

学的解析に適した VP1-2A 領域の nested-PCR は、3 種類の遺伝子検査法の中で最も検出率が低かった。A 型肝炎の感染源・汚染経路の特定やリスク評価には、分子疫学的解析に適した領域において検出感度が高い検査方法を確立する必要がある。

カキ関連食中毒事例および市販生食用カキにおけるウイルス検査結果から、ノロウイルスの場合はカキ喫食に伴う食中毒発生やノロウイルス感染のリスクが高いことが示されたが、HAV の感染リスクは非常に低いことが示唆された。また、カキ関連食中毒事例の患者から HAV が検出されなかったことについては、多くの糞便採取時期が喫食から約 1 週間以内であり、HAV が糞便中へ排出される前の時期であったことが影響していると考えられた。カキ以外に輸入生鮮魚介類の 0.7% に HAV 汚染が認められる報告（食品衛生研究 58, 222-30, 2008）もあるため、今後は HAV 汚染が疑われる輸入食品の汚染実態を明らかにしていく必要があると考えられた。

#### E. 結論

- ・患者情報および検出された HAV の遺伝子型から、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ると考えられた。
- ・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特定に有用であった。
- ・生食用カキ喫食に伴う 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 型肝炎の感染源・汚染経路の特定やリ

スク評価には、信頼性の高い検査法の確立が重要であり、さらなる検査法の検討が必要である。

・食品からの HAV 感染のリスク評価には、カキ以外に輸入生鮮魚介類など汚染が疑われる食品の汚染実態調査を継続して実施していく必要があると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 入谷展弘, 改田厚, 久保英幸, 阿部仁一郎, 西尾治, 後藤薫, 長谷篤:市販生食用カキにおけるノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルス汚染調査 (2006-2007 ~2009-2010 シーズン), 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 平成 21 年度版 第 72 集, 7-12 (2010)
- 2) 入谷展弘, 久保英幸, 改田厚, 関口純一郎, 後藤薫, 長谷篤, 齊藤武志, 石黒正博, 鎌倉和哉, 吉田英樹, 清原知子, 石井孝司, 野田衛: 大阪市内で認められた A 型肝炎 3 症例について, IASR 31(No. 368), 296-297 (2010)
- 3) 石井孝司, 清原知子, 吉崎佐矢香, 佐藤知子, 脇田隆字, 中村奈緒美, 島田智恵, 中島一敏, 多田有希, 野田衛, 三上稔之, 齊藤哲也, 山崎彰美, 埼玉県衛生研究所, 清水英明, 宇宿秀三, 長岡宏美, 吉田徹也, 岡村雄一郎, 小原真弓, 柴田伸一郎, 楠原一, 近野真由美, 入谷展弘, 奴久妻聡一, 川西伸也, 榑原啓子, 榑本義正, 岡本玲子, 世良暢之, 川本大輔, 増本久人, 上村晃秀: 2010 年春季に日本で多発した A 型肝炎の分子疫学的解析, IASR 31(No. 368), 287-289 (2010)

## 2. 学会発表

- 1) 入谷展弘, 改田厚, 久保英幸, 阿部仁一郎, 西尾治, 後藤薫, 長谷篤: 市販生食用カキにおけるノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルス汚染調査 (2006-2007~2009-2010 シーズン), 平成 22 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会総会, 奈良 (2010. 9. 17)
- 2) 野田衛, 片山和彦, 石井孝司, 岡智一郎, 多田有希, 山下和予, 三瀬敬治, 吉澄志摩, 植木洋, 林志直, 山崎匠子,

小原真弓, 吉田徹也, 小林慎一, 中田恵子, 入谷展弘, 三好龍也, 阿部勝彦, 山下育孝, 糸数清正, 岡部信彦: 塩基配列情報共有化の食品媒介ウイルス感染症の疫学調査への応用, 第 31 回日本食品微生物学会, 大津 (2010. 11. 11-12)

## 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

表 1. 大阪市で認められた 3 症例の A 型肝炎

	症例 1	症例 2	症例 3
年齢	26 歳	57 歳	31 歳
性別	男性	男性	男性
海外 渡航歴	なし	なし	エジプト・トルコ滞在 (4 月末～5 月上旬)
発症時期	4 月下旬	5 月初旬	不明 (帰国後発症)
症状	発熱、黄疸、嘔吐 肝機能障害	発熱、黄疸、 肝機能障害、肝腫大	発熱、黄疸、下痢、 肝機能障害、肝腫大
推定感染 時期	3 月～4 月	不明	海外渡航時
HAV IgM 抗体検査	陽性	陽性	陽性
備考	推定感染時期に魚介類 の喫食あり		

表 2. A 型肝炎 3 症例の検査結果および遺伝子型

症例	糞便 採取日	HAV 遺伝子検査			遺伝子型
		リアルタイム RT-PCR (ウイルス量) <sup>1)</sup>	nested-PCR VP1-2A	nested-PCR VP3-VP1	
1	5/11	+ (4.8x10 <sup>5</sup> )	-(+) <sup>2)</sup>	+	3A
2	5/20	+ (1.7x10 <sup>7</sup> )	+	+	1A
3	6/16	-	-(+)	+	1B

1) 糞便 1g あたりの HAV RNA コピー数

2) Antigen capture 等による再検査結果

表 3. 9 シーズンにおける国産市販生食用カキからの HAV 検出状況<sup>1)</sup>

2000 -01	2001 -02	2002 -03	2003 -04	2006 -07	2007 -08	2008 -09	2009 -10	2010 -11	合計
1/11 <sup>2)</sup> (9.1%)	0/35	1/35 (2.9%)	0/35	0/24	0/24	0/23	0/18	0/9	2/214 (0.9%)

1) 2000-01 ~ 2003-04 シーズンは 10 月から翌年 3 月までの期間、2006-07 ~ 2009-10 シーズンは 12 月~翌年 1 月までの期間、2010-11 シーズンは 12 月に市販されていた生食用カキを調査した。

2) HAV 陽性ロット数/検査ロット数

表 4. カキ関連食中毒事例からの HAV およびノロウイルス検出結果

	HAV 検査数	HAV 陽性数	ノロウイルス 陽性数
カキ関連食中毒事例	30	0	27 (90.0%)
患者糞便検体	76	0	55 (72.4%)

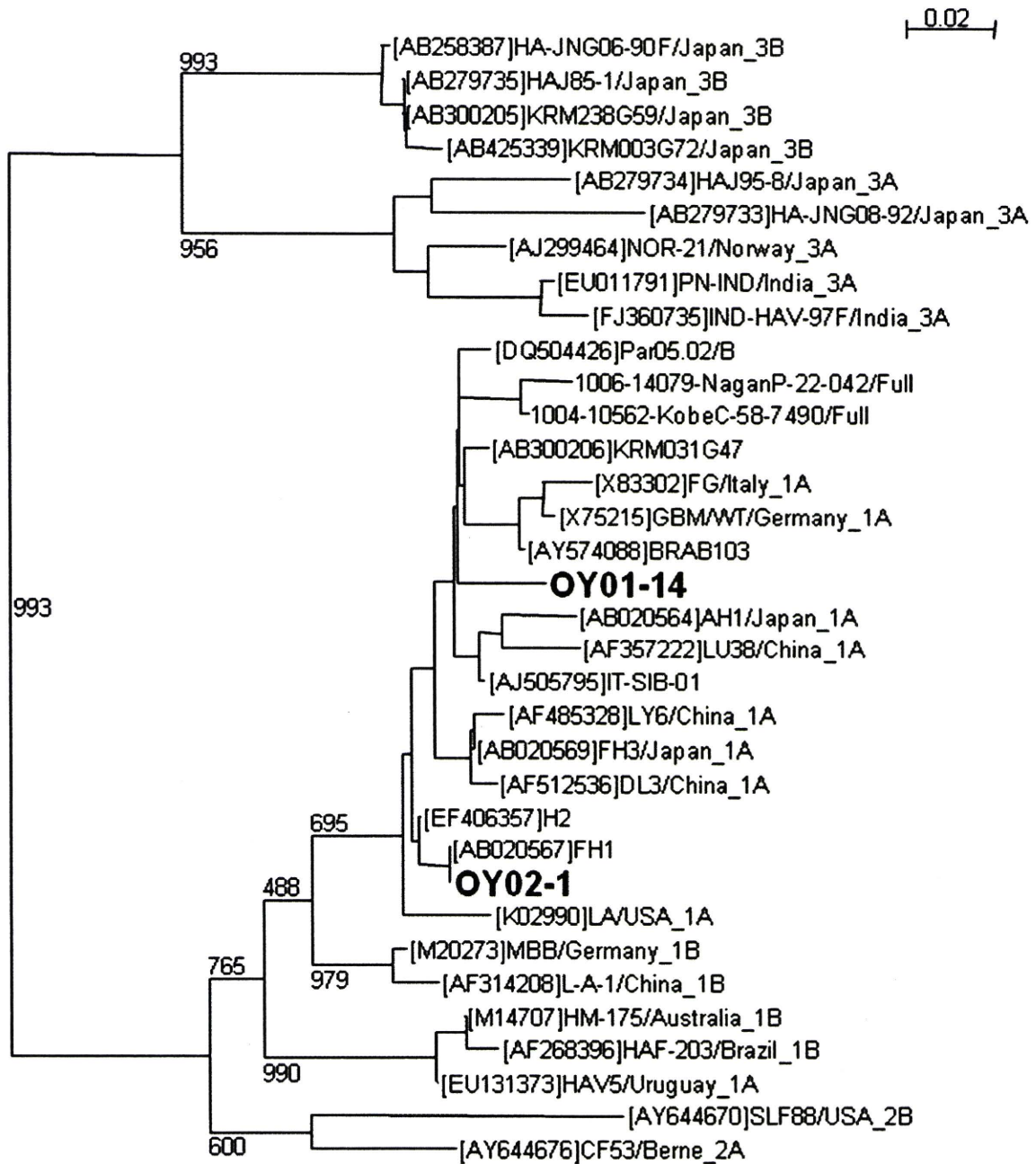


図1 国産市販生食用カキから検出された HAV 遺伝子 (OY01-14 株および OY02-1 株) の VP3-VP1 領域における分子系統樹

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」  
研究協力報告書

長野県における A 型肝炎事例の疫学的分析

研究協力者	吉田 徹也	(長野県環境保全研究所)
研究代表者	野田 衛	(国立医薬品食品衛生研究所)
研究協力者	宮坂たつ子、畔上 由佳、内山友里恵、笠原ひとみ、 上田ひろみ、長瀬 博、藤田 暁	(長野県環境保全研究所)
	石井 孝司	(国立感染症研究所)

研究要旨

2010 年春期に長野県内において、A 型肝炎患者 3 例の届出があった。疫学調査の結果、3 例中 2 例は海外渡航歴があり、患者糞便から検出された A 型肝炎ウイルス (HAV) はそれぞれ遺伝子型 I A および III A に分類された。海外渡航歴のなかった 1 例は、発病の約 1 か月前にアサリの生塩漬けを喫食しており、検出された HAV の遺伝子型は III A に分類された。遺伝子型 I A に分類された 1 株は、2010 年我が国における主流株やフィリピン河川水由来株と同じクラスターに分類された。

疫学情報と HAV の遺伝子型等の情報が迅速かつ広域に収集・解析されることにより、原因究明や予防対策に役立つと考えられた。

A. 研究目的

2010 年第 10 週以降、A 型肝炎患者報告数が西日本を中心に急増し、長野県内においても同時期に A 型肝炎患者 3 例の届出があった。これら患者の感染経路や感染源を明らかにし、食品衛生上の予防対策を講じるための基礎的データとするために、疫学調査と併せて、病因学的解析および遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

1. 材料

2010 年 4 月～5 月にかけて長野県内の医療機関から A 型肝炎として届出のあった患者糞便 3 検体を検査材料とした。糞便は PBS (-) で 10% 程度の乳剤とし、4℃ で 10,000rpm、20 分間遠心分離し、その上清を RNA 抽出試料として用いた。

2. RNA 抽出、DNase 処理および RT 反応

RNA の抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) により行った。抽出した RNA 溶液は DNase (Takara) によって処理され、さらに SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) および

Random hexamer を用いて cDNA を合成した。

### 3. HAV ウイルス検索方法

HAV の同定は病原体検査マニュアル(国立感染症研究所ウイルス第二部(2006))に準じ、Nested RT-PCR 法で実施した。

### 4. 遺伝子解析方法

HAV の遺伝子解析は、HAV+2907/HAV-3186 プライマーにより VP1-2A 領域の一部を増幅し、その PCR 産物をダイレクトシーケンス法により約 230nt の塩基配列の決定を行った。その後、遺伝子型別および分子系統樹解析を行った。

### 5. 疫学調査

疫学調査は、患者の届出のあった医療機関を管轄する保健所において、患者に直接面会し聞き取りすることによって行われた。

(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. 疫学調査結果

3 例の A 型肝炎患者は女性 2 名(54 歳・20 歳)および男性 1 名(52 歳)で、2010 年 4 月 29 日から 5 月 19 日にかけて発病していた(表)。臨床症状は、黄疸、肝機能障害、発熱、倦怠感など、A 型肝炎に典型的な症状を呈していた。3 例中 2 例(患者 A および C)は海外渡航歴を認め、患者 A は韓国および台湾に、患者 C はフィリピンに渡航していた(表)。

### 2. HAV の検出および遺伝子解析結果

A 型肝炎患者 3 例から採取された糞便を用い、RT-PCR 法を実施したところ、す

べて HAV 遺伝子陽性となった。さらに、PCR 増幅産物の塩基配列を解読し系統樹解析を行ったところ、患者 A および B 由来株は遺伝学的に近縁で、いずれも遺伝子型 IIIA に分類された(図)。

一方、患者 C 由来株は遺伝子型 IA に分類され、ドイツにおいてフィリピン渡航者から検出された HAV-DE-2007/08-196 株(accession no. EU825856) および HAV-DE-2007/08-218 株(accession no. EU825857)と同じクラスターに属した(図)。

## D. 考察

疫学調査結果に遺伝子解析結果を加え、3 例の A 型肝炎患者における HAV の暴露時期あるいは感染源について検討した。

患者 A は韓国と台湾に渡航歴を認めたが、A 型肝炎の潜伏期間を考慮すると、患者 A の台湾への渡航は短期間で、しかも発病直前であったことから、HAV 曝露との因果関係は考えられなかった(表)。また、当該患者から検出された HAV の遺伝子型は IIIA に分類された(図)。近年韓国では若年層を中心に A 型肝炎が流行し、患者から検出された HAV 株の多くは遺伝子型 IIIA に属したとの報告がされている(K-O Lee, *et al.*, J Bact Virol 39: 165-171 (2009))。これらのことから、患者 A は韓国滞在期間中に、同国内で流行していた HAV 株に感染した可能性が否定できないと考えられた。

患者 B の渡航歴は認められなかったが、発病の約 1 か月前に「あさりの生塩漬け」を喫食していたことが聞き取り調査で明らかになった(表)。当該あさりの遡り調

査は、患者の記憶が定かでないことから実施できず、二枚貝の産地等の情報は得られなかったものの、これが感染源となった可能性が推定された。

患者Cは非常に長期間フィリピンに滞在(2009年11月～2010年5月18日)し、さらに帰国日の翌日に発病したことから、HAVによる暴露はフィリピン国内であったと強く示唆された(表)。また、患者C由来株は遺伝子型IAに分類され、ドイツにおいてフィリピン渡航者から検出されたHAV-DE-2007/08-196株(accession no. EU825856)およびHAV-DE-2007/08-218株(accession no. EU825857)と同じクラスターに属した(図)。また、図には示していないものの、患者C由来株はフィリピンの河川水から検出された株とも近縁であった。これらの遺伝学的解析結果は、患者Cがフィリピン国内でHAVに感染したことを強く裏付けるものであると考えられた。

今年、我が国で流行しているHAV株の多くは遺伝子型IAに分類され、患者C由来株に近縁との解析結果が示されている。今後、さらに詳細で広範囲な遺伝学的解析と疫学解析が行われることによって、A型肝炎患者急増の原因究明につながると考えられる。

#### E. 結論

2010年春期に長野県内で3例のA型肝炎事例が発生した。

疫学調査の結果、3例中2例は海外渡航歴があり、患者糞便から検出されたA型肝炎ウイルス(HAV)はそれぞれ遺伝子型IAおよびⅢAに分類された。

海外渡航歴のなかった1例は、発病の約1か月前にアサリの生塩漬けを喫食しており、検出されたHAVの遺伝子型はⅢAに分類された。

遺伝子型IAに分類された1株は、2010年我が国における主流株やフィリピン河川水由来株と同じクラスターに分類された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 吉田徹也, 宮坂たつ子, 畔上由佳, 内山友里恵, 笠原ひとみ, 上田ひろみ, 長瀬博, 藤田暁, 石井孝司, 野田衛: 長野県におけるA型肝炎事例の疫学的分析. 病原微生物検出情報, 31: 294-295, 2010.

2) Tetsuya Yoshida, Tatsuko Miyasaka, Yuka Azegami, Yurie Uchiyama, Hitomi Kasahara, Hiromi Ueda, Koji Ishii, Mamoru Noda: Investigation of epidemiology and HAV genomes regarding three hepatitis A infections that occurred in April-May, 2010. Jpn J Infect Dis, (submitted).

##### 2. 学会発表

#### 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



表 HAV患者の疫学情報および遺伝子型別結果

患者	性別	年齢	発病年月日	海外渡航歴		二枚貝生食 喫食物 (時期)	ウイルス株名	遺伝子型
				渡航先	渡航期間			
A	女性	54	'10/04/29	韓国 台湾	'10/04/04~04/07 '10/04/26~04/28	無	1005-12275-NgnP-22-035	ⅢA
B	男性	52	'10/05/13		無	あさりの生塩漬け (4月中旬)	1006-13956-NgnP-22-041	ⅢA
C	女性	20	'10/05/19	フィリピン	'09/11/??~'10/05/18	不明	1006-14079-NgnP-22-042	I A

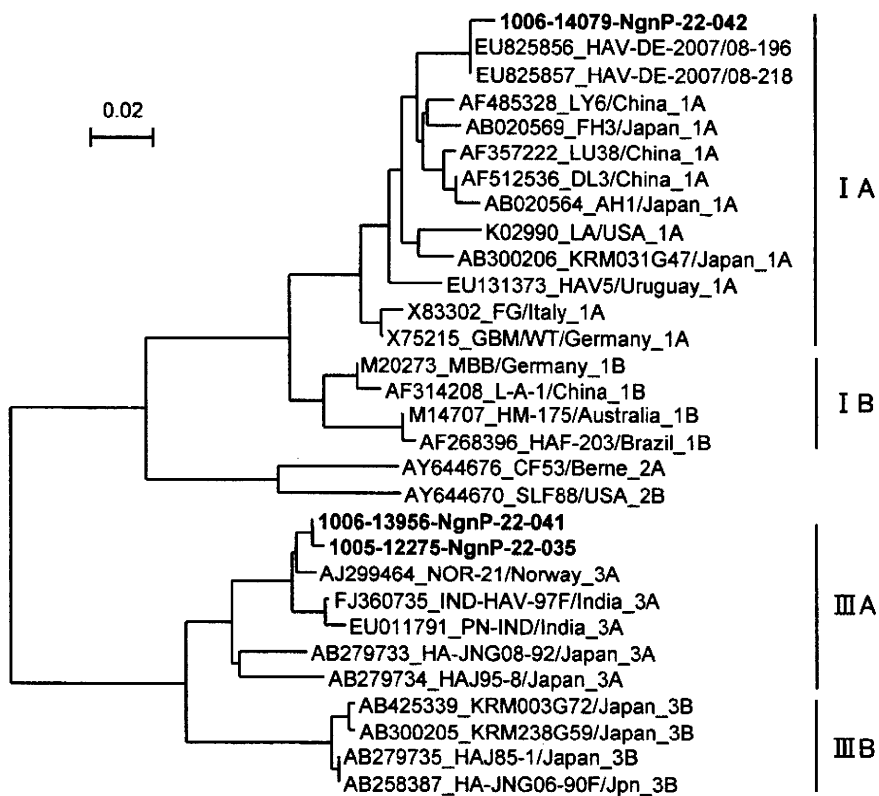


図 HAV の VP1-2A 領域の一部約 230nt の塩基配列に基づく系統樹解析結果

系統樹は neighbor-joining 法を用い、1,000 回ブートストラップを行った。図示していないが、out group として Avian encephalomyelitis virus (accession no. AY275539) を用いた。

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

寿司店を原因施設とする A 型肝炎ウイルス食中毒事例

研究協力者	田中 俊光	千葉県環境保健研究所
研究協力者	横井 一	千葉県環境保健研究所
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

2011 年 1 月に千葉市内の寿司店を原因施設とする A 型肝炎ウイルス (HAV) による食中毒事例が発生した。患者便 31 検体、寿司店従事者便 34 検体、患者家族便 27 検体、寿司店の拭き取り 6 検体、及び参考食材 5 検体の計 103 検体について HAV 遺伝子の検出を行った。その結果、患者便 31 検体、寿司店従事者便 3 検体、患者家族便 1 検体の計 35 検体から HAV 遺伝子が検出され、系統解析が可能であった 34 検体はすべて IA に分類された。

A. 研究目的

同時期に複数の医療機関から A 型肝炎の発生届が出された事例において、患者便からの HAV 遺伝子の検出、及び系統解析を行うことにより、保健所の疫学調査を支援し、感染源の究明、並びに感染の拡大防止の一助とすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 事例の概要

2011 年 1 月 21 日に市内の医療機関から千葉県保健所に 4 件の A 型肝炎発生届が出された。保健所が当該患者 4 名の聞き取り調査を実施したところ、発症がほぼ同時期であること、隣接地域内に居住していることが判明した。その後、1 月 26 日までに同医療機関を含む 5 医療機関か

ら 12 件の A 型肝炎発生届が出され、調査の結果、届出患者 16 名のうち 14 名は 1 月 8 日から 19 日にかけて食欲不振、発熱、肝機能異常等の症状を呈していること、居住区が一部の区域に限局していることが判明した。更に喫食調査の結果、患者 14 名中 10 名が 2010 年 12 月に同一の市内寿司店を利用していることが確認された。以上のことから保健所は患者、患者家族の検便及び行動調査、並びに当該寿司店の施設拭き取り、食材の採取と従事者の検便を実施した。検査の結果、患者及び調理従事者のふん便から HAV が検出されたことを踏まえ (表 1)、2011 年 1 月 28 日付けで当該寿司店を原因施設とする食中毒と断定し、3 日間の営業停止措置を行った。

なお、感染症法に基づく本市の A 型肝炎の発生届は、2011 年 1 月 1 日から 1 月 20 日までは 0 件であったが、本事例の初発の届けである 1 月 21 日から 2 月 20 日現在までの 1 ヶ月間で 45 件あり、保健所は感染経路の解明や、感染源の特定などの詳細な調査を現在も継続している。

## 2. 材料

保健所が同意を得た上で採取した患者便 31 検体、寿司店従事者便 34 検体、患者家族便 27 検体の計 92 検体のふん便、及び保健所が 2011 年 1 月 25 日付けで採取した寿司店の拭き取り 6 検体、参考食材 5 検体の計 103 検体を用いた。ふん便については PBS(-) で 10% 乳剤を作成し、遠心分離を行った上清、拭き取りは Nylon Regular Flocked Swab (Copan) で施設を拭き取り、1ml の PBS(-) に良く浸し、攪拌後に遠心分離を行った上清、参考食材は等量の PBS(-) で表面を良く洗い、その 20ml を超遠心法で濃縮して 200 $\mu$ l にしたものを検査材料とした。

## 3. 方法

検査は厚生労働省通知（平成 21 年 12 月 1 日付 食安監発第 1201 第 2 号）に準拠して行った。検査材料各 200 $\mu$ l から High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いてウイルス核酸を抽出し、DNase I 処理後、Super Script III (Invitrogen) で逆転写を行い cDNA を得た。この cDNA を用いてリアルタイム PCR を実施した。また、リアルタイム PCR で HAV 遺伝子が検出された cDNA については PCR を実施し、その産物について High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) で精製した後、Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied

Biosystems) を用いてシーケンス反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を使用してダイレクトシーケンス法により塩基配列の決定をした。得られた塩基配列については DDBJ の BLAST で検索を行い、既知のウイルスとの相同性を確認した。なお分子系統樹は MEGA4 を使用し、Clustal W によるアライメント後、NJ 法により作成した。

## (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

患者便 31 検体、寿司店従事者便 3 検体、患者家族便 1 検体の計 35 検体からリアルタイム PCR で HAV 遺伝子が検出された(表 1)。拭き取り 6 検体、参考食材 5 検体はすべて陰性であった。なお、保健所のその後の調査により、HAV 陽性の患者家族 1 名は、当該寿司店を利用していることが判明した。

HAV 陽性の 35 検体のうち、解析可能だった 34 検体の塩基配列の解析の結果、患者便 2 検体に 1 塩基の置換が見られたが、残り 32 検体は 100% 一致し、34 検体すべてが genotype IA に分類された。また、当該寿司店を利用した市外在住の患者について、千葉県、横浜市、東京都から塩基配列情報の提供を得て、解析を行ったところ、千葉県患者 2 検体、横浜市患者 1 検体、東京都患者 1 検体と 100% 一致した。

これらの株は過去に大阪市で報告された 1005-13313-OsakaC-100142 と 100% の相同性を示した。また、長野市で報告さ

れた 1012-37891-NaganC-102 と 1 塩基異なるものであった。千葉市に関連する株とも解析を行ったが、2010 年 6 月に本市で散発した株や、2007 年から 2008 年に千葉市内でサンプリングした輸入冷凍ブラックタイガー（ウシエビ）から検出された株とは異なるものであった（図 1, 2）。

#### D. 考察

本事例については千葉市保健所の調査が現在も継続中であるため、喫食状況等の詳細なデータが示せないが、千葉市内の患者 32 名（うち 1 名は患者家族便として採取）と、市外在住の患者 4 名の計 36 名のうち、35 名が 2010 年 11 月から 12 月までの期間に当該寿司店を利用していること、更に 33 名のふん便から検出された HAV の塩基配列と、寿司店従事者 3 名のふん便から検出された HAV の塩基配列が完全に一致したこと、また、この寿司店従事者 3 名は調理を担当していたことから、本事例は当該寿司店が提供した料理を原因とした食中毒であることが判明した。A 型肝炎は HAV の暴露から発症までの潜伏期間が長く、感染源を特定するには非常に困難を極めるケースが多い。本事例は同時期に複数の医療機関から A 型肝炎発生届が出されたことに対して、保健所の迅速な調査と衛生研究所の速やかな検査対応によって、原因施設が判明した貴重なケースであると言える。なお、本事例は 2010 年に我が国で広域に流行した IA-2 クラスターや IIIA と異なっていたが、2000 年以降国内各地で報告されている IA-1 に分類され、特に 2010 年 5 月に大阪市で散発した事例や 2010 年 12 月に

長野市で散発した事例と高い相同性を示している。本市事例を含むこれらの事例の疫学的な関連性については今後の調査が期待されるところである。

#### E. 結論

2011 年 1 月に千葉市内の寿司店を原因施設とする HAV による食中毒事例が発生した。患者便 31 検体、寿司店従事者便 34 検体、患者家族便 27 検体、寿司店の拭き取り 6 検体、及び参考食材 5 検体の計 103 検体について HAV 遺伝子の検出を行った。その結果、患者便 31 検体、寿司店従事者便 3 検体、患者家族便 1 検体の計 35 検体から HAV 遺伝子が検出され、系統解析が可能であった 34 検体は、すべて IA に分類された。千葉市保健所は患者が同一の寿司店を利用しており、患者に共通する食事は当該寿司店が 2010 年 11 月下旬から 12 月中旬にかけて提供した食事に限られていること、患者及び調理従事者の便から HAV が検出されたこと、患者を診察した医師から食中毒患者等届出票が提出されたことから、当該寿司店を原因とする食中毒と断定し、2011 年 1 月 28 日から 1 月 30 日までの 3 日間の営業停止措置を行った。

#### 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

## 謝辞

本研究報告書を作成するにあたり、塩基配列等の貴重なデータを提供して下さいました千葉県衛生研究所 涌井 拓 先生、高木 素 先生、小川 知子 先生、横浜市衛生研究所 宇宿 秀三 先生、東京都立健康安全研究センター 新開 敬行 先

生、神奈川県衛生研究所 片山 丘 先生、古屋 由美子 先生、川崎市衛生研究所 清水 英明 先生、長野市環境衛生試験所 岡村 雄一郎 先生、新潟市衛生環境研究所 齊藤 哲也 先生、大阪市立環境科学研究所 入谷 展弘 先生、佐賀県衛生薬業センター 増本 久人 先生に深謝いたします。

表 1.HAV 陽性検体一覧

検体番号	年齢	性別	届出年月日	発症年月日	検体採取日	copies/cDNA	sequence	NESID-ID
58013	44	男	2011/1/31	-	2011/1/26	$5.3 \times 10^1$	I A	04662
58015	48	男	2011/1/28	2010/12/19	2011/1/26	$1.4 \times 10^4$	I A	04652
58032	20	男	2011/2/2	2011/1/28	2011/1/27	$3.5 \times 10^8$	I A	03465
KHAV1	37	女	2011/1/21	2011/1/8	2011/1/26	$2.7 \times 10^4$	I A	02334
KHAV2	56	女	2011/1/21	2011/1/15	2011/1/24	$5.0 \times 10^6$	I A	02330
KHAV3	43	男	2011/1/21	2011/1/9	2011/1/28	$4.1 \times 10^4$	I A	02335
KHAV4	43	男	2011/1/21	2011/1/12	2011/1/27	$7.9 \times 10^5$	I A	02333
KHAV5	61	男	2011/1/24	2011/1/9	2011/1/25	$3.0 \times 10^2$	I A	02505
KHAV6	43	男	2011/1/24	2011/1/14	2011/1/25	$3.1 \times 10^5$	I A	02507
KHAV7	54	男	2011/1/24	2011/1/13	2011/1/26	$4.0 \times 10^3$	I A	02506
KHAV9	56	女	2011/1/24	2011/1/18	2011/2/3	$6.4 \times 10^5$	I A	02606
KHAV10	21	男	2011/1/25	2011/1/15	2011/1/31	$1.9 \times 10^3$	I A	02624
KHAV12	61	男	2011/1/25	2011/1/10	2011/1/28	$3.5 \times 10^5$	I A	02743
KHAV13	42	男	2011/1/26	2011/1/17	2011/1/28	$8.7 \times 10^6$	I A	02749
KHAV14	55	女	2011/1/26	2011/1/16	2011/1/28	$4.8 \times 10^5$	I A	02744
KHAV15	43	男	2011/1/26	2011/1/10	2011/1/28	$2.9 \times 10^5$	I A	02745
KHAV17	28	女	2011/1/27	2011/1/17	2011/2/9	$5.0 \times 10^6$	I A	02968
KHAV19	31	女	2011/1/27	2011/1/21	2011/2/3	$4.1 \times 10^6$	I A	02970
KHAV20	35	男	2011/1/27	2011/1/18	2011/1/31	$2.9 \times 10^5$	I A	02971
KHAV21	61	男	2011/1/31	2011/1/18	2011/2/3	$9.7 \times 10^5$	I A	03259
KHAV22	54	男	2011/1/31	2011/1/20	2011/2/1	$1.1 \times 10^2$	-	03261
KHAV23	76	女	2011/1/31	2011/1/17	2011/2/7	$1.2 \times 10^3$	I A	03263
KHAV24	12	男	2011/2/1	2011/1/24	2011/2/2	$7.1 \times 10^2$	I A	03376
KHAV25	58	男	2011/2/2	2011/1/13	2011/2/4	$5.2 \times 10^1$	I A	03460
KHAV29	18	女	2011/2/2	2011/1/31	2011/2/10	$3.8 \times 10^5$	I A	03464
KHAV30	31	女	2011/2/3	2011/1/17	2011/2/8	$1.1 \times 10^5$	I A	03623
KHAV31	42	女	2011/2/3	2011/1/10	2011/2/8	$5.7 \times 10^4$	I A	03625
KHAV32	41	女	2011/2/4	2011/1/20	2011/2/10	$3.6 \times 10^4$	I A	03700
KHAV33	53	女	2011/2/4	2011/1/23	2011/2/7	$1.2 \times 10^5$	I A	03708
KHAV34	33	女	2011/2/7	2011/1/23	2011/2/8	$2.0 \times 10^5$	I A	03965
KHAV35	34	男	2011/2/7	2011/1/22	2011/2/10	$3.3 \times 10^5$	I A	03966
KHAV38	35	男	2011/2/10	2011/1/17	2011/2/17	$1.4 \times 10^3$	I A	04452
KHAV39	33	女	2011/2/10	2011/1/15	2011/2/17	$9.7 \times 10^4$	I A	04458
KHAV41	38	男	2011/2/17	2011/2/3	2011/2/18	$5.6 \times 10^3$	I A	05100
K107	43	女	2011/2/8	-	2011/1/31	$1.1 \times 10^5$	I A	04664

※検体番号 58013,58015,58032 は調理従事者。コピー数は cDNA 5  $\mu$ l 中の濃度を表わす。

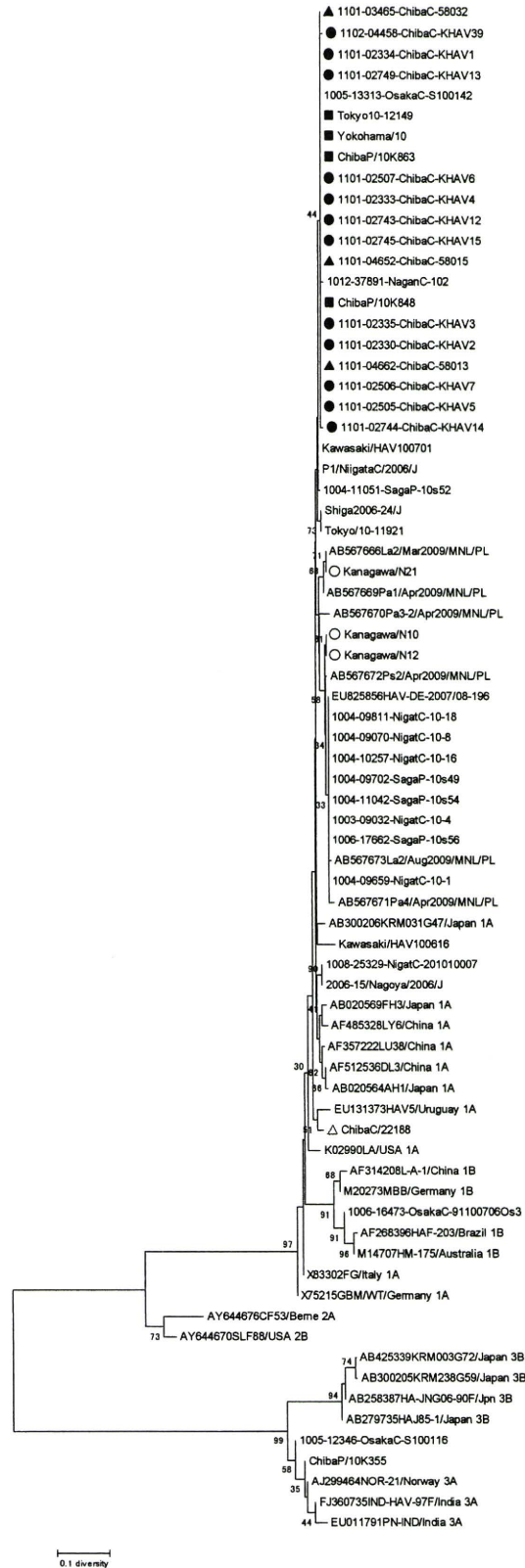


図 1.HAV の VP1-2A 領域の一部約 200nt の塩基配列に基づく分子系統樹

※ ● : 千葉市患者 (一部) ▲ : 調理従事者 ■ : 市外患者 ○ : ブラックタイガー由来 △ : 千葉市散发例



1101-04662-ChibaC-58013	TGT CAC AGA ACA ATC AGA GTT TTA TTT TCC TAG AGC TCC ATT AAA TTC AAA TGC CAT GTT GTC CAC TGA GTC CAT GAT
1101-04652-ChibaC-58015	.....
1101-03465-ChibaC-58032	.....
1101-02334-ChibaC-KHAV1	.....
1101-02330-ChibaC-KHAV2	.....
1101-02335-ChibaC-KHAV3	.....
1101-02333-ChibaC-KHAV4	.....
1101-02505-ChibaC-KHAV5	.....
1101-02507-ChibaC-KHAV6	.....
1101-02506-ChibaC-KHAV7	.....
1101-02743-ChibaC-KHAV12	.....
1101-02749-ChibaC-KHAV13	.....
1101-02744-ChibaC-KHAV14	.....
1101-02745-ChibaC-KHAV15	..... T ..
1102-04458-ChibaC-KHAV39	.....
ChibaP/10K848	.....
ChibaP/10K863	.....
Yokohama/10	.....
Tokyo10-12149	.....
1005-13313-OsakaC-S100142	.....
1012-37891-NaganC-102	..... T ..
1101-04662-ChibaC-58013	GAG TRG AAT TGC AGC TGG AGA TTT GGA GTC ATC GGT GGA TGA TCC TAG ATC AGA GGA GGA CAG AAG ATT TGA GAG TCA
1101-04652-ChibaC-58015	.....
1101-03465-ChibaC-58032	.....
1101-02334-ChibaC-KHAV1	.....
1101-02330-ChibaC-KHAV2	.....
1101-02335-ChibaC-KHAV3	.....
1101-02333-ChibaC-KHAV4	.....
1101-02505-ChibaC-KHAV5	.....
1101-02507-ChibaC-KHAV6	.....
1101-02506-ChibaC-KHAV7	.....
1101-02743-ChibaC-KHAV12	.....
1101-02749-ChibaC-KHAV13	.....
1101-02744-ChibaC-KHAV14	.....
1101-02745-ChibaC-KHAV15	.....
1102-04458-ChibaC-KHAV39	..... T ..
ChibaP/10K848	.....
ChibaP/10K863	.....
Yokohama/10	.....
Tokyo10-12149	.....
1005-13313-OsakaC-S100142	.....
1012-37891-NaganC-102	.....

図 2. 解析した塩基配列の一部

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 型肝炎発症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

東京都における二枚貝類からの HAV 検出状況

研究協力者	森 功次	東京都健康安全研究センター
	秋場 哲哉	東京都健康安全研究センター
	永野 美由紀	東京都健康安全研究センター
	新開 敬行	東京都健康安全研究センター
	原田 幸子	東京都健康安全研究センター
	林 志直	東京都健康安全研究センター
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 3 月以降、A 型肝炎患者の発症数の増加が報告され、報告された患者のうち経口感染と推定された事例についてはカキの喫食歴のあるものが多くみられるとのことから、東京都における市販の生カキおよび集団胃腸炎事例に関連して得られた二枚貝類について A 型肝炎ウイルス (HAV) 遺伝子の検索を試みた。その結果、供試した 183 検体から HAV 遺伝子が検出されなかったことから、2009/2010 シーズンおよび 2010/2011 シーズンに東京都内で市販されていた、あるいは喫食されていた二枚貝類の HAV 汚染はなかったかあったとしても極めて少ないものであると推定された。

A. 研究目的

A 型肝炎は、海外で多くみられる水系感染のほか、環境中で A 型肝炎ウイルスに汚染された二枚貝等の食材の喫食に起因する事例や、感染している調理従事者に由来する事例などウイルス性胃腸炎と同様の感染経路により発生する疾患である。ウイルス性胃腸炎の発症数に比較すると件数は少ないものの、2010 年 3 月以降、A 型肝炎患者の発症数の増加が報告された。報告された患者のうち経口感染と推定さ

れた事例についてはカキの喫食歴のあるものが多くみられるとのことから、東京都における市販の生カキおよび集団胃腸炎事例に関連して得られた二枚貝類について A 型肝炎ウイルス (HAV) 遺伝子の有無を検索した。

B. 研究方法

1. 材料

2009 年度に得られた市販の生カキ 74 検体、集団胃腸炎事例に関連した二枚貝

類 51 検体、および 2010 年度(2010 年 4 月～2011 年 1 月)に得られた市販の生カキ 16 検体、集団胃腸炎事例に関連した二枚貝類 42 検体の計 183 検体について検査を実施した。内訳は別表の通りである。

## 2. real-time PCR 法

「A 型肝炎検査マニュアル(国立感染症研究所)」に記載されている、HAV+449/HAV-537 のプライマーペアと HAV+482-P-FAMプローブによる real-time PCR 法を用いた。

## 3. nested PCR 法

上記 A 型肝炎検査マニュアルに記載されている、HAV+2799/HAV-3273、HAV+2907/HAV-3162 のプライマーペアによる nested PCR 法を用いた。

### (倫理面への配慮)

本研究では食品を対象としており、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. real-time PCR 法による HAV 遺伝子検索

real-time PCR 法により HAV 遺伝子を検索したところ、検索した 183 検体すべてにおいて HAV 遺伝子は検出されなかった(表 1、2)。

### 2. nested PCR 法による HAV 遺伝子検索

nested PCR 法により HAV 遺伝子を検索したところ、検索した 183 検体すべてにおいて HAV 遺伝子は検出されなかった(表 1、2)。

## D. 考察

検索を試みた 183 検体は real-time PCR 法および nested PCR 法いずれの検査法を用いた場合においても HAV 遺伝子が検出されなかった。このことから、2009/2010 シーズンおよび 2010/2011 シーズンに東京都内で市販されていた、あるいは喫食されていた二枚貝類の HAV 汚染はなかったかあったとしても極めて少ないものと思われた。2002 年には中国産オオアサリ関連事例のような、ノロウイルス集団胃腸炎と関連した HAV による集団食中毒事例が発生した。しかし、2009/2010 シーズンおよび 2010/2011 シーズンとも二枚貝類の関与が推定される集団胃腸炎発生後に A 型肝炎が発生した集団事例は都内では現在のところ確認されていない。

今回の検索において HAV 遺伝子は検出されなかったが、二枚貝類等から HAV 遺伝子を検出した場合、情報を共有・還元できる手順が明らかになったことから、今後の行政的な連携が図りやすくなったものとする。

## E. 結論

検索した試料から HAV 遺伝子が検出されなかったことから、2009/2010 シーズンおよび 2010/2011 シーズンに東京都内で市販されていた、あるいは喫食されていた二枚貝類の HAV 汚染はなかったかあったとしても極めて少ないものと思われた。

## 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