

2005年度に山梨県で発生したノロウイルスによる 食中毒事例とその検査法について

原 俊 吉 山 上 隆 也

Detection of Noroviruses in Case of Food Poisoning in Yamanashi
Prefecture during April 2005 to March 2006

Shunkichi HARA and Takaya YAMAGAMI

キーワード：ノロウイルス，検査法，リアルタイムPCR法

ノロウイルス(NV)は、従来から小型球形ウイルス、ノーワーク様ウイルスの名称で冬季に発生する感染性胃腸炎、食中毒の主な原因ウイルスとして知られていたが、2004年12月～2005年1月に高齢者福祉施設での集団発生が多発したことにより一躍注目されるようになった。

NVは培養細胞によるウイルス分離法が確立されていないため、検査法は遺伝子検査もしくは電子顕微鏡による形態観察に依らざるを得ない。当研究所においては、「ノロウイルス検出法について」(2003年11月5日付け食安監発第1105001号)に準じてRT-PCR法¹⁾とマイクロプレートハイブリダイゼーション法²⁾を組み合わせた方法でNV検査を行ってきたが、2005年12月にリアルタイムPCR法³⁾を導入してNV検査法の一部を変更した。今回は、2005年4月～2006年3月(2005年度)に山梨県で発生したNVによる食中毒事例の概要と検査結果について報告するとともに、従来から実施してきたRT-PCR法と、今回導入したリアルタイムPCR法との若干の比較検討を行ったので報告する。

材料及び方法

1. 検査材料

2005年度に山梨県で発生した食中毒10事例(表1)のうち、7事例の患者59名から採取した糞便59検体、吐物7検体、調理従事者64名から採取した糞便64検体の合計130検体を検査材料とした。

2. 検査方法

糞便、吐物検体からRNAを抽出し、抽出されたRNAについて事例1, 2, 4はRT-PCR法で、事例7～10はリアルタイムPCR法でNV遺伝子の検出を行った。RT-PCR法ではNV陽性検体についてマイクロプレートハイブリダイゼーション法により確認検査を行った。

また、リアルタイムPCR法とRT-PCR法の検査結果を比較検討するため、事例2の9検体についてリアルタイムPCR法で、事例7～9の41検体についてRT-PCR法で追試験を行い、合計50検体について比較した。

表1 2005年度に山梨県で発生した食中毒事例

事例No.	発生日月日	喫食者数	患者数	推定原因食品	原因施設
1	2005年4月4日	20	10	バーベキュー	旅館
2	2005年6月23日	28	10	生食用カキ	飲食店
3	2005年6月29日	19	10	鶏レバー刺	飲食店
4	2005年6月30日	不明	76	簡易水道水	簡易水道
5	2005年7月2日	37	7	不明	飲食店
6	2005年10月13日	7	3	不明	飲食店
7	2006年1月6日	約500	91	不明	病院
8	2006年1月23日	35	24	不明	飲食店
9	2006年3月18日	26	16	不明	飲食店
10	2006年3月26日	88	28	不明	飲食店

1) RNA 抽出

RNA の抽出には RNA 抽出キット QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を使用し、添付文書に従い実施した。糞便は PBS(-) で約 10% 乳剤にした後、10,000 rpm で 10 分間遠心し、その上清 140 μ l を用いた。

2) RT-PCR 法

詳細は図 1 に示した。プライマーペアは表 2 の ALPF を除いた 4 種類を用いた¹⁾。これらのプライマーは NV ゲノムの open reading frame 2 中のジャンクション近傍領域からカプシド領域を増幅するプライマーである。G I 検出用には COG 1 F/COG 1 R, G II 検出用には

COG 2 F/COG 2 R のプライマーペアを用い、G I と G II は別々の反応系で行った。

逆転写 (RT) 反応には Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare) の First-strand reaction mix beads を使用した。ビーズの入ったチューブに DW 27.2 μ l, 50 μ M(-) プライマー 0.8 μ l, サンプル RNA 5 μ l を加えて、37 $^{\circ}$ C 1 時間で RT 反応を行った。

この RT 産物に 5 単位/ μ l Taq DNA ポリメラーゼ (Takara) 0.5 μ l, 50 μ M(+) プライマー 0.8 μ l を含む PCR 反応液 67 μ l を加えて、94 $^{\circ}$ C 1 分, 50 $^{\circ}$ C 1 分, 72 $^{\circ}$ C 1 分の PCR サイクルをサーマルサイクラー (TP 3000, Takara) で 40 回行った。

得られた PCR 産物を 2% アガロースゲル (エチジウムブロマイド添加) で電気泳動 (Mupid ミニゲル泳動槽, ADVANCE) し、UV 照射下で目的のフラグメント長のバンドが認められたものを陽性とした。

3) マイクロプレートハイブリダイゼーション法

RT-PCR 法で陽性の検体について確認検査として実施した。PCR 産物を電気泳動したアガロースゲルから目的のバンドをフナゲルチップ (フナコシ) で切り出し、MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN) を使用して PCR 産物 (DNA) を精製した。精製 DNA について図 2 に示した方法でマイクロプレートハイブリダイゼーション法を行った。プローブの代わりに TE バッファーを加えたものを対照とし、吸光度が 2 倍以上かつ 0.2 以上の差が認められたものを陽性とした。

4) リアルタイム PCR 法

RT 反応及びリアルタイム PCR 法の詳細を図 3 に示した。使用したプライマーペアは表 2 のとおりである³⁾。RT 反応には RT-PCR 法同様に First-strand reaction mix beads を使用した。ビーズを DW 19.2 μ l で溶解し、50 μ M ランダムプライマー (PdN6) 0.8 μ l, サンプル RNA 13 μ l を加えて、37 $^{\circ}$ C 1 時間で RT 反応を行い cDNA を作成した。

リアルタイム PCR は表 3 のとおりに調整した試薬を 45 μ l ずつ 96 穴プレートに分注し、cDNA を 5 μ l 加えて ABI 社の PRISM 7300 にて G I, G II 別々に行った。

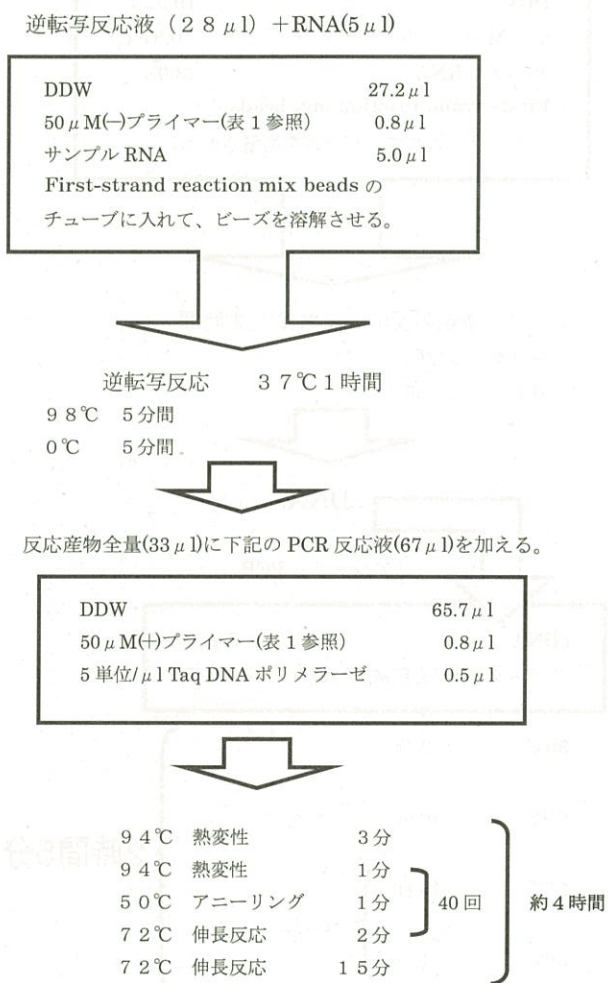


図 1 RT-PCR 法

表 2 プライマーペア

	プライマー	極性	塩 基 配 列	フラグメント
G I	COG1R	(-)	5'-CTTAGACGCCATCATCATTYAC-3'	
	COG1F	(+)	5'-CGYTTGGATGCGNTTYCATGA-3'	85bp
G II	COG2R	(-)	5'-TCGACGCCATCTTCATTCACA-3'	
	COG2F	(+)	5'-CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG-3'	
	ALPF	(+)	5'-TTTGAGTCCATGTACAAGTGGATGCG-3'	98bp

表3 リアルタイム PCR 法の試薬調製

G I		G II	
TaqMan Universal PCR Master Mix	25 μ l	TaqMan Universal PCR Master Mix	25 μ l
4 μ M TaqManプローブ (RING1-TP(a))	4.29 μ l	4 μ M TaqManプローブ (RING2AL-TP)	2.86 μ l
4 μ M TaqManプローブ (RING1-TP(b))	1.43 μ l	100 μ Mプライマー (ALPF)	0.2 μ l
100 μ Mプライマー (COG1R)	0.2 μ l	100 μ Mプライマー (COG2R)	0.2 μ l
100 μ Mプライマー (COG1F)	0.2 μ l	100 μ Mプライマー (COG2F)	0.2 μ l
DDW	13.88 μ l	DDW	16.54 μ l

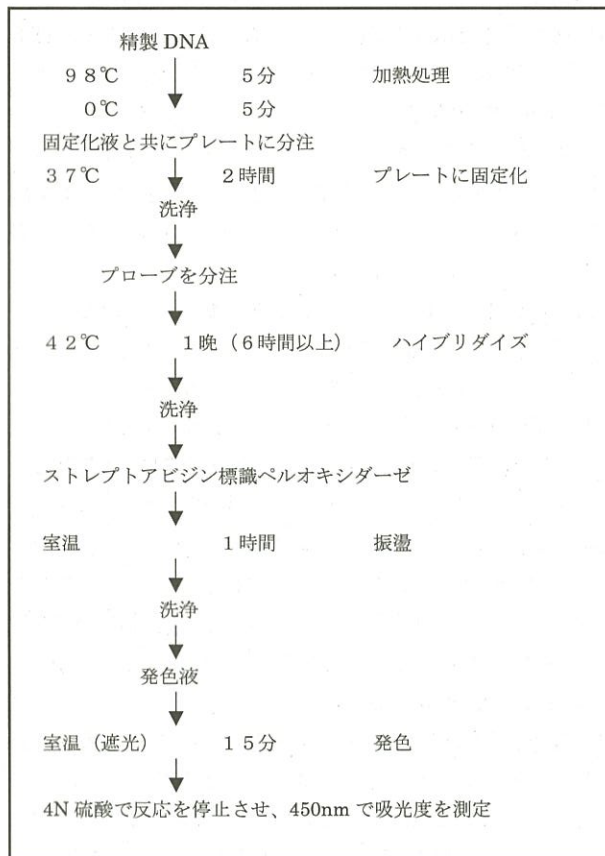


図2 マイクロプレートハイブリダイゼーション法

反応条件は 50°C 2分, 95°C 10分の熱処理後, 95°C 15秒, 56°C 1分の反応を45回行った。G I及びG IIの標的領域をそれぞれ組み込んだプラスミドDNA (国立感染症研究所分与) の $10^7 \sim 10^0$ コピーまでの10倍段階希釈系列を作製して検体と同時にPCRを行い, 作製した検量線からNV遺伝子のコピー数を算出した。コピー数が10コピー以上を陽性として扱った。

結果および考察

1. 食中毒事例について

表1に示したように, 本県では2005年度に10件の食中毒事例があり, ほぼ年間を通じて発生が見られた。原因施設の7割が飲食店であり, 原因食品が推定できたの

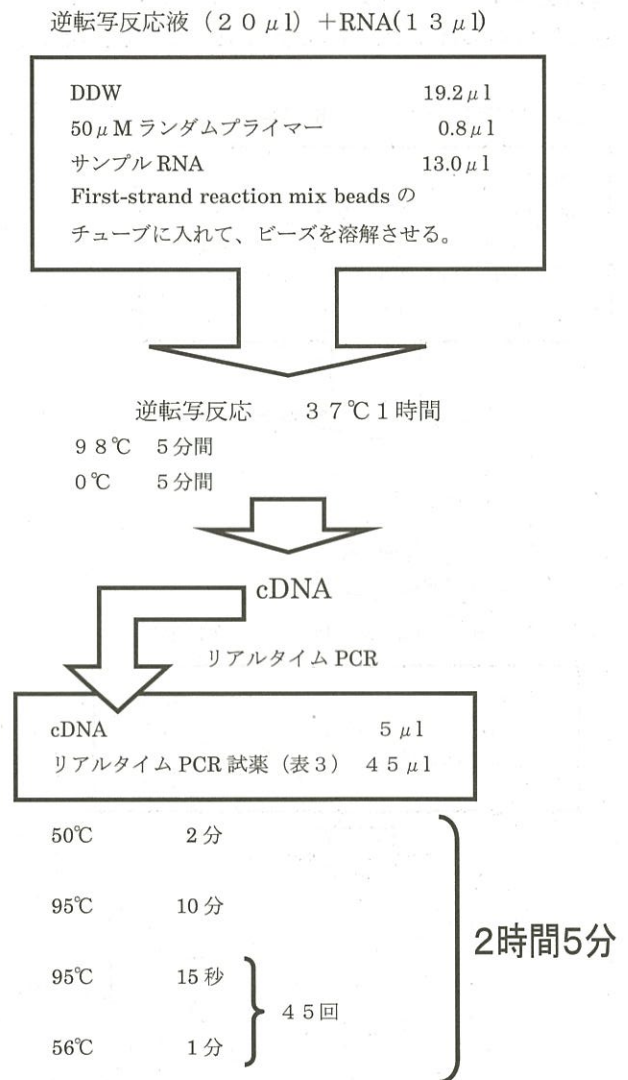


図3 リアルタイムPCR法

は4事例であった。事例4は喫食者数が約500名と比較的規模の大きい食中毒事例であったが, 喫食者数が不明の事例7以外は比較的規模の小さい事例であった。

10事例のうち, 保健所からの依頼によりウイルス検査を実施した7事例の検査結果を表4に示した。検出率は全体で患者糞便60%, 患者吐物100%, 調理従事者糞便14.1%であり, 糞便だけでなく吐物からも高率に検出された。検出されたNVの遺伝子型は事例2では

表4 ノロウイルス検査結果

事例No.	患者				調理従事者		判定
	検査検体数		陽性検体数(%)		検査検体数	陽性検体数(%)	
	糞便	吐物	糞便	吐物	糞便	糞便	
1	0	0	0	0	3	0	—
2	9	0	3 (33.3)	0	2	0	ノロウイルス(G I)
4	4	0	0	0	0	0	—
7	22	7	19 (86.4)	7 (100.0)	47	4 (8.5)	ノロウイルス(G II)
8	15	0	10 (66.7)	0	5	2 (40.0)	ノロウイルス(G II)
9	4	0	4 (100.0)	0	3	3 (100.0)	ノロウイルス(G II)
10	5	0	0	0	4	0	—
計	59	7	36 (60.0)	7 (100.0)	64	9 (14.1)	

G I型、事例7～9ではG II型であった。NVによる食中毒は事例7～9のように一般的には冬季に多発するが、事例2のように夏季においても発生が見られた。夏季におけるノロウイルスによる食中毒は全国的にも少数であるが、散発的に発生が見られている⁴⁾。従って、冬季に限らず一年を通じてNVを考慮した衛生管理が必要であることが示唆された。

2. 検査方法の比較検討

1) 検査所要時間

リアルタイムPCR法の導入によりNV検査法がRT-PCR法からリアルタイムPCR法に変更となった。このため、従来行ってきたPCR産物の電気泳動、陽性検体で行ってきたDNA精製及びマイクロプレートハイブリダイゼーションが不要となり、検査工程と所要時間が短縮された。RT反応後からの所要時間を比較すると、RT-PCR法ではサーマルサイクラーでのPCR反応時間に約4時間、電気泳動に約1時間、ハイブリダイゼーションに約1日を要したのに対し、リアルタイムPCR法ではG I及びG IIのPCR反応時間が各2時間5分で計4時間10分と大差はないものの、ハイブリダイゼーションを実施しないため、約1日早く結果を判定することが可能となった。

このことから、リアルタイムPCR法は従来実施してきたRT-PCR法とマイクロプレートハイブリダイゼーション法を組み合わせた方法と比較して、迅速性に優れたNV検査方法であると考えられた。

2) 検査結果の比較検討

リアルタイムPCR法とRT-PCR法の結果を比較したところ、表5に示すようにリアルタイムPCR法がRT-PCR法に比べてより多くのNVを検出することが可能であった。検査結果が一致したのは50検体中32検体(64%)、結果の一致しなかったのは18検体であった。結果不一致例のうち17検体はRT-PCR法では陰性、リ

表5 RT-PCR法とリアルタイムPCR法の結果の比較

		リアルタイムPCR法		計
		陽性	陰性	
RT-PCR法	陽性	9	1	10
	陰性	17	23	40
計		26	24	50

アルタイムPCR法では陽性であり、残りの1検体はRT-PCR法では陽性、リアルタイムPCR法では陰性であった。RT-PCR法で陽性の検体がリアルタイムPCR法では陰性となる可能性が示唆されるため、今後の検査成績の蓄積が必要であるとともに、検査を実施する上で結果不一致例が多いことに注意を払う必要があると考えられた。

文 献

- 1) 原 俊吉ら：2004年度冬季に山梨県内の高齢者福祉施設で発生したノロウイルス急性胃腸炎集団事例、山梨衛公研年報，48，23～27 (2004)
- 2) 西尾 治，加藤由美子：PCR産物のマイクロプレートハイブリダイゼーションによるノーウォークウイルスの確認および遺伝子型別試験について，日本臨床，60，1175～1180 (2002)
- 3) Kageyama, T. et al. : Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR, J. Clin. Microbiol., 41, 1548～1557 (2003)
- 4) 三好龍也ら：非流行期におけるノロウイルス集団感染事例の特徴—堺市，病原微生物検出情報，26，305～306 (2005)