

低温加熱処理を通じたE型肝炎ウイルスの不活化条件検討に関する研究

研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	米満研三	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	平井和也	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	前田 健	国立感染症研究所獣医科学部
研究協力者	山田 研	学校法人辻料理学館辻調理師専門学校
研究協力者	秋元真一郎	学校法人辻料理学館辻調理師専門学校
研究協力者	迫井千晶	学校法人辻料理学館辻調理師専門学校

研究要旨

昨年度より、猪肉製品を用いた添加回収試験により、E型肝炎ウイルスの不活化に関する検討を開始した。本年度は、昨年度未検討の低温加熱条件によるE型肝炎ウイルスの不活化効果を検討すると共に、「厚生労働省 食肉の加熱条件に関するQ&A」で示される低温加熱処理を通じたE型肝炎ウイルスの感染力価を求めることで、供試した低温加熱条件の妥当性を評価することとした。まず、スチームコンベクションオープンを用いて猪肉を低温加熱調理（70℃3分、69℃4分、67℃8分、66℃11分）に供した際のE型肝炎ウイルスの不活化をリアルタイムPCR法により評価したところ、陽性対照（非加熱群）では平均 $2.68 \times 10^6$ コピー数の同ウイルス遺伝子が検出されたのに対し、供試した全ての低温加熱群ではRNase処理後には同ウイルス遺伝子は検出されず、これらの加熱条件は概ね $10^4$ コピー以上の同ウイルス不活化効果を示したことが想定された。また、低温加熱処理後のE型肝炎ウイルス懸濁液をAlexander細胞に接種し、4週間培養したところ、全ての加熱処理群から同ウイルス遺伝子は検出されず、また、蛍光免疫染色によってもウイルス抗原が検出されなかったことから、供試した低温加熱処理によりE型肝炎ウイルスは生残性を喪失したと考えられた。猪肉におけるE型肝炎ウイルスのように、病原微生物汚染実態については定量性をはじめ、依然として不明な点が多いため、定性・定量の両面から汚染実態に係る更なる情報の蓄積が必要と考えられる。また、野生鳥獣肉の加工・調理にあたっては、一定時間から成る塩蔵やマリネ等の前処理が行われる場合もあることから、こうした加工調理工程を通じた微生物の挙動についても安全性確保の観点から更に検討を進める必要がある。

A. 研究目的

近年の農林水産業をめぐる鳥獣被害の増加を受けて、野生鳥獣の食用としての利活用による鳥獣被害対策や地域活性化への取り組みが薦められている。農林水産省では、本年度に国産ジビエ認証制度を設け、ジビエの衛生的な利活用を推進している。食品としての安全確保に向けて、厚生労働省では平成26年11月に「野生鳥獣肉の衛生管理に関するガイドライン」を策定し、とちく場に倣った衛生的な取り扱いを周知したほか、本年度は日本ジビエ振興協会により、HACCP手引書

が作成された。一方、野生鳥獣肉の衛生管理に関するガイドラインでは、解体から調理に至るフードチェーン全体での衛生的取扱い方法について、詳細に例示されてはならず、各事業者が衛生的な取扱いを行う上では、科学的根拠に基づく実態の把握並びに衛生確保に資する情報の提供が求められている。

猪肉に潜在する危害要因としては、健康被害実態や生体の抗体保有率調査等から、E型肝炎ウイルスが想定されている。厚生労働省では、「野生鳥獣肉に関するQ&A」を2018年10月に発出しており、その中では「75℃、

1 分」と同等な加熱殺菌の条件として、「70℃、3 分」、「69℃、4 分」、「68℃、5 分」、「67℃、8 分」、「66℃、11 分」、「65℃、15 分」が妥当と考えられるとしている。これらの低温度帯での加熱調理(低温加熱調理)は、野生鳥獣肉の物性を踏まえ、汎用される傾向が増加していると解される。一方で、E 型肝炎ウイルスの加熱抵抗性については十分な知見がないため、これらの妥当性については検証が必要と考えられた。

こうした背景から、本分担研究では、昨年度より、低温加熱調理を通じた、猪肉における E 型肝炎ウイルスの生残性について検討を開始した。本年度は、昨年度未検討であった加熱条件(70℃3 分、69℃4 分、67℃8 分、66℃11 分)についての同ウイルスに対する不活化効果を評価すると共に、ウイルス不活化効果の評価法として、感染力価測定法を追加して、不活化のより詳細な評価を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 食品検体及び加熱調理条件

食品検体として用いた猪モモ肉は解体加工後、冷凍保存・輸送されたものを、4℃下で一晩自然解凍させた後、1 ブロックあたり約 80~100g となるよう、カットと真空包装を行ったものとした。

同食品検体の中心温度がそれぞれ「70℃3 分」、「69℃4 分」、「67℃8 分」、「66℃11 分」となるよう、予熱したスチームコンベクションオープン(ホシザキ MIC-5TB3、以下スチコン)内での加熱調理に供した。検体芯温が各設定温度に達した時点より、上記加熱条件を満たすまで加熱調理を行い、終了した時点で取り出し氷冷した。

### 2. E 型肝炎ウイルス添加回収試験

E 型肝炎ウイルス懸濁液を調整後、26G ニードル及びゴムシールを用いて各検体の中心部に接種した。同検体は、上項 1. に示した各条件に従って加熱調理後、滅菌ストマックカー袋(セントラル科学貿易)内で氷冷させた。滅菌鉢で検体全量を細切した後、検体の 3 倍重量の緩衝ペプトン水(BPW, Oxoid)を加え、1 分間ストマッキング処理を行った。これらを試験原液として、項 3 及び 4 で示す評価に供した。非加熱群・非接種群についても同様に試験原液を調整し、陽性対照・陰性対照とした。

### 3. リアルタイム PCR

各試験原液の RNase 処理及びウイルス RNA の精製は以下の方法によった。RNase 処理は、各試験原液に終濃度 20  $\mu$ g/ml となるように RNase A(ニッポンジーン)を添加し、37℃、1 時間処理した。その後、High Pure Viral RNA Kit(Roche)を用いてウイルス RNA を抽出し、これを鋳型として High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いて cDNA を合成した。THUNDERBIRD Probe qPCR Mix(TOYOBO)を用いてリアルタイム PCR を行った。条件は以下のとおりである。プライマーセット及び蛍光標識プローブとしては、JVHEV-F(5' -GGTGGTTTCTGG GGTGAC-3')、JVHEV-R(5' -AGGGGT TGGTTGGATGAA-3')、JVHEV-P(5' -FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-BHQ-3')を使用した。PCR 条件は初期変性を 95℃、60 秒、サイクリングは変性を 95℃、15 秒、伸長を 60℃、30 秒として 40 サイクルとした。

### 4. 感染力価測定試験

項 2 で調整した試験原液 100  $\mu$ L を高グルコース DMEM 培地(含 10%FCS 及びペニシリン・ストレプトマイシン)で培養した Alexander

細胞に接種し、28日間CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養した（この間、培地は3-4日ごとに半量を交換した）。培養後、上清・細胞中のウイルスRNAはMaxwell RSC viral total nucleic acid purification Kit (Promega) または CellAmp Direct RNA Prep Kit (TaKaRa Bio)を用いて抽出し、項3で示すリアルタイムPCR法に供した。平行して、培養後の細胞を固定し、抗E型肝炎ウイルスORF2抗体を用いた免疫蛍光染色法により同ウイルス抗原の検出を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 低温加熱調理を通じたE型肝炎ウイルスの生残性に関する遺伝学的評価

「厚生労働省 野生鳥獣肉に関するQ&A」で示される低温加熱調理条件のうち、昨年度未検討であった条件（70°C3分、69°C4分、67°C8分、66°C11分）によるE型肝炎ウイルスの消長を評価した。RNase処理後の陽性対照（非加熱群）におけるE型肝炎ウイルスの遺伝子コピー数は $2.68 \times 10^6$ であったのに対し、上記の4条件で低温加熱調理を行った検体では、何れも同ウイルス遺伝子が検出されなかった。

#### 2. 低温加熱調理を通じたE型肝炎ウイルスの生残性に関する生物学的評価

上述の加熱条件に加え、「厚生労働省 野生鳥獣肉に関するQ&A」で示される低温加熱調理条件で処理を行った検体懸濁液をAlexander細胞に接種し、28日間培養を行った。その後、培養上清及び細胞中のRNA抽出し、リアルタイムPCR法に供したところ、陽性対象（非加熱群）は上清・細胞中よりそれぞれ $2.4 \times 10^4$ コピー/反応、 $1.8 \times 10^6$ コピー/反応として検出されたが、低温加熱処理検体を接種した群はいずれも同ウイルス

遺伝子不検出を示した（図1）。加えて、培養14及び28日後に免疫蛍光染色法によるウイルス抗原の検出を試みたところ、全ての低温加熱処理検体はリアルタイムPCR法と同様にウイルス抗原は不検出となったが、陽性対象は培養14日後の段階であっても検出され（図2）、同法による感染力価測定が培養時間の短縮に有用となる可能性が示された。

### D. 考察

猪肉におけるE型肝炎ウイルスの汚染可能性は数多くの同動物生体における侵淫状況から示唆されている。こうした背景から、猪肉の喫食にあたっては十分な加熱調理が求められている。一方、野生鳥獣肉の調理に際しては、低温度帯での加熱調理が汎用されている実態を鑑み、本研究では猪肉を低温加熱調理した場合のE型肝炎ウイルスの消長を評価し、結果として「厚生労働省野生鳥獣肉に関するQ&A」で示される低温加熱条件は何れもE型肝炎ウイルスの不活化に一定の有効性を示すことが明らかとなった。

過去の文献情報では用いるウイルス株により耐熱性には差異があることも想定されるため、異なるウイルス株を用いた同様の評価を行うことも今後必要と思われる。こうした評価にあたって、最終的には生物活性である感染力価の評価は必須と考えられるが、その評価には感染時間が長い本ウイルスの性質を考慮すると、より増殖能の高いウイルス株の調整や、高感度な評価方法の設定等が今後検討すべき事項と思われる。その意味において、本研究で見出された、免疫蛍光染色法の有用性は後者の事項に寄与するものと考えられる。

また、野生鳥獣肉の加工調理にあたっては、塩蔵やマリネ等といった前処理が行われることも多い。従って、こうした前処理過程を

通じた病原微生物の動態についても今後精査することが、総合的な生物的危害要因の制御にあたって求められる科学的知見になるものと考えられる。

## **E. 結論**

低温加熱調理を通じた猪肉中でのE型肝炎ウイルスの消長を検討し、「厚生労働省野生鳥獣肉に関するQ&A」で示される低温加熱条件は何れもE型肝炎ウイルスの不活化に一定の有効性を示すことが明らかとなった。また、同ウイルスの感染力価を評価するための手法として蛍光免疫染色法の有用性を示唆する知見を得た。今後は合理的なウイルス評価系の設定に係る検討を進めると共に、加工調理工程での病原微生物の動態把握のための検討を進めることで、野生鳥獣肉の安全性確保に向けた総合的な科学的知見の集積にあたりたい。

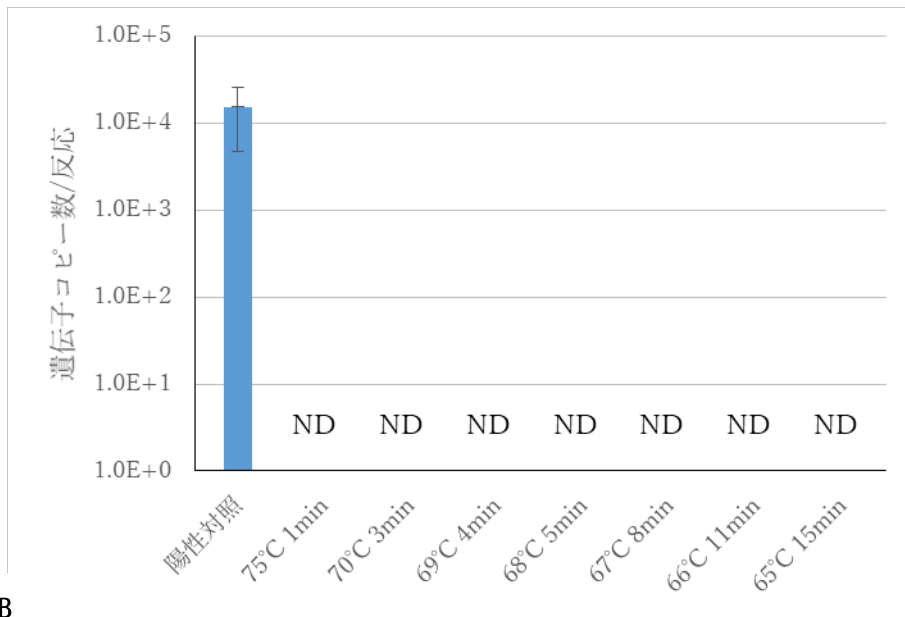
## **F. 研究発表**

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**

なし

A



B

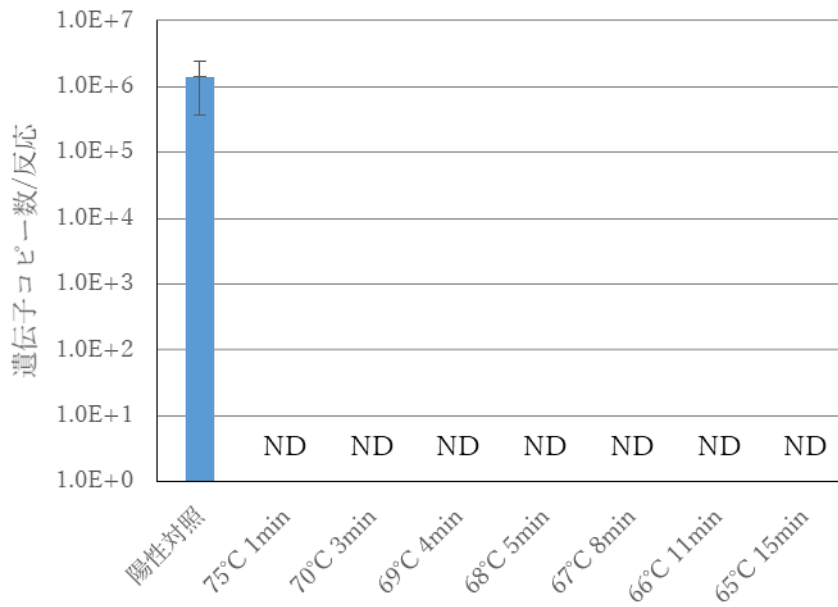
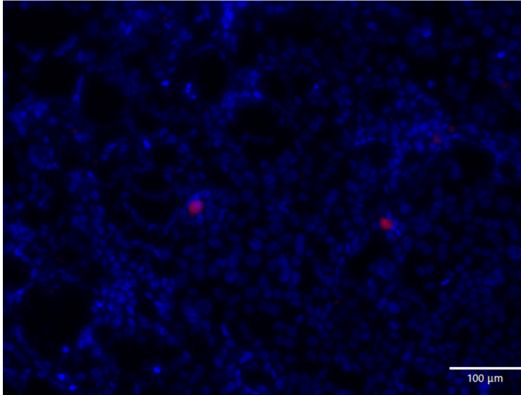
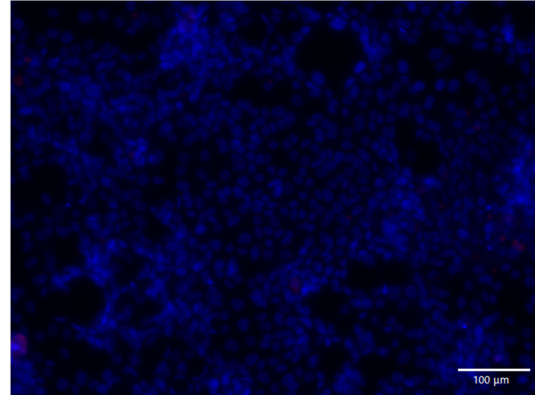


図1. Alexander 細胞における E 型肝炎ウイルス遺伝子の検出状況.  
 低温加熱処理後の検体懸濁液を上記細胞に接種し、28 日間培養した後の上清 (A) 及び細胞 (B) における E 型肝炎ウイルス遺伝子をリアルタイム PCR 法により検出した。

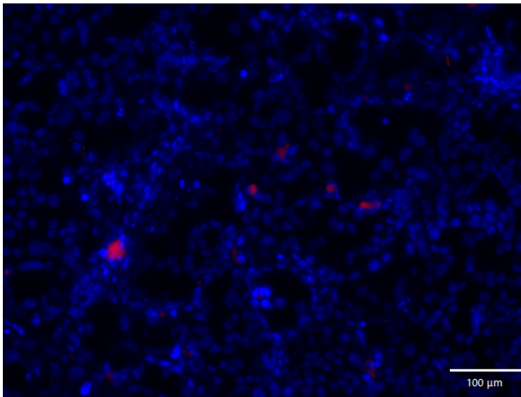
陽性対照-培養14日後



低温加熱群（68°C5分）-培養14日後



陽性対照-培養28日後



低温加熱群（68°C5分）-培養28日後

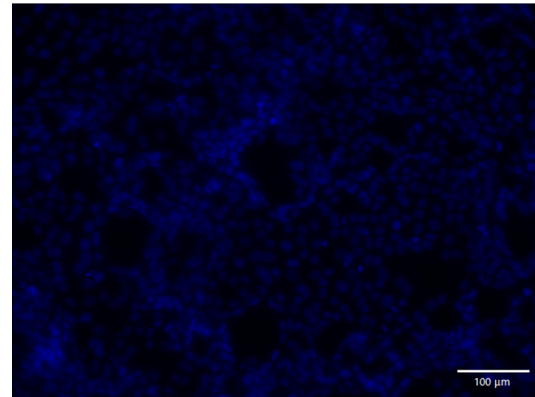


図 2. Alexander 細胞における E 型肝炎ウイルス抗原の検出。  
ウイルス抗原は赤色、細胞核は青色として検出される。