

3. 遺伝子診断の実際

12) 感染症 (14) 原虫

安岡 彰¹⁾

(KEYWORDS) マラリア, トキソプラズマ, ニューモシスチス

はじめに

原虫症は臨床で遭遇する機会が少なく、適切な診断がなされなかったり診断が遅れやすい感染症である。また病原体の検出が顕微鏡的検出に依存しているため、検出感度が十分ではなく、また検査の習熟度によって検出率が変わってきてしまう。遺伝子検出法はこれらの欠点を補う貴重な検査法である。しかしながら、わが国には標準化された原虫の遺伝子検査キットが市販されておらず、すべて研究ベースのものであるため、検査の感度や特異度などの標準的データがない。

マラリア

1. 臨床像の概況

マラリアはハマダラカの吸血によって原虫が体内に侵入し、肝を経て赤血球内で原虫が成長・増殖し、発熱や貧血・肝脾腫などをきたす疾患である。国内での発生はなく輸入感染症として経験する。世界には、熱帯熱マラリア、三日熱マラリア、四日熱マラリア、卵形マラリアの4種類が存在する。このうち熱帯熱マラリアは急速に原虫数を増加させ、脳マラリアをはじめ全身の臓器不全を起こして致死性転帰をとるため、輸入感染症の中で最も迅速な診断が重要な疾患である。

2. 従来の検査法

マラリア確定診断の基本は末梢血の塗抹標本をギムザ染色し、顕微鏡的に検出する方法である。感染赤血球像や虫体像の違いから4種の原虫を区別することができる。この方法は末梢血の計数を行える施設であればどこでも行える方法であるが、標本の作製・染色の技術や原虫検出に経験を要することから施設間の検出力に大きな差がある。特に末梢血中の原虫数が少ない場合に問題となる。

補助診断法としては血液中のマラリア抗原を検出する迅速診断キットがあり、危険度が高い熱帯熱マラリアとその他を区別して検出することができる。2種類の検査があるが、いずれも日本国内では検査試薬として承認されておらず、発売されていない。

3. 遺伝子検査とその臨床的有用性

マラリアでは血液を用いたPCR (polymerase chain reaction) 法が報告されており、4種のマラリアを区別できるものが多い。わが国では岡山大学の綿矢らによる方法が知られており、少ない原虫量でも検出可能で、重複感染も検出できるものとして報告されている。

冒頭で述べたようにマラリアの検査法は検査者の技能に依存するところが大きい検査であり、また最適な採血時期や、採血後すみやかに標本作製する必要があり一般病院では最良の検査結果を得ることが困難である場合も少なくない。この点、遺伝子検査では検体送付が可能なので検査の均一化に有用である。また、経験によることなく

1) YASUOKA Akira 長崎大学医学部・歯学部附属病院感染制御教育センター

4種のマラリアを区別できることや重複感染を容易に検出できることも大きなメリットである。

4. 従来法との関連

マラリアの診断には血液中に虫体が存在することが診断のよりどころとされているため、従来法を抜きにして遺伝子診断法が用いられることは当面考えられない。しかし、PCR検査が地域の検査ラボで迅速に行えるようになれば、将来的には遺伝子検査がマラリアの主たる診断法として認知される可能性もある。



トキソプラズマ

1. 臨床像の概況

トキソプラズマはネコを終宿主とし、ヒトやブタなどの哺乳類が中間宿主であり、われわれに最も身近な原虫症である。急性感染では発熱と全身のリンパ節腫脹をきたし、一過性の全身リンパ節腫脹をきたす原因の一つである。免疫健全者ではその後は脳内やリンパ節などで持続感染するものの生涯症状がみられることはない。急性感染が妊婦に起こると胎児に先天性トキソプラズマ症(水頭症、脈絡網膜炎、精神・運動障害など)を発症させるリスクがある。また既感染者が免疫不全に陥るか、免疫不全者が初感染を受けると特に脳内での増殖が起こりトキソプラズマ脳炎を発症する。特にCD4<200/ μ lのHIV感染者での発症がよく知られている。

2. 従来法の検査法

トキソプラズマを一般的な臨床検体から検出する方法はなく、脳生検による病理診断のみが唯一の確定診断方法である。臨床的に用いられているのはトキソプラズマ抗体の陽性化(発症の前後でIgG抗体の4倍以上の上昇、IgM抗体の検出)である。この方法は急性感染を事後に確定する方法としては有用であるが、免疫不全状態での脳炎の診断には抗体価の上昇が期待できないため用いることができない。

HIV感染者でのトキソプラズマ症の診断は頭部MRIやCT、シンチグラムによって画像的に行われ、既感染を示すIgG抗体陽性であればより確からしいと見なしている。

3. 遺伝子検査とその臨床的有用性

侵襲度の低い検査によるトキソプラズマ症の診断方法がないため、髄液などを用いた遺伝子診断には強い期待が持たれている。しかしながら、これまで報告されたトキソプラズマをターゲットとしたPCRは陽性率はさほど高くはない。PCRで陽性であれば本症である可能性が非常に高いといえるが、陰性であっても否定することはできない。臨床経過で何度か検査に提出することで、いずれかが陽性となることがあるとする報告もあるので、可能であれば経過中数回の検査提出を試みるのも一法である。

妊婦の羊水を用いたPCRで、先天性トキソプラズマ症を診断しようとする試みも報告されている。

4. 従来法との関連

従来法としていくつかの診断手段があるが、病理検査と抗体価の推移以外では臨床的に有用な診断方法がないため、感度のよい遺伝子検査法の開発は非常に期待されている。



その他の原虫症

その他の原虫症として、赤痢アメーバやクリプトスポリジウムなどが日本において時に認められる。いずれも診断は顕微鏡的検出であり、検査に習熟しないと検出が難しい。遺伝子の検出による診断法や、病原体の型別判定の遺伝子診断法(例えば赤痢アメーバでは病原性のある*Entamoeba histolytica*と病原性のない*E. dispar*は形態的には区別困難で、遺伝子型別が有用な区別手段である)が研究途上であり、いずれも均一で確実な診断のためにさらなる開発が望まれる。



ニューモシスチス

1. 臨床像の概況

ニューモシスチスは最近では真菌と分類されるが、臨床検査法では原虫と類似した背景を持つため、ここに付しておく。ニューモシスチスは*Pneumocystis jirovecii*(*P. carinii*から改名)による肺感染症で、ヒト-ヒト感染していると推定される病原体である。ほぼ免疫不全状態でのみ発症

し、特に最近では HIV 感染症や関節リウマチに対するモノクローナル抗体療法、免疫抑制剤による治療を背景として増加してきている。

2. 従来検査法

真菌であるが臨床検査としての培養は困難であり、原虫と同様、顕微鏡的検査が確定診断の方法である。血液を用いた補助診断法として β -glucan が高値になることが知られており、他の真菌症と比べ著しい高値となることも少なくない。

3. 遺伝子検査とその臨床的有用性

遺伝子検査としては PCR 法が用いられており、診療保険には収載されていないが多くの商業検査ラボで受注している。顕微鏡的検査法が誘発喀痰や気管支ファイバースコープなど侵襲性のある検査が必要なに対し、PCR ではこれらの検体に加え喀痰や咽頭拭い液でも陽性が得られることがあり、より侵襲が軽く診断に至ることができる。また顕微鏡的検査では検出に経験が必要(ギムザ染色)であったり、染色に技術が必要(グロコット染色)であるのに対して、均一な結果が得られる

メリットもある。

一方、検査の特異度にはやや問題があり、特に HIV 感染者で明らかな肺病変がなくても陽性となるなど潜在的な *P. jiroveci* の増殖をとらえる可能性が指摘されており、PCR 陽性が必ずしも疾患の発症と一致しない場合がある。したがって陽性結果の解釈は臨床像と併せて行う必要がある。

4. 従来法との関連

確定診断法としては従来の顕微鏡的検査が確実であるが、患者への侵襲性、感度の高さなど PCR は β -glucan 値や臨床像を併せて評価することにより、より高感度で侵襲度の低い診断法として有用性が高い。



おわりに

原虫症は PCR などの遺伝子診断が最も適した感染症の領域であり、今後も遺伝子検査の開発・上市が進むことが望まれる。



形式で学ぶ

真菌感染症診療の実際

Akira Yasuoka

安岡 彰

長崎大学医学部・歯学部附属病院感染制御教育センター教授

Q uestion

免疫抑制患者(入院患者)の真菌症予防では、
どのような環境対策が必要でしょうか？

A nswer

日本においては深在性真菌症として主として考慮される病原体は*Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, 接合菌症(*Mucor* など)および*Pneumocystis*である。このうち*Candida*は生態の常在菌であるため、環境要因を考慮することは少ない。

外来性吸入性病原体である*Aspergillus*(接合菌も該当すると思われるが十分な症例に乏しくエビデンスとして確立していない)は、環境要因が感染率にかかわることが明らかにされており、免疫不全患者では対策が必要である。対象となる免疫不全は造血幹細胞移植患者で、高度の免疫抑制が長期にわたって続く場合もこれに準じて行う。造血幹細胞移植後の患者では、病院周辺で建設工事が行われていると環境中の真菌胞子が増加し、発症率が高くなることが示されている。

このような環境からの真菌曝露への対策として最新のCDCガイドライン¹⁾では保護環境(protective environment; PE)という概念が提唱されている。これは従来の「無菌室」, 「低菌室」の概念に近い。保護環境の設備と運用を表に示す。

*Cryptococcus*は鳩などの糞を培地として増殖し、吸入に

よって感染する。このため細胞性免疫不全(HIV感染者, 免疫抑制剤使用患者, 高用量のステロイド薬使用患者)のいる病棟では、施設やその周囲に鳩などの鳥類が群れている状況は好ましくなく、糞が長期にわたって堆積しないよう清掃が必要である。

*Pneumocystis*は種特異性が強く、人工培養が困難であることなどから、ヒト-ヒト感染で伝播が維持されていると推定されている。実際に施設内でのアウトブレイクが疑われる例も報告されている。まだ十分なエビデンスがあるわけではないが、ニューモシチス肺炎を発症した患者と発症のリスクのある患者は同室にしないという注意は必要ではないかと考えられる。

文献

- 1) CDC Guideline for isolation precautions : preventing transmission of infectious agents in healthcare settings 2007. available from Internet : <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>
- 2) CDC Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. MMWR 52 : RR-10, 2003
- 3) CDC Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. MMWR 49 : RR-10, 2000

表 保護環境 (protective environment ; PE)

1. 患者：造血幹細胞移植患者のみに適応

- ・患者は室内で行うことができない診断・治療のための検査以外では、保護環境から外に出ないこと
- ・患者が外部へ出る場合には、N95マスクなどの呼吸器防御具を着用する

2. 標準予防策および経路別予防策

- ・患者ケアの前後で手指消毒を励行する
- ・部屋に入るだけの場合は医療従事者、訪問者ともにガウンや、手袋、マスクの着用は必要ない
- ・標準予防策が必要とされる場合や、患者に明らかな感染症があり経路別予防策が必要な場合はガウン、手袋、マスクなど必要な個人防御具を着用する

3. 部屋の設備

- ・吸気はHEPAフィルター(0.3 μ m径の粒子を99.97%除去できる能力)を通して供給する
- ・室内は十分な密閉性を有していること
- ・換気は1時間当たり室内気を12回以上排気できる換気量であること
- ・一方向性の気流：清浄な空気は部屋の一侧から供給され、患者のベッドを通過して他側から排気される構造であること
- ・室内気は廊下に対して >2.5 Paの陽圧であること
- ・気流パターン(圧差)は毎日目視的方法または圧力計で確認し記録すること
- ・ドアは自動ドア(自動的に閉まるドア)であること
- ・故障などに対応するため予備の換気システム(ポータブル式など)をもつこと
- ・保護環境が必要で、空気感染をする病原体の罹患者のために前室を有する独立排気の構造が望ましい
- ・このような設備がない場合は患者を空気感染用陰圧室に収容し、吸気にHEPAフィルターを装着して用いる

4. 環境表面

- ・水平面は病院清掃用洗剤または消毒剤で湿式清掃を行う
- ・埃が立つ作業は避ける
- ・廊下と室内にはカーペットは敷かない
- ・クッション・布製の家財・家具は置かない

5. その他

- ・保護環境では花(生花、ドライフラワーともに)や鉢植えは設置しない
- ・吸引清掃が必要な場合はHEPAフィルター付きの掃除機を用いる

Prologue

針刺しに関わる基礎知識

安岡 彰

長崎大学医学部・歯学部附属病院 感染制御教育センター 教授

はじめに

病院感染は様々な感染ルートをもち、それぞれ対策が異なる。血液媒介感染症は最近の日本の医療環境では患者から職員へのルートが大部分を占める。病院感染対策の一環としての職員の血液媒介感染対策は ICT 活動の柱の一つである。

針刺しは病院感染の計数可能なインシデント

医療安全の領域では、大きなエラーの発生を未然に防ぐために、すべてのエラーの情報を収集・解析することでエラーの発生要因を明らかにし、エラーを未然に防ごうという取り組みが進められている。エラーの情報はインシデントレポートとして集められており、多くの報告が集まるほど有用な情報になるため、「どんどん報告してください」と報告数の増加に努力している。このためには報告したことを叱責しない、むしろ「有益な情報をありがとう」という姿勢が大事である。

病院感染も感染症による院内のエラーととらえれば、エラーを報告しそれを解析して対策を立てるといったステップは重要な方策であ

る。針刺しインシデントはまさに自己報告のみが唯一の事例把握の方法であり、「インシデントレポート」の提出を推奨する必要がある。針刺しのインシデントレポートの方式・書式として EPINet™ という共通フォーマットがあり、これを用いることが推奨される。針刺しインシデントでも、「報告数が多いので皆気をつけるように」という指導はインシデントレポートの数を減少させることになり適切とはいえない。報告を奨励しつつ、実際のエラーを減らす取り組みが重要である。

針刺し受傷が医療従事者に与える影響

針刺しは臨床現場では頻回に起こるインシデント/アクシデントであり、血液媒介感染症に罹患するという重大な問題が発生する。しかしあまりに日常的で、これが報告すべきインシデントと認識されていない場合も多い。

一方、受傷の原因となった鋭利物が HIV やクロイツフェルトヤコブ病のような重篤な感染症の患者に使用されていた場合、医療スタッフはパニックに陥ることもあり、またストレス障害を残す場合もある。感染症が明らかの場合の心理的反応は理解できるが、それ

以外の場合は「大したことがない」インシデントなのであろうか？ 針刺しは初診の患者、外来患者、健康診断時の採血など状況を問わずに発生するが、このような状況では感染症に関する情報はない場合が多い。また、通常調べている感染症はB型、C型肝炎、場合によって梅毒やHIV程度であり、それ以外の感染症は調べられていない。感染症の有無は、実際は「知らない」のであるが、我々は「感染症はない」と思い込んで対処していないだろうか？ すべての針刺しは血液媒介感染症のリスクがある、決して軽微ではないインシデントであると考えべきである。

血液媒介感染症

血液媒介感染は一般媒介物感染 (common vehicle transmission) に含まれる感染経路で、血液中に含まれる微生物が、直接あるいは媒介物を介して感受性者の血液内・体内に入ることによって感染する。感染源は血液、一部の体液であり、皮膚のバリアを越えてこれらの体液が体内に入った場合に感染が成立する。皮膚は強固な防御壁であり、血液などの体液が正常な皮膚に触れただけでは血液媒

介感染症は伝播しない(このルートが成立するのであれば、接触感染と定義される)。

したがって、感染の可能性があるのは、①切創や針刺しなどで血液・体液が皮膚を越えて深部に接種される場合、②皮膚が傷や皮膚炎などにより傷害されていた場合、および③粘膜への接種による場合である。

表1に血液媒介感染症をとりうる病原体とその感染リスクを大まかに示したが、我々が通常の医療行為で気をつけておかなければならないのはB型肝炎、C型肝炎、HIVの3つである。もちろんそれ以外の感染も感染のリスクがないわけではないので、この3つの感染症が陰性でも血液媒介感染症の発生がないと思いついてはいけなことは前述した。

■ B型肝炎

B型肝炎は日常的にみられる血液媒介感染の病原体としては最も感染力が強い。また、乾燥した表面で1週間程度は感染性が持続するという報告もある。業務上でB型肝炎ウイルスに感染した医療従事者のうち、針刺しなどの明らかなエピソードを想起できた割合は50%以下とされ、血液体液に触れる機会が

表1 血液媒介感染症の病原体とリスク概要

病原体	遭遇の可能性	事故による感染のリスク	感染した場合の影響
HBV	+++	+++	+++
HCV	+++	++	++++
HIV	+	+	++++
HTLV-1	++	±	++
CMV	++++	?	+
Parvo B19	++++	?	±
出血熱	0~±	++++	++++
梅毒	++	±	+
ヤコブプリオン	0~±	±	++++

多い医療従事者は知らないうちに B 型肝炎ウイルスに感染する可能性があるということになる。すべての医療従事者に B 型肝炎ワクチンが推奨される所以である。

B 型肝炎に罹患すると発症者の 1 % では劇症肝炎化し、血漿交換や肝移植が必要となる。0.1 % では致死性的転帰をとる。成人で B 型肝炎に罹患した場合慢性化する場合は少ないとされてきたが、最近日本でも欧米型の B 型肝炎ウイルスが増えてきており、このウイルスによる感染の場合 10 % 程度では慢性化が起り得るとされている。

2 C 型肝炎

C 型肝炎ウイルスは発見されたのが 1989 年であり、それ以前は非 A 非 B 型（輸血後）肝炎と呼ばれていた。B 型肝炎ウイルスと異なり環境から感染する可能性は低く、ほとんどは針刺しなどの直接曝露である。

C 型肝炎ウイルスに感染した場合、平均 50 日の潜伏期の後急性肝炎を発症する。重症化することは稀で、定期的な検査を行っていないと発症に気づかない場合もあり得る。C 型急性肝炎では 70 % で慢性肝炎に移行し、この 1/2 で平均 20 年後に肝硬変、30 年後に肝癌が発生する。C 型肝炎の問題は慢性化とその後の重篤な転帰にある。

3 HIV

針刺しによる HIV の感染リスクは低く、抗ウイルス薬の開発と治療法の発展により、もはや致死性的疾患とはいえなくなったが、医療従事者の心理的恐怖感は強く、社会的な障害も大きい。HIV に感染した場合、曝露後 2 ~ 8 週の潜伏期の後、発熱・発疹・咽頭発赤といった伝染性単核症様の急性感染症状を呈し、場合によっては髄膜脳炎が認められる。

表 2 針刺しの場合の感染率

病原体	感染率
B 型肝炎 HBeAg (+)	22 ~ 31%
B 型肝炎 HBeAb (+)	1 ~ 6%
C 型肝炎	1 ~ 7%
HIV	0.2 ~ 0.5%

表 3 リスクの高い針刺し

- 中空針 > 非中空針（縫合針など）
- 静脈内に留置された針 > 皮下注、筋注
- 血液付着のある針
- 太い針
- 深い穿刺
- 穿刺時の血液注入

その後平均 10 年の経過で AIDS を発症し、無治療であった場合平均 2 年で致死性的転帰となる。

HIV 感染症は強力な抗 HIV 療法（Highly Active Anti-Retroviral Therapy ; HAART）と呼ばれる治療法の開発により、免疫不全への進行を阻止することが可能となった。

血液媒介感染症の感染リスク

針刺しによる血液媒介感染症の感染リスクは様々な報告がある。表 2 に報告された感染率を示したが、おおむね、B 型肝炎（e 抗原陽性の場合）で 30 %、C 型肝炎 3 %、HIV 0.3 % と覚えておくと良い。

感染率に関わる因子

針刺しなどの血液曝露によって血液媒介感染症の感染が成立するかどうかは、血液の接種量や針刺しの程度が関連する。これまでに指摘されている感染率に関わる因子を表 3 に示した。

表4 B型肝炎陽性血曝露後の感染予防策

	HBsAg (+)	HBsAg 不明
ワクチン未接種	HB-IG × 1 HB ワクチンスタート	HB ワクチンスタート
ワクチン反応例	治療不要	治療不要
ワクチン不応例	HB-IG × 1 HB ワクチンスタート HB-IG × 2*	感染源のリスク↑ ←に準じる
ワクチン反応不明	抗体チェック 陽性→治療不要 陰性→HB-IG × 1 ワクチンブースト	抗体チェック 陽性→治療不要 陰性→ワクチンブースト

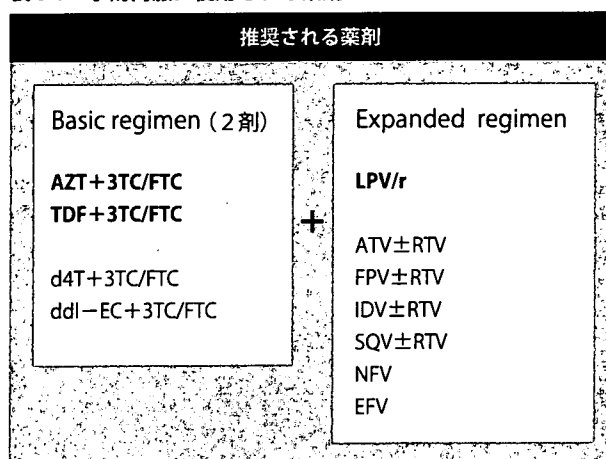
※ 2セットのワクチン接種でも未反応例は1ヵ月後に再度IGを投与する。

表5a HIV 陽性血針刺し後の感染予防策

事故程度	低ウイルス量 VL < 1500 無症候期	高ウイルス量 AIDS 急性感染期	HIV 感染 状態不明	由来不明 (針捨ての中の針など)
非高度 (擦過や非中空針など)	2 剤	≥ 3 剤	不要*	不要*
高度 (留置針, 明らかな血液 付着など)	≥ 3 剤	≥ 3 剤	不要*	不要*

* HIV 感染のリスクが十分あれば 2 剤併用を考慮

表5b 予防内服に使用される薬剤



(MMWR Vol.54 RR-9 Sep 30, 2005)

針刺し後の感染予防策 (Post-Exposure Prophylaxis ; PEP)

B型肝炎陽性血での針刺しの場合で、ワクチンによる抗体が得られていない場合はB型肝炎ウイルス高力価ガンマグロブリンの接種とワクチンの接種開始が推奨される(表4)。

C型肝炎陽性血の場合は、曝露直後に感染を阻止する有効な方法はないが、C型肝炎の発症が自覚症状だけでは明らかとならない可能性があるため、定期的な血液検査による経過観察が必要である。また急性肝炎を発症した場合、回復期にインターフェロン療法を行うことによって慢性化を阻止できるとするエビデンスがある。

HIVの場合発症直後からの抗ウイルス薬2～3剤による発症予防投与により高率に感染を阻止できることが知られている。HIVのPEPで重要なことはなるべくすみやかに抗ウ

イルス薬を開始すること、副作用に注意すること、可能であれば4週間の服薬を持続することである。表5に服薬の適応と薬剤選択を示した。

いずれの場合も曝露後6週間、3ヵ月後、6ヵ月後、さらに可能であれば12ヵ月後に血液検査を行い、感染や急性肝炎発症の有無をチェックする必要がある。

おわりに

血液媒介感染症が成立した針刺し事故の場合、莫大な費用がかかり、HIV感染者ひとりの生涯医療費は7,000万円以上との試算もある。さらに休業や就業制限による損失も発生する。なにより、健康被害を生じた医療従事者の肉体的・精神的苦痛は計り知れない。目先のコストのみにとらわれず、安全な器材導入や環境作りが急がれる。

Reference

- 1) Bolyard EA, Tablan OC, Williams WW et al : Guideline for infection control in health care personnel, 1998. AJIC 26 : 289-354, 1998
- 2) Updated US. Public health service guidelines for the management of occupational exposures to HBV, HCV, and HIV and recommendations for postexposure prophylaxis. MMWR vol.50 RR-11, 2001
- 3) Updated US. Public health service guidelines for the management of occupational exposures to HIV and recommendations for postexposure prophylaxis MMWR vol.54 RR-9, 2005

ノロウイルスの感染対策

安岡 彰

長崎大学医学部・歯学部附属病院感染制御教育センター

key words : エンベロープ, 消毒抵抗性, 手洗い, 個人防御具, 次亜塩素酸ナトリウム

要 旨

ノロウイルスはエンベロープを持たないため消毒や乾燥に抵抗性のウイルスで、少量でも感染症を発症する、普遍的な消化管感染症ウイルスである。病院内での感染は、便や吐物に由来するウイルスが、手指や環境を介して経口接種される糞口感染である。一旦患者が発生すると、今の日本の医療では広範な環境の汚染、手指の汚染が発生しやすく院内伝播のリスクが高まる。感染防止には手洗いの徹底と処置時の個人防御具の着用、よく触れる環境やトイレ、汚物処理室の消毒清掃が重要となる。

はじめに

2006～7年の冬季は全国でノロウイルスによる胃腸炎が流行し、医療施設における院内感染や食中毒も多発した。本稿ではノロウイルスを中心とした消化管感染症の院内感染対策について述べる。

1 ノロウイルスとは

ノロウイルスはカリシウイルスに属する＋ストランドのRNAウイルスであり、消毒や環境抵抗性の指標となるエンベロープを持たない。(エンベロープは寄生した細胞由来の脂質二重膜で、エンベロープを持たないほうが消毒薬や厳しい環境条件での抵抗性が増す。多くの消化管感染症を起こすウイルスはエンベロープを持たない。)ウイルスとしても小型であり、電子顕

微鏡像では小型球形で表面にカップ様の構造があることからカリシウイルスと呼ばれる。カリシウイルスのうちノロウイルスと類似ウイルスであるサポウイルスは人工的増殖が成功しておらず、このため正確な消毒抵抗性や感染性が判明していない。また人以外でのウイルスの増殖も確認されていない。

ノロウイルスははじめ Norwalkvirus として報告され、電顕上の特徴から小型球形ウイルス (small round-shaped virus; SRSV) と称されていた。ウイルスの名前が統一された2000年以前の文献では、上記のいずれの記載もノロウイルスである可能性が高い。

2 食中毒と感染性胃腸炎

ノロウイルス感染症は秋から冬にかけての急性胃腸炎の普遍的な病原体である。小児ではロタウイルスやサポウイルスが多いが、成人ではこれらのウイルス感染は稀となり、ノロウイルスによるものが多い。日本では急性熱性疾患を「風邪」と呼ぶことも多いが、いわゆる「お腹にくる風邪」である。培養による検出ができないため、感染症の実態が明らかとなったのはこの数年であるが、かなり普遍的なウイルスである。例年冬場にかけての流行がみられていたが、2006～7年の冬には従来より大きな流行がみられ、また医療施設内での伝播があちこちで認められた。

ノロウイルスは2枚貝、特にカキの食中毒として有名であるが、ノロウイルスは2枚貝で増殖するのではない。その意味で従来の食中毒とは趣を異にする。ノ

ロウイルスは人の排便とともに排出された後、河川を下り、プランクトンに捕食され、さらに食物連鎖のことで、或いは水中に浮遊したまま2枚貝に取り込まれる。このように貝ではウイルスが濃縮されて蓄積される。この貝を生、または加熱が不十分なまま喫食するとノロウイルス胃腸炎を発症する。ノロウイルス食中毒は貝の鮮度や状態では判別できず、運が悪いと発症するものである。したがって、生で食べることが多いカキで発生が多い。

ノロウイルスの感染症の特徴は、ウイルスが環境中での抵抗性が高く、乾燥や時間経過によっても感染性が残存することと、ごく少量の病原体（100個かそれ以下のウイルス量でよいと考えられている）で発症することにある。このため、感染源（主に排便、時に吐物など）との接触を厳重に避けること、接触後には十分な除去を行うことが重要となる。

3 ノロウイルス胃腸炎の臨床像と対応

ウイルスを経口的に摂取してから24～48時間の潜伏期の後に、倦怠感、嘔気、腹痛などの全身症状、腹部症状が出現する。日常的に経験する急性胃腸炎としては症状が強い部類に入る。その後、嘔吐、下痢が出現し、1日あたり4～8回の下痢を来すとされる。約半数の例で発熱を見る。発症から2～3日で症状は軽快する。

高齢者や高度の免疫不全がある患者では脱水や嘔吐物の誤嚥などにより致死性の転帰をとることがあるが、一般には数日で軽快するself-limitingな疾患である。

急性ウイルス感染症であり、有効な抗ウイルス薬はない。治療は対症的に行うこととなり、脱水に対して経口的に飲水をすすめる。嘔吐などが強く摂取が困難な場合は点滴投与も考慮する。必要に応じて制吐剤、鎮痙剤、マイルドな止痢剤などを投与するが、強い止痢剤（ロペラミドなど）は症状の悪化を来す可能性があり、感染性胃腸炎では使用しない。

4 ノロウイルスによる病院感染

1) 発生パターン

ノロウイルスが病院内で広がる発端としては急性胃腸炎、あるいは食中毒として来院した患者から環境や手を介して院内伝播が起こる場合と、給食調理過程で、スタッフの手から調理食が汚染され食中毒として発生

する場合がある。カキなどの2枚貝による食中毒は、栄養師による食材に対する注意がなされており、病院給食で発生することは稀である。

食中毒で発生した場合も食中毒患者からの2次感染が発生することは言うまでもない。一般に食中毒は患者からの2次感染が発生することは想定しなくてよい場合が多いが、ノロウイルスと病原出血性大腸菌感染症は十分な注意が必要である。また、食中毒では感染源となる患者が同時に多数発生、あるいは多数来院することになるため、2次感染の阻止という点から非常にリスクが高い状態となる点を銘記しておく必要がある。

2) 感染ルート

ノロウイルスは患者の便、吐物にウイルスが存在するため、感染ルートは接触感染、環境表面や器具による媒介物感染が中心となる。ノロウイルスは少量でも感染が成立することと、環境表面で比較的長時間感染性が維持されると推定されることから、標準予防策の破綻があると容易に感染伝播が起こる。すなわち、感染患者のケアをしたり、患者周辺に触れた手で、手指消毒をしないまま次の患者に接すると2次感染が起こる可能性がある。

乾燥に強いウイルスが少量で感染源になることは、いろいろなケア現場で深刻な環境汚染の問題に直面する。たとえば、日常生活に少し介助が必要な患者が急に嘔吐した場面を考えてみる。嘔吐が割合突然に起こることもあり、すでにベッドや寝具に嘔吐した後か、介助者が十分な防御具を着用する暇もなく嘔吐を介助することになる。このとき、スタッフは患者の容態を第一に介護し、場合によっては投薬や点滴などを始める場合もあるであろう。その次に吐物を処理し、寝具や衣類を交換し、ベッドや床などの清掃を行うという手順になる。このように急に処置を要する場合、スタッフの衣類やエプロン、手などにはウイルスが付着し、さらにベッド柵、ドアノブ、衣類だなの取っ手、灯りのスイッチ・輸液ポンプ、洗面台やトイレなどに次々とウイルスが付着していくこととなる。

また、正常に排便をする後の処理を考えても同様である。排便が終わって紙で拭いた後、その手で衣類を整え、トイレのフラッシュのノブ（スイッチ）を押し、ドアノブを開けて室外に出て、洗面台のノブなどを開

けてから手を洗淨することになる。トイレの中や洗面台までは目には見えないが少量のウイルスが点々と付着していることになる。また本人の衣類は確実に汚染されている。

このように、このウイルスの特徴は、他の病原体にはない嚴重な感染対策を行わなければ施設内での感染を防ぐことが困難であることを意味している。

ノロウイルスの感染経路としてはもう一つ「粉塵感染」が報告されている。英語では air-borne infection (空気感染) であるが、いわゆる空気感染では咳やくしゃみで空气中に放出されたほこりとそれに付着した病原体が乾燥した状態で空气中を漂い、これを吸入することによって感染するのに対して、ノロウイルスの場合は吐物や便などが乾燥し、これがほこりとして舞い上がってこれを吸引摂取して感染するというものである。

この粉塵感染は状況証拠から提唱されているものであり、消化管感染症が空気感染をするのかについては疑問点もある。また、本来の空気感染病原体と異なりこの感染経路は特別な状況でしか発生しない。すなわち、ウイルスの混入した吐物などが大量に乾燥し、それが閉鎖空間で舞うという状況で発生するとされる。また、吐物などを処理する際に粉塵を吸入して発症す

る可能性も指摘されている。

5 感染防止策

病院感染対策の基本であり、最終的な方法は標準予防策・経路別感染防止策の遵守である。標準予防策を表1に、ノロウイルス対策に必要な接触感染予防策を表2に示す。

これらの予防策が日常的に遵守できていればノロウイルスも含めて病院感染は発生しないか、少なくとも拡大はしないはずであるが、現実にはなかなか困難である。これらの予防策の完全実施にはほど遠いのが多くの日本の医療現場での実情であろう。ここでは、建前論ではなく、標準予防策の実施がまだ十分でない状況で、ノロウイルス感染の伝播を防ぐ、あるいは発生した場合の拡大を防ぐという観点から述べていく。この観点はあくまで緊急避難であり、病院感染制御の最終目標は標準予防策・経路別予防策の完全実施であることは忘れてはならない。

1) 手指消毒

標準予防策のうち、手洗い・手指消毒は経口感染であるノロウイルス感染防止に最も重要な手技である。日常的に患者や患者の周辺(衣類、寝具、ベッド柵と

表1 標準予防策(要点)
—2007年6月改訂版—

-
1. 手指衛生(手洗い)
必要な場合; 患者診察の前, 血液・体液に触れた後, 正常な皮膚, 医療行為の部位を替えるとき, 患者の周囲のもの, 手袋を脱いだ後など.
 2. 個人防衛具(PPE)
血液・体液が付着・飛散する可能性がある場合は手袋, ガウン, マスクやフェースシールドなどを適切に使用する.
 3. 呼吸衛生/咳のエチケット
咳やくしゃみから病原体が飛散しないように患者への啓蒙や病院での資材を配置などを行う.
 4. 患者配置
患者の部屋(個室/大部屋)の決定に伝播する感染症の有無を考慮する.
 5. 医療機器・器具
医療器具は単回使用品, 再使用品の適切な使用と洗淨・消毒を行う.
 6. 環境の制御(環境整備)
よく触れる環境の清掃・消毒を行う.
 7. 衣類・寝具と洗濯
使用済の衣類・寝具は感染源とならないよう適切に扱う.
 8. 安全な注射処置
注射薬を介した病原体の伝播をふせぐために単回使用包装品の推奨.
 9. 腰椎穿刺時の感染対策
腰椎穿刺で薬液注入の際はマスク着用.
 10. 従業者の安全
法に従った針刺し防止策の実施(米国の場合).
-

表2 接触感染予防策

1. 個室に収容する	困難なら同じ病原体の患者を集めた部屋とする (cohorting). 困難なら病原体の特徴に応じて工夫する.
2. 手袋	病室に入室するときから着用.
3. ガウン	スタッフの着衣が患者に触れる可能性がある行為を行う場合, 入室時から着用.
4. 患者の移動制限	室外への移動は控える.
5. 患者ケアの器材	患者専用とする.

いった周辺器材など)に触れた後は手洗い・手指消毒の励行が必要である。後述のようにアルコールはノロウイルスに対してもある程度有効であるので、日常的には擦り込み式の速乾性手指消毒剤を使用することでよいが、吐物や排便の処理の後、明らかにノロウイルス感染症が疑われる患者に接した後は流水と液体石鹸による手洗いを行う必要がある。

2) 吐物・排便後の処理

患者の吐物や排便後の処理、おむつ交換時には手袋とエプロンを着用して処理し、終了したらこれらを脱いで流水と石鹸による手洗いを行う。便を介した感染、すなわち糞口感染をする病原体には消毒や乾燥に抵抗性があったり、少量の病原体で感染が成立するものが多いので、吐物や排便後の処理を行った場合は患者毎に手袋とエプロンを交換することが望ましい。これは療養型施設などではなかなか困難であるが、少なくとも吐物の処理後と急性の下痢など感染症が疑われる患者の後では交換するようにする。

ノロウイルスによる嘔吐や下痢が考えられる患者では、吐物・便の処理には手袋、長袖のエプロン、マスクを着用して処理に当たり、使用後は破棄（ディスポーザブルのもの）するか、交換するようにする。

床などに飛散したノロウイルス患者の吐物・下痢便の処理時には0.1~0.5%の次亜塩素酸ナトリウムを浸した厚手のペーパータオルで上を覆い、飛沫が発生しないように中央に集めてビニール袋などに入れる方法が推奨されている。床が絨毯など布製のものであった場合は、この方法だけでは十分に吐物・便が除去できないため、0.02~0.05%の次亜塩素酸ナトリウムを含む水で繰り返し洗浄して除去する必要がある。排気部分にHEPAフィルターを備えた掃除機があれば吸引除

去も有効である。一般の掃除機は排気によりウイルスを空気中に拡散させることになるので使用しない。

吐物等の処理過程では、周囲を汚染させないように十分な配慮が必要である。ある程度の高さから床に嘔吐した場合には思った以上に遠くまで飛散している。処理にあたったスタッフの履物による拡散にも注意が必要である。処理した手袋のままドアを開けて汚物処理室に向かうと、ドアノブやスイッチなどを汚染していくことになる。汚物を入れたビニール袋の外側にもウイルスは付着していると思われるので、これに触れた手から知らず知らずに環境を汚染していくことになりやすい。また、車いすは床に付着している病原体を手につけやすい医療器具として十分注意が必要である。車いすに乗った患者が嘔吐・失禁した場合や、十分な汚染除去が済まないうちにその上を車いすが通過した場合は、広範囲に汚染が広がっている可能性がある。

3) トイレの環境浄化

前述のように、排便後の動作を考えた場合に、便器、フラッシュノブ、ドアノブ、洗面台は便由来の病原体で汚染される可能性が高い。日常的にこれらの清掃・消毒を行う必要があるが、特にノロウイルス患者が発生した場合はトイレは専用とし、また汚染される可能性がある部分は0.05%次亜塩素酸ナトリウムで消毒することが望ましい。施設内での発生時にはこの清掃・消毒は患者専用トイレだけでなく、施設内全体で行うほうがよい。

4) 汚物処理室の環境浄化

汚物処理室は吐物や排泄物の破棄、使用した器具の洗浄などが行われるため、病原体の飛散が高度で、シンクや処理槽のフラッシュノブ、水道のコック、各種

スイッチなどを介して様々な病院感染の中継・拡散の場所となってきた。ノロウイルス感染でもこの場所の環境浄化は非常に重要である。

汚物の処理や器具の洗浄を行う場合には必ず手袋、長袖エプロン、マスクを着用して行い、作業後は脱ぐことが必要である。また、ノロウイルス感染者が発生している状況では汚物処理室のシンク、ノブ、コック、スイッチといったよく触れる環境表面は頻回に0.05%次亜塩素酸ナトリウムで消毒する。金属表面はこのあと水かアルコール消毒剤で二度拭きすると錆が発生しにくい。

6 ノロウイルスに対する消毒

1) アルコール消毒剤

ノロウイルスに対するアルコールの効果はやや誤解が生じているようである。エンベロープを持たないウイルスであるためアルコールにはある程度抵抗性であるが、たんぱく変性剤であるアルコールがまったく無効とは思われない。実際アルコールによってウイルス量が1/100程度には減少することが報告されている。ただ、吐物や便などには大量のウイルスが存在するため、この程度の効果では不十分である。これが「ノロウイルスに対してアルコール消毒は十分ではない」と言われるゆえんである。

したがってノロウイルスが付着している、あるいはその可能性がある部位の除染には向かないが、擦り込み式アルコール消毒剤による普段の手指消毒や、日常的な環境浄化としてアルコールによる手すりやドアノブの消毒は、ノロウイルス感染の防止には有効と考えられる。

2) 次亜塩素酸ナトリウム

次亜塩素酸ナトリウムの使用に関しても種々の誤解があるようである。ノロウイルスは塩素系の消毒剤にもやや抵抗性で、塩素濃度として200ppmが必要との報告がある。200ppmはすなわち0.02%である。

ここで注意しなければならないのは次亜塩素酸ナトリウムという消毒剤の特徴である。次亜塩素酸ナトリウムはミルトンという商品名で赤ちゃんにも安全な消毒剤としては乳瓶などの消毒に広く用いられているが、これは蛋白質に接すると酸素と食塩に分解されるからである。これを裏返せば環境表面や吐物などに応用す

る場合、大量に用いるか、有効濃度を十分上回る濃度のものを使用しなければ分解されてしまい、十分な効果が得られないということになる。この点を考慮して米国CDCでは吐物などの処理に用いる次亜塩素酸ナトリウムの濃度は0.1~0.5%を推奨している。これを超える濃度はもちろん有効であるが、使用するスタッフへの毒性(つんとする匂いは塩素ガスである)を考えると推奨されない。環境表面のふき取り消毒では表面の劣化・錆の発生も考慮しなければならないが0.05%を使用すべきで、必要に応じて水やアルコールによる二度拭きを行う。十分な液量を使用することができる場合(食材の洗浄やまな板などを流す場合)は0.02%を用いることができる。

環境消毒に用いる次亜塩素酸ナトリウムは必ずしも医療用でなくても構わない。しかし次亜塩素酸ナトリウムは経時的に濃度が低下し、初期濃度の半分以下になることがあるので、長期にわたって保存したものは不適當であり、また使用にあたっては濃度低下を見込んだ希釈をする必要がある。希釈した状態で保存してはならない。市販されている台所・洗濯用塩素系漂白剤は5~6%の次亜塩素酸ナトリウムを含有するので、吐物などの処理時には10~20倍希釈で用いるとよい。

7 ノロウイルス感染患者発生時の対応

患者発生時の対応を以下にまとめた。チェック表(表3)も参照願いたい。

1) 患者の隔離・コホーティング

ノロウイルス感染が判明したら患者は個室に収容するか、発症者を同じ部屋に集めるコホーティングを行う。感染者と濃厚な接触があり発症するリスクが高い患者も、できれば潜伏期間(平均2日)の2倍の期間、別室でコホーティングを行うことが望ましい。

2) トイレ・洗面所の専用化

感染者が使用するトイレや洗面台は専用とし、ほかの患者と共用しないほうがよい。

3) 手洗い・个人防护具着用の励行

感染者と接する場合はその前後に手洗いを励行し、吐物や排泄物の処理時には手袋、長袖のエプロン、マスクといった个人防护具を着用する。このことは、患

表3 ノロウイルス感染症発生時の対応チェックリスト

-
- 個室に収容し、接触感染対策を開始
 - ノロウイルス患者を同室に集める
 - 患者専用のトイレを確保する
 - 患者専用の手洗いを確保する
 - 医療器具（血圧計、聴診器など）は専用とする
 - 手洗いを励行する
 - 手洗い励行のためのポスター掲示
 - 手洗いの必要についてのスタッフ教育
 - 手洗い場の改善
 - 水道栓は自動式か足踏み・キック式、肘で操作できる長いレバー式にする
 - 手洗い石鹸は液体石鹸にする
 - ペーパータオルを用意する
 - 個人防御具の配置
 - 手袋
 - サージカルマスク
 - 長袖エプロンまたはガウン（一回使い捨て又は使用毎に洗濯）
 - 患者周囲（手すり、ドアノブ、明かりのスイッチ、車いすなど）を1日1回以上次亜塩素酸ナトリウム希釈液（0.05%）で清掃
 - トイレ・汚物処理室の清掃強化
 - 職員教育
 - 手洗いと標準予防策
 - 個人防御具の使い方
 - 吐物・失禁時の汚物処理のしかた
 - 患者・付き添い者教育
 - 手洗いの励行
 - トイレや手洗い場の汚染防止
-

者や患者の付き添い、見舞客に対しても励行するよう指導する必要がある。

4) 環境浄化の励行

患者周囲のよく触れる場所は1日1回以上（頻回に行うことがのぞましい）、次亜塩素酸ナトリウムによる清掃を行う。

結 語

2006～7年の冬季に大きな流行があったことから、この冬の大流行の可能性は低いですが、昨冬の経験を生かし、今後の病院感染防止に務める必要がある。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター編：ノロウイルス感染症とその対応・予防。インターネットより入手可能：<http://idsc.nih.go.jp/disease/norovirus/NV0618-b.pdf>
- 2) 厚生労働省 ノロウイルスに関するQ&A。インターネットより入手可能：<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/yobou/dl/040204-1.pdf>
- 3) Treanor JJ, Dolin R. Norovirus and other caliciviruses. Principles and Practice of Infectious Diseases 6th edition. Edited by Gerald L. Mandell. GL, Bennett JE., Dolin R. Churchill Livingstone pp. 2194-2200, 2004.
- 4) CDC Guideline for isolation precautions: preventing transmission of infectious agents in healthcare settings 2007. available from Internet:<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>

研究成果の刊行に関する一覧表

平成 19 年度 国立感染症研究所 片野晴隆

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishak Mde, O., Martins, R.N., Machado, P.R., de Souza, L.L., Machado, L.F., Azevedo, V.N., <u>Katano, H.</u> , Sata, T., Hasegawa, H., Vallinoto, A.C., and Ishak, R.	High diversity of HHV-8 molecular subtypes in the Amazon region of Brazil: Evidence of an ancient human infection.	J. Med. Virol.	79	1537-1544	2007
<u>Katano, H.</u> , Sato, Y., Hoshino, S., Tachikawa, N., Oka, S., Morishita, Y., Ishida, T., Watanabe, T., Rom, W., Mori, S., Sata, T., Weiden, M., and Hoshino, Y.	Integration of HIV-1 caused STAT3-associated B cell lymphoma in an AIDS patient.	Microbes Infect	9	1581-1589	2007
Kuhara, T., Yoshikawa, T., Ihira, M., Watanabe, D., Tamada, Y., <u>Katano, H.</u> , Asano, Y., and Matsumoto, Y.	Rapid detection of human herpesvirus 8 DNA using loop-mediated isothermal amplification.	J. Virol. Methods	144	79-85	2007
Ueno, T., Mitsuishi, T., Kimura, Y., Kato, T., Hasegawa, H., <u>Katano, H.</u> , Sata, T., Kurane, S., and Kawana, S.	Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with Kaposi's sarcoma: successful treatment with interferon-alpha.	Eur. J. Dermatol.	17	539-540	2007

High Diversity of HHV-8 Molecular Subtypes in the Amazon Region of Brazil: Evidence of an Ancient Human Infection

Marluísa de Oliveira Guimarães Ishak,^{1*} Rosimar Neris Martins,¹ Paula Renata Lima Machado,¹ Lia Lobato Batista de Souza,¹ Luiz Fernando Almeida Machado,¹ Vânia Nakauth Azevedo,¹ Harutaka Katano,² Tetsutaro Sata,² Hideki Hasegawa,² Antonio Carlos Rosário Vallinoto,¹ and Ricardo Ishak¹

¹Virus Laboratory, Universidade Federal do Para, Brazil

²Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

The present study describes the molecular epidemiology of *Human herpesvirus 8* (HHV-8) among four Indian tribes (Kararao, Arara Laranjal, Tiriyo, and Zo'e) of the Amazon region of Brazil and a group of HIV-1-infected subjects from the urban population of Belem, Para. Infection was characterized by the presence of antibodies using ELISA (measuring antibodies to ORF59, ORF65, K8.1A, K8.1B, and ORF73), and molecular assays (gene amplification of the regions ORF26 and the variable region VR1). Antibodies to HHV-8 were detected in 66 samples of the 221 Brazilian Amerindians, namely, 6 (25%) in the Kararao, 18 (19.6%) in the Arara Laranjal, 24 (42.9%) in the Tiriyo, and 18 (36.7%) in the Zo'e. Among the 477 HIV-1-infected subjects, antibodies to HHV-8 were present in 74 (15.5%) persons. The ORF26 region was amplified in seven samples, one of the Arara Laranjal, one of the Tiriyo, two of the Zo'e, and three of the HIV-1-infected group. Subtyping of HHV-8 described a high multiplicity of molecular subtypes, including C (Zo'e), E (Tiriyo), and B (HIV-1 infected). Serological results confirm the high prevalence of HHV-8 among Amerindians and the presence of three subtypes in the Amazon region of Brazil, including a unique subtype, which favors the idea of HHV-8 as an ancient human infection within this particular geographical region. **J. Med. Virol. 79:1537–1544, 2007.**

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: *Human herpesvirus 8* (HHV-8); HHV-8 subtypes; co-infection HHV-8/HIV-1; Brazilian Amerindian groups

INTRODUCTION

Human herpesvirus 8 (HHV-8) is a member of the family *Herpesviridae*, subfamily *Gammaherpesvirinae*,

and the first virus of the genus *Radinovirus* shown infecting humans [Chang et al., 1994; Moore et al., 1996]. HHV-8 is associated to Kaposi sarcoma (KS), primary effusion lymphoma, and Castleman multicentric disease [Chang et al., 1994; Cesarman et al., 1995; Moore and Chang, 1995; Soulier et al., 1995].

HHV-8 was detected in Brazil mostly in Southern regions of the country presenting 3–7% of antibody prevalence among blood donors [Caterino-de-Araujo et al., 1999; Zago et al., 2000; Ferreira et al., 2003; Perez et al., 2004], and in HIV-infected patients with KS (74–99%) and without KS (4–39%) [Zago et al., 2000; Keller et al., 2001; Souza et al., 2004; Nascimento et al., 2005]. HIV-negative male homosexuals presented an antibody prevalence of 32.6% [Souza et al., 2004].

In the North region of the country, HHV-8 was described initially in native Indians tribes without a clearcut prevalence [Biggar et al., 2000] as well as in 16.3% of 497 children and adults from the city of Belem [Freitas et al., 2002].

The present study aimed to describe the epidemiology of HHV-8 among native Indian population groups of the Amazon region of Brazil and HIV-1-infected subjects residing in the city of Belem, Brazil, in order to provide further information regarding the descriptive epidemiology of the virus, to describe the possible transmission pathways, the molecular subtypes of HHV-8 circulating in specific geographical areas, and

The present work was performed at the Virus Laboratory of the Universidade Federal do Para.

Grant sponsor: Japan Health Science Foundation and SEC-TAM/FUNTEC.

*Correspondence to: Marluísa de Oliveira Guimarães Ishak, Rua Diogo Moa 380/1500; 66055-170, Belém, Pará, Brazil. E-mail: marluisa@ufpa.br

Accepted 8 March 2007

DOI 10.1002/jmv.20995

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)

© 2007 WILEY-LISS, INC.



to elucidate the possible role of the virus as an ancient human infection in the Amazon region of Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Population Groups Examined

Blood samples from 172 Amerindians of the Amazon region of Brazil were collected during the years 1996 and 1997 and included the Kararaô village (n = 24, 13 males and 11 females), a group of the Kayapó (Je linguistic group), the tribes Arara Laranjal (Karib; n = 92, 45 males and 47 females), the Tiriyo (Karib; n = 56, 21 males and 35 females), and the Zo'e (Tupi; n = 49, gender unknown). Blood samples of HIV-1-infected individuals (n = 477, 273 males and 204 females), residents in Belem, Para, Brazil, were collected between the years 2000 and 2002 (Fig. 1).

Samples were collected and placed in tubes with anticoagulant to separate the plasma which were kept at -20°C until the moment of use. The samples from Amerindians were collected during medical expeditions of the Virus Laboratory together with the Laboratory of Human Genetics of the Institute of Biological Sciences of the Universidade Federal do Para and the Fundacao Nacional do Indio (FUNAI). HIV-1-infected individuals were attended at the State Reference Unit for Infectious Diseases (URE-DIPE), for routine determinations of viral load and CD4^{+} T lymphocyte counts.

Serologic Test

Antibodies to HHV-8 were detected as described previously [Katano et al., 2000] using an enzyme immunoassay (mixed-antigen ELISA for serum or plasma samples) with four antigens, ORF59 (initial and late protein, lytic cycle), ORF65 (late protein of the capsid, lytic cycle), K8.1A and K8.1B (two variants of the envelope glycoprotein, lytic cycle), and ORF73 (latency maintenance protein). Briefly, serum samples were diluted at 1:100, and reacted with the mixed antigens

of HHV-8 in an ELISA plate for 30 min. Followed by washing, alkaliphosphatase-conjugated anti-human IgG goat antibody (1:5,000 dilution, Tago Immunologicals, Camarillo, CA) was incubated for 30 min. After washing, phosphate substrate tablets (5 mg/tab, Sigma, St. Louis, MO) were used as a substrate to develop the color for 30 min. The absorbance in the wells was measured at 405 nm wavelength. The cut-off value for the mixed-antigen ELISA was determined by the mean absorbance plus 5 standard deviation for 40 negative serum samples whose negativity was confirmed by immunofluorescence assay.

Polymerase Chain Reaction

DNA extraction was performed on PBMC from HHV-8-seropositive subjects (according to the protocol of Puregene, Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN). A nested PCR was attempted to amplify a fragment of 233 bp of the ORF26, in order to confirm the serologic result obtained.

Reactions used 50 μl volumes containing 1 μg of the extracted DNA, 125 μM of each dNTP, 20 pmol/ μl of each of the two external primers, 10 \times PCR buffer— MgCl_2 and 0.5 U *Taq* DNA polymerase in a thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer, Norwalk, CA) for 3 min at 94°C , followed by 35 cycles at 94°C (1 min), 57°C (1 min), 72°C (1 min), and extended for 10 min at 72°C . Five microlitres of the amplified product were used in the nested PCR using a set of internal primers, maintaining the same mixture (final volume of 50 μl), temperature and incubation periods used in the first reaction. The external primers sequences were (KSA) 5'-CCTCTGACAACCTTCAGATA-3' and (KSB) 5'-GTACATGGACAGATCGTCAA-3' aiming the amplification of a sequence of 365 bp. The internal primers sequences were (KS1) 5'-AGCCGAAAGGATTCCAC-CAT-3' and (KS2) 5'-TCCGTGTGTCTACGTCCAG-3' aiming the amplification of a sequence of 233 bp [Chang

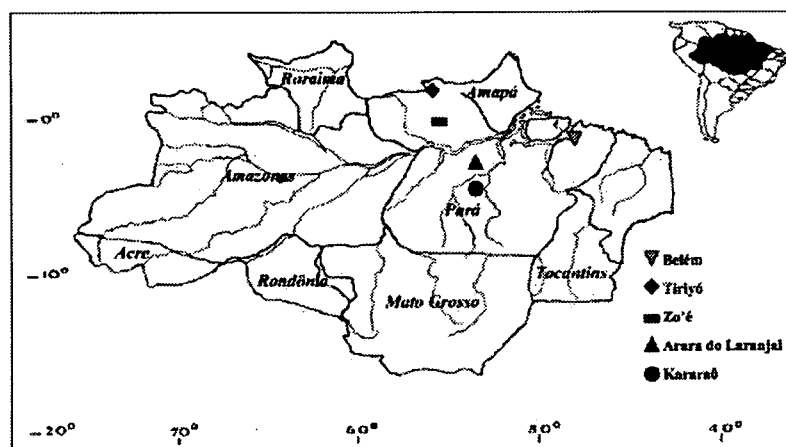


Fig. 1. Geographic distribution of the human population groups (urban and Amerindians) from the Amazon region of Brazil, examined for the presence of HHV-8 infection.

et al., 1994). Amplified products were submitted to electrophoresis on 2% agarose gels.

Another nested PCR was performed to amplify a fragment of 435 bp of the variable region 1 of the *K1* gene, and sequenced directly in order to prepare the phylogenetic tree. Reactions were performed using the protocol described above. The external primers sequences were (PMC20) 5'-GTCTTTCAGACCTTGT-TGG-3' and (K1/481/2) 5'-CCC GTT AGAACAAGTATA-3' corresponding to nucleotide positions 68–86 and 584–567. The internal primers sequences were (PMC20A) 5'-GACCTTGTGGACATCCTG-3' and (K1/427/2) 5'-GT-ATTTAGTTGTGACACGG-3' corresponding to nucleotide positions 76–94 and 530–511 [Cook et al., 1999]. PCR reactions were performed using 3 min at 94°C, followed by 35 cycles at 94°C (1 min), 48°C (1 min), 72°C (1 min), and extended for 3 min at 72°C. The PCR product was electrophoresed on a 2% agarose gel (200 V, 120 Amp/45 min) and purified by QIA Quick Purification Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) prior to a direct sequencing of the product.

Sequencing

The amplified fragments were submitted to a direct sequencing assay according to the protocol of the ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Kit (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CA); the reaction products were loaded on the ABI Prism 373 DNA Sequencer (Perkin-Elmer Cetus).

Phylogenetic Analysis

The nucleotide sequences were obtained from the VR1 of *K1* gene of HHV-8 of the present strains together with the sequences of 22 other HHV-8 strains described in the Genbank to establish the phylogenetic relationships and included subtype A (EMA7 (AF130305), BCBL-R (AF133038), BCBL-B (AF133039), US3 (AF151688), Ug3 (AF151690)); subtype B (G11 (AF130260), G41 (AF130261), G51 (AF130262), Ug52 (AF130290), Ug81 (AF130291)); subtype C (ASM72 (AF133041), BC2 (AF133042), US6 (AF151686), GK17 (AF130267), GK18 (AF130268)); subtype D (TKS10 (AF133043), ZKS3 (AF133044), Au1 (AF151687), J24 (AF278844), J26 (AF278846); subtype E (Tupi1 (AF220292), Tupi2 (AF220293)). The sequence alignment used the ClustalX Sequence Editor, version 1.81 [Thompson et al., 1997]. The aligned sequences were used in the Phylip 3.56

software package [Felsenstein, 1993] to construct Neighbor-Joining (NJ) trees using the HKY substitution model. The statistical reliance of the NJ tree was evaluated using 1,000 bootstrap samples. The trees were drawn with the TreeView 1.4 program [Page, 2001].

Statistical Analysis

The variations of seropositivity to HHV-8 with gender, age, quantitation of CD4⁺ T lymphocytes, and sexual habits were determined using a model of simple regression analysis, with an α value of 0.05. Calculations used the software BIOESTAT 4.0 [Ayres et al., 2005].

RESULTS

Serology

Antibodies to HHV-8 among the Indian groups were detected in 66/221 (29.9%) subjects. Six samples (25%) were from the Kararaô village, 18 (19.6%) from the Arara Laranjal, 24 (42.8%) of the Tiriyo, and 18 (36.7%) from the Zo'e (Table I). Information regarding gender of the subjects tested was obtained in 172 samples and included 48 positive individuals, distributed among the Kararaô (six females), the Arara Laranjal (6 males; 12 females), and the Tiriyo (7 males; 17 females). Gender information was not available for the Zo'e samples.

Prevalence percentages according to age were adjusted for accumulated values due to the low numbers involved in each tribe. Table II shows the summation of those with known age information. The prevalence rose gradually from children under 12 years of age to the highest level among those over 50 years.

Seroreactivity to HHV-8 among those HIV-1 infected in the urban area of Belem was detected among 74/477 (15.5%) subjects (Table III). There were 48 (17.6%) males and 26 (12.7%) females. Prevalence according to their age is described in Table IV. They were low values with a low range variation and no clear difference among them.

A simple logistic regression analysis was employed in order to correlate the seroreactivity to HHV-8 with gender and age among Amerindians when information was available (Table V). A significant association was detected in which females were infected in a higher prevalence than males ($P=0.0261$), but there was no difference according to their age.

TABLE I. Seroprevalence of Antibodies (ELISA) to HHV-8 Among Brazilian Amerindians According to Gender

Amerindian population (linguistic group)	Total		Male		Female	
	Tested	Positive (%)	Tested	Positive (%)	Tested	Positive (%)
Kararao (Je)	24	06 (25)	13	0	11	6
Arara Laranjal (Karib)	92	18 (19.6)	45	6	47	12
Tiriyo (Karib)	56	24 (42.8)	21	7	35	17
Zo'e (Tupi)	49	18 (36.7)	*		*	
Total	221	66 (29.9)	79	13(16.4)	93	35 (37.6)

*No gender data available.