

別紙 3

令和 4 年度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」

総括研究報告書

研究代表者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
研究分担者	窪田 邦弘	国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部
	岡 智一郎	国立感染症研究所 ウイルス第二部
	村上 耕介	国立感染症研究所 ウイルス第二部
	元岡 大祐	大阪大学 微生物病研究所
	佐藤慎太郎	和歌山医科大学 薬学部
	木村 博一	群馬パース大学大学院 保健科学研究科
	吉村和久	東京都健康安全研究センター
研究協力者	高橋 知子	岩手県環境保健研究センター 保健科学部
	水越 文徳	栃木県保健環境センター 微生物部
	本谷 匠	茨城県衛生研究所 ウイルス部
	八尋 俊輔	熊本県保健環境科学研究所
	貞升 健志	東京都健康安全研究センター 微生物部
	長島 真美	東京都健康安全研究センター ウイルス研究科
	浅倉 弘幸	東京都健康安全研究センター ウイルス研究科
	斎藤 博之	秋田県健康環境センター 保健衛生部
	秋野和華子	秋田県健康環境センター 保健衛生部
	坂上亜希恵	宮城県保健環境センター 微生物部
	左近 直美	大阪健康安全基盤研究所
	植木 洋	株式会社 日本環境衛生研究所
	花田 三四郎	群馬パース大学 医療技術学部 臨床工学科
	倉井 大輔	杏林大学 医学部 総合医療学教室（感染症科）
	林 豪士	国立感染症研究所 ウイルス第二部
	高木 弘隆	国立感染症研究所 安全実験管理部
	遠矢 真里	国立医薬品食品衛生研究所
	天沼 宏	国立医薬品食品衛生研究所
	田村 克	国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

国内で発生する食中毒事件・患者の報告

数は、この 20 年で事件数は H16 年の 1600

件超をピークに R3(2021)年は 700 件、

R4(2022)年は960件と約半減し、患者数もH18年の四万人弱からR4(2022)年の6800人へと大きく減少している。とくにR1(2019)年12月に発生した新型コロナウイルス感染症のパンデミック発生をうけて、飲食店の営業自粛等に伴う外食機会減少により、R2-4(2020-22)年の食中毒患者数を大きく減少させた。

ノロウイルスを原因とする食中毒事件数はH27年の500件をピークにR2-4(2020-2022)年は100件以下を維持し、大きく減少しているものの、患者数は依然として全体の食中毒患者数の約3-5割近くを占めているほか、R3(2021)年4月に2545名、R2(2020)年12月に559名、H30(2018)年に550名など、大規模な食中毒事件は引き続き発生しており、食品衛生においてノロウイルス対策は依然として大きな課題である。

ノロウイルスによる食中毒の発生を防ぐためには、HACCPの考え方にもとづき、次の2つが重要となる。

1. 食中毒発生時に原因物質の特定とともに、原因となった食品および汚染経路の特定により、効果的な食品汚染防止策を示すこと、
2. ノロウイルスによる食中毒の多くが食品取り扱い現場において従事者による食品汚染が原因と推定されることから、食品製造時の調理条件や食材の洗浄、さらに従事者の手指等や調理環境にもちいる消毒剤などによる不活化条件を示すこと

しかしながら、現状では食中毒の原因と推定される食品は非常にバラエティにとんでおり、検査担当者は様々な食品に対応する必要があること、さらに細菌と異なり食

品中でウイルスが増殖しないため、食品からの微量のウイルスの検出そのものが非常に難しいことなどがあり、さまざまな食品に対応可能な汎用性の高い食品処理法が求められている。

また、食品の製造工程や食品取り扱いの環境において、ノロウイルス等の対策を取る必要があるが、これまでノロウイルスの実用的な培養系が存在しなかったため、直接的なノロウイルスの不活化条件が提示できないという課題があった。

本研究班では、上記の2つの課題に対して、汎用性の高い食品からのウイルス検出法の整備、および食品取り扱い現場で実施可能なウイルスの制御のための具体的なノロウイルスの不活化条件等の提示を目的とする。

B. 研究方法

1. 検査法の整備

1-1. 食品からのウイルス検査法の整備・公開（分担；上間、吉村、遠矢、木村、元岡、協力；検査機関）

1年目. 食中毒事件において一般食品からのHuNoV検出に対応可能なパンソルビントラップ法やA3T法などの食中毒事例において、食品からウイルス検出の実績のある食品処理法、およびnestedリアルタイムPCR法など遺伝子検出の高感度化、Dual Typing等の新規遺伝子解析法など最新情報にもとづいた検査法の整備に向けた知見を収集し、多機関参加による検証作業手順の策定を行う。1-2年目にかけて遺伝子型による検出感度の差に対応するプライマー配列、試薬入手性や検査感度の確認、検査時の陽性コントロールや検量線の精度検証

などを実施する。

2年目. 地方衛生研究所や登録検査機関参加のもと検査法コラボスタディを実施し、実行性確認を行う。

3年目. 研究期間を通して食中毒事例対応時の検査法の実態など国際情報の収集を実施し、国際動向を反映した食品からのウイルス試験法として提示する。

1-2. 小規模 NGS を利用した食品検査法の開発 (分担 ; 元岡、上間、吉村、協力 ; 検査機関)

プライマー配列に由来する遺伝子型ごとの検出感度の差にも対応可能と考えられる NGS による網羅的な食品中ウイルス検索手法の開発を行う。

1-2年目. 1-1. にて実施する検査法検証および、食中毒検査等で得た処理後検体由来の核酸について Hi-Seq 等 NGS によるメタゲノム解析を通じて食品由来夾雑物を把握する。また、これまでに上間らが構築したローカルブラストソフトを改訂する。

3年目. NV を含む種々の食中毒原因ウイルス迅速同定のための食品検査への NGS 導入に向け、導入費用の負担がなく少数検体を解析可能な Nanopore シーケンサ使用に適した食品処理および RNA 等抽出法などの手法を構築する。

以上の検討を通じ、汎用性が高く、少数検体に対応可能なウイルス検査法を提示でき、従来の PCR 法では原因特定に至らなかった食中毒事件の迅速な原因特定につながる。

2. ウイルスの制御

2-1. NV 失活条件および手法の提示 (分担 ; 村上、佐藤、岡、上間、吉村)
海外で利用されるヒト腸管組織オルガノイ

ドおよび佐藤ら (Sato et al, 2019) が国内で確立したヒト iPSC 由来腸管上皮細胞による HuNoV 培養系を用いて感染能を指標とした不活化評価を国際的な試験規格を参考に実施する。

1-2年目. 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のほか、COVID-19 対応に向けて NITE が公開した製剤成分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 HuNoV の不活化条件定量法を検証・確立する。

3年目. 事業者における HACCP 制度化への対応を念頭に、食品等事業者施設における実行可能なウイルス対策の具体的条件等の科学的データ提示を行う。

2-2. 食品等従事者における上気道飛沫中 NV の調査 (分担 ; 岡、上間、協力 ; 検査機関)

HuNoV は胃腸炎ウイルスであり、食中毒発生要因としては調理従事者の糞便・嘔吐物由来の食品汚染が主と想定されてきたが、近年の疫学解析により胃腸炎症状の有無によらず、鼻腔咽頭ぬぐい液からも HuNoV が検出されることが明らかとなりつつある背景のもと、調理従事者の上気道飛沫による HuNoV 汚染の可能性について調査を実施する。

1年目. 唾液中の NV 検査法を構築する。

1-3年目. 1年目冬季より民間臨床検査機関の協力のもと、食品取扱者を対象に実態調査を行う。食中毒事例発生時には自治体の協力を得て同様の調査を行う。調査結果を踏まえ、便以外の新規汚染経路の存在と重要性が明らかとなった場合には、HuNoV

食中毒発生抑制に向け、マスク等による HuNoV 拡散予防の必要性を解析し、得られた情報を厚生労働省担当官に共有し、啓発のための資料作成に協力する。

C. 研究の進捗状況

1. 検査法の整備

1) パンソルビン・トラップ法に関する検討（上間）

- ・パンソルビン・トラップ法に用いる試薬の入手性は良好であった。
- ・冷凍ベリーの処理の際は、pH9.0 以上の食品洗浄液が効果的であった。
- ・塩おにぎり、食パン、刻みのりの食品処理手順について確認した。
- ・Mengovirus が工程管理に不適であることが明らかとなった。
- ・秋田県で 2019-2022 年度に発生したウイルス性食中毒 7 事件において食品検体 83 検体のうち 7 検体からパンソルビン・トラップ法にてノロウイルスを検出した。

2) A3T 法による食中毒事例における食品からのウイルス検出（吉村）

- ・東京都内で 2021.4-2022.11 に発生した食中毒事例で搬入された 307 事例について検査を実施した。46 事例からノロウイルスを検出した。
- ・食品検体 207 検体について A3T 法でウイルス検出を試みたが、検出できなかった。

3) 食品からのウイルス検査法への NGS 導入に関する検討（元岡）

- ・食品へのウイルス添加回収試験について、パンソルビン・トラップ法で得られた核酸抽出物を NGS によってメタゲノム解析を実施した。
- ・食品検査についてメタゲノム解析が実施

できる可能性は十分あることが示された。

4) ノロウイルスの疫学動向の解析（木村）

- ・国内における 2018-2022 年のノロウイルスの遺伝子群、遺伝子型は GII が GI より多く検出されていた。
- ・GI.2, GI.3, GI.4, GI.7 が検出報告されていた。
- ・GII.2, GII.4, GII.6, GII.17 が多く検出報告されていた。
- ・主要流行株は GII.4 から GII.2, GII.17 と変遷している。

5) 米国・英国の食中毒発生時のウイルス検査に関する調査（窪田）

- ・食中毒事件対応における食品検査の実施状況について米国・英国から聞き取り調査を行った。
- ・米国・英国では食中毒発生時に食品検査を必ずしも実施していなかった。
- ・米国、欧州では「食品取り扱い従事者にノロウイルス感染が確認された場合、症状消失から 48 時間待機後に仕事に復帰する」という推奨事項があった。

2. ウイルスの制御

1) ノロ・サポウイルスの不活化条件に関する調査（上間）

- ・ノロウイルス、サポウイルスに対する不活化条件について文献調査を実施した。
- ・HACCP にもとづくウイルス対策として衛生管理を実施するには、科学的なデータはまだ少ない状況であった。

2) 腸管オルガノイドを用いたヒトノロウイルス不活化条件の検討（村上）

- ・ノロウイルス培養系に用いる糞便検体の入手体制を整えた。
- ・シジミをモデルとした食品中のノロウイ

ルス不活化に検討を進めた。

3) iPSC 由来腸管上皮細胞を用いたヒトノロウイルス不活化条件の検討 (佐藤)

- ・ノロウイルス培養系に用いる iPSC 由来腸管上皮細胞のロット選定をおこなった。

- ・ノロウイルス培養系に用いる遺伝子型を GII.4 シドニーを基本とすることを決定した。

- ・他の遺伝子型についても検討を進めることとした。

4) 食品従事者等における上気道飛沫中のノロウイルスの調査 (岡)

- ・調理従事者等からの食品のウイルス汚染経路として唾液の可能性が示唆される報告がされている。

- ・食品取り扱い事業者を対象に唾液中のノロウイルスの実態調査を実施した。

- ・今年度は 304 検体について唾液の調査を実施したが、ノロウイルスは検出されなかった。

- ・地方衛生研究所の協力のもと、集団胃腸炎事例において糞便・唾液中のノロウイルス検出を試みた。

D. 政策等への活用または実用化に向けた取り組み

高感度で汎用性の高いウイルス検出法が示されることで、食中毒事件に対応する地方衛生研究所や民間検査会社において、食品からのノロウイルス検査の標準法として利用され、食中毒事件の原因究明につながるほか、汚染経路等の知見の集積は、ウイルス性食中毒の未然防止、公衆衛生の向上に繋がる。またノロウイルスに限らずさまざまな食品由来ウイルスを網羅的に検出可能なメタゲノム解析手法構築は、食中毒発生時の迅速な原因究明手法となる。

本研究では H10 や iPSC 由来腸管細胞を用いてヒトノロウイルスの感染・増殖能力を

直接評価し、不活化条件にかかる科学的エビデンスを示し、現行の代替ウイルスによる不活化条件に対する確実性を高めることとなる。本研究成果は客観的な科学的エビデンスを有する食中毒原因ウイルス制御方法として HACCP の考え方に基づいた食品取り扱い事業者に向けた各種ガイドラインへ反映可能であり、HACCP 制度化に対応したウイルス対策へつながる。

E. 健康危険情報

ノロウイルスの新規汚染経路に関する調査結果を踏まえ、便以外の新規汚染経路の存在と重要性が明らかとなった場合には、ノロウイルス食中毒発生抑制に向け、マスク等によるノロウイルス拡散予防の必要性を解析し、得られた情報を厚生労働省担当官に共有し、啓発のための資料作成に協力する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Doan YH, Yamashita Y, Shinomiya H, Motoya T, Sakon N, Suzuki R, Shimizu H, Shigemoto N, Harada S, Yahiro S, Tomioka K, Sakagami A, Ueki Y, Komagome R, Saka K, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Mizukoshi F, Arita Y, Haga K, Katayama K, Kimura H, Muramatsu M, Oka T. Distribution of Human Sapovirus Strain Genotypes over the last four Decades in Japan: a Global Perspective. *Jpn J Infect Dis.* 2023 Mar 31. doi: 10.7883/yoken.JJID.2022.704. Online ahead of print.

2. Watanabe K, Oka T, Takagi H, Anisimov S, Yamashita SI, Katsuragi Y, Takahashi M, Higuchi M, Kanki T, Saitoh A, Fujii M. Myeloid-associated differentiation marker is an essential host factor for human parechovirus PeV-A3 entry. *Nat Commun.* 2023 Mar 31;14(1):1817. doi: 10.1038/s41467-023-37399-8.
3. Li T-C, Kataoka M, Doan YH, Saito H, Takagi H, Muramatsu M, Oka T. Characterization of a Human Sapovirus Genotype GII.3 Strain Generated by a Reverse Genetics System: VP2 Is a Minor Structural Protein of the Virion. *Viruses.* 2022 Jul 27;14(8):1649. doi: 10.3390/v14081649.
4. Miyazaki N, Song C, Oka T, Miki M, Murakami K, Iwasaki K, Katayama K, Murata K. Atomic Structure of the Human Sapovirus Capsid Reveals a Unique Capsid Protein Conformation in Caliciviruses. *J Virol.* 2022 May 11;96(9):e0029822. doi: 10.1128/jvi.00298-22.
5. Takagi H, Oka T, Ami Y, Suzaki Y, Saito H. A Human Intestinal Cell Line Suitable for the Propagation of Human Parechovirus Type 1 to 6 with a Clear Cytopathic Effect. *Jpn J Infect Dis.* 2022 May 24;75(3):318-321. doi: 10.7883/yoken.JJID.2021.534.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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 γ -linolenic acid metabolites are PPAR δ ligands that reduce lipid accumulation in human intestinal organoids. *J Biol Chem.* 2022 Nov;298(11):102534. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102534.
 11. 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.
 12. 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.
 13. Kimura Y, Shin J, Nakai Y, Takahashi M, Ino Y, Akiyama T, Goto K, Nagata N, Yamaoka Y, Miyakawa K, Kimura H, Ryo A. Development of Parallel Reaction Monitoring Mass Spectrometry Assay for the Detection of Human Norovirus Major Capsid Protein. *Viruses.* 2022 Jun 28;14(7):1416. doi: 10.3390/v14071416.
 14. Honjo S, Kuronuma K, Fujiya Y, Nakae M, Ukae S, Nihira H, Yamamoto M, Akane Y, Kondo K, Takahashi S, Kimura H, Tsutsumi H, Kawasaki Y, Tsugawa T. Genotypes and transmission routes of noroviruses causing sporadic acute gastroenteritis among adults and children, Japan, 2015-2019. *Infect Genet Evol.* 2022 Oct;104:105348. doi:10.1016/j.meegid.2022.105348.
 15. Masashi Uema, Kenzo Yonemitsu, Yoshimasa Sasaki, Hiroshi Asakura. Detection of hepatitis E virus RNA from pig bile collected at a slaughterhouse in Japan[J]. *AIMS Microbiology*, 2022, 8(4): 566-574.
 16. 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.
 17. 矢尾板 優、長谷川道弥、浅倉弘幸、永野美由紀、林 志直、根岸 あかね、河上麻美代、林 真輝、山崎 貴子、黒木絢士郎、磯貝まや、北村 有

- 里恵、加來英美子、藤原卓士、鈴木淳、三宅啓文、長島真美、貞升健志：東京都内で検出されたノロウイルスの遺伝子解析（2021年度）、東京健安研七年報、73、123-130、2022
18. 永野美由紀、浅倉弘幸、矢尾板 優、鈴木 愛、磯貝 まや、藤原卓士、根岸あかね、河上麻美代、伊藤 仁、黒木絢士郎、横田翔太、北村有里恵、加來英美子、長谷川道弥、三宅啓文、千葉隆司、鈴木 淳、長島真美、貞升健志：東京都の感染症発生動向調査事業における感染性胃腸炎のウイルス検出状況（2019年度～2021年度）、東京健安研七年報、73、101-107、2022
2. 学会発表
1. 非胃腸炎症例の咽頭拭い液からの下痢症ウイルス検出. 岡智一郎、高木弘隆、斎藤博之. 第63回日本臨床ウイルス学会 2022. 6.
2. 汎用細胞増殖系を活用した下痢症ウイルスの浄水処理性の評価. 白崎伸隆、胡秋吟、白川大樹、高木弘隆、岡智一郎、松下拓、松井佳彦. ウイルス性下痢症研究会第33回学術集会, 2022. 11.
3. ヒトサポウイルス研究加速のための遺伝子型網羅的リソース確立に向けた取り組み. 岡智一郎、李天成、米満研三、網康至、須崎百合子、中村（桶本）優子、片岡紀代、団海燕、三田哲朗、小林孝行、斎藤博之、八尋俊輔、佐藤重紀、柴田伸一郎、塚田竜介、高木弘隆. 第69回日本ウイルス学会、2022. 11.
4. 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
5. 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
6. 浅倉弘幸、永野美由紀、矢尾板 優、鈴木 愛、磯貝まや、藤原卓士、三宅啓文、長島真美、貞升健志、日本食品衛生学会第118回学術講演会、2022年11月10日（木）～11月11日（金）（長崎）
7. 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
8. 食品のノロウイルス汚染検出法としてのパンソルビン・トラップ法の有用性の検討 斎藤博之、秋野和華子、野田衛、上間匡. 日本ウイルス学会、2022. 11. 長崎
- G. 知的財産の出願・登録状況
なし