

difference of capsid gene sequences, in which GI, GII, GIV, and GV are found in humans, while GIII is found in porcine species [Farkas et al., 2004]. Recently, Akihara et al. [2005] reported that SV strains are classified further into 16 genetic clusters/genotypes (8 in GI, 5 in GII, 1 each in GIII, GIV, and GV) based on the differences of partial capsid amino acid sequences. HAstVs can be divided into eight distinct serotypes or genotypes based on the antigenic difference or variation in the capsid gene sequences: serotype/genotype 1 to 8, in which a high concordance between results of serotyping and genotyping was observed [Sakamoto et al., 2000].

In Thailand, epidemiological studies of NV, SV, and HAstV are less frequent than those of RV. The study conducted in Chiang Mai in 2000 and 2001 [Hansman et al., 2004] reported that NV infection in children hospitalized with diarrhea was 7.6%, while SV infection was 3.8%. One specimen (0.95%) was an NV/SV mixed infection. Later, during 2002 and 2003, Guntapong et al. [2004] reported 11 NV and 9 SV single infections, and 3 were NV/SV mixed infections from a total of 80 stool specimens collected from children hospitalized with acute gastroenteritis in 5 different geographical areas of Thailand (Sa Kaeo, Chanthaburi, Songkhla, Nong Khai, and Tak). For HAstV, the frequency of detection rate ranged from 8.6% to 14% in hospitalized children [Herrmann et al., 1991; Echeverria et al., 1994]. In 2004, a report from Bangkok demonstrated that HAstV was the cause of a neonatal gastroenteritis outbreak, which occurred in the nursery of a maternity ward at Ramathibodi Hospital. HAstV was detected in 4 of 13 (30.7%) diarrheic neonates and 1 member of the nursery staff who had diarrhea [Sirinavin et al., 2006].

This study reports the prevalence and molecular epidemiology of norovirus, sapovirus, and astrovirus infections in sporadic gastroenteritis among hospitalized children in Chiang Mai, Thailand from May 2000 to March 2002.

MATERIALS AND METHODS

Specimen Collection

Two hundred ninety-six fecal specimens were collected from children hospitalized with diarrhea in four different hospitals and one private clinic in Chiang Mai province between May 2000 and March 2002. The ages of the subjects ranged from neonate up to 5 years old.

RNA Extraction and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Viral RNA was extracted from 10% fecal supernatant using the QIAamp viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). For RT, the viral RNA was reverse transcribed according to the manufacturer's instruction (Fermentas, Lithuania Glen Burnie, MD). The presence

of NV (GI and GII), SV, and HAstV was detected by RT-PCR using the protocol described previously [Yan et al., 2003]. A forward primer, G1-SKF (nt 5,342–5,361) 5'-CTGCC-CGAATTGTAAATGA-3', was used in combination with the reverse primer, G1-SKR (nt 5,653–5,671) 5'-CCAACCCARCCATRTACA-3', for the amplification of NVGI, which specifically generated a PCR amplicon of 330 bp. For NVGII identification, a forward primer, COG2F (nt 5,003–5,028) 5'-CARGARBC-NATGTT-YAGRTGGATGAG-3', was used in combination with the reverse primer, G2-SKR (nt 5,367–5,389) 5'-CCR-CCNGCATRHCCRTTRTACAT-3', which generated a PCR product size of 387 bp. For SV detection, a 434 bp fragment was generated using the forward primer, SLV5317 (nt 5,083–5,105) 5'-CTCGCCACCTA-CRAW-GCTTGGTT-3', and reverse primer, SLV5749 (nt 5,516–5,494) 5'-CGGRCYTCAAAIVSTACCBCCC-CA-3'. For amplification of HAstV, a forward primer, PreCAP1 (nt 4,235–4,255) 5'-GGACTGCAAAGCAG-CTTCGTG-3', was used in combination with the reverse primer, 82b (nt 4,934–4,953) 5'-GTGAGCCACCAGC-CATCCCT-3', which generated a PCR product size of 719 bp. All of the positive samples were analyzed further for their genotypes by nucleotide sequence and phylogenetic analyses.

Sequence and Phylogenetic Analyses

The PCR products were purified by the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) and sequenced by using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) on an automated DNA sequencer (ABI 3100; Perkin Elmer-Applied Biosystems, Inc.). The primers employed for amplification of the partial capsid genes were also used as sequencing primers. The nucleotide sequences obtained were translated into amino acid sequences using the GeneDoc program, and compared to those of NV (GI and GII), SV, and HAstV reference strains available in the GenBank using the BLAST program. The genotypes of NV (GI and GII) and SV were classified based on the recent capsid region classification scheme of Zheng et al. [2006] and Akihara et al. [2005], respectively. The serotypes/genotypes of HAstV were assigned in comparison with those of the reference strains by analysis of their amino acid sequences.

Nucleotide Sequence Accession Numbers

The partial nucleotide sequences of the capsid gene were deposited in GenBank under the accession number EU363852–EU363875 for NV strains, EU363876–EU363885 for SV strains, and EU363886–EU363892 for HAstV strains. The following capsid gene sequences of reference strains published in the GenBank were used in the phylogenetic analysis: NVGI: Boxer/01/US (AF538679), Chiba/00/JP (AB042808), DSV395 (U04469), Hesse (AF093797), Musgrove/89/UK (AJ277614), Norwalk/68 (M87661), Saitama T36GI/01/JP (AB112133), Southampton (L07418),

Winchester/94/UK (AJ277609); NVGII: Amsterdam/98-18/98/NET (AF195848), Bristol (X76716), CS-E1/02/US (AY502009), Erfurt/546/00/DE (AF427118), Fayetteville/98/US (AY113106), Hawaii (U07611), Hillingdon/90/UK (AJ277607), J23/99/US (AY130762), Leeds/90/UK (AJ277608), M7/99/US (AY130761), NongKhai-22/Thai (AY646866), NongKhai-51/Thai (AY646867), SaKao-14/Thai (AY646868), Seacroft/90/UK (AJ277620), Snow Mountain virus (AY134748), Tak-62/Thai (AY646877), Tiffin/99/USA (AY502010), Toronto (U02030), VA97207/97 (AY038599), Wortley/90/UK (AJ277618); SV: 4408/Maizuru/JP (AB180209), 8/DCC/Tokyo/JP/44 (AB236377), Arg39 (AY289803), Chanthaburi-74/Thai (AY646854), Chiba/000671T/99 (AJ412805), Cruise/US (AY289804), Hou7-1181/90 (AF435814), Houston/90 (U95644), Karachi/874/92 (AB181129), Karachi/876/93 (AB181132), Karachi/877/90 (AB181133), Karachi/878/90 (AB181228), Karachi/938/94 (AB181248), Karachi/1021/92 (AB181230), Karachi/1026/92 (AB181134), London/92 (U95645), Lyon/598/97/F (AJ271056), Manchester/93 (X86560), Mex340/90 (AF435812), Moscow/2196/02/RF (AY538722), Moscow/4536/02/RF (AY538716), NongKhai-24/Thai (AY646856), NongKhai-50/Thai (AY646853), PEC (Porcine Enteric Calicivirus) (AF182760), Sapporo/82/JP (U65427), Songkhla-6/Thai (AY646857), Stockholm/318/97/SE (AF194182), Tak-69/Thai (AY646864).

RESULTS

Prevalence and Distribution of Norovirus, Sapovirus, and Human Astrovirus Infections

A total of 296 fecal specimens were collected from children hospitalized with diarrhea, 40 (13.5%) of which were positive for NV, SV, and HAsV. Of these, NV was detected in 24 (8.1%) of the fecal specimens tested. Seven of these (2.4%) were identified as GI genogroup and 17 (5.7%) as GII genogroup. Among the NVs detected, NVGII was more predominant (70.8%) than NVGI (29.2%). SV was detected in 10 (3.4%) specimens and one of these was positive for both NVGI and SV. In addition, HAsV was found in 7 (2.4%) of the specimens tested (Table I). NVGI, NVGII, SV, and HAsV were detected in 27 of 187 (14.4%) specimens in the first period (May 2000–April 2001) and 14 of 109 (12.8%) in the following period (May 2001–March 2002) (Table I). The monthly distribution of NVGI, NVGII, SV, and

HAsV infections in children hospitalized with diarrhea is shown in Figure 1. In the year 2000, NVGII infection was detected at a high peak (~25%) in November. In 2001, infections of almost all NVGI, NVGII, SV, and HAsV tended to occur in the first 7 months of the year, except NVGII, which remained detectable in October. In January 2002, NVGI and GII were detected, while only NVGII was detected in February and HAsV in March. However, SV infection was not detected during this period (January–March 2002). The age of children at infection ranged from 4 months to 5 years old. Among those children, who were infected with NV, SV, or HAsV, 85% were 2 years of age and younger. When the children were grouped into 0–5, 6–11, 12–24, and >24 months of age, no significant difference in the rate of infection with NV, SV, or HAsV was observed among each age group.

Sequence and Phylogenetic Analyses of Noroviruses

All of the NV strains were characterized further for their genotypes by sequencing of the partial capsid genes. The genotypes were classified according to the classification scheme of [Zheng et al., 2006]. Six NVGI strains detected in this study were classified into four distinct GI genotypes as follows: 2 strains of GI/4, 2 strains of GI/6, and 1 strain each of GI/3, and GI/7. In addition, 1 NVGI strain, CMH308/01, could not be classified into any genotype based on the scheme described by Zheng, however, it belonged to GI/13, with a percentage deduced amino acid sequence identity of 100%, according to the classification scheme of [Okada et al., 2005] (Fig. 2).

All 17 NVGII strains were classified further into seven distinct GII genotypes, comprising GII/1, GII/3, GII/4, GII/6, GII/8, GII/10, and GII/15 (Fig. 2). NVGII/4 was found to be the most predominant genotype (9 of 17; 52.9%) of the NVGII strains detected in this study. The GII/3 and GII/10 genotypes were detected at an equally prevalent rate of 11.7% (2 of 17 strains). In addition, a relatively low detection frequency of GII/1, GII/6, GII/8, and GII/15 at 5.8% (1 of 17) was observed.

Sequence and Phylogenetic Analyses of Sapoviruses

A total of 10 SV strains were analyzed and classified further into two distinct genogroups, GI and GII,

TABLE I. The Prevalence of NVGI, NVGII, SV, and HAsV Detected in Children Hospitalized With Acute Gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand, From May 2000 to March 2002

Date of specimen collection	No. of specimens tested	No. of specimens positive for virus (%)				Total (%)
		NVGI	NVGII	SV	HAsV	
May 2000–Apr 2001	187	5 (2.7)	11 (5.9)	8 (4.3)	3 (1.6)	27 (14.4)
May 2001–Mar 2002	109	2 (1.8)	6 (5.5)	2 (1.8)	4 (3.7)	14 (12.8)
Total (%)	296	7 (2.4) ^a	17 (5.7)	10 (3.4) ^a	7 (2.4)	40 (13.5) ^a

^aOne specimen was positive for both NVGI and SV.

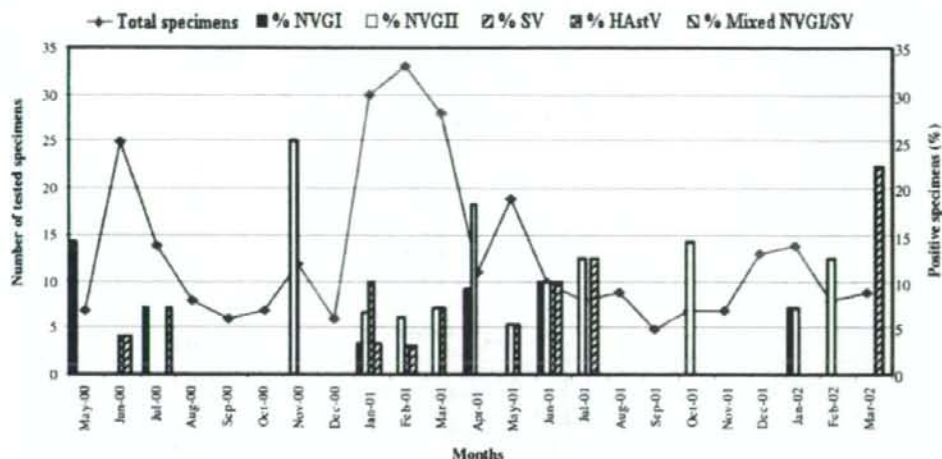


Fig. 1. Monthly distribution of NVGI, NVGII, SV, and HAstV infections among children hospitalized with diarrhea in Chiang Mai, Thailand, from May 2000 to March 2002 [number of tested specimens, \blacklozenge ; positive specimens (%), \square].

according to the recent SV capsid region classification scheme described by Akihara et al. [2005]. It was observed that SVGI was a more common genogroup (80%) than the SVGII (20%) detected in this study. Eight strains of SVGI were classified further into three genotypes, that is, four strains were GI/1, three were GI/4, and one was GI/5. Moreover, two strains of SVGII were also classified into GII/1 and GII/2 genotypes (Fig. 3).

Sequence Analysis of Human Astroviruses

Seven HAstV strains detected in the present study, two of each isolate were HAstV-1, HAstV-2, HAstV-5, and one isolate was HAstV-3. The detection rate of the HAstV in children with acute gastroenteritis was rather low.

DISCUSSION

The present study describes the prevalence of NV and SV infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai city during May 2000–March 2002. The prevalent rates are in good agreement with those reported by Hansman et al. [2004] which also conducted the study in Chiang Mai during July 2000–July 2001. However, the prevalence of NV and SV are somewhat lower when compared to the follow-up study conducted recently in Chiang Mai from March 2002 to December 2004 [Khamrin et al., 2007] as well as to the study conducted in five other regions of Thailand by Guntapong et al. [2004]. The discrepancy of the prevalent rates between our study and others might be due to the difference in the duration and/or geographical area where those studies have been conducted.

Like other studies [Schnagl et al., 2000; Buesa et al., 2002; Oh et al., 2003; Boga et al., 2004; Hansman

et al., 2004], the findings showed that NVGI strains are less common (29.2%) than NVGII (70.8%). It should be noted that in 2002 and 2003, NVGI disappeared completely from five other regions of Thailand [Guntapong et al., 2004]. In addition, NVGI was also undetectable in Chiang Mai area during 2002 and 2004 [Khamrin et al., 2007]. For NVGII, GI/4 has been reported as a major cause of global outbreaks and sporadic cases of gastroenteritis [Foley et al., 2001; White et al., 2002; Lau et al., 2004]. This study in Chiang Mai area found that GII/4 circulated as the most predominant genotype (37.5%), which is similar to those reported by Hansman et al. [2004]. However, a study conducted by Guntapong et al. [2004] in five other regions of Thailand during 2002 and 2003 reported a relatively high GII/4 at the incidence of 64.3%. Interestingly, in the following three consecutive years from 2002 to 2004 [Khamrin et al., 2007], GII/4 increased to 62.8% in Chiang Mai region, which similar to the finding of Guntapong et al. [2004]. For SV infection, SV genogroup I (GI) has been reported worldwide as the most predominant strain [Okada et al., 2002; Phan et al., 2004; Akihara et al., 2005; Phan et al., 2005, 2006]. SVGI/1 strains were previously reported as the most predominant genotype, followed by GII/1 strains and one isolate belonging to an intragenogroup recombinant strain in Chiang Mai during 2000 and 2001 [Hansman et al., 2004; Katayama et al., 2004]. In our study, SVGI was also detected at a very high incidence (80%), with GI/1 as the most predominant strain and followed by GI/4, GI/5, GII/1, and GII/2 strains. The study conducted in the other regions of Thailand by Guntapong et al. [2004] during 2002 and 2003 reported a higher detection rate of SV (15.0%). SVGI/1 was the most prevalent genotype, while the other two strains belonged to SVGV and a novel genotype in the SVGII

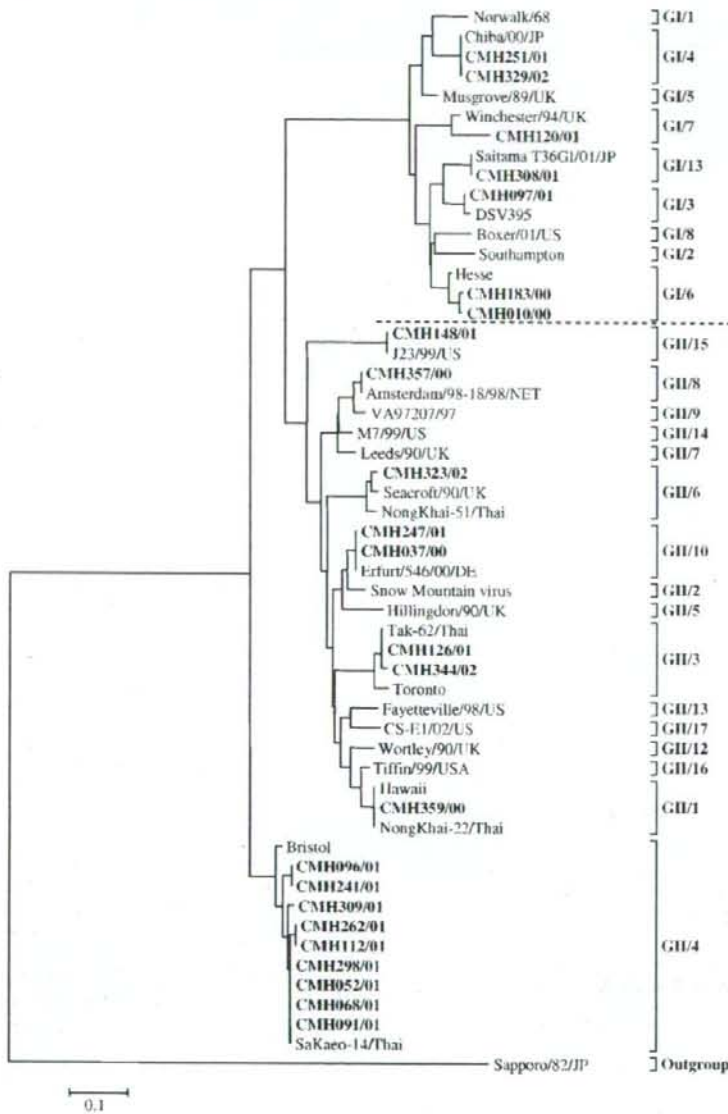


Fig. 2. Phylogenetic analysis of partial capsid deduced amino acid sequences of NVGI and GII strains detected between 2000 and 2002 in Chiang Mai, Thailand. The tree was constructed by multiple alignment of 7 NVGI and 17 NVGII positive sequences (indicated in boldface), 29 reference sequences, and 1 outgroup sequence. In the phylogenetic tree, NVGI strains were classified into eight distinct genotypes from 1

to 8 and NVGII strains were classified into sixteen distinct genotypes from 1 to 10 and 12 to 17 (excepting genotype 11 of porcine NVGII). Sapporo/82/JP was used as an outgroup strain for phylogenetic analysis. Bootstrap values are 1,000 replicates based on neighbor-joining and distance methods. Genotypes or genetic clusters are divided by brackets.

cluster, respectively. Another study in Chiang Mai region from 2002 to 2004 by Khamrin et al. [2007] reported a rather low detection rate of SV (1.2%) in which two strains belonged to SVGI genogroup (SVGI/1, SVGI/2) and other strain belonged to SVGIV genogroup. The data from our study and others [Guntapong et al.,

2004; Khamrin et al., 2007] reveals that the detection rate, genogroup and genotype of NV and SV strains circulating in several regions of Thailand vary from time to time. However, the predominant NVGII/4 and SVGI persist in these regions over a number of years.

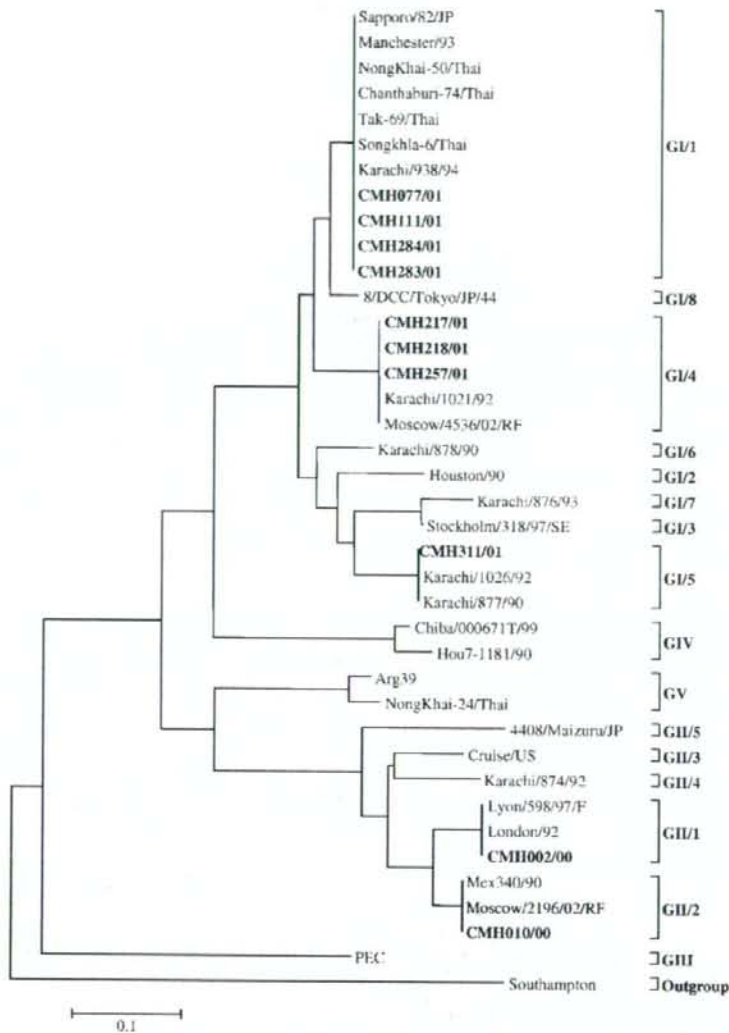


Fig. 3. Phylogenetic analysis of partial capsid deduced amino acid sequences of SV strains detected between 2000 and 2002 in Chiang Mai, Thailand. The tree was constructed by multiple alignment of 10 SV positive sequences (indicated in boldface), 27 reference sequences, and 1 outgroup sequence. In the phylogenetic tree, SV strains were classified into genogroup I, II, IV, and V. SVGI was classified further

into eight genotypes and SVGII into five. SVGIII (Porcine enteric calicivirus, PEC) was also analyzed. Southampton was used as an outgroup strain for phylogenetic analysis. Bootstrap values are 1,000 replicates based on neighbor-joining and distance methods. Tree is unrooted. Genotypes or genetic clusters are divided by brackets.

Epidemiological data of HAsV as a causative agent of gastroenteritis in Thailand is rather limited. In 1991, Herrmann et al. first detected HAsV serotype 2 at 8.6% in children hospitalized with diarrhea in Bangkok. Later, Echeverria et al. [1994] reported the detection of HAsV at 14% in children hospitalized with diarrhea in Ratchaburi province in the central part of Thailand. In 2004, Sirinavin et al. [2006] reported an outbreak of HAsV with a detection rate of 30.7% in neonates at a

nursery in the maternity ward of Ramathibodi Hospital, Bangkok. However, the detection of HAsV infection in the previous studies based on serological assays [Herrmann et al., 1991; Echeverria et al., 1994; Sirinavin et al., 2006]. Our study is the first report that describes the distribution of HAsV genotypes circulating in Chiang Mai city. The data suggest that HAsV infection is less common in children with acute gastroenteritis compared to rotavirus and norovirus infection

in this area. These percentages are similar to those reported from other regions of the world such as Australia [Mustafa et al., 2000], Germany [Oh and Schreier, 2001], and Spain [Guix et al., 2002].

In conclusion, this study describes the genetic diversity of NV, SV, and HAsV genotypes cocirculating in children hospitalized with diarrhea in Chiang Mai, Thailand.

REFERENCES

- Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Yagyu F, Okitsu S, Müller WE, Ushijima H. 2005. Identification of sapovirus infection among Japanese infants in a day care center. *J Med Virol* 77:595–601.
- Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. 2003. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: A novel function for the VP2 protein. *J Virol* 77:11603–11615.
- Boga JA, Melón S, Nicieza I, De Diego I, Villar M, Parra F, De Oña M. 2004. Etiology of sporadic cases of pediatric acute gastroenteritis in Asturias, Spain, and genotyping and characterization of norovirus strains involved. *J Clin Microbiol* 42:2668–2674.
- Buesa J, Collado B, López-Andujar P, Abu-Mallouh R, Rodriguez Diaz J, Garcia Diaz A, Prat J, Guix S, Llovet T, Prats G, Bosch A. 2002. Molecular epidemiology of calciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *J Clin Microbiol* 40:2854–2859.
- Echeverria P, Hoge CW, Bodhidatta L, Tungtarn C, Herrmann J, Imlarp S, Tamura K. 1994. Etiology of diarrhea in a rural community in western Thailand: Importance of enteric viruses and enterovirulent *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 169:916–919.
- Farkas T, Zhong WM, Jing Y, Huang PW, Espinosa SM, Martinez N, Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK, Jiang X. 2004. Genetic diversity among sapoviruses. *Arch Virol* 149:1309–1323.
- Foley B, O'Mahony J, Hill C, Morgan JG. 2001. Molecular detection and sequencing of "Norwalk-like viruses" in outbreaks and sporadic cases of gastroenteritis in Ireland. *J Med Virol* 65:388–394.
- Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolomé R, Latorre C, Rabella N, Simó M, Bosch A, Pintó RM. 2002. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol* 40:133–139.
- Guntapong R, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Kageyama T, Pongsuwanna Y, Katayama K. 2004. Norovirus and sapovirus infection in Thailand. *Jpn J Infect Dis* 57:276–278.
- Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N, Ushijima H. 2004. Genetic diversity of norovirus and sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Clin Microbiol* 42:1305–1307.
- Herrmann JE, Taylor DN, Echeverria P, Blacklow NR. 1991. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N Engl J Med* 324:1757–1760.
- Jiraphongs C, Laosiritaworn Y, Ngwabunpat A. 2005. Diarrhea mortality in children 0–5 years old in Thailand, 2001–2004. *Bull Dep Med Services* 30:43–51.
- Katayama K, Miyoshi T, Uchino K, Oka T, Tanaka T, Takeda N, Hansman GS. 2004. Novel recombinant sapovirus. *Emerg Infect Dis* 10:1874–1876.
- Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Tonusin S, Malasao R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. 2007. Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol* 79:1921–1926.
- Lau CS, Wong DA, Tong LK, Lo JY, Ma AM, Cheng PK, Lim WW. 2004. High rate and changing molecular epidemiology pattern of norovirus infections in sporadic cases and outbreaks of gastroenteritis in Hong Kong. *J Med Virol* 73:113–117.
- Mustafa H, Palombo E, Bishop R. 2000. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J Clin Microbiol* 38:1058–1062.
- Oh D, Schreier E. 2001. Molecular characterization of human astroviruses in Germany. *Arch Virol* 146:443–455.
- Oh DY, Gaedicke G, Schreier E. 2003. Viral agents of acute gastroenteritis in German children: Prevalence and molecular diversity. *J Med Virol* 71:82–93.
- Okada M, Shinozaki K, Ogawa T, Kaiho I. 2002. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. *Arch Virol* 147:1445–1451.
- Okada M, Ogawa T, Kaiho I, Shinozaki K. 2005. Genetic analysis of noroviruses in Chiba prefecture, Japan, between 1999 and 2004. *J Clin Microbiol* 43:4391–4401.
- Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Maneekarn N, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H. 2004. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. *J Med Virol* 73:256–261.
- Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H. 2005. Genetic diversity of sapovirus in fecal specimens from infants and children with acute gastroenteritis in Pakistan. *Arch Virol* 150:371–377.
- Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Sugita K, Okitsu S, Müller WE, Ushijima H. 2006. Outbreak of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Osaka City, Japan during 2004–2005. *J Med Virol* 78:839–846.
- Sakamoto T, Negishi H, Wang QH, Akihara S, Kim B, Nishimura S, Kaneshi K, Nakaya S, Ueda Y, Sugita K, Motohiro T, Nishimura T, Ushijima H. 2000. Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1 to 8). *J Med Virol* 61:326–331.
- Schnagl RD, Barton N, Patrikis M, Tizzard J, Erlich J, Morey F. 2000. Prevalence and genomic variation of Norwalk-like viruses in central Australia in 1995–1997. *Acta Virol* 44:265–271.
- Schnagl RD, Belfrage K, Farrington R, Hutchinson K, Lewis V, Erlich J, Morey F. 2002. Incidence of human astrovirus in central Australia (1995 to 1998) and comparison of deduced serotypes detected from 1981 to 1998. *J Clin Microbiol* 40:4114–4120.
- Sirinavin S, Techasaensiri C, Okascharoen C, Nuntnarumit P, Tonsuttakul S, Pongsuwan Y. 2006. Neonatal astrovirus gastroenteritis during an inborn nursery outbreak. *J Hosp Infect* 64:196–197.
- White PA, Hansman GS, Li A, Dable J, Isaacs M, Ferson M, McIver CJ, Rawlinson WD. 2002. Norwalk-like virus 95/96-US strain is a major cause of gastroenteritis outbreaks in Australia. *J Med Virol* 68:113–118.
- Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. 2003. Detection of norovirus (GI, GII), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J Virol Methods* 114:37–44.
- Zheng D, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346:312–323.


 食の安全

ノロウイルスによる 食中毒の原因食材



西尾 治

国立感染症研究所 客員研究員
愛知医科大学 客員教授

にしお おさむ

■ 略 歴

- 1970年 鳥取大学農学研究科修士課程獣医学専攻 修了
- 1970年 愛知県衛生研究所ウイルス部
- 1994年 国立公衆衛生院衛生微生物学部 ウイルス室長
- 2002年 国立感染症研究所感染症情報センター 室長
- 2003年 東京大学医学部 非常勤講師
- 2006年 国立感染症研究所 客員研究員
- 2007年 愛知医科大学 客員教授

厚生労働省薬事・食品衛生審議会臨時委員、食品安全委員会専門委員微生物・ウイルス専門調査会委員、文部科学省学校給食における衛生管理の改善・充実に関する調査研究協力者会議委員を務めている。

●はじめに

近年、厚生労働省に届けられた病因物質別のノロウイルスの患者数は多くを占め、今や食中毒発生防止の緊急課題となっている。

ノロウイルスによる食中毒は二枚貝による事件の報告数は減少しているものの、生食用カキのノロウイルス汚染は依然として見られている。また、輸入生鮮魚介類にもノロウイルスの汚染が存在し、それらを介しての事件も起きている。一方、食品取扱者による食中毒事件は多発しており、原因食材は寿司、刺身、パン、和え物などである。

●ノロウイルスの概要

ノロウイルスは1968年にアメリカのオハイオ州のノーウォークで発生した急性胃腸炎の集団発生由来患者糞便から電子顕微鏡で発見され¹⁾、電子顕微鏡での形態学的特徴から「小型球形ウイルス：SRV」と呼称されていた。1990年代に入ると、多くの株で遺伝子配列が決定され、ノロウイルス遺伝子検出のRT-PCR法が開発された。その後の研究により、生カキの喫食による急性胃腸炎の多くの食中毒事件は小型球形ウイルス（ノロウイルス）に起因していることが判明した²⁾。

この状況から、厚生省（現厚生労働省）は、1997年5月に食品衛生法施行規則を改正し、食中毒の病因物質に「小型球形ウイルス」および「その他のウイルス」を加えた。さらに、1998年12月には「生食用カキの養殖海域」を記載するように食品衛生法が改正された。

2002年8月の国際ウイルス命名委員会で、「ノーウォーク様ウイルス」、「小型球形ウイルス」は「カリシウイルス科」、「ノロウイルス属」に命名された。これを受けて、厚生労働省は2003年8月に食品衛生法での病因物質を「小型球形ウイルス」から「ノロウイルス」に改めた。

ノロウイルスはウイルスの中でも小さく直径30～40nm前後で球形を呈し、表面はカップ状の蛋白構造物で覆われ、その内部に長さ約7.7Kbのプラス一本鎖RNA分子ゲノムを持つが、エンベロープは持たない。

ノロウイルスは遺伝子群（genogroup：G）IとIIに大きく分けられ、GIは14、GIIは17あるいはそれ以上が知られている。ノロウイルスの増殖系（組織培養、実験動物）はいまだ見いだされていないことから血清型、免疫、感染性、抵抗性などの正確な情報が得られていない。

物理・化学的抵抗性はノロウイルスの培養系が

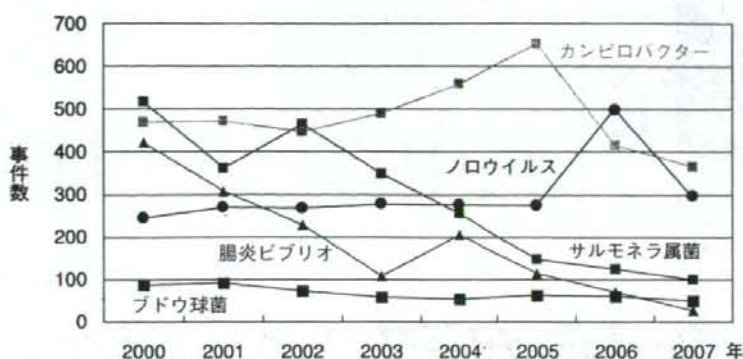


図1 病因物質別事件数の年次推移 (厚生労働省食中毒統計より)

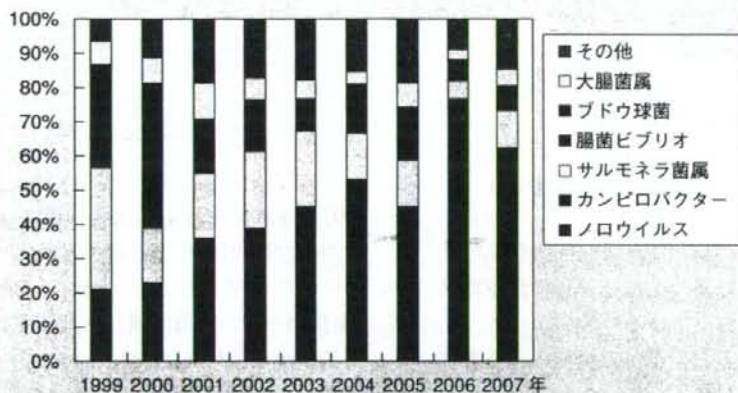


図2 年別の食中毒病因物質別患者数

ないので正確なことは不明であるが、ノロウイルスと類似の形態であるネコカリシウイルスの成績から推測すると、ノロウイルスは乾燥・液中で長期間安定であり、4℃では2か月間、20℃では1か月間程度生存可能で、加熱にも強く、60℃、30分間の処理に安定で、不活化には70℃、5分間、85℃、1分間の加熱が必要と考えられている。

●臨床症状

ノロウイルスは経口感染で、潜伏期間は通常12～72時間(主に24～48時間)、主症状は嘔気、嘔吐、下痢、腹痛である。感染部位は小腸の粘膜上皮細胞で、腸管の炎症に伴う下痢症状を呈し、

激しい水様性の便が数回続くこともある。胃内容物を腸に送る運動神経の機能低下・麻痺に伴う嘔気、嘔吐の症状が見られる。嘔吐は突然、急激に起こり、その際に腸がひっくり返るような嘔吐が起きるため、腸内容物が逆流し、ウイルスが吐物中に入り込む。患者からの多くの糞便1g中にはノロウイルスが1億個以上、吐物では1g中に百万個以上が存在する。糞便・吐物中にノロウイルスが大量に排出され、ウイルスの排出は治癒後2週間程度続く。このことが食中毒事件の多発の要因となっている。症状は一般的に1～3日続いた後治癒し、後遺症は残さない、また不顕性感染もある。

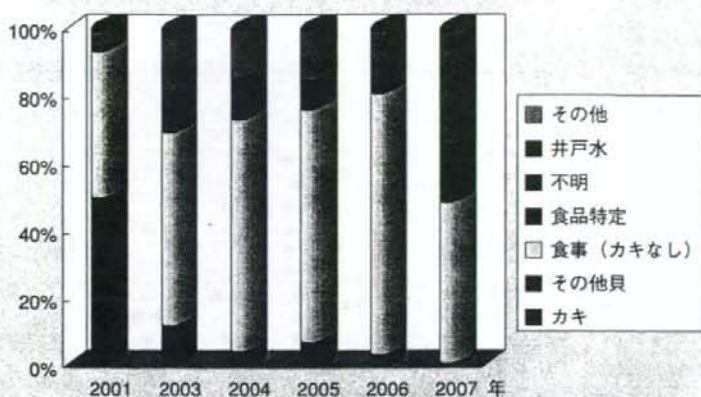


図3 2001～2006年のノロウイルスによる食中毒事件の食材別の事件数の推移 (%)
(厚生労働省食中毒統計)

●食中毒事件の発生状況

2001～2005年に厚生労働省に届けられたノロウイルスによる食中毒事件数はほぼ250～290件程度で、病因別では2001年が第4位、2002～2003年が第3位、2004～2005年が第2位、2006年は事件数が499件で1位となり、翌年には344件で2位となった(図1)。患者数は、2000年は黄色ブドウ球菌による大規模な事件が発生し第2位であったが、その後は第1位で、2004年まで患者数は増加し(約8,000人～12,000人)、2005年は減少したが、2006年は27,616人で過去最大となり、2007年は18,750人であった。食中毒患者数に占めるノロウイルスの割合は2000年が19%、2003年は30%を超え、2004年は45%と半数に迫り、2005年は32%とやや減少し、2006年はノロウイルスによる大流行に伴い71%と過去最大となり、2007年も56%を占めていた(図2)。近年では、ノロウイルスによる食中毒の患者数が全体の40%程度を占め、ノロウイルスによる食中毒の防止対策が行われれば、食中毒患者の多くを減少させることができる。

ノロウイルスによる食中毒の原因食材は1999～2001年頃まではカキを含む二枚貝事件が50%以上を占めていたが、2003年には25%、2004年および2005年は15%程度に減少した。2006年はノロウイルスの大流行が例年よりも早く、11月から見られ、西日本のカキ生産業者が生食用カキの販売を自粛

したことから事件数は4%、2007年は2%と減少した(図3)。

●食品取扱者・調理者による食品汚染

食中毒は突然起こるものではなく、ノロウイルスに感染した食品取扱者・調理者が食品を提供する前に食品、調理器具、食器などを汚染することにより起きる。近年はこの様式の食中毒が多発し、施設、学校などで患者数が100人以上の規模でしばしば発生している。汚染された食品には寿司、刺身、サラダ、和え物、饅頭、パン、サンドイッチ、うどん(後から入れたネギ、かつお節)、おかゆ(トッピングとして入れたもの)などがある。

2006年に厚生労働省に届けられた食中毒事件のうち、患者数が500以上の食中毒事件は6件で、そのすべてがノロウイルスであり、ほとんどが弁当で起きている。その原因は、短時間で大量の食品を調理するために、調理過程において漬物を切る、和え物、果物、加熱調理後の食品などを素手で取り扱い、提供したことが原因と推測されている。

調理従事者が焼き上げたパンにきな粉と砂糖をまぶす工程があり、ノロウイルスに感染していた従事者がきな粉と砂糖の混ぜ合わせを素手で行ったことにより511名が食中毒となった。この事件は手洗いが不十分などには膨大なウイルスが手に付着していることを示している³⁾。

また、ノロウイルスに感染していた給食調理員の手指を介して、調理器具、給食が汚染されたと

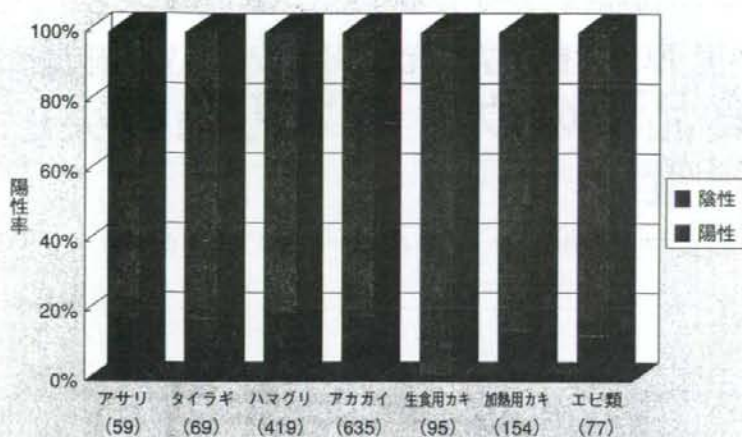


図4 輸入生鮮魚介類におけるノロウイルス汚染状況 () : 検体数

我々は2001年4月～2007年2月の間に、生鮮魚介類を扱う市場に搬入されたものを調べた。

輸出国では中国、韓国、北朝鮮、インドネシアなどの13か国で、魚介類はアカガイ、ハマグリ、カキ、タイラギ、エビなどの1,508件を用いた。

生鮮魚介類16%からノロウイルスが検出された。種類別の汚染率はハマグリ、アカガイおよび加熱用カキが約20%で、エビ類はそれよりも低く、生食用カキは4%であった(図4)。生食用カキは河川から離れ、河川水の汚染を受けることが少ない沖合の海域で養殖されており、汚染率は低い。

これらは年間を通してノロウイルス汚染が認められ、常に食中毒の発生防止に努めなくてはならない。

なお、輸入二枚貝による食中毒事件も起きている。また、輸入生鮮魚介類を介して、ノロウイルスの多様な遺伝子型がわが国に侵入してきており、日本に存在しない遺伝子型も認められている⁵⁾。

●予防

ノロウイルスに感染している人が排便時、嘔吐物の処理の際に、手に糞便・嘔吐物を付着させ、その汚染された手で、非加熱食品、加熱後の食品(パン、和え物など)、調理器具、食器などに素手で触れることにより食中毒を起こす。この防止には徹底した衛生的な手洗いとプラスチック手袋を着用して、加熱後の食品、非加熱食品、食器などを汚染させないことである。

二枚貝などの海産物の安全性確保には、水環境をノロウイルスで汚染させないことである。このためには浄化施設のノロウイルスの除去効率を高めることが必要であり、総合的な環境汚染の防止が必要である。

鶏肉、牛肉などの食品において、キャンピロバクター、O-157などによる食中毒事件も多発しており、ゼロリスクの食品はないのが現状である。生食用カキの購入に当たり、自主検査でノロウイルス陰性あるいは滅菌海水で20時間以上浄化したものを選べば、リスクはかなり低減すると推測される。それでも心配なときには加熱(85℃、1分間以上)を行えば、ノロウイルスによる食中毒を心配をすることなく、カキを食べることができる。

文献

- 1) Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, et al : Visualization by immuno electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 10 : 1075-1081, 1972
- 2) Inouye S, Yamashita K, Yamadera S, et al : Surveillance of viral gastroenteritis in Japan ; Pediatric cases and outbreak incidents. *J Infect Dis* 181 (Suppl 2) : S270-274, 2000
- 3) 西尾 治, 古田太郎 : 現代社会の脅威! ノロウイルス. 幸書房, 2008
- 4) 丸山 務 (編) : 改訂ノロウイルス現場対策. 幸書房, 2008
- 5) 西尾 治, 中川 (岡本) 玲子 : ノロウイルス感染症と海産物の安全性. *臨床とウイルス* 36 : 305-314, 2008

平成19年度 厚生労働科学研究(食品の安心・安全確保推進研究) 輸入食品中のウイルス汚染の実態と その対策

Virus Contamination in Imported Raw Foods and Prevention from Infection

国立感染症研究所 感染症情報センター

西尾 治, 秋山美穂

Department of Infectious Disease
Surveillance Center,
National Institute of Infectious Diseases

Osamu NISHIO, Miho AKIYAMA

I はじめに

食品を介するウイルスは、二枚貝ではノロウイルスおよびA型肝炎ウイルスが重要なものとして挙げられ、近年は動物の肉・内臓(肝臓)を介するE型肝炎ウイルスも問題視されている。3つのウイルスの特徴は、いずれも小型の球形で、外殻のタンパク構造物の内部に+1本鎖RNA(ノロウイルスは7.6kb, A型肝炎ウイルスは7.5kb, E型肝炎ウイルス7.2kb)ゲノムを有する。しかしエンベロープはもたない。エンベロープのないウイルスの特徴は、アルコールで容易に破壊されず、加熱にも強く、殺滅が難しい。自然界では長期間感染性を維持することができるので食中毒を起こす。

ノロウイルスおよびE型肝炎ウイルスはいまだ培養系が見出されていない。A型肝炎ウイルスは培養系があるものの、分離には数週間を要し、細胞変性効果が見られないことから、臨床材料のウイルス診断には実用的ではない。

前述のウイルス検出には遺伝子増幅法(RT-PCR、

リアルタイムPCR法)あるいは酵素抗体法が用いられるが、検出されたのはウイルス遺伝子であり、必ずしもウイルスの感染性を示しているとは限らないので、結果の判断には注意を要する。

二枚貝のノロウイルスおよびA型肝炎ウイルス汚染は人から排泄されたウイルスが水系環境を汚染することにより発生している。

E型肝炎の外国感染例では環境水を介する事例が多く、国内では感染したシカ、イノシシ、ブタ等の肉、肝臓等を生あるいは加熱不足で喫食することにより健康被害が起きている。

近年わが国には、大量の生鮮魚介類および動物肉が輸入されており、2006年の厚生労働省の輸入食品監視統計によると、生鮮魚介類はおもにアジアからで、貝類は71,298トンのうち二枚貝類が66,917トン、エビ類は126,889トン輸入された。わが国で消費されるアカガイ、ハマグリは90%程度、アサリでは半分程度が輸入品であるとされている。生鮮肉類の総量は1,775,141トンで、牛肉513,086トン、豚肉は837,565トン、馬肉8,669ト

ンであった。

それら食品のウイルス学的な安全性は、輸出国および輸入国であるわが国でもまったくと言ってよいほど確保されていない。

そこで、われわれは輸入食品のウイルス汚染状況について、2001年4月から2006年2月の間に厚生科学、厚生労働科学研究で行った研究成果を中心に述べることにした。なおE型肝炎ウイルスは2006年6月から2007年2月の成績である。

II ノロウイルス

ノロウイルスは1968年にアメリカ、オハイオ州のノーウォークで発生した急性胃腸炎の集団発生病由来患者の糞便から電子顕微鏡で発見され、電子顕微鏡での形態学的特徴から「小型球形ウイルス」と呼称されていた。ノロウイルスはウイルスのなかでも小さく直径30～40nm前後で球形を呈し、表面はカップ状のタンパク構造物で覆われている。

ノロウイルスは遺伝子群(G) IとIIに大きく分けられ¹⁾、さらに多数の遺伝子型に分かれ、GIは14、GIIは18あるいはそれ以上の型が存在している。

1990年代に入ると、生カキの喫食による食中毒事件の多くが小型球形ウイルス(ノロウイルス)に起因していた²⁾。この状況から、厚生省(現厚生労働省)は、1997年5月に食品衛生法施行規則を改正し、食中毒の病因物質に「小型球形ウイルス」および「その他のウイルス」を加えた。1998年12月には、「生食用カキの採取海域」を記載するように食品衛生法が改正された。2002年に国際ウイル

ス命名委員会で「ノロウイルス」に統一され、厚生労働省は2003年8月に病因物質を「小型球形ウイルス」から「ノロウイルス」に改めた。

ノロウイルスは経口感染で、感染力が非常に強く、ウイルス粒子10～100個で感染・発病し、潜伏期間は通常12～72時間(おもに24～48時間)である。感染部位は小腸の上皮細胞で、主症状は嘔気、嘔吐、下痢、腹痛である。嘔吐は突然、急激に起こり、その際に腸内容物が逆流し、ウイルスが吐物中に入り込む。多くの急性期の患者糞便1g中には1億個以上のノロウイルスが存在し、糞便からのウイルス排泄は10日間程度続く。吐物では1g中に100万個以上のウイルスが存在し³⁾、環境を汚染する。症状は一般的に1～3日続いた後治癒する。

1 わが国におけるノロウイルスによる食中毒の発生状況

厚生労働省に届けられた食中毒の病因物質別事件数の年次推移は、2000年はノロウイルスが、サルモネラ、カンピロバクター、腸炎ビブリオに続いて第4位で、2002年および2003年は第3位、2004、2005年は第2位、2006年は事件数が例年の約2倍以上となり、病因物質別で第1位となった(図1)。患者数では、2000年はブドウ球菌による大事件が起こり、ブドウ球菌に次いで第2位であったが、その後は第1位で、2006年は事件数、患者数ともに過去最大となった(図2)。

事件数の割合の推移では、2001年は事件数の44%がカキを介する事件で、カキ以外の貝が9%

食品衛生検査指針【微生物編】

(厚生労働省監修)

・体裁 B5判 736 ページ ・定価 22,000 円 (本体価格+税)

社団法人 日本食品衛生協会

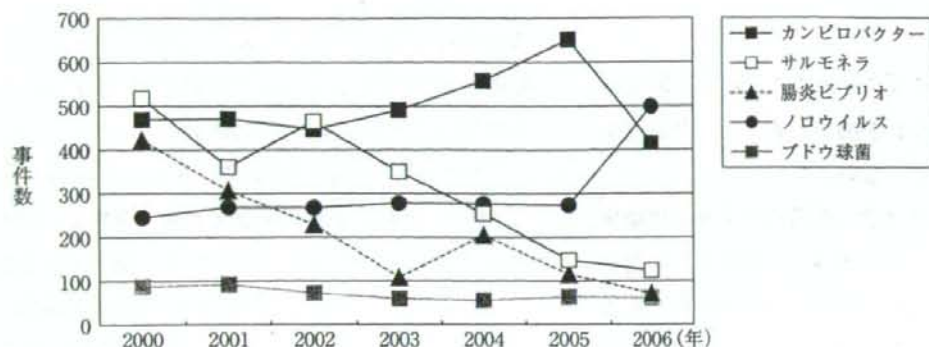


図1 病因物質別事件数の年次推移(厚生労働省食中毒統計より)

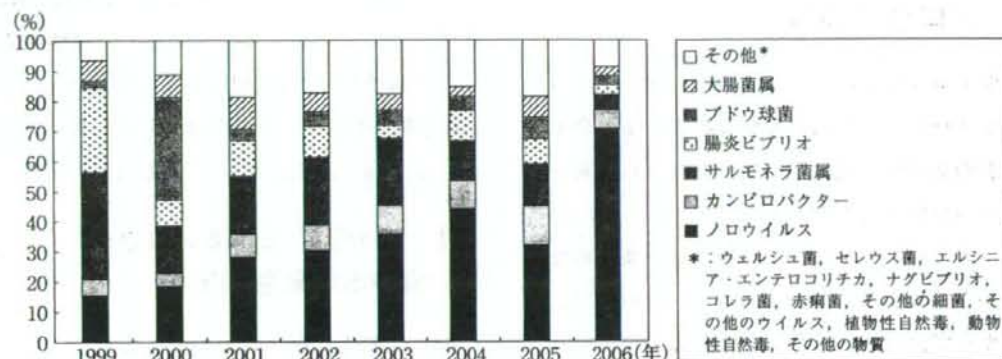


図2 年別の食中毒病因物質別患者数(厚生労働省食中毒統計より)

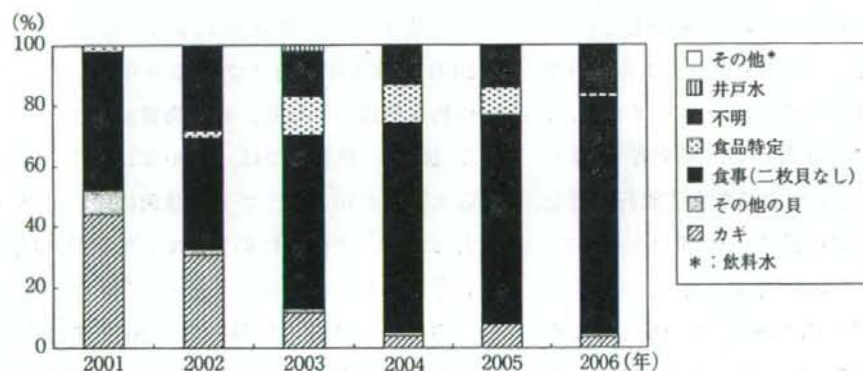


図3 ノロウイルスによる食中毒事件の食材別の事件数の推移(2001～2006年)

で、二枚貝が全体の53%を占めていた。カキを介する事件は2003年が11%と減少し、その後はさらに低率となり、2006年は晩秋からノロウイルスによる大流行が発生したことから生食用カキの販売を多くの生産者が控えたこともあって4%と激

減した。一方、「食事(二枚貝なし)」と「不明」が著しく増加した(図3)。

また、輸入二枚貝によるノロウイルス食中毒事件はウチムラサキガイ(通称大アサリ)によって発生している。

2 輸入生鮮魚介類におけるノロウイルス汚染状況

2001年4月から2007年2月の間に、国内2カ所の生鮮魚介類を扱う市場に搬入されたものうち、おもにアジアからの生鮮魚介類を買い上げた。

輸出国では中国、韓国、北朝鮮、インドネシア、フィリピン等の13カ国で、魚介類はアカガイ、ハマグリ、カキ、タイラギ、エビ等の1,327件を用いた。

魚介類では1ロットにつき3検体を調べ、貝類では個体ごとに中腸腺を採取し、中腸腺が1個体あたりに1gに満たないときには、複数個体の中腸腺を集め1gとし、1ロットにつき3検体を調べた。エビの場合は背ワタを集めて1gを1検体とした。ウイルスの検出はRT-PCRおよびリアルタイムPCR法で行った⁴⁾。

3 輸入生鮮魚介類別ノロウイルス汚染状況

生鮮魚介類1,327件中213件(16%)からノロウイルスが検出された。種類別の陽性率はシジミが40%、タイラギ、ハマグリ、アカガイおよび加熱用カキが16~19%で、エビ類は17%、生食用カキは2%であった(図4)。

二枚貝のノロウイルス汚染様式はノロウイルスに感染した人の糞便および嘔吐物から大量に排出され、ウイルスが便器を通り、浄化施設に行き、大部分は除去されるものの、一部はすり抜け、河川から海域に達する。二枚貝はプランクトンを食餌としており、活動が旺盛なときのカキは1日にプランクトン10億個以上を食するため、海水を1時間に10L以上を吸引するので、中腸腺にノロウイルスが濃縮・蓄積する。シジミの陽性率が高いのは汽水域に生息しており、河川水の影響を最も受け、次いで、アサリ、ハマグリ、アカガイ、加

熱用カキ等は沿岸部で生息し、河川水が海水で希釈されるので汚染度が低い。生食用カキは河川から離れ、河川水の汚染を受けることが少ない海域で養殖されているので、汚染率は最も低い。

4 輸入生鮮魚介類における月別ノロウイルス汚染状況

月別のノロウイルス汚染状況は図5に示したように、1~3月は汚染率が高いものの、年間を通してノロウイルス汚染が認められた。ヒトでは常にノロウイルス感染症が起きており、常時これら食品が汚染されている可能性を示している。二枚貝を介する食中毒事件は冬期のみならず、年間を通して起こりうる。また、これらの食品は冷凍で輸入されることもあり、冷凍保存されているものは採取時期が不明である。年間を通して輸入生鮮魚介類の食中毒防止には努めなくてはならない。

5 輸入生鮮魚介類における国別ノロウイルス汚染状況

輸入生鮮魚介類における国別の汚染状況は図6に示したように、北朝鮮産がやや高い陽性率であったが、中国、インドネシア、フィリピンはともにほぼ同様で、韓国はやや低い汚染状況であった。これらの国では環境中のノロウイルス汚染はほぼ同程度と推察される。生鮮魚介類でノロウイルスに安全な国はなく、常に十分に加熱することが健康被害防止となる。

6 輸入生鮮魚介類から検出されたノロウイルス遺伝子型

輸入生鮮魚介類から検出されたノロウイルスの遺伝子型は116件決定できた。そのうちGIが22件で2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 15型で、GIIでは1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 16型で、多くの遺伝子型が生鮮魚介類を介して侵入してきて

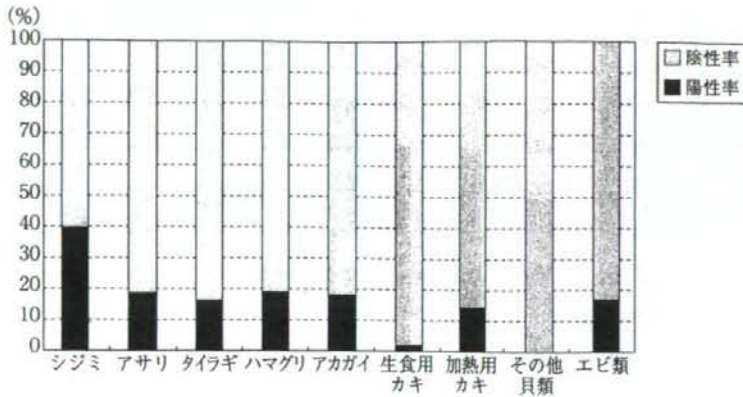


図4 輸入生鮮魚介類のノロウイルス汚染率

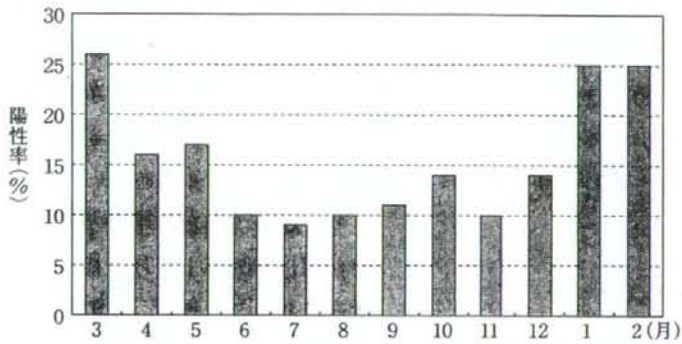


図5 輸入生鮮魚介類の月別ノロウイルス汚染状況(2001～2006年)

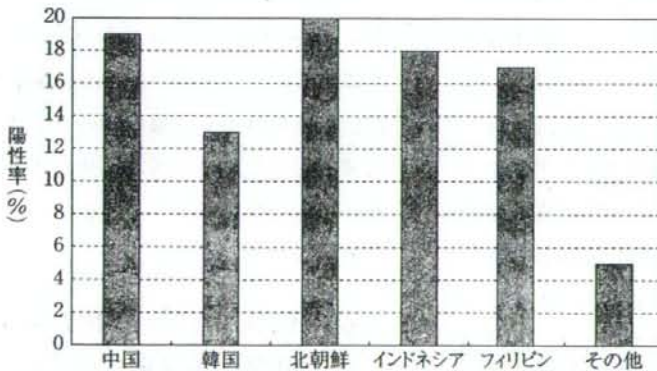


図6 輸入生鮮魚介類の国別ノロウイルス汚染状況(2001～2006年)

いる。このうち近年世界的に流行しているGII/4型が36株で最も多く、次いで日本でもしばしば検出されるGII/3型が15株と多く、アジアでも主流である遺伝子型は日本と同様であることがうかが

われる。日本では多く検出されていないGII/7型が14株検出された。さらに既存の遺伝子型に近縁なものが確認できない3遺伝子型が見出された。すなわちGII/18型に近いがそれとは異なる5株

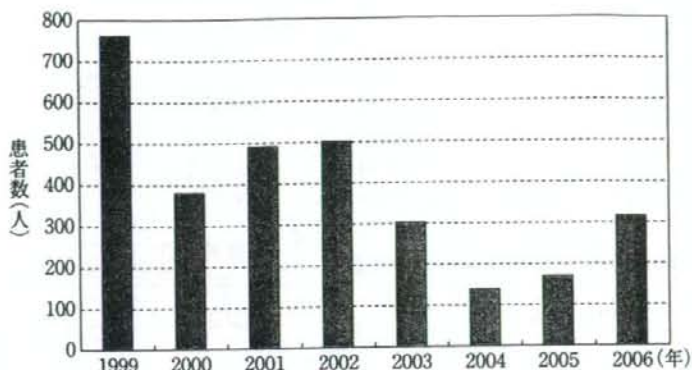


図7 年次別のA型肝炎患者発生数

(AY356543), さらに異なる1株(Genbank accession No. AY641760)の9株, GIに属する(AY356548)各1株が検出された。これらの株はわが国の下痢症患者からは検出されていないようであり, 日本に存在しない遺伝子型が食品を介して侵入していることも示唆された。

Ⅲ A型肝炎ウイルス

A型肝炎ウイルスは直径27nmの小型ピコルナウイルス科のヘパトウイルス属に分類され, 血清型は1種類で, 遺伝子型はI型からVII型が存在する。

A型肝炎ウイルスは経口感染で, 潜伏期間は2~6週間, 平均して約1カ月で肝炎を起こす。A型肝炎ウイルスは腸管組織を経て肝細胞に達する。肝臓で増殖したウイルスは胆汁とともに胆管系を経て, 腸管内に達し, 糞便とともに体外に排出され, 環境を汚染する。糞便からのウイルス排出は潜伏期から発症後1カ月間程度認められる。

1 わが国のA型肝炎患者発生状況

A型肝炎ウイルスの血清疫学の成績から, わが国には常在していないと考えられている。しかしながら, 2000年から2006年のA型肝炎患者は毎年100~500名程度発生している(図7)。A型肝炎患者のうち, 40%程度の患者は海外で感染した

ものあるいはA型肝炎患者が身の周りに存在し, 二次感染と考えられている。しかし, 約60%のA型肝炎患者は海外渡航歴がなく, 身の周りにA型肝炎患者がいないにもかかわらず, A型肝炎を発症していると考えられている⁵⁾。その要因の1つとして輸入二枚貝が推測されている。A型肝炎の潜伏期は平均約1カ月と長いため, 原因食材の特定がほとんどできず, 原因不明となっている。

2 わが国におけるA型肝炎食中毒発生状況

近年では国内ではA型肝炎食中毒事件は7件発生しているが, 浜松市と江戸川区の事件は中国産ウチムラサキガイによるものであった。その他の感染経路は寿司店が4件, 飲食店が1件で, いずれも生鮮魚介類を大量に扱っている調理人が感染し, 潜伏期の長いことから発病前に, 利用客にA型肝炎ウイルスに汚染された食品を提供したことによると推測されている^{6~8)}(表1)。食中毒を起こした遺伝子型はアジアで広く分布しているIA型であった。

3 輸入生鮮魚介類におけるA型肝炎ウイルス汚染状況

A型肝炎ウイルス検出法あるいは(<http://www.nih.go.jp/nuid/reference/HA-manual.pdf>)を参照され

表1 国内におけるA型肝炎ウイルスによる食中毒事件

事件No.	発生時期	発生地域	感染源	感染経路	患者数 遺伝子型	その他
1	2000年9～10月	岐阜県	寿司食材 調理器具	調理従業員 寿司店員	23名 IA型	
2	2002年3月	東京都江東区	寿司食材 調理器具	調理従業員 寿司店員	24名 IA型	
3	2001年12月～ 2002年1月	浜松市	ウチムラサキガイ (中国産)	中華料理店	4名 IA型	ノロウイルス と重複感染
4	2002年4月	東京都江戸川区	ウチムラサキガイ (中国産)	飲食店	5名 IA型	ノロウイルス と重複感染
5	2006年12月	名古屋市	不明	寿司店 店主	20名 IA型	患者の接触感 染1名
6	2006年4～5月	新潟市	不明	回転寿司店 調理従事者	10名 IA型	調理従事者の 妻も感染
7	2006年7～9月	滋賀県	不明	飲食店 調理従事者	15名 IA型	調理従事者の 母も感染

たい。

輸入生鮮魚介類1,196件中7件(0.6%)からA型肝炎ウイルス検出され、アカガイ3件、ハマグリ2件、ウチムラサキガイ2件であった(表2)。ノロウイルスに比べA型肝炎ウイルスの汚染はきわめて低率であった。なお、検出されたA型肝炎ウイルスの遺伝子型はすべてIA型であり、即断はできないものの、その感染源として、二枚貝がその1つとして推察される。

4 輸入生鮮魚介類における国別A型肝炎ウイルス汚染状況

国別では中国産614件中5件(0.8%)、韓国産390件中2件(0.5%)で、ほかの国は検体が少数であったこともあり検出されなかった。二枚貝はA型肝炎ウイルスの陽性頻度が少ないものの、汚染の危険性があるものとして、取り扱う必要があり、特に大量に取り扱う調理人は感染予防に注意する。

IV E型肝炎ウイルス

E型肝炎ウイルスはヘパウイルス科、ヘパウイ

表2 輸入魚介類からのA型肝炎ウイルス検出状況
(2001年4月～2007年2月)

種類	A型肝炎ウイルス		
	検査数	陽性数	%
アカガイ	531	3	0.6
ハマグリ	390	2	0.5
カキ	60	0	0
アサリ	59	0	0
タイラギガイ	69	0	0
ウチムラサキガイ	3	2	66.7
その他の貝	21	0	0
エビ類	63	0	0
計	1,196	7	0.6

その他の貝：ミルガイ、トリガイ、シジミ、アゲマキ
カイ、ホッキガイ

エビ類：ブラックタイガー、キングエビ、大正エビ、
クルマエビ

ルス属で、遺伝子型はG1からG4の4つで、G3とG4は人と動物の両方に感染し人畜共通感染症として重要な遺伝子型である。E型肝炎ウイルスは潜伏期が平均6週間と長い。感染すると肝炎を起こす。高齢者および妊婦では重症化することがある。予後は一般的に良好である。

1 わが国におけるE型肝炎患者発生と動物生肉の汚染状況

わが国での2001年以降のE型肝炎患者数は、2001年0名、2002年16名、2003年31名、2004年41名、2005年43名、2006年71名で、近年わずかに増加しており、それらの半数以上はE型肝炎の常在している開発途上国(アジア、中国等)で感染した輸入例ではなく、国内で感染したものと推測されている。なお、わが国におけるE型肝炎ウイルスの食中毒事件は日本のシカ、イノシシ、ブタの肝臓あるいは肉の加熱不十分または生食によりE型肝炎患者が発生し、いずれも動物と人に感染する遺伝子型である3あるいは4型であった⁹⁾。ブタ、イノシシと患者からはほぼ一致する遺伝子配列が同定されていることから、動物をreserverとする人畜共通感染症と考えられている¹⁰⁾。

2 輸入動物肉および生鮮魚介類のE型肝炎ウイルス汚染状況

E型肝炎ウイルスの検出は1パックにつき3カ所から、肉を100mgずつを採取し、RT-PCR法で行った¹¹⁾。

アメリカおよびカナダ各17件、デンマークおよびメキシコ各13件、フランス11件、オーストラリア8件、チリ7件、ニュージーランドおよびスペイン各6件、ハンガリー3件、イタリア、中国、ブラジル各2件、オランダ、フィンランド、オーストリア各1件から輸入された豚肉、牛肉、鹿肉、羊肉、馬肉の計110件について実施し、すべて陰性であった(表3)。

このことから、輸入生鮮動物肉には感染性を有するE型肝炎ウイルスが存在していないと考えられた。上記の輸入国のうち、E型肝炎ウイルスの常在している国もあり、常在国からのものが陰性であったことは、おそらくブタ等では生まれた後、

表3 輸入動物別のE型肝炎ウイルス汚染状況(2006年)

動物	検査数	陽性数
豚肉	95	0
牛肉	6	0
鹿肉	5	0
羊肉	2	0
馬肉	2	0
計	110	0

早期に感染し、成長して肉として販売される時には抗体が産生され、筋肉中のウイルスは排除された結果と推察される。今後、これらの動物は血清抗体の調査が必要と考えている。

生鮮魚介類は中国および韓国からのカキ1件、アカガイ32件およびハマグリ6件、計39件を検査したが、E型肝炎はすべて陰性であった。例数は少ないものの、二枚貝ではE型肝炎の汚染はほほないものと考えられた。

V 食品からのウイルス感染防止

現在、輸入生鮮魚介類および動物肉等は輸出国および輸入国であるわが国において、ウイルス学的な検査はまったく行われていないのが現状である。上記、食品からの健康被害の防止には自らが感染の防止に努め、身を守るほかはない。

今回取り上げたウイルスはいずれも十分に加熱すれば殺滅が可能であり、ノロウイルスおよびA型肝炎ウイルス汚染の危険性を有する二枚貝、E型肝炎ウイルスの汚染の危険性のある動物の肉および肝臓は中心部まで完全に過熱して食することである。

二枚貝で、アカガイ、トリガイ等では中腸腺を取り除く際には感染防止のマスクと手袋を装着し、取り除いた中腸腺で周りを汚さないこと、取り除いた中腸腺は消毒してから、廃棄すること。

二枚貝、動物の肉および肝臓の調理は最後に行い、調理後は使用した器具、シンク等は消毒を行

う。二枚貝、動物の肉および肝臓の調理後は手洗いを徹底すること。

A型肝炎には有効なワクチンがあり、生鮮魚介類を取り扱う調理人はA型肝炎のワクチン接種を積極的に受け、感染源となることを防止する。

A型肝炎蔓延地域への海外渡航者は事前にA型肝炎ウイルスのワクチン接種を受け、A型肝炎およびE型肝炎の蔓延地域では生水、生野菜等の非加熱食品を摂らないこと。

医療関係者はA型肝炎ウイルスのワクチンを受ける。

謝 辞

本研究は平成13年～15年度厚生労働科学研究補助金 主任研究者 西尾 治「食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究」、平成16、17年度厚生労働科学研究費 分担研究者 西尾治「食品由来のウイルス性感染症の検出法の高度化、実用化に関する研究」、平成18年度厚生労働

科学研究費補助金 主任研究者 西尾 治「輸入生鮮魚介類および動物生肉のウイルス汚染のサーベイランスに関する研究」の補助を受けて行われた。

国立感染症研究所：木村博一、藤本嗣人、山下和子、加藤由美子、愛木智香子、藍野大学：牛島廣治、沖津祥子、新潟大学教育研究院：鈴木 宏、西川 眞、田村 務、国立医薬品食品衛生研究所：野田 衛、神奈川県衛生研究所：古屋由美子、片山 丘、横浜市衛生研究所：宇宿秀三、静岡県環境衛生科学研究所：杉枝正明、足立 聡、山口県環境保健研究センター：岡本玲子、松本知美、独立行政法人日本スポーツ振興センター：有田知子、愛媛県立衛生環境研究所：大瀬戸光明、山下育孝、近藤玲子、大塚有加、市川高子、群馬県衛生環境研究所：森田幸雄、坂野智恵子、千葉市保健所：田中俊光の各先生の共同研究のもとに行われたものであり、感謝いたします。また検体採取に協力いただいた愛知県食品検査所の各位に深謝します。

参 考 文 献

- 1) Kageyama T. *et al.*: J Clin Microbiol, **42**, 2988-2995 (2004)
- 2) Inoye S. *et al.*: J. Infect. Dis., **181** (52), 270-274 (2000)
- 3) 西尾 治, 丸山 務編：改訂版ノロウイルス現場対策, 幸書房, p23-70 (2007)
- 4) 西尾 治, 厚生労働省監修：食品衛生検査指針(微生物編), p450-474 (2004)
- 5) 国立感染症情報センター：病原微生物検出情報, **23**, 271-272 (2002)
- 6) 猿渡正子 他：病原微生物検出情報, **23**, 147-149 (2001)
- 7) 貞楢健志 他：病原微生物検出情報, **23**, 273 (2002)
- 8) 長谷川嘉子 他：病原微生物検出情報, **27**, 341-342 (2006)
- 9) 国立感染症情報センター：病原微生物検出情報, **26**, 261-262 (2005)
- 10) Nishizaki M. *et al.*: J Gen Virol, **84**, 851-862 (2003)
- 11) Takahashi K. *et al.*: Intervirology, **46**, 308-3128 (2003)