

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

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 教授

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、加熱や、食品添加物として認可される次亜塩素酸 Na、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 HuNoV 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、本事業でウイルスソースとして用いる患者糞便検体を地衛研から集め、GII.4 遺伝子型検体を 2 ロット決定した。また、異なる機関、異なる細胞で同一の結果が確認できるかを重要視し、次年度に行う加熱による不活化に関して、感染研・村上班と実験プロトコールの確認を行った。

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。ヒト糞便検体を使用するに当たり、当該倫理審査を感染研で一括承認していただき、和歌山医大においても許可承認を受けた。岩手、宮城、大阪の地衛研から提供された HuNoV 陽性便検体は一度感染研に集められ、そこでウイルスゲノムコピー数とヒト組織由来の IEC を用いたスクリーニングにより、ウイルスソースとして用いる候補として 8 検体に絞られた。この 8 検体全てについて、和歌山医大において、ヒト iPS 細胞由来の IEC を用いた場合も *in vitro* 増殖が可能か

どうかを評価した。

また、異なる機関、異なる細胞で同一の結果が確認できるかを重要視し、次年度に行う加熱による不活化に関して、感染研・村上班と実験プロトコールの確認を行った。

C. 研究結果

ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を用いて、感染研でスクリーニングを終えた 8 検体について、HuNoV の *in vitro* 増殖が確認できた。増殖効率は感染研とほぼ同程度であり、同一のウイルスソースを用いて、異なる機関、異なる細胞（ヒト組織、もしくは人 iPS 細胞由来の腸管上皮細胞）において同様の結果が得られた。8 検体の中でも増殖効率が良く、糞便検体としても余裕のある GII.4_Sydney (GII.4[P31], GII.4[P16]) 2 検体を次年度以降に行う不活化評価に用いることにした。

D. 考察

異なる機関、異なる細胞において、同一糞便検体に由来する HuNoV が同様に *in vitro* で増殖することが確認できたことは、少なくとも国内では初めてのことであり、本評価系が普遍的であることが確認できたと言える。

評価系が 2 拠点において稼働することが確認できたため、次年度から加熱による不活化の評価を検討予定である。

E. 結論

実際に次年度から不活化の検討が行える体制が整った。まずは加熱による不活化を感染研とプロトコールを併せて行う予定であり、進捗としては十分であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Khamrin P, Kumthip K, Yodmeeklin A, Okitsu S, Motomura K, Sato S, Ushijima H, Maneekarn N. Genetic recombination and genotype diversity of norovirus GI in children with acute gastroenteritis in Thailand, 2015–2021. **J Infect Public Heal.** 2024 Jan 12;17(3):379–385.
- 2) Hattori-Muroi K, Naganawa-Asaoka H, Kabumoto Y, Tsukamoto K, Fujisaki Y, Fujimura Y, Komiyama S, Kinashi Y, Kato M, Sato S, Takahashi D and Hase K. α -Glucosidase inhibitors boost gut immunity by inducing IgA responses in Peyer's patches. **Front Immunol.** 2023 Nov 1; 14: 1277637.
- 3) Yokota C, Fujimoto K, Yamakawa N, Kono M, Miyaoka D, Shimohigoshi M, Uematsu M, Watanabe M, Kamei Y, Sugimoto A, Kawasaki N, Yabuno T, Okamura T, Kuroda E, Hamaguchi S, Sato S, Hotomi M, Akeda Y, Ishii KJ, Yasutomi Y, Sunami K, Uematsu S. Prime-boost-type PspA3 + 2 mucosal vaccine protects cynomolgus macaques from intratracheal challenge with pneumococci. **Inflamm Regen.** 2023 Nov 15;43(1):55.
- 4) Matsumoto N, Kurokawa S, Tamiya S, Nakamura Y, Sakon N, Okitsu S, Ushijima H, Yuki Y, Kiyono H, Sato S. Replication of Human Sapovirus in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Epithelial Cells. **Viruses.** 2023 Sep 15;15(9):1929.
- 5) Minami S, Matsumoto N, Omori H, Nakamura Y, Tamiya S, Nouda R, Nurdin JA, Yamasaki M, Kotaki T, Kanai Y, Okamoto T, Tachibana T, Ushijima H, Kobayashi T, Sato S. Effective SARS-CoV-2 replication of monolayers of intestinal epithelial cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. **Sci Rep.** 2023 Jul 18;13(1):11610. doi: 10.1038/s41598-023-38548-1.
- 6) Hoque SA, Kotaki T, Pham NTK, Onda Y, Okitsu S, Sato S, Yuki Y, Kobayashi T, Maneekarn N, Kiyono H, Hayakawa S, Ushijima H. Genotype Diversity of Enteric Viruses in Wastewater Amid the COVID-19 Pandemic. **Food Environ Virol.** 2023 Apr 14:1-16.
- 7) Takahashi Y, Inoue Y, Sato S, Okabe T, Kojima H, Kiyono H, Shimizu M, Yamauchi Y, Sato R. Drug cytotoxicity screening using human intestinal organoids propagated with extensive cost-reduction strategies. **Sci Rep.** 2023 Apr 3;13(1):5407. doi: 10.1038/s41598-023-32438-2.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし