

ノート

感染経路が解明された *Norwalk virus* 食中毒事例

福田 伸治, 高尾 信一, 河崎 智彦^{*1}, 山本 一夫^{*2}, 住井 賢一^{*1},
正岡 亮太^{*3}, 片平 尚貴^{*4}, 島津 幸枝, 宮崎 佳都夫

An Outbreak of Acute *Norwalk Virus* Gastroenteritis Traced Transmission Route

SHINJI FUKUDA, SHINICHI TAKAO, TOMOHIKO KAWASAKI^{*1}, KAZUO YAMAMOTO^{*2}, KEN-ICHI SUMII^{*1},
RYOTA MASAOKA^{*3}, NAOTAKA KATAHIRA^{*4}, YUKIE SHIMAZU, and KAZUO MIYAZAKI

(Received Sep. 30, 2002)

We traced the transmission route in an outbreak of acute *Norwalk virus* (NV) gastroenteritis occurred on December 4, 2000. In this case, it was strongly suggested that NV was transmitted from food handler's feces to patients through food handler's hands and cooked foods because the same sequenced NV strains were detected from patient's feces, food handler's feces, swab of his hands, and cooked foods such as horse mackerel fry and shaomai.

Key words: *Norwalk virus*, gastroenteritis, outbreak, transmission route

緒 言

冬季に多発する胃腸炎の原因ウイルスの一つである *Norwalk virus* [1] は培養ができないウイルスであることから, その検出は主にRT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) により行われている。しかし, 糞便材料以外からのNVの検出は非常に困難であり, 感染経路を特定できない事例が多い [1]。今回, 著者らは検査結果から *Norwalk virus* の感染経路が解明できた事例を経験したので報告する。

事件の概要

2000年12月6日, 県北の開業医からT中学校生徒および教職員に多数の食中毒様症状を呈する患者を診察した旨の連絡が所轄保健所になされた。調査の結果, 患者は共通して12月4日および5日に仕出し弁当屋が調整した

昼食弁当を喫食していることが判明した。本事例は摂食者数が257名, 患者数89名で, その発症率は32.4%であった。患者の初発症状は下痢3.4%, 腹痛46.6%, 発熱1.1%, 頭痛5.7%, 嘔吐8.0%, 嘔気31.8%, その他3.4%であり, 当初ウイルスによる感染が強く疑われた。

材料および方法

1 検査供試検体数

検査には患者便54検体, 調理従事者便7検体, 調理従事者の手指ふき取り4検体, 食品15検体および器具ふき取り3検体の計83検体を供した。

2 検査対象ウイルス

Norwalk virus (NV), *Sapporo virus* (SV), *Astrovirus* (HAstV), *Rotavirus* (A群およびC群) および *Adenovirus* (40/41型) を対象に検査した。

*1 備北地域保健所: Hiroshima Prefectural Bihoku Regional Community Health Center
(現東広島地域保健所: Present Address, Hiroshima Prefectural Higashihiroshima Regional Community Health Center)
*2 備北地域保健所: Hiroshima Prefectural Bihoku Regional Community Health Center
*3 備北地域保健所: Hiroshima Prefectural Bihoku Regional Community Health Center
(現食肉衛生検査所: Present Address, Hiroshima Prefectural Meat Inspection Center)
*4 備北地域保健所: Hiroshima Prefectural Bihoku Regional Community Health Center
(現福祉保健部衛生・被爆者総室薬務室: Present Address, Pharmaceutical Office, Sanitation and Atomic Bomb Victims Management Office, Welfare and Health Affairs Department, Hiroshima Prefectural Government)

3 検査方法

(1) 材料の前処理

糞便はPBSで10%乳剤を作成し、フルオロカーボン処理後に2,500rpm、30分間遠心分離した上清をRNA抽出に用いた。

食品材料は3倍量のPBSを加えて乳剤とし、その10mlを2,500rpm、30分間遠心分離した後に、上清をフルオロカーボン処理した。そして、ポリエチレングリコール6,000(最終濃度8%)を加え、4℃、1夜静置後、3,000rpm、30分間遠心分離した沈殿物を500μlの蒸留水に再浮遊し、RNA抽出に用いた。

5~10mlのふき取り材料はポリエチレングリコール6,000を加え、食品と同様に処理してRNA抽出に用いた。

(2) RT-PCR (NV, SV, HAstV)

RNAの抽出はTrizol LS試薬 (Invitrogen) により行った。抽出したRNAからReverTra Ace (TOYOBO) を用いて、37℃10分間、42℃60分間、99℃5分間逆転写反応を行いcDNAを作成した。そのcDNAをテンプレートとして、94℃3分間の熱変性後、94℃1分間、48℃1分間、72℃1分間を40サイクル行い、72℃で15分間反応させて1st PCRを行った。さらに、NVはPCR産物をテンプレートとして前述と同一の条件で2nd PCRを行った。NVにはNV35/36、NV81/NV82, SM82およびMR4/3, Yuri52R/F、Yuri22R/Fの2系統のプライマーセット [2] を、SVにはJV33/SR80プライマーを [3]、HAstVにはAC230/AC1'プライマーを [4] 用いた。

(3) ハイブリダイゼーション

PCR産物を電気泳動した後に目的のバンドが認められた検体については、ドットプロットハイブリダイゼーション [5] を行い、目的遺伝子が増幅されていることを確認した。NVにはFukudaら [6] のプローブセットを、SVにはSAP, LON, PARおよびSTOプローブを [3]、HAstVにはAComプローブ [4] をそれぞれ用いた。さらに、NVはFukudaら [6] の8型別プローブセットを用いてマイクロプレートハイブリダイゼーションにより型別を行った。これらのプローブはジゴキシゲニン標識プローブとして用いた。

(4) PCR産物をプローブとしたハイブリダイゼーション

1名の患者便から検出された遺伝子からPCR DIG プローブ合成キット (Roche Molecular Biochemicals) を用いてジゴキシゲニン標識プローブを作成し、ドットプロットハイブリダイゼーションにより他検体から検出した遺伝子と反応させた。

(5) 系統解析

PCR産物についてダイターミネーター法によるダイレ

クトシーケンスを行って塩基配列を決定した後、Neighbor-Joining法 (CLUSTAL Wプログラム) [7] により系統解析を行い系統樹を作成した。

(6) Rotavirus (A群およびC群), Adenovirus 40/41型の検出
ロタクロン (TFB), アデノクロンE (TFB) およびC群ロタクウイルス検出用試薬 (デンカ生研) を用いて行った。

結 果

83検体について検査した結果、36検体からNVが検出されたが、SV, HAstV, Rotavirus および Adenovirus は検出されなかった。検出されたNVは遺伝子型に属するウイルスでFukudaら [6] のG2Eプローブ型であった。

1 検体別検出状況

Table 1に示したように、NVは患者便31検体 (検出率57.4%)、調理従事者便2検体 (28.6%)、調理従事者の手指ふき取り1検体 (25.0%) および食品2検体 (13.3%) から検出された。手指ふき取りからNVが検出された調理従事者は、その便からもNVが検出された。NVが検出された食品はアジフライ (調理品) およびシューマイ (調理品) であった。12月4日には、ハヤシライス、チキン唐揚げ、たこ焼き、千切りキャベツ、みかん、牛乳およびつけものが、12月5日には、アジフライ、シューマイ、味まめ、ほうれん草のおひたし、千切りキ

Table 1. Detection of *Norwalk virus* from samples.

| Samples tested | Detection of NV No. of positives/No. of samples |
|-----------------------------------|--|
| Patient's feces | 31/54 |
| Food handler's feces | 2/7 |
| Swab of food handler's hand | 1/4 |
| Swab of cooking utensil | 0/3 |
| Food | 2/15 |
| Horse mackerel fry | |
| frozen | |
| cooked | ○ |
| Shaomai | |
| frozen | |
| cooked | ○ |
| Flavored bean | |
| Spinach | |
| Boiled spinach with ground sesame | |
| seed dressing | |
| Raw pork | |
| Octopus ball | |
| Fried chicken | |
| Box lunch delivered on December 5 | |
| Horse mackerel fry | |
| Shaomai | |
| Boiled spinach with ground sesame | |
| seed dressing | |
| Flavored bean | |
| Julienne cabbage | |

○ indicates positive.

ヤベツ, ごはんおよび牛乳が提供されていたが, ²検定では, 4日のハヤシライス, チキン唐揚げ, 5日のほうれん草のおひたしに有意差($p < 0.05$)が認められた.

²検定および検査結果から両日に渡り原因と考えられる食材が存在しており, 患者発生も二峰性を示していた. すべての食材が検査に供されていないが, ²検定結果と検査結果は一致しなかった.

2 PCR産物をプローブとしたハイブリダイゼーション
患者便から検出したNV遺伝子をプローブにしてハイブリダイゼーションを行った結果をFig. 1に示した. 用いた36NV遺伝子はすべてプローブと強く反応した.

3 系統解析

RNAポリメラーゼ領域の267bpにおける系統樹をFig. 2に示した. 患者便, 調理従事者便, 調理従事者手指ふき取り, アジフライ(調理品)およびシューマイ(調理品)から検出した5株とも同一の塩基配列を示し, 標準株であるTorontoと95.8%の相同性を示した.

考 察

NVの感染様式は カキなどの貝類の生食, 調理従事者の糞便に存在するNVが手指を介して汚染した食品の摂取, ヒトからヒトへの感染などが考えられる. しかし, 食品等に混入しているNV量が極端に少ないため, 感染源や感染経路を特定することは非常に困難な状況にある[8]. 本事例ではハイブリダイゼーションおよび系統解析を試みた結果 調理従事者便および手指ふき取り, 調理済み食品, 患者便から検出されたNVが遺伝子学的にすべて同一の株であることが確認された. NVはヒトが唯一の感染動物であり[8], 食品中では増殖しないことから, 本事例では, 調理従事者便 手指 食品 摂食者へとNVが伝播したことを強く示唆する結果が得られた. また, 同一の食材においても調理品からのみNVが検出されたことは, ヒトによる汚染を裏付けるものであると考えられる. 今回, ²検定の結果とウイルス検査の結果が必ずしも一致しなかったものの, NVの検出結果は調理従事者の保有するNVが広く食材を汚染して摂食者に感染したことを明確に示すものであると考えられる. さらに, 本事例では患者発生が二峰性を示しており, 2日間に渡り食材が汚染されていたことも否定できない.

食品等に存在するNV量が少ないことから, その検出には困難を伴っているが, 現在磁気ビーズを用いた検査法が開発されつつある[9]. この方法が確立されると, NVの感染経路がより明確になるものと思慮される. 本事例のように, 系統立って検体が確保される事例は少なく, 感染経路を究明する方策の一つとしては, 広く検体

を確保することが重要と考えられる.

まとめ

今回, NVの感染経路が解明できた事例を経験した. この事例では患者便, 調理従事者便, 手指ふき取りおよび調理済み食品から遺伝子学的に同一のNVが検出され, 調理従事者便 手指 食品 摂食者へと伝播したことが強く示唆された.

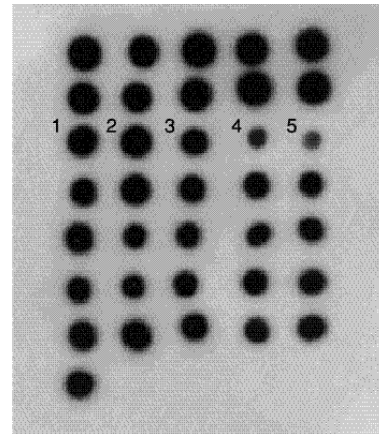


Fig. 1. Result of dot blot hybridization. 1 and 2, food handler's feces; 3, swab of food handler's hand; 4, horse mackerel fry (cooked); 5; food samples; others, patient's feces.

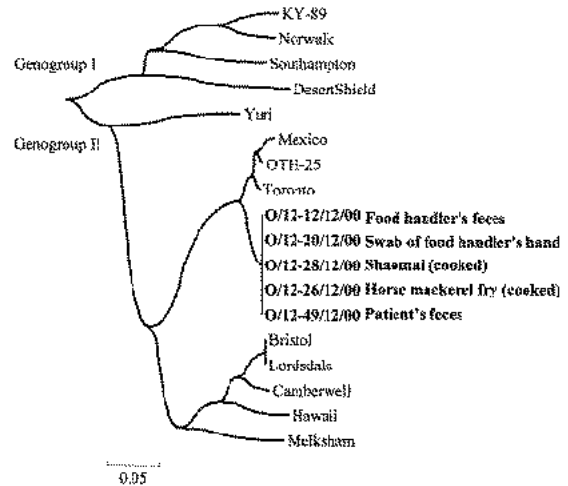


Fig. 2. Phylogenetic tree of 5 amplicons. Phylogenetic analysis was performed using Neighbor-Joining method (CLUSTAL W program)[7], using 267 base nucleotide sequences from the RNA polymerase region. The calibration bar shows 5% divergence. GenBank accession numbers for 13 reference strains are as follows: KY-89, L23828; Norwalk, M87661; Southampton, L07418; Desert Shield, U04469; Yuri, AB009876; Mexico, U22498; OTH-25, L23830; Toronto, U02030; Bristol, X76716; Lordsdale, X86557; Camberwell, AF145896; Hawaii, U07611; Melksham, X81879.

文 献

- [1] Inoue S., Yamashita S. et al. (2000): Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: Pediatric case and outbreak incidents. *J. Infect. Dis.*, 181 (Suppl. 2), S270-S274.
- [2] Saito H., Saito S. et al. (1998): Application of RT-PCR designed from the sequence of the local SRSV strain to the screening in viral gastroenteritis outbreaks. *Microbiol. Immunol.*, 42, 439-446.
- [3] Vinje J., Deijl, H. et al. (2000): Molecular detection and epidemiology of Sapporo-like viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 530-536.
- [4] Sakon N., Yamazaki K. et al. (2000): Genomic characterization of human astrovirus type 6 Katano virus and the establishment of a rapid and effective reverse transcription-polymerase chain reaction to detect all serotypes of human astrovirus. *J. Med. Virol.*, 61, 125-131.
- [5] Levett P. N., Gu M. et al. (1996) : Longitudinal study of molecular epidemiology of small round structured viruses in a pediatric population. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 1497-1501.
- [6] Fukuda S., Takao S. et al. (2002): An application of microplate hybridization assay for the confirmation and probe typing of " Norwalk-like viruses " . *Microbiol. Immunol.*, 46, 495-498.
- [7] Thompson J. D., Higgins D. G. et al. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673-4680.
- [8] 武田直和, 名取克郎ほか (1999) : ヒトカリシウイルス感染による急性胃腸炎, *モダンメディア*45, 169-179 .
- [9] 小林慎一, 榮 賢司ほか (2001) : 磁気ビーズを利用したRT-PCRによる食品からのノーウォークウイルスの検出, 第49回日本ウイルス学会学術集会抄録集 (大阪), p84 .