

この試料が DNase 処理済みの抽出 RNA とした。

NV の検出 : NV 遺伝子の検出方法は、リアルタイム PCR 法および RT-PCR 法で行った。

リアルタイム PCR 法は、COGF/COGR プライマーと RING-TP Taqm Man プローブを用いた影山らの方法で行い、LightCycler で測定し、機知濃度(国立感染症研究所、西尾 治博士)の NV 陽性コントロールを用い、実測値で 10 コピー以上のものを陽性とした。

NV の検出 : NV 遺伝子の検出方法は、リアルタイム PCR 法および RT-PCR 法で行った。

リアルタイム PCR 法は、COGF/COGR と プライマーと RING-TP Taqm Man プローブを用いた影山らの方法で行い、LightCycler で測定し、機知濃度(国立感染症研究所、西尾 治博士)の NV 陽性コントロールを用い、実測値で 10 コピー以上のものを陽性とした。また、RT-PCR 法は、1st プライマーに G1 用として、COG1F/G1-SKR、Nested 用に G1-SKF/G1-SKR、G2 用として COG2F/G2-SKR、Nested 用に G2-SKF/G2 を用いた。

HAV の検出 : HAV 遺伝子の検出方法は、リアルタイム PCR 法および RT-PCR 法で行った。

リアルタイム PCR 法は、HAV449 プライマーと HAV557 プライマーを用い、プローブは Taqm Man プローブで HA+482-P-FAM を用いた。

RT-PCR は、HAV2799/3273(1st PCR)、HAV2907/3162(Nested PCR)プライマーを用いて実施した。

HEV の検出 : HEV の検出法は、RT-PCR 法を用い、プライマーは HECOM-S/HECM-AS(1st PCR)、TP-HECOM-AS(Nested PCR)を用いた、

表 1 検体の採取状況

採取月	産地	種類	件数	検体数
5	中国	アカガイ	2	6
		ハマグリ	1	3
	韓国	アカガイ	1	3
6	中国	アカガイ	2	6
		ハマグリ	1	3
	韓国	アカガイ	1	3
7	中国	ハマグリ	1	3
	韓国	アカガイ	3	9
8	中国	ハマグリ	1	3
	韓国	アカガイ	2	6
	ロシア	アカガイ	1	3
9	韓国	アカガイ	3	9
	ロシア	アカガイ	1	3
10	韓国	アカガイ	4	12
11	中国	アカガイ	2	6
	韓国	カキ	1	3
	台湾	トコブシ	1	3
12	中国	アカガイ	3	9
		ハマグリ	1	3
1	中国	アカガイ	3	9
	韓国	アカガイ	1	3
2	中国	アカガイ	3	9
		ハマグリ	1	3
計			40	120

### C 結果

2006 年 5 月～翌年 2 月までの期間に、輸入された生鮮魚介類からの NV、HAV について、リアルタイム PCR 法および RT-PCR

法で検出を試みたが、各検体(アカガイ、ハマグリ、カキ、とコブシ)から遺伝子は検出されなかった(表 2、3)。また、HEV についても、RT-PCR 法で遺伝子は検出されなかった(表 4)。

#### D 考察

生鮮魚介類のウイルス汚染は、国内外を問わず汚染して汚染していることが指摘されている。その原因はヒトが保有した腸管系ウイルスが排泄されると浄化されずに、魚介類の生息域に、その影響が反映されると考えられている。

今回、海外の 4 カ国から輸入されたアカガイ、ハマグリ、カキ、トコブシについて実施したが、NV、HAV、HEV 遺伝子は検出されなかった。これまでの調査では、NV が約 20%前後の汚染を示していたが、その原因については、個体差である可能性が考えられる。

今シーズンは、国内では NV による流行が例年よりも早い時期から始まり、全国各地で流行が確認され、遺伝子型は G2/4 が主流を占めていることが確認されている。この遺伝子は諸外国で初めて確認されているが、国内でも確認されている遺伝子で

あることから、大流行の原因が輸入生鮮魚介類で起こったとは思われない。

しかし、これらの遺伝子型が環境汚染を引き起こす可能性は十分考えられることから、魚介類、環境中の汚染については調査していく必要がある。

また、これらの検査法については、野田先生が報告したカキなどの中腸腺から高感度に検出するアミラーゼー混合法を実施して行きたいと考える。

#### E まとめ

平成 18 年 5 月～翌年 2 月の期間に、搬入された輸入生鮮魚介類について調査した。リアルタイム PCR 法、RT-PCR 法で検査した結果、40 件 120 検体から NV、HAV、HEV 遺伝子は検出されなかった。

#### F 健康危険情報

なし

#### G 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### H 研究発表

なし

表 2 輸入生鮮魚介類からの NV の汚染状況

種類	検体数	NV リアルタイム		NV RT-PCR	
		G1	G2	G1	G2
アカガイ	96	0/96	0/96	0/96	0/96
ハマグリ	18	0/12	0/12	0/12	0/12
カキ	3	0/3	0/3	0/3	0/3
トコブシ	3	0/3	0/3	0/3	0/3
計	120				

表 3 輸入生鮮魚介類からの HAV の汚染状況

種類	検体数	HAV リアルタイム	HAV RT-PCR	
			1st	Nest
アカガイ	96	0/96	0/96	0/96
ハマグリ	18	0/12	0/12	0/12
カキ	3	0/3	0/3	0/3
トコブシ	3	0/3	0/3	0/3
計	120			

表 4 輸入生鮮魚介類からの HEV 汚染状況

種類	検体数	HEV RT-PCR	
		1st	Nest
アカガイ	96	0/96	0/96
ハマグリ	18	0/12	0/12
カキ	3	0/3	0/3
トコブシ	3	0/3	0/3
計	120		

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

輸入生鮮魚介類および動物生肉のウイルス汚染の  
サーベイランスに関する研究

所属：東京大学大学院 医学系研究科 発達医科学教室

分担研究者：教授 牛島廣治

研究協力者：沖津祥子、Phan Gia Tung

研究要旨：中国福建省および日本国内4カ所（宮城県、茨城県、三重県、愛知県）産の加熱用カキを商店にて購入し、ノロウイルスゲノムの検出を nested-RT-PCR 法にて行った。陽性検体については genotype の決定、ウイルスコピー数の測定を行った。その結果、中国産カキでは 14.6%、日本産では 25.3%のカキからノロウイルスが検出された。ウイルスの genotype は両国産ともに急性胃腸炎に検出されることの多い GII/3 と GII/4 であった。ウイルスコピー数は  $10^2$  コピー以上が 95.3%であった。

A 研究目的：ノロウイルスは腸管感染症を引き起こす病原体として世界的に認知されており、散发性胃腸炎とともにさまざまな状況下で広範囲の年齢層に対して急性胃腸炎の集団感染を引き起こす。この研究では中国産輸入カキと日本産カキに対するノロウイルスのサーベイランスを行った。

B 研究方法：中国福建省産の加熱用カキと日本国内4カ所（産地：宮城県、茨城県、三重県、愛知県）を産地とする加熱用カキを東京都台東区の商店で2005年10月から2006年9月まで2週間に1パック購入した。日本産のカキは夏季（6月から）には出荷量は減少し、8月後半と9月には購入できなかった（表1）。各パックから5個ずつ取り、1個につき1検体とした。-30℃で保存後、分析時に解凍して用いた。いずれも1パックから5個を取り出し、1個につき1検体を作成した。中腸腺を取り出し、爪楊枝でよくつぶした後、凍結融解にて組織を破壊し蒸留水 140  $\mu$ l を加えて、10分間ボルテックスした。20分間シェーキングした後、6000  $\times$  g で20分遠心し、上清 140  $\mu$ l を中腸腺抽出液とした。QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen)にてRNAを抽出し、得られたRNAからcDNAを作成し、

semi-nested PCR 法にてノロウイルス GI と GII を検出した。陽性検体については配列決定を行い、genotype を決定した。さらに real-time PCR を用いて含まれるウイルス量を測定した。

C 結果：中国および日本産の加熱用カキからのノロウイルス検出率はそれぞれ 14.6% (130個中19個)、25.3% (95個中24個)であった（表2）。中国産カキからのノロウイルス検出は、7月から2月まで連続し、8月、10月、11月が最頻度であった（それぞれ21%）。一方日本産カキでは8月と9月を除く1年中検出され、最も頻度の高い月は3月と10月（20.8%）であった（図1、表1）。検出されたノロウイルスの genotype は2つのみで、GII/3 (Mexico virus cluster) と GII/4 (Lordsdale virus cluster) に属する virus であった（表3）。中国産では GII/4 が最も多く、78.9% (19個中15個) で、GII/3 は 21.1% (19個中4個) であった。これに対し日本産では GII/3 と GII/4 は同数（50%）であった。さらに興味深いことにどちら国の GII/4 株も Farmington Hill variant と Hunter variant として知られる cluster に属し、これらの株はアメリカやオーストラリアで多くの急性胃

腸炎の集団感染を引き起こしたことが知られている。ウイルスコピー数の測定結果では43個中41個(95.3%)で10<sup>2</sup>コピー以上が検出された(表4)。コピー数と genotype の間に関係は見いだされなかった。

D 考察: 加熱用のカキではノロウイルスが検出されることが、知られていたが、中国産のカキからも検出されることが明らかとなった。今回の研究で検出された株は急性胃腸炎の原因ウイルスとして、頻度の高い genotype であり、さらに海外で近年実際に集団発生が報告された variant virus であった。このことはこれらの株のウイルスが世界各地に遍在することを示している。日本産のカキは8月、9月を除き1年中検出された。中国産では7月から2月までの各月で検出された。なお、購入した商店で確認したところ、カキはすべて生であり、冷凍保存はしていないとのことであり、購入した日付と採取された日付が大きく異なっていることはないとのことであった。

E 健康危険情報: なし

F 研究発表:

1. 論文発表

1. Phan TG, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Nishimura T, Yagyu F, Okitsu S, Müller WEG, Maneekarn N, Ushijima H. Changing Distribution of Norovirus Genotypes and Genetic Characterization of Recombinant GIIB among Infants and Children with Diarrhea in Japan. *J Med Virol*. 78(7): 971-978, 2006.
2. Phan TG, Yagyu F, Kozlov V, Kozlov A, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Viral gastroenteritis and Genetic Characterization of Recombinant Norovirus among Infants and Children with Diarrhea in Eastern Russia. *Clin Lab* 52 (5-6): 247-253, 2006.
3. Phan TG, Yan H, Li Y, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Novel Recombinant Norovirus in China. *Emerg Infect Dis*. 12(5): 857-858, 2006.
4. Phan TG, Okitsu S, Müller WEG, Kohno H, Ushijima H. Identification of Novel Recombinant Sapovirus in Japan. *Emerg Infect Dis*. 12(5): 865-867, 2006.
5. Khamrin P, Maneekern N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals an evidence for human-animals multiple interspecies transmissions. *J Med Virol* 78(7):986-994, 2006.
6. Phan TG, Trinh OD, Yagyu F, Sugita K, Okitsu S, Muller WEG, Ushijima H. Outbreak of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Osaka City, Japan during during 2004-2005. *J Med Virol* 78(6):839-846, 2006.
7. Okame M, Akihara S, Hansman G, hainan Y, Thien Tuan Tran H, Phan TG, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple genotypes associated with acute gastroenteritis during 6-year survey of norovirus infection in Japan. *J Med Virol* 78(10):1318-1324, 2006.
8. Phan TG, Shimizu H, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Human adenovirus type 1 related to feline adenovirus: evidence of interspecies transmission. *Clin Lab* 52 (9-10): 515-518, 2006.
9. Phan TG, Takanashi S, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Detection and genetic characterization of norovirus strains circulating among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2004-2005. *Clin Lab* 52 (9-10): 519-525, 2006.
10. Phan TG, Yan H, Khamrin P, Quang T, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Mueller

- WEG, Ushijima H. Novel intragenotype recombination in sapovirus. *Clin Lab* 52(7-8):363-366, 2006.
11. Okitsu-Negishi S, Okame M, Shimizu Y, Phan TG, Tomaru T, Kamijo S, Sato T, Yagyu F, Mueller WEG, Ushijima H. Detection of norovirus antigens from recombinant virus-like particles and stool samples by a commercial norovirus enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 44(10):3784-3786, 2006.
  12. Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan in 2004-2005. *Infection, Genetics and Evolution* 7: 347-253, 2007.
  13. Phan TG, Trinh QD, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of new variant rotavirus G3 among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2003-2004. *Clin Lab*, 53: 41-48, 2007.
  14. Maneekarn N, Khamrin P, Chan-it W, Peerakome S, Sukchai S, Pringprao K, Ushijima H. Detection of rare G3P[19] porcine rotavirus strains in Chiang Mai, Thailand provides evidence for the origin of VP4 genes of Mc323 and Mc345 human rotaviruses. *J Clin Microbiol* 44:4113-4119, 2006.
  15. 柳生文宏、砂田亜津子、小島禎、池戸正成、沖津祥子、生島廣治. 新しい遺伝子増幅技術によるノロウイルスの検出法補の比較 *感染症学雑誌*、80 : 275-276, 2006.
  16. Terao Y, Takagi H, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Identification of IgA against coronavirus in breast milk. *Clin Lab*, in press.
  17. Shimizu H, Phan TG, Nishimura S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru city, Japan. *Infect, Genet and Evol* 7:247-253, 2007
  18. Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of rare sapovirus genotype among infants and children with acute gastroenteritis in Japan. *Eur J Clin Microbiol & Infect Diseases* 26(1): 21-27,2007.
  19. Zhou Y, Ushijima H., Frey TK. Genomic analyses of diverse rubell virus genotypes. *J Gen Virol* 88:932-941, 2007.
  20. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Chan-It W, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Norvel porcine rotavirus of the genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. *Virology* 2007 (E-pub).
  21. Makita K, Hayakawa Y, Okame M, Homma K, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. First detection of IgA against Norovirus in breast milk. (short communication) *Clin. Lab.*, in press.
  22. Dieng H, Boots M, Tamori N, Satho T, Higashihara J, Okada T, Kato K, Komalamisra N, Ushijima H., Takasaki T, Kurane I, Eshita Y. Effect of food, embryo density and conspecific immatures on hatchability in the dengue vector *Aedes albopictus* House and household insect pest, in press.
  23. Dieng H, Boots M, Higashihara J, Satho T, Kato K, Okada T, Komalammisra N, Ushijima H., Takahashi T, Kurane I, Eshita Y. Two dimensional gel analysis of midgut proteins of the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera Culicidae) with reference to sex and Bbody size. *Jpn J Environ Entemol Zool*, in press.

24. Nguyen TA, Yagyu F, Okame M, Phan TG, Yan H, Hoang PL, Cao Anh TH, Hoang KT, Okitsu S, Ushijima H. Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh city, Vietnam. *J Med Virol*, in press.
  25. Trinh QT, Nguyen TA, Phan TG, Khamrin P, Yan H, Hoang PL, Maneekarn N, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Amino acid substitution in VP7 sequences of human rotavirus G1 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam in 2002-2003. *J Med Virol*, in press.
  26. Wang XT, Liu PY, Tang JB, Mizutani H, Xin KQ, Ozawa K, Ushijima H. Tendon healing in vitro: Adeno-associated virus-2 effectively transduces intrasynovial tenocytes with persistent expression, but other serotypes do not. *Hand/Peripheral Nerve Plastic and reconstructive surgery*. 119(1):227-234, 2007
  27. Ushijima H. Foreword. *Mother and child health in Asia and Africa*. *Pediatrics International*, in press.
  28. Li Y, Hotta M, Shi A, Li Z, Yin J, Guo G, Kawata K, Ushijima H. Malnutrition Improvement for Infants and Young Children under 18 months old of Dai Minority in Luxi, China. *Pediatrics International*, in press.
  29. Kominami M, Kawata K, Ali M, Meena H, Ushijima H. Factors determining prenatal HIV testing for PMTCT in Dar Es Salaam, Tanzania. *Pediatrics International*, in press.
  30. Nguyen TH, Ushijima H. Nutritional status of low birth weight ethnic minority infants in Backan province, Vietnam. *Pediatrics International*, in press.
  31. Hotta M, Ali M, Ushijima H, Lee S, Nakamura Y, Shigeta M, Kobayashi N. Situational analysis of maternal and child health services for foreign residents in Japan. *Pediatrics International*, in press.
  32. Li L, Li K, Ushijima H. Moderate- to -vigorous physical activity and body fatness in Chinese urban school children. *Pediatrics International*, in press.
  33. Manilay P, Ali M, Yagyu F, Soulivanh P, Kuroiwa C, Ushijima H. Risk factors for protein-energy malnutrition of children under 5 years: A study from Luangprabang province, Lao PDR. *Pediatrics International*, in press.
  34. Dey SK, Phan TG, Nguyen TA, Nishio O, Salim AFM, Yagyu F, Ushijima H. Prevalence of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh during 2004-2005. *J Med Virol*, in press.
  35. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Tonusin S, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of rare G3P[9] rotavirus strains isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis. *J Med Virol*. in press.
  36. Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan. *J Virol*, in press.
  37. Phan TG, Khamrin P, Trinh DQ, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Emergence of Intragenotype Recombinant Sapovirus in Japan. *Infection, Genetics and Evolution*, in press.
2. 学会発表
    1. Okitsu-Negishi S, Okame M, Shimizu Y, Phan GT, Shiota T, Yagyu F, Ushijima H. Evaluation of a commercial norovirus ELISA kit using rVLP and stool samples. The 6<sup>th</sup> China

- Japan International Conference of Virology, June 22-24, 2006, Shanghai, China.
2. Ushijima H, Yagyu F, Okitsu S, Phan GT. Surveillance of viral infection associated with acute gastroenteritis in Japan. The 6<sup>th</sup> China Japan International Conference of Virology, June 22-24, 2006, Shanghai, China.
  3. Takanashi S, Katsumata N, Okitsu S, Shiota T, Phan TG, Igarashi T, Ushijima H. Development and evaluation of immunochromatography of norovirus: a novel rapid detection test for the highly communicable diseases. 40<sup>th</sup> Joint Working Conference on Viral Diseases, July 24-26, 2006, Sendai.
  4. Duy Qunag Trinh, Dey Shuvra Kanti, 高梨さやか、柳生文宏、沖津祥子、牛島廣治 Amino acids substitutions in VP7 sequences of human rotavirus A serotype G1 strains isolated in Japan, China, Thailand and Vietnam in 2002-2003. 第 80 回日本感染症学会総会 (2006.4.20-21、東京)
  5. Dey Shuvra Kanti, Duy Quang Trinh, 高梨さやか、柳生文宏、沖津祥子、牛島廣治 Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh. 第 80 回日本感染症学会総会 (2006.4.20-21、東京)
  6. 柳生文宏、砂田亜津子、小島禎、池戸正成、沖津祥子、牛島廣治 LAMP 法によるノロウイルスの検出。第 80 回日本感染症学会総会 (2006.4.20-21、東京)
  7. Tung Gia Phan, Sayaka Takanashi, Shoko Okitsu, Hiroshi Ushijima Surveillance of viral infection associated with acute gastroenteritis in Japan. 第 47 回日本臨床ウイルス学会 (2006.6.4、東京)
  8. Pham Thi Kim Ngan, Khamrin Pattara, Nguyen Anh Tuan, Shuvra Kanti Dey, Phan Gia Tung, 沖津祥子、牛島廣治 日本、バングラデシュ、タイ、ベトナムにおけるアイチウイルスの分子疫学 第 47 回日本熱帯医学会・第 21 回日本国際保健医療学会合同大会 (2006. 10. 12, 長崎)
  9. Trinh Duy Quang, Nguyen Anh Tuan, Phan Gia Tung, Khamrin Pattara, Yan Hainian, 沖津祥子、牛島廣治 2001 年から 2003 年に日本、中国、ロシア、タイ、ベトナムにおいて分離されたヒトロタウイルス G1, G2, G3, G4 の VP7 の遺伝子解析第 47 回日本熱帯医学会・第 21 回日本国際保健医療学会合同大会 (2006. 10. 12, 長崎)
  10. Dey Shuvra Kanti, Nguyen Anh Tuan, Phan Gia Tung, 沖津祥子、牛島廣治 バングラデシュ、ダッカにおけるノロウイルス胃腸炎の分子疫学 第 47 回日本熱帯医学会・第 21 回日本国際保健医療学会合同大会 (2006. 10. 12, 長崎)
  11. 沖津祥子、柳生文宏、西村修一、杉田久美子、西村忠史、牛島廣治 ノロウイルス ELISA kit の使用評価 第 55 回日本感染症学会東日本地方会総会、第 53 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同総会 (2006、10、26-27, 東京)
  12. 柳生文宏、沖津祥子、牛島廣治 RT-LAMP 法を用いた日本におけるノロウイルスの検出 第 55 回日本感染症学会東日本地方会総会、第 53 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同総会 (2006、10、26-27, 東京)
  13. 高梨さやか、沖津祥子、柱新太郎、松永貞一、五十嵐隆、牛島廣治 ノロウイルス胃腸炎患児血清からのウイルス遺伝子検出 第 38 回日本小児感染症学会総会・学術集会 (2006, 11.10-11, 高知)
  14. 塩田智之、大亀路生、高梨さやか、柳生文宏、沖津祥子、牛島廣治 ノロウイルス genus-specific モロクローナル抗体の作製と立体構造を含めた評価 日本ウイルス学会 第 54 回学術集会 (2006.11.19-21, 名古屋)
  15. 高梨さやか、沖津祥子、柳生文宏、塩田智之、牛島廣治 ノロウイルス胃腸炎患



- 児血清からのウイルス遺伝子検出 日本ウイルス学会第 54 回学術集会 (2006.11.19-21, 名古屋)
16. Dey Shuvra Kanti, Phan Tung, Nguyen Tuan, 高梨さやか、柳生文宏、沖津祥子、牛島廣治 Sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka city, Bangladesh. 日本ウイルス学会第 54 回学術集会 (2006.11.19-21, 名古屋)
17. 柳生文宏、沖津祥子、牛島廣治 絨毛癌細胞および直腸癌細胞における G プロテインレセプターの発現 日本ウイルス学会第 54 回学術集会 (2006.11.19-21, 名古屋)
18. Phan Ngan, Khamrin Pattara, Nguyen Tuan, Shuvra Dey, Phan Tung、沖津祥子、牛島廣治 Isolation and molecular characterization of the Aichi viruses from fecal specimens collected in Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam. 日本ウイルス学会第 54 回学術集会 (2006.11.19-21, 名古屋)
19. Khamrin Pattara, 柳生文宏、沖津祥子、牛島廣治 Novel porcine rotavirus of the genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. 日本ウイルス学会第 54 回学術集会 (2006.11.19-21, 名古屋)
20. Trinh Quang, Nguyen Tuan, Phan Tung, Khamrin Pattara, Yan Hainian, 柳生文宏、沖津祥子、牛島廣治 Amino acid substitutions in the VP7 sequences of human rotavirus G3 isolated in China, Russia, Thailand, and Vietnam in 2001-2003. 日本ウイルス学会第 54 回学術集会 (2006.11.19-21, 名古屋)
21. Nguyen Anh Tuan, Khamrin Pattara, Trinh Quang, Yagyu Fumihiko, Okitsu Shoko, Ushijima Hiroshi P genotyping of Vietnamese group A rotavirus and divergence of P[8] strains 日本ウイルス学会第 54 回学術集会 (2006.11.19-21, 名古屋)
22. 清水英明、顔海念, Pattara Khamrin、沖津祥子、牛島廣治 日本、中国およびタイで検出されたアデノウイルス 41 型の genome type. 日本ウイルス学会第 54 回学術集会 (2006.11.19-21, 名古屋)
- G 知的財産権の出願・登録状況：なし

Table 1. Monthly distribution of norovirus detected in oysters during 2005-2006

Number of norovirus detected/number of oyster examined												
Country	October	November	December	January	February	March	April	May	June	July	August	September
China	4/10	4/10	1/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/15	0/10	3/10	4/10	1/15
Japan	5/10	2/10	2/10	2/10	2/10	5/10	1/5	2/15	1/5	2/5	0/5	0/0

Table 2. Detection of norovirus in oysters from China and Japan during 2005-2006.

Countries	Total of samples	Norovirus positives (%)
China	130	19 (14.6%)
Japan	95	24 (25.3%)

Table 3. Genetic characterization of norovirus detected in oysters from China and Japan.

Countries	Norovirus genotypes	
	GII/3	GII/4
China	4 (21.1%, 4 of 19)	15 (78.9%, 15 of 19)
Japan	12 (50%, 12 of 24)	12 (50%, 12 of 24)
		Farmington Hill variant (%)    Hunter variant (%)
China		8 (53.3%, 8 of 15)    7 (46.7%, 7 of 15)
Japan		3 (25%, 3 of 12)    9 (75%, 9 of 12)

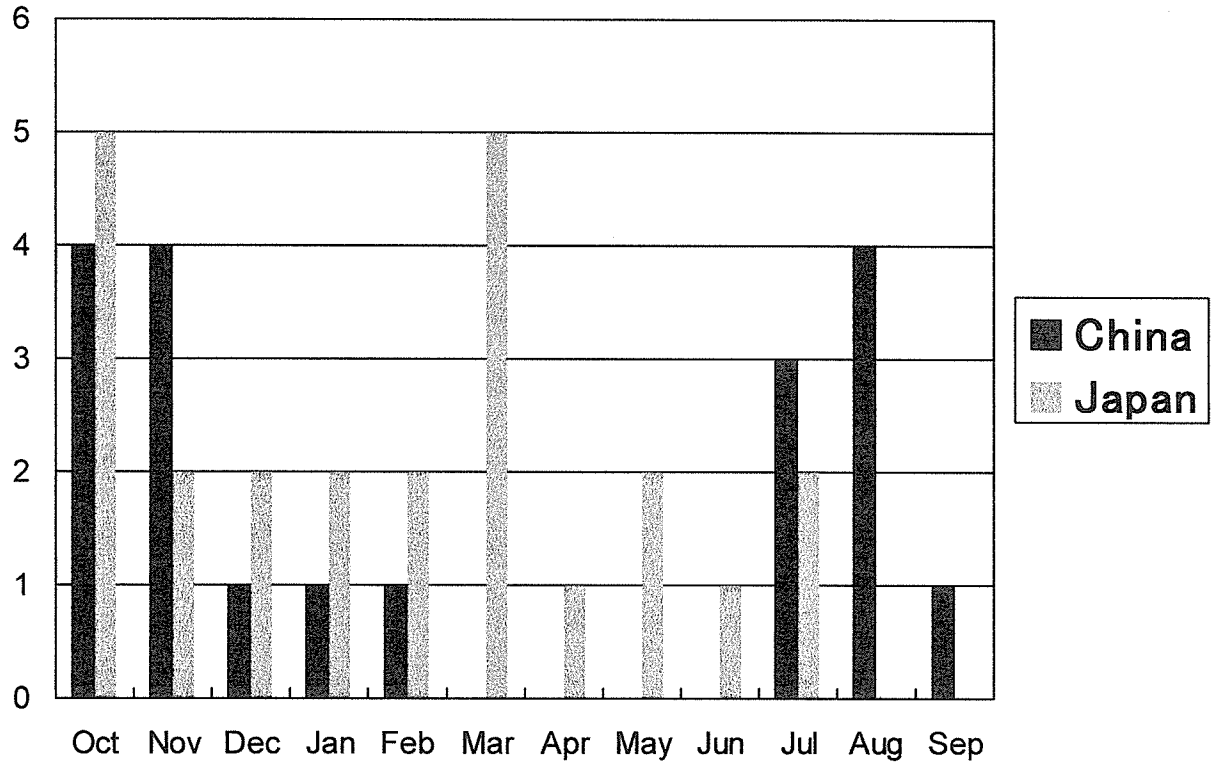
Table 4. Characterization of norovirus strains detected in oysters from China and Japan during 2005-2006

Number	Strain	Place	Collection date	Genogroup	Genotype	Variant	Genome copy per oyster
1	1/oyster/CN	China	October 2005	II	4	Farmington Hills	1.2 10 <sup>3</sup>
2	4/oyster/CN	China	October 2005	II	4	Hunter	4 10 <sup>2</sup>
3	7/oyster/JP	Japan	October 2005	II	4	Hunter	3.3 10 <sup>2</sup>
4	9/oyster/JP	Japan	October 2005	II	3	-	7.8 10 <sup>5</sup>
5	16/oyster/CN	China	October 2005	II	3	-	2.5 10 <sup>3</sup>
6	18/oyster/CN	China	October 2005	II	3	-	9 10 <sup>4</sup>
7	22/oyster/CN	China	October 2005	II	3	-	2.1 10 <sup>3</sup>
8	24/oyster/JP	Japan	October 2005	II	3	-	8 10 <sup>2</sup>
9	25/oyster/JP	Japan	October 2005	II	3	-	4.2 10 <sup>2</sup>
10	26/oyster/CN	China	November 2005	II	3	-	1.1 10 <sup>3</sup>
11	27/oyster/CN	China	November 2005	II	3	-	1.1 10 <sup>5</sup>
12	31/oyster/JP	Japan	November 2005	II	4	Hunter	2.6 10 <sup>3</sup>
13	38/oyster/CN	China	November 2005	II	4	Hunter	1.3 10 <sup>3</sup>
14	40/oyster/CN	China	November 2005	II	4	Hunter	1.2 10 <sup>2</sup>
15	45/oyster/JP	Japan	November 2005	II	4	Hunter	3.8 10 <sup>2</sup>
16	51/oyster/JP	Japan	December 2005	II	4	Farmington Hills	4.2 10 <sup>3</sup>
17	55/oyster/JP	Japan	December 2005	II	4	Hunter	6 10 <sup>1</sup>
18	56/oyster/CN	China	December 2005	II	4	Farmington Hills	4.1 10 <sup>3</sup>
19	72/oyster/JP	Japan	January 2006	II	4	Hunter	2.6 10 <sup>2</sup>
20	76/oyster/CN	China	January 2006	II	4	Farmington Hills	3 10 <sup>3</sup>
21	84/oyster/JP	Japan	January 2006	II	4	Farmington Hills	2 10 <sup>5</sup>

22	89/oyster/CN	China	February 2006	II	4	Farmington Hills	2.5 10 <sup>2</sup>
23	91/oyster/JP	Japan	February 2006	II	4	Farmington Hills	5.7 10 <sup>2</sup>
24	104/oyster/JP	Japan	February 2006	II	4	Hunter	3.5 10 <sup>2</sup>
25	111/oyster/JP	Japan	March 2006	II	4	Hunter	1.7 10 <sup>2</sup>
26	121/oyster/JP	Japan	March 2006	II	3	-	7.5 10 <sup>3</sup>
27	122/oyster/JP	Japan	March 2006	II	3	-	3.5 10 <sup>3</sup>
28	123/oyster/JP	Japan	March 2006	II	3	-	7.3 10 <sup>5</sup>
29	125/oyster/JP	Japan	April 2006	II	3	-	5 10 <sup>3</sup>
30	139/oyster/JP	Japan	May 2006	II	3	-	6.6 10 <sup>2</sup>
31	146/oyster/JP	Japan	May 2006	II	3	-	6 10 <sup>2</sup>
32	168/oyster/JP	Japan	June 2006	II	3	-	2.9 10 <sup>3</sup>
33	177/oyster/JP	Japan	July 2006	II	3	-	6.7 10 <sup>2</sup>
34	186/oyster/CN	China	July 2006	II	4	Hunter	4.4 10 <sup>2</sup>
35	187/oyster/CN	China	July 2006	II	4	Hunter	1.5 10 <sup>3</sup>
36	189/oyster/CN	China	July 2006	II	4	Hunter	5.5 10 <sup>2</sup>
37	191/oyster/JP	Japan	July 2006	II	4	Hunter	1.5 10 <sup>2</sup>
38	192/oyster/JP	Japan	August 2006	II	4	Hunter	2.2 10 <sup>2</sup>
39	201/oyster/CN	China	August 2006	II	4	Farmington Hills	3 10 <sup>2</sup>
40	202/oyster/CN	China	August 2006	II	4	Hunter	1 10 <sup>1</sup>
41	203/oyster/CN	China	August 2006	II	4	Farmington Hills	6.4 10 <sup>2</sup>
42	205/oyster/CN	China	August 2006	II	4	Farmington Hills	2.3 10 <sup>2</sup>
43	216/oyster/CN	China	September 2006	II	4	Farmington Hills	3.4 10 <sup>2</sup>

Figure 1. Seasonal pattern of norovirus in oysters from China and Japan

cases



厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究費事業)  
分担研究報告書

輸入生鮮魚介類および動物生肉のウイルス汚染のサーベイランスに関する研究  
研究協力項目 輸入食肉の E 型肝炎ウイルス汚染状況調査に関する研究および  
群馬県における野生イノシシおよび肥育豚の E 型肝炎ウイルス感染状況

研究協力者 坂野智恵子 塩野雅孝 信澤敏夫 群馬県食肉衛生検査所  
森田幸雄 小沢邦壽 群馬県衛生環境研究所  
壁谷英則 丸山総一 日本大学  
分担研究者 木村博一 国立感染症研究所

## 研究要旨

輸入生肉の E 型肝炎ウイルス汚染に関するサーベイランスを目的として、輸入生肉(豚肉 11 検体、牛肉 6 検体、羊肉 2 検体、鹿肉 5 検体、馬肉 2 検体:合計 26 検体)の E 型肝炎ウイルス(HEV)汚染状況に関する調査を行った。さらに、我が国の野生イノシシおよび肥育豚の HEV の浸潤状況を把握する目的で、血清中の抗 HEVIgG 抗体検査および HEV 遺伝子検査を実施した。RNA を抽出後、RT-PCR 法で HEV 遺伝子の検索を行ったところ、輸入生肉では、すべての検体において HEV 遺伝子は検出されなかった。一方、14.3%(10/70)の野生イノシシおよび、67.5%(114/169)の肥育豚に抗 HEVIgG 抗体が検出された。また、HEV 遺伝子は 1.4%(1/70)の野生イノシシならびに、1.8%(3/169)の肥育豚から検出された。検出された HEV の genotype はすべて G3 であった。群馬県の野生イノシシおよび肥育豚には一定頻度で HEV 保有していることが判明した。

## A. 研究目的

我が国には大量の食肉が輸入されているものの、E 型肝炎ウイルス(HEV)汚染状況調査は実施されておらず、輸入食肉の HEV に対するリスクについては明らかではない。さらに、近年、わが国において、野生シカ肉やイノシシの生レバーの喫食による HEV 感染例や死亡例が相次いで発生したことから、本症の感染源としてこれらの動物が注目されている。また、北海道では市販豚生レバーから HEV 遺伝子が検出されており、ゲームミートのみならず、豚を原因とする E 型肝炎の発生も危惧されるようになった。しかしながら、我が国における野生動物および肥育豚における HEV 感染状況については、不明な点が多く、それらの E 型肝炎感染リスクについて把握されていないのが現状である。

そこで、輸入食肉および国内産豚肉ならびに野

生イノシシの E 型肝炎感染リスクを把握し、HEV を原因とする感染症の発生防止に寄与すること目的として、輸入食肉については HEV 遺伝子検査を、肥育豚ならびに野生イノシシについては、その血清を用いて HEV 遺伝子検査および抗 HEV 抗体検査を実施した。

## B. 研究方法

### 1. 輸入生肉の HEV 汚染状況

平成18年8月から9月にかけて、群馬県内の食肉小売店より、豚肉 11 検体(アメリカ 6 検体、カナダ 3 検体、デンマーク 2 検体)、牛肉 6 検体(オーストラリア)、羊肉 2 検体(オーストラリア 1 検体、ニュージーランド 1 検体)、鹿肉 5 検体(ニュージーランド)、馬肉 2 検体(カナダ)の合計 26 検体を購入し、検査に供した(表 1-1、表 1-2)。

検体からのウイルス RNA の抽出は RNeasy

Fibrous Mini Kit(QIAGEN)で、HEVのRNA検出は、Takahashiら(2003)の方法で実施した。増幅産物はダイターミネーター法により塩基配列を解析後、近隣結合法で系統樹解析を行った。

## 2. 群馬県における野生イノシシおよび肥育豚のE型肝炎感染状況

平成16年11月から平成17年6月に県内猟友会等によって捕獲された野生イノシシ70頭の血清および平成16年11月～12月に17農場(9～10検体/農場)からG食肉処理場に搬入された肥育豚(約6カ月齢)169頭の血清を材料として用いた。

(1)抗体の保有状況:HEV構造蛋白(ORF2)を組みかえバキュロウイルスにより発現させ、それを抗原としたELISA法でIgG抗体の検出を行った。

(2)HEVの遺伝子検出および解析法:検体からのウイルスRNAの抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)で行った。HEVのRNA検出は、ORF1領域の326bpを増幅するTakahashiら(2002)の方法で行った。増幅産物はダイターミネーター法により塩基配列を読み取り、近隣結合法で系統樹解析を行った。

## C. 研究結果

### 1. 輸入生肉のHEV汚染状況

豚肉11検体(アメリカ6検体、カナダ3検体、デンマーク2検体)、牛肉6検体(オーストラリア)、羊肉2検体(オーストラリア1検体、ニュージーランド1検体)、鹿肉5検体(ニュージーランド)、馬肉2検体(カナダ)、合計26検体について調査を行ったところ、HEV遺伝子はすべて陰性だった。

### 2. 群馬県における野生イノシシおよび肥育豚のE型肝炎感染状況

(1)抗体の保有状況(表2-1、表2-2):HEV抗体は、14.3%(10/70)の野生イノシシおよび67.5%(114/169)の肥育豚が陽性であった。肥育豚の農場別の抗体陽性率は、80%(8/10)が4農場100%(10/10)、90%(9/10)、50%(5/10)および

40%(4/10)がそれぞれ2農場、89%(8/9)、70%(7/10)、60%(6/10)、30%(3/10)および20%(2/10)がそれぞれ1農場であった。

(2)HEVの遺伝子検出および解析状況(表2-1、表2-3、図2-1):HEV遺伝子は、1.4%(1/70)の野生イノシシおよび1.8%(3/169)の肥育豚からそれぞれ検出された。HEV遺伝子陽性の野生イノシシは、群馬県西部(妙義山麓)で捕獲された推定年齢5才(体重80Kg)のオスであった。HEV遺伝子が検出された3頭の肥育豚は、2頭がA農場、1頭がB農場由来であり、A農場の2頭から検出されたHEV遺伝子の塩基配列は同一であった。検出HEV遺伝子は、すべて遺伝子型G3であり、系統樹解析の結果、日本各地で多く検出される株と近縁であった。また、HEV遺伝子が検出された野生イノシシは、HEV抗体は陰性であったが、同遺伝子が検出されたA農場の1頭の肥育豚は、HEV抗体陽性であった。

## D. 考察

### 1. 輸入生肉のHEV汚染状況

輸入生肉26検体の調査を実施したがHEV遺伝子は検出されなかった。検体数は少なかったものの、調査を行った食肉の輸入国が公衆衛生的に良好な国であることがこの成績の背景にあると思われた。

E型肝炎の流行地域はアジアの開発途上国が多く、これらの国ではときとしてHEVに汚染された飲料水等を介して大規模な流行を引き起こすことが知られている。これらのことを勘案すると、輸入食肉によるE型肝炎のリスクを把握するためには、E型肝炎の流行地域から輸入されたものを検査するのが妥当であろう。今後は、E型肝炎流行地域や衛生状況が好ましくないと思われる地域からの輸入食肉について調査する必要があると考えられた。

### 2. 群馬県における野生イノシシおよび肥育豚のE型肝炎感染状況

(1)抗体の保有状況:HEV 抗体の保有状況調査において、14.3%(10/70)の野生イノシシおよび67.5% (114/169)の肥育豚が陽性であった。群馬県の野生イノシシの抗体陽性率は、Sonoda ら(2004)が報告した 9%(3/35)に近い値で、肥育豚については、Takahashi ら(2003)が報告した宮崎県 88%(53/60)、北海道 91%(127/140)、青森県 87%(26/30)、鹿児島 100%(10/10)と比べて低い値であった。また、肥育豚の農場別の抗体陽性率は、20%~100%と農場により差があることが判明した。

(2) HEV の遺伝子検出および解析状況:HEV 遺伝子の検出状況調査では、1.4%(1/70)の野生イノシシおよび 1.8%(3/169)の肥育豚からそれぞれ検出された。今回、我々が野生イノシシおよび肥育豚から検出した HEV 遺伝子は、すべて遺伝子型 G3 であり、分子系統樹解析では日本各地で多く検出される株と近縁であったことから日本に土着している株である可能性が高いと思われた。また、A 農場で飼育されていた 2 頭から検出した HEV 遺伝子の塩基配列は同一であったことから、農場内には、同じ HEV 株による感染が広がっていることが示唆された。HEV 遺伝子と HEV 抗体の検出状況の関係をみると、HEV 遺伝子が検出された A 農場と B 農場の抗体陽性率は、それぞれ 88.9%(8/9)、50%(5/10)であり、農場別の肥育豚抗体陽性率と HEV 遺伝子の検出状況に関連は認められなかった。また、A 農場には HEV とその抗体が共存する個体が存在することも判明した。

今回の調査成績から、群馬県内にも HEV、遺伝子型 G3 が分布しており、野生イノシシおよび肥育豚も HEV に高率に感染していることが判明した。したがって、野生イノシシや豚を喫食する際には、十分な加熱と生食のリスクに関する啓発を行うことが食品衛生上重要であると思われた。

さらに、肥育豚の HEV 感染率は農場により差がみられたため、HEV 暴露のない豚を生産するためには、農場毎の衛生対策と HEV の汚染源を

究明することが急務であると思われた。

#### 引用文献

- Takahashi K, Kang JH, Ohnishi S, Hino K, Mishiro S. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus recovered from Japanese patients with acute sporadic hepatitis. *J Infect Dis.* 2002, 185(9):1342-1345
- Takahashi K, Kang JH, Ohnishi S, Hino K, Miyakawa H, Miyakawa Y, Maekubo H, Mishiro S. Full-length sequences of six hepatitis E virus isolates of genotypes III and IV from patients with sporadic acute or fulminant hepatitis in Japan. *Intervirology* 2003, 46(5): 308-318.
- Sonoda H, Abe M, Sugimoto T, Sato Y, Bando M, Fukui E, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J Clin Microbiol.* 2004, 42(11):5371-4.

#### E. 結論

今回の輸入生肉の HEV 汚染状況の調査結果では、公衆衛生および食品衛生状況の良好な国から輸入された食肉に関しては、E 型肝炎感染リスクは低いことが確認された。

一方、群馬県における野生イノシシおよび肥育豚の HEV 感染状況調査では、群馬県にも HEV、遺伝子型 G3 が分布しており、野生イノシシおよび肥育豚にも感染していることが判明した。この調査結果で特筆すべき事は、食肉処理場に搬入された肥育豚が高率に HEV 抗体を保有し、さらに HEV 遺伝子を保有する個体が存在したことである。これは、豚を原因とする E 型肝炎発生の可能性を強く示唆するものである。したがって、HEV



よる食中毒を防止するためには、食肉販売業者および消費者等に対し、「生食の禁止」および「十分な加熱の必要性」について周知することが食品衛生上重要である。

また、E 型肝炎研究における今後の課題は、消費段階である食品(食肉)からの E 型肝炎のリスクの把握のみならず、生産段階(農場段階)における HEV 感染状況の調査を行い、HEV 暴露のない豚を生産するため、その感染源、感染ルート の 解 明 が 必 要 である と 考 える。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 森田幸雄他:群馬県における野生イノシシおよび肥育豚の E 型肝炎ウイルス感染状況. 日本獣医公衆衛生学会(関東). 神奈川県川崎市、平成 18 年 9 月 10 日
- 2) 森田幸雄他:群馬県における野生イノシシおよび肥育豚の E 型肝炎ウイルス感染状況. 全国食肉衛生検査所協議会微生物部会(第 26 会研修会). 東京. 平成 18 年 11 月 21 日
- 3) 森田幸雄他:群馬県における野生イノシシおよび肥育豚の E 型肝炎ウイルス感染状況. 日本獣医公衆衛生学会(地区学会長賞講演). さいたま市. 平成 19 年 2 月 23 日

表 1-1 供試検体（輸入国）

輸入国	豚肉	牛肉	羊肉	鹿肉	馬肉	合計
アメリカ	6	0	0	0	0	6
カナダ	3	0	0	0	2	5
オーストラリア	0	6	1	0	0	7
ニュージーランド	0	0	1	5	0	6
デンマーク	2	0	0	0	0	2
合計	11	6	2	5	2	26

表 1-2 供試検体（採取月）

採取月	豚肉	牛肉	羊肉	鹿肉	馬肉	合計
8月	0	4	0	0	0	4
9月	7	1	2	5	1	16
10月	4	1	0	0	1	6
合計	11	6	2	5	2	26

表 2-1 HEV 抗体保有率およびHEV 遺伝子検出率

動物種	抗体陽性率	遺伝子陽性率
	(陽性数／検体数)	(陽性数／検体数)
野生イノシシ	14.3% (10/70)	1.4% (1/70)
肥育豚	67.5% (114/169)	1.8% (3/169)

表 2-2 農場別にみた HEV 抗体保有率

農場	検体数	抗体陽性数	陽性率(%)
A <sup>1)</sup>	9	8	88.9
B <sup>2)</sup>	10	5	50
C	10	10	100
D	10	10	100
E	10	9	90
F	10	9	90
G	10	8	80
H	10	8	80
I	10	8	80
J	10	8	80
K	10	7	70
L	10	6	60
M	10	5	50
N	10	4	40
O	10	4	40
P	10	3	30
Q	10	2	20

1) A農場の2頭からHEVが検出

2) B農場の1頭からHEVが検出

表 2-3 HEV 遺伝子検出検体の HEV 抗体保有状況

検体No.	捕獲場所・農場	HEV抗体
野生イノシシ I	群馬県西部	—
肥育豚 I	A農場 <sup>1)</sup>	—
肥育豚 II	A農場 <sup>1)</sup>	+
肥育豚 III	B農場 <sup>2)</sup>	—

1) A農場の88.9%(8/9頭)の肥育豚はHEV抗体陽性

2) B農場の50.0%(5/10頭)の肥育豚はHEV抗体陽性

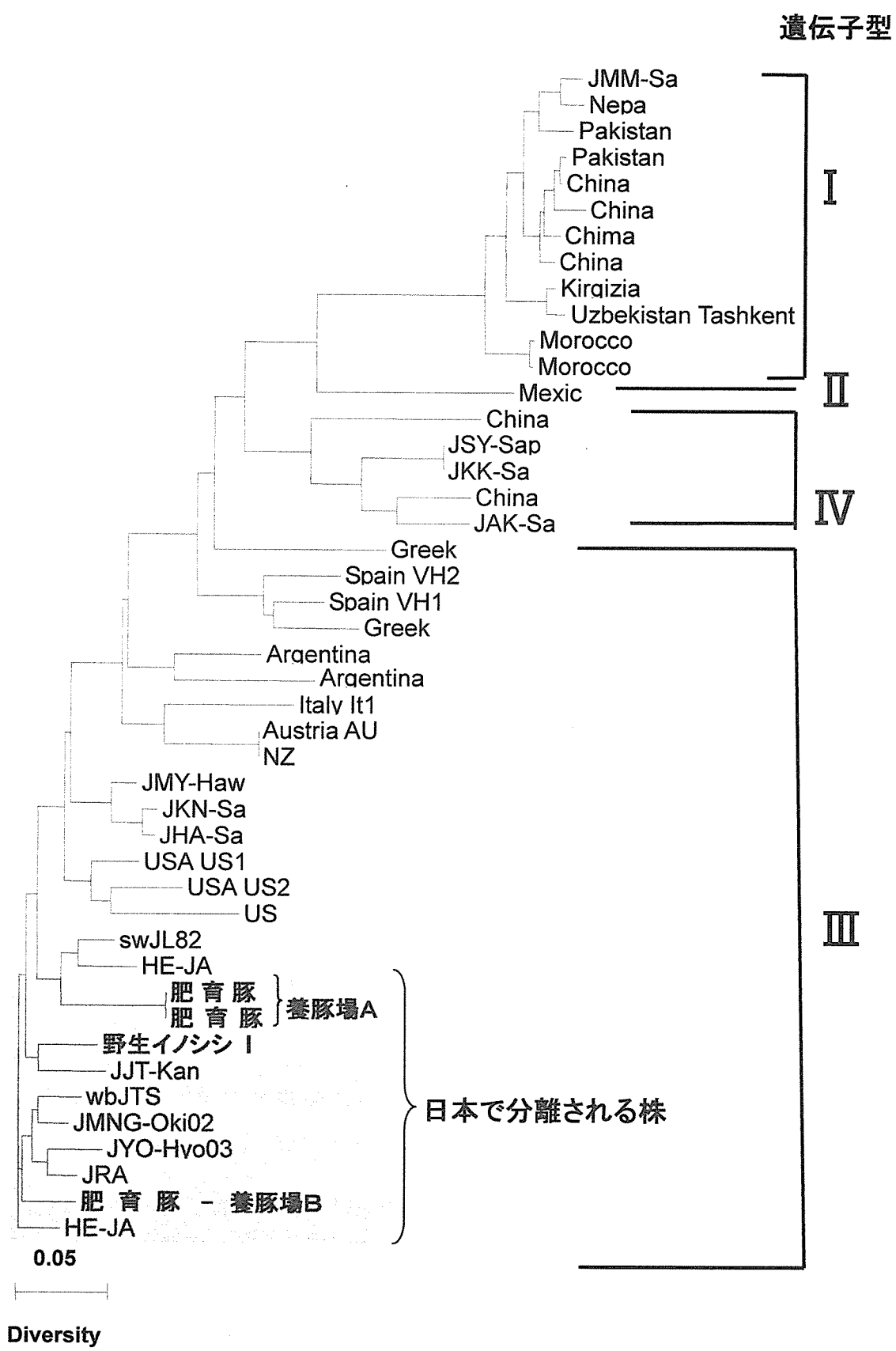


図2-1 HEVのORF1領域の分子系統