

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」

分担報告書

ウイルス検出法への NGS 導入に関する研究

研究分担者 遠矢真理 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食中毒事件発生時に、原因究明を迅速かつ精確に行うことは極めて重要であり、次に起こりうる食中毒を防止するためにも寄与する。

食中毒の原因となるウイルスを食品中から検出できたのちに、食品から検出されたウイルスと患者検体から検出されたウイルスの遺伝子配列を比較することは、科学的根拠としてより精確な情報を提示できるが、現在はウイルスの核酸検出のみが基本的に行われており、遺伝子配列の解析まではまだ整備されていない。

本研究では、次世代シーケンサー（NGS）の中でも迅速性に優れている Nanopore 社のシーケンサーを用いた検討を行うことにした。また NGS を用いた疫学調査が実装化し始めている下水検体を用いてノロウイルスをターゲットにした研究を行うことで、効率的に食中毒事例での実用化を目標とした検討を行うことにした。

A. 研究目的

食中毒の原因となった病原体を食品や環境サンプルから迅速かつ精確に検出することは、食中毒事件解決のための科学的根拠となり重要である。さらに将来に向けた食中毒防止に向けた対策へ寄与する。

現在のウイルス性食中毒の調査においては、主に原因ウイルス核酸をリアルタイム PCR 等での検出が行われ、原因の特定や汚染ルートの調査推定が行われている。

近年、遺伝子配列解析技術の発展から病原体解析において次世代シーケンサー（NGS）の導入が盛んに試みられている。ウイルス病原体についても同様であり、代表的な例としては下水由来のウイルス配列の NGS での解析が挙げられる。この解析ではウイルス遺伝子

の検出とウイルスの配列情報を合わせて解析することで、食中毒等での探知よりも前の病原体探知や遺伝子変異による流行株の早期検出が可能となっている。また迅速性の高さや導入のしやすさという利点から、Nanopore 社の NGS 技術は注目を集めている。

そこで本研究では、食品からの原因ウイルスの遺伝子配列解析を目標とし、まずは下水を使ってノロウイルスの疫学調査を実施し、現時点での環境サンプルからのウイルス回収と解析に関する改善点や問題点の確認を行うことにした。NGS は Nanopore 社の Flongle を用いて行うことにした。

B. 研究方法

1) 供試検体

秋田市内の下水処理場に

て2019年1月～2022年12月の期間で流入水を毎月採取し、本研究に用いた。

2) ウイルスの濃縮法

下水検体40mlにPEG 6000およびNaClを3.2gヌクレオ酸の抽出を行った。

3) ウイルス核酸の抽出法

上記PEG沈殿法で沈澱を収集後、自動核酸抽出機器MaxwellR (Promega社)と抽出試薬MaxwellR RSC Viral Total Nucleic Acid (Promega社)を用いて核酸抽出を行った。

4) リアルタイムPCR法

TaqMan™ Fast virus 1-step master mix (Thermo Fisher Scientific社)を用いて、国立感染症研究所の病原体検出マニュアルノロウイルス(第1版)に従って行った。

5) NGS

抽出したウイルス核酸はPrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis KitでcDNA合成を行い、国立感染症研究所の病原体検出マニュアルノロウイルス(第1版)に従ってnested PCRを行った。その後Oxford Nanopore Technologies社のNGS調整試薬SQK-PBK004kitを用いて、ライブラリ調整を行い、フローセルはFlongleを用いて遺伝子配列の取得を行った。取得した遺伝子配列はV-Nus Net toolを用いて解析を行った。

C. 研究結果

リアルタイムPCRでは、2019年11月、2020年9月、2021年9月および11月、2022年12月の検体ではGIおよびGII共にノロウイルスは検出されなかったが、それ以外の月ではどちらか一方、もしくは両方が検出された(図1)。

NGSを用いた遺伝子配列解析では、GIは毎年

ずつ加え、4℃で一晩回転させながら反応させた。その後、4℃で12,000g、30分間遠心させて沈澱からウイル

2-5種類の遺伝子型が検出されており(表1-1)、GIIは毎年5-6種類の遺伝子型が検出された。(表1-2)。

D. 考察

本来の流行季節ではない夏季においても下水サンプルからノロウイルスが検出された。

NGSを用いた遺伝子配列の解析から、GIではGI.3およびGI.6が、GIIでは、GII.2、GII.4、GII.6およびGII.17が毎年検出されることが明らかとなった。一方で、Flongleからの排出されたリード情報を遺伝子型別ソフトで解析するだけでは、ウイルス株の多様性については明らかにすることができない。また本研究では解析領域を350bp程度に限定しているが、ノロウイルスはORF1のPolymerase領域とORF2のN/S領域を合わせたDual typingを行うことが推奨されている。解析領域を長くすることで、さらに詳細なウイルス解析が可能となる。新たなNGS技術が将来的には食中毒原因ウイルスの調査の科学的根拠を提示するうえで重要な手法となると考えられるが、その一方で試薬や機器のアップデートが早く、手技の変更が求められる場合もあるため検査現場でのマニュアル化が難しい側面もある。

E. 結論

本研究で用いた方法により、下水からの流行株の配列解析を実施することが可能であり、有用であることが確認できた。今後は

NGS から排出されるリード情報の多様性を詳細に解析していくとともに、解析領域を 350 bp 程度から 7000bp とノロウイルスの遺伝子配列の全長に近い長さまで増やすことや Dual typing の導入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

1) NGS を活用した下水疫学調査によるノロウイルスの流行状況の把握 遠矢真理, 南村幸世, 國吉杏子, 秋野和華子, 斎藤博之, 上間匡. 日本食品衛生学会, 2023. 11. 東京

G. 知的財産権の出願・登録

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

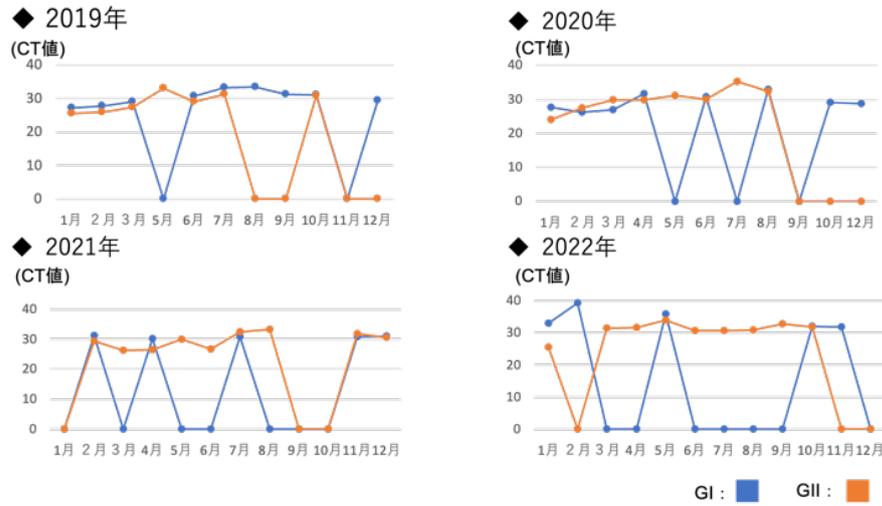


図1. ノロウイルスGIおよびGIIのリアルタイムPCRによる検出成績

表1. NGS で検出されたノロウイルスの遺伝子型

1-1. GI タイプ

年 \ 月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2019	I. 2, I. 3, I. 6	I. 2, I. 3, I. 4	I. 2, I. 3, I. 4	-	-	-	-	-	I. 2, I. 3	I. 2, I. 3	-	I. 3
2020	I. 3, I. 6	I. 3, I. 6	I. 3	I. 2	-	-	I. 6	I. 4	-	-	-	I. 2
2021	-	I. 3, I. 4	-	-	I. 3, I. 6	-	-	-	-	-	I. 6	I. 3
2022	I. 2, I. 6	I. 6	-	I. 4	I. 3, I. 5	-	-	-	-	-	I. 3	-

1-2. GII タイプ

年 \ 月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2019	II. 2, II. 3, II. 4, II. 17	II. 2, II. 4, II. 17	II. 2, II. 4, II. 17	-	II. 2, II. 4	-	II. 3, II. 6	-	II. 2, II. 17	II. 17	-	-
2020	II. 17	II. 2, II. 4, II. 6, II. 17	II. 2, II. 4, II. 6, II. 17	II. 2, II. 8, II. 17	II. 4, II. 17	II. 2	-	II. 2, II. 6	-	II. 17, II. 2, II. 4	-	II. 2

2021	-	II. 2, II. 17	II. 2, II. 17	II. 2	II. 2 , II. 4 , II. 1 7	II. 2 , II. 3	-	II. 1 7	II. 1 0	-	II. 2 , II. 4 , II. 1 0	II. 6
2022	II. 3, II. 4, II. 6	II. 2, II. 3, II. 4, II. 6, II. 17	II. 2	II. 4	II. 1 7	-	-	-	II. 4	II. 2 , II. 6 , II. 1 7	II. 2	II. 2 , II. 4