の液滴に分割された後、それぞれの液滴で独立して PCR 増幅が行われ、陽性と陰性の液滴の数をポアソン統計解析することで、正確な絶対定量が可能である。

今回、ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキを用い、その中腸腺抽出液に段階希釈したノロウイルス懸濁液を添加する実験系を構築した。その試料から実際の検査で行われる操作によってウイルス RNA を抽出し、qPCR および

ddPCR によって検出・定量を行った。これまでに得られた結果では、ddPCR 法、特に RT 反応から ddPCR まで One-Step で行う方法が最も検出感度が高かった。今後さらなる検討を要するが、食品、拭き取り検体、環境水などからの食中毒原因ウイルスの高感度検出方法が確立すれば、各種ウイルスの汚染経路や感染パターンの解明に繋がり、今後の予防対策に貢献できると期待される。

E. 結論

ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキの中腸腺抽出液に段階希釈したノロウイルス懸濁液を添加する実験系を構築し、その試料中のウイルスを qPCR および ddPCR によって定量した結果、ddPCR 法、特に RT 反応から ddPCR まで One-Step で行う方法が最も検出感度が高いことを明らかにした。これらの結果は、今後の食中毒原因ウイルスの感染制御に向け、有益な方法論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

表1. カキ中腸腺抽出液中ノロウイルスのリアルタイム PCR またはデジタル PCR による検出

検体番号	中腸腺抽出液への ノロウイルス添加 コピー数	qPCR 測定による RNA 抽出液中コピー数	ddPCR 測定による RNA 抽出液中コピー 数	One-Step ddPCR 測 定による RNA 抽出液 中コピー数
QIAcube (中腸腺抽出液 130 μ L + ノロウイルス懸濁液 10 μ L)				
Q-1	None	N. D.	N. D.	N. D.
Q-2	1. 16E+02	N. D.	N. D.	N. D.
Q-3	1. 16E+03	N. D.	60	204
Q-4	1. 16E+04	36	270	654
Q-5	1. 16E+05	507	2, 250	8, 220
Q-6	1. 16E+06	3, 313	11, 700	75, 900
magLEAD 200 (中腸腺抽出液 190 μ L + ノロウイルス懸濁液 10 μ L)				
M1-1	None	N. D.	N. D.	N. D.
M1-2	1. 16E+02	N. D.	N. D.	50
M1-3	1. 16E+03	N. D.	N. D.	75
M1-4	1. 16E+04	7	200	365
M1-5	1. 16E+05	79	700	2, 600
M1-6	1. 16E+06	1, 444	12, 750	39, 600
magLEAD 400 (中腸腺抽出液 380 μ L + ノロウイルス懸濁液 20 μ L)				
M2-1	None	N. D.	N. D.	N. D.
M2-2	3. 32E+02	N. D.	N. D.	50
M2-3	3. 32E+03	N. D.	N. D.	40
M2-4	3. 32E+04	N. D.	175	700
M2-5	3. 32E+05	2. 2	1, 275	5, 050
M2-6	3. 32E+06	2. 6	10, 250	71, 000

qPCR : real-time PCR, ddPCR : droplet digital PCR

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 門屋 俊祐 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、酸沈殿法を適用しビーフェキスを用いたウイルス検出手法の検出感度の向上に成功した。本年度は、野菜表面上に存在するウイルスのより効率的な手法の探索を目的とし、ふきとり法及びパウダリング法によるウイルス検出感度のさらなる効率化を図った。ヒトノロウイルス及び新型コロナウイルスの代替としてマウスノロウイルス及びマウス肝炎ウイルスをカット野菜（キャベツ）に吸着させ、4種のふきとり剤を用いて野菜表面を拭き取り、ふきとり剤からウイルスを回収した。パウダリング法においては、ウイルス吸着野菜を液体窒素存在下ですり潰し、得られた野菜粉末からウイルス RNA を回収した。また、ウイルス吸着野菜を消毒・洗浄し、洗浄後の野菜からのウイルス検出も試みた。その結果、液体窒素を用いたパウダリング法において最もウイルス検出量が高く、また、誤差が小さいことから安定した検出能力を有していることも示された。

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。野菜の摂取による食中毒の例も報告されており、途上国では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との報告もなされている。我が国では、キャベツなどの野菜の供給を海外からの輸入に強く依存しており、ウイルスに汚染された輸入食品を摂取することで輸入感染症が国内で蔓延する可能性がある。ウイルス性食中毒による被害を防ぐためには、食品表面あるいは内部に存在するウイルスを適切に検出する手法が必要である。野菜表面上のウイルス検出として、拭き取り剤及び誘出法が広く適用されているが、対象とするウイルスによっては検出感度の多様性が見られる。

そこで本研究では、野菜表面に付着したウイルス検出法の開発及び検出感度の向上を目的として、種々のふきとり剤とその誘出法、野菜表面からの直接検出法の比較検討を行い、最適な検出手法の決定を目指した。

昨年度は、ビーフェキス誘出法に酸沈殿法を組み合わせることで検出感度の向上に成功したが、

今年度は、野菜表面上からより効率的なウイルス検出手法を決定するために、ふきとり法及びパウダリング法によるウイルス検出量の比較を行なった。検出対象としてノロウイルスの代替であるマウスノロウイルス（MNV）及びエンベロープウイルスの代替指標としてマウス肝炎ウイルス（MHV）を採用し、これら二種のウイルスを野菜表面上に付着させることで、各手法の検出感度を評価した。さらに、カット野菜生産プロセスにおける野菜の消毒・洗浄過程を想定し、消毒・洗浄後のウイルス検出感度の評価も行った。

B. 研究方法

1) ウイルス吸着野菜の準備

MNV 及び MHV を滅菌蒸留水に添加し、両ウイルス濃度が 10^6 及び 10^3 copis/mL となるように高濃度及び低濃度条件のウイルス懸濁液を準備した。このウイルス懸濁液 20 mL に対してカットキャベツ 20 g を添加し、10 分おきに攪拌しながら 1 時間浸漬させた。浸漬後、ウイルス懸濁液を排除し、野菜から水気をよく切った。

2) ふきとり法

拭き取り剤としてレーヨン、コットン、ガラス

繊維、酸化アルミニウム繊維の5種類の素材を採用した。各拭き取り剤をピンセットで掴める程度のサイズに調整し（レーヨン 0.17 g、コットン 0.23 g、ガラス繊維 0.50 g、酸化アルミニウム繊維 0.50 g）、ウイルス吸着野菜を満遍なくこすり、拭き取り剤に吸着させた。RNeasy PowerMicrobiome Kit (QIAGEN 社) を用いて拭き取り剤から RNA を回収した後、RT-qPCR を行なった。

3) パウダリング法

乳鉢内でウイルス吸着野菜を液体窒素により急速に冷凍させ、液体窒素（約 100 mL）を適宜加えながらパウダー上になるまですり潰した。この手法により野菜表面上ウイルスの自然減衰及び野菜由来の有害な酵素活性を抑制することが可能となる。RNA 抽出及び RT-qPCR はふきとり法と同様である。

4) 消毒・洗浄後の野菜表面上ウイルスの検出

カット野菜プロセスにおいて水道水あるいは希釈次亜塩素酸ナトリウム溶液で洗浄されることを想定し、2 mg/L に調整した次亜塩素酸ナトリウム溶液を洗浄水とした。ウイルス吸着野菜をフィルタホルダーにセットし、1L の洗浄水を用いて5分かけて洗浄・消毒処理を行なった。ふきとり法及びパウダリング法を用いて、消毒・洗浄後の野菜からウイルス RNA の回収・定量を行なった。

C. 結果及び考察

ふきとり法及びパウダリング法を用いて野菜表面からのウイルス検出量を比較した。高濃度のウイルス懸濁液に浸漬させた野菜に関して、MNV 及び MHV の検出量は手法間及び素材間で有意な差は見られなかったものの、パウダリング法によって得られた検出量が最も高かった（3.55 及び 6.61 \log_{10} copy/g-野菜）。低濃度条件下では、ふきとり法における MHV の検出量の標準偏差が大きい一方で、パウダリング法では高い定量値及び小さい標準偏差が確認された（ $2.62 \pm 0.2 \log_{10}$ copy/g-野菜）。MNV に関しては高濃度条件と類似した結果が見られた。

洗浄・消毒処理を施した野菜からはパウダリング法において MHV の検出感度が最も高かった（5.13 \log_{10} copy/g-野菜）。一方、MNV の検出感度はレーヨンによるふきとり法及びパウダリング法が高い値を示した（4.30 及び 4.13 \log_{10} copy/g-野菜）。

本実験系は全て3回試行したが、ふきとり法ではカット野菜の拭き取り残しによる偶然誤差の影響が強く、安定した定量値を得るためにはより多くの試行回数が必要になると考えられる。一方、パウダリング法では、野菜からの直接回収により偶然誤差の影響が低減され、パウダー化による表面積の増加によって RNA 抽出溶液への接触機会が増加し、高い検出感度が得られたと考えられる。

E. 結論

野菜表面上からの効率的なウイルス検出手法の探索を行ったところ、最も誤差が小さく且つ高い検出感度を示したパウダリング法が適した手法であることが示された。

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

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

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

アイチウイルスは自然環境中において、二枚貝や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を通しアイチウイルスの環境中の動態を把握することは、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 RT-LAMP 法の開発、および河川水からのアイチウイルス RNA 検出を行った。

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、集団発生および散発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 RT-LAMP 法の開発、実際に河川水からのアイチウイルス RNA の検出を行った。

B. 研究方法

1) 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およびGenotype Aのみを検出可能なプライマーセットを、ソフトウェアPrimer Explorer V5を利用して設計した。コントロールの鋳型としては、

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 RNA増幅試薬キット (RT-LAMP) (栄研化学株式会社)を用い、62℃、60分反応した。白濁の有無を目視で確認し、陽性、陰性を判定した。

2) 河川水からのウイルス RNA 回収

愛知県豊明市の河川 2 か所 (皆瀬川、境川) において、2021 年 9 月から 2022 年 3 月にかけて毎月 1 回、河川水を採集した。河川水 1 リットルに 8% PEG 6000、2.3% NaCl を加え、4℃、16 時間攪拌した後、4℃で 9000×g、30 分遠心し、沈殿を滅菌蒸留水に懸濁した。この懸濁液から、QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen)を用いてウイルス RNA を精製した。ウイルス RNA の検出は、リアルタイム RT-PCR (Kitajima et al., 2013)、および RT-PCR (Yamashita et al., J Clin Microbiol, 2000) により行った。RT-PCR は、Superscript IV One-step RT-PCR System (Invitrogen) および PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (Takara) を用いた。1 回目の PCR は

AV6291F-AV6779Rv のプライマーペア、2 回目の Nested PCR は C94b-246k のプライマーペアで行った。Nested PCR は、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara) を使用した。

C. 研究結果

1) RT-LAMP 法開発の試み

合計 11 のプライマーセットをデザインした。その際、イヌコブウイルスやネココブウイルスなど、身近な動物のコブウイルスの配列と比較し、これらの動物ウイルスを検出しにくいようなプライマーのデザインに留意した。結果として、 10^3 コピーのウイルス RNA を検出可能なプライマーセットが複数得られた。しかし、 10^2 コピーのウイルス RNA の検出はできなかった。

2) 河川水からのウイルス RNA 検出

愛知県豊明市の河川 2 か所 (皆瀬川、境川) で採集したサンプルについて、リアルタイム PCR および RT-PCR の 2 方法により、アイチウイルス RNA の検出を試みた。

①リアルタイム PCR の結果

皆瀬川の 11 月と 1 月、境川の 9~12 月で約 200-450 copies/リットルのアイチウイルス RNA が検出された。

②RT-PCR の結果

One-Step RT-PCR、続けて Nested PCR を行い、PCR 産物が産生されるか調べた。その結果、皆瀬川からは、10 月および 12 から 3 月まで検出された。一方、境川からは一度も検出されなかった。Nested PCR 産物の塩基配列を解析した結果、いずれも Genotype A であった。また、検出されたのは、いずれも Takara のキットで RT-PCR を行った場合であった。

D. 考察

RT-LAMP 法による検出に関して、Genotype A, B 両方検出できるプライマーセットのデザインは、様々な株に対応してすべてを検出しようとするデザインであることに加え、動物コブウイルスを検出しないようなデザインも考えた場合、かなりプライマー設定領域が限られてくることが分かった。結果として本研究でデザインした複数のプライマーセットで、 10^3 コピーのウイルス RNA まで検出できた。アイチウイルスの RT-LAMP 法による検出に関する論文 (Lee et al., Indian J Microbiol, 59:375-378, 2019) で発表されているプライマーセットを利用した RT-LAMP を本研究で行った場合、 10^4 コピーまでしか検出できなかったのも、それよりは感度は高かった。しかし、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) コピーであることを考えると、感度向上にむけた検討の必要があるものと考えられた。

河川水からのウイルス RNA の検出の試みでは、リアルタイム PCR の結果と RT-PCR の結果は一致しなかった (リアルタイム PCR では検出されなかったサンプルから RT-PCR で検出された例も認められた)。この違いに関しては今後検討が必要である。

One-Step RT-PCR でウイルス RNA が検出されたのは、いずれも Takara の PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit で RT-PCR を行った場合であった。このことから、今回用いた One Step RT-PCR 2 キットのうちでは、Takara のキットが検出に適しているものと考えられた。

河川水サンプルを採集した 9 月から 3 月にかけては、感染性胃腸炎症例の増加する冬季を含む。下水調査で、アイチウイルスは、冬季から春季にかけて多くなるとの報告がある (Kitajima et al., Applied Environ Microbiol. 3952-58.

2013)。今回の結果ではそのような傾向は認められなかった。SARS CoV-2 の流行に対する感染対策により、感染性胃腸炎症例が減少していることが関係しているのかもしれない。アイチウイルスの環境中の増減を把握するためには、長期的な調査の継続が必要である。

E. 結論

RT-LAMP法による検出に関して、 10^3 コピーのウイルスRNAまで検出できるプライマーセットを得た。ただし、市販のノロウイルスの検出感度と比較すると劣ることから、感度向上に関する検討の余地が残された。

河川水からのアイチウイルスRNAの検出については、RT-PCR、リアルタイムPCRの2方法でウイルスRNAが検出できた。しかし、両者の結果は一致せず、両方法についてさらなる検討が必要であると考えられた。RT-PCRに関しては、TakaraのPrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kitを用いた場合、より良い結果が得られた。

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

前年度に引き続き、リアルタイム qPCR によるロタウイルスの検出法について、従来の検査で行われていた方法よりも特異性や感度を向上するための検討をおこなった。本年度は、ロタウイルスの NSP3 セグメントおよび NSP5 セグメントに新たなプライマー・プローブを設計して非特異反応の発生頻度について検討したが、従来から利用されている Freeman らが設計したプライマー・プローブセットと比較して大幅な改善は見られなかった。次に、プライマー・プローブの濃度を 0.25 μ M each から様々な濃度に変更して検証したところ、フォワードプライマー 0.4 μ M、リバースプライマー 0.2 μ M、プローブ 0.2 μ M とすることで、従来の方法と比較して、非特異反応の発生頻度がおよそ半減することが判明した。この結果は、ロタウイルスのリアルタイム qPCR 法による検査の精度向上につながると考えられる。

A. 研究目的

本研究では、昨年度までに RNA 抽出方法やリアルタイム qPCR 試薬間の検出効率の比較等について検討を行った。RNA 抽出方法は Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) を用いて DNase 処理をせずに抽出を行うのが最も抽出効率が高く、プライマー・プローブセットについては Jothikumar らのセット (Journal of Virological Methods, 2009, 155(2), 126-131) より Freeman らのセット (Journal of Medical virology, 2008, 80(8), 1489-1496) 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。試薬に関してはどのメーカーの試薬でも大きな違いはないが、本研究では New England Biolabs (NEB) 社の LunaScript RT SuperMix Kit および Luna Universal Probe qPCR Master Mix がわずかながら非特異反応が発生しにくい結果が得られた。

本年度は上記の最適な RNA 抽出法および NEB 社の試薬を用いて、より非特異反応が発生しにくい

プライマー・プローブセットの探索と qPCR 反応条件の検討を行った。

B. 研究方法

ロタウイルスのリアルタイム qPCR 法は上記の通り NEB 社の LunaScript RT SuperMix Kit および Luna Universal Probe qPCR Master Mix を使用した。プライマー・プローブは ThermoFisher Scientific 社 および Integrated DNA Technologies (IDT) 社に依頼して合成した。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、Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) を用いて DNase 処理をせずに RNA を抽出した。

(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 Freeman らが設計したプライマー・プローブのターゲットとなっている NSP3 セグメントの 3' 末端付近にある非常に保存性の高い領域 (90 bp 程度) に、より良いプライマー・プローブを設計できるか検証を行った。フォワードプライマー 3 種、リバースプライマー 3 種、プローブ 6 種を作製してその組み合わせによる非特異反応の発生率を検証したが、いずれも Freeman らのオリジナルのプライマー・プローブセットと比較して、非特異反応が大幅に抑えられることはなかった。

続いて、2種類のタンパク質 (NSP5 および NSP6) をコードしている NSP5 セグメントにおいて保存性の高い領域 (250 bp 程度) があるため、そこに良いプライマー・プローブを設計できるか検証を行った。フォワードプライマー 5 種、リバースプライマー 4 種、プローブ 2 種を作成してその組み合わせによる非特異反応の発生率を検証したところ、Freeman らのオリジナルのプライマー・プローブセットと比較して非特異反応が若干抑えられる組み合わせがあったが、NSP3 をターゲットとする場合より検出感度が若干落ちる (Ct 値が 3 程度高くなる) 傾向が見られた。

次に、プライマー・プローブの濃度を変更することで非特異反応の発生率に違いが見られるか検証を行った。上記の検証はフォワードプライマー、リバースプライマー、プローブの濃度をいずれも $0.25 \mu\text{M}$ で統一していたが、リバースプライマーとプローブの濃度を $0.2 \mu\text{M}$ 、フォワードプライマー濃度を 2 倍の $0.4 \mu\text{M}$ とすることで、非特異反応の発生が大幅に軽減される傾向が見られた。この傾向は Freeman らのオリジナルのプライマー・プローブセットを始め、上記の新たに作製した様々なプライマー・プローブの組み合わせでも同様に見られた。検証に用いるサンプルによって非特異反応の発生率にバラツキが見られるが、本研究で用いた約 50 検体のロタウイルス陰性サンプルの場合では、従来のプライマー・プローブの濃度 ($0.25 \mu\text{M}$ each) では 20~25% のサンプルで非特異反応が見られていたが、濃度を変更

($0.4 \mu\text{M}$ 、 $0.2 \mu\text{M}$ 、 $0.2 \mu\text{M}$) することにより、12% 程度まで軽減された。(これらのサンプルには非特異反応が出やすいサンプルを意図的に含めているので、実際の調査時の発生率を反映しているとは限らない。) また、アニーリング+伸長反応は、 60°C より 56°C で行った方が、非特異反応が軽減された。

D. 考察

プライマー・プローブの濃度を変更することで非特異反応の発生が軽減されるメカニズムについては詳細には解明されていない。Freeman らのオリジナルのプライマー・プローブセットの場合は、ウイルス遺伝子におけるフォワードプライマー結合部位の配列が遺伝子型によって異なるため、フォワードプライマー 20 塩基中に混合塩基が 3 つ入っている (8 番目に W、12 番目に R、14 番目に R)。つまり、ウイルスの塩基配列に対して 100% 相補的なプライマーは、理論的には添加されたフォワードプライマーの内の $1/8$ ($1/2 \times 1/2 \times 1/2$) に過ぎない。従って、フォワードプライマーの濃度をリバースプライマーおよびプローブの倍量添加することで、PCR 反応の特異性や増幅効率が改善している可能性が考えられる。しかし、フォワードプライマーの濃度を $0.6 \mu\text{M}$ 、 $0.8 \mu\text{M}$ と増加させても、非特異反応が軽減されることはなく、 $0.4 \mu\text{M}$ が至適濃度であると考えられた。

本研究により、ロタウイルスのリアルタイム qPCR 検出法において現行法よりも非特異反応を軽減させる方法が見いだされた。新たに作製したプライマー・プローブセットの中には Freeman らのプライマー・プローブセットよりわずかに良い結果が得られたものもあるが、大きな差ではないため、地方衛生研究所等における検査業務に混乱を来たさないためには、従来から広く利用されている Freeman らのプライマー・プローブセットの利用を続けるのが無難であると考えられる。今後、各地方衛生研究所でも「濃度を変更することにより非特異反応が軽減される」現象の再現性が確認できれば、検査マニュアル等に反映させていく予

定である。

E. 結論

現在、ロタウイルスのリアルタイム qPCR 検出法において、幅広い遺伝子型を高い特異性で検出する最適な方法は、Freeman らが設計したプライマー・プローブセット（フォワードプライマー：ACCATCTWCACRTRACCCTC、リバープライマー：GGTCACATAACGCCCTATA、ダブルクエンチャープローブ：ATGAGCACAAATAGTAAAAGCTAACACTGTCAA）を用い、それぞれの終濃度を $0.4\mu\text{M}$ 、 $0.2\mu\text{M}$ 、 $0.2\mu\text{M}$ とし、アニーリング+伸長反応は 56°C で行うものである。

G. 研究発表

論文発表

(英文)

1. 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.* 2021 Apr;102(4).
2. Hayashi T, Murakami K, Hirano J, Fujii Y, Yamaoka Y, Ohashi H, Watashi K, Estes MK, Muramatsu M: Dasabuvir Inhibits Human Norovirus Infection in Human Intestinal Enteroids. *mSphere.* 2021 Nov 3;6(6):e0062321.

(和文)

1. 藤井克樹：特集 ウイルス研究に進歩をもたらした新しい技術 ウイルス遺伝子の網羅的解析：1) 次世代シーケンサー 臨床とウイルス 2022, 50(1), 30-36

学会発表

1. 藤井克樹、津川毅、中田修二、村松正道：札幌市において小規模な流行を起こしたロタウイルス G12 株の全遺伝子解析 (Full-genome analysis of rotavirus G12 strains that caused a small epidemic in Sapporo) 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2021 年 11 月 16-18 日

2. 津川毅、藤井克樹、赤根祐介、本庄紗帆、近藤謙次：ウシ由来ロタウイルス G15 株のヒト初感染例の分子的特徴 (Molecular characterization of the first human G15 rotavirus strain of zoonotic origin from the bovine species) 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2021 年 11 月 16-18 日

3. 林豪士、村上耕介、平野順紀、藤井克樹、山岡曜子、大橋啓史、渡士幸一、Mary Estes、村松正道：Screening of an antiviral compound library identifies dasabuvir as a novel anti-human norovirus inhibitor 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2021 年 11 月 16-18 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

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。

殻から取り出したシジミにGII.4ノロウイルスをマイクロシリンジで接種した後、90℃の熱湯中で1、2、3、4分間加熱した。加熱処理したシジミはホモジナイズした後に遠心分離を行い、上清をウイルス抽出液として腸管オルガノイドに接種した。感染24時間後のウイルスコピー数をリアルタイムPCRで解析したところ、非加熱サンプルでは42.5倍のウイルス増殖が認められたが、加熱サンプルでは1分間の加熱でウイルスが検出限界以下となった。

本研究では、シジミから抽出したノロウイルスが腸管オルガノイドに感染すること、90℃・1分間の加熱で感染性が失われることを「直接的」に示した。得られた技術及び知見は、二枚貝中ノロウイルスの不活化方法の開発に活用されることが期待される。

A. 研究目的

ノロウイルスは急性胃腸炎の主要病原体で、大規模食中毒事例を引き起こすことから食品衛生上で重要である。しかし近年まで感受性細胞が見つかっていなかったことから、不活化条件の知見はマウスノロウイルス等の培養可能な近縁ウイルスの研究に依存していた。本研究分担者らのグループは、腸管オルガノイドを用いたノロウイルス培養系を確立し、加熱（60℃、15分）によりウイルスの感染性が失われることを示した。しかし、この系では接種用の10%ノロウイルス溶液を直接加熱していたため、食品中ウイルスの不活化条件設定には即していなかった。そこで本研究では、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モデル食品として用いるこ

とで、加熱によるウイルス不活化条件の特定を目指した。

B. 研究方法

本年度は、シジミを90℃の熱湯中で加熱することを想定した試験を実施した。あらかじめ温浴およびシジミ内部の温度変化を5分間まで15秒ずつ測定した。加熱試験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（290 ± 70 mg）を1.5 mL チューブに入れ、GII.4 ノロウイルス 1.06×10^8 コピー/30 μ L をマイクロシリンジで接種した後、90℃の温浴で1、2、3、4分間加熱処理した。加熱前のウイルス接種シジミを0分間加熱処理サンプルとした。各シジミを培地中でホモジナイズした後、遠心分離（9,100 xg、3分間）により残渣を

取り除いた。上清をウイルス抽出液として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、ウイルス抽出液に含まれるノロウイルスを同様にリアルタイム PCR で解析することでウイルス回収率を算出した。

なお本研究で用いた腸管オルガノイドはベイラー医科大学が樹立したものを、国立感染症研究所人を対象とする生命科学・医学系研究倫理審査委員会からの承認を受け、MTA を締結した上でウイルス第二部に譲渡されたものを使用した。

C. 研究結果

90°C に設定した温浴およびシジミ内部の温度を継時的に測定したところ、シジミ内部が 90°C に達するまで 2 分間を要した。この結果を考慮し、GII.4 ノロウイルスを接種したシジミを 90°C で 0、1、2、3、4 分間加熱した。各シジミから調製したウイルス抽出液を腸管オルガノイドに接種したところ、未加熱サンプルでは感染 24 時間後に 42.5 倍のウイルス増殖が見られた。一方、1-4 分間加熱サンプルでは全てでウイルス増殖が認められなかった。ウイルス回収率は、未加熱サンプルで 62.0 ± 7.3%、1 分間加熱サンプルで 27.7 ± 15.9% であったが、2-4 分間加熱サンプルでは 11~12% であった。

D. 考察

本年度は 90°C で温度を固定した検証を行ったが、例えば 60°C など異なる温度での加

熱を含めた条件についても検証が必要である。本研究ではシジミをモデル食材とした試験を実施したが、得られた技術及び知見を応用させることにより、生食が行われるカキを対象とする検証が行われることが期待される。一方で、実際の汚染食品中には数コピー程度のウイルス量しか含まれないことが多いが、本研究では検出限界値を 20 コピー/反応溶液として設定していることから、本系を実用化するためには検出感度の改善が求められる。

E. 結論

シジミから抽出したノロウイルスが腸管オルガノイドに感染すること、90°C・1 分間の加熱で感染性が失われることを「直接的」に示した。得られた技術及び知見は、二枚貝中ノロウイルスの不活化方法の開発に活用されることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hayashi T, Yamaoka Y, Ito A, Kamaishi T, Sugiyama R, Estes MK, Muramatsu M, Murakami K. Evaluation of heat inactivation of human norovirus in fresh-water clams using human intestinal enteroids. *Viruses*. Accepted (2022).

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
鈴木亮介、 李天成、塩田智之	E型肝炎ウイルスの感染増殖系		「創薬研究者がこれだけは知っておきたい最新のウイルス学」	技術情報協会		2021	25-31

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
Sun L, Li Y, Misumi I, González-López O, Hensley L, Cullen JM, McGivern DR, Matsuda M, Suzuki R, Sen GC, Hirai-Yuki A, Whitmire JK, Lemon SM.	IRF3-mediated pathogenicity in a murine model of human hepatitis A.	PLoS Pathog.	17(9):e1009960.		2021
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.	102(4)		2021
Hayashi T, Murakami K, Hirano J, Fujii Y, Yamaoka Y, Ohashi H, Watashi K, Estes MK, Muramatsu M	Dasabuvir inhibits human norovirus infection in human intestinal enteroids.	mSphere	6(6)	e0062321	2021
Hayashi T, Yamaoka Y, Ito A, Kamaishi T, Sugiyama R, Estes MK, Muramatsu M, Murakami K.	Evaluation of heat inactivation of human norovirus in freshwater clams using human intestinal enteroids.	Viruses.	Accepted		2022
藤井克樹	特集 ウイルス研究に 進歩をもたらした新しい技術 ウイルス遺伝子の網羅的解析: 1) 次世代シーケンサー	臨床とウイルス	50(1)	30-36	2022

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3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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。

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3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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。

機関名 藤田医科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 湯澤 由紀夫

次の職員の 令和3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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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3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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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3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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。