

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

ロングリードメタゲノム解析を用いたウイルス検出法に関する検討

研究分担者 元岡 大祐 大阪大学び生物病研究所

研究概要

ウイルス性食中毒では、原因食品や汚染経路の特定が困難な事例が少なくなく、既存のリアルタイム PCR で対象外となるウイルスや、変異により検出効率が低下するウイルスに対応するため、網羅的な遺伝子検出法の整備が重要である。本分担研究では、食品検体や水試料への応用を見据え、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析によるウイルス検出法の基盤整備を進めてきた。本年度は、ノロウイルス陽性糞便から抽出した RNA を用いてメタゲノムショットガンライブラリを作製し、ウイルス核酸濃縮後にショートリードおよびロングリードシーケンサーで解析した。その結果、ショートリード解析ではノロウイルス由来リードが全リードの 18～32%であったのに対し、ロングリード解析では 63～85%を占め、平均して 7 割以上がノロウイルス由来であった。総リード数が少ない条件でも効率よくウイルス由来リードが得られ、ウイルス核酸濃縮とロングリード解析の組み合わせが、ウイルス検出およびゲノム情報取得に有用である可能性が示された。

A. 研究目的

食中毒発生時には、原因食品および汚染経路を迅速に推定し、被害拡大を防止することが重要である。ヒトノロウイルスなどの食中毒原因ウイルスでは、リアルタイム PCR を中心とした標的検査法が広く用いられているが、対象ウイルスを事前に想定する必要がある、未知または変異したウイルスへの対応には限界がある。また、食品中のウイルス量は極めて少ないことが多く、食品由来核酸や細菌由来核酸などの夾雑物により検出感度が低下する可能性がある。したがって、多様な食品や水試料に対応し、想定外のウイルスも検出可能な網羅的検出法の整備は、食品衛生上重要な課題である。

本研究班では、食品取扱現場におけるウイルス汚染対策の策定に向け、食品からのウイルス検出法の整備、通知法原案の作成、ならびに NGS を用いた網羅的ウイルス遺伝子検出法の基本手順作成を目標としている。令和 4～6 年度の検討では、各種食品処理・核酸抽出法を用いた添加回収試験により、メタゲノム解析で添加ウイルスを検出できることを確認した。一方で、食品処理法や夾雑核酸が検出効率に影響すること、ウイルスターゲットキャプチャーによる濃縮が感度向上に有効であることも示された。

本年度は、限られたシーケンス量で効率よくウイルス由来リードを取得することを主な目的とした。食品検体や水試料への応用を見据

え、ポータブル型ロングリードシーケンサーである Nanopore シーケンサーを用い、ウイルス核酸濃縮後のメタゲノム解析における検出効率をショートリードシーケンサーと比較した。ノロウイルス陽性糞便を陽性サンプルとして用い、ライブラリ調製、核酸濃縮、シーケンサー種、データ解析の各工程がウイルス検出効率に与える影響を整理し、今後の食品検体への適用に向けた基礎データを得ることを目的とした。

B. 研究方法

1. 検討の位置づけ

本年度は、実際の食品検体を用いた大規模な添加回収試験ではなく、NGS 基本手順の最適化に重点を置いた。食品検体ではウイルス量が少なく、食品由来核酸や細菌由来核酸の影響も大きいため、まずウイルス陽性であることが確認されているノロウイルス陽性糞便を用い、ウイルス核酸濃縮後にショートリード解析とロングリード解析で得られるウイルス由来リードの割合を比較した。本検討は、食品由来検体そのものの検出限界を決定する試験ではなく、前処理後の核酸を対象に、どのシーケンス方式が効率的にウイルスリードを取得できるかを評価する基礎検討として位置づけた。

2. サンプル調製およびライブラリ作製

ノロウイルス陽性糞便から RNA を抽出し、逆転写により cDNA を合成した。得られた cDNA を用いてメタゲノムショットガンライブラリを調製した。糞便検体では、ウイルス陽性であっても細菌、宿主、食物残渣などに由来する核酸が大部分を占めることが

想定されるため、ライブラリ調製後にウイルス核酸を濃縮する工程を組み込んだ。濃縮後ライブラリを用いて、ショートリードシーケンサーとロングリードシーケンサーの比較を行った。ショートリード解析には DNBSEQ を、ロングリード解析には Nanopore シーケンサーを用いた。解析対象は 7 検体とし、各検体について総リード数、ノロウイルス由来リード数、総リードに占めるノロウイルス由来リード割合を算出した。

3. データ解析

得られたシーケンスリードについて、品質確認および必要な前処理を行った後、Kraken2 を用いて生物種アノテーションを実施した。ノロウイルス由来と分類されたリード数を集計し、総リード数に対する割合を算出した。解析結果は、ショートリード解析とロングリード解析の間で比較し、ウイルス検出効率、必要シーケンス量、食品検査法への応用可能性の観点から評価した。本年度の解析では、ウイルス由来リードの絶対数だけでなく、全リードに占めるウイルス由来リード割合を主要な評価指標とした。これは、メタゲノム解析では総データ量が同じでも、夾雑核酸が多い場合にはウイルス検出に寄与する有効リード数が低下するためである。

C. 研究結果

1. ウイルス核酸濃縮後のメタゲノム解析

ノロウイルス陽性糞便由来 RNA を用いたメタゲノム解析において、ウイルス核酸を濃縮した後にシーケンスすることで、ショートリード解析およびロングリード解析のいずれにおいても、ノロウイルス由来リードを明瞭

に検出することができた。糞便メタゲノム解析では、通常、細菌などウイルス以外に由来する核酸が大部分を占めるが、濃縮工程を導入することで、解析リードの相当部分をノロウイルス由来リードとして取得できることが確認された。

各検体の解析結果を表 1 に示す。ショートリード解析では、総リード数は約 5,000 万リードであり、ノロウイルス由来リード割合は 18～32%であった。一方、ロングリード解析では、総リード数は約 400 万リードであり、ノロウイルス由来リード割合は 63～85%であった。

2. ショートリード解析とロングリード解析の比較

7 検体の合計では、ショートリード解析で 375,426,259 リードが得られ、そのうち 91,771,095 リード (24.4%) がノロウイルス由来であった。ロングリード解析では 31,066,041 リードが得られ、そのうち 23,046,071 リード (74.2%) がノロウイルス由来であった。ロングリード解析の総リード数はショートリード解析の約 8.3%であったが、全リードに占めるノロウイルス由来リード割合は約 3 倍高かった。

検体ごとの割合で比較しても、ショートリード解析におけるノロウイルス由来リード割合は平均 24.6%であったのに対し、ロングリード解析では平均 75.3%であった。すべての検体でロングリード解析の方がノロウイルス由来リード割合が高く、ウイルス核酸濃縮後のメタゲノム解析において、Nanopore シーケンサーが効率的にウイルス由来リードを取得できることが示された。

D. 考察

本年度の検討では、ウイルス核酸濃縮後のライブラリに対して Nanopore 解析を行うことで、ショートリード解析より高い割合でノロウイルス由来リードを取得できることが示された。メタゲノム解析では、標的外核酸が多い場合に検出効率が低下するため、実用化に向けてはシーケンス量の増加だけでなく、前処理やライブラリ調製段階でウイルス由来リードの割合を高めることが重要である。

本検討は、食品検体への応用に先立ち、陽性であることが明確なノロウイルス陽性糞便を用いて、濃縮後ライブラリから効率よくウイルスリードを取得できるかを評価したものである。ロングリード解析では、比較的少ない総リード数でもウイルス由来リード割合が高く、検出に加えてゲノム情報取得にも有用である可能性が示された。特に、ロングリードでは連続した配列情報を得やすいため、今後、型別や分子疫学的解析への応用も期待される。

一方で、本年度の検討は食品検体そのものを対象としたものではなく、食品中ウイルスの検出限界を直接示すものではない。また、食品由来阻害物質、水試料中の夾雑物、ウイルス種の違いが検出効率に与える影響については未検証である。今後は、食品・水試料処理法と組み合わせた添加回収試験および実検体での検証が必要である。

E. 結論

本年度は、ノロウイルス陽性糞便を陽性サンプルとして用い、ウイルス核酸濃縮後のメタゲノム解析におけるショートリードシーケ

ンサーと Nanopore シーケンサーの比較を行った。その結果、ショートリード解析ではノロウイルス由来リード割合が 18～32%であったのに対し、ロングリード解析では 63～85%であり、平均して 7 割以上のリードがノロウイルス由来であった。

以上より、ウイルス核酸濃縮と Nanopore 解析の組み合わせは、少ない総リード数でも効率的にウイルス由来リードを取得できる有用な方法であり、食品検体や水試料における網羅的ウイルス遺伝子検出法の基本手順作成に向けた有望な基盤技術であると考えられた。今後は、食品処理法および水試料処理法との組み合わせ、検出限界、再現性、判定基準を検討し、実際のウイルス性食中毒発生時に活用可能な検査法としての実用化を目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tabe C, Motooka D, Fujita T, Makiguchi T, Taima K, Tanaka H, Itoga M, Ishioka Y, Akita T, Ishidoya M, Chubachi K, Fukushima T, Tanaka Y, Odagiri H, Kameyama Y, Kobori Y, Tasaka S, Fujii H. The gut microbiota as a potential biomarker in patients with EGFR-mutant lung cancer. *Sci Rep*. 2025.

2) Kotaki T, Akieda Y, Chen Z, Onishi M, Komatsu S, Motooka D, Omori H, Tamiya

S, Kanai Y, Minami S, Kawagishi T, Sakon N, Sato S, Ishitani T, Kobayashi T.

Recovery of infectious recombinant human norovirus using zebrafish embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2025 Dec 9;122(49):e2526726122.

3) Kotaki T, Kanai Y, Onishi M, Sakai Y, Motooka D, Chen Z, Enoki Y, Komatsu S, Hirai K, Minami S, Kawagishi T, Ushijima H, Kobayashi T. Single-round infectious rotaviruses with deletions of VP7 or VP4 genes, based on SA11 and WC3 strain backbones, and their potential use as viral vectors. *PLoS Pathog*. 2025 Sep 15;21(9):e1013484.

4) Lin NY, Fukuoka S, Koyama S, Motooka D, Turlousse DM, Shigeno Y, Matsumoto Y, Yamano H, Murotomi K, Tamaki H, Irie T, Sugiyama E, Kumagai S, Itahashi K, Tanegashima T, Fujimaki K, Ito S, Shindo M, Tsuji T, Wake H, Watanabe K, Maeda Y, Enokida T, Tahara M, Yamashita R, Fujisawa T, Nomura M, Kawazoe A, Goto K, Doi T, Shitara K, Mano H, Sekiguchi Y, Nakamura S, Benno Y, Nishikawa H. Microbiota-driven antitumour immunity mediated by dendritic cell migration. *Nature*. 2025 Aug;644(8078):1058-1068.

5) Shirai T, Motooka D, Ushikai Y, Komano J, Shioda T, Iida T, Sakon N. Molecular epidemiology of human sapovirus based on the surveillance of wastewater and patients with acute gastroenteritis in

Osaka, Japan. Sci Total Environ. 2025 Jul 10;985:179622.

2. 学会発表・講演等

- 1) 白井 達哉, 元岡 大祐, 牛飼 裕美, 駒野 淳, 塩田 達雄, 飯田 哲也, 左近 直美、大阪府の下水および臨床検体から検出されたヒトサポウイルスの分子疫学的解析. 日本ウイルス学会学術集会, 2025 年 10 月 28～30 日, アクトシティ浜松.
- 2) 元岡大祐. メタゲノム解析による臨床検体や環境試料からの病原体探索. ベックマン・コールター社オンラインセミナー, 2025 年 6 月 19 日, オンライン.

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