

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」

総合研究分担報告（令和 4～6 年度）

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。しかしながら、食品中に含まれるウイルスは微量であり、ウイルス性食中毒事例における原因食品の特定は難しい。さらに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、現在は遺伝子配列の解析までは整備が不十分である。有効なウイルス検出法としてパンソルビントラップ法が挙げられるが、本方法は黄色ブドウ球菌の DNA が混入する為、次世代シーケンサー（NGS）を用いた遺伝子配列解析では不適とされている。

本研究では、NGS への応用もふまえたウイルス検出法の検討および、NGS を利用したウイルスの遺伝子配列解析を行うことにした。そこで 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た研究を行い、効率的に食中毒事例での実用化を目標とした検討を行った。

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。しかしながら、食品中に含まれるウイルスは微量であることが多く、ウイルス性食中毒事例における原因食品の特定は難しい。また、現在のウイルス性食中毒の調査においては、原因ウイルス核酸をリアルタイム PCR 等で検出することが主に行われ、遺伝子配列解析によるより精確な原因の特定や汚染ルートの調査法の整備はまだ不十分である。さらに食品中からの有効なウイルス検出法としてパンソルビントラップ

法が挙げられるが、本方法は黄色ブドウ球菌の DNA が混入する為、将来的に導入される次世代シーケンサー（NGS）を用いた遺伝子配列解析では不適とされている。

近年 NGS を利用したウイルスの疫学解析について研究成果が出ているが、特に下水を使った疫学解析への NGS の導入は盛んに試みられており、NGS 導入をふまえたウイルスの濃縮法についても新規手法が報告されている。下水試料からのウイルスの検出法では、ポリエチレングリコール（PEG）沈殿法が多くの検査機関で導入されている。PEG 沈殿法は簡便で特別な機械の導入の必要性がない長所がある一方で、オーバーナイトでの沈殿処理が必要で時間がかかる短所を持つとされる。近

年 PEG 沈殿法の短所を補う新たな代替法である COPMAN 法や Pegcision 法が開発、発表された。しかしながら、新たな代替法と従来の PEG 沈殿法の比較については、逆転写酵素の統一やリアルタイム PCR 用試薬を統一するなどの十分な検討が行われていない。そこで本研究では、PEG 沈殿法の短所を補うために、沈殿処理時間の短縮を検討する。さらに、新

B. 研究方法

1) ウイルスの検出法比較のための試料検体の調整

秋田県の下水处理施設で採水し、ノロウイルス (Nov) 陰性と確認された流入水と処理水にノロウイルス G1 (Nov G1), ノロウイルス G2 (Nov G2), メンゴウイルスおよびネコカリシウイルスを添加し、試料検体を調整し、10ml ずつに分注し、本研究に用いた。

2) ウイルスの濃縮および核酸抽出

PEG 沈殿法では試料 10ml に PEG6000 および NaCl を 0.8g ずつ添加し、沈殿時間を 0 時間、3 時間、24 時間 (オーバーナイト、0/N) の 3 条件を設けて試験した。沈殿処理後、10,000g で 30 分間の遠心を行った。沈澱を収集後、自動核酸抽出機器 Maxwell

(Promega 社) と抽出試薬 Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid (Promega 社) を用いて核酸抽出を行った。COPMAN 法では試料 10ml を用いて、COPMAN DNA/RNA extraction kit for wastewater

(AdvanSentinel 社) を用いて、ウイルスの濃縮および核酸抽出を行った。Pegcision 法では試料 10ml を用いて、Pegcision キット (SEGNOS 社) を用いてウイルスの濃縮を行い、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて核酸抽出を行った。

たな代替法と PEG 沈殿法で用いるリアルタイム用試薬を統一させた水試料からのウイルス検出性の比較を行うことにした。また下水由来のウイルスの遺伝子配列解析に関して NGS を導入し、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。

3) NGS を用いた疫学調査のための下水供試検体、ウイルスの濃縮方法および核酸抽出

秋田市内の下水处理場にて 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。下水検体 40ml に PEG 6000 および NaCl を 3.2g 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 分間遠心させ沈澱を収集後、自動核酸抽出機器 Maxwell (Promega 社) と抽出試薬 Maxwell 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

核酸抽出後、TaqMan Fast Virus 1-Step Master mix (ThermoFisher 社) にて 1 Step RT-qPCR を実施した。

5) NGS を用いたウイルスの配列解析

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 を用いて遺伝子型の解析を行った。

C. 研究結果

1) ウイルスの検出法の検討

各条件における CT 値の変化を試料の種類（放流水および流入水）とウイルスごとに分けて比較を行った（図 1）。

1-1) 沈殿時間の条件比較

PEG 沈殿法において、沈殿時間を 0 時間、3 時間、0/N で比較したところ、沈殿作用時間が長いほど CT 値が減少し、検出されるウイルスの増加が認められた。また沈殿時間を取らずに遠心作業に移ると、一部の検体からはウイルスの検出はされなかった。一方で、沈殿時間 3 時間と 0/N で比較をすると CT 値の差は減少されており、3 時間の条件で安定的に検出できた。

1-2) PEG 沈殿法とその他の濃縮法の比較
COPMAN 法で濃縮および核酸抽出をした際に、放流水では Nov G1 の検出において 11 検体中 4 検体で、メンゴウイルスでは 11 検体中 1 検体で検出できなかった。流入水でも同様に Nov G1 およびメンゴウイルスにおいて 1 検体から検出できなかった。一方で Pegcision 法ではどの検体からもウイルスは安定的に検出された。

0/N 条件での PEG 沈殿法と比較をすると、COPMAN 法および Pegcision 法は CT 値が高く、3 時間の沈殿処理条件の PEG 沈殿法とは同程度であった。

2) NGS を利用したウイルスの遺伝子配列解析

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 Nov GI および GII 共に Nov 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 2）。NGS を用いた遺伝子配列解析では、GI は

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

D. 考察

1) ウイルスの検出法の検討

PEG 沈殿法において様々な沈殿時間の条件を比較したところ、0/N の条件が今回用いたウイルスの検出において一番検出効率がよかった。また 3 時間の沈殿条件の場合、0/N との CT 値の差は減少しており、0 時間の沈殿条件でウイルス検出が出来なかった検体でもウイルスが検出された。本データは、3 時間の沈殿条件でもウイルス検出における定性的な結果が変わらないことを明らかにし、従来の PEG 沈殿法の短所をカバーできる結果となり、PEG 沈殿法の改良の提案に有用な情報となった。

二つの代替法について、本研究では数検体においてウイルスの検出が出来なかった。これは代替法で推奨されている逆転写酵素やリアルタイム PCR 酵素試薬を用いなかったことが影響していると考えられる。つまり濃縮液の中に残る阻害物質の影響を考慮する必要性を示している。そのため、代替法で推奨されている製品やその他の製品も含めて、逆転写酵素やリアルタイム PCR 試薬についても同様の試験を実施し比較する必要性を示唆している。

2) NGS を利用したウイルスの遺伝子配列解析

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 Nov が検出された。NGS を利用した遺伝子配列解析から、Nov GI では GI.3 および GI.6 が、Nov 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

本研究結果から、PEG 沈殿法における沈殿時間の短縮について有用な知見が得られた。また逆転写酵素やリアルタイム PCR 酵素試薬についても比較検討を行う必要性も明らかとなった。さらに、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 Nov 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。

本成績は食品検体からのより効率的なウイルス検出法の確立、さらに将来的な NGS を用いた遺伝子配列解析への応用にもつながるため、同様の試験を食品サンプルでも試験し比較について検討を進めたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 遠矢真理, 南村幸世, 國吉杏子, 秋野和華子, 斎藤博之, 上間匡. 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. 日本食品衛生学会. 2023. 10/12, 13, 東京都.

2) 遠矢真理, 南村幸世, 上間匡. 下水試料からのウイルス検出法の比較. 第 45 回日本食品微生物学会, 2024. 9/5, 6. 青森.

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. 試料水ごとの各ウイルスの CT 値

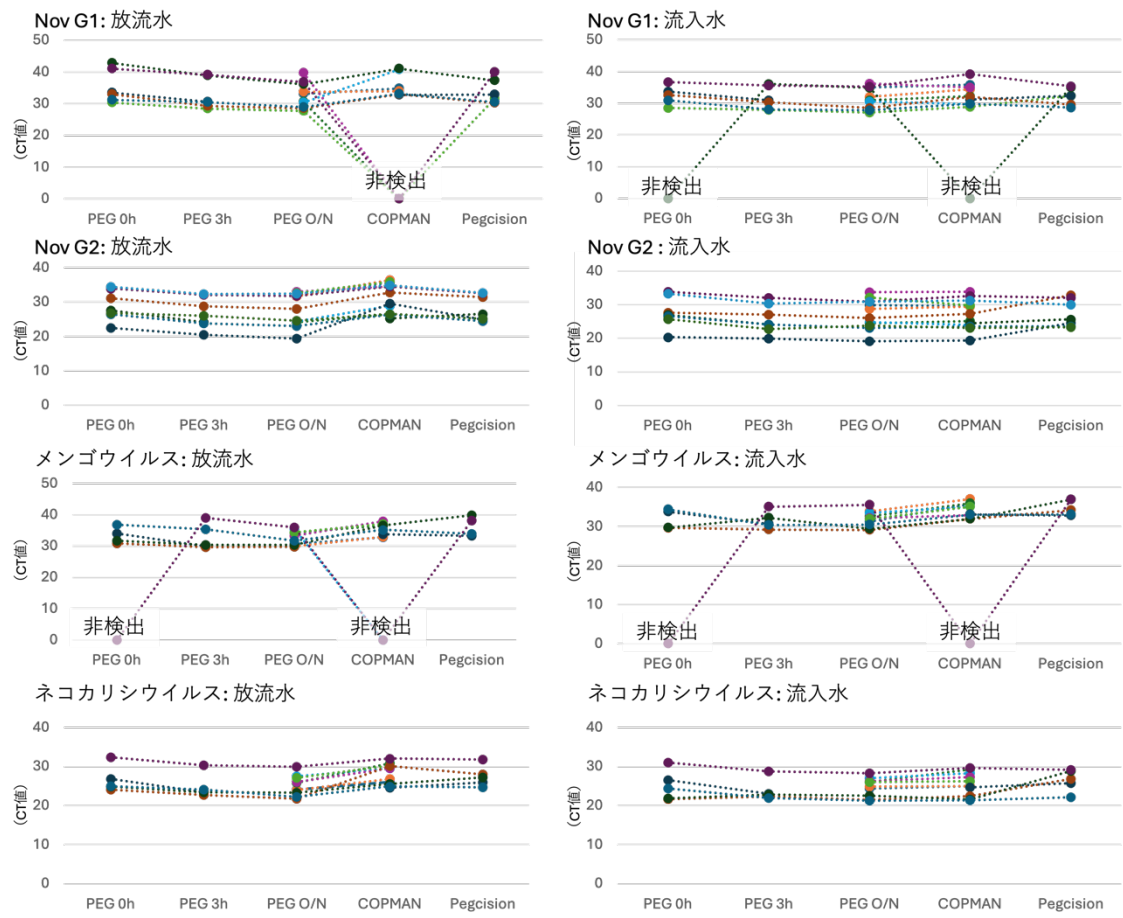
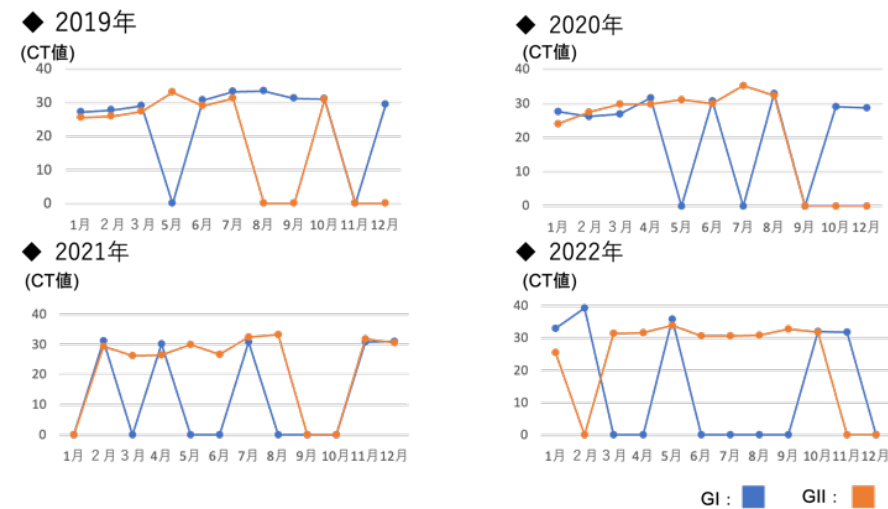


図 2. Nov GI および GII のリアルタイム PCR による検出成績

表 1. NGS で検出されたノロウイルスの遺伝子型

2019 年		2020 年	2021 年	2022 年
1 月	GI. 2, -3, -6	GI. 3, -6	—	GI. 2, -6



	GII. 2, -3, -4, -17	GII. 17	—	GII. 3, -4, -6
2 月	GI. 2, -3, -4	GI. 3, -6	GI. 3, -4	GI. 6
	GII. 2, -4, -17	GII. 2, -4, -6, -17	GII. 2, -17	GII. 2, -3, -4, -6, -17
3 月	GI. 2, -3, -4	GI. 3	—	—
	GII. 2, -4, -17	GII. 2, -4, -6, -17	GII. 2, -17	GII. 2
4 月	—	GI. 2	—	GI. 4
	—	GII. 2, -8, -17	GII. 2	GII. 4
5 月	—	—	GI. 3, -6	GI. 3, -5
	GII. 2, -4	GII. 4, -17	GII. 2, -4, -17	GII. 17
6 月	—	—	—	—
	—	GII. 2	GII. 2, -3	—
7 月	—	GI. 6	—	—
	GII. 3, -6	—	—	—
8 月	—	GI. 4	—	—
	—	GII. 2, -6	GII. 17	—
9 月	GI. 2, -3	—	—	—
	GII. 2, -17	—	GII. 10	GII. 4
10 月	GI. 2, -3	—	—	—
	GII. 17	GII. 1, -2, -4,	—	GII. 2, -6, -17
11 月	—	—	GI. 6	GI. 3
	—	—	GII. 2, -4, -10	GII. 2
12 月	GI. 3	GI. 2	GI. 3	—
	—	GII. 2	GII. 6	GII. 2, -4