

東京都内で発生したA型肝炎ウイルスによる食中毒2事例について

新開 敬行*, 貞升 健志*, 中村 敦子*, 山崎 清*,
村田 以和夫*, 諸角 聖**

The Case Study of Food Born Infection Caused by Hepatitis A Virus in Tokyo.

Takayuki SHINKAI*, Kenji SADAMASU*, Atsuko NAKAMURA*, Kiyoshi YAMAZAKI*
Iwao MURATA* and Satoshi MOROZUMI**

Keywords : A型肝炎ウイルス hepatitis A virus, ウイルス性食中毒 food born viral infection,
遺伝子解析 sequencing analysis

はじめに

我が国におけるA型肝炎ウイルス(HAV)感染症は、戦後の一時期に全国規模で蔓延していた。その後、上下水道の普及等、生活環境が整備されるに伴って沈静化した歴史がある。その推移は、1996年に行われた年齢階層別の全国A型肝炎抗体保有調査結果¹⁾からも知ることが出来る。この抗体保有調査結果から現在の抗体保有率を推測すると、50歳を境に急速に低下し、30歳代以下の抗体保有率は、わずか数%しかないことがうかがえ、若年層における感染防御能の低下が危惧されている²⁾。

近年、HAVによる肝炎の散発発生が全国各地でみられており、年間平均700例報告されている。本症散発発生の理由としては、海外から輸入される食材が大幅に増加したこと、交通機関の発達と冷凍保存技術の向上および輸入から国内流通、販売までの時間短縮等が考えられている。HAVはすでに食中毒の「病因物質」として指定された小型球形ウイルス(SRSV)に次いで、食中毒の原因となる「その他のウイルス」の一つとして注目を集めている。ウイルスが食中毒原因物質として追加された平成9年度以降、輸入食材が関与したと考えられるA型肝炎患者を含むウイルス性疾患患者の発生数は、海外で感染し国内で発症する他の輸入感染症と同様に増加傾向にある³⁾。しかしながら、HAVの潜伏期間は約1ヶ月と長く、検食用食材が長期保存されていないため、本症の感染経路および感染源の特定はこれまで極めて困難であった。2001年8月には東京都においてA型肝炎の散発事例が多発し、食品の関与が推測されたが原因の特定は出来なかった。

2002年4月に東京都においてHAVによる二つの集団食中毒事例が発生した。一つの事例は、参考食品からHAV遺伝子が検出された事例であり、他の一つは、当該飲食店の従業員および患者のふん便材料からHAV遺伝子が検出された事例である。検出された遺伝子を解析した結果、前

者はHAVを蓄積した二枚貝を原因とした食中毒であり、後者はHAVに感染した従業員を介した食品汚染による食中毒であることが推察された。これらの二事例から検出されたウイルス遺伝子を東京都において過去に流行したHAV株の遺伝子と比較検討したのでその概要を報告する。

材料と方法

1. 事例の概要

1) 事例1: 江戸川区内の飲食店で2002年3月中旬に中国産ウチムラサキ(通称:大アサリ)の紹興酒風味蒸しを含む会食料理を喫食した86名中44名が数日後に、腹痛、下痢、吐き気、おう吐等の食中毒症状を呈し、患者ふん便からSRSV遺伝子が検出された。原因食として疑われたウチムラサキの参考品からは、飲食店側の自主検査により貝毒ならびにSRSV遺伝子が検出されたことから、我々はウチムラサキの一斉検査と疫学調査を行った。その結果、食中毒発生から約1ヵ月後に同グループのうち4名と同飲食店従業員1名が共に急性A型肝炎を発症し、患者材料とウチムラサキの参考品からもHAVが検出された事例である。

2) 事例2: 2002年3月上旬に会社の会合で江東区内の寿司店から出前された寿司の喫食者、または同寿司店を訪れて「にぎり寿司」または「寿司ランチセット」を喫食した計23名(搬入検体は15名分)が約3週間後の3月末から4月にかけて38~39の発熱、倦怠感、黄疸、吐き気などの症状を呈しA型肝炎と診断された。疫学調査の結果、この寿司店の調理従事者2名もA型肝炎を発症していることが判明したが、後にこの2名中1人が集団発生以前の時期にA型肝炎を発症していた事実が明らかとなった事例である。

2. 検査材料

1) 事例1: 冷凍保存されていたウチムラサキ検体26件、

* 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター微生物部

A型肝炎発症者5名(SHA-1~SHA-5)から得られたふん便4件, 血清5件を材料とした。

2) 事例2: A型肝炎発症者17名(K-1~K-17)から得られたふん便19件および血清20件を材料とした。

3) 2001年~2002年に積極的疫学調査として搬入された検体: A型肝炎を発症した患者23名分のふん便および血清を材料とした。

3. 検体の前処理

ふん便にPBSを加え10%乳剤10mlを作成後HCFC141bを等量加えて振とうし, 3,000rpmにて遠心した。上清をさらに6,000rpmで遠心し, 得られた上清のうちの1mlに500μLのポリエチレングリコール液(1.2M NaCl添加24%ポリエチレングリコール6000)を加えAで一晩静置した。次に14,000rpmで20分間遠心し上清を除いた。沈査からのRNAの抽出には市販のRNA抽出試薬(セパジーンRVR:三光純薬)を用いた。血清については, 血清500μLに250μLのポリエチレングリコール液を加えた後, ふん便同様に処理しRNAを抽出した。

4. 遺伝子解析

遺伝子検出は, HAVのVP1-P2A領域を標的とし, Bruistenらの報告⁴⁷⁾を参考にしたsemi-nested-PCR法にて実施した(図1)。すなわち, プライマーBR-9と逆転写酵素により, ふん便および血清から抽出したRNAからcDNAを作成後, プライマーBR-5を加え, 94 1分, 53 1分, 72 1分を1cycleとし, 30cycle反応させた。この増幅産物5μLをさらにプライマーBR-5およびBR-6を用いて同条件で増幅した。増幅産物を2%アガロースゲルで電気泳動し, 特異バンドを確認後, 増幅産物すべてを低融点アガロースゲルで電気泳動し, 特異バンドを切り出してフェノール溶液および市販のDNA精製キット(QIAquick PCR Purification Kit: QIAGEN)によってDNA産物を精製した。精製したDNA産物は, プライマーBR-5およびBR-6を用いたdye terminator cycle sequencing法によるシーケンス反応を行い, ABI PRISM 310 genetic analyzerで塩基配列を決定した。

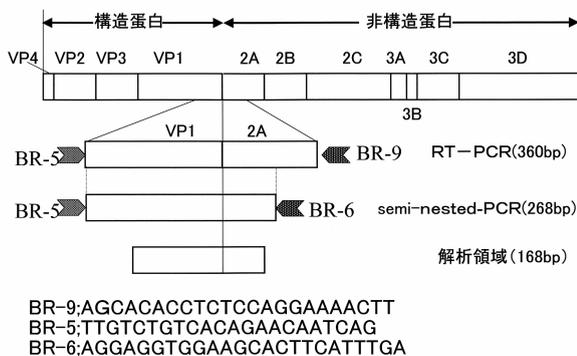


図1. A型肝炎ウイルス(HAV)の遺伝子コード地図と使用プライマー

得られたHAV塩基配列(168塩基)の結果は, NCBI

(DNAバンク)に登録されている既知HAVのVP1-P2A接合領域配列とともにclustalX(1.81)を用いた多重アライメント処理によって塩基配列相互の相同性を計算した。計算結果である距離係数に従って系統樹を作成し, 今回得られた遺伝子配列を比較検討した。

結果と考察

HAVは, 遺伝子解析の結果, 現在のところ7種類の遺伝子型()に分類されており, さらに型と型はAとBの亜型が確認されている。

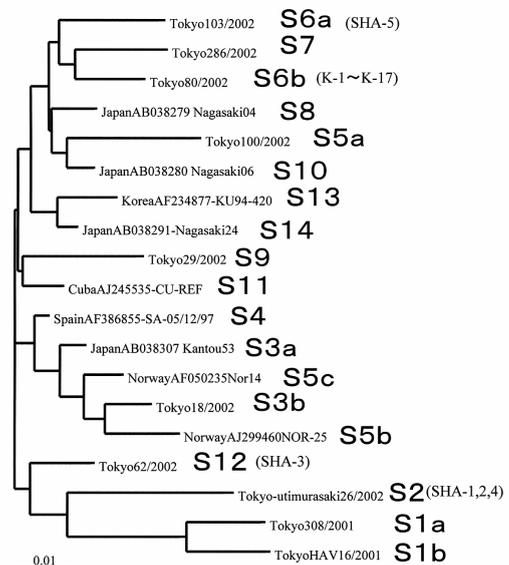
表1. 食中毒事例から検出されたHAV遺伝子型とサブグループ

事例	検体	検出された遺伝子	
		遺伝子型	サブグループ
1	ウチムラサキ*	A	S2
	SHA-1	A	S2
	SHA-2	A	S2
	SHA-3#	A	S12
	SHA-4	A	S2
	SHA-5	A	S6a
2	K-1~K-15	A	S6b
	K-16, 17#	A	S6b

* 参考品

SHA-3, K-16, 17は調理従事者

今回の調査で得られたHAVの遺伝子型は, 2事例ともにA型であった(表1)。また, 積極的疫学調査として搬入された散発例の遺伝子型もA型であった。感染経路の推定を行う目的で, 得られた全てのHAV遺伝子の塩基配列をサブグループ別に分類することを独自に試みたところ, 19種類(S1a~S14)のサブグループに分類することが出来た(図2)。



* 遺伝子系統樹上の株名は, 各サブグループの代表株名を表す

図2. HAV遺伝子(IA型)のサブグループ分類

1. 事例1の調査結果

発症者が喫食した残品は保存されていなかったが、参考品として検査した中国産ウチムラサキから検出された HAV 遺伝子の塩基配列は、遺伝子型 A 型、サブグループ S2 に属するものであった。一方、発症者のふん便および血清検体から検出された HAV 遺伝子の塩基配列は 3 種類のサブグループに分類された。すなわち、S2 型が 3 名 (SHA-1, 2, 4) から、S6a 型が 1 名 (SHA-5) から、S12 型が 1 名 (SHA-3) からそれぞれ検出された (図 2)。

本事例は、同一集団の感染事例であるにもかかわらず、発症者から 3 種類の HAV 遺伝子が検出されたことから、原因食とされたウチムラサキは様々な種類の HAV を蓄積しており、これを食したヒトが塩基配列の異なる HAV にそれぞれ感染した可能性があると推定された。

本事例は、2002 年 3 月末に、中国産ウチムラサキを原因食とする SRSV による食中毒事例として一旦処理された後に、同一集団から肝炎患者が発生した珍しい事例である。加えて、中国産二枚貝 (ウチムラサキが主) の緊急監視による参考品の検査によって、同食材から麻痺性貝毒やウイルス遺伝子 (SRSV と HAV) が検出されるなど、消費者が健康被害を受ける可能性が高い食材が流通していたことが明らかとなった。幸い、これらの検査結果等から、残りの在庫食材 (輸入凍結保管品) の全てが廃棄処分対象となり、汚染品の市場への拡散を水際で阻止する事に成功した事例である。患者から検出された HAV 遺伝子が 3 種類のサブグループ (S2, S6a, S12 型) に分かれることが明らかとなったため、原因食となったウチムラサキは、最低 3 つの型の HAV に汚染されていたものと推察された。本事例は、2002 年 4 月に浜松市で発生した A 型肝炎事例の原因食となったウチムラサキと同一産地から輸入されたウチムラサキに起因した事例であり、浜松の事例で検出された遺伝子と同じサブグループに属する遺伝子も一部検出されたことから、ウチムラサキによる広域散発発生 (defuse outbreak) に位置付けられる 1 事例ではないかと思われる。

2. 事例2の調査結果

本事例は、集団感染した発症者 17 名から採取したふん便および血清検体について HAV の遺伝子検査を行った結果、「にぎり寿司」等を媒介として 17 名 (K-1~K-17) が肝炎を発症したと推測された事例であった。遺伝子検査の結果は、遺伝子型、サブグループ型が全て同一 (S6b 型) であったことから (図 2)、単一暴露による可能性が強く示唆された。食中毒事件発生後の聞き取り調査および HAV 抗原抗体検査で、この寿司店の調理従事者 2 名 (K-16, 17) が A 型肝炎を発症していたことが明らかとなった。しかし、その内 1 名は自らの A 型肝炎発症を自覚しておらず、発症後も通常通りの勤務をしていたことから、HAV に感染した従業員によって汚染された寿司食材または調理器具を介した HAV の単一暴露が主原因であることが明らかとなった。本事例は、見かけ上は HAV に汚染された食品の喫食による集団感染と思われたが、調理従事者を介した感染事

例であったことが明らかになった事例である。

今回の調査では、A 型肝炎を発症後 70 日目のふん便および発症後 35 日目の血清からも HAV の遺伝子を検出することが出来た。このことから HAV 遺伝子は、発症後長期間ふん便や血清検体からの遺伝子検索が可能であることが判った。今回の経験から、A 型肝炎の遺伝子検査は、発症後 30 日目の検体でも十分に検索することが可能であり、また遺伝子解析を行うことは、「ウイルス性食中毒」の原因究明と感染経路の検索に極めて有用な手段となり得るものと思われる⁸⁾。

食品製造およびサービス業等の従事者がウイルス性疾患を発症した場合には、感染性を有したウイルス粒子の排出がないことを確認するまで就業を制限したり、感染拡大防止のために他の従事者の健康状況を速やかに調査する等の予防措置についても検討する必要がある。そのための方策の一つとして今回用いた遺伝子検査および遺伝子解析は十分な情報を提供できる方法であると考えられる。今後も本手法を、感染源の特定や感染経路の解明に活用していきたい。

結 論

2002 年 4 月に東京都において発生した感染経路が異なる二つの HAV 集団食中毒事例を経験した。

事例 1 は、参考食品であるウチムラサキから遺伝子型が A 型で、サブグループ S2 型の遺伝子が検出され、発症者から遺伝子型が A 型で、サブグループが S2, S6a, S12 型の遺伝子が検出されたことによりウチムラサキが原因食品と推定された事例である。

事例 2 は、当該飲食店の従業員および患者から同一の HAV 遺伝子が検出され、見かけ上は HAV に汚染された食品の喫食による集団感染と思われたが、HAV に感染していた調理従事者を介した感染事例と推定された事例である。

謝辞 本報をまとめるにあたり、御協力いただきました東京都健康局食品医薬品安全部食品監視課を始め、医療サービス部感染症対策課、江東区保健所、練馬区保健所、品川区保健所、江戸川区保健所、葛飾区保健所、川崎市、千葉市ならびに長野県の関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) T.Kiyohara, T.Satoh, H.Yamamoto, *et al*: *Jap. J. Med. Science and Biology*, **50(3)**, 123-131, 1997.
- 2) 飯野四郎: 臨床とウイルス, **23-Supplement**, 251-252, 1995.
- 3) The Topic of This Month: *IASR*, **23(11)**, 271-272, 2002.
- 4) 新開敬行, 森功次, 貞升健志他: 東京都立衛生研究所

- 年報, **50**, 28-32, 1999.
- 5) 戸塚敦子, 森次保雄: 臨床とウイルス, **23-Supplement**, 253-256, 1995.
- 6) S.M. Bruisten, J.E. van Steenbergen, A.S. Pijl, *et.al.*: *J. Med. Virol.* **63**, 88-95, 2001.
- 7) Robertson B.H., Jansen R.W., Khanna B., *et al*: *J. Gen. Virol.*, **73**, 1356-1377, 1992.
- 8) 新開敬行: 東京都微生物検出情報, **24-2**, 2003.