

腸管オルガノイドを用いた HuNoV 増殖系による ウイルス不活化条件の検討

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

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。しかし再現性の高い培養系が長年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、その確実性には疑問が残されている。本研究ではヒト腸管オルガノイドに加え、同研究班研究分担者である佐藤教授の有する iPS 由来腸管上皮細胞を駆使することでノロウイルス不活化条件を直接的に評価する。研究に用いるノロウイルスは糞便検体を用いることから、本研究実施に関わる各機関と検体採取及び輸送に関する研究体制の整備を行った。また前研究班にて進めていたシジミをモデルとした食品中ノロウイルス不活化法に関する研究を発展させるため、カキ稚貝を用いた予備実験を実施し、カキに取り込まれたノロウイルス VLP をウェスタンブロット法で検出することに成功した。

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。しかし再現性の高い培養系が長年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、その確実性には疑問が残されている。本研究分担者らのグループは、前研究班（研究代表者 鈴木亮介）においてシジミをモデルとした食品中ノロウイルスの不活化方法に関する研究を実施した。本研究班では、iPS 由来腸管上皮細胞を有する同研究班研究分担者の佐藤と連携することで、ノロウイルス不活化条件を直接的に評価す

る。さらに、ノロウイルス以外の食中毒原因ウイルス、代替ウイルスでの評価データも蓄積し、食中毒原因ウイルスの不活化に対し実効性あるノロウイルス衛生対策手法の構築を目指す。

また前研究を発展すべき、ノロウイルス混入食品モデルとしてカキを用いる研究に向けた検討も実施する。

B. 研究方法

本研究では加熱、食品添加物として認可されるアルコール、次亜塩素酸 Na、亜塩素酸水や電解水等を対象とした直接的な評価を行う。その後、カキをはじめとする二枚貝を含めた様々な食品中 HuNoV の不活化条

件定量法を検証・確立する。

研究に用いるノロウイルスは糞便検体を供することとし、同班分担研究者吉村の協力研究者 左近 (大阪健康安全基盤研究所)、同 高橋 (岩手県環境保健研究センター)、同 坂上 (宮城県保健環境センター) より提供いただく。感染研にて腸管オルガノイドへの感染性を評価した後、同班分担研究者佐藤 (和歌山県立医科大学) に送付し、iPS由来腸管上皮細胞を用いて検証する。その上で不活化法を解析する。また糞便検体は同班分担研究者 元岡 (大阪大学微生物病研究所) にも送付してウイルス遺伝子の解析を実施する。本年度は研究実施に向けた体制整備を行った。

また、前研究班にて進めていたシジミをモデルとした食品中ノロウイルス不活化法に関する研究を発展させるため、カキ稚貝を用いた予備実験を実施した。具体的には、直径 1 cm 程度に生育したカキ稚貝にノロウイルス VLP を加え、その上で、餌として食物プランクトンあるいは海水を加えた。室温で 2 時間静置した後に殻を取り外してから人工海水で 2 回程度洗い、SDS-PAGE サンプルバッファーを加えて溶解した。その後、ウェスタンブロット法によりノロウイルス VLP を検出した。

C. 研究成果

研究計画策定に先立ち、本年度は新型コロナウイルス感染拡大により地方衛生研究所の業務が圧迫されていたことを受け、検体の取り扱い等の際に、各機関の負担を減らすことに腐心しながら調整を行った。その上で、人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針に沿った申請を行い、

感染研倫理委員会から承認された。また、必要に応じて実施した機関ごとの申請も全てが承認された。

また食品中ノロウイルス不活化の解析に向けた予備検討として、カキ稚貝へのノロウイルス VLP の取込と検出法を検討した。その結果、カキに取り込まれた VLLP を検出することができた。また餌の存在下において取り込み量が大きく増加することが示された。

D. 考察

本研究が多機関共同研究の一括審査であったことから倫理申請完了までに時間を要したが、ほぼ想定通りの達成度であった。体制が整備されたことから次年度からは実際に研究を開始する。

カキ稚貝を用いた予備実験から、食品中ノロウイルス不活化に向けた研究が実施可能であることが示唆された。今後は VLP ではなく感染性ウイルスを用いた検証を実施予定である。

前研究班で実施した、シジミ中ノロウイルスの加熱による不活化方法の確立に関する研究成果が海外学術雑誌に掲載された。当初の研究計画にはないが、本研究と深く連動しており、研究遂行の基盤になる (Hayashi et al. *Viruses*, 2022)。

E. 結論

倫理申請を含めた研究体制が十分に整備されたことから、次年度から実際に不活化研究を実施開始となった。また、カキ稚貝に蓄積したノロウイルス VLP をウェスタンブロットで検出できたことから、食品中ノロウイルスの解析方法の選択肢が広がった。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文)

(1) 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* 14(5) 2022年5月10日.

2. 学会発表

(1) 村上耕介, 林豪士, 山岡曜子, 伊藤篤, 釜石隆, 杉山隆一, Mary K. Estes, 村松正道. ヒト腸管オルガノイドを用いたシジミ中ヒトノロウイルスの感染性評価. 第69回日本ウイルス学会学術集会(長崎) 2022年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

該当なし