

## 食中毒原因ウイルスの不活化および高感度検出法に関する研究

研究代表者 鈴木亮介 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

### 研究要旨

本研究では、食中毒の原因ウイルスを迅速・確実に検出するために、食材やその洗浄水からのウイルス濃縮／精製法および高感度検出法を開発する事を目標とし、以下の研究を実施した。

E型肝炎の原因食材と疑われるイノシシ肉からHEVの検出を試みた。イノシシ86頭の血清からHEV IgG抗体およびHEVゲノムを測定した。便検体からの検出方法について検討を行った。抗A型肝炎ウイルスウサギ血清を作製した。

アイチウイルス検出リアルタイムに関しては、高感度、簡便な検出法を開発し、食品や環境水中のウイルス検出、定量を行うために、リアルタイムPCR法の検出感度の検討、ウイルス濃縮法の検討、RT-LAMP法の開発を行った。

ロタウイルスの検出法に関しては、リアルタイムPCR用のFreemanらのプライマー・プローブセットは、幅広いロタウイルス株を検出可能であるが、便検体からの検出においては、しばしば非特異反応が認められた。これらの非特異反応は、多くの場合 $10^2$ コピー未満として検出されるため、 $10^2$ コピー以上を閾値として陽性判定すれば、問題は起こらないと考えられた。

食品中の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。

野菜表面や水中のウイルス検出を目的として、ビーフエキス誘出液からの検出感度を向上させるために、酸沈殿法を用いて濃縮する方法を開発した。エンベロープウイルスの代替指標としてΦ6を用い、手法の妥当性の評価に用いた。ウイルスの回収率を高くし、容易に少ない液量で回収操作を実施可能であることが示された。

原因ウイルスの追求が難しい食品・食材やふき取り検体について、地衛研で行われている前処理および濃縮・精製法について現状調査するとともに、食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等について情報を収集した。デジタルPCRによる高感度検出を試行した。

#### 研究分担者

四宮博人・愛媛県立衛生環境研究所・所長  
片山浩之・東京大学大学院工学系研究科・教授

佐々木潤・藤田医科大学医学部・講師  
藤井克樹・国立感染症研究所ウイルス第二部・主任研究官  
村上耕介・国立感染症研究所ウイルス第二部・主任研究官

#### 研究協力者

吉澄志磨・北海道立衛生研究所  
坂上亜希恵・宮城県保健環境センター  
植木 洋・宮城県保健環境センター  
岸本 剛・埼玉県衛生研究所  
貞升健志・東京都健康安全研究センター  
皆川洋子・愛知県衛生研究所  
白井達哉・大阪健康安全基盤研究所  
西嶋駿弥・大阪健康安全基盤研究所  
左近直美・大阪健康安全基盤研究所  
岡本玲子・山口県環境保健センター  
調 恒明・山口県環境保健センター  
田中義人・福岡県保健環境研究所  
豊嶋千俊・愛媛県立衛生環境研究所  
岩城洋己・愛媛県立衛生環境研究所  
山下育孝・愛媛県立衛生環境研究所  
青木紀子・愛媛県立衛生環境研究所  
関瑛理子・東京大学大学院工学系研究科  
小宮智義・北陸大学 医療保健学部  
阿部冬樹・静岡県環境衛生科学研究所  
李 天成・国立感染症研究所  
清原知子・国立感染症研究所  
杉山隆一・国立感染症研究所  
林 豪士・国立感染症研究所  
小林さくら・国立感染症研究所

#### A. 研究目的

ヒト検体由来の食中毒原因ウイルスの遺伝子情報は、地方衛生研究所と感染症研究所の連携により蓄積されているものの、食中毒の原因と疑われる食材からのウイルス検出は、汚染ウイルス量が少ない事や、食品に含まれる夾雑物が検出を妨げる事などから困難であり、原因食品や汚染経路の特定に至らず、効果的な対策を取る為の知見も不足している。そこで本研究では以下に挙げる各課題を実施し、各食中毒の原因ウイルスを迅速・確実に検出するために、食材やその洗浄水からのウイルス濃縮／精製法および高感度検出法を開発する事を目的とした。

(1) A型およびE型肝炎ウイルスは、患者由来のウイルス遺伝子情報は蓄積されているものの、原因と疑われる食材からのウイルス検出は困難である。ウイルスの遺伝子型に関わらず濃縮が可能な抗体を探索し、その抗体を利用して検査の高感度化を図る。

(2) アイチウイルスは胃腸炎患者や、二枚貝および河川水から検出されている。食品や環境水中のウイルス定量は、感染経路の理解に必要であり、申請者らのグループはその検出に成功している(Kitajima ら, *Appl, Environ Microbiol*, 2013)。本研究では、高感度、簡便な検出法を開発し、食品や環境水中のウイルス検出、定量を行う。

(3) ヒトに胃腸炎をもたらす胃腸炎ウイルスのうち、ロタウイルスの高感度検出法の開発・改良を行う。特に不純物の多い食品等からの適切な検出法について検討を行う。これにより、食中毒が疑われる事例におけ

る検査方法を適正化する。

(4) ノロウイルスは食中毒の主要原因であるが、近年まで感受性細胞がなかった。そのため、不活化条件等の知見は培養細胞に感染可能な近縁ウイルス（マウスノロウイルス等）の研究に依存していた。申請者らのグループは、腸管オルガノイドを用いることでノロウイルスを増殖させることに成功した（Ettayebiら, *Science*, 2016）。この独自の系を利用することで、食品中のノロウイルス不活化条件の特定を目指す。

(5) 海外からの輸入も多いカット野菜は、洗浄水が野菜表面のウイルスを不活化しているか明らかでなく、ウイルス学的安全性に疑問が残る。野菜表面のウイルスが一定程度以下であることを保証する安全スキームを提案するため、洗浄水のウイルス測定と野菜表面の残存ウイルス量の関係を定量的に把握する。

(6) 各食中毒の原因ウイルスを迅速・確実に検出するために、食材やその洗浄水からのウイルス濃縮／精製法および高感度検出法を開発し、確立された検査法は地方衛生研究所（以下、地衛研）において実用性を検証し、汎用性を高める。また食材の検査を通じ、各ウイルスの食品等への汚染経路、感染パターンを解明する。

## B. 研究方法

(1) 積極的疫学調査によりE型肝炎の原因として疑われたイノシシ肉が得られた。この肉汁約25mLから、抗HEVウサギ血清およびパンソルビンを用い、ウイルス濃縮操作を行った。濃縮サンプルからRNAを抽出し、リアルタイムPCRを行った。イノシシ86頭の血清についてHEV IgGおよびHEVゲノム

の測定を行った。便検体からのHEV遺伝子抽出方法について、使用するキットによって抽出効率に違いがあるかどうかを確認した。A型肝炎ウイルスの濃縮が可能な抗血清を得るために、異なる免疫プロトコルでウサギを免疫し、血清の感染中和活性を評価した。

(2) アイチウイルスのリアルタイム RT-PCRは、TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix (Thermo Fisher)およびQuantStudio 7リアルタイムPCRシステム (Thermo Fisher)、あるいはStepOnePlusリアルタイムPCRシステム (Thermo Fisher)を用いて行った。鋳型として、アイチウイルスcDNAクローンより *in vitro* で合成したRNAを用いた。環境水からのウイルス検出の検討として、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法を用い、試料からの回収率を調べた。蒸留水40 mlにウイルス希釈液10  $\mu$ l、8% PEG 6000、2.3% NaClを加え、遠心によりウイルスを回収し、QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen)を用いてウイルスRNAを精製した。同時に、同量同濃度のウイルス希釈液からも直接ウイルスRNAを精製し、両者のウイルスRNAコピー数をリアルタイムRT-PCR法で比較した。RT-LAMP法については、Genotype A, Bともに検出可能なプライマーセットを、ソフトウェアPrimer Explorerを利用して設計した。鋳型としては、アイチウイルスcDNAクローンより *in vitro* で合成したRNAを用いた。Loopamp遺伝子検査RNA増幅試薬キット(栄研化学)を用い、63°C、60分反応した。

(3) ロタウイルスのリアルタイムPCR法としては、NSP3遺伝子をターゲットとし

たプライマー・プローブセットのうち、基本的に Freeman らが報告したセット (Freeman et al., J Med Virol. 2008, 80(8):1489-96) を利用した。検体は、ロタウイルス胃腸炎患者から採取された糞便を PBS で 10%乳剤としたものを使用した。

(4) ノロウイルスの不活化条件探索を目的とした食品モデル二枚貝として、食中毒事例が報告されており、かつ小規模アッセイが可能な市販のシジミを用いた。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°C 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。

(5) 野菜表面のウイルス検出におけるウイルスの濃縮手法として、ビーフエキスなどのタンパクが豊富な液体に対するオーガニックフロキュレーション (酸沈殿法) を採用し、高アルカリ条件下にあるビーフエキスを pH3 程度にまで下げることでウイルスやタンパクのフロックを形成し、それを沈

殿・再懸濁することで濃縮を行う。3% および 10%ビーフエキス (Difco および HiMedia) と 3% および 10%肉エキス (極東) を高圧蒸気滅菌し、1MNaOH の添加で pH 9.0  $\pm$  0.1 に調整した。そこに MS2 と  $\Phi$ 6 を添加し、ボルテックスしてよく混合した。酸沈殿処理を行い、ウイルス濃縮液を得た。濃縮前・濃縮後それぞれのウイルス濃度を測定し、回収率を評価した。また、凝集性の悪いビーフエキスの場合は、FeCl<sub>3</sub> の添加により共沈が発生し、ペレットの形成を期待できるので、本実験では FeCl<sub>3</sub> を添加した場合と、しなかった場合で回収率を比較した (ビーフエキス・肉エキス 40ml に対して 2.5mM FeCl<sub>3</sub> 0.2ml)。各条件につき 2 回ずつ実験を行った。

(6) 地衛研の状況を把握する目的で、原因ウイルスの追求が難しい場合が多く、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、どのような前処理および濃縮・精製法を実施しているか、について現状調査し、食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等 (マニュアル、研修、情報還元、検体保管等) について情報を収集した。回答は愛媛県立衛生環境研究所に送付され、調査項目毎に集計された。

## C. 研究結果

(1) E 型肝炎の原因食材と疑われるイノシシ肉の肉汁に界面活性剤存在下で抗 HEV ウサギ血清およびパンソルビンを加えて HEV の濃縮操作を行い、RNA を抽出し、リアルタイム PCR を行ったが、ウイルス核酸は検出されなかった。2017-2019 年に捕獲されたイノシシ 86 頭の血清の HEV IgG を測定した。22 頭 (26%) が陽性で、性別

での陽性率はオスの 31%に対し、メスは 17%であった。また体重 20kg 未満の幼獣で 30%、成獣の 24%が陽性であり、抗体価の高い個体は幼獣に多く認められた。一方で HEV 核酸の検出も試みたが、ウイルス核酸は検出されなかった。便検体からの検出方法には、使用するキットによって抽出効率に違いがあるという報告（分担研究者 藤井克樹の報告書参照）があったため、HEV 患者の便検体 24 例から、Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) と QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN) を用いて核酸を抽出し、リアルタイム PCR を行った。今回用いた検体については両キットの抽出によるコピー数は高い相関が認められた。異なる免疫プロトコルでウサギに HAV 抗原を免疫し、血清の感染中和活性を評価した。一方のプロトコルで、高い中和活性が認められた。

(2) アイチウイルスのリアルタイム RT-PCR 法について、昨年度は 2-step 法でリアルタイム PCR を行っていたが、今年度は 1-step 法について検出感度の検討を行った。Kitajima et al. (Appl Environ Microbiol, 2013) のプライマー/プローブを用いた場合、Genotype A, B ともに  $10^1$  コピーの RNA を検出した。今回新たに VP1 領域にプライマー/プローブをデザインしたが、Kitajima et al.の方法ほどの感度は得られなかった。試料水からのウイルス回収についての検討は、高濃度のウイルス ( $10^4$  コピー以上) の場合は 15~20%以上の回収率であったが、低濃度の場合は、5%前後まで回収率が低下した。RT-LAMP 法の検討については、現時点で、プライマー 1 セットしか試みていないが、Genotype A, B ともに  $10^3$  コピーの

ウイルス RNA から、目視で増幅を確認した。

(3) ロタウイルス RNA の抽出方法の最適化を図るため、汎用されているキットとして Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) と QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN) を利用した。QIAGEN のキットにはキャリア RNA が付属しているため、キャリア RNA 使用の有無による差も検討した。その結果、QIAGEN のキットでは、キャリア RNA 使用の有無による抽出効率の差はほとんど見られなかった。一方、ZYMO Research のキットでは、QIAGEN のキットで抽出した場合より 10-1000 倍程度高く検出される例が見られた。キット間の差がほとんど無い検体もあり、検体による差が非常に大きかった。大きな差が見られた検体について、便乳剤を 10-1000 倍まで希釈してから同様の RNA 抽出を行ったところ、キット間の差が軽減される傾向が見られた。この現象の原因は特定できていないが、抽出キットによる PCR 阻害物質の除去効率などが影響しているのではないかと考えられる。以降の検証では、ロタウイルス遺伝子を一貫して高感度で検出できる ZYMO Research のキットを使用した。また ZYMO Research のキットに付属している DNase の使用の影響を検証した。DNase 処理は RNA 抽出時に混入する DNA を分解除去して非特異反応を軽減させる効果が期待されるが、ロタウイルス胃腸炎患者の便検体について DNase 処理を行ったところ、行わなかった場合と比較して検出効率が 1/10 から 1/100 程度に低下した。ロタウイルスのゲノムは 2 本鎖 RNA であるため、DNase による非

特異的な分解を受けてしまうと考えられる。従って、ロタウイルス遺伝子の検出を目的として RNA 抽出を行う場合には、DNase 処理は行うべきではない。次に、より多くの臨床検体を用いて qPCR 試薬間の検出効率の比較検討を行った。使用した試薬は、Thermo Fisher Scientific 社の SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit および TaqMan Universal PCR Master Mix、タカラバイオ社の PrimeScript RT reagent Kit および Premix Ex Taq (Probe qPCR)、New England Biolabs 社の LunaScript RT SuperMix Kit および Luna Universal Probe qPCR Master Mix である。急性胃腸炎患者の場合、一度に複数の胃腸炎原因ウイルスを調べる機会が多いため、いずれも 2-step 法を用いて検討した。その結果、いずれの試薬でもほとんど遜色なくウイルスを検出できることが確認できた。ただし、検体によっては非特異反応が現れやすいものがあり、ロタウイルス陰性であっても 35-40 サイクル付近でシグナルの上昇が見られることがあった。非特異反応の原因を調べるため、どの試薬でも非特異反応が見られた検体について、同じ反応条件で RT-PCR 反応を行い、その PCR 増幅産物のシーケンス解析を行った。その結果、得られた配列には、ヒトゲノム (Human chromosome 14)、腸内細菌 (Bacteroides fragilis)、アストロウイルス (Astrovirus 4) 等があり、様々な原因で非特異反応が現れることが判明した。現状より非特異反応の少ないプライマー・プローブセットの作製を試みているが、現時点では Freeman らのセット以上の良好な結果は得られていない。

(4) 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°C 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。

(5) 野菜表面のウイルス検出におけるウイルスの濃縮手法の検討の結果、全条件でペレットは形成されたが、10%のビーフエキスではペレットが小さかった。一方、極東肉エキス 3%ではしっかりとしたペレットの形成が認められた。FeCl<sub>3</sub>を添加した条件では、すべて多量の沈殿ができ、ペレット形成を促すことが確認できた。次に各条件における MS2 並びに Φ6 の回収率を調べた。MS2 の回収率は Difco10%の時は 10%を超えたが、他条件ではそれより低い回収率で安定していた。一方、Φ6 は HiMedia3%と 10%及び極東 3%が回収率が高かった。特に極東 3%における回収率は約 100%であり、かなり高い回収率だった。

(6) 地衛研の現状調査については、全国 83 か所の地衛研のすべてから回答があった (回答率 100%)。内訳は、都道府県型 47 施

設（大阪健康安全基盤研究所の天王寺センターと森ノ宮センターからはそれぞれ回答があり、合計 48 施設）、政令指定都市型（以下、政令市）19 施設、中核市・特別区型（以下、中核市等）17 施設である。ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体についての前処理については、「実施していない」が最も多く、実施している中では、アミラーゼ処理、細菌添加法、リパーゼ処理の順に多かった。一方、濃縮・精製法については、超遠心法が最も多く、次いで、PEG 沈殿法、パンソルビントラップ法の順に多く、「実施していない」は少数であり、何らかの方法でウイルス検出効率を高めようとしていることが明らかになった。食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等については、ノロウイルス以外の食中毒原因ウイルスについての検査マニュアルの整備、陽性コントロールの配布、食品からのウイルス検出法の改良、各種検査についての研修、食中毒事例の対応についての情報交換などがあげられた。食中毒原因ウイルスの高感度検出法の試みとして、ノロウイルスを用いて、デジタル PCR による高感度検出を試行した。5~5,000 copies/ $\mu$  L のレンジで検出可能であった。

#### D. 考察

(1) E 型肝炎の原因食材と疑われるイノシシ肉の肉汁より抗 HEV ウサギ血清およびパンソルビンを用い、濃縮操作を行った。RNA 抽出し、1 step リアルタイム RT-PCR を行ったが、ウイルス核酸は検出されなかった。今回の事例だけでは、濃縮が適切に行われなかったのか、食材中のウイルス量

が十分でなかったのかについて明らかでないため、濃縮法の可否を検証するには、さらに多くの事例で検討する必要がある。イノシシ 86 頭の血清のうち、22 頭 (26%) が HEV IgG 陽性であった。したがって、野生のイノシシは一過性に感染するケースは少なくないと考えられる。一方で HEV 核酸は検出されなかった。野生動物において HEV がどのように伝播しているのか、今後調査が必要と思われる。異なる免疫プロトコルでウサギに HAV 抗原を免疫したところ、一方の個体で HAV に対する感染中和活性を示した。今後、この血清を用いて感染性のウイルスが濃縮されるかどうかを、次年度に検討する。

(2) アイチウイルスのリアルタイム RT-PCR 法に関しては、1-step 法により、Kitajima et al. (2013)のプライマー/プローブで高感度検出が可能であった。昨年度、2-step 法では  $10^1$  コピーのウイルス cDNA を検出したが、RNA の検出を行う場合、逆転写のステップを加えることで感度の低下がみられたことから、感度、簡便さから当研究室では 1-step 法で行う方が良いと考える。一方で、Kitajima et al. (2013)の方法を上回る感度の独自のプライマー/プローブはデザインできていない。試料水からのウイルス回収、および RT-LAMP 法についても、準備段階として当研究室での実施が可能であることが確認できたが、それぞれ回収率と感度の改善が必要である。特に、アイチウイルスの LAMP 法による検出報告はごく限られるため、検出法の開発は有意義であると考えるが、市販のノロウイルス検出キット(栄研化学)の感度は、60 (GI)および 200 (GII) コピーである。今後、感度

向上を目指して検討を加える必要がある

(3) ロタウイルス胃腸炎患者の便検体には大量のウイルスが存在している事が多く、qPCR において高コピーが検出される例が多い。本研究において観察された非特異反応は  $10^2$  コピー未満として検出される事が多いため、 $10^2$  コピー以上を陽性判定の閾値として設定すれば、ほとんど問題は起こらないと考えられる。食品からロタウイルスを検出する目的では、低コピーの検体を検査するケースも多いと考えられるが、検体に混入する夾雑物の種類も便検体とは大きく異なるため、別途の検証が必要である。今後は更なるプライマー・プローブセットの改良および食品サンプルからの検出方法とその検出感度について検証を進める予定である。

(4) 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。

(5) 野菜表面のウイルス検出におけるウイルスの濃縮条件として、 $\text{FeCl}_3$  を添加しない場合、 $\Phi 6$  においてはペレットの形成と回

収率はある程度の整合性があることが示された。

(6) 原因ウイルスの追求が難しい場合が多く、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、どのような前処理および濃縮・精製法を実施しているか、について現状調査したところ、特に濃縮・精製法において様々な工夫がなされており、原因追及を求める姿勢やその過程での苦慮がうかがわれた。今後さらなる検出法の開発が望まれる。食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等(マニュアル、研修、情報還元、検体保管等)については、ノロウイルス以外の食中毒原因ウイルスについての検査マニュアルの整備、陽性コントロールの配布、食品からのウイルス検出法の改良、各種検査についての研修、食中毒事例の対応についての情報交換などがあげられており、このような現場の声を今後の参考にしていく必要性が感じられた。糞便等のヒト由来検体の検査に比べ、食材・食品や汚染水に対する検査方法は十分に確立しておらず、本研究班で予定されている、食材・食品や環境水からの食中毒原因ウイルスの高感度検出方法の開発が望まれ、各種ウイルスの食品等への汚染経路、感染パターンの解明がすすめば、今後の予防対策に貢献できると期待される。

## E. 結論

(1) 昨年度に条件検討を行った HEV 濃縮法を用い、原因食材と疑われるイノシン肉から HEV の検出を試みたが、検出には至らなかった。引き続き疑い食材を集め、濃縮法の検証を行う必要がある。イノシン 86 頭

の血清から HEV IgG 抗体および HEV ゲノムの検出を試みたが、ウイルス遺伝子は検出されなかった。便検体からの検出方法の検討を行い、現行の抽出法に問題はないと考えられた。A 型肝炎ウイルスについて濃縮が可能な抗血清を得るためにウサギに免疫し、HAV に対して感染中和活性を持つ血清を得た。今後の食中毒原因ウイルスの感染制御に向け、検査法をさらに一般化し、地衛研等にも提供可能なものにする事が期待される。

(2) アイチウイルスのリアルタイム RT-PCR 法に関しては、1-step 法で高感度にウイルス RNA を検出できた。感度、簡便さの点から、2-step 法より 1-step 法で行う方が良いと考える。試料水からの PEG 沈殿法により、5~20% 程度の回収率でウイルス濃縮できた。加えて、RT-LAMP 法のためのプライマーセットを設計し、 $10^3$  コピーのウイルス RNA を検出した。ウイルス濃縮、RT-LAMP 法については、効率の改善が必要であった。

(3) Freeman らが設計したロタウイルス検出用のプライマー・プローブセットは幅広い流行株を高感度で検出可能であるが、便検体からの検出においては非特異反応が見られることがある。ただし、 $10^2$  コピー以上を閾値として陽性判定すれば、偽陽性となる懸念はほとんど無いと考えられる。

(4) 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  $90^{\circ}\text{C}$  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。

(5) 昨年度に得られたビーフエキスをを用いたウイルスの誘出法に続き、その後の酸沈殿法の手法の最適化を行った結果、3% 極東肉エキスを誘出液として実験を行うことが最適であると判断した。

(6) 地衛研は所属自治体の食中毒原因ウイルス検査において中核的な役割を担っており、各種ウイルスの食品等への汚染経路、感染パターンの解明がすすめば、今後の予防対策に貢献できると考えられる。ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、地衛研で行われている前処理および濃縮・精製法について現状調査し、食中毒における下痢症ウイルス検査に関する要望等について情報を収集した。これらは今後の食中毒原因ウイルスの感染制御に向け、地衛研からの貢献において有益な基盤を提供するものと期待される。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

論文発表

(英文)

1. Koga M, Lim LA, Ogishi M, Satoh H, Kikuchi T, Adachi E, Sugiyama R, Kiyohara T, Suzuki R, Muramatsu M, Koibuchi T, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H. Comparison of clinical features of hepatitis A in people living with HIV between pandemic in 1999-2000 and that in 2017-2018 in a metropolitan area of Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2020.

- 73:89-95.
2. Murakami K, Fujii Y, Someya Y: Effects of the thermal denaturation of Sabin-derived inactivated polio vaccines on the D-antigenicity and the immunogenicity in rats. *Vaccine*. 2020, 38(17):3295-3299.
  3. Akane Y, Tsugawa T, Fujii Y, Honjo S, Kondo K, Nakata S, Fujibayashi S, Ohara T, Mori T, Higashidate Y, Nagai K, Kikuchi M, Sato T, Kato S, Tahara Y, Kubo N, Katayama K, Kimura H, Tsutsumi H, Kawasaki Y.: Molecular and clinical characterization of the equine-like G3 rotavirus that caused the first outbreak in Japan, 2016. *J Gen Virol*. 2021 Mar;102(3).
  4. Tsugawa T, Fujii Y, Akane Y, Honjo S, Kondo K, Nihira H, Kimura H, Kawasaki Y.: Molecular characterization of the first human G15 rotavirus strain of bovine origin. *J Gen Virol*. (in press)
- (和文)
1. 山下信子、鈴木亮介: ウイルス性食中毒. *小児科*. 2020. Vol.61. p363-368.
  2. 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
- 学会発表
1. 廣瀬翔子、千野梓、早田衣里、藤森誠、濱田洋通、高梨潤一、藤井克樹: 当院入院患者におけるロタウイルス遺伝子型の検討 (2019年) 第52回日本小児感染症学会学術集会(オンライン)2020年11月7-8日
  2. 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).
  3. 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).
  4. 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.

5. 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  
(予定を含む。)

特許取得

特願 2018-188665 (2018 年 10 月 3 日出願)、PCT/JP2019/038893 (2019 年 10 月 2 日 PCT 出願)、ロタウイルスの遺伝子型検出方法と、これに用いる遺伝子増幅用プライマーセット 藤井克樹、株式会社島津製作所