

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」  
令和4年度分担研究報告書

ヒトノロウイルスのin vitro増殖系を用いたウイルス不活化条件の検討

研究分担者 佐藤 慎太郎 和歌山県立医科大学薬学部

## 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。加えて、ヒトノロウイルス（HuNoV）不活化法の妥当性評価も検査法と共に重要な課題である。これまで、HuNoVのin vitro培養法は確立されておらず、代替ウイルス（ネコカリシウイルス等）を用いた評価に留まっていたが、近年ではヒトiPS細胞由来の腸管上皮細胞を用いてHuNoV培養が可能な状況となっていることに着目し、本研究では同培養系を用いた食品マトリクスや食品取扱環境でのHuNoV不活化条件を直接的に評価することで、HuNoVの特性を踏まえた実効性あるHuNoV衛生対策の妥当性を評価しようとする特色を併せ持つ。

本分担研究では、佐藤らが確立したHuNoVのin vitro増殖系を用いて、患者由来の糞便をウイルスソースとしたHuNoV感染能を指標とする不活化評価を行う。不活化条件の検証にあたっては、食品添加物として認可される次亜塩素酸Naや電解水等を対象とした直接的な評価を行った上で、カキをはじめとする二枚貝を含めた様々な食品中でのヒトノロウイルスに対するこれらの成分の不活化条件定量法を検証し、具体的なHuNoVの不活化に有効となる条件及び手法を取り纏める。

今年度は、本事業で用いるHuNoVの遺伝子型について、感染研・村上を中心として打ち合わせをおこなうと共に、地衛研からのヒト糞便検体収集体制の構築を行った。また、当該遺伝子型が安定して増殖できるヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞のロットを再度確認した。

### A. 研究目的

本研究では食中毒原因ウイルス、特にヒトノロウイルス（HuNoV）の汎用性および国際整合性を備えた検査法を整備すると共に、実用的なウイルス不活化法を裏付ける科学的根拠を提示することを目的とする。

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向けて極めて重要である。一方、ウイルスは食品中では増殖せず極微量が維持されるのみであるため、検査法の精度・感度向上がその対策に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) からの HuNoV 検査法が通知されているが、多様な食品が HuNoV 食中毒の原因と推定される現況を踏まえると、これに対応するウイルス検査法の提示は食品衛生上の喫緊の課題と言える。更に食品の輸出入が増加する中での検査法提示は国際整合性を踏まえる必要がある。また、本研究では食品より精製される RNA を次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析に供することで、食品中の夾雑物及びウイルスのプロファイル化を行い、食品処理法の改善に資する知見を集積する。

加えて、HuNoV 不活化法の妥当性評価も検査法と共に重要な課題である。これまで、HuNoV の *in vitro* 培養法は確立されておらず、代替ウイルス (ネコカリシウイルス等) を用いた評価に留まっていたが、近年ではヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いて HuNoV 培養が可能な状況となっていることに着目し、本研究では同培養系を用いた食品マトリクスや食品取扱環境での HuNoV 不活化条件を直接的に評価することで、HuNoV の特性を踏まえた実効性ある HuNoV 衛生対策の妥当性を評価する。

## B. 研究方法

ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いた HuNoV の *in vitro* 増殖系は佐藤らによりすでに確立されているが、現在この増殖系では数百倍程度の増殖を認めるに留まっている。したがって、ウイルスソースとして患者由来の糞便検体を用いる必要がある。今年度は本事業で用いる HuNoV の遺伝子型について、感染研・村上を中心として打ち合わせをおこなうと共に、地衛研からのヒト糞便検体収集体制の構築を行

った。また、当該遺伝子型が安定して増殖できるヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞のロットを再度確認した。

## C. 研究結果

ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いた HuNoV の *in vitro* 増殖系を指標としたウイルス不活化評価の実施に向け、ウイルスソースとして用いるヒト糞便検体の本事業における使用のための倫理申請を行った。この申請に関しては感染研にて一括審査について承認を受け、佐藤が所属する和歌山県立医科大学においても承認確認された。また、本事業で用いる HuNoV の遺伝子型について村上らと打ち合わせを行い、例年最も流行している GII.4\_Sydney (GII.4[P31]、GII.4[P16]) をまず用いて、必要に応じて他の遺伝子型についても検討することとした。それを踏まえ、当該遺伝子型が安定して増殖できるヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞のロットを再度確認し、主に用いる細胞 (IEC#17) と、それとは異なる iPS 細胞から誘導した細胞 (IEC#29) を決定した。

## D. 考察

ウイルスソースとして用いる糞便検体は、地衛研から一度感染研に送られ、そこで増殖能と必要に応じて他の感染症の有無を確認する。地衛研および感染研における検体の保存温度に関しては、検体ごとに適切な保管温度があると思われるが、検体収集のしやすさを重要視し、その上で本事業に用いる検体を選択することとなった。検体が決まり次第、その一部が和歌山県立医科大学に送付される予定である。

## E. 結論

次年度からはウイルスソースとしての糞便検体が実験に使用出来る見込みであり、不活化試験法、不活化製剤の効果の検討を行える体制が構築できたことから、初年度の進捗としては十分であると考えます。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yuki Y, Zuo F, Kurokawa S, Uchida Y, **Sato S**, Sakon N, Hammarström L, Kiyono H, Marcotte H. Lactobacilli as a Vector for Delivery of Nanobodies against Norovirus Infection. **Pharmaceutics**. 2022 Dec 25;15(1):63. doi: 10.3390/pharmaceutics15010063.

2. Nurdin JA, Kotaki T, Kawagishi T, **Sato S**, Yamasaki M, Nouda R, Minami S, Kanai Y, Kobayashi T. N-Glycosylation of Rotavirus NSP4 Protein Affects Viral Replication and Pathogenesis. **J Virol**. 2023 Jan 31;97(1):e0186122. doi: 10.1128/jvi.01861-22.

3. Masuda A, Man Lee J, Miyata T, **Sato S**, Masuda A, Taniguchi M, Fujita R, Ushijima H, Morimoto K, Ebihara T, Hino M, Kakino K, Mon H, Kusakabe T. High yield production of norovirus GII.4 virus-like particles using silkworm pupae and evaluation of their protective immunogenicity. **Vaccine**. 2023 Jan 16;41(3):766-777. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.12.015.

4. Hoque SA, Kotaki T, Pham NTK, Onda Y, Okitsu S, **Sato S**, Yuki Y, Kobayashi T, Maneekarn N, Kiyono H, Hayakawa S, Ushijima H. Abundance of Viral Gastroenteritis before and after the Emergence of COVID-19: Molecular Evidence on Wastewater. **J Infect**. 2023 Feb;86(2):154-225. doi: 10.1016/j.jinf.2022.11.007.

5. Noguchi M, Shimizu M, Lu P, Takahashi Y, Yamauchi Y, **Sato S**, Kiyono H, Kishino S, Ogawa J, Nagata K, Sato R. Lactic acid bacteria-derived  $\gamma$ -linolenic acid metabolites are PPAR $\delta$  ligands that reduce lipid accumulation in human intestinal organoids. **J Biol Chem**. 2022 Nov;298(11):102534. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102534.

6. Takahashi Y, Noguchi M, Inoue Y, **Sato S**, Shimizu M, Kojima H, Okabe T, Kiyono H, Yamauchi Y, Sato R. Organoid-derived intestinal epithelial cells are a suitable model for preclinical toxicology and pharmacokinetic studies. **iScience**. 2022 Jun 7;25(7):104542. doi: 10.1016/j.isci.2022.104542.

7. Pham NTK, Nishimura S, Shimizu-Onda Y, Trinh QD, Komine-Aizawa S, Khamrin P, Okitsu S, **Sato S**, Kobayashi T, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Emerging norovirus GII.4 Sydney[P31] causing acute gastroenteritis outbreak in children in Japan, during COVID-19, 2021.

**J Infect Chemother.** 2022  
Sep;28(9):1347-1351. doi:  
10.1016/j.jiac.2022.05.015.

2. 学会発表

1. 佐藤 慎太郎、「ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いたヒトノロウイルス増殖系の確立」、和歌山医学会、2022年7月3日、和歌山
2. 佐藤 慎太郎、「ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いたヒトノロウイルス増殖系の確立とその応用」、第96回日本細菌学会、2023年3月16日、兵庫

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし