

## 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。

殻から取り出したシジミにGII.4ノロウイルスをマイクロシリンジで接種した後、90℃の熱湯中で1、2、3、4分間加熱した。加熱処理したシジミはホモジナイズした後に遠心分離を行い、上清をウイルス抽出液として腸管オルガノイドに接種した。感染24時間後のウイルスコピー数をリアルタイムPCRで解析したところ、非加熱サンプルでは42.5倍のウイルス増殖が認められたが、加熱サンプルでは1分間の加熱でウイルスが検出限界以下となった。

本研究では、シジミから抽出したノロウイルスが腸管オルガノイドに感染すること、90℃・1分間の加熱で感染性が失われることを「直接的」に示した。得られた技術及び知見は、二枚貝中ノロウイルスの不活化方法の開発に活用されることが期待される。

### A. 研究目的

ノロウイルスは急性胃腸炎の主要病原体で、大規模食中毒事例を引き起こすことから食品衛生上で重要である。しかし近年まで感受性細胞が見つかっていなかったことから、不活化条件の知見はマウスノロウイルス等の培養可能な近縁ウイルスの研究に依存していた。本研究分担者らのグループは、腸管オルガノイドを用いたノロウイルス培養系を確立し、加熱（60℃、15分）によりウイルスの感染性が失われることを示した。しかし、この系では接種用の10%ノロウイルス溶液を直接加熱していたため、食品中ウイルスの不活化条件設定には即していなかった。そこで本研究では、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モデル食品として用いるこ

とで、加熱によるウイルス不活化条件の特定を目指した。

### B. 研究方法

本年度は、シジミを90℃の熱湯中で加熱することを想定した試験を実施した。あらかじめ温浴およびシジミ内部の温度変化を5分間まで15秒ずつ測定した。加熱試験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（290 ± 70 mg）を1.5 mL チューブに入れ、GII.4 ノロウイルス  $1.06 \times 10^8$  コピー/30  $\mu$ L をマイクロシリンジで接種した後、90℃の温浴で1、2、3、4分間加熱処理した。加熱前のウイルス接種シジミを0分間加熱処理サンプルとした。各シジミを培地中でホモジナイズした後、遠心分離（9,100 xg、3分間）により残渣を

取り除いた。上清をウイルス抽出液として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、ウイルス抽出液に含まれるノロウイルスを同様にリアルタイム PCR で解析することでウイルス回収率を算出した。

なお本研究で用いた腸管オルガノイドはベイラー医科大学が樹立したものを、国立感染症研究所人を対象とする生命科学・医学系研究倫理審査委員会からの承認を受け、MTA を締結した上でウイルス第二部に譲渡されたものを使用した。

### C. 研究結果

90°C に設定した温浴およびシジミ内部の温度を継時的に測定したところ、シジミ内部が 90°C に達するまで 2 分間を要した。この結果を考慮し、GII.4 ノロウイルスを接種したシジミを 90°C で 0、1、2、3、4 分間加熱した。各シジミから調製したウイルス抽出液を腸管オルガノイドに接種したところ、未加熱サンプルでは感染 24 時間後に 42.5 倍のウイルス増殖が見られた。一方、1-4 分間加熱サンプルでは全てでウイルス増殖が認められなかった。ウイルス回収率は、未加熱サンプルで 62.0 ± 7.3%、1 分間加熱サンプルで 27.7 ± 15.9% であったが、2-4 分間加熱サンプルでは 11~12% であった。

### D. 考察

本年度は 90°C で温度を固定した検証を行ったが、例えば 60°C など異なる温度での加

熱を含めた条件についても検証が必要である。本研究ではシジミをモデル食材とした試験を実施したが、得られた技術及び知見を応用させることにより、生食が行われるカキを対象とする検証が行われることが期待される。一方で、実際の汚染食品中には数コピー程度のウイルス量しか含まれないことが多いが、本研究では検出限界値を 20 コピー/反応溶液として設定していることから、本系を実用化するためには検出感度の改善が求められる。

### E. 結論

シジミから抽出したノロウイルスが腸管オルガノイドに感染すること、90°C・1 分間の加熱で感染性が失われることを「直接的」に示した。得られた技術及び知見は、二枚貝中ノロウイルスの不活化方法の開発に活用されることが期待される。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Hayashi T, Yamaoka Y, Ito A, Kamaishi T, Sugiyama R, Estes MK, Muramatsu M, Murakami K. Evaluation of heat inactivation of human norovirus in fresh-water clams using human intestinal enteroids. *Viruses*. Accepted (2022).

#### 2. 学会発表

該当なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし