

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 和歌山医科大学 薬学部

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った。不活化条件の検証にあたっては、宮城県、岩手県、大阪府の協力を得てノロウイルス陽性便検体をウイルスソースとして用い、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、国立感染症研究所ウイルス第二部において腸管オルガノイド系を用い、和歌山県立医科大学にて iPS 由来細胞系を用いて、加熱による不活化に関して、同一の実験プロトコルを用いて確認を行った。

85 度 1 分以上の加熱で *in vitro* でのウイルス増殖が観察されなくなること、さらに加熱によりゲノムコピー数の減少が観察されたことから、ウイルスゲノムにも損傷が起きていることが示唆された。

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する。

B. 研究方法

昨年度までに、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、感染研・村上班と実験プロトコルの確認を行った。今年度はそのプロトコルに乗っ取り、加熱による GII.4 型ヒトノロウイルスの不活化効果を、*in vitro* ウイルス増殖系を用いて検討した。

C. 研究結果

これまでに、25℃で1時間静置しても HuNoV の *in vitro* 複製には影響がないことが報告されているため、25℃に設定したブロックインキュベーターに HuNoV をセットし、設定温度を 85℃、もしくは 60℃に上げて、設定温度に達してからの時間を振って検討した。その結果、85℃では5秒という短時間で完全に不活化された。しかし、ブロックインキュベーター用いた場合、25℃から 85℃に温度が上がるのに5分ほど要しており、85℃になるまでの間に不活化されていることが考えられた。そこで、ウイルス液の容量を減らし、より温度制御が早く正確な PCR 機を用いて再検

討した。85℃では1分以内に完全に不活化されており、60℃、65℃ではわずかに複製能が残る結果となった。60℃、65℃での加熱では、1分と10分で HuNoV の不活化の程度は変わらなかった。

D. 考察

85℃での検討では、1分以上の加熱で、感染に用いるウイルス液中のゲノムコピー数がすでに減弱していた。この結果は、85℃で1分前後の加熱により、HuNoV のタンパク変性のみならず、ゲノムに損傷が入ることを強く示唆するものである。低温調理などで用いられる 60℃程度の加熱の場合も、1分程度で 90%以上のウイルス不活化が認められたが、反応時間を延長してもその効果に変化は認められなかった。感染研・村上班では、60℃の加熱によっても完全に不活化されるという結果が得られている。この相違に関しては、実験に用いた PCR 機種の違いや、リアルタイム PCR を 2-step で行うことにより、検出限界の値が小さくなっていることが考えられる。

E. 結論

85℃の加熱では、比較的早い段階で HuNoV の不活化が認められ、代替ウイルスを用いた場合と同様の結果が得られた。60℃前後による不活化に関しては、今後も条件を変えて（特に加熱時間）検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tamiya S, Matsumoto N, Kurokawa S,

Nakamura Y, Takahashi Y, Sakon N, Inoue M, Koike Y, Uchida K, Yuki Y, Ushijima H, Kiyono H, Sato S., H and B Blood Antigens Are Essential for In Vitro Replication of GII.2 Human Norovirus. Open Forum Infect Dis, 2024, 12(1):ofae714.

2) Fujimoto K, Hayashi T, Yamamoto M, Sato N, Shimohigoshi M, Miyaoka D, Yokota C, Watanabe M, Hisaki Y, Kamei Y, Yokoyama Y, Yabuno, Hirose A, Nakamae M, Nakamae H, Uematsu M, Sato S., Yamaguchi K, Furukawa Y, Akeda Y, Hino M, Imoto S, Uematsu S., An enterococcal phage-derived enzyme suppresses graft-versus-host disease. Nature, 2024, 632(8023):174-181.

3) Watanabe M, Uematsu M, Fujimoto K, Hara T, Yamamoto M, Miyaoka D, Yokota C, Kamei Y, Sugimoto A, Kawasaki N, Yabuno T, Sato N, Sato S., Yamaguchi K, Furukawa Y, Tsuruta D, Okada F, Imoto S, Uematsu S., Targeted lysis of Staphylococcus hominis linked to axillary osmidrosis using bacteriophage-derived endolysin. J Invest Dermatol, 2024, 144(11):2577-2581.

2. 学会発表：

1) 佐藤慎太郎. H and B blood antigens are essential for in vitro replication of GII.2 human norovirus. 第71回日本ウイルス学会学術集会. 2024.11/4-6. 愛知県.

2) 佐藤慎太郎. ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を用いたノロウイルス, サポウイルスのアルコール不活化の評価. ウイルス性下痢症

研究会 第35回学術集会. 2024.11/3. 愛知県.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし