

## 平成 16 年度の胃腸炎集団発生のウイルス学的検査結果

野田 衛 藤井 彰人\* 山本美和子 池田 義文  
松本 勝 荻野 武雄

平成 16 年度に広島市内で発生した胃腸炎集団感染、有症苦情、食中毒および他の自治体からの依頼による遡り調査のうち 39 事例についてウイルス学的検査を実施した結果、22 事例(56.4%)からノロウイルス(NV)が検出された。供試 387 検体中 95 検体(24.5%)が NV 陽性で 検査材料別の検出率は患者吐物 42.9%、患者便 30.0%、食品 21.6%、従事者便 15.0%であった。NV 陽性事例のうち 17 事例は G<sup>-</sup>、5 事例は G<sup>+</sup> と G<sup>-</sup> が関与し、後者はいずれもカキの関連が疑われた事例であった。遺伝子型を調べた事例の多くは G<sup>-</sup>/4(ローズデイル類似株)が関与した。NV 陽性となった従事者の一部について約 1 週間後に採取した糞便について再検査を行った結果、半数以上が陽性であった。今年度の集団発生は、感染症事例が多いこと、高齢者福祉施設での発生が急増したことが特徴的であった。

キーワード： ノロウイルス、胃腸炎集団発生、高齢者福祉施設、G<sup>-</sup>/4

### はじめに

ノロウイルス(NV)は胃腸炎集団発生、食中毒の主要な原因ウイルスである。NV の感染経路は、食品を介しての感染と食品を介さないヒト-ヒト感染(感染症)とに大きく分類され<sup>1)</sup>、前者はさらにカキ等の二枚貝を介する場合と調理従事者等から汚染した食品を介する場合とに分けられる。これまでの NV 集団発生はカキ関連の食中毒事例が大半を占めていた<sup>2)</sup>が、近年、カキ以外の食品を介した事例や感染症事例が増加傾向にある<sup>3)</sup>。さらに、昨年末から発生した福山市での高齢者福祉施設での 7 名の死亡例を伴う NV 集団感染を発端に、全国各地で同様の事例が報告され、大きな社会問題となった。一方、NV は今だその培養系が確立されていないことから、ウイルス学的な様相は不明の部分が多く残されている。このような状況の中、NV による集団発生を防ぎ、適切な予防対策を講ずるためには、NV のウイルス学的解明とともに、NV による感染事例の疫学的検討の蓄積が重要である。

本報告では、平成 16 年度に広島市内で発生した胃腸炎集団発生事例および他の自治体の依頼に基づく遡り調査のウイルス学的検査結果ならびに検出ウイルスの分子疫学的解析結果について取りまとめた。

### 方法

#### 1 検査材料

平成 16 年 4 月 1 日から平成 17 年 3 月 31 日までの 1 年間に広島市内で発生した胃腸炎集団発生事例(食中毒、有症苦情、感染症を含む)および他の自治体の依頼に基づく調査(遡り調査)のうち保健所、各区保健センターからウイルス検査が依頼された 39 事例の患者、喫食者、施設入居者などの糞便(患者便)203 検体、従事者、関係者などの糞便(従事者便)133 検体、患者吐物 14 検体、および食品 37 検体(カキ 15 検体、その他の食品 22 検体)、合計 387 検体を検査材料とした。

#### 2 検体の前処理

糞便は veal infusion broth で 10% 乳剤化後 10,000rpm, 30 分遠心分離した上清(10%糞便上清)を等量のウイルス分離用検体処理液で希釈し、フィルターでろ過した。カキは中腸腺を切り出し PBS(-)で 10%乳剤にした後 10,000rpm, 30 分遠心分離を行い、その上清をポリエチレングリコールで濃縮し、40%ショ糖に重層し超遠心分離を行った沈渣を少量の蒸留水に再浮遊した。カキ以外の食品は PBS(-)で 10%乳剤にした後遠心分離を行った上清をポリエチレングリコールで濃縮し、沈渣が少量の場合はそのまま、多い場合はさらに粗遠心後の上清を超遠心分離した沈渣を、それぞれ少量の蒸留水に再浮遊した。

\*：現 社会局保健部食肉衛生検査所

### 3 ウイルス検査

検査はNVを対象としたPCR法を基本として、必要に応じて電子顕微鏡検査、HEp-2細胞、ヒト胎児線維芽細胞、RD18S細胞、Vero細胞を用いたウイルス分離、サポウイルス、アストロウイルスを対象としたPCR法、ロタウイルス検出ELISA法(ロタクロン®、TFB)、アデノウイルス検出ELISA法(アデノクロン®、TFB)、アデノウイルス40/41型検出ELISA法(アデノクロンE®、TFB)、C群ロタウイルスRPHA法(デンカ生研)を併用または単独で使用した。

#### (1) RNA抽出と逆転写-遺伝子増幅法

糞便は10%糞便上清100μl、カキを含む食品は得られた濃縮液100μlを抽出材料として、それぞれセバジーン®RV-R(三光純薬)、SV Total RNA Isolation System(プロメガ)で使用説明書に従いウイルスRNAの抽出を行い、少量の遺伝子解析用蒸留水に再浮遊した。

逆転写-遺伝子増幅法(RT-PCR)は既報<sup>4)</sup>に準じ、M-MLV Reverse Transcriptase RNaseH-(東洋紡)およびEX Taq®(宝酒造)を用いた同一反応系またはReady-To-Go RT-PCR®(アマシャム・バイオサイエンス)で行った。糞便はポリメラーゼ領域を標的としたP289/290<sup>5)</sup>、カプシッド領域を標的としたG1-SKF/SKR、G2-SKF/SKR<sup>3)</sup>によるRT-PCR法、食品、患者吐物はポリメラーゼ領域を標的とした36/35' 82/81、MR3/4 Yuri22F/R、カプシッド領域を標的としたCO-G1F/G1SKR G1-SKF/SKR、CO-G2F/G2SKR G1-SKF/SKR<sup>3)</sup>によるRT-nested PCR法(RT-nPCR)を中心に実施し、必要に応じ他の系を併用した。エチジウムブロマイド加×0.5 TBE緩衝液でアガロースゲル電気泳動後、紫外線照射下で写真撮影を行い、目的DNAの増幅の有無を確認した。一部の検体には、COG1F/COG1R、COG2F/COG2Rを用いたリアルタイムPCR法<sup>6)</sup>を実施した。

#### (2) 塩基配列決定

PCR増幅産物から直接あるいはゲルから切り出した後、それぞれQIAquick PCR Purification Kit(キアゲン)、QIAquick Gel Extraction Kit(キアゲン)で目的DNAを回収・精製し、BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction(アプライドバイオシステムズ)でサイクルシークエンス反応を行った。反応産物をAutoSeq™ G-50(アマシャム・バイオサイエンス)で精製した後、ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer(PEアプライドバイオ

システムズ)で電気泳動を行い、得られたデータをUPGMA法で解析し、Katayamaらの方法<sup>7),8)</sup>によりNV遺伝子型を決定した。

## 結 果

### 1 検査実施状況

期間内に発生した39事例についてウイルス検査を実施した(表1)。依頼区分別にみると食中毒1事例、有症苦情10事例、感染性胃腸炎集団発生17事例、遡り調査11事例で、胃腸炎集団発生(感染症)が全体の約45%を占めた。市内発生27事例の発生場所(推定される感染場所を含む)をみると、老人ホーム、特別養護施設等の高齢者福祉施設が9事例で全体の1/3を占め、以下、小学校7事例、飲食店5事例が主な発生場所であった。小・中学校の8事例および高齢者福祉施設事例の1例を除く8事例はすべて感染症事例であった。食中毒1事例(NV検出)は5月に町民運動会で発生し、117名が発症した。遡り調査11件中8件は広島県産カキが原因食品として疑われた事例で、検食として保存されていたカキ残品および検体採取を行った日の加工カキについて検査を実施した。

### 2 ウイルス検査結果

39事例、387検体のうち、22事例(56.4%)、95検体(24.5%)からNVが検出された(表1)。検査区分別にみると、感染症事例11/17(64.7%)、遡り調査4/11(36.3%)、有症苦情事例5/10(50%)、食中毒事例1/1(100%)からNVが検出された。検査材料別にみると、患者便61/203(30.0%)、従事者便20/133(15.0%)、患者吐物6/14(42.9%)、食品8/37(21.6%)で、患者吐物、患者便の検出率が高かった。吐物からの検出例のうち1例は死亡者からの検出であった。

事例の60.5%は11月~3月の冬季に集中し、その間の検出率は82.6%(19/23事例)と高い値を示した。一方、4月~10月では20%(3/15事例)と検出率は低いものの、4月、5月の春季の事例からNVが検出された。

食品からは6事例(遡り調査5事例、有症苦情1事例)から検出され、検出時期は12月~3月に集中し、すべてカキからの検出であった。

従事者便のうち、初回の検査で陽性となったものの一部について陰性確認のため期間をおいて再検査を行った(表2)。初回検査後約1週間後に採取された糞便では9例中5例(55.6%)がNV陽性となり、陰性を確認できなかった。一方、2週間

表1 平成16年度の胃腸炎集団発生ウイルス検査結果の概要

事例番号	受付日	検査区分	発生場所 <sup>1)</sup>	施設等	糞便		患者吐物	食品	検出ウイルス	備考 <sup>2)</sup>
					患者・喫食者	従事者				
0407	H16.4.7	有症苦情	東区	飲食店(弁当)	3/3 <sup>3)</sup>	3/5			NV	G
0408	H16.4.8	遡り調査	京都府		0/3					
0410	H16.5.14	遡り調査	福岡県		0/3					
0411	H16.5.20	感染症	安芸区	小学校	1/16		0/1			
0412	H16.5.25	遡り調査	兵庫県					0/6		
0413	H16.5.25	食中毒	安佐南区	町民運動会	11/22		0/2		NV	G
0414	H16.5.31	感染症	安佐南区	中学校	2/8		0/1		NV(1), Ad3(1)	
0415	H16.6.2	感染症	安芸区	小学校	0/3		0/1			
0416	H16.6.4	感染症	中区	小学校	1/6				Polio-1	
0417	H16.6.4	感染症	安佐南区	小学校	0/6					
0418	H16.6.16	有症苦情	佐伯区	飲食店	0/14	0/23				
0421	H16.7.2	有症苦情	西区	事業所	0/9					
0422	H16.9.24	有症苦情	西区	介護施設	0/11					
0423	H16.10.28	感染症	南区	保育園	1/1				SRSV	
0424	H16.10.31	有症苦情	西区	家庭内	0/1					
0425	H16.11.19	感染症	安芸区	小学校	1/1		0/1		NV	G
0427	H16.12.8	有症苦情	中区	飲食店	0/10			0/2		
0428	H16.12.10	感染症	安佐南区	小学校	0/6					
0429	H16.12.14	有症苦情	愛媛県	社員旅行中	4/5				NV	G /4
0430	H16.12.15	遡り調査	香川県					1/2	NV	G
0431	H16.12.17	遡り調査	山口県					1/3	NV	G ,G
0432	H16.12.22	遡り調査	大阪市					0/1		
0501	H17.1.5	遡り調査	大阪府					2/2	NV	G ,G
0502	H17.1.11	感染症	南区	老健施設	5/8 (3/6) <sup>4)</sup>	14/33 (9/24)	1/1 <sup>5)</sup>	0/4	NV	G /12
0503	H17.1.14	遡り調査	滋賀県		0/1					
0504	H17.1.14	感染症	西区	小学校	2/3				NV	G /4
0505	H17.1.14	感染症	西区	老健施設	3/5	0/4		0/4	NV	G /3
0506	H17.1.17	遡り調査	岐阜県					0/1		
0507	H17.1.18	感染症	安佐南区	介護施設	3/7	1/9		0/3	NV	G /4
0509	H17.1.31	感染症	安佐北区	老健施設	2/9 (2/8)	0/8			NV	G /4
0510	H17.2.1	遡り調査	新潟県					1/1	NV	G ,G
0511	H17.2.7	感染症	東区	老健施設	3/5	1/16 (1/15)	1/1		NV	G /4
0513	H17.2.16	感染症	安佐北区	老健施設	2/2		3/4		NV	G
0514	H17.2.17	感染症	南区	老健施設	4/5		1/1		NV	G
0515	H17.2.21	有症苦情	中区	飲食店	2/2				NV	G ,G
0517	H17.2.21	有症苦情	中区	飲食店	3/4	0/5		1/1	NV	G ,G
0519	H17.2.22	感染症	安佐北区	老健施設	5/7	1/26			NV	G
0520	H17.3.23	遡り調査	横浜市					2/2	NV	G
0521	H17.3.30	有症苦情	安佐北区	家庭内	3/17	0/4	0/1	0/5	NV	G
計					61/203	20/133	6/14	8/37		
検出率					30.0%	15.0%	42.9%	21.6%		

\*1: 遡り調査では調査依頼元の自治体を示す。  
 \*2: 判明したNVの遺伝子群, 遺伝子型を示す。  
 \*3: 陽性検体数/検査検体数  
 \*4: ( )内は陽性者数/検査者数  
 \*5: 死亡例

後に採取された1例は陰性であった。  
 その他の検出ウイルスとして, 1事例から電子

顕微鏡検査で小型球形ウイルス(SRSV)を検出したが, 当所保有の種々のNV検出用プライマー<sup>4)</sup>ある

表2 初回の検査でNV陽性となった従事者便の陰性確認検査結果

事例番号	受付番号	初回検査		陰性確認検査		採取間隔
		採取月日	検査結果	採取月日	検査結果	
20502	05	1.11	+ <sup>*1</sup>	1.18	+	7日
	06	1.11	+	1.18	-	7日
	12	1.12	+	1.18	-	6日
	14	1.12	+	1.18	-	6日
	22	1.11	+	1.18	-	7日
	27	1.11	+	1.18	+	7日
	31	1.11	+	1.18	+	7日
	32	1.11	+	1.18	+	7日
	34	1.11	+	1.18	+	7日
	20511	03	2.7	+	2.16	-

\*1: +はNV陽性, -はNV陰性を示す。

いはサポウイルス, アストロウイルス用のプライマーを用いた RT-PCR では陰性であった。また, 事例番号 0416 からポリオウイルス 1 型, 事例番号 0414 からアデノウイルス 3 型が各 1 人から検出された。

3 検出 NV の分類と特徴

NV 陽性 22 事例のうち 17 事例(77.3%)は遺伝子群 G が検出され, 5 事例(22.3%)は G と G が検出された(表 1)。G と G が検出された事例はすべて遡り調査(3 事例)のカキあるいはカキの関連が疑われる有症苦情事例(2 事例)のカキおよび患者便からの検出であった。

遺伝子型を決定した 7 事例では, 5 事例が G /4(ローズデイル類似株), 1 事例が G /3(メキシコ類似株), 1 事例が G /12(チッタ類似株)であった。各遺伝子型を検出した事例の発生場所をみると, G /4 は高齢者福祉施設 3 事例, 小学校 1 事例, 旅行中の感染 1 事例, G /3, G /12 はいずれも高齢者福祉施設事例であった。

4 各プライマーの NV 検出率の比較

検査に使用した主要な PCR 増幅系について検出率を比較した(表 3)。糞便検査に使用した 3 種類のプライマー組では, 検出率が最も高かった系は P289/290 で 21.6%(52/241), 以下, G2-SKF/R 15.8%(52/329), G1-SKF/R 1.8%(4/221)であった。食品に使用した 4 種類の nPCR の系では, G2COF/G2-SKR G2-SKF/R の系が最も検出率が高く 25%(10/40) 以下 MR3/4 Yuri22F/R 8.3%(2/24), G1COF/G1-SKR G1-SKF/R 8.1%(3/37), 36/35' 82/81 0%(0/24)であった。

考 察

平成 16 年度に発生した胃腸炎集団発生など 39 事例の 387 検体についてウイルス検査を実施した結果, 22 事例(56.4%), 95 検体(24.5%)から NV が検出され, 事例の多くにおいて NV が関与していたことが明らかになった。本年度の集団発生事例はこれまでとは異なる特徴をいくつか指摘することができる。第一に, これまでは有症苦情事例を含む食中毒事例(食品媒介性の感染症集団発生)

表3 プライマー別のNV検出率の比較

検体区分	G1SS <sup>*1</sup>	G2SS	P289/290	36/35'- 82/81	MR3/4- Yuri22F/R	G1CS- G1SS	G2CS- G2SS
糞便	4/220 <sup>*2</sup>	52/327	52/240				
吐物	0/1	0/2	0/1	0/6	1/6	0/10	4/13
食品 <sup>*3</sup>				0/6	0/6	0/13	0/14
カキ				0/12	1/12	3/14	6/13
計	4/221	52/329	52/241	0/24	2/24	3/37	10/40
検出率	1.8%	15.8%	21.6%	0%	8.3%	8.1%	25%

\*1: 略号は以下のとおり。G1SS :G1-SKF/G1-SKR, G2SS :G2-SKF/G2-SKR, G1CS :COG1F/G1-SKR, G2CS :COG2F/G2SKR。36/35'-82/81より右のプライマー組は上段を1回目, 下段を2回目のPCRに使用したnested PCR。

\*2: 陽性検体数/検査検体数

\*3: カキを除く

の検査が大半を占めていた<sup>4)</sup>が、今年度は、食品を媒介しないヒト-ヒト感染のいわゆる感染症事例の検査が半数近くを占めたこと、第二に、老人ホーム、特別養護施設などの高齢者福祉施設での発生が9事例と急増したことがあげられる。これらの特徴は、7名の死亡例をみた福山市の高齢者施設でのNV集団感染事例以後、全国各地で同様の発生があったことが、マスコミ等の報道、厚生労働省の調査<sup>9)</sup>、各自治体からの報告書等<sup>10)-12)</sup>から明らかになっており、全国的な傾向であったと考えられる。第三に、これまではウイルスの関与が疑われる事例の多くは冬季に発生していたが、今年度は4月~10月の冬季以外の時期でも発生が少なからずみられた。特に、4月~6月には全国からノロウイルス集団感染の報告が相次ぎ、広島市でも、117人が発症した町民運動会での大規模食中毒事例などが発生した。

事例ごとの検出NVをみると、17事例はG<sub>1</sub>、5事例はG<sub>2</sub>とG<sub>3</sub>が検出され、G<sub>1</sub>による事例が大半を占めた。この傾向はこれまでのわが国での傾向<sup>13)</sup>と同様であった。G<sub>1</sub>とG<sub>2</sub>が検出された事例はいずれもカキの関連が疑われる事例であった。

遺伝子型を決定した7事例のうち5事例はG<sub>1</sub>/4(ローズデイル類似株)、他の事例はG<sub>1</sub>/3(メキシコ類似株)、G<sub>1</sub>/12(チッタ類似株)が各1事例であった。G<sub>1</sub>/4は近年欧米を始め<sup>14)-19)</sup>、わが国においても主要流行株であり<sup>10)-12)</sup>、広島市においてもG<sub>1</sub>/4がNV集団感染の主要原因遺伝子型ウイルスであったと推測される。近年の高齢者福祉施設でのNV集団感染の多発の要因にG<sub>1</sub>/4の全国的な流行がその背景にあることが指摘されており<sup>20)</sup>、詳細な検討が期待される。また、近年欧米でポリメラ-ゼ領域に共通の変異を持つG<sub>1</sub>/4変異株の流行が報告されている<sup>19)</sup>ことから、一部の株についてその変異の有無を調べた結果、いずれも従来のG<sub>1</sub>/4の配列であり、変異株の存在は確認できなかった(データ示さず)。

今回の調査で、従事者等の糞便の15.0%(20/133)からNVが検出された。従事者等の多くは無症状であり、NVが不顕性感染を起こしていたと推定される。初回の検査でNV陽性となった従事者の一部について、陰性確認のため間隔をあけて再検査を行った結果、約1週間後の再検査では半数以上が陽性であった。NVの糞便中の排出期間に関しては、2~15日(平均8.5日)<sup>21)</sup>、7日以

内<sup>22)</sup>、22日以内<sup>23)</sup>、35日以内<sup>24)</sup>などいくつか報告があり、今回の結果からも少なくとも1週間の間隔では、NVは陰性化しない場合があることが示された。これらの結果は症状消失後もかなり長期間糞便中にウイルス粒子が排泄することを示しており、行政対応的には手洗い等一般的な衛生管理の徹底が極めて重要であることを意味している。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、検体採取等にご協力いただきました広島市社会局保健医療課、同食品保健課、同環境衛生課および各区の保健センターの関係各位に深謝します。

## 文 献

- 1) 西尾 治 他：ウイルス性食中毒について-特にノロウイルスおよびA型肝炎ウイルス-、日本食品微生物学会雑誌 21(3), 179~186(2004)
- 2) ノロウイルス感染集団発生 2001.1~2003.10, 病原微生物検出情報, 24, 309~310(2003)
- 3) 西尾 治：厚生労働科学研究補助金食品安全確保研究事業「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15年度 総括・分担研究報告書 平成13~15年度 総合研究報告書」(2004)
- 4) 野田 衛 他：平成12年度の胃腸炎集団発生事例のウイルス学的検査結果について、広島市衛研年報, 20, 43~48(2001)
- 5) Jiang X et al: Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR, J Virol Methods, 83, 145~154(1999)
- 6) 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)
- 7) Katayama K et al: Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses, Virol, 299, 225~239(2002)
- 8) 片山和彦：ノロウイルス感染症, 感染症発生動向調査週報, 第11週号(2004年3月8日~3月14日)(2004)
- 9) 厚生労働省ホームページ：今冬の感染性胃腸

- 炎の集団発生事例について ,  
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/200501/h0112-3.html>
- 10) 系数清正 他：沖縄県における2003/04シーズンに検出したノロウイルスの遺伝子型について，沖縄県衛生環境研究所報，38，67～69(2004)
  - 11) 原田美樹 他：ノロウイルスによる感染性胃腸炎の実態把握と予防への取り組み，神奈川県衛生研究所研究報告，34，29～31(2004)
  - 12) 吉澄志磨 他：ノロウイルスによる胃腸炎集団発生について-北海道2003/04シーズン-，北海道衛研所報，54，37～42(2004)
  - 13) 国立感染症情報センターホームページ，  
<http://idsc.nih.go.jp/iasr/prompt/graph-kj.html>
  - 14) Lopman B et al: Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant, *Lancet*, 363, 682～688 (2004)
  - 15) Vinje J et al: The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands, *J Infect Dis*, 176, 1374～1378(1997)
  - 16) Vinje J et al: Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands, *J Infect Dis*, 174, 610～615(1996)
  - 17) Gallimore I et al: Diversity of noroviruses
  - 18) Vipond et al: National epidemic of Lordsdale norovirus in the UK, *J Clin Virol*, 30, 243～247(2004)
  - 19) Dingle KE, Mutation in a Lordsdale norovirus epidemic strain as a potential indicator of transmission routes, *J Clin Microbiol* 42, 3950～3957(2004)
  - 20) 野田 衛：ノロウイルスの最近の研究動向と話題，第50回広島県獣医学会（産業動物・公衆衛生・小動物部門からの話題提供）抄録 ([http://www.city.hiroshima.jp/shakai/eiken/cyoken/happyo/hpy\\_05/hpy\\_05-noro.htm](http://www.city.hiroshima.jp/shakai/eiken/cyoken/happyo/hpy_05/hpy_05-noro.htm))
  - 21) Goller JL et al: Long-term features of noroviruses gastroenteritis in the elderly, *J Hosp Infect*, 58, 286～291(2004)
  - 22) Graham DY et al: Norwalk virus infection of volunteers: new sights based on improved assays, *J Infect Dis*, 170, 34～43(2003)
  - 23) Rockz B et al: Natural history of human Calicivirus infection: a prospective cohort study, *Clin Infect Dis*, 35, 246～253(2002)
  - 24) 岩切 章 他：ノロウイルス(NV)による食中毒事例における感染経路の究明と糞便中のNVの排泄期間，宮崎県衛生環境研究所年報，16，41～44(2004)