

表4 アミラーゼ混合法と個別法との比較のまとめ

| 比較項目 | | アミラーゼ混合法 | 個別法 | |
|--|--------|------------|-----------|-----------|
| 2ndRealTimePCRの結果 | G1 | 陽性 | 5 | 1[1]*1 |
| | | 陰性 | 2 | 6[65] |
| | | 陽性率(%) | 71.4 | 14.3[1.5] |
| | G2 | 陽性 | 7 | 2[2] |
| | | 陰性 | 0 | 5[64] |
| | | 陽性率(%) | 100 | 28.6[3.0] |
| 1個体当たりの平均定量値 (実測値)*2 | G1 | 検体1 | 1.85 | 0 |
| | | 検体2 | 6.18 | 0.0357 |
| | | 検体3 | 8.665 | 0.00506 |
| | | 検体4 | 0.098 | 0.0275 |
| | | 検体5 | 0.04 | 0 |
| | | 検体6 | 0.001 | 0 |
| | | 検体7 | 0.042 | 0 |
| | G2 | 検体1 | 9.13 | 0.0721 |
| | | 検体2 | 16.66 | 0.3275 |
| | | 検体3 | 24.68 | 0.284 |
| | | 検体4 | 1.25 | 0 |
| | | 検体5 | 0.738 | 0.2609 |
| | | 検体6 | 0.111 | 0.1534 |
| | | 検体7 | 0.27 | 0.107 |
| 定量値の分布 (実測値)*2 | G1 | 0 | 0 | [63] |
| | | >0<1 | 4 | [3] |
| | | 1<10 | 3 | [0] |
| | | 10<100 | 0 | [0] |
| | G2 | 0 | 0 | [51] |
| | | >0<1 | 3 | [10] |
| | | 1<10 | 2 | [5] |
| | | 10<100 | 2 | [0] |
| PC添加実験(添加量16) (実測値) N=7(AM-混合法), N=66(個別法) | 平均値±SD | 11.39±4.08 | 5.30±3.34 | |
| | 最大値 | 15.96 | 14.76 | |
| | 最小値 | 6.39 | 0.70 | |

*1:[]内は個別別の結果

*2:アミラーゼ混合法は1個当たりの値に計算して示した。

添加(16コピー/反応系)し、G1を定量した(表4)。PC定量値の平均値±標準偏差、最大値、最小値は、AM-混合法では11.39±4.08, 15.96, 6.39、個別法では5.30±3.34, 14.76, 0.70で、AM-混合法で得たcDNA検体がPCR阻害作用を受けにくく、実際の添加量に近い定量値を示した(表4)。

3 定性PCR法の結果と定量値の関連性

AM-混合法、混合法、個別法において定性PCR法の結果と定量PCR法での定量値の関連を調べた(表5)。定量値0を陰性、>0を陽性とした場合、定性PCR法と定量PCR法の結果の一致率(両法で陰性あるいは両法で陽性になった検体数の全検体数の割合)は、AM-混合法80.7%、混合法71.6%、

個別法83.3%、全体では79.6%であった。個別法は大半が陰性の結果であり、両法で陽性となった検体はなかった。

定量値を0、>0<1、1<10、10<100に区分し、それぞれの定量値区分での両法での結果を比較した。定量値0での陰性一致率(両法で陰性となった検体数の当該定量値区分の検体数に対する割合)は、AM-混合法96.7%、混合法89.7%、個別法97.3%、全体で95.6%であった。定量値>0について両法の陽性一致率をみると、定量値>0<1ではAM-混合法48.0%、混合法38.9%、個別法0%、全体で33.9%、定量値1<10ではAM-混合法88.9%、混合法64.3%、個別法0%、全体で70.2%、

表5 各濃縮法における2ndRealTimePCR法とRealTimePCR法の比較と両法の一一致率

| 区分 | 2ndRealTime PCR結果 | アミラーゼ 混合法 | | 混合法 | | 個別法 | | 全体 | |
|------------------------------|----------------------|----------------|----|----------------|----|-----------------|---|-----------------|----|
| | | - | + | - | + | - | + | - | + |
| 定量値 | 0 | 29 | 1 | 35 | 4 | 110 | 3 | 174 | 8 |
| | >0 | 16 | 42 | 17 | 18 | 19 | 0 | 52 | 60 |
| >0の定量 値の分布 | >0~<1 | 13 | 12 | 11 | 7 | 13 | 0 | 37 | 19 |
| | 1~<10 | 3 | 24 | 5 | 9 | 6 | 0 | 14 | 33 |
| | 10~<100 | 0 | 6 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 8 |
| 0を陰性、>0を陽性とした場合の全体の一一致率(%)*1 | | 80.7 (N=88) | | 71.6 (N=74) | | 83.3 (N=132) | | 79.6 (N=294) | |
| 定量値0の陰性一一致率(%)*2 | | 96.7 (N=30) | | 89.7 (N=39) | | 97.3 (N=113) | | 95.6 (N=182) | |
| 定量値>0~<1の陽性一一致率(%)*3 | | 48.0 (N=25) | | 38.9 (N=18) | | 0 (N=13) | | 33.9 (N=56) | |
| 定量値1~<10の陽性一一致率(%)*3 | | 88.9 (N=27) | | 64.3 (N=14) | | 0 (N=6) | | 70.2 (N=47) | |
| 定量値10~<100の陽性一一致率(%)*3 | | 100 (N=6) | | 66.7 (N=3) | | - | | 88.9 (N=9) | |

*1: 両法で陰性あるいは陽性となった検体数の全検体数に対する割合。

*2: 定量値0を示した検体のうち、2ndRealTimePCR法で陰性となった検体数の割合。

*3: それぞれの定量値を示した検体のうち、2ndRealTimePCR法で陽性となった検体数の割合。

定量値 10~<100 では AM-混合法 100%、混合法 66.7%、全体で 88.9%であった。これらの結果から、定量 PCR法と定性 PCR法の結果は AM-混合法が最もよく一致した。また、定量値>0の場合、定量値が高くなるに従い両法の一一致率が高くなるのが AM-混合法、混合法で認められたが、いずれの定量値区分においても、AM-混合法の一一致率が高かった。

考 察

現在、厚生労働省の NV 検査指針¹⁾には「貝 1 ロットに付き 3 検体から 10 検体(中腸腺としての合計 12g から 24g 程度を目途とする。)の検査を行う。」と記載されている。3 個の検査と 10 個の検査ではコスト的また労力的に大きく異なり、実際には、3 個程度の個体についての検査が一般的であると推測される。カキを個体別に検査するのは、多くのカキ個体を混合して検査を行った場合、PCR 反応を阻害する物質の混入が増えることなどから検査結果の信頼性が下がることが最大の理由とされている。一方、同一ロットに含まれるカキ

には、その中に含まれる NV の有無およびその定量値に個体差があり、3 個程度の検査では検出率が低いことが指摘されている²⁾。そのため、10 個程度のカキを混合した検体のインヒビターの影響を受けない簡便な濃縮法の開発が望まれている。今回我々は、カキ混合検体の濃縮時に、カキの主成分であるグリコーゲンを AM によって消化する操作を導入し、その有用性を AM 処理を行わない場合あるいは個体別に検査する場合と比較し検討した。その結果、AM-混合法は、他の 2 法と比較して、定性 PCR法による NV 検出率が高く、定量 PCR法で PCR 阻害作用を受けにくく実際のコピー数に近い定量値を示し、定量 PCR法と定性 PCR法の結果の一一致率が高かった。また、AM 消化は PEG 沈殿操作と同時に実施できることから、従来の混合法と比較してもほぼ同様の操作で実施可能であった。以上のことから、AM-混合法は混合したカキ検体からの NV 濃縮に有用な方法であると考えられた。さらに、一部の検体に凍結保存されていたものを使用し冷蔵品と同様の結果が得られたことから、食中毒原因究明などの凍結保存品に

対しても使用できると考えられる。

今回我々は NV 検出に定量 PCR 法と通常の PCR 産物を鋳型 DNA としてリアルタイム PCR 法で nestedPCR を行うセカンドリアルタイム PCR 法による定性 PCR 法を併用した。その結果、厚生労働省の NV 検査指針で陰性と判定される 10 コピー/系未満の定量値でも定性 PCR 法陽性となる例が多く認められ、特に定量値 1~10 では 70% (AM-混合法濃縮検体では約 90%) が定性 PCR 法で陽性であった。また、定性 PCR 法と定量 PCR 法の一致率をみると、定量 PCR 法における定量値が低いほど両法の結果が一致せず、定量値が高くなるにつれ一致率が増加した。このことは、検体に含まれるコピー数が少なくなるにつれ PCR 反応液に NV cDNA が入る確率が減少することによる必然的な結果として理解することができる。さらに今回の結果からも示されたようにカキから精製した cDNA 検体には PCR 阻害物質が含まれ、定量 PCR 法で実際のコピー数より少なく定量されるため、実際には得られた定量値より多くの NV が含まれていると考えられる。以上のことから、定量 PCR 法で実測値 > 10 コピーの定量値の場合、実際に NV が含まれる可能性が極めて高いと考えられる。さらに今回の食中毒事例の原因と推定されるカキと同一日に加工された 2 検体についても、実測値 10 コピー以下であり陰性と判断される汚染量であった。これらのことから、現在、厚生労働省の検査指針の基準では定量 PCR 法の実用性が極めて低く、陽性限界値の見直しが早急に必要と考えられる。当面の対応策として、検査結果を(陽性、陰性と記載せず)定量値で示すことが有効であると考えられ、少なくとも実測値 10 コピー以下の場合は「陰性」と表記するのではなく、「10 コピー/系以下」と表記し必ずしも NV 陰性でないことを示す必要がある。一方、定性 PCR 法陽性・定量 PCR 法陰性の検体より、定性 PCR 法陰性・定量 PCR 法陽性の検体が多い傾向にあった。この理由として、定性 PCR 法の 1 回目の PCR に使用している G1SFR(G2SKR)プライマーのミスマッチにより増幅されない場合がある(偽陰性)可能性のほか、定量 PCR 法が偽陽性を示した可能性も否定できず、今後詳細に検討する必要がある。

今回我々は、AM 消化を PEG 沈殿時に、室温で

一夜、スターラーで攪拌することにより行った。これは、当所においては検体搬入が午後になることが多く PEG 沈殿を一夜行っていたことから、検査の簡便化のためその工程に合わせたことによる。反応温度については、予備実験において 37℃、室温、4℃で比較した結果、37℃の消化が最も効率的であったが、細菌の繁殖および PEG 沈殿によるウイルス濃縮に対する影響が不明であったことから室温での反応とした。短時間でを行う場合は、37℃での AM 消化後、PEG 沈殿を 4℃で行うことが考えられるがその条件は改めて設定する必要がある。

本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 ウイルス性食中毒の予防に関する研究(主任研究者 武田直和)によって行われた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、検体採取にご協力いただきました広島市社会局保健部食品保健課の関係各位に深謝します。

文 献

- 1) 厚生労働省ホームページ: ノロウイルスの検出法について、<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html>
- 2) 西尾 治: 厚生労働科学研究費補助金生活安全総合研究事業 食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究 平成 14 年度総括・分担研究報告書(2003)
- 3) 野田 衛 他: ノロウイルス検出率の及ぼすカキ検査個数の影響, 広島市衛研年報, 23, 70~73(2004)
- 4) Kageyama T et al: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR, J Clin Microbiol, 41, 1548~1557(2003)
- 5) 篠原美千代 他: リアルタイム PCR 法で得られた低い値の信頼性について, 厚生労働科学研究費補助金生活安全総合研究事業 食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究 平成 14 年度総括・分担研究報告書, 56~59(2003)

資料

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)

宮原香代子, 片山 丘, 古屋由美子

Occurrence of Viral Gastroenteritis in Kanagawa Prefecture (2005)

Kayoko MIYAHARA, Takashi KATAYAMA
and Yumiko FURUYA

ウイルスによる集団胃腸炎は、主に食品を介する食中毒やヒトからヒトへ伝播する感染性胃腸炎として発生している。その原因ウイルスには、ノロウイルスをはじめサポウイルス、ロタウイルス、アデノウイルスなどがある。特にノロウイルスは、平成16年の全国食中毒発生状況を見ると、病因物質別食中毒事件数が277件でカンピロバクターの558件に次いで第2位でありながら、患者数は12,537名で第2位のサルモネラ属菌3,788名に比べ3倍以上で第1位となっている。さらに平成16年度冬季には高齢者施設における集団感染の急増など、大規模な集団発生が問題となっている。我々は集団発生時の感染拡大を防止するために、原因ウイルスや感染源の早期解明を目的とした検査および調査を実施している。そこで平成17年4月から平成18年3月にかけて、神奈川県域で発生した集団胃腸炎事例の原因ウイルス検出状況について報告する。

平成17年度にウイルス検査を行った集団胃腸炎事例は72事例で、検体数は便606検体、吐物4検体、食品15検体の625検体であった。検査方法について、ノロウイルスは定量PCR、サポウイルスとC群ロタウイルスは逆転写PCR、A群ロタウイルスは酵素抗体法を用いた。電子顕微鏡観察は、原因ウイルスを広く迅速に検索するため有症者の検体を中心に行った。72事例のうち45事例の便257検体および吐物1検体からウイルスが検出され、食品からは検出されなかった。そのうち食中毒と判定されたものが8事例(表1)、感染性胃腸炎と判定されたものが

17事例(表2)であった。その他の20事例は、有症苦情が10事例、他の自治体からの関連調査が10事例であり、検出されたウイルスは有症苦情の1事例がA群ロタウイルスで、それ以外は全てノロウイルスであった。

食中毒事例で検出された原因ウイルスは全てノロウイルスであり、電子顕微鏡観察においても、これらの事例の患者便26検体および調理従事者便3検体から小型球形ウイルス粒子を検出することができた(表1, 図1)。

食中毒8事例から原因として検出されたノロウイルスのgenogroupはGIIが5事例(62.5%)で半数以上を占め、次いでGIが2事例(25.0%)、GIとGIIの両方が検出された事例は1事例(12.5%)であった。事例番号7では患者便からGIIのみが検出されGIIによる食中毒と推定されたが、調理従事者便からはGIのみ、GIとGIIの重複、GIIのみが検出された。聞き取り調査の結果、調理従事者は1週間ほど前に生カキを摂食していたためにGIとGIIが混在して検出され、患者便と調理従事者便のgenogroupに不一致が生じたと考えられた。また、事例番号8では患者便からGIのみ、GIとGIIの重複、GIIのみが検出され、疫学調査より原因食品が生カキと推定された。このように事例番号7, 8では、生カキを摂食した調理従事者や患者より複数のgenogroupが検出されたことから、摂食した生カキが数種類のノロウイルスに汚染されていたと推測された。

食中毒の原因食品については、生カキと推定されたこの1事例以外不明であった。しかし、原因食品が不明であった7事例全てにおいて、調理従事者便よりノロウイルスが検出されたことから、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。これら調理従事者の大部分は聞き取り調査で「症状がない」と回答しており、不顕性感染の可能性も含め、自己の健康管理および手洗いの励行や調理用手袋着用など食中毒予防に対するさらなる注意が必要である。また、事例番号7にみられるように、調理従事者は生カキの摂食を控える等の対策も重要であると考えられた。

感染性胃腸炎17事例で検出された原因ウイルスは、ノロウイルスが12事例、サポウイルスが2事例、A群ロタウイルスが2事例、C群ロタウイルスが1事例であった(表2, 図2, 3)。事例番号1はサポウイルスが原因であったが、調理従事者便1検体からノロウイルスGIが検出された。また、事例番号16ではノロウイルスGIIが原因であったが、症状のある施設職員便1検体からA群ロタウイルスが検出された。この2事例からそれぞれ検出されたノロウイルス、A群ロタウイルスは疫学調査の結果、今回発生した集団胃腸炎とは関連がないものと考えられた。ノロウイルスが検出された12事例のgenogroupは

GIIが11事例で大部分を占め、GIは事例番号5の小学校で発生した1事例のみであった。

感染性胃腸炎の発生施設は、小学校が5事例、高齢者

施設が5事例、福祉施設と病院がそれぞれ2事例、高校、児童養護施設および宿泊施設がそれぞれ1事例であった。

特に小学校で発生した5事例は、サポウイルスが2事例

表1 平成17年度食中毒事例

| 事例番号 | 発生年月 | 管轄保健福祉事務所 | 原因施設 | 原因食品 | 検体 | ノロウイルス定量PCR | | | 電子顕微鏡観察 | |
|------|---------|-----------|------|------|--------|-------------|-----|--------------|---------|-----|
| | | | | | | 検体数 | 陽性数 | genogroup | 検体数 | 陽性数 |
| 1 | H 17.5 | 秦野 | 飲食店 | 不明 | 患者便 | 14 | 6 | GI | 7 | 4 |
| | | | | | 調理従事者便 | 15 | 2 | GI | 2 | 2 |
| 2 | H 17.11 | 小田原 | 旅館 | 不明 | 患者便 | 6 | 6 | GII | 4 | 4 |
| | | | | | 調理従事者便 | 13 | 2 | GII | N.T. | |
| 3 | H 17.11 | 大和 | 飲食店 | 不明 | 患者便 | 8 | 6 | GI | 5 | 2 |
| | | | | | 調理従事者便 | 3 | 1 | GI | 3 | 0 |
| 4 | H 17.12 | 小田原 | 飲食店 | 不明 | 患者便 | 2 | 2 | GII | 2 | 2 |
| | | | | | 調理従事者便 | 2 | 1 | GII | 1 | 1 |
| 5 | H 17.12 | 平塚 | 飲食店 | 不明 | 患者便 | 10 | 8 | GII | 1 | 1 |
| | | | | | 調理従事者便 | 4 | 2 | GII | N.T. | |
| 6 | H 18.1 | 藤沢 | 飲食店 | 不明 | 患者便 | 18 | 17 | GII | 12 | 6 |
| | | | | | 調理従事者便 | 7 | 1 | GII | N.T. | |
| 7 | H 18.1 | 小田原 | 飲食店 | 不明 | 患者便・吐物 | 43 | 33 | GII | 3 | 3 |
| | | | | | 調理従事者便 | 31 | 3 | GI,GI&II,GII | N.T. | |
| 8 | H 18.2 | 厚木 | 飲食店 | 生力キ* | 患者便 | 5 | 5 | GI,GI&II,GII | 4 | 4 |
| | | | | | 調理従事者便 | 4 | 0 | | N.T. | |

N.T.: 検査せず * : 疫学調査より推定

表2 平成17年度感染性胃腸炎事例

| 事例番号 | 発生年月 | 管轄保健福祉事務所 | 発生施設 | 検体 | 検体数 | 陽性数 | 検出ウイルス | 電子顕微鏡観察 | | |
|------|---------|-----------|--------|---------|-------|-----|-------------|-------------|------|-----|
| | | | | | | | | 検体数 | 陽性数 | |
| 1 | H 17.5 | 小田原 | 小学校 | 発症者便 | 児童 | 40 | 36 | サポウイルス | 40 | 21 |
| | | | | | 職員 | 1 | 1 | | 1 | 1 |
| | | | | | 職員 | 2 | 2 | | 2 | 2 |
| | | | | 非発症者便 | 調理従事者 | 15* | 0 | | 15 | 0 |
| 2 | H 17.5 | 鎌倉 | 高齢者施設 | 発症者便 | 8 | 5 | A群ロタウイルス | 8 | 5 | |
| 3 | H 17.5 | 平塚 | 小学校 | 発症者便 | 12 | 11 | サポウイルス | 9 | 7 | |
| 4 | H 17.5 | 茅ヶ崎 | 小学校 | 発症者便 | 11 | 11 | C群ロタウイルス | 11 | 8 | |
| 5 | H 17.5 | 厚木 | 小学校 | 発症者便・吐物 | 5 | 5 | ノロウイルス(GI) | 4 | 4 | |
| 6 | H 17.6 | 秦野 | 高校 | 発症者便 | 9 | 6 | ノロウイルス(GII) | 6 | 4 | |
| | | | | 非発症者便 | 5 | 1 | | 1 | 1 | |
| 7 | H 17.11 | 平塚 | 高齢者施設 | 発症者便 | 入所者 | 4 | 2 | ノロウイルス(GII) | 1 | 1 |
| | | | | | 職員 | 2 | 2 | | 2 | 2 |
| | | | | 非発症者便 | 調理従事者 | 5 | 0 | | N.T. | |
| 8 | H 17.12 | 津久井 | 福祉施設 | 発症者便 | 入所者 | 3 | 3 | ノロウイルス(GII) | 3 | 2 |
| | | | | | 職員 | 2 | 2 | | 2 | 1 |
| | | | | 非発症者便 | 調理従事者 | 5 | 0 | | N.T. | |
| 9 | H 17.12 | 平塚 | 病院 | 発症者便 | 3 | 2 | ノロウイルス(GII) | N.T. | | |
| 10 | H 17.12 | 足柄上 | 福祉施設 | 発症者便 | 7 | 3 | ノロウイルス(GII) | 7 | 1 | |
| 11 | H 18.1 | 小田原 | 宿泊施設 | 発症者便 | 3 | 3 | ノロウイルス(GII) | N.T. | | |
| | | | | 非発症者便 | 調理従事者 | 7 | | 0 | N.T. | |
| 12 | H 18.1 | 藤沢 | 病院 | 発症者便 | 患者 | 4 | 2 | ノロウイルス(GII) | 3 | 2 |
| | | | 職員 | 2 | 1 | 1 | 0 | | | |
| 13 | H 18.1 | 鎌倉 | 小学校 | 発症者便 | 2 | 2 | ノロウイルス(GII) | 2 | 1 | |
| 14 | H 18.1 | 藤沢 | 高齢者施設 | 発症者便 | 入所者 | 4 | 4 | ノロウイルス(GII) | 3 | 2 |
| | | | | | 職員 | 1 | 1 | | N.T. | |
| | | | | 非発症者便 | 職員 | 4 | 1 | | N.T. | |
| 15 | H 18.2 | 茅ヶ崎 | 高齢者施設 | 発症者便・吐物 | 3 | 1 | ノロウイルス(GII) | 2 | 1 | |
| 16 | H 18.3 | 鎌倉 | 児童養護施設 | 発症者便 | 入所者 | 3 | 3 | ノロウイルス(GII) | 2 | 2 |
| | | | | | 職員 | 1** | 0 | | 1 | 1** |
| | | | | 非発症者便 | 調理従事者 | 11 | 1 | | N.T. | |
| | | | | 食品 | 12 | 0 | N.T. | | | |
| 17 | H 18.3 | 足柄上 | 高齢者施設 | 発症者便 | 11 | 9 | A群ロタウイルス | 5 | 4 | |
| | | | | 非発症者便 | 調理従事者 | 13 | | 2 | N.T. | |

N.T.: 検査せず * : 1検体よりノロウイルスGIを検出 ** : A群ロタウイルスを検出

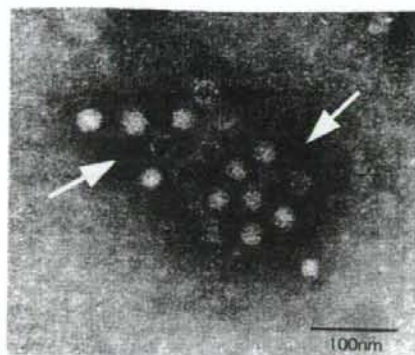


図1 食中毒事例で検出されたノロウイルスの電子顕微鏡像(16万倍)

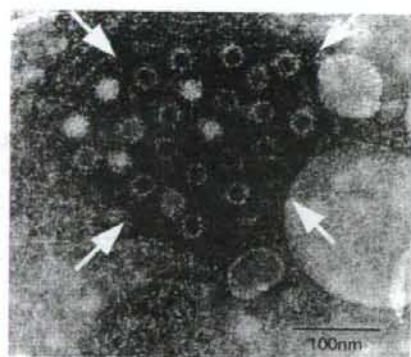


図2 感染性胃腸炎事例で検出されたサボウイルスの電子顕微鏡像(16万倍)

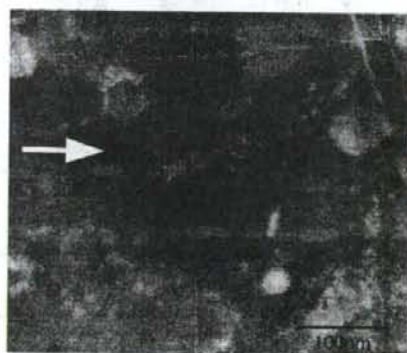


図3 感染性胃腸炎事例で検出されたC群ロタウイルスの電子顕微鏡像(16万倍)

(事例番号1, 3), C群ロタウイルス(事例番号4), ノロウイルスGI(事例番号5), およびノロウイルスGII(事例番号13)がそれぞれ1事例と原因ウイルスが多岐にわたっていたが、発生時期はノロウイルスGIIの事例以外は全て5月に集中していた。サボウイルスおよびC群ロタウイルスによる事例は、神奈川県域で初めて確認された集団発生であり、事例番号1では当該小学校と同じ給食が供給された他2校に集団胃腸炎の発生がなかったこと、事例番号3および4では発症者が一学年に限られていたことなどの疫学調査から、食中毒ではなく感染性胃腸炎と判定された。この3事例では定量PCRでノロウイルスは検出されず、同時に進めていた電子顕微鏡観察により小型球形ウイルス粒子、ロタウイルス粒子を検出することができたため、それぞれのウイルスの確認検査を早期に進めることが可能であった。このようにノロウイルスが検出されない場合には、多種類のウイルスが同時に検索できる電子顕微鏡観察が有用であった。

聞き取り調査から感染性胃腸炎の多くの事例では、施設の利用者とともに職員にも発症がみられた。特に高齢者・福祉施設などで便や吐物の処理を行う介護職員は、感染の危険性が高いと考えられた。また今回、症状のない施設職員からもウイルスが検出された事例があり、不顕性感染の可能性も考えられた。施設内が汚染されると利用者間で感染が広がるだけでなく、利用者と職員および職員と職員の間でも感染が拡大すると推測された。このことから感染拡大を防止するためには、施設職員における日常的な衛生意識の再確認をすることが重要であると考えられた。

このようにひとたび施設内でウイルスによる胃腸炎が起ると、容易に感染が拡大し大規模な集団発生となる。その集団発生の原因ウイルスはほとんどがノロウイルスであったが、今回のようにサボウイルスやロタウイルスが原因となる集団発生も確認されたことから、今後はノ

ロウイルス同様これらのウイルスの動向についても監視する必要があると考えられた。

平成17年度の結果を当所で実施した前年度の結果と比較すると食中毒による集団発生事例はやや減少し、発生時期は冬季に集中していた。一方、感染性胃腸炎による集団発生事例は前年度に引き続き増加傾向にあり、発生時期は冬季に加え春季にもピークがみられたことから、冬季に限らず施設内における対策が必要であると考えられた。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検出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させる事が可能になると考えられた。

最後に、衛生研究所への検体搬入や情報提供にご尽力いただいた各保健福祉事務所、県生活衛生課および健康増進課の方々に深謝いたします。

(平成18年7月20日受理)

新しい遺伝子増幅技術によるノロウイルスの検出方法の比較

¹⁾ 東京大学大学院医学系研究科発達医学教室, ²⁾ 栄研化学株式会社生物化学研究所

柳生 文宏¹⁾ 砂田亜津子²⁾ 小島 禎²⁾
池戸 正成²⁾ 沖津 祥子¹⁾ 牛島 廣治¹⁾

(平成 18 年 1 月 31 日受付)

(平成 18 年 3 月 30 日受理)

Key words: Norovirus, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, reverse transcriptase-loop-mediated isothermal amplification

序 文

ノロウイルスは主に冬期において感染性胃腸炎の原因となり、嘔吐、腹痛、下痢などの症状を引き起こす。また高齢者施設において死亡者が出るなど、集団感染や食中毒が問題となっている。従来 RT-PCR により診断を行うが、検体から抽出精製済みの RNA から始めても cDNA 合成反応、PCR、電気泳動による確認を行うため判定まで 7 時間程度かかる。また 2 時間ほどで判定まで行える Realtime RT-PCR もあるが、より迅速で簡便なかつ経済的な方法が求められている。そこで、同一検体に対し Reverse Transcription-Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) 法¹⁾を用いて RT-PCR 法と比較した。

材料と方法

サンプルは 2004~2005 年のシーズン冬期に札幌、東京、大阪、舞鶴で小児下痢症患者から採取された。102 サンプルの便から QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN) により RNA を抽出し、実験に用いた。RT-LAMP 法は、栄研化学の「Loopamp ノロウイルス GI 検出試薬キット」「Loopamp ノロウイルス GII 検出試薬キット」を用いプロトコールにしたがってリアルタイム濁度測定装置 LA-320C を用いて 63°C 60 分の反応で実験を行った。また、RT-PCR は Capsid 領域を GI 用プライマー G1-SKF (5'-CTGCCCGAA-TTYGTAATGA-3'), G2-SKR (5'-CCAACCCAR-CCATTRTACA-3'), GII 用プライマー COG2F (5'-CARGARBCNATGTTTYAGRTGGATGAG-3'), G2-SKR (5'-CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT-3') を用いて 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 60 秒で 35 サイク

Table Detection of Norovirus GI and GII by RT-LAMP method

| | sequence | GI-LAMP ^{a)} | | GII-LAMP ^{b)} | |
|--|----------|-----------------------|---|------------------------|---|
| | | + | - | + | - |
| | GI | 10 | 6 | 4 | 0 |
| | GII | 92 | 0 | 92 | 0 |
| | Total | 102 | | | |

^{a)} Result by Loopamp Norovirus GI Detection Kit

^{b)} Result by Loopamp Norovirus GII Detection Kit

ル増幅^{2,3)}、電気泳動により判定後、陽性サンプルはシーケンスを行って genogroup を決定した。

結果及び考察

RT-PCR、シーケンスによる結果 GI と判定されたものは 10 サンプルあった。それらのサンプルは RT-LAMP 法では、6 サンプルが GI (+) GII (-) で、4 サンプルは GI (-) GII (-) であった。また RT-PCR、シーケンスにより GII と判定されたものは 92 サンプル有り。RT-LAMP 法で 92 サンプルすべてが GI (-) GII (+) となり、GI (-) GII (-) もしくは GI (+) GII (-) となったものはなかった (Table)。よって、RT-PCR をスタンダードとしてみたときの「Loopamp ノロウイルス GI 検出試薬キット」の感度・特異度はそれぞれ 60%・100%、「Loopamp ノロウイルス GII 検出試薬キット」の感度、特異度はそれぞれ 100%・100% であった。RT-LAMP 法は迅速簡便な診断法で、現在日本でのノロウイルス感染のほとんどを占める GII については非常に高い感度と特異度で検出が可能である。また、RT-LAMP 法は RT 反応と増幅反応から判定までを 1 ステップで行うことができるため、操作は非常に簡便であり、かつ、所要時間、試薬、測定装置を含めたトータルコストを経済的な

別刷請求先: (〒113-0033) 文京区本郷7-3-1

東京大学大学院医学系研究科発達医学教室

柳生 文宏

平成 18 年 5 月 20 日

PCRと同等で低く抑えることが可能である。さらに6つの領域を含む4種類のプライマーを使うので特異性が高く、RT-PCRのようにプロダクトをゲルで泳動する必要がない。よってエチジウムブロマイドのような蛍光インターカレート剤を使う必要がなく、安全性も高い。また、GI RT-PCR陽性/GI RT-LAMP陰性成績は、GI-LAMP試薬の感度やサンプルの塩基配列とプライマーとのホモロジーに原因があると考えられた。

(共同研究者：兼次邦男、山本あつ子、西村忠史、杉田久美子、西村修一、上田勇一、中谷茂和、Phan Gia Tung、Pattara Khamrin)

文 献

- 1) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, *et al.* : Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 2000 ; 28 : e63.
- 2) Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, *et al.* : Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 2002 ; 100 : 07-14.
- 3) Shinohara M, Kageyama T : Rapid and efficient detection method of Norwalk virus. *Nippon Rinsyo* 2002 ; 60 : 1181-7.

Detection of Norovirus by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Method

Fumihiko YAGYU¹, Atsuko SUNADA², Tadashi KOJIMA², Masanari IKEDO²,
Shoko OKITSU-NEGISHI¹ & Hiroshi USHIJIMA¹

¹Department of Developmental Medical Sciences, Graduate School of Medicine,
The University of Tokyo, ²EIKEN CHEMICAL CO., LTD

[J.J.A. Inf. D. 80 : 275~276, 2006]

新しい遺伝子増幅技術によるノロウイルスの検出方法の比較

¹ 東京大学大学院医学系研究科発達医学教室, ² 栄研化学株式会社生物化学研究所

柳生 文宏¹⁾ 砂田亜津子²⁾ 小島 禎²⁾
池戸 正成²⁾ 沖津 祥子¹⁾ 牛島 廣治¹⁾

(平成 18 年 1 月 31 日受付)

(平成 18 年 3 月 30 日受理)

Key words: Norovirus, reverse transcriptase-polymerase chain reaction,
reverse transcriptase-loop-mediated isothermal amplification

序 文

ノロウイルスは主に冬期において感染性胃腸炎の原因となり、嘔吐、腹痛、下痢などの症状を引き起こす。また高齢者施設において死亡者が出るなど、集団感染や食中毒が問題となっている。従来 RT-PCR により診断を行うが、検体から抽出精製済みの RNA から始めても cDNA 合成反応、PCR、電気泳動による確認を行うため判定まで 7 時間程度かかる。また 2 時間ほどで判定まで行える Realtime RT-PCR もあるが、より迅速で簡便かつ経済的な方法が求められている。そこで、同一検体に対し Reverse Transcription-Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) 法を用いて RT-PCR 法と比較した。

材料と方法

サンプルは 2004~2005 年のシーズン冬期に札幌、東京、大阪、舞鶴で小児下痢症患者から採取された。102 サンプルの便から QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN) により RNA を抽出し、実験に用いた。RT-LAMP 法は、栄研化学の「Loopamp ノロウイルス GI 検出試薬キット」「Loopamp ノロウイルス GII 検出試薬キット」を用いプロトコールにしたがってリアルタイム濁度測定装置 LA-320C を用いて 63°C 60 分の反応で実験を行った。また、RT-PCR は Capsid 領域を GI 用プライマー G1-SKF (5'-CTGCCCGAA-TTYGTAATGA-3')、G2-SKR (5'-CCAACCCAR-CCATRTACA-3')、GII 用プライマー COG2F (5'-CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG-3')、G2-SKR (5'-CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT-3') を用いて 94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 60 秒で 35 サイク

Table Detection of Norovirus GI and GII by RT-LAMP method

| sequence | | GI-LAMP ^{a)} | | GII-LAMP ^{b)} | |
|----------|----|-----------------------|----|------------------------|----|
| | | - | + | - | + |
| GI | 10 | 6 | 1 | 0 | 10 |
| | 92 | 0 | 92 | 92 | 0 |
| Total | | 102 | | | |

^{a)} Result by Loopamp Norovirus GI Detection Kit

^{b)} Result by Loopamp Norovirus GII Detection Kit

ル増幅^{2,3)}、電気泳動により判定後、陽性サンプルはシーケンスを行って genogroup を決定した。

結果及び考察

RT-PCR、シーケンスによる結果 GI と判定されたものは 10 サンプルあった。それらのサンプルは RT-LAMP 法では、6 サンプルが GI (+) GII (-) で、4 サンプルは GI (-) GII (-) であった。また RT-PCR、シーケンスにより GII と判定されたものは 92 サンプル有り。RT-LAMP 法で 92 サンプルすべてが GI (-) GII (+) となり、GI (-) GII (-) もしくは GI (+) GII (-) となったものはなかった (Table)。よって、RT-PCR をスタンダードとしてみたときの「Loopamp ノロウイルス GI 検出試薬キット」の感度・特異度はそれぞれ 60%・100%、「Loopamp ノロウイルス GII 検出試薬キット」の感度、特異度はそれぞれ 100%・100% であった。RT-LAMP 法は迅速簡便な診断法で、現在日本でのノロウイルス感染のほとんどを占める GII については非常に高い感度と特異度で検出が可能である。また、RT-LAMP 法は RT 反応と増幅反応から判定までを 1 ステップで行うことができるため、操作は非常に簡便であり、かつ、所要時間、試薬、測定装置を含めたトータルコストを経済的な

別刷請求先: (〒113-0033) 文京区本郷7-3-1

東京大学大学院医学系研究科発達医学教室
柳生 文宏

平成 18 年 5 月 20 日

PCR と同等で低く抑えることが可能である。さらに6つの領域を含む4種類のプライマーを使うので特異性が高く、RT-PCRのようにプロダクトをゲルで泳動する必要がない。よってエチジウムブロマイドのような蛍光インターカレート剤を使う必要がなく、安全性も高い。また、GI RT-PCR 陽性/GI RT-LAMP 陰性成績は、GI-LAMP 試薬の感度やサンプルの塩基配列とプライマーとのホモロジーに原因があると考えられた。

(共同研究者：兼次邦男，山本あつ子，西村忠史，杉田久美子，西村修一，上田勇一，中谷茂和，Phan Gia Tung, Pattara Khamrin)

文 献

- 1) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, *et al.* : Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 2000 ; 28 : e63.
- 2) Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, *et al.* : Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 2002 ; 100 : 07-14.
- 3) Shinohara M, Kageyama T : Rapid and efficient detection method of Norwalk virus. *Nippon Rinsho* 2002 ; 60 : 1181-7.

Detection of Norovirus by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Method

Fumihiko YAGYU¹, Atsuko SUNADA², Tadashi KOJIMA², Masanari IKEDO²,
Shoko OKITSU-NEGISHI¹ & Hiroshi USHIJIMA¹

¹Department of Developmental Medical Sciences, Graduate School of Medicine,
The University of Tokyo, ²EIKEN CHEMICAL CO., LTD

[J.J.A. Inf. D. 80 : 275-276, 2006]

2006/2007 シーズンにおける散発性及び集団発生の 感染性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

大塚有加 市川高子 豊嶋千俊* 近藤玲子 大瀬戸光明 井上博雄

Detection of Viruses from Sporadic Infectious Gastroenteritis and Outbreaks
during 2006/2007 Season in Ehime Prefecture

Yuka OOTSUKA, Takako ICHIKAWA, Chitoshi TOYOSHIMA, Reiko KONDO
Mitsuaki OSETO, Hiroo INOUE

Cases of infectious gastroenteritis in ehime prefecture, under the National Epidemiological surveillance of Infectious Diseases (NESID) in the 2006/2007 season, started to markedly increase from November, as other areas of Japan, approximately one month earlier than average year. Norovirus (NV) is classified into genogroups (G) I - V. G I and G II cause human infection. In 2006/2007 NV (G II) was pandemic. The numbers of NV (G II) detected by PCR (polymerase chain reaction) from patients with gastroenteritis rapidly increased from November in ehime prefecture. NV from outbreaks of gastroenteritis in 2006 were mainly G II as sporadic cases. G II /4 was detected in 22 (69%) of 32 sporadic cases and 7 (70%) of 10 outbreaks, in which G II genotypes was identified by nucleotide sequencing. NV epidemic during 2006/2007 season was caused by G II /4 variants having new mutation.

Keywords : Norovirus, infectious gastroenteritis, genotype

はじめに

感染性胃腸炎は、多種多様の病原体、つまり多くの細菌、ウイルス、寄生虫が原因となる疾患である。この中でも国の病原微生物検出情報への報告数としてはウイルス性のものが最も多い。

感染性胃腸炎の原因ウイルスの主要なものとして、ノロウイルス (NV)、サボウイルス (SV)、ロタウイルス、腸管アデノウイルス、アストロウイルスがある。これらの中で、NV の報告数が最も多い。

NV は主に経口感染でヒトに嘔吐、下痢などの急性胃腸炎症状を起こす。NV は RNA ウィルスで、大きく genogroup (G) I ~ V に分けられ、G I と G II が主にヒトに感染する。少なくとも G I は15、G II は18の遺伝子型が存在する。NV は糞便及び吐物に大量に排出され、症状消失後も長期に糞便中に排出されるため、注意が必要である¹⁾。

2006 / 2007シーズンは全国的に NV が大流行し、過去最高の患者の報告がなされた¹⁾。愛媛県においても同様に、NV による急性胃腸炎が多発した。そこで愛媛県の流行状況を把握するために、感染性胃腸炎原因ウイルス検出状況の調査と、検出された NV の遺伝子型を指標とした疫学的解析を実施した。

材料と方法

1 材料

散発性胃腸炎患者の材料は2003年1月から2007年6月の間に定点医療機関で採取された糞便を、集団発生事例の材料は2006年に発生した17事例の患者及び調理従事者の糞便、食品、ふきとり検体を用いた。各材料は使用時まで -20℃で保存した。

2 方法

感染性胃腸炎起因ウイルス検索には、電子顕微鏡法 (EM)、RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法を実施した。EM で検出されたロタウイルスは、イムノクロマト法 (第一化学) 及び RPHA 法で群別した。NV 遺伝子の検出

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地
*現 食肉衛生検査センター

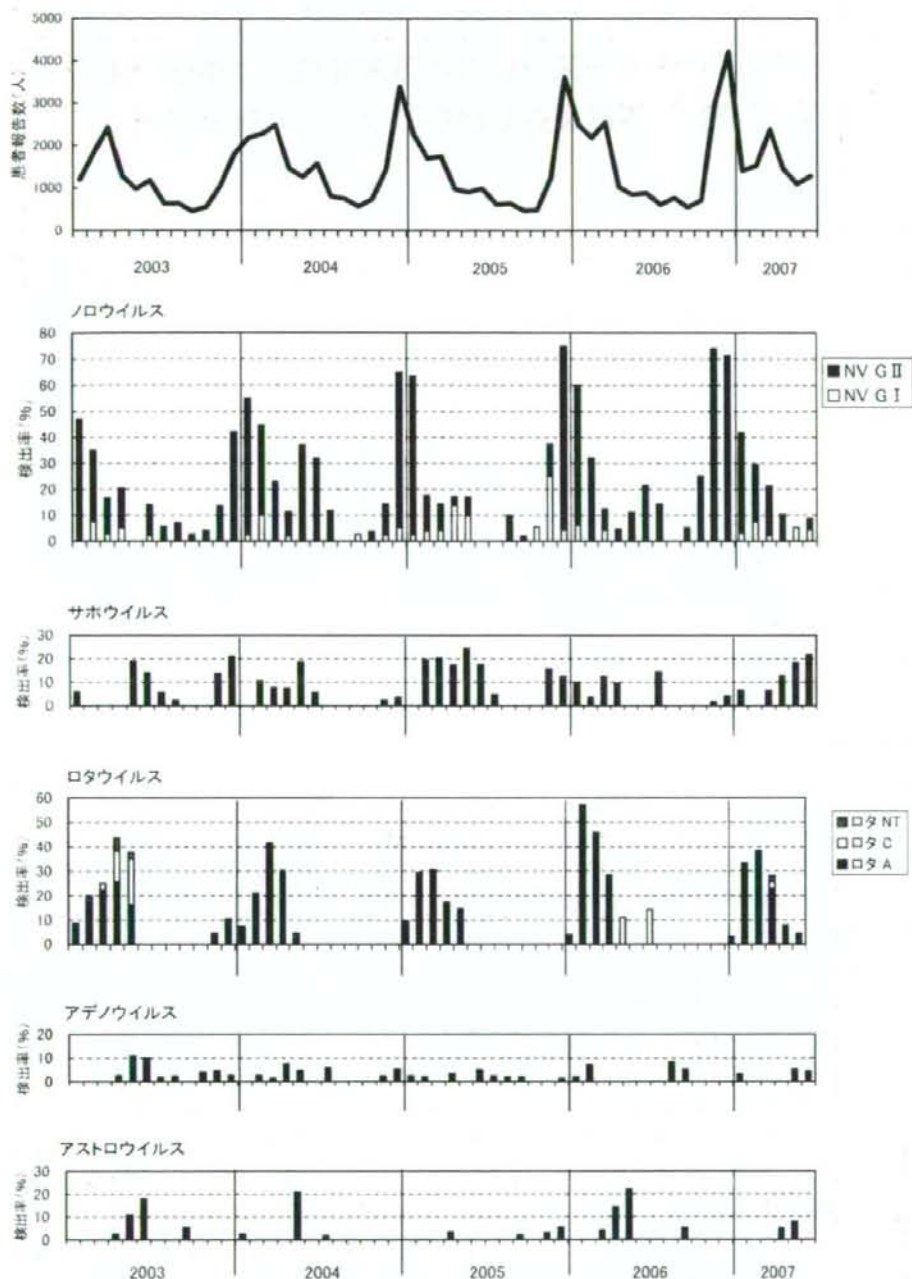


図1 感染性胃腸炎患者報告数と起因ウイルス検出率の月別推移

には、COGF/RプライマーとRING TaqManプローブを用いた、影山ら²⁾のリアルタイムPCR法を実施した。SV遺伝子の検出は、岡田ら³⁾のSV系プライマー(1st SV-F1/R1, nested SV-F21/R2)を用いたnested

PCRを行った。

さらに、NV陽性検体についてNV系プライマー(COG1F/G1-SKR及びCOG2F/G2-SKR)を用いたRT-PCR法により、NV遺伝子のキャプシド領域を増

表1 感染性胃腸炎からのウイルス検出状況(2003.1-2007.6)

| 年別 | ウイルス別 | 1月 | 2月 | 3月 | 4月 | 5月 | 6月 | 7月 | 8月 | 9月 | 10月 | 11月 | 12月 | 計 |
|-------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 2003年 | ノロウイルス G I | | 3 | 1 | 2 | | 1 | | | | | | | 7 |
| | ノロウイルス G II | 16 | 11 | 5 | 6 | | 6 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 16 | 71 |
| | サポウイルス | 2 | | | | 7 | 7 | 3 | 1 | | | 3 | 8 | 31 |
| | ロタウイルス A | 3 | 7 | 8 | 10 | 6 | | | | | | 1 | 3 | 38 |
| | ロタウイルス C | | | 1 | 5 | 7 | | | | | | | | 13 |
| | ロタウイルス NT | | 1 | | 2 | 1 | | | | | | | 1 | 5 |
| | アデノウイルス | | | | 1 | 4 | 5 | 1 | 1 | | 1 | 1 | 1 | 15 |
| | アストロウイルス | | | | 1 | 4 | 9 | | | 2 | | | | 16 |
| | 小計 | 検出数 | 21 | 22 | 15 | 27 | 29 | 28 | 7 | 5 | 3 | 2 | 8 | 29 |
| | 検査数 | 34 | 40 | 36 | 39 | 37 | 50 | 53 | 42 | 37 | 24 | 22 | 38 | 452 |
| 2004年 | ノロウイルス G I | 1 | 4 | | 1 | | | | | 1 | | 1 | 3 | 11 |
| | ノロウイルス G II | 21 | 13 | 15 | 5 | 16 | 17 | 6 | | | 1 | 5 | 34 | 133 |
| | サポウイルス | | 4 | 5 | 4 | 8 | 3 | | | | | 1 | 2 | 27 |
| | ロタウイルス A | 3 | 8 | 27 | 16 | 1 | | | | | | | | 55 |
| | ロタウイルス C | | | | | | | | | | | | | |
| | ロタウイルス NT | | | | | 1 | | | | | | | | 1 |
| | アデノウイルス | | 1 | 1 | 4 | 2 | | 3 | | | | 1 | 3 | 15 |
| | アストロウイルス | 1 | | | | 9 | | 1 | | | | | | 11 |
| | 小計 | 検出数 | 26 | 30 | 48 | 30 | 37 | 20 | 10 | 0 | 1 | 1 | 8 | 42 |
| | 検査数 | 40 | 38 | 65 | 53 | 43 | 53 | 51 | 46 | 37 | 27 | 42 | 57 | 552 |
| 2005年 | ノロウイルス G I | 1 | 2 | 2 | 4 | 4 | | | | | 2 | 8 | 3 | 26 |
| | ノロウイルス G II | 25 | 7 | 5 | 1 | 3 | | | 5 | 1 | | 4 | 51 | 102 |
| | サポウイルス | | 10 | 10 | 5 | 10 | 7 | 2 | | | | 5 | 9 | 58 |
| | ロタウイルス A | 4 | 14 | 15 | 5 | 6 | | | | | | | | 44 |
| | ロタウイルス C | | | | | | | | | | | | | |
| | ロタウイルス NT | | 1 | | | | | | | | | | | 1 |
| | アデノウイルス | 1 | 1 | | 1 | | 2 | 1 | 1 | 1 | | | | 9 |
| | アストロウイルス | | | | 1 | | | | | 1 | | 1 | 4 | 7 |
| | 小計 | 検出数 | 31 | 35 | 32 | 17 | 23 | 9 | 3 | 6 | 3 | 2 | 18 | 68 |
| | 検査数 | 41 | 51 | 49 | 29 | 41 | 40 | 42 | 50 | 50 | 37 | 32 | 72 | 534 |
| 2006年 | ノロウイルス G I | 3 | | 1 | | | | | | | | | | 4 |
| | ノロウイルス G II | 27 | 9 | 2 | 1 | 1 | 3 | 1 | | 1 | 6 | 40 | 35 | 126 |
| | サポウイルス | 5 | 1 | 3 | 2 | | | 1 | | | | 1 | 2 | 15 |
| | ロタウイルス A | 2 | 16 | 11 | 6 | | | | | | | | | 35 |
| | ロタウイルス C | | | | | 1 | | 1 | | | | | | 2 |
| | ロタウイルス NT | | | | | | | | | | | | | |
| | アデノウイルス | 1 | 2 | | | | | | 1 | 1 | | | | 5 |
| | アストロウイルス | | | 1 | 3 | 2 | | | | 1 | | | | 7 |
| | 小計 | 検出数 | 38 | 28 | 18 | 12 | 4 | 3 | 3 | 1 | 3 | 6 | 41 | 37 |
| | 検査数 | 50 | 28 | 24 | 21 | 9 | 14 | 7 | 12 | 19 | 24 | 54 | 49 | 311 |
| 2007年 | ノロウイルス G I | 1 | 2 | 1 | | 2 | 1 | | | | | | | 7 |
| | ノロウイルス G II | 12 | 6 | 9 | 4 | | 1 | | | | | | | 32 |
| | サポウイルス | 2 | | 3 | 5 | 7 | 5 | | | | | | | 22 |
| | ロタウイルス A | 1 | 9 | 18 | 9 | 3 | 1 | | | | | | | 41 |
| | ロタウイルス C | | | | 1 | | | | | | | | | 1 |
| | ロタウイルス NT | | | | 1 | | | | | | | | | 1 |
| | アデノウイルス | 1 | | | | 2 | 1 | | | | | | | 4 |
| | アストロウイルス | | | | 2 | 3 | | | | | | | | 5 |
| | 小計 | 検出数 | 17 | 17 | 31 | 22 | 17 | 9 | | | | | | |
| | 検査数 | 31 | 27 | 47 | 39 | 38 | 23 | | | | | | | 205 |
| 合計 | 検出数 | 133 | 132 | 144 | 108 | 110 | 69 | 23 | 12 | 10 | 11 | 75 | 176 | 1003 |
| | 検査数 | 196 | 184 | 221 | 181 | 168 | 180 | 153 | 150 | 143 | 112 | 150 | 216 | 2054 |

幅し、そのPCR産物についてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し遺伝子型別を行った。

結果

1 散発性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

図1に、2003年1月から2007年6月までの、感染症発生動向調査事業における感染性胃腸炎の患者報告数と散発性胃腸炎患者検体からのウイルス検出率の推移を重ねて示し、表1にウイルス検出状況の一覧を示した。本疾患は例年冬季に患者数が増加し、3月から4月の穏やかなピークと冬季の急峻なピークの、2峰性のピークを形成する⁴⁾。2006/2007シーズンは例年より約1ヶ月早く流行が開始し、11月に入り患者数が急増した。第49週(12月上旬)には定点当たり患者数は37.19人/週と非常に大きなピークを形成し、12月の患者報告数は4000人を超える大規模なものとなった⁵⁾。

ウイルス検出率の推移は、患者数の増減と相応した結果がみられた。2006/2007シーズンにおいて、NVは10月頃から検出が増加し始め、例年より約1ヶ月早く11月にピークを形成し、続いて12月も高い検出率を示した。またその大部分がGⅡであった。さらに全検出ウイルスに対するNV(GⅡ)検出割合は11月が98%、12月が95%であり、この時期の感染性胃腸炎の主要原因ウイルスであった。

SVは例年11月から7月頃に検出されている。2005年に検出数が増加したが、2006/2007シーズンは11月、12

月は2~4%と低い検出率であり、春先から増加がみられた。ロタウイルスは例年と同様、主に1月から5月に多く検出された。アデノウイルスで季節的消長がみられなかったこと、アストロウイルスが春に多く検出されたことは、それぞれ例年の動向と同じであった⁶⁾。

2 集団発生事例のウイルス検出状況

2006年において当所が検査を実施した集団発生事例の一覧を表2に示した。全17事例のうち13事例からNVが検出された。特に2006/2007シーズンにあたる10月以降の発生事例は、12事例中11事例の患者便からNV(GⅡ)が検出され、さらに調理従事者や食品、ふきとり検体からNV(GⅡ)が検出された事例もあった。11月、12月において発生事例数が増加したことは、散発性の感染性胃腸炎患者の発生動向と相関するものであった。

3 検出ノロウイルスの遺伝子型の解析

2006/2007シーズンの散発性及び集団発生胃腸炎患者から検出されたNV(GⅡ)の遺伝子型別の結果を表3に示した。散発性では32例中22例(69%)でGⅡ/4が検出された。その他にGⅡ/2が7例(22%)、GⅡ/6が2例(6%)、GⅡ/3が1例(3%)で検出された。集団発生事例では10事例中7事例(70%)でGⅡ/4が検出された。

次にこれらの検出株の塩基配列について、系統樹解析を行い、結果を図2に示した。検体番号の頭2桁の数字

表2 2006年における集団発生事例(食中毒及び施設内発生)

| 事例No. | 発生月 | 発生施設 | 発症者/喫食者数(人) | 陽性数/検査数 | | | | 検出ウイルス |
|-------|-----|---------|-------------------------------------|---------|-------|------|------|---------------------|
| | | | | 患者 | 調理従事者 | 食品 | ふきとり | |
| 1 | 1月 | 福祉施設 | 57 / - | 8/8 | | | | NV GⅡ |
| 2 | 3月 | 飲食店 | 16 / 26 | 12/12 | 0/4 | | | NV GⅠ(9), NV GⅡ(11) |
| 3 | 5月 | 研修施設 | 14 / 245 | 0/3 | | | | - |
| 4 | 6月 | 研修施設 | 37 / 75 | 0/4 | | | | - |
| 5 | 8月 | 学生寮 | 14 / 32 | 0/5 | | | | ※原虫検査:クリプトスポリジウム(1) |
| 6 | 10月 | 飲食店 | 5 / 60 | 6/6 | 1/3 | | | NV GⅡ |
| 7 | 11月 | 研修施設 | 6 / 76 | 0/4 | | | | - |
| 8 | 11月 | 店舗購入 | 15 / 41 | 4/4 | | | | NV GⅡ |
| 9 | 11月 | 福祉施設・給食 | 24 / 32 | 9/9 | 1/2 | | 2/10 | NV GⅡ |
| 10 | 11月 | 学生寮 | 28 / 130 | 8/8 | 0/12 | | | NV GⅡ |
| 11 | 12月 | 福祉施設 | 33 / 65 | 4/5 | | | | NV GⅡ |
| 12 | 12月 | 学生寮 | 34 / 89 | 2/2 | | | | NV GⅡ |
| 13 | 12月 | 福祉施設 | 23 / 90 | 4/4 | | | | NV GⅡ |
| 14 | 12月 | 飲食店 | 73 / 127 | 5/5 | 0/1 | | | NV GⅡ |
| 15 | 12月 | 食家・弁当 | 96 / 3840 [※] ※2日間経過後人数 | 10/11 | 14/25 | 3/12 | 1/11 | NV GⅡ |
| 16 | 12月 | 弁当 | 63 / 148 | 10/11 | 3/6 | | | NV GⅡ |
| 17 | 12月 | 福祉施設 | 29 / - | 3/4 | | | | NV GⅡ |

表3 2006/07シーズンの散発性及び集団発生胃腸炎におけるノロウイルス遺伝子型別検出数

| | 散発性 | 集団発生 |
|---------|-----|------|
| G II /4 | 22 | 7 |
| G II /2 | 7 | |
| G II /6 | 2 | |
| G II /3 | 1 | |
| G II | | 3 |
| 計 | 32 | 10 |



図2 NV系統樹

は検体採取年を示す。2006/2007シーズンに流行した株は図2のG II /4 dに属するものが多いことがわかった。

考察

2006/2007シーズンはNVが全国的に大流行した。国の集計によると、感染症発生動向調査における感染性胃腸炎の患者数は、2006年第42週（10月中旬）から大きく増加し、第50週に定点当たり22.8人と1981年の調査開始以来最高のピークとなった¹⁾。愛媛県においても例年より約1ヶ月早く11月に患者数が急増し、12月上旬（第

49週）には定点当たり37.19人/と非常に大きなピークを形成した。それに相俟いNV（G II）の検出率も10月から増加し始め11月にピークを形成後、12月も依然として高い結果となった。集団発生事例についてもNV（G II）に起因するものが大多数を占めた。

これら散発性及び集団発生事例から検出されたNVの遺伝子型はG II /4が多く、このG II /4型が2006/2007シーズンの散発性及び集団発生事例の胃腸炎の主要原因となっていたことが示唆された。

国立感染症研究所及び都道府県の衛生研究所が共同で実施したG II /4株のゲノム解析の結果、2006/2007シーズンに日本で流行したNV株は、2006年初冬に世界各地で同定された英国株、EU株、香港株と近縁で、これまでにわが国で流行した株とは起源が異なることがわかった¹⁾。県内で主に流行したNV株（G II /4 d）についても、塩基配列解析から、新しい変異株であることが判明した。2006年春にヨーロッパで流行した株が広まり、日本でも大流行を招き、県内においても同様であったといえる。今後も新しい変異株の発生を視野に入れ、NVをはじめとした胃腸炎起因ウイルスの検出状況、患者発生状況の動向には注意する必要がある。

まとめ

愛媛県における、2006/2007シーズンの散発性及び集団発生の胃腸炎患者からウイルス検出状況について調査した結果、次の結論を得た。

- 1 例年より約1ヶ月早い11月にNVの検出が急増し、そのピークは感染性胃腸炎患者数と相関していた。
- 2 検出されたNVの遺伝子型はG II /4型であり、2006年春にヨーロッパで流行した変異株であった。

文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター：病原微生物検出情報、28、10、1-3（2007）
- 2) 影山努ほか：Vita、18、42-49（2001）
- 3) Okada, M. et al. : Arch. Virol. Jul. 147, 7, 1445-1451（2002）
- 4) 近藤玲子ほか：愛媛衛環研年報、5、1-8（2002）
- 5) 愛媛県感染症情報センター：愛媛県感染症発生動向調査事業報告書（2006）
- 6) 大瀬戸光明ほか：愛媛衛環研年報、3、5-9（2000）
- 7) 国立感染症研究所感染症情報センター：病原微生物検出情報、28、10、3-4（2007）