

都内における胃腸炎集団発生例のウイルス検索（平成19 - 20年度）

永野 美由紀, 林 志直, 秋場 哲哉, 森 功次, 田中 達也, 保坂 三継, 甲斐 明美

Genetic Epidemiology of Viral Gastroenteritis Outbreaks in Tokyo, Apr. 2007 - Mar. 2009

Miyuki NAGANO, Yukinao HAYASHI, Tetsuya AKIBA, Kohji MORI, Tatsuya TANAKA,
Mitsugu HOSAKA and Akemi KAI

都内における胃腸炎集団発生例のウイルス検索（平成19 - 20年度）

永野 美由紀*, 林 志直*, 秋場 哲哉*, 森 功次*, 田中 達也*, 保坂 三継*, 甲斐 明美**

平成19年度と20年度に都内で確認された胃腸炎集団発生例1,364事例において、ノロウイルス等の胃腸炎起因ウイルスの検索を行った。その結果、1,364事例中693事例（50.8%）からウイルスが検出され、ノロウイルスが大多数を占めていた。発生施設別に比較すると、低年齢層が利用する施設において、ロタウイルス等の単独事例や混合事例が比較的多く確認された。ノロウイルスの遺伝子型は、平成19年度はGII/4型が主流であったのに対し、平成20年度はGII/4型に加えてGII/3型やGII/6型も流行した。

キーワード：ノロウイルス、食中毒、感染性胃腸炎、集団発生、遺伝子疫学

はじめに

ウイルス性の食中毒および感染性胃腸炎は、冬季から春先を中心に発生し、腹痛や下痢、嘔吐、発熱を引き起こす。主な病原ウイルスとして、ノロウイルス (*Norovirus*, NV) やサポウイルス (*Sapovirus*, SaV)、ロタウイルス (*Rotavirus*, RV)、アストロウイルス (*Astrovirus*, AstV) などが挙げられる。

ウイルス性食中毒は、平成9年に「小型球形ウイルス」および「その他のウイルス」として、食品衛生法の食中毒原因物質に加えられた。また、平成15年には「小型球形ウイルス」を「ノロウイルス」と変更した。近年、特にNVによる食中毒の報告数は増加傾向にある。厚生労働省の食中毒統計資料によると、原因物質別の食中毒発生件数では、平成16年度以降は事件数で第2位（平成18年度は第1位）、患者数で第1位となっている¹⁾。NV食中毒の原因は、NVが蓄積したカキ等の二枚貝を生あるいは加熱不十分で喫食した事例と、NVに感染した調理従事者により汚染された食品を喫食した事例が挙げられる。現在は、後者によるNV食中毒が過半数を占めている。また、NVは食中毒だけではなく、高齢者福祉施設や幼稚園、学校等における感染性胃腸炎の原因としても挙げられる²⁾。

SaV, RVおよびAstVは、乳幼児下痢症の主要な病原ウイルスである。RVはA群 (ARV) の検出頻度が最も多く、生後6ヶ月から2歳の乳幼児を中心に胃腸炎を引き起こす。C群 (CRV) は年長児や成人からの報告事例があるが、比較的少数である。

今回、平成19年度から20年度の2年間に東京都内で発生した胃腸炎集団発生例において、胃腸炎起因ウイルスの検索と、検出されたNVの遺伝子解析を行ったので、その疫学的な特徴を報告する。

材料と方法

1. 検査材料

平成19年4月から平成21年3月までに、都内で報告された

胃腸炎集団発生1,364事例（平成19年度630事例、平成20年度734事例）について、当センターへ搬入された糞便および食品検体12,012件（19年度5,877件、平成20年度6,135件）を検査材料とした。

2. 検査方法

1) 検査材料の前処理

材料はPBS (-) (pH7.4: 日水製薬) を用いて10%乳剤に調整し、激しく攪拌した後、3,000 rpm, 10分 (HITACHI himac CF8DL) の遠心を行った。その上清を4°C, 10,000 rpm, 20分 (HITACHI himac CR21E) の条件で遠心し、上清にポリエチレングリコール6000 (和光純薬) を8%, NaCl (ナカライテスク) を0.4 Mになるように加えて軽く攪拌し、4°Cで一晩静置した。静置後は、4°C, 10,000 rpm, 20分の遠心を行い、沈渣を400 μLのTN緩衝液 (0.01M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 5 μM MgCl₂, pH7.5) で再浮遊し、核酸抽出材料とした。

2) 核酸抽出

核酸の抽出は、CTAB法³⁾により行った。核酸抽出材料100 μLに20 mg/mL proteinase K (和光純薬) 5 μL と3× proteinase K Buffer 50 μLを加えて混和し、37°C, 15分間の処理を行った。加温処理の後、4 M NaClと10% Cetyl trimethyl ammonium bromide (ナカライテスク) を各50 μLずつ加えて混和し、56°C, 15分間の処理を行った。加温の後、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1) (ナカライテスク) を200 μL添加し、混和して4°C, 14,000 rpm, 15分 (HITACHI himac CF15RX) で遠心分離し、水層全量を回収した。回収液と20 mg/mL Glycogen (Roshe) 1 μL, 3 M NaOAc (和光純薬) 20 μL, 99.5% Ethanol (和光純薬) 600 μL を混和し、-80°Cで1時間静置した。静置の後、4°C, 14,000 rpm, 25分の遠心を行い、沈渣を蒸留水 50 μLで浮遊し、核酸抽出液とした。

3) cDNA合成

核酸抽出液 12 μLを、5×First Strand Buffer (invitrogen)

* 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

** 東京都健康安全研究センター微生物部

6 μ L, 2.5 mM dNTPs (TaKaRa) 1.5 μ L, Random hexamer (Amersham Biosciences) 0.75 μ L, 100 mM Dithiothreitol (Invitrogen) 1.5 μ L, 40 U/ μ L RNase inhibitor (ナカライテスク) 1 μ L, 逆転写酵素 Super Script II (Invitrogen) 1.5 μ L, および蒸留水 5.75 μ L を用いて, 42°C, 60分間の逆転写反応を行い, cDNAを合成した.

4) ノロウイルスの検索

(1) ノロウイルス遺伝子の検出

NV遺伝子の検出は, 厚生労働省の通知法⁴⁾に基づいて行った. すなわち, 合成したcDNA 5 μ L を鋳型とし, 2 \times Mastermix (Roche) 12.5 μ L, プライマー各 0.2 μ L, プローブ 0.3 μ L, および蒸留水 6.8 μ L を用いて, ABIPRISM7900 (Applied Biosystems) によりリアルタイムPCRを行った. プライマーおよびプローブは, GI 検出用にはCOG1F/COG1R (100 pmol/ μ L), RING1-TP (a) (30 pmol/ μ L), GII 検出用にはCOG2F/COG2R (100 pmol/ μ L), RING2-TP (10 pmol/ μ L) を用い, PCRは, 50°C2分間, 95°C10分間の後, 94°C15秒間, 56°C1分間のサイクルを40回行った.

(2) ノロウイルス遺伝子の解析

上記の方法により, NV陽性と判定した検体について, 遺伝子解析を行った. COG1F/G1SKR および COG2F/G2SKR の領域を対象としたRT-PCRを行い, PCR産物をMontage-PCR (Millipore) を用いて精製し, Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequence Kit (ABI) によるシークエンス反応を行った. 反応産物を, Centri Sep Spin Columns (ABI) を用いて精製し, ABI PRISMTM Genetic Analyzer (ABI) により塩基配列解析を行った. 遺伝子解析は, Genetix version 7 を用いた. 遺伝子型の分類は, 国立感染症研究所の病原微生物検出情報⁵⁾の記載に準じて決定した.

5) その他の胃腸炎起因ウイルスの検索

その他の胃腸炎起因ウイルスについては, 必要に応じて

検索を行った. SaVは, Oka らの方法⁶⁾によるリアルタイムPCR法により検査を行った. ARVはラピッドテスト ロタアデノ (SEKISUI) を用いた酵素抗体法, CRVはC群ロタウイルス検出用試薬 (デンカ生研) を用いたR-PHA法, AstVについては, Amplified IDEIA Astrovirus キット (DAKO) を用いた酵素抗体法により検査を行った. 各市販キットの操作手順は, 添付の説明書に従った.

結果及び考察

1. 胃腸炎集団発生例におけるウイルス検出状況

ウイルス検索の結果, 平成19年度は630事例中337事例 (53.5%), 平成20年度は734事例中356事例 (48.5%), 合計1,364事例中693事例 (50.8%) から胃腸炎起因ウイルスが検出された (表1). その内訳はNVが大多数を占め, 2年間でウイルスが検出された693事例中655事例 (94.5%) から検出された. NVが検出された655事例の中で, GI単独が75事例 (10.8%), GII単独が528事例 (76.2%), GI+GIIの混合事例が40事例 (5.8%), GI+ARVが1事例 (0.1%), GI+GII+SaVが4事例 (0.6%), GI+GII+ARVが1事例 (0.1%), GII+SaVが3事例 (0.4%), GII+SaV+AstVが1事例 (0.1%), GII+ARVが2事例 (0.3%) から検出された. その他のウイルスの単独事例の検出状況は, SaVが23事例 (3.3%), ARVが10事例 (1.4%), CRVが5事例 (0.7%) であった.

月別の比較では, 冬季における検体数の増加に伴い, ウイルス陽性事例も冬季に増加した. また, GI+GIIの混合事例が, 16-17年度の報告⁷⁾に対して, 増加傾向にあった. GI+GIIの混合事例の原因としては, カキ等の二枚貝の喫食による食中毒が最も疑われることから, 二枚貝のウイルス汚染監視を行うことの必要性が示唆された.

表1. 平成19-20年度の胃腸炎集団発生におけるウイルス検出状況

| | 平成19年度 | | | | | 平成20年度 | | | | | 合計 |
|--------------|--------|------|--------|------|-----|--------|------|--------|------|-----|------|
| | 4-6月 | 7-9月 | 10-12月 | 1-3月 | 合計 | 4-6月 | 7-9月 | 10-12月 | 1-3月 | 合計 | |
| 集団発生事例数 | 110 | 80 | 154 | 286 | 630 | 164 | 121 | 253 | 196 | 734 | 1364 |
| GI | 1 | 1 | 1 | 20 | 23 | 17 | 1 | 11 | 23 | 52 | 75 |
| GI | 31 | 4 | 98 | 119 | 252 | 28 | 8 | 125 | 115 | 276 | 528 |
| SaV | 1 | 3 | 3 | 8 | 15 | 3 | | 2 | 3 | 8 | 23 |
| ARV | 1 | 1 | | 8 | 10 | | | | | | 10 |
| CRV | 1 | | | 2 | 3 | 2 | | | | 2 | 5 |
| 陽性事例数 | 1 | | 2 | 23 | 26 | 4 | 1 | 3 | 6 | 14 | 40 |
| GI+ARV | | | | 1 | 1 | | | | | | 1 |
| GI+GII+SaV | | | | 2 | 2 | 1 | | | 1 | 2 | 4 |
| GI+GII+ARV | | | | 1 | 1 | | | | | | 1 |
| GII+SaV | | | 2 | 1 | 3 | | | | | | 3 |
| GII+SaV+AstV | | | | | | 1 | | | | 1 | 1 |
| GII+ARV | | | | 1 | 1 | 1 | | | | 1 | 2 |
| 合計 | 36 | 9 | 106 | 186 | 337 | 57 | 10 | 141 | 148 | 356 | 693 |

表2. 発生施設別のウイルス検出状況（平成19-20年度）

| | 飲食店 | 保・幼・小 | 家庭内 | 高齢福祉 | 会食・弁当 | 宿泊施設 | 病院 | 中・大・職 | 合計 |
|--------------|-----|-------|-----|------|-------|------|----|-------|------|
| 集団発生事例数 | 490 | 184 | 338 | 92 | 111 | 107 | 19 | 23 | 1364 |
| GI | 26 | 20 | 11 | 2 | 6 | 9 | | 1 | 75 |
| GII | 132 | 109 | 79 | 84 | 56 | 39 | 17 | 12 | 528 |
| SaV | 2 | 5 | 11 | 2 | 1 | 2 | | | 23 |
| ARV | 1 | 8 | 1 | | | | | | 10 |
| CRV | | 5 | | | | | | | 5 |
| 陽性事例数 | | | | | | | | | |
| GI+GII | 19 | 8 | 6 | 1 | 2 | 3 | | 1 | 40 |
| GI+ARV | | 1 | | | | | | | 1 |
| GI+GII+SaV | 3 | 1 | | | | | | | 4 |
| GI+GII+ARV | | 1 | | | | | | | 1 |
| GII+SaV | 1 | 2 | | | | | | | 3 |
| GII+SaV+AstV | | 1 | | | | | | | 1 |
| GII+ARV | | 1 | | | | 1 | | | 2 |
| 合計 | 184 | 162 | 108 | 89 | 65 | 54 | 17 | 14 | 693 |

2. 発生施設別のウイルス検索

2年間の胃腸炎集団発生事例1364事例を施設別に分類した（表2）。ウイルス陽性事例693事例の内訳は、飲食店が最も多く184事例（26.6%）、次いで保育園・幼稚園・小学校で162事例（23.4%）、家庭内で108事例（15.6%）、高齢者福祉施設で89事例（12.8%）、会食料理・弁当で65事例（9.4%）、宿泊施設で54事例（7.8%）、病院で17事例（2.5%）、中学・高校・大学・職場で14事例（2.0%）であった。

ウイルス陽性率が最も高かったのは、高齢者福祉施設で92事例中89事例（96.7%）、次いで病院の19事例中17事例（89.5%）、保育園・幼稚園・小学校が184事例中162事例（88.0%）、中学・高校・大学・職場が23事例中14事例（60.9%）、会食・弁当が111事例中65事例（58.6%）、宿泊施設で107事例中54事例（50.5%）、飲食店が490事例中184事例（37.6%）、家庭内が338事例中108事例（32.0%）の順であった。

各施設において、GII単独事例が大多数を占めており、病院では17事例全て、高齢者福祉施設では89事例中84事例（94.4%）が、GII単独事例であった。一方、保育園・幼稚園・小学校では、162事例中109事例（67.3%）がGII単独であったが、他のウイルスによる単独事例や、混合事例も確認された。以上の結果より、低年齢層における胃腸炎集団発生のウイルス検索の際には、RV等のNV以外のウイルス

についても幅広く行う必要があることが示唆された。

3. ノロウイルスの遺伝子解析

NVが検出された655事例中453事例について、塩基配列を決定し、遺伝子解析を行った。遺伝子型は、GI/1, 3, 4, 8, 11, 14, GII/1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 17, 19の合計18型に分類された（表3）。内訳は、GII/4型が最も多く、453事例中267事例（58.9%）から検出された。また、平成19年度の流行期（平成19年10月から平成20年3月）は、GII/4型が153事例中120事例（78.4%）を占め、流行期にGII/4型が主流となる例年通りの傾向を示した⁸⁾。一方、平成20年度の同時期は、GII/4型が208事例中115事例（55.3%）、GII/6型が28事例（13.5%）、GII/3型が27事例（13.0%）、GI/4型が18事例（8.7%）と、他の遺伝子型の増加もみられた。

発生施設別に遺伝子型を比較したところ、ほとんどの施設でGII/4型が大多数を占めていた（表4）。特に、高齢者福祉施設では76事例中64事例（84.2%）がGII/4型であり、過去の報告と同様の傾向を示した。一方、保育園・幼稚園・小学校では、GII/4型と同様にGII/3型やGII/6型、GII/13型も多く確認された。

表3. 平成19-20年度におけるノロウイルスの遺伝子型

| CapSid遺伝子型 | GI/1 | GI/3 | GI/4 | GI/8 | GI/11 | GI/14 | GII/1 | GII/2 | GII/3 | GII/4 | GII/6 | GII/7 | GII/9 | GII/10 | GII/12 | GII/13 | GII/17 | GII/19 | 合計 |
|------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|
| 平成19年度 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4-6月 | | 1 | | 1 | | | 1 | 2 | | 18 | 1 | | 2 | | | 6 | | | 32 |
| 7-9月 | | | 1 | | | | | | | 1 | | | | | | 2 | 1 | | 5 |
| 10-12月 | | | | 2 | | | | | | 60 | | | | 1 | | 2 | | 1 | 66 |
| 1-3月 | | | 7 | | | | | 5 | | 60 | | | | | | 15 | | | 87 |
| 平成20年度 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4-6月 | | 3 | 11 | | | | | 5 | 3 | 8 | 2 | | 2 | 1 | | 7 | | | 42 |
| 7-9月 | | | | | 2 | | | | 2 | 5 | 1 | | | | | | | | 10 |
| 10-12月 | | 3 | 6 | | | 1 | | 1 | 26 | 52 | 19 | 1 | | | | | | | 109 |
| 1-3月 | 3 | 2 | 12 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 63 | 9 | | | | 8 | 1 | | | 99 |
| 合計 | 3 | 9 | 37 | 4 | 3 | 1 | 1 | 14 | 32 | 267 | 32 | 1 | 4 | 2 | 8 | 33 | 1 | 1 | 453 |

表4. 発生施設別のノロウイルスの遺伝子型 (平成19-20年度)

| Capsid遺伝子型 | GI/1 | GI/3 | GI/4 | GI/8 | GI/11 | GI/14 | GII/1 | GII/2 | GII/3 | GII/4 | GII/6 | GII/7 | GII/9 | GII/10 | GII/12 | GII/13 | GII/17 | GII/19 | 合計 |
|------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|
| 飲食店 | 2 | 4 | 11 | 3 | 1 | | 1 | 3 | 6 | 64 | 6 | 1 | 2 | | 6 | 6 | | | 116 |
| 保・幼・小 | | 2 | 13 | | | 1 | | 2 | 17 | 31 | 20 | | 1 | | | 18 | | | 105 |
| 家庭内 | | 1 | 5 | 1 | 2 | | | 2 | 3 | 31 | 1 | | 1 | 1 | 1 | 3 | | | 52 |
| 高齢福祉 | | | 1 | | | | | 7 | | 64 | 3 | | | | | | 1 | | 76 |
| 会食・弁当 | | | 3 | | | | | | 2 | 39 | 1 | | | | 1 | 1 | | 1 | 47 |
| 宿泊施設 | 1 | 1 | 3 | | | | | | | 18 | 1 | | | 1 | | 1 | | | 26 |
| 病院 | | | | | | | | | 3 | 14 | | | | | | | | | 17 |
| 中・大・職 | | 1 | 1 | | | | | | 1 | 6 | | | | | | | 4 | | 13 |
| 合計 | 3 | 9 | 37 | 4 | 3 | 1 | 1 | 14 | 32 | 267 | 32 | 1 | 4 | 2 | 8 | 33 | 1 | 1 | 453 |

ま と め

平成19-20年度において、東京都内で発生した胃腸炎集団発生例のウイルス検索を行った。

- 1,364事例中693事例 (50.8%) から胃腸炎起因ウイルスが検出され、内訳はNVが大多数を占めていた。
- 低年齢層が利用する施設では、RVや数種類のウイルスによる混合事例も比較的多く確認されたことから、低年齢層におけるウイルス検索を行う際には、NV以外のウイルスについても幅広く実施する必要がある。
- 検出されたNVの遺伝子型は、GII/4型が主流であったが、平成20年度の冬季においては、GII/4型と共にGI/4型やGII/3型、GII/6型も流行した。

文 献

- 1) 厚生労働省：食中毒統計資料
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/index.html> (2009年8月10日現在、なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 2) 東京都感染症情報センター：感染性胃腸炎 (ノロウイルスを中心に)
<http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/diseases/gastro/index.html>
 (2009年8月10日現在、なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 3) Jiang, X., J., Wang, and M, K., Estes. : *Journal of Clinical Microbiology*, **30**, 2529-2534, 1992.
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：食安監発第1105001号、ノロウイルスの検査法について、2003.
- 5) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報
<http://idsc.nih.go.jp/pathogen/refer/graph/norofig1.gif>
 (2009年8月10日現在、なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 6) Oka, T., Katayama, K., Grant, S. Hansman, *et al.* : *Journal of Medical Virology*, **78**, 1347-1353, 2006.
- 7) 林志直, 森 功次, 野口 やよい, 他：東京健安研七
 年報, **57**, 83-86, 2006.
- 8) 東京都微生物検査情報, **28-9**, 2007.

Genetic Epidemiology of Viral Gastroenteritis Outbreaks in Tokyo, Apr. 2007 - Mar. 2009

Miyuki NAGANO*, Yukinao HAYASHI*, Tetsuya AKIBA*, Kohji MORI*, Tatsuya TANAKA*,
Mitsugu HOSAKA* and Akemi KAI*

We conducted a survey of gastroenteritis-causing viruses, such as *Norovirus* (NV), in 1,364 cases of gastroenteritis outbreaks in Tokyo between Apr. 2007 and Mar. 2009. Viruses were detected from 693 patients (50.8%), and NV was found to be the predominant agent. It was shown that outbreaks in the facilities for young children were caused by *Rotavirus* as a single agent and also by multiple viral agents. Although GII/4 was predominant between Apr. 2007 and Mar. 2008, GII/3 and GII/6 were subsequently detected as subdominant types between Apr. 2008 and Mar. 2009.

Keywords: *Norovirus*, food poisoning, infectious gastroenteritis, outbreak, genetic epidemiology

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan