

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

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

令和 4-6 年度 総合研究報告書

研究代表者 上間 匡
令和 7 年（2025）5 月

別紙 2

目次

I. 総合研究報告	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.....20
2. ノロウイルス・サポウイルスの不活化条件に関する情報収集	上間 匡.....30
3. 下水試料を用いたウイルス検出法に関する検討	遠矢真理.....35
4. 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.....41
5. ノロウイルスの疫学動向の解析（2018/25 シーズン）	木村博一.....51
6. 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.....55
7. 腸管オルガノイドを用いた HuNoV 増殖系によるウイルス不活化条件の検討	村上耕介.....61
8. 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.....64
9. 食品等従事者における上気道飛沫中のノロウイルスの調査	岡智一郎.....70
10. 米国および英国における食中毒事件発生時のウイルス検査に関する調査	窪田邦宏.....75
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	83

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

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

令和 4-6 年度 総合研究報告書

研究代表者 上間 匡
令和 7 年（2025）5 月

別紙 2

目次

I. 総合研究報告	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.....20
2. ノロウイルス・サポウイルスの不活化条件に関する情報収集	上間 匡.....30
3. 下水試料を用いたウイルス検出法に関する検討	遠矢真理.....35
4. 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.....41
5. ノロウイルスの疫学動向の解析（2018/25 シーズン）	木村博一.....51
6. 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.....55
7. 腸管オルガノイドを用いた HuNoV 増殖系によるウイルス不活化条件の検討	村上耕介.....61
8. 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.....64
9. 食品等従事者における上気道飛沫中のノロウイルスの調査	岡智一郎.....70
10. 米国および英国における食中毒事件発生時のウイルス検査に関する調査	窪田邦宏.....75
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	83

別紙 3

令和 4-6 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
	窪田 邦宏	国立医薬品食品衛生研究所	安全情報部
	岡 智一郎	国立感染症研究所	ウイルス第二部
	村上 耕介	国立感染症研究所	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
	水越 文徳	栃木県保健環境センター	微生物部
	本谷 匠	茨城県衛生研究所	ウイルス部
	永田 記子	茨城県衛生研究所	企画情報部
	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）
	田中 良太	杏林大学	医学部 呼吸器・甲状腺外科
	五十嵐映子	福井県健康福祉部健康医療局	医薬食品・衛生課
	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
	西村 直行	神戸常磐大学/KtenBio株式会社	
	佐守 秀友	神戸常磐大学/KtenBio株式会社	

研究概要

食中毒発生時の迅速な原因究明は、特に広域事例での被害拡大防止に極めて重要である。一方、ウイルスは食品中で極微量のみが維持されるため、食中毒対応におけるウイルス検査法の精度・感度向上は必須であり、さまざまな食品、複数の食品媒介ウイルスに対応する汎用性の高い検査法の整備が重要である。同様に、ウイルスによる食中毒予防には科学的根拠に基づいた不活化処理も重要であり、本研究班では次の2点を大きな解決目標として取り組んだ。

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用いる消毒剤などによる不活化条件を示すこと

国内で発生するノロウイルス等によるウイルス性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病原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。

食品の製造工程や食品取り扱いの環境において、ノロウイルス等による食品の汚染防止や、食品中や食品取扱現場に存在するノロウイルス等を不活化するなど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、ノロウイルスに対する直接的な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、研究成果として以下を示した。

- パンソルビン・トラップ法、PEG/NaCl 法ともに、多様な食品に対応できる汎用性の高い食品処理法であり、多くの検査機関でも実施可能と考えられた。
- PEG/NaCl 法とロングリードシーケンサ(現状ではナノポア社)による NGS 解析の組み合わせが食品処理液からの網羅的ウイルス遺伝子検出に実用できる可能性を示した。
- 市販を含む in vitro 培養系でのノロウイルス直接評価が可能であることを示した。
- in vitro 培養系でのノロウイルス加熱不活化方法について、標準プロトコルを作成した。
- 「中心部が 85-90 度で 90 秒以上の加熱」によりノロウイルスが増殖しないことを実証した。
- 60 度、65 度でもノロウイルスが増殖しなくなる可能性はあるが、さらに詳細な検討が必要である。
- 現在流行しているノロウイルスは、GI. 2, GI. 3, GI. 4, GI. 7, GII. 2, GII. 4, GII. 6, GII. 17 が多い。
- 2018-2024 年にかけて主要流行株は GII. 4 から GII. 2, GII. 17 と変遷し、2022 年は GII. 4, 2024 年は GII. 7 の検出が増加していた。
- 唾液からのノロウイルス検査法を確立した。
- 大量調理施設衛生管理マニュアルに従いノロウイルス便検査を実施している食品事業者の

協力のもと、のべ 890 検体の唾液のノロウイルス調査を実施したが、全て陰性であった。

- 米国・英国では食中毒発生時の食品検査は実施されていないこと、従事者対策としては下痢等の症状消失後 48 時間は待機、その後復帰する、という運用がされていた。

一方で今後対応すべき課題として次の点が上がった。

- パンソルビン・トラップ法、PEG/NaCl 法について、幅広い食品へ適用できる検査法として通知へ繋げるためには、検査機関で実施する際の工程管理が必要となるが、現時点では有効な候補を見つけれられていない。
- 工程管理に用いるウイルスは市販品で入手が容易、購入したものを濃度調整程度の簡単な作業のみで利用できるものが望ましい。
- これまで食中毒事件で汚染食品が特定できた例では、検出されるウイルスコピー数は定量限界以下である。
- ノロウイルスの *in vitro* 培養系は現状ではウイルスソースは糞便を用いるしかない。
- ノロウイルスの増殖については感染後 72 時間における RNA 増幅を指標としており、ウイルスの増殖はインプットしたコピー数とほぼ同レベルにとどまっており、ストックウイルスの作成はできない。
- ノロウイルスを用いた定量的な評価、例えば 85 度 1 分間の加熱により、6log のウイルスクリアランスが得られる、といった評価はいまだに困難である。
- サポウイルスはほぼ全ての遺伝子型株にて非常に効率よく増殖する培養系が確立されており、食品中のウイルス制御・安全性確保に向けた検証にサポウイルスを有効に利用していく必要がある。
- 飲食店等での調理から提供までの作業工程（フロー図）において、食品へのウイルス汚染を効果的に防止する、より重点的に対策を取るべき工程について、具体的な対策を示す必要がある。

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 4 万人弱から R4(2022)年の 6800 人へと大きく減少した。とくに R1(2019)年 12 月に発生した新型コロナウイルス感染症のパンデミック発生をうけて、飲食店の営業自粛等に伴う外食機会減少により、R2-4(2020-22)年の食中

毒患者数を大きく減少させたが、COVID-19 を経た後、R5(2023)年は 1,021 件、11,180 人、R6(2024)年は 1,037 件、14,239 人と COVID-19 以前の水準に戻っている。

ノロウイルスを原因とする食中毒事件数は H27 年の 500 件をピークに R2-4(2020-2022)年は 100 件以下を維持し、大きく減少しているものの、患者数は依然として全体の食中毒患者数の約 3-5 割近くを占めているほか、R3(2021)年 4 月に 2545 名、R2(2020)年 12 月

に 559 名，H30(2018)年に 550 名などに加え，2024 年 8 月に大分県で発生した飲用水として用いる水の汚染による食中毒の発生など，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。

倫理面への配慮

ヒト腸管幹細胞由来オルガノイドの利用，ノロウイルスのウイルスソースとしての便検体の入手，食品取扱者の唾液におけるノロウイルス調査のための唾液検体の採取，食品取扱者のノロウイルス便検査に関するデータについては，国立感染症研究所，国立医薬品食品衛生研究所，協力いただいた地方衛生研究所が，研究計画について倫理審査を受け承認を受けた。

患者検体である便検体，唾液検体については，患者情報などの個人情報を除いた匿名化の上で検体を扱った。

C. 研究の結果

1. 検査法の整備

パンソルビン・トラップ法、PEG/NaCl 法が汎用性が高い食品処理法であること、さらに PEG/NaCl とナノポアシーケンサを組み合わせることで NGS によるウイルス遺伝子検出の実用性が示唆された。ノロウイルスの流行遺伝子型に GII.7 があらたに報告数の上昇が認められている。

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・遠矢）

パンソルビントラップ法、及び PEG/NaCl 沈殿法（ISO 法）について、野菜スティック、冷凍ベリー、おにぎり、レタスサラダ、食パンなどへの適用について検討を行い、両法ともに汎用性の高い食品処理法であることが確認できた。食品検体に 50 から 500 コピー程度のウイルスを添加し、リアルタイム RT-PCR にて A 型肝炎ウイルス、GII ノロウイルスともに検出できることを確認した。また、ボトル水検体、下水検体から PEG/NaCl 法にてウイルスを検出できることを確認した。水検体からの検出方法については大分県検査機関へ情報提供し、食中毒調査においてノロウイルス検出に繋がった。

2) NGS 利用による汎用的な遺伝子検出法の検討（元岡）

ポータブル次世代シーケンサーである Nanopore シーケンサーを用いて、ロングリードシーケンスによるウイルスの検出を評価した。核酸抽出方法によるウイルスを添加した食品からのメタゲノム解析によるウイルス検出の条件検討を行った。パンソルビントラップ法、PEG/NaCl (ISO) 法、FDA (超遠心) 法を比較した。ショートリードシーケンスの場合と同様にメタゲノム解析を行う上では、ISO 法か FDA 法の方が、より多くのウイルスリー

ドが検出できた。冷凍ベリーでは ISO 法と FDA 法を比較するとノロウイルスは ISO 法の方が 10 倍ほど多く検出できていた。

ロングリードシーケンサーとショートリードシーケンサーのウイルス検出リードの比較を行った。その結果、ロングリードではショートリードに比べて、155~12,658 倍(平均 3,800 倍)の感度向上を達成出来た。

ロングリードシーケンサーは、ショートリードシーケンサーに比べて多くのリード数を得ることが難しく、またリードあたりのシーケンスコストが 10 倍ほど高いことが弱点であったが、今回の実験で、感度を 3800 倍向上させることができたことから、PEG/NaCl 法と Nanopore シーケンサーを組み合わせることでより安価に、どこでも解析ができる検査手順作成の可能性が示された。

3) 食品関連ウイルスの流行状況（吉村、木村、上間）

・都内のウイルス性食中毒発生状況（吉村）

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）の検査結果をまとめた。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、検出されたウイルスの内訳は、HuNoV 202 事例（98.1%）、サポウイルス 4 事例（1.9%）であった。なお、HuNoV の遺伝子型（Capsid 領域の遺伝子型別を実施）は、GII:160 事例、GI:18 事例で、さらに GII.2 46 事例（28.7%）、GII.4 86 事（53.7%）、GII.17 14 事例（8.7%）であった。食品検査は 874 検体を実施し、4 検体から HuNoV を検出している。そのうち、3 例は二枚貝で、1 例はフルーツからの検出であった。

・国内のノロウイルスの疫学動向（木村）

過去7年間（2018～2024年上期まで）の遺伝子群・遺伝子型別 NoV 検出・報告状況に関する研究を行った。その結果、過去5年間においては、GII が GI に比し多く検出された。また、GI においては、GI.2, GI.3, GI.4 ならびに GI.7, GII においては、GII.2, GII.4, GII.6 ならびに GII.17 が多く検出・報告されていた。さらに、2020～2022年まで、一部の遺伝子型の NoV を除き、それ以前に比し、検出報告数が激減した。しかし、2023年以降、再び GII.4 をはじめとする遺伝子型の NoV 検出が多くなりつつある。また、2024年度においては、過去にほとんど検出されなかった GII.7 が多く検出されていた。新型コロナウイルス感染症の出現前後で、インフルエンザを含め、種々のウイルス感染症の動向が変化しているが、NoV 感染症の動向も他の感染症と同様に変化している可能性がある。

・食中毒事件での食品からのノロウイルス検出された事例（上間，研究協力者：斎藤博之（秋田県））

2023年2月に発生した病院給食による手段食中毒事件において、食品検体38検体からパンソルビン・トラップ法により1品目からノロウイルス GII.2 を検出し、患者および調理従事者から検出されたウイルスと一致した。

4) 米国・英国におけるウイルス性食中毒対応（窪田）

食中毒事件対応における食品検査の実施状況について米国・英国から聞き取り調査を行い、米国・英国では食中毒発生時に食品検査を必ずしも実施していないことが明らかとなった。また、感染発症している従事者対策としては、症状出現時の待機に加えて、症状消失後48時間までの待機と、そ

の後の復帰という運用を行っていた。

2. ウイルスの制御

2-1. NV 失活条件および手法の提示（村上，佐藤，吉村，岡）

オルガノイドおよび iPS 由来細胞を用いる in vitro 培養系で同等にノロウイルスの直接評価が可能であることが示され、加熱条件「85 から 90 度で 90 秒以上」を実証した。

近年報告が増えているサポウイルスについても in vitro 培養系でウイルスを分離した。

2-1-1. In vitro 培養系を用いたノロウイルスの直接評価（村上，佐藤，研究協力者：左近直美（大阪健康安全基盤研究所），高橋知子（岩手県環境保健研究センター），坂上亜希恵（宮城県保健環境センター）

オルガノイド、及び iPS 由来腸管上皮細胞の両方の培養系で同一ウイルス検体を用いてノロウイルスの不活化を同等に検証できることが明らかとなった。

昨年度、幹細胞由来腸管オルガノイド（感染研にて実施）および iPS 腸管上皮細胞（和医大にて実施）の両細胞において高い増殖性を示した GII.4 ノロウイルス2検体（ヒトノロウイルス陽性糞便検体）を用いて、加熱による不活化条件の検討を行った。サーマルサイクラーを用いてノロウイルスを様々な条件（60℃・15分、75℃・1分、85℃・1分）で加熱した後に培養系細胞へ感染させたところ、全ての群において感染性が喪失していた。オルガノイド（感染研）及び iPS 腸管上皮細胞（和医大）を用いた不活化試験の結果も一致した。

現在厚労省 HP などでは示されている「中心部が 85 から 90 で 90 秒以上の加熱」を実証するとともにヒトノロウイルスの加熱条件につ

いてデータを得ることができた。

2-1-2. 市販 in vitro 培養系を用いたノロウイルスの直接評価（吉村）

市販されているヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を使用し、臨床検体からの各種 HuNoV の分離を検討した。その結果、ウイルス量が 10^6 以上あれば、ウイルス増殖が可能と思われた。また、培養により GII.2[P16]は約 300 倍、GII.3[P12]は約 20 倍、GII.6[P7]は約 700 倍、GII.7[P7]は約 1,000 倍、GII.4[P16]は約 3.8 倍、GII.17[P17]は約 1.5 倍に増加し、糞便検体を、 85°C で 5 分間加熱して培養が可能か調べたところ、加熱処理により増殖が抑制されることを確認した。

2-1-3. 汎用細胞株による食中毒関連ウイルスの分離（岡）

ヒト小腸由来の汎用培養細胞株を用いて 7 つの食中毒事例のウイルス陽性糞便からヒトサポウイルス増殖・分離を達成した。

2-2. 食品等従事者における上気道飛沫中 NV の調査（岡）

唾液からのノロウイルス検査法は確立できた。

2023.12-2024.3 に調理従事者の唾液 371 検体に対するノロウイルス検出をリアルタイム RT-PCR で実施した。過去 2 年、合計 675 名の健常調理従事者の唾液からのノロウイルス陽性例はないが、2 名が糞便中ノロウイルス陽性で、シーケンズ解析できた 1 名から GII.17[P17]が検出された。2024 年度は 215 名について調査を行い、陽性となった検体はなかった。また、唾液から直接ウイルス遺伝子を検出する検査法を構築し、 5×10 コピー/well の感度で添加したノロウイルスを検出できる事を確認した。

倫理面への配慮

便検体の入手について、食中毒患者等の個人の特定はできないよう管理されている。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 1464）。

唾液検体の入手について、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）。

D. 政策等への活用または実用化に向けた取り組み

現在、ノロウイルスを中心としたウイルス性食中毒の発生は、パンデミック以前の水準に戻りつつあり、また冬季以外のアウトブレイクも散見される。本研究成果はノロウイルスを始めとしたウイルス性食中毒の原因究明、さらに発生防止に貢献すると期待できる。

研究成果

パンソルビン・トラップ法、PEG/NaCl 法ともに、多様な食品に対応できる汎用性の高い食品処理法であり、多くの検査機関でも実施可能と考えられた。

PEG/NaCl 法とロングリードシーケンサ（現状ではナノポア社）による NGS 解析の組み合わせが食品処理液からの網羅的ウイルス遺伝子検出に実用できる可能性を示した。

市販を含む in vitro 培養系でのノロウイルス接評価が可能であることを示した。

in vitro 培養系でのノロウイルス加熱不活化方法について、標準プロトコルを作成した。

「中心部が $85-90^{\circ}\text{C}$ で 90 秒以上の加熱」に

よりノロウイルスが増殖しないことを実証した。

- 60 度、65 度でもノロウイルスが増殖しなくなる可能性はあるが、さらに詳細な検討が必要である。
- 現在流行しているノロウイルスは、GI. 2, GI. 3, GI. 4, GI. 7, GII. 2, GII. 4, GII. 6, GII. 17 が多い
- 2018-2024 年にかけて主要流行株は GII. 4 から GII. 2, GII. 17 と変遷し、2022 年は GII. 4, 2024 年は GII. 7 の検出が増加していた。
- 唾液からのノロウイルス検査法を確立した。
- 大量調理施設衛生管理マニュアルに従いノロウイルス便検査を実施している食品事業者の協力のもと、のべ 890 検体の唾液のノロウイルス調査を実施したが、全て陰性であった。
- 米国・英国では食中毒発生時の食品検査は実施されていないこと、従事者対策としては下痢等の症状消失後 48 時間は待機、その後復帰する、という運用がされていた。

今後解決すべき課題

- パンソルビン・トラップ法、PEG/NaCl 法について、幅広い食品へ適用できる検査法として通知へ繋げるためには、検査機関で実施する際の工程管理が必要となるが、現時点では有効な候補を見つけられていない。
- 工程管理に用いるウイルスの一つの候補として BSL1 で扱うことができる MS2 ファージがあるが、各検査機関で工程管理用ストックを作成する必要がある。
- 工程管理に用いるウイルスは市販品で

入手が容易、購入したものを濃度調整程度の簡単な作業のみで利用できるものが望ましい。

- 食中毒事件での食品検査は 1 事件について数十検体を検査して、1 検体の陽性ができるかどうかという状況であり、汚染食品の特定は検査人員や、検査に必要な時間など作業コストが大きい状況は変わらない。
- ウイルス性食中毒事件に関連した食品や品目についてデータ集計により検査対象食品の優先順位などをつけることも必要と思われる。
- これまで食中毒事件で汚染食品が特定できた例では、検出されるウイルスコピー数は定量限界以下であり、これを元に食品中のウイルスについて基準等を設けるのは困難と考えられる。
- ノロウイルスの *in vitro* 培養系は増殖レベルが低く、ウイルス増殖を確認するには、 10^6 コピー以上のウイルスを細胞へインプットする必要がある、現状ではウイルスソースは糞便を用いるしかない。
- ノロウイルスの増殖についても感染後 72 時間における RNA 増幅を指標としており、ウイルスの増殖も RNA コピー数で最大 4log 程度であり、インプットしたコピー数とほぼ同レベルであり、ストックウイルスの作成はできない。
- 加熱不活化についても、加熱処理によりウイルス増殖がなくなることは確認できるが、定量的な評価、例えば 85 度 1 分間の加熱により、6log のウイルスクリアランスが得られる、といった評価はいまだに困難であり、ひきつづき効率の良い培養方法の探索が必要である。

- サポウイルスはほぼ全ての遺伝子型株にて非常に効率よく増殖する培養系が確立されており，ストックウイルスの作成も進んでいる．ノロウイルスに近縁なヒト腸管系病原ウイルスとして食品中のウイルス制御・安全性確保に向けた検証にサポウイルスを有効に利用していく必要がある．
- 現在国内の食品事業者は HACCP に沿った衛生管理を行なっている．飲食店等での調理から提供までの作業工程（フロー図）において，食品へのウイルス汚染を効果的に防止する，より重点的に対策を取るべき工程について，具体的なウイルス対策を示していく必要がある．

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

2024 年度

1. Mizukoshi F, Kimura R, Shirai T, Hirata-Saito A, Hiraishi E, Murakami K, Doan YH, Tsukagoshi H, Saruki N, Tsugawa T, Kidera K, Suzuki Y, Sakon N, Katayama K, Kageyama T, Ryo A, Kimura H, Molecular Evolutionary Analyses of the RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRp) Region and VP1 Gene in Sapovirus GI.1 and GI.2. Microorganisms, 2025, 13(2):322.
2. 横田 翔太, 浅倉 弘幸, 赤瀬 悟, 根岸 あかね, 伊藤 仁, 黒木 絢士郎, 小泉 美優, 岩崎 直哉, 北村 有里恵, 磯貝 まや, 九澤 香織, 林 志直, 長島 真美, 貞升 健志：市販のヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を用いたヒトノロウイルス分離培養方法の検討, 東京健安研セ年報, 75, 141-147, 2024. (吉村和久)
3. 浅倉 弘幸, 赤瀬 悟, 横田 翔太, 岩崎 直哉, 磯貝 まや, 林 志直, 根岸 あかね, 伊藤 仁, 黒木 絢士郎, 小泉 美優, 北村有里恵, 九澤 香織, 長島 真美, 貞升 健志：東京都における胃腸炎ウイルスの検出状況（2022 年度～2023 年度）, 東京健安研セ年報, 75, 125-131, 2024. (吉村和久)
4. Oki H, Niwa R, Pranee S, Motooka D, Onda Y, Nakata J, Nakajima H, Oka Y, Sugiyama H, Yoshii Y, Anzai N, Nakamura S, Iida T., Identification of causative fungus from sterile abscess using metagenomics followed by in situ hybridization, Access Microbiol, 2024, 6(8):000779. v3.
5. Minami S, Kotaki T, Sakai Y, Okamura S, Torii S, Ono C, Motooka D, Hamajima R, Nouda R, Nurdin JA, Yamasaki M, Kanai Y, Ebina H, Maeda Y, Okamoto T, Tachibana T, Matsuura Y, Kobayashi T., Vero cell-adapted SARS-CoV-2 strain shows increased viral growth through furin-mediated efficient spike cleavage., Microbiol Spectr., 2024, 12(4): e0285923.
6. Sada RM, Matsuo H, Motooka D, Kutsuna S, Hamaguchi S, Yamamoto G, Ueda A., Clostridium butyricum Bacteremia Associated with Probiotic Use, Japan., Emerg Infect Dis, 2024, 30(4):665-671.

7. Tamiya S, Matsumoto N, Kurokawa S, Nakamura Y, Takahashi Y, Sakon N, Inoue M, Koike Y, Uchida K, Yuki Y, Ushijima H, Kiyono H, Sato S., H and B Blood Antigens Are Essential for In Vitro Replication of GII.2 Human Norovirus. *Open Forum Infect Dis*, 2024, 12(1):ofae714.
 8. Fujimoto K, Hayashi T, Yamamoto M, Sato N, Shimohigoshi M, Miyaoka D, Yokota C, Watanabe M, Hisaki Y, Kamei Y, Yokoyama Y, Yabuno, Hirose A, Nakamae M, Nakamae H, Uematsu M, Sato S, Yamaguchi K, Furukawa Y, Akeda Y, Hino M, Imoto S, Uematsu S., An enterococcal phage-derived enzyme suppresses graft-versus-host disease. *Nature*, 2024, 632(8023):174-181.
 9. Watanabe M, Uematsu M, Fujimoto K, Hara T, Yamamoto M, Miyaoka D, Yokota C, Kamei Y, Sugimoto A, Kawasaki N, Yabuno T, Sato N, Sato S, Yamaguchi K, Furukawa Y, Tsuruta D, Okada F, Imoto S, Uematsu S., Targeted lysis of *Staphylococcus hominis* linked to axillary osmidrosis using bacteriophage-derived endolysin. *J Invest Dermatol*, 2024, 144(11):2577-2581.
 10. Oka T, Li T-C, Yonemitsu K, Ami Y, Suzuki Y, Kataoka M, Doan YH, Okemoto-Nakamura Y, Kobayashi T, Saito H, Mita T, Tokuoka E, Shibata S, Yoshida T, Takagi H., Propagating and banking genetically diverse human sapovirus strains using a human duodenal cell line: investigating antigenic differences between strains. *J Virol*, 2024, 98(9):e0063924.
 11. Yokoyama M, Doan YH, Motomura K, Sato H, Oka T., Strong evolutionary constraints against amino acid changes in the P2 subdomain of sapovirus GI.1 capsid protein VP1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 710:149878.
- 2023 年度
12. 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.* 2024;16 (1):3.
 13. 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
 14. 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, 14(7):1416.
 15. 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, 104:105348.
16. 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, 15(7): 1497.
 17. 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., Prevalence and Characterization of Gastroenteritis Viruses among Hospitalized Children during a Pilot Rotavirus Vaccine Introduction in Vietnam. *Viruses.*, 2023;15(11):2164.
 18. 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 ウイルス 2023.8 73(1)1-8.
 19. 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. (吉村和久)
 20. 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. (吉村和久)
 21. 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.* 2023, 14:1284274.
 22. 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, 17(3):379–385.
 23. 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. α -Glucosidase inhibitors boost gut immunity by inducing IgA responses in Peyer' s patches. *Front Immunol.* 2023, 14: 1277637.
 24. 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, 43(1):55.
25. 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, 15(9):1929.
 26. 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, 13(1):11610.
 27. 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, 1-16.
 28. 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, 13(1):5407.
 29. 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*. 2023;236:119951.
- 2022年度
30. Doan YH, Yamashita Y, Shinomiya H, Motoya T, Sakon N, Suzuki R, Shimizu H, Shigemoto N, Harada S, Yahiro S, Tomioka K, Sakagami A, Ueki Y, Komagome R, Saka K, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Mizukoshi F, Arita Y, Haga K, Katayama K, Kimura H, Muramatsu M, Oka T. Distribution of Human Sapovirus Strain Genotypes over the last four Decades in Japan: a Global Perspective. *Jpn J Infect Dis*. 2023, 76(4):255-258.
 31. Watanabe K, Oka T, Takagi H, Anisimov S, Yamashita SI, Katsuragi Y, Takahashi M, Higuchi M, Kanki T, Saitoh A, Fujii M. Myeloid-associated differentiation marker is an essential host factor for human parechovirus PeV-A3 entry. *Nat Commun*. 2023, 14(1):1817.
 32. Li T-C, Kataoka M, Doan YH, Saito H, Takagi H, Muramatsu M, Oka T. Characterization of a Human Sapovirus Genotype GII.3 Strain Generated by a Reverse Genetics System: VP2 Is a Minor Structural Protein of the

- Virion. *Viruses*. 2022, 14(8):1649.
33. Miyazaki N, Song C, Oka T, Miki M, Murakami K, Iwasaki K, Katayama K, Murata K. Atomic Structure of the Human Sapovirus Capsid Reveals a Unique Capsid Protein Conformation in Caliciviruses. *J Virol*. 2022, 96(9):e0029822.
 34. Takagi H, Oka T, Ami Y, Suzaki Y, Saito H. A Human Intestinal Cell Line Suitable for the Propagation of Human Parechovirus Type 1 to 6 with a Clear Cytopathic Effect. *Jpn J Infect Dis*. 2022, 75(3):318–321.
 35. Yuki Y, Zuo F, Kurokawa S, Uchida Y, Sato S, Sakon N, Hammarström L, Kiyono H, Marcotte H. Lactobacilli as a Vector for Delivery of Nanobodies against Norovirus Infection. *Pharmaceutics*. 2022, 15(1):63.
 36. Nurdin JA, Kotaki T, Kawagishi T, Sato S, Yamasaki M, Nouda R, Minami S, Kanai Y, Kobayashi T. N-Glycosylation of Rotavirus NSP4 Protein Affects Viral Replication and Pathogenesis. *J Virol*. 2023, 97(1):e0186122.
 37. Masuda A, Man Lee J, Miyata T, Sato S, Masuda A, Taniguchi M, Fujita R, Ushijima H, Morimoto K, Ebihara T, Hino M, Kakino K, Mon H, Kusakabe T. High yield production of norovirus GII.4 virus-like particles using silkworm pupae and evaluation of their protective immunogenicity. *Vaccine*. 2023, 41(3):766–777.
 38. Hoque SA, Kotaki T, Pham NTK, Onda Y, Okitsu S, Sato S, Yuki Y, Kobayashi T, Maneekarn N, Kiyono H, Hayakawa S, Ushijima H. Abundance of Viral Gastroenteritis before and after the Emergence of COVID-19: Molecular Evidence on Wastewater. *J Infect*. 2023, 86(2):154–225.
 39. Noguchi M, Shimizu M, Lu P, Takahashi Y, Yamauchi Y, Sato S, Kiyono H, Kishino S, Ogawa J, Nagata K, Sato R. Lactic acid bacteria-derived γ -linolenic acid metabolites are PPAR δ ligands that reduce lipid accumulation in human intestinal organoids. *J Biol Chem*. 2022, 298(11):102534.
 40. Takahashi Y, Noguchi M, Inoue Y, Sato S, Shimizu M, Kojima H, Okabe T, Kiyono H, Yamauchi Y, Sato R. Organoid-derived intestinal epithelial cells are a suitable model for preclinical toxicology and pharmacokinetic studies. *iScience*. 2022, 25(7):104542.
 41. Pham NTK, Nishimura S, Shimizu-Onda Y, Trinh QD, Komine-Aizawa S, Khamrin P, Okitsu S, Sato S, Kobayashi T, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Emerging norovirus GII.4 Sydney[P31] causing acute gastroenteritis outbreak in children in Japan, during COVID-19, 2021. *J Infect Chemother*. 2022, 28(9):1347–1351.
 42. 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, 14(7):1416.
43. 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, 104:105348.
 44. Uema M, Yonemitsu K, Sasaki Y, Asakura H. Detection of hepatitis E virus RNA from pig bile collected at a slaughterhouse in Japan. *AIMS Microbiology*, 2022, 8(4): 566-574.
 45. Hayashi T, Yamaoka Y, Ito A, Kamaishi T, Sugiyama R, Estes MK, Muramatsu M, Murakami K. Evaluation of Heat Inactivation of Human Norovirus in Freshwater Clams Using Human Intestinal Enteroids. *Viruses*. 2022;14(5):1014.
 46. 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. (吉村和久)
 47. 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. (吉村和久)
- ## 2. 学会発表
- ### 2024 年度
1. Mari Tohya, Masashi Uema. Is Hepatitis E virus emerging in Japan? 8th international Society for Food and Environmental Virology conference, 2024. June 9-14. Tokyo.
 2. Masashi Uema, Mari Tohya. Detection of Norovirus from food related to food poisoning incidents in Japan. 13th International Symposium on Toxic Microorganisms, UJNR. 2024. Sep 17, 18. Tokyo.
 3. Mari Tohya, Masashi Uema. Update on epidemiology and research of HEV in Japan. 13th International Symposium on Toxic Microorganisms, UJNR. 2024. Sep 17, 18. Tokyo.
 4. 上間匡, 南村幸世, 遠矢真理, 斎藤博之. 多様な食品からのウイルス検出のための食品処理方法の検討. 第 45 回日本食品微生物学会, 2024. 9/5, 6. 青森.
 5. 遠矢真理, 南村幸世, 上間匡. 下水試料からのウイルス検出法の比較. 第 45 回日

- 本食品微生物学会, 2024. 9/5, 6. 青森.
6. 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛, 上間匡. パンソルビン・トラップ法プロトコールのアップデートに関する検討. 第 45 回日本食品微生物学会, 2024. 9/5, 6. 青森.
 7. 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛, 上間匡. 病院給食の調理品からパンソルビン・トラップ法によりノロウイルスを検出した食中毒の一例. 第 71 回日本ウイルス学会学術集. 2024. 11/4-6. 愛知県.
 8. 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛, 上間匡. 食品中のウイルスを検出するパンソルビン・トラップ法の開発と実事例への適用. 第 76 回日本細菌学会東北支部 総会・学術集会. 2024. 8/19, 20. 秋田県.
 9. 横田翔太, 浅倉弘幸, 黒木絢士郎, 磯貝まや, 岩崎直哉, 林志直, 赤瀬悟, 長島真美, 貞升健志, (吉村和久). 市販のヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞によるヒトノロウイルス培養と加熱による増殖抑制の検討. 第 71 回日本ウイルス学会学術集会. 2024. 11/4-6. 愛知県.
 10. 笠純華, 原田誠也, 八尋俊輔, 岡智一郎, 徳岡英亮. 2011 年度から 2023 年度に熊本県内の感染性胃腸炎患者から検出されたサポウイルス遺伝子型の推移. 第 71 回日本ウイルス学会学術集会. 2024. 11/4-6. 愛知県.
 11. 楠原一, 前田千恵 Yen Hai Doan, 高木弘隆, 岡智一郎. 三重県におけるサポウイルスの流行状況 2010~2022. VP1 領域の全長解析による遺伝子型別と臨床像. 第 28 回日本ワクチン学会・第 65 回日本臨床ウイルス学会合同学術集会 2024. 10/27. 愛知県.
 12. 岡智一郎. サポウイルス研究の歩みと現在. 第 57 回 ウイルス学会北海道支部シンポジウム. 2024. 7/14. 北海道.
 13. 佐藤慎太郎. H and B blood antigens are essential for in vitro replication of GII.2 human norovirus. 第 71 回日本ウイルス学会学術集会. 2024. 11/4-6. 愛知県.
 14. 佐藤慎太郎. ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を用いたノロウイルス, サポウイルスのアルコール不活化の評価. ウイルス性下痢症研究会 第 35 回学術集会. 2024. 11/3. 愛知県.
- 2023 年度
12. Mari Tohya, Masashi Uema. Recent situation of foodborne viruses in Japan. UJNR 55th Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting. 2023. 8/8, 米国.
 13. 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛, 上間匡. 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. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会. 2023. 9/21, 22, 大阪府.
 14. 上間匡, 南村幸世, 斎藤博之, 秋野和華子. 冷凍ベリーからのウイルス検出法の検討. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会. 2023. 9/21, 22, 大阪府.
 15. 斎藤博之, 秋野和華子*, 野田衛, 上間匡. 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. 第 70 回日本ウイルス学会学術集会. 2023. 9/26-28, 宮城県.
 16. 遠矢真理, 南村幸世, 國吉杏子, 秋野和華子, 斎藤博之, 上間匡. 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. 日本食品衛生学会.

2023. 10/12, 13, 東京都.

17. 元岡大祐. 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. 日本生化学学会大会, 2023. 11. 1, 福岡県.
 18. 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, (吉村和久). 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, 第44回日本食品微生物学会学術総会. 2023. 9/21, 22, 大阪府.
 19. 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. 山口県.
 20. Oka T, Li T-C, Yonemitsu K, Ami Y, Suzaki Y, Okemoto-Nakamura Y, Kataoka M, Doan YH, Takagi H. Establishment and application of an efficient human sapovirus propagation method using HuTu80 cells. The 8th International Calicivirus Conference. 2023. 5/7-11. Netherland.
- 2022 年度
21. 岡智一郎, 高木弘隆, 斎藤博之. 非胃腸炎症例の咽頭拭い液からの下痢症ウイルス検出. 第63回日本臨床ウイルス学会 2022. 6/18, 19, 東京都.
 22. 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下痢症ウイルスの浄水処理性の評価. ウイルス性下痢症研究会第33回学術集会, 2022. 11/12, 長崎県.
 23. 岡智一郎, 李天成, 米満研三, 網康至, 須崎百合子, 中村(桶本)優子, 片岡紀代, 団海燕, 三田哲朗, 小林孝行, 斎藤博之, 八尋俊輔, 佐藤重紀, 柴田伸一郎, 塚田竜介, 高木弘隆. ヒトサポウイルス研究加速のための遺伝子型網羅的リソース確立に向けた取り組み. 第69回日本ウイルス学会, 2022. 11/13-15, 長崎県.
 24. 佐藤 慎太郎. ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いたヒトノロウイルス増殖系の確立. 和歌山医学会. 2022. 7/3, 和歌山県.
 25. 佐藤 慎太郎. ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いたヒトノロウイルス増殖系の確立とその応用. 第96回日本細菌学会, 2023. 3/16-18, 兵庫県.
 26. 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, (吉村和久). 日本食品衛生学会第118回学術講演会. 2022. 11/10, 11, 長崎県.
 27. 村上耕介, 林豪士, 山岡曜子, 伊藤篤, 釜石隆, 杉山隆一, Mary K. Estes, 村松正道. ヒト腸管オルガノイドを用いたシジミ中ヒトノロウイルスの感染性評価. 第69回日本ウイルス学会学術集会 2022. 11/13-15, 長崎県.
 28. 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛, 上間匡. 食品のノロウイルス汚染検出法としてのパンソルビン・トラップ法の有用性の検討 日本ウイルス学会, 2022. 11/13-15, 長崎県.
- 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」

総合研究分担報告（令和 4～6 年度）

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

研究要旨

ノロウイルスによる食中毒事件発生時に、原因食品を特定することは行政処分等の科学的な根拠となるほか、汚染経路の解明、特定は、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、特に食品から原因ウイルスを効率よく精製、抽出する食品処理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 等に示される PEG/NaCl 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、食品中に数十コピー程度のウイルスが含まれていれば検出可能であることを示した。しかし、実際の食中毒では 1 事件で多数（数十種類）の食品検体のうちわずか 1 検体からのみ検出されるなど、作業量と成果には乖離があり、人員が限られる中効率よく検査を進めるために、汚染頻度の高い食品に関するデータの整備なども今後必要と考えられた。

A. 研究目的

食中毒発生時の食品検査において、ノロウイルス等の原因ウイルスの検出率向上は、食中毒事件において行政処分等への科学的根拠となるほか、汚染食品の特定により、食品へのウイルス汚染経路が明らかになるなど、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．

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

戻しわかめ（乾燥わかめを水で戻したもの）

味付きめかぶ

2) 添加回収試験に用いたウイルス液

ノロウイルス GII (4.5×10^4 copies/5uL)

A 型肝炎ウイルス (6.0×10^4 copies/5uL)

Mengovirus (10^5 copies/5uL 程度)

MS2 (12.5×10^6 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，100 倍，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図に示した．

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．

C. 研究結果

1) パンソルビントラップ法（100 倍希釈ウイルス液添加）（表 1）

100 倍に希釈したウイルス液を添加した場合の，試験回数と，陽性数，平均 Ct 値を表 1 に示した．ノロウイルスが 450copies/ μ L，HAV が 600copies/ μ L 程度の添加となる．

冷凍ベリー、野菜スティック、塩むすび、食パン、レタスサラダ、味付きめかぶにおいて、パンソルビン・トラップ法は高い検出率を示した。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（1000 倍希釈ウイルス液添加）（表 2）

表 2 に 1000 倍希釈した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。冷凍ベリーでのノロウイルス検出率が 15/25、HAV が 12/25 と検出できない場合が増加した。他の食材においても検出が難しくなった。

3) PEG/NaCl 沈殿（100 倍希釈ウイルス液添加）（表 3）

パンソルビントラップ法との比較のために PEG/NaCl 法による添加回収試験を実施した（表 3）。

パンソルビントラップ法でと比較して、食パンからの検出率が非常に悪くなったほか、味付きめかぶでもウイルスの検出が難しくなった。

味付きとろろや冷凍とろろは粘性が高いが、添加したノロウイルス、HAV 共によく検出された。

工程管理のために添加した Mengovirus、MS2 とともに高い陽性率を示した。

4) PEG/NaCl 沈殿（1000 倍希釈ウイルス液添加）（表 4）

添加回収試験の結果を表 4 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。塩むすびについては、パンソルビン・トラップ法ではノロウイルスが検出できなかったのに対して、PEG/NaCl 法では 8/16 の検出率となった。戻しわかめ、ネバネバサラダ、ひじきの煮物などはパンソルビン・トラップ法と同程度の低い検出率となった。

D. 考察

本研究では、パンソルビントラップ法と 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 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。表 4、5 の検出率から、パンソルビン・トラップ法、PEG/NaCl 法共に、食品からの検出限界は、食品処理に用いる食品中に存在するウイルスが、数十コピー程度であることが示唆された。

非加熱でかつ、食品取扱時に直接手で扱うことも想定されるところなどの粘性の高い食材でウイルス検出が難しく、粘性の原因となる成分への対処が今後解決すべき課題として残った。

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や PEG/NaCl 法で工程管理に用いることが可能と示唆された。

PEG/NaCl 法では、Mengovirus, MS2 と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に使用するガンマグロブリンの性能に依存すると考えられたが、国内で流通する製品ロットが 1 ロットとなっており、ガンマグロブリンの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。

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 PEG/NaCl 沈殿も、汎用性が高い可能性が示された。

とろろや、オクラ・めかぶ等が材料となる粘性の高い食品については、パンソルビン・トラップ法、PEG/NaCl 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。粘性の原因となるムチンなどの処理法について対処法は新たな課題となった。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uema M, Yonemitsu K, Sasaki Y, Asakura H. Detection of hepatitis E virus RNA from pig bile collected at a slaughterhouse in Japan. AIMS

Microbiology, 2022, 8(4): 566-574.

2. 学会発表

- 1) Mari Tohya, Masashi Uema. Is Hepatitis E virus emerging in Japan? 8th international Society for Food and Environmental Virology conference, 2024. June 9-14. Tokyo.
- 2) Masashi Uema, Mari Tohya. Detection of Norovirus from food related to food poisoning incidents in Japan. 13th International Symposium on Toxic Microorganisms, UJNR. Sep 17, 18. Tokyo.
- 3) Mari Tohya, Masashi Uema. Update on epidemiology and research of HEV in Japan. 13th International Symposium on Toxic Microorganisms, UJNR. Sep 17, 18. Tokyo.
- 4) 上間匡, 南村幸世, 遠矢真理, 斎藤博之. 多様な食品からのウイルス検出のための食品処理方法の検討. 第 45 回日本食品微生物学会, 2024. 9/5, 6. 青森.
- 5) 遠矢真理, 南村幸世, 上間匡. 下水試料からのウイルス検出法の比較. 第 45 回日本食品微生物学会, 2024. 9/5, 6. 青森.
- 6) 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛, 上間匡. パンソルビン・トラップ法プロトコルのアップデートに関する検討. 第 45 回日本食品微生物学会, 2024. 9/5, 6. 青森.
- 7) 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛, 上間匡. 病院給食の調理品からパンソルビン・トラップ法によりノロウイルスを検出した食中毒の一例. 第 71 回日本

ウイルス学会学術集. 2024. 11/4-6. 愛知県.

- 8) 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛, 上間匡. 食品中のウイルスを検出するパンソルビン・トラップ法の開発と実事例への適用. 第 76 回日本細菌学会東北支部総会・学術集会. 2024. 8/19, 20. 秋田県.
- 9) 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛, 上間匡. 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. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会. 2023. 9/21, 22, 大阪府.
- 10) 上間匡, 南村幸世, 斎藤博之, 秋野和華子. 冷凍ベリーからのウイルス検出法の検討. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会. 2023. 9/21, 22, 大阪府.
- 11) 斎藤博之, 秋野和華子*, 野田衛, 上間匡. 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. 第 70 回日本ウイルス学会学術集会. 2023. 9/26-28, 宮城県.
- 12) 遠矢真理, 南村幸世, 國吉杏子, 秋野和華子, 斎藤博之, 上間匡. 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. 日本食品衛生学会. 2023. 10/12, 13, 東京都.
- 13) 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛, 上間匡. 食品のノロウイルス汚染検出法としてのパンソルビン・トラップ法の有用性の検討 日本ウイルス学会, 2022. 11/13-15, 長崎県.

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

パンソルビン・トラップ法による食品処理手順

1. 食品 10g
フィルター付きストマッカー袋に入れる
↓
2. 50mL の食品洗浄液を加える
↓
3. 室温 15 分 超音波洗浄あるいは手で揉む
↓
4. フィルター濾過液 45mL を遠心チューブへ移す
↓
5. 室温 30 分 3,000 RPM で遠心する
↓
6. 遠心上清を新しいチューブへ移す
↓
7. ガンマグロブリン, パンソルビンを添加, 混合
↓
8. 37 度 15 分 静置
↓
9. 室温 20 分 3,000RPM で遠心する
↓
10. 沈渣に RNA 抽出キットの Lysis Buffer 等を加えて懸濁する

・食品洗浄液 0.1M Tris/HCl, 0.5% NaCl, 0.1% Tween 20, pH8.4)

・パンソルビン・トラップ法 Hiroyuki Saito, et al., Food and Environmental Virology, 7(3), 239-248, 2015 DOI: 10.1007/s12560-015-9191-7

・乾燥食品の場合は, 滅菌水などを加えてから食品洗浄液を加える

・検体が 10g に満たない場合は全量を用いる

PEG/NaCl 法による食品処理手順

1. 食品 25g
フィルター付きストマッカー袋に入れる
↓
2. 40mL の食品洗浄液を加える
↓
3. 室温 20 分 60RPM で振盪
↓
4. フィルター濾過液 45mL を遠心チューブへ移す
↓
5. 4 度 30 分 10,000 g で遠心する
↓
6. 遠心上清を新しいチューブへ移す
↓
7. 5x PEG/NaCl 溶液 10mL 加える
↓
8. 室温 1 分 60RPM で振盪してよく混和する
5 度 60 分 60RPM で振盪
↓
9. 4 度 30 分 10,000 g で遠心, 上清は捨てる
↓
10. ペーパータオル上に逆さに静置するなどしてチューブ内の水分を除く
↓
11. PBS 500 μ L で懸濁する
↓
12. クロロホルム/ブタノールを加える
↓
13. 4 度 10,000 g で 15 分遠心して水相を新しいチューブへ移す

・ 5x PEG/NaCl 溶液 (PEG 500g/L, 1.5M NaCl)

・ ベリー類など食品洗浄液の pH が低下する食品は、あらかじめ pH9 以上に食品洗浄液を調整する

表 1. ウイルス検出率（パンソルビントラップ法，100 倍希釈ウイルス液添加）

	GII (450copies/5 μ l)	HAV (600copies/5 μ l)	Mengovirus	MS2 (12.5 $\times$ 10 ⁶ /5 μ l)
冷凍ベリー	2/4	4/4	0/4	実施せず ^a
	Ct 値: 35.0	Ct 値: 32.4		
野菜スティック	6/6	6/6	4/6	6/6
	Ct 値: 33.0	Ct 値: 32.6	Ct 値: 37.7	Ct 値: 32.2
塩むすび	21/33	33/33	9/33	33/33
	Ct 値: 33.9	Ct 値: 33.4	Ct 値: 37.5	Ct 値: 33.1
食パン	5/9	9/9	2/9	9/9
	Ct 値: 33.6	Ct 値: 33.0	Ct 値: 37.8	Ct 値: 32.2
レタスサラダ	4/6	6/6	1/6	6/6
	Ct 値: 32.2	Ct 値: 31.1	Ct 値: 36.8	Ct 値: 32.4
戻しわかめ	8/8	8/8	2/8	8/8
	Ct 値: 34.8	Ct 値: 34.2	Ct 値: 40.9	Ct 値: 34.0
味付きめかぶ	7/18	12/18	1/18	18/18
	Ct 値: 36.4	Ct 値: 37.0	Ct 値: 39.9	Ct 値: 38.7

表 2. ウイルス検出率（パンソルビントラップ法，1000 倍希釈ウイルス液添加）

	GII (45copies/5 μ l)	HAV (60copies/5 μ l)	Mengovirus	MS2 (12.5 $\times$ 10 ⁵ /5 μ l)
冷凍ベリー	15/25	12/25	5/21	8/8
	Ct 値: 37.3	Ct 値: 36.4	Ct 値: 38.2	Ct 値: 33.4
塩むすび	0/15	12/15	4/15	15/15
		Ct 値: 36.1	Ct 値: 37.7	Ct 値: 32.5
食パン	0/6	1/6	2/6	6/6
	Ct 値: 33.9	Ct 値: 36.0	Ct 値: 36.2	Ct 値: 31.3
レタスサラダ	1/3	3/3	3/3	3/3
	Ct 値: 36.6	Ct 値: 35.7	Ct 値: 37.7	Ct 値: 31.8
戻しわかめ	1/7	2/7	3/7	7/7
	Ct 値: 37.9	Ct 値: 37.3	Ct 値: 36.8	Ct 値: 37.7
ネバネバサラダ	3/25	1/25	0/25	
	Ct 値: 37.7	Ct 値: 37.9		
ひじきの煮物	0/4	1/4	0/4	
		Ct 値: 38.9		
卵の花	1/4	1/4	0/4	
	Ct 値: 37.0	Ct 値: 36.9		
ポテトサラダ	1/3	2/3	1/3	
	Ct 値: 37.0	Ct 値: 36.3	Ct 値: 36.7	

表 3. ウイルス検出率 (PEG/NaCl 法, 100 倍希釈ウイルス液添加)

	GII (450copies/5 μ l)	HAV (600copies/5 μ l)	Mengovirus	MS2 (12.5 $\times$ 10 ⁶ /5 μ l)
冷凍ベリー	30/30	33/34	32/34	24/24
	Ct 値: 31.5	Ct 値: 33.2	Ct 値: 33.8	Ct 値: 27.2
野菜スティック	6/6	6/6	6/6	6/6
	Ct 値: 31.6	Ct 値: 32.8	Ct 値: 29.3	Ct 値: 24.9
塩むすび	10/10	9/10	10/10	10/10
	Ct 値: 33.3	Ct 値: 35.3	Ct 値: 34.6	Ct 値: 26.4
食パン	3/21	0/21	16/21	21/21
	Ct 値: 37.3		Ct 値: 35.4	Ct 値: 30.7
レタスサラダ	10/21	12/12	12/12	12/12
	Ct 値: 30.6	Ct 値: 29.7	Ct 値: 30.1	Ct 値: 24.5
戻しわかめ	7/9	7/9	6/9	9/9
	Ct 値: 36.0	Ct 値: 36.3	Ct 値: 38.4	Ct 値: 32.4
味付きめかぶ	0/13	0/13	0/13	0/13
ネバネバサラダ	3/15	3/15	1/15	14/15
	Ct 値: 36.2	Ct 値: 37.2	Ct 値: 39.0	Ct 値: 37.7
味付きとろろ	19/22	18/22	20/22	22/22
	Ct 値: 34.6	Ct 値: 35.0	Ct 値: 36.1	Ct 値: 29.8
冷凍とろろ	5/7	6/7	7/7	7/7
	Ct 値: 33.5	Ct 値: 34.5	Ct 値: 36.7	Ct 値: 29.8
ひじきの煮物	2/3	1/3	0/3	3/3
	Ct 値: 36.5	Ct 値: 36.7		Ct 値: 30.0
ポテトサラダ	3/3	2/3	3/3	3/3
	Ct 値: 35.6	Ct 値: 37.0	Ct 値: 35.7	Ct 値: 26.1

表 4. ウイルス検出率 (PEG/NaCl 法, 1000 倍希釈ウイルス液添加)

	GII (45copies/5 μ l)	HAV (60copies/5 μ l)	Mengovirus	MS2 (12.5×10^5 /5 μ l)
冷凍ベリー	36/48	32/52	52/52	36/36
	Ct 値: 32.9	Ct 値: 34.2	Ct 値: 32.9	Ct 値: 26.6
塩むすび	8/16	13/16	16/16	16/16
	Ct 値: 37.0	Ct 値: 36.6	Ct 値: 33.5	Ct 値: 26.4
食パン	0/11	1/11	6/11	11/11
		Ct 値: 42.1	Ct 値: 35.1	Ct 値: 31.9
レタスサラダ	3/3	2/3	3/3	3/3
	Ct 値: 34.7	Ct 値: 36.6	Ct 値: 31.3	Ct 値: 24.6
戻しわかめ	0/7	2/7	4/7	7/7
		Ct 値: 37.8	Ct 値: 38.1	Ct 値: 33.0
ネバネバサラダ	0/2	0/2	0/2	2/2
				Ct 値: 37.8
ひじきの煮物	0/3	0/3	0/3	3/3
				Ct 値: 32.2
味付きとろろ	0/4	1/4	4/4	4/4
		Ct 値: 35.2	Ct 値: 36.0	Ct 値: 29.9
ポテトサラダ	0/3	0/3	3/3	3/3
			Ct 値: 35.3	Ct 値: 26.3

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」

総合研究分担報告(令和4~6年度)

ノロウイルス, サポウイルスの不活化条件に関する情報収集

研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	遠矢 真理	国立医薬品食品衛生研究所
	岡 智一郎	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

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

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

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

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

A. 研究目的

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

2016年に Ettayebi らがヒト腸管由来のオルガノイドを用いたヒトノロウイルスの *in vitro* 培養系を発表後は、複数の研究グループにおいてヒトノロウイルスの実験室内増殖系が開発され、ヒトノロウイルスを直接用いた

不活化条件が提示される状況となっている。

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

B. 研究方法

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

C. 研究結果

1. ヒトノロウイルスの不活化条件(表1)

1-1. 次亜塩素酸ナトリウム

ヒト腸管由来の培養系では 50ppm 以上の濃度で 1 分間反応させることで感染後のウイルス増殖がなくなった。一方で、iPS 由来腸管上皮を用いた培養系では 1000ppm5 分間の反応で不活化された。

1-2. エタノール

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

1-3. 加熱

2022 年度の情報では、少なくとも 60 度 15 分の処理が必要であったが、2024 年に 50 度 20 分で 2log 程度のウイルス増殖の減少が起きると報告されていた。

1-4. 紫外線

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

1-5. 塩素、二酸化塩素、過酢酸によるノロウイルスの不活化が報告されていた。

2. ヒトサポウイルスの不活化条件 (表 2)

1-1. 塩素

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

1-2. 加熱

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

60 度 30 分では GII.3 型のサポウイルスは不活化されなかった。

1-3. 紫外線

5.4mJ/cm² の反応ではサポウイルスは不活化されなかった。

D. 考察

ヒト腸管由来、iPS 細胞由来、ゼブラフィッシュなど複数の in vitro ヒトノロウイルス培養系が開発され、研究が進行しており、さまざまなウイルス不活化方法についてデータが報告されつつある。

ノロウイルスを用いた実験系では、本研究班でも検証しているように、細胞へインプットする際のウイルス量、感染後に増殖したウイルス量ともに RNA コピー数で計測し判断するしかない。

さらに in vitro 培養系では基本的に、感染直後と感染 72 時間後のウイルス RNA コピー数を比較し、72 時間後に RNA コピー数が増加するかどうか、さらに増加した RNA レベルが対象群と比べてどの程度かで感染性ウイルスがどの程度残存していたかを判断している。

RNA コピー数は感染性ウイルス量を必ずしも示さないため、現状で報告される加熱温度等による不活化条件は、定量的なウイルスクリアランスを示すことができていないことに注意が必要である。

また、不活化処理によってごくわずかに残存する感染性ウイルスが増殖するには 72 時間以上の時間を要する可能性もあり、現状のノロウイルス in vitro 培養系では判断できない。

サポウイルスは、ノロウイルスに比較して非常に効率よく増殖する培養系が確立されており、ストックウイルスの作成も進んでいる。ノロウイルスに近縁なヒト腸管系病原ウイルスとして食品中のウイルス制御・安全性確保に向けた検証にサポウイルスを有効に利用していく必要がある。

E. 結論

HACCP の考え方に基づいたウイルス制御に

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

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

なし

2. 学会発表：

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

表 1 ノロウイルスの不活化条件

次亜塩素酸Na					
遺伝子型	濃度	反応時間	Log reduction	培養細胞系	文献
GII.4	50ppm以上	1min	Inactivated 50ppmだとinput titerの減少なし。ただし細胞内での増殖なし。	Human intestinal enteroids (HIEs)	Costantini V, et. al., Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. <i>Emerg Infect Dis.</i> 2018 Aug;24(8):1453-1464.
GII.4	0.1% (1000 ppm)	5 min	Inactivated 約3 logの減少	human iPSC-derived IECs	Sato S, et. al., Alcohol abrogates human norovirus infectivity in a pH-dependent manner. <i>Sci Rep.</i> 2020 Sep 28;10(1):15878.
GII.3, GII.6, GII.17	0.1% (1000 ppm)	5 min	Inactivated 約2-3 logの減少		
エタノール					
遺伝子型	濃度	反応時間	Log reduction	培養細胞系	文献
GII.4	70%エタノール	5min	1.3-2.9 log: input titerの減少値、 up to 0.7 log: replication level	Human intestinal enteroids (HIEs)	Costantini V, et. al., Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. <i>Emerg Infect Dis.</i> 2018 Aug;24(8):1453-1464.
GII.4	70%エタノール	1min	1.3-2.9 log: input titerの減少値		
GII.4	70%エタノール	5min	Inactivated 約 3 log の減少: replication level (72 hpi)	human iPSC-derived IECs	Sato S, et. al., Alcohol abrogates human norovirus infectivity in a pH-dependent manner. <i>Sci Rep.</i> 2020 Sep 28;10(1):15878.
	70%エタノール+1%クエン酸	20sec	Inactivated 約 2.5 log の減少: replication level (72 hpi)		
GII.3, GII.6	70%エタノール	5min	減少なし		
	70%エタノール+1%クエン酸	5min	約 2 log の減少: replication level (72 hpi)		
GII.7	70%エタノール	5min	減少なし		
	70%エタノール+1%クエン酸	5min	約 1 log の減少: replication level (72 hpi)		
GII.17	70%エタノール	5min	減少なし		
	70%エタノール+1%クエン酸	5min	約 2 log の減少: replication level (72 hpi)		
	70%エタノール+15%レモンジュース	5min	約 3 log の減少: replication level (72 hpi)		
GII.17	70%エタノール	60 sec	減少なし	Human induced pluripotent stem cell-derived small intestinal	Hiraishi E, et al., In Vitro Differential Virucidal Efficacy of Alcohol-Based Disinfectants Against Human Norovirus and Its Surrogates. <i>Microorganisms.</i> 2025 Feb 8;13(2):368.
熱					
遺伝子型	反応温度	反応時間	Log reduction	培養細胞系	文献
GII.4	60℃	15min	Inactivated 約2.5-3 logの減少	Stem cell-derived human enteroids	Ettayebi K, et. al., Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. <i>Science.</i> 2016 Sep 23;353(6306):1387-1393.
GII.4	90℃	1min	Inactivated 約1.5 logの減少	Human intestinal enteroids (HIEs)	Hayashi T, et. al., Human Norovirus in Freshwater Clams Using Human Intestinal Enteroids. <i>Viruses.</i> 2022 May 10;14(5):1014.
GII.4	50℃	20min	Inactivated	Human intestinal enteroids (HIEs)	Shaffer M, et al., Heat inactivation of aqueous viable norovirus and MS2 bacteriophage. <i>J Appl Microbiol.</i> 2024 Feb 1;135(2):xxae033.
	60℃	7min 30sec	約2logの減少		
	70℃	5 min			
紫外線					
遺伝子型	反応条件		Log reduction	培養細胞系	文献
GII.2, GII.4, GII.17	6.0mJ/cm ²		Infectivity が2 log以上減少	Zebra fish embryo	Tan MTH, et. al., Use of Zebrafish Embryos To Reproduce Human Norovirus and To Evaluate Human Norovirus Infectivity Decay after UV Treatment. <i>Appl Environ Microbiol.</i> 2023 Mar 21:e0011523.
塩素					
遺伝子型	反応条件	反応時間	Log reduction	培養細胞系	文献
GII.4	20ppm	1min	Inactivated 約3 logの減少	Human intestinal enteroids (HIEs)	Allende A, et. al., Human intestinal enteroids and predictive models validate the operational limits of sanitizers used for viral disinfection of vegetable process wash water. <i>Int J Food Microbiol.</i> 2024 Mar 2;413:110601.
二酸化塩素					
遺伝子型	反応条件	反応時間	Log reduction	培養細胞系	文献
GII.4	3ppm	5min	Inactivated 約3 logの減少	Human intestinal enteroids (HIEs)	Allende A, et. al., Human intestinal enteroids and predictive models validate the operational limits of sanitizers used for viral disinfection of vegetable process wash water. <i>Int J Food Microbiol.</i> 2024 Mar 2;413:110601.
過酢酸					
遺伝子型	反応条件	反応時間	Log reduction	培養細胞系	文献
GII.4	80ppm	5min	Inactivated 約4 logの減少	Human intestinal enteroids (HIEs)	Allende A, et. al., Human intestinal enteroids and predictive models validate the operational limits of sanitizers used for viral disinfection of vegetable process wash water. <i>Int J Food Microbiol.</i> 2024 Mar 2;413:110601.

表 2 サポウイルスの不活化条件

塩素

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

熱

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

紫外線

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

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「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」

総合研究分担報告（令和 4～6 年度）

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。しかしながら、食品中に含まれるウイルスは微量であり、ウイルス性食中毒事例における原因食品の特定は難しい。さらに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、現在は遺伝子配列の解析までは整備が不十分である。有効なウイルス検出法としてパンソルビントラップ法が挙げられるが、本方法は黄色ブドウ球菌の DNA が混入する為、次世代シーケンサー（NGS）を用いた遺伝子配列解析では不適とされている。

本研究では、NGS への応用もふまえたウイルス検出法の検討および、NGS を利用したウイルスの遺伝子配列解析を行うことにした。そこで 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た研究を行い、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。

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。しかしながら、食品中に含まれるウイルスは微量であることが多く、ウイルス性食中毒事例における原因食品の特定は難しい。また、現在のウイルス性食中毒の調査においては、原因ウイルス核酸をリアルタイム PCR 等で検出することが主に行われ、遺伝子配列解析によるより精確な原因の特定や汚染ルートの調査法の整備はまだ不十分である。さらに食品中からの有効なウイルス検出法としてパンソルビントラップ

法が挙げられるが、本方法は黄色ブドウ球菌の DNA が混入する為、将来的に導入される次世代シーケンサー（NGS）を用いた遺伝子配列解析では不適とされている。

近年 NGS を利用したウイルスの疫学解析について研究成果が出ているが、特に下水を使った疫学解析への NGS の導入は盛んに試みられており、NGS 導入をふまえたウイルスの濃縮法についても新規手法が報告されている。下水試料からのウイルスの検出法では、ポリエチレングリコール（PEG）沈殿法が多くの検査機関で導入されている。PEG 沈殿法は簡便で特別な機械の導入の必要性がない長所がある一方で、オーバーナイトでの沈殿処理が必要で時間がかかる短所を持つとされる。近

年 PEG 沈殿法の短所を補う新たな代替法である COPMAN 法や Pegcision 法が開発、発表された。しかしながら、新たな代替法と従来の PEG 沈殿法の比較については、逆転写酵素の統一やリアルタイム PCR 用試薬を統一するなどの十分な検討が行われていない。そこで本研究では、PEG 沈殿法の短所を補うために、沈殿処理時間の短縮を検討する。さらに、新

B. 研究方法

1) ウイルスの検出法比較のための試料検体の調整

秋田県の下水处理施設で採水し、ノロウイルス (Nov) 陰性と確認された流入水と処理水にノロウイルス G1 (Nov G1), ノロウイルス G2 (Nov G2), メンゴウイルスおよびネコカリシウイルスを添加し、試料検体を調整し、10ml ずつに分注し、本研究に用いた。

2) ウイルスの濃縮および核酸抽出

PEG 沈殿法では試料 10ml に PEG6000 および NaCl を 0.8g ずつ添加し、沈殿時間を 0 時間、3 時間、24 時間 (オーバーナイト、0/N) の 3 条件を設けて試験した。沈殿処理後、10,000g で 30 分間の遠心を行った。沈澱を収集後、自動核酸抽出機器 Maxwell

(Promega 社) と抽出試薬 Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid (Promega 社) を用いて核酸抽出を行った。COPMAN 法では試料 10ml を用いて、COPMAN DNA/RNA extraction kit for wastewater

(AdvanSentinel 社) を用いて、ウイルスの濃縮および核酸抽出を行った。Pegcision 法では試料 10ml を用いて、Pegcision キット (SEGNOS 社) を用いてウイルスの濃縮を行い、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて核酸抽出を行った。

たな代替法と PEG 沈殿法で用いるリアルタイム用試薬を統一させた水試料からのウイルス検出性の比較を行うことにした。また下水由来のウイルスの遺伝子配列解析に関して NGS を導入し、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。

3) NGS を用いた疫学調査のための下水供試検体、ウイルスの濃縮方法および核酸抽出

秋田市内の下水处理場にて 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。下水検体 40ml に PEG 6000 および NaCl を 3.2g 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 分間遠心させ沈澱を収集後、自動核酸抽出機器 Maxwell (Promega 社) と抽出試薬 Maxwell 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

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

5) NGS を用いたウイルスの配列解析

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 を用いて遺伝子型の解析を行った。

C. 研究結果

1) ウイルスの検出法の検討

各条件における CT 値の変化を試料の種類（放流水および流入水）とウイルスごとに分けて比較を行った（図 1）。

1-1) 沈殿時間の条件比較

PEG 沈殿法において、沈殿時間を 0 時間、3 時間、0/N で比較したところ、沈殿作用時間が長いほど CT 値が減少し、検出されるウイルスの増加が認められた。また沈殿時間を取らずに遠心作業に移ると、一部の検体からはウイルスの検出はされなかった。一方で、沈殿時間 3 時間と 0/N で比較をすると CT 値の差は減少されており、3 時間の条件で安定的に検出できた。

1-2) PEG 沈殿法とその他の濃縮法の比較
COPMAN 法で濃縮および核酸抽出をした際に、放流水では Nov G1 の検出において 11 検体中 4 検体で、メンゴウイルスでは 11 検体中 1 検体で検出できなかった。流入水でも同様に Nov G1 およびメンゴウイルスにおいて 1 検体から検出できなかった。一方で Pegcision 法ではどの検体からもウイルスは安定的に検出された。

0/N 条件での PEG 沈殿法と比較をすると、COPMAN 法および Pegcision 法は CT 値が高く、3 時間の沈殿処理条件の PEG 沈殿法とは同程度であった。

2) NGS を利用したウイルスの遺伝子配列解析

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 Nov GI および GII 共に Nov 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 2）。NGS を用いた遺伝子配列解析では、GI は

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

D. 考察

1) ウイルスの検出法の検討

PEG 沈殿法において様々な沈殿時間の条件を比較したところ、0/N の条件が今回用いたウイルスの検出において一番検出効率がよかった。また 3 時間の沈殿条件の場合、0/N との CT 値の差は減少しており、0 時間の沈殿条件でウイルス検出が出来なかった検体でもウイルスが検出された。本データは、3 時間の沈殿条件でもウイルス検出における定性的な結果が変わらないことを明らかにし、従来の PEG 沈殿法の短所をカバーできる結果となり、PEG 沈殿法の改良の提案に有用な情報となった。

二つの代替法について、本研究では数検体においてウイルスの検出が出来なかった。これは代替法で推奨されている逆転写酵素やリアルタイム PCR 酵素試薬を用いなかったことが影響していると考えられる。つまり濃縮液の中に残る阻害物質の影響を考慮する必要性を示している。そのため、代替法で推奨されている製品やその他の製品も含めて、逆転写酵素やリアルタイム PCR 試薬についても同様の試験を実施し比較する必要性を示唆している。

2) NGS を利用したウイルスの遺伝子配列解析

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 Nov が検出された。NGS を利用した遺伝子配列解析から、Nov GI では GI.3 および GI.6 が、Nov 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

本研究結果から、PEG 沈殿法における沈殿時間の短縮について有用な知見が得られた。また逆転写酵素やリアルタイム PCR 酵素試薬についても比較検討を行う必要性も明らかとなった。さらに、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 Nov 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。

本成績は食品検体からのより効率的なウイルス検出法の確立、さらに将来的な NGS を用いた遺伝子配列解析への応用にもつながるため、同様の試験を食品サンプルでも試験し比較について検討を進めたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 遠矢真理, 南村幸世, 國吉杏子, 秋野和華子, 斎藤博之, 上間匡. 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. 日本食品衛生学会. 2023. 10/12, 13, 東京都.

2) 遠矢真理, 南村幸世, 上間匡. 下水試料からのウイルス検出法の比較. 第 45 回日本食品微生物学会, 2024. 9/5, 6. 青森.

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. 試料水ごとの各ウイルスの CT 値

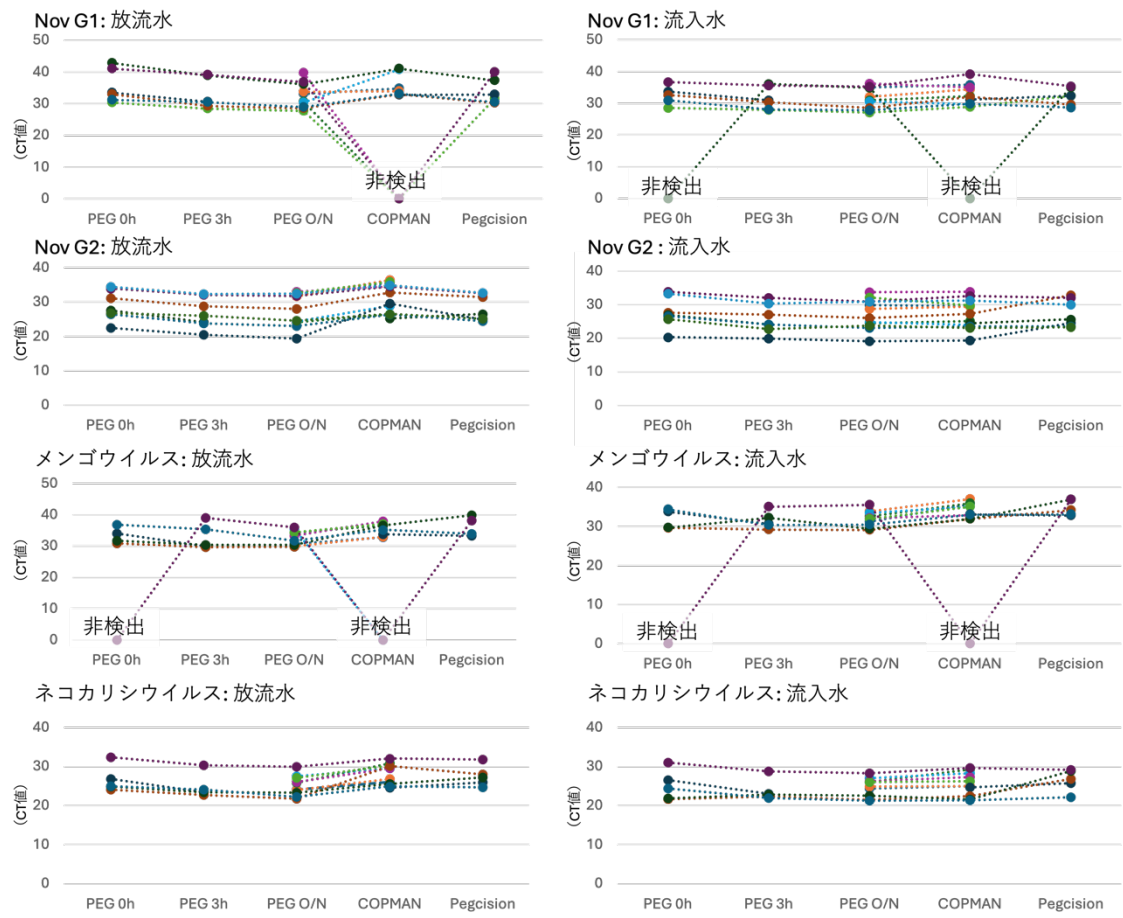
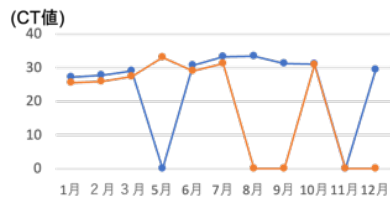


図 2. Nov GI および GII のリアルタイム PCR による検出成績

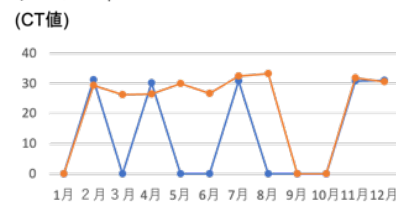
表 1. NGS で検出されたノロウイルスの遺伝子型

2019 年		2020 年	2021 年	2022 年
1 月	GI. 2, -3, -6	GI. 3, -6	—	GI. 2, -6

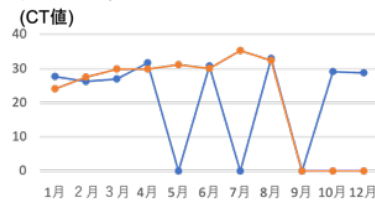
◆ 2019年



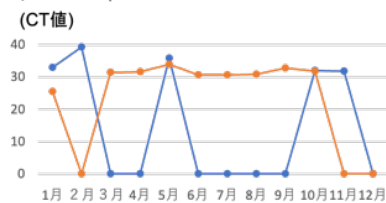
◆ 2021年



◆ 2020年



◆ 2022年



GI : ■ GII : ■

	GII. 2, -3, -4, -17	GII. 17	—	GII. 3, -4, -6
2 月	GI. 2, -3, -4	GI. 3, -6	GI. 3, -4	GI. 6
	GII. 2, -4, -17	GII. 2, -4, -6, -17	GII. 2, -17	GII. 2, -3, -4, -6, -17
3 月	GI. 2, -3, -4	GI. 3	—	—
	GII. 2, -4, -17	GII. 2, -4, -6, -17	GII. 2, -17	GII. 2
4 月	—	GI. 2	—	GI. 4
	—	GII. 2, -8, -17	GII. 2	GII. 4
5 月	—	—	GI. 3, -6	GI. 3, -5
	GII. 2, -4	GII. 4, -17	GII. 2, -4, -17	GII. 17
6 月	—	—	—	—
	—	GII. 2	GII. 2, -3	—
7 月	—	GI. 6	—	—
	GII. 3, -6	—	—	—
8 月	—	GI. 4	—	—
	—	GII. 2, -6	GII. 17	—
9 月	GI. 2, -3	—	—	—
	GII. 2, -17	—	GII. 10	GII. 4
10 月	GI. 2, -3	—	—	—
	GII. 17	GII. 1, -2, -4,	—	GII. 2, -6, -17
11 月	—	—	GI. 6	GI. 3
	—	—	GII. 2, -4, -10	GII. 2
12 月	GI. 3	GI. 2	GI. 3	—
	—	GII. 2	GII. 6	GII. 2, -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」

総合研究分担報告（令和 4～6 年度）

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

本研究では、食品中に微量に存在する食中毒原因ウイルスを網羅的に検出する新たな検査法の構築を目的として、次世代シーケンサー（NGS）を用いたメタゲノム解析技術を食品衛生検査へ応用する手法の開発に取り組んだ。食品にごく僅かに付着しているウイルス核酸を検出する必要があり、食品自体の DNA などウイルスを検出する上では、夾雑物となるものを効率的に除去しながら、ウイルスの検出感度を上げることが重要である。RNA 抽出法の最適化、ウイルス核酸のターゲット濃縮法の導入、そしてショートリードおよびロングリードシーケンサーを活用することで、微量ウイルスの検出精度を大幅に向上させることができた。特に ISO 法による抽出と Nanopore シーケンサーによる解析の組み合わせにより、ノロウイルスの検出においては、冷凍ベリーで 408 倍、きゅうりで 6,745 倍、レタスで 1,812 倍と、それぞれ検出感度が上昇した。得られた成果は、地方自治体や食品製造現場での迅速な検査実施に資する実用的な検査体系としての可能性を示し、今後の食中毒対策や食品衛生管理体制の高度化に貢献することが期待される。

A. 研究目的

ヒトノロウイルスをはじめとしたウイルス性食中毒は、微量汚染による感染が多く、既存のリアルタイム PCR 法では検出限界を超えられない事例がある。加えて、原因不明の事例に対処するためには網羅的な検出法が不可欠である。本研究は、次世代シーケンス技術によるメタゲノム解析を応用し、想定外のウイルスも含めて食品中の病原体を網羅的に検出する新たな検査法を確立することを目的とした。メタゲノム解析によるウイルス検出は、臨床検体中の病原体を探索する手法としては活用されつつある。一方で、食品由来

の検体は、RNA の分解、夾雑物の存在、ウイルス核酸抽出効率の低さなど、多くの技術的課題があり、検査精度と感度の両立が難しい。本研究では、こうした食品特有の制約を踏まえつつ、RNA 抽出法の最適化、ウイルス濃縮技術の導入、シーケンス法の選定を段階的に評価することで、現実的かつ高性能な検査体系を構築することを目指した。とりわけ近年では、小型かつ現場対応可能な NGS 機器の開発が進み、地方自治体や食品製造現場などでも迅速にウイルスを検出できる可能性が見えてきた。本研究では、ロングリード型のポータブルシーケンサー（Nanopore シーケン

サー)を活用し、抽出から解析までを簡便かつ短時間で行えるプロトコルの構築も目指した。

B. 研究方法

1. 食品のメタゲノム解析における夾雑物の把握

ウイルスを添加した食品をモックサンプルとして準備し、抽出した RNA を対象とし、ショートリードシーケンサーを用いたメタゲノムショットガン解析を行った。食品サンプルとしてミックスベリー、塩むすびを用意した。ウイルスとしては、猫カリシウイルス (feline calicivirus; FCV)、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)。サンプル #3 以外について、パンソルビン・トラップ法を用いた食品処理法により RNA を抽出し、添加したウイルスのリアルタイム PCR およびメタゲノムショットガン解析を行った。cDNA 合成は、微量 RNA からの cDNA 合成に適している RamDA-seq 法を用いて行い、イルミナ社 Nextera XT ライブラリ調製キットを用いて NGS ライブラリを作成した。ライブラリは MGI 社 DNBSEQ-G400RS を用いて 100bp ペアエンドシーケンスを行った。データ解析は、アダプタートリミング、重複リードの除去を行った後、Kraken2 を用いた生物種アノテーションを行った。

2. 夾雑物である 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 2)。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、Nextera XT 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。

3. 核酸抽出方法の違いによるウイルス検出能の比較

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)。

4. ウイルスタージョイントシーケンス法によるウイルス核酸配列の濃縮

パンソルビン・トラップ法を用いない場合、ウイルス濃縮の効果は期待できなくなるため、

代替手法として、抽出済み核酸中に含まれるウイルス配列を濃縮した。食品材料としては、冷凍ベリー、きゅうりスティック、レタスサラダを選定し、それぞれに A 型肝炎ウイルス (HAV)、ノロウイルス、Mengovirus を添加してモックサンプルを作製した (表 4)。パンソルビントラップ法もしくは ISO 法によって抽出された RNA は、ランダムプライマーを用いて逆転写し cDNA を合成後、二本鎖 DNA 化した。Twist 社 EF 2.0 Library Prep キットを用いて NGS ライブラリ化したのち、Twist Comprehensive Viral Research Panel を用いてウイルス由来核酸を濃縮した。ライブラリは、MGI 社の DNBSEQ-G400 を用いてシーケンスした。得られたリードは、demultiplexing、アダプタートリミングを行った後 Kraken2 により生物種のアノテーションを行った。

5. Nanopore シーケンサーによるメタゲノム解析

ポータブルシーケンサーである Nanopore シーケンサーの有用性を確認するため、ショートリード用の NGS ライブラリを用いて、Oxford Nanopore Technologies 社の Ligation Sequencing Kit V14 を用いて Nanopore 用のライブラリ化した後、P2solo を用いてシーケンスした。

6. メタゲノムシーケンスのデータ解析

MGI 社 DNBSEQ-G400RS、Oxford Nanopore Technologies 社の P2solo のデータ共に、得られたリードは、サンプルごとに付加した Index 配列に基づき demultiplexing を行った。続けて、cutadapt を用いたアダプタートリミングを行った後、Kraken2 により生物種のアノテーションを行った。Kraken2 では、あらゆる微生物のゲノム情報を含むデータベースを用いた。

C. 研究結果

1. 食品のメタゲノム解析における夾雑物の把握

1-1. ウイルス検出効率の評価

各サンプルから抽出された RNA を用いて、qPCR によって定量されたウイルス量 (Ct 値、表 5) とメタゲノム解析で検出されたウイルスリード数 (表 6) を比較した。FCV は Ct 値が低いにもかかわらず、他のウイルスよりも得られたリード数が少なかった。さらにミックスベリーにこれらのウイルスを添加したサンプル #2 では、qPCR、メタゲノム共に検出できなかった。一方で、Mengovirus や HAV については、ミックスベリーにウイルスを添加した場合には qPCR で検出できなかったが、メタゲノム解析では食品がない場合と同程度に検出できた。

1-2. メタゲノム解析結果

メタゲノムショットガン解析により得られたリードを様々な生物種にアノテーションした (図 1)。その結果、パンソルビントラップ法を行っていない水にウイルスを添加したサンプル #3 を除き、多くのデータが細菌由来であることがわかった。さらにその細菌種について解析した結果、最も多くアサインされた細菌種は黄色ブドウ球菌であった。

2. 夾雑物である 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したかを表 7 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ほとんど変化しなかった。またウイルス由来のリード数も改善しなかった。

3. 核酸抽出方法の違いによるウイルス検出

能の比較

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 8)。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。

4. ウイルスタargetシーケンス法によるウイルス核酸配列の濃縮

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 9 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ており、冷凍ベリーの場合、最大でノロウイルスは 400 倍以上の検出率に上昇することがわかった。

5. Nanopore シーケンサーによるメタゲノム解析

すでに取得済みのショートリードシーケンサー(DNBSEQ)によるウイルス検出リード数と新たに取得した Nanopore シーケンサーの結果を比較した。比較には、同一抽出核酸かつ同一 NGS ライブラリを用いた。ショートリードシーケンサーにおける検出リード数に対するロングリードシーケンサーにおける 1000 万リードあたりのウイルス検出リード数、つまりロングリードシーケンサーにおける濃縮率を表 10 に示した。パンソルビントラップ法、ISO 法ともに Nanopore シーケンサーの使用によって、大幅にウイルス検出率が上昇した。

特に ISO 法におけるノロウイルスの検出リード数は、冷凍ベリーで 408 倍、きゅうりスティックで 6,745 倍、レタスサラダで 1,812 倍と上昇し、HAV の場合もそれぞれ 12,658 倍、2,313 倍、155 倍と著しく向上した。

D. 考察

本研究により、NGS によるメタゲノム解析は、食品検体中に微量に存在するウイルスの高感度かつ網羅的な検出に有効であることが実証された。中でも食品中に存在する多種多様なウイルスを網羅的かつ高感度に検出するには、抽出法・濃縮法・シーケンス技術の最適な組み合わせが必要であることが示された。特に ISO 法でウイルス核酸を抽出し、ターゲットキャプチャー法によるウイルス由来核酸を濃縮したのち、ロングリードシーケンサーを用いてメタゲノム解析をする手法は、食品中ウイルス検出における有力な手法として有用であることが確認できた。特にロングリード技術の導入は、食品中の夾雑物の影響を受けにくく、リード長による病原体同定精度の向上にも寄与しており、今後の食品衛生検査に活用できる可能性を秘めている。

E. 結論

パンソルビントラップ法に代わる高感度かつ汎用性のある RNA 抽出法(ISO 法)、ターゲットキャプチャー法とロングリード型 NGS(Nanopore)を組み合わせたメタゲノム解析手法が、食品中の病原ウイルス検出において高い実用性を持つことが確認された。今後は、方法の簡略化と標準化を通じ、地方衛生研究所や民間検査機関などへの技術移転と実装が期待される。

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) Oki H, Niwa R, Pranee S, Motooka D, Onda Y, Nakata J, Nakajima H, Oka Y, Sugiyama H, Yoshii Y, Anzai N, Nakamura S, Iida T, Identification of causative fungus from sterile abscess using metagenomics followed by in situ hybridization, *Access Microbiol*, 2024, 6(8):000779. v3
- 3) Minami S, Kotaki T, Sakai Y, Okamura S, Torii S, Ono C, Motooka D, Hamajima R, Nouda R, Nurdin JA, Yamasaki M,

Kanai Y, Ebina H, Maeda Y, Okamoto T, Tachibana T, Matsuura Y, Kobayashi T., Vero cell-adapted SARS-CoV-2 strain shows increased viral growth through furin-mediated efficient spike cleavage., *Microbiol Spectr.*, 2024, 12(4): e0285923

- 4) Sada RM, Matsuo H, Motooka D, Kutsuna S, Hamaguchi S, Yamamoto G, Ueda A., *Clostridium butyricum* Bacteremia Associated with Probiotic Use, Japan., *Emerg Infect Dis*, 2024, 30(4):665-671

2. 学会発表

- 1) 元岡大祐. 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.日本生化学学会大会, 2023.11.1, 福岡県.

A. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図表

表 1. サンプルと添加したウイルス

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

表 2. 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 3. 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 4. 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	冷凍ベリー	パントラ法	HAV, Noro, Mengo
#2	冷凍ベリー	ISO 法	HAV, Noro, Mengo
#3	きゅうりスティック	パントラ法	HAV, Noro, Mengo
#4	きゅうりスティック	ISO 法	HAV, Noro, Mengo
#5	レタスサラダ	パントラ法	HAV, Noro, Mengo
#6	レタス	ISO 法	HAV, Noro, Mengo

表 5. 各ウイルスの Ct 値

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

表 6. 各ウイルスのリード数(100 万リードあたり)

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

表 7. 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 8. 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 9. 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 (HAV)	Noro	濃縮率 (Noro)	Mengo	濃縮率 (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	きゅうり	パントラ法	233		188		75	
#4	きゅうり	ISO 法	9,344	40 倍	20,186	107 倍	16,365	218 倍
#5	レタス	パントラ法	73		117		59	
#6	レタス	ISO 法	1,582	22 倍	12,669	108 倍	14,516	246 倍

表 10. ロングリードシーケンサーにおける各ウイルスの検出濃縮率

	食品	抽出法	HAV	Noro	Mengo
#1	冷凍ベリー	パントラ法	373	408	0
#2	冷凍ベリー	ISO 法	12,658	4,142	2,309
#3	きゅうりスティック	パントラ法	6,547	1,608	156
#4	きゅうりスティック	ISO 法	2,313	6,745	2,634
#5	レタスサラダ	パントラ法	9	28	2
#6	レタスサラダ	ISO 法	155	1,812	1,598

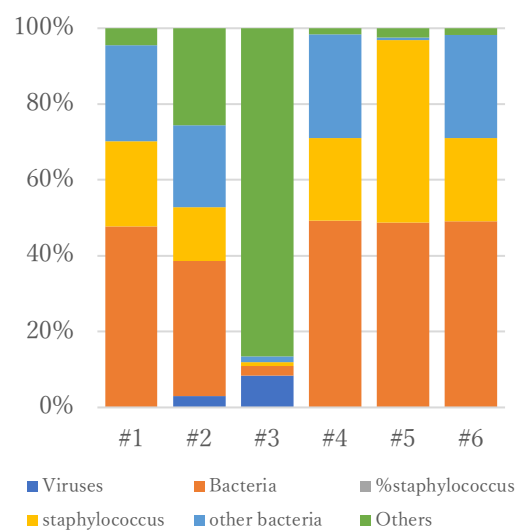


図 1. メタゲノム解析で検出された生物種の相対割合

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」

総合研究分担報告（令和 4～6 年度）

ノロウイルスの疫学動向の解析（2018/25シーズン）

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
	永田 紀子	茨城県衛生研究所 企画情報部
	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）
	田中 良太	杏林大学 医学部 呼吸器・甲状腺外科学
	五十嵐 映子	福井県健康福祉部健康医療局医薬食品・衛生課

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、2018～2025 年 3 月までの遺伝子群・遺伝子型別 NoV 検出・報告状況に関する研究を行った。その結果、過去 5 年間ににおいては、GII が GI に比し多く検出された。また、GI においては、GI. 2, GI. 3, GI. 4 ならびに GI. 7, GII においては、GII. 2, GII. 4, GII. 6 ならびに GII. 17 が多く検出・報告されていた。さらに、2020～2022 年まで、一部の遺伝子型の NoV を除き、それ以前に比し、検出報告数が激減した。しかし、2023 年以降、再び GII. 4 をはじめとする遺伝子型の NoV 検出が多くなりつつある。また、2024 年度においては、過去にほとんど検出されなかった GII. 7 が多く検出されている。さらに、2025 年初頭より、GII. 4 ならびに GII. 17 の両遺伝子型が多く検出されるようになった。本邦において、新型コロナウイルス感染症が感染症法上、5 類移行に伴い、インフルエンザを含め、種々のウイルス感染症の動向が変化しているが、NoV 感染症の動向も他の感染症と同様に変化している可能性が示唆された。

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、約 40 種類報告されているが、主流行遺伝子型はシーズンごとに異なることも示唆されている[ref]。そこ

で、本研究においては、直近の NoV 疫学動向研究の一環として、過去 7 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

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://id-info.jihs.go.jp/surveillance/iasr/graphdata/040/index.html>

C. 研究結果

1. 過去 7 年間に本法で検出・報告された遺伝子群・遺伝子型別 NoV 検出状況を表 1 に示す。その結果、過去 7 年間においては、GII が GI に比し多く検出された。また、GI においては、GI. 2, GI. 3, GI. 4 ならびに GI. 7, GII においては、GII. 2, GII. 4, GII. 6 ならびに GII. 17 が多く検出・報告されていた。さらに、2020～2022 年まで、一部の遺伝子型の NoV を除き、それ以前に比し、検出報告数が激減した。しかし、2023 年以降、再び GII. 4 をはじめとする遺伝子型の NoV 検出が多くなりつつある。また、2024 年度においては、過去にほとんど検出されなかった GII. 7 が多く検出されている。さらに、2025 年初頭より、GII. 4 ならびに GII. 17 の両遺伝子型が多く検出されるようになった。

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

今回のデータにおける特徴として、まず、GI

ならびに GII において、複数の遺伝子型が 2018 年と 2019 年に検出される一方、各遺伝子型の検出報告数には変動がみられた。

GI においては、2018 年には、GI. 2, GI. 3, GI. 4 ならびに GI. 7 が多く検出されたが、2019 年以降それらの遺伝子型の検出報告数が減少した。また、GII においては、2018～2019 年にかけて、GII. 2, GII. 4 ならびに GII. 17 が多く検出されたが、2020 年以降、当該遺伝子群の NoV 検出報告数が大きく減少した。特に、2022 年はこの傾向が顕著であった。既報によれば、新型コロナウイルス感染症の出現後、インフルエンザや RS ウイルス感染症をはじめとする季節性の流行傾向が強い感染症の流行動態に変化がみられている。しかし、2023 年以降、再び GII. 4 をはじめとする遺伝子型の NoV 検出が多くなりつつある。また、2024 から 2025 年前半まで、過去にほとんど検出されなかった GII. 7 が多く検出されていた。さらに、2025 年初頭より、GII. 4 ならびに GII. 17 の両遺伝子型が多く検出されるようになり、2 月以降、これらの遺伝子型が原因と思われる食中毒事例が多発している。本邦において、新型コロナウイルス感染症が感染症法上、5 類移行に伴い、他の感染症と同様、NoV 感染症の動向も変化している可能性がある。よって今後の動向に注意が必要である。

E. 結論

本邦における過去 5 年間（2018～2025 年 3 月）の遺伝子群・遺伝子型別 NoV 検出・報告状況に関する研究を行った。その結果、過去 5 年間においては、GII が GI に比し多く検出された。2024 年以降、過去にほとんど検出されなかった GII. 7 が多く検出されている。さらに、2025 年初頭より、GII. 4 ならびに GII. 17 の両遺伝子型が多く検出されるようになった。

本邦において、新型コロナウイルス感染症が感染症法上、5 類移行に伴い、インフルエンザを含め、種々のウイルス感染症の動向が変化しているが、NoV 感染症の動向も他の感染症と同様に変化している可能性があることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

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, 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, 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 *VP1* Gene

in Human Norovirus Genotypes GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6. *Viruses*. 2023, 15(7): 1497.

- 4) Mizukoshi F, Kimura R, Shirai T, Hirata-Saito A, Hiraishi E, Murakami K, Doan YH, Tsukagoshi H, Saruki N, Tsugawa T, Kidera K, Suzuki Y, Sakon N, Katayama K, Kageyama T, Ryo A, Kimura H. , Molecular Evolutionary Analyses of the RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRp) Region and VP1 Gene in Sapovirus GI.1 and GI.2. *Microorganisms*, 2025, 13(2):322.

2. 学会発表

なし

H. 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. 各年に検出されたNoVの遺伝子型（2018～2025年3月まで）

遺伝子型\年代	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025
GI. 1	2	－	1	1	1	－	18	9
GI. 2	54	49	1	2	－	10	1	－
GI. 3	25	2	2	－	3	6	8	3
GI. 4	19	2	28	11	－	－	5	－
GI. 5	5	1	5	1	1	－	0	－
GI. 6	9	19	－	11	2	3	8	－
GI. 7	40	6	1	1	－	2	0	－
GI. 9	1	－	－	－	－	－	－	－
GII. 1	5	7	1	－	－	－	－	－
GII. 2	634	368	215	379	134	254	53	1
GII. 3	72	251	42	16	16	67	93	3
GII. 4	478	531	267	265	336	513	426	38
GII. 5	2	－	－	－	－	－	－	－
GII. 6	47	93	27	9	2	38	19	10
GII. 7	6	－	－	－	－	40	275	12
GII. 8	3	11	1	－	1	－	0	－
GII. 10	－	4	－	－	－	－	－	－
GII. 13	2	－	1	－	－	1	－	－
GII. 14	1	2	2	－	－	－	－	－
GII. 17	140	67	70	44	21	21	35	142

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 ウイルス研究科長
	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
	黒木絢土郎	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

ノロウイルスを原因とする食中毒事例の発生件数は、新型コロナウイルス感染症以降、以前と比べ著しく減少してきたが、2023年5月以降、再び増加し、2024年は事件数、患者数ともに最も多かった。東京都においては、2021年4月より食中毒事例におけるウイルス検査を集計した結果、1,013事例中365事例（36.0%）の胃腸炎発症者からウイルスを検出した。その内訳として、ノロウイルスを原因とする事例は360事例（98.0%）、サポウイルスは4事例（1.9%）、ロタウイルスは1事例（0.1%）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が多かった。中でもGII.4は107事例と多く、GII.17は56事例、GII.2が49事例であった。さらに、食中毒検査を目的に搬入された1,287検体の食品についてウイルス検査を実施したところ、ノロウイルス等は7検体で検出された。また、市販のiPS細胞を用いたノロウイルスの培養では、検体中のウイルス量が 10^6 以上あれば、ノロウイルスの分離が可能と思われ、糞便検体を85℃、5 分間の加熱処理により増殖が抑制されることを確認することができた。

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ならびに市販iPS細胞によるノロウイルスの分離を試みた。

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2025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1,013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。

2. iPS 細胞を用いたノロウイルスの分離

市販のヒト iPS 細胞（富士フイルム和光純薬）を用い、ノロウイルス陽性検体（糞便）からのノロウイルスの分離ならびに加熱によるノロウイルス増殖の影響を検討した。

（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

1,013 事例中 365 事例 (36.0%) の胃腸炎発症者の糞便材料からウイルスを検出した（図 1）。検出したウイルスは、ノロウイルスが 360 事例 (98.0%)、サポウイルスが 4 事例 (1.9%)、ロタウイルスは 1 事例 (0.1%) 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 45 事例、GII が 291 事例であり、GII の中では GII.4 が 107 事例と最も多く、GII.17 は 56 事例、GII.2 は 49 事例であった。これらの中で、GII.4 および GII.17 は比較的満遍なく検出されていた（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 1,287 検体の食品からのウイルス検出を試み、7 検体 (0.5%) からノロウイルスやロタウイルスが検出された（表 1）。5 検体は二枚貝から、2 件はそれ以外の食品からであった。

3. iPS 細胞を用いたノロウイルスの分離

検体中のウイルス量が 10^6 以上あれば、市販の iPS 細胞でもノロウイルスの分離が可能と思われた。また、ジェノタイプ毎では、GII.2[P16]は約 300 倍、GII.3[P12]は約 20 倍、

GII.6[P7]は約 700 倍、GII.7[P7]は約 1,000 倍、GII.4[P16]は約 3.8 倍、GII.17[P17]は約 1.5 倍に増加し、糞便検体を、85°C で 5 分間加熱して培養が可能か調べたところ、加熱処理により増殖が抑制されることを確認した（図 2）。

D. 考察

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 年以降には増加に転じ、2024 年には食中毒事件数、患者数において他の病原因子と比較し最も多かった。

一方で、食品からの検出率においては、それほど変化はなく、ウイルス量の多い食品においてのみの検出と考えられた。今後はさらなる検出率の向上に向けた検討が必要である。

ノロウイルスの培養については、市販のヒト iPS 細胞を用いた分離が可能であり、熱処理による増殖抑制効果を確認することができた。一方で、市販 iPS 細胞は高価であることから、今後は、オルガノイドを用いた培養についても検討していく予定である。

E. 結論

2021 年 4 月以降、1,013 事例中 365 事例 (36.0%) の胃腸炎発症者の糞便材料を検査し、種々のウイルスを検出した。検出したウイルスは、ノロウイルスが 360 事例 (98.0%)、サポウイルスが 4 事例 (1.9%)、ロタウイルスは 1 事例 (0.1%) 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 45 事例、GII が 291 事例であり、GII の中では GII.4 が 107 事例と最も多く、GII.17 は 56 事例、GII.2 は 49 事例であった。これらの中で、GII.4 および GII.17 は

比較的満遍なく検出された。

食中毒検査を目的に搬入された 1,287 検体の食品からのウイルス検出では、7 検体からノロウイルスやロタウイルスが検出された。

iPS 細胞を用いたノロウイルスの分離では、検体中のウイルス量が 10^6 以上あれば、市販の iPS 細胞でもノロウイルスの分離が可能と思われた。また、加熱処理により増殖が抑制されることを確認することができた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 横田 翔太, 浅倉 弘幸, 赤瀬 悟, 根岸 あかね, 伊藤 仁, 黒木 絢士郎, 小泉 美優, 岩崎 直哉, 北村 有里恵, 磯貝 まや, 九澤 香織, 林 志直, 長島 真美, 貞升 健志: 市販のヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を用いたヒトノロウイルス分離培養方法の検討, 東京健安研セ年報, 75, 141-147, 2024. (吉村和久)
- 2) 浅倉 弘幸, 赤瀬 悟, 横田 翔太, 岩崎 直哉, 磯貝 まや, 林 志直, 根岸 あかね, 伊藤 仁, 黒木 絢士郎, 小泉 美優, 北村 有里恵, 九澤 香織, 長島 真美, 貞升 健志: 東京都における胃腸炎ウイルスの検出状況 (2022年度~2023年度), 東京健安研セ年報, 75, 125-131, 2024. (吉村和久)
- 3) 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. (吉村和久)
- 4) 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.

(吉村和久)

- 5) 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. (吉村和久)
 - 6) 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. (吉村和久)
- ### 2. 学会発表
- 1) 横田翔太, 浅倉弘幸, 黒木絢士郎, 磯貝まや, 岩崎直哉, 林志直, 赤瀬悟, 長島真美, 貞升健志, (吉村和久). 市販のヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞によるヒトノロウイルス培養と加熱による増殖抑制の検討. 第 71 回日本ウイルス学会学術集会. 2024. 11/4-6. 愛知県.
 - 2) 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, (吉村和久). 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, 第44回日本食品微生物学会学術総会. 2023. 9/21, 22, 大阪府.
 - 3) 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，（吉村和久）．日本食品衛生学会第 118 回学術講演会．2022．11/10, 11，長崎県．

H. 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

	搬入数	陽性数	陽性検体
二枚貝	101	5	牡蠣
一般食品	1,186	2	フルーツ、わかめそばの具

→ フルーツ: ノロウイルスGII (遺伝子型: GII.4[P16])
わかめそばの具: ロタウイルス (遺伝子型 G8P[8])

表1 東京都内で発生した食中毒事例における食品からのウイルス検出状況
(2021年4月～2025年2月)

- リアルタイムPCR法による胃腸炎起因ウイルス検査
1,013事例中365事例 (36.0%) の胃腸炎発症者からウイルスを検出
検出されたウイルス (内訳)
・ノロウイルス 360事例 (98.0%)
・サポウイルス 4事例 (1.9%)
・ロタウイルス 1事例 (0.1%)
・食品検査は1,287検体
- ノロウイルス (Capsid領域の遺伝子型別を実施)
GII: 291事例、GI: 45事例
GII.2 49事例 (16.8%)、GII.4 107事例 (36.7%)、GII.17 56事例 (19.2%)

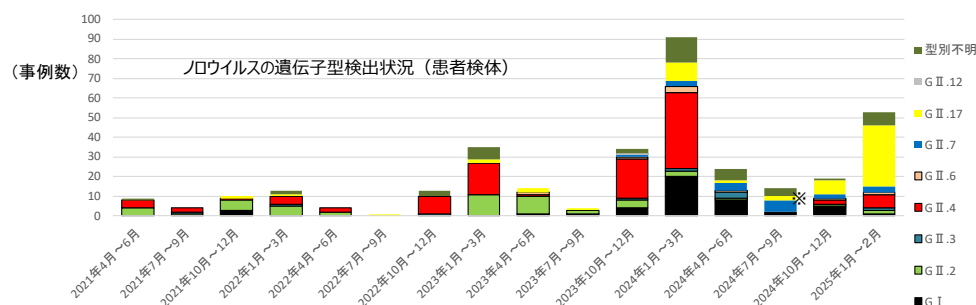
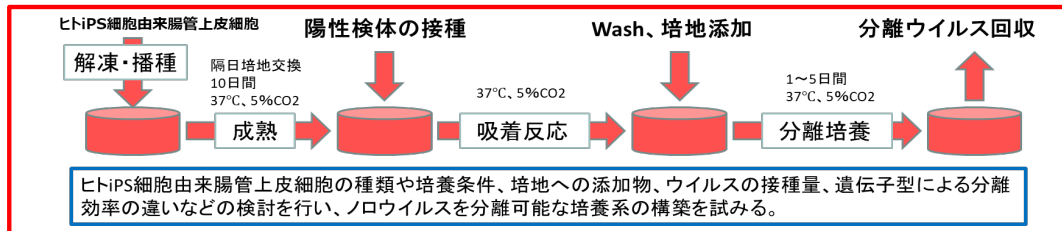


図1 東京都内で発生した食中毒事例におけるウイルス検出状況
(2021年4月～2025年2月)

●分離培養方法が確立されていないノロウイルスについて、市販のヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞および当センターに搬入された陽性検体を使用し、分離培養条件の検討や熱処理による増殖性の変化を検討した。



検体中のウイルス量が 10^6 以上あれば、市販のiPS細胞でもノロウイルスの分離が可能と思われた。また、ジェノタイプ毎では、GII.2[P16]は約300倍、GII.3[P12]は約20倍、GII.6[P7]は約700倍、GII.7[P7]は約1,000倍、GII.4[P16]は約3.8倍、GII.17[P17]は約1.5倍に増加し、糞便検体を、85℃で5分間加熱して培養が可能か調べたところ、加熱処理により増殖が抑制されることを確認した。

図2 ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞を使用したノロウイルス分離法の検討

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」

総合研究分担報告（令和 4～6 年度）

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て、加熱による不活化試験を実施し、iPS 腸管上皮細胞における試験結果との整合性を検証した。検体を様々な条件（60℃・15 分，75℃・1 分，85℃・1 分間）で加熱した後に腸管オルガノイドへ感染させたところ、全ての群において感染性が喪失していた。当該試験結果は、iPS 腸管上皮細胞（和医大にて実施）を用いた不活化試験の結果と一致した。したがって、上記の加熱条件によりヒトノロウイルスが不活化されることが明らかとなった。

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 iPS 細胞を用いた *in vitro* ノロウイルス培養系とも比較することで、より確実性の高い不活化条件の提示を目指した。

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。選抜されたノロウイルス GII.4 2 株を様々な条件で加熱した後、組織幹細胞由来ヒト腸管オルガノイドに感染させた。ノロウイルス溶液は PCR チューブに加えてから、サーマルサイクラーにセットし、特定の温度（85℃、75℃、60℃）および時間で加熱した。加熱後はウイルス溶液を培地に懸濁して、ヒト腸管オルガノイドを用いて感染性を解析した。リアルタイム PCR に用いる標準プラスミド、プライマー（COG2F/COG2R）、プローブ（RING2）は和歌山医科大学（分担研究者 佐藤）と同じものを使用した。

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。iPS 由来腸管上皮細胞による感染結果を比較したところ、同様の感染性を示すことが示された。

選抜された GII.4 2 株を用いて、検体を様々な条件（60℃・15 分、75℃・1 分、85℃・1 分間）で加熱した後に腸管オルガノイドへ感染させたところ、全ての群において感染性が喪失していた。当該試験結果は、iPS 腸管上皮細胞（和医大にて実施）を用いた不活化試験の結果と一致した。本研究成果は海外学術誌にて発表するため、執筆中である。

D. 考察

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結果を得ることができた

E. 結論

異なる施設かつ in vitro 培養系を用いて「中心部で 85-90 度 90 秒以上の加熱」によりノロウイルスが増殖しないことが実証された。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hayashi T, Yamaoka Y, Ito A, Kamaishi T, Sugiyama R, Estes MK, Muramatsu M, Murakami K. Evaluation of Heat Inactivation of Human Norovirus in Freshwater Clams Using Human Intestinal Enteroids. *Viruses*. 2022;14(5):1014.
- 2) 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, 15(7): 1497.

- 3) 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. 2023, 14:1284274.

2. 学会発表

- 1) 村上耕介, 林豪士, 山岡曜子, 伊藤篤, 釜石隆, 杉山隆一, Mary K. Estes, 村松正道. ヒト腸管オルガノイドを用いたシジミ中ヒトノロウイルスの感染性評価. 第69回日本ウイルス学会学術集会 2022. 11/13-15, 長崎県.

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」

総合研究分担報告（令和 4～6 年度）

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

分担研究者

佐藤慎太郎

和歌山医科大学薬学部

研究要旨

食中毒発生時の迅速な原因究明は、特に広域事例での被害拡大防止に極めて重要である。加えて、ヒトノロウイルス (HuNoV) 不活化法の妥当性評価も検査法と共に重要な課題である。これまで、HuNoV の *in vitro* 培養法は確立されておらず、代替ウイルス（ネコカリシウイルス等）を用いた評価に留まっていたが、近年ではヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いて HuNoV 培養が可能な状況となっていることに着目し、本分担研究では、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った。不活化条件の検証にあたっては、宮城県、岩手県、大阪府の協力を得てノロウイルス陽性便検体をウイルスソースとして用い、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、国立感染症研究所ウイルス第二部において腸管オルガノイド系を用い、和歌山県立医科大学にて iPS 由来細胞系を用いて、加熱による不活化に関して、同一の実験プロトコルを用いて確認を行った。

85 度 1 分以上の加熱で *in vitro* でのウイルス増殖が観察されなくなること、さらに加熱によりゲノムコピー数の減少が観察されたことから、ウイルスゲノムにも損傷が起きていることが示唆された。

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

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

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、感染研・村上と実験プロトコルの確認を行った。そのプロトコルに乗っ取り、加熱による GII.4 型

ヒトノロウイルスの不活化効果を、*in vitro* ウイルス増殖系を用いて検討した。

C. 研究結果

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

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 検体を不活化評価に用いることにした。

これまでに、25℃で 1 時間静置しても HuNoV の *in vitro* 複製には影響がないことが報告されているため、25℃に設定したブロックイ

ンキュベーターに HuNoV をセットし、設定温度を 85℃、もしくは 60℃に上げて、設定温度に達してからの時間を振って検討した。その結果、85℃では 5 秒という短時間で完全に不活化された。しかし、ブロックインキュベーター用いた場合、25℃から 85℃に温度が上がるのに 5 分ほど要しており、85℃になるまでの間に不活化されていることが考えられた。そこで、ウイルス液の容量を減らし、より温度制御が早く正確な PCR 機を用いて再検討した。85℃では 1 分以内に完全に不活化されており、60℃、65℃ではわずかに複製能が残る結果となった。60℃、65℃での加熱では、1 分と 10 分で HuNoV の不活化の程度は変わらなかった。

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の 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。

85℃での検討では、1 分以上の加熱で、感染に用いるウイルス液中のゲノムコピー数がすでに減弱していた。この結果は、85℃で 1 分前後の加熱により、HuNoV のタンパク変性のみならず、ゲノムに損傷が入ることを強く示唆するものである。低温調理などで用いられる 60℃程度の加熱の場合も、1 分程度で 90%以上のウイルス不活化が認められたが、反応時間を延長してもその効果に変化は認められなかった。感染研・村上班では、60℃の加熱によっても完全に不活化されるという結果が得られている。この相違に関しては、実験に用いた PCR 機種の違いや、リアルタイム

PCR を 2-step で行うことにより、検出限界の値が小さくなっていることが考えられる。

E. 結論

85℃の加熱では、比較的早い段階で HuNoV の不活化が認められ、代替ウイルスを用いた場合と同様の結果が得られた。60℃前後による不活化に関しては、今後も条件を変えて（特に加熱時間）検討する必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yuki Y, Zuo F, Kurokawa S, Uchida Y, Sato S, Sakon N, Hammarström L, Kiyono H, Marcotte H. Lactobacilli as a Vector for Delivery of Nanobodies against Norovirus Infection. *Pharmaceutics*. 2022;15(1):63.
- 2) Nurdin JA, Kotaki T, Kawagishi T, Sato S, Yamasaki M, Nouda R, Minami S, Kanai Y, Kobayashi T. N-Glycosylation of Rotavirus NSP4 Protein Affects Viral Replication and Pathogenesis. *J Virol*. 2023, 97(1):e0186122.
- 3) Masuda A, Man Lee J, Miyata T, Sato S, Masuda A, Taniguchi M, Fujita R, Ushijima H, Morimoto K, Ebihara T, Hino M, Kakino K, Mon H, Kusakabe T. High yield production of norovirus GII.4 virus-like particles using silkworm pupae and evaluation of their protective

- immunogenicity. *Vaccine*. 2023, 41(3):766-777.
- 4) Hoque SA, Kotaki T, Pham NTK, Onda Y, Okitsu S, Sato S, Yuki Y, Kobayashi T, Maneekarn N, Kiyono H, Hayakawa S, Ushijima H. Abundance of Viral Gastroenteritis before and after the Emergence of COVID-19: Molecular Evidence on Wastewater. *J Infect*. 2023, 86(2):154-225.
 - 5) Noguchi M, Shimizu M, Lu P, Takahashi Y, Yamauchi Y, Sato S, Kiyono H, Kishino S, Ogawa J, Nagata K, Sato R. Lactic acid bacteria-derived γ -linolenic acid metabolites are PPAR δ ligands that reduce lipid accumulation in human intestinal organoids. *J Biol Chem*. 2022, 298(11):102534.
 - 6) Takahashi Y, Noguchi M, Inoue Y, Sato S, Shimizu M, Kojima H, Okabe T, Kiyono H, Yamauchi Y, Sato R. Organoid-derived intestinal epithelial cells are a suitable model for preclinical toxicology and pharmacokinetic studies. *iScience*. 2022, 25(7):104542.
 - 7) Pham NTK, Nishimura S, Shimizu-Onda Y, Trinh QD, Komine-Aizawa S, Khamrin P, Okitsu S, Sato S, Kobayashi T, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Emerging norovirus GII.4 Sydney[P31] causing acute gastroenteritis outbreak in children in Japan, during COVID-19, 2021. *J Infect Chemother*. 2022, 28(9):1347-1351.
 - 8) 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, 17(3):379-385.
 - 9) 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. α -Glucosidase inhibitors boost gut immunity by inducing IgA responses in Peyer's patches. *Front Immunol*. 2023, 14: 1277637.
 - 10) 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, 43(1):55.
 - 11) 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, 15(9):1929.

- 12) 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, 13(1):11610.
 - 13) 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, 1-16.
 - 14) 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, 13(1):5407.
 - 15) Tamiya S, Matsumoto N, Kurokawa S, Nakamura Y, Takahashi Y, Sakon N, Inoue M, Koike Y, Uchida K, Yuki Y, Ushijima H, Kiyono H, Sato S, H and B Blood Antigens Are Essential for In Vitro Replication of GII.2 Human Norovirus. *Open Forum Infect Dis*, 2024, 12(1):ofae714.
 - 16) Fujimoto K, Hayashi T, Yamamoto M, Sato N, Shimohigoshi M, Miyaoka D, Yokota C, Watanabe M, Hisaki Y, Kamei Y, Yokoyama Y, Yabuno, Hirose A, Nakamae M, Nakamae H, Uematsu M, Sato S, Yamaguchi K, Furukawa Y, Akeda Y, Hino M, Imoto S, Uematsu S., An enterococcal phage-derived enzyme suppresses graft-versus-host disease. *Nature*, 2024, 632(8023):174-181.
 - 17) Watanabe M, Uematsu M, Fujimoto K, Hara T, Yamamoto M, Miyaoka D, Yokota C, Kamei Y, Sugimoto A, Kawasaki N, Yabuno T, Sato N, Sato S, Yamaguchi K, Furukawa Y, Tsuruta D, Okada F, Imoto S, Uematsu S., Targeted lysis of *Staphylococcus hominis* linked to axillary osmidrosis using bacteriophage-derived endolysin. *J Invest Dermatol*, 2024, 144(11):2577-2581.
2. 学会発表
- 1) 佐藤 慎太郎. ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いたヒトノロウイルス増殖系の確立. 和歌山医学会. 2022. 7/3, 和歌山県.
 - 2) 佐藤 慎太郎. ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いたヒトノロウイルス増殖系の確立とその応用. 第 96 回日本細菌学会, 2023. 3/16-18, 兵庫県.
 - 3) 佐藤慎太郎. H and B blood antigens are essential for in vitro replication of GII.2 human norovirus. 第 71 回日本ウイルス学会学術集会. 2024. 11/4-6. 愛知県.
 - 4) 佐藤慎太郎. ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を用いたノロウイルス, サボウイルスのアルコール不活化の評価. ウイルス性下痢症研究会 第 35 回学術集会.

2024. 11/3. 愛知県.

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

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」

総合研究分担報告書

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 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
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
	西村直行	神戸常盤大学/Kten Bio 株式会社
	佐守 秀友	神戸常盤大学/Kten Bio 株式会社

研究要旨

ノロウイルスによる食中毒発生要因としては調理従事者の糞便・嘔吐物 由来の食品汚染が主と想定されてきた。しかし、近年、胃腸炎症状の有無に関わらず口腔、鼻腔咽頭ぬぐい液や唾液からもノロウイルスが検出されることが明らかとなってきた。そのため本研究では調理従事者・食品取扱者の上気道飛沫によるノロウイルス汚染の可能性について調査するため、唾液中のノロウイルス検査法を構築し、登録衛生検査所の協力のもと、3年間にわたり調理従事者・食品取扱者、合計 890 検体を対象にノロウイルス検出状況の実態調査を行った。

A. 研究目的

ノロウイルスによる食中毒が頻発しているが、その発生要因として、調理従事者の糞便・嘔吐物飛沫による食品汚染が主と想定されてきた。しかし、我々自身の解析、および海外からの論文報告により、糞便だけでなく、口腔、鼻腔咽頭スワブや唾液からもノロウイルス核酸が検出される例が明らかとなってきた(岡ら, 第 63 回日本臨床ウイルス学会 2022, Dabilla N et al., J. Clin. Virol. 2017; 87:60-66., Anfruns-Estrada E et al., Viruses. 2020;12 :1369.)。さら

に本研究班の開始後まもなく、ヒトノロウイルスが唾液腺細胞株に感染し増殖することが報告された (Ghosh S. et al., Nature. 2022; 607:345-350.)。

調理従事者について、糞便に加え、上気道粘液からノロウイルスが検出されれば、糞便・嘔吐物汚染以外のルートでもノロウイルスが感染伝播する可能性が示され、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、本研究では我が国の調理従事者・食品 取扱者を対象に、糞便に加え、医療関係者を介在せず非侵襲的に自己採取でき

る上気道粘液として唾液を対象にノロウイルスが検出されるか検討した。

B. 研究方法

1. 材料

1) ノロウイルスをスパイクした唾液検体
陽性コントロールとして、ノロウイルス陰性の市販唾液（健常者の唾液を pool したもの）（991-05-P Lee BioSolutions, コスモ・バイオ取り扱い）にノロウイルス陽性糞便 GI.7 GII.4 を添加した唾液を調製した。

2) 調理従事者・食品取扱者の唾液検体

2022～2024 年度に株式会社 日本環境衛生研究所において糞便中のノロウイルス検査を行う調理従事者・食品取扱者のうち、本研究への参加の同意が得られた 890 名が自己採取した唾液を PBS(-) で 2 倍希釈したものを解析対象とした。検体の内訳は 2022 年度が 304 検体、2023 年度が 371 検体、2024 年度が 215 検体である。

2. ノロウイルスの検出

2022～2023 年度は、MagNAPure 96 (Roche) と MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (ロシュ 6543588001) でウイルス核酸を抽出後、TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher Scientific 4444434) と、COG1 F/R プライマーと RING1-TPa, TPb プローブ、もしくは COG2-F/R プライマーと RING2-TP プローブを用いて、2024 年度は唾液中ノロウイルス核酸直接検出キット（神戸常盤大学/Kten Bio 株式会社）を使用し、それぞれキットの指示通りの組成、温度条件で反応させた。

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。

いずれの検出系も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

3 年間の研究期間中に解析した健常な調理従事者・食品取扱者の唾液、合計 890 検体については、ノロウイルス陽性検体は認められなかった。また、2 名の糞便からノロウイルスが検出され、遺伝子解析できたものは GII.17[P17]であった。

D. 考察

本研究では糞便中のノロウイルス陽性者が一定数いることを前提に、かつ医療行為とならない、自己採取可能な上気道粘液として選定した唾液でノロウイルス陽性になる例を想定して解析を行ったが、解析期間中、健常調理従事者で糞便中のノロウイルスが陽性だったのがわずか 2 名であり、唾液からのノロウイルス陽性者を認めなかった。

なお、本研究の解析期間終了後の 2025 年 2 月下旬以降、我が国では新型コロナ以前に匹敵するノロウイルス集団食中毒事例が多発し

ていることから、引き続きノロウイルスの汚染源調査の重要性があると考えている。

E. 結論

本研究期間中、唾液でノロウイルス陽性となる健常者な調理従事者・食品取扱者はいなかった。本研究の目的を達成するために、今後は、糞便中のノロウイルス陽性率の高い対象者を選定する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oka T, Li T-C, Yonemitsu K, Ami Y, Suzaki Y, Kataoka M, Doan YH, Okemoto-Nakamura Y, Kobayashi T, Saito H, Mita T, Tokuoka E, Shibata S, Yoshida T, Takagi H., Propagating and banking genetically diverse human sapovirus strains using a human duodenal cell line: investigating antigenic differences between strains. J Virol, 2024, 98(9):e0063924.
- 2) Yokoyama M, Doan YH, Motomura K, Sato H, Oka T., Strong evolutionary constraints against amino acid changes in the P2 subdomain of sapovirus GI.1 capsid protein VP1. Biochem Biophys Res Commun, 2024, 710:149878.
- 3) 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. 2024 Jan 18;16(1):3.

- 4) 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., Prevalence and Characterization of Gastroenteritis Viruses among Hospitalized Children during a Pilot Rotavirus Vaccine Introduction in Vietnam. Viruses., 2023;15(11):2164.
- 5) 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ウイルス 2023.8 73(1)1-8.
- 6) Doan YH, Yamashita Y, Shinomiya H, Motoya T, Sakon N, Suzuki R, Shimizu H, Shigemoto N, Harada S, Yahiro S, Tomioka K, Sakagami A, Ueki Y, Komagome R, Saka K, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Mizukoshi F, Arita Y, Haga K, Katayama K, Kimura H, Muramatsu M, Oka T. Distribution of Human Sapovirus Strain Genotypes over the last four Decades in Japan: a Global Perspective. Jpn J Infect Dis. 2023, 76(4):255–258.
- 7) 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. 2023;236:119951.

- 8) Watanabe K, Oka T, Takagi H, Anisimov S, Yamashita SI, Katsuragi Y, Takahashi M, Higuchi M, Kanki T, Saitoh A, Fujii M., Myeloid-associated differentiation marker is an essential host factor for human parechovirus PeV-A3 entry. Nat Commun. 2023 Mar 31;14(1):1817.
- 9) Li T-C, Kataoka M, Doan YH, Saito H, Takagi H, Muramatsu M, Oka T. Characterization of a Human Sapovirus Genotype GII.3 Strain Generated by a Reverse Genetics System: VP2 Is a Minor Structural Protein of the Virion., Viruses. 2022 Jul 27;14(8):1649.
- 10) Takagi H, Oka T, Ami Y, Suzaki Y, Saito H., A Human Intestinal Cell Line Suitable for the Propagation of Human Parechovirus Type 1 to 6 with a Clear Cytopathic Effect. Jpn J Infect Dis. 2022;75(3):318-321.
- 11) Miyazaki N, Song C, Oka T, Miki M, Murakami K, Iwasaki K, Katayama K, Murata K., Atomic Structure of the Human Sapovirus Capsid Reveals a Unique Capsid Protein Conformation in A Caliciviruses. J Virol. 2022 May 11;96(9):e0029822.
- 2) 楠原一, 前田千恵 Yen Hai Doan, 高木弘隆, 岡智一郎. 三重県におけるサポウイルスの流行状況 2010~2022. VP1 領域の全長解析による遺伝子型別と臨床像. 第 28 回日本ワクチン学会・第 65 回日本臨床ウイルス学会合同学術集会 2024.10/27. 愛知県.
- 3) 岡智一郎. サポウイルス研究の歩みと現在. 第 57 回 ウイルス学会北海道支部シンポジウム. 2024.7/14. 北海道.
- 4) 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. 山口県.
- 5) Oka T, Li T-C, Yonemitsu K, Ami Y, Suzaki Y, Okemoto-Nakamura Y, Kataoka M, Doan YH, Takagi H. Establishment and application of an efficient human sapovirus propagation method using HuTu80 cells. The 8th International Calicivirus Conference. 2023. 5/7-11. Netherland.
- 6) 岡智一郎, 李天成, 米満研三, 網康至, 須崎百合子, 中村(桶本)優子, 片岡紀代, 団海燕, 三田哲朗, 小林孝行, 斎藤博之, 八尋俊輔, 佐藤重紀, 柴田伸一郎, 塚田竜介, 高木弘隆. ヒトサポウイルス研究加速のための遺伝子型網羅的リソース確立に向けた取り組み. 第 69 回日本ウイルス学会, 2022.11/13-15, 長崎県.
- 7) 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下痢症ウイルスの浄水処理性の評価. ウイルス性下痢症

学会発表:

- 1) 笠純華, 原田誠也, 八尋俊輔, 岡智一郎, 徳岡英亮. 2011 年度から 2023 年度に熊本県内の感染性胃腸炎患者から検出されたサポウイルス遺伝子型の推移. 第 71 回日本ウイルス学会学術集会. 2024.11/4-6. 愛知県.

研究会第 33 回学術集会， 2022. 11/12，
長崎県.

- 8) 岡智一郎，高木弘隆，斎藤博之． 非胃
腸炎症例の咽頭拭い液からの下痢症ウイ
ルス検出． 第 63 回日本臨床ウイルス学
会 2022. 6/18， 19， 東京都.

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

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「食中毒原因ウイルス等の汎用性を備えた検査法と

制御を目的とした失活法の開発のための研究」

令和4年度分担報告書

米国および英国における食中毒事件発生時のウイルス検査に関する調査

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

研究要旨

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

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

A. 研究目的

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

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

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

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

B. 研究方法

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

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

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

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

C. 研究結果

1. 政府機関ウェブページでの情報提供

(1) US CDC, US FDA による情報提供

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

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

(2) MOHLTC による情報提供

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

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

(3) HPSC Ireland による情報提供

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

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

2. MMWR 論文 (参考資料 3) による情報提供

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

3. EID 論文 (参考資料 8) による情報提供

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

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

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

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

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

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

5. 英国の担当者の対応（UK HPA の調査結果）

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

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

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

D. 考察

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

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

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

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

E. 結論

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

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

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(参考資料)

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

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

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

A. Curry *et al.*

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

[https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014067368791061](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0140673687910610)

0

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 なし

雑誌
令和6（2024）年度

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
横田翔太、浅倉弘幸、赤瀬 悟、根岸あかね、伊藤 仁、黒木絢土郎、小泉美優、岩崎直哉、北村有里恵、磯貝まや、九澤香織、林 志直、長島真美、貞升健志、（吉村和久）	市販のヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞を用いたヒトノロウイルス分離培養方法の検討	東京健安研 74(2) セ年報			2024
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(2)	20-22	2024
岡智一郎	特集「サポウイルス」	IASR	45	205-206	2024
高木弘隆, 岡智一郎	特集関連情報「サポウイルスの分離・増殖系の確立と応用」	IASR	45	221-223	2024
上間匡	特集関連情報「食品衛生におけるサポウイルス」	IASR	45	211-212	2024
Tamiya S, Matsumoto N, Kurokawa S, Nakamura Y, Takahashi Y, Sakon N, Inoue M, Koike Y, Uchida K, Yuki Y, Ushijima H, Kiyono H, Sato S.	H and B Blood Antigens Are Essential for In Vitro Replication of GII.2 Human Norovirus.	Open Forum Infect Dis.	Dec18 ; 12(1)	714	2024

Fujimoto K, Hayashi T, Yamamoto M, Sato N, Shimohigoshi M, Miyaoka D, Yokota C, Watanabe M, Hisaki Y, Kamei Y, Yokoyama Y, Yabuno, Hirose A, Nakamae M, Nakamae H, Uematsu M, <u>Sato S</u> , Yamaguchi K, Furukawa Y, Akeda Y, Hino M, Imoto S, Uematsu S.	An enterococcal phage-derived enzyme suppresses graft-versus-host disease.	Nature	632(8023)	174-181	2024
Watanabe M, Uematsu M, Fujimoto K, Hara T, Yamamoto M, Miyaoka D, Yokota C, Kamei Y, Sugimoto A, Kawasaki N, Yabuno T, Sato N, <u>Sato S</u> , Yamaguchi K, Furukawa Y, Tsuruta D, Okada F, Imoto S, Uematsu S	Targeted lysis of <i>Staphylococcus hominis</i> linked to axillary osmidrosis using bacteriophage-derived endolysin.	J Invest Dermatol.	144(11)	2577-2581	2024
Okai H, Niwa R, Prantsev S, <u>Motooka D</u> , Onoda Y, Nakata J, Nakajima H, Oka Y, Sugiyama H, Yoshii Y, Abnzai N, Nakamura S, Iida T	Identification of causative fungus from sterile abscess using metagenomic followed by in situ hybridization.	Access Microbiol,	6(8)	000779.v3	2024
Minami S, Kotaki T, Sakai Y, Okamura S, Torii S, Ono C, <u>Motooka D</u> , Hamajima R, Nouda R, Nurdin JA, Yamasaki M, Kanai Y, Ebina H, Maeda Y, Okamoto T, Tachibana T, Matsuura Y, Kobayashi T	Vero cell-adapted SARS-CoV-2 strain shows increased viral growth through furin-mediated efficient spike cleavage.	Microbiol Spectr	12(4)	E0285923	2024
Sada RM, Matsuo H, <u>Motooka D</u> , Kutsuna S, Hamaguchi S, Yamamoto G, Ueda A.	<i>Clostridium butyricum</i> Bacteremia Associated with Probiotic Use, Japan.	Emerg Infect Dis	30(4)	665-671	2024

Oka T, Li TC, Yone mitsu K, yAmi Y, Sug zaki Y, Kataoka M, Doan YH, Okemoto-N akamura Y, Kobayas hi T, Saito H, Mita T, Tokuoka E, Shibata a S, Yoshida T, Taka gi H.	Propagating and bankin g genetically diverse hu man sapovirus strains u sing a human duodenal cell line: investigating a ntigenic differences betw een strains.	J Virol.	98	e00639-2 4.	2024
Yokoyama M, Doan YH, Motomura K, Sa to H, <u>Oka T</u> .	Strong evolutionary cons traints against amino ac id changes in the P2 su bdomain of sapovirus G I.1 capsid protein VP1.	Biochem B iophys Res Commun.	710	149878.	2024

令和5（2023）年度

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takahashi T, Kimura R, Shirai T, Sada M, Sugai T, <u>Murakami K</u> , Harada K, Ito K, Mats ushima Y, Mizukoshi F, Okayama K, Hayas hi Y, Kondo M, Kagey ama T, Suzuki Y, Ishii H, Ryo A, Katayama K, Fujita K, <u>Kimura H</u> .	Molecular Evolutionary Analyses of the RNA-De pendent RNA Polymeras e (RdRp) Region and V P1 Gene in Human Nor ovirus Genotypes GII.P6 -GII.6 and GII.P7-GII.6.	Viruses	15(7)	1497	2023
Doan YH, Yamashita Y, Shinomiya H, Moto ya T, Sakon N, Suzuki R, Shimizu H, Shige moto N, Harada S, Ya hiro S, Tomioka K, Sa kagami A, Ueki Y, Ko magome R, Saka K, O kamoto-Nakagawa R, S hirabe K, Mizukoshi F, Arita Y, Haga K, Kat ayama K, Kimura H, Muramatsu M, <u>Oka T</u> .	Distribution of Human Sapovirus Strain Genot ypes over the last four Decades in Japan: a Gl obal Perspective.	Jpn J Infec t Dis.	76(4)	255-258	2023
Hattori-Muroi K, Naganawa-Asaoka H, Kabumoto Y, Tsukamoto K, Fujisaki Y, Fujimura Y, Komiyama S, Kinashi Y, Kato M, <u>Sato S</u> , Takahashi D, Hase K.	α -Glucosidase inhibitors boost gut immunity by inducing IgA responses in Peyer's patches.	Front Imm unol.	14	1277637	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, <u>Sato S</u> , 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 Re gen.	43(1)	55	2023
Matsumoto N, Kurokawa S, Tamiya S, Nakamura Y, Sakon N, Okitsu S, Ushijima H, Yuki Y, Kiyono H, <u>Sato S</u> .	Replication of Human Sapovirus in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Epithelial Cells.	Viruses	15(9)	1929	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 T, <u>Sato S</u> .	Effective SARS-CoV-2 replication of monolayers of intestinal epithelial cells differentiated from human induced pluripotent stem cells.	Sci Rep.	13(1)	11610	2023
Hoque SA, Kotaki T, Pham NTK, Onda Y, Okitsu S, <u>Sato S</u> , 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(2)	176	2023
Takahashi Y, Inoue Y, <u>Sato S</u> , 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(1)	5407	2023

Suzuki Y, <u>Kimura H</u> , Katayama K.	Classification of sapoviruses based on comparison of phylogenetic trees for structural and non-structural proteins.	Gene Reports	34	101875	2024
Khamrin P, Kumthip K, Yodmeeklin A, Okitsu S, Motomura K, <u>Saito S</u> , Ushijima H, Maneeekarn N.	Genetic recombination and genotype diversity of norovirus GI in children with acute gastroenteritis in Thailand, 2015-2021.	J Infect Public Heal.	17(3)	379	2024
Dianty R, Hirano J, Anzai I, Kanai Y, <u>Hayashi T</u> , Morimoto M, Kataoka-Nakamura C, Kobayashi S, Uemura K, Ono C, Watanabe T, Kobayashi T, <u>Murakami K</u> , 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

令和4（2022）年度

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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、 <u>(吉村和久)</u>	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
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、 <u>(吉村和久)</u>	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

Li TC, Kataoka M, Doan YH, Saito H, Takagi H, Muramatsu M, Oka T.	Characterization of a Human Sapovirus Genotype GII.3 Strain Generated by a Reverse Genetics System: VP2 Is a Minor Structural Protein of the Virion.	Viruses	14(8)	1649	2022
Takagi H, Oka T, Amiyama Y, Suzaki Y, Saito H.	A Human Intestinal Cell Line Suitable for the Propagation of Human Parechovirus Type 1 to 6 with a Clear Cytopathic Effect.	Jpn J Infect Dis	75(3)	318	2022
Hayashi T, Yamaoka Y, Ito A, Kamaishi T, Sugiyama R, Estes MK, Muramatsu M, Murakami K.	Evaluation of Heat Inactivation of Human Norovirus in Freshwater Clams Using Human Intestinal Enteroids.	Viruses	14	-	2022
Miyazaki N, Song C, Oka T, Miki M, Murakami K, Iwasaki K, Katayama K, Murata K.	Atomic Structure of the Human Sapovirus Capsid Reveals a Unique Capsid Protein Conformation in Caliciviruses.	J. Virol	96(9)	E0029822	2022
Yuki Y, Zuo F, Kurokawa S, Uchida Y, Sato S, Sakon N, Hammarström L, Kiyono H, Marcotte H.	Lactobacilli as a Vector for Delivery of Nanobodies against Norovirus Infection.	Pharmaceutics.	15(1)	63	2022
Noguchi M, Shimizu M, Lu P, Takahashi Y, Yamauchi Y, Sato S, Kiyono H, Kishino S, Ogawa J, Nagata K, Sato R.	Lactic acid bacteria-derived γ -linolenic acid metabolites are PPAR δ ligands that reduce lipid accumulation in human intestinal organoids.	J Biol Chem.	298(11)	102534	2022
Takahashi Y, Noguchi M, Inoue Y, Sato S, Shimizu M, Kojima H, Okabe T, Kiyono H, Yamauchi Y, Sato R.	Organoid-derived intestinal epithelial cells are a suitable model for preclinical toxicology and pharmacokinetic studies.	iScience	25(7)	104542	2022

Pham NTK, Nishimura S, Shimizu-Onda Y, Trinh QD, Komine-Aizawa S, Khamrin P, Okitsu S, <u>Sato S</u> , Kobayashi T, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H.	Emerging norovirus GII.4 Sydney[P31] causing acute gastroenteritis outbreak in children in Japan, during COVID-19, 2021.	J Infect Chemother	28(9)	1347	2022
<u>Uema M</u> , Yonemitsu K, Sasaki Y, Asakura H.	Detection of hepatitis E virus RNA from pig bile collected at a slaughterhouse in Japan	AIMS Microbiology	8(4)	566	2022
Kimura Y, Shin J, Nakai Y, Takahashi M, Inoue Y, Akiyama T, Goto K, Nagata N, Yamaoka Y, Miyakawa K, <u>Kimura H</u> , Ryo A.	Development of Parallel Reaction Monitoring Mass Spectrometry Assay for the Detection of Human Norovirus Major Capsid Protein.	Viruses	14(7)	1416	2022
Honjo S, Kuronuma K, Fujiya Y, Nakae M, Ukae S, Nihira H, Yamamoto M, Akane Y, Kondo K, Takahashi S, <u>Kimura H</u> , Tsutsumi H, Kawasaki Y, Tsugawa T.	Genotypes and transmission routes of noroviruses causing sporadic acute gastroenteritis among adults and children, Japan, 2015-2019.	Infect Gene Evol.	104	105348	2022
Nurdin JA, Kotaki T, Kawagishi T, <u>Sato S</u> , Yamasaki M, Nouda R, Minami S, Kanai Y, Kobayashi T.	N-Glycosylation of Rotavirus NSP4 Protein Affects Viral Replication and Pathogenesis.	J Virol.	97(1)	E0186122	2023

Masuda A, Man Lee J, Miyata T, <u>Sato S</u> , Masuda A, Taniguchi M, Fujita R, Ushijima H, Morimoto K, Ebihara T, Hino M, Kakino K, Mon H, Kusakabe T.	High yield production of norovirus GII.4 virus-like particles using silk worm pupae and evaluation of their protective immunogenicity.	Vaccine	41(3)	766	2023
Hoque SA, Kotaki T, Pitham NTK, Onda Y, Okitsu S, <u>Sato S</u> , Yuki Y, Kobayashi T, Maneeakarn N, Kiyono H, Hayakawa S, Ushijima H.	Abundance of Viral Gastroenteritis before and after the Emergence of COVID-19: Molecular Evidence on Wastewater.	J Infect	86(2)	154-225	2023
Watanabe K, <u>Oka T</u> , Tamakagi H, Anisimov S, Yamashita SI, Katsuragi Y, Takahashi M, Hiraguchi M, Kanki T, Saitoh A, Fujii M.	Myeloid-associated differentiation marker is an essential host factor for human parechovirus PeV-A3 entry.	Nat. Commun.	14(1)	1817	2023