

表 4 HAV の検出状況と海産物の調理方法

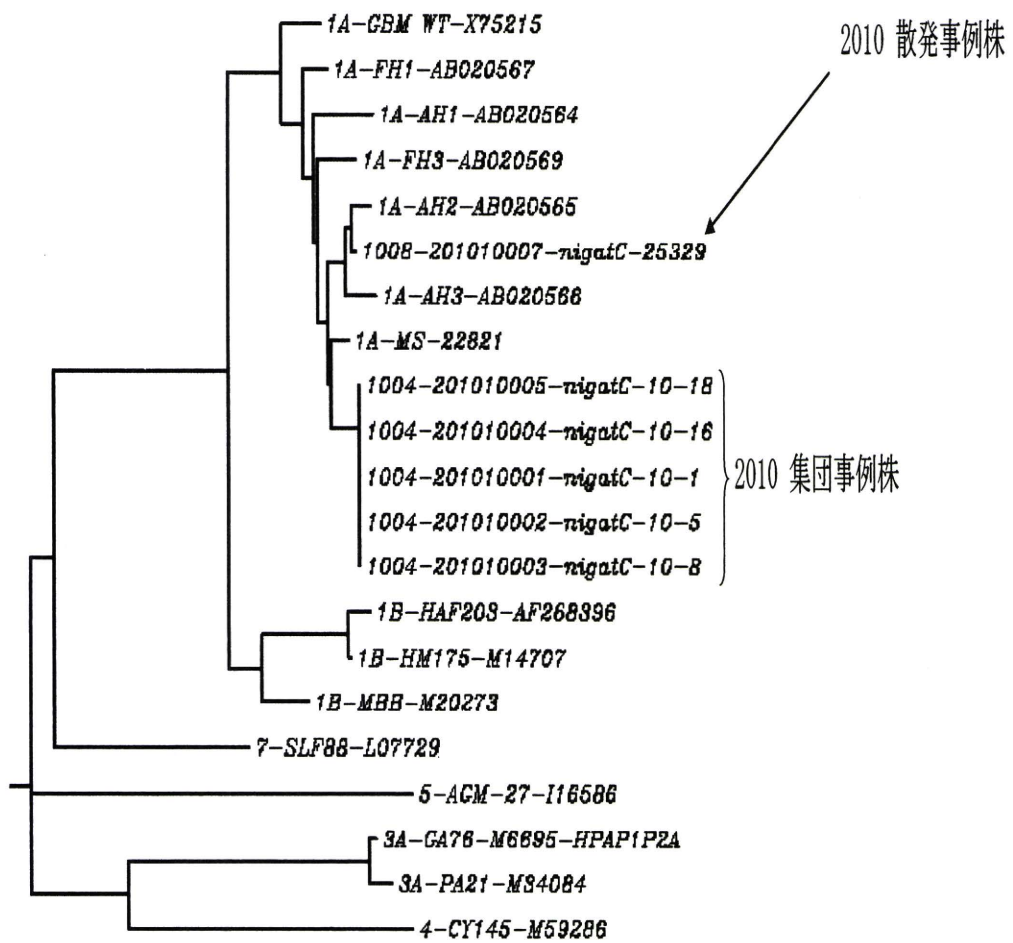
	発症の有無	検出	食べた個数	
			生	加熱
No.1	有	○	1	
No.2	有	○	5	
No.3	有	○	1	
No.4	有	○	3	
No.5	有	○	2	
No.6	無	○	2	3
No.7	無	×	1	
No.8	無	×	1	
No.9	無	×	1	1
No.10	無	×		2
No.11	無	×		1
No.12	無	×		1
No.13	無	×		5
No.14	無	×		1.5
No.15	無	×		0.5
No.16	無	×		2
No.17	無	×		2
No.18	無	×		6
No.19	無	×		1
No.20	無	×		3
No.21	無	×		6
No.22	無	×		1
No.23	無	×		1

(N=23:海産物を喫食した者)

表 5 散発事例における HAV 検査結果

	検体数	陽性数
患者	1	1
職場同僚	11	0
患者の家族(含 友人)	9	0
計	21	1

図1 A型肝炎ウイルス遺伝子VP1-2領域の系統樹



平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業)  
「A 型肝炎発生報告増加に対する食品衛生上の原因究明と予防対策」  
研究分担報告書

## 神戸市における A 型肝炎の発生状況とその解析

研究協力者	飯島 義雄	神戸市環境保健研究所
研究分担者	石井 孝司	国立感染症研究所
研究代表者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

神戸市内で発生した A 型肝炎患者の発生状況、喫食状況、遺伝子型等の調査・解析を行なった。3 月、4 月に発生した事例は、遺伝子型 1A によるもので、同一の感染源の可能性が高く、喫食状況調査からろ過食性二枚貝であるカキが感染源の可能性が示唆された。流通や喫食までの経過が不明なため感染予防には二枚貝の生食に対する注意喚起や十分な加熱を啓発する必要がある。

### A. 研究目的

2010 年に神戸市内で発生した A 型肝炎患者の発生状況を調査するとともに、喫食状況や遺伝子型等を解析することにより、感染源を推定し、感染防止対策に資する。

### B. 研究方法

#### 1. 喫食調査

2010 年(平成 22 年)には、神戸市保健所に 13 件の A 型肝炎の届出があり、積極的疫学調査として届出医と連携して、喫食状況等を調査した。

#### 2. 分子疫学的解析

患者便検体が 8 検体入手できたので、A 型肝炎ウイルス(HAV)の塩基配列を決定し、他都市での事例とも比較し、分子疫学的解析を行った。

#### 3. カキからの HAV の検出

わが国では、A 型肝炎の感染源のひとつとして、生カキが言われている。2010 年 1 月 19 日と 26 日に採取した生食用カキ 8 検体(岡山県産 3 検体、広島県産 3 検体、兵庫県産 1 検体、山口県産 1 検体)の中腸腺抽出物が冷凍保存されていたので、通知法にある nested PCR 法で HAV の検出を試みた。

#### 4. 倫理面への配慮

本研究では、研究対象者が特定されることなく、調査・解析を行なった。

### C. 研究結果

#### 1. 発生状況等と遺伝子型

神戸市では A 型肝炎の届出は 3~5 月に複数件あり、7~9 月に 1 件ずつあった(図 1)。3 月と 4 月に発生した 8 事例のうち、患者検体の入手できた 4 事例は全て遺伝

子型 1A に分類され、これらは同一の感染源の可能性が高いと考えられた(表 1)。喫食状況の聞き取り調査から、生食用カキが原因であった可能性や特定の産地を示唆する情報が得られた。

5月に発生した2事例は、いずれも遺伝子型 3A に分類され、3月と4月の事例とは異なる感染源の可能性が示唆された。原因と考えられる食材は特定できなかった。

## 2. カキ中の HAV

2010年1月に採取した生食用カキの中腸腺抽出物からは、HAVは検出されなかった。

## D. 考察

HAV やノロウイルスなどは、感染した人の便中に放出され、下水を介して海水を汚染する。カキ等のろ過食性二枚貝は海水中のプランクトンやウイルスなどを中腸腺に濃縮・蓄積するため、感染源となる可能性が高い。今回保管されていたカキ中腸腺の抽出物からHAVは検出されなかったが、喫食状況からカキの生食の可能性が示唆された。複数地域で発生した患者による分子

疫学的調査から共通する遺伝子型が検出されれば、広域的な感染源の推定が可能と考えられる。感染防止のためには、流通過程や喫食までの経過が不明であるため、カキの生食に対する注意喚起と十分な加熱調理が必要と考えられる。

## E. 結論

喫食状況から、カキ等のろ過食性二枚貝がA型肝炎の感染源の一つである可能性が示唆された。広域的な分子疫学調査によって感染源の推定が期待できる。

## F. 研究発表

1. 論文発表: なし
2. 学会発表: なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

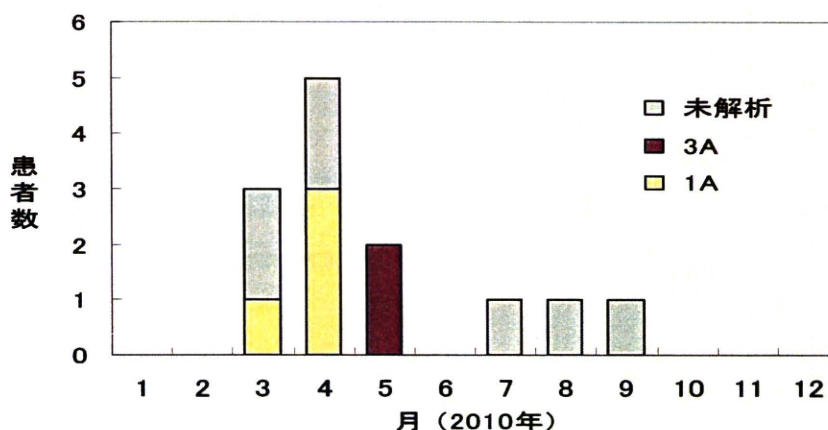


図1. 患者発生状況と遺伝子型

表 1. 神戸市内で発生した A 型肝炎患者の遺伝子型と喫食状況<sup>a</sup>

症例	性別 (年齢)	遺伝子型	喫食状況	届出日 <sup>b</sup> (初診日)	備考
1	男 (68)	— <sup>c</sup>	2/10～2/15 にかけて、複数日間生ガキの喫食あり	3/24 (3/15)	基礎疾患に糖尿病あり、劇症肝炎にて 4/9 死亡。
2	女 (57)	1A	2/15 に生ガキの喫食あり	3/25 (3/18)	基礎疾患に糖尿病、3/13 頃より嘔気・全身倦怠感あり
3	女 (26)	—	生ガキの喫食あり	3/31	
4	女 (57)	1A	3 月初旬に豚しゃぶ・ホルモンの喫食あり、カキの喫食なし	4/5	渡航歴無し
5	女 (65)	1A	2/10 にカキ(症例 1 と同一品、軽く茹でた)の喫食あり	4/19 (4/13)	症例 1 の妻、3 月初旬より倦怠感あり
6	男 (46)	1A	2 月に生ガキの喫食あり	4/19 (4/14)	
7	女 (35)	—	不明	4/23 (4/12)	
8	男 (53)	—	不明	4/23 (4/13)	
9	女 (64)	3A	寿司の喫食あり	5/18 (5/18)	
10	女 (43)	3A	4 月に海鮮丼の喫食あり	5/24 (5/24)	
11	男 (39)	—	不明	7/13 (6/26)	
12	男 (34)	—	あさり等の貝の喫食あり	8/26 (8/13)	
13	男 (67)	—	不明	9/2 (8/23)	

<sup>a</sup> 神戸市保健所による積極的疫学調査資料

<sup>b</sup> 日付は、いずれも 2010 年

<sup>c</sup> 検体が入手できなかったため、遺伝子解析が実施できず

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)  
「A 型肝炎発生報告増加に対する食品衛生上の原因究明と予防対策」  
研究協力報告書

## 佐賀県における A 型肝炎事例と分子疫学的検討

研究協力者 増本 久人、南 亮仁、野田日登美、江口 正宏、  
原崎 孝子、轟田 清典 (佐賀県衛生薬業センター)  
北島 正章、片山 浩之 (東京大学大学院工学系研究科)  
研究分担者 清原 知子、石井 孝司 (国立感染症研究所ウイルス第二部)  
野田 衛 (国立医薬品食品衛生研究所食品衛生部)

### 研究要旨

我が国では、2000 年以降、A 型肝炎の患者数は減少傾向を示していたが、2010 年 2 月（第 5 週）頃から国内で A 型肝炎発生届が増加傾向を示し、3 月（第 10 週）以降に急増した。佐賀県でも 2010 年 3 月から 6 月の間に計 7 事例の A 型肝炎発生届出（図 1）があり、各患者の疫学調査を行い協力が得られた 5 事例の患者便検体およびその 1 事例の患者自宅敷地内の井戸水 1 件について A 型肝炎ウイルス（HAV）の VP1/2A 遺伝子領域の検出を試みた。また、県内の下水処理場 1 定点から採取した流入水中の HAV 遺伝子検出も行った。

その結果、4 事例の患者便検体と井戸水 1 件から HAV を検出した。HAV 遺伝子を検出した検体について分子系統樹解析などを行った結果、全て IA 型に分類され、それらは IA-1 亜型(1 事例)と IA-2 亜型(3 事例と井戸水 1 件)の 2 種類の分枝を形成していた。この IA 型は 2000 年以降、国内の食中毒事例に報告されており、特に IA-1 亜型は国内に常在している型であると推測された。2010 年 6 月～12 月採取の下水 7 検体から HAV 遺伝子は検出されなかった。

### A. 研究目的

2010 年 3 月（第 10 週）以降、国内において A 型肝炎発生届が急増したことから、厚生労働省は A 型肝炎による感染原因の調査と感染源の共通性などを解明するため、発生届を受理した場合の患者の糞便検体の確保と分子疫学的な検査実施について各自治体宛に通知があった。佐賀県でも 2010 年の同じ時期に 7 事例の患者発

生届があり、積極的疫学調査として患者糞便検体を確保し、A 型肝炎ウイルス（HAV）遺伝子の分子疫学的な解析調査を行った。

また、県内の HAV 侵潤状況を把握するために、県内の下水処理場 1 定点で採取された下水流入水からの HAV 遺伝子の検出を試みた。

### B. 研究方法

## 1. 材料

2010年3月(第12週)から2010年6月(第23週)の間に計7事例の発生届があり、5事例から患者便検体5検体と患者自宅敷地内の井戸水1件の検体を確保し、計6件の検体についてHAV遺伝子の検出を実施した。

また、2010年6月～12月に県内の下水処理場1定点で月1回採取された下水流入水7検体についてもHAV遺伝子検出を試みた。

## 2. 方法(図1)

HAV遺伝子検査法は、食安監発第1201号「A型肝炎ウイルス検出法」、国立感染症研究所「病原体検査マニュアル」に準じ、糞便検体からQIAmp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いRNA抽出、DNase処理、逆転写反応によりcDNA合成後、HAV遺伝子のVP1/2A接合部領域を1st PCR(+2799/-3273), NestedPCR(+2907/-3162)法にてHAV遺伝子の検出を試みた。PCR陽性産物はダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、プライマー塩基部位を除く、232塩基について系統樹解析などの分子疫学的検討を行った。

井戸水は、約300mlを粗遠心後、Amicon Ultra-30K(ミリポア)で濃縮処理し、最終濃度約200 $\mu$ lを糞便検体と同様に処理後、PCR法を行った。なお、後述のように当所での検査では井戸水は陰性であったことから、井戸水を国立感染症研究所へ送付し、東京大学工学部都市工学科片山研究室にて再検査を実施した。

下水流入水は採水した1,000mlから約200mlを分取し粗遠心処理後、アミコンウルトラ-30K(ミリポア)を用い最終濃度

約200 $\mu$ lとした濃縮液を検体とした。

## (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. A型肝炎事例の検査結果(表1)

A型肝炎発生届の7事例中5事例から患者便検体5件と井戸水1件についてHAV遺伝子の検出を試みた結果、患者便検体4件と井戸水1件からHAV遺伝子を検出した。

#### (1) 患者情報

2010年にA型肝炎発生届のあった患者の年齢は、26歳の1事例を除く、6事例は45歳から84歳で高い年齢群であったが、性別差は認めなかった。HAVと診断された7事例のすべてが、受診先の病院における血中IgM抗体価測定を検出により確定診断されたものであった。感染経路(推定)としては、7事例中5事例が経口感染、感染源は3事例が貝類で、他の事例は不明の調査結果であった。また、各事例の推定発病日から届出受理までの期間は1週から4週までの週差を認めた。感染地域としては、海外への渡航歴はなく、県内発生6事例と県外発生1事例で、調査状況から、すべて散発的な届出事例であった。

#### (2) 遺伝子検査結果

##### 1) 検出事例

事例2、事例4、事例6、事例7の4事例からPCR法でHAV遺伝子を検出した。それらの増幅産物のVP1/2A接合部領域(232bp)の塩基配列を比較した結果、事例2、

事例 6、事例 7 の HAV 塩基配列は完全に一致 (100%) した。事例 4 の塩基配列とは 8 塩基 (224/232bp) の違いが見られ、前述の 3 事例とは 96.6% の塩基相同性を示した。

また、事例 6 の患者宅の井戸水については再検査で陽性であったことから、患者便検体の塩基配列 (232bp) と相同性比較を行った結果、1 塩基 (191 番目) の不読部分 (N) を除き、完全に一致していた。

## 2) 系統樹解析 (図 3) (表 2)

事例 2、事例 4、事例 6、事例 7 の患者便検体 4 件と井戸水 1 件から検出した HAV の塩基配列 (232bp) を基に種々の参照株を用いて、分枝系統樹解析を行った結果、全て IA 型の HAV5[EU131373]Uruguay 株、DL3[AF512636]China 株の分枝下に属していた。

事例 4 は DL3[AF512636]China 株と 97.4% (226/232bp) の相同性を示し、最も近縁であった。また、BLAST 検索においては HAV-iso-a56[FJ445821]Taiwan 株と 99.6% (231/232bp) の相同性を示した。便宜的に IA-1 亜型とした。

一方、事例 2、事例 6 (井戸水を含む)、事例 7 の HAV 検出株は DL3[AF512636]China 株とは 96.6% (224/232bp) の相同性を示すサブグループを形成し、BLAST 検索株の HAV-DE-2007/08/218[EU825857]Germany 株と塩基配列は 100% (232/232bp) 一致していた。便宜的に IA-2 亜型とした。

## 3) アミノ酸置換

今回決定した HAV の塩基配列 (232bp) を基に推定されるアミノ酸に置換 (77aa) し、前述の塩基系統樹解析において検出

事例が最も近縁であった IA 型の DL3[AF512636]China 株とアミノ酸配列の比較を行った結果、事例 4 の IA-1 亜型は完全に一致していた。これに対して、事例 2、事例 6 (井戸水を含む)、事例 7 の IA-2 亜型グループは 77 番目に位置するグルタミン酸 (E) がアスパラギン酸 (D) に変異 (E70D) し、98.7% (76/77aa) の相同性を示した。

## 2. 下水流入水の検査結果

2010 年 6 月～12 月に県内の下水処理場 1 定点で月 1 回採取された下水流入水 7 検体について HAV 遺伝子の検出を試みたが、全て陰性であった。

## D. 考察

佐賀県では 2010 年 4 月～6 月の間に 7 事例の A 型肝炎患者の届出があり、患者便検体が採取された 5 事例のうち 4 事例の患者便検体から HAV 遺伝子を検出した。検出した HAV は全て遺伝子型 IA と判明した。この IA 型は 2000 年～2006 年の間に岐阜県、浜松市、東京都、新潟市、滋賀県で発生した事例と類似していることが推定され、その大半は、飲食施設が関与した食中毒事例から IA 型が検出されており、2000 年以降から国内で流行していた型と推察された。

今回の HAV 検出事例の中で、IA-2 亜型の事例 2、事例 6、事例 7 の 3 事例の患者便検体から検出された HAV の塩基配列 (232bp) は完全に一致していた。また、この株の塩基配列 (232bp) はフィリピン河川水から検出された株との関連性が示唆される HAV-DE-2007/08/218[EU825857]

Germany 株とも完全に一致することから、この Germany 株との関連性が強く推察されるとともに、本ウイルス株は海外から侵入したものと推測された。しかし、この 3 名の A 型肝炎が発症するまでの潜伏期が長いことから患者の聞き取り調査情報などから十分な疫学情報は得られず、患者間の疫学的な関連性や感染源の究明には至らなかった。

一方、事例 6 においては患者自宅の井戸水から HAV が検出され、その塩基配列は 1 塩基の不読部分 (N) を除き、当該患者から検出された株の塩基配列と一致していた。この患者の家では水道が引かれておらず、井戸水が飲用を含む生活水として利用されていることから、井戸水の飲用により感染した可能性が考えられる。しかし、家族内に他の発症者が見られず、トイレが汲取り式の便槽であることから当該患者の便中のウイルスが井戸水を汚染した可能性も否定できず、感染源として特定するには至っていない。

IA-1 亜型とした事例 4 は、上記の 3 事例とは、検出塩基 232bp 中 8 塩基が異なる亜型であった。また、BLAST 検索において 2006 年以降、国内の食中毒検出例などに近縁を示したと報告されている HAV-is o-a56[FJ445821]Taiwan 株や Serpukhov/2001/101[AY226610]Russia 株と類似していたが、疫学調査から感染源などを特定するには至らなかった。

佐賀県内においては 1977 年に県内東部の小学校児童 411 名を中心とした A 型肝炎集団事例が発生しているが、それ以降、大規模な集団発生は確認されていない。

国立感染症研究所の感染症発生動向調

査システムの登録情報によると県内の A 型肝炎報告数は 2006 年 2 件、2007 年 3 件、2008 年 3 件、2009 年は 0 件であった。2010 年は 8 月現在で 7 件の届出があり、HAV 遺伝子検索の結果、IA 型で IA-1 亜型と IA-2 亜型の 2 種類の亜群をはじめ県内で検出し分子疫学的に検討した事例であった。今後も HAV の監視および感染予防対策のために分子疫学的な調査を継続して行くことが重要と思われる。

県内の HAV 侵潤状況を把握するために、県内の下水処理場 1 定点で採取された下水流入水からの HAV 遺伝子の検出を試みたが全て陰性であった。このことから、県内における HAV の侵淫状況は低いものと考えられた。

## E. 結論

A 型肝炎ウイルス感染の潜伏期は長く、発症後の聞き取り調査情報などによる感染源の調査は非常に困難な状況である。しかし、確定診断時の患者便にはウイルスが通常より長い期間排泄される状況から遺伝子を確実に検出し塩基配列情報を一元的に分析することにより、共通の感染源の特定や感染経路の究明に分子疫学的な調査や分析が極めて有効な手法であると期待される。

謝辞：本調査にあたり、ご協力をいただきました佐賀県健康福祉本部健康増進課、佐賀中部保健福祉事務所、鳥栖保健福祉事務所の各担当さま、病原体および情報提供の医療機関の関係者さまに感謝申し上げます。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

増本久人, 南 亮仁, 野田日登美, 江口  
正宏, 原崎孝子, 靄田清典, 北島正章,  
片山浩之, 清原知子, 石井孝司, 野田 衛:  
A型肝炎ウイルス検出事例の分子疫学的検  
討ー佐賀県, 病原微生物検出情報, 31,  
292-294 (2010)

### 2. 学会発表

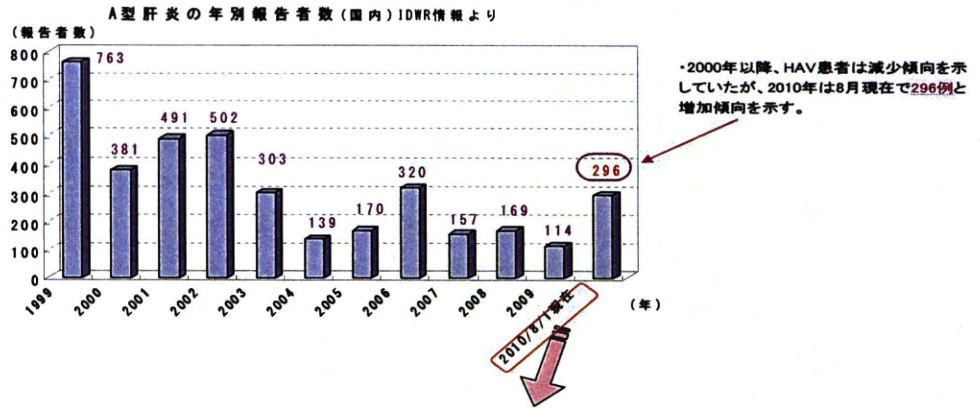
なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし

2. 実用新案登録: なし

3. その他: なし



・佐賀県での発生届出例(月)は?  
 2006年: 2例(6月、7月)  
 2007年: 3例(4月、8月、10月)  
 2008年: 3例(9月、10月、11月)  
 ↓  
 2010年: 7例(4月/6例、6月/1例)

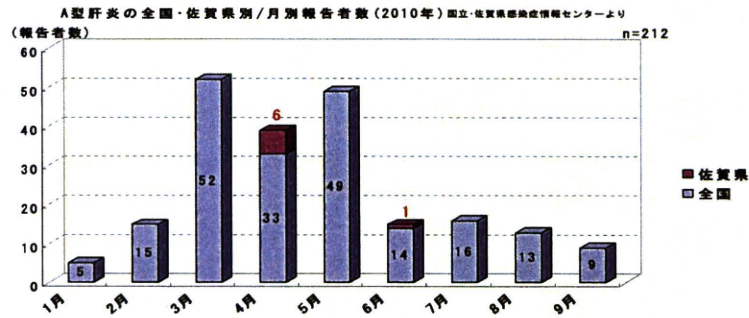


図1、A型肝炎の全国および佐賀県の発生報告数

表1、A型肝炎ウイルス患者発生届事例一覧 (2010年:佐賀県)

事例No.	事例1	事例2	事例3	事例4	事例5	事例6		事例7
						(患者便)	(井戸水)	
管轄保健所 (届出)	佐賀中部 (n)	佐賀中部 (n)	鳥栖 (n)	佐賀中部 (n)	佐賀中部 (n)	鳥栖 (福岡県久留米市)		佐賀中部 (n)
NESID登録	201011048	201009702	201011189	201011051	201011050	201011042		201017662
患者	84歳、男性	45歳、男性	53歳、男性	47歳、女性	78歳、女性	60歳、男性	—	26歳、女性
発病日 <sup>(1)</sup>	3月28日 (12週)	3月29日 (13週)	不明	4月8日 (14週)	4月15日 (15週)	4月18日 (15週)	—	6月13日 (23週)
診断日	4月1日 (13週)	4月1日 (13週)	4月8日 (14週)	4月21日 (16週)	4月22日 (16週)	4月23日 (16週)	—	6月23日 (25週)
届出受理日	4月23日 (16週)	4月12日 (15週)	4月26日 (17週)	4月23日 (16週)	4月23日 (16週)	4月23日 (16週)	—	6月23日 (25週)
確定診断	IgM抗体	IgM抗体	IgM抗体	IgM抗体	IgM抗体	IgM抗体	—	IgM抗体
感染経路 <sup>(2)</sup>	経口	経口	経口	不明	不明	経口	—	経口
感染源 <sup>(1)</sup>	物々、生貝	生鮎	生鮎	不明	不明	不明	—	不明
感染地域 <sup>(2)</sup>	佐賀市	国内不明	佐賀県	佐賀県	佐賀市	三養基郡(家族内発生なし)		福岡県
		↓		↓	↓	↓		↓
採取日	—	4月13日 (15週)	—	4月26日 (17週)	4月26日 (17週)	4月27日 (17週)	4月27日 (17週)	6月25日 (25週)
検体No.	—	10s49	—	10s52	10s53	10s54	10s505	10s65
検体	なし	便	なし	便	便	便	井戸水	便
PCR結果	—	陽性	—	陽性	陰性	陽性	陽性	陽性
遺伝子型 <sup>(3)</sup>	—	IA-2	—	IA-1	陰性	IA-2	IA-2	IA-2

(1)聞き取り調査(推定)情報より。(2)全例、海外渡航歴なし。(3)遺伝子型:便宜的にIA-1、IA-2に分類。

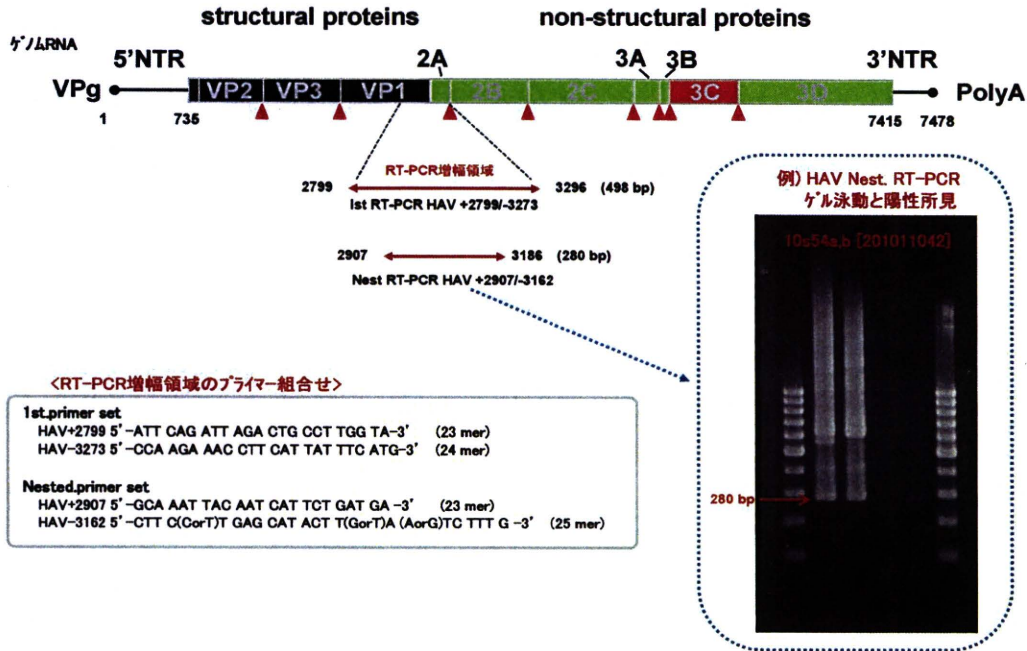


図2、A型肝炎ウイルス遺伝子のPCR増幅部位と塩基解析部位

ゲノム構造図提供: 国立感染症研究所(石井)

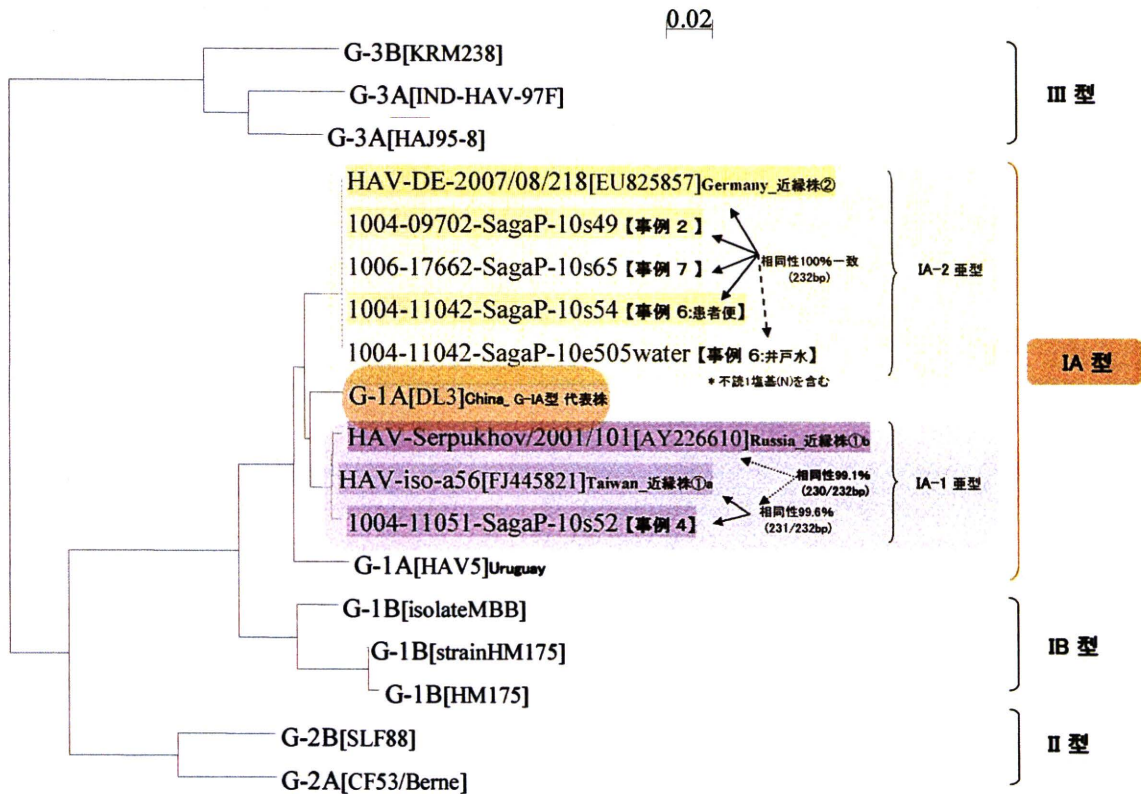


図3、A型肝炎ウイルス遺伝子検出事例の系統樹 (VP1/2A領域: 232bp)

DDBJ CLUSTALW ver. 1.83

表 2、A型肝炎ウイルス検出事例と塩基(232bp)

およびアミノ酸(77aa)の相同性比較一覧

遺伝子情報			HAV系統樹解析 (VP1/2A領域:232bp)		BLAST検索 (VP1/2A領域:232bp)	
			I A型代表株 (近縁株)		I A-1近縁株	I A-2近縁株
事例			HAV-DL3[AF512536] china		HAV-iso-a56[FJ445821] Taiwan	HAV-DE-2007/08/218[EU825857] Germany
			塩基相同性 (232bp)	アミノ酸相同性 (77aa)	塩基相同性 (232bp)	塩基相同性 (232bp)
I A-1	事例4	佐中 10s52 47y.F	97.4% (226/232)	100% (77/77)	99.6% (231/232)	#77/117との関連性が示唆される類似株
I A-2	事例2	佐中 10s49 45y.M	96.6% (224/232)	98.7% (76/77)	*アミノ酸置換と変異部位 (E70D)	100% (232/232)
	事例6	鳥栖 10s54 60y.M (井戸水含)				
	事例7	佐中 10s65 26y.F				

アミノ酸置換と変異部位 (E70D)

VP1-2A/G-1A[DL3] (109)	EPV	...LLELVGH
10s52[saga/04/2010]G-1A (66)	EPV	...LLELVGH
HAV-iso-a56[FJ445821] (71)	EPV	...LLELVGH
10s49[saga/04/2010]G-1A (66)	EPV	...LLELVGH
10s54[saga/04/2010]G-1A (66)	EPV	...LLELVGH
10s65[saga/06/2010]G-1A (66)	EPV	...LLELVGH
HAV-DE-2007/08/218[EU825857] (71)	EPV	...LLELVGH

E: グルタミン酸、D: アスパラギン酸

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)  
「A 型肝炎発生報告増加に対する食品衛生上の原因究明と予防対策」  
研究分担報告書

富山県における A 型肝炎発生状況

研究協力者	小原 真弓	富山県衛生研究所
研究協力者	堀元 栄詞	富山県衛生研究所
研究協力者	滝澤 剛則	富山県衛生研究所
研究協力者	宮田 英喜	富山市保健所
研究協力者	嶋尻 悟志	富山市保健所
研究代表者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

富山県における A 型肝炎患者について、疫学調査及び遺伝子学的解析から感染経路の推定や流行状況の把握を行った。2010 年は、全国と同様に富山県でも A 型肝炎が多発し、9 名の患者発生があった。4 名から得られた A 型肝炎ウイルス遺伝子は IA 型であり、2010 年に全国で主流を占めたフィリピン由来の株と一致していた。3 名から得られたウイルス遺伝子は IIIA 型であり、2008 年頃から韓国で流行している株と近縁であった。同一家族で複数の患者が発生した事例が 2 例あり、うち 1 事例は 1 名から 3 名へ二次感染した可能性が高いと考えられた。このように、富山県の A 型肝炎患者報告数の増加は、新たなタイプが侵入したこと、二次感染により同一家族に多数の患者が発生したことが要因と考えられた。

A. 研究目的

A 型肝炎は、経口感染することから、食品媒介感染症として重要である。しかしながら、一般的な食中毒細菌やウイルスに比べ、潜伏期間が長く、発症してからでは原因を追及することが困難であることが多い。一方、抗体検査で確定診断できることから、その遺伝子学的解析についてはこれまで十分行われていなかった。

そこで、富山県における A 型肝炎患者について、疫学調査及び遺伝子学的解析

から感染経路の推定や流行状況の把握を行い、感染防止に役立てること目的とした。

B. 研究方法

1. 疫学調査及び材料

富山県内で 2010 年に発生した A 型肝炎患者について疫学調査を行った。7 名の患者からは糞便検体を得た。採便及び疫学調査は、各管轄厚生センター及び保健所が実施した。

## 2. A型肝炎ウイルスの検出

糞便検体の10%乳剤上清から、厚生労働省通知（食安監発1201第2号）に基づきRNAを抽出し、DNase処理、逆転写反応ののちPCRに用いた。PCR及びsemi-nested PCRには、VP1-2A領域を対象としたプライマーペアHAV-JCT-2F/HAV-JCT-1R-A及びHAV-JCT-2F/HAV-JCT-2Rを用いた。PCR産物から、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

（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. 患者の概要

2010年、富山県においては9名の患者が発生した。これは、全国と同様に、2004年以来最多であった（図1）。9名の患者の概要を表1に示す。発症時期は3月～7月に集中していた。2名はカキの喫食があり、少なくとも2名は海産物の喫食があった。9名のうち、4名と2名はそれぞれ同一家族であった。

検査した7名は全てPCR陽性となった。4名はIA型であり、解析領域568塩基の配列は一致した。さらに、フィリピンからドイツに帰国した患者から分離された株（HAV-DE-2007/08-196, accession no. EU825856）とも一致していた。3名はIIIA型であり、このうち同一家族の2名（表1、△）の配列は一致した。IIIA型は全て、2007年に韓国で検出された株（HAVSEOUL1, accession no. GU991288）と近縁であった。

### 2. 二次感染したと思われる事例

1名が発症したのち、約1カ月の時間を経て同居家族3名が発症した事例があった（表1、★）。家族構成は父、母、長男、長女、次男、祖父の6名で、3月末に父がA型肝炎を発症したのち、4月末～5月初めに母及び長女、次男が発症していた。父の検体は得られなかったが、母、長女、次男ではウイルス遺伝子が一致していた。

疫学調査により、2月下旬に生ガキを加熱調理して祖父・父・長男（母は不明）が喫食していたことが判明した。特に、父は生焼けのカキを食した記憶があった。さらに、残った生ガキは冷蔵庫に保管し、翌日加熱調理して父が食していた。

なお、入浴は祖父ののちその他が順不同で入るが、父の後は発症者（母、長女、次男）が利用する傾向があった。トイレは汲取り式で、父と他の家族では違うトイレを使用していた。各トイレの手拭タオルは共用であった。

食事は主に母が調理するが、まれに父が調理することがあった。父は夕食の他に、晩酌メニュー（カキを含む）を別に喫食していた。

## D. 考察

2010年は全国と同様、富山県でもA型肝炎が多発した。全国で2010年春に検出されたA型肝炎ウイルスの過半数は、これまでの流行株とは異なるタイプであり、IA型フィリピン由来株HAV-DE-2007/08-196と同じクラスターに属していたとの報告（石井他，病原微生物検出情報（IASR）31：287-289，2010）がある。また、残りの株のほとんどは、IA型の別クラスター（従来から日本に常

在しているタイプ) 及び IIIA 型 (韓国で 2008 年頃から流行しているタイプ) に属していたことから、2010 年は、常在する IA 型に加え、フィリピン由来 IA 型と IIIA 型が侵入して広がり、各地で患者を多発させたと考えられている。富山県においても、このフィリピン由来 IA 型が 4 名から、韓国で流行している IIIA 型が 3 名から検出され、全国と同様の傾向を示した。

同一家族で発生した 2 例のうち、1 例では詳細な情報が得られた。家族 4 名が時間差で発症した要因として、父が加熱不十分のカキ等で感染したのち、入浴、調理などにより家族に二次感染させた可能性が高いと考えられた。しかしながら、カキを保存した際などに他食材へ汚染した可能性についても否定はできない。

夫婦 2 名が患者となった例では、2 名のウイルス遺伝子が一致し、同一感染源から感染したか二次感染した可能性が考えられた。

以上のことから、2010 年における富山県の A 型肝炎患者報告数の増加は、全国と同様に新たなタイプが侵入したこと、二次感染により同一家族に多数の患者が発生したことが要因と考えられた。

A 型肝炎に関しては、厚生労働省通知 (健感発第 0426 第 2 号、食安監発 0426 第 4 号) により各自治体に積極的な疫学調査、検体確保が依頼されている。これを受け、富山県においても疫学調査、糞便検体の確保及び遺伝子検出を行い、今回

の結果が得られた。今後も調査を継続することで、短期的・長期的な流行状況の把握に役立つと期待される。また、今回フィリピン由来の株が流行した要因に、病原性や感染力の違いが関わっていないか、今後の詳細な解析が必要である。

#### E. 結論

2010 年は、全国と同様に富山県でも A 型肝炎が多発した。同一家族で複数の患者が発生した事例が 2 例あり、うち 1 事例は二次感染した可能性が高いと考えられた。富山県の A 型肝炎患者報告数の増加は、新たなタイプが侵入したこと、二次感染により同一家族に多数の患者が発生したことが要因と考えられた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表
  - 1) 三浦正義，金田尚，橋本郁夫，中川裕康，西浦可祝，樋上義伸，高櫻明子，小原真弓：A 型肝炎の家族発症．第 300 回日本小児科学会北陸地方会，石川県，平成 22 年 12 月 12 日

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

図1. 近年のA型肝炎患者数

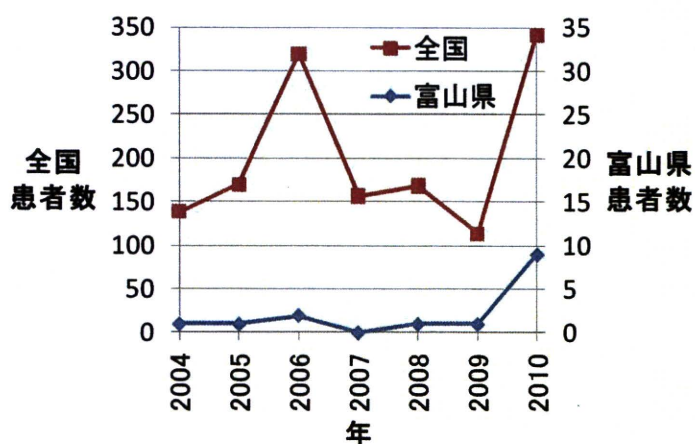


表1. 2010年に富山県で発生したA型肝炎患者

No.	年齢	発症日	IgM検出	遺伝子検出	遺伝子型	備考
★ 1	40代	2010年3月27日	+	NT		カキ喫食
2	50代	4月1日	+	+	III A	カキ喫食
★ 3	10代	4月27日	+	+	IA	患者No.1の子
★ 4	40代	4月30日	+	+	IA	患者No.1の妻
★ 5	10歳未満	5月5日	+	+	IA	患者No.1の子
6	20代	5月11日	+	+	IA	海外に約1年滞在後、県外に2日滞在(寿司喫食)
△ 7	40代	6月10日	+	+	III A	カキは食べない
△ 8	40代	6月23日	+	+	III A	患者No.7の妻
9	30代	7月7日	+	NT		県外にて海産物摂取

★△の同印は同じ家族。NT：未検査

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)  
「A 型肝炎発生報告増加に対する食品衛生上の原因究明と予防対策」  
研究協力報告書

大阪府で認められた A 型肝炎 3 症例の分子疫学的解析、  
生食用カキおよびカキ関連食中毒事例からの A 型肝炎ウイルスの検出

研究協力者	入谷 展弘	大阪府立環境科学研究所
	改田 厚	大阪府立環境科学研究所
	関口 純一郎	大阪府立環境科学研究所
	久保 英幸	大阪府立環境科学研究所
研究分担者	石井 孝司	国立感染症研究所
研究代表者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

2010 年 10 週以降に A 型肝炎が国内で急増した状況において、2010 年 4 月～6 月に大阪府で認められた 3 症例の A 型肝炎について分子疫学的解析を実施した。その結果、本 3 症例に疫学的な関連性はなく、個別の感染によるものであったと考えられた。今回実施した A 型肝炎ウイルス (HAV) の分子疫学的解析は、各症例間の関連性や感染地域の推定に有用であり、原因究明に重要な情報になると考えられた。

2010 年 12 月に市販されていた国産市販生カキおよび 2004 年 12 月以降に発生したカキ関連食中毒事例について HAV 検査を実施したが、すべて陰性であった。国産市販生カキ喫食に伴う HAV 感染のリスクは、ノロウイルスに比べて非常に低いことが示唆された。

#### A. 研究目的

A 型肝炎ウイルス (HAV) はウイルス性食中毒の病因の一つである。しかし、感染から発症までの潜伏期間が長いために、感染源や汚染経路などの原因究明が困難であり、疫学的に不明な点が多い。

2010 年 10 週以降に A 型肝炎が国内で急増し、厚生労働省より「A 型肝炎の Diffuse Outbreak に関する注意喚起情報」が 4 月末に通知された。このような状況の中、

2010 年 4 月～6 月に大阪府で認められた 3 症例の A 型肝炎について、各症例間の関連性を調査するために HAV の検出および分子疫学的解析を行った。また、カキ喫食に伴う HAV 感染リスクについて検討するために、生食用カキの HAV 汚染およびカキ関連食中毒患者における HAV 感染を調査した。

#### B. 研究方法

## 1. 材料

2010年4月～6月に認められたA型肝炎3症例(表1)の糞便材料および2004年12月以降に当研究所に搬入されたカキ関連食中毒30事例の患者糞便材料76検体を対象とした。

国産生食用カキは、2010年12月初旬に市販されていた9ロットについて、1ロットにつきカキ3個をまとめて、HAVの検査に用いた。9ロットの産地は、広島県産3ロット、岡山県産2ロット、兵庫県産2ロット、三重県産1ロット、宮城県産1ロットであった。

## 2. 患者糞便材料からのHAV検出

HAVの検査には、西尾らのリアルタイムRT-PCR (IASR 23, 274-5, 2002)、VP1-2A領域(病原体検出マニュアル, 急性ウイルス肝炎, 6-14)およびVP3-VP1領域(Mol Cell Probes 8, 117-24, 1994)におけるnested-PCRを用いた。カキ関連食中毒事例については、リアルタイムRT-PCRのみで検査した。さらに増幅された特異的PCR産物は、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、遺伝子系統解析により型別した(JGV 73, 1365-77, 1992)。

## 3. カキからのHAV検出

カキは、むき身カキから中腸腺を摘出し、凍結融解により粉碎した後、PBS(-)で30-40%乳剤を作製し、野田ら(広島市衛生研究所年報 25, 35-43, 2006)のアミラーゼ処理・PEG法を用いて前処理を実施した。即ち、上記カキ乳剤に25mgの $\alpha$ -アミラーゼを加えて、37°Cで60分間攪拌し、グリコーゲンの消化を行った。アミ

ラーゼ処理後、10,000rpm 20分間遠心した上清にPEG溶液(最終濃度12%PEG#6000および1M NaCl)を加え、4°Cで2-3時間放置した。さらに4°C 10,000rpm 20分間遠心した沈渣に0.4mlのDEPC処理水を加え、RNA抽出用試料とした。

ウイルスRNAの抽出にはHigh Pure Viral RNA kit (Roche)、抽出したRNAのDNase処理にはTurbo DNA-free kit (ABI)、cDNAの作製にはHigh-Capacity cDNA RT kit (ABI)、HAV検査にはリアルタイムRT-PCRおよびVP3-VP1領域のnested-PCRを用いた。

(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. A型肝炎3症例の分子疫学的解析

検査を実施した3症例は、いずれかの方法でHAV遺伝子が検出され、異なる遺伝子型に分類された(表2)。VP1-2A領域のnested-PCRで陰性となった症例1および3は、国立感染症研究所においてAntigen capture等による再検査を実施し、陽性となった。リアルタイムRT-PCRで陽性となった症例1および2の糞便1gあたりのウイルスRNAコピー数は、それぞれ $4.8 \times 10^5$ 、 $1.7 \times 10^7$ であった。

### 2. 生食用カキのHAV汚染状況

2010年12月初旬に市販されていた国産生食用カキから、HAV遺伝子は検出されなかった。一方でノロウイルスは7ロット(77.8%)から検出された。表3には、

2000-2001 シーズンから今シーズン（2010-2011）までの9シーズン（2004-2005 および 2005-2006 シーズンを除く）にわたる国産食用カキからのHAV 検出状況を示した。9シーズンで、214ロットのカキを検査し、2ロット（0.9%）からHAV 遺伝子が検出された。2000-2001シーズンについてはリアルタイム RT-PCR を実施していないため、カキに含まれていたウイルス量は不明であるが、2002-2003 シーズンに検出された HAV はカキ1個あたり3コピーであり、微量な汚染であった。検出されたHAV 遺伝子は、すべて1A型に分類され、1株（図1, OY02-1）は、2006年型1AのFH1株（GenBank accession no. AB020567）と同じ塩基配列であったが、もう一方の株（図1, OY01-14）は過去に検出された株と特に近縁な株は認められなかった。

### 3. カキ関連食中毒事例からの HAV 検出状況

2004年12月以降に発生したカキ関連食中毒事例患者から、HAV 遺伝子は検出されなかった（表4）。一方でノロウイルスは、27事例（90.0%）55検体（72.4%）から検出された。

### D. 考察

大阪市で認められたA型肝炎3症例は、患者情報から、ウイルスが経口感染したものと考えられたが、原因となった食品などの感染源は特定できなかった。また、検出されたHAVの遺伝子型がすべて異なっていたことから、3症例に疫学的な関連性はなく、個別の感染によるものであ

たと考えられた。症例1および2については、渡航歴がないことから感染地域は国内と推定された。症例1の3A型は、従来日本ではまれであったが、2007および2008年に韓国で検出された株（GenBank accession no. GU991288、GU991309、GU991321）と非常に近縁であった（塩基配列相同性99.6%以上）。3A型は韓国において2008年頃から大きく増加していることから（J Bacteriol Virol 39, 165-71, 2009, J Clin Virol 46, 184-8, 2009）、今後注意を要する株であると考えられた。症例2の1A型は、世界各地で広く検出されている型であり、日本においても最も多く検出されている（IASR 21, 74, 2000）。今回検出された1A株は、2006年に新潟県など国内で検出された1A株と近縁であった。症例3については、海外渡航時期と推定感染時期が一致すること、および1B型が国内ではほとんど認められず、海外で検出されている型であることから渡航地域での感染が強く疑われた。1B型については2009年からトルコ産セミドライトマトを介した食中毒がオーストラリア（ProMED-mail 20090522.1917, 20091104.3811, 2009）やフランス（Health Protection report 4(10), 2010）などで発生しており、感染拡大が危惧されている。

今回実施したHAVの分子疫学的解析は、各症例間の関連性や感染地域の推定に有用であった。A型肝炎は潜伏期間が長く、感染源や感染経路の特定が非常に困難であるため、患者から検出されたウイルスの分子疫学的解析が原因究明に重要な情報になると考えられた。しかし、分子疫