

## 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。

今年度は国内での報告が稀な遺伝子型 1 の E 型肝炎ウイルスに感染した患者の検体からウイルス分離を試み、感染性ウイルスの全長塩基配列情報を決定した。また分子疫学調査により 2021 年には A 型肝炎ウイルスと E 型肝炎ウイルスの塩基配列情報がそれぞれ 12 件および 37 件が収集され、系統樹解析を行った。

アイチウイルスの検出に関しては、高感度、簡便なアイチウイルス検出法を開発し、食品や環境水中のウイルス検出、定量を行うために、アイチウイルス検出 RT-LAMP 法の開発、および河川水からのアイチウイルス RNA 検出を行った。

ロタウイルスの検出法に関しては、リアルタイム PCR 用のプライマー・プローブの濃度の検討を行い、フォワードプライマー 0.4  $\mu$ M、リバースプライマー 0.2  $\mu$ M、プローブ 0.2  $\mu$ M とすることで、従来の方法と比較して、非特異反応の発生頻度がおよそ半減することが判明した。

食品中ノロウイルスの不活化条件の探索を目的として、シジミにノロウイルスを接種した後、90°C の熱湯中で加熱し、ウイルスを抽出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、1 分間の加熱でウイルスが検出限界以下となった。

野菜表面上のウイルスの効率的な回収法の探索を目的とし、ふきとり法及びパウダリング法によるウイルス検出感度のさらなる効率化を図った。液体窒素を用いたパウダリング法において最もウイルス検出量が高く、また、誤差が小さいことから安定した検出能力を有していることが示された。

ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキの中腸腺抽出液に段階希釈したノロウイルス懸濁液を添加する実験系を構築し、その試料中のウイルスを qPCR および droplet digital PCR (ddPCR) によって定量した結果、ddPCR 法、特に RT 反応から ddPCR まで One-Step で行う方法が最も検出感度が高いことを明らかにした。

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  
中西千尋・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  
門屋俊祐・東京大学大学院工学系研究科  
岩本朋忠 神戸市健康科学研究所  
森 愛 神戸市健康科学研究所  
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

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り、効果的な対策を取るための知見も不足している状況にある。したがって、原因が疑われる食材のみならず、幅広く環境中のウイルスの存在を調査する必要がある。今年度は、国内での報告が稀な遺伝子型1のHEVのウイルス分離を試み、感染性ウイルスの全長塩基配列情報を決定した。一方で分子疫学調査により2021年にHAVとHEVの塩基配列情報がそれぞれ32件および15件収集され、それらについて系統樹解析を行った。

(2) アイチウイルスは、胃腸炎関連のピコルナウイルスであり、集団発生および散発発生の胃腸炎患者から検出されるほか、二枚貝および下水、河川水などの環境中からも検出されている。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る。本研究では、本ウイルスの高感度検出法の開発および既報の検出法の評価を行う。加え

て、食品や環境水中のウイルス検出、定量を行い、本ウイルスの環境中の分布の理解を深めることを目的として、アイチウイルス検出 RT-LAMP 法の開発、実際に河川水からのアイチウイルス RNA の検出を行った。

(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。この系を利用し、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。

(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、野菜表面に付着したウイルス検出法の開発及び検出感度の向上を目的として、種々のふきとり剤とその誘出法、野菜表面からの直接検出法の比較検討を行い、最適な検出手法の決定を目指した。

(6) 食品からのウイルス検出において、デジタル PCR (dPCR) 法による高感度検出法は有望な方法の候補である。リアルタイム PCR (qPCR) 法による定量には、ノロウイルス

等の標準物質が不可欠であるが、dPCR ではサンプルを標的遺伝子コピー1 個または全く含まない数千個の個々の PCR に分割するため、増幅後にコピー数の総数が算出され、標準物質を必要としない。また、サンプルを多数のサブサンプルに分割することで、食品のマトリックスタイプの成分等に由来する酵素阻害物質の影響を低減できる可能性がある。昨年度ノロウイルス遺伝子を含むプラスミドを用いて試行した dPCR による高感度検出を実際の検体を用いて検討した。検体としては、ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキを用いた。

## B. 研究方法

(1) 積極的疫学調査により E 型肝炎と診断された患者の血清および便 (10%乳剤) から QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。HEV ゲノムの一部 (ORF2 領域) を RT-PCR により増幅した後に、得られた断片の塩基配列を決定し、遺伝子型を同定した。そのうち遺伝子型 1 と確定された便および血清検体を HEV 感染感受性細胞に添加し、長期間培養を行った。継時的に培地を交換するとともに、その培地から RNA を抽出し、HEV genome の定量を行った。また抽出 RNA からほぼ全長のウイルスゲノムを RT-PCR で増幅し、遺伝子配列を決定した。

積極的疫学調査により得られた HAV および HEV の遺伝子情報については、MEGA (version 10.1.8) を用いて系統樹解析を行った。

(2) アイチウイルスの Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) 法では、Genotype A, B ともに検出可能なプライマーセットおよび Genotype A のみを検出可能なプライマ

一セットを設計した。コントロールの鋳型としては、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 RNA 増幅試薬キットを用い、62°C、60 分反応した。白濁の有無を目視で確認し、陽性、陰性を判定した。河川水からのウイルス RNA 回収は、愛知県豊明市の河川 2 か所において、2021 年 9 月から 2022 年 3 月にかけて毎月 1 回、河川水を採集した。河川水 1 リットルに 8% PEG 6000、2.3% NaCl を加え、4°C、16 時間攪拌した後、4°C で 9000×g、30 分遠心し、沈殿を滅菌蒸留水に懸濁した。この懸濁液からウイルス RNA を精製した。ウイルス RNA の検出は、リアルタイム RT-PCR および RT-PCR により行った。

(3) ロタウイルスのリアルタイム qPCR 法は NEB 社の LunaScript RT SuperMix Kit および Luna Universal Probe qPCR Master Mix を使用した。プライマー・プローブは ThermoFisher Scientific 社および Integrated DNA Technologies (IDT) 社に依頼して合成した。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、Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) を用いて DNase 処理をせずに RNA を抽出した。

(4) ノロウイルスの不活化条件を明らかにするために、シジミを 90°C 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 × 10<sup>8</sup> コピー/30 μL をマイクロシリンジで接

種した後、90°C 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。

(5) 野菜表面のウイルス検出法については、マウスノロウイルス及びマウス肝炎ウイルスの 10<sup>6</sup> 及び 10<sup>3</sup> copis/mL のウイルス懸濁液 20 mL に対してカットキャベツ 20 g を添加し、10 分おきに攪拌しながら 1 時間浸漬させた。浸漬後、ウイルス懸濁液を排除し、野菜から水気をよく切った。拭き取り剤としてレーヨン、コットン、ガラス繊維、酸化アルミニウム繊維の 5 種類の素材を採用し、各拭き取り剤をピンセットで掴める程度のサイズに調整し、ウイルス吸着野菜を満遍なくこすり、拭き取り剤に吸着させた。拭き取り剤から RNA を回収した後、RT-qPCR を行なった。パウダリング法は、乳鉢内でウイルス吸着野菜を液体窒素により急速に冷凍させ、液体窒素を適宜加えながらパウダー上になるまですり潰した。消毒・洗浄後の野菜表面上ウイルスの検出については、2 mg/L に調整した次亜塩素酸ナトリウム溶液を洗浄水とした。ウイルス吸着野菜をフィルタホルダーにセットし、1L の洗浄水を用いて 5 分かけて洗浄・消毒処理を行なった。ふきとり法及びパウダリング法を用いて、消毒・洗浄後の野菜からウイルス RNA の回収・定量を行なった。

(6) 食品検体としてカキを用い、ノロウイルス検査の常法にしたがって、カキ中腸線の抽出液を調製した（以下、中腸線抽出液）。ノロウイルスとして患者由来糞便懸濁液（qPCRによりコピー数を概算済み）を用いた（以下、ノロウイルス懸濁液）。中腸線抽出液に変量のコピー数を含むノロウイルス懸濁液を加え、QIAcube（QIAGEN社）またはmagLEAD 12gC（Precision System Science社）を用いてRNAを抽出した。常法にしたがい、RNA抽出液をDNase処理後、逆転写（RT）反応を行った。RT産物中のノロウイルスcDNAをqPCR（7900HT Fast, Applied Biosystems社）またはdPCRの一種であるdroplet dPCR（ddPCR）（QX200 ddPCRシステム、BIO-RAD社）により増幅して検出した。qPCRは3ウェル測定し、平均値を得た。ddPCRでは、RT産物の増幅以外に、RNA抽出液からOne-Stepで逆転写反応からddPCRを行う方法も実施した。

（倫理面への配慮）

ヒト由来の検体を使用する際には実験計画書を提出して、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得た上で研究を行った。ヒト由来検体の検体情報について、これらの倫理審査に基づき、適切に取り扱った。

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、国立感染症研究所の人を対象とする生命科学・医学系研究倫理審査委員会からの承認を受け、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

(1) 遺伝子型1のE型肝炎ウイルス（HEV）に感染した患者の血清および便（10%乳剤）のHEV RNAコピー数は、それぞれ $4.1 \times 10^6$  copies/mLおよび $1.1 \times 10^8$  copies/mLであった。検体をPLC/PRF/5細胞のサブクローンである4-21細胞に添加し、数日ごとに培地を置換しながら長期間培養し、培養上清中のHEV RNAを測定したところ、血清検体を感染させた細胞の培養上清中からはHEV RNAは検出されなかったが、便乳剤を感染させた細胞では感染後17日目に培養上清のRNAが陽性となった。その後RNAコピー数は徐々に増加し、感染後73日目でピークとなった。コピー数が上昇した上清からRNAを抽出し、ほぼ全長に相当する領域の塩基配列を決定した。

感染症発生動向調査において2021年のE型肝炎の報告数は452例であった。このうち、ウイルス遺伝子情報が明らかになったものは、遺伝子型3が32件、遺伝子型4が5件であった。食中毒が関連したと考えられる7件を除き、配列や地域、発生時期について集中した事例はなかった。一方で遺伝子型4の4検体は配列の相同性が高く、同一クラスターに分類されたものの、共通する感染源情報はなく、関連については不明であった。

A型肝炎については2021年の報告数はわずかに71例で、過去最少となった。このうちウイルスの配列情報が得られたのは12例で、10例は比較的近い配列を示したことから、共通した汚染源の存在が示唆されたが、同定には至らなかった。

(2) アイチウイルスのRT-LAMP法開発のために、合計11のプライマーセットをデザインした。その際、イヌコブウイルスやネココブウイルスなど、身近な動物のコブウイルスの

配列と比較し、これらの動物ウイルスを検出しにくいようにプライマーのデザインに留意した。結果として、 $10^3$  コピーのウイルス RNA を検出可能なプライマーセットが複数得られた。しかし、 $10^2$  コピーのウイルス RNA の検出はできなかつた。河川水からのウイルス RNA 検出については、愛知県豊明市の河川 2 か所で採集したサンプルについて、リアルタイム PCR および RT-PCR の 2 方法により、アイチウイルス RNA の検出を試みた。リアルタイム PCR により、皆瀬川の 11 月と 1 月、境川の 9~12 月で約 200-450 copies/リットルのアイチウイルス RNA が検出された。RT-PCR の結果、皆瀬川からは、10 月および 12 から 3 月まで検出された。一方、境川からは一度も検出されなかつた。Nested PCR 産物の塩基配列を解析した結果、いずれも Genotype A であった。また、検出されたのは、いずれも Takara のキットで RT-PCR を行った場合であった。

(3) ロタウイルスのリアルタイム qPCR 法の検討で、NSP3 セグメントの 3' 末端付近にある非常に保存性の高い領域 (90 bp 程度) について、フォワードプライマー 3 種、リバープライマー 3 種、プローブ 6 種を作製してその組み合わせによる非特異反応の発生率を検証したが、いずれも非特異反応が大幅に抑えられることはなかつた。

続いて NSP5 および NSP6 領域のフォワードプライマー 5 種、リバープライマー 4 種、プローブ 2 種を作成してその組み合わせによる非特異反応の発生率を検証したところ、非特異反応が若干抑えられる組み合わせがあつたが、検出感度が若干落ちる傾向が見られた。プライマー・プローブの濃度

の検討では、リバープライマーとプローブの濃度を  $0.2 \mu\text{M}$ 、フォワードプライマー濃度を 2 倍の  $0.4 \mu\text{M}$  とすることで、非特異反応の発生が大幅に軽減される傾向が見られた。また、アニーリング+伸長反応は、 $60^\circ\text{C}$  より  $56^\circ\text{C}$  で行った方が、非特異反応が軽減された。

(4) ノロウイルスの不活化条件の検討において、 $90^\circ\text{C}$  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  $90^\circ\text{C}$  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  $90^\circ\text{C}$  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つた。ウイルス回収率は、未加熱サンプルで  $62.0 \pm 7.3\%$ 、1 分間加熱サンプルで  $27.7 \pm 15.9\%$  であつたが、2-4 分間加熱サンプルでは 11~12% であつた。

(5) ふきとり法及びパウダリング法を用いて野菜表面からのウイルス検出量を比較した。高濃度のウイルス懸濁液に浸漬させた野菜に関して、マウスノロウイルス (MNV) 及びマウス肝炎ウイルス (MHV) の検出量は手法間及び素材間で有意な差は見られなかつたものの、パウダリング法によって得られた検出量が最も高かつた。低濃度条件下では、ふきとり法における MHV の検出量の標準偏差が大きい一方で、パウダリング法では高い定量値及び小さい標準偏差が確認された ( $2.62 \pm 0.2 \log_{10} \text{ copy/g-野菜}$ )。MNV に関しては高濃度条件と類似した結果が見られた。洗浄・消毒処理を施した野菜からはパウダリング法において MHV の検出感度が最も高かつた。一方、MNV の検出感度はレーヨンによるふき

とり法及びパウダリング法が高い値を示した。

(6) ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキの抽出液を用い、そこへ段階希釈したノロウイルス懸濁液を添加する実験系を構築した。中腸線抽出液中に変量のノロウイルスを添加した試料から RNA を抽出し、RT 反応後、qPCR および ddPCR によって検出した。RNA 抽出液から One-Step で RT 反応から ddPCR を行う測定系も実施した。それぞれの測定値から RNA 抽出液中のターゲット配列のコピー数結果を表 1 に示す。RNA の抽出方法 (QIAcube, magLEAD 200, 400) によらず、ddPCR が qPCR よりも検出感度が高かった。ddPCR 測定系中では、RNA 抽出液からの One-Step 反応系が最も検出感度が高い結果であった。

#### D. 考察

(1) 遺伝子型 1 の E 型肝炎ウイルス (HEV) が国内で報告されることは稀である。本研究でウイルス分離の由来となった E 型肝炎患者はインドから日本に移動して約 3 週間後に発病したため、国内ではなくインドで感染した可能性が強く疑われる。全長の塩基配列を用いた系統樹解析により、遺伝子型 1 の中でも比較的新しく分類されたサブタイプ g である事が判明した。また ORF の 1 つである ORF4 が、これまで報告されているものより短い特徴を持つ事が明らかになった。分離された遺伝子型 1 の HEV は培養細胞で効率的に感染、増殖が可能であるため、今後の HEV 研究に利用される事が期待される。

一方で 2021 年の国内の E 型肝炎の届け出数は 452 人と例年並みであったのに比べ、A 型肝炎はわずかに 71 例と減少した。同じ経

口肝炎ウイルスでも、コロナ禍での人々の生活様式の変容による影響は異なることは興味深く、感染経路の違いを示唆している可能性が考えられた。

(2) アイチウイルスの RT-LAMP 法による検出に関して、Genotype A, B 両方検出できるプライマーセットのデザインは、様々な株に対応してすべてを検出しようとするデザインであることに加え、動物コブウイルスを検出しないようなデザインも考えた場合、かなりプライマー設定領域が限られてくることが分かった。結果として本研究でデザインした複数のプライマーセットで、 $10^3$  コピーのウイルス RNA まで検出できた。アイチウイルスの RT-LAMP 法による検出に関する論文 (Lee et al., Indian J Microbiol, 59:375-378, 2019) で発表されているプライマーセットを利用した RT-LAMP を本研究で行った場合、 $10^4$  コピーまでしか検出できなかったのも、それよりは感度は高かった。しかし、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) コピーであることを考えると、まだ、感度向上にむけた検討の必要があるものと考えられた。

河川水からのウイルス RNA の検出の試みでは、リアルタイム PCR の結果と RT-PCR の結果は一致しなかった (リアルタイム PCR では検出されなかったサンプルから RT-PCR で検出された例も認められた)。この違いに関しては今後検討が必要である。

One-Step RT-PCR でウイルス RNA が検出されたのは、いずれも Takara の PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit で RT-PCR を行った場合であった。このことから、今回用いた One Step RT-

PCR 2 キットのうちでは、Takara のキットが検出に適しているものと考えられた。

河川水サンプルを採集した 9 月から 3 月にかけては、感染性胃腸炎症例の増加する冬季を含む。下水調査で、アイチウイルスは、冬季から春季にかけて多くなるとの報告がある (Kitajima et al., Applied Environ Microbiol. 3952-58. 2013)。今回の結果ではそのような傾向は認められなかった。SARS CoV-2 の流行に対する感染対策により、感染性胃腸炎症例が減少していることが関係しているのかもしれない。アイチウイルスの環境中の増減を把握するためには、長期的な調査の継続が必要である。

(3) ロタウイルスのリアルタイム qPCR 法の検討で、プライマー・プローブの濃度を変更することで非特異反応の発生が軽減されるメカニズムについては詳細には解明されていない。Freeman らのオリジナルのプライマー・プローブセットの場合は、ウイルス遺伝子におけるフォワードプライマー結合部位の配列が遺伝子型によって異なるため、フォワードプライマー 20 塩基中に混合塩基が 3 つ入っている (8 番目に W、12 番目に R、14 番目に R)。つまり、ウイルスの塩基配列に対して 100%相補的なプライマーは、理論的には添加されたフォワードプライマーの内の  $1/8$  ( $1/2 \times 1/2 \times 1/2$ ) に過ぎない。従って、フォワードプライマーの濃度をリバースプライマーおよびプローブの倍量添加することで、PCR 反応の特異性や増幅効率が改善している可能性が考えられる。しかし、フォワードプライマーの濃度を  $0.6 \mu\text{M}$ 、 $0.8 \mu\text{M}$  と増加させても、非特異反応が軽減されることはなく、 $0.4 \mu\text{M}$  が至適濃度であると考えられた。

本研究により、ロタウイルスのリアルタイム qPCR 検出法において現行法よりも非特異反応を軽減させる方法が見いだされた。新たに作製したプライマー・プローブセットの中には Freeman らのプライマー・プローブセットよりわずかに良い結果が得られたものもあるが、大きな差ではないため、地方衛生研究所等における検査業務に混乱を来たさないためには、従来から広く利用されている Freeman らのプライマー・プローブセットの利用を続けるのが無難であると考えられる。今後、各地方衛生研究所でも「濃度を変更することにより非特異反応が軽減される」現象の再現性が確認できれば、検査マニュアル等に反映させていく予定である。

(4) ノロウイルスの不活化条件について、 $90^{\circ}\text{C}$  で温度を固定した検証を行ったが、例えば  $60^{\circ}\text{C}$  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。

(5) ふきとり法及びパウダリング法を用いた野菜表面からのウイルス検出の検討は全て 3 回試行したが、ふきとり法ではカット野菜の拭き取り残しによる偶然誤差の影響が強く、安定した定量値を得るためにはより多くの試行回数が必要になると考えられる。一方、パウダリング法では、野菜からの直接回収により偶然誤差の影響が低減され、パウダ



一化による表面積の増加によって RNA 抽出溶液への接触機会が増加し、高い検出感度が得られたと考えられる。

(6) 糞便等のヒト由来検体の検査に比べ、ウイルス量が少ない食材・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、これらの検体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ている。

通常の PCR は、最終増幅産物をアガロースゲル電気泳動で検出するエンドポイント解析であり、定量性がなく、qPCR では、蛍光を用いた検出により反応進行中の増幅産物を測定することができるものの、陽性コントロールによる標準曲線に対して正規化する必要がある、増幅効率のばらつきが結果に影響を与える可能性もある。一方、dPCR では、PCR 増幅と蛍光プローブによる検出方法を基礎としながら、標準曲線を用いることなくサンプル中のターゲット DNA コピー数を高感度に絶対定量することが可能である。さらに、dPCR の一種である droplet dPCR (ddPCR) では、サンプル DNA は 20,000 個の液滴に分割された後、それぞれの液滴で独立して PCR 増幅が行われ、陽性と陰性の液滴の数をポアソン統計解析することで、正確な絶対定量が可能である。

今回、ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキを用い、その中腸腺抽出液に段階希釈したノロウイルス懸濁液を添加する実験系を構築した。その試料から実際の検査で行われる操作によってウイルス RNA を抽出し、qPCR および ddPCR によって検出・定量を行った。これまでに得られた結果では、ddPCR 法、特に RT 反応から ddPCR まで One-Step で行う方法が最も検出感度が高かった。今後さらなる検討を要するが、食品、拭き取

り検体、環境水などからの食中毒原因ウイルスの高感度検出方法が確立すれば、各種ウイルスの汚染経路や感染パターンの解明に繋がり、今後の予防対策に貢献できると期待される。

## E. 結論

(1) 国内での報告が稀な遺伝子型 1 の E 型肝炎ウイルス (HEV) のウイルス分離を行い、感染性ウイルスの全長塩基配列情報を決定した。このウイルスはサブタイプ g に分類され、またインド由来である可能性が考えられた。培養細胞で感染増殖が可能な株であるため、今後の HEV 研究への利用が期待される。

2021 年の A 型肝炎の報告数が過去最少であった一方で、E 型肝炎の報告数は例年並みであった。またその遺伝子型は 3 および 4 で占められていた。今後の食中毒原因ウイルスの感染制御に向け、継続的な分子疫学調査が必要であるとともに、環境調査の重要性が認識された。

(2) アイチウイルスの RT-LAMP 法による検出に関して、 $10^3$  コピーのウイルス RNA まで検出できるプライマーセットを得た。ただし、市販のノロウイルスの検出感度と比較すると劣ることから、感度向上に関する検討の余地が残された。

(3) ロタウイルスのリアルタイム qPCR 検出法において、幅広い遺伝子型を高い特異性で検出する最適な方法は、Freeman らが設計したプライマー・プローブセットを用い、それぞれの終濃度を  $0.4 \mu\text{M}$ 、 $0.2 \mu\text{M}$ 、 $0.2 \mu\text{M}$  とし、アニーリング+伸長反応は  $56^\circ\text{C}$  で行うものである。

(4) 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。

(5) 野菜表面上からの効率的なウイルス検出手法の探索を行ったところ、最も誤差が小さく且つ高い検出感度を示したパウダリング法が適した手法であることが示された。

(6) ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキの中腸腺抽出液に段階希釈したノロウイルス懸濁液を添加する実験系を構築し、その試料中のウイルスを qPCR および ddPCR によって定量した結果、ddPCR 法、特に RT 反応から ddPCR まで One-Step で行う方法が最も検出感度が高いことを明らかにした。これらの結果は、今後の食中毒原因ウイルスの感染制御に向け、有益な方法論を提供するものと期待される。

#### F. 健康危険情報 該当なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表 (英文)

1. Sun L, Li Y, Misumi I, González-López O, Hensley L, Cullen JM, McGivern DR, Matsuda M, Suzuki R, Sen GC, Hirai-Yuki A, Whitmire JK, Lemon SM. IRF3-mediated pathogenicity in a murine model of human hepatitis A. *PLoS Pathog.* 2021 17(9):e1009960.
2. 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.* 2021 Apr;102(4).

3. Hayashi T, Murakami K, Hirano J, Fujii Y, Yamaoka Y, Ohashi H, Watashi K, Estes MK, Muramatsu M: Dasabuvir Inhibits Human Norovirus Infection in Human Intestinal Enteroids. *mSphere.* 2021 Nov 3; 6(6):e0062321.
4. 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).

##### (和文)

1. 鈴木亮介、李天成、塩田智之：「創薬研究者がこれだけは知っておきたい最新のウイルス学」第1章 第3節「E型肝炎ウイルスの感染増殖系」。2021. 8月 p25-31.
2. 杉山隆一、李天成、鈴木亮介、石井孝司、村松正道. 病原微生物検出情報 (IASR)、2021、Vol. 42、No. 12、わが国のE型肝炎分子疫学情報 (2016~2021年第42週)
3. 藤井克樹：特集 ウイルス研究に進歩をもたらした新しい技術 ウイルス遺伝子の網羅的解析：1) 次世代シーケンサー 臨床とウイルス 2022, 50(1), 30-36

##### 学会発表

1. レポーター遺伝子を持つ組換え A 型肝炎ウイルスを用いた抗ウイルス低分子化合物の探索、鈴木亮介、松田麻未、西山直子、小林さくら、鈴木祐成、結城 (平井)

- 明香、山根大典、村松正道. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 2021/11/16-18, 国内, 口頭.
2. A 型肝炎ウイルスにおける新規抑制剤の開発、鄭シン, 史紹春, 鈴木亮介, 結城(平井)明香, 若江 亨祥, 劉慶博, 宋少江, 村松正道、第 68 回日本ウイルス学会学術集会 2021/11/16-18, 国内, ポスター.
  3. 低分子化合物ライブラリーを用いた HEV 増殖阻害物質の探索. 杉山隆一、石井孝司、鈴木亮介、脇田隆字、村松正道. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 2021/11/16-18, 国内, ポスター.
  4. 藤井克樹、津川毅、中田修二、村松正道：札幌市において小規模な流行を起こしたロタウイルス G12 株の全遺伝子解析 (Full-genome analysis of rotavirus G12 strains that caused a small epidemic in Sapporo) 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2021 年 11 月 16-18 日
  5. 津川毅、藤井克樹、赤根祐介、本庄紗帆、近藤謙次：ウシ由来ロタウイルス G15 株のヒト初感染例の分子的特徴 (Molecular characterization of the first human G15 rotavirus strain of zoonotic origin from the bovine species) 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2021 年 11 月 16-18 日
  6. 林豪士、村上耕介、平野順紀、藤井克樹、山岡曜子、大橋啓史、渡士幸一、Mary Estes、村松正道：Screening of an antiviral compound library identifies dasabuvir as a novel anti-human norovirus inhibitor 第 68 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2021 年 11 月 16-18 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 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
  2. 実用新案登録  
該当なし
  3. その他  
該当なし