

ウイルス性食中毒集団発生5事例の疫学的検討および 検出したNorwalk Virus (NV) の遺伝子解析

【微生物科】

川 本 歩 ・ 松 本 尚 美 ・ 谷 尾 進 司
竹 内 功 二 ・ 太田垣 公 利*

Epidemiological Aspects of Foodborn Viral Gastroenteritis Outbreaks of 5 Cases and Sequence Analysis of Norwalk virus (NV) Genome Detected from Fecal Specimen

Ayumi KAWAMOTO, Naomi MATSUMOTO, Shinji TANIO,
Koji TAKEUCHI, Kimitoshi OHTAGAKI*

Abstract

Foodborn viral gastroenteritis outbreaks of 5 cases occurred in Tottori, Japan between April and May, 1999. And this 5 cases were outbreaks due to Norwalk virus. We found that 4 cases of these outbreaks were food born and the all patients ate oysters. The others were drinking water-related gastroenteritis in junior high school students who joined an excursion outside. The symptoms of 115 patients in these cases were stomachache (71%), fever (45%), vomiting (38%) and diarrhea (38%).

We detected 35 strains of NV genome from fecal specimen of these outbreaks by the RT-PCR using the kinds of two primer sets. One is the first primer pair 35/36 and the second primer pair NV81/NV82/SM82. The other is the first primer pair MR3/4 and the second primer pair Yuri22F/22R. However we could not detect the NV genome from oysters and well water. Nucleotide sequencing was done on 32 strains in the ORF1 region from genomic nucleotide position 4568 to 4861 (the alignment of NV) and we found that 14 strains (44%) of them belonged to genogroup II (GII). GII could be classified into two clusters. Genogroup I was 18 strains (56%) and could be classified into five clusters. This clusters based on the nucleotide sequences showing a similarity of more than 80%. Genetic and antigenic diversities were suggested by this studies.

1 はじめに

Norwalk Virus (NV) は冬季に頻発する食中毒や小児の急性胃腸炎の原因ウイルスとして知られており、食水系感染、ヒトからヒトへの感染経路がありそのプロトタイプとして知られている¹⁾²⁾。近年NV遺伝子の全塩基配列が決定され³⁾

RT-PCR法によるNV遺伝子の検出が可能となり⁴⁾、現在ではCaliciviridae (カリシウイルス科) に分類されている。またNV遺伝子型の多様性が報告され⁵⁾ その遺伝子的特性からGenogroup I (GI)、genogroup II (GII) に分かれており、わが国においてもその多様性が報告されている^{6) 7)}。わが国では平成9年5月に食品衛生法の一部改

* 現鳥取県東部健康福祉センター

正により、食中毒の病因物質としてこれらのウイルスの追加指定した。それ以降全国からの食中毒事例からのNV検出数が多数報告されるようになった⁸⁾。

鳥取県において1999年4月から5月の春先に5例のNVによる集団食中毒事例が発生した。そこで、われわれはこれらの集団食中毒事例の患者便、調理従事者便のRT-PCR法によるNV遺伝子の検出を行い検出したNV遺伝子の遺伝子解析による分子疫学的調査と5例の食中毒発生状況の疫学的検討を行ったのでその結果について報告する。

2 材料と方法

1) 材 料

1999年1月～11月に発生した食中毒発生状況を調べ、検査材料は集団食中毒事例5事例の患者便36件、調理従事者便23件、非発症者便1件、神社手水舎の水20ℓ、生カキ（殻付き）3個を用いた。

2) 方 法

糞便材料はPBS 10%乳剤を3000rpm 10分遠心し、その上清を等量のダイフロン処理後5000rpm 30分遠心し100μℓをRNA抽出に用いた。水20ℓは限外濾過器にて50mℓ濃縮後ポリエチレングリコール吸着し遠心沈殿後500μℓのDEPC水に再浮遊し100μℓをRNA抽出に用いた。

生かきは中腸腺をPBSで10%乳剤とし粗遠心後40000rpm 2時間遠心し、200μℓのDEPC水に再浮遊し100μℓをRNA抽出に用いた。RNA抽出はCTAB法⁴⁾に準じた。RT-PCR法は2種類のプライマー対、FirstPCRprimer35/36: SecondPCRprimerNV81/82/SM82、FirstPCRprimerMR3/4: SecondPCRprimerYuri22F/Rを用いて行った。反応条件は各Firstprimer20μM、dNTPmix2.5mM、reverse transcriptase20units (MMLV)、DEPC水、PCRbuffer、EXTaq2.5 units (TaKaRa)、Rnasin40units（東洋紡）で45μℓ調整しRNAを5μℓ加えてRT反応を37℃60分、94℃3分熱処理し、94℃1分、45℃1分、72℃1分のサイクルを40回、72℃15分おこなった。さらにSecondPCRを行う場合は各primer20μM、

PCRbuffer、EXTaq2.5unitsで50μℓ反応液を調整しFirstPCR産物1μℓ加えて94℃3分熱処理後94℃1分、45℃1分、72℃1分のサイクルを40回、72℃15分行った。

遺伝子解析はPCR法陽性32検体のPCR産物を用いpolymerase鎖域4568b～4861b、293bについてダイターミネーター法によるsequencesを行い系統樹はUPGMA法で作成した。

3 結 果

1) 鳥取県における食中毒発生状況

鳥取県では1999年1月から11月の間に17事例の集団食中毒が発生した。その発生状況をtable 1に示す。17事例中No.1～No.5の5事例がNV起因で他の事例は細菌性、植物性自然毒であった、NVによる5事例の集団食中毒は4月から5月に集中した。事例No.2は中学生100人の集団発生例で、生徒144人が遠足に参加し、飲水者100人のうち有症者数68人、非飲水者44人は無症状であり、飲水者と非飲水者で $P < 0.001$ の有意差を認め遠足中に飲んだ神社手水舎の水（井戸水）が原因と推察された。他の4事例はいずれも飲食店で発生し摂食メニューに生カキが含まれていたが原因食品は推定されなかった。この4事例の有症者数は20人以下で小規模の発生であった。これら5事例の集団食中毒は鳥取県西部、東部地域に発生した。

2) 疫学調査結果

Table 2に5事例の疫学調査結果を示す。5事例中の患者の潜伏時間は最も早いヒトで7時間、最も遅いヒトで75.5時間と個人差がみられる。各事例の平均潜伏時間は26.9～46.3時間で平均39.4時間であった。発症率についてみると、事例No.2は68.0%、他の4事例はいずれも成人で28.9%、30.2%、30.4%、44.8%であった。患者の受診率は16.2%～54.5%、平均24.3%で重症者はみられなかった。症状は腹痛、下痢、嘔吐、嘔気、頭痛、発熱などであった。発熱症状はすべての事例で認め、事例No.5では発熱症状を72.7%示していた。また事例No.1の1名に関節痛を認めた。

Table 1 Outbreaks of food poisoning in Tottori, Japan, January–November 1999

No.	Date day–month	District	Consumer	Cases	Suspected route of transmission	Causative agents detected	Place of eating/ providing food
1	7–Apr	Yazu County	53	16	Meal served (foodstuff: unknown)	NV	Restaurant
2	22–Apr	Ketsuka County	100	68	Water born (well water)	NV	Shrine
3	24–Apr	Yonago City	29	13	Meal served (foodstuff: unknown)	NV	Restaurant
4	27–Apr	Yonago City	23	7	Meal served (foodstuff: unknown)	NV	Restaurant
5	22–May	Tottori City	38	11	Meal served (foodstuff: unknown)	NV	Restaurant
6	25–Jan	Yazu County	18	15	Meal served (foodstuff: unknown)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Dormitory
7	1–Aug	Tohoku County	5	1	Meal served (foodstuff: Turban shell)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Home
8	3–Aug	Tohoku County	7	3	Meal served (foodstuff: unknown)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Unknown
9	14–Aug	Tohoku County	29	8	Meal served (foodstuff: Japanese rice cake over spreaded with bean jam)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Home
10	15–Aug	Tohoku County	16	6	Meal served (foodstuff: unknown)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Home
11	15–Aug	Yazu County	111	20	Meal catered (foodstuff: unknown)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cater
12	15–Aug	Yonago City	Unknown	1	Unknown	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Unknown
13	15–Aug	Saihaku County	Unknown	1	Unknown	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Unknown
14	15–Aug	Unknown	Unknown	2	Unknown	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Unknown
15	16–Aug	Yonago City	344	76	Unknown	<i>Salmonella</i> Montevideo	Cater
16	17–Oct	Krayoshi City	2	2	Meal served (foodstuff: toad + stool)	Plant toxin (<i>Rhodophyllus rhodopolius</i>)	Home
17	6–Nov	Tohoku County	2	2	Meal served (foodstuff: toad + stool)	Plant toxin (<i>Lampteromyces</i>)	Home

Table 2 Clinical profile in five outbreaks of food poisoning due to NV

No.	Cases/ Consumer (%)	Age ($\bar{X}$)	Sex	Incubation period: hours ($\bar{X}$)	Examined patients/Cases (%)	Symptoms (%)							
						Stomach	Diarrhea	Vomiting	Nausea	Headache	Fever	Chill	Ennui weariness
★1	16/53 (30.2)	24–61 (36.4)	M:7 F:9	21.0–50.0 (42.3)	4/16 (25.0)	9 (56.2)	6 (37.5)	4 (25.0)	0 (0)	0 (0)	7 (43.8)	2 (12.5)	2 (12.5)
2	68/100 (68)	14 (14)	M:44 F:24	7.0–75.5 (46.3)	11/68 (16.2)	51 (75.0)	18 (26.5)	31 (45.0)	18 (26.5)	23 (33.8)	30 (44.1)	0 (0)	8 (11.8)
★3	13/29 (44.8)	22–47 (33.5)	M:6 F:7	16.0–66.0 (38.9)	4/13 (30.1)	9 (69.2)	10 (76.9)	5 (38.5)	8 (61.5)	4 (30.8)	6 (46.2)	5 (38.5)	7 (53.8)
★4	7/23 (30.4)	20–30 (27)	M:0 F:7	12.0–38.0 (26.9)	3/7 (42.8)	5 (71.8)	3 (42.8)	3 (42.8)	6 (85.7)	2 (28.6)	1 (14.3)	3 (42.8)	2 (28.6)
★5	11/38 (28.9)	30–55 (35.7)	M:9 F:2	21.0–61.5 (42.8)	6/11 (54.5)	8 (72.7)	7 (63.6)	1 (9.1)	8 (72.7)	4 (36.4)	8 (72.7)	2 (18.2)	3 (27.3)
Total	115/243 (47.3)	14–55 (29.3)	M:66 F:49	7.0–75.5 (39.4)	28/115 (24.3)	82 (71.3)	44 (38.2)	44 (38.2)	40 (34.8)	33 (28.7)	52 (45.2)	12 (10.4)	22 (19.1)

★Food born presumably due to Raw Oysters

3) RT-PCR結果

Table 3 に事例別のRT-PCR検査結果を示す。患者便のRT-PCR陽性率は7/7 (100)、3/11 (27.2%)、4/4 (100%)、2/3 (66.7%)、7/11 (63.6%) であった。一方、4事例の従事者便の陽性率は、事例No.1:0/3 (0%)、No.3:2/12

(8.3%)、No.4:3/6 (50.0%)、No.5:0/2 (0%) であった。一方、生かき、神社の手水舎の水からはNVは検出されなかった。

遺伝子的系統解析は塩基配列80%以上の相同性をもとに、Gene Bank登録のStandard Strainと比較し、その結果をTable 4 に示した。Standard

Strainと80%以下の相同性でStandard Strainグループに属さないNV genomeはG I (I a、I b、I c)、G II (II a)とした。G IではGene Bank登録のStandard Strain、Norwalk Virus (NV)様、Desert Shield (DSV)様とNVとDSVに属さないその中間型でDSVと75.2%の相同性を示したI a、I aと75.2%の相同性を示すI b、I bと76.9%の相同性のI cの5つのクラスターに分類された。G IIはMX様のグループとYuri strainと70%のホモロジーを示すII aの2つのグループに分類された。GenotypeはG Iのみが2事例 (No. 1、No. 4)、G IIのみは1事例 (No. 2)

であった。またG I、G IIの混合を2事例 (No. 3、No. 5)に認めた。また患者と従業員のGenotypeが異なる例がみられ、事例No. 3では患者G I、従事者G IIと異なっていた。

水系感染が原因とされた事例No. 2では9人中1名がMX様であった。他の8名はII aでその8株は100%の相同性を示していた。生かき摂食事例では4事例中2事例がG I、G IIの混合で他の2事例はG IのみであったがG Iグループ内でも2～3のクラスターに分かれた。東部地域ではDSV様、I a、II aが多く検出され、I cは西部地域のみで検出された。

Table 3 Detection of NV genomes from fecal samples by RT-PCR

No.	Cases	food day/month	Date of attack day/month	Date of sampling day/month	Positive cases/examined (%)	Note
1	16	5/4	6-7/4	1/4	7/ 7 (100)	Patient
					0/ 3 (0)	Cook
2	68	21/4	22-26/4	27-28/4	9/11 (82)	Patient
					4/ 4 (100)	Patient
3	13	23/4	24-26/4	27/4	1/ 1 (100)	Non patient
					2/12 (17)	Cook
4	7	26/4	27-28/4	30/4	2/ 3 (67)	Patient
					3/ 6 (50)	Cook
5	11	21/5	22-24/5	24-26/5	7/11 (64)	Patient
					0/ 2 (0)	Cook
Total	115				35/60 (58)	

Table 4 Result of sequence analysis of NV genome from fecal specimen

District	No	Genotype								
		Genogroup	Standard strain					Genogroup	Standard strain	
		G I	DSV	I a	I b	I c	NV	G II	MX	II a
The east	1	6	4	0	0	0	2	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	9	1	8
	5	4	0	3	1	0	0	3	1	2
The west	3	4	1	0	0	2	1	2	2*	0
	4	4	0	0	1	1	2*	0	0	0
Total		18	5	3	2	3	5	14	4	10

*Cook

考 察

生かきによると推定された食中毒事例は1～2月に多く⁸⁾、また自生かきから冬季に多くNVが検出され⁹⁾市販の貝の17%からもNVの遺伝子を検出したと報告されている¹⁰⁾。しかし、今回の事例ではNVに起因する食中毒が4月から5

月に集中し5月下旬までみられた。これらの事例において摂食メニューに提供された生かきの流通経路および生産地は不明であった。わが国では、平成11年9月以降かきの生産海域の表示を義務づけたが、輸人生かきも存在しており生産地が不明な場合もある。今回の生かき摂食による食中毒が春先まで続いた要因は不明であった。また井戸水

が原因食品と推定された事例も1例ありヒトの糞便による環境水の汚染が推察された。

患者の症状では腹痛がもっとも多く次いで下痢が多くみられ、経過中に下痢回数を6回呈した1名の成人患者がいた。嘔吐回数では事例2の1人が1日10回呈していた。発熱は37.5～38.2℃程度を示し発症率でみると、事例5では72.7%と高く他の事例では50.0%以下であった。事例2の中学生の発生例では下痢症状を26.5%示し他の成人の事例と比べて低く小児における他の報告においても同様であった^{11) 12)}。小児のNVによる症状ではけいれん、イレウスなどの報告があるが¹³⁾ 今回の事例ではみられなかった。しかし遺伝子型と症状との相関性はみられずヒトの個体差の違いによると考えられる。事例3の摂食者1名の健康者からNVが検出されており不顕性感染を認めた。

同一集団発生例で患者と従事者のGenotypeが異なっていた例が認められた。このことは摂食時期の差によるのか、食品が複数のGenotypeのNVに汚染していたのか不明であるが、NVが検出された調理従事者は、いずれも無症状で食品を介しての二次汚染防止に注意を要する。

生カキを原因食品とした食中毒事例の他の報告では複数のGenotypeの検出例がみられ^{6) 7)}、世界においても多数の遺伝子型が報告されている¹⁴⁾。今回の結果で同一事例から2～4種類、また同一人から2種類のNVが検出された1人の患者を認め、遺伝学的多様性をみとめた。

またNVのGenotypeに地域差および遺伝学的多様性を認めた。遺伝子型GⅡaはYURI株とは異なっておりわが国のみで検出されている遺伝子型⁷⁾なのか検討が必要である。また、小児の胃腸炎散発例のNV流行状況と環境水のNV汚染状況把握が必要でありNVの分子疫学的データの蓄積をしたいと考える。

謝辞：遺伝子解析のご指導いただいた国立公衆衛生院衛生微生物学部西尾治先生に深謝します。

疫学的調査の資料提供に協力いただいた鳥取保健所、米子保健所の生活環境課の皆様にお礼申し上げます。

文 献

- 1) Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica RM: Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 10: 1075-1081, 1972
- 2) Kapikian AZ, Estes M, Chanock M: Norwalk group viruses. In Fields Virology, 3rd Edition. eds. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996, pp. 783-810
- 3) Jiang X, Graham DY, Wang, Estes MK: Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 250: 1580-1583, 1990
- 4) Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK: Detection of Norwalkvirus in stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 2529-2594, 1992
- 5) Wang J, Jiang X, Madore HP, Gray J, Desselberger U, Ando T, Seto Y, Oishi I, Lew JF, Green KY, Estes MK: Sequence diversity of small round structured viruses in the Norwalk virus group. *J Virol* 68: 5982-5990, 1994
- 6) 山崎謙治, 大石 功, 奥野良信, 峯川好一, 柴田忠良: 急性胃腸炎の集団発生—RT-PCRにより検出されたSRSVの遺伝子的多型. *臨床とウイルス* 23: 251-256, 1995
- 7) 山崎謙治, 大山 徹, 宇田川悦子, 川本尋義: 1989年～1998年に日本国内で検出されたNorwalk-like viruses(NLVs)の遺伝的特徴および統一プライマーの検討. *感染症学雑誌* 74 (5): 470-475, 2000
- 8) 国立感染症研究所厚生省保健医療局結核感染症課: 病原微生物検出情報 19 (1): 1-2,

- 1998
- 9) 北橋智子, 田中俊光, 宇田川悦子: 千葉市沿岸の自生カキからのH A V, S R S V, アストロウイルス遺伝子の検出。感染症学雑誌 73 (6): 559-564, 1999
- 10) Numata K, Tanaka S, Jiang X, Estes MK, and Chiba S: Epidemiological study of Norwalk virus infections in Japan and Southeast Asia by enzymelinked immunosorbent assays with Norwalk virus capsid protein produced by the Baculovirus expression system. J Clin Microbiol 32: 121-126, 1994
- 11) 国立感染症研究所厚生省保健医療局結核感染症課: 病原微生物検出情報 19 (11): 248-249, 1998
- 12) 大石 功: カリシウイルス胃腸炎の疫学。臨床とウイルス 27 (3): 114-126, 1999
- 13) 和泉桂子, 小堀勝充, 秋原志穂, 牛島廣治: 1995年末埼玉県南部で流行したノーウオーク関連ウイルスによる急性胃腸炎の臨床的検討。臨床とウイルス 27 (3): 133-137, 1999
- 14) 染谷雄一, 名取克郎, 武田直和, 宮村達男: ヒトカリシウイルスの多様性。臨床とウイルス 27 (4): 294-303, 1999