



## 短報

### 食中毒疑い事例におけるウイルスの 検出と解析

—患者，従事者，検食および拭き取り  
検体での検討—

片山 丘，鈴木理恵子，須永 悟，  
齋藤隆行，古屋由美子

### Detection and analysis of viruses in suspected food poisoning cases

—Examination of the patients,  
cooking workers, cooking ingredients  
and wipe off specimens—

Takashi KATAYAMA, Rieko SUZUKI,  
Satoru SUNAGA, Takayuki SAITO  
and Yumiko FURUYA

#### はじめに

近年，検査法の発展により下痢や嘔吐を主症状とする感染症において，ウイルスを原因とする感染性胃腸炎の動向が明らかとなってきた。神奈川県（川崎市，横浜市，横須賀市，相模原市，藤沢市を除いた地域）ではノロウイルス（NV）やA群ロタウイルス（GARV）を中心として，サポウイルス（SV），アストロウイルス（AstV），C群ロタウイルス（GCRV）およびアデノウイルス（AdV）による胃腸炎が見られている<sup>1-4</sup>。このなかでもNVを原因とした食中毒や感染性胃腸炎が毎年多数発生し，さらにSV，GARVおよびGCRVの集団事例なども発生しており<sup>5, 6</sup>，社会的問題となっている<sup>7, 9</sup>。

そこで県域で発生した食中毒を疑われた事例において患者，調理従事者（従事者），検食および拭き取り検体の関連性を調べるために，検出されたウイルスの遺伝子配列を決定し，それぞれの遺伝子について比較検討を行った。

#### 材料および方法

##### 1. 検査材料

平成20年度から平成22年度に発生した食中毒を疑われた事例のなかで，同一事例で患者，従事者，検食およ

び拭き取りなどからウイルスが検出された6事例の53検体（患者便29検体，従事者便15検体，検食1検体，拭き取り8検体）および他県からの関連調査1事例の患者5検体の合計58検体を用いた（表1）。

表1 検出ウイルスの塩基配列決定を行った事例

| 事例   | 発生場所 | 検出ウイルス  | 塩基配列決定 |   |
|------|------|---------|--------|---|
|      |      |         | 検体     | 数 |
| H20A | 居酒屋  | NV G I  | 患者     | 9 |
|      |      |         | 従事者    | 4 |
| H20B | 旅館   | NV G II | 患者     | 3 |
|      |      |         | 従事者    | 2 |
|      |      |         | 拭き取り   | 1 |
|      |      |         | 検食     | 1 |
| H21A | 旅館   | NV G II | 患者     | 4 |
|      |      |         | 従事者    | 1 |
|      |      |         | 拭き取り   | 3 |
| H21B | 飲食店  | NV G II | 患者     | 3 |
|      |      |         | 従事者    | 3 |
|      |      |         | 拭き取り   | 1 |
| H22A | 運動施設 | NV G II | 患者     | 5 |
| H22B | 飲食店  | NV G II | 患者     | 6 |
|      |      |         | 従事者    | 5 |
|      |      |         | 拭き取り   | 1 |
| H22C | 老健施設 | GARV    | 患者     | 4 |
|      |      |         | 拭き取り   | 2 |

##### 2. 解析用cDNAの作製

患者および従事者便は滅菌リン酸緩衝液（PBS(-)）で10%乳剤とし，検食および拭き取り検体は40,000rpm，2時間超遠心分離後の沈渣をPBS(-) 140  $\mu$ lで再浮遊したものをを用い，既報<sup>10</sup>に従いcDNAを作製した。

##### 3. 解析用遺伝子の増幅

NV遺伝子の増幅は，厚生労働省の「ウイルス性下痢症診断マニュアル」（マニュアル<sup>11</sup>）に従ったプライマーを用いて行った。反応容量は25  $\mu$ lを基準とし，反応条件は95°C5分間Taq DNA polymerase活性化後，94°C1分間，50°C1分間，72°C1分間を40サイクル行い，75°C10分間の伸長反応を行った。検食および拭き取り検体などで1st PCRで目的バンドが検出されない場合は，マニュアルに従ったプライマーを用いた反応条件35サイクルの2nd PCRを行った。

GARV遺伝子の増幅は，マニュアル<sup>11</sup>に従ったプライマーを用いて行った。反応容量は25  $\mu$ lを基準とし，反応条件は95°C5分間Taq DNA polymerase活性化後，94°C1分間，42°C1分間，72°C2分間を30サイクル行い，75°C10分間の伸長反応を行った。

##### 4. ウイルス遺伝子の解析

得られたPCR産物から1.5%アガロースゲル電気泳動によりそれぞれNV genogroup I（G I）は381bp，NV genogroup II（G II）は387bpおよびGARVは1062bpの目的バンドを切り出し，BigDye Terminator v1.1

Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いて、キット添付のマニュアルに従って塩基配列の決定を行った。

遺伝子の塩基配列が決定された検体についてはGENE TYX-MACプロトコールに従い、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (ゼネティックス) を用いてそれぞれの事例で得られた他の遺伝子と比較検討すると共に、NVについてはG I /1からG I /15, G II /1からG II /18の塩基配列<sup>12)</sup>を基に感染株の解析を行った。GARVについてはG genotype (G) 1からG12の塩基配列を基に感染株の解析を行った。

### 結果

平成20年度に発生した事例H20Aは原因施設が居酒屋で、NV GIが検出された事例であった。この事例の患者9検体 (H20A患者1からH20A患者9) および従事者4検体 (H20A従事者1からH20A従事者4) のNV遺伝子の塩基配列を決定し比較したところ、13検体すべての塩基配列は一致した。検出されたNVは、2007年に中国で確認されたGuangxi/NN07230/2007に近縁でGI/8に属するNVであった (図1)。事例H20Bは原因施設が旅館で、NV G II が検出された事例であった。この事例の患者3検体 (H20B患者1からH20B患者3)、従事者2検体 (H20B従事者1, H20B従事者2)、拭き取り1検体 (トイレドアノブ: H20B拭き取り1) および検食 (朝食: H20B検食1) 1検体のNV遺伝子の塩基配列を決定し比

較したところ、7検体すべての塩基配列は一致した。検出されたNVは、2006年に秋田県で確認されたakita4/2006と同一でG II /4に属するNVであった (図2)。

平成21年度に発生した事例H21Aは原因施設が旅館で、NV G II が検出された事例であった。この事例の患者4検体 (H21A患者1からH21A患者4)、従事者1検体 (H21A従事者1) および拭き取り3検体 (トイレ引き戸取っ手、食堂入口ドアノブ、3F男子トイレドアノブ: H21A拭き取り1からH21A拭き取り3) のNV遺伝子の塩基配列を決定したところ、患者4検体の遺伝子はすべて一致した。また従事者1検体および拭き取り3検体の計4検体はすべて一致したが、患者とは325塩基中7塩基異なっていた。患者より検出されたNVは、2007年に舞鶴市で確認されたMaizuru/7764/2007に近縁でG II /4に属するNVであり、従事者および拭き取りより検出されたNVは、2007年中国で確認されたBeijing/362/2007に近縁でG II /4に属するNVであった (図3)。事例H21Bは原因施設が飲食店で、NV G II が検出された事例であった。この事例の患者3検体 (H21B患者1からH21B患者3)、従事者3検体 (H21B従事者1からH21B従事者3) および拭き取り1検体 (トイレドアノブ: H21B拭き取り) のNV遺伝子の塩基配列を決定し比較したところ、7検体すべての塩基配列は一致した。検出されたNVは、2010年に中国で確認されたCHO-032304/CHN/2010と近縁でG II /4に属するNVであった (図4)。

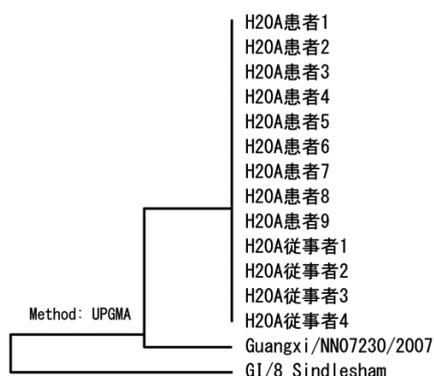


図1 事例H20Aの系統樹

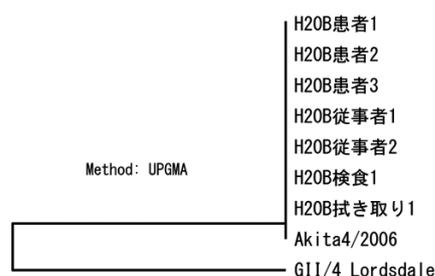


図2 事例H20Bの系統樹

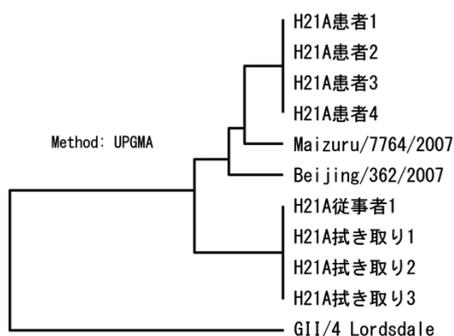


図3 事例H21Aの系統樹

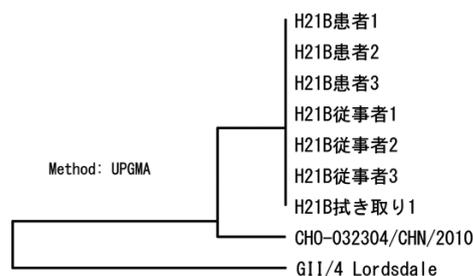


図4 事例H21Bの系統樹

平成22年度に発生した事例H22Aは運動大会で発生した集団胃腸炎で、NV GIIが検出された事例であった。この事例の患者5検体（H22A患者1からH22A患者5）のNV遺伝子の塩基配列を決定し比較したところ、H22A患者5以外の4検体の塩基配列は一致したが、H22A患者5は339塩基中85塩基異なっていた。患者4検体より検出されたNVは、2010年に中国で確認されたCHO-032304/CHN/2010と近縁でGII/4に属するNVであり、H22A患者5より検出されたNVは、2009年に韓国で確認されたSeoul/0561/2009と近縁でGII/2に属するNVであった（図5）。事例H22Bは原因施設が飲食店で、NV GIIが検出された事例であった。この事例の患者6検体（H22B患者1からH22B患者6）、従事者5検体（H22B従事者1からH22B従事者5）および拭き取り1検体（冷蔵庫取手：H22B拭き取り）のNV遺伝子の塩基配列を決定し比較したところ、患者6検体、従事者2検体および拭き取り1検体の塩基配列は一致したが、従事者の3

検体（H22B従事者3、H22B従事者4、H22B従事者5）は同一で、患者などの9検体とは339塩基中95塩基異なっていた。患者6検体、従事者2検体および拭き取り1検体より検出されたNVは、2007年に中国で確認されたBeijing/54023/2007と同一でGII/4に属するNVであり、従事者の3検体（H22B従事者3、H22B従事者4、H22B従事者5）より検出されたNVは、2009年に中国で確認されたShanghai/SH312/2009と近縁でGII/3に属するNVであった（図6）。事例H22Cは原因施設が老健施設で、GARVが検出された事例であった。この事例の患者4検体（H22C患者1からH22C患者4）および拭き取り2検体（洗面所蛇口、トイレの手すり：H22C拭き取り1、H22C拭き取り2）のGARV遺伝子の塩基配列を決定し比較したところ、6検体すべての塩基配列は一致した。検出されたGARVは、2006年に米国で確認されたVanderbilt/VU06-07-32/2006と近縁でG1P[8]に属するGARVであった（図7）。

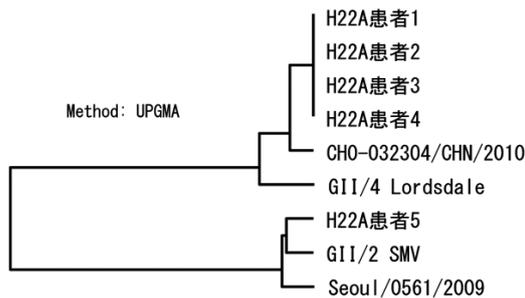


図5 事例H22Aの系統樹

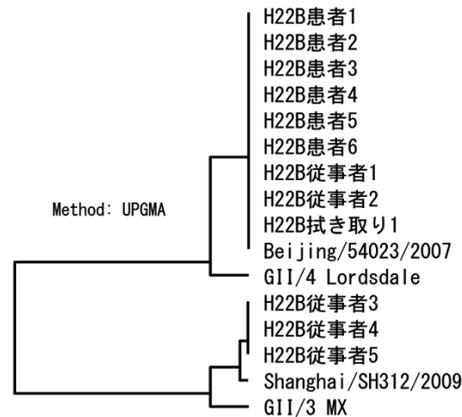


図6 事例H22Bの系統樹

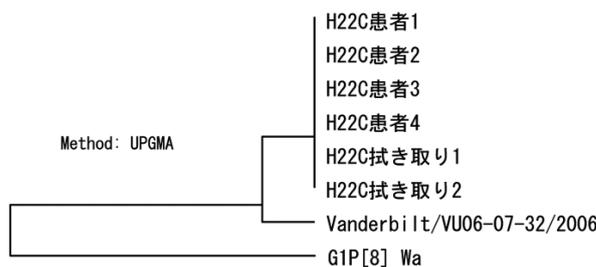


図7 事例H22Cの系統樹

考察

近年全国的に問題となっているNVやGARVによる食中毒事例や集団感染症事例において、検出された遺伝子の塩基配列を決定し比較検討したところ、それぞれの事例に関して興味深い知見が得られた。

NVが検出された事例H20A、H20BおよびH21Bは患者と従事者あるいは拭き取りの遺伝子が一致し、従事者から患者への感染が示唆された。事例H22CはGARVが

原因で、ウイルスの検出は、患者もしくは患者の使用していた洗面所とトイレの拭き取りのみであったため、患者同士で洗面所やトイレなどを介して広まった感染症事例である可能性が考えられた。

事例H21Aは旅館で発生した事例で患者、従事者および拭き取り検体よりNV GIIが検出された。疫学情報では、患者が1グループに限られていることなどから感染症を疑い、検査は客室付近のトイレなどの拭き取りも行わ

れた。この事例の患者4検体、従事者1検体および拭き取り3検体のNV遺伝子の塩基配列は、患者4検体は一致したが、従事者および拭き取りは患者とは異なった配列で一致した。このことより患者の発症ウイルスと原因施設とされる旅館の従事者や施設との関連性は低い事が示唆され、疫学調査で感染症を疑った事例の裏付けとなった。しかし、従事者検体と同じNV株が旅館内部の数カ所を汚染していることも明らかとなり、患者発生とは別の型のNVによる感染の発生を予防するための注意喚起を行う必要性が明らかとなった。

事例H22Bは飲食店で発生した食中毒疑い事例で患者、従事者および拭き取り検体からNV GIIが検出され、疫学調査においてこの施設を原因とする食中毒と判断された。この事例の患者6検体、従事者2検体および拭き取り1検体のNV遺伝子の塩基配列は一致しており、このNVが食中毒の原因であることが示唆された。しかし、従事者3検体より異なった遺伝子型が検出されたことから食中毒の原因ウイルスとは異なる型のNVがこの飲食店の従事者間で流行していたと推測された。これは、ウイルス遺伝子の検出のみの検査ではなく、塩基配列の決定や解析の重要性を示す結果であった。また、これらの結果は一つの事例でもそれぞれの患者や従事者によって異なるNVが検出される可能性を示唆するものであった。

今回検討した7事例のうちH22Aは他県からの関連調査事例であり、その他の6事例は県域で発生した食中毒疑い事例であった。関連調査事例H22Aは大規模な運動大会であったため大勢の学生や関係者がいろいろな地域から集まってきた。ここで起こった集団胃腸炎であり、検出されたウイルスはNV GIIのみであり、NV GIIの集団感染症事例と考えられた。しかし検出されたNV遺伝子の塩基配列から、患者の中にはGII/4とGII/2と単一の暴露ではない症例があったことが明らかになった。この事例が単一の暴露であるとすれば複数のNVに汚染されていた感染源の存在が考えられる。今回我々が行った検査は患者5検体のみであり、5例中1例のみの塩基配列が異なっていることが全体の状況を表している事なのか、1例の患者がたまたまこの事例とは無関係のNV GIIに感染していたのかは不明である。このように他地域から多くの人間が集まるスポーツ大会などを行うような集団では、ウイルスを広める原因や機会が多く存在していると考えられた。

食中毒疑い事例は、行政指導などの処分が行われる場合が多く、原因物質の検出速度、検出感度および精度が高いことが要求される。これらを考えながら、クローニング技術の導入など今後もさらなる精度の向上に向けた検討が必要である。また今後も引き続き解析を行う事例数を増やすとともに他の領域の遺伝子の検討も加えること

により、県域における食中毒疑い事例でのウイルスの動向をさらに詳しく探ることが可能であると考えられた。

## 謝 辞

最後になりましたが、検体および患者情報の収集にご協力いただきました小児科定点医療機関の先生方に深謝いたします。さらに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、県健康危機管理課および食品衛生課の方々に深謝いたします。

(平成23年8月5日受理)

## 文 献

- 1) 宮原香代子, 片山 丘, 原田美樹, 古屋由美子: 感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況 (平成19年度), 神奈川県研報告, **38**, 69-71 (2008)
- 2) 片山 丘, 原田美樹, 宮原香代子, 古屋由美子: 感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況 (平成20年度), 神奈川県研報告, **39**, 30-32 (2007)
- 3) 片山 丘, 宮原香代子, 古屋由美子: 感染性胃腸炎患者からの原因ウイルス検出状況 (平成21年度), 神奈川県研報告, **40**, 43-45 (2010)
- 4) 片山 丘, 古屋由美子, 岡崎則男: 研修施設で発生したC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例-神奈川県, 病原微生物検出情報, **30**, 185-186 (2009)
- 5) 宮原香代子, 片山 丘, 古屋由美子: 神奈川県におけるウイルス性集団胃腸炎の発生状況 (平成17年度), 神奈川県研報告, **36**, 48-50 (2006)
- 6) 宮原香代子, 片山 丘, 古屋由美子: 神奈川県におけるウイルス性集団胃腸炎の発生状況 (平成18年度), 神奈川県研報告, **37**, 72-74 (2007)
- 7) 食品衛生専門監視班編: 食中毒, かながわの食品衛生, **14**, 12 (2009)
- 8) 食品衛生専門監視班編: ノロウイルスを知って防ごう食中毒, かながわの食品衛生, **15**, 12 (2010)
- 9) ノロウイルスの流行 2006/07シーズン, 病原微生物検出情報, **28**, 1-2 (2007)
- 10) 片山 丘, 宮原香代子, 古屋由美子: 神奈川県域で検出されたノロウイルスの解析, 神奈川県研報告, **38**, 8-11 (2008)
- 11) 国立感染症研究所ウイルス第二部衛生微生物技術協議会レファレンス委員会: ウイルス性下痢症診断マニュアル, 第3版, pp25-66 (2004)
- 12) Okada, K., Ogawa, T., Kaiho, I. and Shinozaki, K.: Genetic analysis of norovirus in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004. J. Clin. Microbiol., **43**, 4391-4401 (2005)