

令和 7 年 6 月 18 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2024

課題番号：20K02339

研究課題名（和文）食品のウイルス汚染を評価するための高感度新規汚染指標マーカーの検討

研究課題名（英文）Investigation of highly sensitive novel indicator markers for assessing the risk of viral contamination in ready-to-eat (RTE) foods.

研究代表者

山元 誠司（Yamamoto, Seiji）

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主任研究員

研究者番号：20649008

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：そのまま食べることのできる冷凍ベリー類などのRTE食品がノロウイルスやA型肝炎ウイルスに汚染されていると食中毒事件に発展することがあるが、これらのウイルス汚染は極微量のヒトふん便汚染によりもたらされるため、その汚染リスクを評価するためには高感度にふん便汚染を検出できる指標が必要である。本研究では、その指標としてヒトの腸内に優位に存在するバクテロイデスという細菌の一種に着目し、その検出特異性ならびに検出感度を高める方法をそれぞれ開発した。また、実際に市場に流通している冷凍ベリー類を用いて調査を行い、冷凍ベリー類における汚染リスクの評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で極微量のヒトふん便汚染の指標として用いたバクテロイデスは嫌気性の細菌であるため環境中では増殖せず、それが食品上に存在することはヒトふん便汚染の可能性を示唆する。市場の冷凍ベリーと調査したところ、その25%でヒトの腸内に優位に存在するバクテロイデス種を検出した。東京都が2014年（平成26年）に、またアメリカのFDAが2019～2022年に行った調査では、ノロウイルスおよびA型肝炎ウイルスをそれぞれ0%および3.85%、0.51%および0.64%から検出している。本研究の結果は、ウイルス検出に伴うヒトふん便汚染リスクの判明は氷山の一角であり、実際の汚染リスクはさらに高いことを示している。

研究成果の概要（英文）：Ready-to-eat (RTE) foods such as frozen berries, which can be consumed without further preparation, may sometimes lead to outbreaks of foodborne illness if contaminated with norovirus or hepatitis A virus. Since such viral contamination can result from extremely small amounts of human fecal matter, a highly sensitive indicator capable of detecting fecal contamination is essential for accurate risk assessment. In this study, we focused on Bacteroides species that are predominantly present in humans, and developed methods to improve both the specificity and sensitivity of their detection. In addition, we conducted an investigation using commercially available frozen berries to assess the contamination risk in these products.

研究分野：ウイルス感染症

キーワード：バクテロイデス RTE食品 ノロウイルス A型肝炎ウイルス

1. 研究開始当初の背景

(1) ウイルス性胃腸炎の原因ウイルスの代表であるノロウイルスは、感染から **24~48** 時間後に下痢や嘔吐などの消化器症状を惹起する。一方、**A** 型肝炎は、**A** 型肝炎ウイルスに感染することにより引き起こされる急性肝炎であり、感染後 **2~6** 週間の潜伏期間を経たのちに発症するため、その原因の遡り調査には難儀することも多い。これらのウイルスは糞口感染で伝播するが、わずか **10** 個ほどのウイルス粒子を口にただけで感染が成立することもあるため、ウイルスを含む極微量のふん便に汚染された食品を介した食中毒も多い。ウイルスは加熱により失活するものの、そのまま食べることでできる **RTE** 食品が加工後にウイルスに汚染されている場合、ウイルスが不活化されることなく口に運ばれることになる。特にベリー類(ストロベリー、ラズベリー、ブルーベリー等)は洋生菓子やスムージーなどの原料として加熱せずに食することが多く、汚染された冷凍ベリー類が生産国から輸出されることにより、国をまたいだ **diffuse outbreak** に発展することもある。これまでの海外の食中毒事例や各国での調査報告書などから、ベリー類のウイルス汚染の原因としては、生産工程での不適切な灌漑や施肥、使用水の汚染のほか、収穫や包装段階での手や器具からの汚染が可能性として挙げられている。しかしながら、ウイルス検査は食品がそのウイルスを含むふん便に汚染されている場合には有効な手段であるが、ふん便にウイルスが含まれていない場合には、ウイルス検査ではそもそもの元凶であるふん便汚染の程度に関する情報は得られない。

(2) 環境や食品のふん便汚染の指標として一般的に用いられているのは大腸菌を標的とした大腸菌群であるが、大腸菌はヒトや動物のふん便だけでなく、土壌、水、空気中に幅広く分布して生育しているため、大腸菌汚染がヒトに由来する汚染のみを示しているわけではない。さらに、ふん便 **1 g** 中に含まれるウイルス量は多いときで $10^9 \sim 10^{11}$ (**10** 億 ~ **1000** 億) 個であるのに対し、大腸菌量は $10^8 \sim 10^9$ (**1** 億 ~ **10** 億) 個と少ないため、ウイルス量に見合った極微量のふん便汚染を評価することは難しい。実際、ヒトふん便中の微生物に占める大腸菌の割合は **0.1%** に満たず、そのほとんどはファーミキューテス (*Firmicutes*) やバクテロイデス (*Bacteroidetes*) の仲間が占める [Eckburg, 2005, Science]。バクテロイデスは、グラム陰性の偏性嫌気性非芽胞形成桿菌で環境中では生育できず、体内に多く存在し、種特異性 (あるいは優位性) が高く、ヒト以外の宿主に由来するバクテロイデスと区別可能であるため、**RTE** 食品におけるふん便由来ウイルス汚染のリスクを測る指標として利用できるポテンシャルを有している。

なお、これまでヒト優位 (**human-associated**) とされてきた *Bacteroides dorei* および *B. vulgatus* を含む一部の *Bacteroides* 属 **11** 種は *Phocaeicola* 属に属名が変更され、それぞれ *Phocaeicola dorei*、*P. vulgatus* となった[García-López, 2019, Front Microbiol] が、これらについても一括りに「バクテロイデス」と定義する。

2. 研究の目的

RTE 食品、特に冷凍ベリー類におけるヒトふん便汚染のリスクを、ヒト優位のバクテロイデスを高感度で検出することにより評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) プライマー/プローブ： 本研究で使用した既報のプライマー/プローブ：**27F** および **1492R** (**16S rRNA** を増幅するバクテリア共通のプライマーとして広く使用されている)、**Bac32F**、**Bac303R** [Bernhard, 2000, Appl Environ Microbiol]、**BacH_f**、**BacH_r**、**BacH_pC** (**FAM-MGB**)、**BacH_pT** (**FAM-MGB**) [Reisher, 2007, Lett Appl Microbiol]、ノロウイルス **GI**、ノロウイルス **GII**、**A** 型肝炎ウイルスを検出するプライマー/プローブ [国立感染症研究所 病原体検出マニュアル]。 *P. dorei*、*P. vulgatus* を特異的に検出するプライマー/プローブセット **Pdv-F**、**Pdv-R**、**Pdv-P** (**FAM-MGB**) は本研究でデザインした (後述)。

(2) 菌の培養： **10%**ヒトふん便乳剤 (**PBS**) をバクテロイデス選択培地 (アキュディア バクテロイデス培地 [島津製作所]) に塗布し、**37** の嫌気状態 (アネロパウチ・ケンキ [スギヤマゲン]) にて **2** 日間培養した (一次培養)。発育したコロニーを釣菌後、再度バクテロイデス選択培地に塗布し、**37** の嫌気状態にて **2** 日間培養した (二次培養)。二次培養で得られたコロニーを釣菌して **20** μ L の **RNase-free water** に懸濁して菌液とし、種々の遺伝子解析に使用した。

(3) 菌液中の菌の同定： 菌液、**27F** および **1492R** プライマー、**EmeraldAmp PCR Master Mix** [TaKaRa] を用いた **PCR** 産物 (**16S rRNA** 遺伝子) の塩基配列をサンガーシークエンス法により解読し、**BLAST** 解析によって種を同定した。

(4) 菌液を用いたリアルタイム PCR： 菌液、プライマー/プローブ、**TaqMan Universal PCR Master Mix** (サーモフィッシャー) を混合し、**QuantStudio 5** (サーモフィッシャー) によりリアルタイム PCR を行った。

(5) 食品検体の処理および核酸抽出： 市場に流通している冷凍ベリー類を購入した。冷凍ベリー約 **50 g** と **PBS 50 mL** を **EOG 滅菌瓶 (PP 広口、250mL)**(サンプラテック)に入れて激しくシェイクしてフィルトレイトバッグ (栄研化学) に移し、不織布フィルターを通過した液体 **40 mL** の PEG 沈により得られたペレットを **Proteinase K** および **キャリア RNA (yeast RNA)** 含有 **Buffer ATL** に懸濁し、**DNeasy Blood and Tissue Kit protocol (QIAGEN)** に準じた方法で核酸を抽出した。

(6) 食品検体由来核酸のバクテロイデス遺伝子解析： バクテロイデスを検出するために抽出核酸、**BacH_f**、**BacH_r**、**BacH_pC (FAM-MGB)**、**BacH_pT (FAM-MGB)**、**TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix** (サーモフィッシャー) を混合し、**QuantStudio 5** によりリアルタイム RT-PCR を行った。反応が見られた核酸は、**27F**、**Bac303R**、**SuperScript III** (サーモフィッシャー) による逆転写反応後、同じプライマーセットおよび **KOD One PCR Master Mix (TOYOBO)** を用いて **1st PCR** を行った。**1st PCR** 産物を **RNase-free water** で **50 倍希釈**したテンプレート、**Bac32F**、**BacH_r**、**KOD One PCR Master Mix (TOYOBO)** を用いて **2nd PCR** を行い、その増幅産物の塩基配列をサンガーシーケンシング法により解読し、**BLAST** 解析によって種を同定した。**P. dorei**、**P. vulgatus** を特異的に検出するリアルタイム RT-PCR では、**Pdv-F**、**Pdv-R**、**Pdv-P (FAM-MGB)**、**TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix** (サーモフィッシャー) を用いた。

(7) 食品検体由来核酸のウイルス遺伝子解析： ノロウイルス **GI**、ノロウイルス **GII**、**A 型肝炎ウイルス**を検出するために、抽出核酸、**random primer**、**SuperScript III** (サーモフィッシャー) による逆転写反応により得られた **cDNA**、それぞれのウイルスを検出するプライマー/プローブ、**TaqMan Universal PCR Master Mix** (サーモフィッシャー) を混合し、**QuantStudio 5** によりリアルタイム RT-PCR を行った。

(8) PCR 産物の NGS 解析： バクテロイデス遺伝子解析における一部の **2nd PCR** 産物について、**Rapid Barcoding Kit (Nanopore)** により調製したライブラリー、**R10.4 フローセル (Nanopore)**、**MinION (Nanopore)** を用いてアンプリコン解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト優位のバクテロイデス **P. dorei**、**P. vulgatus** を特異的に検出するために、これら 2 種とその他のバクテロイデスのゲノム配列を比較したところ、**TonB-linked outer membrane protein (QJR78334)** 領域において、この 2 種にのみ存在し、他種では欠損している領域を見出した。そこで、この領域にリアルタイム PCR 用のプライマー/プローブとして **Pdv-F**、**Pdv-R**、**Pdv-P (FAM-MGB)** を設計し、本研究でヒトふん便から分離したバクテロイデス (**Phocaeicola** 属、**Bacteroides** 属) を用いてリアルタイム PCR の反応性を検証した結果、**P. dorei** および **P. vulgatus** には反応したが、特に近縁な **P. massiliensis** を含むその他の近縁種 (**B. eggerthii**、**B. fragilis**、**B. koreensis**、**B. ovatus**、**B. stercoris**、**B. thetaiotaomicron**、**B. uniformis**) には反応しなかった (図 1)。すべての **Bacteroides** 属あるいは **Phocaeicola** 属に対して実験的検証はできていないが、前述の通りデータベース上では **P. dorei** および **P. vulgatus** のゲノム上にのみ存在する配列であることがリアルタイム PCR の反応性によって裏付けられた。

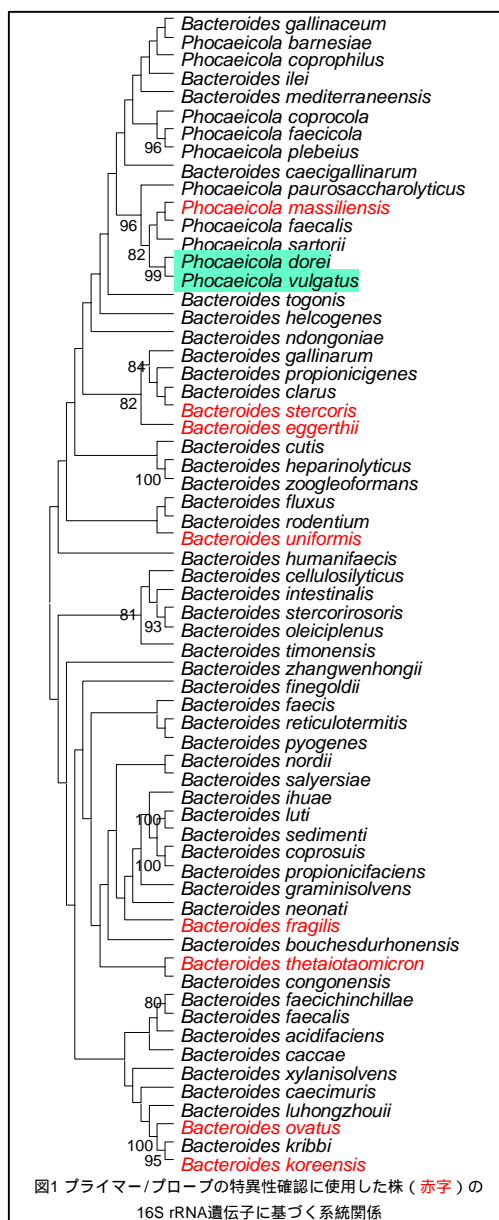
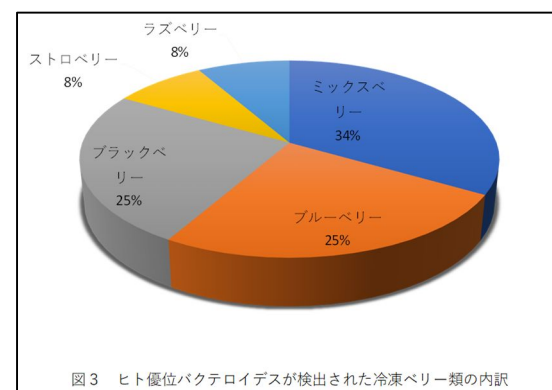
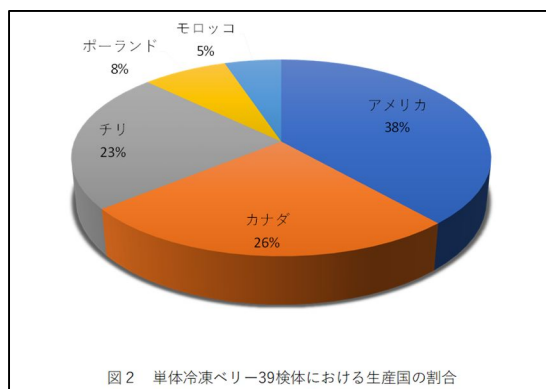


図1 プライマー/プローブの特異性確認に使用した株 (赤字) の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統関係

(2)高感度のリアルタイム PCR 反応系の検討： ヒト優位のバクテロイデス *P. dorei*, *P. vulgatus* を特異的に検出する Pdv プライマー/プローブの感度について、当該領域をクローニングしたコピー数既知のプラスミド DNA を用いてリアルタイム PCR で検討したところ、10~20 コピー/ウェルであった。これは、16S rRNA 遺伝子に対して設計された高感度の Bach プライマー/プローブ (Bach_f, Bach_r, Bach_pC (FAM-MGB), Bach_pT (FAM-MGB)) と同程度であった。一方で、*P. dorei* 菌体から抽出した核酸 (DNA および RNA を含む) を用いてリアルタイム PCR あるいはリアルタイム RT-PCR を実施したところ、Pdv プライマー/プローブを使用した場合には RT の有無で Ct 値は大きく変わらなかったが、Bach プライマー/プローブを使用した場合は RT の過程を経ることにより Ct 値が 9~10 程度低くなり、感度にして 500~1000 倍高くなった。これは、Pdv プライマー/プローブの標的遺伝子である TonB-linked outer membrane protein の転写量がわずかであることに対して、16S rRNA はリボソームの構成要素として大量に転写されているためであると考えられる。条件検討を行った結果、Bach プライマー/プローブではヒト優位のバクテロイデス以外にも反応してしまう恐れはあるが、RT により飛躍的に感度が高まるため、スクリーニングとしては Pdv プライマー/プローブよりも有効であると考えられた。

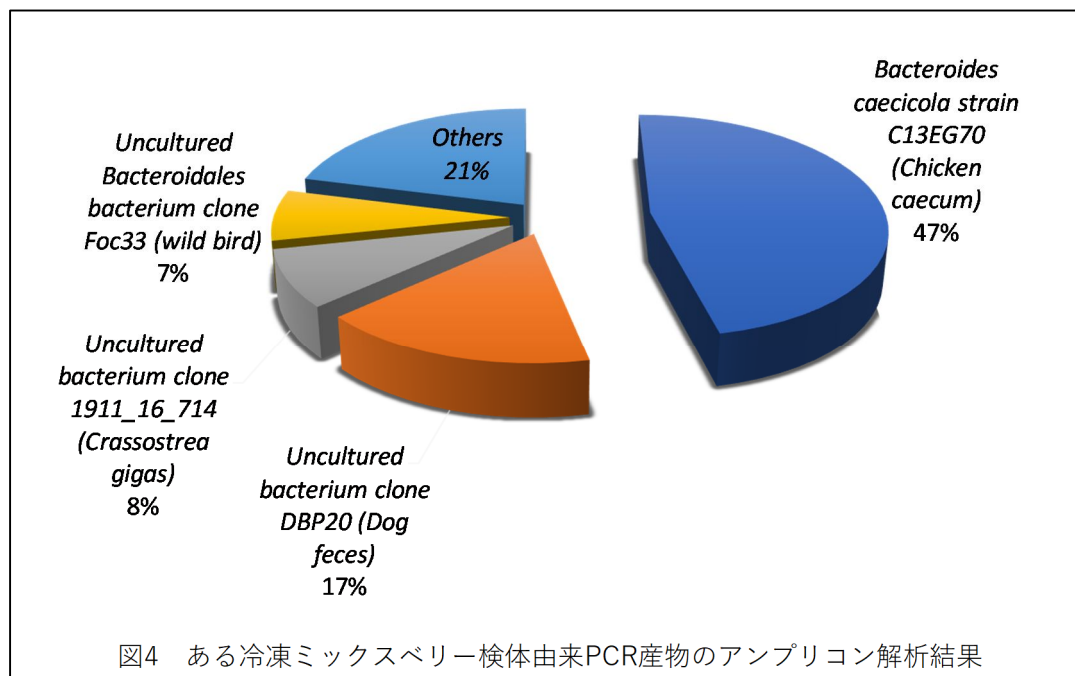
(3)食品のバクテロイデス検査法の確立： 冷凍ベリーなどの RTE 食品がウイルスに汚染された場合、基本的には食品の表面にウイルスが付着しているため、食品を PBS に浸して振とうし、その PBS を PEG 沈することによりウイルスを濃縮する方法が広く用いられてきた。PEG 沈の過程の遠心操作によってバクテロイデスも同時に濃縮されると考えられることから、ウイルスとバクテロイデスの同時検査が可能な方法である。また、例えば、1 mL の懸濁液にバクテロイデスが 1 個体含まれている場合に、そこから 100 µL を分取して核酸抽出に用いると、陽性になる確率 (バクテロイデスが含まれる確率) は 1 割であるが、1 mL の懸濁液が溶菌されるものであれば、1 個の菌体であってもそこから放出された 16S rRNA が液全体に拡散するため、そこから分取した 100 µL は遺伝子検査にて陽性となる。そのため、PEG 沈によるペレットの再懸濁には、溶菌のため Buffer ATL (Proteinase K とキャリア RNA 含有) を用いた。本法によって市販されている輸入冷凍ベリー 48 検体 (単体 39 検体 (図 2)、混合 9 検体) を検査したところ、33 検体 (68.7%) で Bach にて反応が見られ (Pdv プライマー/プローブではすべて陰性)、RT-nested-PCR およびサンガーシーケンス解析により 12 検体 (25.0%) からヒト優位のバクテロイデスである *P. dorei* あるいは *P. vulgatus* が検出された。一方、ノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルスはすべての検体で陰性であった。ヒト優位のバクテロイデスが検出された種類の内訳はミックスベリー 4 検体 (34%) と最も多かったが、ブルーベリー、ブラックベリー、ストロベリー、ラズベリーの単体から検出され (図 3)、これらの生産国はある 2 か国 (ここでは A 国、B 国とする) であり、この 2 か国のいずれかが陽性となったミックスベリーの生産国にも含まれていた。東京都が 2014 年 (平成 26 年) に輸入冷凍ベリー類 109 検体について、A 型肝炎ウイルスやノロウイルスを検査した結果によると、A 型肝炎ウイルスはすべての検体で陰性であったが、ノロウイルスが 4 検体 (3.8%) から検出された。また、アメリカの FDA



が 2019~2022 年に冷凍ベリー類 1,558 検体に対して行った調査では、A 型肝炎ウイルスおよびノロウイルスをそれぞれ 8 検体 (0.5%) および 10 検体 (0.6%) から検出した。これらのウイルス陽性率 (0.5%~3.8%) と本研究におけるヒト優位のバクテロイデス陽性率 (25%) を比較することで、ウイルス陽性となりヒトふん便汚染が判明するケースは、ごく一部に過ぎないことが示唆された。

(4) NGS 解析： RT-nested-PCR の増幅産物が確認されたもののうち、いくつかについて Nanopore を用いたアンプリコン解析 (NGS 解析) を実施した。その結果、ほとんどの検体では前出のサンガーシーケンス解析にて検出された種が大勢を占めていたが、ある冷凍ミックスベリーからは動物由来と考えられる複数の種が一定以上の割合で検出された (図 4)。最も多かったものはサンガーシーケンス法でも確認された *Bacteroides caecicola* (46.6%) で、これは Local BLAST 解析では鶏の盲腸由来の C13EG70 株に最も近縁で、次いで Uncultured bacterium clone DBP20 (Dog feces, 16.7%)、Uncultured bacterium clone 1911_16_714 (Crassostrea gigas, 8.3%)、Uncultured Bacteroidales bacterium clone Foc33 (wild bird, 7.3%)

に近縁な配列が多く検出された。動物種の特定は困難であるが、当該ミックスベリーは少なくともヒト以外のふん便によって汚染されていた可能性が強く示唆された。



5. 参考文献

A 型肝炎ウイルス検出マニュアル（第2版） 国立感染症研究所 平成30年12月
病原体検出マニュアルノロウイルス（第1版） 国立感染症研究所 令和元年6月
輸入ベリー類のA型肝炎ウイルス汚染実態調査 東京都 平成26年

Summary Report: Frozen Berries (Strawberries, Raspberries and Blackberries) FY 2019 – 2023 Microbiological Sampling Assignment - FDA

García-López M, Meier-Kolthoff JP, Tindall BJ, Gronow S, Woyke T, Kyrpides NC, Hahnke RL, Göker M. **Analysis of 1,000 Type-Strain Genomes Improves Taxonomic Classification of Bacteroidetes.** *Front Microbiol.* 2019.

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. **Diversity of the human intestinal microbial flora.** *Science.* 2005.

Reischer GH, Kasper DC, Steinborn R, Farnleitner AH, Mach RL. **A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive and specific detection of human faecal influence in spring water from a large alpine catchment area.** *Lett Appl Microbiol.* 2007.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村寛海、山元誠司、朝倉宏、阿部仁一郎
2. 発表標題 飲食店の調理環境におけるカンピロバクターの定量的汚染評価の試み
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------