

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

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 国立感染症研究所感染症危機管理研究センター 室長

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

ノロウイルスは大規模な食中毒事例を引き起こすことから、経済損失を社会に与える病原体として認識される。しかし再現性の高い培養法が長らく未確立であったことから、実効性のある感染制御法が確立されていない。本研究では、組織由来ヒト腸管オルガノイドを用いてノロウイルス不活化条件を「直接的」に検証することを目的とし、本年度は研究に使用するノロウイルス陽性糞便検体の選定を目指した。

地衛研から感染研へ搬入された 80 検体のヒト腸管オルガノイドへの感染性を解析し、100 倍以上の増殖幅を示す 16 検体、10 倍以上を示す 32 検体を取得した。このうち 8 検体（GII.2 3 検体、GII.3 1 検体、GII.4 4 検体）を選別し、iPS 由来腸管上皮細胞による解析のために分担研究者に送付した。両方の解析結果を基に協議を行い、最終的に 2 検体（GII.4 2 検体）を選定した。

A. 研究目的

ノロウイルスは冬季に流行する急性胃腸炎の主要原因であり、大規模な食中毒事例を引き起こすことから、社会的にも制御されるべき病原体として認識される。そのため効果的な感染制御法が求められているが、再現性の高い培養法が約半世紀にわたって未確立であった。そのため、現在のガイドライン等に用いら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」に調べられたものであり、その実効性は長らく議論されてきた。その中、本分担研究者は組織由来ヒト腸管オルガノイドを用いて培養系の確立に成功した。

本研究では、組織由来ヒト腸管オルガノイドを用いてノロウイルス不活化条件を「直接的」に検証し、さらに分担研究者と協調しながら研究を進めることで、より確実性の高い不活化条件の提示を目指す。本年度は、分担研究者とともにノロウイルス陽性糞便検体採取及び輸送に係る体制を確認するとともに、研究に使用する便検体の選定を目指した。

B. 研究方法

地方衛生研究所（大阪健康安全基盤研究所・左近、岩手県環境保健研究センター・高橋、宮城県保健環境センター・坂上、それぞれ本研究班分担研究者 吉村の協力研究者）において

採取され、事前に遺伝子型が解析されたノロウイルス陽性糞便検体（計 80 検体）を感染研に搬入し、ヒト腸管オルガノイドを用いて感染性を解析した。感染性の解析は、既報（Murakami et al, PNAS, 2016）に準じた。その上で、感染性の高い検体を和歌山医科大学（分担研究者 佐藤）へ送付し、iPS 由来腸上皮細胞への感染性を評価した。解析結果を関係者で協議し、本研究で用いる検体を選別した。また次世代シーケンサー（iSeq100 シーケンスシステム）を用いて遺伝子型を詳細に解析した。

C. 研究成果

感染研に搬入された 80 検体を用いて、ヒト腸管オルガノイドへの感染性を解析したところ、100 倍以上の増殖幅を示した 16 検体、10 倍以上を示した 32 検体を取得した。増殖した検体の多くは GII.4 であったが、様々な遺伝子型を用いた試験を想定して 8 検体（GII.2・3 検体、GII.3・1 検体、GII.4・4 検体）を選別し、iPS 由来腸管上皮細胞による感染性評価のために和医大へ送付した。また、次世代シーケンサーを用いて和医大に送付用検体の遺伝子型を解析し、遺伝子型の確認を行った。

D. 考察

感染研の「人を対象とする生命科学・医学系研究倫理審査委員会」から多機関共同研究計画の承認が得られたことから、本年度より実際に検体を扱った作業を開始したが、研究者間で事前に細かな調整が行われたため、滞りなく体制が運用された。さらに、異なる施設で運用される組織幹細胞由来ヒト腸管オルガノイド及び iPS 由来腸管上皮細胞により同

じ検体を用いた感染性解析が行われ、同等の結果が得られたことは大きな成果である。これまでに同様の解析が行われたことは少なく、両システムの一般性が確認されたのみならず、本研究で目的としている確実性の高い不活化条件の提示が期待される。

本年度の結果を元に、本研究で使用する検体の選定は終了しており、また不活化条件も協議済みであることから、来年度は不活化条件の評価を実施する予定である。

E. 結論

同じノロウイルス陽性糞便検体に対し、異なる施設で運用されている組織幹細胞由来腸管オルガノイドおよび iPS 由来腸管上皮細胞を用いて感染性を解析したところ、同様の結果が得られた。その上で、本研究で使用するノロウイルス陽性検体の選定を完了した。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi T, Kimura R, Shirai T, Sada M, Sugai T, Murakami K, Harada K, Ito K, Matsushima Y, Mizukoshi F, Okayama K, Hayashi Y, Kondo M, Kageyama T, Suzuki Y, Ishii H, Ryo A, Katayama K, Fujita K, Kimura H. Molecular Evolutionary Analyses of the RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRp) Region and VP1 Gene in Human Norovirus Genotypes GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6. *Viruses*, 15;7 (2023).
- 2) Dianty R, Hirano J, Anzai I, Kanai

Y, Hayashi T, Morimoto M, Kataoka-
Nakamura C, Kobayashi S, Uemura K,
Ono C, Watanabe T, Kobayashi T,
Murakami K, Kikuchi K, Hotta K,
Yoshikawa T, Tagawa S, Matsuura Y.
Electrolyzed hypochlorous acid water
exhibits potent disinfectant
activity against various viruses
through irreversible protein
aggregation. Front. Microbiol.
14:1284274 (2023).

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む.)

該当なし