

1999/2000年冬季に山梨県で発生した ウイルス性胃腸炎について

山上隆也*¹ 町田篤彦 浅川洋美
小澤 茂 西尾 治*² 井上利男*³

Prevalence of Viral Gastroenteritis in
Yamanashi Prefecture (1999/2000)

Takaya YAMAGAMI, Atsuhiko MACHIDA, Hiroyoshi ASAKAWA,
Shigeru OZAWA, Osamu NISHIO and Toshio INOUE

冬季に多発する急性胃腸炎はウイルスによるものがほとんどであり、A群ロタウイルス(HRV)、腸管アデノウイルス(Ad)、ノーウォーク様ウイルス(NLV)などが起因ウイルスとして知られている。特にHRV、Adは乳幼児下痢症の、またNLVは食中毒の病因物質として近年注目されている。

平成9年5月に食品衛生法施行規則が改正され、食中毒発生時のNLV検査が各都道府県に義務づけられた。それ以降、全国各地で発生した急性胃腸炎集団発生例からのNLVの検出状況が報告されてきている¹⁾。われわれも急性胃腸炎集団発生例からのNLVの検出状況を報告してきた^{2, 3)}が、山梨県で発生した散発急性胃腸炎におけるNLVの流行については把握できていなかった。

そこで、今回われわれは冬季に発生した散発急性胃腸炎の患者糞便中からHRV、Ad、NLV、エンテロウイルス(EV)の検出を試み、散発急性胃腸炎におけるNLVの浸潤について調査した。また、散発例ならびに集団発生例から検出されたNLVについて遺伝子解析を実施し、山梨県におけるNLVの流行について検討した。

材料と方法

1. 被検材料

1999年12月から2000年3月に甲府市内の内科小児科医院で採取した散発急性胃腸炎の患者糞便47件ならびに同期間に採取した集団食中毒(有症苦情、県外関連調査を含む)10事例の患者および調理従事者の糞便76件を材料とした。

2. NLVの検出

NLVの検出はRT-PCR法による遺伝子検出を実施した。糞便からUltraspec3-RNA isolation system (BIOTECX)でウイルスRNAを抽出し、既に報告した方法²⁾でRT-PCRを行った。プライマーにはNLV遺伝子のRNAポリメラーゼ領域⁴⁻⁷⁾およびキャプシド領域⁸⁾を増幅するものを用いた。PCR産物は1.5%アガロースゲル電気泳動でバンドを確認した。プライマーペアYURI22R/F, 35/36, 81/82で目的とするバンドがみられたものは、西尾らのプローブを用いたマイクロプレートハイブリダイゼーション⁹⁾でプローブ型別を行った。また、一部のものはダイナーミネーター法で塩基配列を決定し、UPGMAで解析を行った。

3. HRV, Adの検出

NLVの検出されなかった散発急性胃腸炎の患者糞便についてHRV, Adの検出を実施した。HRV, Adの検出はラテックス凝集法を原理とする市販キット「ロタ・アデノドライ」(Orion Diagnostica)による抗原検出を行った。HRV抗原の検出されたものはGouveaら¹⁰⁾のRT-PCR法でG血清型別を行った。

4. EVの検出

NLV, HRV, Adが検出されなかった散発急性胃腸炎の患者糞便はHEp-2, RD-18S, Caco-2細胞に接種してEVの分離を行った。分離ウイルスはデンカ生研製ウイルス抗血清による中和反応で同定した。

* 1 : 現 山梨県立中央病院

* 2 : 国立公衆衛生院

* 3 : 井上内科小児科医院

結果と考察

1. 散発急性胃腸炎からのウイルス検出

(1) 散発急性胃腸炎の起因ウイルス

散発例の患者糞便 47 件中 HRV 抗原 3 件 (6.4%), Ad 抗原 1 件 (2.1%), EV 1 件 (2.1%), NLV 遺伝子 14 件 (29.8%) が検出された。各検査法の検出感度に相違はあるものの、冬季に発生した散発急性胃腸炎の約 1/3 から NLV が検出され、起因ウイルスとして重要であることが示唆された。28 件 (59.6%) からはいずれのウイルスも検出されなかったが、HRV, Ad, EV についてもより高感度である RT-PCR 法による遺伝子検出を行えば検出率は高くなると思われ、今後実施していきたい。また、アストロウイルスなどその他の胃腸炎起因ウイルスも含めて検討したいと考えている。

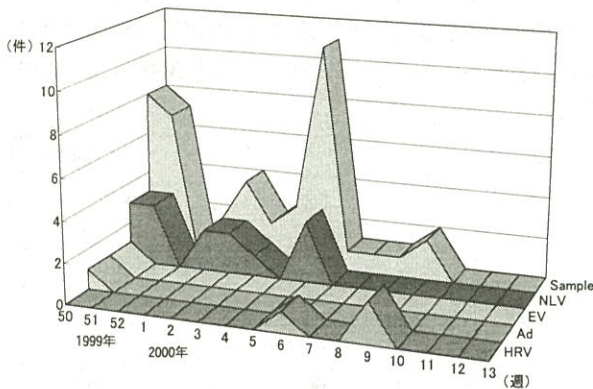


図1 散発急性胃腸炎からの週別ウイルス検出数

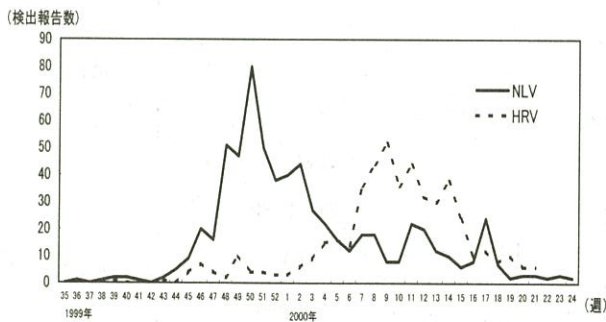


図2 週別NLV・HRV 検出報告数 (病原微生物検出情報ホームページ: 2000年6月26日現在報告数)

原因食品としては生かきの喫食が 2 件判明しており、そのうち 1 件から NLV 遺伝子が検出された。その他の症例については原因食品は推定できなかった。

ウイルスの検出された時期をみると、Ad, EV は 1999 年の第 50 週にのみ各 1 件ずつ検出され、Ad, EV の流行期である夏季に引き続いて検出されたものと思われた。NLV は 1999 年の第 50 週から 2000 年の第 5 週にかけて比較的長期間検出されたがそれ以降は全く検出されず、第 6 週以降は替わって HRV が検出された (図 1)。病原微生物検出情報の 1999/2000 年週別ウイルス検出報告数¹¹⁾によると、NLV の流行ピークは 1999 年の第 50 週であり、2000 年の第 6 週から HRV の流行に逆転している (図 2)。このように、冬季にみられた急性胃腸炎の流行は山梨県においても全国流行と同様に前半には NLV、後半には HRV の流行がみられた。年間をとおした全国の流行状況を見ると NLV の流行は 1999 年 11 月上旬 (第 45 週) ごろから、HRV の流行は 2000 年 5 月上旬 (第 18 週) ごろまでみられている。また、EV は夏季に、Ad は通年で流行する¹²⁾ ことから、ウイルス性胃腸炎流行の把握には冬季に限らず年間をとおした調査が必要であると思われる。

(2) HRV の血清型別

検出された HRV 3 件の G 血清型は 1 型 (1 歳), 2 型 (57 歳), 9 型 (1 歳) とそれぞれ異なっていた。ヒトでは 1 ~ 4 型が大部分を占め、9 型の検出はまれである¹³⁾ と考えられていたが、近年、札幌、東京において高率に検出されている¹⁴⁾。2 型は 2000 年 3 月下旬から 4 月上旬に山梨県の老人保健施設内で集団流行がみられ¹⁵⁾、今回の散発例でも 57 歳と比較的高年齢者から検出されており、2 型に対して高年齢層の感受性が高くなっていることが推察される。

(3) NLV の遺伝子解析

検出された NLV 遺伝子 14 件のプローブ型別結果は、G1P-A 1 件, G2P-A 3 件, G2P-B 3 件, G2P-C 3 件, G2P-A と G2P-B の両プローブに反応するもの (G2P-AB) 3 件, いずれのプローブにも反応しないもの (NT) 1 件であった (表 1)。

このうち、G2P-AB 3 件, NT 1 件を含む 10 件について塩基配列を調べ、遺伝系統的解析を実施した。その

表 1 検出された NLV のプローブ型別結果

	件数	G1P-A	G1P-B	G2P-A	G2P-B	G2P-C	G2P-AB	NT
散発例	14	1	0	3	3	3	3	1
集発例	30	2	1	0	3	9	6	9

結果、図3に示すようにプローブ型G2P-Aに属するHawaii類似株1件、G2P-Bに属するCamberwell類似株6件、G2P-Cに属するYuri類似株2件およびMexico類似株1件であった。なお、G2P-AB 3件はいずれもCamberwell類似株であった。Camberwellはプローブ型分類ではG2P-Bに属するが、遺伝子系統解析では比較的G2P-Aに近い塩基配列である。従って、今回の反応条件下では、これら3件はG2P-A、G2P-B両プローブに

表2 NVLによる集団食中毒事例

事例番号	月日	原因食品	検体数	陽性数
1	12. 7	不明	3	1
2	1.12	不明	2	2
3	1.18	生かき	5	4
4	1.19	生かき	9	1
5	1.25	生かき	9	5
6	2. 8	生かき	13	9
7	3. 8	不明	12	8

反応したものと考えられるが、ハイブリダイゼーションの反応温度を上げることにより型特異性を高くして¹⁸⁾、非特異反応を抑制することができると思われる。しかし、検体中にG2P-A、G2P-Bの両者が混在していた可能性も否定できない。このことから、ハイブリダイゼーションの反応条件について再検討するとともに、検出されたNLV遺伝子についても詳細に検討したいと考える。

以上のように散発急性胃腸炎から検出されたNLVの遺伝子型は多様であったが、プローブ型G2P-CならびにG2P-BのCamberwell類似株が比較的多くみられた。年毎に地域流行するプローブ型は変遷するという知見も報告されており^{19, 20)}、今後も継続的に監視を続ける必要があると考える。

2. 集団食中毒事例からのNLVの検出

(1) NLVによる集団食中毒発生状況

集団食中毒10事例76件中7事例(70%)30件からNLV遺伝子が検出された(表2)。推定原因食品は生かきが7事例中4事例(57.1%)と最も多かった。NLV

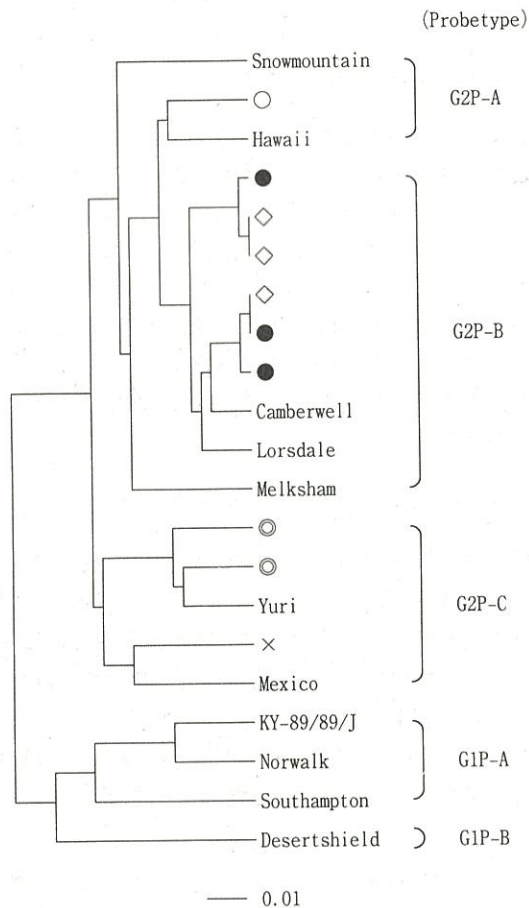


図3 散発急性胃腸炎から検出されたNLVの遺伝子系統解析

遺伝子解析を実施した10件のプローブ型別結果を
 ○: G2P-A ●: G2P-B ◎: G2P-C
 ◇: G2P-AB ×: NT で示した。

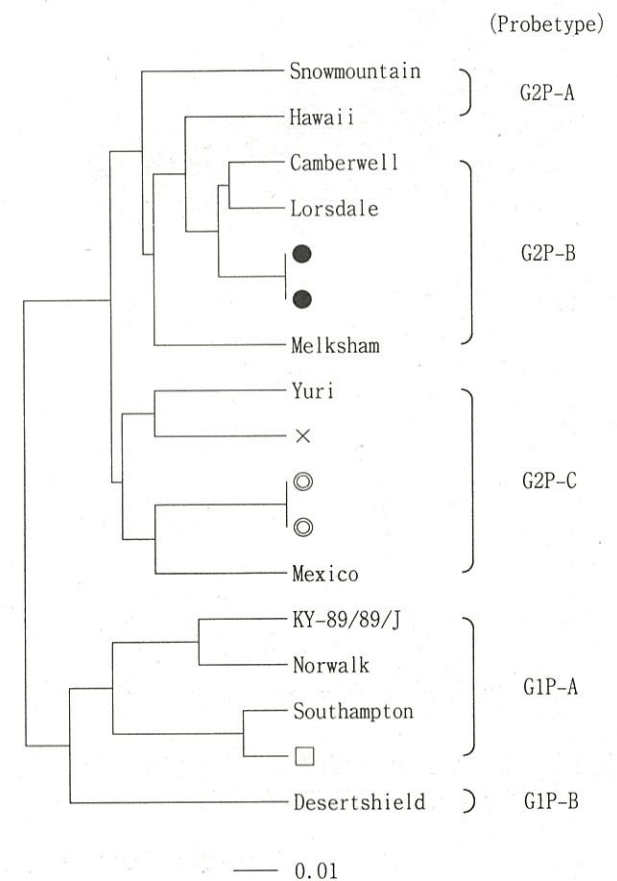


図4 集団食中毒から検出されたNLVの遺伝子系統解析

遺伝子解析を実施した6件のプローブ型別結果を
 ●: G2P-B ◎: G2P-C □: G1P-A
 ×: NT で示した。

が検出された事例の発生時期は12月上旬から3月上旬までみられたが、特に1月上旬から2月上旬に5事例が集中し、散発例におけるNLVの流行期とほぼ一致した。

(2) NLVの遺伝子解析

検出されたNLV遺伝子30件のプローブ型別はG1P-A 2件、G1P-B 1件、G2P-B 3件、G2P-C 9件、G2P-AB 6件、NT 9件であり、G2P-Aは全く検出されなかった(表1)。このうち、G1P-A 1件、G2P-B 2件、G2P-C 2件、NT 1件について遺伝子系統解析を実施した。その結果、G1P-A 1件はSouthampton類似株、G2P-B 2件はLorsdale類似株、G2P-C 2件に属するMexico類似株のNT 1件はYuri類似株であった(図4)。散発例で検出されたG2P-ABは遺伝子解析からCamberwell類似株であったことは前述のとおりである。また、遺伝子解析を実施したNT(散発例、集団発生例各1件)はG2P-Cに属する株であった。このことから集団発生例で検出されたG2P-AB 6件はCamberwell類似株、塩基配列を決定していない残りのNT 8件はG2P-Cである可能性が推測される。現在、G2P-AB 6件、NT 8件を含む24件についての遺伝子解析を実施中である。

以上のように1999/2000年冬季に山梨県において散発的に検出されたNLVと集団発生から検出されたNLV遺伝子はG2P-CとG2P-ABが多く、プローブ型G2P-CならびにG2P-BのCamberwell類似株が流行したことが推測された。今回の散発例の対象と集団発生例の対象との違いは、散発例は生かき喫食例は少数であったのに対して集団発生例では半数以上の事例が生かき喫食事例であったことである。かきの体内にはさまざまなNLVが蓄積されており、かきの喫食により感染するNLVは多種多様であると考えられ、生かきの喫食群と非喫食群とでは検出されるNLVの型が異なることも推測される。今回は散発例と集団発生例で検出されたNLVの型別では同様の傾向がみられたが、今後はこの点についても検討する必要があると思われる。

ま と め

冬季に散発的に発生した急性胃腸炎の患者糞便中からHRV、Ad、EV、NLVの検出を試みた結果、約40%からいずれかのウイルスが検出され、そのうちNLVが最も多く約30%であった。主に初冬にはNLVの流行が、晩冬にはHRVの流行がみられ、全国のウイルス性胃腸炎の流行状況と同様であった。

NLVによる集団食中毒事例は散発例と同様に初冬に多くみられ、流行時期がほぼ一致した。散発例と集団発生例から検出されたNLVの遺伝子型はともに多様であったがG2P-C、G2P-ABが多かった。遺伝子解析の結果

G2P-ABはCamberwell類似株であったことからG2P-CならびにG2P-BのCamberwell類似株が主として流行したことが推測された。

謝 辞

集団食中毒発生時の検体採取に協力いただきました各保健所ならびに衛生業務課の担当者の方々に深謝いたします。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，19，1～2 (1998)
- 2) 山上隆也，小澤 茂：山梨衛公研年報，41，38～43 (1997)
- 3) 山上隆也，小澤 茂：山梨衛公研年報，42，55～60 (1998)
- 4) Moe, C. L. et al. : J. Clin. Microbiol., 32, 642～648 (1994)
- 5) 林 志直ら：第36回日本臨床ウイルス学会抄録集，S77 (1995)
- 6) Saitoh, H. et al. : Microbiol. Immunol., 42, 439～446 (1998)
- 7) Ando, T. et al. : J. Clin. Microbiol., 33, 64～71 (1995)
- 8) Kobayashi, S. et al. : J. Med. Virol., in press.
- 9) Inoue, S., Hondo, R. : J. Clin. Microbiol., 28, 1469～1472 (1990)
- 10) Gouvea, V. et al. : J. Clin. Microbiol., 28, 276～282 (1990)
- 11) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報ホームページ，<http://idsc.nih.go.jp/prompt/rota-j.html>
- 12) 川本尋義：検査微生物学(2) ウイルスと原虫・寄生虫感染症の検査診断，74～83，臨床病理刊行会，東京 (1998)
- 13) 中田修二，千葉峻三：Medical Technology, 25, 1188～1198 (1997)
- 14) 周 玉梅ら：第41回日本臨床ウイルス学会抄録集，S25 (2000)
- 15) 浅川洋美ら：病原微生物検出情報，21，144 (2000)
- 16) 武田直和，名取克郎：食品衛生研究，48，65～75 (1998)
- 17) 秋原志穂ら：第39回日本臨床ウイルス学会抄録集，S67 (1998)
- 18) 西尾 治ら：第45回日本ウイルス学会学術集会抄録集，204 (1997)
- 19) 大瀬戸光明ら：愛媛衛環研年報，1，1～5 (1998)
- 20) 大石 功：臨床とウイルス，27，114～126 (1999)