

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）

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て、加熱による不活化試験を実施し、iPS 腸管上皮細胞における試験結果との整合性を検証した。検体を様々な条件（60℃・15 分，75℃・1 分，85℃・1 分間）で加熱した後に腸管オルガノイドへ感染させたところ、全ての群において感染性が喪失していた。当該試験結果は、iPS 腸管上皮細胞（和医大にて実施）を用いた不活化試験の結果と一致した。したがって、上記の加熱条件によりヒトノロウイルスが不活化されることが明らかとなった。

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 iPS 細胞を用いた *in vitro* ノロウイルス培養系とも比較することで、より確実性の高い不活化条件の提示を目指した。

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。選抜されたノロウイルス GII.4 2 株を様々な条件で加熱した後、組織幹細胞由来ヒト腸管オルガノイドに感染させた。ノロウイルス溶液は PCR チューブに加えてから、サーマルサイクラーにセットし、特定の温度（85℃、75℃、60℃）および時間で加熱した。加熱後はウイルス溶液を培地に懸濁して、ヒト腸管オルガノイドを用いて感染性を解析した。リアルタイム PCR に用いる標準プラスミド、プライマー（COG2F/COG2R）、プローブ（RING2）は和歌山医科大学（分担研究者 佐藤）と同じものを使用した。

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。iPS 由来腸管上皮細胞による感染結果を比較したところ、同様の感染性を示すことが示された。

選抜された GII.4 2 株を用いて、検体を様々な条件（60℃・15 分、75℃・1 分、85℃・1 分間）で加熱した後に腸管オルガノイドへ感染させたところ、全ての群において感染性が喪失していた。当該試験結果は、iPS 腸管上皮細胞（和医大にて実施）を用いた不活化試験の結果と一致した。本研究成果は海外学術誌にて発表するため、執筆中である。

D. 考察

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結果を得ることができた

E. 結論

異なる施設かつ in vitro 培養系を用いて「中心部で 85-90 度 90 秒以上の加熱」によりノロウイルスが増殖しないことが実証された。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hayashi T, Yamaoka Y, Ito A, Kamaishi T, Sugiyama R, Estes MK, Muramatsu M, Murakami K. Evaluation of Heat Inactivation of Human Norovirus in Freshwater Clams Using Human Intestinal Enteroids. *Viruses*. 2022;14(5):1014.
- 2) Takahashi T, Kimura R, Shirai T, Sada M, Sugai T, Murakami K, Harada K, Ito K, Matsushima M, 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 *VPI* Gene in Human Norovirus Genotypes GII.P6-

GII.6 and GII.P7-GII.6. Viruses. 2023, 15(7): 1497.

- 3) 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, Taguwa S, Matsuura Y. Electrolyzed hypochlorous acid water exhibits potent disinfectant activity against various viruses through irreversible protein aggregation. Front. Microbiol. 2023, 14:1284274.

2. 学会発表

- 1) 村上耕介, 林豪士, 山岡曜子, 伊藤篤, 釜石隆, 杉山隆一, Mary K. Estes, 村松正道. ヒト腸管オルガノイドを用いたシジミ中ヒトノロウイルスの感染性評価. 第69回日本ウイルス学会学術集会 2022. 11/13-15, 長崎県.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む.)

該当なし