

## 短報

# 集団胃腸炎事例からのウイルス 検出と遺伝子解析

古屋由美子, 片山 丘, 伊達佳美  
高橋孝則, 新川隆康

## Detection and Genetic Analyses of Viruses in Gastroenteritis Outbreaks

Yumiko FURUYA, Takashi KATAYAMA  
Yoshimi DATE, Takanori TAKAHASHI  
and Takayasu NIKKAWA

### はじめに

平成16年12月から平成17年1月にかけて全国の老人保健施設で、ノロウイルスを原因とする集団胃腸炎が多発し問題となった。ノロウイルスは冬に発生するウイルス性食中毒や感染性胃腸炎の原因となることが知られている。老人保健施設や病院のような集団生活の場でウイルスが原因の感染性胃腸炎が発生すると、患者発生規模が大きい事例になる可能性があることから、感染拡大を防ぐためにも原因ウイルスや感染源の調査など早期の対応が重要となっている。またウイルス性食中毒事例では生鮮魚介類以外の原因食品は不明な事例が多く、感染経路を解明することは重要である。

そこで平成16年4月から平成17年3月にかけて、県域で発生した集団胃腸炎事例について、ウイルス学的原因調査を行ったので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 検査材料

平成16年4月から平成17年3月に神奈川県域で発生した集団胃腸炎55事例より得られた便859検体と吐物7検体、事例に関連した食品33検体を用いた。

#### 2. ノロウイルスの遺伝子検出法

便および吐物は滅菌したリン酸緩衝液 (PBS(-)) で10%乳剤とし、攪拌後10,000rpm で10分間遠心し、上清をRNA抽出に使用した。RNAの抽出にはQIAamp Viral

RNA Mini Kit (Qiagen社製) を用いた。抽出したRNAはDNase Iで処理後、Random Hexamer (Amersham社製) およびSuper Script II RT (Invitrogen社製) を用いて42°Cで1時間逆転写反応を行いcDNAを作製した。リアルタイムPCRは影山らの方法<sup>1)</sup>に従って、TaqMan Universal PCR Master Mix (ABI社製) を用いて、genogroup I (G I) はプライマー: COG1F/COG1R, プローブ: RING1-TP(a)/RING1-TP(b), genogroup II (G II) はプライマー: COG2F, ALPF/COG2R, プローブ: RING2AL-TPを使用し、G I, G IIのそれぞれについてウイルス遺伝子の定量を行った。さらにリアルタイムPCRでノロウイルス遺伝子が検出された代表的な検体について新たにPCRを行い、PCR産物を用いてダイターミネーター法でダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を決定した。

食品は約1gを取り、滅菌PBS(-)を9ml加えて混合し、攪拌後8,400rpmで20分間遠心した。さらに上清を30%シヨ糖溶液に重層し、40,000rpmで2時間遠心した。沈査を滅菌PBS(-)200 $\mu$ lに再浮遊し、RNAの抽出に用いた。抽出、逆転写反応およびリアルタイムPCRは便と同様の方法で行った。

#### 3. 電子顕微鏡観察

便は滅菌PBS(-)で10%乳剤とし、攪拌した。8,400rpmで20分間遠心後上清を30%シヨ糖溶液に重層して40,000rpmで2時間遠心した。沈査を滅菌PBS(-)で200 $\mu$ lに再浮遊後、2%リンタングステン酸ナトリウムでネガティブ染色後40,000倍でウイルス粒子の有無を検鏡した。

#### 4. A群ロタウイルスの抗原検出法

A群ロタウイルス抗原検出用キットであるロタクロン(TBF社製)を用い、キットの使用説明書に従いA群ロタウイルスを検出した。

### 結果と考察

平成16年度に発生した集団胃腸炎55事例のうち37事例の353検体から遺伝子検出法でノロウイルスが検出された。そのうち食中毒と判定されたものが10事例(表1)、感染性胃腸炎としてとり扱われたものが13事例あった(表2)。

電子顕微鏡観察は、主に遺伝子検出法でノロウイルスが検出されなかった事例についてノロウイルス以外の原因ウイルスの検索や、ノロウイルスが検出された検体の一部については確認の目的で行った。その結果ノロウイルス遺伝子が検出されなかった18事例中1事例からロタウイルス粒子が観察され、それらはA群ロタウイルス抗原検出キットにより、A群ロタウイルスであることが確

表 1 食中毒事例

事例 No.	発生年月	管轄保健 福祉事務所	原因施設	原因食品	検体名	検体数	RT-PCR 陽性数	genogroup	電顕 陽性数
1	H16.4	厚木	寮	不明	患者便	17	14	GII	N.D.
					調理従事者便	10	5	GII	N.D.
2	H16.12	茅ヶ崎	飲食店	和え物	患者便	32	27	GII	N.D.
					調理従事者便	34	5	GII	N.D.
3	H16.12	小田原	飲食店	生力キ	患者便	34	27	GI,GI&II,GII	N.D.
					調理従事者便	8	1	GII	N.D.
4	H16.12	小田原	飲食店	不明	患者便	4	3	GII	N.D.
					調理従事者便	12	5	GII	N.D.
5	H16.12	厚木	飲食店	不明	患者便	12	11	GII	N.D.
					調理従事者便	9	3	GII	N.D.
6	H17.1	小田原	飲食店	不明	患者便	17	17	GII	N.D.
					調理従事者便	14	1	GII	N.D.
					食品	1	0		
7	H17.1	藤沢	老人保健施設	不明	患者便	11	9	GII	0
					調理従事者便	17	7	GII	1
					食品	1	0		
8	H17.1	藤沢	旅館	不明	患者便	28	23	GII	3
					調理従事者便	16	1	GII	0
9	H17.2	厚木	飲食店	生力キ	患者便	9	8	GI,GI&II	1
					調理従事者便	5	0		0
					食品	2	0		
10	H17.3	秦野	飲食店	不明	患者便	13	11	GII	3
					調理従事者便	15	3	GII	0
					食品	1	0		

N.D. : 検査せず

表 2 感染性胃腸炎事例

事例 No.	発生年月	管轄保健 福祉事務所	原因施設	検体名	検体数	RT-PCR 陽性数	genogroup	電顕 陽性数
1	H16.10	鎌倉	幼稚園	発症者便	81	27	GII	1
				食品	2	0		
2	H16.12	大和	老人保健施設	発症者便	34	30	GII	N.D.
				調理従事者便	14	0		N.D.
3	H16.12	足柄上	病院	発症者便	8	6	GII	N.D.
				調理従事者便	9	0		N.D.
4	H16.12	茅ヶ崎	病院	発症者便	25	20	GII	N.D.
				発症者吐物	6	4	GII	N.D.
				調理従事者便	15	0		N.D.
5	H16.12	大和	老人保健施設	発症者便	7	5	GII	N.D.
6	H16.12	大和	老人保健施設	発症者便	6	4	GII	N.D.
7	H17.1	三崎	老人保健施設	発症者便	5	4	GII	N.D.
8	H17.1	藤沢	老人保健施設	発症者便	4	1	GII	N.D.
				調理従事者便	4	0		N.D.
9	H17.1	足柄上	老人保健施設	発症者便	16	10	GII	N.D.
10	H17.1	厚木	老人保健施設	発症者便	7	4	GII	N.D.
				調理従事者便	12	0		N.D.
11	H17.1	三崎	老人保健施設	発症者便	2	2	GII	N.D.
12	H17.1	三崎	老人保健施設	発症者便	1	1	GII	N.D.
13	H17.2	平塚	老人保健施設	発症者便	9	7	GII	N.D.
14*	H17.3	鎌倉	老人保健施設	発症者便	12	0		6
				調理従事者便	19	0		N.D.
				食品	11	0		

N.D. : 検査せず

\* : ロタウイルスが検出された事例

認められた (表2)。またノロウイルス遺伝子が検出された食中毒事例8検体, 感染性胃腸炎事例1検体から小型球形ウイルス粒子が観察され, それらはノロウイルスであることが確認された (図1, 表1, 2)。

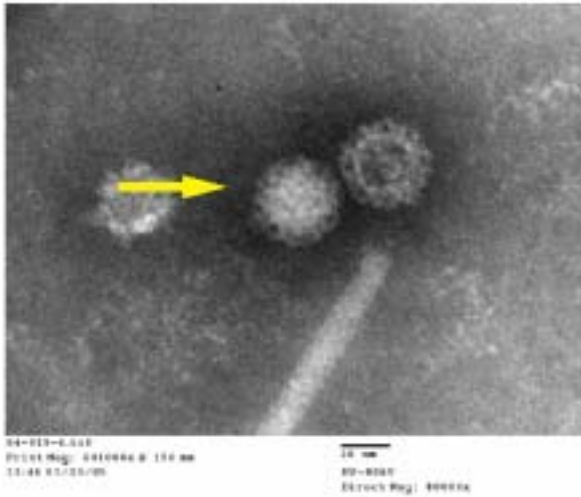


図1 食中毒事例から検出されたノロウイルス

食中毒事例で検出されたノロウイルスの genogroup は G II が8事例 (80%) で大部分を占めており, G I と G II の両方が検出された事例は2事例 (20%) であった。事例3の患者便からは G I のみ検出されたもの, G I および G II が重複して検出されたもの, G II のみ検出されたものがあり, 事例9は G I のみ検出されたもの, G I と G II が重複して検出されたものがあった。同一事例で G I と G II が重複して検出されたこれらの2事例はともに生カキを摂食しており, 原因食品は生カキと推定された。摂食した生カキが数種類のノロウイルスを蓄積しており<sup>2)</sup>, そのため異なる genogroup が同一事例から検出されたと推察された。しかし事例9の食品残品の生カキについて検査を行ったが, これら生カキからはノロウイルス遺伝子は検出されなかった。これは摂食した生カキはヒトを発症させる量のノロウイルスに汚染されていたが, 残品の生カキは検出限界以下のウイルス汚染であったか, あるいは汚染されていなかったと考えられた。

その他の事例の原因食品は, 事例2については疫学調査から和え物と推定された。しかし事例6, 7, 10では原因食品の検査を行ったが, ノロウイルス遺伝子は検出されず, 原因食品が不明であった。これら原因食品不明の事例ではいずれも調理従事者からノロウイルスが検出されていることから, 調理従事者による二次汚染が原因で食中毒が発生した可能性も考えられた。調理従事者には手洗いの励行や調理用手袋の着用など食中毒発生予防のために注意を喚起する必要が再確認された。

検出されたウイルスの遺伝子の塩基配列を調べたとこ

ろ, 事例3では G I および G II が重複した1検体の遺伝子は, G I が Stavanger 株近縁, G II が Miami 株近縁であり, 他の1検体は G I が DesertShield 株近縁, G II が Chitta 株近縁であった。事例9では G I のみ検出された遺伝子は DesertShield 株近縁で, G I および G II が重複したものは G I が Winchester 株近縁, G II が Lordsdale 株近縁であった。生カキには数種類のノロウイルスが蓄積されている<sup>2)</sup> ことから, これら生カキによるウイルス性食中毒から検出される株は多種であると考えられた。またその他5事例は Lordsdale 株近縁, 1事例は Miami 株近縁, 1事例は Amsterdam 株近縁であった (図2)。

県内の食中毒事例で検出されたノロウイルスの genogroup は毎年 G II が多く, これは全国状況と一致した<sup>3)</sup>。

感染性胃腸炎13事例の発生場所は, 10事例が老人保健施設, 2事例が病院, 1事例が幼稚園であった。感染性胃腸炎事例では, 発症者 (入所者, 入院患者や施設等の職員) を中心に検査を行っているが, 食中毒を疑った事例では非発症の調理従事者についても検査を行ったものもある。感染性胃腸炎事例で検出されたノロウイルスの genogroup はすべて G II であり, 全国状況と同様の傾向であった<sup>3)</sup>。検出されたウイルスの遺伝子の塩基配列を調べたところ, 10事例は Lordsdale 株近縁, 1事例は Miami 株近縁であり (図2), この時期県域では Lordsdale 株による感染性胃腸炎が流行していたと思われた。

聞き取り調査の結果ほとんどの事例で入所者や入院患者とともに職員にも発症が見られた。またこのなかには職員がはじめに発症している事例もみられており, このような場合, 職員が施設外からウイルスを持ち込み感染源となった可能性が高いと考えられた。

ノロウイルスは100個程度のウイルスが体内に侵入すると発症する可能性がある<sup>4)</sup>。今回の事例では患者便や吐物中のウイルス遺伝子量は検体1gあたり $10^4$ コピー以上含まれていた。そのため便や吐物を処理する職員への感染の危険が高く, 施設内で感染が起これば入所者や入院患者の間で感染が広がるとともに, 職員の間でも感染が広がり, ノロウイルスによる感染を拡大したと考えられた<sup>5)</sup>。

このように施設内でひとたびノロウイルスの感染が起これば, 特に老人保健施設においては容易に感染が拡大し, その結果多くの患者が発生する。そのため拡大を防止するには, 職員の衛生教育を十分に行い, 作業ごとの手洗いの奨励や, 便や吐物の処理にはディスポーザブル手袋を使用し, 容器や周囲の清掃と殺菌を徹底させることが重要である。

平成16年度は昨年度に比べて施設内での感染性胃腸炎

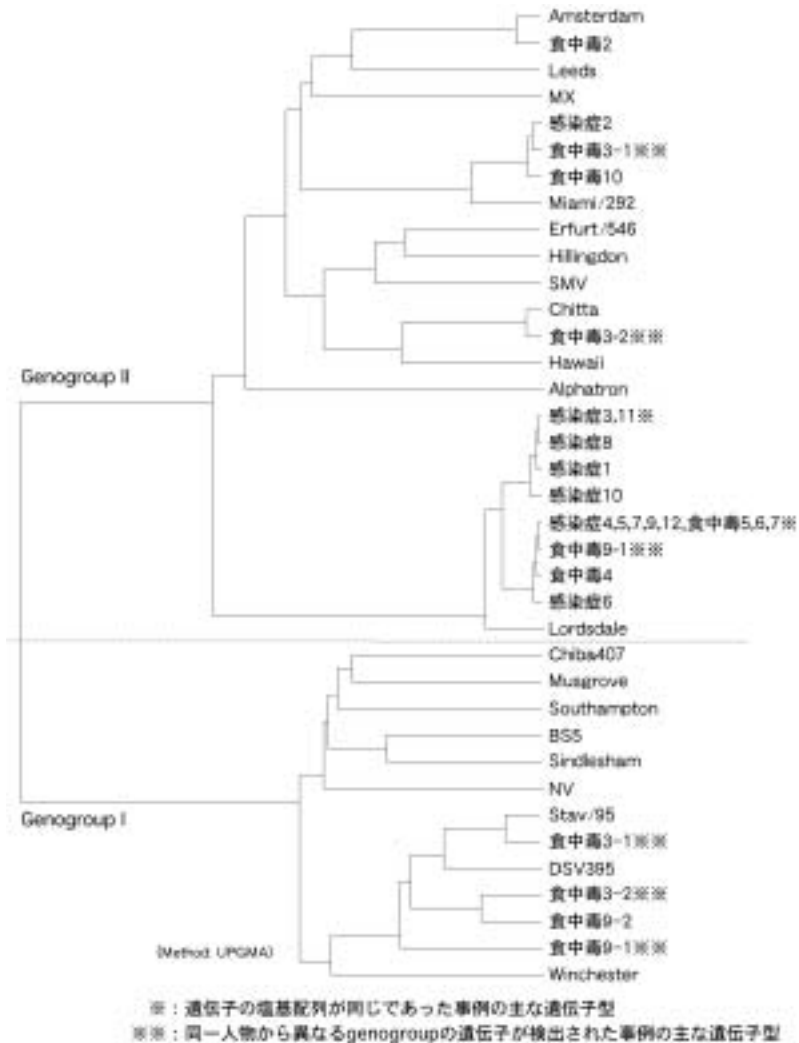


図2 県域の事例より検出されたノロウイルス遺伝子の系統樹

の集団発生が多発した。さらに今後もこの傾向は続くと思われる。施設内で集団発生が疑われた場合は、調理従事者や職員を含めた施設全体の発症者を把握し原因ウイルスの調査を速やかに行うことで、感染源および感染経路の推測ができ、集団発生を早期に終息に導く事が可能になると考えられた。

最後に、衛生研究所への迅速な検体搬入や情報提供にご尽力いただきました各保健福祉事務所、県生活衛生課および保健予防課（健康増進課）の方々に深謝いたします。

(平成17年7月22日受理)

文 献

1) 影山 努, 小嶋慈之, 福士秀悦, 片山和彦: 蛍光プローブを用いた Norwalk virus (NV) の高感度検出法の開発, *Vita*, 18, 14-17 (2001)

2) 斎藤博之, 原田誠三郎, 佐藤宏康: ノーウォークウイルス (NLV) の検査における一本鎖高次構造多型 (SSCP) 解析の応用, *臨床とウイルス*, 30, 163-171 (2002)

3) ウイルス検出状況・2005年3月25日現在, *病原微生物検出情報*, 26, 110-112 (2005)

4) 西尾 治, 西香南子, 福田伸治, 西田知子, 篠原美千代, 沖村容子ほか: ウイルス性食中毒の病因, *臨床とウイルス*, 31, 163-169 (2003)

5) 古屋由美子, 片山 丘, 伊達佳美, 高橋孝則, 新川隆康: 2004年12月神奈川県で発生したノロウイルスによる集団胃腸炎事例, *病原微生物検出情報*, 26, 71-72 (2005)