

二枚貝のアストロウイルスおよび A 型肝炎ウイルス汚染実態調査

若月紀代子¹・宮代守²・樋脇弘¹・武田昭¹

Survey of Astrovirus and Hepatitis A Virus in Bivalve Molluscan Shellfishes

Kiyoko WAKATSUKI, Mamoru MIYASHIRO, Hiroshi HIWAKI
and Akira TAKEDA

要旨

平成 12 年度から平成 14 年 1 月にかけて、二枚貝の買い上げまたは収去を行い、アストロウイルス(AstV)および A 型肝炎ウイルス(HAV)の汚染実態を調査した。AstV では RT-PCR, HAV ではリアルタイム PCR を用いて、ウイルス遺伝子を検出した。その結果, AstV については 94 検体中 2 検体からウイルス遺伝子が検出されたが, HAV では検査した 109 検体からは検出されなかった。

Key Words : アストロウイルス Astrovirus, A 型肝炎ウイルス Hepatitis A virus, 二枚貝 bivalve molluscan shellfish, 汚染 contamination

はじめに

材料および方法

急性胃腸炎患者の糞便から電子顕微鏡で検出される直径 40nm 以下の小型の球形状粒子、いわゆる小型球形ウイルスには、カリシウイルス科に属する Norwalk-like viruses (NLVs) や Sapporo-like viruses のほかに、アストロウイルス科に属するアストロウイルス (AstV) がある。この AstV は、1975 年に小児の下痢糞便中から発見されたもので、現在、その血清型は 1 ~ 8 型に分類されている。

一方、A 型肝炎ウイルス (HAV) はピコルナウイルス科のヘパトウイルス属に属し、経口感染により、発熱や全身倦怠感、下痢などを伴った急性肝炎を発症させる。

AstV, HAV とも食品衛生法上、食中毒の病因物質に指定されており、その汚染源の一つに二枚貝が推定されている。

今回は、市内に流通する二枚貝 (カキ、アサリ、ハマグリ、アカガイ) について、AstV と HAV の汚染実態調査を実施したので、報告する。

1. 検査材料

平成 12 年度から平成 14 年 1 月にかけて鮮魚市場または魚介類販売業から買い上げ、または収去を行った二枚貝を検査材料とした。

AstV は 94 検体、HAV は 109 検体について検査を実施した。

2. 前処理

1 検体あたり中腸腺をカキでは 5 個、他の貝では 5 g になるように採取し、国立公衆衛生院の示した方法に従い¹⁾、SV Total RNA Isolation System キット (Promega)、または QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。

3. RT-PCR法による遺伝子の検出

1) AstV

国立感染症研究所の示した方法に従い²⁾、カプシド領域の共通プライマー (1st PCR; PreCAP1/12G, 2nd PCR; Mon244/82b) を用いて増幅し、さらに陽性であった検体については 1st PCR 産物を型別混合プライマー (AST-S1 ~ S8/END) を用いて 2nd PCR を行った。

1. 福岡市保健環境研究所 微生物部門 (現保健科学部門)

2. 福岡市保健環境研究所 微生物部門 (現保健科学部門)

(現所属: 保健福祉局 生活衛生部 生活衛生課)

陽性検体はさらに BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, ABI310 (Applied Biosystems) を用いダイレクトシーケンスを行い,塩基配列を決定し,GenBank 登録株との同源性検索を行った.

2) HAV

国立公衆衛生院の示した方法に従い³⁾cDNA を作製し,リアルタイム PCR 法により,HAV 遺伝子検出を行った.プライマーは,非翻訳領域に設定した HAV+449, HAV-557 を, TaqMan プローブには HAV+482-P-FAM を用いた.サンプルのコピー数が 2 ウェル共に 10 コピー以上の時を陽性とした.

結果及び考察

AstV および HAV 遺伝子の検出結果を表 1 に示した.

AstV は型共通プライマーで,二枚貝 94 検体(カキ 74 検体,アサリ 10 検体,ハマグリ 6 検体,アカガイ 2 検体,シジミ 2 検体)中 2 検体(生食用カキおよび加熱用カキ)からウイルス遺伝子が検出された.

1 検体(生食用カキ)については,型別混合プライマーによる 2nd PCR の結果,AstV8 型の特異的バンドが検出された.この PCR 産物をダイレクトシーケンスで塩基配列を調べた結果,Human astrovirus (ヒトアストロウイルス)type 8 (Accession No. Z66541)に対して,93% の同源性を示した.

もう 1 検体(加熱用カキ)については,型別混合プライマーで型別不能であったが,型共通プライマーで増幅された PCR 産物をダイレクトシーケンスした結果,Feline astrovirus (ネコアストロウイルス)(Accession No. AF056197)と最も高い同源性(87%)を示した.

なお,HAV については,109 検体について検査を実施したがウイルス遺伝子は検出されなかった.

AstV は小児の急性胃腸炎の原因の一つであるが,その検出割合は,ほかの原因ウイルスであるロタウイルスや NLVs に比べるとかなり低く,血清型についても 1 型が多いとされている⁴⁾.

北橋らは,自生のカキ 112 検体中 15 検体(13.4%)から AstV 遺伝子を検出⁵⁾したことを報告している.

一方,これまでに実施された二枚貝の NLVs 汚染実態調査では,生食用カキが 27.4%⁶⁾,40%⁷⁾,自生カキが 25%⁵⁾と報告されており,本市でも,生食用カキ(むき身)で

23.8%⁸⁾と非常に高い汚染率であった.

したがって,二枚貝における AstV の汚染率は NLVs と比べると非常に低く,小児の急性胃腸炎に大きくは関与していないと考えられるが,さらにヒト由来と二枚貝由来株の血清型について比較検討する必要がある.

1999 年 4 月から 2002 年 9 月にかけて発生した A 型肝炎のうち,その推定感染経路が判明している事例の 81% は,生カキなどの魚介類の生食が原因とされている⁹⁾.

近年,輸入ウチムラサキ貝の喫食による NLVs と HAV の同時感染事例も報告されており¹⁰⁾,西尾らは輸入二枚貝 244 検体中 3 件(1%)から,HAV を検出¹¹⁾したことを報告しており,二枚貝の HAV 汚染は食品衛生上問題となっている.

今回検査した二枚貝から HAV 遺伝子は検出されなかったが,HAV 高浸淫地からの輸入生鮮魚介類については,検疫所におけるモニタリング検査の強化が望まれる.

文 献

- 1)平成 10 年および平成 11 年度小型球形ウイルス(ヒトカリシウイルス)技術研修テキスト,国立公衆衛生院
- 2)ウイルス性下痢症診断マニュアル(第 2 版),国立感染症研究所
- 3)A 型肝炎ウイルス(HAV)の RT-PCR 法,国立公衆衛生院
- 4)荒木和子ほか:一定点におけるアストロウイルスおよびその血清型の流行疫学 - 1991 ~ 1996 年の成績 -, 感染症学雑誌, 72, 1998
- 5)北橋智子ほか:千葉市沿岸の自生カキからの HAV, SRSV, アストロウイルス遺伝子の検出, 感染症学雑誌, 73, 1999
- 6)杉枝正明ほか:市販生食用カキからの SRSV 遺伝子の検出状況(1995 ~ 1996 年)とその遺伝子解析, 第 18 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, 1997
- 7)橋本修ほか:カキに濃縮される小型球形ウイルスの検出とその遺伝子解析, 第 19 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, 1998
- 8)和佐野ちなみほか:RT-PCR 法による二枚貝からのノーウォーク様ウイルスの検出, 福岡市保健環境研究所報 27, 2002
- 9)A 型肝炎・E 型肝炎 2002 年 9 月現在, IASR, Vol.23, 2002
- 10)古田敏彦ほか:ノロウイルス(ノーウォーク様ウイルス)と A 型肝炎ウイルスに汚染されたウチムラサキ貝による食中毒事例, 感染症学雑誌, 77, 2003
- 11)輸入生鮮魚介類からの A 型肝炎ウイルス検出状況, IASR, Vol.23, 2002

表 1 AstV および HAV 遺伝子の検出結果

	AstV	HAV
検体数	94	109
陽性数	2	0
陽性率(%)	2.1	0

