

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）
「食品取扱現場における効果的なウイルス汚染対策の策定のための研究」
分担報告書

水試料を用いたウイルス検査と NGS の検討

研究分担者	遠矢 真理	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	斎藤 博之	秋田県健康環境センター
	國吉 杏子	国立医薬品食品衛生研究所
	南村 幸世	国立医薬品食品衛生研究所

研究概要

食品中に含まれるウイルスは微量であることが多く、ウイルスの濃縮が食中毒検査における重要な点となる。さらに、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、科学的根拠として精確な情報を提示につながる。しかし現在、食中毒検査ではウイルスの核酸検出のみが基本的に行われており、遺伝子配列の解析体制まではまだ十分に整備されていない。

そこで本研究では、食品検査への応用を見据えた基礎的検討として、下水試料を用いてポリエチレングリコール（PEG）沈殿法によるウイルスの濃縮を実施した。さらにその濃縮産物からウイルス検出、および次世代シーケンサー（NGS）を用いたウイルス配列データに関する検討を行った。

本研究結果から、PEG 沈殿法によるウイルス濃縮から、リアルタイム PCR による検出、さらに NGS による配列解析までの一連の流れにおいて有用な知見が得られた。本研究成果は食品検体からのウイルス検出法の確立からその後の解析への応用につながるため、食中毒調査への導入について引き続き検討を進める。

A. 研究目的

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く、ウイルスの濃縮が食中毒検査における重要な点となる。ウイルス濃縮方法の検討は、昨今の下水疫学手法の発展から様々な新規手法が提唱されている。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。食中毒を起こすウイルスは発症前や不顕性感染者からも排泄されるので、下水を利用した疫学調査は感染症発生動向調査の対象外となる病原体も検知可能である。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り、将来に向けた食中毒防止に向けた対策へ寄与する。さらに次世代シーケンサー（NGS）を用いた遺伝子配列解析手法を、食中毒検査に早期に導入することが期待され

ているが、まだ研究上での利用のみであり、実際の検体などでは評価はできていない。

そこで本研究では、PEG 沈殿法を用いて、下水検体からリアルタイム PCR により食中毒関連ウイルスの検出を行った。検出対象ウイルスとしては、食中毒の原因となる、ノロウイルス GI (NoV GI) , GII (NoV GII) , サポウイルス (SaV) , A 型肝炎ウイルス (HAV) および E 型肝炎ウイルス (HEV) を検出対象とし、調査を行なった。一部検体については NGS を行い、出力される配列データに関する検討を行った。

B. 研究方法

1) 試料検体

2020 年 1 月～2024 年 12 月に秋田市内の下水処理場にて流入水を毎月採取し (2020 年 11 月を除く) , 合計 59 検体を解析した

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、オーバーナイトで処理を行った。沈殿処理後、10,000g で 30 分間の遠心を行い、沈渣を収集後、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。

3) リアルタイム PCR

RNA の抽出後、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems 社) で cDNA 合成を行なった。Real-time PCR は国立感染症研究所の病原体検出マニュアルに従い、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) を用いて行った。検出の判定は、Real-time PCR 法において Ct 値によらず、増幅が認め

られた (閾値を超えた) 検体を陽性と判定した。

4) NGS 解析

陽性検体については、増幅産物の精製を行い、PCR barcoding kit を用いてライブラリサンプルの調整を行った後に、NGS (Nanopore 社 Flongle フローセル使用) で配列の取得を試みた。

C. 研究結果

1) ウイルスの検出率

各ウイルスの検出率は、NoV GI: 54.2% (32/59 検体) , NoV GII: 76.3% (45/59 検体) , SaV: 57.6% (34/59 検体) , HAV 0% (0/59) , HEV: 11.9% (7/59 検体) であった。2020 年 9 月, 10 月, 2021 年 2 月, 8 月, 2022 年 9 月はどのウイルスの検出も認められなかった。HEV は 2020 年 1 月, 3 月, 12 月, 2021 年 9 月, 2022 年 3 月, 11 月, 2023 年 11 月の下水から検出された (図 1) 。

2) NGS 解析

NGS で配列の取得を行ったところ、7 検体から HEV の配列が検出され、Genotype3 が検出された。また検出されたリードの多くは、遺伝子型のサブタイプまでの細かな分類結果は出なかったものの、一部の配列は 3a, 3b, 3k と同定された。

D. 考察

NoV の大規模な流行は冬季ではあるものの、NoV GI および GII の両方もしくはどちらか片方が本来の流行季節ではない夏季でも検出されていた (図 1) 。SaV も同様に、流行が起こる冬季以外の季節でも検出されていた。一方肝炎ウイルスでは、HAV の検出は 5 年間で一件も認められず、感染症発生動向調査においては、2020 年から 2023 年の間

において秋田県では A 型肝炎の患者は報告されていなかった。HAV は下水でも検出されていないことから、秋田市内において不顕性感染が起こっている可能性は低いと考えられた。さらに、本調査の結果から、一部の下水から HEV の配列が検出された。感染症発生動向調査においては、秋田県では 2020 年に 2 名 (2 月, 6 月), 2022 年に 1 名 (11 月) で E 型肝炎の患者報告がされているが, 2021 年, 2023 年の患者数は 0 名であった。HEV は E 型肝炎患者が報告されていない年でも下水で検出されており, HEV 不顕性感染者の存在が示唆された。さらに, HEV の遺伝子配列解析では国内のヒト由来 HEV (献血由来の HEV) と一致しており, 病原体サーベイランスで探知されなくても病原体の存在を探知できるという NGS 解析の有効性が示唆された。

E. 結論

本研究結果から, PEG 沈殿法によるウイルスの濃縮から, リアルタイム PCR によるウイルスの検出, さらに NGS によるウイルスの配列の解析までの一連の流れにおいて有用

な知見が得られた。本成績は食品検体からのウイルス検出法の確立から先の解析までの応用につながる。今後は, 同様の試験を食品サンプルでも試験し, NGS のウイルス性食中毒の実態調査への実践的な導入について検討を進めたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表:

1) 下水疫学による食中毒関連ウイルスの流行調査, 遠矢 真理, 南村 幸世, 國吉 杏子, 斎藤 博之, 岡 智一郎, 上間 匡. 第 46 回日本食品微生物学会学術総会, 2025 年 9 月 18—19 日.

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

陽性と判定された箇所に○をつけて表示

ウイルス	2020年												2021年												2022年											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NoV GI		●	●	●	●	●		●				●	●		●	●				●		●	●	●		●	●		●	●			●	●	●	
NoV GII	●	●	●	●	●	●	●	●				●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
SaV		●	●			●				●		●	●		●	●			●		●	●			●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	
HAV																																				
HEV	○		○									○														○									○	

ウイルス	2023年												2024年											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nov GI	●		●					●	●	●		●	●					●					●	●
Nov GII	●	●	●	●	●	●	●	●	●			●	●		●			●		●	●	●	●	●
SaV																								
HAV																								
HEV	●		●	●	●	●		●	●	●		●	●					●		●	●			

図 1. 各ウイルスの検出状況