

## シジミを用いたノロウイルス汚染食品モデル作製と不活化法の検討

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

### 研究要旨

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

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

### A. 研究目的

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

### B. 研究方法

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

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

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

### C. 研究成果

GII.4 ノロウイルスを添加したシジミの懸

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

#### D. 考察

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

存在部位の視覚的解析においては、FITC 標識デキストランが非特異的に吸着

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

#### E. 結論

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

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(和文)

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

##### 2. 学会発表

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

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

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

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし