

20. 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
 21. 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39回日本肝臓学会西部会、平成23年12月、岡山
 22. 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、平成23年10月、東京
 23. 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32回日本食品微生物学会、平成23年10月、東京
 24. 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、平成23年10月、東京
 25. 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、平成23年10月、東京
 26. 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47回日本肝臓学会総会、平成23年6月、東京
 27. Kubota T., Kumagai A., Ito H., Furukawa S., Someya Y., Ishii K., Wakita T., Takeda N., Shirato H. and Narimatsu H. X-ray crystallographic studies on binding specificity of norovirus to Lewis antigens. 4th Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology. Jeju, Korea, October 28-31, 2012
 28. Ishii K., Kanda T., Sugiura N., Kiyohara T., Yoshizaki S., Nakamura N., Shimada T., Nakashima K., Tada Y., Yokosuka O., Wakita T. and Noda M. Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A between 2010 and 2011 in Japan. 14th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases. Shanghai, China. June 22-25, 2012
 29. Li T.C., Yoshimatsu K., Yasuda S., Arikawa J., Kataoka M., Ami Y., Suzaki Y., Ishii K., Takeda N. and Wakita T. Antigenicity and infectivity of rat hepatitis E virus. The 9th Japan-China International Conference of Virology. Sapporo, Japan, June 12-13, 2012
 30. Ishii K., Li T.C., Yoshizaki S., Shiota T., Kato T., Takeda N. and Wakita T. Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Taipei, Taiwan, February 16-19, 2012.
 31. 清原知子、脇田隆字、石井孝司：B型肝炎ワクチン力価測定法の比較：第16回日本ワクチン学会、平成24年11月、横浜
 32. 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的解析：第60回日本ウイルス学会、平成24年11月、大阪
 33. 横川 寛、森山正樹、赤澤大輔、中村紀子、石井孝司、加藤孝宣、脇田隆字：イオン交換クロマトグラフィーを用いたC型肝炎ウイルス粒子精製の検討、第60回日本ウイルス学会、平成24年11月、大阪
 34. 塩田智之、李 天成、吉崎佐矢香、武田直和、脇田隆字、石井孝司：E型肝炎ウイルス生活環におけるカプシド蛋白C末端52アミノ酸の機能解析、第60回日本ウイルス学会、平成24年11月、大阪
 35. 清原知子、Niroshana Dahanayaka、脇田隆字、石井孝司：スリランカにおけるA型肝炎の流行(2009-2010年)、第16回日本渡航医学会、平成24年7月、大阪
- G. 知的所有権の取得状況
なし

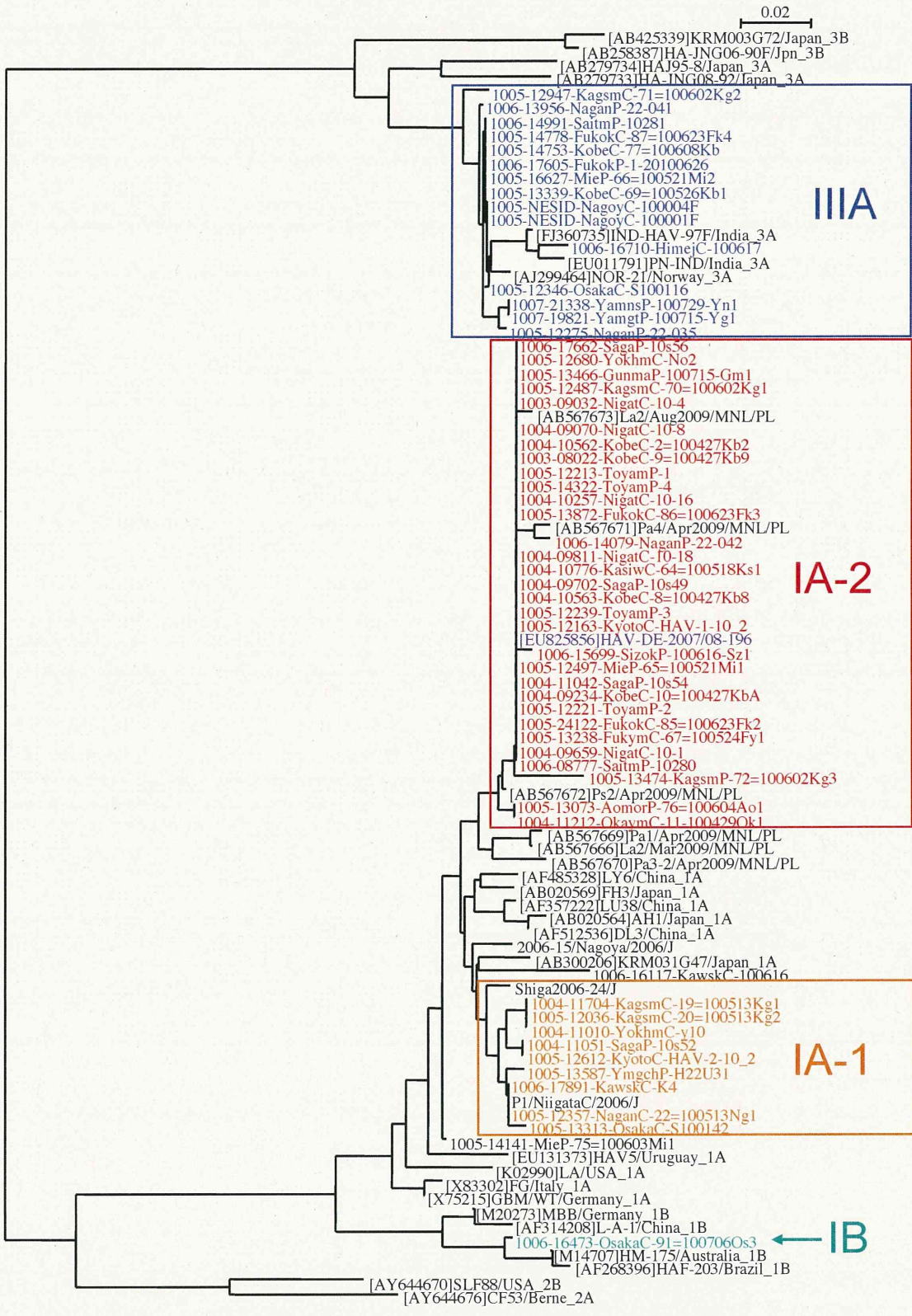


図1:2010年春期に日本で流行したHAV遺伝子の系統樹解析

遺伝子型	検体数	渡航歴がある検体
IA-1	13	2 (インドネシア、タイ/カンボジア)
IA-2	31	2 (フィリピン)
IA-その他	3	1 (ペルー/ボリビア)
IB	1	1 (エジプト/トルコ)
IIIA	13	1 (韓国)
合計	61	5

表1 遺伝子型別集計

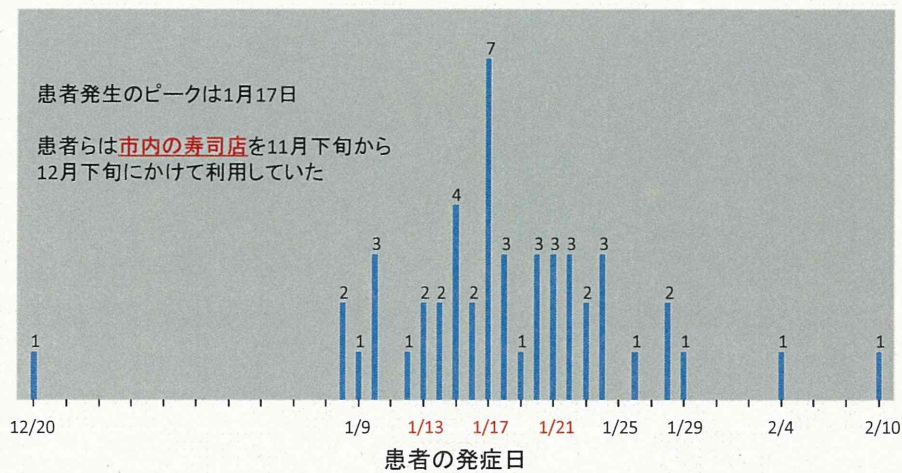


図2 千葉市での集団食中毒患者数

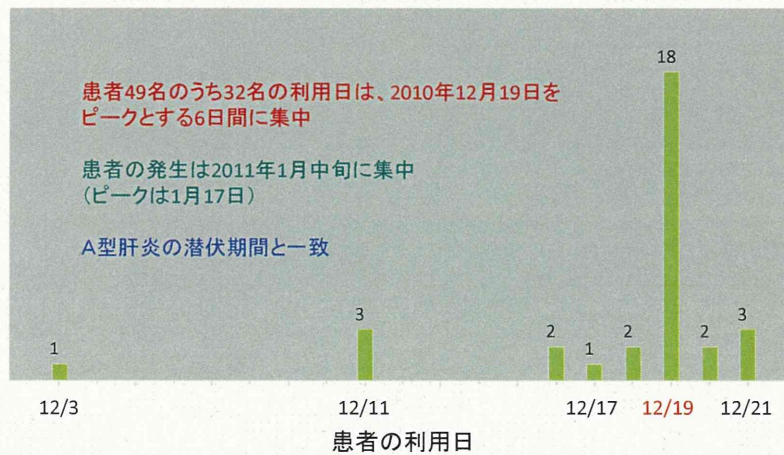


図3 寿司店の利用状況

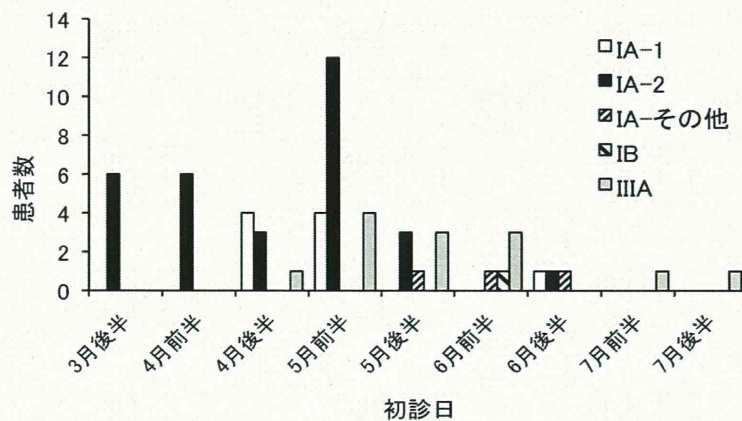


図4 遺伝子型の推移

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」
総合研究分担報告(平成 22～24 年度)

HEV の安定性、抗原性および感受性の研究

研究分担者	李 天成	国立感染症研究所
研究協力者	吉崎 佐矢香	国立感染症研究所
	脇田 隆字	国立感染症研究所
	網 康至	国立感染症研究所
	片岡 紀代	国立感染症研究所

研究要旨

E 型肝炎ウイルス (HEV) 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に発生し、先進国においても、輸入感染症だけではなく、人畜共通感染症として注目されている。本研究では細胞培養で増殖させた HEV の安定性の解析、組換えバキュロウイルス発現システムを用いて作製した Genotype 5 HEV (G5 HEV) のウイルス様粒子の抗原性の解析を行った。また、ラット感染実験により、ヒト由来およびラット由来の HEV の感受性を検討した。

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス (Hepatitis E virus; HEV) は E 型肝炎の原因ウイルスである。現在、既知の四つの遺伝子型以外に、イノシシやラットなどの野生動物から新たな遺伝子型のウイルスも発見された。E 型肝炎は途上国では多発しており、HEV 感染妊婦の死亡率が高い。また、E 型肝炎は人獣共通感染症でもあり、HEV はすでに日本に土着していることが明らかになってきた。これまでに HEV が増殖できる培養細胞系は確立されておらず、ウイルス増殖、複製機序は未だに明らかにされていない。そのため、ワクチン開発のための基盤的情報が不足しており、HEV による

食中毒の対策を作る根拠が見いだしていない。本研究では、Genotype I (G1) HEV をヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 に接種し、ウイルスの複製、増殖等の有無を観察し、さらに異なる培養条件下でのウイルス増殖を培養上清中の HEV RNA, HEV 抗原を RT-PCR, ELISA 法にて経時的に測定し、HEV の増殖できる最適な培養条件を検討した。さらにこの培養系を用いて 1 型 HEV の熱に対する安定性、消毒剤や紫外線などに対する抵抗性などを検討し、これまで樹立した 3 型および 4 型 HEV の安定性と比較し、HEV を不活化する条件を検討した。

Genotype 5 HEV (G5 HEV) は最近日本に

棲息するイノシシから検出された新しい遺伝子型の HEV である。その抗原性や病原性などはまだ解析されていない。組換えバキュロウイルス発現システムを用いて G5 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。

Rat HEV は野生ラットから分離された遺伝子構造上ではヒト HEV と類似するウイルスであり、その病原性やヒトへの感染性などに関する情報が少ない。一方、野生ラットから抗 HEV 抗体が検出されているが、ヒト HEV に対するラットの感受性は明らかではない。本研究ではヒト HEV、rat HEV をラットに接種し、ウイルスの増殖の有無を ELISA 法および RT-PCR 法を用いて評価した上、HEV に対するラットの感受性を検討した。

B. 研究方法

1. 材料と方法

(1) HEV の安定性

1) 細胞培養系の樹立: G1 HEV 感染カニクイザル肝臓組織をすりつぶし、PBS(-)で 10%乳剤を作製した。ELISA 法および RT-PCR 法によってウイルス抗原と遺伝子を確認した。1 ml の肝細胞乳剤を PLC/PRF/5 細胞に接種し、培養上清を二、三日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、培養細胞で増殖するか否かを評価した。

2) 熱安定性: 培養細胞で増殖した G1, G3 および G4 HEV をそれぞれ 60°C, 5 分、60°C, 10 分、65°C, 5 分、65°C, 10 分間で熱処理した後、PLC/PRF/5 細胞に接種し、培

養上清を三、四日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、ウイルスが増殖するか否かによって感染性を評価した。

3) 消毒剤に対する抵抗性: 培養細胞にて増殖した G1, G3 および G4 HEV を異なる濃度の NaClO (62.5ppm~1000ppm) と混合して室温 30 分間反応させた後、PLC/PRF/5 細胞に接種し、培養上清を三、四日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、ウイルスが増殖するか否かによって感染性を評価した。

4) 紫外線に対する抵抗性: 培養細胞にて増殖した G1, G3 および G4 HEV をそれぞれ 10, 20, 30, 60, 120 分間 50uw 強度で紫外線照射した後、PLC/PRF/5 細胞に接種し、培養上清を三、四日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、ウイルスが増殖するか否かによって感染性を評価した。

(2) HEV の抗原性

G5 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 法を、抗体を用いて抗原検出 ELISA 法をそれぞれ樹立し、G5 HEV の抗原性を既知の G1, G3, G4 HEV の抗原性と比較した。

(3) HEV のラット感受性

Genotype 1, 3, 4 (G1, G3, G4) HEV および rat HEV をラット尾静脈内から接種し、経時的に採血と採便を行った。ウイルス

遺伝子、抗体、ALT/AST を測定してウイルスの感染の有無を評価した。Rat HEV の感染ルートを同定するため、rat HEV に汚染されたケージで一週間飼育した後、rat HEV 汚染されないケージに移して観察した。観察期間は3ヶ月間である。

(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. G1 HEV を感染した PLC/PRF/5 細胞の上清に 52 日目から HEV-RNA が検出され、89 日目から HEV 構造蛋白が検出された。その後、HEV 構造蛋白および HEV-RNA はコンスタントに培養上清から検出され、接種後 5 ヶ月が経った時点でも依然高いレベルを維持している。培養上清に分泌されまたウイルスのアミノ酸配列は感染出発材料から分離したウイルスのアミノ酸配列と一致するので、HEV の培養細胞での複製、増殖が確認された。さらに培養上清を新しい細胞に接種しても、ウイルスの増殖が確認され、培養上清から分離したウイルスが感染性を有することが明らかになった。ウイルスの増殖速度はウイルスの継代と共に速くなる傾向が見られ、ウイルスは細胞にアダプトすることが推測される。

G3 と G4 HEV と同様、50uw 強度で 30 分間紫外線照射、あるいは 125ppm 以上の濃度の消毒剤 NaClO で、30 分処理することにより、G1 HEV の PLC/PRF/5 細胞に対する感染性は無くなった。つまり以上の条件で HEV を不活化される可能性が示唆さ

れた。また、アルコール、クロロホルムに対しては抵抗性を示した。温度の感受性に関して G3 HEV と同様、60°C10 分間、65°C5 分間以上の熱処理により失活した。また、ウイルスと血漿とを混合して加熱処理する場合、ウイルスの不活化効果に影響がみられた。

2. 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 HEV-LPs は G1, G3, G4 HEV-LPs と極めて類似する。G5 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 抗体を検出し、感度は G1, G3, G4 HEV-LPs を用いる場合と差がなかった。また、G5 HEV-LPs をウサギとモルモットに免疫し、高力価な抗体が誘導され、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。現在、抗 G5 HEV-LPs 抗体の G1, G3 および G4 HEV の中和活性を検討している。

3. G1, G3, G4 HEV を接種したラットから抗 HEV IgG、IgM 抗体および HEV RNA が検出されず、ALT の上昇も見られなかった。この結果からラットは HEV に対する感受性を有しないことが推測された。Rat HEV を接種したラットでは接種後の三週目から抗 rat HEV IgG と IgM 抗体が検出され、便中から rat HEV RNA が検出された。この結果により rat HEV はラットに感染することが証明された。さらに、rat HEV に汚染されたケージで飼育されたラットから抗 rat HEV 抗体及び rat HEV RNA が検出され、rat HEV は糞口ルートによって伝播することが明らかになった。しかし、すべての rat HEV 感染ラットでは ALT の

上昇が認められなかったことから rat HEV は肝炎を引き起こさないことが推測された。

D. 考察

遺伝子型が異なる G1, G3 および G4 HEV の増殖できる培養細胞系を確立した。培養細胞の樹立によって、各遺伝子型の安定性を培養細胞系で検討した。また、新しい遺伝子型の抗原性やラットにおける HEV の感受性を感染実験で検討した。本研究から得られた情報は HEV による感染症や食中毒防止対策の有力な科学根拠となる。

E. 結論

G1 HEV は他の遺伝子型 HEV と同様の条件で加熱や紫外線照射によって不活化される。G5 HEV の抗原性は従来ヒト由来 HEV と類似する。Rat HEV はラットに感染するが、ヒト由来 HEV はラットに感染しない。

F. 研究発表

1. 論文発表

1). Li TC, Yoshizaki S, Ami Y, Suzuki Y, Yasuda SP, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takeda N, Wakita T. Article title: Susceptibility of laboratory rats against genotypes 1, 3, 4, and rat hepatitis E viruses. *Vet Microbiol.* 2013, 163:54-61.

2). Tian-Cheng Li, Yasushi Ami, Yuriko Suzuki, Shumpei P. Yasuda, Kumiko Yoshimatsu, Jiro Arikawa,

Naokazu Takeda, and Wakita Takaji. Full-Genome Characterization of a Rat Hepatitis E Virus Strain Isolated in Vietnam. *EID.* 2013 Jan;19(1):115-8.

3). Hiroshi Yamamoto, Juri Suzuki, Atsushi Matsuda, Takafumi Ishida, Yasushi Ami, Yuriko Suzuki, Adachi Isao, Takaji Wakita, Naokazu Takeda, and Tian-Cheng Li Hepatitis E Outbreak in Monkey Facility, Japan. *EID* 2012, 18 (12) 2032-2034.

4). Koma T, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Li TC, Amada T, Shimizu K, Isozumi R, Mai LT, Hoa NT, Nguyen V, Yamashiro T, Hasebe F, Arikawa J. A survey of rodent-borne pathogens carried by wild *Rattus* spp. in Northern Vietnam. *Epidemiology and Infection.* *Epidemiol Infect.* 2012 Nov 1:1-9.

5). Kitamoto N, Oka T, Katayama K, Li TC, Takeda N, Kato Y, Miyoshi T, Tanaka T. Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. *Microbiol Immunol.* 2012 Nov;56 (11):760-770.

6). Jariyapong P, Xing L, van Houten NE, Li TC, Weerachatanukul W, Hsieh B, Moscoso CG, Chen CC, Niikura M, Cheng RH. Chimeric hepatitis E virus-like particle as a carrier for oral-delivery. *Vaccine.* 2012 Oct 26. (12) 01533-2.

- 7). Ishii K., Li T.C., Yoshizaki S., Shiota T., Kato T., Takeda N. and Wakita T. Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. *Hepatology International*. 6: 292 (2012)
- 8). Tian-Cheng Li, Susumu Ochiai, Hiroaki Ishiko, Takaji Wakita, Tatsuo Miyamura and Naokazu Takeda. A retrospective study on imported hepatitis E in Japan. *Travel Med Infect Dis*. 2012 ;10(2):80-5.
- 9). 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.
- 10). 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 Mar;74(3):279-83.
- 11). Xing L, Wang JC, Tian-Cheng Li, Yasutomi Y, Lara J, Khudyakov Y, Schofield D, Emerson SU, Purcell RH, Takeda N, Miyamura T, Cheng RH. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J Virol*. 2011 Jan;85(2):1117-24.
- 12). Tian-Cheng Li, Shili Song QiFa Yang, Koji Ishii, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. A cell culture system for hepatitis E virus. *Hepatology International*. 2011. March 5(1):202.
- 13). Tian-Cheng Li, Xing L, Mayazaki N, Simon MN, Wall JS, Moore M, Wang CY, Takeda N, Wakita T, Miyamura T, Cheng RH. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway *J Biol Chem*. 2010 Oct 22;285 (43):33175-83.
2. 学会発表
- 1). 李天成、方 苓、王 澤均、宋士利 片岡 紀代、鈴木 哲朗、脇田 隆字。ヒトボカウイルス様粒子の作製およびその応用。日本ウイルス学会、第58回学術集会 2010年11月 徳島
- 2). 李天成、方苓、網康至、須崎百合子、武田直和、脇田隆字。不活化E型肝炎ワクチンの検討。日本ウイルス学会、第58回学術集会 2010年11月 徳島
- 3). 李天成、方苓、片岡 紀代、宮村 達男 脇田 隆字。日本のブタから分離したブタエンテロウイルス8型の解析。日

本ウイルス学会、第58回学術集会 2010年10月 徳島

4). 石井 孝司、吉崎 佐矢香、杉山 奈央、加藤 孝宣、李天成、武田 直和、脇田 隆字 E型肝炎ウイルスの感染性を規定する宿主側因子の探索第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月、徳島

5). Tian-cheng Li, Lanjun Liu, Sayaka Yoshizaki, Koji Ishii, Tatsuo Miyamura, Naokazu Takeda, Takaji Wakita. The stability and inactivation of Hepatitis E virus grows in cell culture. The 9 th international symposium on positive strand RNA viruses. 2010. May 17-23. Atlant.

6). Tian-Cheng Li, Shili Song QiFa Yang, Koji Ishii, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. A cell culture system for hepatitis E virus. The 8th China-Japan International Conference of Virology. 2010. July 4-7. Harbing

7). Tian-Cheng Li, Koji Ishii, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. The stability and inactivation of Hepatitis E virus grown in cell culture. The 21th Conference of the Asian Pacific Association for the studay of the liver. 2011. February 17-20. Bangkok.

8). Tian-Cheng Li, Shili Song QiFa Yang, Koji Ishii, Naokazu Takeda, and

Takaji Wakita. A cell culture system for hepatitis E virus. The 8th China-Japan International Conference of Virology. 2010. July 4-7. Harbing

9). 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

10). 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

11). 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.

12). 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.

13). Koji Ishii, Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Tomoyuki Shioda, Takanobu Kato, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. Cloning of permissive 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.

14). Tian-Cheng Li, Koji Ishii, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. The stability and inactivation of Hepatitis E virus grown in cell culture. The 21th Conference of the Asian Pacific Association for the study of the liver. 2011. February 17-20. Bangkok.

15). 李 天成、片岡 紀代、網 康至、須崎 百合子、安田 俊平、吉松 組子、有川 二郎、武田 直和、脇田 隆字。ラット E 型肝炎ウイルス様粒子の作製および粒子形成に必須な領域の同定。第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 大阪。

16). 塩田 智之、李 天成、吉崎 佐矢香、武田 直和、脇田 隆字、石井 孝司。E 型肝炎ウイルス生活環にカプシド蛋白 C 末端 52 アミノ酸の機能解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月大阪。

17). 田中聖一、山本 博、万年 和明、李天成。ニホンザルにおける E 型肝炎ウイルス感染状況。第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 大阪。

18). 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、シカおよびブタの 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 2012 年 11 月大阪。

19). 李 天成、安田 俊平、吉松 組子、片岡 紀代、吉崎 佐矢香、網 康至、須崎百合子、有川 二郎、武田 直和、脇田隆字。E 型肝炎ウイルスに対するラットの感受性。第 154 回日本獣医学会学術集会 2012 年 9 月 岩手。

20). 清水健太郎、李 天成、安田 俊平、吉松 組子、駒 貴明、長谷部 太、山本哲、有川 二郎。ベトナムのラットおよびヒトにおけるラット E 型肝炎ウイルスの感染状況の調査。第 154 回日本獣医学会学術集会 2012 年 9 月 岩手。

21). Tian-Cheng Li, Kumiko Yoshimatsu, Shumpei P. Yasuda, Jiro Arikawa, Yasushi Ami³, Yuriko Suzaki and Takaji Wakita. Characterizations of the infectivity of genotype 1, 3, 4 and rat hepatitis E viruses in laboratory rats. 14th international Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (14th ISVHLD). June 22-25, 2012 China

Shanghai.

第9回日中国際ウイルス学会. Jun 12-13.
2012. Sapporo.

22). Tian-Cheng Li, Kumiko Yoshimatsu,
Shumpei P. Yasuda, Jiro Arikawa,
Michiyo Kataoka, Yasushi Ami, Yuriko
Suzaki, Koji Ishii, Naokazu Takeda and
Takaji Wakita. Antigenicity and
infectivity of rat hepatitis E viruses.

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」

総合研究協力報告(平成 22～24 年度)

非晶性リン酸カルシウム微粒子を用いたウイルス濃縮法の検討

研究協力者	篠原 美千代	埼玉県衛生研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	内田 和江	埼玉県衛生研究所
研究協力者	島田 慎一	埼玉県衛生研究所
研究協力者	富岡 恭子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	鈴木 典子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	貫洞 里美	埼玉県衛生研究所
研究協力者	小川 泰卓	埼玉県衛生研究所
研究協力者	岸本 剛	埼玉県衛生研究所

研究要旨

水中や食品中のウイルスを短時間で簡便に濃縮でき、かつ特殊な試薬や装置を必要としない検出方法の構築を目的として、非晶性リン酸カルシウム (Amorphous calcium phosphate : ACP) 微粒子を用いたウイルス濃縮法 (ACP 微粒子濃縮法) を検討した。野菜・果実類、穀物類、食肉・魚肉類等の食品についてネコカリシウイルス (FCV) 及び一部の食品でノロウイルス (NV) を用いた添加回収実験を実施した。また、ウイルス回収率の低かった食品について濃縮法の改良を検討した。この結果、野菜・果実類、穀物類、食肉・魚肉類では、効率良く FCV が回収されたが、小豆あん、ひじきの煮物等一部の食品で低い回収率であった。低回収率の食品のうち、ロースハムではアスコルビン酸の添加、油脂含有食品ではイソアミルアルコール処理、冷凍ラズベリーでは食品洗浄液を 3% ビーフエキス加 PBS(-) に変更することにより回収率の大幅な改善が認められた。3% ビーフエキス加 PBS(-) の使用や食品残渣除去に 10,000rpm の遠心を行うことで、さらなる回収率の向上が得られることが一部の食品で確認された。一方、NV を用いた添加回収実験(キャベツ、レタス、ハム) でも FCV を用いた場合と同様の結果が得られた。以上の結果から、ACP 微粒子濃縮法は食品からの FCV・NV 濃縮に利用可能であることが判明した。

A. 研究目的

ノロウイルス (NV) は、冬季を中心に発

生するウイルス性食中毒の主要な病原体である。国内では、カキを含む二枚貝の

ほか、寿司、さしみ、サラダなどの手指による調理でそのまま喫食する食品や仕出し弁当のように手指を使った盛り付け行程がある食品が食中毒の原因食品として多く報告されている。一方、諸外国では、レタス等の生鮮野菜や冷凍ラズベリーを原因とする食中毒の広域発生が複数報告されている。また、NV は、環境中で容易に不活化されず長期間感染性を保持することから水系感染も引き起こされる。この様な状況において、食中毒における感染経路の推定や原因究明のための食品や水からのウイルス検出、さらに広域食中毒の発生予防のための広域流通食品のウイルスモニタリングが期待されている。しかし、食品中や飲料水中のウイルス量は一般に微量であること、食品成分がウイルス濃縮を阻害すること、さらに、食品中に酵素反応阻害物質が存在することなどから、食品中からのウイルス検出は極めて困難で、その検出報告例も少ない。そこで、本研究では、短時間で簡便に実施でき、かつ特殊な試薬や装置必要と下にウイルス濃縮方法の構築を目的として、ACP 微粒子を用いたウイルス濃縮方法の検討を行った。

B. 研究方法

1. 検討材料

添加回収実験には、コンビニエンスストア、スーパーマーケットおよびインターネットストアで販売されていたサラダ材料およびサラダ類、弁当惣菜類、生菓子、冷凍および生鮮果実を用いた。具体的には、千切りキャベツ、カットレタス、スライスハム（ロースハム）、白飯、マ

グロの刺身、つぼ漬、中華風きゅうりの和え物、フライドポテト、うずら豆煮物、焼鮭、皮なしウインナー、つくね、肉団子の甘酢あん、ひじきの煮物、卵の花、白和え、キンピラゴボウ、ロールパン、タマゴフィリング、ツナフィリング、ハムカツ、ミートソーススパゲティ、ゆでうどん、ソース焼きそば、ポテトサラダ、ハルサメサラダ、マカロニサラダ、小豆あん、シュークリーム、冷凍ラズベリー、冷凍ストロベリー、冷凍ブルーベリー、生鮮ストロベリー、生鮮ブルーベリー、生鮮パイナップルの35種類の食材を検討の対象とした。

2. 添加ウイルス

Crandell Reese Feline Kidney (CRFK) 細胞で培養した Feline calicivirus F9 株 (FCV) を添加ウイルスに使用した。CRFK 細胞は 10%ウシ胎児血清 (FBS)、0.03%グルタミン、0.2%重炭酸ナトリウムを含む Eargle's minimum essential medium (MEM)を用いて、炭酸濃度 5.0%、湿度 99.9%、温度 37°Cの条件で培養した。ウイルス接種後は FBS 濃度を 1%にした維持培地で培養した。CPE が最大になった時点で培養上清を回収し、10 倍希釈し小分けして-80°Cに保管した。

一部の食品にはNVを用いた添加回収実験も行った。NV は、食中毒事例の患者糞便で NVGII.4 陽性であった糞便を精製して使用した。

3. 食品検体の人工的ウイルス汚染方法

食品サンプル 10 g に FCV $4.5 \times 10^2 - 7.5 \times 10^4$ コピーを添加し、1 時間室温に放置し乾燥した。

NV は $1.0 \times 10^2 - 1.1 \times 10^5$ コピーを添加

し、同様に処理をした。

4. ウイルス濃縮方法

ウイルスで汚染させた食品サンプルをストマッカーバッグに移し、食品洗浄液 40 ml (レタスでは一部 80 ml) を添加して 10 分間振とうした。食品洗浄液には PBS(-) (以下 PBS と記載)、超純水、pH 3.0 あるいは pH 9.0 になるように塩酸を添加した蒸留水、Tris-glycine 液 (pH 9.5) (100 mM Tris、50 mM glycine) を用いた。テトロンメッシュ (100 メッシュ) でろ過後、ろ液を 1,880 × g (3,000rpm) 30 分、4°C で遠心し、上清をフラスコあるいは 50 ml コニカルチューブに移した。ここに ACP 粒子 (積水化成工業株式会社、大阪) 0.3 g を添加し 1 時間攪拌した。1,880 × g で 10 分遠心した後、上清を捨て、集めた ACP 粒子を 3.3 M クエン酸 3 ml で溶解した。

さしみはストマッカーバッグに移し、3% ACP 粒子懸濁液 10 ml を添加し、さしみによく行き渡らせた。次に食品洗浄液 30 ml を添加し 1 時間振とうした後、メッシュろ過した。ろ過後のバッグ内を 10 ml の洗浄液で洗い、メッシュを通して前述ろ液に合わせた。ろ液 40 ml を 1,880 × g で 10 分遠心し、ACP 粒子を集め、3.3 M クエン酸 3 ml で溶解した。

ハムはろ過、遠心後にアスコルビン酸を添加し、良く溶かしてから ACP 微粒子を加え、攪拌した。

油脂含有食品 (ミートソーススパゲティ) については、食品洗浄液に PBS、Tris-glycine 液、pH3 と pH9 に調整した蒸留水を用いた。また、攪拌時に還元剤、酵素 (リパーゼ、アミラーゼ) の添加、

イソアミルアルコール処理についても検討した。イソアミルアルコール処理はろ過後の液にイソアミルアルコール 5ml を添加し、10 回転倒混和した。遠心後、イソアミルアルコール層を除去した液に ACP 粒子を添加し、前述のとおり操作した。油脂含有食品のうちキンピラゴボウについてはミートソーススパゲティの結果を踏まえ、洗浄液には Tris-glycine 液を使用し、イソアミルアルコール処理の有無によるウイルス回収を検討した。

冷凍ラズベリーを用いた検討では、食品洗浄液に PBS、3% ビーフエキス加 PBS(-) (以下 BE 加 PBS と記載)、Tris-glycine 液 (pH9.5) (100mM Tris、50mM glycine)、3% ビーフエキス加 Tris-glycine 液 (pH9.5) (以下 BE 加 Tris-glycine 液と記載) を用い、他の果実には BE 加 PBS を用いた。冷凍ラズベリーでは、ACP 微粒子を加えて攪拌する際に、ペクチナーゼ (マセラゼ) 0.04g を添加する方法も検討した。冷凍ラズベリー以外の果実は冷凍ラズベリーで最も適しているとされた方法を用いてウイルス回収実験を行った。

5. ウイルス RNA の抽出

ACP 粒子溶解液 140 μ l から、QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用いて、操作説明書に従いウイルス RNA を抽出した。カラムからの RNA 溶出には Diethylpirocarbonate 処理水 60 μ l を用いた。

6. 逆転写反応

逆転写反応 (30 μ l) は抽出 RNA 15 μ l、0.5 mM 各 dNTP、0.5 mM dithiothreitol、2.5 μ M random hexamers、30 units RNasin

inhibitor (Promega)、300 units Superscript II RNase H(-) reverse transcriptase (Invitrogen)、50 mM Tris-HCl (pH 8.3)、75 mM KCl、3 mM MgCl₂ の組成で、42°C、1 時間反応させた後、98°C 10 分の加熱で酵素を不活化した。

7. リアルタイム PCR によるウイルスゲノムコピー数の測定方法

FCV のゲノムコピー数の測定は、森ら (感染症学雑誌、vol. 80、2006) が報告した方法で実施した。標準曲線は、FCV F9 株の塩基配列の 4462-4548 塩基 (DDBJ accession number M86379) を合成し、10 倍段階希釈 (10⁰ - 10⁷ コピー/μl) したものをを用いて作成した。

NV のゲノムコピー数の測定は通知法 (平成 15 年 11 月 5 日付、食安監発第 1105001 号) に準じて実施した。すなわち、プライマーには COG2F 及び COG2R をそれぞれ 400nM、プローブには RING2-TP を 100nM の濃度で用い、TaqMan Universal PCR Master Mix を使用して 31 μl の系で反応を行った。標準曲線作成には、国立感染症研究所から分与を受けたプラスミド DNA を 10 倍段階希釈 (10⁰ - 10⁷ コピー/4 μl) したものをを用いた。

8. 検出感度の検討

ACP 粒子濃縮法の検出感度を決定するため、食品サンプル (キャベツ、レタス、ハム) 10 g に FCV 4.5 × 10³ - 4.5 × 10² コピーを添加し、1 時間乾燥後、PBS(-) を用いて、前述のとおりウイルス濃縮操作を行った。ハムでは ACP 粒子添加前にアスコルビン酸 1.0 g を加えた。

9. 回収率の評価

回収率の区分は 1-5% : 低回収率、6

-10% : 中程度の回収率、11-20% : 高回収率 (J. Virol. Methods, 169, 22-27, 2010) を参考にし、1-5% をほとんど回収ができなかったもの、6-10% を低い回収率、11% 以上を回収率が良いものとして評価した。

(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. キャベツ、レタス、ハムを用いた洗浄液の検討 (表 1)

洗浄液として PBS を用いた場合、キャベツでは平均 32%、レタスで平均 50% の添加 FCV が回収された。また、キャベツでは洗浄液を Tris-glycine 液にした場合に回収率が低下する傾向が見られたが、統計的には有意な差ではなかった。一方、レタスでは Tris-glycine 液を使用した場合に、キャベツとは反対に回収率が向上する傾向が見られたが、こちらも有意な差ではなかった。

次に、ハムでは洗浄液として PBS、Tris-glycine 液、蒸留水のいずれを使用しても、FCV は回収できなかった。しかし、アスコルビン酸を添加することにより、FCV 回収は可能となった。検討の結果、アスコルビン酸添加量が 0.2 g、0.5 g、1.0 g と増加するにつれ、回収率も 13%、20%、45% と向上した。しかし、2.0 g の添加では、アスコルビン酸による ACP 微粒子の溶解が起こり、回収率は下がった。以上の結果より、アスコルビン酸 1.0 g 添加時の回収率は他の添加量にお

ける回収率に比べ有意に高いことが判明した($p < 0.01$)。

2. キャベツ、レタス、ハムにおける検出感度 (表 2)

キャベツ、レタス、ハムを用いて検出感度の検討を行った結果を表 2 に示した。いずれの食品でもサンプル 10g に対して FCV 4.5×10^3 コピーの添加までは検出が可能であった。しかし、 4.5×10^2 コピー添加時は実測値が 1 未満となり、リアルタイム PCR では不検出の判定となった。

3. NV を用いた添加回収実験結果 (表 3)

キャベツ、レタス、ハムについて NV を用いた添加回収実験を行った結果、FCV を用いた場合と同様の結果であった。

4. 油脂含有食品に添加した FCV の回収方法検討結果 (表 4、表 5)

油脂を多く含む食品のひとつとして、ミートソーススパゲティに注目し、処理方法を検討した。PBS、蒸留水 (pH3、pH9) および Tris-glycine 液を洗浄液として使用した場合、いずれの洗浄液でも添加 FCV はほとんど回収されなかった。ACP 微粒子によるウイルス吸着時に、酵素 (リパーゼ、アミラーゼ)、還元剤 (アスコルビン酸) を添加した場合には、リパーゼ添加、アミラーゼ添加とも回収率に改善が見られ、PBS 洗浄ではリパーゼ添加で 16%、アミラーゼ添加で 24% の回収率となった。また、Tris-glycine 液洗浄ではリパーゼ添加で 40%、アミラーゼ添加で 26% であった。一方アスコルビン酸の添加ではほとんど変わらなかった。油脂を除去する目的でイソアミルアルコール処理を追加実施した場合は、洗浄液に PBS を用いた場合では 10^5 コピー添加

時 65%、 10^4 コピー添加時 28%、Tris-glycine 液を用いた場合には 10^5 コピー添加時 98%、 10^4 コピー添加時 80% となり、FCV 回収率は大幅に改善した。

次に、ミートソーススパゲティで最適とされたイソアミルアルコールによる油脂分除去方法をキンピラゴボウに適用した結果、キンピラゴボウではミートソーススパゲティ同様、Tris-glycine 液での洗浄が適していたが、イソアミルアルコール処理は必須ではないことが判明した。

5. 冷凍および生鮮果実に添加した FCV の回収方法検討結果 (表 6、表 7)

種々の洗浄液およびペクチナーゼを用いて冷凍ラズベリーからの添加 FCV 回収実験を行った。PBS、Tris-glycine 液で洗浄した場合にはともに 2% の FCV 回収率であった。ペクチナーゼ処理を追加すると、Tris-glycine 液では 3%、PBS では 8% の回収率となった。一方、BE 加 PBS を洗浄液に用いると 56% の回収率となったが、BE 加 Tris-glycine 液の場合には回収率は改善されなかった。

冷凍ラズベリーで最適とされた BE 加 PBS を用いて実施した他の冷凍および生鮮果実からは、効率よくウイルスが回収された。

6. ウイルス添加回収実験結果

表 8 に検討したすべての食品の添加 FCV 回収結果をまとめた。それぞれの食品について最適とされた方法での回収結果を記載した。野菜・果実群では検討したすべての食品で 11% 以上の回収率 (16-185%) が得られた。穀物群ではロールパン、フライドポテトからの回収が不十分

であったが、その他の食品では効率的にウイルスが回収された(11-192%)。食肉・魚肉類からも検討したすべての食品で効率よくFCVが回収された(16-52%)。一方、その他の食品群に分類した菓子類、サンドイッチ材料、ひじきの煮物、卵の花、白和えからはほとんどFCVが回収されなかった。

D. 考察

食中毒においてノロウイルスが関与する事例は増加してきており、原因食材も多岐にわたっている。中でも、加熱せずに食べることの多い食品、たとえば野菜、果物、ハム、寿司などが原因食材となることが多い。原因食材の特定のために、疫学的な情報が重要であることはもちろんであるが、ウイルス学的な根拠が求められている。また、野菜やベリー類は下水で汚染された水による灌漑や洗浄過程でのウイルス汚染、ウイルスに感染した有症・無症を問わない従業員によるパッケージングや調理等、生産から消費まで様々な工程でウイルス汚染を受ける可能性があることから、これらの食品における腸管系ウイルスのモニタリングは食中毒予防のために重要な情報と考えられる。

本研究では、まず生で摂食されることの多いキャベツ、レタス、ハムを用いてウイルス濃縮方法について検討した。次にこの方法を種々の食品に応用し、添加ウイルス回収実験により本法の有用性を検討した。さらに、ウイルス回収率の低かった油脂含有食品および冷凍ラズベリーについて操作法の改良を行い、これを

類似の食品に適応し、改良操作が有効であるか否かを検証した。

野菜や果実からのウイルス誘出のための洗浄液にはBE加Tris-glycine液が最適であるという報告があるため、事前にこの洗浄液を用いて実験したところ、本法では攪拌時に泡立ちが激しく、ウイルスが全く回収できないという結論を得た。また、消泡剤を用いた場合にも全くウイルスの回収はできなかった。そこで、泡立ちの原因であるビーフエキスを除いたTris-glycine液を検討洗浄液に加え、実験を行った。レタスにおいてはどの洗浄液を用いても高いFCV回収率が得られ、特にTris-glycine液を用いた場合の回収率は高い傾向が見られた。しかし、統計的には他の洗浄液を用いた場合との間に有意な差があるとは認められなかった。逆に、キャベツにおいてはTris-glycine液による回収率は低い傾向であったが、他の洗浄液との間に有意差は認められなかった。レタス全体の回収率は60%、キャベツ全体の回収率は28%で、両者に有意差が認められた($p < 0.01$)。この回収率の差には、千切りキャベツの細胞が大きく破壊され、レタスよりも内容物が放出されやすい状態であったことが影響していると考えられた。ウイルス検出を阻害する食品成分についてはいくつかの報告がある。このうち、レタス中に何らかの遺伝子増幅反応阻害成分が存在するという報告は多い。しかし、本研究では、レタスからのFCV回収率は60%と高く、遺伝子増幅反応の阻害は見られなかった。植物中の遺伝子増幅阻害物質については、酸性ポリサッカライドの中には、

強い阻害作用をもつものがあるとの報告がある。本研究で用いたキャベツはペクチン含有量の高い野菜であるといわれており、これがレタスに比べウイルス検出率を低下させる原因の可能性もあると推測された。なお、キャベツ、レタスの洗浄液に関しては、スターラーに泡立ちにくい機種を用いることにより、最終的には BE 加 PBS が最適であるという結論を得ている。

ハムからの FCV 回収に関する実験の結果では、アスコルビン酸の添加が必要であることが判明した。アスコルビン酸を添加しない場合には定量限界値以下であったが、アスコルビン酸を 1.0 g 添加することにより、回収率は大幅に改善し 45% となった。また、リアルタイム RT-PCR では 4.5×10^3 コピーの FCV ウイルス添加まで検出することができた。なお、アスコルビン酸はウイルスの ACP 微粒子への吸着過程ではなく、抽出操作以降に作用していることを別途確認した。

また、キャベツ、レタス、ハムについては NV の添加回収実験も実施し、FCV 同様 NV の回収も可能であることを確認した。

キャベツ、レタス、ハムで構築した方法を、種々の食品に応用し、PBS を洗浄液に用い、本法の有用性を確認したところ、中華風きゅうりの和え物 (73%)、ソース焼きそば (33%)、ゆでうどん (29%)、肉団子の甘酢あん (25%) などの回収率が得られた食品と、ひじきの煮物、卵の花、小豆あん、タマゴフィリングなどほとんど回収ができなかった食品が存在した。回収率が 10% を超えるか否かを指標とし

て、回収結果を食品群別にみると、野菜群では冷凍ラズベリー以外は効率良くウイルスが回収された。穀物群では白飯、ゆでうどん、ソース焼きそばでは効率良くウイルスが回収されたが、フライドポテト、ミートソーススパゲティでは低い回収率であった。またロールパンからの回収率も 9% であり、回収効率は低かった。このうちパンは洗浄時に洗浄液をほとんど吸ってしまい、十分に洗浄液が回収できなかったことが影響していると推測された。食肉および魚肉類では焼鮭以外は効率良く FCV が回収された。その他の食品群では本法ではほとんど FCV が回収できなかった。この群に分類した食品はハムカツを除き、洗浄液を加えて振とうすると食品が溶液全体に分散し、ろ過ができず、また、遠心操作を行っても食品残渣と洗浄液を分離することができない食品であった。このような食品では ACP 微粒子とウイルスを接触させることおよび ACP 微粒子の分離が困難であると考えられる。また、卵の花や白和えは大豆製品であることから、酸性ポリサッカライドを多く含有しており、これが酵素反応を阻害し、ウイルス遺伝子の検出を阻害している可能性も考えられる。また、ハムカツでは、衣が洗浄液を吸ってしまい、溶液の回収が十分にできないことと、食品に含まれる油脂分が濃縮を阻害していることが低回収率の原因ではないかと推測される。さらに、ひじきの煮物については、別途洗浄後の液に FCV を多量に添加し、その液から直接 RNA 抽出し、逆転写反応、リアルタイム PCR を実施しても、全く遺伝子が検出されないという結果を

得ている。ひじきから溶出される何らかの物質が逆転写反応以降を強く阻害している可能性が浮上した。

ウイルス回収がほとんどできなかった(1%) ミートソーススパゲティを検討材料とし、種々の洗浄液の利用、酵素の利用、還元剤の利用、有機溶媒による油脂分の除去によるウイルス回収状況を、FCVを用いた添加回収実験により検討した。

まず、食品の洗浄液について5種の溶液を検討した。ACP微粒子は hidroキシアパタイトと同様の性質であるため、ウイルスの吸着には低濃度のリン酸緩衝液が適していると考えられる。さらに、添加したウイルスの安定性を考慮し、ACP微粒子濃縮法ではPBSを基本の洗浄液として選択した。しかし、ミートソーススパゲティではPBSを洗浄液とした場合、FCVはほとんど回収されなかったことから、pHを3あるいは9に調整した蒸留水による洗浄を試みた。また、食品洗浄液として複数の報告があるTris-glycin液をミートソーススパゲティにも適用した。洗浄液のpHを変えることにより、食品からのウイルス遊離のしやすさが変化するため、その結果、添加ウイルス回収率が改善される可能性があったが、いずれの洗浄液でもウイルスはほとんど回収されなかった。したがって、FCV回収率の低さは食品表面からのウイルス遊離の可否によるものではないと推測された。どの洗浄液を用いても回収率は改善されないことが判明したため、以下の実験にはPBSとTris-glycine液の2種を使用することとした。

次に油脂、糖類等の食品由来成分がウイルスのACP微粒子への吸着を阻害している可能性を考え、酵素処理を組み入れた。ACP

微粒子によるウイルス吸着のための攪拌ステップで、油脂処理用にリパーゼを、また糖類処理のために α -アミラーゼを添加した。また、これまでの研究で、酸化剤として作用する物質があるとACP微粒子へのウイルス吸着が大きく阻害されることが判明しているため、酸化剤の作用を停止させるため、還元剤としてアスコルビン酸を添加した。これらの添加の結果、アスコルビン酸は全く効果を現さなかったが、酵素の添加により、ウイルス回収率は改善され、特に、Tris-glycine液を用いた場合の回収率が高い傾向が見られた。糖類は核酸と類似の挙動を示すため、食品からのウイルス回収を阻害するが、アミラーゼ処理により改善されることがこれまでも報告されている。本研究においてもアミラーゼ処理によって回収率が上昇したことは、スパゲティの糖類が、洗浄時に流出して、阻害の一因となっていた可能性を示している。

油脂分の除去方法として、イソアミルアルコールによる処理を行ったところ、添加FCVの回収率は大きく改善された。特に、洗浄液にTris-glycine液を用いた場合には、 10^5 コピーのFCV添加時で98%、 10^4 コピー添加時でも80%の回収率となり、非常に効率良くウイルスが回収されることが示された。

そこで、ミートソーススパゲティ以外で、油脂分が多く含まれ、これまで回収率が低かった「キンピラゴボウ」について、PBSとTris-glyci緩衝液を用いてイソアミルアルコール処理を応用した。その結果、Tris-glycine液を用いた場合にはイソアミルアルコール処理の有無にかかわらず高い回収率を得ることができた。ミートソーススパゲティとキンピラゴボウを比較すると、

前者には動物性の油脂が多く含まれ、後者は植物性の油脂のみである点が大きく異なっている。植物性の油脂の場合にはイソアミルアルコール処理を行わなくても、Tris-glycine液を用いればウイルス回収ができる可能性が高いと推測され、今後、他の動物性および植物性の油脂含有食品に応用し、確認をする必要がある。

次に、油脂含有食品以外で回収率の低かった食品の1つとして冷凍ラズベリーを取り上げ、回収率向上のための検討を行った。冷凍ラズベリーは果実の形状が複雑で、洗浄によりウイルスを誘出することが難しいことと、解凍時に溶出する果汁中のペクチンにより濃縮や酵素反応が阻害されることが報告されている。これを回避するために種々の処理方法が検討されており、ビーフエキスを添加したpHの高い洗浄液を用いることと、ペクチナーゼ処理をすることを組み合わせた方法が多数報告されている。本研究でも、Tris-glycine液(pH9.5)を用いてビーフエキスの添加とペクチナーゼ処理を試みたところ、回収率の改善は見られなかった。この結果は、高pHの洗浄液を使用することにより、果実の損傷がPBSに比べて激しく、内容液の流出も多いためではないかと考えられた。実際に、Tris-glycine液を用いて洗浄した後の液は、PBSを用いた場合よりもろ過がしにくく、粘性が高くなっており、また、食品残渣を除去するために実施した遠心後に沈渣が多く認められた。高pH洗浄液の効果が認められなかったため、細胞損傷が少ないと思われるPBSを用いて、ビーフエキス添加とペクチナーゼ処理を実施し

た。ペクチナーゼ処理では回収率に若干の改善が認められたが、回収率は10%未満であり、効果的な方法とはならなかった。これに対し、BE加PBSを用いた場合、回収率は平均で56%と大きく改善された。BE加PBSでは、洗浄後の液にほとんど粘性が認められず、ろ過も容易に行うことができた。以上の結果から、冷凍ラズベリーでは、BE加PBSを用いることで、その他の手順を変更することなく効率的にFCVを回収できることが判明した。

冷凍ラズベリーで検証した方法を、他の冷凍果実および生鮮果実に応用したところ、いずれの果実からも効率良くFCVを回収することができたが、冷凍果実では回収率が一定せずばらつきが多い傾向が見られた。この結果は、トレーに置いた冷凍果実にFCVを添加して放置した際に、果汁が流れ出て、これをストマッカーバッグにすべて移すことができたか否かによる差ではないかと考えられた。生鮮果実では回収率は安定していた。生鮮果実、特にブルーベリーでは、PBSを加えた時に、洗浄液をはじいてしまい、液中に没することがなかったが、ビーフエキスを添加することにより、洗浄液が果実全体を覆うことが可能となり、これにより、果実表面からのウイルス誘出が促進されたのではないかと推測された。

以上の検討結果を表8にまとめた。ACP微粒子濃縮法により、検討したほとんどの食品から添加ウイルスを効率よく回収できることが判明した。現時点で回収率が低いとされているロールパン、フライドポテト、タマゴフィリング、ツナフィリング、ハムカツについては、その食品