

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
「食中毒原因ウイルス等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした  
失活法の開発のための研究」

食品からのウイルス検出法への NGS の導入に関する検討  
研究分担者 元岡大祐 大阪大学微生物病研究所助教

研究要旨： 食中毒発生時の迅速な原因究明は、特に広域事例での被害拡大防止に極めて重要である。一方、ウイルスは食品中で極微量のみが維持されるため、検査法の精度・感度向上は必須の課題である。国内では二枚貝（平成 13 年）及びセミドライトマト（平成 21 年）のウイルス検査法が通知されているが、多様な食品がヒトノロウイルス（HuNoV: Human Norovirus）食中毒の原因と推定される現況を踏まえ、一般食品に対応する汎用性の高い検査法提示は食品衛生上喫緊の課題と言える。同時に、食品輸出入に係る検査法は国際整合性も踏まえる必要がある。本研究では、過去の大規模広域食中毒事件（食パン：平成 26 年、刻みのり：平成 29 年）で原因食品特定に活用された検出法の改良により、新規変異型ウイルスへの対応、実行性の確認、検査感度、陽性コントロールや検量線等の精度検証を行い、国内検査法としての提案を検討する。また、食品中に存在する RNA をメタゲノム解析することで、食品中の夾雑物及びウイルスをプロファイル化し、食品処理法の改善に資する知見を集積、食品由来病原ウイルスへの対応も試みる。

本分担研究では、今年度、食品のウイルス検査法の整備・公開の研究の一環として、メタゲノム解析手法を用いた食品からの網羅的ウイルス検出を行った。サンプルは、既知のウイルスを食品に添加したモックサンプルを使い評価した。その結果、添加したウイルスは、リアルタイム PCR で検出できる条件下ではいずれのウイルスも検出・同定することが確認できた。またリアルタイム PCR で検出限界以下となったサンプルにおいても、ほとんどのケースでウイルスの検出に成功した。このことから、病原体が同定できていないウイルス汚染の食品も含め網羅的な病原体探索としてメタゲノム解析が有用である可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

食中毒発生時の迅速な原因究明は、特に広域事例での被害拡大防止に極めて重要である。一方、ウイルスは食品中で極微量のみが維持されるため、検査法の精度・感度向上は必須の課題である。国内では二枚貝（平成 13 年）のノロウイルス及びセミドライトマト（平成 21 年）の A 型肝炎ウイルスに関してウイルス検査法が通知されているが、多

様な食品がヒトノロウイルス（HuNoV: Human Norovirus）食中毒の原因と推定される現況を踏まえ、一般食品に対応する汎用性の高い検査法提示は食品衛生上喫緊の課題と言える。同時に、食品輸出入に係る検査法は国際整合性も踏まえる必要がある。本研究では、過去の大規模広域食中毒事件（食パン：平成 26 年、刻みのり：平成 29 年）で原因食品特定に活用された検出法の改良

により、新規変異型ウイルスへの対応、実行性の確認、検査感度、陽性コントロールや検量線等の精度検証を行い、国内検査法としての提案を検討する。また、食品中に存在する RNA をメタゲノム解析することで、食品中の夾雑物及びウイルスをプロファイル化し、食品処理法の改善に資する知見を集積することにより、食品由来病原ウイルスへの対応も試みる。

本分担研究では、食品からのウイルス検出法の整備・公開の研究の一環として、メタゲノム解析手法を用いた食品からの網羅的ウイルス検出を行うことを目的とする。病原体検出法として一般的に用いられる定量 PCR 法は、特異度も感度も高い一方で、対象ごとに特異的なプライマー/プローブセットの準備が必要であること、想定外のウイルスは検出できないこと、多種類の病原体を対象とした探索的な解析には不向きであるなどの欠点もある。そこで NGS を用いた網羅的な解析により、食品中のウイルス探索手法を用いることで、従来法では特定に至らなかった食中毒事件の迅速な原因特定に繋がられるような方法を構築することが目的である。

## B. 研究方法

ウイルスを添加した食品をモックサンプルとして準備し、抽出した RNA を対象とし、ショートリードシーケンサーを用いたメタゲノムショットガン解析を行った。食品となるサンプルとしてミックスベリー、塩むすびを用意した。ウイルスとしては、猫カリシウイルス (feline calicivirus; FCV)、Meningovirus、A 型肝炎ウイルス (HAV)、ノロウイルス GI、GII を使用した。ポジティブ

コントロールとして水にウイルスを添加したサンプルを、作業コントロールとして処理に使用する食品洗浄液にウイルスを添加したサンプルを準備した (表 1)。

表 1. サンプルと添加したウイルス

	食品	添加ウイルス
#1	食品洗浄液	FCV, Mengo, HAV
#2	ミックスベリー	FCV, Mengo, HAV
#3	水	Mengo, HAV, GI, GII
#4	食品洗浄液	Mengo, HAV, GI, GII
#5	ミックスベリー	Mengo, HAV, GI, GII
#6	塩むすび	Mengo, HAV, GI, GII

サンプル#3 以外について、パンソルビントラップ法を用いた食品処理法により RNA を抽出し、添加したウイルスのリアルタイム PCR およびメタゲノムショットガン解析を行った。cDNA 合成は、微量 RNA からの cDNA 合成に適している RamDA-Seq 法を用いて行い、イルミナ社 NexteraXT ライブラリ調製キットを用いて NGS ライブラリを作成した。ライブラリは MGI 社 DNBSEQ-G400RS を用いて 100bp ペアエンドシーケンスを行った。データ解析は、アダプタートリミング、重複リードの除去を行った後、Kraken2 を用いた生物種アノテーションを行った。

## C. 研究結果

### 1. ウイルス検出効率の評価

各サンプルから抽出された RNA を用いて、

qPCR によって定量されたウイルス量(Ct 値、表 2)とメタゲノム解析で検出されたウイルスリード数(表 3)を比較した。

### 1) FCV、Mengo、HAV 添加サンプル

FCV は Ct 値が低いにもかかわらず、他のウイルスよりも得られたリード数が少なかった。さらにミックスベリーにこれらのウイルスを添加したサンプル#2 では、qPCR、メタゲノム共に検出できなかった。一方で、Mengovirus や HAV については、ミックスベリーにウイルスを添加した場合には qPCR で検出できなかったが、メタゲノム解析では食品がない場合と同程度に検出できた。

表 2. 各ウイルスの Ct 値

	FCV	Mengo	HAV	GI	GII
#1	26	33	28		
#2	N. D.	N. D.	N. D.		
#3		28	22	19	22
#4		N. D.	28	23	28
#5		38	27	25	33
#6		37	30	24	30

表 3. 各ウイルスのリード数(100 万リードあたり)

	FCV	Mengo	HAV	GI	GII
#1	21	306	119		
#2	0	305	70		
#3		17,721	8,716	27,632	20,187
#4		78	26	208	69
#5		64	18	100	46
#6		69	29	330	96

### 2) Mengo、HAV、ノロウイルス添加サンプル

水にウイルスを入れただけの溶液から RNA を抽出したサンプル#3 に比べて、ウイルスを添加した食品洗浄液からパンソルビ

ントラップ法により抽出した場合に Ct 値は増大(ウイルス量は低下)しており、食品からウイルス RNA を抽出する処理によって、ウイルス検出感度が下がることが確認できた。メタゲノム解析においては qPCR 以上に顕著に低下しており、2 桁以上も検出ウイルスリード数が低下した。一方で、FCV、Mengo、HAV セットのときと同じく食品にウイルスを添加したものは、qPCR での検出感度は低下するが、メタゲノム解析によるウイルス検出リード数は同等であった。

### 2. メタゲノム解析結果

メタゲノムショットガン解析により得られたリードを様々な生物種にアノテーションした(図 1)。

その結果、パンソルビントラップ法を行っていない水にウイルスを添加したサンプル#3 を除き、多くのデータが細菌由来であることがわかった。さらにその細菌種について解析した結果、最も多くアサインされた細菌種は黄色ブドウ球菌であった。

またミックスベリー由来のサンプルからは、添加したウイルス以外に Strawberry mild yellow edge virus が検出された。

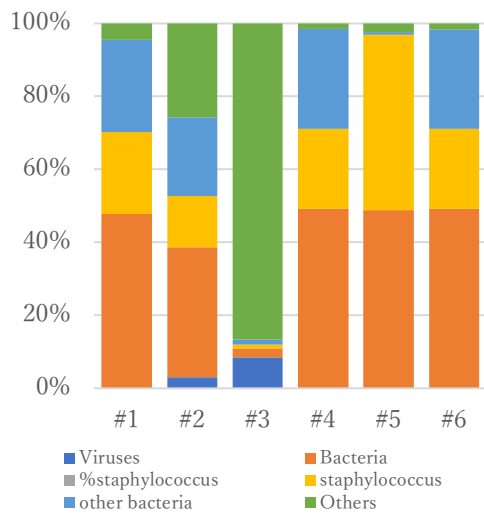


図 1. メタゲノム解析で検出された生物種の相対割合

#### D. 考察

今回はメタゲノム解析によるウイルス検出能を評価するために、食品に既知のウイルスを添加したモックサンプルを調製し検討を行った。qPCRによるウイルス検出とは異なり、メタゲノム解析では食品の有無に関わらず同程度のウイルス検出能があることがわかった。メタゲノム解析では、予め既知の病原体を設定しないで解析するにもかかわらず、目的ウイルスを検出し、また食品の有無、種類に依存せずに同様に検出できることから、食品からウイルスを検出する上で有用な方法であると考えられる。さらにミックスベリーからは、ベリーに関連することが知られているウイルスが検出されており、想定していないウイルスでも検出が可能であるということが確認できた。一方で、パンソルビントラップ法の処理によりウイルス由来のリード数は大きく低下した。この原因は、パンソルビントラップ法に用いる黄色ブドウ球菌菌体に由来するリー

ドが大半を占めたことが明らかとなった。メタゲノム解析は、溶液中に存在する全ての核酸を解読するため、ウイルス以外の生物由来の核酸が多いとその影響を受けやすく、検出感度が低下してしまう。パンソルビントラップ法を用いないと食品からウイルスが抽出できないため、今後、添加した黄色ブドウ球菌由来のゲノムの除去工程を組み込むことで感度の工場が見込まれると考える。

#### E. 結論

本研究メタゲノム解析手法が、食品に付着した病原体の検出に有用であることが確認できた。今後は、より感度を向上させ、簡便化させるために、方法の改良に取り組む必要がある。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録

なし