

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5年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上間 匡  
令和6年（2024）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. 食品からのウイルス検出法における食品処理法の汎用性に関する研究               | 上間 匡……………12  |
| 2. ウイルス検出法への NGS の導入に関する検討                       | 遠矢真理……………20  |
| 3. メタゲノム解析を用いた食品からのウイルス検出法に関する検討                 | 元岡大祐……………25  |
| 4. ノロウイルスの疫学動向の解析                                | 木村博一……………30  |
| 5. 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……………33  |
| 6. 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                  | 村上耕介……………38  |
| 7. ヒトノロウイルスの <i>in vitro</i> 増殖系を用いたウイルス不活化条件の検討 | 佐藤慎太郎……………41 |
| 8. 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……………45  |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表                              | ……………48      |
| IV. 倫理審査報告書の写し                                   | ……………52      |

令和5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 | 遠矢 真理 | 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部   |
|       | 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 感染症危機管理センター   |
|       | 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    |
|       | 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  |
|       | 横田 翔太 | 東京都健康安全研究センター ウイルス研究科  |
|       | 黒木絢士郎 | 東京都健康安全研究センター ウイルス研究科  |
|       | 赤瀬 悟  | 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       |
|       | 水越 文徳 | 国立感染症研究所 ウイルス第三部       |

## 研究概要

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多様であり、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。

令和 5 年度は食品処理法としてパンソルビントラップ法と ISO 法による食品処理方法の汎用性を比較したほか、パンソルビントラップ法と A3T 法の比較検証データを入手、分析した。また、NGS による食品中のウイルス検索の課題解決に向けた検討を行った。ウイルス不活化条件の検討に向けては、in vitro 培養系に供するノロウイルス陽性便 80 検体を入手して、腸管オルガノイドおよび iPS 由来腸管上皮細胞の両方の培養系が同等のノロウイルス増殖評価を実施できることを示した。さらに、食品等取り扱い事業者の協力のもと、唾液中のノロウイルスの実態調査を継続した。

### 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 6,800 人へと大きく減少したが、R5(2023)年は 1,021 件、11,803 人と増加した。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 2,545 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、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。

令和5年度は食品処理法としてパンソルビントラップ法とISO法による食品処理方法の汎用性を比較したほか、パンソルビントラップ法とA3T法の比較検証データを入手、分析した。また、NGSによる食品中のウイルス検索の課題解決に向けた検討を行った。ウイルス不活化条件の検討に向けては、*in vitro* 培養系に供する80検体を入手して、腸管オルガノイドおよびiPS由来腸管上皮細胞の両方の培養系が同等のノロウイルス増殖評価を

実施できることを示した。さらに、食品等取り扱い事業者の協力のもと、唾液中のノロウイルスの実態調査を継続した。

## 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) 食品からのウイルス検出法における食品処理法の汎用性に関する研究（上間）

・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食品処理法としてパンソルビントラップ法と，ISO15216-1:2017 に示される PEG/NaCl 沈殿法について，さまざまな食品を対象にウイルスの添加回収試験を実施し，それぞれの食品処理法の汎用性について比較を行った。

・塩むすび，冷凍ベリー，野菜スティック，味付きとろろなど，両方法ともにある程度の汎用性の高さを示した。

- ・実際の食中毒検体では食品中のウイルス量はごく微量であることから、今後は検出限界等について詳細な検証が必要である。

## 2) ウイルス検出法への NGS 導入に関する研究 (遠矢)

- ・次世代シーケンサー (NGS) の中でも迅速性に優れている Nanopore 社のシーケンサーを用いた検討を行った。
- ・NGS を用いた疫学調査が実装化し始めている下水検体を用いてノロウイルスをターゲットにした解析を行なった。
- ・効率的に食中毒事例での実用化を目標とした検討を行った。
- ・NGS 利用における課題を抽出した。
- ・Nanopore 社デバイスは安価、小型、オールインワンで簡便性に優れるものの、ソフトウェア、ハードウェアのアップデートが頻繁に行われる。
- ・食品検査のルーチンとして実施するにはアップデート間隔が短いため、プロトコルの更新も頻繁に行う必要が出てくる。
- ・アップデート後は旧バージョンの試薬キットやシーケンスチップの入手ができなくなる可能性が高いことが示された。
- ・ウイルスの遺伝子型の詳細な解析には強力なツールであると考えられる。

## 3) メタゲノム解析を用いた食品からのウイルス検出法に関する検討 (元岡)

- ・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の開発を行う。
- ・メタゲノム解析によるウイルス検出は、食品中のウイルスの検出に適用する場合は付着しているウイルス量が極微量であり、食品から抽出された核酸の大部分を占める食品由来ゲノムにより、ウイルス検出感度が著しく低下する。

- ・メタゲノム解析に適した食品からの効率的なウイルス核酸の抽出方法の適用、開発を目的にパンソルビントラップ法、ISO 法による食品処理後の抽出核酸を用いて比較検証を行った。

- ・現状では NGS 解析に接続する場合は、パンソルビントラップ法よりも PEG/NaCl 沈殿を利用する ISO 法や超遠心を用いる FDA 法の方が適していると考えられた。
- ・ただし食材によってウイルス検出の状況が変化するため、明らかな優劣を判断することはできなかった。
- ・RNA 抽出後にウイルス核酸濃縮プローブを用いることで、ウイルス検出感度が 20 から 400 倍に上昇することが確認できた。

## 4) ノロウイルスの疫学動向の解析 (木村)

- ・2018 年から 2023 年までに検出された遺伝子群・遺伝子型別 NoV 検出・報告状況に関する研究を行った。
- ・GII が GI に比し多く検出された。
- ・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。
- ・2020 年に新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の出現後、多くの遺伝子型の NoV の検出件数は減少した。

- ・COVID-19 後、特に当該感染症の 5 類以降後は、GII. 4 を主体に NoV の検出数が増加、COVID-19 出現前の水準に戻っていることが示唆された。

## 5) ノロウイルス等の検出・不活化評価のための研究 (吉村)

- ・東京都において、2021 年 4 月より食中毒事例 688 事例中 206 事例 (29.9%) の胃腸炎

発症者からウイルスを検出した。

- ・ノロウイルスを原因とする事例は 202 事例 (98.1%)、サポウイルスは 4 事例 (1.9%) 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.4 は 86 事例 (53.7%) と最も多く、GII.2 が 46 事例 (28.7%)、GII.17 は 14 事例 (8.7%) であった。

- ・食中毒検査を目的に搬入された 874 検体の食品についてウイルス検査を A3T 法にて実施し、ノロウイルスは 4 検体で検出された。

## 2. ウイルスの制御

### 1) 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)

- ・地衛研の協力のもと便検体 80 検体を入手した。
- ・ヒト腸管オルガノイドへの感染性を解析した。

- ・100 倍以上の増殖幅を示す 16 検体、10 倍以上を示す 32 検体など、*in vitro* 培養系で増殖性に差があることを確認した。

- ・iPS 由来腸管上皮細胞による比較解析に用いるために増殖性の高い 8 検体 (GII.2 3 検体、GII.3 1 検体、GII.4 4 検体) を選別した。

- ・両培養系の解析結果を基に協議を行い、最終的に不活化条件の検証に用いる 2 検体 (GII.4 2 検体) を選定した。

### 2) 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)

- ・地衛研の協力を得て、腸管オルガノイド系で増殖性の高いノロウイルス株が iPS 由来腸管上皮細胞培養系においても高い増殖性を示すことを明らかにした。

- ・*in vitro* 培養系にてノロウイルス不活化条件を検証する GII.4 遺伝子型検体を 2 検体決定した。

- ・異なる機関、異なる細胞で同一の結果が確認できるかを重要視し、加熱によるウイルス不活化に関して実験プロトコールの確認を行った。

### 3) 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)

- ・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、昨年度と同様、登録衛生検査機関の協力のもと、調理従事者・食品取扱者を対象に唾液中のノロウイルス核酸の検出を行った。

- ・令和 5 年は合計 371 検体について検査を実施したが、全て陰性であった。

## 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 ヒト腸管オルガノイドや iPSC 由来腸管上皮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することで、ノロウイルスの不活化条件に関する科学的エビデンスを示し、現行の代替ウイルスを用いた食

品取り扱い現場でのウイルス不活化条件をより確実性なものとして提示する。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. Miyata R, Miyabe C, Oki H, Motooka D, Nakamura S, Miyabe Y, Takenaka Y, Fukuya Y, Yudo K, Ishiguro N. Alteration of microbial composition in the skin and blood in vasculitis. *Sci Rep*. 2023, 13(1):15317
2. 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.
3. 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.

4. Takahashi T, Kimura R, Shirai T, Sada M, Sugai T, Murakami K, Harada K, Ito K, Matsushima M, Mizukoshi F, Okayama K, Hayashi Y, Kondo M, Kageyama T, Suzuki Y, Ishii H, Ryo A, Katayama K, Fujita K, Kimura H. Molecular Evolutionary Analyses of the RNA-Dependent RNA Polymerase (*RdRp*) Region and *VP1* Gene in Human Norovirus Genotypes GII.P6–GII.6 and GII.P7–GII.6. *Viruses*. 2023 Jul; 15(7): 1497.
5. 村上 昂, 2022 年の全国及び東京都における食中毒発生状況, 東京都微生物検査情報, 44, 1–3, 2023
6. 浅倉弘幸, 東京都における胃腸炎起因ウイルスの検出状況 (2022/23 シーズン), 東京都微生物検査情報, 44, 4–7, 2023
7. 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), 東京健安研セ年報, 73, 123–130, 2022
8. 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), 東京健安研セ年報, 73, 101-107, 2022
9. Takahashi T, Kimura R, Shirai T, Sada M, Sugai T, Murakami K, Harada K, Ito K, Matsushima Y, Mizukoshi F, Okayama K, Hayashi Y, Kondo M, Kageyama T, Suzuki Y, Ishii H, Ryo A, Katayama K, Fujita K, Kimura H. Molecular Evolutionary Analyses of the RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRp) Region and VP1 Gene in Human Norovirus Genotypes GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6. *Viruses*, 15;7 (2023).
  10. Dianty R, Hirano J, Anzai I, Kanai Y, Hayashi T, Morimoto M, Kataoka-Nakamura C, Kobayashi S, Uemura K, Ono C, Watanabe T, Kobayashi T, Murakami K, Kikuchi K, Hotta K, Yoshikawa T, Taguwa S, Matsuura Y. Electrolyzed hypochlorous acid water exhibits potent disinfectant activity against various viruses through irreversible protein aggregation. *Front. Microbiol.* 14;1284274 (2023).
  11. Khamrin P, Kumthip K, Yodmeeklin A, Okitsu S, Motomura K, Sato S, Ushijima H, Maneekarn N. Genetic recombination and genotype diversity of norovirus GI in children with acute gastroenteritis in Thailand, 2015-2021. *J Infect Public Heal.* 2024 Jan 12;17(3):379-385.
  12. Hattori-Muroi K, Naganawa-Asaoka H, Kabumoto Y, Tsukamoto K, Fujisaki Y, Fujimura Y, Komiyama S, Kinashi Y, Kato M, Sato S, Takahashi D and Hase K.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors boost gut immunity by inducing IgA responses in Peyer' s patches. *Front Immunol.* 2023 Nov 1; 14: 1277637.
  13. Yokota C, Fujimoto K, Yamakawa N, Kono M, Miyaoka D, Shimohigoshi M, Uematsu M, Watanabe M, Kamei Y, Sugimoto A, Kawasaki N, Yabuno T, Okamura T, Kuroda E, Hamaguchi S, Sato S, Hotomi M, Akeda Y, Ishii KJ, Yasutomi Y, Sunami K, Uematsu S. Prime-boost-type PspA3 + 2 mucosal vaccine protects cynomolgus macaques from intratracheal challenge with pneumococci. *Inflamm Regen.* 2023 Nov 15;43(1):55.
  14. Matsumoto N, Kurokawa S, Tamiya S, Nakamura Y, Sakon N, Okitsu S, Ushijima H, Yuki Y, Kiyono H, Sato S. Replication of Human Sapovirus in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Epithelial Cells. *Viruses.* 2023 Sep 15;15(9):1929.
  15. Minami S, Matsumoto N, Omori H, Nakamura Y, Tamiya S, Nouda R, Nurdin JA, Yamasaki M, Kotaki T, Kanai Y, Okamoto T, Tachibana T, Ushijima H, Kobayashi T, Sato S. Effective SARS-CoV-2 replication of monolayers of intestinal epithelial cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep.*

- 2023 Jul 18;13(1):11610. doi: 10.1038/s41598-023-38548-1.
16. Hoque SA, Kotaki T, Pham NTK, Onda Y, Okitsu S, **Sato S**, Yuki Y, Kobayashi T, Maneekarn N, Kiyono H, Hayakawa S, Ushijima H. Genotype Diversity of Enteric Viruses in Wastewater Amid the COVID-19 Pandemic. **Food Environ Virol.** 2023 Apr 14:1-16.
  17. Takahashi Y, Inoue Y, **Sato S**, Okabe T, Kojima H, Kiyono H, Shimizu M, Yamauchi Y, Sato R. Drug cytotoxicity screening using human intestinal organoids propagated with extensive cost-reduction strategies. **Sci Rep.** 2023 Apr 3;13(1):5407. doi: 10.1038/s41598-023-32438-2.
2. 学会発表
1. Recent situation of foodborne viruses in Japan. Mari Tohya, Masashi Uema. UJNR 55<sup>th</sup> Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting (2023. 08. 08), 米国
  2. パンソルビン・トラップ法により給食材料からノロウイルスが検出された食中毒の一例. 斎藤博之, 秋野和華子\*, 野田衛, 上間匡. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会 (2023. 09. 21)
  3. 冷凍ベリーからのウイルス検出法の検討. 上間匡, 南村幸世, 斎藤博之, 秋野和華子. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会 (2023. 09. 21)
  4. 近年の試薬の供給状況を反映したパンソルビン・トラップ法プロトコールのア
- ップデート. 斎藤博之, 秋野和華子\*, 野田衛, 上間匡. 第 70 回日本ウイルス学会学術集会 (2023. 09. 26)
5. NGS を活用した下水疫学調査によるノロウイルスの流行状況の把握 遠矢真理, 南村幸世, 國吉杏子, 秋野和華子, 斎藤博之, 上間匡. 日本食品衛生学会, 2023. 11. 東京
  6. 大阪大学微生物病研究所ゲノム解析室における研究支援と共生微生物研究, 元岡大祐, 日本生化学学会大会, 2023. 11, 福岡
  7. 浅倉弘幸, 横田翔太, 磯貝まや, 林志直, 永野美由紀, 藤原卓士, 三宅啓文, 長島真美, 貞升健志: 東京都内で発生したノロウイルス食中毒事例における全長遺伝子解析, 日本食品微生物学会, 2023年9月21日 (木) ~9月22日 (金) (大阪市)
  8. 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)
- 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」

分担報告書

### 食品からのウイルス検出法における食品処理法の汎用性に関する研究

|       |       |              |
|-------|-------|--------------|
| 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 | 南村幸世  | 国立医薬品食品衛生研究所 |
|       | 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  |

#### 研究概要

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食品処理法としてパンソルビン・トラップ法と、ISO15216-1:2017 に示される PEG/NaCl 沈殿法について、さまざまな食品を対象にウイルスの添加回収試験を実施し、それぞれの食品処理法の汎用性について比較を行った。塩むすび、冷凍ベリー、野菜スティック、味付きとろろなど、両方法ともにある程度の汎用性の高さを示したが、実際の食中毒検体では食品中のウイルス量はごく微量であることから、今後は検出限界等について詳細な検証が必要である。

#### 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ションが広く、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。

汎用性の高い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) について、令和4年度本研究班にて、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ところ、冷凍ベリーなど一部の食品において、パンソルビン・トラップ法が苦手とする食材が存在することが示されたことから、パンソルビン・トラップ法に加えて、ISO15216-1:2017 にて示される PEG/NaCl を食品洗浄液に加えて遠心、沈殿させてウイルスを分離回収する手順 (PEG/NaCl 沈殿) と、パンソルビン・トラップ法で、複数の食品を対象に、両方法の汎用性について検討した。

また、福島県にて 2019 (令和元年) 年から 2022 年 (令和4年) の間に実施されたパンソルビン・トラップ法と細菌培養処理法の比較検証に関する報告書を入手し、両者の比較について調査した。

## B. 研究方法

### 1) 検体に供した食品

冷凍ベリー

野菜スティック

レタスサラダ

ネバネバサラダ (オクラ、メカブなど)

味付きとろろ

塩むすび

卵の花

ひじきの煮物

ポテトサラダ

食パン

ホットケーキ

刻みのり

### 2) 添加回収試験に用いたウイルス液

ノロウイルス GII ( $4.5 \times 10^4$  copies/5uL)

A 型肝炎ウイルス ( $6.0 \times 10^4$  copies/5uL)

Mengovirus ( $10^5$  copies/5uL 程度)

MS2 ( $12.5 \times 10^6$  copies/5uL)

ウイルスのコピー数は QIAcuity ONE (QIAGEN 社) デジタル PCR にて定量した数値より算出した。

ノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルスは原液あるいは、1000 倍希釈したウイルス液を各 5uL 食品に添加した。

Mengovirus および MS2 は工程管理ウイルスとして希釈せずに 5uL 添加した。

### 3) 食品処理手順

パンソルビン・トラップ法、および PEG/NaCl 沈殿の両法の概要を表 1 に示した。

### 4) RNA 抽出

食品処理後の核酸抽出は磁気ビーズ法により実施した。

### 5) リアルタイム PCR

核酸抽出後の RNA は、TaqMan Fast Virus 1-Step Master mix (ThermoFisher 社) にて 1 Step RT-qPCR を実施した。

### 6) 細菌培養処理法とパンソルビン・トラップ法の比較

令和元年、令和4年に福島県衛生研究所にて実施された「食品等からのウイルス濃縮法の検討」について、福島県衛生研究所年報の当該報告書を入手し分析した。

## C. 研究結果

### 1) パンソルビン・トラップ法 (高濃度ウイルス液添加)

高濃度のウイルス液（原液）を添加した場合の、試験回数と、陽性数、平均 Ct 値を表 2 に示した。

高濃度のウイルス液の添加回収試験ではノロウイルス、A 型肝炎ウイルスともにウイルスが回収されることが示されたが、A 型肝炎ウイルスを冷凍ベリーに添加した場合に、陽性率が 36/55 となったほか、ノロウイルスでも 41/44 と検出できない場合があることが示された。工程管理のために添加した Mengovirus は陽性率が低い結果となった。

## 2) パンソルビントラップ法（低濃度ウイルス液添加）

表 3 に 1000 倍希釈した低濃度ウイルス液による添加回収試験の結果を示した。

ノロウイルスが 45copies/5uL、A 型肝炎ウイルスが 60copies/5uL の添加となる。陽性率は冷凍ベリーでノロウイルス 63.2%、A 型肝炎ウイルス 36.8%と低下した。また、ネバネバサラダ、ポテトサラダ、ひじきの煮物、卵の花などの陽性率も低い結果となった。

## 3) ISO 法 ; PEG/NaCl 沈殿（高濃度ウイルス液添加）

パンソルビントラップ法との比較のために PEG/NaCl 沈殿を利用する ISO 法の手順で添加回収試験を実施した（表 4）。

パンソルビントラップ法では陽性率が低かった A 型肝炎ウイルスの陽性率も高い結果となった。工程管理のために添加した Mengovirus、MS2 ともに高い陽性率を示した。

## 4) ISO 法 ; PEG/NaCl 沈殿（低濃度ウイルス液添加）

添加回収試験の結果を表 5 に示した。

冷凍ベリーへの添加回収ではノロウイルス、A 型肝炎ウイルスともにパンソルビントラップ法より陽性率が高い結果となった。一方でネバネバサラダではウイルスを検出することができなかったが、塩むすびではすべての試行でウイルスを検出することが可能であった。

## 5) 福島県衛生研究所による細菌培養処理法とパンソルビントラップ法の比較

添加回収試験をノロウイルス（令和元年）、サポウイルス（令和 4 年）を用いて実施していた。模擬食品として表 6 に示す 10 品目を用いていた。福島県衛生研究所年報より、細菌培養処理法とパンソルビントラップ法による各食品からの検出状況について抜粋し、表 6 に示した。

ノロウイルスについては、パンソルビントラップ法では 10 品目のうち 4 品目からウイルス検出がされたのに対して、細菌培養処理法では 6 品目からウイルスが検出されていた。Ct 値については両方法で大きな差はないと思われた。

サポウイルスについては、パンソルビントラップ法で 10 品目のうち 1 品目でのみウイルス検出されたのに対して、細菌培養処理法では 10 検体でウイルス検出がされ、細菌培養処理法が優れていることが示唆された。

## D. 考察

本研究では、パンソルビントラップ法と ISO 法 (PEG/NaCl 沈殿) の食品処理方法の比較のみに焦点をあてるために、核酸抽出や RT-qPCR については手順を統一した。パンソルビントラップ法と ISO 法 (PEG/NaCl 沈殿

法)を比較したところ、両方法ともにさまざまな食品への処理法として利用できる可能性が示された。

食中毒事件における食品検査の際には、食品検体に含まれるウイルス量が微量であることが想定されるため、低濃度のウイルスの添加回収試験を実施した。ISO法が冷凍ベリー、塩むすびにおいて高い陽性率を示したのに対して、試行回数はまだ十分ではないが、とろろやネバネバサラダといった粘性の高い食材でウイルス検出がむずかしかった。

パンソルビントラップ法でも粘性の高い食品については陽性率は低いことから、今後これら粘性の高い食品への対応策を考慮する必要がある。

工程管理に用いるウイルスについては、ISO15216-1に示される Mengovirus は市販品も存在するが、パンソルビントラップ法では一貫して陽性率が低く工程管理に用いることが難しいと考えられた。代替のウイルスとして、大腸菌ファージの一種で、水質検査のISO法などで利用されるMS2を用いたところ、パンソルビントラップ法で工程管理に用いることが可能と示唆された。

ISO法(PEG/NaCl沈殿)では、Mengovirus、MS2ともにパンソルビントラップ法よりも良好に回収された。パンソルビントラップ法によるウイルス回収が使用するガンマグロブリンの性能に依存するためと考えられたが、流通する製品ロットが1ロットとなっており、ロット間の差を比較することが不可能となっている。今後国内で試験研究目的での使用可能な他のガンマグロブリン試薬について検討することも新たな課題となった。

福島県衛生研究所にて実施された研究報告によるとパンソルビントラップ法よりも細菌培養処理法のほうがノロウイルス、サポウイルスとともにウイルス検出の成績に優れていることが報告されている。令和5年度本研究で実施した検討と、福島県衛生研究所で実施した検討に用いたウイルス、核酸抽出試薬、PCR試薬等が同一でないため単純な比較はできないが、細菌培養処理法も汎用性の高い処理法の一つとして有用な処理法であると考えられる。

## E. 結論

パンソルビントラップ法はその原理から汎用性の高さ、検出感度の高さが期待されるが、冷凍ベリーや葉物野菜を対象としてISO法(PEG/NaCl沈殿)も、パンソルビントラップ法と同様に汎用性が高い可能性が示された。

とろろや、オクラ・メカブ等が材料となる粘性の高いネバネバサラダなどの食品については、ISO法、パンソルビントラップ法ともにウイルス検出率が低くなるため、改良が必要と思われる。

現時点ではあらゆる食品に対応するにはいくつかの処理法を実施できるほうが食中毒検査に柔軟に対応できると考えられる。

貴重なデータ報告の情報を提供いただいた福島県衛生研究所の齋藤先生に感謝いたします。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表

1) Recent situation of foodborne viruses in Japan. Mari Tohya, Masashi Uema. UJNR 55<sup>th</sup> Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting (2023. 08. 08), 米国

2) パンソルビン・トラップ法により給食材料からノロウイルスが検出された食中毒の一例. 斎藤博之, 秋野和華子\*, 野田衛、上間匡. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会 (2023. 09. 21)

3) 冷凍ベリーからのウイルス検出法の検討. 上間匡, 南村幸世, 斎藤博之, 秋野和華

子. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会 (2023. 09. 21)

4) 近年の試薬の供給状況を反映したパンソルビン・トラップ法プロトコールのアップデート. 斎藤博之, 秋野和華子\*, 野田衛、上間匡. 第 70 回日本ウイルス学会学術集会 (2023. 09. 26)

#### G. 知的財産権の出願・登録

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表 1. 食品処理方法の概要

|       |                                                         |                                                              |
|-------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|       | パンソルビントラップ法                                             | ISO15216-1 (PEG/NaCl 沈殿)                                     |
| 食品検体量 | 10g                                                     | 25g                                                          |
| 食品洗浄液 | 50mL<br>(Tris-HCl/NaCl/Tween20)、<br>ガンマグロブリン、<br>パンソルビン | 40mL<br>(Glycine/Tris/beef extract<br>buffer)<br>PEG<br>NaCl |
| 遠心条件  | 3,000 rpm, 20min                                        | 10,000xg, 30min, 4°C                                         |

表 2. ウイルス検出率 (パンソルビントラップ法、高濃度)

ノロウイルス GII ( $4.5 \times 10^4$  copies/5uL)、A 型肝炎ウイルス (HAV ( $6.0 \times 10^4$ /5uL)), Mengovirus ( $10^5$  copies/5uL 程度), MS2 ( $12.5 \times 10^6$  copies/5uL)

|         | ノロウイルス                     | A 型肝炎ウイルス                  | Mengo                      | MS2                        |
|---------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 冷凍ベリー   | 41/44 (93.2%)<br>Ct 値 29.0 | 36/50 (72.0%)<br>Ct 値 29.3 | 10/50 (20.0%)<br>Ct 値 37.6 | 30/34 (88.2%)<br>Ct 値 33.7 |
| 塩むすび    | 33/34 (97.1%)<br>Ct 値 29.1 | 34/34<br>Ct 値 29.5         | 10/34 (29.4%)<br>Ct 値 35.5 | 21/21<br>Ct 値 32.3         |
| 野菜スティック | 23/23<br>Ct 値 29.1         | 23/23<br>Ct 値 26.9         | 9/23 (39.3%)<br>36.4       | 16/16<br>Ct 値 33.2         |
| 刻みのり    | Not tested                 | 3/3<br>Ct 値 30.6           | 0/3                        | Not tested                 |
| 食パン     | Not tested                 | 9/9<br>Ct 値 29.1           | 5/9 (55.6%)<br>Ct 値 33.8   | Not tested                 |
| ひじきの煮物  | 3/3<br>Ct 値 35.1           | 4/4<br>Ct 値 32.8           | 0/4                        | Not tested                 |
| ホットケーキ  | 3/4 (75.0%)<br>CT 値 24.7   | 4/4<br>Ct 値 32.3           | 0/4                        | Not tested                 |
| 卵の花     | 2/2<br>Ct 値 31.8           | 4/4<br>Ct 値 30.5           | 0/4                        | Not tested                 |
| ネパネバサラダ | 4/4<br>Ct 値 36.8           | Not tested                 | Not tested                 | Not tested                 |

表 3. ウイルス検出率（パンソルビントラップ法、低濃度）

ノロウイルス GII(45 copies/5uL)、A 型肝炎ウイルス (HAV(60 copies/5uL)), Mengovirus (10<sup>5</sup>copies/5uL 程度), MS2 (12.5x10<sup>6</sup> copies/5uL)

|         | ノロウイルス                     | A 型肝炎ウイルス                 | Mengo        | MS2        |
|---------|----------------------------|---------------------------|--------------|------------|
| 冷凍ベリー   | 12/19 (63.2%)<br>Ct 値 37.1 | 9/17 (36.8%)<br>Ct 値 36.9 | 3/15<br>39.3 | Not tested |
| ネバネバサラダ | 3/25(12%)<br>Ct 値 37.7     | 1/25 (4%)<br>Ct 値 37.9    | 0/25         | Not tested |
| ポテトサラダ  | 1/3 (33.3%)<br>Ct 値 37.0   | 2/3 (66.7%)<br>Ct 値 35.5  | 1/3<br>36.7  | Not tested |
| ひじきの煮物  | 0/4 (0%)                   | 1/4 (25.0%)<br>Ct 値 38.9  | 0/4          | Not tested |
| 卵の花     | 1/4 (25.0%)<br>Ct 値 37.0   | 1/4 (25.0%)<br>Ct 値 36.9  | 0/4          | Not tested |

表 4. ウイルス検出率（ISO 法、高濃度）

ノロウイルス GII(4.5x10<sup>4</sup>copies/5uL)、A 型肝炎ウイルス (HAV(6.0x10<sup>4</sup>/5uL)), Mengovirus (10<sup>5</sup>copies/5uL 程度), MS2 (12.5x10<sup>6</sup> copies/5uL)

|         | ノロウイルス                    | A 型肝炎ウイルス                  | Mengo              | MS2                |
|---------|---------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|
| 冷凍ベリー   | 21/21 (100%)<br>Ct 値 29.0 | 30/31 (96.8%)<br>Ct 値 28.0 | 39/39<br>Ct 値 31.6 | 17/17<br>Ct 値 26.9 |
| 野菜スティック | 8/8<br>Ct 値 27.9          | 8/8<br>Ct 値 28.4           | 8/8<br>Ct 値 30.5   |                    |
| 茄子      |                           | 8/8<br>Ct 値 29.0           | 8/8<br>Ct 値 33.7   |                    |
| レタスサラダ  | 7/7<br>Ct 値 25.5          | 7/7<br>Ct 値 27.5           | 7/7<br>Ct 値 29.8   | 3/3<br>Ct 値 23.9   |

表 5. 表 3. ウイルス検出率 (ISO 法、低濃度)

ノロウイルス GII(45 copies/5uL)、A 型肝炎ウイルス (HAV(60 copies/5uL)), Mengovirus (10<sup>5</sup>copies/5uL 程度), MS2 (12.5x10<sup>6</sup> copies/5uL)

|         | ノロウイルス                     | A 型肝炎ウイルス                  | Mengo              | MS2                |
|---------|----------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|
| 冷凍ベリー   | 36/48 (75.0%)<br>Ct 値 32.9 | 32/52 (61.5%)<br>Ct 値 34.2 | 52/52<br>Ct 値 32.9 | 36/36<br>Ct 値 26.6 |
| ネバネバサラダ | 0/2                        | 0/2                        | 0/2                | 2/2<br>Ct 値 37.8   |
| 味付きとろろ  | 0/4                        | 1/4 (25.0%)<br>Ct 値 35.2   | 4/4<br>Ct 値 36.0   | 4/4<br>Ct 値 29.9   |
| 塩むすび    | 4/4<br>Ct 値 36.1           | 4/4<br>Ct 値 34.5           | 4/4<br>Ct 値 33.4   | 4/4<br>Ct 値 23.7   |

表 6. 細菌培養処理法とパンソルビントラップ法の比較 (福島県衛生研究所年報より抜粋して作成) 数値は Ct 値

|                         | 細菌増殖処理法     |        | パンソルビントラップ法 |        |
|-------------------------|-------------|--------|-------------|--------|
|                         | GI Ⅱ ノロウイルス | サポウイルス | GI Ⅱ ノロウイルス | サポウイルス |
| 焼きそば                    | 37.1        | 36.2   | 38.7        | 40.4   |
| 食パン                     | 36.6        | 39.9   | ND          | ND     |
| メンチカツ                   | 39.4        | 36.7   | 39.7        | ND     |
| 刺身 (マグロ、サーモン)<br>まぐろすき身 | ND          | 39.7   | ND          | ND     |
| ミックスサラダ                 | ND          | 36.5   | ND          | ND     |
| 加熱調理済みカット野菜             | 38.4        | 38.9   | 38.7        | ND     |
| ワラビとゼンマイの煮物             | 38.5        | 37     | ND          | ND     |
| サバの水煮                   | 39          | 38.6   | 39.6        | ND     |
| おかゆ                     | ND          | 37.7   | ND          | ND     |
| 焼き海苔                    | ND          | 36.7   | ND          | ND     |

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」

分担報告書

### ウイルス検出法への NGS 導入に関する研究

研究分担者 遠矢真理 国立医薬品食品衛生研究所

#### 研究要旨

食中毒事件発生時に、原因究明を迅速かつ精確に行うことは極めて重要であり、次に起こりうる食中毒を防止するためにも寄与する。

食中毒の原因となるウイルスを食品中から検出できたのちに、食品から検出されたウイルスと患者検体から検出されたウイルスの遺伝子配列を比較することは、科学的根拠としてより精確な情報を提示できるが、現在はウイルスの核酸検出のみが基本的に行われており、遺伝子配列の解析まではまだ整備されていない。

本研究では、次世代シーケンサー（NGS）の中でも迅速性に優れている Nanopore 社のシーケンサーを用いた検討を行うことにした。また NGS を用いた疫学調査が実装化し始めている下水検体を用いてノロウイルスをターゲットにした研究を行うことで、効率的に食中毒事例での実用化を目標とした検討を行うことにした。

#### A. 研究目的

食中毒の原因となった病原体を食品や環境サンプルから迅速かつ精確に検出することは、食中毒事件解決のための科学的根拠となり重要である。さらに将来に向けた食中毒防止に向けた対策へ寄与する。

現在のウイルス性食中毒の調査においては、主に原因ウイルス核酸をリアルタイム PCR 等での検出が行われ、原因の特定や汚染ルートの調査推定が行われている。

近年、遺伝子配列解析技術の発展から病原体解析において次世代シーケンサー（NGS）の導入が盛んに試みられている。ウイルス病原体についても同様であり、代表的な例としては下水由来のウイルス配列の NGS での解析が挙げられる。この解析ではウイルス遺伝子

の検出とウイルスの配列情報を合わせて解析することで、食中毒等での探知よりも前の病原体探知や遺伝子変異による流行株の早期検出が可能となっている。また迅速性の高さと導入のしやすさという利点から、Nanopore 社の NGS 技術は注目を集めている。

そこで本研究では、食品からの原因ウイルスの遺伝子配列解析を目標とし、まずは下水を使ってノロウイルスの疫学調査を実施し、現時点での環境サンプルからのウイルス回収と解析に関する改善点や問題点の確認を行うことにした。NGS は Nanopore 社の Flongle を用いて行うことにした。

#### B. 研究方法

##### 1) 供試検体

秋田市内の下水処理場に

て2019年1月～2022年12月の期間で流入水を毎月採取し、本研究に用いた。

## 2) ウイルスの濃縮法

下水検体40mlにPEG 6000およびNaClを3.2gヌクレオ酸の抽出を行った。

## 3) ウイルス核酸の抽出法

上記PEG沈殿法で沈渣を収集後、自動核酸抽出機器Maxwell1R (Promega社)と抽出試薬Maxwell1R RSC Viral Total Nucleic Acid (Promega社)を用いて核酸抽出を行った。

## 4) リアルタイムPCR法

TaqMan™ Fast virus 1-step master mix (Thermo Fisher Scientific社)を用いて、国立感染症研究所の病原体検出マニュアルノロウイルス(第1版)に従って行った。

## 5) NGS

抽出したウイルス核酸はPrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis KitでcDNA合成を行い、国立感染症研究所の病原体検出マニュアルノロウイルス(第1版)に従ってnested PCRを行った。その後Oxford Nanopore Technologies社のNGS調整試薬SQK-PBK004kitを用いて、ライブラリ調整を行い、フローセルはFlongleを用いて遺伝子配列の取得を行った。取得した遺伝子配列はV-Nus Net toolを用いて解析を行った。

## C. 研究結果

リアルタイムPCRでは、2019年11月、2020年9月、2021年9月および11月、2022年12月の検体ではGIおよびGII共にノロウイルスは検出されなかったが、それ以外の月ではどちらか一方、もしくは両方が検出された(図1)。

NGSを用いた遺伝子配列解析では、GIは毎年

ずつ加え、4℃で一晩回転させながら反応させた。その後、4℃で12,000g、30分間遠心させて沈渣からウイル

2-5種類の遺伝子型が検出されており(表1-1)、GIIは毎年5-6種類の遺伝子型が検出された。(表1-2)。

## D. 考察

本来の流行季節ではない夏季においても下水サンプルからノロウイルスが検出された。

NGSを用いた遺伝子配列の解析から、GIではGI.3およびGI.6が、GIIでは、GII.2, GII.4, GII.6およびGII.17が毎年検出されることが明らかとなった。一方で、Flongleからの排出されたリード情報を遺伝子型別ソフトで解析するだけでは、ウイルス株の多様性については明らかにすることができない。

また本研究では解析領域を350bp程度に限定しているが、ノロウイルスはORF1のPolymerase領域とORF2のN/S領域を合わせたDual typingを行うことが推奨されている。解析領域を長くすることで、さらに詳細なウイルス解析が可能となる。新たなNGS技術が将来的には食中毒原因ウイルスの調査の科学的根拠を提示するうえで重要な手法となると考えられるが、その一方で試薬や機器のアップデートが早く、手技の変更が求められる場合もあるため検査現場でのマニュアル化が難しい側面もある。

## E. 結論

本研究で用いた方法により、下水からの流行株の配列解析を実施することが可能であり、有用であることが確認できた。今後は

NGS から排出されるリード情報の多様性を詳細に解析していくとともに、解析領域を 350 bp 程度から 7000bp とノロウイルスの遺伝子配列の全長に近い長さまで増やすことや Dual typing の導入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

1) NGS を活用した下水疫学調査によるノロウイルスの流行状況の把握 遠矢真理，南村幸世，國吉杏子，秋野和華子，斎藤博之，上間匡. 日本食品衛生学会，2023. 11. 東京

G. 知的財産権の出願・登録

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

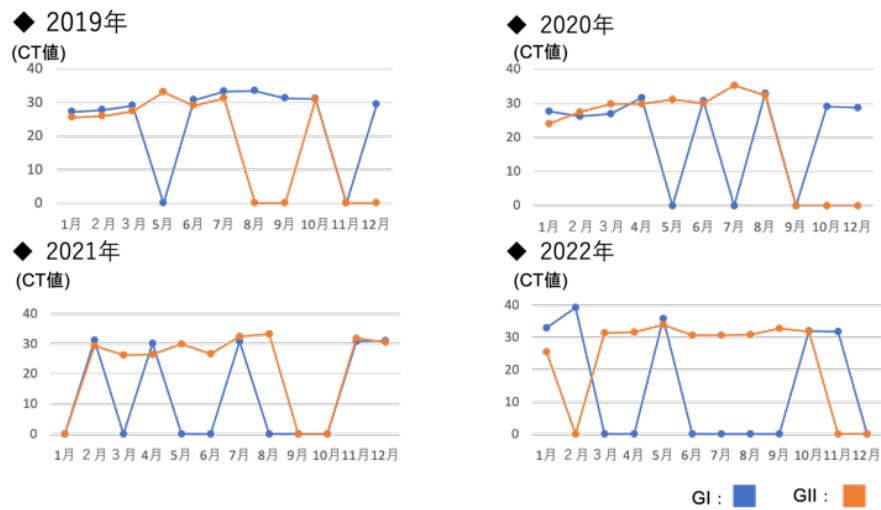


図1. ノロウイルスGIおよびGIIのリアルタイムPCRによる検出成績

表 1. NGS で検出されたノロウイルスの遺伝子型

1-1. GI タイプ

| 年 \ 月 | 1                      | 2                      | 3                      | 4    | 5             | 6 | 7    | 8    | 9             | 10            | 11   | 12   |
|-------|------------------------|------------------------|------------------------|------|---------------|---|------|------|---------------|---------------|------|------|
| 2019  | I. 2,<br>I. 3,<br>I. 6 | I. 2,<br>I. 3,<br>I. 4 | I. 2,<br>I. 3,<br>I. 4 | —    | —             | — | —    | —    | I. 2,<br>I. 3 | I. 2,<br>I. 3 | —    | I. 3 |
| 2020  | I. 3,<br>I. 6          | I. 3,<br>I. 6          | I. 3                   | I. 2 | —             | — | I. 6 | I. 4 | —             | —             | —    | I. 2 |
| 2021  | —                      | I. 3,<br>I. 4          | —                      | —    | I. 3,<br>I. 6 | — | —    | —    | —             | —             | I. 6 | I. 3 |
| 2022  | I. 2,<br>I. 6          | I. 6                   | —                      | I. 4 | I. 3,<br>I. 5 | — | —    | —    | —             | —             | I. 3 | —    |

1-2. GII タイプ

| 年 \ 月 | 1                                    | 2                                    | 3                                    | 4                          | 5                | 6     | 7               | 8               | 9                | 10                         | 11 | 12    |
|-------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|------------------|-------|-----------------|-----------------|------------------|----------------------------|----|-------|
| 2019  | II. 2,<br>II. 3,<br>II. 4,<br>II. 17 | II. 2,<br>II. 4,<br>II. 17           | II. 2,<br>II. 4,<br>II. 17           | —                          | II. 2,<br>II. 4  | —     | II. 3,<br>II. 6 | —               | II. 2,<br>II. 17 | II. 17                     | —  | —     |
| 2020  | II. 17                               | II. 2,<br>II. 4,<br>II. 6,<br>II. 17 | II. 2,<br>II. 4,<br>II. 6,<br>II. 17 | II. 2,<br>II. 8,<br>II. 17 | II. 4,<br>II. 17 | II. 2 | —               | II. 2,<br>II. 6 | —                | II. 17,<br>II. 2,<br>II. 4 | —  | II. 2 |

|      |                           |                                                |                  |       |                                        |                     |   |            |            |                                        |                                        |                     |
|------|---------------------------|------------------------------------------------|------------------|-------|----------------------------------------|---------------------|---|------------|------------|----------------------------------------|----------------------------------------|---------------------|
| 2021 | –                         | II. 2,<br>II. 17                               | II. 2,<br>II. 17 | II. 2 | II. 2<br>,<br>II. 4<br>,<br>II. 1<br>7 | II. 2<br>,<br>II. 3 | – | II. 1<br>7 | II. 1<br>0 | –                                      | II. 2<br>,<br>II. 4<br>,<br>II. 1<br>0 | II. 6               |
| 2022 | II. 3,<br>II. 4,<br>II. 6 | II. 2,<br>II. 3,<br>II. 4,<br>II. 6,<br>II. 17 | II. 2            | II. 4 | II. 1<br>7                             | –                   | – | –          | II. 4      | II. 2<br>,<br>II. 6<br>,<br>II. 1<br>7 | II. 2                                  | II. 2<br>,<br>II. 4 |

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」

分担報告書

## メタゲノム解析を用いた食品からのウイルス検出法に関する検討

研究分担者

元岡 大祐

大阪大学微生物病研究所

### 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。ヒトノロウイルスなど、食中毒の原因と考えられるウイルスの場合は、リアルタイム PCR など従来法によって検出することが可能であるが、これらの一般的な検査で、すべての病原体が陰性であった場合には、網羅的な病原体検出が必要である。そこで本分担研究では、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の開発を行う。メタゲノム解析によるウイルス検出は、ヒトの臨床検体中では用いられる事例が増えてきたが、食品中の場合は付着しているウイルス量は極微量であり、食品から抽出された核酸の大部分を占める食品由来ゲノムにより、ウイルス検出感度が著しく低下すると考えられる。そこで、メタゲノム解析に適した食品からの効率的なウイルス核酸の抽出方法の適用、開発が必須である。従来より、汎用性・検出感度の高い食品処理法サンプルとして、パンソルビントラップ法が開発されており、本手法がメタゲノム解析でも有効であるかを検証した。

### 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。ヒトノロウイルス（HuNoV: Human Norovirus）など、食中毒の原因となりやすいウイルスの場合は、リアルタイム PCR など効率的な検出が可能であるが、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。また、標的外のウイルスの場合は原因不明となるため、標的病原体以外については、網羅的な病原体検出法の確立も必要である。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れると考えられる。これまでの取り組みにおいて、パンソルビントラップ法により回収した核酸に対してメタゲノム解析を行うことで、食品に付着した病原体が検出できることを示してきた。しかし、ウイルス以外の核酸配列がリード

の大部分を占めており、より感度を上げるための核酸抽出方法、ライブラリ調製方法を検討することを目的とする。

## B. 研究方法

ウイルスが付着した食品から、パンソルビントラップ法により回収した核酸のメタゲノム解析では、得られたシーケンスデータの大半が黄色ブドウ球菌由来であった。そこで本年度は、ウイルス検出目的としては不要な核酸をどのように減らし、ウイルス検出感度を上げるかという取り組みを行った。

### 1. DNA 除去法の検討

ウイルスが付着した食品から、パンソルビントラップ法により核酸を抽出した場合、食品の素材となる生物のゲノム DNA に加え、パンソルビントラップ法に用いた黄色ブドウ球菌の DNA、ウイルス由来核酸が主たる構成成分であると考えられる。そこで、DNaseI にて残存 DNA を除去することで、ウイルス検出感度が上げられないか検討した。食品となるサンプルとしてミックスベリーを用意した。ウイルスとしては、猫カリシウイルス (feline calicivirus; FCV)、Mengovirus、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)。パンソルビントラップ法により抽出した核酸に対して DNaseI で処理した後、RamDA-Seq 法による cDNA 合成・増幅、NexteraXT ライブラリ調製キットによる NGS ライブラリ化を行っ

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い、DNaseI 未処理の結果と比較した。

### 2. パンソルビントラップ法以外の手法との感度比較

DNaseI 処理では、黄色ブドウ球菌由来配列を減らすことができなかったことから、パンソルビン・トラップ法以外の RNA 抽出方法がメタゲノム解析には適している可能性を考慮し、FDA 法、ISO 法による抽出核酸と比較検討した。食品となるサンプルとして冷凍ベリー、きゅうり、レタスを用意した (表 3)。またその場合、パンソルビントラップ法によるウイルス濃縮の効果は期待できなくなるため、抽出済み核酸中に含まれるウイルス配列を Twist 社の Twist Comprehensive Viral Research Panel を使い濃縮する試みも行った。

## C. 研究結果

### 1. DNA 除去法の検討

DNaseI 処理の有無で、メタゲノムデータ中のウイルス由来のリード数の割合がどのように変化について表 3 にまとめた。

予想に反して DNaseI 処理を行っても黄色ブドウ球菌由来のリード数の割合は全く減らなかった。またウイルス由来のリード数も改善しなかった。

### 2. パンソルビントラップ法以外の手法との感度比較

各サンプルから抽出された RNA を用いて、メタゲノム解析で検出されたウイルスリード数を比較した(表 4)。冷凍ベリーときゅうりでは、ISO 法の場合にパンソルビントラップ法よりも多くのウイルス由来核酸配列を検出できた。しかし、レタスではウイルス由来配列は減っており、ISO 法がパンソルビントラップ法より一般的に優れているとは言い難い結果であった。また FDA 法もパンソルビン・トラップ法や ISO 法と比べて改善が見られなかった。

一方で、これらの抽出 RNA に対してウイルスターゲットシーケンスを行った場合には、表 5 に示すようにいずれの食品においても、パンソルビントラップ法よりも ISO 法や FDA 法で抽出した核酸を用いた方がターゲットとするウイルスをよく検出できることがわかった。

#### D. 考察

パンソルビントラップ法は、食品に付着したウイルスの核酸を得る方法としては有用であることは以前からも示されており、実際に本研究で行った網羅的な RNA シーケンスの結果でも、ISO 法や FDA 法の方がいいとは言い難い結果であった。しかし、パンソルビントラップ法に用いる黄色ブドウ球菌がメタゲノム解析では感度低下という負の影響を及ぼしていることも間違いない。そこで今回、ISO 法や FDA 法といった一見すると検出感度が落ちる方法を用いつつ、RNA 抽出後にウイルス濃縮プローブを用いてウイルス核酸を濃縮することで、20~400 倍程度の感度向上を達成した。

#### E. 結論

食品に対して、メタゲノム解析を用いたウイルス検出を行う場合は、存在する核酸すべてを解析してしまうという特性上、パンソルビントラップ法を用いない方法を用いて RNA を抽出することで効率的な網羅的ウイルス検出ができることがわかった。今後は、実際の食中毒事件での実用化にむけ、検出限界の検討およびポータブル NGS の適用について検討を進めたい。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表：

- 1) Miyata R, Miyabe C, Oki H, Motooka D, Nakamura S, Miyabe Y, Takenaka Y, Fukuya Y, Yudo K, Ishiguro N. Alteration of microbial composition in the skin and blood in vasculitis. Sci Rep. 2023, 13(1):15317

##### 2. 学会発表：

- 1) 大阪大学微生物病研究所ゲノム解析室における研究支援と共生微生物研究，元岡大祐，日本生化学学会大会，2023.11，福岡

#### 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. サンプルと添加したウイルス

|    | 食品      | 添加ウイルス              |
|----|---------|---------------------|
| #1 | 水       | Mengo, HAV, GI, GII |
| #2 | 食品洗浄液   | FCV, Mengo, HAV     |
| #3 | 食品洗浄液   | Mengo, HAV, GI, GII |
| #4 | ミックスベリー | Mengo, HAV, GI, GII |

表 2. サンプルと添加したウイルス

|    | 食品   | 抽出法   | 添加ウイルス          |
|----|------|-------|-----------------|
| #1 | ベリー  | パントラ  | HAV, GII, Mengo |
| #2 | ベリー  | ISO 法 | HAV, GII, Mengo |
| #3 | ベリー  | FDA 法 | HAV, GII, Mengo |
| #4 | きゅうり | パントラ  | HAV, GII, Mengo |
| #5 | きゅうり | ISO 法 | HAV, GII, Mengo |
| #6 | レタス  | パントラ  | HAV, GII, Mengo |
| #7 | レタス  | ISO 法 | HAV, GII, Mengo |

表 3. DNA 除去効率の比較結果

|    | 処理法    | FCV   | Mengo | HAV   | Noro (GI) | Noro (GII) | 黄色ブドウ球菌 |
|----|--------|-------|-------|-------|-----------|------------|---------|
| #1 | 非処理    | 0.00% | 1.77% | 0.87% | 2.76%     | 2.02%      | 0.70%   |
|    | DNaseI | 0.00% | 0.05% | 0.04% | 0.11%     | 0.09%      | 0.02%   |
| #2 | 非処理    | 0.00% | 0.03% | 0.01% | 0.01%     | 0.01%      | 34.36%  |
|    | DNaseI | 0.00% | 0.05% | 0.02% | 0.00%     | 0.00%      | 39.44%  |
| #3 | 非処理    | 0.00% | 0.01% | 0.00% | 0.02%     | 0.01%      | 33.30%  |
|    | DNaseI | 0.00% | 0.01% | 0.00% | 0.01%     | 0.00%      | 39.20%  |
| #4 | 非処理    | 0.00% | 0.03% | 0.01% | 0.05%     | 0.02%      | 16.81%  |
|    | DNaseI | 0.00% | 0.06% | 0.02% | 0.08%     | 0.03%      | 25.56%  |

#1 はコントロール用の水について、パンソルビントラップ法を用いずに抽出したため、黄色ブドウ球菌の割合については評価しない。

黒色で網掛けをしたセルは、添加していないウイルスのため評価しない

表 4. メタゲノム解析で得られたウイルスリード数(1000 万リードあたり)

|    | 食品   | 抽出法   | HAV | Noro | Mengo |
|----|------|-------|-----|------|-------|
| #1 | ベリー  | パントラ法 | 2   | 3    | 7     |
| #2 | ベリー  | ISO 法 | 1   | 56   | 136   |
| #3 | ベリー  | FDA 法 | 18  | 6    | 82    |
| #4 | きゅうり | パントラ法 | 0   | 1    | 3     |
| #5 | きゅうり | ISO 法 | 40  | 37   | 135   |
| #6 | レタス  | パントラ法 | 135 | 71   | 230   |
| #7 | レタス  | ISO 法 | 74  | 60   | 180   |

表 5. ウイルス標的メタゲノム解析で得られたウイルスリード数(1000 万リードあたり)

|    | 食品   | 抽出法   | HAV   | 濃縮率<br>(HAV) | Noro   | 濃縮率<br>(Noro) | Mengo  | 濃縮率<br>(Mengo) |
|----|------|-------|-------|--------------|--------|---------------|--------|----------------|
| #1 | ベリー  | パントラ法 | 54    |              | 57     |               | 58     |                |
| #2 | ベリー  | ISO 法 | 1,694 | 31 倍         | 23,087 | 405 倍         | 15,768 | 272 倍          |
| #3 | ベリー  | FDA 法 | 1,480 | 27 倍         | 2,021  | 35 倍          | 10,467 | 180 倍          |
| #4 | きゅうり | パントラ法 | 233   |              | 188    |               | 75     |                |
| #5 | きゅうり | ISO 法 | 9,344 | 40 倍         | 20,186 | 107 倍         | 16,365 | 218 倍          |
| #6 | レタス  | パントラ法 | 73    |              | 117    |               | 59     |                |
| #7 | レタス  | ISO 法 | 1,582 | 22 倍         | 12,669 | 108 倍         | 14,516 | 246 倍          |

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 国立感染症研究所ウイルス第三部  
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、2018 年から 2023 年までに検出された遺伝子群・遺伝子型別 NoV 検出・報告状況に関する研究を行った。まずこの間において、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。2020 年に新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の出現後、多くの遺伝子型の NoV の検出件数は減少した。しかし、その後、特に当該感染症の 5 類以降後は、GII. 4 を主体に NoV の検出数が COVID-19 出現前の水準に戻っていたことが示唆された。

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。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 6 年間に本邦で検出・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 年と 2021 年は、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。その一方で、2022 年以降 GII. 4 を主体とした GII・NoV の検出数が増加していた。

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 年以降、この傾向が顕著であった。また、GII. 4 や GII. 2 以外の遺伝子型、例えば GII. 7 の検出数も増加していることが示唆された。既報によれば、COVID-19 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、2023 シーズンにおいては、AH1, AH3 型のみならず 2024 年初頭から B 型の大規模な患者数の増加が見られ、警報値（10 人/定点）を超える流行が 5 か月以上続いた。また、2021 年以降、RS ウイルス感染症の流行も起こり、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。

## E. 結論

本邦における過去 6 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、本調査期間において、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 年と 2021 年は、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が、その後、COVID-19 出現前の検出水準に戻りつつある。したがって、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。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Takahashi T, Kimura R, Shirai T, Sada M, Sugai T, Murakami K, Harada K, Ito K, Matsushima M, Mizukoshi F, Okayama K, Hayashi Y, Kondo M, Kageyama T, Suzuki Y, Ishii H, Ryo A, Katayama K, Fujita K, Kimura H. Molecular Evolutionary Analyses of the RNA-Dependent RNA Polymerase (*RdRp*) Region and *VPI* Gene in Human Norovirus Genotypes GII.P6–GII.6 and GII.P7–GII.6. *Viruses*. 2023 Jul; 15(7): 1497.

### 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. 2018年から2023年までに本邦で検出された遺伝子群・遺伝子型別NoV

|         | 2018 | 2019 | 2020 | 2021 | 2022 | 2023 |
|---------|------|------|------|------|------|------|
| GI. 1   | 2    | －    | 1    | 1    | 1    | －    |
| GI. 2   | 54   | 49   | 1    | 2    | －    | 2    |
| GI. 3   | 25   | 2    | 2    | －    | 3    | 5    |
| GI. 4   | 19   | 2    | 28   | 11   | －    | －    |
| GI. 5   | 5    | 1    | 5    | 1    | 1    | －    |
| GI. 6   | 9    | 19   | －    | 11   | 2    | 3    |
| GI. 7   | 40   | 6    | 1    | 1    | －    | 2    |
| GI. 9   | 1    | －    | －    | －    | －    | －    |
| GII. 1  | 5    | 7    | 1    | －    | －    | －    |
| GII. 2  | 634  | 368  | 215  | 353  | 128  | 222  |
| GII. 3  | 72   | 251  | 42   | 16   | 16   | 54   |
| GII. 4  | 478  | 531  | 267  | 249  | 329  | 466  |
| GII. 5  | 2    | －    | －    | －    | －    | －    |
| GII. 6  | 47   | 93   | 27   | 8    | 1    | 25   |
| GII. 7  | 6    | －    | －    | －    | －    | 38   |
| GII. 8  | 3    | 11   | 1    | －    | 1    | －    |
| GII. 10 | －    | 4    | －    | －    | －    | －    |
| GII. 12 | －    | －    | －    | －    | －    | －    |
| GII. 13 | 2    | －    | 1    | －    | －    | 1    |
| GII. 14 | 1    | 2    | 2    | －    | －    | －    |
| GII. 16 | －    | －    | －    | －    | －    | 3    |
| GII. 17 | 140  | 67   | 70   | 42   | 21   | 18   |
| GII. 22 | －    | －    | －    | 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」

分担報告書

### 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  | 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 |
|       | 横田翔太  | 東京都健康安全研究センター ウイルス研究科 |
|       | 黒木絢士郎 | 東京都健康安全研究センター ウイルス研究科 |
|       | 赤瀬 悟  | 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きたが、2023年5月、新型コロナウイルス感染症が5類定点疾患となって以降、再び増加傾向にある。東京都においては、2021年4月より食中毒事例688事例中206事例（29.9%）の胃腸炎発症者からウイルスを検出した。ノロウイルスを原因とする事例は202事例（98.1%）、サポウイルスは4事例（1.9%）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.4は86事例（53.7%）と最も多く、GII.2が46事例（28.7%）、GII.17は14事例（8.7%）であった。さらに、食中毒検査を目的に搬入された874検体の食品についてウイルス検査を実施し、ノロウイルスは4検体で検出された。

#### 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2024年2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2024年2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688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

688 事例中 206 事例（29.9%）の胃腸炎発症者の糞便材料からウイルスを検出した（表 1）。検出したウイルスは，ノロウイルスが 202 事例（98.1%），サポウイルスが 4 事例（1.93%）であった。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，GI が 18 事例，GII が 160 事例であり，GII の中では GII.4 が 86 事例（53.8）と最も多く，GII.2 は 46 事例（28.8），GII.17 は 14 事例（8.8）であった。これらの中で，GII.4 および GII.2 は比較的満遍なく検出された（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 874 検体の食品からのウイルス検出を試み，4 検体からノロウイルスが検出された（表 2）。3 検体は二枚以外から nested-realtime PCR のみでの検出で遺伝子型は不明，1 検体はフルーツからの検出で（Ct 値 33.8），遺伝子型は GII.4[P16]であった。

## 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

べ著しく減少していたが，2023 年には増加し（図 2），食中毒患者数においても同様の傾向が認められている（図 3）。

今後は，ヒト iPS 細胞を用いたノロウイルス分離法について検討していく予定である。

## E. 結論

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きたが，新型コロナウイルス感染症が 5 類定点疾患となって以降，再び増加傾向にある。東京都においては，2021 年 4 月より食中毒事例 688 事例中 206 事例

（29.9%）の胃腸炎発症者からウイルスを検出した。ノロウイルスを原因とする事例は 202 事例（98.1%），サポウイルスは 4 事例（1.9%）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.4 は 86 事例（53.7%）と最も多く，GII.2 が 46 事例（28.7%），GII.17 は 14 事例（8.7%）であった。さらに，食中毒検査を目的に搬入された 874 検体の食品についてウイルス検査を実施し，ノロウイルスは 4 検体で検出された。

今後，ヒト iPS 細胞を用いたノロウイルス分離法について検討していく予定である。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表：

- 1) 村上 昂，2022 年の全国及び東京都における食中毒発生状況，東京都微生物検査情報，44，1-3，2023
- 2) 浅倉弘幸，東京都における胃腸炎起因ウ

- イルスの検出状況(2022/23 シーズン),  
東京都微生物検査情報, 44, 4-7, 2023
- 3) 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), 東京健安研セ年報, 73, 123-130, 2022
- 4) 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), 東京健安研セ年報, 73, 101-107, 2022
2. 学会発表
- 1) 浅倉弘幸, 横田翔太, 磯貝まや, 林志直, 永野美由紀, 藤原卓士, 三宅啓文, 長島真美, 貞升健志: 東京都内で発生したノロウイルス食中毒事例における全長遺伝子解析, 日本食品微生物学会, 2023年9月21日(木)~9月22日(金)(大阪市)
- 2) 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～2024年2月）

|     | 検出ウイルス    |        |
|-----|-----------|--------|
| 事例数 | ノロウイルス    | サポウイルス |
| 688 | 202（98.1） | 4（1.9） |

表2. 食品検査検体の内訳とノロウイルス検査陽性数

|      | 搬入数 | 陽性数（遺伝子型）     | 陽性検体 |
|------|-----|---------------|------|
| 二枚貝  | 44  | 3（不明）         | 牡蠣   |
| 一般食品 | 830 | 1（GII.4[P16]） | フルーツ |

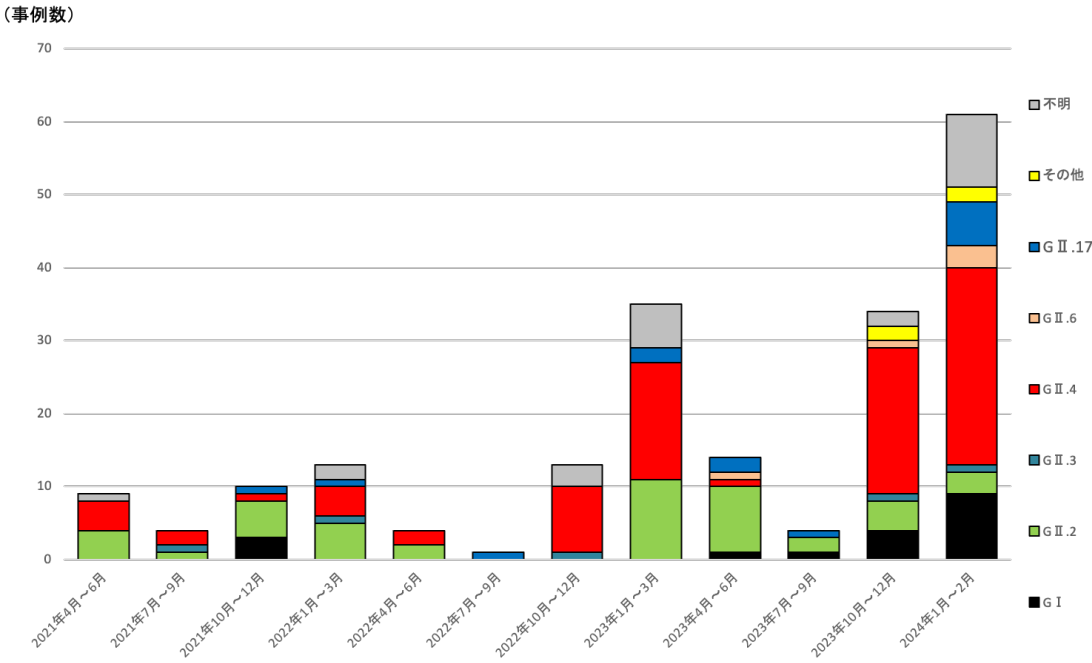


図1. 東京都内で発生した食中毒事例におけるウイルス検出状況（2021年4月～2024年2月）

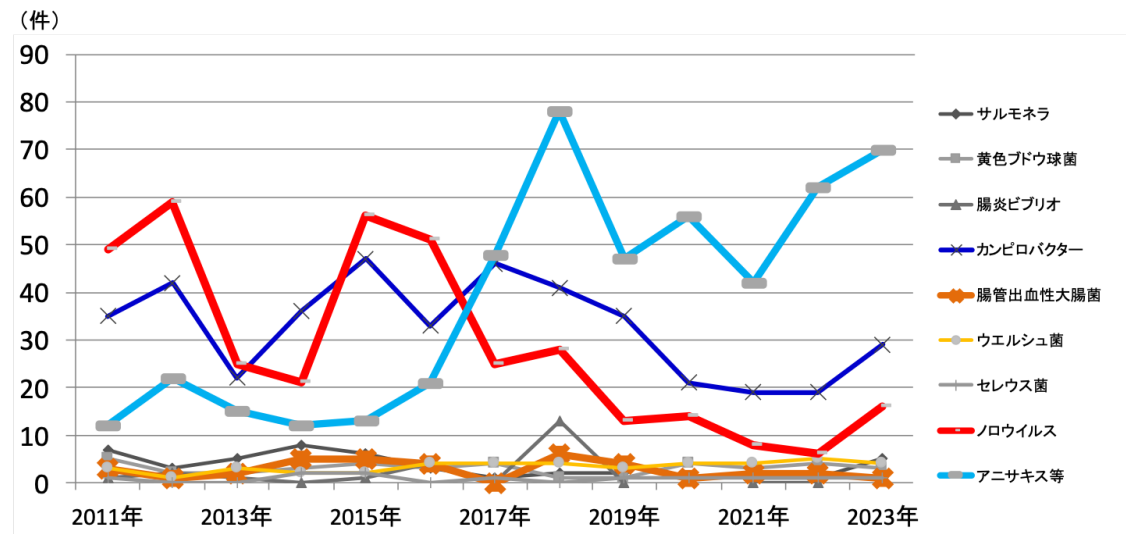


図2. 病因物質別食中毒発生状況（事件数）（東京都，2011-2023年）

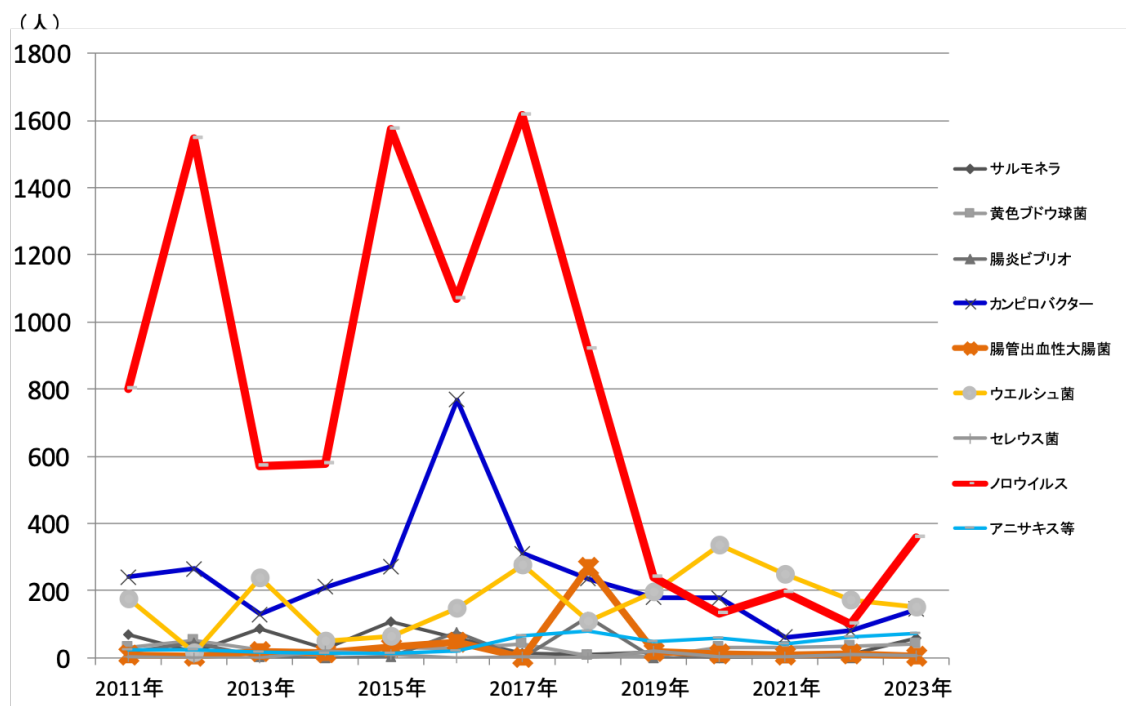


図3. 病因物質別食中毒発生状況（患者数）（東京都，2011-2023年）

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 国立感染症研究所感染症危機管理研究センター 室長

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

ノロウイルスは大規模な食中毒事例を引き起こすことから、経済損失を社会に与える病原体として認識される。しかし再現性の高い培養法が長らく未確立であったことから、実効性のある感染制御法が確立されていない。本研究では、組織由来ヒト腸管オルガノイドを用いてノロウイルス不活化条件を「直接的」に検証することを目的とし、本年度は研究に使用するノロウイルス陽性糞便検体の選定を目指した。

地衛研から感染研へ搬入された 80 検体のヒト腸管オルガノイドへの感染性を解析し、100 倍以上の増殖幅を示す 16 検体、10 倍以上を示す 32 検体を取得した。このうち 8 検体（GII.2 3 検体、GII.3 1 検体、GII.4 4 検体）を選別し、iPS 由来腸管上皮細胞による解析のために分担研究者に送付した。両方の解析結果を基に協議を行い、最終的に 2 検体（GII.4 2 検体）を選定した。

#### A. 研究目的

ノロウイルスは冬季に流行する急性胃腸炎の主要原因であり、大規模な食中毒事例を引き起こすことから、社会的にも制御されるべき病原体として認識される。そのため効果的な感染制御法が求められているが、再現性の高い培養法が約半世紀にわたって未確立であった。そのため、現在のガイドライン等に用いら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」に調べられたものであり、その実効性は長らく議論されてきた。その中、本分担研究者は組織由来ヒト腸管オルガノイドを用いて培養系の確立に成功した。

本研究では、組織由来ヒト腸管オルガノイドを用いてノロウイルス不活化条件を「直接的」に検証し、さらに分担研究者と協調しながら研究を進めることで、より確実性の高い不活化条件の提示を目指す。本年度は、分担研究者とともにノロウイルス陽性糞便検体採取及び輸送に係る体制を確認するとともに、研究に使用する便検体の選定を目指した。

#### B. 研究方法

地方衛生研究所（大阪健康安全基盤研究所・左近、岩手県環境保健研究センター・高橋、宮城県保健環境センター・坂上、それぞれ本研究班分担研究者 吉村の協力研究者）において

採取され、事前に遺伝子型が解析されたノロウイルス陽性糞便検体（計 80 検体）を感染研に搬入し、ヒト腸管オルガノイドを用いて感染性を解析した。感染性の解析は、既報（Murakami et al, PNAS, 2016）に準じた。その上で、感染性の高い検体を和歌山医科大学（分担研究者 佐藤）へ送付し、iPS 由来腸上皮細胞への感染性を評価した。解析結果を関係者で協議し、本研究で用いる検体を選別した。また次世代シーケンサー（iSeq100 シーケンスシステム）を用いて遺伝子型を詳細に解析した。

#### C. 研究成果

感染研に搬入された 80 検体を用いて、ヒト腸管オルガノイドへの感染性を解析したところ、100 倍以上の増殖幅を示した 16 検体、10 倍以上を示した 32 検体を取得した。増殖した検体の多くは GII.4 であったが、様々な遺伝子型を用いた試験を想定して 8 検体（GII.2・3 検体、GII.3・1 検体、GII.4・4 検体）を選別し、iPS 由来腸管上皮細胞による感染性評価のために和医大へ送付した。また、次世代シーケンサーを用いて和医大に送付用検体の遺伝子型を解析し、遺伝子型の確認を行った。

#### D. 考察

感染研の「人を対象とする生命科学・医学系研究倫理審査委員会」から多機関共同研究計画の承認が得られたことから、本年度より実際に検体を扱った作業を開始したが、研究者間で事前に細かな調整が行われたため、滞りなく体制が運用された。さらに、異なる施設で運用される組織幹細胞由来ヒト腸管オルガノイド及び iPS 由来腸管上皮細胞により同

じ検体を用いた感染性解析が行われ、同等の結果が得られたことは大きな成果である。これまでに同様の解析が行われたことは少なく、両システムの一般性が確認されたのみならず、本研究で目的としている確実性の高い不活化条件の提示が期待される。

本年度の結果を元に、本研究で使用する検体の選定は終了しており、また不活化条件も協議済みであることから、来年度は不活化条件の評価を実施する予定である。

#### E. 結論

同じノロウイルス陽性糞便検体に対し、異なる施設で運用されている組織幹細胞由来腸管オルガノイドおよび iPS 由来腸管上皮細胞を用いて感染性を解析したところ、同様の結果が得られた。その上で、本研究で使用するノロウイルス陽性検体の選定を完了した。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takahashi T, Kimura R, Shirai T, Sada M, Sugai T, Murakami K, Harada K, Ito K, Matsushima Y, Mizukoshi F, Okayama K, Hayashi Y, Kondo M, Kageyama T, Suzuki Y, Ishii H, Ryo A, Katayama K, Fujita K, Kimura H. Molecular Evolutionary Analyses of the RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRp) Region and VP1 Gene in Human Norovirus Genotypes GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6. *Viruses*, 15;7 (2023).
- 2) Dianty R, Hirano J, Anzai I, Kanai

Y, Hayashi T, Morimoto M, Kataoka-  
Nakamura C, Kobayashi S, Uemura K,  
Ono C, Watanabe T, Kobayashi T,  
Murakami K, Kikuchi K, Hotta K,  
Yoshikawa T, Tagawa S, Matsuura Y.  
Electrolyzed hypochlorous acid water  
exhibits potent disinfectant  
activity against various viruses  
through irreversible protein  
aggregation. Front. Microbiol.  
14:1284274 (2023).

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む.)

該当なし

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 教授

### 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、加熱や、食品添加物として認可される次亜塩素酸 Na、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 HuNoV 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、本事業でウイルスソースとして用いる患者糞便検体を地衛研から集め、GII.4 遺伝子型検体を 2 ロット決定した。また、異なる機関、異なる細胞で同一の結果が確認できるかを重要視し、次年度に行う加熱による不活化に関して、感染研・村上班と実験プロトコルの確認を行った。

### 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。ヒト糞便検体を使用するに当たり、当該倫理審査を感染研で一括承認していただき、和歌山医大においても許可承認を受けた。岩手、宮城、大阪の地衛研から提供された HuNoV 陽性便検体は一度感染研に集められ、そこでウイルスゲノムコピー数とヒト組織由来の IEC を用いたスクリーニングにより、ウイルスソースとして用いる候補として 8 検体に絞られた。この 8 検体全てについて、和歌山医大において、ヒト iPS 細胞由来の IEC を用いた場合も *in vitro* 増殖が可能か

どうかを評価した。

また、異なる機関、異なる細胞で同一の結果が確認できるかを重要視し、次年度に行う加熱による不活化に関して、感染研・村上班と実験プロトコールの確認を行った。

## C. 研究結果

ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いて、感染研でスクリーニングを終えた 8 検体について、HuNoV の *in vitro* 増殖が確認できた。増殖効率は感染研とほぼ同程度であり、同一のウイルスソースを用いて、異なる機関、異なる細胞（ヒト組織、もしくは人 iPS 細胞由来の腸管上皮細胞）において同様の結果が得られた。8 検体の中でも増殖効率が良く、糞便検体としても余裕のある GII.4\_Sydney (GII.4[P31], GII.4[P16]) 2 検体を次年度以降に行う不活化評価に用いることにした。

## D. 考察

異なる機関、異なる細胞において、同一糞便検体に由来する HuNoV が同様に *in vitro* で増殖することが確認できたことは、少なくとも国内では初めてのことであり、本評価系が普遍的であることが確認できたと言える。

評価系が 2 拠点において稼働することが確認できたため、次年度から加熱による不活化の評価を検討予定である。

## E. 結論

実際に次年度から不活化の検討が行える体制が整った。まずは加熱による不活化を感染研とプロトコールを併せて行う予定であり、進捗としては十分であると考ええる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Khamrin P, Kumthip K, Yodmeeklin A, Okitsu S, Motomura K, Sato S, Ushijima H, Maneekarn N. Genetic recombination and genotype diversity of norovirus GI in children with acute gastroenteritis in Thailand, 2015–2021. **J Infect Public Heal.** 2024 Jan 12;17(3):379–385.
- 2) Hattori-Muroi K, Naganawa-Asaoka H, Kabumoto Y, Tsukamoto K, Fujisaki Y, Fujimura Y, Komiyama S, Kinashi Y, Kato M, Sato S, Takahashi D and Hase K.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors boost gut immunity by inducing IgA responses in Peyer's patches. **Front Immunol.** 2023 Nov 1; 14: 1277637.
- 3) Yokota C, Fujimoto K, Yamakawa N, Kono M, Miyaoka D, Shimohigoshi M, Uematsu M, Watanabe M, Kamei Y, Sugimoto A, Kawasaki N, Yabuno T, Okamura T, Kuroda E, Hamaguchi S, Sato S, Hotomi M, Akeda Y, Ishii KJ, Yasutomi Y, Sunami K, Uematsu S. Prime-boost-type PspA3 + 2 mucosal vaccine protects cynomolgus macaques from intratracheal challenge with pneumococci. **Inflamm Regen.** 2023 Nov 15;43(1):55.
- 4) Matsumoto N, Kurokawa S, Tamiya S, Nakamura Y, Sakon N, Okitsu S, Ushijima H, Yuki Y, Kiyono H, Sato S. Replication of Human Sapovirus in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Epithelial Cells. **Viruses.** 2023 Sep 15;15(9):1929.
- 5) Minami S, Matsumoto N, Omori H, Nakamura Y, Tamiya S, Nouda R, Nurdin JA, Yamasaki M, Kotaki T, Kanai Y, Okamoto T, Tachibana T, Ushijima H, Kobayashi T, Sato S. Effective SARS-CoV-2 replication of monolayers of intestinal epithelial cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. **Sci Rep.** 2023 Jul 18;13(1):11610. doi: 10.1038/s41598-023-38548-1.
- 6) Hoque SA, Kotaki T, Pham NTK, Onda Y, Okitsu S, Sato S, Yuki Y, Kobayashi T, Maneekarn N, Kiyono H, Hayakawa S, Ushijima H. Genotype Diversity of Enteric Viruses in Wastewater Amid the COVID-19 Pandemic. **Food Environ Virol.** 2023 Apr 14:1-16.
- 7) Takahashi Y, Inoue Y, Sato S, Okabe T, Kojima H, Kiyono H, Shimizu M, Yamauchi Y, Sato R. Drug cytotoxicity screening using human intestinal organoids propagated with extensive cost-reduction strategies. **Sci Rep.** 2023 Apr 3;13(1):5407. doi: 10.1038/s41598-023-32438-2.

2. 学会発表

なし

H. 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 食品衛生管理部 |
|       | 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 安全管理研究センター  |

#### 研究要旨

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、昨年度と同様、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唾液中のノロウイルス核酸の検出を行った。

#### A. 研究目的

ノロウイルスによる食中毒発生要因として、ウイルス陽性調理従事者がその汚染源の1つになりうる。しかし、近年の疫学解析により、小児におけるデータではあるものの、胃腸炎症状の有無に関わらず上気道粘液（口腔、鼻腔咽頭ぬぐい液、唾液）から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 (Dabilla N et al., J. Clin. Virol. 2017; 87:60-66., Anfruns-Estrada E et al., Viruses. 2020;12 :1369. 岡智一郎, 高木弘隆, 斎藤博之. 2022 年; 第 63 回日本臨床ウイルス学会)。さらに本研究班が開始後、ヒトノロウイルスがヒト唾液腺細胞株で増殖すること、マウスにおいて、唾液を介したマウスノロウイルス感染が起こることも報告された (Ghosh S. et al., Nature. 2022; 607:345-350. )。

調理従事者・食品取扱者において上気道粘液からノロウイルスが検出されれば、糞便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、食品衛生上の感染制御対策のための新たな知見となりうる。そこで、本研究では昨年度から、我が国の調理従事者・食品取扱者について、糞便に加え、上気道粘液からノロウイルスが検出されるか検討している。

#### B. 研究方法

##### 1. 材料

##### 1) 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った調理従事者・食品取扱者 371 名から 2023 年 12 月 (n=44), 2024 年 1 月 (n=121), 2024 年 2 月 (n=124), 2024 年 3 月 (n=82) に採取され、株式会社 日

本環境衛生研究所においてPBS(-)で2倍希釈したものを解析対象とした。

## 2. ノロウイルスの検出

ノロウイルス検出のための核酸抽出は昨年度と同様、MagNAPure 96 (Roche)と MagNAPure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (ロシュ 6543588001)で行った。昨年度の検討結果をふまえ、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)と、COG1 F/R プライマーと RING1-TPa, TPb プロンプ、もしくは COG2-F/R プライマーと RING2-TP プロンプを用いて、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。

RT-PCR 用によるノロウイルス検出は Random 6 mer(タカラバイオ 3801)と RevTra Ace (東洋紡 TRT-101)を用いて cDNA 合成後、G2SKF/SKR プライマーと KAPA 2G HotStart Ready Mix with dye (KAPA Biosystems KK5610)を用いて行った。

陽性コントロールとして、ターゲット領域の遺伝子配列を含む合成プラスミドもしくはノロウイルスをスパイクした唾液検体を用いた。

## (倫理面への配慮)

調理従事者・食品取扱者の特定はできないよう管理されている。また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承認を得ている(承認番号 1405)。

## C. 研究結果

調理従事者・食品取扱者の唾液 371 検体については、ノロウイルス陽性例はなかった。なお、糞便については2名がノロウイルス陽性(いずれも GII, Ct 値: 33 もしくは 25)であった。残存核酸から塩基配列を決定できた1名からは、GII.17[P17]が検出された。

## D. 考察

昨年度の304検体に加え、今年度新たに371検体の調理従事者唾液中のノロウイルス核酸の有無を検出した。

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%程度とのものであったが、今季も0.5%とまだ例年と比べ低い状態が続いていることが示された。

今回糞便でノロウイルスが検出された2名はいずれも自覚症状がなかったことから、無自覚なままノロウイルス感染源になりうると考えられた。

## E. 結論

2年間で健常調理従事者・食品取扱者の唾液、合計675検体を解析した。現時点では唾液からノロウイルスは検出されていないが、糞便中にノロウイルスが検出されたのが2検体と限られることから、次年度も本課題に継続して取り組む。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表:

- 1) Investigation of removal and inactivation efficiencies of human sapovirus in drinking water treatment

- processes by applying an in vitro cell-culture system. Shirakawa D, Shirasaki N, Hu Q, Matsushita T, Matsui Y, Takagi H, Oka T. Water Res. 2023 Jun 1;236:119951. doi: 10.1016/j.watres.2023.119951.
- 2) 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 Jul 24;76(4):255-258. doi: 10.7883/yoken.JJID.2022.704. 10.3390/v15112164.
- 3) ヒトサポウイルス培養法の開発  
高木弘隆, 岡智一郎  
日本ウイルス学会誌  
ウイルス 2023. 8 73(1)1-8.
- 4) Prevalence and Characterization of Gastroenteritis Viruses among Hospitalized Children during a Pilot Rotavirus Vaccine Introduction in Vietnam. Mai CTN, Ly LTK, Doan YH, Oka T, Mai LTP, Quyet NT, Mai TNP, Thiem VD, Anh LT, VAN Sanh L, Hien ND, Anh DD, Parashar UD, Tate JE and Van Trang N. Viruses . 2023 Oct 27;15(11):2164. doi: 10.3390/v15112164.
- 5) Comprehensive Full Genome Analysis of Norovirus strains from Eastern India, 2017–2021. Lo M, Doan YH, Mitra S, Saha R, Miyoshi S, Kitahara K, Dutta S, Oka T, Chawla-Sakar M. Gut Pathog. 2024 Jan 18;16 (1):3. doi: 10.1186/s13099-023-00594-5.
2. 学会発表 :
- 1) Oka T, Li T-C, Yonemitsu K, Ami Y, Suzaki Y, Okamoto-Nakamura Y, Kataoka M, Doan YH, Takagi H. Establishment and application of an efficient human sapovirus propagation method using HuTu80 cells. The 8<sup>th</sup> International Calicivirus Conference, Netherland, 2023. 5
- 2) 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. 汎用細胞増殖系を活用した浄水処理におけるヒトサポウイルスの除去・不活化特性の把握. 第 60 回環境工学研究フォーラム 2023. 11/29-12/1.
- 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  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------|---------|------|
| Shirakawa D, Shirasaki N, Hu Q , Matsushita T , Matsui Y , Takagi H , Oka T.                                                                                                                                                                                          | Investigation of removal and inactivation efficiencies of human sapovirus in drinking water treatment processes by applying an in vitro cell-culture system. | Water Res.        | 236        |         | 2023 |
| 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. | 76<br>(4)  | 255-258 | 2023 |
| 高木弘隆、岡智一郎.                                                                                                                                                                                                                                                            | ヒトサポウイルス培養法の開発                                                                                                                                               | 日本ウイルス学会誌         | 73<br>(1)  | 1-8     | 2023 |
| Mai CTN, Ly LTK, Doan YH, Oka T, Mai LTP, Quyet NT, Mai TNP, Thiem VD, Anh LT, VAN Sanh L, Hien ND, Anh DD, Parashar UD, Tate JE, Van Trang N.                                                                                                                        | Prevalence and characterization of gastroenteritis viruses among hospitalized children during a pilot rotavirus vaccine                                      | Viruses           | 15<br>(11) |         | 2023 |

|                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                            |                   |        |         |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------|---------|------|
|                                                                                                                                                                                                               | introduction in Vietnam.                                                                                                                                   |                   |        |         |      |
| Lo M, Doan YH, Mitra S, Saha R, Miyoshi S, Kitahara K, Dutta S, Oka T, Chawla-Sakar M.                                                                                                                        | Comprehensive full genome analysis of norovirus strains from eastern India, 2017-2021.                                                                     | Gut Pathog        | 16 (1) |         | 2024 |
| 村上 昂                                                                                                                                                                                                          | 2022 年の全国及び東京都における食中毒発生状況                                                                                                                                  | 東京都微生物検査情報        | 44     | 1-3     | 2023 |
| 浅倉弘幸                                                                                                                                                                                                          | 東京都における胃腸炎起因ウイルスの検出状況 (2022/23 シーズン)                                                                                                                       | 東京都微生物検査情報        | 44     | 4-7     | 2023 |
| Takahashi T, Kimura R, Shirai T, Sada M, Sugai T, Murakami K, Harada K, Ito K, Matsushima Y, Mizukoshi F, Okayama K, Hayashi Y, Kondo M, Kageyama T, Suzuki Y, Ishii H, Ryo A, Katayama K, Fujita K, Kimura H | Molecular Evolutionary Analyses of the RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRp) Region and VP1 Gene in Human Norovirus Genotypes GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6. | Viruses           | 15 (7) |         | 2023 |
| Dianty R, Hirano J, Anzai I, Kanai Y, Hayashi T, Morimoto M, Kataoka-Nakamura C, Kobayashi S, Uemura K, Ono C, Watanabe T, Kobayashi T, Murakami K, Kikuchi K, Hotta K, Yoshikawa T, Tagawa S, Matsuura Y.    | Electrolyzed hypochlorous acid water exhibits potent disinfectant activity against various viruses through irreversible protein aggregation.               | Front. Microbiol. | 14     |         | 2023 |
| Khamrin P, Kumthip K, Yodmeeklin A, Okitsu                                                                                                                                                                    | Genetic recombination and genotype                                                                                                                         | Infect Public     | 17(3)  | 379-385 | 2024 |

|                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                  |               |        |  |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------|--|------|
| S, Motomura K, Sato S, Ushijima H, Maneekarn N.                                                                                                                                                                                                | diversity of norovirus GI in children with acute gastroenteritis in Thailand, 2015–2021.                                         | Health        |        |  |      |
| Hattori-Muroi K, Naganawa-Asaoka H, Kabumoto Y, Tsukamoto K, Fujisaki Y, Fujimura Y, Komiyama S, Kinashi Y, Kato M, Sato S, Takahashi D and Hase K.                                                                                            | $\alpha$ -Glucosidase inhibitors boost gut immunity by inducing IgA responses in Peyer' s patches.                               | Front Immunol | 14     |  | 2023 |
| Yokota C, Fujimoto K, Yamakawa N, Kono M, Miyaoka D, Shimohigoshi M, Uematsu M, Watanabe M, Kamei Y, Sugimoto A, Kawasaki N, Yabuno T, Okamura T, Kuroda E, Hamaguchi S, Sato S, Hotomi M, Akeda Y, Ishii KJ, Yasutomi Y, Sunami K, Uematsu S. | Prime-boost-type PspA3 + 2 mucosal vaccine protects cynomolgus macaques from intratracheal challenge with pneumococci.           | Inflamm Regen | 43 (1) |  | 2023 |
| Matsumoto N, Kurokawa S, Tamiya S, Nakamura Y, Sakon N, Okitsu S, Ushijima H, Yuki Y, Kiyono H, Sato S.                                                                                                                                        | Replication of human sapovirus in human-induced pluripotent stem cell-derived intestinal epithelial cells.                       | Viruses       | 15 (9) |  | 2023 |
| Minami S, Matsumoto N, Omori H, Nakamura Y, Tamiya S, Nouda R, Nurdin JA, Yamasaki M, Kotaki T, Kanai Y, Okamoto T, Tachibana T, Ushijima H, Kobayashi                                                                                         | Effective SARS-CoV-2 replication of monolayers of intestinal epithelial cells differentiated from human induced pluripotent stem | Sci Rep       | 13 (1) |  | 2023 |

|                                                                                                                             |                                                                                                                   |                    |           |         |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-----------|---------|------|
| T, Sato S.                                                                                                                  | cells.                                                                                                            |                    |           |         |      |
| Hoque SA, Kotaki T, Pham NTK, Onda Y, Okitsu S, Sato S, Yuki Y, Kobayashi T, Maneekarn N, Kiyono H, Hayakawa S, Ushijima H. | Genotype diversity of enteric viruses in wastewater amid the COVID-19 pandemic.                                   | Food Environ Virol | 15<br>(2) | 176-191 | 2023 |
| Takahashi Y, Inoue Y, Sato S, Okabe T, Kojima H, Kiyono H, Shimizu M, Yamauchi Y, Sato R.                                   | Drug cytotoxicity screening using human intestinal organoids propagated with extensive cost-reduction strategies. | Sci Rep            | 13<br>(1) |         | 2023 |
| 上間匡、遠矢真理                                                                                                                    | UJNR 有毒微生物専門部会第55回日米合同部会 食品媒介性ウイルスセッション                                                                           | 食品衛生研究             | 74<br>(2) | 20-22   | 2024 |

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 本間 正充

次の職員の令和5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) 食品衛生管理部・部長  
(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<br>有 無                                                    | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1)      |        |                          |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------|--------------------------|
|                                     |                                                                  | 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"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <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"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <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"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <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<br>(指針の名称： ) | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <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： )  |

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 本間 正充

次の職員の令和5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) 食品衛生管理部・主任研究官  
(氏名・フリガナ) 遠矢 真理・トオヤ マリ

4. 倫理審査の状況

|                                     | 該当性の有無<br>有 無                                                    | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1)      |        |                          |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------|--------------------------|
|                                     |                                                                  | 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"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <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"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <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"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <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<br>(指針の名称： ) | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <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： )  |

令和6年4月1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5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) 感染症危機管理研究センター・室長  
(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<br>有 無                                                | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1)                 |          |                          |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------|--------------------------|
|                                     |                                                              | 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<br>(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： )  |

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 隆子

次の職員の令和5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 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) 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<br>有 無                                                | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1)                 |          |                          |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------|--------------------------|
|                                     |                                                              | 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<br>(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  
(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 5 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<br>有 無                                                | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1)                 |                      |                          |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|--------------------------|
|                                     |                                                              | 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<br>(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 <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 C O I 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 C O I 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 C O I 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 C O I 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6年 4月 22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(令和 5 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 5 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

3. 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<br>有 無                                                    | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1)      |        |                          |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------|--------------------------|
|                                     |                                                                  | 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"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <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"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <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"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <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<br>(指針の名称: ) | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <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 checked="" type="checkbox"/> 無 <input 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 和歌山県立医科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 中尾 直之

次の職員の令和5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。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について  
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和6年 5 月 15 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  
所属研究機関長 職 名 微生物病研究所 所長  
氏 名 高倉 伸幸

次の職員の(令和) 5 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・講師  
(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<br>有 無                                                | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1)                 |          |                          |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------|--------------------------|
|                                     |                                                              | 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<br>(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 checked="" type="checkbox"/> 無 <input 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。