

# ウイルス性下痢症研究会第 34 回学術集会プログラム

会場: 宮城県保健環境センター 本庁舎 1F 大会議室 〒983-0836 宮城県仙台市宮城野区幸町 4 丁目 7-2

2023 年 9 月 25 日 (月) 12:15 開場 (12:30 からオンライン参加者の接続開始予定)

\*会場参加者はオンライン接続不可

## 12:40 - 12:55 「2023 年度 総会」

司会: 上間 匡 (国立医薬品食品衛生研究所)、岡 智一郎 (国立感染症研究所)

## 13:00 - 13:40 「話題提供 1」

座長: 左近 直美 (大阪健康安全基盤研究所)

「ノロウイルスはどう進化するのか?」

演者: 当广 謙太郎 (米国食品医薬品局 (US FDA))

## 13:50 - 14:50 「トピックス 1 下痢症ウイルスの動向」

座長: 山元 誠司 (大阪健康安全基盤研究所)

1. 「三重県における感染性胃腸炎患者検体からの下痢症関連ウイルス検出状況 (2017~2023 年現在)」  
演者: 楠原 一 (三重県保健環境研究所)
2. 「福岡県における classic、MLB、VA を含むアストロウイルスの検出状況について (2019 年~2022 年)」  
演者: 上田 紗織 (福岡県保健環境研究所)

## 15:00 - 16:20 「話題提供 2」

座長: 牛島 廣治 (日本大学)

1. 「ウマロタウイルス感染症」  
演者: 根本 学 (日本中央競馬会 競走馬総合研究所)
2. 「遡及型下水疫学調査による COVID-19 流行開始前後での下痢症ウイルス流行状況の変化の解析」  
演者: 北島 正章 (北海道大学)
3. 「第 8 回 国際カリシウイルス学会の紹介」  
演者: 林 豪士 (国立感染症研究所)

**16:30 – 17:30 「トピックス2 感染性ウイルスを用いた研究」**

座長：坂上 亜希恵（宮城県保健環境センター）

1. 「下痢症ウイルス汚染牡蠣に関する研究」

演者：大島 千尋（水研機構 水産技術研究所）

2. 「ヒトカリシウイルス(ノロウイルス/サポウイルス)の実態に肉薄する  
＝サポウイルス培養系確立のその後と応用でみえてきたこと＝」

演者：高木 弘隆（国立感染症研究所）

会員からの情報提供・閉会挨拶

18:00 閉場

# 抄録

## 話題提供 1

### ノロウイルスはどう進化するのか？

当廣 謙太郎

米国食品医薬品局（US FDA）生物学的製剤評価研究センター ウイルス製剤部門

ロタウイルスワクチンが導入されて以降、ヒトノロウイルスは最も重要な急性胃腸炎起因ウイルスである。ヒトノロウイルスその遺伝子配列の違いに基づいて分類される。そのため、ノロウイルスの遺伝子配列データベースは近年大きく増大し、GenBank 上では 50,000 以上のノロウイルス配列データを確認出来る。そこで米国食品医薬品局 ウイルス製剤部門 胃腸炎ウイルスユニットでは、これら膨大な遺伝子配列データを用いて、ノロウイルスの分子疫学と進化メカニズムの解析を行っている。GenBank 上に公開されているデータは年代・地域に偏りがあり、解読されている遺伝子領域についてもデータバイアスが存在する。そこでまず、1970-2000 年代に検出された検体や、データが不足している南米・アフリカ地域の検体、さらに出生コホートで得られた数週間にわたって同一の小児から排出された検体からノロウイルスの全長ゲノムを再解析し、遺伝子配列データベースの拡充を行ってきた。その結果、未知の遺伝子型や遺伝子組替えも含めたノロウイルスの遺伝子多様性・宿主間/内進化の一端を垣間見ることができた。小児における中長期のウイルス感染・宿主内進化がグローバルレベルでのノロウイルス遺伝子多様性に大きく寄与しており、とりわけ GII.4 と非 GII.4 型のノロウイルス進化パターンの違いに寄与していることが示唆された。つまり、宿主内での選択圧が変異パターンを決定づけており、GII.4 型のカプシドタンパク質では宿主内で生じた非同義コドンの変異が既存の配列に取って代わって宿主間で広がっていくのに対し、非 GII.4 型では同義コドン変異が多く、生じた変異が宿主内で優位となり宿主間で広がるといった例も少なかった。現在は、1970 年代-2020 年代に検出されたウイルスの遺伝子配列データから遺伝子変異のパターンを抽出し、その変異メカニズムと進化可能性の解明を目指している。

では、遺伝子変異による抗原性の違いはどれほどあるのだろうか。ワクチン開発・評価をする上で、ウイルスの抗原性解析は非常に重要である。当ユニットでは、特に疫学的に重要な GII.4 型に注目し、ウイルス様粒子（VLPs）及びモノクローナル抗体ライブラリーの作成、抗原性部位の特定、そして 1995 年以降に出現した GII.4 変異株の抗原性マップの作成を行ってきた。興味深いことに、エピトープ上の遺伝子変異と抗原性の変化は必ずしも相関しているわけではなく、変異によって生じた免疫優勢の変化と抗原部位同士の相互作用の変化が、GII.4 の抗原多様性を生み出している。今後、抗原性や免疫優勢パターンを決定する因子の同定とともに、遺伝子配列データから抗原性を予測できるようなツールの開発を目指す予定である。



## トピックス 1-1

### 「三重県における感染性胃腸炎患者検体からの下痢症関連ウイルス検出状況 (2017～2023 年現在)」

○楠原 一<sup>1)</sup>、小林章人<sup>1)</sup>、川合秀弘<sup>1)</sup>、福田美和<sup>2)</sup>、岩出義人<sup>2)</sup>、浅井隆治<sup>2)</sup>

三重県保健環境研究所

1)衛生研究室・微生物研究課、2)企画調整室・疫学研究課

#### 1. はじめに

三重県では三重県感染症発生動向調査事業に基づき、県内の病原体定点医療機関等より搬入された感染性胃腸炎患者検体の病原体検査を行っている。検査結果は三重県保健環境研究所年報に掲載しており、また三重県感染症情報センターのホームページで最新の情報を見ることができる。我々はこれまでの結果から、2017～2022 年に発生した感染性胃腸炎において、サポウイルスは GI.1 を中心に多様な遺伝子型のウイルスが関与しており、2 シーズンに一度はノロウイルスと同等以上に流行していたことを明らかにした<sup>1)</sup>。

#### 2. 対象病原体と検出方法

当研究所において、感染性胃腸炎の病原体検査の対象となっている下痢症関連ウイルスは、ノロウイルス、サポウイルス、A 群ロタウイルス、アストロウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルスである。検査方法は、国立感染症研究所の病原体検査マニュアルを中心に、研修会等で紹介された検査法も取り入れて行っている。現在、ノロウイルスの検査は Capsid 領域を標的としたリアルタイム PCR 法を行い、陽性例は Dual-typing 法により遺伝子型を決定している。ノロウイルス以外の検査は、コンベンショナル PCR 法を用いている。PCR の標的は、サポウイルス、アストロウイルスおよびエンテロウイルスは Capsid 領域、A 群ロタウイルスは VP7 遺伝子、アデノウイルスはヘキソン C4 領域で、得られた PCR 産物の塩基配列を基に遺伝子型を決定している。遺伝子のタイピングは、ウェブ上のタイピングツールや BLAST 検索、系統樹解析により行っている。

#### 3. 感染性胃腸炎の発生動向と検査依頼数(検体数)

2017～2022 年の三重県における定点当たりの週別患者報告数は 0.68～14.27 人(平均 4.12 人)であり、警報レベルの 20 人を超えた週はなかった<sup>2)</sup>。この期間に採取され、当研究所に搬入された感染性胃腸炎の検査依頼数は 703 検体であった。2017～2019 年の検査依頼数は年間 150 検体以上あったが、2020 年以降は新型コロナウイルス感染症流行の影響により減少した。また、週別患者報告数と月別検査依頼数および検査の陽性率の増減には類似傾向が見られた(図 1 参照)。

#### 4. 下痢症関連ウイルスの検出状況

搬入された検体 703 検体中 387 検体(55.0%)から下痢症関連ウイルスの遺伝子等が検出された。このうち 20 検体は 2 種類のウイルス遺伝子が検出された混合感染事例であった。検出された計 407 件のウイルスの内訳は、ノロウイルスが 145 件(GI が 14 件、GII が 131 件)で最も多く、次いでサポウイルス

が 96 件(GI が 50 件、GII が 42 件、GIV が 1 件、GV が 3 件)、アデノウイルスが 55 件(うち 40/41 型は 47 件)、アストロウイルスが 39 件、エンテロウイルスが 31 件(コクサッキーウイルスが 17 件、エコーウイルスが 14 件)、A 群ロタウイルスが 30 件、ライノウイルスが 11 件であった。

### 5. 下痢症関連ウイルスの季節消長

ノロウイルスとサポウイルスは 1 年を通して多く検出されたが、特に冬期におけるノロウイルスの検出率が高かった。一方、アデノウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルスは夏期、A 群ロタウイルスは春期に検出率が高くなる傾向が見られた。

### 6. おわりに

2017～2022 年のノロウイルスとサポウイルスは、散発例から流行の主体となるものまで、それぞれ 9 つの遺伝子型のウイルスが検出された。また、2022 年はアデノウイルス 41 型が台頭し、例年検出数が多いノロウイルスやサポウイルスの数を上回った<sup>3)</sup>。感染性胃腸炎は多様なウイルスが関与しているため、病原体検索により流行の趨勢を把握することは、本疾患を理解する上でも重要である。本講演では、2017 年以降の感染性胃腸炎患者検体からのウイルス検出状況の詳細について、2023 年上半期も含めて紹介したい。

### 7. 参考

- 1) IASR 44: 62-64, 2023
- 2) <https://www.kenkou.pref.mie.jp/weeklyss/4.html>
- 3) 三重県保健環境研究所年報 24: 37-40, 2022

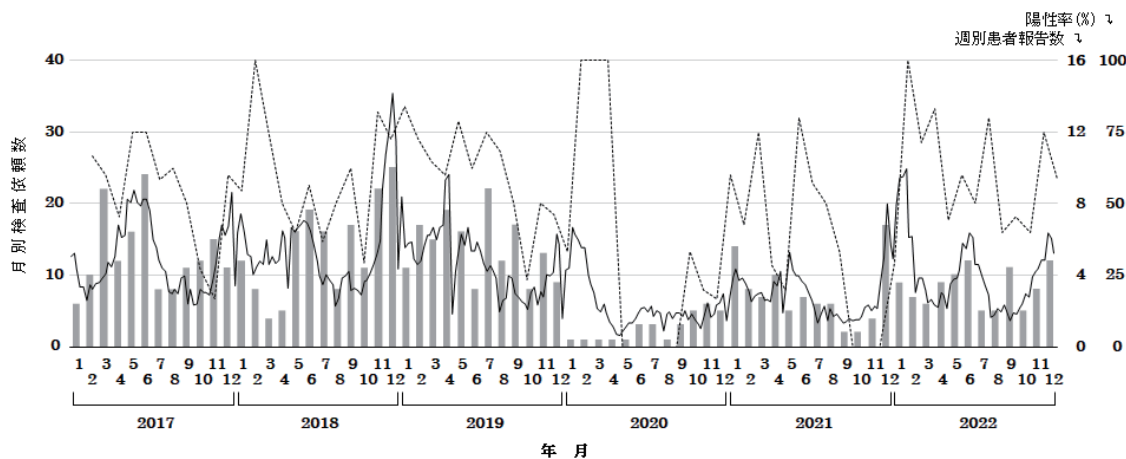


図1 2017～2022年における週別患者報告数・月別検査依頼数・陽性率

■ 月別検査依頼数, — 週別患者報告数, --- 陽性率

## トピックス 1-2

### 福岡県における classic、MLB、VA を含むアストロウイルスの検出状況について (2019 年～2022 年)

上田紗織、小林孝行、中村麻子、金藤有里、芦塚由紀

福岡県保健環境研究所

#### 【はじめに】

アストロウイルスは、特に小児において感染性胃腸炎を引き起こす公衆衛生上重要なウイルスである。アストロウイルスには、classic HAstV (HAstV1-8) と、2008 年頃から報告されている MLB HAstV (MLB1-3) および VA HAstV (VA1-5) の 3 種類の遺伝子型がある。近年、急性脳炎患者の糞便から MLB HAstV が検出されるなど、classic HAstV 以外の遺伝子型が胃腸炎以外の症状を引き起こす可能性が示唆されており<sup>1)</sup>、classic HAstV 以外の遺伝子型の流行実態の把握が重要である。我々はこれまでに、福岡県の終末処理場の流入水中から classic HAstV、MLB HAstV、VA HAstV を検出しており、福岡県においてこれら 3 種類の遺伝子型が流行していることを推察している。しかし、現在福岡県において人由来検体からのアストロウイルス検出に使用しているプライマー Mon269/Mon270 (以下、Mon269/Mon270) は、MLB HAstV 及び VA HAstV を検出できないため、両遺伝子型の流行状況を把握できていない。今回、3 種類の遺伝子型を検出できるプライマー SF0073/SF0076<sup>2)</sup> (以下、SF0073/SF0076) を用いて臨床検体からアストロウイルスを検出し、福岡県における流行状況の把握を試みたので報告する。

#### 【材料と方法】

検査材料には、2019 年 1 月から 2022 年 12 月にかけて福岡県感染症発生動向調査事業において県内 (福岡市、北九州市を除く) の医療機関で採取された糞便検体 246 検体を使用した。検体の疾患内訳について表 1 に示す。糞便検体から RNA を抽出し、ORF1b 領域の一部を標的とした SF0073/SF0076 および ORF2 領域の一部を標的とした Mon269/Mon270 を用いて PCR を行った。アストロウイルスが検出された検体について、ダイレクトシーケンスにより塩基配列決定した。

#### 【結果】

2019 年から 2022 年までに採取された 246 検体のうち、13 検体からアストロウイルスが検出された。本研究で検出されたアストロウイルスの遺伝子型について表 2 に示す。SF0073/SF0076 を用いた場合、Mon269/Mon270 で陰性であった 3 検体から MLB1、1 検体から MLB2 および 1 検体から VA2 が検出された。また、1 検体は、Mon269/Mon270 では陰性であったが、SF0073/SF0076 では HAstV1 が検出された。



アストロウイルス感染症の主要な遺伝子型である HAstV1 は 2019 年から 2022 年にかけて毎年検出された。一方、MLB HAstV と VA HAstV は、2019 年または 2021 年に検出された。2019 年には、MLB1 が 2 検体、VA2 が 1 検体検出され、2021 年は、MLB1 と 2 の 2 種類の遺伝子型が 1 検体ずつ検出された。

アストロウイルスは HAstV1 の 1 検体のみ手足口病から検出され、その他の遺伝子型はすべて感染性胃腸炎から検出された。

### 【まとめ】

本研究より、SF0073/SF0076 を用いることで、Mon269/Mon270 で陰性であった検体から MLB1、MLB2 及び VA2 が検出された。このことから、本研究で用いた方法は、遺伝子型ごとの流行を把握する上で有用と考えられた。

今回の結果より、福岡県では 2019 年から 2022 年にかけて、classic HAstV に加え、MLB HAstV や VA HAstV が流行していることが考えられた。国内では、2012 年頃にアストロウイルスの 3 種類の遺伝子型が検出されていることに加え<sup>3)</sup>、これまでの研究で、福岡県では、2018 年に classic HAstV の他に MLB 1 が検出されており、2018 年以前からアストロウイルスの 3 種類の遺伝型が流行していたことが予想される。3 種類の遺伝子型について、流行状況を把握するため、より遡って調査するとともに、今後も継続して流行状況を把握することが重要である。

### 【参考文献】

- 1) Sato *et al.*, J Clin Virol. 2016, 78:66-70.
- 2) Finkbeiner, S. R. *et al.*, Virol. J. 2009, 6:161.
- 3) Khamrin *et al.*, J Med Virol. 2016, 88(2):356-60.

表1 本研究で使用した糞便検体の疾患内訳

疾患名	検体数
感染性胃腸炎	216
手足口病	15
無菌性髄膜炎	5
ヘルパンギーナ	3
突発性発しん	3
RSウイルス感染症	2
咽頭結膜熱	1
その他	1
合計	246

表2 2019年～2022年に検出されたアストロウイルスの遺伝子型別

検体番号	発病年月日	性別	年齢	診断名	使用したプライマー	
					SF0073/SF0076	Mon269/Mon270
1	2019/6/29	女	1歳1ヶ月	手足口病	HAstV 1	陰性
2	2019/7/22	女	0歳11ヶ月	感染性胃腸炎	HAstV 1	HAstV 1
3	2019/10/21	女	1歳3ヶ月	感染性胃腸炎	MLB1	陰性
4	2019/12/22	男	1歳4ヶ月	感染性胃腸炎	MLB1	陰性
5	2019/12/21	男	2歳4ヶ月	感染性胃腸炎	VA2	陰性
6	2020/1/11	女	0歳10ヶ月	感染性胃腸炎	HAstV 1	HAstV 1
7	2020/1/16	男	0歳8ヶ月	感染性胃腸炎	HAstV 1	HAstV 1
8	2020/1/19	女	1歳0ヶ月	感染性胃腸炎	HAstV 1	HAstV 1
9	2021/8/27	男	5歳0ヶ月	感染性胃腸炎	HAstV 1	HAstV 1
10	2021/9/12	女	1歳1ヶ月	感染性胃腸炎	MLB2	陰性
11	2021/11/25	男	2歳1ヶ月	感染性胃腸炎	HAstV 1	HAstV 1
12	2021/12/26	男	2歳9ヶ月	感染性胃腸炎	MLB1	陰性
13	2022/1/18	女	1歳0ヶ月	感染性胃腸炎	HAstV 1	HAstV 1

## 話題提供 2-1

### 「ウマロタウイルス感染症」

日本中央競馬会 競走馬総合研究所  
根本 学

本発表では、ウマの A 群ロタウイルス感染症を解説する。ウマロタウイルスは、他動物と同様に子馬（特に 3 か月齢以下）に感染し、下痢等の消化器症状を引き起こす。日本では、1990 年代前半までは G3P[12]のウイルスのみが支配的に流行していたが、1990 年代後半に G14P[12]のウイルスが検出された。その後現在まで、G3P[12]および G14P[12]のウイルスが両方流行している。日本以外の国においても、G3P[12]および G14P[12]のウイルスが流行している。全ゲノム解析によって 11 分節の遺伝子型が明らかとなっており、G3P[12]ウイルスは G3-P[12]-I6-R2-C2-M3-A10-N2-T3-E2/E12-H7、そして G14P[12]は G14-P[12]-I2-R2-C2-M3-A10-N2-T3-E2/E12-H7 である。ウマロタウイルスは、他動物の A 群ロタウイルスと比較して遺伝子型がよく保存されていることが特徴的である。また、他動物からウマへの種を超えた感染例は少ない。これまでに、G8P[1]、G10P[11]、G3P[3]、G5P[7]、G6P[5]が報告されているが、これらは他動物のロタウイルス由来と考えられている。全ゲノム解析の結果、G8P[1]および G10P[11]はウシ由来、G3P[3]はネコおよびイヌ由来、G5P[7]はブタ由来、G6P[5]はウシおよびウシ由来のヒトロタウイルス由来であると考えられている。しかしこれらの遺伝子型のウイルスはその後ウマに定着していない。

日本では、2001 年から不活化ワクチンが日生研株式会社から市販されている。1990 年代前半当時の疫学を基に開発されたため、G3P[12]のウイルスのみをワクチン株として使用している。このワクチンは、初乳にロタウイルスに対する抗体を豊富に含ませる目的で、分娩前の妊娠馬にワクチンを接種する。そして生まれた子馬は初乳摂取し、ロタウイルスに対する受動免疫を獲得する。生後 1 か月未満の子馬が感染し発症することがあり、子馬自体を免疫しても効果が薄いため妊娠馬を免疫する方法を採用していると考えられる。複数の野外試験から、ワクチンはロタウイルス感染を完全に防ぐことはできないが、下痢の期間を短縮し、臨床症状を緩和することが示唆されている。

ワクチンには G3P[12]のウイルスしか入っていないが、現在 G3P[12]および G14P[12]のウイルスが同程度流行している。G14P[12]に対する G3P[12]ワクチンの有効性を評価した研究がなかったため、ワクチン接種した妊娠馬の血清とマウスモデルにて評価した。G3P[12]ワクチンを接種した妊娠馬の血清は、G3P[12]だけでなく G14P[12]のウイルスに対しても中和抗体を有していたが、その抗体価は G3P[12]ウイルスに対する抗体価と比較して低かった。またマウスモデルでは、G3P[12]ワクチンは G3P[12]ウイルスに対して有効であったが、G14P[12]ウイルスに対しては効果が低かった。逆に、G14P[12]ワクチンは G3P[12]と G14P[12]の両方のウイルスに対して有効だった。P 遺伝子型が同じであるため、G3P[12]ワクチンが G14P[12]ウイルスに対してある程度効果を有していると考えられる。理想的には、ワクチン株として G14P[12]ウイルスを追加することが望ましいと考える。



## 話題提供 2-2

### 「遡及型下水疫学調査による COVID-19 流行開始前後での 下痢症ウイルス流行状況の変化の解析」

○北島正章（北海道大学 大学院工学研究院 環境工学部門）  
安藤宏紀（アリゾナ大学 公衆衛生大学院）

下水疫学調査は、COVID-19 流行開始後にその流行状況を把握するためのツールとして社会的に大きな期待と注目を集めてきた<sup>1)</sup>。下水試料は、当該地域の公衆衛生情報を含む貴重な疫学情報源であり、定期的に採取し凍結保存する「下水バンキング」により過去の感染状況を解明することが可能である。言い換えれば、下水バンキングは現実的に可能な唯一の網羅的公衆衛生情報保管手段であり、感染症の発生・侵入状況を時系列で追跡する上で極めて有用である。我々は、世界最高レベルの感度を誇る下水中ウイルス検出手法である EPISENS-M (Efficient and Practical virus Identification System with ENhanced Sensitivity for Membrane) 法を開発し<sup>2)</sup>、この手法を用いて COVID-19 流行以前の 2018 年 10 月から札幌市において継続的に採取し凍結保存しておいた下水試料からの A 型インフルエンザウイルスおよび RS ウイルスの検出調査を実施した。その結果は、COVID-19 流行開始後の厳しい感染症対策の副次的効果により季節性インフルエンザ及び RS ウイルス感染症が抑制されたことを裏付けるとともに、遡及的な下水疫学調査を可能とする下水バンキングの有効性を実証するものであった<sup>3)</sup>。

ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルスなどの下痢症ウイルスについても COVID-19 流行開始後に報告感染者数が減少したとの報告があるが、医療機関等における検査キャパシティや感染者の受診行動等によるバイアスの影響も否定できない。一方、下水疫学調査ではそのようなバイアスの影響を受けない客観的なデータを取得することができるため、COVID-19 流行がウイルス性下痢症に与えた影響を解明する上では非常に有効なツールとなり得る。そこで我々は、上述の 2018 年 10 月以降の凍結保存下水検体に対して、EPISENS-M 法によりノロウイルス (GI, GII, GIV)、ヒトサポウイルス、A 群ロタウイルス、アイチウイルスの定量検出調査を実施した。その結果、これらの下痢症ウイルスについても COVID-19 流行開始後は開始前に比べて検出率・濃度ともに低下する傾向が認められた。

一方で、その低下傾向は A 型インフルエンザウイルスや RS ウイルスに比べると緩やかであり、COVID-19 の感染対策が他のウイルス感染症に与える副次的効果はウイルス性呼吸器感染症とウイルス性下痢症では異なることが示唆された。これは、呼吸器ウイルスと下痢症ウイルスの感染経路の違い、ウイルス学的構造・性状（エンベロープの有無等）や消毒剤等への感受性の差異などによるものと推察される。

下水バンキングは、ポストコロナ社会において、ウイルス性下痢症を含む感染症の疫学情報アーカイブとしての活用が期待される。本講演では、COVID-19 流行開始前後での下痢症ウイルスの流行状況の変化について、下水バンキングによる遡及型調査に基づく解析結果の詳細を紹介する。

## References

- <sup>1</sup> Kitajima M, Ahmed W, Bibby K, Carducci A, Gerba CP, Hamilton KA, Haramoto E, Rose JB. SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Science of the Total Environment*, 739, 139076, 2020.
- <sup>2</sup> Ando H, Murakami M, Ahmed W, Iwamoto R, Okabe S, Kitajima M. Wastewater-based prediction of COVID-19 cases using a highly sensitive SARS-CoV-2 RNA detection method combined with mathematical modeling. *Environment International*, 173, 107743, 2023.
- <sup>3</sup> Ando H, Ahmed W, Iwamoto R, Ando Y, Okabe S, Kitajima M. Impact of the COVID-19 pandemic on the prevalence of influenza A and respiratory syncytial viruses elucidated by wastewater-based epidemiology, *Science of the Total Environment*, 880:162694, 2023.

## 話題提供 2-3

### 第 8 回 国際カリシウイルス学会の紹介

国立感染症研究所 ウイルス第二部 林 豪士、岡 智一郎

2023 年 5 月 7～11 日にオランダ ロッテルダムで第 8 回国際カリシウイルス学会が対面形式で開催された。主催者によると参加登録者は約 230 名。口演会場、ポスター会場各 1 つにカリシウイルス研究者が集った。我々も参加・発表してきたので、ヒトに下痢症を引き起こすノロウイルス、サポウイルスを中心に抜粋して紹介する。

発表はノロウイルスによるものが圧倒的に多かった。新型コロナウイルスの影響により海外でもノロウイルスの検出はこの期間少なくなっていたようだ。世界各地ともに依然、GII.4 sydney が主流株とのこと。新たな GII.4 クラスター株の紹介もあった。臨床検体・下水等環境水ともに従来の RT-PCR 産物の解析に加え、NGS の導入が進んだ。

ヒトノロウイルスの感染性評価系を導入した発表が増加し、阻害化合物評価やウイルス不活化条件評価に利用されていた。Caco-2、BJAB 細胞の報告がなくなり、小腸オルガノイドとゼブラフィッシュを用いた系の発表がメインとなった。いずれもウイルス感染・増殖能は評価できるがウイルス分離はできないことが大きな課題である。新たな系として唾液腺細胞でのヒトノロウイルス増殖も報告されていたが、この系でもウイルスストックは得られていないとのこと。小腸オルガノイドに関して、15 の遺伝子型（4 GI、11 GII 遺伝子型）のヒトノロウイルスがオルガノイド内での増殖することや大人由来と比較して、幼児由来オルガノイドでよりヒトノロウイルスの感受性が高いなどの新たな知見も発表された。病原メカニズム解析、特に当該解析に有用なツールである遺伝子改変オルガノイドを用いた宿主因子研究の発表は僅かであり、また阻害薬研究に関しても、ヒトノロウイルス感染培養系を用いたハイスループットの系は確立されておらず、これらの研究を行う上で、代替ウイルス（マウスノロウイルス）を用いた研究の重要性・必要性は失われていないことが分かった。多くは in vitro の研究発表であったが、ヒトノロウイルスのサルを用いた感染実験や、ネコカリシウイルスが感染した猫を用いた増殖阻害薬（PSSNa）の効果（ウイルス量の減少、症状の緩和）の結果も興味深かった。培養系に依存しないウイルス感染性代用解析法として、ウイルスゲノムの完全性を検出する Long RT-PCR 法を用いた評価系の報告もあった。

サポウイルスについての検出報告、小腸オルガノイドを用いたサポウイルス増殖に関する発表もあった。ヒト十二指腸由来細胞株を用いる系ではサポウイルスの分離が達成できている。

第 9 回国際カリシウイルス学会は 3 年毎のスケジュールに戻すため、2 年半後の 2025 年秋に カナダ アルバータで開催することが会場参加者の投票で決まった。



## トピックス 2-1

### 「下痢症ウイルス汚染牡蠣に関する研究」

国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産技術研究所  
環境・応用部門 水産物応用開発部 安全管理グループ  
大島 千尋

日本では年間 16 万トンほどのカキが生産されており、カキは日本で養殖される貝類の代表種である。また、カキは世界的にも生食文化のある水産物で、加工品も含めて国産のカキがアジアやヨーロッパに輸出されている。しかしながら、ISO 基準の厳しい検査によりノロウイルスが検出され、シップバックを余儀なくされることもあり、それが大きな損失を生んでいる。

カキのノロウイルス汚染を防ぐには、清浄海水域での生産が有効である。しかし、国内のカキ生産者が漁場を変更することは難しく、また、下水処理システムの入替も現実的ではない。そのほか、これまでの研究から高圧処理によりカキ中のノロウイルスが低減することが明らかになっているが、機器の導入コストが高額であるため普及していない。そのため、ノロウイルスに汚染されたカキから浄化等でウイルスを低減させる技術の開発が求められている。また、カキ中のウイルスの低減量を体系的に調べる必要があるとされている。本講演では、カキのノロウイルス汚染対策に関して、浄化効果検証用のウイルス汚染カキ試料作成方法の確立から、各種浄化方法による浄化効果の検証結果について報告する。

#### 1) 人為的にノロウイルスに汚染させたカキ試料作製法の確立

はじめに、浄化によるカキ中のノロウイルス低減を検証するのに使用する、人為的なノロウイルス汚染カキ試料の作製法を検討した。カキのノロウイルス汚染は、過去の報告に倣ってカキの飼育海水にノロウイルスを接種し、その中で畜養することで実施した。飼育海水の pH、温度、塩濃度の変化や給仕の有無により、カキのノロウイルス取込量がどのように変化するか調べ、その結果からカキが効率よくノロウイルスを取り込む条件を選定し、ノロウイルス汚染カキ試料作製法とした。

また、カキの生活環によりノロウイルス取込量に違いがあるのかどうかを、年間を通して検証し、明らかにした。

#### 2) 浄化によるカキ中のノロウイルス低減効果の検証

次に、ノロウイルス汚染カキ試料を用いて、生産地で実施されているような清浄海水での畜養によるノロウイルスの低減効果を検証した。その結果、6 日間の畜養後も一度カキに取り込まれたノロウイルスが残存していることが明らかとなった。また、畜養海水に、鮮魚介類への使用が認められている次亜塩素酸ナトリウムを添加した場合においても、カキ中のノロウイルスが低減しなかった。

そのほか、海水の pH や水温を変化させた場合の浄化効果についても検証を行った。

#### 3) カキのウイルス対策におけるノロウイルス代替ウイルスとしてのサポウイルスの有用性の検証



カキのノロウイルス汚染対策に関する研究は、ノロウイルスの代替ウイルスである FCV や MNV が用いられることが多かったが、この方法にはノロウイルスの蓄積や低減量を十分に評価できていないという懸念があった。そのため、我々はノロウイルスを用いて汚染カキ試料を作成し試験研究を行っていた。しかし、新型コロナウイルス感染症の広がり等により、ノロウイルス検体(患者便)を入手することが非常に困難となった。

そのような状況下で、サポウイルスが、カキのノロウイルス研究に代替ウイルスとして利用できないか検証した。サポウイルスは、国立感染症研究の高木らにより培養系が確立されている<sup>1)</sup>ためウイルス供給量に不安がなく、ノロウイルスと同じヒトの下痢症の原因ウイルスであること、カキからの検出報告があることなどから、ノロウイルスの代替ウイルスとして活用できると考えた。

ノロウイルスと同様にカキ飼育海水にサポウイルスを接種し畜養したところ、カキ中腸腺内にサポウイルスが蓄積されることを確認した。また、それを清浄海水でしばらく畜養しても、中腸腺中のサポウイルスが浄化されないことが明らかとなった。このことから、サポウイルスがノロウイルス代替ウイルスとしてカキのウイルス汚染対策研究に活用できる可能性が示唆された。

さらに、国際的にはサポウイルスによる汚染が原因でカキがシップバックされる事例も発生していることから、今後カキにおけるサポウイルス汚染にも注意するべきであり、本研究の成果は今後の研究の発展に大きく寄与すると考えられた。

1) Takagi H., Oka T. et al., Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. Proc. Nat. Acad. Sci.; 117 (50) 32078-32085, 2020.

## トピックス 2-2

ヒトカリシウイルス(ノロウイルス/サポウイルス)の実態に肉薄する  
=サポウイルス培養系確立のその後と応用でみえてきたこと=

高木 弘隆

国立感染症研究所 安全実験管理部 第7室

2020年12月にヒトサポウイルス GI.1 および GII.3 培養系発表し、本研究会第32回学術集会で紹介させていただいた。その後、培養手法の若干の改良や HuTu 細胞の継代数によるウイルス増殖効率の向上など当該培養系において unknown だった部分が垣間見えてきている一方で、GIV.1 のように培養増殖に至っていないものも存在しており、目下継続検討中である。今回は当該培養系を活用し、以下に示す実践的な検証等の試みを中心に紹介したい。

### (1)農水省 RS 事業におけるノロウイルス代替としてサポウイルスの活用

カキのノロウイルス低減に関する研究という課題で令和3年より参画した。ここではカキを人工汚染させる材料として、陽性便検体(粗精製)を使用するため、その量的確保やウイルス感染性の不確からしさを常に抱えながら検証を継続していた。参画ミッションとしてはサポウイルス培養サンプルを用いて、ノロウイルスと同様にカキを汚染させた場合の中腸腺への取り込みや保持の状態を比較し、代替汚染ガキとし、様々なウイルス低減検証に応用可能か否かという試みを検討することであった。参画を強く推薦していただいた野田衛先生には改めて深謝したい。

汚染工程やウイルス取り込みについては、前段の大島先生のご発表に一任するが、まずは汚染ガキ中腸腺からのウイルス検出について、従来の方法(ISO 準拠)と新規前処理を加えた方法でのウイルス RNA 検出の比較を紹介する。

また汚染時に負荷したウイルスのクリアランス確認の可否に関わる「汚染海水からのノロウイルス回収と検出に関する手法開発」について紹介したい。

前者は食品サンプルからのノロウイルス/サポウイルス検出においても十分応用可能な前処理方法であり、後者はイオン交換樹脂や陰荷電膜法では成功せず、実践的に活用できる手法が存在していなかったものである。

### (2)長期保存糞便検体からのサポウイルス検出および分離培養

昨年第33回学術集会の発表で、西村先生ご自身が体験されたサポウイルス感染例について、保存温度が不確定な長期保存糞便検体および使用済みティッシュを供与していただき、これらからのサポウイルス検出および分離培養を試みた。便サンプルはすべて RT-PCR 陽性となり、RT-qPCR では 1/22 および 1/23 のサンプルでは乳剤 1mL あたり約  $2E+08$  copies であった。

比較的 RNA コピー数の高かった 1/22-1/24 までの 3 サンプルを HuTu80 細胞に接種したところ、1/22 および 1/23 の培養上清でウイルス RNA コピー数の顕著な上昇が認められた。このことから「感染性粒子が糞便中で比較的安定であること」が示唆された。

### (3)トピック：下痢症ウイルス？パレコウイルス感染例における一考

COVID-19 が 5 類感染症に移行する前後より、パレコウイルス感染症の依頼検査要請が少しずつ増えてきた。本年春先は新生児での事例のみであり、血清からの検出・分離が主体となったが、4 月以降成人例が散見された。直近で依頼のあった流行性筋痛症例では熱発/感冒様症状から筋力低下に至るまで 5 日を要し入院となったが、軟便症状だけは継続していたようだ。山川らの報告<sup>1)</sup>でも筋痛症では便からの検出・分離が有効であることが示唆されており、また「呼吸器感染症」として 33-34°C でウイルス分離を試みたとしても、増殖至適温度が高いものも多いため、分離に至らないケースが増えるであろう。腸管感染症ウイルスとしての対応を考えるべきでは？を踏まえ、改めて一考するデータを紹介したい。

そのほか、ヒトカリシウイルス培養についてのトピックも紹介する予定である。

### 参考文献

- 1) 「パレコウイルス 3 型感染に伴う成人の流行性筋痛症 17 例の検討」  
山川達志、水田克巳、黒川克朗、永沢光、山田尚弘、鈴木恵美子、和田学  
臨床神経学 57 巻 9 号 p485-491. 2017.