

表2-2. 平成15年度に福井県でノロウイルス陽性となった急性胃腸炎集団発生

事例No.	発生年月日	発生施設 原因施設	感染源 原因食品	発症者 数	曝露可能者数 喫食者数	NV陽性数 /検査数	増幅された PCR産物の SSCPパターン	遺伝子型- 配列パターン名	推定感染経路	備考
21501	2003.10.24	飲食店	喫食者 グループ での感染?	18	36	7 / 13	1種類	G II / 4-H15-2	ヒト-ヒト(感染症)?	他の利用客からは 発症なし
21502	2003.11.11	高齢者施設		57	126	6 / 28	1種類	G II / 4-H15-3	ヒト-ヒト(感染症)	
21503	2003.11.20	飲食店	仕出し 弁当	44	72	6 / 12	2種類 (相同性99%)	G II / 6-H15-1, G II / 6-H15-2	従事者による 食品汚染(食中毒)	
21504	2003.12.11	小学校		49	88	7 / 7	1種類	G II / 3-H15-1	ヒト-ヒト(感染症)	
21505	2004.1.27	高齢者施設		18	90	6 / 16	1種類	G II / 4-H15-3	ヒト-ヒト(感染症)	
21506	2004.2.28	保育園		51	238	14 / 28	2種類 (有症者と 拭き取り*で別)	G II / 4-H15-6, G II / 2-H15-1*	ヒト-ヒト(感染症)	
21507	2004.3.7	家庭?		2	2	1 / 1		G II / 4-H15-7		飲食店を疑ったの苦情
21508	2004.3.10	宿泊施設		17	55	16 / 38	1種類	G I / 1-H15-1	ヒト-ヒト(感染症)	
21509	2004.3.15	高齢者施設		24	138	7 / 8	1種類	G II / 4-H15-7	ヒト-ヒト(感染症)	
21510	2004.3.29	飲食店		209	748	37 / 63	3種類 (拭き取り*が 異なる)	G II / 4-H15-7, G II / 4-H15-9, G II / 4-H15-8*	従事者による 食品汚染(食中毒)	

表2-3. 平成16年度に福井県でノロウイルス陽性となった急性胃腸炎集団発生

事例No.	発生年月日	発生施設 原因施設	感染源 原因食品	発症者 数	曝露可能者数 喫食者数	NV陽性数 /検査数	増幅された PCR産物の SSCPパターン	遺伝子型- 配列パターン名	推定感染経路	備考
21603	2004.4.21	小学校		61	?	4 / 6	1種類	G II / 2-H16-1	ヒト-ヒト(感染症)	12クラス中12クラスに ほぼ集中
21604	2004.4.23	高齢者施設	介護 職員?	16	38	5 / 20	1種類	G II / 4-H16-1	ヒト-ヒト(感染症)	
21607	2004.11.11	知的障害者 施設		63	273	7 / 10	1種類	G I / 8-H16-1	ヒト-ヒト(感染症)	食10種中の1種から 広がる
21608	2004.12.25	家庭?		3	6	1 / 1		G I / 2-H16-1		ケーキを疑ったの苦情
21609	2005.1.10	仕出し屋	仕出し 弁当	24	46	4 / 4	1種類	G II / 4-H16-4	従事者による 食品汚染(食中毒)	県外でのイベント参加
21610	2005.1.6	保育所		9	77	1 / 5	21612と一致	G II / 4-H16-5	不明 (唯一の陽性者は 散発的感染?)	検査陽性者は 21612従事者の子供
21611	2005.1.16	病院	入院患者	7	?	1 / 1		G II / 4-H16-6	ヒト-ヒト(感染症)	
21612	2005.1.16	飲食店	従事者	26	58	14 / 19	1種類	G II / 4-H16-5	従事者による 食品汚染(食中毒)	21610患者が 従事者の子供
21613	2005.1.17	保育所		38	115	7 / 10	1種類	G II / 4-H16-2	ヒト-ヒト(感染症)	
21614	2005.1.24	宴会場	出席者?	24	53	10 / 27	1種類	G II / 4-H16-7	ヒト-ヒト(感染症)?	発症者の席に偏り
21615	2005.1.17	保育所		33		1 / 2		G II / 5-H16-1	ヒト-ヒト(感染症)	
21616	2005.1.29	飲食店	酢カキ	4	4	2 / 22	患者ごとに バラバラ	G I / 11-H16-1, G I / ?	カキ喫食(食中毒)	
21617	2005.2.7	家庭?	カキ料理	3	4	1 / 2		G I / 11-H16-2	カキ喫食(食中毒)	飲食店を疑ったの苦情 だったが、2/5の家庭での 夕食にカキフライ・酢カキ など喫食
21618	2005.2.8	寮・合宿所		約80	249	5 / 10	1種類	G I / 3-H16-1	従事者による 食品汚染(食中毒)	
21619	2005.2.22	高齢者施設	ショート 利用者?	16	128	3 / 3	1種類	G II / 4-H16-5	ヒト-ヒト(感染症)	緊急ショート利用者から 同室者へ、2階フロアへ、 そして1階へと広がった
21620	2005.3.8	イベント 会場	カキ料理	11	30	3 / 3	患者ごとに バラバラ	G II / 5-H16-1, G I / 11-H16-1, G I / 8-H16-1	カキ喫食(食中毒)	カツアードで焼きカキ・ 生カキを食べ、さらに カキを持ち帰っている
21621	2005.3.10	高齢者施設		18	71	1 / 2	21619と一致	G II / 4-H16-5	ヒト-ヒト(感染症)	21619の施設と 隣り合わせ

表2-4. 平成17年度に福井県でノロウイルス陽性となった急性胃腸炎集団発生

事例No.	発生年月日	発生施設 原因施設	感染源 原因食品	発症者 数	曝露可能者数 喫食者数	NV陽性数 検査数	増幅された PCR産物の SSCPパターン	遺伝子型- 配列パターン名	推定感染経路	備考
21701	2005.5.1	スポーツ人会 会場		182	1520	5 / 7	1種類	G II / 2-H17-1	ヒト-ヒト(感染症)	
21702	2005.5.27	小学校		16	142	4 / 5	1種類	G I / 4-H17-1	ヒト-ヒト(感染症)	
21703	2005.7.14	知的障害者 施設		22	32	5 / 6	1種類	G II / 6-H17-1	ヒト-ヒト(感染症)	
21706	2005.10.8	旅館		88	366	2 / 24	2種類 (相同性99%)	G II / 7-H17-1, G II / 7-H17-2	従事者による食品 汚染(食中毒)?	旅館での宴会・宿泊
21707	2005.11.30	保育園		16	63	2 / 3	1種類	G II / 3-H17-2	ヒト-ヒト(感染症)	
21708	2005.12.19	イベント 会場		34	70	6 / 30	1種類	G II / 7-H17-2	感染症?	
21709	2005.12.24	宴会場		35	73	6 / 16	2種類 (無症状の 調理従事者* のみ異なる)	G II / 3-H17-2, G II / 7-H17-2*	従事者による食品 汚染(食中毒)	結婚披露宴
21710	2006.2.6	飲食店	カキ料理	12	49	9 / 14	有症者ごとに バラバラ	G I / 4-H17-2, G I / 8-H17-1, G I / 8-H17-2, G II / 3-H17-4, G II / 4-H17-2, G II / 6-H17-2, G II / 12-H17-1	カキ喫食(食中毒)	盛りつきカキを 生もしくは焼いて喫食
21711	2006.2.12	飲食店	仕出し 料理	15	36	9 / 15	1種類	G II / 4-H17-3	従事者による食品 汚染(食中毒)	
21712	2006.2.19	飲食店	生カキ	14	19	11 / 19	有症者ごとに バラバラ	G I / 4-H17-2, G I / 4-H17-3, G I / 8-H17-1, G I / 14-H17-1, G II / 3-H17-2, G II / 3-H17-5, G II / 4-H17-4, G II / 6-H17-3, G II / 9-H17-1, G II / 9-H17-2, G II / 9-H17-3	カキ喫食(食中毒)	生カキを喫食
21713	2006.2.19	家庭?		4	5	4 / 4	1種類	G II / 4-H17-5	家族内感染?	飲食店を疑ったの苦情

表2-5. 平成18年度に福井県でノロウイルス陽性となった急性胃腸炎集団発生

事例No.	発生年月日	発生施設 原因施設	感染源 原因食品	発症者 数	曝露可能者数 喫食者数	NV陽性数 /検査数	増幅された PCR産物の SSCPパターン	遺伝子型- 配列パターン名	推定感染経路	備考
21801	2006.4.9	宴会場	4/8の 会食	26	181	7 / 10	1種類	G II /6-H18-1	従事者による食品 汚染(食中毒)?	県外で行われた 結婚披露宴参加者
21802	2006.4.9	高齢者施設		20	93	1 / 1		G II /4-H18-1	ヒト-ヒト(感染症)	
21803	2006.4.16	飲食店	4/14の 会食	11	22	4 / 12	1種類	G II /3-H18-1	従事者による 食品汚染(食中毒)	NV陽性の従事者は 調理時に症状あり
21807	2006.5.28	旅館	5/27-29に 提供された 食品	8	10	8 / 13	1種類	G II /4-H18-2	従事者による 食品汚染(食中毒)	宿泊客(5/27+ 仕出し弁当5/27-29) 喫食者が発症
21809	2006.6.6	飲食店		5	21	1 / 9		G II /3-H18-2*		潜伏時間数時間 従事者が散発感染?
21813	2006.6.26	旅館	宿泊者の 持ち込み	4	11	3 / 5	1種類	G II /4-H18-3	ヒト-ヒト(感染症)	県外中学生の 宿泊学習
21815	2006.10.30	家庭?	幼児から 感染拡大?	4	5	2 / 4	1種類	G II /4-H18-5	家族内感染?	飲食店を疑ったの苦情
21816	2006.11.4	高齢者施設		23	130	3 / 6	1種類	G II /4-H18-5	ヒト-ヒト(感染症)	
21817	2006.11.11	宴会場	出席者が 会場で喫食	135	264	1 / 1		G II /4-H18-9	ヒト-ヒト(感染症)	県外で行われた 結婚披露宴参加者
21818	2006.11.19	宴会場		9	30	7 / 7	1種類	G II /4-H18-10		県外で行われた 結婚披露宴参加者
21819	2006.11.19	ホテル	11/18 夕食	100	137	11 / 30	1種類	G II /4-H18-5	従事者による 食品汚染(食中毒)	
21820	2006.11.21	ホテル	11/15夕食 朝食	80	249	1 / 1		G II /4-H18-11	従事者による食品 汚染(食中毒)	県外のホテル利用
21821	2006.11.29	飲食店		2	2	2 / 2	1種類	G II /4-H18-5	グループ内感染?	飲食店を疑ったの苦情
21822	2006.11.26	宴会場		22	29	1 / 1		G II /4-H18-12		県外で行われた 結婚披露宴参加者
21823	2006.11.22	高齢者施設		?	?	2 / 4	1種類	G II /4-H18-13	ヒト-ヒト(感染症)	
21824	2006.12.7	飲食店	喫食者 グループ での 感染?	5	9	2 / 3	2種類 (喫食者と 調理従事者で 異なる)	G II /4-H18-10, G II /4-H18-13*	ヒト-ヒト(感染症)	潜伏時間数時間、 従事者は散発感染?
21825	2006.12.9	飲食店		8	12	1 / 5		G II /4-H18-10*		潜伏時間数時間、 従事者は散発感染?
21826	2006.12.12	視覚障害者 施設		39	181	4 / 5	2種類 (相同性99%)	G II /4-H18-16, G II /4-H18-7	ヒト-ヒト(感染症)	
21827	2006.12.13	身体障害者 施設		31	145	3 / 3	1種類	G II /4-H18-17	ヒト-ヒト(感染症)	
21828	2006.11.27	知的障害者 施設		53	186	4 / 5	1種類	G II /4-H18-5	ヒト-ヒト(感染症)	
21829	2006.12.25	飲食店	12/22の 仕出し弁当	22	26	7 / 11	1種類	G II /4-H18-7	従事者による 食品汚染(食中毒)	
21830	2006.12.25	飲食店	喫食者 グループ での 感染?	10	24	1 / 1		G II /4-H18-18	ヒト-ヒト(感染症)	県外の民宿を スキー合宿で利用
21831	2007.1.7	飲食店	仕出し 弁当	32	51	10 / 13	2種類 (相同性99%)	G II /4-H18-7, G II /4-H18-18	従事者による 食品汚染(食中毒)	
21834	2007.2.17	飲食店	2/16-19 提供の 食品	10	13	11 / 18	1種類	G II /4-H18-5	従事者による 食品汚染(食中毒)	
21835	2007.2.25	飲食店	2/24の 会食	10	12	11 / 20	2種類 (ふきとりが異なる)	G II /4-H18-7, G II /3-H18-3*	従事者による 食品汚染(食中毒)	
21836	2007.3.16	旅館		9	26	4 / 4	1種類	G II /4-H18-7		県外の旅館への 宿泊者が発症

5. まとめ

平成14～18年度に検査した集団発生94事例・小児散発例337検体のうち、集団発生73事例・小児散発例112検体から検出したNVについて、発生状況や遺伝子情報を解析した。

その結果、18種類の遺伝子型のNVが検出され、中ではGII/4が多数(集団発生63%・小児散発例66%)を占めた。

GII/4NVの検出パターンは52パターンに分類され、系統樹解析では8種類のクラスターを形成した。

流行ウイルスが属するクラスターは年度ごとに変遷しており、特にNVの大流行が社会問題となった平成16年度・平成18年度の流行期には、新しいクラスターに属するウイルスが広い地域にわたり急速に感染を拡大して大流行につながったことが確認された。

6. 謝辞

検体の採取、搬入および疫学等の情報収集を担当された健康福祉センター、食品安全・衛生課、健康増進課の関係各位に深謝いたします。

なお、この研究の一部は、平成15～17年度厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)「食品由来のウイルス性感染症の検出法の高度化、実用化に関する研究」班の協力研究、および平成18年度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」班の協力研究として行った。

7. 参考文献

- 1) 丸山務他、つけない・うつさない・持ち込まない ノロウイルス現場対策 その感染症と食中毒、幸書房(2006)
- 2) 感染症情報センター事務局他、ノロウイルス感染集団発生 2003年9月～2005年10月、病原微生物検出情報月報、26,12(2005)
- 3) 感染症情報センター事務局他、注目すべき感染症 感染性胃腸炎、感染症発生動向調査 週報、48(2006)
- 4) 厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知: ノロウイルス(NLV)のRT-PCR法について、食監発第267号、平成13年11月16日
- 5) 厚生労働省医薬局食品安全部監視安全課長通知: ノロウイルスの検出法について、食安監発第1105001号、平成15年11月5日
- 6) Kojima S et al : Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses., J Virol Methods. 100(1-2) : 107-14 (2002)
- 7) 齊藤博之他 : ノロウイルス(NLV)の検査における一本鎖高次構造多型解析(SSCP)の応用、臨床とウイルス、30(3),163-171(2002)
- 8) Kageyama T et al : Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan, J. Clin. Microbiol. , 42, 2988-2995(2004)
- 9) Morse DL et al : Widespread outbreaks of clam- and oyster-associated gastroenteritis. Role of Norwalk virus., N Engl J Med, 314(11), 678-81(1986)
- 10) 三好正浩他 : 学校給食で提供されたパンを原因としたノロウイルスによる食中毒事例-北海道、病原微生物検出情報月報、24,315-316(1997)
- 11) 東方美保他 : 平成13～15年度に福井県内の高齢者施設内で発生したノロウイルス急性胃腸炎集団発生、福井県衛生環境研究センター年報、2,144-148(2004)
- 12) 齊藤博之他 : 簡易水道が原因と考えられたノロウイルスの流行-秋田県、病原微生物検出情報月報、26,150-151(2005)
- 13) 田村務他 : 飲料水が原因のノロウイルスによる食中毒事例-新潟県、病原微生物検出情報月報、26,330-331(2005)
- 14) 感染症情報センター事務局 : ノロウイルスの感染経路、感染症情報センターホームページ(2007)
- 15) Lopman B et al : Increase in viral gastroenteritis outbreaks and epidemic spread of new norovirus variant., Lancet, 363(9410),682-8(2004)
- 16) Bull RA et al : Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis., J Clin Microbiol. ,44(2),327-33(2006)
- 17) Siebenga JJ et al : Epochal Evolution of GGII.4 Norovirus Capsid Proteins from 1995 to 2006., J Virol. ,81(18),9932-41 (2007)
- 18) Tan M et al : Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle., Trends Microbiol. , 13(6), 285-93(2005)
- 19) 野田衛他 : 2006年非流行期に広島市でノロウイルス集団感染が継続した要因、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平成18年度総括・分担報告書、141-148(2007)
- 20) Okada M et al : Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities., Arch Virol. , 151(8), 1635-41 (2006)
- 21) Okada M et al : Genetic analysis of noroviruses in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004., J Clin Microbiol. 43(9),4391-401 (2005)

パンソルビン・トラップ法による食品検体からの ノロウイルスの回収検討(第1報)

東方 美保・川畑 光政*1・斎藤 博之*2・田中 智之*3・武田 直和*4

Examination of Pansorbin Trapping Method as Concentration Detection of Norovirus from Food Samples (1)

Miho TOHO, Mitsumasa KAWABATA*1, Hiroyuki SAITO*2, Tomoyuki TANAKA*3, Naokazu TAKEDA*4

1. はじめに

ノロウイルス(NV)を原因物質とする食中毒検査において、推定原因食品からのウイルス検出が切望されている。しかし、効率的な濃縮法が存在しない現状では、多大な労力と時間をかけても、検出可能なケースが二枚貝・表面汚染・高濃度汚染等に限られ、偽陰性のまま原因食品の汚染が見過ごされている可能性が高い^{1),2)}。

このような事態を打開するべく、平成 19 年度から、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)「食品中のウイルスの制御に関する研究」班では、斎藤らによって開発されたパンソルビン・トラップ法(以下、パントラ法)を用いて、汚染させたモデル食品からの NV 検出を試み、実用化に向けて検討を行っている³⁾⁻⁷⁾。

その検討の一環として、現行の食品検査で汎用されているポリエチレングリコール(PEG)沈殿法による濃縮を並行して行い、これを比較対象として検出効率を評価した^{4),6)}。また、プロトコールの改良により検出効率の向上が確認できた^{5),6)}ので、その一部を併せて報告する。

2. 方法

2. 1 NV 陽性糞便による食品の汚染

2. 1. 1 汚染実験に用いる食品

市販の 10 種の総菜(ナポリタン、マカロニサラダ、ポテトサラダ、まぐろ刺身、切り干し大根煮付、もやし和え物、鶏五目煮、れんこんの金平、きのこの白和え、ゴボウサラダ)を用いた。

2. 1. 2 汚染実験に用いる検出対象 NV

2006 年 12 月に福井市で発生した急性胃腸炎集団感染症事例⁸⁾で搬入された NV 陽性糞便(Genogroup II/4 型)を用いた。

2. 1. 3 NV 陽性糞便による食品の汚染方法

NV 陽性糞便を DW で 10% 乳剤とし、その遠心上清を汚染用 NV 原液とした。さらに 10 倍階段希釈で、10、100、1,000、10,000、100,000 倍希釈液を作成した。

これらの汚染用 NV 原液または希釈液を各食品 10g あた

り 70 μ L 加えて汚染させた。

2. 2 汚染食品からのウイルス濃縮

汚染させた食品 10g に対して、PBS・0.1% Tween20 を食品洗滌液として 50mL 加え懸濁させ、粗遠心(3,000rpm で 20 分、プロトコール改良後は 3,000rpm で 30 分)を行った後の上清を分取し、パントラ法または PEG 沈殿法で濃縮した。

2. 2. 1 パンソルビン・トラップ法

汚染食品の粗遠心後の上清液 50mL に、抗 Genogroup II/4 血清[国立感染症研究所より分与]⁹⁾を 5 μ L 加え、37°C で 30 分反応させて NV-抗体複合体を作らせた。そこに黄色ブドウ球菌の菌体であるパンソルビン(PANSORBIN Cells [和光純薬; #501-43261])を 300 μ L 加え、さらに 37°C で 30 分反応させることで NV-抗体-パンソルビン複合体を形成させた。その後 3,000rpm で 20 分遠心した沈殿を回収し、100 μ L の DW で懸濁して RNA 抽出用サンプルとした。

2. 2. 2 PEG 沈殿法

汚染食品の粗遠心後の上清液 50mL に、PEG6000 を 4.00g、NaCl を 1.05g 加え、振とうして完全に溶解させた後、4°C で 1 晩放置し、遠心操作(8,500 \times g で 90 分、または 9,500 \times g で 20 分)後の沈殿を、100 μ L の DW で懸濁して RNA 抽出用サンプルとした。

2. 3 RNA 抽出および DNase 処理

改良前のプロトコールでは、TRIzol-LS[invitrogen]を用いて抽出した RNA を、RNeasy Mini kit[QIAGEN]で精製した。

改良後のプロトコールでは、TRIzol-LS を用いてフェノール抽出した段階で分取した水層に、0.8 容のエタノールを加え、RNeasy カラム(RNeasy Mini Kit [QIAGEN])の構成成分で精製した。

DNase 処理は、いずれの場合も、RNeasy-Free DNase Set [QIAGEN]を適用して RNeasy カラム上で処理した。

2. 4 NV 遺伝子の定量測定

2. 4. 1 逆転写反応

10 μ L 分の RNA をテンプレートとして、ランダムプライマー(Nona-deoxyribonucleotide mixture [TaKaRa])および Super Script III Reverse Transcriptase[invitrogen]を用いた逆転写反応により、20 μ L の cDNA を合成した。

2. 4. 2 コピー数の測定

厚生労働省通知¹⁰⁾に準じて NV のコピー数を測定した。すなわち 2.4.1 で得た cDNA の 2 μ L 分をテンプレートと

* 1) 元福井県衛生環境研究センター

* 2) 秋田県健康環境センター

* 3) 堺市衛生研究所

* 4) 元国立感染症研究所

して、TaqMan Universal PCR MASTER MIX[ABI]を用いてABI PRIZM 7900HT (384well version)[ABI]によりリアルタイム PCR 定量反応 (反応容量 20 μ L) を行った。陽性コントロールには国立感染症研究所より分与された陽性コントロール用プラスミドを用いた。陽性コントロールは3ウェル、他は2ウェルずつ反応を行い、平均を実測値とした。

3. 結果

3.1 汚染用 NV 原液で汚染した食品 (6 種) からの回収実験

6 種の総菜 (ナポリタン、マカロニサラダ、ポテトサラダ、まぐろ刺身、切り干し大根煮付、もやし和え物) を汚染用 NV 原液で汚染し、パントラ法および PEG 沈殿法で濃縮後、TRIzol-LS で抽出した RNA を RNeasy Mini Kit で精製して検査に用いた場合の回収実験結果を、図 1 および表 1 に示す。

RNA1 μ L あたりの実測値は、パントラ法の場合、 $3.8E+04 \sim 1.9E+05$ コピー/ μ L と安定しており、増幅曲線も「ポテトサラダ」以外の食品 5 種 (ナポリタン、マカロニサラダ、まぐろ刺身、切り干し大根煮付、もやし和え物) ではほとんど一致していた。

それに対し、PEG 沈殿法の場合、増幅曲線が食品の品目によりばらついており、測定値においても $4.6E+01 \sim$

$1.6E+05$ コピー/ μ L と差が大きかった。これにより、食品の種類や状態が、NV 遺伝子定量値に大きく影響することが改めて確認された。

また、PEG 沈殿法での測定値を基準とすると、パントラ法での測定値は食品の品目ごとにそれぞれ 0.33~830 倍に相当した (表 1)。

3.2 汚染用 NV 原液で汚染した食品 (8 種) からの回収実験 (プロトコル改良後)

8 種の総菜 (ナポリタン、マカロニサラダ、ポテトサラダ、まぐろ刺身、鶏五目煮、れんこんの金平、きのこの白和え、ゴボウサラダ) を汚染用 NV 原液で汚染し、汚染食品からのウイルス洗い出し後の遠心条件をより厳しく変更した ($3,000\text{rpm}$ で 20 分 \rightarrow $3,000\text{rpm}$ で 30 分) 改良プロトコルにより、パントラ法および PEG 沈殿法で濃縮後、TRIzol-LS+RNeasy の系で RNA 抽出を行った場合の回収実験結果を、図 2 および表 2 に示す。

3.1 と同様に、PEG 沈殿法では品目ごとにばらつきが大きかったのに対し、パントラ法では品目によらず一定の回収を見込むことができた (図 2)。

汚染食品からのウイルス洗い出し後の遠心条件をより厳しく変更したことで火雑物の混入が抑えられ、プロトコル改良前と比べ、パントラ法で $2.6E+05 \sim 2.4E+06$ コピー/ μ L、PEG 沈殿法で $1.2E+03 \sim 2.0E+05$ コピー/ μ L と

表 2. 食品種類別の NV 測定値 (プロトコル改良後)

食品 (汚染用 NV 液には 原液使用)	測定値 (抽出 RNA 1 μ L あたりのコピー数)		PEG 沈殿法を 1とした ときの 効率 (倍)
	パンスルピン・ トラップ法	PEG 沈殿法	
ナポリタン	$3.9E+05$	$1.5E+05$	2.70
マカロニサラダ	$8.9E+05$	$2.5E+03$	360.00
ポテトサラダ	$1.5E+06$	$2.0E+05$	7.60
まぐろ刺身	$2.6E+05$	$6.8E+04$	3.90
鶏五目煮	$7.7E+05$	$4.9E+04$	16.00
れんこんの金平	$5.8E+05$	$6.6E+03$	87.00
きのこの白和え	$5.1E+05$	$1.3E+05$	3.80
ゴボウサラダ	$1.2E+06$	$1.2E+03$	1000.00
食品なし	$2.4E+06$	$1.3E+04$	190.00

表 1. 食品種類別の NV 測定値

食品 (汚染用 NV 液には 原液使用)	測定値 (抽出 RNA 1 μ L あたりのコピー数)		PEG 沈殿法を 1とした ときの 効率 (倍)
	パンスルピン・ トラップ法	PEG 沈殿法	
ナポリタン	$4.2E+04$	$1.6E+04$	2.60
マカロニサラダ	$5.3E+04$	$1.6E+05$	0.33
ポテトサラダ	$1.9E+05$	$9.0E+04$	2.10
まぐろ刺身	$4.6E+04$	$1.7E+02$	270.00
切り干し大根煮付	$4.9E+04$	$7.8E+04$	0.63
もやし和え物	$3.8E+04$	$4.6E+01$	830.00
食品なし	$5.4E+04$	$1.3E+02$	420.00

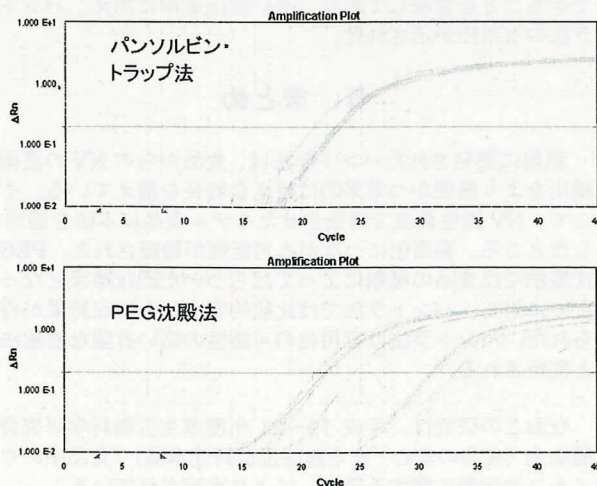


図 1. 汚染モデル食品からの NV 回収実験の増幅曲線 (濃縮法別)

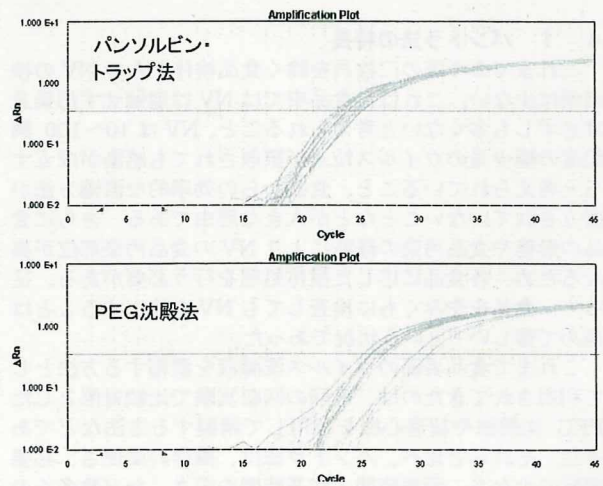


図 2. 汚染モデル食品からの NV 回収実験の増幅曲線 (濃縮法別, プロトコル改良後)

表3. 汚染用NV液希釈濃度別でのNV測定値(プロトコール改良後)

食品	汚染用NV液希釈濃度	測定値 (抽出RNA1μLあたりのコピー数)		PEG沈殿法を1としたときの効率(倍)
		パンソルビン・トラップ法	PEG沈殿法	
ナポリタン	原液*	3.9E+05	1.5E+05	2.70
	10倍希釈	9.9E+03	2.3E+03	4.30
	100倍希釈	1.4E+03	9.6E+01	15.00
マカロニサラダ	原液*	8.9E+05	2.5E+03	360.00
	10倍希釈	1.7E+05	7.2E+02	230.00
	100倍希釈	4.9E+03	2.0E+01	250.00
食品なし	原液*	2.4E+06	1.3E+04	190.00
	10倍希釈	2.4E+05	7.0E+02	340.00
	100倍希釈	2.3E+04	1.1E+02	200.00
	1,000倍希釈	1.3E+03	1.7E+00	750.00

*表2の再掲

高いレベルの測定値が得られた。

なお、全ての品目でパントラ法がPEG沈殿法より高い値を示し、PEG沈殿法での測定値を基準とすると、パントラ法での測定値は食品の品目ごとにそれぞれ2.7~1000倍に相当した。(表2)。

3. 3 汚染用NV液で段階希釈的に汚染した食品(2種)からの回収実験(プロトコール改良後)

3. 1において、パントラ法の方がより測定値の高かった食品4種(ナポリタン、ポテトサラダ、まぐろ刺身、もやし和え物)の代表として「ナポリタン」を、PEG沈殿法の方がより測定値の高かった食品2種(マカロニサラダ、切り干し大根煮付)の代表として「マカロニサラダ」を、それぞれ選択し、汚染レベルを低くした場合(原液、10・100・1,000倍希釈)の回収実験結果を表3に示す。いずれの場合においても、パントラ法がPEG沈殿法より高い測定値を示した。

4. 考察

4. 1 パントラ法の特長

これまでカキ等の二枚貝を除く食品検体からのNVの検出例は少ない。これは、食品中ではNVは増殖せず汚染量は必ずしも多くないと考えられること、NVは10~100個程度の極少量のウイルス粒子が摂取されても感染が成立すると考えられていること、食品からの効率的な濃縮方法が確立されていないことなどが大きな理由である。さらに食品の形態や食品汚染の経路によりNVの食品汚染部位が異なるため、各食品に応じた検体処理を行う必要がある。従って、食品をやみくもに検査してもNVを検出することは極めて難しい²⁾という状況であった。

これまで食品表面のウイルス洗滌液を濃縮する方法として利用されてきたのは、今回の回収実験で比較対照としたPEG沈殿法や超遠心機を利用して精製する方法などであった。それらと比べ、パントラ法は、操作の簡便さ、必要機材の少なさ、所要時間・作業時間の短さ、など数多くの利点が挙げられる。何よりも、パンソルビン抗体-NV複合体を回収する遠心操作後の沈殿状態は、PEG沈殿法で得ら

れる沈殿状態と比較して格段に扱いやすく、ストレスなく処理を進めることが可能であるという有利さは大きい。

4. 2 食品種類別での検出効率

表2、3によると、改良プロトコールを適用した場合には全ての食品において、パントラ法の方が高い測定値を示した。

しかし、「まぐろ刺身」や「きのこの白和え」では、その差はわずかだった。このような表面的な汚染にとどまると考えられる食品では、食品洗滌液でNVを洗い出し遠心上清として回収した時点で比較的夾雑物が少ないため、PEG沈殿法との差も小さいのであろう。パントラ法がより効果を発揮するのは、練り物や油物といった夾雑物が多く混入する食品の場合だと考えられる。

また、「ナポリタン」や「ポテトサラダ」についても、比較的差が小さかった。このような食品洗滌液のpHを酸性側に傾ける性質のある食品では、むしろ夾雑物を取り除けていないと思われる状態において、増幅曲線の立ち上がり方がより早まる傾向がみられた。抽出RNAに混入して持ち込まれた夾雑物がリアルタイムPCR反応系に増幅曲線の立ち上がり方を早める影響を及ぼすことで、見かけ上高い測定値がはじきだされる現象が想定される。夾雑物が多いPEG沈殿法でその影響がより大きく、結果として差が小さくなった可能性が考えられる。

なお、全く夾雑物のない「食品なし」の検体において、低汚染レベルでPEG沈殿法による回収がうまくいかなかったのは、RNA抽出のエタノールを加えた段階で共沈する物質(少量の夾雑物)が存在しない場合に沈殿形成が困難であることを示している。

以上のことから、夾雑物がNV検出での測定値に及ぼす影響は、その種類や混入の程度によって増減いずれの方向にも作用する、そのことが特にPEG沈殿法において、食品の種類により検出効率に大きな差を生む要因となっていると考えられる。それに対しパントラ法では、どの食品においても安定した検出効率が得られており、こうした夾雑物の影響を受けにくい方法といえる。すなわち、パントラ法を用いる場合には食品の種類によらず共通の工程で作業できることを意味しており、高い検出効率に加え、パントラ法の有用性が示された。

5. まとめ

新規に開発されたパントラ法は、食品からのNVの濃縮検出をより簡便かつ効果的に行える特長を備えている。そこで、NV陽性糞便で汚染させたモデル食品に本法を適用したところ、実用化につながる可能性が確認された。PEG沈殿法では食品の種類によってばらついた回収結果となったのに対し、パントラ法では比較的安定した回収結果が得られた。パントラ法は実用化の可能性の高い有望な濃縮法と期待される。

なおこの研究は、平成19~21年度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)「食品中のウイルスの制御に関する研究」により実施されている。

参考文献

- 1) 薬事・食品衛生審議会 食品衛生分科会食中毒部会：ノロウイルス食中毒対策について（提言）（2007）
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センターおよび国立感染症研究所ウイルス第二部：ノロウイルス集団発生事例に対して感染症および食品部局が共同で実施する初期実地疫学調査および微生物学検査のポイント（第1版：平成19年11月18日版）（2007）
- 3) 斎藤博之他：パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収，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 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成19年度 総括・分担研究報告書,103-111(2008)
- 4) 東方美保他：パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収(検討2)，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 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成19年度 総括・分担研究報告書,125-133(2008)
- 5) 斎藤博之：パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良（検討1），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 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成20年度 総括・分担研究報告書,27-38(2009)
- 6) 東方美保他：パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良（検討2），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 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成20年度 総括・分担研究報告書,181-190(2009)
- 7) 斎藤博之：食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の開発,秋田県健康環境センター年報, 4 (in press)
- 8) 東方美保他：平成14～18年度に福井県で検出されたノロウイルスの遺伝子解析,福井県衛生環境研究センター年報,5,60-72(2007)
- 9) Hansman GS et al. : Genetic and antigenic diversity among noroviruses, J.Gen.Virol., 87, 909-919 (2006)
- 10) 厚生労働省医薬局食品安全部監視安全課長通知：ノロウイルスの検出法について,食安監発第1105001号,平成15年11月5日(2003)

2006年度に大阪市内で認められたノロウイルス流行

入谷展弘、久保英幸、改田 厚、阿部仁一郎、後藤 薫、石井營次

Epidemic of norovirus in Osaka City, Japan between April 2006 and March 2007

Nobuhiro IRITANI, Hideyuki KUBO, Atsushi KAIDA,

Niichiro ABE, Kaoru Goto, Eiji ISHII

Abstract

In the 2006/07 season, there was a marked increase in norovirus (NV) infections in Japan including Osaka city. In the genotyping of NV strains in Osaka City between April 2006 and March 2007, GII/4 genotype strains were detected in 89.1% of NV-positive outbreaks. These GII/4 strains were closely related to each other and could be classified into three clusters. One of the three clusters was predominant in the 2006/07 season and differed genetically from past epidemic GII/4 strains.

Keywords : Norovirus, Outbreak, Genotype, GII/4, 2006/07 season

はじめに

ノロウイルス (NV) は、乳幼児から成人までの幅広い年齢層のヒトに感染し、嘔吐や下痢を主症状とした急性胃腸炎を引き起こす¹⁾。NVは、全長7.5-7.7 kbのプラス1本鎖RNAウイルスであり、カリシウイルス科に分類される。NVの分類・型別はウイルスゲノムの遺伝子解析によって行われており、ヒトNVは主に Genogroup I (GI) と Genogroup II (GII) に分類される²⁻⁴⁾。さらにそれぞれには複数の遺伝子型が存在し、合計30種類以上の遺伝子型が報告されている⁵⁾。

大阪市内においても、検出されたNV株の遺伝子型別による流行解析を実施し、同時期に複数の遺伝子型のNVが流行していることを報告している^{6,7)}。最近では、GII/4型NVが変異を起こし、世界的に大きく流行を繰り返していることが報告され、公衆衛生上大きな問題となっていた^{8,9)}。

2006年秋頃から、大阪市内だけでなく全国的にNVによる胃腸炎事例が多発し始め、結果的に2006/07シーズンはNVの記録的な大流行となった。今回、2006年度に大阪市内で検出されたNV株について、遺伝子型別を実施し、過去もしくは同時期に他の国や地域で検出されたNV株と遺伝子の比較を行い、大阪市内にお

ける2006/07シーズンのNV流行について解析した。

材料と方法

2006年4月～2007年3月までの期間に大阪市立環境科学研究所に搬入された非細菌性胃腸炎117事例(患者糞便540検体)を対象とした。

糞便材料の処理は既報の方法に準じて行った¹⁰⁾。ウイルスRNAはQIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN)を用いて、それぞれの添付説明書にしたがって抽出した。NV遺伝子の検出にはKageyamaらの報告したリアルタイムPCR法¹¹⁾に従い、ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems)を用いて行った⁷⁾。

リアルタイムPCR法でNV陽性となった検体については、Capsid N terminal/Shell (N/S)領域におけるPCRを行い、既報の方法に準じて遺伝子型別を実施した^{6,7)}。同じ事例で複数のNV陽性検体があった場合は、少なくとも2検体以上について、遺伝子型別を実施した。即ち、NV株の塩基配列は、ダイレクトシーケンス法により、オートシーケンサー (ABI PRISM 310, Applied Biosystems)を用いて決定した。遺伝子型別の対象領域はGI/290塩基およびGII/278塩基とした。得られたシーケンスデータは、Sequencher V4.7 (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.)を用いて編集した。塩基配列のアライメント (DNA weight

大阪市立環境科学研究所

〒543-0026 大阪市天王寺区東上町8-34

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences,

8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

matrix : Clustal W 1.6) は、BioEdit (version 7.0.5、<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>)¹²⁾ または Clustal X (version 1.81、<http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/>)¹³⁾ を用いて行い、Kimuraの2パラメータ法¹⁴⁾ で遺伝的距離 (Genetic distance) を計算した。NVの遺伝子型別は、Katayamaらの分類⁹⁾ に基づいて、近隣接合 (Neighbor joinning) 法¹⁵⁾ により分子系統樹を作成して行った。分子系統樹の樹型はブートストラップを1,000回行い検定した¹⁶⁾。NVの遺伝子型番号は、Kageyamaら⁵⁾ の分類に従った。

結 果

NVは117事例中92事例 (78.6%)、患者糞便材料540検体中412検体 (76.3%) から検出され、2006年度は大阪市においてNVが検出された胃腸炎事例数が最も多かった (図1)。NVが検出された胃腸炎事例の発生月は7月および8月を除くすべての月で認められた (図2)。2006/07シーズンのNV流行は、9月から始まり、11月および12月に集中していた。推定原因として最も多かったのはカキ以外の食品 (45.7%)

であり、寿司、弁当、魚介類、調理パン、菓子パンなどが原因食品として疑われた。またカキの喫食が疑われた事例は少なかった (2.2%) (図3)。ヒトからヒトへ感染が拡がった事例 (ヒト-ヒト感染事例) は、少なくとも22事例 (23.9%) 認められ、主な原因施設は特別養護老人施設、保育園、小学校などであった。

検出したNVの遺伝子型は、GIではGI/8型 (Sindlesham/95/UK) が2事例 (2.2%) のみであった。GIIではGII/4型 (Bristol/93/UK) が81事例 (88.0%)、GII/6型 (Seacroft/90/UK) が3事例 (3.3%)、GII/2型 (Melksham/94/UK)、GII/5型 (Hillingdon/90/UK)、GII/7型 (Leeds/90/UK)、GII/13型 (M7/99/US)、GII/16型 (SaitamaT 5 3 GII/02/JP) がそれぞれ1事例ずつであった。複数の遺伝子型が混在していた事例は1事例であり、GI/4型 (Chiba 407/87/JP) およびGII/4型のNVが含まれていたため、2006年度にGII/4型NVが検出された事例は、合計82事例 (89.1%) であった (表1)。特に2006年9月から2007年3月の流行期に発生した76事例においては、1事例を除いたすべてからGII/4型

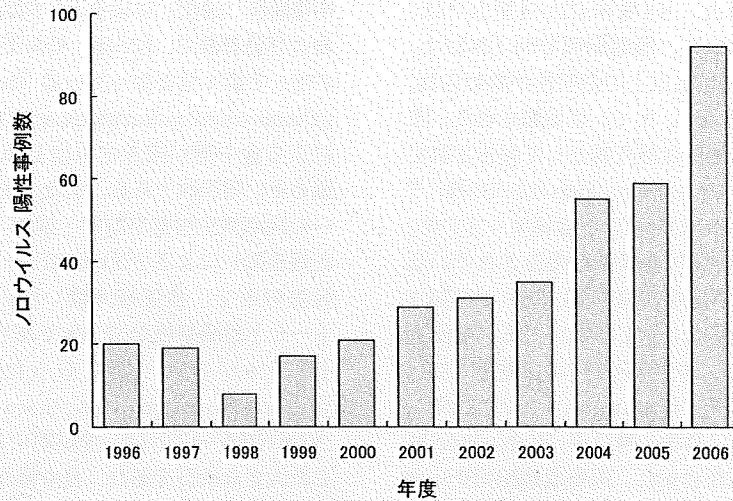


図1 年度別ノロウイルス陽性事例数

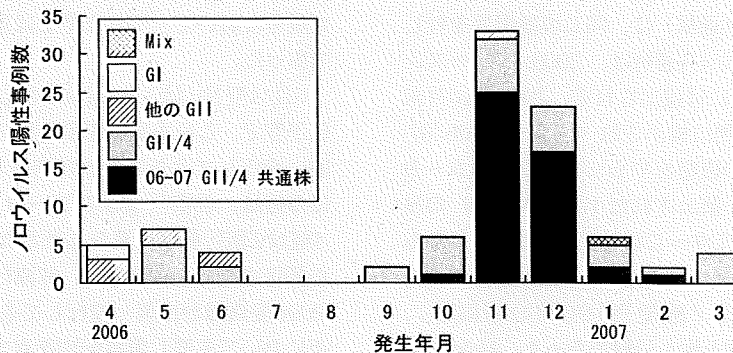


図2 月別ノロウイルス陽性事例数

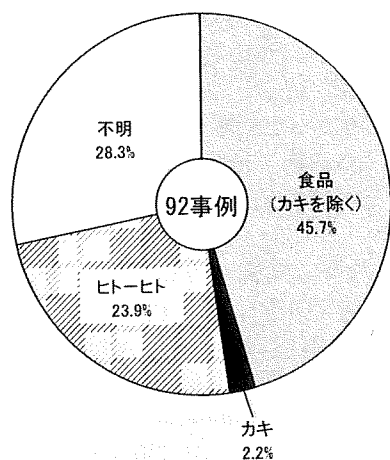


図3 2006年度ノロウイルス陽性事例の推定原因および感染経路

NVが検出された(図2)。

検出されたGII/4型NV株の遺伝子を比較するために、塩基配列を決定した合計84株のGII/4型NVの系統樹を作成した(図4)。これら84株は、同じ事例内で異なる2種類の塩基配列が認められた場合が2事例あり、他の80事例においては同じ事例内で同じ塩基配列のみが認められた。84株のGII/4型NVは、Capsid N/S領域において、塩基配列で94.9%以上、推定アミノ酸配列で95.6%以上の相同性が認められ、3つのクラスター(図4: A, B, C)に分類された。またGII/4型の過去の代表的な流行株として報告されている95/96-US株¹⁷⁾、FarmingtonHills/02/US株^{8, 18)}およびHunter284E/04O/AU株⁹⁾とは異なっていた。クラスターAには、2006年変異株と報告されている281/06/HKG株¹⁹⁾に近縁な76株(90.5%)が分類された(塩基配列97.4%以上および推定アミノ酸配列96.7%以上の相同性)。本クラスターには香港(281/06/HKG)、オランダ(Nijmegen 115/06/NL、DenHaag 89/06/NL)、日本・神戸市(Kobe 034/06/JP)で検出された株が含まれ、国際塩基配列データベース(DDBJ/EMBL/GenBank)上で日本の他地域から同時期に検出された近縁なNV株の塩基配列も登録されていた(data not shown)。さらに76株中47株(図4: 06-07 GII/4共通株)は、同じ塩基配列を有していた。本06-07 GII/4共通株は、2006/07シーズンの流行前(4-6月)には検出されず、2006年10月末から2007年2月の期間に検出され(図2)、2006/07シーズンのNV流行の優勢株であった。クラスターBには、2006年12月に検出された1株(06195)のみが分類された。クラスターCには、2006年5月から11月に検出された7株が分類され(塩基配列98.9%以上および推定アミノ酸配列100%の相同性)、Hokkaido 231/04/JP株と最も近縁であった。Hokkaido 231/04/JP類似株は主に2003/04および2004/05

表1 2006年度に検出されたノロウイルスの遺伝子型

遺伝子型		事例数 (%)
GI	GI/8	2 (2.2)
GII	GII/2	1 (1.1)
	GII/4	81 (88.0)
	GII/5	1 (1.1)
	GII/6	3 (3.3)
	GII/7	1 (1.1)
	GII/13	1 (1.1)
	GII/16	1 (1.1)
Mix	GI/4, GII/4	1 (1.1)
合計		92

ーズンに日本の各地域において流行していたことが報告されている^{20, 21)}。

考 察

2006/07シーズンは、全国的にNVの記録的な大流行が認められたシーズンであった。2006年の全国食中毒統計(速報)によると、病因物質別食中毒事件数および患者数で、NVは、それぞれ499事例および27,616人で第1位となっている(<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/index.html>)。これは、ウイルスによる食中毒が報告されはじめた平成10年以降で、最も多い報告数である。また、国立感染症情報センターの病原微生物検出情報・速報(2007年6月14日現在報告数)によると2006/07シーズンのNV感染集団発生の中で、食品媒介疑いが20.2%に対して、ヒト-ヒト感染事例が57.6%であり、検出されたNVの95.5%がGII/4型であったと報告されている(<http://idsc.nih.go.jp/iasr/noro.html>)。したがって、2006/07シーズンは、全国的にGII/4型NVを中心とした大きな流行であり、食中毒だけでなくヒト-ヒト感染事例も多発していたことが特徴的であったといえる。本傾向は、大阪市においても同様であった。また今回のように、1種類の遺伝子型のみによる大流行は、大阪市において、これまでとは異なったNVの流行像であった。

GII/4型NVは、Bristol/93/UK株に代表される遺伝子型で、これまで遺伝子変異を起こしながら、世界的に流行してきたことが報告されている^{8, 9, 17)}。さらに最近では、香港¹⁹⁾およびヨーロッパ²²⁾で過去のGII/4型NV流行株とは異なる新たな変異株の出現・流行が報告された。香港では、非流行期である5-6月に2006変異株が出現・流行しており¹⁹⁾、同時期に大阪市においても同じ塩基配列を有する株(図4: 06057, 06059, 06066)が検出されていた。ヨーロッパでも、

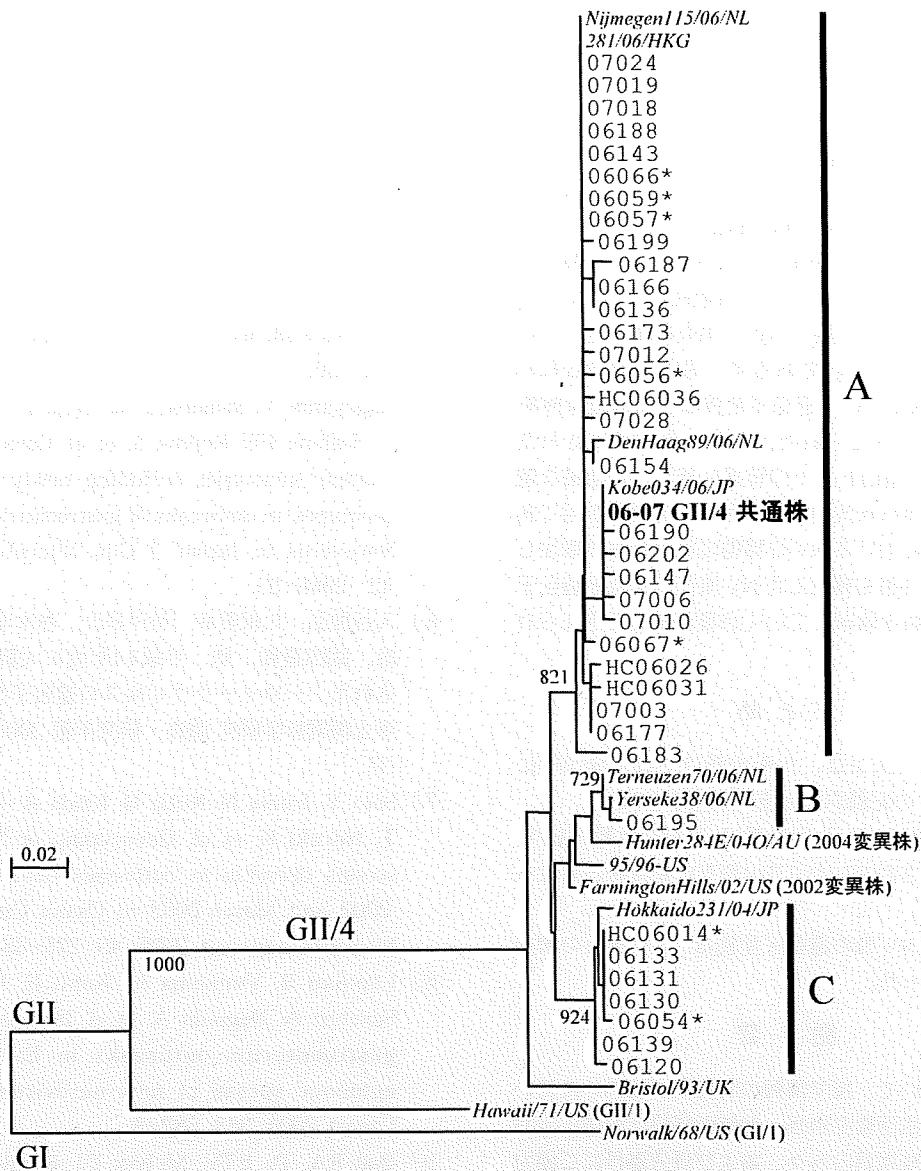


図4 2006年度に検出されたGII/4型ノロウイルス株の分子系統樹

分子系統樹はCapsid N/S領域 (GI:290塩基、GII:278塩基) においてNJ法で作成した。ブートストラップ値は、クラスターを支持する枝にそれぞれ数字で示した。斜体はNV参考株、太字は同じ塩基配列を有していた株 (06-07 GII/4 共通株)、その他の番号は大阪で検出されたGII/4型NV株を示す。2006年5-6月に検出された株はアスタリスク (*) で示した。NV参考株のGenBank accession numberは以下のとおりである: 281/06/HKG, EF121839; 95/96-US (345/96002726/1996/SC), AF080549; Bristol/93/US, X76716; DenHaag89/06/NL, EF126965; Farmington Hills/02/US, AY502023; Hawaii/71/US, U07611; Hokkaido231/04/JP, AB240183; Hunter284E/04O/AU, DQ078794; Kobe034/06/JP, AB291542; Nijmegen115/06/NL, EF126966; Norwalk/68/US, M87661; Terneuzen70/06/NL, EF126964; Yerseke38/06/NL, EF126963

非流行期である春・夏季に2006変異株が出現・流行していることが報告されている²²⁾。ヨーロッパにおいては、2006aおよび2006bの2種類の変異株が報告されており、Terneuzen 70/06/NL株やYerseke 38/06/NL株が2006aに、Nijmegen 115/06/NL株やDenHaag 89/06/NL株が2006bに分類される。したがって、今回の系統解析において2006a株はクラスターBに、2006b株はクラスターAに分類される。大阪

市では、クラスターAに分類された株、特に06-07 GII/4共通株が2006/07シーズンの主流であった。同時期に日本の他地域で検出されたクラスターA類似株の塩基配列が、遺伝子データベース上に登録されていたことから、全国的に本類似株が流行していたことが示唆された。また同じ塩基配列を有する株による流行は、1997/98シーズンに大阪で認められており、GII/3 (P2-A) 型NV共通株に汚染されたカキの喫食

が主な原因であった¹⁰⁾。しかし、今回の06-07 GII/4 共通株については、各事例で共通する要因が認められず、株の由来や感染が拡大した原因を特定することができなかった。

クラスターCに分類された株は、2006年11月初旬まで検出されたが、それ以降は検出されなかった。本類似株は、過去に日本で流行を起こしたGII/4型NV変異株のひとつとして報告されており^{20, 21)}、大阪府においても同時期に流行していた可能性がある。GII/4型NVの変異株が、出現・流行・消失を繰り返している原因は明らかにされておらず、過去に検出されたGII/4型NV株について遺伝子変異などの詳細な解析が必要であると考えられた。また、今回検出されたNV株の遺伝子型別と、その結果に基づいた詳細な遺伝子解析は、流行状況の把握や解析に非常に有用であった。大阪府におけるNVの胃腸炎事例は毎年増加しているため、今後も継続したNV流行の監視と遺伝子型別による解析を継続していく必要があると考えられた。

まとめ

- 2006/07シーズンは、大阪府だけでなく全国的にGII/4型NVの記録的な大流行が認められた。
- 大阪府で流行していた主な株は、非常に近縁であり、過去に報告されていたGII/4型NV変異株と異なっていた。
- 検出されたNV株の遺伝子型別は、NV流行の解析に有用であった。

謝辞

本研究において、疫学情報の収集にご協力いただいた健康福祉局生活衛生担当、保健所感染症対策担当および食品衛生監視員の方々、および研究遂行にご協力いただいた環境科学研究所企画担当 蓑城昇次氏、白井雄也氏、松岡秀明氏、西田利一氏に深謝いたします。

付記

本研究の概要は、平成19年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会（2007年9月大阪）および第23回地方衛生研究全国協議会近畿支部疫学情報部会（2007年11月和歌山）において発表した。

参考文献

- 1) Green KY, Chanock RM, and Kapikian AZ. Human Caliciviruses, "Fields Virology", 4th ed. (Knipe DM, et al., ed). Philadelphia, Pa; Lippincott-Raven; 2001. p841-74.
- 2) Ando T, Noel JS, and Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses". J Infect Dis 2000; 181 (Suppl 2) : 336-48.
- 3) Vinje J, Green J, Lewis DC, Gallimore CI, Brown DWG, and Koopmans MPG. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". Arch Virol 2000; 145: 223-41.
- 4) Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, et al. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. Virology 2002; 299: 225-39.
- 5) Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, et al. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. J Clin Microbiol 2004; 42: 2988-95.
- 6) 入谷展弘, 久保英幸, 勢戸祥介, 春木孝祐, 西尾治, 武田直和, 他. 平成14年度に大阪府で検出されたノーウォークウイルスの遺伝子型別. 大阪府立環境科学研究 調査・研究年報 2003; 65: 29-37.
- 7) Seto Y, Iritani N, Kubo H, Kaida A, Murakami T, Haruki K, et al. Genotyping of Norovirus strains detected in outbreaks between April 2002 and March 2003 in Osaka City, Japan. Microbiol Immunol. 2005; 49: 275-83.
- 8) Lopman B, Vennema H, Kohli E, Pother P, Sanchez A, Negredo A, et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. Lancet 2004; 363: 682-8.
- 9) Bull RA, Tu ETV, McIver CJ, Rawlinson WD, and White PA. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. J Clin Microbiol 2006; 44: 327-33.
- 10) Iritani N, Seto Y, Haruki K, Kimura M, Ayata M, and Ogura H. Major change in the predominant type of Norwalk-like viruses" in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in Osaka City, Japan, between April 1996 and March 1999. J Clin Microbiol 2000; 38: 2649-54.
- 11) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol 2003; 41: 1548-57.
- 12) Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological

- sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999; 41: 95-8.
- 13) Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, and Higgins DG. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 4876-82.
 - 14) Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of bases substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16: 111-20.
 - 15) Saitou N, and Nei M. The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 406-25.
 - 16) Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39: 783-91.
 - 17) Noel JS, Fankhauser RL, Ando T, Monroe SS, and Glass RI. Identification of a distinct common strain of Norwalk-like viruses" having a global distribution. *J Infect Dis* 1999; 179: 1334-44.
 - 18) Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, and Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *J Infect Dis* 2006; 346: 312-23.
 - 19) Ho EC, Cheng PK, Lau AW, Wong AH, and Lim WW. Atypical norovirus epidemic in Hong Kong during summer of 2006 was caused by a new genogroup II/4 variant. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2205-11.
 - 20) 愛木智香子, 秋山美穂, 岡部信彦, 西尾 治, 杉枝正明, 山下育孝, 他. 欧米で流行しているノロウイルス GII/4変異型の国内での検出状況. *病原微生物検出情報 月報* 2005; 26: 325-7.
 - 21) 吉澄志磨, 三好正浩, 池田徹也, 石田勢津子, 奥井登代, 岡野素彦, 他. 高齢者施設におけるノロウイルス集団感染事例の発生状況—北海道, *病原微生物検出情報 月報* 2005; 26: 331-2.
 - 22) Kroneman A, Vennema H, Harris J, Reuter G, von Bonsdorff CH, Hedlund Ko, et al. Increase in norovirus activity reported in Europe. *Eurosurveillance Weekly releases* 2006; 11: 14 /Dec/2006, <http://www.eurosurveillance.org/ew/2006/061214.asp#1>

表1. 便検体(計25検体)についての検査結果

対象者	発症の有無	発症日	検査結果 (RT-PCR)	シーケンス結果
入所者	有	1/8	NVG II	G II/4
入所者	有	1/8	NVG II	
入所者	有	1/9	NVG II	G II/4
職員	有	1/8	NVG II	G II/4
調理従事者	無		NVG II	G II/4
調理従事者	無		-	
調理従事者	無		-	
入所者	有	1/8	NVG II	G II/4
入所者	有	1/8	NVG II	
入所者	有	1/10	NVG II	G II/4
入所者	有	1/8	NVG II	
入所者	有	1/8	NVG II	
入所者	有	1/8	NVG II	
調理従事者	無		-	
調理従事者	無		-	
調理従事者	無		-	
調理従事者	無		-	
調理従事者	有	1/9	NVG II	G II/4
調理従事者	無		-	
調理従事者	無		-	
調理従事者	無		-	
調理従事者	無		-	
調理従事者	無		-	
調理従事者	無		-	
調理従事者	有	1/8	NVG II	G II/4

<速報>

ノロウイルス感染による介護老人保健施設での集団発生事例 — 青森県

2007年1月に介護老人保健施設でノロウイルス (NV) による集団感染事例が発生したので、その概要を報告する。

弘前保健所に1月9日、管内の介護老人保健施設(入所者99名、職員65名、リハビリテーション通所者80~90名)から、施設内において嘔吐・下痢等の症状を呈する入所者が増えているという連絡が入った。保健所は直ちに食中毒および感染症を考慮して調査を行った。入所者の発症状況は1月6日に1名、7日2名の発症者であったが、8日には18名、9日10名とピークが見られた。また、その後の調査により、職員やリハビリテーション通所者も発症していることが判明した。11日以後は1口あたり5名前後の発症者があり、最終的に発症者は17日までに105名となった(図1)。

原因究明のための検査材料は、発症者10名(入所者9名、職員1名)、調理従事者15名(うち発症者2名)の糞便計25検体、厨房を中心としたふきとり6検体と、1月6日および7日の検食2検体であった。検食は2検体とも朝、昼、夕をプールして検査した。

NVの検出は、糞便はRT-PCR法と電子顕微鏡法により、ふきとりと検食はリアルタイムPCR法により行った。その結果、入所者および職員の発症者では全員から、調理従事者では15名中発症者2名を含む3名からNV genogroup II (NV GII)が検出された(表1)。ふきとりでは、盛り付け用調理台から実測値で平均256コピー、1月7日の検食からは実測値で平均27コピーのNV GII遺伝子が検出された(表2)。

表2. ふきとりおよび検食の検査結果

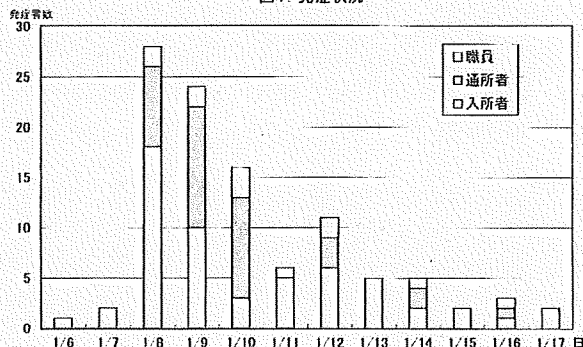
種類	検体の内容	検査結果 (リアルタイムPCR)	シーケンス結果
ふきとり	盛り付け用調理台	NVG II	G II/3
"	汁飯用調理台	-	
"	カウンター下の台	-	
"	冷蔵庫	-	
"	調理用シンク	-	
"	手洗い	-	
検食	1月6日	-	
"	1月7日	NVG II	

NV GIIが検出されたふきとりおよび検食について、Nested PCRを行ったところ、盛り付け用調理台のふきとりからはPCR産物が得られたが、検食からは得られなかった。遺伝子解析は、ダイレクトシーケンス法により発症者由来8検体とふきとりの1検体について行い、8検体はすべてNV GII/4型類似株であり、ふきとりの1検体はNV GII/3型類似株であった。

調査の結果、保健所では、施設入所者においては排泄後の手洗いが不十分だったこと、職員が行った6日および7日発症者の吐物の処理において、手袋は着用していたが、塩素系消毒薬を使用しておらず、処理においても不完全であったことから、施設内においてNVが広い範囲に、しかも濃厚に拡散し、8日以降の多数の発症者の発生に繋がったものと推察した。また、施設の食事を喫食していない職員の発症が確認されたことなどから、食品を介した発症ではなく、接触感染による発症と判断した。

遺伝子解析については、発症者がNV GII/4型類似株で、盛り付け用調理台がNV GII/3型類似株で

図1. 発症状況



あり、遺伝子型の一致がみられなかった。今シーズンは、全国の集団発生において検出された NV 遺伝子型はほとんどが G11/4 型であり、盛り付け用調理台が、どのような経路により汚染されたかは不明である。現在、本事例以外の集団発生および散発事例についても解析を進めている。

青森県環境保健センター微生物部

熊谷邦彦 石川和子 三上稔之 阿部幸一

中南地域県民局地域健康福祉部保健総室

(弘前保健所)

高橋優子 成田むつ子 安山準 田鎖良樹

<速報>

結婚式披露宴会場で発生したノロウイルスによる集団感染性胃腸炎事例——長野県

長野県内の結婚式披露宴会場で、会場の絨毯張りの床がノロウイルスにより汚染されたことが原因の一つと考えられた集団感染事例が発生したので、その概要を報告する。

2008年4月28日に長野県南部の結婚式場から、4月26日午後3時30分より披露宴を行ったグループ（Aグループ）の中に胃腸炎症状を呈している患者が多数発生しているとの連絡が管轄の保健所にあり、調査を開始した。

患者の認められたAグループ（披露宴参加者）は総勢119名で、そのうち67名（56%）が発症していた。患者の発生状況は、4月28日の午前中をピークとする一峰性を示していた（図1）。披露宴開始時刻を曝露点と仮定した潜伏時間は10.5～56.5時間で、平均34.3時間であった（n=65）。患者の主な臨床症状は、嘔気が43名（66%）、水様性下痢が41名（63%）、発熱、嘔吐および腹痛が34名（52%）であった（n=65）。

当該結婚式場では、Aグループの利用した日の午前中に、他グループ（Bグループ）が別会場で披露宴を行っていたものの、胃腸炎症状を呈する者は認められなかった。これら2グループに共通して提供された献立は、2品のみであった。当該結婚式場の調理従事者11名はいずれも発症しなかったのに対し、フロアスタッフ26名中8名（31%）が4月27日～28日にかけて胃腸炎症状を呈していた（図1）。発症したフロアスタッフの披露宴開始時刻を曝露点と仮定した潜伏時間は8.5～55.5時間（平均40.4時間）で、披露宴参加者中の患者の潜伏時間とほぼ重なることから、披露宴会場内における同一曝露が推定された。なお、フロアスタッフの喫食調査の結果、披露宴参加者との共通食は認められなかった。また、Aグループの宴会中に会場内で嘔吐した者は、認められていなかった。

患者便8検体について、リアルタイムRT-PCR法によりノロウイルスの検査を実施したところ、7検体

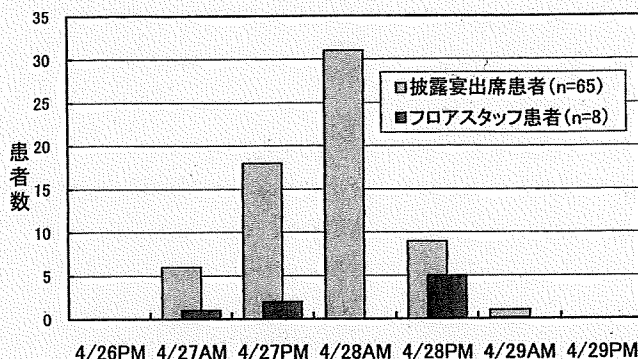


図1. 日別患者発生状況

表1. ノロウイルス検査結果

検体名	検体数	陽性数 ^{※1}
患者便	8	7
調理従事者	11	0
結婚式場 従事者便		
フロア	5	4
スタッフ	4	0
掃除機ダスト	3	3 ^{※2}

※1: すべてGII

※2: 1.7×10^4 , 3.8×10^4 , 1.6×10^5 copies/g

がGII陽性であった。また、調理従事者（いずれも非発症）便11検体およびフロアスタッフ（発症5名、非発症4名）便9検体も同様にノロウイルスの検査を実施したところ、発症していたフロアスタッフ便4検体がGII陽性であった（表1）。

さらに、感染源追及のため、Aグループの利用した披露宴会場の床を清掃した掃除機内のダスト3検体についても、ノロウイルスの検査を実施した。その結果、3検体ともGII陽性で、定量値は $1.7 \times 10^4 \sim 1.6 \times 10^5$ コピー/gであった（表1）。

患者便、調理従事者便、フロアスタッフ便、検食、調理室内ふきとり等を検体として細菌検査を実施したが、いずれも食中毒起因菌は不検出であった。

以上の調査結果から、本事例はノロウイルスによる当該結婚式披露宴会場における単一曝露が強く示唆された事例であった。

感染経路については、調理従事者便がノロウイルス陰性であったこと、共通する献立は少ないものの、同一利用日のBグループから発症者が認められないこと、喫食調査の結果において有意差の認められる献立がなかったことなどから、当該結婚式場が提供した飲食物を媒介とする感染症（食中毒）の可能性は低いと考えられた。披露宴会場内のダストがノロウイルス陽性だったことから、何らかの原因で当該会場内の床がノロウイルスによって広範囲に汚染されていたことが考えられ、会場内に入り出した者が宴会時間内に塵埃とともにノロウイルスに曝露（塵埃感染）した可能性が推察された。少なくとも発症したフロアスタッフは、Aグループのみを担当していたこと、および披露宴会場で飲食をしていなかったことから、本経路による感染の可能性が高いと考えられた。

長野県環境保全研究所保健衛生部

吉田徹也 粕尾しず子 畔上由佳

内山友里恵 薩摩林一代 白石 崇

長野県伊那保健所食品・生活衛生課

中沢春幸 園田春美 藤田 暁

<国内情報>

長野県内で発生したサポウイルスによる集団感染性胃腸炎の2事例

長野県内北部の保育所および東部の旅館において、過去に2事例のサポウイルス(SV)による集団感染性事例が発生している。それぞれの事例の概要と原因ウイルスの糞便中におけるウイルス量および遺伝子解析結果について報告する。

事例の概要

事例1: 本事例は、2004(平成16)年6月15日~6月18日にかけて長野県北部の保育所で発生した。患者は当該保育所に通う園児139名中17名(12.2%)で、職員21名からの発症者は認められなかった。クラスごとの患者の発生にはばらつきが認められ、年齢の低いクラスの発症率が、年齢の高いクラスの発症率に比べ低い傾向にあった(表1)。また、初発患者の存在したDクラスよりも4歳児のクラス(A, B)の発症率が高かった。

表1. クラス別患者発生状況

園児年齢(歳児)・クラス	患者数	クラス人数	発症率(%)	備考	
5	4	33	12.1		
4	A	4	21	19.0	
	B	5	21	23.8	
	C	1	15	6.7	
3	D	2	12	16.7	初発患者含む
	E	0	15	0.0	
2	1	11	9.1		
1	0	11	0.0		
職員	0	21	0.0		
合計	17	160	10.6		

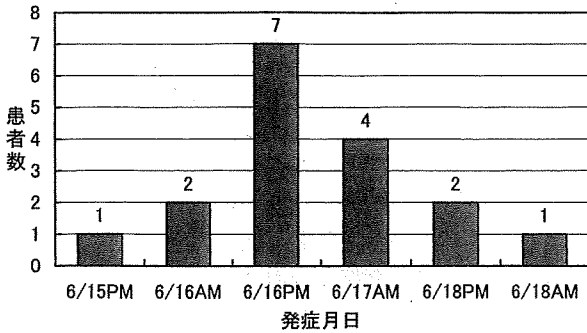


図1. 日別患者発生状況

主な臨床症状は嘔吐14名 (82%), 腹痛11名 (65%), 下痢10名 (59%), 発熱8名 (47%) などであった。嘔吐の回数は、14名中8名が3回以下で治まっていた。下痢は13名中9名が軟便にとどまり、水様性下痢を呈したのは3名のみであった。発熱は8名中6名が37℃台で、38℃以上の患者は2名であった。ノロウイルスによる感染症患者の臨床症状に比べ、全般的に軽い傾向がみられた。

日別の患者発生状況は、6月16日の午後をピークとする一峰性を示していた (図1) ことから、何らかの単一曝露が疑われた。しかし、年齢あるいはクラス別の発症率に偏りがあったこと、全体の発症率も12.2%と比較的低いこと、調理従事者3名の便がRT-PCR法によりSV陰性であったことなどから、同一の飲食物を介した感染症 (食中毒) とは考えにくかった。また、聞き取り調査による初発患者はDクラスの3歳児であったものの、発症率の高かったのは4歳児のAおよびBクラスであったこと、当該両クラスに挟まれるようにトイレが位置していた (図2) ことなどから、何らかの理由でトイレがSVに汚染され、そこから感染が広がった可能性も示唆された。

本事例は長野県内で初めて確認されたSVによる感染性胃腸炎の集団事例であった。

表2. 学年等別患者発生状況

学年等区分	患者数	人数	発症率(%)	備考
1年生	9	21	42.9	
2年生	16	17	94.1	初発患者含む
3年生	0	1	0.0	
マネージャー	1	2	50.0	
引率	2	4	50.0	
合計	28	45	62.2	

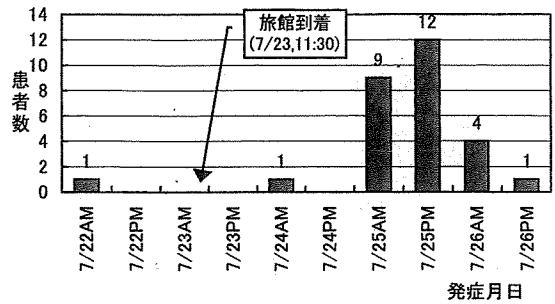


図3. 日別患者発生状況

事例2: 2事例目は、2007 (平成19) 年7月22日~7月26日にかけて長野県東部の旅館で発生した。患者は当該旅館に合宿のため宿泊していた高等学校のサッカー部生徒および引率者45名中28名 (62.2%) であった。学年別の患者の発生には偏りが認められ、初発患者を含む2年生の発症率が他の学年に比べ高かった (表2)。

発熱22名 (79%), 嘔気18名 (64%), 頭痛14名 (50%), 嘔吐12名 (43%) が主な臨床症状であった。嘔気の発現率は50%を超えていたが、嘔吐、下痢、腹痛等の胃腸炎症状の発現頻度が低く、発熱や頭痛の頻度が高かったことが臨床症状の特徴であった。

日別の患者発生状況は、旅館到着前の7月22日午前中に初発患者が発生し、その後7月25日の午後をピークとする一峰性であった (図3)。疫学調査の結果、生徒達は練習中にスポーツドリンクの回し飲みを行っていた、往路バス内において初発患者の座席付近に座っ

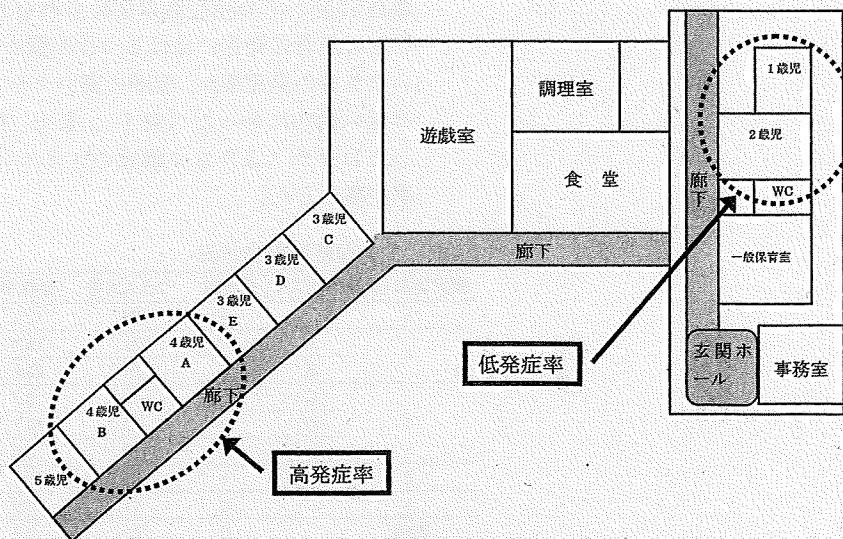


図2. 保育所平面図