

ウイルスの状況を包括的に把握する有効な手段に1つであることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

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

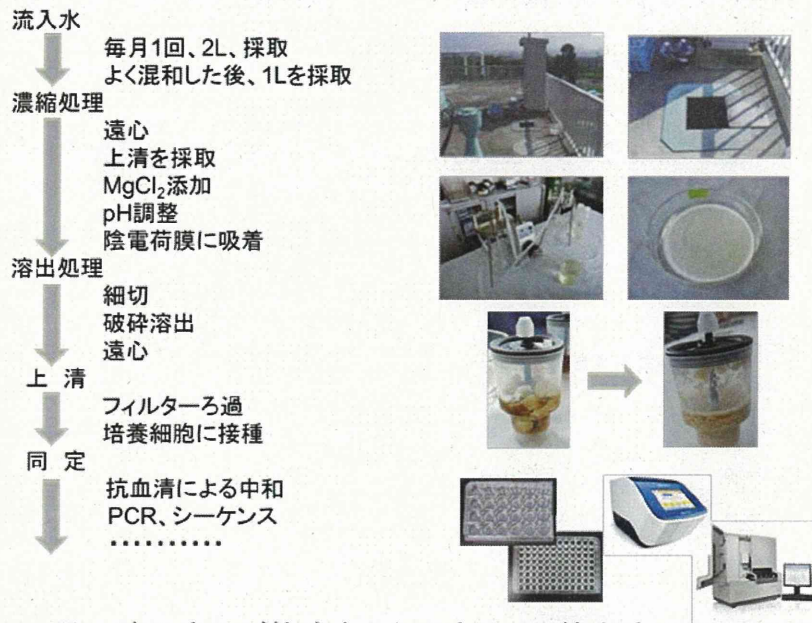


図1 流入水及び放流水からのウイルス検出法

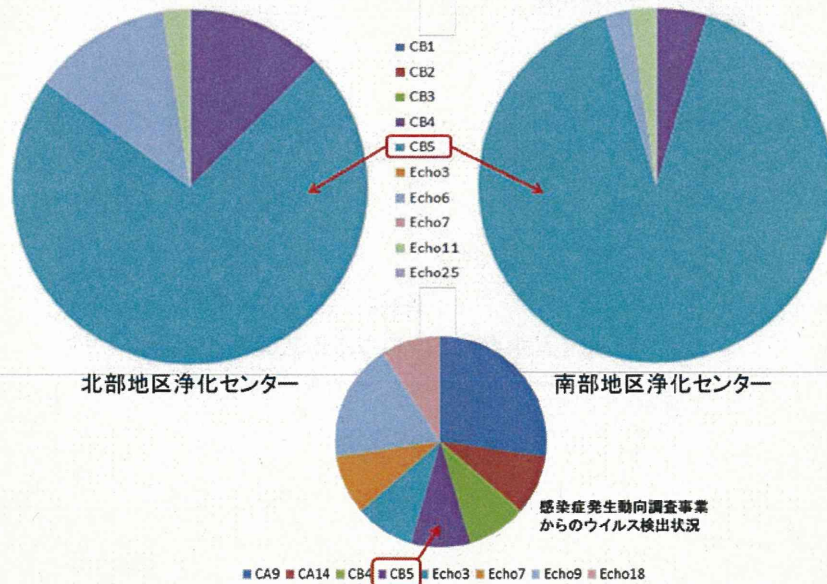


図2 浄化センター流入水から検出したエンテロウイルスの種類

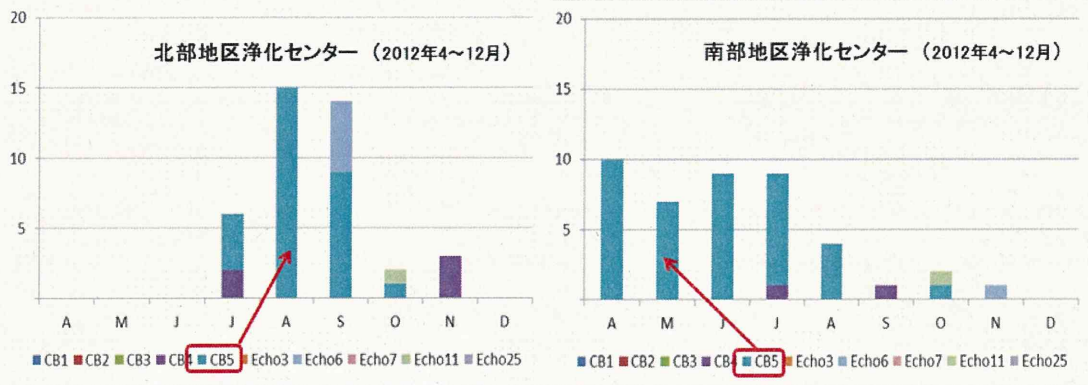


図3 浄化センター流入水からのエンテロウイルスの月毎検出状況

■ CB1 ■ CB2 ■ CB3 ■ CB4 ■ CB5 ■ Echo3 ■ Echo6 ■ Echo7 ■ Echo11 ■ Echo25

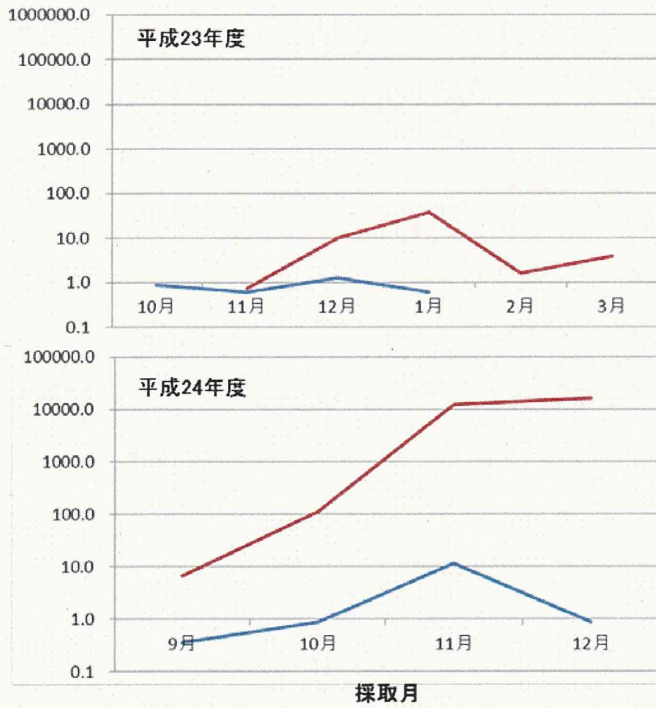


図4 下水流入水からのノロウイルスの検出状況

— Norovirus GI — Norovirus GII

## カキ関連食中毒事例および下水からの下痢症ウイルスの検出

研究協力者	森田 晴美	岩手県環境保健研究センター
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	齋藤 幸一	岩手県環境保健研究センター

### 研究要旨

下水処理施設の流入水および放流水中のウイルス遺伝子の検出調査をしたところ、ノロウイルスが高率に検出された。アイチウイルス、アデノウイルスなどの下痢症ウイルスも検出され、一部のウイルスは下水処理により除去しきれずに放流水へ残存することが確認された。また、カキ関連食中毒事例の患者便を調査したところ、ノロウイルス以外にもアイチウイルスをはじめとした下痢症ウイルスが検出された。これらのことから、ノロウイルス以外の下痢症ウイルスもノロウイルスと同様に下水から放流された後にカキへ蓄積し、カキの喫食による食中毒の原因になると考えられた。

#### A. 研究目的

昨年度までの研究では、カキの喫食によるノロウイルス以外の下痢症ウイルスの感染リスクについて検証することを目的として、下水処理施設の流入水及びおよび放流水、試験的に河口部に垂下したカキを対象に調査を行い、ノロウイルス以外の多様な下痢症ウイルスが検出されることを確認した。

本年度は、これまでの調査対象に加え、カキ関連食中毒事例の患者便を対象として調査を行い、カキ関連食中毒事例におけるノロウイルス以外の下痢症ウイルスの関与について検証した。

#### B. 研究方法

##### 1. 材料

- ・岩手県内の下水処理施設(対象人口:8000人、処理方法:長時間エアレーション法)の流入水および放流水を平成 24 年 11 月～平成 25 年 2 月の計 7 回採水した。
- ・平成 23 年 12 月～平成 25 年 1 月に岩手県で発生したカキ関連食中毒事例の患者便を調査対象とした。

##### 2. 試料前処理方法

- ・環境水は 12,000rpm で 20 分間遠心後、上清を pH3.5 に調整、陰電荷フィルターでろ過した後フィルターを細切り、3% Beef extract に誘出させたものを濃縮検

体とした。

・患者便は蒸留水で 10%乳剤に調整したものを検体とした。

### 3. ウイルス検出方法

QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN) を用いて核酸抽出を行った。DNase I 処理後、PrimeScript RT reagent Kit (TAKARA) を用いて cDNA を合成し、以下のプライマーセットで PCR 反応を行った。

・ノロウイルス

COG1F/G1SKR, COG2F/G2SKR

・サポウイルス

1st SV-F13, SV-F14/SV-R13, SV-R14

nest SV-F22/SV-R2

・エンテロウイルス

1st EVP2/OL68-1

nest EVP4/OL68-1

・アストロウイルス

1st Mon244/82b

2nd AST-S1, AST-S2, AST-S3, AST-S4,

AST-S5, AST-S6, -S7, AST-S8/END

・アイチウイルス

C94b(+)/264K(-)

・A 群ロタウイルス

1st Beg9/End9

nest aAT8, aBT1, aCT2, aDT4, aET3,

aFT9/RVG9

・C 群ロタウイルス

1st G8S/G8A

2nd NG8S1/NG8A2

・アデノウイルス

AdnU-S' 2/AdnU-A2

(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. 環境水における下痢症ウイルス検出 (図 1～4)

下水処理施設流入水からは 7 回 (2012/2013 シーズン) の採水を行ったすべての回でノロウイルス G II が検出されたほか、アイチウイルス、アストロウイルス、アデノウイルスが 7 回中 6 回と高率に検出された。また、ノロウイルス G I、A 群ロタウイルスが 4 回、サポウイルス、エンテロウイルスが 2 回ずつそれぞれ検出された。流入水における下痢症ウイルスの検出件数は、当該調査地域の定点あたりの感染性胃腸炎の患者実数に沿って増減する傾向にあった。(図 1)

放流水からは流入水と同様にノロウイルス G II が 7 回中 5 回と最も多く検出されたほか、ノロウイルス G I、アイチウイルス、A 群ロタウイルスがそれぞれ 3 回、アストロウイルスが 2 回検出された。流入水で検出されたサポウイルス、エンテロウイルスは放流水では検出されなかった。また、流入水、放流水とも C 群ロタウイルスは検出されなかった。

下水中 1 ml あたりのノロウイルスのコピー数は流入水で G I が  $10^1 \sim 10^2$ 、G II が  $10^3 \sim 10^4$ 、放流水で G I が  $10^0 \sim 10^1$ 、G II が  $10^1 \sim 10^2$  オーダーと調査期間を通じてほぼ同程度検出された。下水処理により流入水中のウイルスはある程度除去されるものの完全ではなく、放流水からもノロウイルスが検出される傾向が確認された。(図 3、4)

## 2. カキ関連食中毒事例患者便における下痢症ウイルスの検出（表1）

カキ関連食中毒事例における患者便からのノロウイルス検出状況は、7事例中2事例でノロウイルスGⅠのみが検出された以外は、一つの事例からGⅠとGⅡの両方のノロウイルスが検出された。

また、ノロウイルス以外の下痢症ウイルスについては7事例中5事例でアイチウイルスが検出されたほか、サポウイルス、エンテロウイルスがそれぞれ1事例で検出された。

下水、カキ関連食中毒事例患者便とも、ノロウイルス以外の下痢症ウイルスではアイチウイルスが高率に検出される傾向にあった。

## D. 考察

下水処理施設流入水からの下痢症ウイルスの検出状況は、処理対象地域でノロウイルス以外にもアイチウイルス、アストロウイルス、ロタウイルス等の下痢症ウイルスが検出され、ノロウイルス以外の下痢症ウイルスによる感染性胃腸炎の発生の関与を示唆する成績であった。また、流入水において、一部のウイルスが連続して検出される場合もあり、当該ウイルスの流行を示唆するものと考えられた。検出が連続した期間もウイルスの種類により数週間から数か月と異なっており、上流地域でのウイルスの流行期間を反映しているものと考えられた。

放流水中からの下痢症ウイルスの検出状況から、胃腸炎患者数の少ない時期や患者数増加の初期には、下痢症ウイル

スは下水処理工程で効果的に除去されるが、患者数増加が継続すると、一部が除去されず、放流水から検出されるウイルスが増加すると考えられた。

カキ関連食中毒事例では、患者便からノロウイルスを含む数種類の下痢症ウイルスが同時に検出されており、それらのウイルスによりカキおよび海域が汚染されていたものと推察された。また、患者便から検出された下痢症ウイルスと同様のウイルスが下水処理施設放流水から検出された。これらのことから、ノロウイルス以外の下痢症ウイルスが放流水からカキへ蓄積し、カキ喫食による食中毒発生の原因となる可能性が示唆された。

## E. 結論

下水処理施設流入水の下痢症ウイルスの調査により、地域に流行している感染性胃腸炎の原因ウイルスを推定することができると考えられた。今回の調査では、ノロウイルス以外のウイルスの検出は定性であり、今後は、定量的な調査および考察が必要である。ノロウイルス以外の下痢症ウイルスも放流水中へ排出され、カキ等の二枚貝へ蓄積し、食中毒に関するものとし唆された。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## 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

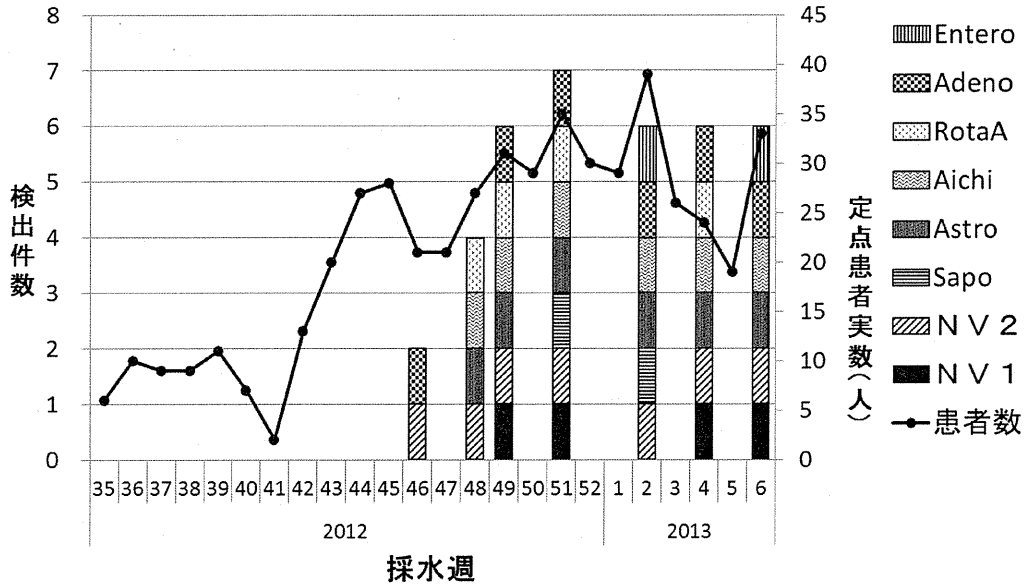


図1. 流入水における下痢症ウイルスの検出

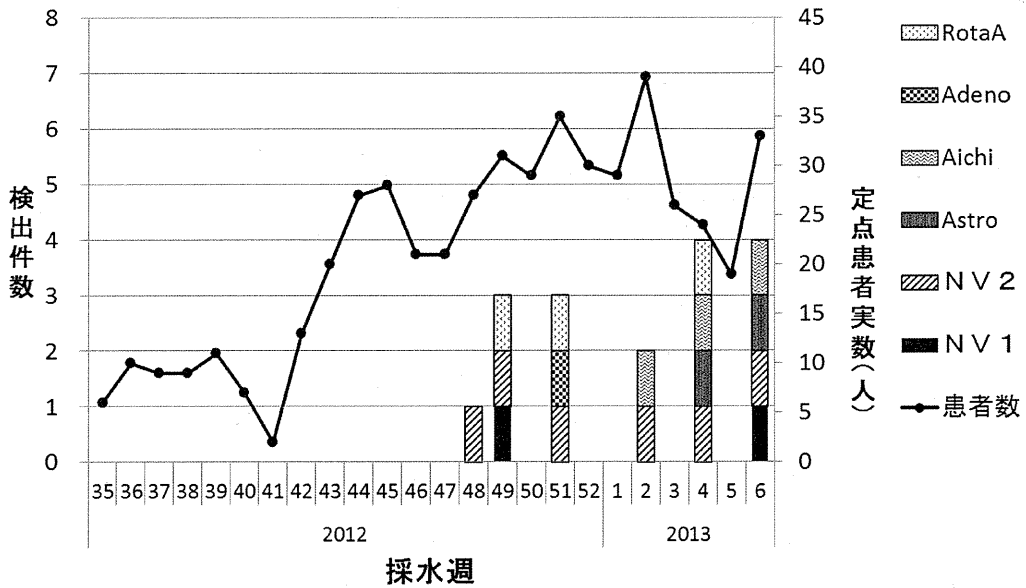


図2. 放流水における下痢症ウイルスの検出

図3 流入水中のノロウイルス濃度

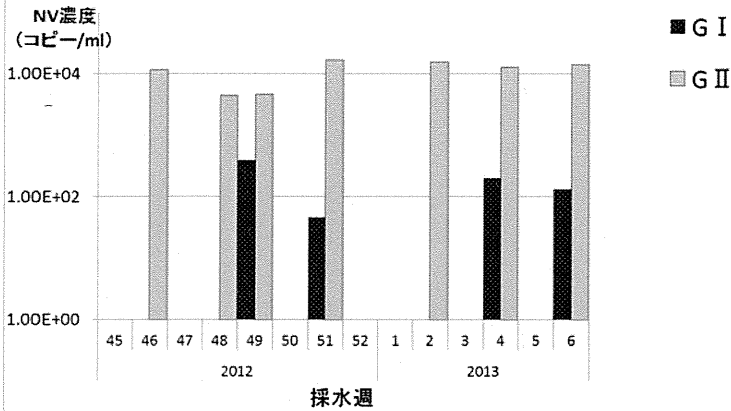
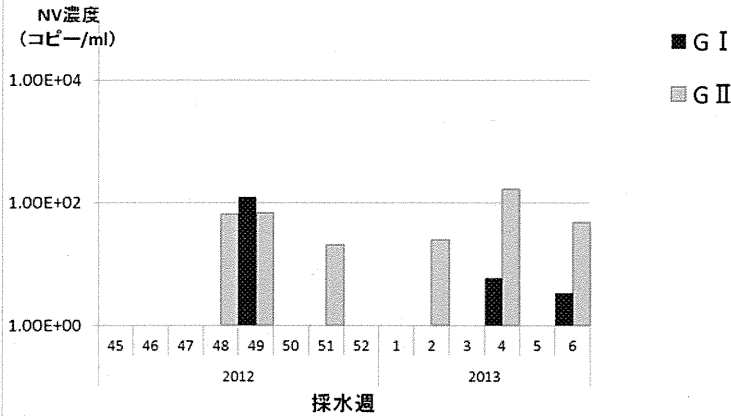


図4 放流水中のノロウイルス濃度



発生期間	患者数	検査数	検出ウイルス					
			NV I	NV II	NV I + NV II	Sapo	Aichi	Entero
2011.12	10	5	5				1	
2011.12	20	4	4					
2011.12	26	10	2		8	2	8	
2012.2	6	3	1	1	1		2	
2012.3	20	11		10	1		1	
2012.12	11	4	2	5				
2013.1	8	7	1	4	1		2	1

表5 カキ関連食中毒事例患者便における下痢症ウイルス検出状況

平成 24 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

## カキ中のヒト糞便由来 F 特異 RNA 大腸菌ファージの検出法の検討

研究協力者	山本美和子	広島市衛生研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	田中 寛子	広島市衛生研究所
研究協力者	藤井 慶樹	広島市衛生研究所
研究協力者	京塚 明美	広島市衛生研究所
研究協力者	石村 勝之	広島市衛生研究所

### 研究要旨

感染性のあるヒト糞便由来病原ウイルスの汚染指標としての F 特異 RNA 大腸菌ファージ(F-ファージ)の有用性を検証することを目的とした。プラーク法およびリアルタイム PCR 法によるカキ中の F-ファージの検出を試み、リアルタイム PCR 法による NoV、SaV 遺伝子検出との相関について調査し、ウイルスの存在指標として使用できるか検討した。その結果、カキ中からの F-ファージは、プラーク法では 1 検体のみ形成されたが、リアルタイム PCR 法では、II 群ファージ 25 検体、III 群ファージ 44 検体が陽性であった。II 群ファージと NoVG2 の一致率は 80.4%、II 群ファージと SaV の一致率は 78.4%と高い結果が得られた。さらに II 群ファージと NoVG2 のコピー数の相関係数は 0.86 と正の相関がみられた。

### A. 研究目的

ノロウイルス(NoV)、サポウイルス(SaV)など食中毒の原因となるウイルスは培養が不可能なため、その検出は PCR 法等の遺伝子検査に依存している。遺伝子検査は、感染性のあるウイルスだけを検出しているわけではなく、特にカキ等の二枚貝や下水放流水、海水等の環境中には紫外線や下水処理場の塩素等で不活化されたウイルスも含まれる可能性がある。そのため、二枚貝の腸管系ウイルス

汚染リスクや安全性の指標を遺伝子検査によって正確に把握することはできない。

また、カキ等の二枚貝が関連する食中毒は主に NoV によるが、二枚貝には NoV 以外のさまざまな腸管系ウイルスなどの汚染リスクが高い。したがって、二枚貝の安全性を確保するためには、NoV だけでなく、ヒトの糞便由来ウイルス全般の汚染の有無をモニタリングする必要がある。

現在、水環境中の腸管系ウイルスの存在指標として、腸管系ウイルスと同じよ



うな挙動をとる F-ファージが有望視されている。そのなかで、Ⅱ群およびⅢ群ファージは主にヒト由来であることが知られている。本研究は、感染性のあるヒト糞便由来病原ウイルスの汚染指標としての F-ファージの有用性を検証することを目的として、カキ中の F-ファージをプラーク法で検出するとともに、リアルタイム PCR 法による NoV、SaV 遺伝子検出率と F-ファージの相関を検討した。

## B. 研究方法

### 1. プラーク法

#### (1) 試薬等の調製方法

(a) 液体培地：Bacto Tryptone 10g、D(+) グルコース 1g、NaCl 8g、CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O 0.3g および MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.15g を蒸留水 1L に溶解後、滅菌した。

(b) 培養液：液体培地 20mL にナルジキシン酸溶液 20 μl およびカナマイシン溶液 20 μl を加えたものを宿主菌の培養に供した。

(c) F-ファージ感受性菌株の培養：宿主菌は *Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49 (WG49) を用いた。WG49 は *Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG45 に大腸菌の F 繊毛を組み込んだ宿主菌である。F 特異大腸菌ファージ感受性、体表面吸着大腸菌ファージ非感受性、*Salmonella* ファージ感受性という特徴を有している。一般的に環境水中に *Salmonella* ファージはほとんど存在しないとされているので、WG49 は環境水中から主に F-ファージを検出することができる。

凍結 WG49 菌液を融解後、培養液 20ml

に約 1 ml 加えて攪拌し、37°C で 3~4 時間振とう培養を行った。

(d) 寒天培地：液体培地 1L に Bacto agar 9g を加えて滅菌後、50°C に保温し、使用直前に、ナルジキシン酸溶液 1 ml、カナマイシン溶液 1 ml を加え、培養した WG49 を適量加えて使用した。

(e) WG49 の宿主菌としての有効性の確認：宿主菌としての有効性を確認するため、培養した WG49 を MacConkey Agar で培養し、大腸菌の F 繊毛を有していることを意味するラクトース分解性である赤色コロニーが全体の 9 割以上であり、その濃度が 10<sup>8</sup>CFU/ml 以上であることを確認した。

#### (2) 50%カキ中腸線乳剤

カキ中腸線 5 個に等量の PBS と αアミラーゼ 50mg を添加後、ストマッカーで 3 分間処理して乳剤とし、36°C 1~2 時間インキュベートし、2ml のマイクロチューブに採取後、12,000rpm、5 分間遠心した上清をその後の検査に用いた。

#### (3) ファージ測定手順(単層寒天培地法)

50%カキ中腸線乳剤遠心上清 1ml をシャーレに加え、(d)の寒天培地 10ml 程度を添加して十分に混和後、静置凝固させ、37°C 18~24 時間培養し、形成したプラークを計数した。単位は、PFU/ml (Plaque Forming Unit/ml)。

### 2. リアルタイム PCR 法

50%カキ中腸線乳剤遠心上清 280 μl から QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて RNA 抽出を行い、AVL バッファー 60 μl に溶出した。溶出液 50 μl を RT 反応に用い、100 μl の cDNA を得た。cDNA 液 5 μl をリアルタイム PCR 法に用い、F-ファージ I

群～IV群、NoVG1、G2 および SaV 遺伝子検出を実施した。

### 3. MS2 ファージ (I 群) のプラーク数およびリアルタイム PCR 法における Ct 値との関連性

陽性コントロールとして用いている MS2 ファージ (I 群) を WG49 に感染させ 18～24 時間培養後に、フィルター濾過し、10 倍段階希釈して上述のプラーク法およびリアルタイム PCR 法を実施し、プラーク数と Ct 値との関連性を調べた。

#### (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. プラーク法による F-ファージの検出 (表 1)

カキ 51 検体についてプラーク法による F-ファージの検出を試みた。その結果プラークを形成したのは 1 検体のみであり、プラーク数は遠心上清 1ml あたり 1 個であった。

### 2. リアルタイム PCR 法による群特異的 F-ファージ、NoVG1、NoVG2 および SaV 遺伝子の検出 (表 2)

カキ 51 検体について、ファージ群別プライマーを用いたリアルタイム PCR 法により I 群～IV群別の F-ファージ、NoVG1、NoVG2 および SaV 遺伝子の検出を試みた。II 群ファージは 25 検体、III 群ファージは 44 検体、NoVG1 は 12 検体、NoVG2 は 27 検体、SaV は 16 検体から遺伝子が検出された。I 群および IV 群ファージは検出されなかった。II 群ファージおよび III 群フ

ァージと NoVG1、NoVG2 および SaV 遺伝子検出との一致率は、II 群ファージと NoVG1 が 54.9%、II 群ファージと NoVG2 が 80.4%、II 群ファージと SaV が 78.4%、III 群ファージと NoVG1 が 25.5%、III 群ファージと NoVG2 が 47.1%、III 群ファージと SaV が 41.2% で、II 群ファージと NoVG2 群が最も高い結果となった。

### 3. MS2 ファージ (I 群) のプラーク数およびリアルタイム PCR 法における Ct 値との関連性 (表 3)

MS2 ファージの培養液を 10 倍段階希釈したものについてプラーク数およびリアルタイム PCR 法を 2 系列で実施した結果、 $10^{-7}$  希釈では①プラーク数 137 個、リアルタイム Ct 値 40.95、②プラーク数 230 個、リアルタイム Ct 値 39.08 となった。リアルタイム PCR の Ct 値は各段階希釈液  $7\mu\text{l}$  に相当するので、プラーク数も  $7\mu\text{l}$  当たりの量に換算し、さらに 2 系列の平均をとると、リアルタイム Ct 値 40.95 のときプラーク数 0.96 となった。プラーク数 1 個を 1 コピーと想定し、段階希釈ごとのリアルタイム Ct 値に当てはめ検量線を引くと直線が得られ、II 群および III 群ファージが I 群ファージと同じようにプラーク形成すると仮定し、作成した検量線に実際のカキ検体のリアルタイム PCR の Ct 値を当てはめコピー数を算出した。II 群ファージコピー数と一致率の最も高かった NoVG2 のコピー数で散布図を作成し、相関係数を算出した。その結果、図 1 になり、3 個の外れ値を除くと図 2 になった。相関係数は 0.86 となり、強い正の相関がみられた。

#### D. 考察

カキ中の F-ファージをプラーク法およびリアルタイム PCR 法により検討した。プラーク法ではカキ 51 検体中 1 検体のみプラークが形成され、プラーク数は 1 個であった。リアルタイム PCR 法では、II 群ファージが 25 検体、III 群ファージが 44 検体陽性であった。MS2 ファージを用いた実験では、不活化されていない F-ファージは、リアルタイム PCR の Ct 値から算出されたコピー数とプラーク数がほぼ同じ値であることが確認できた。これらのことからリアルタイム PCR 法では陽性であったにも関わらず、プラーク法では検出されない要因として、カキ中にプラーク形成を阻害する要因が存在し、見かけ上低く定量されている可能性や、カキ中に不活化された F-ファージが存在し、プラーク法では検出されないことなどが推測された。

しかし、リアルタイム PCR 法によるカキからの II 群ファージおよび NoVG2 の一致率は 80.4%、II 群ファージと SaV は 78.4% と高い一致率を示すこと、さらに II 群ファージと NoVG2 のコピー数の相関係数が 0.86 と強い正の相関がみられたことなどから、II 群ファージと腸管系ウイルスは相関があることが示唆された。今

後は感染性のある F-ファージを検出するためには、プラーク法での検出が必須であり、検査法についてさらなる検討が必要であると考えられた。

#### E. 結論

カキ中の F-ファージプラーク数は、リアルタイム PCR 法から推測される数値より低い結果となった。

リアルタイム PCR 法による II 群ファージと NoVG2 の一致率は 80.4%、II 群ファージと SaV は 78.4% と高く、II 群ファージと腸管系ウイルスの相関が高いことが示唆された。

II 群ファージと NoVG2 のコピー数の相関係数は 0.86 と強い正の相関がみられた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### 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

表 1 プラーク法およびリアルタイム PCR 法検出数

プラーク法	リアルタイム PCR 法							
	F-ファージ				NoVG1	NoVG2	SaV	
	I 群	II 群	III 群	IV 群				
検出数	1/51 (2.0%)	0/51 (0%)	25/51 (49.0%)	44/51 (86.3%)	0/51 (0%)	12/51 (23.5%)	27/51 (52.9%)	16/51 (31.4%)

表 2 リアルタイム PCR 法による F-ファージと NoV、SaV 検出状況

	NoVG1 陽性	NoVG1 陰性	NoVG2 陽性	NoVG2 陰性	SaV 陽性	SaV 陰性
II 群ファージ 陽性	7 (13.7%)	17 (33.3%)	21 (41.2%)	4 (7.8%)	15 (29.4%)	9 (17.6%)
II 群ファージ 陰性	6 (11.8%)	21 (41.2%)	6 (11.8%)	20 (39.2%)	2 (3.9%)	25 (49.0%)
III 群ファージ 陽性	9 (17.6%)	35 (68.6%)	22 (43.1%)	22 (43.1%)	15 (29.4%)	29 (56.9%)
III 群ファージ 陰性	3 (5.9%)	4 (7.8%)	5 (9.8%)	2 (3.9%)	1 (2.0%)	6 (11.8%)
一致率						
		NoVG1	NoVG2	SaV		
II 群ファージ		54.9%	80.4%	78.4%		
III 群ファージ		25.5%	47.1%	41.2%		

表 3 プラーク数とリアルタイム Ct 値

段階希釈	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
プラーク数 (PFU/ml)	1.8E8	1.8E7	1.8E6	1.8E5	1.8E4	1835	183.5 (実測値)
リアルタイム Ct 値 (7 μl)	16.695	20.095	23.945	28.66	32.44	36.275	40.015
リアルタイム コピー数(copy/7 μl)	1.1E6	1.5E5	1.6E4	1000	110	12	1.4
リアルタイム コピー数(copy/ml)	1.5E8	2.1E7	2.3E6	1.4E5	1.6E4	1700	200

$$Y(Ct) = -3.958X + 40.552$$

$$\text{コピー数} = 10^X$$

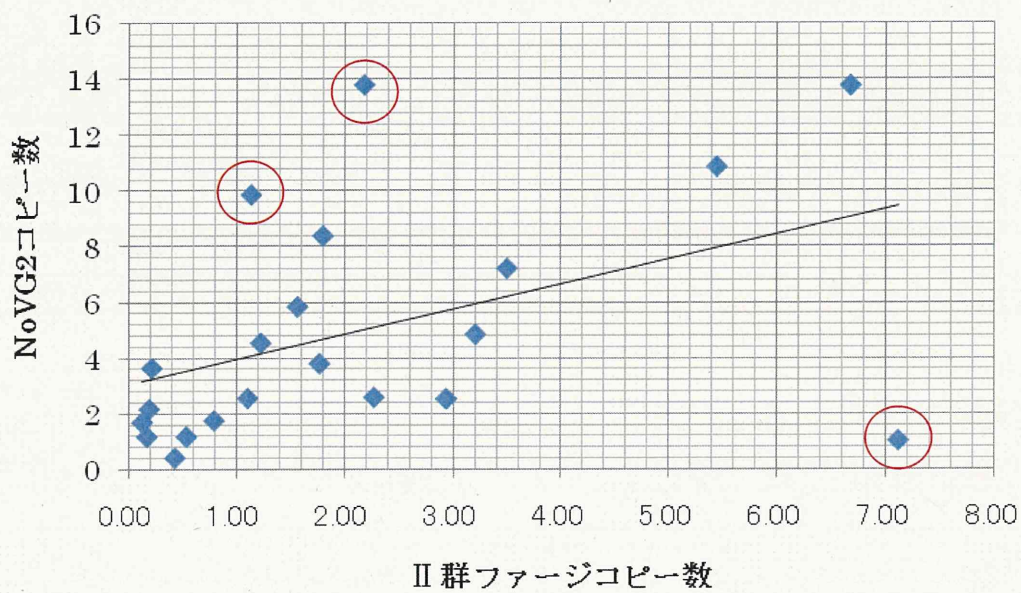


図1 II群ファージコピー数とNoVG2コピー数

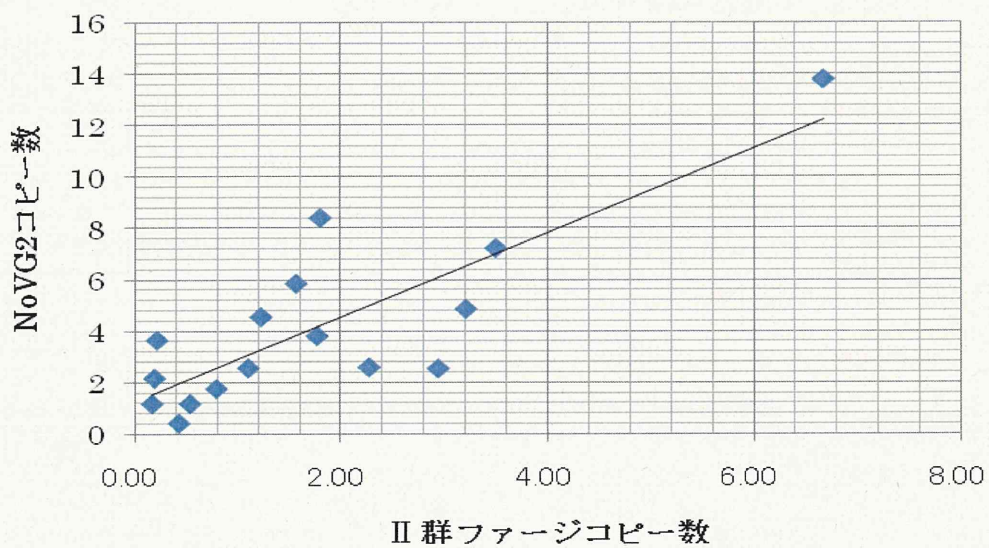


図2 II群ファージコピー数とNoVG2コピー数(外れ値除外後)

平成 24 年度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)  
「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

熊本県におけるイノシシ、シカ及びブタの E 型肝炎ウイルス汚染実態調査  
— 平成 24 年度 —

研究協力者	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	大迫 英夫	熊本県保健環境科学研究所
研究協力者	吉岡 健太	熊本県保健環境科学研究所

### 研究要旨

イノシシ、シカ及びブタを対象に、Nested RT-PCR 法により E 型肝炎ウイルス (HEV) 検査を行った。イノシシ 31 頭及びシカ 2 頭からは検出されなかったが、ブタ 305 頭中 3 頭 (1.0%) から遺伝子型 3 型の HEV 遺伝子が検出された。HEV 遺伝子が検出されたブタの内訳は、血液 225 頭中 1 頭 (0.4%) 及びと畜検査で合格となった肝臓 80 頭中 2 頭 (2.5%) であり、血液及び肝臓の各 1 頭は同一養豚場由来であった。また、今回のブタの調査で、22 養豚場中 2 養豚場 (9.1%) の HEV 汚染が判明した。

平成 24 年 7 月 1 日から生食用牛肝臓が販売禁止となり、ブタ肝臓を生食用として提供しているとの一部報道もあるが、ブタ肝臓は HEV 汚染の可能性もあることから、生食の危険性を、繰り返し消費者に周知徹底する必要がある。

#### A. 研究目的

厚生労働省の感染症発生動向調査によると、わが国における E 型肝炎の患者数は例年 50 例前後で、近年漸増傾向にあり、特に平成 23 年は 2 倍近い 116 例が報告された。E 型肝炎は、E 型肝炎ウイルス (HEV) よって起こる経口感染症で、イノシシ、シカまたはブタの肉や肝臓等の生食、あるいは加熱不十分な状態での喫食を原因とする感染事例が数多く含まれていると推定される。そこで本研究では、これらの HEV 汚染実態を調査し、情報を提供す

ることにより健康被害の未然防止に役立てることを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 1. 材料

平成 24 年 3 月～平成 25 年 1 月に熊本県内で捕獲されたイノシシ 31 頭 (筋肉 30 検体、肝臓 23 検体及び血液 22 検体)、シカ 2 頭 (筋肉 2 検体、肝臓 2 検体)、及びと畜場で処理されたブタ 305 頭 (と畜検査合格肝臓 80 検体及び血液 225 検体) を検査材料とした。

##### 2. Nested RT-PCR 法による HEV 遺伝子の

#### 検出及び塩基配列解析

イノシシ、シカ及びブタの肉と肝臓は、既報と同様に処理して検査した。すなわち、それぞれ約 2g を切り取りペースト状にした後、PBS(-)で 50%乳剤を調整し、3,000rpm で 10 分間遠心した。その上清をさらに 10,000rpm で 10 分間遠心し、得られた上清を検体とした。また、血液は室温に放置して血清を分離後、3,000rpm、10 分間遠心した上清を検体とした。

次に、乳剤及び血清の 100  $\mu$ l から AGPC 法で RNA を抽出（最終的に 50  $\mu$ l の DEPC 処理水に溶解）し、Random Primer を使用して cDNA を合成した。

その後、E 型肝炎検査マニュアルに記載された ORF2 領域のプライマーセットによる Nested PCR を行い、2%アガロースゲル電気泳動で増幅バンドを確認した。

確認された Nested PCR の増幅バンドを精製後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、遺伝子解析ソフト ME GA5.0 を用いて、近隣結合法（NJ 法）による分子系統樹解析を行った。

#### （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

本年度は、イノシシ（31 頭）及びシカ（2 頭）から HEV の遺伝子を検出することはできなかった（表 1）。しかし、と畜されたブタ 305 頭（合格肝臓 80 検体及び血液 225 検体）を検査したところ、3 頭（血液 1 検体、肝臓 2 検体）から HEV の遺伝子が検出された（表 1）。養豚場別に見る

と、22 養豚場中 2 養豚場（9.1%）のブタから HEV 遺伝子が検出され、このうち、血液 1 検体と肝臓 1 検体は同一の G 養豚場由来のブタであった（表 3）。また、残りの肝臓 1 検体は、昨年多数の HEV 汚染ブタが検出された B 養豚場由来であった。

また、検出された遺伝子の解析結果から、ブタから検出された HEV の遺伝子型は 3 型で、G 養豚場由来の 2 株は 100%の相同性を示した。また、B 養豚場の残り 1 株は同一養豚場で昨年検出された株と 99-100%一致した（図 1）。

#### D. 考察

Yazaki ら（J. Gen. Virol., 84, 2351-2357, 2003）は、北海道北見市の病院で経験された 10 名の E 型肝炎患者のうち 9 名が発病前にブタの肝臓を食べていたこと、市販の冷凍ブタ肝臓 363 検体中 7 検体（1.9%）が HEV 遺伝子陽性であったこと、及び患者とブタ肝臓から検出された HEV 遺伝子の塩基配列の相同性が高いことを報告した。そこで今回、と畜検査で合格となったブタ肝臓から HEV の遺伝子検査を試みたところ、2.5%が陽性であった。さらにブタ肝臓は、カンピロバクターやサルモネラ等の食中毒菌による汚染の可能性もあり、生食には適しない。しかし、平成 24 年 7 月 1 日から生食用牛肝臓の販売が禁止されたことで、ブタ肝臓を生食用として提供しているとの報道もあり、実際に、平成 24 年度食品、添加物等の年末一斉取締りにおける立ち入り調査では、生食用としてのブタ肝臓等の提供に対する指導が全国で 80 件も行われていることから、ブタ肝臓の生食の危険性について、

繰り返し関係事業者及び消費者に周知徹底する必要がある。

## E. 結論

平成 24 年度は、県内のイノシシ及びシカから HEV 遺伝子を検出することはできなかったが、と畜されたブタの約 1% から HEV 遺伝子が検出され、と畜検査で合格となった肝臓からも 2.5% から検出された。また今回の調査では、HEV 遺伝子が検出された養豚場は 9.1% であった。

このように、ブタは HEV に汚染されている可能性があるため、喫食に際し十分な加熱調理を行うとともに、調理時の二次汚染を防止するため、ブタ肉や肝臓等と他の食品との調理器具の共用を避けることが重要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 原田誠也，西村浩一，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，シカ及びブタの E 型肝炎ウイルス汚染実態調査と分子疫学解析，第 60 回日本ウイルス学会学術集会，平成 24 年 11 月，大阪市

## 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



表1 イノシシ及びシカの HEV 遺伝子検査結果 (平成 24 年度)

	イノシシ				シカ			
	筋肉	肝臓	血液	頭数	筋肉	肝臓	血液	頭数
検査数	30	23	22	31	2	2	0	2
陽性数	0	0	0	0	0	0	0	0
陽性率 (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表2 ブタの HEV 遺伝子検査結果 (平成 24 年度)

	ブタ		
	肝臓*	血液	頭数
検査数	80	225	305
陽性数	2	1	3
陽性率 (%)	2.5	0.4	1.0

\* : と畜検査合格肝臓

表 3 養豚場別のブタの HEV 遺伝子検査結果

養豚場	検査頭数 (陽性頭数)	
	肝臓	血液
A	26	
B	14 (1)	
C	12	
D	11	
E	9	
F	4	20
G	4 (1)	25 (1)
H		5
I		20
J		5
K		5
L		15
M		35
N		5
O		5
P		5
Q		5
R		20
S		5
T		20
U		10
V		20
22	80 (2)	225 (1)

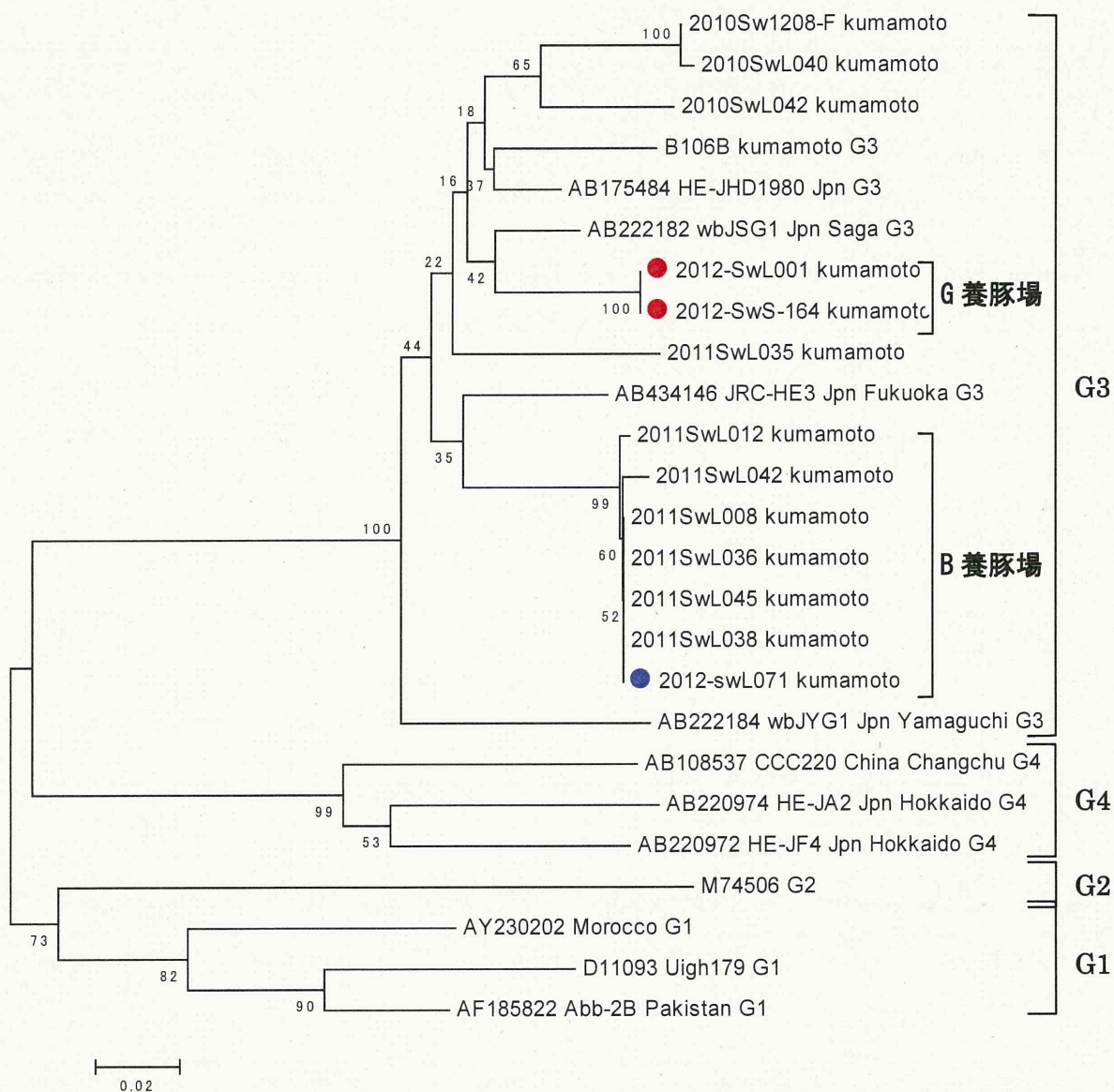


図1 ブタから検出されたHEVの分子系統樹 (NJ法)

平成 24 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」  
研究協力報告

サポウイルス VLPs に対する新規単クローン抗体の作製とその解析

研究協力者	北元憲利	兵庫県立大学
研究分担者	田中智之	堺市衛生研究所
研究分担者	岡智一郎	国立感染症研究所
	李 天成	同
	村上耕介	同
	片山和彦	同

### 研究要旨

ヒトに急性胃腸炎を起こすサポウイルス (Sapovirus、SaV) は、遺伝子学的に多様性であり、現在 4 つの Genogroup (GI, GII, GIV および GV) に分類されている。SaV の検出法は PCR 法に依存しており、簡便迅速な免疫学的診断法は確立されていない。本研究では、SaV の簡便・迅速・経済的・多検体が検出可能な診断法を開発する目的で、SaV-VLPs に対する MAbs の作製を試みている。これまでに、いくつかの MAbs を得て、その診断 (イムノクロマト法、IC) への有用性について検討してきた。しかし、臨床材料を用いて調べたところ、Genogroup によっては検出率が低いことが分かった。そこで今回、新たに GIV (Yakumo8) を免疫源として抗体の作製を試み、より感度の高い診断法の可能性を検討した。各 Genogroup (GI、GII、GIV および GV) の VLPs を抗原とした ELISA 法およびウエスタンブロット法により各抗体の反応性を調べたところ、すべての Genogroup に交叉する抗体があることがわかった。また、Genogroup 特異的な抗体も得られた。今後、既存の抗体も含め、ブロードに反応する抗体あるいは Genogroup 特異的な抗体のカクテルにより、イムノクロマト法などによる検出系を検討する予定である。

#### A. 研究目的

サポウイルス (SaV) のレコンビナントウイルス様中空粒子 (VLPs) の 4 Genogroup (GI、GII、GIV および GV) に反応する単クローン抗体 (MAbs) を用い (昨年度報告)、その診断 (イムノクロ

マト法、IC) への有用性について検討してきた。しかし、臨床材料を用いて調べたところ、Genogroup によっては検出率が低いことが分かった。そこで今回、新たに GIV (Yakumo8) を免疫源として抗体の作製を試み、より感度の高い診断法の可