

# ヒトと環境およびカキから検出したNorwalk Virusの疫学的検討

【微生物科】

川本 歩・松本 尚美・谷尾 進司  
竹内 功二・細井 亨

## Epidemiological Investigation of Norwalk Virus detected in Humans, Environment and Oysters

Ayumi KAWAMOTO, Naomi MATUMOTO, Sinji TANIO,  
Koji TAKEUTI, Toru HOSOI

### Abstract

During Apr. 1999-2001, 11 cases of Foodborn outbreaks due to Norwalk virus (NV) occurred in Tottori. Foodstuff meal served of those cases were almost oysters.

NV was detected in 60-100% of patients and in 40-67% of food handlers by RT-PCR. NV was found in infantile gastroenteritis (Oct-Mar.), 52% (Dec.), 38% (Feb.). We examined seawater, untreated waste water and oyster in a study of environment polluted by NV and food contaminated with it. It was found in seawater and untreated waste water all season of the year, and in oyster in Jan, Mar. and Apr. GII<sub>MX</sub> genotype of NV was detected in examinations of infants, seawater, waste water and oysters. It was suspected that NV cycled in patients, environment, food and humans. Also, raw oysters have a high risk, especially during the season from winter to May.

## 1 はじめに

Norwalk Virus (NV, 小型球形ウイルス, SRSV) は食品を介する食中毒様胃腸炎の集団発生や小児の急性胃腸炎の病因ウイルスであり、感染経路は食品あるいは水を介するものおよびヒトからヒトへの経路が知られている。近年NVの遺伝子の全塩基配列が多く株で決定され遺伝子型の多様性が報告されている。その遺伝子的特性からgenogroup I (GI), genogroup II (GII) に大きく分けられている。わが国においてもGI, GII ともに見られ、多くの遺伝子型が存在していることが明らかとなっている。

鳥取県において集団食中毒事例が、2000年8月1件、2001年になって1月から4月までに10件発生し、これらのうち2件は他県、1件は国外発

生であった。また、これらの事例はほとんどが生カキ摂食事例であった。

NVの環境汚染および食品汚染の実態を明らかにする目的で、海水(3地点)、生水(1地点)、岩カキ(2地点)を定点として毎月1回調査し継続的に検出を試みた。また、小児の散発胃腸炎の流行形態についても調査し、鳥取県で検出したNVの遺伝子解析を行いNVの分子疫学的調査を行ったので報告する。

## 2 材料と方法

### 1) 材 料

(1) 2000年8月～2001年4月発生の食中毒11事例の患者便68件、調理従事者便40件、5事例に関連したカキ45個をNV検出に用いた。カキは5個をプールし1検体とした。

- (2) 1999年12月30件、2000年8月から2001年3月までの小児胃腸炎散発例患者便190件をNV検出に用いた。
- (3) 海水36件（毎月3地点2000年6月～2001年5月）、生水11件（毎月1地点2000年7月～2001年5月）および岩カキ85個17件（毎月2地点：1地点5個、2000年6月～2001年5月）をNV検出に用いた。
- (4) 食中毒発生の患者便20件、調理従事者便6件、小児胃腸炎散発例の患者便18件、カキ2件、海水3件、生水2件のNV陽性PCR産物を遺伝子解析に用いた。

## 2) PT-PCR法

### (1) 材料の前処理法

- ・糞便はPBSで10%乳剤を作成し、粗遠心後の上清を10,000rpm10分遠心し、上清をRNA抽出に用いた。
- ・生カキは中腸腺をPBSで10%乳剤とし粗遠心後、40,000rpmで2時間遠心し200 $\mu$ lのDEPC水に再浮遊し、そのうちの100 $\mu$ lをRNA抽出に用いた。
- ・海水20 $\ell$ は陽電荷フィルター濾過濃縮後ポリエチレングリコール6000に吸着させ遠心沈殿後500 $\mu$ lのDEPC水に再浮遊し、その100 $\mu$ lをRNA抽出に用いた。
- ・生水は270mlをポリエチレングリコール6000に吸着させ、遠心沈殿後500 $\mu$ lのDEPC

水に再浮遊し、その100 $\mu$ lをRNA抽出に用いた。

- (2) ウイルスRNA抽出はSV RNA Isolation System KitとCTAB法に準じて行った。
- (3) RT-PCR法はプライマーとして2種類のプライマー対FirstPCR Primer35/36：Second PCR primer NV81/82/SM82と、First PCR primer MR3/4：Second PCR primer Yuri22F/Rを用いた。

3) 遺伝子配列の決定はpolymerase領域4568～4861の293bpをダイターミネーター法で行い、系統樹はUPGMA法で作成した。遺伝子解析は国立公衆衛生院で実施し、一部民間検査機関に外部委託した。

## 3 結 果

- 1) 鳥取県における2000年8月～2001年4月までの食中毒発生状況を示した。(Table 1)
- 2000年8月～2001年4月に県内に原因施設のあった食中毒事件は8件で、東部地区3件、中部地区2件、西部地区3件であった。8件中6件が飲食店を原因施設とし他の2件は家庭内であった。11件中7件の事例には摂食メニューにカキが提供されていた。事例No3は摂食メニューに生カキはなく水泳強化合宿中に発生し感染経路は不明であった。

Table 1. Foodborn outbreaks of due to NV (1999.4-2001.4)

No.	Date	District	Consumer	Cases	Suspected route of transmission	Place of eating/providing
1	31/8/2000	Abroad	23	8	Unknown	Unknown
2	13/1/2001	TohakuCounty	6	3	Meal served (Foodstuff unknown)	Home
3	28/1	Yazu County	65	21	Meal served (Foodstuff unKnown)	Restaurant
4	30/1	Yonago City	207	11	Raw oyster	Restaurant
5	4/2	Tottori City	101	61	Raw oyster	Restaurant
6	8/2	Yonago City	23	7	Meal served (Foodstuff unKnown)	Restaurant
7	12/2	Kurayoshi City	5	5	Unknown	Home
8	9/39	Shimane Pre	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
9	12/3	Yonago City	7	5	Meal served (Foodstuff unKnown)	Restaurant
10	28/3	Tokushima Pre	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
11	30/4	Tottori City	49	17	Meal served (Foodstuff unKnown)	Restaurant

Table 2. Detection of NV genomes in specimen by RT-PCR

No	Cases	No of detected/No of specimens					
		Stool		Foodstuff		Other	Water
		Patients	Food handlers	Oyster*	Other	Vomitus	Swimming pool
1	8	2/2					
2	3	3/3		0/1		1/1	
3	21	7/7					0/1
4	11	9/9	8/12	0/3			
5	61	17/21	4/10	2/2			
6	7	1/3	0/11	0/1			
7	5	5/5					
8	Unknown	1/2					
9	5	4/5	0/2	2/2			
10	Unknown	3/3					
11	17	7/8	0/1		0/6		

( ) Health

\*1 : 5

Blank; Not test

8月発生の事例No.1は韓国帰り高校生の発生病例で、No.8とNo.10は他県での発生病例であった。原因食品が推定できたのは事例No.4、No.5の2事例で、酢カキが原因と推定された。

## 2) NV検出成績 (RT-PCR検査結果: Table 2)

患者便のRT-PCR陽性率は事例No.1、No.2、No.3、No.4、No.7、No.10は100%、No.5、No.9は80%から検出された。従事者便では事例No.4は60%、No.5は40%で、その他の事例は検出されなかった。事例No.5、No.9の食品残品等のカキからNVが検出された。

3) 小児胃腸炎散発例190件からのNV検出率は1999年12月; 6/20、2001年9月; 0/25、10月; 1/22、11月; 8/35、12月; 13/25、1月; 1/20、2月; 8/21、3月; 1/22であった。12月が52%と最も高い検出率を示し、ついで2月が38%であった。

## 4) 岩カキと海水からのNV検出状況 (Table 3)

西部海域の1月、3月、4月採取岩カキおよび東部海域の4月採取岩カキから検出された。また

海水のNV陽性率は東部で3/12、中部で9/12、西部で2/12であった。中部の天神川河口付近で高い検出率を示した。生下水からは毎月検出された。海水、生下水の調査では年間を通してNVが検出されていることから、このウイルスは年間を通じてヒトへの感染が継続していると考えられた。また、カキでは冬季にNVが陽性となりこの時期にカキをはじめとして食品媒介の食中毒集団発生が起きている。そして、小児散発胃腸炎患者便からも12月、1月に高率にNVが検出され冬季に環境中に排泄されるウイルス量が増大することが推察される。海水、生下水、カキからはすべてG II型が検出されヒトから検出される遺伝子型を反映していると考えられた。

小児胃腸炎患者便から検出された遺伝子型はMX typeが多く、環境水、カキからもMX typeが検出されている。しかし、食中毒事例患者便からD SV type、Yuri type、IIaなど小児、環境水、カキから検出されていない遺伝子型が検出されている。

Table 3. Detection of NV genomes in native oyster, sea water and waste water by RT-PCR

Specimen	Sampling point	Year Month	2000						2001					
			6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5
Native oyster	East		(-)	(-)	(-)								●	(-)
	West		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	●	(-)	●	●	(-)
Sea water	East		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	●	(-)	●	(-)	●	(-)	(-)
	Middle		●	●	(-)	(-)	●	(-)	●	●	●	●	●	●
	West		(-)	(-)	●	(-)	(-)	(-)	●	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Untreated waste water	East			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

● : Detected NV  
Blank : Not test

小児でのNVの遺伝子型の流行形態を2シーズンしか観察していないが、G IIのMX type、MX株に近似のCamberwell、Melshan、Hawaii株が17/18 (94%)検出されており、食中毒における成人でのMX type検出例が少ないのはすでに免疫を獲得していることも考えられる。また、カキなどの原因食品が複数のgenotypeのNVに汚染されており各個体の生体内で増殖しやすいgenotypeが検出されたと推測される。今回の結果から特に冬季のカキはNV汚染のリスクが高く、また、食中毒発生状況から5月まではカキの生食には注意が必要と考えられる。

#### 5) 遺伝子解析結果 (Table 4)

遺伝学的系統解析は塩基配列80%以上の相同性

をもつものをひとつのクラスターとして遺伝子型を分けた。G IではKYtype、DSV typeとChiba株とSOV株の中間型I bの3つの遺伝子型に分けられた。G IIはHawaii type、Camberwell type、Mx type、Yuri type、Melkshan type、Yuri株と70%の相同性であるII aの6つが存在していた。

(1) 7例の食中毒事例別のgenotypeはG IIのみが1事例 (No.8) で、他の事例は、G I、G IIの混合感染が認められた。また、事例No.4およびNo.5では、患者と従業員のgenotypeの同じものが検出され、4~5種類の遺伝子型に分かれ多様性を示した。韓国帰りの高校生の事例No.1の発生例から検出したNVの遺伝子型はG I : I b type、G II : Yuri typeであった。

Table 4. Result of sequence analysis of NV genome in specimen (1999-2001)

Source	District	Genotype				Genotype								
		G I	KY	DSV	I b	G II	SMV	Hawaii	Camber	MX	Yuri	Melkshan	II a	
Sporadic Infantile gastroenteritis	East					3	1		1	1				
	Middle	1	1			11	3		2	4		2		
	West					3	1			2				
	Total	1	1			17	5		3	7		2		
Food born outbreak/00-01 No.1	Abroad	1			1	1						1		
	2	Middle	1		1	2				2				
	3	East	1	1		2			2					
	4	West	3		1(2)	3					1	1	1	
	5	East	3	1(1)	(1)	5		1			2		1(1)	
	7	Middle	1	1		2			(1)				1	
	8	Other Pre.				1							1	
	Total		10	4	5	1	16		1	3	2	4	1	5
	Sea water	Middle					2				2			
West						1				1				
Un treated waste water	East					2			2					
Oyster Restaurant foodstuff Native	Other Pre.					1				1				
	West					1				1				
Total		11	5	5	2	40	5	1	6	16	4	3	5	

(2) 小児胃腸炎散発例では、G IはKY typeが1株のみ検出され、G IIは4種類の遺伝子型に分かれ、なかでもMX type、Hawaii typeが多くみられた。

(3) 7月、12月に天神川河口付近で採取した海水、12月採水の日野川河口付近海水および12月、1月採取の生下水はいずれもMX typeであった。一方、食中毒事例No.5関連の養殖カキは患者が摂

食したカキと同一ロット品ではないが、飲食店に残っていた後日仕入れ品からMX typeのNVが検出された。また、西部海域で1月採取した岩カキから検出したNVの遺伝子型もMX typeであった。

## 4 考 察

生カキを介する事例は1~2月に多く、また市販カキおよび自生カキからは冬季にNVが検出さ

れている。1999年にはNVに起因する集団発生が4月から5月下旬まで見られたが、本年は1月から3月に10件頻発し4月下旬に1件発生した。県内に原因施設のあった8事例中7例では摂食メニューにカキが提供されており、このカキが喫食調査からNV汚染食品と推察された。今回、カキのウイルス検査が行えた事例は5事例で、2事例の関連カキからNVが検出された。また、鳥取県の西部海域の岩カキからは1月、3月、4月にNVが検出され、東部海域でも4月に検出された。通常生カキは3月末になると市販されるものが急速に減少するが、5月までNVに起因する食中毒の発生がみられ、No.1の事例では8月の夏季に発生した。この事例は国外が原因とされ調査不能であった。NV起因性の食中毒が集中的に多発する年と2000年のように全く発生のみられない年があり、このちがいについては、流通カキの採取海域が年、時期により異なっていたり、近年の輸入増加傾向などの影響が推測される。

海水、下水の調査では年間を通してNVが検出されており、このウイルスは年間を通じてヒトへの感染が継続していると考えられた。また、カキでは冬季にNVが陽性となりこの時期にカキなど食品媒介の食中毒集団発生が起きている。そして、

小児散発胃腸炎患者便からも12月、1月に高率にNVが検出され冬季に環境中に排泄されるウイルス量が増大することが推察される。海水、下水、カキからはすべてGⅡ型が検出されヒトから検出される遺伝子型を反映していると考えられた。

小児胃腸炎患者便から検出された遺伝子型はMX typeが多く、環境水、カキからもMX typeが検出されている。しかし、食中毒事例患者便からDSV type、Yuri type、Ⅱaなど小児、環境水、カキから検出されていない遺伝子型が検出されている。小児でのNVの遺伝子型の流行形態を2シーズンしか観察していないが、GⅡのMX type、MX株に近似のCamberwell、Melshan、Hawaii株が17/18 (94%) 検出されており、食中毒における成人でのMX type検出例が少ないのはすでに免疫を獲得していることも考えられる。また、カキなどの原因食品が複数のgenotypeのNVに汚染されており各個体の生体内で増殖しやすいgenotypが検出されたと推測される。今後PCR産物のクローニングを行いこの点について明らかにしたいと考えている。今回の結果から特に冬季のカキはNV汚染のリスクが高く、また、食中毒発生状況から5月まではカキの生食には注意が必要と考えられる。