

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等の汎用性を備えた検査法と
制御を目的とした失活法の開発のための研究 (22KA1001)

令和4年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上間 匡
令和5年(2023)5月

別紙 2

目次

I. 総括研究報告	……………3
食中毒原因ウイルス等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした失 活法の開発のための研究	上間匡
II. 分担研究報告	
1. パンソルビン・トラップ法による食品からのウイルス検出法に関する検討	上間匡 ……11
2. 食品からのウイルス検出法への NGS の導入に関する検討	元岡大祐……………16
3. ノロウイルス等の検出・不活化評価のための研究	吉村和久……………20
4. ノロウイルスの疫学動向の解析	木村博一……………24
5. 米国および英国における食中毒事件発生時のウイルス検査に関する調査	窪田邦宏……………27
6. ノロウイルス、サポウイルスの不活化条件に関する情報収集	上間匡 ……35
7. 腸管オルガノイドを用いた HuNoV 増殖系によるウイルス不活化条件の検討	村上耕介……………40
8. ヒトノロウイルスの in vitro 増殖系を用いたウイルス不活化条件の検討	佐藤慎太郎……………43
9. 食品等従事者における上気道飛沫中のノロウイルスの調査	岡智一郎……………47
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	……………52
IV. 倫理審査報告書の写し	……………55

別紙 3

令和 4 年度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等の汎用性を備えた検査法と
制御を目的とした失活法の開発のための研究」

総括研究報告書

研究代表者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
研究分担者	窪田 邦弘	国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部
	岡 智一郎	国立感染症研究所 ウイルス第二部
	村上 耕介	国立感染症研究所 ウイルス第二部
	元岡 大祐	大阪大学 微生物病研究所
	佐藤慎太郎	和歌山医科大学 薬学部
	木村 博一	群馬パース大学大学院 保健科学研究科
	吉村和久	東京都健康安全研究センター
研究協力者	高橋 知子	岩手県環境保健研究センター 保健科学部
	水越 文徳	栃木県保健環境センター 微生物部
	本谷 匠	茨城県衛生研究所 ウイルス部
	八尋 俊輔	熊本県保健環境科学研究所
	貞升 健志	東京都健康安全研究センター 微生物部
	長島 真美	東京都健康安全研究センター ウイルス研究科
	浅倉 弘幸	東京都健康安全研究センター ウイルス研究科
	斎藤 博之	秋田県健康環境センター 保健衛生部
	秋野和華子	秋田県健康環境センター 保健衛生部
	坂上亜希恵	宮城県保健環境センター 微生物部
	左近 直美	大阪健康安全基盤研究所
	植木 洋	株式会社 日本環境衛生研究所
	花田 三四郎	群馬パース大学 医療技術学部 臨床工学科
	倉井 大輔	杏林大学 医学部 総合医療学教室（感染症科）
	林 豪士	国立感染症研究所 ウイルス第二部
	高木 弘隆	国立感染症研究所 安全実験管理部
	遠矢 真里	国立医薬品食品衛生研究所
	天沼 宏	国立医薬品食品衛生研究所
	田村 克	国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

国内で発生する食中毒事件・患者の報告

数は、この 20 年で事件数は H16 年の 1600
件超をピークに R3(2021)年は 700 件、

R4(2022)年は960件と約半減し、患者数もH18年の四万人弱からR4(2022)年の6800人へと大きく減少している。とくにR1(2019)年12月に発生した新型コロナウイルス感染症のパンデミック発生をうけて、飲食店の営業自粛等に伴う外食機会減少により、R2-4(2020-22)年の食中毒患者数を大きく減少させた。

ノロウイルスを原因とする食中毒事件数はH27年の500件をピークにR2-4(2020-2022)年は100件以下を維持し、大きく減少しているものの、患者数は依然として全体の食中毒患者数の約3-5割近くを占めているほか、R3(2021)年4月に2545名、R2(2020)年12月に559名、H30(2018)年に550名など、大規模な食中毒事件は引き続き発生しており、食品衛生においてノロウイルス対策は依然として大きな課題である。

ノロウイルスによる食中毒の発生を防ぐためには、HACCPの考え方にもとづき、次の2つが重要となる。

1. 食中毒発生時に原因物質の特定とともに、原因となった食品および汚染経路の特定により、効果的な食品汚染防止策を示すこと、
2. ノロウイルスによる食中毒の多くが食品取り扱い現場において従事者による食品汚染が原因と推定されることから、食品製造時の調理条件や食材の洗浄、さらに従事者の手指等や調理環境にもちいる消毒剤などによる不活化条件を示すこと

しかしながら、現状では食中毒の原因と推定される食品は非常にバラエティにとんでおり、検査担当者は様々な食品に対応する必要があること、さらに細菌と異なり食

品中でウイルスが増殖しないため、食品からの微量のウイルスの検出そのものが非常に難しいことなどがあり、さまざまな食品に対応可能な汎用性の高い食品処理法が求められている。

また、食品の製造工程や食品取り扱いの環境において、ノロウイルス等の対策を取る必要があるが、これまでノロウイルスの実用的な培養系が存在しなかったため、直接的なノロウイルスの不活化条件が提示できないという課題があった。

本研究班では、上記の2つの課題に対して、汎用性の高い食品からのウイルス検出法の整備、および食品取り扱い現場で実施可能なウイルスの制御のための具体的なノロウイルスの不活化条件等の提示を目的とする。

B. 研究方法

1. 検査法の整備

1-1. 食品からのウイルス検査法の整備・公開（分担；上間、吉村、遠矢、木村、元岡、協力；検査機関）

1年目. 食中毒事件において一般食品からのHuNoV検出に対応可能なパンソルビントラップ法やA3T法などの食中毒事例において、食品からウイルス検出の実績のある食品処理法、およびnestedリアルタイムPCR法など遺伝子検出の高感度化、Dual Typing等の新規遺伝子解析法など最新情報にもとづいた検査法の整備に向けた知見を収集し、多機関参加による検証作業手順の策定を行う。1-2年目にかけて遺伝子型による検出感度の差に対応するプライマー配列、試薬入手性や検査感度の確認、検査時の陽性コントロールや検量線の精度検証

などを実施する。

2年目. 地方衛生研究所や登録検査機関参加のもと検査法コラボスタディを実施し、実行性確認を行う。

3年目. 研究期間を通して食中毒事例対応時の検査法の実態など国際情報の収集を実施し、国際動向を反映した食品からのウイルス試験法として提示する。

1-2. 小規模 NGS を利用した食品検査法の開発 (分担 ; 元岡、上間、吉村、協力 ; 検査機関)

プライマー配列に由来する遺伝子型ごとの検出感度の差にも対応可能と考えられる NGS による網羅的な食品中ウイルス検索手法の開発を行う。

1-2年目. 1-1. にて実施する検査法検証および、食中毒検査等で得た処理後検体由来の核酸について Hi-Seq 等 NGS によるメタゲノム解析を通じて食品由来夾雑物を把握する。また、これまでに上間らが構築したローカルブラストソフトを改訂する。

3年目. NV を含む種々の食中毒原因ウイルス迅速同定のための食品検査への NGS 導入に向け、導入費用の負担がなく少数検体を解析可能な Nanopore シーケンサ使用に適した食品処理および RNA 等抽出法などの手法を構築する。

以上の検討を通じ、汎用性が高く、少数検体に対応可能なウイルス検査法を提示でき、従来の PCR 法では原因特定に至らなかった食中毒事件の迅速な原因特定につながる。

2. ウイルスの制御

2-1. NV 失活条件および手法の提示 (分担 ; 村上、佐藤、岡、上間、吉村)
海外で利用されるヒト腸管組織オルガノイ

ドおよび佐藤ら (Sato et al, 2019) が国内で確立したヒト iPSC 由来腸管上皮細胞による HuNoV 培養系を用いて感染能を指標とした不活化評価を国際的な試験規格を参考に実施する。

1-2年目. 加熱、食品添加物として認可されるアルコール、次亜塩素酸 Na、亜塩素酸水や電解水等のほか、COVID-19 対応に向けて NITE が公開した製剤成分等を対象とした直接的な評価を行った上で、カキをはじめとする二枚貝を含めた様々な食品中での HuNoV の不活化条件定量法を検証・確立する。

3年目. 事業者における HACCP 制度化への対応を念頭に、食品等事業者施設における実行可能なウイルス対策の具体的条件等の科学的データ提示を行う。

2-2. 食品等従事者における上気道飛沫中 NV の調査 (分担 ; 岡、上間、協力 ; 検査機関)

HuNoV は胃腸炎ウイルスであり、食中毒発生要因としては調理従事者の糞便・嘔吐物由来の食品汚染が主と想定されてきたが、近年の疫学解析により胃腸炎症状の有無によらず、鼻腔咽頭ぬぐい液からも HuNoV が検出されることが明らかとなりつつある背景のもと、調理従事者の上気道飛沫による HuNoV 汚染の可能性について調査を実施する。

1年目. 唾液中の NV 検査法を構築する。

1-3年目. 1年目冬季より民間臨床検査機関の協力のもと、食品取扱者を対象に実態調査を行う。食中毒事例発生時には自治体の協力を得て同様の調査を行う。調査結果を踏まえ、便以外の新規汚染経路の存在と重要性が明らかとなった場合には、HuNoV

食中毒発生抑制に向け、マスク等による HuNoV 拡散予防の必要性を解析し、得られた情報を厚生労働省担当官に共有し、啓発のための資料作成に協力する。

C. 研究の進捗状況

1. 検査法の整備

1) パンソルビン・トラップ法に関する検討（上間）

- ・パンソルビン・トラップ法に用いる試薬の入手性は良好であった。
- ・冷凍ベリーの処理の際は、pH9.0 以上の食品洗浄液が効果的であった。
- ・塩おにぎり、食パン、刻みのりの食品処理手順について確認した。
- ・Mengovirus が工程管理に不適であることが明らかとなった。
- ・秋田県で 2019-2022 年度に発生したウイルス性食中毒 7 事件において食品検体 83 検体のうち 7 検体からパンソルビン・トラップ法にてノロウイルスを検出した。

2) A3T 法による食中毒事例における食品からのウイルス検出（吉村）

- ・東京都内で 2021.4-2022.11 に発生した食中毒事例で搬入された 307 事例について検査を実施した。46 事例からノロウイルスを検出した。
- ・食品検体 207 検体について A3T 法でウイルス検出を試みたが、検出できなかった。

3) 食品からのウイルス検査法への NGS 導入に関する検討（元岡）

- ・食品へのウイルス添加回収試験について、パンソルビン・トラップ法で得られた核酸抽出物を NGS によってメタゲノム解析を実施した。
- ・食品検査についてメタゲノム解析が実施

できる可能性は十分あることが示された。

4) ノロウイルスの疫学動向の解析（木村）

- ・国内における 2018-2022 年のノロウイルスの遺伝子群、遺伝子型は GII が GI より多く検出されていた。
- ・GI.2, GI.3, GI.4, GI.7 が検出報告されていた。
- ・GII.2, GII.4, GII.6, GII.17 が多く検出報告されていた。
- ・主要流行株は GII.4 から GII.2, GII.17 と変遷している。

5) 米国・英国の食中毒発生時のウイルス検査に関する調査（窪田）

- ・食中毒事件対応における食品検査の実施状況について米国・英国から聞き取り調査を行った。
- ・米国・英国では食中毒発生時に食品検査を必ずしも実施していなかった。
- ・米国、欧州では「食品取り扱い従事者にノロウイルス感染が確認された場合、症状消失から 48 時間待機後に仕事に復帰する」という推奨事項があった。

2. ウイルスの制御

1) ノロ・サポウイルスの不活化条件に関する調査（上間）

- ・ノロウイルス、サポウイルスに対する不活化条件について文献調査を実施した。
- ・HACCP にもとづくウイルス対策として衛生管理を実施するには、科学的なデータはまだ少ない状況であった。

2) 腸管オルガノイドを用いたヒトノロウイルス不活化条件の検討（村上）

- ・ノロウイルス培養系に用いる糞便検体の入手体制を整えた。
- ・シジミをモデルとした食品中のノロウイ

ルス不活化に検討を進めた。

3) iPSC 由来腸管上皮細胞を用いたヒトノロウイルス不活化条件の検討 (佐藤)

- ・ノロウイルス培養系に用いる iPSC 由来腸管上皮細胞のロット選定をおこなった。

- ・ノロウイルス培養系に用いる遺伝子型を GII.4 シドニーを基本とすることを決定した。

- ・他の遺伝子型についても検討を進めることとした。

4) 食品従事者等における上気道飛沫中のノロウイルスの調査 (岡)

- ・調理従事者等からの食品のウイルス汚染経路として唾液の可能性が示唆される報告がされている。

- ・食品取り扱い事業者を対象に唾液中のノロウイルスの実態調査を実施した。

- ・今年度は 304 検体について唾液の調査を実施したが、ノロウイルスは検出されなかった。

- ・地方衛生研究所の協力のもと、集団胃腸炎事例において糞便・唾液中のノロウイルス検出を試みた。

D. 政策等への活用または実用化に向けた取り組み

高感度で汎用性の高いウイルス検出法が示されることで、食中毒事件に対応する地方衛生研究所や民間検査会社において、食品からのノロウイルス検査の標準法として利用され、食中毒事件の原因究明につながるほか、汚染経路等の知見の集積は、ウイルス性食中毒の未然防止、公衆衛生の向上に繋がる。またノロウイルスに限らずさまざまな食品由来ウイルスを網羅的に検出可能なメタゲノム解析手法構築は、食中毒発生時の迅速な原因究明手法となる。

本研究では H10 や iPSC 由来腸管細胞を用いてヒトノロウイルスの感染・増殖能力を

直接評価し、不活化条件にかかる科学的エビデンスを示し、現行の代替ウイルスによる不活化条件に対する確実性を高めることとなる。本研究成果は客観的な科学的エビデンスを有する食中毒原因ウイルス制御方法として HACCP の考え方に基づいた食品取り扱い事業者に向けた各種ガイドラインへ反映可能であり、HACCP 制度化に対応したウイルス対策へつながる。

E. 健康危険情報

ノロウイルスの新規汚染経路に関する調査結果を踏まえ、便以外の新規汚染経路の存在と重要性が明らかとなった場合には、ノロウイルス食中毒発生抑制に向け、マスク等によるノロウイルス拡散予防の必要性を解析し、得られた情報を厚生労働省担当官に共有し、啓発のための資料作成に協力する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Doan YH, Yamashita Y, Shinomiya H, Motoya T, Sakon N, Suzuki R, Shimizu H, Shigemoto N, Harada S, Yahiro S, Tomioka K, Sakagami A, Ueki Y, Komagome R, Saka K, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Mizukoshi F, Arita Y, Haga K, Katayama K, Kimura H, Muramatsu M, Oka T. Distribution of Human Sapovirus Strain Genotypes over the last four Decades in Japan: a Global Perspective. *Jpn J Infect Dis.* 2023 Mar 31. doi: 10.7883/yoken.JJID.2022.704. Online ahead of print.

2. Watanabe K, Oka T, Takagi H, Anisimov S, Yamashita SI, Katsuragi Y, Takahashi M, Higuchi M, Kanki T, Saitoh A, Fujii M. Myeloid-associated differentiation marker is an essential host factor for human parechovirus PeV-A3 entry. *Nat Commun.* 2023 Mar 31;14(1):1817. doi: 10.1038/s41467-023-37399-8.
3. Li T-C, Kataoka M, Doan YH, Saito H, Takagi H, Muramatsu M, Oka T. Characterization of a Human Sapovirus Genotype GII.3 Strain Generated by a Reverse Genetics System: VP2 Is a Minor Structural Protein of the Virion. *Viruses.* 2022 Jul 27;14(8):1649. doi: 10.3390/v14081649.
4. Miyazaki N, Song C, Oka T, Miki M, Murakami K, Iwasaki K, Katayama K, Murata K. Atomic Structure of the Human Sapovirus Capsid Reveals a Unique Capsid Protein Conformation in Caliciviruses. *J Virol.* 2022 May 11;96(9):e0029822. doi: 10.1128/jvi.00298-22.
5. Takagi H, Oka T, Ami Y, Suzaki Y, Saito H. A Human Intestinal Cell Line Suitable for the Propagation of Human Parechovirus Type 1 to 6 with a Clear Cytopathic Effect. *Jpn J Infect Dis.* 2022 May 24;75(3):318-321. doi: 10.7883/yoken.JJID.2021.534.
6. Yuki Y, Zuo F, Kurokawa S, Uchida Y, Sato S, Sakon N, Hammarström L, Kiyono H, Marcotte H. Lactobacilli as a Vector for Delivery of Nanobodies against Norovirus Infection. *Pharmaceutics.* 2022 Dec 25;15(1):63. doi:10.3390/pharmaceutics15010063.
7. Nurdin JA, Kotaki T, Kawagishi T, Sato S, Yamasaki M, Nouda R, Minami S, Kanai Y, Kobayashi T. N-Glycosylation of Rotavirus NSP4 Protein Affects Viral Replication and Pathogenesis. *J Virol.* 2023 Jan 31;97(1):e0186122. doi: 10.1128/jvi.01861-22.
8. Masuda A, Man Lee J, Miyata T, Sato S, Masuda A, Taniguchi M, Fujita R, Ushijima H, Morimoto K, Ebihara T, Hino M, Kakino K, Mon H, Kusakabe T. High yield production of norovirus GII.4 virus-like particles using silkworm pupae and evaluation of their protective immunogenicity. *Vaccine.* 2023 Jan 16;41(3):766-777. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.12.015.
9. Hoque SA, Kotaki T, Pham NTK, Onda Y, Okitsu S, Sato S, Yuki Y, Kobayashi T, Maneekarn N, Kiyono H, Hayakawa S, Ushijima H. Abundance of Viral Gastroenteritis before and after the Emergence of COVID-19: Molecular Evidence on Wastewater. *J Infect.* 2023 Feb;86(2):154-225.

- doi: 10.1016/j.jinf.2022.11.007.
10. Noguchi M, Shimizu M, Lu P, Takahashi Y, Yamauchi Y, Sato S, Kiyono H, Kishino S, Ogawa J, Nagata K, Sato R. Lactic acid bacteria-derived γ -linolenic acid metabolites are PPAR δ ligands that reduce lipid accumulation in human intestinal organoids. *J Biol Chem.* 2022 Nov;298(11):102534. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102534.
 11. Takahashi Y, Noguchi M, Inoue Y, Sato S, Shimizu M, Kojima H, Okabe T, Kiyono H, Yamauchi Y, Sato R. Organoid-derived intestinal epithelial cells are a suitable model for preclinical toxicology and pharmacokinetic studies. *iScience.* 2022 Jun 7;25(7):104542. doi: 10.1016/j.isci.2022.104542.
 12. Pham NTK, Nishimura S, Shimizu-Onda Y, Trinh QD, Komine-Aizawa S, Khamrin P, Okitsu S, Sato S, Kobayashi T, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Emerging norovirus GII.4 Sydney[P31] causing acute gastroenteritis outbreak in children in Japan, during COVID-19, 2021. *J Infect Chemother.* 2022 Sep;28(9):1347-1351. doi: 10.1016/j.jiac.2022.05.015.
 13. Kimura Y, Shin J, Nakai Y, Takahashi M, Ino Y, Akiyama T, Goto K, Nagata N, Yamaoka Y, Miyakawa K, Kimura H, Ryo A. Development of Parallel Reaction Monitoring Mass Spectrometry Assay for the Detection of Human Norovirus Major Capsid Protein. *Viruses.* 2022 Jun 28;14(7):1416. doi: 10.3390/v14071416.
 14. Honjo S, Kuronuma K, Fujiya Y, Nakae M, Ukae S, Nihira H, Yamamoto M, Akane Y, Kondo K, Takahashi S, Kimura H, Tsutsumi H, Kawasaki Y, Tsugawa T. Genotypes and transmission routes of noroviruses causing sporadic acute gastroenteritis among adults and children, Japan, 2015-2019. *Infect Genet Evol.* 2022 Oct;104:105348. doi:10.1016/j.meegid.2022.105348.
 15. Masashi Uema, Kenzo Yonemitsu, Yoshimasa Sasaki, Hiroshi Asakura. Detection of hepatitis E virus RNA from pig bile collected at a slaughterhouse in Japan[J]. *AIMS Microbiology*, 2022, 8(4): 566-574.
 16. 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* 14(5) 2022年5月10日.
 17. 矢尾板 優、長谷川道弥、浅倉弘幸、永野美由紀、林 志直、根岸 あかね、河上麻美代、林 真輝、山崎 貴子、黒木絢士郎、磯貝まや、北村 有

- 里恵、加來英美子、藤原卓士、鈴木淳、三宅啓文、長島真美、貞升健志：東京都内で検出されたノロウイルスの遺伝子解析（2021年度）、東京健安研七年報、73、123-130、2022
18. 永野美由紀、浅倉弘幸、矢尾板 優、鈴木 愛、磯貝 まや、藤原卓士、根岸あかね、河上麻美代、伊藤 仁、黒木絢士郎、横田翔太、北村有里恵、加來英美子、長谷川道弥、三宅啓文、千葉隆司、鈴木 淳、長島真美、貞升健志：東京都の感染症発生動向調査事業における感染性胃腸炎のウイルス検出状況（2019年度～2021年度）、東京健安研七年報、73、101-107、2022
2. 学会発表
1. 非胃腸炎症例の咽頭拭い液からの下痢症ウイルス検出. 岡智一郎、高木弘隆、斎藤博之. 第63回日本臨床ウイルス学会 2022. 6.
2. 汎用細胞増殖系を活用した下痢症ウイルスの浄水処理性の評価. 白崎伸隆、胡秋吟、白川大樹、高木弘隆、岡智一郎、松下拓、松井佳彦. ウイルス性下痢症研究会第33回学術集会, 2022. 11.
3. ヒトサポウイルス研究加速のための遺伝子型網羅的リソース確立に向けた取り組み. 岡智一郎、李天成、米満研三、網康至、須崎百合子、中村（桶本）優子、片岡紀代、団海燕、三田哲朗、小林孝行、斎藤博之、八尋俊輔、佐藤重紀、柴田伸一郎、塚田竜介、高木弘隆. 第69回日本ウイルス学会、2022. 11.
4. 佐藤 慎太郎、「ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いたヒトノロウイルス増殖系の確立」、和歌山医学会、2022年7月3日、和歌山
5. 佐藤 慎太郎、「ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いたヒトノロウイルス増殖系の確立とその応用」、第96回日本細菌学会、2023年3月16日、兵庫
6. 浅倉弘幸、永野美由紀、矢尾板 優、鈴木 愛、磯貝まや、藤原卓士、三宅啓文、長島真美、貞升健志、日本食品衛生学会第118回学術講演会、2022年11月10日（木）～11月11日（金）（長崎）
7. 村上耕介、林豪士、山岡曜子、伊藤篤、釜石隆、杉山隆一、Mary K. Estes, 村松正道. ヒト腸管オルガノイドを用いたシジミ中ヒトノロウイルスの感染性評価. 第69回日本ウイルス学会学術集会（長崎）2022年11月
8. 食品のノロウイルス汚染検出法としてのパンソルビン・トラップ法の有用性の検討 斎藤博之、秋野和華子、野田衛、上間匡. 日本ウイルス学会、2022. 11. 長崎
- G. 知的財産の出願・登録状況
なし

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等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした失活法の
開発のための研究」
分担研究報告書

パンソルビン・トラップ法による食品からの
ウイルス検出法に関する検討

研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	斎藤 博之	秋田県健康環境センター
	秋野 和華子	秋田県健康環境センター

研究要旨

ノロウイルスによる食中毒事件発生時に、原因食品を特定することは汚染経路の解明など行政処分等の科学的な根拠となるほか、食中毒の未然防止のための具体的対策へ寄与することになる。

食中毒の原因となるウイルスは基本的に食品中で増殖しないため、食品に含まれるごく微量のウイルスを検出する必要があること、ノロウイルスをはじめとする食中毒にはさまざまな食品が関与することから、汎用性の高い食品検査法の整備は重要な課題である。

本研究では食中毒事件で実施される食品からのノロウイルス検出における汎用性の高い食品処理法としてパンソルビン・トラップ法について、現在の試薬入手性や、実施手順の確認を、冷凍ベリーや食パンなどいくつかの食品に対してウイルスの添加回収実験により確認した。

A. 研究目的

食中毒発生時の食品検査において、ノロウイルス等の原因ウイルスの検出率向上は、食中毒事件において行政処分等への科学的根拠となるほか、食中毒未然防止のための具体的対策へ寄与することが期待される。

一方で、ノロウイルス等による食中毒事件では、調理従事者からの汚染により、多種多様な食品が汚染される可能性があり、食品検査に供される食品のバリエーティ

が広く、食品処理には高い汎用性が求められる。

また、食品中に含まれる原因ウイルスは細菌と異なり食品中では増殖しないためごく微量のウイルスを回収、検出するという感度の高さも同時に求められる。

汎用性の高さ、高い検出感度の両者をそなえた食品の処理法として、パンソルビン・トラップ法(食品衛生検査指針 微生物編 2018年、Hiroyuki Saito, et al., Food and Environmental Virology, 7(3), 239-

248, 2015) を厚労省研究班にて開発したが、本法の現時点での試薬入手性や、さまざまな食品への対応を想定した添加回収実験を実施し、改善点の確認を行った。

また、秋田県にて 2019 (令和元年) 年から 2022 年 (令和 4 年) の間に発生したウイルス性食中毒事件においてパンソルビン・トラップ法にて食品からノロウイルスを検出した実績について調査した。

B. 研究方法

1. パンソルビン・トラップ法の手順等確認

1) 食品検体

市販の冷凍ベリー、塩おにぎり、食パン、刻みのりを用いた。

2) 添加ウイルス

ノロウイルス GI、GII、A 型肝炎ウイルス、および Mengovirus を添加回収用ウイルスとして用いた。各食品 10g に 10^5 コピー程度のウイルスを添加した。

3) 試薬類

- ・パンソルビン (メルク 507861-50ML)
- ・ヒトガンマグロブリン (HDM Labs 140103)
- ・RNA 抽出試薬 (QIAGEN QIAamp viral RNA mini kit 52906))
- ・1 Step RT-qPCR 試薬 (Thermofisher Scientific TaqMan™ Fast virus 1 step master mix 4444432)

2. パンソルビン・トラップ法の実績

秋田県健康環境センターにて令和 1-4 年に実施したウイルス性食中毒における食品検査での、パンソルビン・トラップ法によるノロウイルス検出の実績について情

報提供を受けた。

C. 研究結果

1. 食品への添加回収試験 (表 1)

1-1. 冷凍ベリー

合計 17 回の添加回収試験を実施した。うち 8 回は食品洗浄液を pH9.0 以上に調整して実施した。

Mengovirus および A 型肝炎ウイルスの回収成績はそれぞれ 4/17、12/17 であった。食品洗浄液が pH9.0 以上の場合、A 型肝炎ウイルスの回収成績は 8/8 となった。

食品洗浄液の pH が高いほうが回収成績が良かった。

GI ノロウイルスは 6 回、GII ノロウイルスは 8 回の添加回収試験 (すべて食品洗浄液 pH9.0) を実施し、回収成績は 6/6 8/8 であった。

1-2. 塩おにぎり

合計 11 回の添加回収試験を実施した。うち 2 回は食品洗浄液を pH9.0 以上に調整した。

GI ノロウイルス、GII ノロウイルス、A 型肝炎ウイルス、Mengovirus の回収成績はそれぞれ、11/11、11/11、11/11、5/11 となった。pH9.0 以上への調整を実施しなくても高い回収成績を示した。

1-3. 食パン

合計 10 回の添加回収を実施した。

A 型肝炎ウイルス、Mengovirus の回収成績はそれぞれ 10/10、5/10 となった。食品洗浄液 pH9.0 以上の場合は、それぞれ 2/2、0/2 となった。

1-4. 刻みのり

1回のみ実施した。A型肝炎ウイルスは検出できたが、Mengovirusは検出できなかった。

2. 秋田県でのパンソルビン・トラップ法によるノロウイルス検出実績 (表2)

令和1-4年(2019-2022)に秋田県でウイルス性食中毒として立件された事件数は合計7件、うち食品検査を実施したのは4件、検査を実施した食品検体数は合計83検体であった。

83検体のうちノロウイルスが検出された食品は合計7検体であった。

また、食中毒事件の食品検体については含まれるウイルスがごく微量であることを考慮して、逆転写反応後に、PCRを1回実施してから nested real-time PCR を実施していた。

2-1. 令和元年

ウイルス性食中毒2件
食品検査実施1件
食品検体12検体
ノロウイルス検出3検体

2-2. 令和2年

ウイルス性食中毒2件
食品検査実施0件
食品検体0検体
ノロウイルス検出0検体

2-3. 令和3年

ウイルス性食中毒2件
食品検査実施2件
食品検体33検体
ノロウイルス検出3検体

2-4. 令和4年

ウイルス性食中毒1件
食品検査実施1件
食品検体38検体

ノロウイルス検出1検体

D. 考察

パンソルビン・トラップ法に用いる試薬について、現時点で入手困難なものはないことが確認できた。

さまざまな食品への添加回収試験において、ノロウイルス、A型肝炎ウイルスともに、パンソルビン・トラップ法で成績良く回収できること(10^4 コピー/g程度のウイルス量)が示されたが、冷凍ベリーに関しては食品洗浄液のpHが9.0以上の場合に回収成績が良くなることが示された。

また、ISO15216-1(食品からのノロウイルス、A型肝炎ウイルスの検出法)にて示されている工程管理用のMengovirusの添加回収については、ウイルスの検出成績が試行回数の半分以下であり、パンソルビン・トラップ法の工程管理ウイルスとしては不適と考えられた。

実際の食中毒事件におけるパンソルビン・トラップ法の実績は食品検査を実施した4事件すべてで食品からノロウイルスを検出しており、検出率が高いことが改めて示された。

E. 結論

当初の計画にそって、パンソルビン・トラップ法の使用試薬の入手性、および作業手順の確認を実施し、現状の課題を抽出できた。

また、実際の食中毒事件での実用にむけ、検出限界の検討およびrealtimePCRの感度向上策(nested realtimePCRの適用や、デジタルPCRやNGSの適用など)について検討を進める他、ラボ間再現性の確認を進める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

- 1) Masashi Uema, Kenzo Yonemitsu, Yoshimasa Sasaki, Hiroshi Asakura. Detection of hepatitis E virus RNA from pig bile collected at a slaughterhouse in Japan. AIMS Microbiology, 2022, 8(4): 566-574.

2. 学会発表：

- 1) 食品のノロウイルス汚染検出法としてのパンソルビン・トラップ法の有用性の検討 斎藤博之、秋野和華子、野田衛、上間匡. 日本ウイルス学会、2022. 11. 長崎

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表 1 各種食品へのウイルス添加回収試験の検出成績

	GI NoV	GII NoV	HAV	Mengovirus	
冷凍ベリー	6/6 (6/6)	8/8 (8/8)	12/17 (8/8)	4/17 (1/12)	pH9.0 以上
塩おにぎり	11/11 (2/2)	11/11 (2/2)	11/11 (2/2)	5/11 (2/2)	pH9.0 以上
食パン			10/10 (2/2)	5/10 (0/2)	pH9.0 以上
刻みのり			1/1	0/1	

NoV: ノロウイルス

HAV: A 型肝炎ウイルス

添加ウイルス 10^5 コピー/10g 食品

Thermofisher TaqMan Fast virus 1-step master mix にて実施

表 2 秋田県健康環境センターでの食品検査実績

年度	ウイルス性 食中毒件数	食品検査実 施事件数	食品検体数	NoV 検出食 品検体数	備考
2019(R1)	2	1	12	3	1 事件は食 品検査なし
2020(R2)	2	0			
2021(R3)	2	2	10, 23	2, 1	検出成績 2/10、1/23
2022(R4)	1	1	38	1	

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等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした
失活法の開発のための研究」

食品からのウイルス検出法への NGS の導入に関する検討
研究分担者 元岡大祐 大阪大学微生物病研究所助教

研究要旨： 食中毒発生時の迅速な原因究明は、特に広域事例での被害拡大防止に極めて重要である。一方、ウイルスは食品中で極微量のみが維持されるため、検査法の精度・感度向上は必須の課題である。国内では二枚貝（平成 13 年）及びセミドライトマト（平成 21 年）のウイルス検査法が通知されているが、多様な食品がヒトノロウイルス（HuNoV: Human Norovirus）食中毒の原因と推定される現況を踏まえ、一般食品に対応する汎用性の高い検査法提示は食品衛生上喫緊の課題と言える。同時に、食品輸出入に係る検査法は国際整合性も踏まえる必要がある。本研究では、過去の大規模広域食中毒事件（食パン：平成 26 年、刻みのり：平成 29 年）で原因食品特定に活用された検出法の改良により、新規変異型ウイルスへの対応、実行性の確認、検査感度、陽性コントロールや検量線等の精度検証を行い、国内検査法としての提案を検討する。また、食品中に存在する RNA をメタゲノム解析することで、食品中の夾雑物及びウイルスをプロファイル化し、食品処理法の改善に資する知見を集積、食品由来病原ウイルスへの対応も試みる。

本分担研究では、今年度、食品のウイルス検査法の整備・公開の研究の一環として、メタゲノム解析手法を用いた食品からの網羅的ウイルス検出を行った。サンプルは、既知のウイルスを食品に添加したモックサンプルを使い評価した。その結果、添加したウイルスは、リアルタイム PCR で検出できる条件下ではいずれのウイルスも検出・同定することが確認できた。またリアルタイム PCR で検出限界以下となったサンプルにおいても、ほとんどのケースでウイルスの検出に成功した。このことから、病原体が同定できていないウイルス汚染の食品も含め網羅的な病原体探索としてメタゲノム解析が有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

食中毒発生時の迅速な原因究明は、特に広域事例での被害拡大防止に極めて重要である。一方、ウイルスは食品中で極微量のみが維持されるため、検査法の精度・感度向上は必須の課題である。国内では二枚貝（平成 13 年）のノロウイルス及びセミドライトマト（平成 21 年）の A 型肝炎ウイルスに関してウイルス検査法が通知されているが、多

様な食品がヒトノロウイルス（HuNoV: Human Norovirus）食中毒の原因と推定される現況を踏まえ、一般食品に対応する汎用性の高い検査法提示は食品衛生上喫緊の課題と言える。同時に、食品輸出入に係る検査法は国際整合性も踏まえる必要がある。本研究では、過去の大規模広域食中毒事件（食パン：平成 26 年、刻みのり：平成 29 年）で原因食品特定に活用された検出法の改良

により、新規変異型ウイルスへの対応、実行性の確認、検査感度、陽性コントロールや検量線等の精度検証を行い、国内検査法としての提案を検討する。また、食品中に存在する RNA をメタゲノム解析することで、食品中の夾雑物及びウイルスをプロファイル化し、食品処理法の改善に資する知見を集積することにより、食品由来病原ウイルスへの対応も試みる。

本分担研究では、食品からのウイルス検出法の整備・公開の研究の一環として、メタゲノム解析手法を用いた食品からの網羅的ウイルス検出を行うことを目的とする。病原体検出法として一般的に用いられる定量 PCR 法は、特異度も感度も高い一方で、対象ごとに特異的なプライマー/プローブセットの準備が必要であること、想定外のウイルスは検出できないこと、多種類の病原体を対象とした探索的な解析には不向きであるなどの欠点もある。そこで NGS を用いた網羅的な解析により、食品中のウイルス探索手法を用いることで、従来法では特定に至らなかった食中毒事件の迅速な原因特定に繋がられるような方法を構築することが目的である。

B. 研究方法

ウイルスを添加した食品をモックサンプルとして準備し、抽出した RNA を対象とし、ショートリードシーケンサーを用いたメタゲノムショットガン解析を行った。食品となるサンプルとしてミックスベリー、塩むすびを用意した。ウイルスとしては、猫カリシウイルス (feline calicivirus; FCV)、Meningovirus、A 型肝炎ウイルス (HAV)、ノロウイルス GI、GII を使用した。ポジティブ

コントロールとして水にウイルスを添加したサンプルを、作業コントロールとして処理に使用する食品洗浄液にウイルスを添加したサンプルを準備した (表 1)。

表 1. サンプルと添加したウイルス

	食品	添加ウイルス
#1	食品洗浄液	FCV, Mengo, HAV
#2	ミックスベリー	FCV, Mengo, HAV
#3	水	Mengo, HAV, GI, GII
#4	食品洗浄液	Mengo, HAV, GI, GII
#5	ミックスベリー	Mengo, HAV, GI, GII
#6	塩むすび	Mengo, HAV, GI, GII

サンプル#3 以外について、パンソルビントラップ法を用いた食品処理法により RNA を抽出し、添加したウイルスのリアルタイム PCR およびメタゲノムショットガン解析を行った。cDNA 合成は、微量 RNA からの cDNA 合成に適している RamDA-Seq 法を用いて行い、イルミナ社 NexteraXT ライブラリ調製キットを用いて NGS ライブラリを作成した。ライブラリは MGI 社 DNBSEQ-G400RS を用いて 100bp ペアエンドシーケンスを行った。データ解析は、アダプタートリミング、重複リードの除去を行った後、Kraken2 を用いた生物種アノテーションを行った。

C. 研究結果

1. ウイルス検出効率の評価

各サンプルから抽出された RNA を用いて、

qPCR によって定量されたウイルス量(Ct 値、表 2)とメタゲノム解析で検出されたウイルスリード数(表 3)を比較した。

1) FCV、Mengo、HAV 添加サンプル

FCV は Ct 値が低いにもかかわらず、他のウイルスよりも得られたリード数が少なかった。さらにミックスベリーにこれらのウイルスを添加したサンプル#2 では、qPCR、メタゲノム共に検出できなかった。一方で、Mengovirus や HAV については、ミックスベリーにウイルスを添加した場合には qPCR で検出できなかったが、メタゲノム解析では食品がない場合と同程度に検出できた。

表 2. 各ウイルスの Ct 値

	FCV	Mengo	HAV	GI	GII
#1	26	33	28		
#2	N. D.	N. D.	N. D.		
#3		28	22	19	22
#4		N. D.	28	23	28
#5		38	27	25	33
#6		37	30	24	30

表 3. 各ウイルスのリード数(100 万リードあたり)

	FCV	Mengo	HAV	GI	GII
#1	21	306	119		
#2	0	305	70		
#3		17,721	8,716	27,632	20,187
#4		78	26	208	69
#5		64	18	100	46
#6		69	29	330	96

2) Mengo、HAV、ノロウイルス添加サンプル

水にウイルスを入れただけの溶液から RNA を抽出したサンプル#3 に比べて、ウイルスを添加した食品洗浄液からパンソルビ

ントラップ法により抽出した場合に Ct 値は増大(ウイルス量は低下)しており、食品からウイルス RNA を抽出する処理によって、ウイルス検出感度が下がることが確認できた。メタゲノム解析においては qPCR 以上に顕著に低下しており、2 桁以上も検出ウイルスリード数が低下した。一方で、FCV、Mengo、HAV セットのとく同じく食品にウイルスを添加したものでは、qPCR での検出感度は低下するが、メタゲノム解析によるウイルス検出リード数は同等であった。

2. メタゲノム解析結果

メタゲノムショットガン解析により得られたリードを様々な生物種にアノテーションした(図 1)。

その結果、パンソルビントラップ法を行っていない水にウイルスを添加したサンプル#3 を除き、多くのデータが細菌由来であることがわかった。さらにその細菌種について解析した結果、最も多くアサインされた細菌種は黄色ブドウ球菌であった。

またミックスベリー由来のサンプルからは、添加したウイルス以外に Strawberry mild yellow edge virus が検出された。

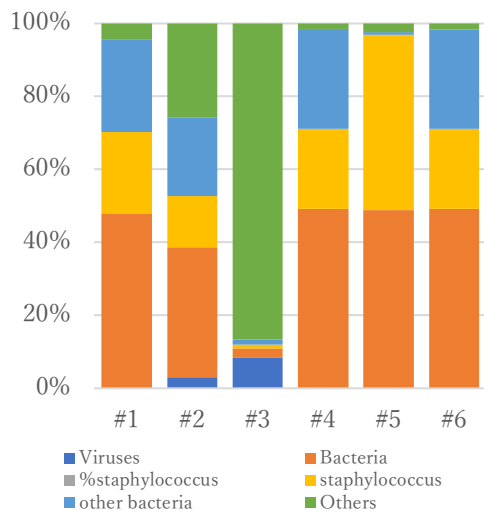


図 1. メタゲノム解析で検出された生物種の相対割合

D. 考察

今回はメタゲノム解析によるウイルス検出能を評価するために、食品に既知のウイルスを添加したモックサンプルを調製し検討を行った。qPCRによるウイルス検出とは異なり、メタゲノム解析では食品の有無に関わらず同程度のウイルス検出能があることがわかった。メタゲノム解析では、予め既知の病原体を設定しないで解析するにもかかわらず、目的ウイルスを検出し、また食品の有無、種類に依存せずに同様に検出できることから、食品からウイルスを検出する上で有用な方法であると考えられる。さらにミックスベリーからは、ベリーに関連することが知られているウイルスが検出されており、想定していないウイルスでも検出が可能であるということが確認できた。一方で、パンソルビントラップ法の処理によりウイルス由来のリード数は大きく低下した。この原因は、パンソルビントラップ法に用いる黄色ブドウ球菌菌体に由来するリー

ドが大半を占めたことが明らかとなった。メタゲノム解析は、溶液中に存在する全ての核酸を解読するため、ウイルス以外の生物由来の核酸が多いとその影響を受けやすく、検出感度が低下してしまう。パンソルビントラップ法を用いないと食品からウイルスが抽出できないため、今後、添加した黄色ブドウ球菌由来のゲノムの除去工程を組み込むことで感度の工場が見込まれると考える。

E. 結論

本研究メタゲノム解析手法が、食品に付着した病原体の検出に有用であることが確認できた。今後は、より感度を向上させ、簡便化させるために、方法の改良に取り組む必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録

なし

令和4年度
厚生労働科学研究費「食中毒原因ウイルス等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした
失活法の開発のための研究」

分担研究報告書

ノロウイルス等の検出・不活化評価のための研究

研究分担者	吉村和久	東京都健康安全研究センター 所長
研究協力者	貞升健志 長島真美 浅倉弘幸	東京都健康安全研究センター 微生物部 東京都健康安全研究センター ウイルス研究科 東京都健康安全研究センター ウイルス研究科

研究要旨 2019年以降、ノロウイルスを原因とする食中毒事例の発生件数はそれ以前と比べ著しく減少している。東京都においては、食中毒事例307事例中46事例（15.0%）の胃腸炎発症者からウイルスを検出し、ノロウイルスを原因とする事例は44事例（95.7%）、サポウイルスは2事例（4.3%）であった。検出されたノロウイルスについてCapsid領域の遺伝子型別を実施した結果、GII.2が17事例（38.6%）と最も多く、GII.4は15事例（34.1%）、GII.17は3事例（6.8%）であった。さらに、食中毒検査を目的に搬入された207検体の食品についてウイルス検査を実施したが、ノロウイルス等は検出されなかった。

A. 研究目的

食品からのウイルス検出率の向上により、食中毒事例の解明に寄与するとともに、食中毒未然防止に寄与することを本研究の目的とする。今年度は、2021年4月から2022年11月に東京都内で発生したウイルス性食中毒事例のウイルス解析および食品からのウイルス検出を試みた。

B. 研究方法

1. 東京都内で発生した食中毒事例におけるウイルス検出状況

2021年4月から2022年11月に東京都内で発生した食中毒事例（有症苦情を含む）で、東京都健康安全研究センターに検査依頼のあった307事例（臨床検体および食品検体）について、胃腸炎起因ウイルスの検索を行った。また、ノロウイルス陽性事例については、代表的な検体からCapsid領域の核酸増幅・塩基配列の解析を行い、遺伝子型別を実施した。なお、食品からのウイルス検査はA3T法（秋場ら、日食微誌、29, 38-41, 2012）により実施した。

（倫理面への配慮）

本研究は東京都健康安全研究センター倫理委員会により承認されている[3 健研健466]

C. 研究結果

1. 食中毒検体のウイルス検査結果

307事例中46事例（15.0%）の胃腸炎発

症者の糞便材料からウイルスを検出した。検出したウイルスは、ノロウイルスが44事例（95.7%）、サポウイルスが2事例（4.3%）であった。ノロウイルスについては、Capsid領域の遺伝子型別を実施した結果、GII.2が17事例（38.6%）と最も多く、GII.4は15事例（34.1%）、GII.17は3事例（6.8%）であった（図1）。

2. 食品からのウイルス検出結果

食中毒検査を目的に搬入された207検体の食品からのウイルス検出を試みた。検査を実施した食品検体の内訳は表の通りである。調理品が最も多く、二枚貝は1検体のみであり、全ての検体からノロウイルス等は検出されなかった。

D. 考察

2019年および新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の流行下（2020年～2022年）では、食中毒事例の発生件数がそれ以前と比べ著しく減少した（図2）。食中毒の患者数においても同様の減少傾向が認められている（図3）。

一方で、COVID-19が5類になったことで、様々な規制がさらに緩和され、食中毒の発生件数は今後増加していくものと考えられる。

今回の調査では残念ながら食品からのウイルス検出には至らなかった。我々で使用しているA3T法の検出感度未満であったことは否めないことから、今後、食品からの検出法について更なる検討を加えていく必要

があると思われた。

E. 結論

食中毒事例 307 事例中 46 事例 (15.0%) の胃腸炎発症者からウイルスを検出した。検出したウイルスは、ノロウイルスが 44 事例 (95.7%)、サポウイルスが 2 事例 (4.3%) で検出された。さらに、ノロウイルスについて、Capsid 領域の遺伝子型別を実施した結果、GII.2 が 17 事例 (38.6%) と最も多く、GII.4 は 15 事例 (34.1%)、GII.17 は 3 事例 (6.8%) であった (図 1)。しかしながら、食中毒検査を目的に搬入された 207 検体からノロウイルス等は検出されなかった。今後、食品からの検出法の検討を引き続き実施する必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

[論文発表]

1. 矢尾板 優、長谷川道弥、浅倉弘幸、永野美由紀、林 志直、根岸 あかね、河上麻美代、林 真輝、山崎 貴子、黒木絢士郎、磯貝まや、北村 有里恵、加來英美子、藤原卓士、鈴木 淳、三宅啓文、長島真美、貞升健志: 東京都内で検出されたノロウイルスの遺伝子解析 (2021年度)、東京健安研七年报、**73**、123-130、2022
2. 永野美由紀、浅倉弘幸、矢尾板 優、鈴木 愛、磯貝 まや、藤原卓士、根岸あかね、河上麻美代、伊藤 仁、黒木絢士郎、横田翔太、北村有里恵、加來英美子、長谷川道弥、三宅啓文、千葉隆司、鈴木 淳、長島真美、貞升健志: 東京都の感染症発生動向調査事業における感染性胃腸炎のウイルス検出状況 (2019年度～2021年度)、東京健安研七年报、**73**、101-107、2022

[学会発表]

1. 浅倉弘幸、永野美由紀、矢尾板 優、鈴木 愛、磯貝まや、藤原卓士、三宅啓文、長島真美、貞升健志、日本食品衛生学会第118回学術講演会、2022年11月10日(木)～ 11月11日(金)(長崎)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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

表 食品検査検体（内訳）

二枚貝	1
ご飯	15
パン	3
サラダ・お浸し	9
果物・野菜	21
調理品	122
生肉	31
刺身	5
	207

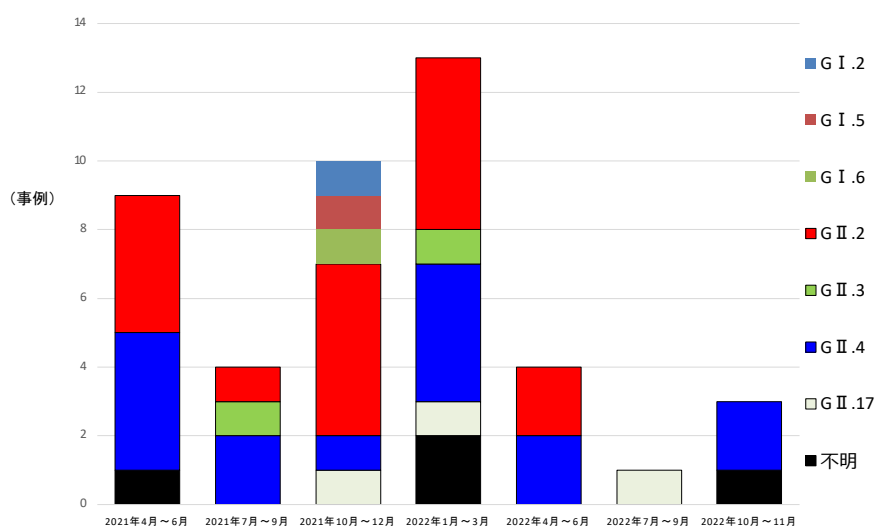
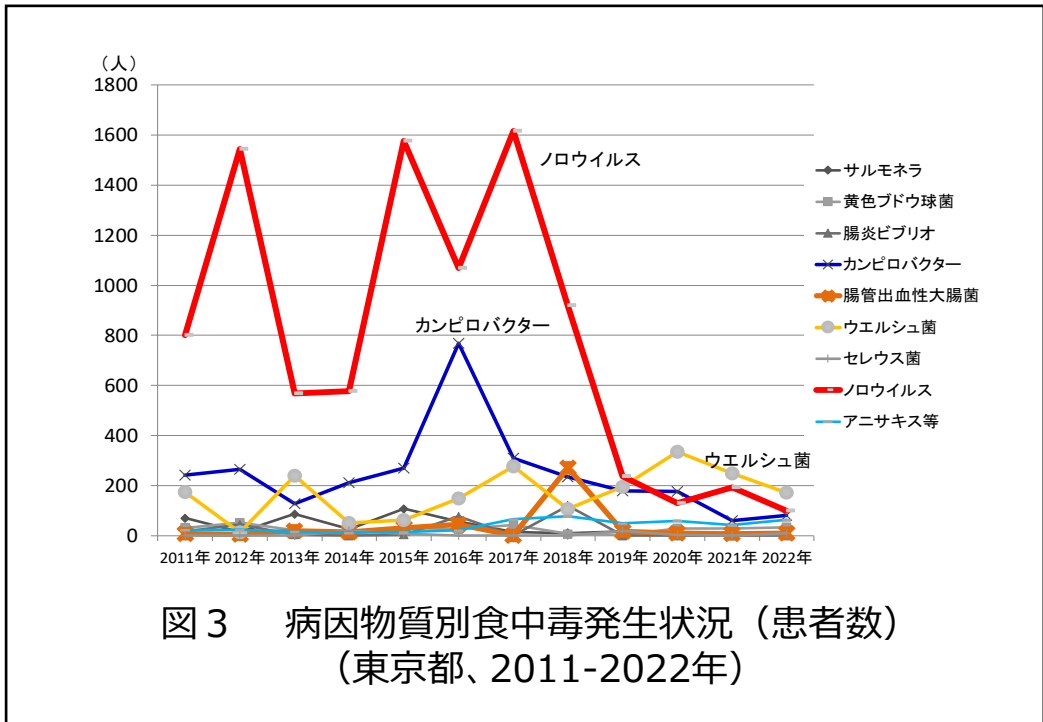
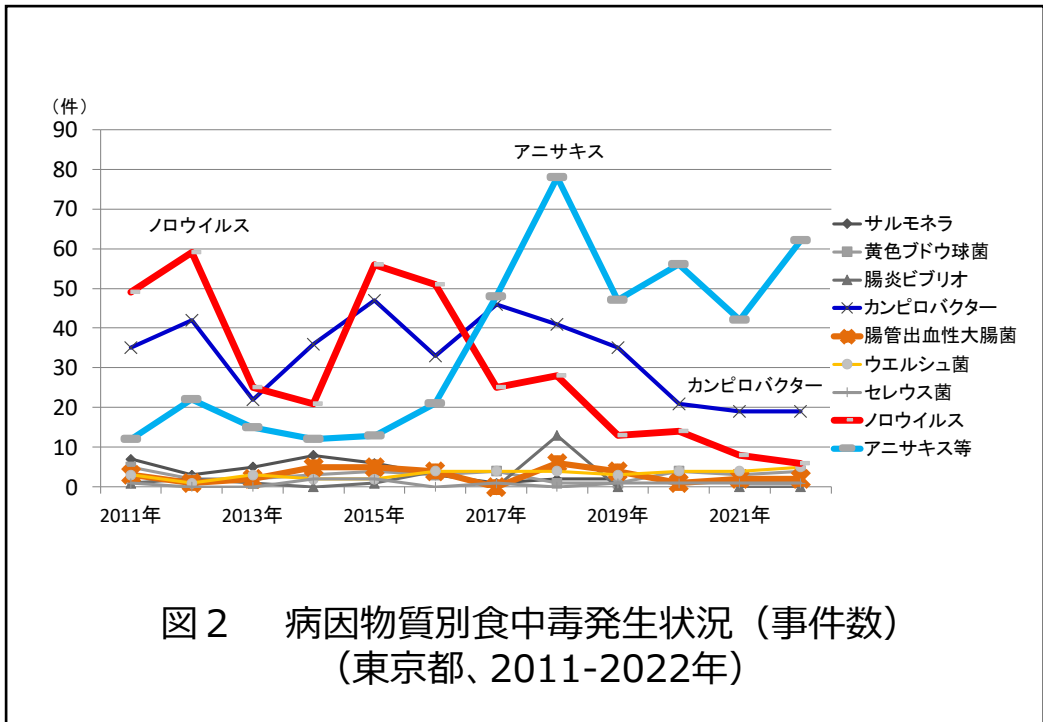


図1 ノロウイルスの遺伝子型検出状況（患者検体）



「食中毒原因ウイルス等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした
失活法の開発のための研究」

分担研究報告書

ノロウイルスの疫学動向の解析

研究分担者	木村 博一	群馬パース大学大学院保健科学研究科
研究協力者	高橋 知子	岩手県環境保健研究センター 保健科学部
	水越 文徳	栃木県保健環境センター 微生物部
	本谷 匠	茨城県衛生研究所 ウイルス部
	花田 三四郎	群馬パース大学 医療技術学部 臨床工学科
	倉井 大輔	杏林大学 医学部 総合医療学教室（感染症科）

研究要旨 本邦におけるノロウイルスの疫学動向を把握するために、過去5年間（2018～2022年）の遺伝子群・遺伝子型別 NoV 検出・報告状況に関する研究を行った。その結果、過去5年間においては、GII が GI に比し多く検出された。また、GI においては、GI.2、GI.3、GI.4 ならびに GI.7、GII においては、GII.2、GII.4、GII.6 ならびに GII.17 が多く検出・報告されていた。さらに、2020年以降、一部の遺伝子型の NoV を除き、それ以前に比し、検出報告数が激減した。これは、インフルエンザなどと同様に新型コロナウイルス感染症の出現によるものと推定された。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) は、急性胃腸炎を引き起こす主要な下痢症ウイルスであり、新型コロナウイルスやインフルエンザと同様にパンデミックを引き起こすことが知られている。現在まで、NoV の遺伝子型は、30 以上報告されているが、主流遺伝子型はシーズンごとに異なることも示唆されている[ref]。そこで、本研究においては、直近の NoV 疫学動向研究の一環として、過去5年間に国内で検出された NoV の遺伝子群・遺伝子型別検出状況に関する研究を行った。

B. 研究方法

1. 遺伝子群・遺伝子型別 NoV 検出データ

各年の遺伝子群・遺伝子型別の NoV 検出データは、国立感染症研究所のデータベースから取得し、集計した。

参照 WEB（前出）：

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/norovirus-m/2082-idsc/iasr-noro/5701-iasr-noro-150529.html>

C. 研究結果

1. 過去5年間に本法で検出・報告された遺伝子群・遺伝子型別 NoV 検出状況を表1に示す。まず、GII が GI に比し多く検出された。次に、遺伝子群 GI においては、GI.2、GI.3、GI.4 ならびに GI.7 が多く検出・報告されていた。GII においては、GII.2、

GII.4、GII.6 ならびに GII.17 が多く検出・報告されていた。さらに、2020年以降、一部の遺伝子型の NoV を除き、それ以前に比し、検出報告数が減少した。

D. 考察

既報によれば、2006/07 シーズンに GII.4 が出現後、当該遺伝子型はパンデミックを引き起こした。また、当該遺伝子型の変異株 (variant) が数シーズンごとに出現し、約10年間 GII.4 が主に流行した。しかし、2016/17 シーズンには、GII.2 (GII.P16-GII.2 変異株) が主流型となった。さらに、2013/14 シーズン以降、新型 NoV と推定される GII.17-GII.17 が出現し、食中毒事例を中心に、当該遺伝子型が多く検出されている。

今回のデータにおける特徴として、まず、GI ならびに GII において、複数の遺伝子型が2018年と2019年に検出される一方、各遺伝子型の検出報告数には変動がみられた。

GI においては、2018年には、GI.2、GI.3、GI.4 ならびに GI.7 が多く検出されたが、2019年以降それらの遺伝子型の検出報告数が減少した。また、GII においては、2018～2019年にかけて、GII.2、GII.4 ならびに GII.17 が多く検出されたが、2020年以降、当該遺伝子群の NoV 検出報告数が大きく減少した。特に、2022年はこの傾向が顕著であった。既報によれば、新型コロナウイルス感染症の出現後、イン

フルエンザや RS ウイルス感染症をはじめとする季節性の流行傾向が強い感染症の流行動態に変化がみられている。特に、この傾向は、2020 年に顕著にみられているが、2021 年以降、RS ウイルス感染症報告数が過去 10 年間で最大級になるなど、各感染症の流行動態の変化も見られている。よって、ノロウイルス感染症においても、今後の流行動態の変化に十分な注意が必要であると思われる。

E. 結論

本邦における過去 5 年間（2018～2022 年）の遺伝子群・遺伝子型別 NoV 検出・報告状況に関する研究を行った。その結果、過去 5 年間においては、GII が GI に比し多く検出された。また、GI、GII とも特定の遺伝子型（GI.2、GI.3、GI.4 ならびに GI.7；GII.2、GII.4、GII.6 ならびに GII.17）が多く検出・報告された。さらに、2020 年以降、一部の遺伝子型の NoV を除き、それ以前に比し、検出報告数が激減したが、これは、インフルエンザなどと同様に新型コロナウイルス感染症の出現によるものと推定された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kimura Y, Shin J, Nakai Y, Takahashi M, Ino Y, Akiyama T, Goto K, Nagata N, Yamaoka Y, Miyakawa K, Kimura H, Ryo A. Development of Parallel Reaction Monitoring Mass Spectrometry Assay for the Detection of Human Norovirus Major Capsid Protein. *Viruses*. 2022 Jun 28;14(7):1416. doi: 10.3390/v14071416.

Honjo S, Kuronuma K, Fujiya Y, Nakae M, Ukae S, Nihira H, Yamamoto M, Akane Y, Kondo K, Takahashi S, Kimura H, Tsutsumi H, Kawasaki Y, Tsugawa T. Genotypes and transmission routes of noroviruses causing sporadic acute gastroenteritis among adults and children, Japan, 2015-2019. *Infect Genet Evol*. 2022 Oct;104:105348. doi:10.1016/j.meegid.2022.105348.

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

表1. 過去5年間に国内で検出された遺伝子群・遺伝子型別ノロウイルス

	2018年	2019年	2020年	2021年	2022年	Total (each genotype)
GI.1	2		1	1	1	5
GI.2	54	49	1	2		106
GI.3	25	2	2		3	32
GI.4	19	2	28	11		60
GI.5	5	1	5	1	1	13
GI.6	9	19		11	2	41
GI.7	40	6	1	1		48
GI.9	1		38			39
GI total (each genotype)	155	79	76	27	7	344
GII.1	5	7	1			13
GII.2	634	368	215	353	128	1698
GII.3	72	251	42	16	13	394
GII.4	478	531	267	249	326	1851
GII.5	2					2
GII.6	47	93	27	8	1	176
GII.7	6					6
GII.8	3	11	1		1	16
GII.10		4				4
GII.13	2		1			3
GII.14	1	2	2			5
GII.17	140	67	70	42	21	340
GII.22				1		1
GII total (each genotype)	1390	1334	626	669	490	4509

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等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした
失活法の開発のための研究」
令和4年度分担研究報告書

米国および英国における食中毒事件発生時のウイルス検査に関する調査

研究分担者 窪田邦宏 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第二室長
研究協力者 天沼 宏 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第二室
田村 克 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第二室

研究要旨： 食中毒発生時の迅速な原因究明は、特に広域事例での被害拡大防止に極めて重要である。一方、ウイルスは食品中で極微量のみが維持されるため、検査法の精度・感度向上は必須の課題である。国内では二枚貝（平成 13 年）及びセミドライトマト（平成 21 年）のウイルス検査法が通知されているが、多様な食品がヒトノロウイルス（HuNoV: Human Norovirus）食中毒の原因と推定される現況を踏まえ、一般食品に対応する汎用性の高い検査法提示は食品衛生上喫緊の課題と言える。同時に、食品輸出入に係る検査法は国際整合性も踏まえる必要がある。本研究では、過去の大規模広域食中毒事件（食パン：平成 26 年、刻みのり：平成 29 年）で原因食品特定に活用された検出法の改良により、新規変異型ウイルスへの対応、実行性の確認、検査感度、陽性コントロールや検量線等の精度検証を行い、国内検査法としての提案を検討する。また、食品中に存在する RNA をメタゲノム解析することで、食品中の夾雑物及びウイルスをプロファイル化し、食品処理法の改善に資する知見を集積、食品由来病原ウイルスへの対応も試みる。

本分担研究では、今年度、食品のウイルス検査法の整備・公開の研究の一環として、食中毒事件対応時の検査法の実態などに関して国際情報の収集を実施した。その結果、米国および英国においては、食中毒事件対応時に食品のウイルス検査を必ずしも実施していないことが確認された。また、米国や英国をはじめとする欧米の一部の国においてみられる推奨事項「食品取扱事業従業員にノロウイルス感染が確認された場合には、症状が消失してから 48 時間待機後に仕事に復帰する」について、その待機時間の根拠に関する調査を行った結果、一部の実験データは存在するものの全体としては現場での安全管理指導における現実的な対応である可能性が示唆された。

A. 研究目的

食中毒発生時の迅速な原因究明は、特に広域事例での被害拡大防止に極めて重要である。一方、ウイルスは食品中で極微量のみが維持されるため、検査法の精度・感度向上は必須の課題である。国内では二枚貝（平成13年）のノロウイルス及びセミドライトマト（平成21年）のA型肝炎ウイルスに関してウイルス検査法が通知されているが、多様な食品がヒトノロウイルス（HuNoV: Human Norovirus）食中毒の原因と推定される現況を踏まえ、一般食品に対応する汎用性の高い検査法提示は食品衛生上喫緊の課題と言える。同時に、食品輸出入に係る検査法は国際整合性も踏まえる必要がある。本研究では、過去の大規模広域食中毒事件（食パン：平成26年、刻みのり：平成29年）で原因食品特定に活用された検出法の改良により、新規変異型ウイルスへの対応、実行性の確認、検査感度、陽性コントロールや検量線等の精度検証を行い、国内検査法としての提案を検討する。また、食品中に存在するRNAをメタゲノム解析することで、食品中の夾雑物及びウイルスをプロファイル化し、食品処理法の改善に資する知見を集積することにより、食品由来病原ウイルスへの対応も試みる。

本分担研究では、食品からのウイルス検出法の整備・公開の研究の一環として、食中毒事件対応時の検査法の実態などに関して国際情報の収集を実施した。

具体的には、英国および米国での食中毒事件対応時における食品からのウイルス検出に関する調査を行った。また、米国や英国をはじめとする欧米の一部の国において「食品取扱事業の従業員でノロウイルス感

染が確認された場合には、症状が消失してから48時間待機後に仕事に復帰すること」との推奨事項の記述が見られるため（参考資料1、2）、その根拠等に関する調査を行った。

B. 研究方法

食中毒発生時における原因食品のウイルス検査に関して、米国および英国をはじめとする英語で情報提供している欧米各国政府機関のウェブページの調査を行った。

さらに食中毒発生時の食品検体の採取および保存に関しては、米国疾病予防管理センター（US CDC: Centers for Disease Control and Prevention）のウェブページに紹介されているMMWR（Morbidity and Mortality Weekly Report）論文（参考資料3）の調査を行った。食品取扱事業の従業員が感染した場合、症状が消失してから仕事に復帰するまでの待機時間を「48時間」とする推奨事項については各国政府機関のウェブページを、またその科学的根拠となる論文等については上記MMWR論文の引用文献を調査した。

また2022年10月から2023年1月にかけて、US CDCおよび英国健康保護局（UK HPA: United Kingdom Health Protection Agency）でノロウイルスをはじめとするウイルスのアウトブレイク対応のために疫学調査および検査情報を取り扱っていた担当者複数人に電子メールでの聞き取り調査（Personal Communication）を実施した。また、2023年2月には米国食品医薬品局（US FDA: United States, Food and Drug Administration）および米国農務省食品安全検査局（USDA FSIS: United States Department of

Agriculture, Food Safety and Inspection Service) の担当者から直接聞き取り調査を行った。調査内容はいずれも食中毒事件発生時における食品のウイルス検査実施の実態およびその方法についての情報であった。また食品取扱事業の従業員において、ノロウイルス感染時に症状が消失してから仕事に復帰するまでの待機時間を「48 時間」とする推奨事項の科学的根拠についても聞き取り調査を行った。

C. 研究結果

1. 政府機関ウェブページでの情報提供

(1) US CDC、US FDA による情報提供

英語で情報提供を行なっている欧米各国のウェブページの調査を行ったところ、US CDC のノロウイルス関連のウェブページにて食中毒アウトブレイク発生時の食品検体採取に関する記述がみられた(参考資料 4)。

それによると、食中毒アウトブレイク発生時に原因食品であることが疑われた場合には、ただちに当該食品検体を採取し-20℃で冷凍保存、水検体は冷蔵庫内もしくは氷上にて 4℃で冷蔵保存すべきであると記載されていた。さらに一部の食品(貝類、葉物野菜、ベリー類)からのノロウイルスの抽出方法、検出方法に関する US FDA の文献(参考資料 5)が紹介されていた。

(2) MOHLTC による情報提供

「食品取扱事業の従業員がノロウイルスに感染した場合、症状が消失してから 48 時間後に仕事に復帰する」という推奨事項については、カナダのオンタリオ州保健・長期介護局(MOHLTC: Ministry of Health and Long Term Care)が 2018 年に作成、同局のウェブページに掲載した文書にその経緯が

記載されている(参考資料 6)。それによると、1994 年以前の報告の多くでは、症状回復後のノロウイルスの便中への排出は 48~72 時間であり、これらの研究結果にもとづいて、食品提供施設を含む高リスクな施設においては、標準的な待機期間は症状回復後「48 時間」となると記載されていた。参考資料 6 の引用文献(参考資料 7)によると、症状回復後およそ 24 時間および 48 時間経過した時点で調理に従事した食品取扱者が感染源となった可能性が初めて報告されたのが 1986 年のこの論文であり、その中で著者らは「回復後、少なくとも 48 時間は食品の取り扱いに従事しないことを推奨する」と記載している。その後の研究で、患者が症状回復後 72 時間を超えてもウイルスを排出することが判明したが(参考資料 8)、その感染・伝播能力との関連に関するデータが不十分であり、現在に至るまで「48 時間」の待機期間が使われていると記載されていた。

(3) HPSC Ireland による情報提供

「食品取扱事業の従業員がノロウイルスに感染した場合、症状が消失してから 48 時間後に仕事に復帰する」という推奨事項について、「48 時間」の根拠を調査するための少し古い資料としては、アイルランドの保健サーベイランスセンター(HPSC: Health Protection Surveillance Centre; 旧称 NDSC: National Disease Surveillance Centre)が 2004 年 4 月に作成、同局のウェブページに掲載した文書に「症状回復後少なくとも 48 時間」の記載がある(参考資料 9)。参考資料 9 の引用文献(参考資料 10)によると、既に 1993 年の時点で英国の Public Health Laboratory

Service (PHLS) Virology Committee の Viral Gastroenteritis Sub-Committee が「食品取扱者は症状回復後 48 時間まで従事しないこと」を推奨していた。この Sub-Committee メンバー 10 人のうち 4 人が E. O. Caul 博士、A. Curry 博士、S. R. Palmer 博士、T. Riordan 博士であり、彼らは 1993 年に先立って「少なくとも 48 時間」を推奨する論文を発表している(参考資料 11、12)。参考資料 12 の論文では、参考資料 7 の論文を引用しており、特に強固なエビデンスが得られない限りは「症状回復後 48 時間」での復帰で問題ないだろう、と記載していた。

2. MMWR 論文(参考資料 3)による情報提供

US CDC のノロウイルス関連のウェブページはまた、アウトブレイク対応と疾患予防のためのガイドラインを記した MMWR の論文(参考資料 3)を紹介している(US CDC > Norovirus > Reporting and Surveillance for Norovirus)。この論文の Specimen Collection-Environmental Specimens の項目では、US CDC のウェブページの推奨事項と同様に、「特定の食品がアウトブレイクの原因であると強く疑われた場合は、その食品検体を早急に採取し、その検査に関して US CDC または US FDA に相談し、食品検体は -20°C で冷凍保存、水検体は冷蔵庫内もしくは氷上にて 4°C で冷蔵保存すべきである。」と記載されていた。

3. EID 論文(参考資料 8)による情報提供

「食品取扱事業の従業員がノロウイルスに感染した場合、症状が消失してから 48 時間後に仕事に復帰する」という推奨事項

が、当初はウイルスの便中への排出期間「48~72 時間」にもとづいて決められたという MOHLTC の記載(参考資料 6)を受け、ノロウイルスの便中への排出期間に関する研究の文献を、MMWR 論文(参考資料 3)の引用文献から抽出した。抽出された EID (Emerging Infectious Diseases) の論文(参考資料 8)では 16 人の被験者にノロウイルスを実験感染させた後、経時的に症状を観察し、また便中へのノロウイルスの排出を Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法およびより感度の高い Reverse Transcription (RT)-PCR 法にて定量していた。ウイルス排出の経時変化の結果によると、症状が治まってから約 1 日後に便中ウイルス量はピークになり、その後急速に減少することがわかった。しかしながら、ノロウイルスの排出は ELISA 法では実験感染後平均 7 日間(最長 10 日間)、RT-PCR 法では平均 28 日間(範囲: 13~56 日間)検出されていた。排出されたウイルスが感染性を有しているか否かを結論づけるためにはウイルスの感染性を評価するための感度の高い実験手法が必要であり、この論文においては、排出されたウイルスの感染性は不明とのことであった。このため、ノロウイルスの排出に関しては「48 時間」を越える実験データはあるものの、ガイドラインにおいては現在も「48 時間」という待機期間が継続して使用されている可能性があると考えられた。

4. 米国の担当者の対応 (US CDC、US FDA、USDA FSIS の調査結果)

US CDC の担当者によると、ウイルス性食中毒事件が発生した際に、喫食した可能性

のある食材のウイルス検査は実施していないとのことであった。その理由として、患者報告時には食品残品が既に存在していないことが多いことや、食品残品からのウイルス検出が難しいことを挙げていた。US FDA および USDA FSIS の担当者も、検査は各州の食中毒調査担当者や US CDC の担当者が受け持っているためあくまで一般論としての回答であるが、同様に、行っていないと思われるとのことであった。

また、「食品取扱事業従業員のノロウイルス感染時には症状が消失してから 48 時間待機後に仕事復帰が可能」とする根拠に関しては、US CDC、US FDA、USDA FSIS の担当者はともに、科学的には症状消失後 48 時間ではウイルス排出が継続している可能性を否定できないが、食品取扱事業従業員（小規模事業者の場合は経営者自身も含まれる）に 48 時間以上の待機を推奨しても現実的には守られないこと等に鑑み 48 時間待機に決定された可能性を指摘していた。

5. 英国の担当者の対応（UK HPA の調査結果）

UK HPA の担当者によると、米国の場合と同様、ウイルス性食中毒事件が発生した際に、喫食した可能性のある食材のウイルス検査は実施していないとのことであった。理由も同様で、患者報告時には食品残品が既に存在していないことが多いことや、食品残品からのウイルス検出が難しいことを挙げていた。

米国の政府機関と同様に英国の政府機関も「食品取扱事業従業員のノロウイルス感染時には、症状が消失してから 48 時間待機後であれば仕事復帰が可能」と情報提供し

ている（参考資料 2）。英国の担当者も、科学的には症状消失後 48 時間ではウイルス排出が継続している可能性を否定できないが、食品取扱事業従事者にそれ以上の待機を推奨しても現実的には守られないこと等によって 48 時間待機が決定された可能性を指摘していた。

D. 考察

今回は新型コロナウイルス感染症（COVID-19）パンデミックの影響により、米国の検査機関等での現地調査が困難となり、かわりに、US CDC、US FDA、USDA FSIS、UK HPA で食中毒発生時対応に関わっていた担当者から得られた電子メールでの Personal Communication の情報および直接の聞き取りの情報等をもとに調査を行った。問い合わせを行った担当者らは、以前、ノロウイルス等の食品関連ウイルスの担当であったが、COVID-19 をはじめとする感染症対応専門部署への異動や組織変更等で調査時には以前の担当（食品担当）ではない場合が多かった。しかしながら担当していた当時から 1～2 年程度とそれほど時間も経っておらず、現場の対応は大きく変更されてはいないであろうとのことであった。

どの担当者も、食中毒事件発生時において、喫食された可能性のある食材のウイルス検査は実施していないことがほとんどであると回答していた。その理由として、担当者全員が、患者報告時には食品残品が既に存在していないことが多いことや、食品残品からのウイルス検出が難しいことを挙げていた。

米国、英国、アイルランドおよびカナダの政府機関が「食品取扱事業従業員のノロウ

ウイルス感染時には、症状が消失してから 48 時間待機後であれば仕事復帰が可能」と情報提供している根拠に関しては、1994 年以前の実験データであるウイルス排出期間「48～72 時間」にもとづいて決められたと考えられる。しかしながら、ウイルス排出期間が 72 時間を越えることが判明した現在でも依然として「48 時間」の基準が用いられている理由としては、排出されたウイルスの感染・伝播能力に関するデータが不十分であること、および科学的根拠以外にもとづくのではなく、現実的な現場での監視指導実態に合わせた結果であるとの見解で一致していた。

E. 結論

本調査により、米国および英国においては、食中毒事件対応時に、喫食した可能性がある食品のウイルス検査を必ずしも実施していないことが確認された。

また「食品取扱事業従業員のノロウイルス感染時に、症状が消失してから 48 時間待機後であれば仕事復帰が可能」と情報提供しているのは、実験データは一部存在するものの、それだけではなく現場での監視指導における現実的な対応である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(参考資料)

1. Norovirus: Facts for Food Workers (US CDC)
<https://www.cdc.gov/norovirus/downloads/foodhandlers.pdf>
2. Food Handlers: Fitness to Work, Regulatory Guidance and Best Practice Advice For Food Business Operators (2009, UK FSA)
<https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/fitnesstoworkguide.pdf>
3. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines
Aron J Hall *et al.*
MMWR Recomm Rep. 2011 Mar 4;60(RR-3):1-15
https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr6003a1.htm?s_cid=rr6003a1_w
4. 【食品検体採取に関する情報（米国疾病予防管理センター）】 US CDC > Norovirus > Laboratory information > Specimen Collection (Food, Water, and Environmental Specimens) (US CDC)
<https://www.cdc.gov/norovirus/lab/specimen-collection.html>
5. 【一部の食品（貝類、葉物野菜、ベリー類）からのノロウイルスの抽出、検

- 出に関する文献情報（米国食品医薬品局）
- BAM Chapter 26 and Appendices: Concentration, Extraction and Detection of Enteric Viruses from Food (US FDA)
<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-26-and-appendices-concentration-extraction-and-detection-enteric-viruses-food>
6. Recommendations for the Control of Gastroenteritis Outbreaks in Long-Term Care Homes: Recommendations for Long-Term Care Homes and Public Health Unit Staff (March 2018, MOHLTC)
https://www.health.gov.on.ca/en/pro/programs/publichealth/oph_standards/docs/reference/Control_Gastroenteritis_Outbreaks_2018_en.pdf
7. A foodborne outbreak of Norwalk virus gastroenteritis. Evidence for post-recovery transmission
 Karen E. White *et al.*
 Am J Epidemiol. 1986 Jul;124(1):120-6
<https://academic.oup.com/aje/article-abstract/124/1/120/149872>
8. Norwalk virus shedding after experimental human infection
 Robert L. Atmar *et al.*
 Emerg Infect Dis. 2008 Oct;14(10):1553-7
https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/10/08-0117_article
9. Preventing Foodborne Disease: A Focus on the Infected Food Handler (April 2004, HPSC Ireland)
<https://www.hpsc.ie/a-z/gastroenteric/norovirus/guidanceandpublications/File,871,en.pdf>
10. Outbreaks of Gastroenteritis Associated with SRSV's (1995, shortened form of the original 1993 report)
 Viral Gastroenteritis Sub-Committee of the PHLS Virology Committee
 Culture. 1995 Mar 16;1:2-5
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Culture-Vol-16-No-1-March-1995.pdf>
 (オリジナル版はPHLS Microbiology Digest 1993; 10(1): 2-8)
11. Role of infected food handler in hotel outbreak of Norwalk-like viral gastroenteritis: implications for control
 J. A. Reid *et al.*
 Lancet. 1988 Aug 6;2(8606):321-3
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0140673688923677>

12. Small round structured viruses and persistence of infectivity in food handlers

A. Curry *et al.*

Lancet. 1987 Oct 10;2(8563):864-5

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014067368791061>

0

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等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした失活法の
開発のための研究」
分担研究報告書

ノロウイルス、サポウイルスの不活化条件に関する情報収集

研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	遠矢 真里	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食品の調理工程においてノロウイルスを制御するための具体的な条件については、従来ノロウイルス代替ウイルスに対するデータのみが示されていた。

2016年に Ettayebi らがヒト腸管由来のオルガノイドを用いたノロウイルスの *in vitro* 培養系を発表以降、ヒトノロウイルスを用いて、直接不活化条件を検討することが可能となり、iPS 細胞由来腸管上皮細胞を用いた系(佐藤ら)など、複数の培養系が報告されている。

HACCP の考え方に基づく衛生管理においてウイルス対策を講じることが可能となるよう、現在入手可能な報告から、ノロウイルスの不活化条件について情報収集を行い、まとめた。

また、ノロウイルスと同じくカリシウイルスに属するサポウイルスについても情報収集を行った。

A. 研究目的

食中毒発生防止のため、ノロウイルス等の原因ウイルスを食品の製造工程で制御することは大きな課題となっている。これまで、ヒトノロウイルスの実用的な *in vitro* 培養系が存在しなかったため、ネコカリシウイルスなどのノロウイルス代替ウイルスを用いた不活化条件が示されるのみであり、具体的なノロウイルス対策を講じる上で大きな障害となっていた。

2016年に Ettayebi らがヒト腸管由来のオルガノイドを用いたヒトノロウイルスの *in*

vitro 培養系を発表後は、複数の研究グループにおいてヒトノロウイルスの実験室内増殖系が開発され、ヒトノロウイルスを直接用いた不活化条件が提示される状況となっている。

本研究では HACCP の考え方に基づく食品製造工程での食中毒原因ウイルスの制御に向けて、ヒトノロウイルスを用いて示された不活化条件をとりまとめることを目的に、情報収集をおこなった。

B. 研究方法

PubMedにてヒトノロウイルス、および近縁のヒトサポウイルスを用いて示された不活化条件について情報収集を行った。

C. 研究結果

1. ヒトノロウイルスの不活化条件 (表 1)

1-1. 次亜塩素酸ナトリウム

ヒト腸管由来の培養系では 50ppm 以上の濃度で 1 分間反応させることで感染後のウイルス増殖がなくなった。一方で、iPS 由来腸管上皮を用いた培養系では 1000ppm 5 分間の反応で不活化された。

1-2. エタノール

汎用的な消毒剤として用いられる 70%エタノールでの処理により GII. 4 は不活化されたものの、GII. 3、GII. 6、GI. 7 などは不活化されなかった。ただし、有機酸を添加して pH を下げた場合に不活化効果が見られた。

1-3. 加熱

少なくとも 60 度 15 分の処理が必要であった。

1-4. 紫外線

ゼブラフィッシュを用いた実験系にて、6.0 mJ/cm² の処理で 2log の感染性減少が確認された。

2. ヒトサポウイルスの不活化条件 (表 2)

1-1. 塩素

0.02 mg・Cl₂・min/L の反応で GI. 1 のサポウイルスが不活化された。

1-2. 加熱

少なくとも 70 度 10 分以上の加熱がサポウイルスの不活化に必要であった。

60 度 30 分では GII. 3 型のサポウイルスは

不活化されなかった。

1-3. 紫外線

5.4mJ/cm² の反応ではサポウイルスは不活化されなかった。

D. 考察

ヒト腸管由来、iPS 細胞由来、ゼブラフィッシュなど複数の in vitro ヒトノロウイルス培養系が開発され、研究が進行しているが、提示される不活化条件はまだまだデータが少ない状況であった。

また、ノロウイルス、サポウイルスともに、それぞれ非常に多くの遺伝子型が存在するが、現状で培養系で増殖可能なウイルス株は限定的であった。

E. 結論

HACCP の考え方に基づいたウイルス制御にむけ、具体的なノロウイルスの不活化条件はすでにいくつか示されているものの、実際の食品製造工程にて実施するためにはさらに細かい条件での提示が必要と思われる。

また、調理工程のみならず、食品の洗浄工程や、従事者の手指・食品取り扱い環境の消毒を視野に入れた、実用的な消毒剤等による不活化条件、とくに食品添加物として認められている電解水などによる不活化条件について、多くのデータを示していくことは食品製造工程における衛生管理に大きく貢献するものと思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：
なし.

2. 学会発表：
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表1 ノロウイルスの不活化条件

次亜塩素酸Na

遺伝子型	濃度	反応時間	Log reduction	培養細胞系	文献
GII.4	50ppm以上	1min	Inactivated 50ppmだとinput titerの減少なし。 ただし細胞内での増殖なし。	Human intestinal enteroids (HIEs)	Costantini V, et. al., Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. <i>Emerg Infect Dis.</i> 2018 Aug;24(8):1453-1464.
GII.4	0.1% (1000 ppm)	5 min	Inactivated 約3 logの減少	human iPSC-derived IECs	Sato S, et. al., Alcohol abrogates human norovirus infectivity in a pH-dependent manner. <i>Sci Rep.</i> 2020 Sep 28;10(1):15878.
GII.3, GII.6, GII.17	0.1% (1000 ppm)	5 min	Inactivated 約2-3 logの減少		

エタノール

遺伝子型	濃度	反応時間	Log reduction	培養細胞系	文献
GII.4	70%エタノール	5min	1.3-2.9 log: input titerの減少値、 up to 0.7 log: replication level	Human intestinal enteroids (HIEs)	Costantini V, et. al., Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. <i>Emerg Infect Dis.</i> 2018 Aug;24(8):1453-1464.
GII.4	70%エタノール	1min	1.3-2.9 log: input titerの減少値		
GII.4	70%エタノール	5min	Inactivated 約3 logの減少: replication level (72 hpi)	human iPSC-derived IECs	Sato S, et. al., Alcohol abrogates human norovirus infectivity in a pH-dependent manner. <i>Sci Rep.</i> 2020 Sep 28;10(1):15878.
		70%エタノール +1%クエン酸	20sec		
GII.3, GII.6	70%エタノール	5min	減少なし		
	70%エタノール +1%クエン酸	5min	約2 logの減少: replication level (72 hpi)		
GII.7	70%エタノール	5min	減少なし		
	70%エタノール +1%クエン酸	5min	約1 logの減少: replication level (72 hpi)		
GII.17	70%エタノール	5min	減少なし		
	70%エタノール +1%クエン酸	5min	約2 logの減少: replication level (72 hpi)		
	70%エタノール +15%レモンジュース	5min	約3 logの減少: replication level (72 hpi)		

熱

遺伝子型	反応温度	反応時間	Log reduction	培養細胞系	文献
GII.4	60°C	15min	Inactivated 約2.5-3 logの減少	Stem cell-derived human enteroids	Ettayebi K, et. al., Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. <i>Science.</i> 2016 Sep 23;353(6306):1387-1393.
GII.4	90°C	1min	Inactivated 約1.5 logの減少	Human intestinal enteroids (HIEs)	Hayashi T, et. al., Human Norovirus in Freshwater Clams Using Human Intestinal Enteroids. <i>Viruses.</i> 2022 May 10;14(5):1014.

紫外線

遺伝子型	反応条件	Log reduction	培養細胞系	文献
GII.2, GII.4, GII.17	6.0mJ/cm ²	Infectivity が2 log以上減少	Zebra fish embryo	Tan MTH, et. al., Use of Zebrafish Embryos To Reproduce Human Norovirus and To Evaluate Human Norovirus Infectivity Decay after UV Treatment. <i>Appl Environ Microbiol.</i> 2023 Mar 21:e0011523.

表2 サポウイルスの不活化条件

塩素

遺伝子型	反応条件	Log reduction	培養細胞系	文献
GI.1	0.02 mg-Cl ₂ -min/L	3.8-4.0 logの減少	Human intestinal cell	Shirakawa D, et. al., Investigation of removal and inactivation efficiencies of human sapovirus in drinking water treatment processes by applying an in vitro cell-culture system. Water Res. 2023 Apr 7;236:119951.

熱

遺伝子型	反応温度	反応時間	Log reduction	培養細胞系	文献
GI.1	70°C	10-30min	約4-4.5 logの減少 30分処理で inactivated	Human intestinal cell	Takagi H, et. al., Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Dec 15;117(50):32078-32085.
	60°C	10-30min	約3.5-4 logの減少		
	50°C	10-30min	ほとんど減少せず		
GII.3	70°C	10-30min	約4.5 logの減少 10分処理で inactivated		
	60°C	10-30min	ほとんど減少せず		
	50°C	10-30min	ほとんど減少せず		

紫外線

遺伝子型	反応条件	Log reduction	培養細胞系	文献
GI.1, GII.3	5.4mJ/cm ²	ほとんど減少せず	Human intestinal cell	Takagi H, et. al., Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Dec 15;117(50):32078-32085.

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）
分担研究報告書

腸管オルガノイドを用いた HuNoV 増殖系による
ウイルス不活化条件の検討

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

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。しかし再現性の高い培養系が長年未確立であったため、現在のガイドライン等に使用されている不活化条件は、培養可能な近縁ウイルスを用いて「間接的」に策定されたものであり、その確実性には疑問が残されている。本研究ではヒト腸管オルガノイドに加え、同研究班研究分担者である佐藤教授の有する iPS 由来腸管上皮細胞を駆使することでノロウイルス不活化条件を直接的に評価する。研究に用いるノロウイルスは糞便検体を用いることから、本研究実施に関わる各機関と検体採取及び輸送に関する研究体制の整備を行った。また前研究班にて進めていたシジミをモデルとした食品中ノロウイルス不活化法に関する研究を発展させるため、カキ稚貝を用いた予備実験を実施し、カキに取り込まれたノロウイルス VLP をウェスタンブロット法で検出することに成功した。

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。しかし再現性の高い培養系が長年未確立であったため、現在のガイドライン等に使用されている不活化条件は、培養可能な近縁ウイルスを用いて「間接的」に策定されたものであり、その確実性には疑問が残されている。本研究分担者らのグループは、前研究班（研究代表者 鈴木亮介）においてシジミをモデルとした食品中ノロウイルスの不活化方法に関する研究を実施した。本研究班では、iPS 由来腸管上皮細胞を有する同研究班研究分担者の佐藤と連携することで、ノロウイルス不活化条件を直接的に評価す

る。さらに、ノロウイルス以外の食中毒原因ウイルス、代替ウイルスでの評価データも蓄積し、食中毒原因ウイルスの不活化に対し実効性あるノロウイルス衛生対策手法の構築を目指す。

また前研究を発展すべき、ノロウイルス混入食品モデルとしてカキを用いる研究に向けた検討も実施する。

B. 研究方法

本研究では加熱、食品添加物として認可されるアルコール、次亜塩素酸 Na、亜塩素酸水や電解水等を対象とした直接的な評価を行う。その後、カキをはじめとする二枚貝を含めた様々な食品中 HuNoV の不活化条

件定量法を検証・確立する。

研究に用いるノロウイルスは糞便検体を供することとし、同班分担研究者吉村の協力研究者 左近 (大阪健康安全基盤研究所)、同 高橋 (岩手県環境保健研究センター)、同 坂上 (宮城県保健環境センター) より提供いただく。感染研にて腸管オルガノイドへの感染性を評価した後、同班分担研究者佐藤 (和歌山県立医科大学) に送付し、iPS由来腸管上皮細胞を用いて検証する。その上で不活化法を解析する。また糞便検体は同班分担研究者 元岡 (大阪大学微生物病研究所) にも送付してウイルス遺伝子の解析を実施する。本年度は研究実施に向けた体制整備を行った。

また、前研究班にて進めていたシジミをモデルとした食品中ノロウイルス不活化法に関する研究を発展させるため、カキ稚貝を用いた予備実験を実施した。具体的には、直径 1 cm 程度に生育したカキ稚貝にノロウイルス VLP を加え、その上で、餌として食物プランクトンあるいは海水を加えた。室温で 2 時間静置した後に殻を取り外してから人工海水で 2 回程度洗い、SDS-PAGE サンプルバッファーを加えて溶解した。その後、ウェスタンブロット法によりノロウイルス VLP を検出した。

C. 研究成果

研究計画策定に先立ち、本年度は新型コロナウイルス感染拡大により地方衛生研究所の業務が圧迫されていたことを受け、検体の取り扱い等の際に、各機関の負担を減らすことに腐心しながら調整を行った。その上で、人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針に沿った申請を行い、

感染研倫理委員会から承認された。また、必要に応じて実施した機関ごとの申請も全てが承認された。

また食品中ノロウイルス不活化の解析に向けた予備検討として、カキ稚貝へのノロウイルス VLP の取込と検出法を検討した。その結果、カキに取り込まれた VLLP を検出することができた。また餌の存在下において取り込み量が大きく増加することが示された。

D. 考察

本研究が多機関共同研究の一括審査であったことから倫理申請完了までに時間を要したが、ほぼ想定通りの達成度であった。体制が整備されたことから次年度からは実際に研究を開始する。

カキ稚貝を用いた予備実験から、食品中ノロウイルス不活化に向けた研究が実施可能であることが示唆された。今後は VLP ではなく感染性ウイルスを用いた検証を実施予定である。

前研究班で実施した、シジミ中ノロウイルスの加熱による不活化方法の確立に関する研究成果が海外学術雑誌に掲載された。当初の研究計画にはないが、本研究と深く連動しており、研究遂行の基盤になる (Hayashi et al. *Viruses*, 2022)。

E. 結論

倫理申請を含めた研究体制が十分に整備されたことから、次年度から実際に不活化研究を実施開始となった。また、カキ稚貝に蓄積したノロウイルス VLP をウェスタンブロットで検出できたことから、食品中ノロウイルスの解析方法の選択肢が広がった。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文)

(1) 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* 14(5) 2022年5月10日.

2. 学会発表

(1) 村上耕介, 林豪士, 山岡曜子, 伊藤篤, 釜石隆, 杉山隆一, Mary K. Estes, 村松正道. ヒト腸管オルガノイドを用いたシジミ中ヒトノロウイルスの感染性評価. 第69回日本ウイルス学会学術集会(長崎) 2022年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「食中毒原因ウイルス等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした
失活法の開発のための研究」
令和4年度分担研究報告書

ヒトノロウイルスのin vitro増殖系を用いたウイルス不活化条件の検討

研究分担者 佐藤 慎太郎 和歌山県立医科大学薬学部

研究要旨

食中毒発生時の迅速な原因究明は、特に広域事例での被害拡大防止に極めて重要である。加えて、ヒトノロウイルス（HuNoV）不活化法の妥当性評価も検査法と共に重要な課題である。これまで、HuNoVのin vitro培養法は確立されておらず、代替ウイルス（ネコカリシウイルス等）を用いた評価に留まっていたが、近年ではヒトiPS細胞由来の腸管上皮細胞を用いてHuNoV培養が可能な状況となっていることに着目し、本研究では同培養系を用いた食品マトリクスや食品取扱環境でのHuNoV不活化条件を直接的に評価することで、HuNoVの特性を踏まえた実効性あるHuNoV衛生対策の妥当性を評価しようとする特色を併せ持つ。

本分担研究では、佐藤らが確立したHuNoVのin vitro増殖系を用いて、患者由来の糞便をウイルスソースとしたHuNoV感染能を指標とする不活化評価を行う。不活化条件の検証にあたっては、食品添加物として認可される次亜塩素酸Naや電解水等を対象とした直接的な評価を行った上で、カキをはじめとする二枚貝を含めた様々な食品中でのヒトノロウイルスに対するこれらの成分の不活化条件定量法を検証し、具体的なHuNoVの不活化に有効となる条件及び手法を取り纏める。

今年度は、本事業で用いるHuNoVの遺伝子型について、感染研・村上を中心として打ち合わせをおこなうと共に、地衛研からのヒト糞便検体収集体制の構築を行った。また、当該遺伝子型が安定して増殖できるヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞のロットを再度確認した。

A. 研究目的

本研究では食中毒原因ウイルス、特にヒトノロウイルス（HuNoV）の汎用性および国際整合性を備えた検査法を整備すると共に、実用的なウイルス不活化法を裏付ける科学的根拠を提示することを目的とする。

食中毒発生時の迅速な原因究明は、特に広域事例での被害拡大防止に向けて極めて重要である。一方、ウイルスは食品中では増殖せず極微量が維持されるのみであるため、検査法の精度・感度向上がその対策には必須の課題である。国内では二枚貝（平成13年）及びセミドライトマト（平

成 21 年) からの HuNoV 検査法が通知されているが、多様な食品が HuNoV 食中毒の原因と推定される現況を踏まえると、これに対応するウイルス検査法の提示は食品衛生上の喫緊の課題と言える。更に食品の輸出入が増加する中での検査法提示は国際整合性を踏まえる必要がある。また、本研究では食品より精製される RNA を次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析に供することで、食品中の夾雑物及びウイルスのプロファイル化を行い、食品処理法の改善に資する知見を集積する。

加えて、HuNoV 不活化法の妥当性評価も検査法と共に重要な課題である。これまで、HuNoV の *in vitro* 培養法は確立されておらず、代替ウイルス (ネコカリシウイルス等) を用いた評価に留まっていたが、近年ではヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いて HuNoV 培養が可能な状況となっていることに着目し、本研究では同培養系を用いた食品マトリクスや食品取扱環境での HuNoV 不活化条件を直接的に評価することで、HuNoV の特性を踏まえた実効性ある HuNoV 衛生対策の妥当性を評価する。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いた HuNoV の *in vitro* 増殖系は佐藤らによりすでに確立されているが、現在この増殖系では数百倍程度の増殖を認めるに留まっている。したがって、ウイルスソースとして患者由来の糞便検体を用いる必要がある。今年度は本事業で用いる HuNoV の遺伝子型について、感染研・村上を中心として打ち合わせをおこなうと共に、地衛研からのヒト糞便検体収集体制の構築を行

った。また、当該遺伝子型が安定して増殖できるヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞のロットを再度確認した。

C. 研究結果

ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いた HuNoV の *in vitro* 増殖系を指標としたウイルス不活化評価の実施に向け、ウイルスソースとして用いるヒト糞便検体の本事業における使用のための倫理申請を行った。この申請に関しては感染研にて一括審査について承認を受け、佐藤が所属する和歌山県立医科大学においても承認確認された。また、本事業で用いる HuNoV の遺伝子型について村上らと打ち合わせを行い、例年最も流行している GII.4_Sydney (GII.4[P31]、GII.4[P16]) をまず用いて、必要に応じて他の遺伝子型についても検討することとした。それを踏まえ、当該遺伝子型が安定して増殖できるヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞のロットを再度確認し、主に用いる細胞 (IEC#17) と、それとは異なる iPS 細胞から誘導した細胞 (IEC#29) を決定した。

D. 考察

ウイルスソースとして用いる糞便検体は、地衛研から一度感染研に送られ、そこで増殖能と必要に応じて他の感染症の有無を確認する。地衛研および感染研における検体の保存温度に関しては、検体ごとに適切な保管温度があると思われるが、検体収集のしやすさを重要視し、その上で本事業に用いる検体を選択することとなった。検体が決まり次第、その一部が和歌山県立医科大学に送付される予定である。

E. 結論

次年度からはウイルスソースとしての糞便検体が実験に使用出来る見込みであり、不活化試験法、不活化製剤の効果の検討を行える体制が構築できたことから、初年度の進捗としては十分であると考え。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yuki Y, Zuo F, Kurokawa S, Uchida Y, **Sato S**, Sakon N, Hammarström L, Kiyono H, Marcotte H. Lactobacilli as a Vector for Delivery of Nanobodies against Norovirus Infection. **Pharmaceutics**. 2022 Dec 25;15(1):63. doi: 10.3390/pharmaceutics15010063.

2. Nurdin JA, Kotaki T, Kawagishi T, **Sato S**, Yamasaki M, Nouda R, Minami S, Kanai Y, Kobayashi T. N-Glycosylation of Rotavirus NSP4 Protein Affects Viral Replication and Pathogenesis. **J Virol**. 2023 Jan 31;97(1):e0186122. doi: 10.1128/jvi.01861-22.

3. Masuda A, Man Lee J, Miyata T, **Sato S**, Masuda A, Taniguchi M, Fujita R, Ushijima H, Morimoto K, Ebihara T, Hino M, Kakino K, Mon H, Kusakabe T. High yield production of norovirus GII.4 virus-like particles using silkworm pupae and evaluation of their protective immunogenicity. **Vaccine**. 2023 Jan 16;41(3):766-777. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.12.015.

4. Hoque SA, Kotaki T, Pham NTK, Onda Y, Okitsu S, **Sato S**, Yuki Y, Kobayashi T, Maneekarn N, Kiyono H, Hayakawa S, Ushijima H. Abundance of Viral Gastroenteritis before and after the Emergence of COVID-19: Molecular Evidence on Wastewater. **J Infect**. 2023 Feb;86(2):154-225. doi: 10.1016/j.jinf.2022.11.007.

5. Noguchi M, Shimizu M, Lu P, Takahashi Y, Yamauchi Y, **Sato S**, Kiyono H, Kishino S, Ogawa J, Nagata K, Sato R. Lactic acid bacteria-derived γ -linolenic acid metabolites are PPAR δ ligands that reduce lipid accumulation in human intestinal organoids. **J Biol Chem**. 2022 Nov;298(11):102534. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102534.

6. Takahashi Y, Noguchi M, Inoue Y, **Sato S**, Shimizu M, Kojima H, Okabe T, Kiyono H, Yamauchi Y, Sato R. Organoid-derived intestinal epithelial cells are a suitable model for preclinical toxicology and pharmacokinetic studies. **iScience**. 2022 Jun 7;25(7):104542. doi: 10.1016/j.isci.2022.104542.

7. Pham NTK, Nishimura S, Shimizu-Onda Y, Trinh QD, Komine-Aizawa S, Khamrin P, Okitsu S, **Sato S**, Kobayashi T, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Emerging norovirus GII.4 Sydney[P31] causing acute gastroenteritis outbreak in children in Japan, during COVID-19, 2021.

J Infect Chemother. 2022
Sep;28(9):1347-1351. doi:
10.1016/j.jiac.2022.05.015.

2. 学会発表

1. 佐藤 慎太郎、「ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いたヒトノロウイルス増殖系の確立」、和歌山医学会、2022年7月3日、和歌山
2. 佐藤 慎太郎、「ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いたヒトノロウイルス増殖系の確立とその応用」、第96回日本細菌学会、2023年3月16日、兵庫

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした失活法の
開発のための研究」
分担研究報告書

食品等従事者における上気道飛沫中の ノロウイルスの調査

研究分担者	岡 智一郎	国立感染症研究所 ウイルス第二部
研究協力者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
	植木 洋	株式会社 日本環境衛生研究所
	高木 弘隆	国立感染症研究所 安全実験管理部
	八尋 俊輔	熊本県保健環境科学研究所

研究要旨

ノロウイルスによる食中毒発生要因としては調理従事者の糞便・嘔吐物由来の食品汚染が主と想定されてきた。しかし、近年の疫学解析によって胃腸炎症状の有無に関わらず口腔、鼻腔咽頭ぬぐい液や唾液からもノロウイルスが検出されることが明らかとなりつつある。そのため本研究では調理従事者・食品取扱者の上気道飛沫によるノロウイルス汚染の可能性について調査するため、唾液中のノロウイルス検査法を構築し、登録衛生検査所の協力のもと、調理従事者・食品取扱者を対象にノロウイルス検出状況の実態調査を行った。また地方衛生研究所において集団事例における糞便・唾液中のノロウイルス検出も実施した。

A. 研究目的

ノロウイルスによる食中毒発生要因として、調理従事者の糞便・嘔吐物飛沫による食品汚染が主と想定されてきた。しかし、近年の疫学解析により、胃腸炎症状の有無に関わらず口腔、鼻腔咽頭スワブや唾液からもノロウイルス核酸が検出されることが明らかとなってきた(Dábilla N et al., *J. Clin. Virol.* 2017; 87:60-66., Anfruns-Estrada E et al., *Viruses.* 2020;12 :1369.)。さらに本研究

班が始まってから、ヒトノロウイルスが唾液腺細胞株に感染し増殖すること、*in vivo* 実験系で唾液を介したマウスノロウイルス感染も報告された(Ghosh S. et al., *Nature.* 2022; 607:345-350.)。

糞便以外の上気道粘液からノロウイルスが検出されれば、糞便・嘔吐物汚染以外のルートでもノロウイルスが感染伝播する可能性が示され、感染制御対策のための新たな知見となりうることから、本研究では我が国の調理従事者・

食品取扱者を介した食中毒発生の汚染源の可能性を探るため、糞便に加え、上気道粘液として医療関係者を介在せず非侵襲的に自己採取できる唾液を対象にノロウイルスが検出されるか検討することとした。

B. 研究方法

1. 材料

1) ノロウイルスをスパイクした唾液検体

ノロウイルス陰性の市販唾液（健常者の唾液を pool したもの）（991-05-P Lee BioSolutions, コスモ・バイオ取り扱い）にノロウイルス陽性糞便 GI.7 GII.4 を添加し、GI スパイク唾液： 8.0×10^7 viral genomic copies/mL、GII スパイク唾液： 4.9×10^7 viral genomic copies/mL を調製した。

2) 調理従事者・食品取扱者の唾液検体

株式会社 日本環境衛生研究所において糞便中のノロウイルス検査を行う調理従事者・食品取扱者のうち、本研究への参加（糞便と同時に採取した唾液の提供）の同意が得られた方を解析対象とした。採取した唾液検体（匿名化済み）、合計 304 検体を国立感染症研究所に送付し、抽出核酸を用いた RT-リアルタイム PCR によるノロウイルスのスクリーニング検査を行った。検体採取日および数の内訳は

2022. 12. 7 (n=62)、2023. 1. 5 (n=62)、
2023. 1. 26 (n=58)、2023. 2. 8 (n=64)、
2023. 2. 13 (n=58)
である。

2. ノロウイルスの検出

抽出操作は自動核酸抽出機 MagNaPure 96 (Roche) を使用し、MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (ロシユ 6543588001) で行った。200 μ L の唾液を使用し、50 μ L に溶出後、COG1 F/R プライマーと RING1-TPa, TPb プローブ、もしくは COG2-F/R プライマーと RING2-TP プローブを用いたリアルタイム RT-PCR、あるいは COG1 F/G1SKR もしくは G2SKF/SKR プライマーを用いた RT-PCR 法でノロウイルスの核酸検出を行った。

リアルタイム PCR 用のマスターミックスは cDNA を鋳型にする QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen 204343)、Luna universal probe qPCR Master Mix (New England Biolabs M3004)、抽出核酸をそのまま鋳型にする TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher Scientific 4444434) で行い、それぞれキットの指示通りの組成、温度条件で反応させ、7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) で検出した。

Conventional PCR 用のマスターミックスは KAPA 2G HotStart Ready Mix with dye (KAPA Biosystems KK5610) を用いた。1-step 系以外の核酸検出系については、Random 6 mer (タカラバイオ 3801) と RevTra Ace (東洋紡 TRT-101) を用いて cDNA 合成を行った。

(倫理面への配慮)

調理従事者・食品取扱者からの唾液検体採取に先立ち、国立感染症研究所において人を対象とする生命科学・医学系

研究に関する倫理審査を申請し、2022年7月に承認を得た（承認番号1405）。

C. 研究結果

ノロウイルスGIもしくはGIIをスパイクした唾液を用いた検討により、使用したリアルタイム用マスターミックス、conventional PCR用マスターミックスはいずれも 5×10^1 viral genomic copies/ μ Lまで検出できた。

例年の検出動向から糞便からのノロウイルス陽性率が増加する12月より株式会社日本環境衛生研究所の協力のもと、胃腸炎症状のない調理従事者・食品取扱者から提供された唾液検体（304検体）を対象にノロウイルス核酸の抽出・検出を行った。今回は陽性コントロールとして用いたノロウイルスをスパイクした唾液の結果から、抽出核酸をそのまま使用することが可能で、より多くの抽出核酸を反応系に持ち込むことができ、同じノロウイルス濃度の検体の場合、より低いCt値でシグナルを検出できたTaqMan Fast Virus 1-Step Master Mixで行った。

今回の解析では調理従事者・食品取扱者唾液検体からのノロウイルス陽性例はなかった。なお、株式会社日本環境衛生研究所において解析対象となった協力者の糞便のノロウイルスを検出したところ、これらもすべて陰性であった。

また本研究期間中に、熊本県保健環境科学研究所において、高齢者施設における集団胃腸炎事例（1事例）の病原因子検索を目的として8名の糞便および唾液のノロウイルス検出を実施した。

糞便からはノロウイルス（GII、Ct値：17.6～34.8）を検出したが、唾液からはノロウイルスが検出されなかった。

D. 考察

調理従事者・食品取扱者糞便におけるノロウイルス陽性率は例年、冬季は1%程度とのことであったが、今回の解析では糞便、唾液いずれからもノロウイルスが検出されなかったため、唾液における陰性結果は妥当と考えた。

国立感染症研究所の集計によると、今回解析対象とした2022.12～2023.2のノロウイルスの報告数は2020.2までと比較しても半数以下で推移していた（https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/rapid/noro/230410/norolong_230410.gif）。このようなノロウイルスの低い検出状況も本研究班の目的である唾液からノロウイルス検出に影響した可能性がある。

また今回解析できた集団胃腸炎事例対象者の唾液からはノロウイルスが検出されなかった。従来の糞便での解析では発症後、経時的にウイルス排泄量が減少することが知られていることから、今回は糞便でノロウイルスが陽性となつてから、後日唾液の採取・調査を実施したことも影響した可能性が考えられた。

E. 結論

当初の研究計画通り、初年度にノロウイルスをスパイクした唾液サンプルを用いて、唾液からのノロウイルス検出に適した核酸抽出、検出系を選定した。現時点では健常調理従事者・

食品取扱者ならびに有症胃腸炎集団事例の解析対象者の唾液からノロウイルスは検出されていないが、次年度以降も継続して取組む。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

- 1) Distribution of Human Sapovirus Strain Genotypes over the last four Decades in Japan: a Global Perspective. Doan YH, Yamashita Y, Shinomiya H, Motoya T, Sakon N, Suzuki R, Shimizu H, Shigemoto N, Harada S, Yahiro S, Tomioka K, Sakagami A, Ueki Y, Komagome R, Saka K, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Mizukoshi F, Arita Y, Haga K, Katayama K, Kimura H, Muramatsu M, **Oka T**. *Jpn J Infect Dis.* 2023 Mar 31. doi: 10.7883/yoken.JJID.2022.704. Online ahead of print.
- 2) Myeloid-associated differentiation marker is an essential host factor for human parechovirus PeV-A3 entry. Watanabe K, **Oka T**, Takagi H, Anisimov S, Yamashita SI, Katsuragi Y, Takahashi M, Higuchi M, Kanki T, Saitoh A, Fujii M. *Nat Commun.* 2023 Mar 31;14(1):1817. doi: 10.1038/s41467-023-37399-8.

3) Characterization of a Human Sapovirus Genotype GII.3 Strain Generated by a Reverse Genetics System: VP2 Is a Minor Structural Protein of the Virion. Li T-C, Kataoka M, Doan YH, Saito H, Takagi H, Muramatsu M, **Oka T**.

Viruses. 2022 Jul 27;14(8):1649. doi: 10.3390/v14081649.

4) Atomic Structure of the Human Sapovirus Capsid Reveals a Unique Capsid Protein Conformation in Caliciviruses.

Miyazaki N, Song C, **Oka T**, Miki M, Murakami K, Iwasaki K, Katayama K, Murata K. *J Virol.* 2022 May 11;96(9):e0029822. doi: 10.1128/jvi.00298-22.

5) A Human Intestinal Cell Line Suitable for the Propagation of Human Parechovirus Type 1 to 6 with a Clear Cytopathic Effect.

Takagi H, **Oka T**, Ami Y, Suzaki Y, Saito H. *Jpn J Infect Dis.* 2022 May 24;75(3):318-321. doi: 10.7883/yoken.JJID.2021.534.

2. 学会発表：

- 1) 非胃腸炎症例の咽頭拭い液からの下痢症ウイルス検出。 **岡智一郎**、高木弘隆、斎藤博之。第63回日本臨床ウイルス学会 2022.6.

- 2) 汎用細胞増殖系を活用した下痢症ウイルスの浄水処理性の評価.

白崎伸隆, 胡秋晗, 白川大樹, 高木弘隆, 岡智一郎, 松下拓, 松井佳彦. ウイルス性下痢症研究会第33回学術集会, 2022. 11.

- 3) ヒトサポウイルス研究加速のための遺伝子型網羅的リソース確立に向けた取り組み. 岡智一郎, 李天成, 米満研三, 網康至, 須崎百合子, 中村(桶本)優子, 片岡紀代, 団海燕, 三田哲朗, 小林孝行, 斎藤博之, 八尋俊輔, 佐藤重紀, 柴田伸一郎, 塚田竜介, 高木弘隆. 第69回日本ウイルス学会, 2022. 11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：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
Doan YH, Yamashita Y, Shinomiya H, Motoya T, Sakon N, Suzuki R, Shimizu H, Shigemoto N, Harada S, Yahiro S, Tomioka K, Sakagami A, Ueki Y, Komagome R, Saka K, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Mizukoshi F, Arita Y, Haga K, Katayama K, Kimura H, Muramatsu M, <u>Oka T.</u>	Distribution of Human Sapovirus Strain Genotypes over the last four Decades in Japan: a Global Perspective.	Jpn J Infect Dis.			2023
Watanabe K, <u>Oka T</u> , Takagi H, Anisimov S, Yamashita SI, Katsuragi Y, Takahashi M, Higuchi M, Kanki T, Saitoh A, Fujii M.	Myeloid-associated differentiation marker is an essential host factor for human parechovirus PeV-A3 entry.	Nat. Commun.	14(1)	1817	2023
Li T-C, Kataoka M, Doan YH, Saito H, Takagi H, Muramatsu M, <u>Oka T.</u>	Characterization of a Human Sapovirus Genotype GII.3 Strain Generated by a Reverse Genetics System: VP2 Is a Minor Structural Protein of the Virion.	Viruses	14(8)	1649	2022
Miyazaki N, Song C, <u>Oka T</u> , Miki M, Murakami K, Iwasaki K, Katayama K, Murata K.	Atomic Structure of the Human Sapovirus Capsid Reveals a Unique Capsid Protein Conformation in Caliciviruses.	J. Virol	96(9)	E0029822	2022
Takagi H, <u>Oka T</u> , Amiyama Y, Suzaki Y, Saito H.	A Human Intestinal Cell Line Suitable for the Propagation of Human Parechovirus Type 1 to 6 with a Clear Cytopathic Effect.	Jpn J Infect Dis	75(3)	318	2022
Tsuyoshi Hayashi, Yoko Yamaoka, Atsushi Ito, Takashi Kamaishi, Ryuichi Sugiyama, Mary K Estes, Masamichi Muramatsu, Kosuke Murakami	Evaluation of Heat Inactivation of Human Norovirus in Freshwater Clams Using Human Intestinal Enteroids.	Viruses	14	-	2022

矢尾板 優、長谷川道弥、浅倉弘幸、永野美由紀、林志直、根岸 あかね、河上麻美代、林 真輝、山崎貴子、黒木絢士郎、磯貝まや、北村 有里恵、加來英美子、藤原卓士、鈴木 淳、三宅啓文、長島真美、貞升健志	東京都内で検出されたノロウイルスの遺伝子解析 (2021年度)	東京 健安研 73 セ年報	73	123-130	2022
永野美由紀、浅倉弘幸、矢尾板 優、鈴木 愛、磯貝まや、藤原卓士、根岸あかね、河上麻美代、伊藤仁、黒木絢士郎、横田翔太、北村有里恵、加來英美子、長谷川道弥、三宅啓文、千葉隆司、鈴木 淳、長島真美、貞升健志	東京都の感染症発生動向調査事業における感染性胃腸炎のウイルス検出状況 (2019年度～2021年度)	東京 健安研 73 セ年報	73	101-107	2022
Yuki Y, Zuo F, Kurokawa S, Uchida Y, <u>Sato S</u> , Sakon N, Hammarström L, Kiyono H, Marcotte H.	Lactobacilli as a Vector for Delivery of Nanobodies against Norovirus Infection.	Pharmaceuti cs.	15(1)	63	2022
Nurdin JA, Kotaki T, Kawagishi T, <u>Sato S</u> , Yamasaki M, Nouda R, Minami S, Kanai Y, Kobayashi T.	N-Glycosylation of Rotavirus NSP4 Protein Affects Viral Replication and Pathogenesis.	J Virol.	97(1)	E018612 2	2023
Masuda A, Man Lee J, Miyata T, <u>Sato S</u> , Masuda A, Taniguchi M, Fujita R, Ushijima H, Morimoto K, Ebihara T, Hino M, Kakino K, Mon H, Kusakabe T.	High yield production of norovirus GII.4 virus-like particles using silkworm pupae and evaluation of their protective immunogenicity.	Vaccine	41(3)	766	2023
Hoque SA, Kotaki T, Pham NTK, Onda Y, Okitsu S, <u>Sato S</u> , Yuki Y, Kobayashi T, Maneeekarn N, Kiyono H, Hayakawa S, Ushijima H.	Abundance of Viral Gastroenteritis before and after the Emergence of COVID-19: Molecular Evidence on Wastewater.	J Infect	86(2)	154	2023
Takahashi Y, Noguchi M, Inoue Y, <u>Sato S</u> , Shimizu M, Kojima H, Okabe T, Kiyono H, Yamauchi Y, Sato R.	Organoid-derived intestinal epithelial cells are a suitable model for preclinical toxicology and pharmacokinetic studies.	iScience	25(7)	104542	2022

Pham NTK, Nishimura S, Shimizu-Onda Y, Trinh QD, Komine-Aizawa S, Khamrin P, Okitsu S, Sato S , Kobayashi T, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H.	Emerging norovirus GII.4 Sydney[P31] causing acute gastroenteritis outbreak in children in Japan, during COVID-19, 2021.	J Infect Chemother	28(9)	1347	2022
Masashi Uema, Kenzo Yonemitsu, Yoshimasa Sasaki, Hiroshi Asakura.	Detection of hepatitis E virus RNA from pig bile collected at a slaughterhouse in Japan	AIMS Microbiology	8(4)	566	2022
Kimura Y, Shin J, Nakai Y, Takahashi M, Ino Y, Akiyama T, Goto K, Nagata N, Yamaoka Y, Miyakawa K, Kimura H, Ryo A.	Development of Parallel Reaction Monitoring Mass Spectrometry Assay for the Detection of Human Norovirus Major Capsid Protein.	Viruses	Volume14 Issue 7	1416	2022 Jun 28
Honjo S, Kuronuma K, Fujiya Y, Nakae M, Ukae S, Nihira H, Yamamoto M, Akane Y, Kondo K, Takahashi S, Kimura H, Tsutsumi H, Kawasaki Y, Tsugawa T.	Genotypes and transmission routes of noroviruses causing sporadic acute gastroenteritis among adults and children, Japan, 2015-2019.	Infect Genet Evol.	Volume104	105348	2022 Oct

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和4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。

- 研究事業名 厚生労働化学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 食中毒原因ウイルス等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした失活法の開発のための研究 (22KA1001)
- 研究者名 (所属部署・職名) 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部第四室・室長
(氏名・フリガナ) 上間 匡・ウエマ マサシ

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 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和4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。

- 研究事業名 厚生労働化学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 食中毒原因ウイルス等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした失活法の開発のための研究 (22KA1001)
- 研究者名 (所属部署・職名) 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部第二室・室長
(氏名・フリガナ) 窪田 邦宏・クボタ クニヒロ

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。

令和5年4月3日

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4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等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした失活法の開発のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 国立感染症研究所ウイルス第二部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 岡 智一郎・オカ トモイチロウ

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。

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4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等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした失活法の開発のための研究
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。

令和5年5月23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 東京都健康安全研究センター

所属研究機関長 職名 所長

氏名 吉村 和久

次の職員の(元号) 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 令和4年度 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)

2. 研究課題名 食中毒原因ウイルス等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした失活法の開発のための研究(22KA1001)

3. 研究者名 (所属部署・職名) 東京都健康安全研究センター・所長

(氏名・フリガナ) 吉村和久・ヨシムラカズヒサ

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"/>	東京都健康安全研究センター・倫理委員会	<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) 特になし

(※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 未受講

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 5年 5月26日

厚生労働大臣 殿

機関名 和歌山県立医科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 宮下 和久

次の職員の令和4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等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした失活法の開発のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 薬学部・教授
(氏名・フリガナ) 佐藤 慎太郎・サトウ シンタロウ

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。

令和5年 5月 19日

厚生労働大臣 殿

機関名 学校法人群馬パース大学

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 樋口 建介

次の職員の(元号) 令和4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。

- 研究事業名 令和4年度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)
- 研究課題名 食中毒原因ウイルス等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした失活法の開発のための研究
- 研究者名 (所属部署・職名) 大学院 保健科学研究科・教授
(氏名・フリガナ) 木村博一・キムラヒロカズ

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。

令和5年 5月 10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 国立大学法人大阪大学微生物病研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 高倉 伸幸

次の職員の(令和) 4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 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
2. 研究課題名 食中毒原因ウイルス等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした失活法の開発のための研究 (22KA1001)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 微生物病研究所・助教
(氏名・フリガナ) 元岡 大祐 ・ モトオカ ダイスケ

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。