

長崎県下における食中毒(ノロウイルス)の検出状況(2003)

中村 まき子・吉川 亮・平野 学・原 健志

Food Poisoning (Noro Virus) in Nagasaki Prefecture(2003)

Makiko NAKAMURA, Akira YOSIKAWA, Manabu HIRANO, and Kensi HARA

Key words : Food Poisoning , Noro Virus , RT-PCR

キーワード : 食中毒, ノロウイルス, RT - PCR

はじめに

ノロウイルスは平成9年度に食品衛生法が一部改正されたことにより、小型球形ウイルス(SRSV)(以下、SRSVと略す)がはじめて食中毒の原因物質として追加された。SRSVは、ウイルス性胃腸炎による集団発生の原因の主要ウイルスの一つであり、小児から成人に至る幅広い年齢層にわたって食品・水を介して、さまざまな規模の急性胃腸炎を引き起こす。

このウイルスには培養細胞による増殖法が確立されておらず、診断のためのウイルス検出は電子顕微鏡による形態観察に頼っており、「小型球形ウイルス(SRSV)」と呼ばれていた。

平成9年度からSRSVの検査体制を整備し、ウイルスの遺伝子検査(RT-PCR法)が実施可能となった。しかし、近年、SRSVの遺伝子解析が大きく進み、主にカリシウイルス科に属する2種類のウイルスであることがわかった。¹⁾それに伴いSRSVの検査法については、平成11年2月の厚生省通知「ヒトカリシウイルスの検査法について」より検査法の改訂があり、さらに、平成13年11月には厚生労働省通知「ノーウォーク用ウイルス(NLV)のRT-PCR法について」があり、その検査法で実施していた。SRSVについては、2002年の夏、国際ウイルス命名委員会によって、「ノロウイルス」という正式名称が決定され、世界で統一されて用いられるようになったため、本稿でも以下、ノロウイルス名で使用した。さらに、平成15年11月に「ノロウイルスの検出法」へと改訂が行われた。したがって、今年度、11月以降は「ノロウイルスの検出法」に準じて実施している。

今回、県内で発生したノロウイルスを原因とする食中毒事例で2次感染を疑う事例の発生について報告する。

2)

検査方法

1. 糞便材料の処理

糞便の10%乳剤(PBS(-))を作成し、激しく攪拌

10,000~12,000rpm、20分間冷却遠心

上清138μlを検体とした。

2. RNAの抽出(QIAamp Viral RNA Miniキット)

1.5mlチューブ

Buffer AVL/Carrier RNA 560μl

+

上清138μl

+

エコーウイルス9型Hill株を2μl

15秒間Vortex

室温(15~25℃)10分間静置

チューブをスピンドウン

エタノール(96~100%)560μlを加える

15秒間Vortex後にスピンドウン

QIAamp スピンドラム(2mlコレクションチューブ)

サンプル/Buffer液630μlを注入

8,100rpm 1分間遠心

スピンドラムを新しいコレクションチューブに移す

残りのサンプル/Buffer液630μlを注入

表2. RT反応

Dnase処理RNA	15 µl
5 × First-Strand Buffer	4.5 µl
2.5mM dNTPs	1.5 µl
Random Primer (1.0 µg)	0.75 µl
Ribonuclease Inhibitor (40unit / µl)	0.9 µl
100mM DTT	1.5 µl
Super Script RT (200u / µl)	1.5 µl
Distilled water	4.45 µl

遠心して、全ての液が無くなるまで行う

スピнкаラムに Buffer AW1 を 500 µl 入れる

8,100rpm 1 分間遠心

スピнкаラムを新しい 2ml の

コレクションチューブに移す

スピнкаラムに Buffer AW2 を 500 µl 入れる

14,000rpm 3 分間遠心

スピнкаラムを新しい蓋つき

1.5ml のチューブに移す

Buffer AVE 60 µl を加え、1 分間静置

8,100rpm で 1 分間遠心

濾液が抽出RNAである

抽出RNAは - 80 °C で 1 年間安定している。

3. DNase処理

表2に示したようにDNase処理混合液の調整を行い、37 °C に30分、次いで75 °C に5分置き、直ちに on ice (または4 °C) し、DNase処理した。

表1. DNase

試薬	
抽出RNA	12 µl
5 × First-Strand Buffer	1.5 µl
Distilled Water	1.3 µl
Dnase (5U / µl)	0.2 µl

4. RT反応(Super Script RT (Invitrogen)を用いる)

表3に示したようにRT反応調整液の調整を行い、42 °C で1時間、次いで99 °C で5分間加熱し、直ちに on ice(または4 °C) し、RT反応を実施した。

5. 1st PCR

ノロウイルスについては、表4の組成でG1とG2を別々に作成する。また、エコーウイルス9型Hill株については、表5の混合液を作成し、94 °C 3分1サイクル、94 °C 1分、50 °C 1分、72 °C 2分を40サイクル、72 °C 15分1サイクルを実施した。

プライマー:

G1: G1-SKF / G1-SKR, COG1F / COG1R

G2: G2-SKF / G2-SKR, G2-SKF / G2AL-SKR, COG2F / COG2R, ALPF / COG2R

表3. ノロウイルス

Distilled Water	27 µl
10 × Ex Taq Buffer	4 µl
dNTP(2.5mM)	3.2 µl
NVプライマー-F (25 µM)	0.8 µl
NVプライマー-R (25 µM)	0.8 µl
cDNA (Templete)	4 µl
EX Taq (5unit / µl)	0.2 µl

表4. エコーウイルス9型 Hill 株

Distilled Water	27 µl
10 × Ex Taq Buffer	4 µl
dNTP(2.5mM)	3.2 µl
E9Hill-Fプライマー (25 µM)	0.8 µl
E9Hill-Rプライマー (25 µM)	0.8 µl
cDNA (Templete)	4 µl
EX Taq (5unit / µl)	0.2 µl

6. 電気泳動

PCR 産物 8 μl と 5 × Loading buffer 2 μl を混合し、2% アガロースゲルに 10% エチジウムブロマイド染色液を加えて用い泳動する。泳動 buffer は 1% TAE を使用する。

7. 写真撮影、バンド確認

ゲルは UV 照射で写真撮影し、バンドの確認を行う。

8. PCR 結果の判定

RNA 抽出のコントロールとしているエコーウイルス 9 型 H111 株の PCR で目的とするバンドを確認し、RNA 抽出に問題がなかったことが判明する。

また、検体の代わりに蒸留水を入れ陰性コントロールでバンドが見られないこと。

以上の条件が満たされたときに PCR の判定を行う。なお、上記条件が満たされないときには再試験を行う。

表5.平成15年度 ノロウイルスの検出状況

	依頼件数	検体数	陽性検体数	geno-group
西彼地区	1	34	8	G1:2、G2:6
県央地区	6	45	4	G1:1、G2:2、G1・G2:1
県南地区				
県北地区	2	12	8	G2:8
五島地区				
上五島地区				
壱岐地区				
対馬地区	4	33	12	G2:12

症例報告

1. 概要について

平成16年3月23日夜、医療機関よりAダンタイノ数名が食中毒症状を呈しており、そのうち2名の患者便からノロウイルスが検出された旨の連絡がB保健所に入った。B保健所の調査の結果、3月9日A団体に参加した一般参加者及びスタッフの会食(45名)を行ったところ、夕食喫食者のうち7名が3月10早朝より、吐気、嘔吐、下痢、発熱などの食中毒様症状を呈し、医療機関を受診し、内1名の便からノロウイルスを検出していた。さらに、夕食を喫食していないが、有症者の介護や汚物等の処理をした6名が同様の症状を呈しており、5名が医療機関を受診し、内1名の便からノロウイルスが検出された。B保健所より、喫食者34名の糞便について当所に行政依頼があり、検査を実施した。

2. 検査結果について

喫食者34名の糞便検体のうち、8検体から1st-PCRでノロウイルス遺伝子が検出された。その内、2名がGeno-groupG1を、6名がGeno-groupG2を検出した。

しかし、検出されたノロウイルス遺伝子のPCR産物について、シーケンスは未実施であったため、原因が同一のウイルスによるものか確認していない。

また、原因食材を調査するにしても食材が残っておらず、食品検査が実施できなかった。

さらに、この事例では、喫食をしていないが有症者の介護や汚物等の処理をした接触者に食中毒様症状を呈する人がおり、感染症として2次感染が強く疑われたが疫学調査は実施していない。

考 察

大規模食中毒の発生においては、患者及び食材からノロウイルス遺伝子を検出し、検出されたウイルス遺伝子のシーケンスを実施するとともにウイルス株の由来について系統樹から確認することは、今後重要である。また、ノロウイルスは2次感染を起こすと言われているが、今回の事例のように確認は出来ていないが、喫食者のみならず接触者にも同様な症状がみられる場

合には、2次感染の疑いが強く懸念される。

ノロウイルスについては、今後、食中毒と同時に感染症における2次感染対策として積極的な疫学調査を進める体制づくりを検討していく必要がある。

参考文献

- 1) 病原微生物検出情報 Vol.24 No.12(No.286)
- 2) ノロウイルスの検出法について(食品衛生法の一部改正)、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知食安監発第 1105001 号、(2003)