

平成 23 年度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)
「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」
研究分担報告書

日本における 2011 年の A 型肝炎の分子疫学的解析

研究分担者 石井孝司 (国立感染症研究所ウイルス第二部・室長)
共同研究者 横井 一、田中俊光、小林圭子 (千葉市環境保健研究所・健康科学課)
野田 衛 (国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部・室長)

研究要旨：日本での A 型肝炎患者数は 2007 年以降非常に低いレベル (150 人/年程度) で推移していたが、2010 年は 3 月から全国各地で A 型肝炎が多発し、最終的には年間 342 人の患者発生を見た。本研究では、2010 年に引き続き全国の地方衛生研究所と共同で、A 型肝炎患者の糞便または血清から A 型肝炎ウイルス(HAV)ゲノムの配列を決定し、流行状況を分子疫学的に解析した。2011 年には 1 月に千葉市で大きな A 型肝炎の流行があったが、その後は A 型肝炎の発生は全国的に少なく、最終的な報告数は 176 人であった。千葉市で流行した株は genotype IA の日本常在型に分類された。2010 年の流行の主要な原因となった、東南アジア由来と考えられる株による発生はほとんど見られなかった。また、genotype IIIA については 2010 年に引き続き検出されている。

A. 研究目的

日本での A 型肝炎患者数は 2007 年以降非常に低いレベル (150 人/年程度) で推移していたが、2010 年は 3 月から全国各地で A 型肝炎が多発し、2010 年の A 型肝炎患者数は最終的には 342 人に達した。我々は、感染症情報センター、国立医薬品食品衛生研究所、および全国の地方衛生研究所と共同で、A 型肝炎の全国的なサーベイランスシステムを構築し、ウイルス(HAV)ゲノムの塩基配列情報を基に分子疫学的な解析を行った。その結果、2010 年に A 型肝炎が多発した理由は、従来日本に常在していた株に加え、東南アジア由来と考えられる株が新たに日本で流行し、また韓国で大流行した株も一部日本に侵淫してきたためであるという結論を得た。

本年は、昨年引き続き 2011 年の A 型肝炎の日本における発生状況について分子疫学的解析を行い、流行状況の調査を行った。

B. 研究方法

A 型肝炎患者の便乳剤または血清から RNA を抽出し、平成 21 年 12 月 1 日に医薬食品局食品安全部監視安全課長より通知された食安監発 1201 第 1 号「A 型肝炎ウイルスの検出法について」に従い、HAV ゲノムの構造/非構造領域の junction 部分の配列を RT-PCR 法により増幅後決定した。これらの配列を過去のデータベースと比較し分子疫学的な解析を行なった。

倫理面への配慮：取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの

実験施設で取り扱われる。各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。

C. 研究結果

2011 年は合計 52 株について配列解析を行なった。その結果、今年の流行株は genotype IA が 46 株、IIIA が 5 株、IIIB が 1 株であり、IA の大部分は千葉市における集団食中毒事例のものであり、この株は IA-1 に属した。2011 年の流行の原因の 1 つであった IA-2 のクラスターに属する株は 1 株 (他に類似株が 2 例) のみであり、これらのクラスターに属さない IA 株として、パプアニューギニアおよびブラジルでの感染と考えられる株がそれぞれ 1 株ずつ検出された。IIIA は 2011 年も 5 株検出された。(図 1)

千葉市での集団食中毒事例は、最終的には確定診断で患者数 49 名という大きな流行となった。本事例については千葉市環境保健研究所が中心となって詳細な解析を行った。その結果、患者 20 名は 1 月 8 日～1 月 21 日にかけて全身倦怠感、発熱、黄疸等の肝炎症状を呈していることが明らかとなった。(図 2) また、これらの患者の 2010 年 11 月下旬～12 月中旬における喫食状況等の調査を実施したところ、患者は市内寿司店で調理、提供された食事を喫食していたことが明らかとなった。(図 3) 分子疫学的解析については、解析可能であった検体はすべて genotype IA に分類され、2010 年の解析で IA-1 と呼んだクラスターに属し、2010 年に日本で広域的に流行した IA-2 や IIIA に属する株とは異なることが明らかとなった。また、2010

年6月に千葉市内での散発事例から検出された1株とは異なる塩基配列を有していた。IA-1クラスターは、2006年に滋賀や新潟で小流行した株と類似しており、2001年から継続して検出されていることが報告されていることから、本事例で検出された株は、国内に常在していた株であると考えられた。また、その遺伝子配列は患者2検体(99.7%)を除く34検体が100%一致し、同一感染源に由来する株であることが強く示唆された。

D. 考察

千葉市における集団事例では、原因となった寿司店を特定することができ、また、A型肝炎に罹患した調理従事者により直接、または調理施設等を介して間接に汚染したためであることを明らかにできた。このような解析が可能であった理由として、医療機関からの迅速な届出や入院患者の調査への理解により迅速な解析ができた点、分子疫学的解析の情報共有ができた点が大きく、そのために潜伏期間が長く、従来は感染源の特定が困難なA型肝炎の感染経路の特定ができたものと考えられる。現在の日本では60歳以下の人口のほとんどがHAVに対する抗体を持たず、HAVが何らかの理由で流入した場合に大きな流行となる危険性が従来より指摘されているが、今回の例はこの危険が現実になったものと考えられる。生鮮魚介類を扱う生産者や調理従事者へのA型肝炎ワクチン接種が強く推奨される。

2010年の全国的なdiffuse outbreakの主要な原因となったIA-2のクラスターに属する株は、2011年には類似株を含めても3株のみであった。このクラスターに属する株は同一の感染源から何らかの理由で2010年に全国に拡散して広域流行をおこしたが、二次的な拡大はせずに収束し、2011年にはほぼ消失したものと推定される。

Genotype IIIAに属する株は2010年に引き続き2011年も検出されており、地域的な偏りは見られていないことから、日本への定着が懸念される。また、近年報告がほとんどないIIIBが仙台市で検出されている。

E. 結論

2010年の流行の主な原因となった株(IA-2)は2011年にはほとんど見られず、日本には定着せずに消失した可能性が示唆されるが、引き続き注意を払う必要がある。IIIAは2011年も検出されており、日本への定着が懸念される。1月の千葉市における集団発生事例は、最終的には患者数49名という大きな流行となったが、詳細な解析の結果市内の寿司店での感染であったことが明らかとなった。

ウイルスの分子疫学的な解析は流行状況把握の上で有用であり、今後もこのようなサーベイランスシステムを継続していくことは極めて重要であると考えられる。

全国サーベイランス共同研究者

清原知子、吉崎佐矢香、佐藤知子、島田智恵、中村奈緒美、中島一敏、多田有希(国立感染症研究所)

上間 匡(国立医薬品食品衛生研究所)

筒井理華(青森県) 青木洋子(山形県) 関根雅夫(仙台市) 齊藤哲也(新潟市) 原 孝(茨城県)

山崎彰美(柏市) 篠原美千代(埼玉県) 新開敬行(東京都) 涌井 拓(千葉県) 清水英明(川崎市)

宇宿秀三(横浜市) 大沼正行(山梨県) 長岡宏美(静岡県) 吉田徹也(長野県) 岡村雄一郎(長野市)

小原真弓(富山県) 柴田伸一郎(名古屋) 楠原 一(三重県) 近野真由美(京都市) 入谷展弘(大阪市) 飯島義雄(神戸市) 川西伸也(姫路市)

榊原啓子(岡山市) 榎本義正(福山市) 岡本玲子(山口県) 世良暢之(福岡県) 川本大輔(福岡市) 増本久人(佐賀県) 上村晃秀(鹿児島県)

研究発表

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Wakita T., Shimada T., Nakamura N., Nakashima K., Tada Y. and Noda M. Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. Journal of Clinical Virology, in press.
2. Iwasaki Y., Mori K., Ishii K., Maki N., Iijima S., Yoshida T., Okabayashi S., Katakai Y., Lee Y.J., Saito A., Funai H., Kimura N., Ageyama N., Yoshizaki S., Suzuki T., Yasutomi Y., Miyamura T., Kannagi M. and Akari H. Long-term persistent GBV-B infection and development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets. Frontiers in Microbiology, in press
3. Miyamura T., Ishii K., Kanda T., Tawada A., Sekimoto T., Wu S., Nakamoto S., Arai M., Fujiwara K., Imazeki F., Kiyohara T., Wakita T. and Yokosuka O. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. Hepatology Research, in press
4. Akazawa D., Morikawa K., Omi N., Takahashi H., Nakamura N., Mochizuki H., Date T., Ishii K., Suzuki T. and Wakita T. Production and Characterization of Hepatitis C Virus Particles from Serum-free Culture. Vaccine, 29: 4821-4828 (2011)
5. Yoshida T., Miyasaka T., Azegami Y., Uchiyama Y., Kasahara H., Ueda H., Nagase H., Fujita S., Ishii K. and Noda M. Investigation of epidemiology and HAV genomes regarding three hepatitis A infections that occurred in April-May, 2010-Nagano. Japanese Journal of Infectious Diseases, 64: 260-261 (2011)
6. Li T.C., Song S. Yang Q., Ishii K., Takeda N., and Wakita T. A cell culture system for hepatitis

- E virus. *Hepatology International*. 5: 202 (2011)
7. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada T., Nakamura N., Tada Y., Noda M. and Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Hepatology International*. 5: 204-205 (2011)
 8. 石井孝司 B 型肝炎の現状とワクチン 愛知県小児科医会会報 94: 38-46 (2011)
 9. 石井孝司、清原知子 A 型肝炎の血清保有状況と最近の流行状況 小児科 52: 1819-1825 (2011)
 10. 道免和文、小野原伸也、田中博文、春野政虎、下田慎治、姜 貞憲、石井孝司、高橋和明 2010 年 A 型肝炎ウイルス福岡株に対する分子疫学的検討—1999 年ボルネオ(カリマンタン)島由来株との近縁性 肝臓 52: 497-502 (2011)
 11. 石井孝司 A 型肝炎ウイルスのウイルス学的特徴 日本臨床 69:559-565 (2011)
 12. 石井孝司、李 天成 E 型肝炎 公衆衛生 75: 43-46 (2011)
2. 学会発表
1. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Wakita T., Shimada T., Nakamura N., Tada Y. and Noda M. Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011
 2. Noda M., Tada Y., Uema M., Nakashima K., Shimada T., Nakamura N., Kiyohara T. and Ishii K. Food hygienic investigation on hepatitis A cases in the spring of 2010, Japan.
 3. Akari H., Iwasaki Y., Mori K., Ishii K., Maki N., Iijima S., Yoshida T., Okabayashi S., Katakai Y., Lee Y.J. and Saito A. Long-term persistent GBV-B infection and development of a progressive chronic hepatitis C-like disease in marmosets. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011.
 4. Uema M., Aoki N., Aoki S., Furuya Y., Nishio O., Shibata S., Kodaira A., Ishii K. and Noda M. Role of imported seafood as a vehicle of hepatitis A viruses. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011
 5. Someya Y., Shirato H., Kumagai A., Ito H., Furukawa S., Wakita T., Ishii K., Narimatsu H. and Kubota T. Structural basis for recognition of Lewis A antigen by norovirus. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011
 6. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada C., Nakamura N., Tada Y., Noda M. and Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Bangkok, Thailand, February 17-20, 2011.
 7. Li T.C., Song S., Yang Q., Ishii K., Takeda N. and Wakita T. The stability and inactivation of hepatitis E virus grown in cell culture. Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Bangkok, Thailand, February 17-20, 2011.
 8. Nakamura N., Shimada T., Tada N., Okabe N., Kiyohara T., Ishii K. and Noda M. Diffuse outbreak of hepatitis A suspected by national case based surveillance in Japan, 2010, International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED 2011), Vienna, Austria, February 17-20, 2011
 9. 道免和文、田中博文、春野政虎、姜 貞憲、石井孝司、高橋和明：2010 年 A 型肝炎ウイルス福岡株に対する分子疫学的検討- 1999 年ボルネオ(カリマンタン)島由来株との近縁性、第 3 9 回日本肝臓学会西部会、平成 2 3 年 1 2 月、岡山
 10. 上間 匡、石井孝司、小原真弓、田中俊光、増本久人、入谷展弘、斎藤哲也、吉田徹也、山下育孝、柴田伸一郎、田中智之、内野清子、野田 衛：A 型肝炎ウイルス検出 PCR の高感度化の検証、第 3 2 回日本食品微生物学会、平成 2 3 年 1 0 月、東京
 11. 野田 衛、多田有希、田中智之、石井孝司：2010 年の A 型肝炎の分子疫学と食品衛生上の原因究明、第 3 2 回日本食品微生物学会、平成 2 3 年 1 0 月、東京
 12. 山下育孝、青木紀子、青木里美、土井光徳、古屋由美子、西尾 治、石井孝司、野田 衛：A 型肝炎の国内発生における輸入生鮮魚介類の関与、第 3 2 回日本食品微生物学会、平成 2 3 年 1 0 月、東京
 13. 西村浩一、原田誠也、李 天成、石井孝司、田中智之、野田 衛：熊本県におけるイノシシ、ブタ及びシカの E 型肝炎ウイルス保有状況に関する実態調査、第 3 2 回日本食品微生物学会、平成 2 3 年 1 0 月、東京
 14. 石井孝司、清原知子、島田智恵、中村奈緒美、多田有希、野田 衛、脇田隆字：2010 年春季の A 型肝炎の diffuse outbreak の分子疫学的解析、第 4 7 回日本肝臓学会総会、平成 2 3 年 6 月、東京
- G. 知的所有権の取得状況
なし

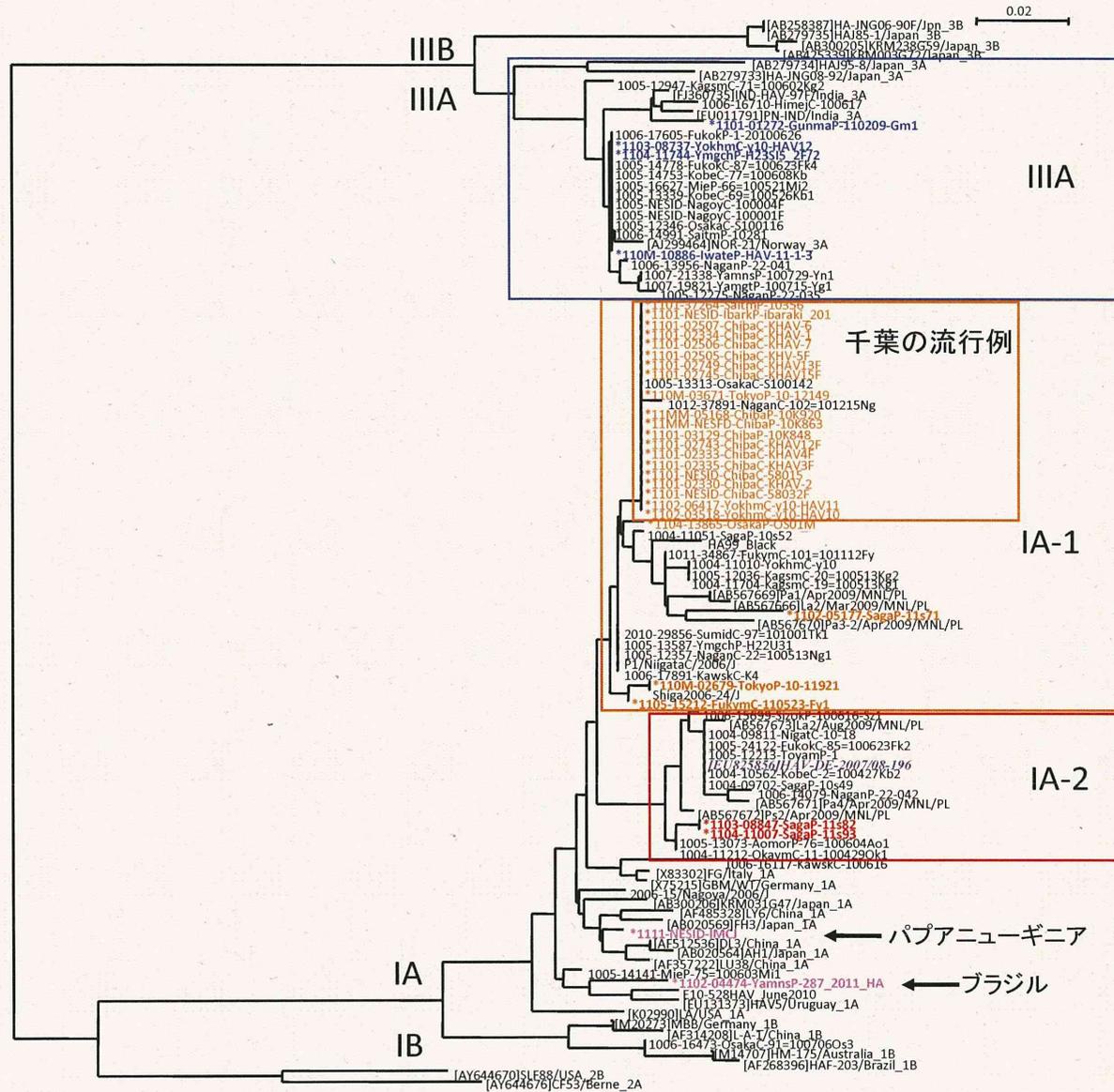


図 1

図2 千葉市のA型肝炎食中毒事例における患者の発症日

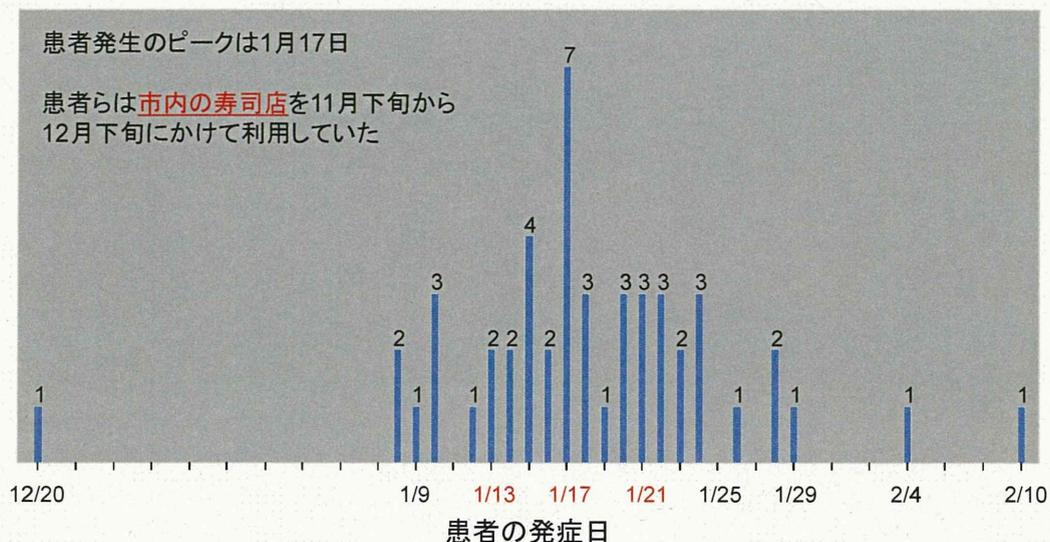
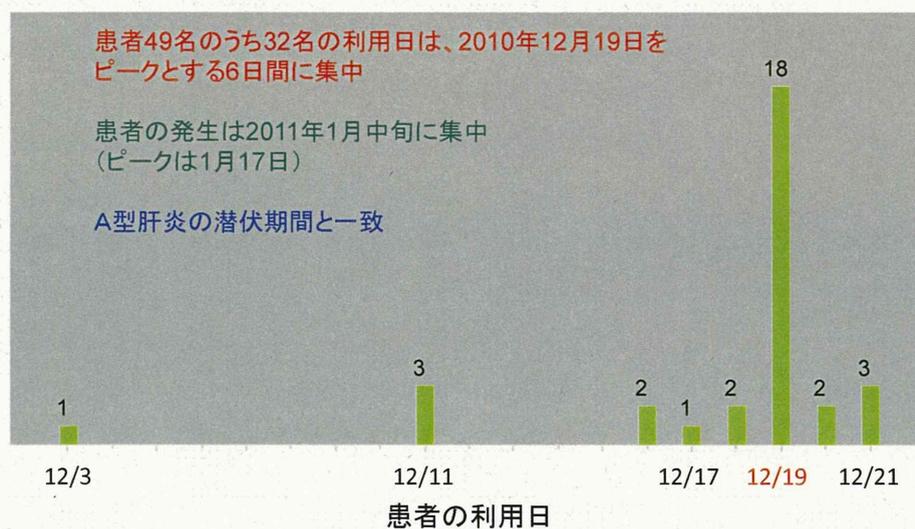


図3 千葉市のA型肝炎食中毒事例における患者の寿司店利用日



平成 23 年度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)
「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」

研究分担報告書

A 型肝炎ウイルス検出 PCR の高感度化の検証

研究代表者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	石井孝司	国立感染症研究所
研究協力者	名古屋真弓	富山県衛生研究所
研究協力者	田中俊光	千葉市環境保健研究所
研究協力者	増本久人	佐賀県衛生薬業センター
研究協力者	入谷展弘	大阪市環境科学研究所
研究協力者	斎藤哲也	新潟市衛生環境研究所
研究協力者	吉田徹也	長野県環境保全研究所
研究協力者	山下育孝	愛媛県立衛生環境研究所
研究協力者	柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所
研究分担者	田中智之	堺市衛生研究所
研究協力者	内野清子	堺市衛生研究所

研究要旨

A 型肝炎ウイルスの RT-PCR 法は、現在通知法に基づき VP1-2A 領域を対象に行われているが、検出感度が十分ではなく、また、増幅産物から得られる塩基配列情報が分子疫学的解析に不足している。そこで検出感度および分子疫学的解析能の向上を目的として、RT-PCR 用のプライマーを新たに設計し、通知法と検出率を比較した。A 型肝炎と診断された患者から採取された糞便 54 検体の検出率は通知法では 83.3%、新プライマーでは 96.3%で、検出率が向上した。遺伝子増幅領域は 280bp から 615bp に約 2 倍に増加し、かつ通知法の増幅部位および韓国等での解析領域を含むことから、より詳細な分子疫学的解析が実施できると考えられた。

A. 研究目的

A 型肝炎は A 型肝炎ウイルス (HAV) による急性肝炎で、HAV に汚染した食品や水を介して感染する。しかし、潜伏期が 1 カ

月程度と長く、感染源や感染経路の特定や患者間の疫学的関連性の把握が困難な状況にある。一方、2010 年 3 月以降、国内で A 型肝炎患者の報告数が増加した結

果, A 型肝炎は病原体サーベイランス対象疾患となり, 検体保存や検出ウイルスの分子疫学等の調査・解析環境が整いつつある。現在, HAV の検出・解析は主に患者血清や糞便を検体として, 通知法に従い VP1-2A 領域の 280bp を対象にした RT-nested PCR とその塩基配列を基にした型別・系統樹解析および 5' IRES 領域のリアルタイム PCR で行われている。患者検体の他にも, 環境中の HAV モニタリングを目的に河川水や食品等についても HAV 遺伝子 (RNA) の検出が試みられている。環境中からの HAV 検出は検体に含まれる HAV 粒子数が少なく, 通知法ではこれまで検出が困難な場合があり, 感度の高い検出方法の開発が課題となっていた。

通知法のうち, RT-PCR 法については, 検体中のウイルス量や遺伝子型により, 検出感度に差があることが指摘されており, また, 増幅産物の長さは, 感染源や感染経路の特定, 患者間の疫学的関連性の把握等の分子疫学的解析を行うためには不十分である。さらに韓国等の諸外国で実施されている解析領域と通知法で増幅する領域には若干のズレがあり, 国内株との比較が困難な状況にある。

そこで, より高感度でかつ分子疫学的解析能に優れた HAV の検出系を確立することを目的として, 新たなプライマーを設計し, その有効性を検討した。

B. 研究方法

1. プライマーの設計

プライマーの設計には, 感染研で全塩基配列を決定した HAV Kobe 株および Nagano 株 (ともに 2010-1A 型), ならびに

データベースに全塩基配列が登録されている株 (1 型, 2 型, 3 型の全ての遺伝子型を含む) 24 株, 計 26 株のゲノム情報を用いた。

Kobe, Nagano 株を基本株にして 1 型, 2 型, 3 型のゲノム情報を simplot 法により比較を行うと同時に, ClustalW を用いてアライメント解析を行い, VP1-2A junction 領域を含む範囲で, 全ての遺伝子間で相同性が高く保存されていると思われる部分にプライマーを設計した。

2. PCR の感度比較

感染研, 千葉市, 長野県, 佐賀県, 富山県, 新潟市, 大阪市の各機関にて保存されていた A 型肝炎の患者検体より抽出した RNA から逆転写反応で得られた cDNA 計 54 検体を材料として用いた。

通知法のプライマーセットと新たに設計したプライマーセットを用いて, cDNA から 1st PCR 用プライマーあるいは 2nd PCR 用プライマーを用いたシングル PCR および nested PCR 法を行い, 各プライマーセットの検出感度を比較した。

3. 環境検体

堺市において 2010 年 5 月に採取され, HAV polyprotein 遺伝子が検出された 1 下水検体について, 改良法のプライマーセットで HAV 遺伝子の検出を試みた。この下水検体は通知法, 名古屋市マニュアル (1st: HAV2789s/HAV3296c, 2nd: HAV2804s/HAV3231c) では VP1-2A 領域の増幅, および遺伝子解析はできなかった。

4. 系統樹解析

感染研の保存検体のうち, 11 検体について, 通知法に従った解析範囲約 200bp での系統樹解析と, 改良法で解析可能と

なる約 500bp での系統樹解析の結果を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. プライマーの設計

26 株のゲノム情報を基に、通知法の増幅領域(1stPCR : HAV+2799/-3296, 498bp, 2nd PCR: HAV+2907/-3186, 280bp)を含むプライマーセットを設定した。設定したプライマーセットは 1st PCR: 2F/1R-A (+2784/-3451, 668bp), 2nd PCR: 2F/2R (+2784/-3398, 615bp)の semi nested PCR とした (図 1)。

塩基配列は 2F: G(A/G)AGAACAGG(A/G)A A(C/T)ATTCA(A/G)ATTAG, 1R-A: (T/C)TT (A/G)TCATC(C/T)TTCATTTCTGTCCA, 2R: CA GT(A/T/C)A(G/A)(A/C)AC(T/C/A)CCAGCAT CCAT と設計した。

2. nested PCR による陽性率の向上

通知法のプライマーセットを用いた場合、54 検体中 9 検体が nested PCR で陰性、5 検体で増幅バンドがスミアとなったのに対して、改良プライマーセットでは、陰性が 2 検体となり、陽性率は 83.3% から 96.3% へと改善された (表)。

さらに、PCR の増幅バンドも通知法に比較して明瞭になり、より判定しやすい結果となった。

1stPCR 用プライマーセットおよび 2ndPCR 用プライマーセットそれぞれ単独の検出感度についても、改良プライマーセットは安定した増幅を示した。

3. ダイレクトシーケンス

通知法における nested PCR の増幅産物は 280bp で、実質的な解析領域は約 230bp 程度であった (図 2 : 2010-NigataV-10-8, 2010-SagaP-10s52)。また、韓国 (図 2 : 2005-A6, 2005-A10, 2006-ANSAN-HKA) や中国 (図 2 : 2006-BbGx3.06-China, 2007-Bj5.07-China) の増幅系とはずれがあり、150bp 程度しか比較ができなかった。改良法では、PCR 産物からのダイレクトシーケンスにより塩基配列の解析を試みた結果、通知法および韓国・中国の解析領域を含む約 590bp を決定することができた (図 2 : NIID HA11, NIID HA19)。

4. 環境検体からの HAV 検出

2010 年 5 月の堺市の 1 下水検体では、通知法や名古屋市マニュアルによるプライマーでは VP1-2A 領域を増幅できなかったが、改良法のプライマーセットにて VP1-2A 領域の増幅を確認し、系統樹解析を行った結果、3A 型であることが確認できた (データ示さず)。

5. 系統樹解析

系統樹解析では、Nagano, Kobe 株を含むクラスター 1A_GM2007 への分岐点の Bootstrap value 値が通知法での 771 (図 3) から 984 (図 4) へと大幅に改善された。同様に HA11 と HA76 の分岐点も 666 から 995 へと改善されるなど Bootstrap value の改善が確認できたが、反対に HA67, HA85, HA86 への分岐点 (646 から 601 へと低下) のように低下する部分も存在した。

D. 考察

新たに設定したプライマーセットにより、RT-PCR による検査での陽性率の向上を確認することができた。プライマーの

位置については通知法の増幅範囲 280bp に加え、データベース上に登録されている韓国や中国の塩基配列情報の範囲を含み、さらに、ダイレクトシーケンスにより新たなプライマーを使用することなく塩基配列の解析ができる長さを考慮した。その結果、通知法と同等の手順と時間で、500bp 以上の範囲が解析可能となった。これにより、感染源や感染経路の特定、患者間の疫学的関連性の把握等の分子疫学的解析の精度向上が図れるものと思われる。特に、我が国を除き、韓国、中国を含めアジア諸国は A 型肝炎が多発しており、それらの国からの HAV の侵入が懸念されることから、それらの国の分離株との比較解析は特に重要である。新たに設計した増幅部位はこれらの国で解析される分離株の遺伝子増幅部位も含んでおり、150bp 程度しか比較できなかった従来の状況も大幅に改善できると期待される。

系統樹解析でも Bootstrap value の改善がみられるなど遺伝系統樹解析においても改良法により、解析能の向上をはかることが期待できる。

また、通知法と比較して非特異的な増幅が減少し、判定・解析の精度向上も図れた。プライマーの長さについては 18bp から検討した結果、22 から 25bp の長さのほうが検出感度、特異性ともに高レベルでバランスが良いこともわかった（データ示さず）。

なお、今回は遺伝子型 2 型の HAV 株を保有していないため、それについては比較を行うことができなかった。今後の検討課題としたい。また、リアルタイム PCR

の検出感度についても高感度化の必要性が指摘されていることから、今後検討を行う必要がある。

E. 結論

新たに設計したプライマーセットにより患者検体からの RT-PCR による HAV 遺伝子の検出感度の向上と、分子疫学的解析能の改善を図ることができた。今後は、患者検体のみならず、食品や環境中の HAV について、より詳細な分子疫学解析を実施できることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

田中俊光，横井一，水村綾乃，小林圭子，木原颯子，都竹豊茂，中台啓二，加曽利東子，落合弘章，大山照雄，西村正樹，山本一重，野田 衛：生シラスが原因食品と疑われる有症苦情事例について-千葉市，病原微生物検出情報，32(12)363-364 (2011)

野田 衛，上間 匡，片山和彦，岡 智一郎，山下和予，岡部信彦，石丸 歩，松岡隆介，温泉川肇彦，地方衛生研究所 (51 機関)：食品媒介事例を中心としたノロウイルス，サポウイルスの塩基配列情報および疫学情報の共有化の取り組み，病原微生物検出情報，32(12)354-355 (2011)

斎藤 博之，東方 美保，岡 智一郎，片山 和彦，田中 智之，野田 衛：パンソルビン・トラップ法による食品からのウイルス検出法，病原微生物検出情報，32(12)355-357 (2011)

篠原美千代，富岡恭子，峯岸俊貴，内田

- 和江, 鈴木典子, 島田慎一, 河橋幸恵, 岸本剛, 野田衛: 非晶性リン酸カルシウム微粒子を用いた食品からのウイルス検出法, 病原微生物検出情報, 32(12)357-358 (2011)
- 吉澄志磨, 後藤明子, 石田勢津子, 野田衛: 二枚貝関連の食中毒疑い事例における各種胃腸炎ウイルスの関与-北海道, 病原微生物検出情報, 32(12)361-363 (2011)
- 溝口嘉範, 木田浩司, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 安原広己, 上間 匡, 野田 衛: ふき取り検体のノロウイルス検査法の改良, 病原微生物検出情報, 32(12)358-359 (2011)
- 吉田徹也, 粕尾しず子, 畔上由佳, 内山友里恵, 笠原ひとみ, 上田ひろみ, 長瀬博, 藤田 暁, 野田 衛: ノロウイルスおよびサポウイルスの掃除機内ダスト中の汚染実態調査, 小児科, 52(10)1419-1423 (2011)
- 細見卓司, 谷脇 妙, 松本一繁, 藤戸亜紀, 鍋島 民, 下司 勲, 松本道明, 今井 淳, 大野雅子, 麻岡文代, 吉澄志磨, 井手 忍, 山崎謙治, 左近直美, 中田恵子, 増本久人, 南 亮仁, 野田日登美, 野田 衛, 片山和彦: 高知県で発生したNorovirus GII/14 による食中毒事例と他県事例株との比較, 病原微生物検出情報, 32(7), 199-201 (2011)
- 植木 洋, 高橋由理, 鈴木優子, 阿部美和, 佐藤由紀, 沖村容子, 高橋達也, 佐藤 淳, 豊嶋 潤, 熊谷 祥, 野田 衛: 2010 年度に県内で集団発生した感染性胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型一宮城, 病原微生物検出情報, 32(6), 173-174 (2011)
- Tetsuya Yoshida, Tatsuko Miyasaka, Yuka Azegami, Yurie Uchiyama, Hitomi Kasahara, Hiro mi Ueda, Koji Ishii, Mamoru Noda: Investigation of epidemiology and HAV genomes regarding three hepatitis A infections that occurred in April -May, 2010, Jpn J Infect Dis, 64, 260-261 (2011)
- Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada T., Nakamura N., Tada Y., Noda M. and Wakita T.: Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010., Hepatology International, 5: 204-205 (2011)
- 野田 衛: 生牡蠣におけるノロウイルス汚染と検査・除去法, 日本医事新報, 4584, 55-56 (2012)
- 野田 衛, 山下和予: ノロウイルス食中毒の発生動向および調査・検査体制の取り組み, 食品衛生研究, 62(1):1-19 (2012)
- Kumagai Y, Noda M, and Kasuga F.: New Approaches for Tackling Foodborne Infections, Journal of Disaster Research, 6(4), 451-458 (2011)
- 学会発表
- 斎藤博之, 東方美保, 岡智一郎, 片山和彦, 田中智之, 野田衛: 病原ウイルスによる食品汚染を検出するパンソルビン・トラップ法の開発, 第19回秋田応用生命科学研究会, 秋田市, 11/25 (2011)
- 上間 匡, 石井孝司, 小原真弓, 田中俊光, 増本久人, 入谷展弘, 斎藤哲也, 吉田徹也, 山下育孝, 柴田伸一郎, 田中智

之, 内野清子, 野田 衛: A型肝炎ウイルス検出PCRの高感度化の検証, 第32回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 10/6 (2011)

阿部 勝彦, 山本美和子, 伊藤文明, 野田 衛: 広島市におけるノロウイルスGII/4のカプシッド蛋白質のP2ドメインの解析(2006~2010年), 第81回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 北九州市, 10/6 (2011)

田中俊光, 横井一, 小林圭子, 木原顕子, 都竹豊茂, 中台啓二, 大山照雄, 西村正樹, 山本一重, 野田衛: 寿司店を原因施設とするA型肝炎ウイルス食中毒事例, 第32回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 10/6 (2011)

野田 衛, 上間 匡, 多田有希, 中島一敏, 島田智恵, 中村奈緒美, 清原知子, 田中智之, 石井孝司: 2010年のA型肝炎の分子疫学と食品衛生上の原因究明, 第32回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 10/6 (2011)

山下育孝, 青木紀子, 青木里美, 土井光徳, 古屋由美子, 西尾 治, 石井孝司, 野田 衛: A型肝炎の国内発生における輸入生鮮魚介類の関与, 第32回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 10/6 (2011)

吉澄志磨, 後藤明子, 石田勢津子, 田中智之, 野田 衛: 二枚貝の喫食のみられた食中毒疑い事例における各種胃腸炎ウイルスの関与について, 第32回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 10/7 (2011)

田村 務, 渡邊香奈子, 田澤 崇, 渡部香, 昆美也子, 野田 衛: 牛血清アルブ

ミンとポリエチレングリコールを使用した水性二相分配法によるノロウイルスの濃縮, 第32回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 10/7 (2011)

篠原美千代, 富岡恭子, 峯岸俊貴, 鈴木典子, 内田和江, 島田慎一, 河橋幸恵, 岸本 剛, 吉川悠子, 大橋典男, 野田衛: 非晶性リン酸カルシウム微粒子を用いた食品からのウイルス検出法, 第32回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 10/7 (2011)

溝口嘉範, 上間 匡, 木田浩司, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 安原広己, 野田 衛: ふき取り検体からのノロウイルス検出法に関する検討, 第32回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 10/6 (2011)

西村浩一, 原田誠也, 李 天成, 石井孝司, 田中智之, 野田 衛: 熊本県におけるイノシシ, ブタ及びシカのE型肝炎ウイルス保有状況に関する実態調査, 第32回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 10/6 (2011)

斎藤博之, 東方美保, 岡智一郎, 片山和彦, 田中智之, 野田衛: 食品中のノロウイルス検出のためのパンソルビン・トラップ法の開発, 第102回日本食品衛生学会学術講演会, 秋田市, 9/29-30 (2011)

Kazushi Motomura, Masa ru Yokoyama, Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Mamoru Noda, Tomoyuki Tanaka, Hironori Sato: Structural dynamics of norovirus GII.4 genome in nature, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 札幌市, 9/15 (2011)

Koji Ishii, Tomoko Kiyohara, Sayaka

Yoshizaki, Takaji Wakita, Tomoe Shimada, Naomi Nakamura, Yuki Tada, Mamoru Noda: Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 札幌市, 9/15 (2011)

野田 衛, 多田 有希, 田中智之, 清原知子, 石井 孝司: 2010年のA型肝炎の分子疫学的解析とA型肝炎サーベイランスシステムの構築, 衛生微生物技術協議会第32回研究会, 江戸川区, 6/30 (2011)
石井孝司, 清原知子, 島田智恵, 中村奈緒美, 多田有希, 野田 衛, 脇田隆宇: 2010年春季のA型肝炎のdiffuse outbreakの分子疫学的解析, 第47回日本肝臓学会総会, 港区, 6/3 (2011)

Mamoru Noda, Yuki Tada, Masashi Uema, Kazutoshi Nakashima, Tomoe Shimada, Naomi Nakamura, Tomoko Kiyohara, Koji Ishii: Food hygienic investigation of hepatitis A cases in the spring of 2010 in Japan, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 札幌市, 9/15 (2011)

Hiroyuki Saito, Miho Toho, Mamoru Noda, Tomoyuki Tanaka, Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama: Development of a PANTRAP method to detect norovirus from contaminated food, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 札幌市, 9/13 (2011)

Shinichi Kobayashi, Noriko Fujiwara, Yoshihiro Yasui, Teruo Yamashita, Akira Fujiura, Mamoru Noda, Hiroko

Minagawa: A foodborne outbreak of sapovirus linked to catered box-lunch in Japan, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 札幌市, 9/13 (2011)

Mamoru Noda, Masashi Uema, Noriko Aoki, Satomi Aoki, Yumiko Furuya, Osamu Nishio, Shinichiro Shibata, Akari Kodaira, Koji Ishii, Yasutaka Yamasita: Role of imported seafood as a vehicle of hepatitis A virus, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 札幌市, 9/15 (2011)

Kohji Mori, Tetsuya Akiba, Miyuki Nagano, Sanae Emura, Noriko Akamatsu, Katsushi Iwakoshi, Yukinao Hayashi, Akemi Kai, Mamoru Noda: Prevalence of sapovirus-related community gastroenteritis in Tokyo from April 2008 to March 2011, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 札幌市, 9/13 (2011)

G. 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

図3: 通知法による系統樹解析結果

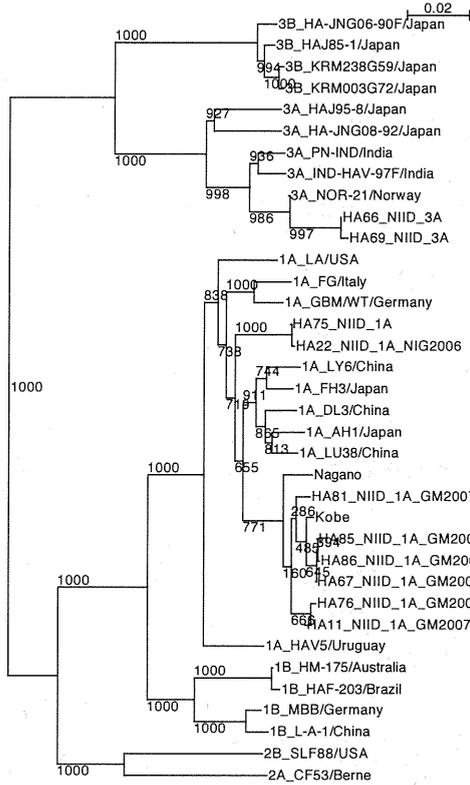


図4: 改良法による系統樹解析結果

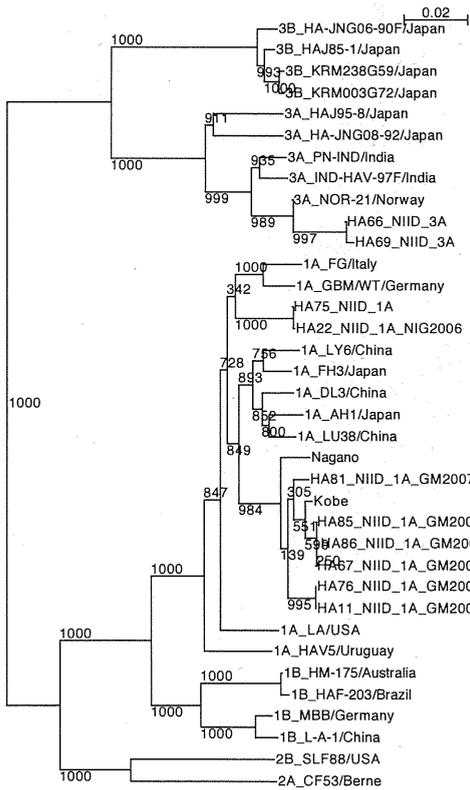


表:通知法と改良法のRT-PCR結果比較

検査機関	検体名	遺伝子型	通知法				改良法		
			RealTime コピー数/g	2799/3273	2907/3186	2799/3273	2F/1RA	2F/2R	2F/1RA
						2907/3186			2F/2R
千葉市	KHAV22	1A(NiG2006)	4.43 × 10 ⁵	+	++	++	++	++	+++
	KHAV24	1A(NiG2006)	1.74 × 10 ⁵	++	++	++	++	++	+++
	KHAV25	1A(NiG2006)	4.01 × 10 ⁷	++	++	+	++	++	+++
	58013	1A(NiG2006)	7.20 × 10 ⁸	+++	+++	W(スメア)	++	+++	+++
長野県	22-35-1	3A	NT	NT	-	±	+	NT	+++
	22-35-2	3A	NT	NT	-	+	++	NT	+++
	22-41	3A	NT	NT	-	++	++	NT	+++
	22-42	1A(1A-2010様)	NT	NT	+++	W(スメア)	+++	NT	+++
佐賀県	10s49	1A(1A-2010)	NT	-	++	++	±	+	++
	10s52	1A(1A-2006)	NT	+	++	+++	++	++	+++
	10s53	-	NT	-	-	-	-	-	-
	10s54	1A(1A-2010)	NT	++	++	+++	++	+++	+++
	10s65	1A(1A-2010)	NT	++	++	+++	++	+++	+++
	11s71	1A	NT	++	++	++	++	++	+++
	11s82	1A	NT	++	++	NT	++	+++	+++
	10e505	1A(1A-2010)	NT	-	-	-	-	NT	-
富山県	1	1A(1A-2010)	-	±	++	+++	++	++	+++
	2	1A(1A-2010)	4.9 × 10 ⁹	+++	+++	++	+++	+++	+++
	3	1A(1A-2010)	1.1 × 10 ¹⁰	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	4	3A	4.4 × 10 ⁵	-	-	-	+	±	+++
	5	1A(1A-2010)	6.9 × 10 ⁸	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	6	3A	-	-	+	-	++	++	+++
	7	3A	1.1 × 10 ⁸	-	++	-	+++	++	+++
新潟県	8	1A(1A-2010)	NT	+	++	+	+	+	+++
	16	1A(1A-2010)	NT	+	++	++	+	+	+++
	1(s)	1A((Nag2006)	NT	+	++	++	+	+	+++
大阪市	1	3A	4.8 × 10 ⁵	-	-	-	+	-	++
	2	1A(NiG2006)	1.7 × 10 ⁷	+	+	+	++	++	++
	3	1B	-	-	+	-	+	+	++
感染症研	HA2	1A(GM2007)	2.11 × 10 ⁸	++	++	++	++	+	+++
	HA8	1A(GM2007)	3.76 × 10 ⁵	-	±	++	-	-	+++
	HA11	1A(GM2007様1)	1.85 × 10 ⁶	-	+	++	++	++	+++
	HA19	1A(NiG2006様3)	not detected	-	+	++	++	++	+++
	HA20	1A(NiG2006様3)	8.05 × 10 ⁴	-	+	-	+	++	+++
	HA22	1A(NiG2006)	6.11 × 10 ⁷	+	-	++	++	++	+++
	HA65	1A(GM2007)	1.27 × 10 ⁵	-	-	±	+	±	+++
	HA66	3A	2.37 × 10 ⁶	-	+	++	++	+	+++
	HA67	1A(GM2007)	9.30 × 10 ⁴	-	+	++	-	-	+
	HA68	3A	2.30 × 10 ⁴	-	-	+	±	-	+++
	HA69	3A	1.10 × 10 ⁶	-	+	++	++	++	+++
	HA75	1A	1.80 × 10 ⁷	+	-	++	++	++	+++
	HA76	1A(GM2007様1)	4.56 × 10 ⁷	±	++	+	++	++	+++
	HA81	1A(GM2007様4)	4.61 × 10 ⁶	+	++	+	++	++	+++
	HA85	1A(GM2007)	5.53 × 10 ⁵	+	++	+	++	++	+++
	HA86	1A(GM2007)	2.28 × 10 ⁶	-	±	+	++	+	+++
	HA87	3A	not detected	-	-	+	+	++	+++
	HA89	3A (VP3-VP1)	2.95 × 10 ⁵	-	+	+	++	++	+++
	HA90	1A(NiG2006様1)	9.23 × 10 ⁶	-	-	++	++	++	+++
	HA91	1B	5.91 × 10 ⁵	-	+	++	+	++	+++
	HA93	1A(GM2007)	4.81 × 10 ⁷	++	++	±(スメア)	++	++	+++
	HA96	3A	1.09 × 10 ⁵	-	-	-	-	-	+++
HA101	1A(NiG2006様3)	1.71 × 10 ⁷	++	++	±(スメア)	++	+	+++	
HA102	1A(NiG2006様1)	1.81 × 10 ⁷	±	-	±(スメア)	+	±	+++	

Genotype 5 と 6 HEV 構造蛋白の発現および抗原性の解析

研究分担者	李 天成	国立感染症研究所
研究協力者	片岡 紀代,	国立感染症研究所
	高橋 和明	東芝病院
	三代 俊治	東芝病院

研究要旨

E 型肝炎ウイルス (HEV, Hepatitis E virus) は E 型肝炎の原因ウイルスである。E 型肝炎は発展途上国で常時散発的に発生し、時として飲料水などを介し大流行を引き起こす。先進国においても、E 型肝炎はすでに土着していて、人畜共通感染症として注目されている。これまで四つの異なる遺伝子型の HEV が同定されていた。最近日本に棲息するイノシシから新しい遺伝子型の HEV が 2 つ発見されたが、その抗原性や病原性などはまだ解析されていない。本研究では組換えバキュロウイルス発現システムを用いて Genotype 5 と 6 HEV (G5 と G6 HEV) の構造蛋白を発現し、ウイルス様粒子の形成およびその抗原性の解析を試みた。

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス (hepatitis E virus, HEV) はエンベロープを持たない一本鎖のポジティブストランド RNA ウイルスであり、ヘペウイルス科 (*Hepeviridae*)、ヘペウイルス属 (*Hepevirus*) に分類される。HEV は急性 E 型肝炎の原因ウイルスである。E 型肝炎は発展途上国で常時散発的に発生し、時として飲料水などを介し大流行を引き起こす。先進国においても、E 型肝炎はすでに土着している。また、HEV はヒトだけではなく、家畜や野生動物にも感染する。E 型肝炎は新興再興感染症でもあり、人獣共通感染症でもある。HEV の感染をコントロールするため、ワクチンの開発が必要である。これまで四

つの異なる遺伝子型の HEV が同定されていた。最近日本に棲息するイノシシから新しい遺伝子型の HEV が 2 つ発見されたが、その抗原性や病原性などはこれまで解析されていない。本研究では組換えバキュロウイルス発現システムを用いて Genotype 5 と 6 HEV (G5 と G6 HEV) の構造蛋白を発現し、ウイルス様粒子の形成およびその抗原性の解析を試みた。

B. 研究方法

1. 材料

昆虫細胞 : Tn5, Sf9.

G5 と G6 HEV RNA と cDNA.

2. 方法

G5 と G6 HEV ORF2 を RT-PCR 法で増幅し、定法どおり作製した組換えバキュロウイルスを用い Tn5 細胞で構造蛋白を発現させ、ウイルス様粒子 (HEV-LPs) を作製した。HEV-LPs をウサギとモルモットに免疫し、抗 HEV-VLPs 抗体を得た。HEV-LPs を用いて抗体検出 ELISA 法、抗体を用いて抗原検出 ELISA 法をそれぞれ樹立し、G5 HEV の抗原性を従前既知の G1, G3, G4 HEV の抗原性と比較した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 結果 1

N 末端 111 個アミノ酸を欠損した G5 および G6 HEV ORF2 ゲノムを持つ組換えバキュロウイルスをそれぞれ昆虫細胞 Tn5 に感染し、感染細胞培養上清から直径約 24nm の HEV-LPs を大量に得た。形態的には G5 と G6 HEV-LPs は G1, G3, G4 HEV-LPs と極めて類似する。G5 および G6 HEV-LPs を用いて G1, G3, G4 HEV に感染した E 型肝炎患者血清から特異的 IgG および IgM 抗体の検出を試みたところ、感度は G1, G3, G4 HEV-LPs を用いる場合と差がなかった。また、G5 と G6 HEV-LPs をウサギとモルモットに免疫した結果、高力価な抗体が誘導された。抗 G5 HEV-LPs 抗体を用いた抗原検出 ELISA により G1, G3, G4 HEV を高感度で検出し得た。抗 G5 HEV-LPs 抗体と抗 G6 HEV-LPs 抗体は PLC/PRF/5 細胞への G1, G3 および G4 HEV の感染を阻止することから中和活性を有することが推測される。この結果から G5 と G6 HEV の抗原性は G1, G3, G4 HEV と類似することが推測された。

2. 結果 2

N 末端 13 個アミノ酸を欠損した G5 と G6 HEV ORF2 ゲノムを持つ組換えバキュロウイルスを昆虫細胞 Tn5 に感染し、ネイティブウイルスサイズの HEV-LPs の作製を試みた。感染細胞内には感染 2 日目に、非感染細胞やバキュロウイルス野生株感染細胞では検出されない分子量 72k および 58k のバンドが出現した。発現は 5 日目にプラトーに達し、7~8 日目には 66k、および 54k のバンドが出現した。上清中からはウイルス特異蛋白は全く検出されなかった。感染 7 日目の感染細胞を回収し、細胞を破碎後、遠心上清を回収した。超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察したところ、直径 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する粒子が多数観察された。この粒子内には、構造タンパクをコードする遺伝子が取り込まれていた。

D. 考察

本研究において G5 と G6 HEV-LPs の作製に成功した。G5 と G6 HEV の抗原性はこれまでに発見された G1, G3 および G4 HEV と非常に類似することが明らかになった。G5 と G6 HEV-LPs は優れた免疫原性を持ち、ワクチン開発の有用な材料になると考えられる。また、ネイティブな粒子と類似する大きな G5 と G6 HEV-LPs は HEV の構造解析に非常に有用である。

E. 結論

新しい遺伝子型 G5 および G6 HEV の抗原性は G1, G3, G4 HEV と類似する。

F. 研究発表

1. Tian-Cheng Li, Susumu Ochiai, Hiroaki Ishiko, Takaji Wakita, Tatsuo Miyamura, and Naokazu Takeda. A retrospective study on imported hepatitis E in Japan. Travel Medicine and Infectious Disease. 2012. *In press*.

2. Tian-cheng Li, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Arikawa J, Koma T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Mai LT, Hoa NT, Yamashiro T, Hasebe F, Takeda N, Wakita T. Characterization of self-assembled virus-like particles of rat hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. Journal of General Virology (2011), 92, 2830-2837.

3. Nakamura S, Tsuchiya H, Okahara N, Nakagawa T, Ohara N, Yamamoto H, Li TC, Takeda N, Ogasawara K, Torii R. Epidemiology of Hepatitis E Virus in Indoor-Captive Cynomolgus Monkey Colony. J Vet Med Sci. 2012. *in press*.

1. 学会発表

1) Genotype 5 HEV構造蛋白の発現および抗原性の解析、李 天成、高橋 和明、片岡 紀代、吉崎 佐矢香、網 康至、須崎 百合子、石井 孝司、脇田 隆字、三代 俊治。第152回日本獣医学会学術集会 2011年9月 堺市

2) 田中聖一、山本博、万年和明、李天成。ニッポンザルにおける E 型肝炎ウイルス感染状況。第 152 回日本獣医学会学術集会 2011年9月 堺市

3) Tian-cheng Li, Kumiko Yoshimatsu, Shumpei P. Yasuda, Jiro Arikawa, Michiyo

Kataoka, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, and Takaji Wakita. Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Rat Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses cell culture. IUMS2011, XV international congress of virology. 2011. September, Sapporo.

4) Tian-Cheng Li, kumiko Yoshimatsu, Shumpei P. Yasuda, Jiro Arikawa, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki Tetsuro Suzhki, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. Expression of rat HEV virus capsid protein and generation of the virus-like particles. The 22th Conference of the Asian Pacific Association for the study of the liver. 2012. February 16-19. Taipei.

5) Koji Ishii, Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Tomoyuki Shioda, Takanobu Kato, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. Cloning of oermissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. The 22th Conference of the Asian Pacific Association for the study of the liver. 2012. February 16-19. Taipei.

G. 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

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

食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究

平成 23 年度 研究協力報告書

田中 智之	小和田 和誠
篠原 美千代	三上 稔之
田村 務	名古屋 真弓
吉澄 志磨	内野 清子
森 功次	増本 久人
入谷 展弘	高橋 知子
小林 慎一	阿部 勝彦
山下 育孝	原田 誠也
飯塚 節子	北元 憲利
重本 直樹	

平成 24 (2012) 年 3 月

研究協力総括報告書

研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
	三上 稔之	青森県環境保健センター
	高橋 知子	岩手県環境保健研究センター
	篠原 美千代	埼玉県衛生研究所
	森 功次	東京都健康安全研究センター
	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
	名古屋(小原) 真弓	富山県衛生研究所
	小和田 和誠	福井県衛生環境研究センター
	小林 慎一	愛知県衛生研究所
	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
	内野 清子	堺市衛生研究所
	北元 憲利	兵庫県立大学環境人間学部
	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
	重本 直樹	広島県立総合技術研究所・保健環境センター
	阿部 勝彦	広島市衛生研究所
	山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所

研究総括

今年度の研究協力者による研究報告は次の6分野に大別された。

1. 本班の一つの重要テーマである食中毒事例の原因(疑)食材からのノロウイルス遺伝子の検出法の開発に関して、パンソルビン・トラップ法によって一感染事例の食材からウイルス遺伝子が検出され因果関係が同定された。これ以外に非結晶リン酸カルシウム微粒子による方法、牛血清アルブミンとPEGを用いた水性二相分配法による食材等からのウイルス濃縮法を検討し、回収率の良い成績が得られた。
2. 食中毒事例におけるノロウイルスを含め、他の病原ウイルス(サポウイルス、アイチウイルス、アストロウイルス、アデノウイルス、A群、C群ロタウイルス)の関与を明らかにするために、多くの事例について遺伝子学的解析を行った。ノロウイルス以外ではサポウイルス、アイチウイルス、アストロウイルス、A群ロタウイルスの関与が見られた。
3. 食中毒事例のウイルス遺伝子検査法として、多種類のウイルスの関与を解析する目的で、Multiplex PCR法が構築され、迅速性、特異性に優れた成績が報告された。