

## 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、さらにウイルスの不活化条件を明らかにする事を目標とし、以下の研究を実施した。

E型肝炎ウイルス（HEV）を高感度に検出するために、HEVを含む培養液から、組換えウイルス様粒子を免疫したウサギ血清を用いて濃縮法の条件検討を行い、数十倍のウイルス濃縮条件を決定した。この濃縮法を用いてE型肝炎の原因食材と疑われたイノシシ肉からHEVの検出を試みたが、検出には至らなかった。また環境調査として野生イノシシ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。22頭が抗体陽性であったため、野生イノシシにおけるHEV感染が示唆されたが、ウイルス遺伝子は検出されず、分子疫学情報は得られなかった。A型肝炎ウイルス（HAV）についてもウイルス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、HAVに対して感染中和活性を持つ血清を作製した。また国内で検出されるHEVは遺伝子型3および4で占められているが、報告が稀な遺伝子型1のHEVに感染した患者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。さらに分子疫学調査により2021年にはHAVとHEV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。

アイチウイルスは自然環境中において、二枚貝や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を通しアイチウイルスの環境中の動態を把握することは、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目的で、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法について検討し、食品や環境水中のウイルス検出、定量を行なった。

ロタウイルスのリアルタイムqPCRによる検出法については、精度向上を図るため、RNA抽出方法、プライマー・プローブセットの探索、反応条件の検討を行った。RNA抽出に関してはDirect-zol RNA kitを用い、DNase処理を実施しないことで安定して高感度な検出が可能であった。プライマー・プローブセットは、Freemanらが2008年に報告したものが良好であった。これは幅広い遺伝子型を検出可能であるが、しばしば非特異反応が認められた。しかしプライマー・プローブの濃度を工夫することで非特異反応の発生が軽減された。

ノロウイルスは大規模食中毒事例を引き起こすことから、世界中で不活化条件を特定する

研究が続けられている。本研究では食品に含まれるノロウイルスの不活化条件の特定を目指し、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ノロウイルス汚染食品モデルとし、幹細胞由来ヒト腸管オルガノイドを用いて検証した。シジミに GII.4 ノロウイルスを接種した後、90℃の熱湯で加熱した。加熱処理したシジミからウイルスを抽出し、腸管オルガノイドに接種した。非加熱サンプルでは感染 24 時間後のウイルスコピー数の増加が認められたが、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。またシジミにおけるノロウイルスの局在を明らかにするための検討も実施し、さらなる条件検討の必要性を示した。

野菜表面のウイルス測定法の検討については、ガーゼ、ガラスフィルター、ガラスウールを用いて、ウイルスの吸着効率ならびにそこからの誘出効率を調べた。吸着材としてガラスウールを用い、硫酸による酸洗浄を行ってからビーフエキスで誘出を行う方法において高い回収率を得られた。ビーフエキス誘出液からさらに濃度を高めてウイルス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の開発を試み、酸性条件でウイルスの回収率が高いことが示された。野菜表面上に存在するウイルスのより効率的な回収手法を検討し、液体窒素を用いたパウダリング法においてウイルス検出量が高く、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。

食中毒事例や関連情報の収集と情報提供等に関する地方衛生研究所（以下、地衛研）の状況を把握するため、①当該自治体における食中毒検査体制、②食中毒（疑）発生事例が起こった場合の検査方法、検体種類、検査手順、前処理及び濃縮・精製方法、③遺伝子検査の判定基準等、④食中毒の行政処分等におけるウイルス検査結果の利用、⑤環境中の食中毒原因ウイルスサーベイランス、⑥食中毒調査支援システム (NESFD) の活用などについて調査を行い、情報を収集した。さらに、ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキ抽出液に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リアルタイム PCR およびデジタル PCR によって定量した結果、逆転写反応からデジタル PCR までを One-Step で行う方法が最も検出感度が高いことが判明した。デジタル PCR 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多数の個別の PCR に分割するため、増幅後にコピー数の総数が算出され、標準物質を必要とせず、またサンプルを多数のサブサンプルに分割することで、食品中の夾雑物成分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。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。

#### 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  
関瑛理子・東京大学大学院工学系研究科  
門屋俊祐・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  
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  
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の開発、ウイルス不活化条件を明らかにする事を目的とした。

(1) ウイルス性食中毒の原因となるウイルスの中で、肝機能障害の原因として A 型肝炎ウイルス(HAV)および E 型肝炎ウイルス(HEV)の感染が疑われる。いずれもウイルスに汚染された水や食物を介した経口感染により伝播する。E 型肝炎は、かつては衛生環境の整っていない発展途上国等で散発的に発生する疾患と考えられていた。しかしながら、現在ではブタやイノシシなどの動物にも感染する人獣共通感染症であることが判明し、これらの内臓肉等が先進国内での主な感染源と考えられている。日本の E 型肝炎報告者数は 2012 年以降、年々増加している。加熱不十分な肉の喫食が主な原因と考えられているものの、原因が明らかでないケースも依然として多い。2020 および 2021 年は新型コロナウイルスの流行による人々の行動様式の変化に伴い、報告数が減少した感染症もあったが、E 型肝炎の報告数は例年と比して減少しなかった事は興味深い。

経口肝炎に対して有効な対策を取るためにも、高感度な手法で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を調査する

必要がある。そこで本研究において、HEV の高感度検出法の確立のために、抗体を用いた HEV の濃縮条件の検討を行ない、さらにこの方法を用いて原因食材からの HEV 検出を試みた。HAV についても、濃縮可能なウサギ血清を作製した。また環境調査として、野生イノシシの HEV 感染状況の調査を行い、IgG 抗体および HEV ゲノムの検出を試みた。さらには国内の経口肝炎ウイルスの流行状況を把握する事を目的として、分子疫学調査を行なった。

(2) アイチウイルス (AiV) は、1989 年の愛知県のカキ関連胃腸炎集団発生事例から初めて発見され、現在では世界各地の胃腸炎患者から検出されている。世界各地の胃腸炎散发事例で、アイチウイルスが原因と考えられる例が低頻度ではあるが報告されている。また、二枚貝や河川水、下水など環境中からも検出される。食品や環境水中のウイルス定量を通してアイチウイルスの環境中の動態を把握することは、感染経路の理解に必要である。本研究では、アイチウイルスのリアルタイム RT-PCR 法や RT-LAMP 法などの高感度検出法の開発および既報の検出法の評価を行なった。加えて、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た。

(3) ロタウイルスはヒト (特に乳幼児) に急性胃腸炎を引き起こす代表的なウイルスであり、食中毒の原因としても検出されることがある。ロタウイルスの検査は、患者の糞便や様々な食材等、夾雑物の多い検体を用いてリアルタイム qPCR 等の検査を実施することが多い。従って、ロタウイルスの検査には、高い感度と特異性が求められる。また、ロタウイルスには多くの遺伝子型 (2022 年現在、G 型は 41 種、qPCR のターゲットとなる NSP3 遺伝子 (T 型) は 27 種) が存在しているため、検出可能な型についてもある程度の幅広さが同時に求められる。

本研究では、これまであまり深く検証されて来なかったロタウイルスのリアルタイム qPCR 法について、高精度な検出方法の検証を行い、検査精度の向上を目指した。

(4) ノロウイルスは急性胃腸炎を引き起こす主要病原体で、大規模食中毒事例を引き起こすことから世界中で不活化条件が調べられている。しかし再現性の高い培養系が未確立であったため、現在のガイドライン等に使用さ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」に策定されたものであり、確実性に疑問が残されている。本研究分担者らは幹細胞由来ヒト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°C、15 分) によりウイルス感染性が失われることを示した。この結果を受け、世界中で腸管オルガノイドを用いた不活化条件の研究が始まったが、既存の方法では接種用の 10% ノロウイルス溶液を直接加熱しており、食品内部の不活化条件検討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を「直接的」に特定することを目指した。またシジミ中におけるノロウイルスの局在を明らかにすることで、より正確な食品モデルの作出も試みた。

(5) 日本国内のウイルスを原因とした食中毒事例は 7000 件ほどとなっており、食中毒患者数の半数を占めている。野菜の摂取による食中毒例も報告されており、途上国では市場の野菜表面から大腸菌やノロウイルスが検出されたとの報告もなされている。我が国では、キャベツなどの野菜の供給を海外からの輸入に強く依存しており、ウイルスに汚染された輸入食品を摂取することで輸入感染症が国内で蔓延する可能性がある。ウイルス性食中毒による被害を防ぐためには、食品表面あるいは

内部に存在しうるウイルスを適切に検出する手法が必要である。野菜表面上のウイルス検出として、拭き取り剤及び誘出法が広く適用されているが、対象とするウイルスによっては検出感度の多様性が見られる。そこで本研究では、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。さらに濃縮してウイルスの検出感度を高める手法として、酸沈殿法を適用することを試みた。さらに、野菜表面上からより効率的なウイルス検出手法を決定するために、ふきとり法及びパウダリング法によるウイルス検出量の比較を行なった。さらに、カット野菜生産プロセスにおける野菜の消毒・洗浄過程を想定し、消毒・洗浄後のウイルス検出感度の評価も行った。

(6) ウイルスによる食中毒は、事件数にして全体の2割、患者数にして全体の5割を占める。ヒト検体から同定されたウイルスの遺伝子情報は、地方衛生研究所（以下、地衛研）と国立感染症研究所（以下、感染研）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品からのウイルスの検出や同定は、食品を汚染しているウイルス量が少ないことや、食品に含まれる夾雑物が検出を妨げることなどから困難な場合が多い。そのため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ための知見も不足している。このことから、様々な食中毒原因ウイルスについて効果的な予防策を検討するための知見を収集し、ガイダンス案を提示することが、本研究班としての目的である。当分担任は、食中毒関連情報の収集や検査法の地衛研における検証を担当し、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。さらには、地

方自治体及び国レベルの関係部局の連携、情報共有、遺伝子検査手法の統一化等により、広域的な食中毒事案に共通する発生要因が明らかになることが期待される。

そこで、食品や環境水の収集と提供及び食中毒事例や関連情報の収集と情報提供等に関する地衛研の状況を把握するため、検査体制、検査項目、検体種類、検査方法等について、全国の地衛研を対象に調査を実施した。また原因ウイルスの追求が難しい場合が多い、ウイルス量が少ない食品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、食中毒原因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。さらに、ノロウイルス遺伝子を含むプラスミドを用いて、デジタルPCR(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) E型肝炎ウイルス(HEV)の組換えウイルス様粒子を免疫したウサギ血清を用い、国内で報告の多い遺伝子型3のHEVの濃縮について、抗体結合試薬や界面活性剤の条件検討を行った。培養細胞で増殖させたHEVを10mLの培養液にスパイクし、抗血清と抗体結合試薬および界面活性剤等を添加し、140 $\mu$ Lに濃縮した。濃縮サンプルからRNAを抽出し、リアルタイムPCRによりウイルスのゲノムコピー数を評価した。

イノシシ肉の喫食歴が明らかとなった2件のE型肝炎と診断された患者で、原因として疑われたイノシシ肉の肉汁約25mLからウイルス濃縮操作を行い、RNAを抽出し、リアルタイムPCRを行った。

イノシシ86頭の血清については、HEV IgGおよびHEVゲノムの測定を行った。

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。

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 RNA を抽出し、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。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 ゲノムの定量を行った。

ま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 を用いて系統樹解析を行った。

(2) アイチウイルスのリアルタイム RT-PCR 2-step 法の検討で、DNA の鋳型は Genotype A は、アイチウイルス A846/88 株 cDNA クローンを用い、Genotype B は、Accession No. DQ028632 (Oh et al., 2006) をもとに人工合成した。cDNA クローンから *in vitro* 転写により合成した RNA も鋳型として使用した。リアルタイム RT-PCR 1-step 法は、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。プライマーおよびプローブのデザインは、Primer Express Software を用いて行った。Kitajima et al. (Appl Environ Microbiol 2013) のプライマー/プローブを用いた場合、反応は、25°C 2 分、50°C 10 分、95°C 2 分の後、95°C 15 秒、60°C 1 分を 50 サイクル行った。

Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) 法の検討は、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ーセットを、ソフトウェア Primer Explorer V5 を利用して設計した。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。

環境水からのウイルス検出の準備として、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、4°C、16 時間攪拌した後、4°C で 9000  $\times$ g、30 分の遠心により沈殿させたウイルスを滅菌蒸留水に懸濁し、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。

河川水からのウイルス RNA の検出については、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  $\times$ 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、QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen) を用いてウイルス RNA を精製した。ウイルス RNA の検出は、リアルタイム RT-PCR (Kitajima et al., 2013)、および RT-PCR (Yamashita et al., J Clin Microbiol, 2000) により行った。

(3) ロタウイルスの qPCR 法としては、これまで NSP3 セグメントをターゲットとした 2 種類のプライマー・プローブセットが世界的に広く利用されている。一つは Freeman らが設計したセット (Journal of Medical virology, 2008, 80(8), 1489-1496) であり、もう一つは Jothikumar らが設計したセット (Journal of Virological Methods, 2009, 155(2), 126-131) である。本研究ではこれら 2 種の他に、NSP3 および NSP5 セグメントに新たにプライマー・プローブを設計し、その性能についても検証を行った。

RNA 抽出には Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) および QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN) を使用した。

リアルタイム qPCR 用の試薬としては、各メーカーの 2-step 法の試薬を用い、逆転写反応はランダムプライマーを用いておこなった。具体的には New England Biolabs (NEB) 社の LunaScript RT SuperMix Kit と Luna Universal Probe qPCR Master Mix、タカラバイオ社の PrimeScript RT reagent Kit と Premix Ex Taq (Probe qPCR)、ThermoFisher Scientific 社の SuperScript VIL0 cDNA Synthesis Kit と TaqMan Universal PCR Master Mix を使用した。

リアルタイム qPCR は主に Bio-Rad 社の CFX Connect™ リアルタイム PCR 解析システムを用いて検証した。

検証に用いた検体は、医療機関において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。事前にロタウイルスの検査を行い、ロタウイルス陽性検体と陰性検体に区別し、陽性検体については次世代シーケンズ解析にて全遺伝子型を特定した。

(4) 本研究ではシジミを 90°C の熱湯で加熱することを想定して研究を進めた。シジミは市販の活シジミを購入して試験に供した。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 秒ずつ測定することで加熱状況を把握した。

まず、シジミ成分によるノロウイルス培養系への影響を評価するため、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) に浸漬した。身をホモジナイズした後に遠心分離により残渣を取り除き、上清を GII.4 ノロウイルス添加シジミ懸濁液として腸管オルガノイドに接種した。また、GII.4 ノロウイルス添加シジミ懸濁液を 90°C で 5 分間加熱したものも対照と

して腸管オルガノイドに感染させた。感染 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。

次にシジミ中ノロウイルスの不活化条件を調べるため、殻から取り出したシジミを 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。接種した身を 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。各シジミをホモジナイズした後、遠心分離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。

ノロウイルスの存在部位を視覚的に解析するため 5 日間無給餌飼育した後、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。シジミを殻から身を取り出して市販の透明化試薬 (SCALEVIEW、Fuji Film) で処理し、蛍光顕微鏡にて観察した。

(5) マウスノロウイルス及びマウス肝炎ウイルスを滅菌蒸留水に添加し、両ウイルス濃度が  $10^6$  及び  $10^3$  copis/mL となるように高濃度及び低濃度条件のウイルス懸濁液を準備した。このウイルス懸濁液 20mL に対してカットキャベツ 20g 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た。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（レーヨン 0.17g、コットン 0.23g、ガラス繊維 0.50g、酸化アルミニウム繊維 0.50g）、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。RNeasy PowerMicrobiome Kit (QIAGEN 社) を用いて拭き取り剤から 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（約 100 mL）を適宜加えながらパウダー上になるまですり潰した。この手法により野菜表面上ウイルスの自然減衰及び野菜由来の有害な酵素活性を抑制することが可能となる。RNA 抽出及び RT-qPCR はふきとり法と同様である。

カット野菜プロセスにおいて水道水あるいは希釈次亜塩素酸ナトリウム溶液で洗浄されることを想定し、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) 地衛研の状況を把握する目的で、以下に示す調査を実施した。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。調査項目の概要は以下である。①当該自治体における食中毒検査体制、②食中毒（疑）発生事例が起こった場合の、検査方法、検体種類、検査手順、検査の前処理及び濃縮・精製方法、③遺伝子検査の判定基準等、④食中毒の行政処分等に検査結果がどのように用いられているか、⑤環境中の食中毒原因ウイルスサーベイランスについて、⑥食中毒調査支援システム (NESFD) の活用について、⑦食中毒原因ウイルス検査に関する要望等。

ウイルス量が少ない食品やふき取り検体については、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、食中毒原因ウイルス検査に関するの要望等（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。

dPCR による高感度検出では、食品としてカキを用い、カキ中腸腺の抽出液を調製した（以下、中腸腺抽出液）。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）をもちいた（以下、ノロウイルス懸濁液）。中腸腺抽出液に段階希釈した変数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、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) ウイルス濃縮に用いる抗体結合試薬としてはパンソルビンの使用が濃縮効率の良い結果が得られた。また NP-40 の添加により、添加した E 型肝炎ウイルス (HEV) を高い収率で捕捉する事が出来、数十倍のウイルス濃縮が可能となった。

E 型肝炎の原因食材と疑われた 2 件のイノシシ肉の肉汁から上記条件で 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 年に石川県で捕獲されたイノシシ 86 頭の血清の HEV IgG を測定したところ、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。

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。

E 型肝炎の ORF2 の一部の塩基配列から、遺伝子型 1 の HEV 感染が明らかとなった患者検体について、血清および便 (10% 乳剤) の HEV RNA コピー数を qPCR で測定したところ、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。検体それぞれを PLC/PRF/5 細胞のサブクローンである 4-21 細胞に感染させ、長期間培養した。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。RNA コピー数は感染後 73 日目でピークとなり、コピー数は  $3.1 \times 10^8$  copies/mL となった。上清から RNA を抽出し、ほぼ全長に相当する領域を nested-RT-PCR で増幅し、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事から、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) アイチウイルスのリアルタイム RT-PCR 2-step 法について、既報の方法 (Kitajima et al., Appl Environ Microbiol, 2013; Coudray-Meunier et al., PLOS One 2016; Drexler et al., Emerg Infect Dis 2011) の検出感度を比較した。その結果、DNA が鋳型の場合、いずれの方法でも  $10^1$  コピーのウイルス cDNA を検出した。これらの 2 方法のうち、Genotype A, B を判別できる Kitajima et al. の方法が有用であると考えられた。RNA から逆転写後リアルタイム PCR を行った場合、DNA より 5 倍程度かそれ以上感度が低くなる傾向がみられた。

簡便さの観点から TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix (Thermo Fisher) を用いたリアルタイム RT-PCR 1-step 法についても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 が検出できた。

また今回、本研究独自の RT-PCR プローブ/プライマーの開発を試みた。VP1 領域に 4 種

類のプライマー/プローブをデザインした。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なプライマーやプローブのデザインに留意した。その結果、 $10^2$  コピーのアイチウイルス RNA を検出できるプライマー/プローブのセットが得られたが、Kitajima et al. の方法に匹敵する感度は得られなかった。

アイチウイルスの RT-LAMP 法を開発する目的で、5' 非翻訳領域から 2A コード領域にかけて、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なプライマーのデザインに留意した。結果として、 $10^3$  コピーのアイチウイルス 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 の検出はできなかった。

環境水からのウイルス RNA 検出のための準備として、PEG 沈殿法での検出効率・感度を検討した。高濃度のウイルス ( $10^4$  コピー以上) の場合、15~20%以上の回収率であったが、 $10^4$  コピー以下の場合、5%前後まで回収率が低下する場合もみられた。それでも、試料水 40 ml 中の  $10^1$ ~ $10^2$  オーダーのコピー数のウイルスを濃縮した場合でも、本研究で用いているリアルタイム RT-PCR 法によりアイチウイルス RNA を検出できることが確認された。

愛知県豊明市の河川 2 か所(皆瀬川、境川)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。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 がリアルタイム PCR により検出された。皆瀬川からは、

10 月および 12~3 月まで Nested PCR でウイルス RNA が検出された。一方、境川からは一度も検出されなかった。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) ロタウイルスの検出方法については、まず RNA の抽出方法に関して Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) と QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN) を比較検証した。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れば 1000 倍以上の差が現れる検体もあり、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。

続いて、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と考えられた。

次に、典型的なロタウイルス陽性検体を用いて qPCR 試薬間の検出効率の比較検討を行った。胃腸炎ウイルスの検査を行う際には複数種のウイルスを同時に検査することが多いため、逆転写と qPCR を一度に行う 1-step 法ではなく、別々に行う 2-step 法の方が利便性は高いと考え、2-step 法の試薬について検証を行った。その結果、いずれのメーカー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。しかしながら、本研究では、NEB 社の試薬でわずかながら非特異反応が発生しにくい結果が得られたため、以降の検証では NEB 社の試薬を使用した。

世界的に利用されているプライマー・プローブセットには Freeman らが設計したものと Jothikumar らが設計したものがあため、両者の性能について検証した。Freeman らが設計したプローブは 33 塩基とサイズが大きいいため、蛍光色素とクエンチャーを 5' 末端および 3' 末端に付加させた通常のプローブではバックグラウンドが高く検出に支障が出るがあった。そこで Integrated DNA Technologies (IDT) 社のダブルクエンチャープローブ (5' 末端から 9-10 番目の塩基にもう一つのクエンチャーを入れたもの) を使用したところ、バックグラウンドを低く抑えることに成功した。次に Freeman らのセットと Jothikumar らのセットの増幅効率を検証したところ、両者の増幅効率はほぼ同等であった。ただし、ヒトロタウイルスの主要な流行型 (NSP3 の遺伝子型) である T1 型と T2 型については問題なく検出できたものの、ややマイナーな T3 型に関しては Jothikumar らのプライマー・プローブセッ

トでは検出できないことが判明した。また、ワクチン株 (ロタテック) の T6 型に関しても、Freeman らのプライマー・プローブセットと比較して Jothikumar らのプライマー・プローブセットでは検出感度が 1/1000 程度まで低下した。

Freeman らのプライマー・プローブセットは幅広い遺伝子型を検出可能であるため検査に適していると考えられたが、ロタウイルス陰性検体の一部で非特異反応のシグナルが見られる ( $10^2$  copies 前後あるいはそれ未満として検出される) ことが判明したため、その原因について検証を行った。ロタウイルス陰性検体について、Freeman らのプライマー・プローブセットを用いて同じ反応条件で PCR を行い、得られた非特異的増幅産物のバンドから DNA を精製し、その塩基配列を解読した。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。

最後に、上記の様な非特異反応が発生しにくいプライマー・プローブセットの探索と qPCR 反応条件の検討を行った。Freeman らのプライマー・プローブのターゲットとなっている 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、フォワードプライマー 3 種、リバースプライマー 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、Freeman らのオリジナルのプライマー・プローブセットと比較して、非特異反応が大幅に抑えられることはなかった。続いて、NSP5 セグメントにある保存性の高い領域 (250 bp 程度) にフォワードプライマー 5 種、リバースプライマー 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、Freeman らのオリジナルのプライマー・プローブセットと比較して非特異反応が若干抑えられる組み合わせがあったが、NSP3 をターゲットとする場合より検出感度が若干落ちる (Ct 値が 3 程度高くなる) 傾向が見られた。

次に、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率に違いが見られるか検証を行った。これまでの検証はフォワードプライマー、リバースプライマー、プローブの濃度をいずれも  $0.25 \mu\text{M}$  で統一していたが、リバース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。この傾向は Freeman らのオリジナルのプライマー・プローブセットを始め、上記の新たに作製した様々なプライマー・プローブの組み合わせでも同様に見られた。検証に用いるサンプルによって非特異反応の発生率にバラツキが見られるが、本研究で用いた約 50 検体のロタウイルス陰性サンプルの場合では、従来のプライマー・プローブの濃度 ( $0.25 \mu\text{M}$  each) では 20~25% のサンプルで非特異反応が見られていたが、濃度を変更 ( $0.4 \mu\text{M}$ 、 $0.2 \mu\text{M}$ 、 $0.2 \mu\text{M}$ ) することにより、12%程度まで軽減された。(これらのサンプルには非特異反応が出やすいサンプルを意図的に含めているので、実際の調査時の発生率を反映しているとは限らない。) 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) GII.4 のノロウイルス添加培地に浸漬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、感染 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、 $90^\circ\text{C}$  で 5 分間加熱した GII.4 ノロウイルス添加シジミ懸濁液の接種による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。

$90^\circ\text{C}$  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。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った。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  $27.7 \pm 15.9\%$ であったが、2-4 分間加熱サンプルでは 11~12%であった。

シジミにおける存在部位の視覚的解析に向け、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測定における最適吸着・誘出条件の探求および吸着特性の検討において、ガーゼ・ガラスフィルター・ガラスウールの素材 3 種の F 特異大腸菌 RNA フェージ (MS2) 回収量においては、ガラスフィルター・ガラスウールがガーゼに勝るという結果が得られた。

各誘出条件の比較においては、pH3 程度の硫酸による酸洗浄を経た後に pH9 程度の 3% ビーフエキス溶液 (HiMedia 製) による誘出がもっとも回収量が多かった。また、誘出時間は 2 分と 30 分で差が出なかったことから短時間で十分である可能性が示唆された。また、この手法

における MS2 回収率は 66-68%であり、吸着・誘出効率が十分であることを示している。

吸着特性を解明するため、吸着速度・脱着速度・測定感度を調査した。MS2 溶液の濃度によらず、ガラスウール担体は溶液投入後 5 分以内に吸着飽和に至ることが示された。このことから、この手法では短時間で環境中のウイルス濃度を反映できることが示唆される。

脱着速度は吸着速度より遅く、時間が経つにつれウイルス回収量は減るものの、MS2 溶液から取り出した 24 時間後でもガラスウール担体から MS2 が検出された。定量性を確保するにはサンプル回収後速やかな測定が望ましいが、陽性・陰性だけを判断する場合においては回収後長時間が経過しても対応可能であることが推察された。

ガラスウール担体への MS2 飽和吸着量は  $10^1$ PFU/mL- $10^6$ PFU/mL という濃度幅において各溶液濃度を反映したものとなり、広い濃度域においてこの手法の測定感度が高いことが見られた。よって、ウイルス回収量から溶液濃度を逆算することができる可能性が示されている。

酸沈殿法の検討では、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 フェージの回収率を調べた。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%が高い回収率であった。特に極東 3%における回収率は約 100%であり、高い回収率だった。この結果から FeCl<sub>3</sub>を添加しない場合、Φ6 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。

ウイルス誘出法の検討では、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、MNV 及び 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ったものの、パウダリング法によって得られた検出量が最も高かった。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。MNV に関しては高濃度条件と類似した結果が見られた。

消毒・洗浄後の野菜表面上ウイルスの検出においては、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った。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) 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。調査結果について、項目別に以下に記す。

所属自治体における食中毒検査体制について:所属自治体における食中毒検査(ウイルス検査)をすべて地衛研で実施しているか否かについては、都道府県の 79%、政令市の 100%、中核市等の 71%では地衛研ですべて実施していたが、都道府県の 21%では保健所及び中核市保健所も検査を実施し、中核市等の 29%では近隣の地衛研で実施していた(図 1)。

食中毒(疑)集団発生事例が起きた場合の検査について:各種食中毒原因ウイルスにつ

いて、地衛研で検査できるか否か（所属自治体や当該地衛研の方針として検査する・しない場合も含む）については、図2に示すように、ノロウイルスは地衛研のタイプに関わらずほとんどの施設で検査でき、サポウイルス、ロタウイルス、A型肝炎ウイルスは中核市等以外では大部分で検査でき、アストロウイルス、E型肝炎ウイルスは検査できる地衛研がやや減少し、アイチウイルスは検査できる施設は約半数であった。その他のウイルスとしては、アデノウイルスをあげた施設が最も多く（13施設）、それ以外のウイルス種は少数であった（エンテロウイルス、パレコウイルス）。

検査方法としては、ノロウイルスでは従来からの通知法（厚労省食品安全部）と最近整備された病原体検出マニュアル（感染研）に基づく方法が多く、サポウイルスとアストロウイルスでは食品衛生検査指針（日本食品衛生協会）、病原体検出マニュアル、その他（論文等）のいずれも用いられていた（図3）。他方、ロタウイルス、A型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルスでは、主として病原体検出マニュアルが用いられていた（図3、4）。

検査検体については、患者と調理従事者の糞便は全ての施設で検査され、患者吐物はほとんどの施設で検査される一方、食品・食材、拭き取り、水については多くの施設で必要に応じて検査されていた（図5）。また、患者検体（便・吐物）が搬入された場合、同時に複数の原因ウイルスについて検査されるのではなく、まずノロウイルスの検査を実施する施設が多かった（図6）。

ウイルス遺伝子検査の判定や操作対照について：リアルタイムPCRで実測値が10コピー以下の場合、多くの施設では陰性と判断されるが、一部施設ではNested PCRにより検出感度を高めた検査を実施していた（図7）。また、ウイルス核酸抽出やRT-PCRなどの操作が妥当

であることを確認するために用いる、プロセスコントロールについては過半数の施設で使用していなかった（図8）。

食中毒の判定・処分等に関して、ウイルス検査結果がどのように用いられているか：食中毒（疑）事例等の判定（行政処分）において、84%の施設ではウイルス検査結果が用いられていた（図9）。また、行政からノロウイルスの遺伝子型（GII.4等）や遺伝子解析に基づく系統樹解析等について提供を依頼されるかについては、ほとんどの施設で、依頼される、または、依頼されることがある、という回答であった（図10）。その際、データを求められるタイミングは、行政処分時、または、行政処分後の取りまとめ時が大部分であった（図11）。

環境中の食中毒原因ウイルスサーベイランスについて：県の事業や研究班などで、環境水（河川水、海水など）やカキなどの二枚貝等のウイルスサーベイランスを実施しているかについては、都道府県型の63%、政令市型の42%が実施していた（図12）。検査対象の検体としては、カキ等の二枚貝と下水が多かった（図13）。

食中毒調査支援システム（NESFD）について：NESFDを食中毒対策に使用しているかについては、都道府県型の23%、政令市型の16%が使用していると回答した（図14）。使用目的としては、他自治体での食中毒発生状況の把握、広域食中毒時の情報収集、遺伝子型情報の収集などがあげられた。

ウイルス量が少ない食品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：ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体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（図15）。

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 (図 16)、何らかの方法でウイルス  
検出感度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 (マニュアル、研修、情報還元、検  
体保管等) : 記載意見として情報収集し、末尾  
にまとめた。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 :  
ノロウイルス遺伝子を含むプラスミドを用い  
て、dPCR 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り、  
今後さらに検討を要する。

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) 培養細胞由来の E 型肝炎ウイルスは部分  
的に宿主細胞由来の膜を被っている事が近年  
明らかにされている。抗血清によるウイルス

の濃縮に界面活性剤処理が有効であったのは、  
この膜が除かれて抗体が結合しやすくなった  
と考えられる。一方で糞便由来のウイルスは  
膜を被っていないと考えられる事から、界面  
活性剤処理は必ずしも抗体による濃縮に影響  
しない可能性もあるが、糞便由来のウイルス  
についても検討が必要である。食材・食品や環  
境水からのウイルスの濃縮を考えると、ウイル  
スの由来は両者のケースの可能性が考えら  
れる事から、どちらのウイルスにも有効な条  
件である事が望ましい。検出感度の上昇によ  
り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  
献できる事が期待される。

E 型肝炎の原因食材と疑われるイノシシ肉を  
2 件入手し、肉汁から濃縮操作を行ったが、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、抽出法の可否を検  
証するには、さらに多くの事例での検証が必  
要である。

野生イノシシ 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、過去に  
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、今後も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。この血清を用いた感  
染性ウイルスの濃縮条件の検討が引き続き必  
要である。

遺伝子型 1 の 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。またこのウイルスの ORF4 は、これまで報告されているものに比べ、短い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において、コロナ禍での人々の生活様式の変容による影響が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) アイチウイルスのリアルタイム RT-PCR 法に関しては、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。一方、1-step 法では、 $10^1$  コピーのウイルス RNA から検出できた。感度、簡便さを考慮した場合、当研究室で行うには 1-step 法の方が優れているものと考えられる。1-step 法において、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。Genotype A、B を判別でき、かつ高感度である Kitajima et al. の方法は、有用であると考えられた。一方、本研究で新たにプライマー/プローブのデザインを試みたが、最高でも感度が  $10^2$  コピーで、Kitajima et al. のプライマー/プローブを超える感度のものは、開発できなかった。Kitajima et al. のプライマー/プローブは、Genotype A、B で 3 塩基欠失の有無の違いがある領域に設定されており、Genotype A、B の判別に適した領域である。アイチウイルスのゲノムにはこのような Genotype 間での大きな欠失領域の違いがある領域は他になく、また、イヌコブウイルスや

ネココブウイルスなどの動物のコブウイルスを検出しないようなデザインを求めた場合、かなりプライマー設定領域が限定されてきたことも、今回新たなプライマー/プローブの開発ができなかったことの一因であると考えられる。

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 法によるウイルス RNA の検出に関する論文 (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ため、今回デザインしたプライマーセットは、それよりは高い感度であった。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、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 の結果が一致しなかった (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。

RT-PCR 法でウイルス RNA が検出されたのは、いずれも Takara の Prime Script 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 のキットの方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。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。この点も含め、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 qPCR について、Freeman らのプライマー・プローブセットは NSP3 セグメントの 3' 末端付近に、Jothikumar らのプライマー・プローブセットは NSP3 セグメントの 5' 末端付近に設計されている。遺伝子型間の配列の保存性は 3' 末端付近の方が高く、幅広い遺伝子型を検出するためには 3' 末端付近の方がプライマー・プローブを設計し易いと考えられる。実際、本研究により Jothikumar らのプライマー・プローブセットでは、T3 型および T6 型（ロタテックワクチン株）の検出に支障が出ることが明らかとなった。これは、T3 型のプローブ結合部位の塩基配列がプローブの配列と 25 塩基中 4 塩基異なっている、また、T6 型のプローブ結合部位の塩基配列がプローブの配列と 25 塩基中 2 塩基異なっているためであると考えられた。

ロタウイルスの検査は、患者の糞便や様々な食材等、夾雑物の多い検体を用いてリアルタイム qPCR 等の検査を実施することが多い。本研究でも、実際にヒトゲノム、腸内細菌、アストロウイルス等の様々な混入遺伝子の影響で非特異反応が発生している実態が明らかとなった。しかし、本研究により Freeman らのプライマー・プローブセットを用いる際、その濃

度を変更（フォワードプライマー：リバープライマー：プローブ=0.4 μM、0.2 μM、0.2 μM）することで非特異反応の発生が軽減されることが見いだされたため、この知見は今後の検査精度の向上につながると考えられる。

非特異反応の発生を完全に防止することは困難であるが、通常、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<sup>2</sup> copies 未満として検出される事が多いため、10<sup>2</sup> copies 以上を陽性判定の閾値として設定すれば、偽陽性として誤判定される例は多くないと考えられる。閾値を少し越える程度のコピー数が検出された場合は RT-PCR 法等による確認を行うことで、誤判定を防ぐことが可能と考えられる。

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。今後、各地方衛生研究所とも知見の共有を図り、検査マニュアル等に反映させる予定である。

(4) 食品中ノロウイルスの不活化条件の検討において、本研究では、90℃で温度を固定した検証を行ったが、例えば 60℃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。

シジミにはグリコーゲンが多く含まれる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。一方でアミラーゼによるノロウイルスの感染性への影響はまだ評価されていないことから、引き続きの検証が必要である。

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べきである。

(5) 最適吸着・誘出条件の探求および吸着特性の検討において、ガーゼ・ガラスフィルター・ガラスウールの素材 3 種の MS2 回収量においては、ガラスフィルター・ガラスウールがガーゼに勝るという結果が得られた。これはコットン表面が負に帯電している一方、ガラス繊維はほぼ中性であり、表面電荷が負であるウイルスとの間に静電的反発力が生じなかったためだと考えられる。

本実験系は全て 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、パウダー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) 食中毒原因ウイルスの汚染が疑われる食品や環境水の収集と提供、及び食中毒事例や関連情報の収集と情報提供に関する地衛研の状況を把握するため、検査体制、検査項目、検体種類、検査方法、検査結果の行政処分における利用、環境サーベイランス、食中毒調査支援システム (NESFD) の利用等について調査を実施した。

所属自治体での食中毒検査体制において、地衛研が主要な役割を担っていることが明らかにされた。地衛研で検査可能なウイルス種

としては、ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスがあげられ、アイチウイルスとアデノウイルスについては検査可能な施設が少なかった。なお、「検査できる・できない」には、所属自治体や当該地衛研の方針として検査する・しない場合も含まれる。

検査方法としては、通知法（厚労省食品安全部）、食品衛生検査指針（日本食品衛生協会）、病原体検出マニュアル（感染研）、その他（論文等）に基づいて行われているが、ウイルス種によって参考にしている指針・マニュアル等が異なっていた。また、多くの方法は糞便等のヒト由来検体からの検出に関するもので、食品からの検出に関する記載は充分ではなく、この点について改訂を希望する意見が寄せられた。実際の検査においても、患者及び調理従事者の便検体は全ての施設で検査を実施しているが、食品やふき取り検体については必要に応じて実施する施設が多い状況であることが明らかにされた。しかし、感染原や感染経路に対する関心は高く、過半数の施設でカキ等の二枚貝や下水等の環境水のウイルスサーベイランスを実施していた。

さらに、原因ウイルスの追求が難しい場合が多い、ウイルス量が少ない食品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、ウイルス量が少ない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り、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。

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) E 型肝炎ウイルスを含む培養上清から、抗体を用いて濃縮可能な試薬および界面活性剤の条件検討を行い、NP-40 の添加およびパンソルビンの使用により、数十倍のウイルス濃縮が可能となった。

この濃縮法を用い、原因食材と疑われるイノシシ肉から 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収集し、濃縮法の検証を行う必要がある。ま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。

イノシシ 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。

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。

国内での報告が稀な遺伝子型 1 の 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。いくつかの既報のリアルタイムPCR法を比較検討した結果、1-step法でKitajima et al.のプライマー/プローブを用いた場合、 $10^1$ コピーのウイルスRNAまで検出でき、Genotypingも可能なことから、Kitajima et al.の方法がアイチウイルス検出に適していると考えられた。

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。

試料水からのウイルス濃縮に関して、PEG沈殿法により試料水40ml中の  $10^1 \sim 10^2$ オーダーのコピー数のウイルスを濃縮した場合でも、本研究で用いているリアルタイムRT-PCR法により検出できることが確認できた。

河川水からのアイチウイルス RNA の検出については、RT-PCR、リアルタイム PCR の 2 方法でウイルス RNA が検出できた。しかし、両者の結果は一致せず、両方法についてさらなる検討が必要であると考えられた。RT-PCR に関しては、Takara の PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit を用いた場合、より良い結果が得られた。

(3) 現在、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（フォワードプライマー：ACCATCTWCACRTRACCCTC、リバープライマー：GGTCACATAACGCCCTATA、ダブルクエンチャープローブ：ATGAGCACAATAGTAAAAAGCTAACACTGTCAA）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。 $10^2$  copies を陽性判定の閾値として設定し、閾値を少し越える程度のコピー数が検出された場合は RT-PCR 法等による確認を行うことで、誤判定を防ぐことが可能である。

(4) シジミ中ノロウイルスの不活化に関して、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、 $90^\circ\text{C} \cdot 1$ 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。シジミにおけるノロウイルスの局在解析に向けた検討は解析方法も含めた検討が必要であった。

(5) 水中の MS2 測定にはガラスウールに吸着させ硫酸による酸洗浄の後に 3%ビーフエキスによって 2 分の誘出を行う方法が適しているとわかった。吸着飽和には 5 分以内に至り、ほぼ瞬間的に MS2 がガラスウールに吸着していることが推察される。また、幅広いウイルス濃度を反映できることが示された。以上からガラスウールを用いたウイルス測定法は野菜表面のウイルス検出への適用が期待される。

ビーフエキス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。

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) 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。地衛研の現状を把握するため、自治体における食中毒検査体制、食中毒事例発生時の検査方法、検査手順、食品やふき取り検体に関する前処理や濃縮・精製法、行政処分における検査結果の利

用等について調査を行った。さらに、ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキ抽出液に変量のノロウイルス懸濁液を添加する実験系を構築し、デジタルPCR法による高感度検出系を試行し、従来のリアルタイムPCR法よりも検出感度が高いことを明らかにした。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. 研究発表

##### 論文発表

(英文)

1. Shiota T, Li TC, Nishimura Y, Yoshizaki S, Sugiyama R, Shimojima M, Saijo M, Shimizu H, Suzuki R, Wakita T, Muramatsu M, Ishii K. Integrin  $\alpha 3$  is involved in non-enveloped hepatitis E virus infection. *Virology*. 536, 119-124, 2019.
2. Yamane D, Feng H, Rivera-Serrano EE, Selitsky SR, Hirai-Yuki A, Das A, McKnight KL, Misumi I, Hensley L, Lovell W, Gonzalez-Lopez O, Suzuki R, Matsuda M, Nakanishi H, Ohto-Nakanishi T, Hishiki T, Wauthier E, Oikawa T, Morita K, Reid LM, Sethupathy P, Kohara M, Whitmire JK, Lemon SM. Basal expression of interferon regulatory factor 1 drives intrinsic hepatocyte resistance to multiple RNA viruses. *Nature Microbiology*. s41564-019-0425-6, 2019.
3. Athiyah AF, Utsumi T, Wahyuni RM, Dinana Z, Yamani LN, Soetjipto, Sudarmo SM, Ranuh RG, Darma A, Juniastuti, Raharjo D, Matsui C, Deng L, Abe T, Doan YH, Fujii Y, Shimizu H, Katayama K, Lusida MI, Shoji I.: Molecular Epidemiology and Clinical Features of Rotavirus Infection Among Pediatric Patients in East Java, Indonesia During 2015-2018: Dynamic Changes in Rotavirus Genotypes From Equine-Like G3 to Typical Human G1/G3. *Front Microbiol*. 2019, 10:940.
4. Fujii Y, Doan YH, Wahyuni RM, Lusida MI, Utsumi T, Shoji I, Katayama K.: Improvement of Rotavirus Genotyping Method by Using the Semi-Nested Multiplex-PCR With New Primer Set. *Front Microbiol*. 2019, 10:647.
5. Estes KM., Ettayebi K., Tenge VR., Murakami K., Karandikar U., Lin SC., Ayyar BV., Cortes-Penfield WC-P., Haga K., Neill FH., Opekun AR., Broughman JR., Zeng XL., Blutt SE., Crawford SE., Ramani S., Graham DY., Atmar RL. Human Norovirus Cultivation in Nontransformed Stem Cell-Derived Human Intestinal Enteroid Cultures: Success and Challenges. *Viruses*. 2019, 11.
6. 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*. 73:89-95, 2020.
7. Tsugawa T, Fujii Y, Akane Y, Honjo S, 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.
8. Fujii Y, Oda M, Somura Y, Shinkai T: Molecular characteristics of novel mono-reassortant G9P[8] rotavirus A strains possessing the NSP4 gene of the E2 genotype detected in Tokyo, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2020, 73(1):26-35.
  9. Murakami K, Tenge VR, Karandikar U, Lin SC, Ramani S, Ettayebi K, Crawford SE, Zeng XL, Neill FH, Ayyar BV, Katayama K, Graham DY, Bieberich E, Atmar RL and Estes MK. Bile acids and ceramide overcome the entry restriction for GII.3 human norovirus replication in human intestinal enteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Jan 2. pii: 201910138
  10. 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).
  11. Tsugawa T, Fujii Y, Akane Y, Honjo S, Kondo K, Nihira H, Kimura H, Kawasaki Y, 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).
  12. 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.
  13. 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.
  14. Tenge VR, Murakami K, Salmen W, Lin SC, Crawford SE, Neill FH, Prasad BVV, Atmar RL, Estes MK. Bile Goes Viral. *Viruses*. 2021 May 27;13(6):998.
  15. 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. 小児科診療 特集 小児の食中毒 2019 Vol. 82 A型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス 鈴木亮介
  2. 病原微生物検出情報 (IASR)、2019、Vol. 40、No. 9、2018年のA型肝炎流行状況について 杉山隆一、清原知子、鈴木亮介、石井孝司、村松正道、砂川富正
  3. 病原微生物検出情報 (IASR)、2019、Vol. 40、No. 9、A型肝炎ワクチン 清原知子、鈴木亮介、村松正道
  4. 山下信子、鈴木亮介: ウイルス性食中毒. 小児科. 2020. Vol. 61. p363-368.
  5. 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.
6. 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)
  7. 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
  8. 藤井克樹: ロタウイルスワクチン導入後の流行株の変化 病原微生物検出情報 (IASR) 2019, 40(12) 204-5.
  9. 藤井克樹: マルチプレックス PCR によるロタウイルスの VP7 遺伝子型判定法 病原微生物検出情報 (IASR) 2019, 40(12) 205-6.
  10. 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. 藤井克樹、小田真悠子、宗村佳子、新開敬行: 2017-2018 年の東京都におけるロタウイルス流行株の全ゲノム解析 第 60 回日本臨床ウイルス学会 (愛知) 2019 年 5 月 25-26 日
  2. 杉山 隆一、砂川 富正、清原 知子、鈴木亮介、石井孝司、村松 正道. 2018 年に日本で発生した A 型肝炎アウトブレイクの疫学的及び遺伝学的分析. 第 67 回日本ウイルス学会、船堀 2019 年 10 月 29-31 日.
  3. Yamani LN, Utsumi T, Doan YH, Fujii Y, Dinana Z, Wahyuni RM, Soegijanto S, Athiyyah AF, Soetjipto S, Juniastuti J, Liang Y, Matsui C, Deng L, Abe T, Shimizu H, Ishii K, Katayama K, Lusida MI, Shoji I. Whole genome analysis of G12P [8] rotavirus strains from hospitalized children in Surabaya, Indonesia (インドネシアスラバヤの小児入院症例から採取された G12P[8]株の全ゲノム解析) 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 (東京) 2019 年 10 月 29-31 日
  4. 藤井克樹: 最近のヒト由来ロタウイルスに見られる遺伝的特徴の変化 第 31 回ウイルス性下痢症研究会学術集会 (神奈川) 2019 年 10 月 28 日
  5. 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).
  6. 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).
  7. 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.

8. 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
9. 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
10. 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. 日本ウイルス学会学術集会 2021/11/16-18, 国内, 口頭.
11. 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、日本ウイルス学会学術集会 2021/11/16-18, 国内, ポスター.
12. 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、脇田隆宇、村松正道. 日本ウイルス学会学術集会 2021/11/16-18, 国内, ポスター.
13. 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
14. 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
15. 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
16. 林豪士、村上耕介、平野順紀、松田麻未、鈴木亮介、村松正道. 腸管エンテロイド培養系を用いたヒトノロウイルス感染を規定する宿主因子の探索. 第7回 デザイン生命工学研究会, 2022年3月10日
- G. 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

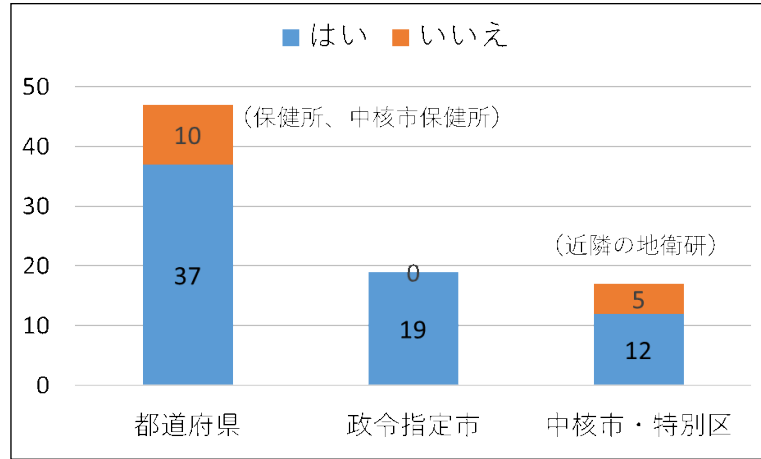


添付図表

厚生労働科学研究「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」  
「食材・食中毒関連情報の収集、及び新規検査法の検証」分担班調査 2019.12.12-26

問1. 貴所が属する自治体での食中毒検査体制についてお聞きます。

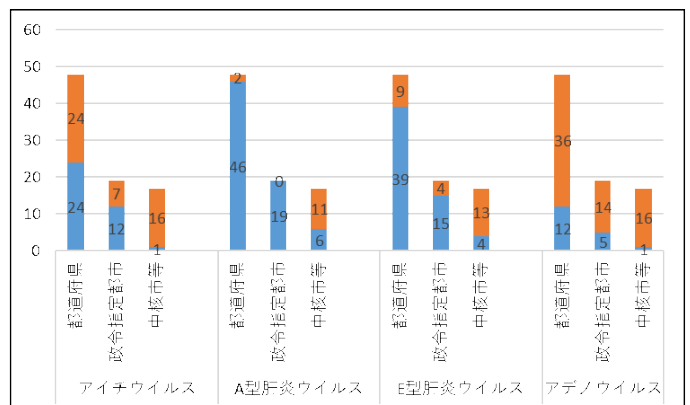
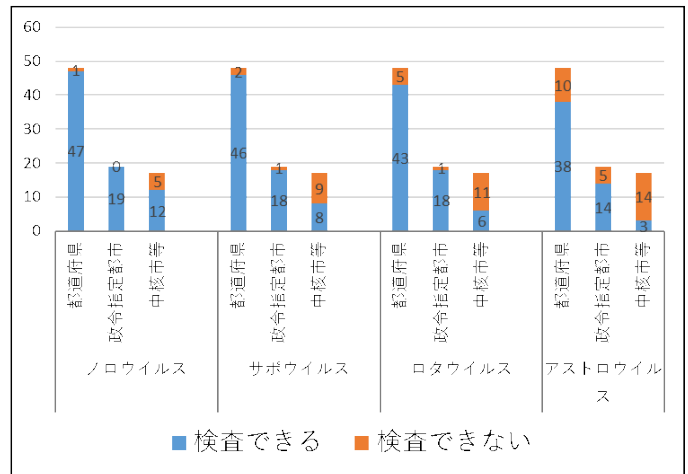
食中毒検査のうちウイルス検査については、すべて地方衛生研究所で実施していますか（図1）



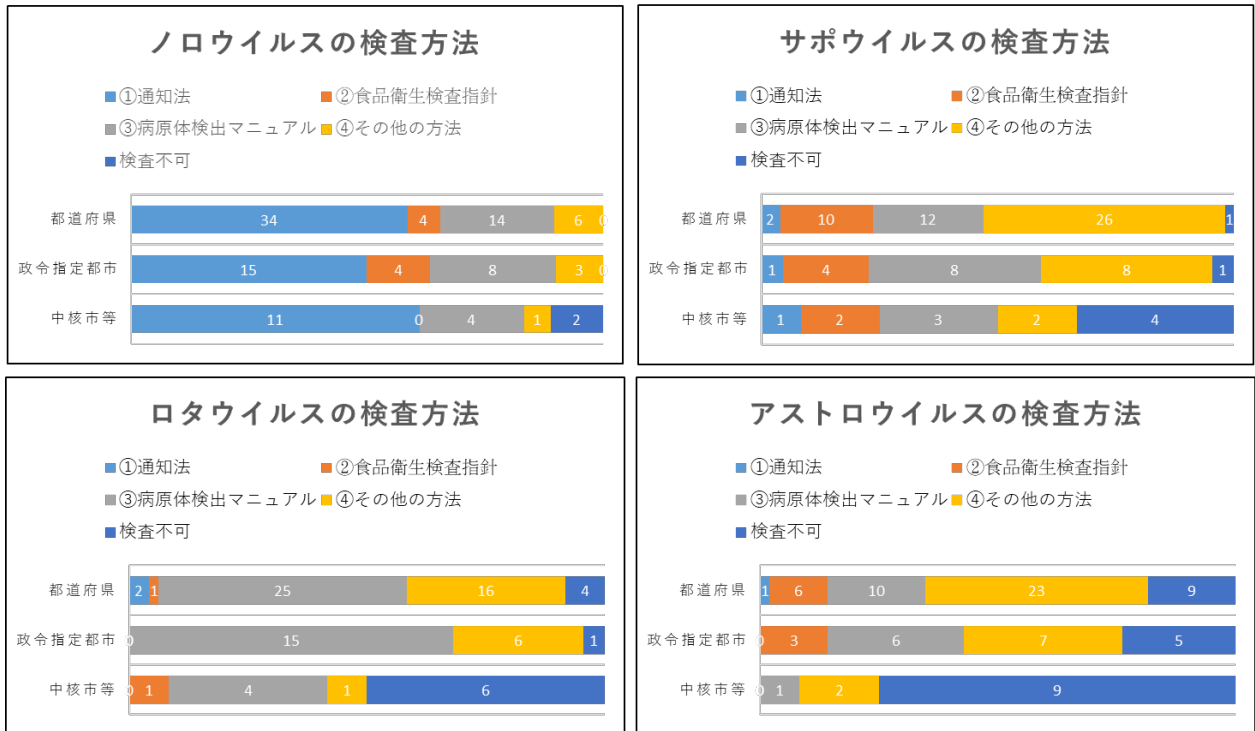
問2. 食中毒（疑）集団発生事例が起こった場合の検査についてお聞きます。

(1) 検査できるか、検査できないか（図2）

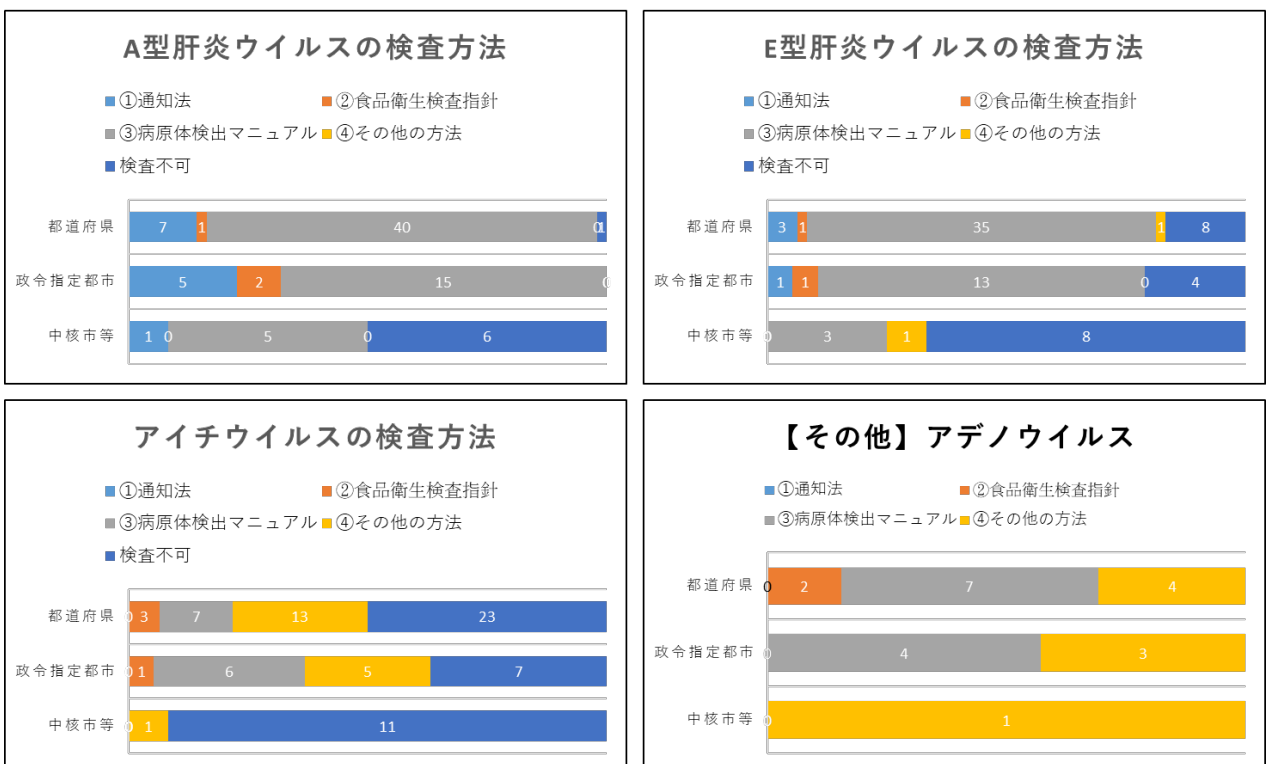
(所属自治体及び地衛研の方針として検査する、しない場合も含む)



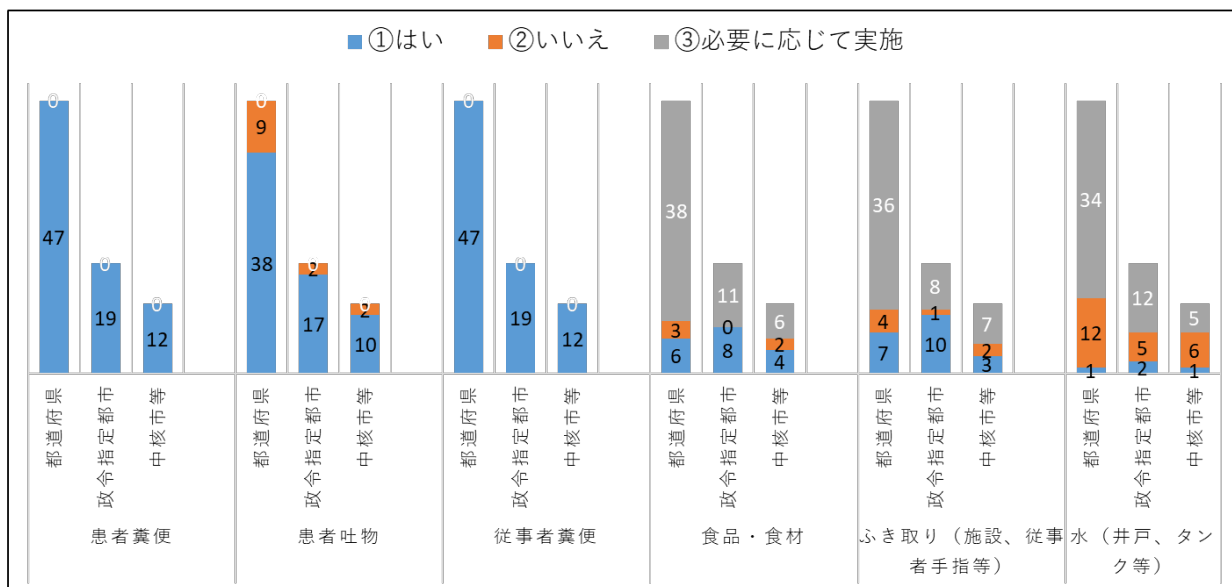
(1)-1 どの検査方法に基づいて検査しているか (図3)



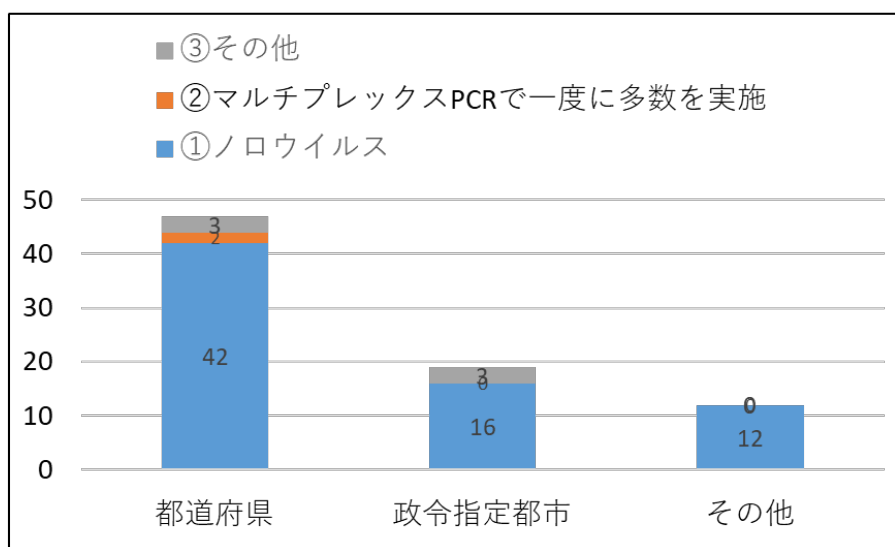
(1)-2 どの検査方法に基づいて検査しているか (図4)



(2) 想定される原因施設が当該自治体内にある場合、通常以下の検体について検査を実施しますか（図5）

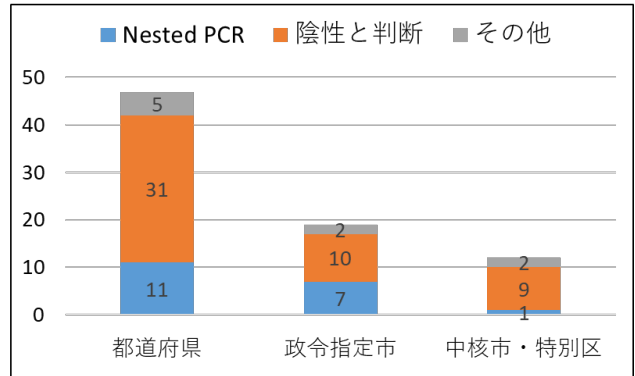


(3) 患者検体（便・吐物）が搬入された場合、どのウイルスの検査から始めますか（図6）



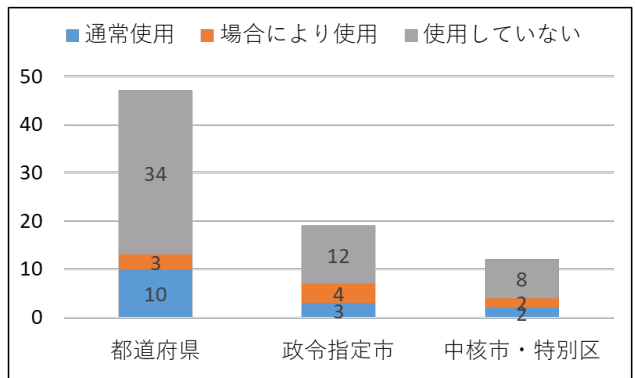
問3. ウイルス遺伝子検査についてお聞きします。

(1) リアルタイムPCRで実測値10コピー未満の場合、どのように対応していますか (図7)



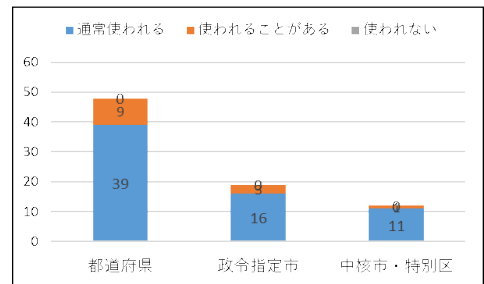
(2) ウイルスRNA抽出にプロセスコントロールを使用していますか (図8)

コントロールとして使用しているウイルス：エコーウイルス9型、マウスノロウイルス、過去の陽性検体

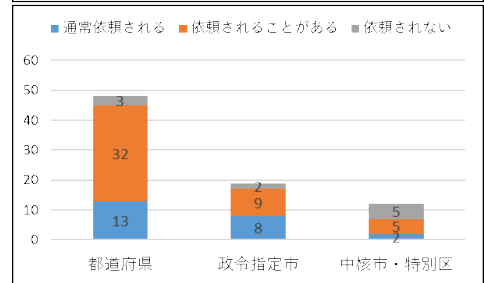


問4. 食中毒の判定・処分等に関して、ウイルス検査結果はどのように用いられているか。

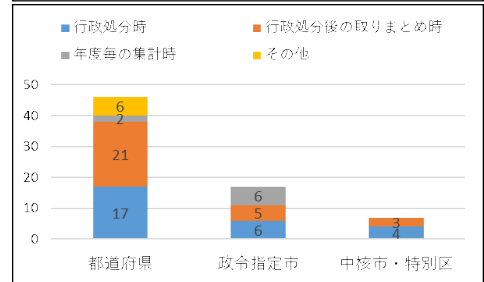
(1) 食中毒(疑)事例等の判定(行政処分)の参考としてウイルス検査の結果が使われるか (図9)



(2) 行政からノロウイルスの遺伝子型(GII.4など、系統樹解析結果等)について提供を依頼されるか (図10)

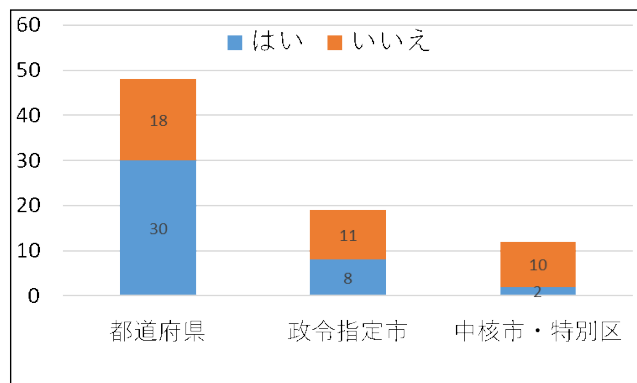


(3) (2)で①または②と回答した施設対象：遺伝子型を求められるタイミングはいつか (図11)



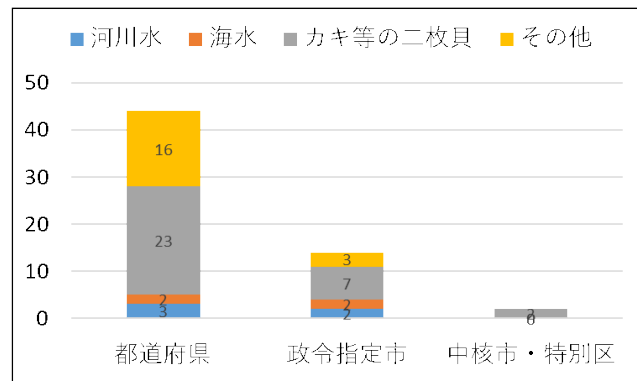
**問5. 環境中の下痢症ウイルスサーベイランスについてお聞きします。**

(1) 県の事業や研究班などで、環境水（河川水、海水など）やカキなどの二枚貝等のウイルスサーベイランスを実施していますか、または、実施したことがありますか（図12）



(2) (1)で①を選択した場合、検体は何ですか（複数選択可）。その他を選んだ方は、検体名をご記入ください（図13）

その他：下水（多数）、ミネラルウォーター、生しらす

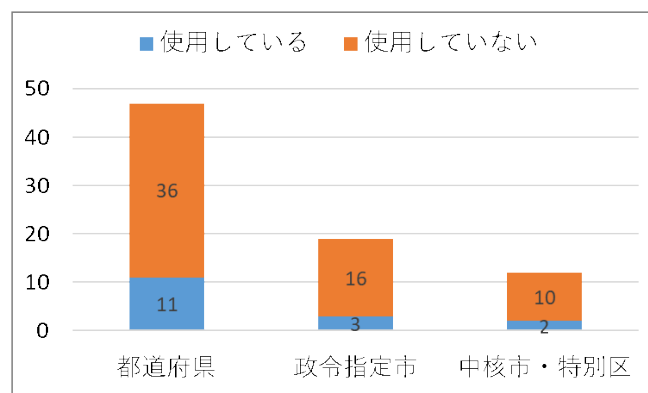


(3) (1)で①を選択した場合、何の病原体（ウイルス等）の検査を実施していますか

病原体：ノロウイルス（多数）、ポリオウイルス、エンテロウイルス、サポウイルス、A型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、アデノウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、レオウイルス、アイチウイルス

**問6. 食中毒調査支援システム（NESFD）についてお聞きします。**

(1) NESFDを食中毒対策に使用していますか（図14）



(2) 使用している場合、どのように使用しているか教えてください

他府県での食中毒発生状況の把握、広域食中毒時の情報収集、検出遺伝子型情報を得る、EHEC MLVAデータの参照、など

図15. 食中毒原因ウイルスに関して、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、どのような前処置を実施しているか（複数回答可）

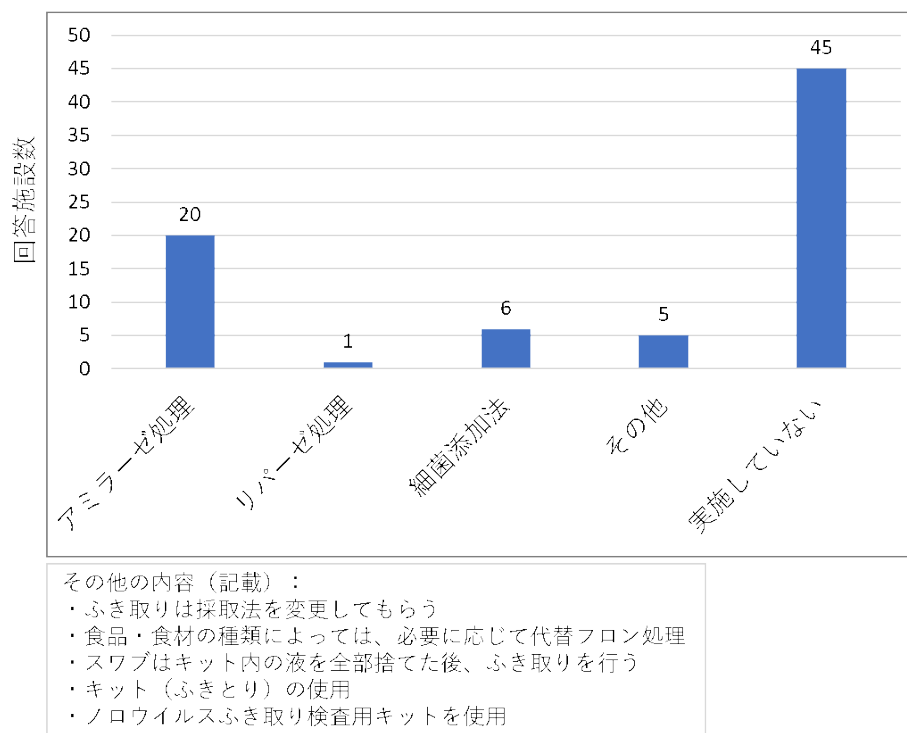
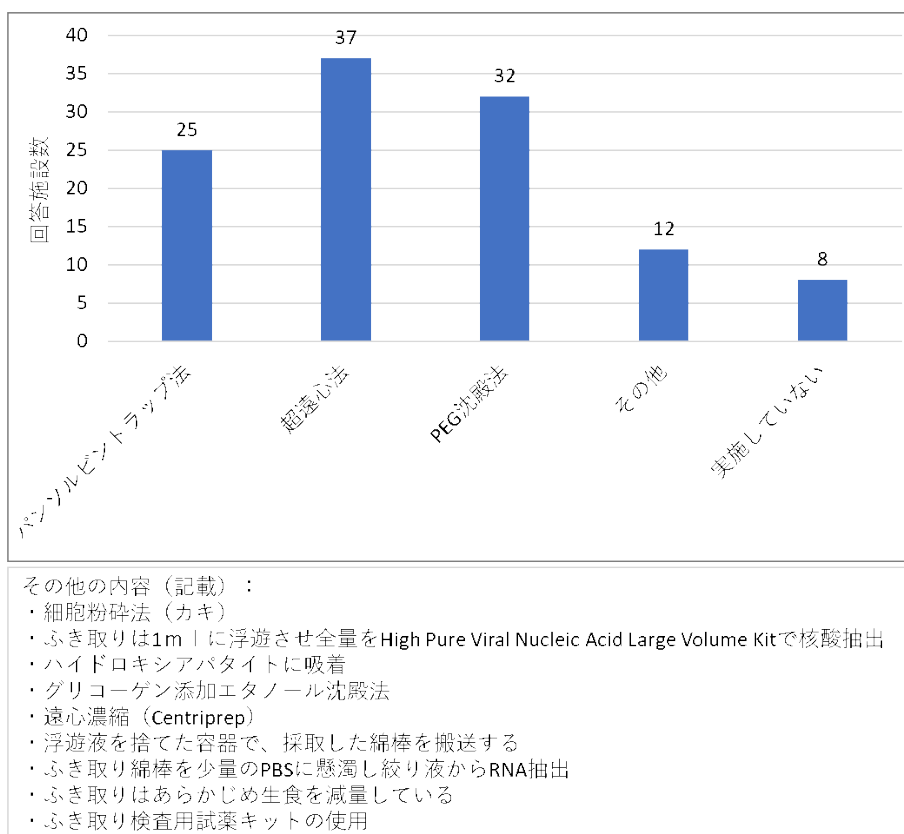


図16. 食中毒原因ウイルスに関して、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、どのような濃縮・精製法を実施しているか（複数回答可）



## 食中毒における下痢症ウイルス検査に関する要望等(マニュアル、研修、情報還元、検体保管等)について(記載意見)(・は1地衛研分を示す)

### 都道府県

- 検食は過熱直後に保存されたものが多く、有効な検体にはなりにくいので、盛り付け後の料理を保存するしくみがあればよい。
- 感染症または食中毒の初動時対応の判断について他の地衛研ではどうしているのか知りたい。食中毒発生時の食品を検査する際のコツについて知りたい。
- 通知法の早期の改訂が望まれる。
- 食品からのウイルス検出もいくつか方法が示されているが、検査の安定性などに疑問があることから改良が望まれる。
- ノロウイルス以外の検査マニュアルの整備
- 研修(食中毒等集団発生時のノロウイルスの検査は、通知法はあるが、自治体によっては工夫をした独自の方法を実施しているところが多いため、情報交換をしたい)。外部精度管理。
- 食中毒関連ウイルスの高感度・高精度かつ迅速なマルチプレックスリアルタイム PCR 法のマニュアルを開発してもらいたい。実習を含めた研修を国や研究班にて企画願いたい。(ブロック単位)
- 現在、食品やふき取り検体からのノロウイルス検出をおこなっていないので、前処理方法や濃縮方法を含んだ検査法の研修を開催してほしい。食品検査と糞便検査それぞれの陽性判定基準や検査設備要件を統一的に著した食中毒検査マニュアルを作成してほしい。
- 検査法に関する研修の開催を要望します。
- 研修をやっただけとありがたい。系統樹解析やノロウイルス以外の食中毒事例への対応など。特に、担当者が頻繁に変更になるためこれまでの流れを理解しにくいところがあるので、流行株の推移や変異部分等を教えていただきたい。
- 原因食品別の検出下限が整理してあれば、有用だと思います。
- NESFD を活用しておりませんが、活用方法などを教えていただければと思います。広域食中毒についての早期探知にいかされるのでしょうか？ パンソルビントラップ法について通知法として残っているので、研修の実施や遺伝子型反応性が確認されたグロブリンの配布を必要時に送付してほしい。
- 一つの窓口で、遺伝子検査が必要となる主要な下痢症ウイルスすべてのポジティブコントロールを配布して貰えるようなシステムになるとありがたいと思います。また、ホームページ等で利用可能なポジティブコントロールの種類が見れると助かります。
- 病原体検出マニュアル「ノロウイルス」と厚生労働省通知「ノロウイルスの検出法」に記載される酵素・試薬等は統一されていればありがたいです。また、サポウイルス等とのマルチプレックスリアルタイム PCR 化をご検討いただきたいです。
- サポウイルスの病原体検出マニュアルを作成していただきますとうれしいです。
- 感染症法の検査マニュアルは改訂されているが、食品衛生法の検査法(通知法や食品衛生検査指針)は長い間更新されていない部分もあるため、最新の知見に基づき試薬等を含めて全体的に

見直して頂きたい。

- 病原体検出マニュアルの整備

#### 政令市・中核市・特別区

- ノロウイルスの検査法について、ヒトを対象とした検査法(感染症発生動向事業)は病原体検出マニュアルとして整備されたが、食品等を対象とした検査法の最終改正は H25 年となっているため更新してほしい。また、ノロウイルスのみならず食中毒の原因となるウイルス全般のマニュアルを整備してほしい。
- サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス等の検出マニュアルの整備をしてほしい。業務効率化のため下痢性ウイルスのマルチプレックスPCR方法について知見を共有してほしい。
- アストロウイルスやアイチウイルス等についても陽性コントロールの配布を希望します。
- 食中毒における下痢症ウイルス検査に関して、短時間での結果を求められるため、対応に困難を極めている。特に土日祝日。現在年末年始の休日に入っているが、このところ連日複数検査を抱え、なおかつ感染症の検査も入っており、対応が厳しい状況である。
- 食品検査についてマニュアルの作成をお願いします。ノロウイルス以外の下痢症ウイルスのマニュアル改訂をお願いします。
- ノロウイルス以外のウイルスについては、マニュアル等が充実していない。また、定量リアルタイム PCR系があっても、低コピー数の検体(従事者便や拭き取り等)の判定をどうすべきか苦慮している。A型肝炎ウイルス等の分子疫学的解析結果について、NESFD では情報共有・還元が行われていない。
- 現在、レファレンスセンター未設置のウイルスについても、陽性コントロールの配布や情報提供等、今後の体制整備を希望します。
- ノロウイルス以外のマニュアルを更新してほしい。スタンダードやコントロールの分与の依頼先を示してほしい。
- 陽性コントロールの分与をお願いしたい。
- 本市では、検査室や安全キャビネット数の問題から、「食品・食材」と「便」の検査室や安全キャビネットを共有せざるを得ない。通常、食中毒が発生した場合は原因究明ために便・吐物から搬入されるため、コンタミネーションを懸念し食品・食材のウイルス検査は行っていない。このため、他の地研とのコンタミネーションに関する情報共有をお願いしたい。
- 本市でも、今後、ノロウイルス以外の食中毒原因ウイルスについて、検査を実施できるかどうか検討したいと考えています。同ウイルスの検査マニュアルの作成や研修等の実施があれば、よいと思います。



表 1. カキ中腸腺抽出液中ノロウイルスのリアルタイム PCR またはデジタル PCR による検出

検体番号	中腸腺抽出液へのノロウイルス添加コピー数	qPCR 測定による RNA 抽出液中コピー数	ddPCR 測定による RNA 抽出液中コピー数	One-Step ddPCR 測定による RNA 抽出液中コピー数
QIAcube (中腸腺抽出液 130 $\mu$ L + ノロウイルス懸濁液 10 $\mu$ L)				
Q-1	None	N.D.	N.D.	N.D.
Q-2	1.16E+02	N.D.	N.D.	N.D.
Q-3	1.16E+03	N.D.	60	204
Q-4	1.16E+04	36	270	654
Q-5	1.16E+05	507	2,250	8,220
Q-6	1.16E+06	3,313	11,700	75,900
magLEAD 200 (中腸腺抽出液 190 $\mu$ L + ノロウイルス懸濁液 10 $\mu$ L)				
M1-1	None	N.D.	N.D.	N.D.
M1-2	1.16E+02	N.D.	N.D.	50
M1-3	1.16E+03	N.D.	N.D.	75
M1-4	1.16E+04	7	200	365
M1-5	1.16E+05	79	700	2,600
M1-6	1.16E+06	1,444	12,750	39,600
magLEAD 400 (中腸腺抽出液 380 $\mu$ L + ノロウイルス懸濁液 20 $\mu$ L)				
M2-1	None	N.D.	N.D.	N.D.
M2-2	3.32E+02	N.D.	N.D.	50
M2-3	3.32E+03	N.D.	N.D.	40
M2-4	3.32E+04	N.D.	175	700
M2-5	3.32E+05	2.2	1,275	5,050
M2-6	3.32E+06	2.6	10,250	71,000

qPCR : real-time PCR, ddPCR : droplet digital PCR