

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

メタゲノム解析を用いた食品からのウイルス検出法に関する検討

研究分担者

元岡 大祐

大阪大学微生物病研究所

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。ヒトノロウイルスなど、食中毒の原因と考えられるウイルスの場合は、リアルタイム PCR など従来法によって検出することが可能であるが、これらの一般的な検査で、すべての病原体が陰性であった場合には、網羅的な病原体検出が必要である。そこで本分担研究では、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の開発を行う。メタゲノム解析によるウイルス検出は、ヒトの臨床検体中では用いられる事例が増えてきたが、食品中の場合は付着しているウイルス量は極微量であり、食品から抽出された核酸の大部分を占める食品由来ゲノムにより、ウイルス検出感度が著しく低下すると考えられる。そこで、メタゲノム解析に適した食品からの効率的なウイルス核酸の抽出方法の適用、開発が必須である。従来より、汎用性・検出感度の高い食品処理法サンプルとして、パンソルビントラップ法が開発されており、本手法がメタゲノム解析でも有効であるかを検証した。

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。ヒトノロウイルス（HuNoV: Human Norovirus）など、食中毒の原因となりやすいウイルスの場合は、リアルタイム PCR などで効率的な検出が可能であるが、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。また、標的外のウイルスの場合は原因不明となるため、標的病原体以外については、網羅的な病原体検出法の確立も必要である。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と考えられる。これまでの取り組みにおいて、パンソルビントラップ法により回収した核酸に対してメタゲノム解析を行うことで、食品に付着した病原体が検出できることを示してきた。しかし、ウイルス以外の核酸配列がリード

の大部分を占めており、より感度を上げるための核酸抽出方法、ライブラリ調製方法を検討することを目的とする。

B. 研究方法

ウイルスが付着した食品から、パンソルビントラップ法により回収した核酸のメタゲノム解析では、得られたシーケンスデータの大半が黄色ブドウ球菌由来であった。そこで本年度は、ウイルス検出目的としては不要な核酸をどのように減らし、ウイルス検出感度を上げるかという取り組みを行った。

1. DNA 除去法の検討

ウイルスが付着した食品から、パンソルビントラップ法により核酸を抽出した場合、食品の素材となる生物のゲノム DNA に加え、パンソルビントラップ法に用いた黄色ブドウ球菌の DNA、ウイルス由来核酸が主たる構成成分であると考えられる。そこで、DNaseI にて残存 DNA を除去することで、ウイルス検出感度が上げられないか検討した。食品となるサンプルとしてミックスベリーを用意した。ウイルスとしては、猫カリシウイルス (feline calicivirus; FCV)、Mengovirus、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)。パンソルビントラップ法により抽出した核酸に対して DNaseI で処理した後、RamDA-Seq 法による cDNA 合成・増幅、NexteraXT ライブラリ調製キットによる NGS ライブラリ化を行っ

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い、DNaseI 未処理の結果と比較した。

2. パンソルビントラップ法以外の手法との感度比較

DNaseI 処理では、黄色ブドウ球菌由来配列を減らすことができなかったことから、パンソルビン・トラップ法以外の RNA 抽出方法がメタゲノム解析には適している可能性を考慮し、FDA 法、ISO 法による抽出核酸と比較検討した。食品となるサンプルとして冷凍ベリー、きゅうり、レタスを用意した (表 3)。またその場合、パンソルビントラップ法によるウイルス濃縮の効果は期待できなくなるため、抽出済み核酸中に含まれるウイルス配列を Twist 社の Twist Comprehensive Viral Research Panel を使い濃縮する試みも行った。

C. 研究結果

1. DNA 除去法の検討

DNaseI 処理の有無で、メタゲノムデータ中のウイルス由来のリード数の割合がどのように変化について表 3 にまとめた。

予想に反して DNaseI 処理を行っても黄色ブドウ球菌由来のリード数の割合は全く減らなかった。またウイルス由来のリード数も改善しなかった。

2. パンソルビントラップ法以外の手法との感度比較

各サンプルから抽出された RNA を用いて、メタゲノム解析で検出されたウイルスリード数を比較した(表 4)。冷凍ベリーときゅうりでは、ISO 法の場合にパンソルビントラップ法よりも多くのウイルス由来核酸配列を検出できた。しかし、レタスではウイルス由来配列は減っており、ISO 法がパンソルビントラップ法より一般的に優れているとは言い難い結果であった。また FDA 法もパンソルビン・トラップ法や ISO 法と比べて改善が見られなかった。

一方で、これらの抽出 RNA に対してウイルスターゲットシーケンスを行った場合には、表 5 に示すようにいずれの食品においても、パンソルビントラップ法よりも ISO 法や FDA 法で抽出した核酸を用いた方がターゲットとするウイルスをよく検出できることがわかった。

D. 考察

パンソルビントラップ法は、食品に付着したウイルスの核酸を得る方法としては有用であることは以前からも示されており、実際に本研究で行った網羅的な RNA シーケンスの結果でも、ISO 法や FDA 法の方がいいとは言い難い結果であった。しかし、パンソルビントラップ法に用いる黄色ブドウ球菌がメタゲノム解析では感度低下という負の影響を及ぼしていることも間違いない。そこで今回、ISO 法や FDA 法といった一見すると検出感度が落ちる方法を用いつつ、RNA 抽出後にウイルス濃縮プローブを用いてウイルス核酸を濃縮することで、20~400 倍程度の感度向上を達成した。

E. 結論

食品に対して、メタゲノム解析を用いたウイルス検出を行う場合は、存在する核酸すべてを解析してしまうという特性上、パンソルビントラップ法を用いない方法を用いて RNA を抽出することで効率的な網羅的ウイルス検出ができることがわかった。今後は、実際の食中毒事件での実用化にむけ、検出限界の検討およびポータブル NGS の適用について検討を進めたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

- 1) Miyata R, Miyabe C, Oki H, Motooka D, Nakamura S, Miyabe Y, Takenaka Y, Fukuya Y, Yudo K, Ishiguro N. Alteration of microbial composition in the skin and blood in vasculitis. *Sci Rep.* 2023, 13(1):15317

2. 学会発表：

- 1) 大阪大学微生物病研究所ゲノム解析室における研究支援と共生微生物研究, 元岡大祐, 日本生化学会大会, 2023.11, 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表 1. サンプルと添加したウイルス

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

表 2. サンプルと添加したウイルス

	食品	抽出法	添加ウイルス
#1	ベリー	パントラ	HAV, GII, Mengo
#2	ベリー	ISO 法	HAV, GII, Mengo
#3	ベリー	FDA 法	HAV, GII, Mengo
#4	きゅうり	パントラ	HAV, GII, Mengo
#5	きゅうり	ISO 法	HAV, GII, Mengo
#6	レタス	パントラ	HAV, GII, Mengo
#7	レタス	ISO 法	HAV, GII, Mengo

表 3. DNA 除去効率の比較結果

	処理法	FCV	Mengo	HAV	Noro (GI)	Noro (GII)	黄色ブドウ球菌
#1	非処理	0.00%	1.77%	0.87%	2.76%	2.02%	0.70%
	DNaseI	0.00%	0.05%	0.04%	0.11%	0.09%	0.02%
#2	非処理	0.00%	0.03%	0.01%	0.01%	0.01%	34.36%
	DNaseI	0.00%	0.05%	0.02%	0.00%	0.00%	39.44%
#3	非処理	0.00%	0.01%	0.00%	0.02%	0.01%	33.30%
	DNaseI	0.00%	0.01%	0.00%	0.01%	0.00%	39.20%
#4	非処理	0.00%	0.03%	0.01%	0.05%	0.02%	16.81%
	DNaseI	0.00%	0.06%	0.02%	0.08%	0.03%	25.56%

#1 はコントロール用の水について、パンソルビントラップ法を用いずに抽出したため、黄色ブドウ球菌の割合については評価しない。

黒色で網掛けをしたセルは、添加していないウイルスのため評価しない

表 4. メタゲノム解析で得られたウイルスリード数(1000万リードあたり)

	食品	抽出法	HAV	Noro	Mengo
#1	ベリー	パントラ法	2	3	7
#2	ベリー	ISO 法	1	56	136
#3	ベリー	FDA 法	18	6	82
#4	きゅうり	パントラ法	0	1	3
#5	きゅうり	ISO 法	40	37	135
#6	レタス	パントラ法	135	71	230
#7	レタス	ISO 法	74	60	180

表 5. ウイルス標的メタゲノム解析で得られたウイルスリード数(1000万リードあたり)

	食品	抽出法	HAV	濃縮率 (HAV)	Noro	濃縮率 (Noro)	Mengo	濃縮率 (Mengo)
#1	ベリー	パントラ法	54		57		58	
#2	ベリー	ISO 法	1,694	31 倍	23,087	405 倍	15,768	272 倍
#3	ベリー	FDA 法	1,480	27 倍	2,021	35 倍	10,467	180 倍
#4	きゅうり	パントラ法	233		188		75	
#5	きゅうり	ISO 法	9,344	40 倍	20,186	107 倍	16,365	218 倍
#6	レタス	パントラ法	73		117		59	
#7	レタス	ISO 法	1,582	22 倍	12,669	108 倍	14,516	246 倍