

## 都内におけるノーウォーク様ウイルスに起因した 胃腸炎集団事例の発生状況 (1997年11月～2000年3月)

林志直, 森功次, 野口やよい, 佐々木由紀子,  
中村敦子, 長島真美, 吉田靖子, 平田一郎,  
関根大正, 諸角聖

### Outbreaks of Gastroenteritis Associated with Norwalk-like Viruses Occurred in Tokyo(1997.11-2000.3)

YUKINAO HAYASHI, KOHJI MORI, YAYOI NOGUCHI, YUKIKO SASAKI,  
ATSUKO NAKAMURA, MAMI NAGASHIMA, YASUKO YOSHIDA, ICHIRO HIRATA,  
HIROMASA SEKINE and SATOSHI MOROZUMI

In May 1997, the Ministry of Health and Welfare regarded Norwalk-like viruses(NLVs) as the causative agents of a gastroenteritis outbreak. According to the change in the Food Sanitation Law which added NLVs as causative agents, we started to diagnose NLVs infection by two steps in the Tokyo Metropolitan Area. RT-PCR for screening and dot-blot hybridization for confirmatory test of NLVs infection. Between November 1997 and March 2000, 5124 samples from 413 outbreaks of gastroenteritis were tested as viral causative agents. Of these, 1465 samples(28.6%) from 247 outbreaks(59.8%) were positive for NLVs.

Recently, the number of gastroenteritis outbreaks occurring in nursing schools, kindergardens, elementary schools, and nursing homes for elderly persons have increased. Contaminated shellfish, most important vehicle of NLVs-related outbreak of gastroenteritis, were not served in these cases. In most of these cases, there were signs of person-to-person spread of infection rather than food-poisoning. The importance of virological testing during outbreaks of gastroenteritis will increase in the future to determine if the outbreaks were caused by food poisoning.

**Keywords:** ノーウォーク様ウイルス Norwalk-like viruses, 胃腸炎 gastroenteritis, 集団発生 outbreak, 遺伝子型 genotype

### はじめに

ノーウォーク様ウイルス(Norwalk-like viruses:NLVs)は冬季に多発するウイルス性食中毒, 乳幼児や小児の急性胃腸炎の原因ウイルスであり, 1968年10月に米国オハイオ州の小学校における胃腸炎集団発生から検出された Norwalk virus (NV) が最初の報告例<sup>1)</sup>である. 1990年にNVの全遺伝子配列<sup>2)</sup>が明らかとなり, これを契機としてNLVsの検査法は電子顕微鏡法からRT-PCR法が主体となっていった. RT-PCR法の普及に伴い, 冬季に多発する原因不明の食中毒や胃腸炎の主要病原体はNLVs

であることが明らかとなった. 厚生省はこのような状況をふまえ, 1997年5月に食品衛生法の改正を行い, 食中毒原因物質にNLVsを始めとする胃腸炎起因ウイルスを加えた. 東京都においては, 1997年11月よりRT-PCR法とドットプロットハイブリダイゼーションによるNLVs検査体制を整え, ウイルス性食中毒事件に対応してきた<sup>3)</sup>. 本報では, 2000年3月まで3回のNLVs流行期における検査成績を総括し, 検出ウイルスの遺伝子型についても考察を行った.

\* 東京都立衛生研究所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

\* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

\* \* 同微生物部

## 材料と方法

### (1) 検査材料

1997年11月から2000年3月までに、都内で発生した急性胃腸炎集団事例413事件から検査材料5124件を採取し、原因ウイルスの検索を行った。検査材料のうち糞便は患者から2908件、非発症者から515件、調理従事者から1075件、食品材料は626件が得られた。さらに、検査期間中に発生した急性胃腸炎集団事例の発生施設、原因食中にカキが存在するかの有無を調査した。

また、1999年4月から2000年3月の間にNLVsが検出された61事例のNLVs分離株については遺伝子型別を実施した。

### (2) 糞便材料の調製

操作の概要は既報<sup>3)</sup>に準じて行った。糞便材料はリン緩衝液 (pH7.3) を用いて10%乳剤を調製し、等量のHCFC-141b (ダイキン工業) を混合し夾雑物を除去した。1,500×g 10分の冷却遠心 (トミー精工 R L 603) により水相を分取し、更に3,000×g 30分の冷却遠心 (日立工機CR20) を行い再び水相を回収した。100,000×g 3時間4分の超遠心 (日立工機CP80) により沈渣を得て、0.01Mトリス塩酸-0.15MNaCl緩衝液pH7.5に浮遊し検査材料とした。

### (3) 食品材料の調製

カキ等の二枚貝からの材料調製は、厚生省通達に準拠して材料の中腸腺、消化網嚢等を用いて行った。磷酸緩衝液を用いて10%乳剤をストマッカ - (ELMEX SH001) で調製し、HCFC処理から以後の操作は糞便材料と同様に行った。その他の食品材料についてもストマッカ - に

より乳剤調製を行った後、糞便材料と同様に行った。水の材料は、陽イオン負荷フィルタ - (AMF CUNO VIROSORB) で濾過した後、ホウ酸緩衝液 (pH9.5) により溶出を行った。続いてHCFC処理を行い、以後の操作は糞便材料と同様に行った。

### (4) 核酸の抽出

ウイルス核酸の抽出はJiangらの方法<sup>1)</sup>に準じてCTAB法により行った。試薬類と操作の一覧をFig.1に示した。プロテイナーゼK消化、CTAB処理、フェノール抽出、エタノール沈殿によりRNA試料を得た。

### (5) RT-PCR法

RT-PCR法に用いたプライマーをTable 1に示した。RT-PCR法はFig.2に示すようにJiangらの方法を一部改変して行った。検出感度を向上させるために逆転写反応、1st-PCRの後に再度2nd-PCRを行っている。2nd-PCRにおいて2000年1月からはLV82も併用した。PCR産物は2%アガロース電気泳動後に紫外線照射により検出し、470bp, 330bp, 206bpの産物が得られたときNLVs陽性を疑いハイブリダイゼーションによる確認試験を行った。

### (6) ドットプロットハイブリダイゼーション法

プローブの調製はクローン化したNLV遺伝子型とのPCR標的領域からECLランダムラベルキット (Amersham Life Science:RPN 3041) を用い、添付された方法に従ってFITC標識を行った。プローブの検出はECL検出キット (Amersham Life Science:RPN 3041) のマニュアルに従って行い、操作の概略をFig.3に示した。最終的に現像したフィルム上に、シグナルが検出された場合をNLVs陽性と判定した。

Table 1 . Sequences of primers used for RT-PCR

Primer name	Position	Polarity		Primer sequence (5'-3')						
RT										
NV35A	4944-4925	-	CTT	GTT	GGT	TTG	AGG	CCA	TA	
NV35C	4944-4924	-	CTT	GTT	GGT	TTG	AGG	CCA	TAC	
MR 4	4942-4925	-	AGT	GGG	TTT	GAG	GCC	GTA	TT	
1st-PCR										
NV36	4475-4493	+	ATA	AAA	GTT	GGC	ATG	AAC	A	
MR 3	4473-4491	+	CCG	TCA	GAG	TGG	GTA	TGA	A	
2nd-PCR										
NV51	4878-4859	-	GTT	GAC	ATC	TCA	ACA	TCA	TC	
NV 3	4673-4692	+	GCA	CCA	TCT	GAG	ATG	GAT	GT	
NV81	4872-4853	-	ACA	ATC	TCA	TCA	TCA	CCA	TA	
NV82	4543-4560	+	TCA	TTT	TGA	TGC	AGA	TTA		
SM82	4543-4560	+	CCA	CTA	TGA	TGC	AGA	TTA		
LV82	4543-4563	+	TCA	CTA	TGA	TGC	TGA	CTA	CTC	

**Reagent**

2x proteinase K Buffer	
20mg/ml proteinase K	
10% cetyltrimethyl ammonium bromide(CTAB)	
4M NaCl	
Phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1)	
20mg/ml glycogen	
3M Sodium acetate(NaoAc)	
Ethanol	
DDW	
<b>Sample</b>	<b>100 μl</b>
2x proteinase K Buffer	100 μl
20mg/ml proteinase K	5 μl
↓ 37°C 30min	
4M NaCl	50 μl
10% CTAB	50 μl
↓ 56°C 30min	
Phenol extraction	
↓ Centrifuge 12,000rpm 10min 4°C	
Aqueous layer	250 μl
3M NaOAc	25 μl
20mg/ml glycogen	1 μl
Ethanol	650 μl
↓ -80°C 1 hr	
↓ Centrifuge 14,000rpm 30min 4°C	
Pelletete	
Pelletete air drying	
Resuspend in DDW	30 μl

Fig. 1. Extraction of viral RNA by CTAB method.

## (7) NLVsの遺伝子型解析

検出されたNLVsの遺伝子型は、Andoらのプローブ型別<sup>5)</sup>に用いた領域を(-)鎖プライマーとし、Table 1.に示したNV82, SM82, LV82と組み合わせ、PCR法により行った。PCRの方法はFig.2に示した2nd-PCRと同様に行い、281bpの産物が得られた場合に型別陽性と判定した。

**結 果**

## 1) 急性胃腸炎集団発生からの月別NLVs検出成績

1997年11月から2000年3月の間に発生した急性胃腸炎集団413事例の検査材料5124件についてNLVs検索を行い、月別のウイルス検出成績をTable2.に示した。調査期間中に検索事例数および検体数は毎年1.5~2倍程度の増加を続け、合計247事例(59.8%)の材料1465件(28.6%)からNLVsが検出された。

月別のNLVs検出数は毎年12月から3月に集中し、6月から9月にはほとんど検出されなかった。年度別には、

集団事例のNLVs陽性率は97年度が78.3%であり、98年度は59.8%、99年度は52.8%であった。また、検査材料のNLVs陽性率は97年度から順に39.8%、24.8%、26.7%であった。

## 2) 検査材料別のNLVs検出成績

検査材料別のNLVs検出状況をTable3.に示した。検査件数の年次推移は、食品材料の増加が顕著であり、毎年2倍以上の増加を示した。また、従業員由来材料も毎年徐々にではあるが増加傾向にあった。検査材料別のNLVs検出率は患者材料からの検出率が42.5%(2908例中1236例)と最も高く、次いで非発症者糞便が24.7%(515例中127例)、従業員糞便が8.1%(1075例中87例)、食品が2.4%(626例中15例)の順であった。

## 3) 原因施設別のNLVs検出成績

NLVsが検出された胃腸炎集団発生事例数をTable 4.で

**Reagent**

Reverse transcription mixture	
DDW	20.15 μl
10x RT buffer	3.0 μl
2.5mM dNTPs	4.0 μl
40U/μl RNase inhibitor	0.1 μl
AMV RTase	0.15 μl
<b>1st-PCR mixture</b>	
DDW	41.9 μl
10x PCR buffer	5.0 μl
2.5mM dNTPs	2.5 μl
50 μM primer NV36	0.2 μl
50 μM primer MR3	0.2 μl
5U/μl Taq polymerase	0.2 μl
<b>2nd-PCR mixture</b>	
DDW	37.8 μl
10x PCR buffer	5.0 μl
2.5mM dNTPs	4.0 μl
50 μM primer NV81	0.2 μl
50 μM primer NV82	0.2 μl
50 μM primer SM81	0.2 μl
50 μM primer LV81	0.2 μl
50 μM primer NV51	0.2 μl
50 μM primer NV 3	0.2 μl
5U/μl Taq polymerase	0.2 μl
<b>RNA sample</b>	<b>2.0 μl</b>
50 μM NV35A	0.2 μl
50 μM NV35C	0.2 μl
50 μM MR4	0.2 μl
↓ 70°C 10min	
↓ 4°C 5min	
RT mixture	27.4 μl
↓ 42°C 20min	
↓ 94°C 5min	
1st-PCR mixture	50.0 μl
94°C	5 min
40 cycles { 94°C	1 min
55°C	1 min
72°C	1 min
72°C	10 min
↓ store in 4°C	
1st-PCR product	2.0 μl
2nd-PCR mixture	48.0 μl
94°C	5 min
40 cycles { 94°C	1 min
55°C	1 min
72°C	1 min
72°C	10 min
↓ store in 4°C	

Fig. 2 Detection of NLV by RT-PCR

**Reagent**

20x SSC :

3M NaCl, 0.3M Sodium citrate, pH7.0

hybridization buffer : 5x SSC, 0.1% SDS,

5% dextran sulfate, liquid block (20x dilution),

100 µg/ml degenerated heterologous DNA

Washing solution after hybridization : 1x SSC, 0.1% SDS

Blocking buffer : ECL buffer, liquid block (20x dilution)

Washing solution : ECL buffer, 0.1% Tween-20

Blot on nylon membrane

↓ PCR products 4 µl, positive control 0.5 µl

Fix the DNA to the membrane using UV crosslinker 0.8Jl

↓ dry at 50°C

Hybridization buffer 0.125ml/cm<sup>2</sup>

↓ prehybridization 50°C 30min

Add probe

↓ hybridization at 50°C overnight

Washing solution after hybridization 0.25ml/cm<sup>2</sup>

↓ washing at 50°C 15min

Blocking solution

↓ room temperature 30min

Antibody reagent

↓ room temperature 30min

Washing solution

↓ room temperature 10min x 3 times

Detection reagent 1, 2 0.06ml/cm<sup>2</sup>

↓ room temperature 2min

Wrap the blots in plastic bag

Place the blots on Hyperfilm-ECL in cassette

↓ expose at room temperature 30min

Develop, determine

Fig. 3 Confirmation of NLV by dot-blot hybridization

は原因施設別に示した。過去3シーズンを通して、原因施設としては飲食店関係が185件と最も多く、次いで家庭が92件、学校・老人施設が38件、仕出し弁当が13件、ホテル等の宿泊施設が7件であった。各施設におけるNLVs検出率は、学校・老人施設が89.5% (38件中34件)と最も高率であった。その他の施設の検出率をみると飲食店関係が62.2%、家庭が48.9%、仕出し弁当が53.8%、ホテル等宿泊施設が42.9%であった。なお、都民が他府県旅行先の飲食店やホテル等で感染したと思われる事例は他府県の項目として取り扱った。その結果、3シーズンで65件発生しており、そのうちNLVsが検出されたの

Table 2. Monthly distribution of suspected foodborne outbreaks of gastroenteritis associated with NLVs in Tokyo.

Year Month	No. of outbreaks		No. of samples		
	tested	positive (%)	tested	positive (%)	
97.11	3	0 ( 0 )	69	0 ( 0 )	
12	25	20 (80.0)	224	130 (58.0)	
98. 1	28	22 (78.6)	261	145 (55.6)	
2	13	13 ( 100)	157	49 (31.2)	
3	14	10 (71.4)	281	65 (23.1)	
-----					
Sub	total	83	65 (78.3)	992	389 (39.2)
98. 4	9	4 (44.4)	160	24 (15.0)	
5	9	5 (55.6)	92	13 (14.1)	
6	3	0 ( 0 )	17	0 ( 0 )	
7	3	1 (33.3)	51	1 ( 2.0)	
8	5	0 ( 0 )	58	0 ( 0 )	
9	2	2 (100)	22	3 (13.6)	
10	2	0 ( 0 )	35	0 ( 0 )	
11	6	3 (50.0)	162	52 (32.1)	
12	26	20 (76.9)	487	158 (32.4)	
99. 1	14	6 (42.9)	81	25 (30.9)	
2	19	16 (84.2)	112	32 (28.6)	
3	14	10 (71.4)	98	33 (33.7)	
-----					
Sub	total	112	67 (59.8)	1375	341 (24.8)
99. 4	21	9 (42.9)	261	52 (19.9)	
5	8	3 (37.5)	157	86 (54.8)	
6	15	1 ( 6.7)	153	2 ( 1.3)	
7	6	1 (16.7)	43	8 (18.6)	
8	1	0 ( 0 )	19	0 ( 0 )	
9	2	1 (50.0)	6	2 (33.3)	
10	6	3 (50.0)	167	46 (27.5)	
11	19	11 (57.9)	367	84 (22.9)	
12	35	17 (48.6)	399	102 (25.6)	
00. 1	42	27 (64.3)	467	149 (31.9)	
2	35	22 (62.9)	371	104 (28.0)	
3	28	20 (71.4)	347	100 (28.8)	
-----					
Sub	total	218	115 (52.8)	2757	735 (26.7)
Total	413	247 (59.8)	5124	1465 (28.6)	

Table 3. Number of NLV positive samples obtained from gastroenteritis outbreaks.

Year.Month	1997.11-1998.3		1998.4-1999.3		1999.4-2000.3		Total	
	No. of samples							
Sample	Tested	Positive (%)						
Patient	602	305 (50.7)	849	306 (36.0)	1457	625 (42.9)	2908	1236 (42.5)
Not ill	116	38 (32.8)	54	11 (20.4)	345	78 (22.6)	515	127 (24.7)
Food handler	206	37 (18.0)	308	22 ( 7.1)	561	28 ( 5.0)	1075	87 ( 8.1)
food items	68	9 (13.2)	164	2 ( 1.2)	394	4 ( 1.0)	626	15 ( 2.4)
Total	992	389 (39.2)	1375	341 (24.8)	2757	735 (26.7)	5124	1465 (28.6)

Table 4. Settings of NLV related outbreaks of gastroenteritis in Tokyo.

Setting	Year.Month		No.of outbreaks positive / tested (%)		Total
	1997.11	-1998.3	1998.4	-1999.3	
Restaurant	40 / 49 (81.6)		24 / 44 (54.5)	51 / 92 (55.4)	115 / 185 (62.2)
Home	8 / 14 (57.1)		19 / 30 (63.3)	18 / 48 (37.5)	45 / 92 (48.9)
Catered meal	2 / 5 (40.0)		1 / 2 (50.0)	4 / 6 (66.7)	7 / 13 (53.8)
Hotel	0 / 0 ( 0 )		2 / 3 (66.7)	1 / 4 (25.0)	3 / 7 (42.9)
School・Nursing home	4 / 4 ( 100)		9 / 10 (90.0)	21 / 24 (87.5)	34 / 38 (89.5)
Other	0 / 0 ( 0 )		1 / 6 (16.7)	3 / 7 (42.9)	4 / 13 (30.8)
Other prefecture	11 / 11 ( 100)		10 / 17 (58.8)	17 / 37 (45.9)	38 / 65 (58.5)
Total	65 / 83 (78.3)		67 / 112 (59.8)	115 / 218 (52.8)	247 / 413 (59.8)

Table 5. Comparison of oyster-associated and -unassociated NLV outbreaks of gastroenteritis in three seasons in Tokyo.

Oyster consumption	Year.Month		No.of outbreaks positive / tested (%)		Total
	1997.11	-1998.3	1998.4	-1999.3	
Associated	48 / 56 (85.7)		15 / 23 (65.2)	45 / 72 (62.5)	108 / 151 (71.5)
Unassociated	16 / 25 (64.0)		51 / 83 (61.4)	70 / 141 (51.1)	137 / 249 (55.0)
Unknown	1 / 2 (50.0)		1 / 6 (16.7)	0 / 5 ( 0 )	2 / 13 (15.4)
Total	65 / 83 (78.3)		67 / 112 (59.8)	115 / 218 (52.8)	247 / 413 (59.8)

は38件 ( 58.5% ) であった .

#### 4 ) カキ喫食の有無によるNLVs検出状況

推定原因食品にカキが含まれるか否かによってNLVs検出状況を分類し, Table5.に示した. カキ関連事件は過去3シーズンで151事例発生し, そのうちNLVsが検出されたのは108事例 ( 71.5% ) であった. これに対し, 非関連事件はシーズン毎に事例数が増加する傾向が見られ, 3シーズンで249事例であった. NLVsが検出されたのは, そのうち137件 ( 55.0% ) であった.

#### 5 ) 検出されたNLVsの遺伝子型

1999年4月から2000年3月の間にNLVsが検出された115事例のうち61事例についてNLVs遺伝子型の調査を行い, その結果をTable6.に示した. 調査を行った61事例のうち, G型が44事例と最も多く, 次いでG型が8事例, G型2種の混在が6事例, GとG型の混在が3事例であった. これらの2種類の遺伝子型が混在した事例は, すべてカキあるいはシジミなどの二枚貝が原因食に含まれた事例であった. また, 大阪府で報告されたSOVと96065プローブに反応するNLVsは認められなかった.

### 考 察

NLVsは, 冬季になると毎年のように発生する胃腸炎集団事例の起因ウイルスであるが, その感染動物実験系も組織培養系もないため検査法の開発やウイルスの性状

Table 6. Number of NLV genotypes of detected outbreaks in Tokyo from April 1999 to March 2000.

Genogroup	Genotype	No.positive	( % )
G	P1A	8	13.1
G +	P1A+P2A	2	3.3
G	P1A+P2B	1	1.6
G	P1B	10	16.4
	P2A	15	24.6
	P2B	19	31.1
G +	P1B+P2A	3	4.9
G	P1B+P2B	1	1.6
	P2A+P2B	2	3.3
Total		61	100

NOTE. Data are no.(%) of total. G : genogroup , G : genogroup , P1A, P1B, P2A, P2B: genotypes from reference 5).

を決定するのは非常に困難が伴った. しかし, 1990年にNVがクローニングされると, 得られた遺伝子情報に基づきRT-PCR法が行われるようになった. RT-PCR法の普及や用いるプライマーの改良により, 冬季に多発する非細菌性胃腸炎の集団発生は主としてNLVsに起因することが明らかとなってきた. このような背景から厚生省は1997年5月に食品衛生法の改正を行い, NLVsを食中毒起因物質に指定し, その検査法にRT-PCR法および確認試験にハイブリダイゼーション法を提示した. 都立衛

生研究所においてもドットプロットハイブリダイゼーション法を新たに導入し、新しい食中毒ウイルス検査に対応してきた。1997年11月に行政検査を開始し、2000年3月までのNLV検索を集計すると、これまでとは異なったNLVsの流行が示された。最初に、胃腸炎集団事件の発生場所の変化が指摘される。これまで飲食店と家庭内における事例が7割以上を占め、原因食にはカキに代表される二枚貝の生食があった。NLVsによる胃腸炎集団事例対策としては都内で冬季に販売されるカキのウイルス汚染調査、あるいはその成績に基づく一般都民への食品の安全性に関する情報発信が主体となってきた。しかし、最近の事件発生状況は、保育園・幼稚園、小学校等の学校施設の他に老人ホームなど給食提供を行っている施設における事例が増加してきた。これらの事例では、食材にカキを含むことはほとんどない。また、患者発生が特定の学級あるいは住居室に集中するなどヒトからヒトへの感染の兆候を示す場合が多く認められた。従って、今後のNLVs対策はこれまでの通常の食中毒調査以上に慎重な調査を行い、感染症発生動向調査の情報も取り入れるなど、食中毒と感染症の両面から進めていく必要があるものと考えられた。

次に、'99年度に検出されたNLVsについて遺伝子型の解析を行った。その結果は、これまでに報告されてきたように遺伝子型G型を中心とするものであったが、約

2割の事例からは遺伝子型G型のNLVsも検出された。また、原因食に二枚貝を含んだ事例の場合、複数の遺伝子型のNLVsが検出されるなど、食中毒事件の解明を進める際に複雑な状況が明らかとなってきた。今回の成績に基づき、最も多かったP2B型のLorsedale virusの遺伝子配列からLV82を新たにプライマーに加え、様々なNLVsを検出できるよう対応し、検査材料からの高いNLVs検出率を維持することができた。今後は検査需要の増加が予測される食中毒原因食品など、微量のウイルス汚染について検出できるような検査法の開発が必要と考えられた。

#### 文 献

- 1) Kapikian,A.Z., Wyatt,R.G., Dolin,R. *et al.* :*J.Virol.* **10**, 1075-1081, 1972.
- 2) Jiang,X., Graham,D.Y., Wang,K., *et al.* :*Science*, **250**, 1580-1583, 1990.
- 3) 佐々木由紀子, 中村敦子, 門間公夫, 他:東京衛研年報, **49**, 12-16, 1998.
- 4) Jiang,X., Wang,J., Graham,D.Y., *et al.* :*J.Clin.Microbiol.* **30**, 2529-2534, 1992.
- 5) Ando,T., Monroe,S.S., Gentsch,J.R., *et al.* :*J.Clin.Microbiol.* **33**, 64-71, 1995.
- 6) Moe,C.L., Gentsch,J.R., Ando,T., *et al.* :*J.Clin.Microbiol.* **32**, 642-648, 1994.