

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。本年度は、昨年度までに選抜した GII.4 の 2 検体を用いて、様々な条件（60℃・15 分、75℃・1 分、85℃・1 分）にて加熱し、腸管オルガノイドへ感染させた。その結果、全ての群において感染性が喪失することが示された。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、加熱による不活化試験を実施し、同研究班における iPS 腸管上皮細胞における試験結果との整合性を検証、加熱によるノロウイルスの不活化条件を検証した。

B. 研究方法

昨年度に選抜したノロウイルス 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

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。感染性の解析は、既報（Murakami et al, PNAS, 2016）に準じた。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

検体を様々な条件（60℃・15分、75℃・1分、85℃・1分）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「中心部が 85-90 度で 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

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし