

## 鹿児島県における海域のウイルス汚染実態調査 及びウイルス性胃腸炎集団発生事例

新川 奈緒美      永田 告治\*      有馬 忠行  
本田 俊郎      吉國 謙一郎      上野 伸広\*\*  
湯又 義勝      西尾 治\*\*\*

### 1 はじめに

*Norovirus* (ノーウォーク様ウイルス, 以下「NV」という。)は、ヒトの間で感染を繰り返しながら、患者の糞便や吐物と共に排泄され、河川、さらには、海域を汚染し、そこに生息する生物は、このウイルスの暴露を受けることになる。そして、ウイルスに汚染された二枚貝などが感染源となり、これをヒトが摂取することにより、再びヒトが感染するサイクルが繰り返されていると考えられている。

厚生労働省に届けられたわが国の2001年の食中毒事件発生状況によると、ウイルス性食中毒は、食中毒事件総数1,928件のうち270件(14%)で、その中でもNVに因るものが269件で99%を占めていた。また、病因物質別の患者数では、1番目に多い7,358人で(全体の28%)で、NVによる食中毒事件の発生は、社会的にも大きな問題となっている。

そこで、2001年4月から2002年2月までに、当センターに検体が搬入されたウイルス性食中毒の発生状況を調査し、原因ウイルス及び原因食品を追究したので報告する。

また、環境水中のウイルス汚染状況を把握するために、自生カキ、プランクトン、海水、県産ヒオウギ貝のNV、*Sapovirus* (サッポロ様ウイルス, 以下「SV」という。), A型肝炎ウイルス(以下「HAV」という。)を検索し、海域のウイルス汚染実態調査を行ったので併せて報告する。

### 2 材料

#### 2.1 自生カキ

2000年4月から2001年3月にかけて採取した県内6地

点(鹿児島市, 東町, 長島町, 加治木町, 福山町, 垂水市)の自生カキ72件及び2001年10月から2002年2月に採取した1地点(鹿児島市)の自生カキ5件, 計77件を用いた。

#### 2.2 プランクトン

2001年10月から2002年2月の期間に1地点の海水50L中のプランクトン4件を検査材料とした。

#### 2.3 ヒオウギ貝

2001年10月から2002年2月に買い上げたヒオウギ貝25個の中腸腺25件を用いた。

#### 2.4 海水

2001年11月に採取した海水10Lからウイルス検出を試みた。

#### 2.5 胃腸炎集団発生事例

2001年4月から2002年2月に発生した胃腸炎集団発生11事例の糞便76件, 吐物9件, 食材43件の計128件を用いた。

### 3 方法

自生カキは、摘出した中腸腺を5gプールし、ヒオウギ貝は、摘出した中腸腺をプールせずに、それぞれPBSで20%乳剤とした後、10,000rpm, 20分遠心した。そして、その上清を30%シュークロースに重層後、35,000rpm, 180分遠心し、pelletを500 $\mu$ Lの蒸留水(DNase, RNase free)に再浮遊し、それをRNA抽出に用いた。プランクトンは、5Lの海水中のプランクトンをストッキングで回収し、3000rpm, 30分遠心後、そのpelletを500 $\mu$ Lの蒸留水(DNase, RNase free)に再浮遊し、RNA抽出に用いた。

胃腸炎集団発生事例の糞便及び吐物は、PBSで10%乳

\* 鹿児島県伊集院保健所 〒899-2501 日置郡伊集院町下谷口1960-1  
\*\* 鹿児島県立大島病院 〒894-0015 名瀬市真名津町18-1  
\*\*\* 国立感染症研究所 〒208-0011 東京都武蔵村山市学園四丁目7番地の1

剤とし、3000rpm、30分遠心後、その上清をRNA抽出に用い、食材は、超遠心後、pelletを500 $\mu$ lの蒸留水(DNase, RNase free)に再浮遊し、RNA抽出に用いた。ウイルスRNAは、QIAmp Viral RNA Miniキット(QIAGEN)を用いて抽出し、DNase I (TaKaRa) 処理後、random hexamer (Amersham Pharmacia)を用いてSuper Script™ II RT (Invitrogen)で逆転写し、cDNAを作製した。cDNAの30 $\mu$ lは、TaqMan Universal PCR Master Mix (ABI社)を用いてReal Time PCRを実施した。

胃腸炎集団発生事例の糞便検体は、1st PCRをCOG1F/G1SKR, COG2F/G2SKRを用いてNVの検出を試み、食材は、COG1F/COG1R, G1SKF/R, COG2F/COG2R, G2SKF/Rを用いてnested PCRを行った。PCR産物は、RING1, RING2プローブを用いて、ドットプロットハイブリダイゼーションを行い、ダイターミネーター法により塩基配列を決定し、系統解析を行った。

#### 4 結果と考察

表1にヒオウギ貝、自生カキ、プランクトン、海水からのウイルス検出状況を示した。ヒオウギ貝からは、2001年12月に採取された検体からNV (G1) が6,780copy/個検出された。自生カキは、2000年6月に始良郡福山町で採捕した検体からSVが3,229copy/個検出された。プランクトン及び海水は、NV, SV, HAVのいずれも検出されなかった。NV, SVは、100個以下でヒトに発症させると言われているので、ヒオウギ貝、自生カキ1個を摂食した場合に発症させ得る十分量のウイルスで汚染されていたことが判明した。また、ヒオウギ貝、自生カキから下痢症ウイルスが見出されたことは、海域がヒトの糞便などで汚染されていることを示している。このことから、海域にヒトの糞便中の微生物が流出しないように公共下水道などのウイルス対策も含めて、環境の整備が今後の課題であると思われる。

2001年4月から2002年2月までに発生した胃腸炎集団発生11事例中10事例からNVが検出された(表2)。事例

4は、会食数日前から胃腸炎患者がおり、嘔吐した有症者の吐物の不適切な処理等により家庭内や忘年会会場でも感染が広がったと推測され、食中毒事件としては扱わなかった。事例10は、共通食が見られなかったことから、大会会場で嘔吐した患者の吐物が端を発したairborneと推定された。その他の8事例は、食中毒と断定された。原因食品の中で貝が直接関連していた事例は、事例1の「貝マヨネーズ焼き」に用いたウチムラサキ貝(中国産、加熱用)、事例2の「寄せ鍋」に入れたカキ(広島産、加熱用)、事例6の「酢の物」に用いたバカガイ(推定、産地不明)であった。事例1, 2は、貝の不完全加熱が原因で発生したと推定され、事例6は、バカガイの不完全加熱が原因であるばかりでなく、加熱前後の貝の取り扱いが同一シンクで行われていたことで二次感染を引き起こした可能性も示唆された。このことから、調理従事者へ貝の取り扱いについての教育の徹底が必要であると思われる。事例3, 5, 7, 8, 9は原因食品を特定することはできなかったが、食品媒介と推定された。

発生時期は、7月に発生した事例1(貝は冷凍保存)を除き、冬季に集中していた。遺伝子型は、G1が事例1, 9の2事例、G2が事例2, 3, 4, 5, 7, 8, 10の7事例で、事例6は、G1・G2が同時に検出された。このことから、2001年4月から2002年2月に当センターに搬入された集団胃腸炎事例で検出されたNVの遺伝子型は、G2が主流であったが、G1との混在であり、多様な遺伝子型が認められた。

NV陽性患者の臨床症状は、下痢(74%)、嘔吐(66%)、嘔気(59%)、腹痛(57%)が主症状であった。下痢便の性状は、大抵が水様便や軟便であったが、事例7では、粘液便が大半を占めていた。そこで、大腸菌との混合感染を考慮し、易熱性毒素(LT)、耐熱性毒素(ST)、侵入性因子(inv)、志賀毒素(VT)についてPCRを試みたが、いずれの毒素も陰性で、NVの単独感染と推定された。

このことから、NVに感染することにより、白血球関与の炎症を惹起して病巣を拡大し、細胞を脱落させた結果

表1 検査材料からのウイルス検出状況(copies/個)

検査材料	例数	陽性数	NV		SV	HAV
			G1	G2		
ヒオウギ貝	25	1	6,780	0	0	0
自生カキ	77	1	0	0	3,229	0
プランクトン	4	0	0	0	0	0
海水	1	0	0	0	0	0

表2 集団胃腸炎の発生状況

事例	発生年月	発生地管轄保健所	患者概要	患者数	発症率 (%)	原因食品等	症 状*	MP/リアルタイムPCR陽性/患者検体	Real time PCR (G1)	Real time PCR (G2)
1	2001.7	徳之島	職場宴会	23	74.2	ウチムラサキ貝	下痢(100%) 嘔気(0%) 嘔吐(1%) 腹痛(1%) 発熱(33%)	2/6	2/2	
2	2001.11	加治木	家庭	3	60.0	カキ(寄せ鍋)	下痢(100%) 嘔気(100%) 嘔吐(100%) 腹痛(50%) 発熱(0%)	2/2		2/2
3	2001.12	出水	職場宴会	8	40.0	会席料理	下痢(50%) 嘔気(100%) 嘔吐(50%) 腹痛(50%) 発熱(0%)	2/3		2/2
4	2001.12	屋久島	幼稚園(忘年会)	76	72.4	-	下痢(43%) 嘔気(0%) 嘔吐(86%) 腹痛(14%) 発熱(0%)	7/9		6/6
5	2001.12	川内	職場忘年会	137	61.2	会席料理	下痢(100%) 嘔気(67%) 嘔吐(83%) 腹痛(50%) 発熱(17%)	6/6		6/6
6	2001.12	鹿屋	職場忘年会	29	74.4	パカガイの酢の物(推定)	下痢(80%) 嘔気(100%) 嘔吐(80%) 腹痛(80%) 発熱(20%)	5/5	5/5	5/5
7	2001.12	川内	高校サッカー大会	72	75.0	旅館の食事	下痢(71%) 嘔気(76%) 嘔吐(53%) 腹痛(59%) 発熱(59%)	17/19		17/17
8	2002.1	鹿児島市	結婚披露宴	309	47.2	披露宴の料理	下痢(100%) 嘔気(60%) 嘔吐(80%) 腹痛(40%) 発熱(0%)	5/5		5/5
9	2002.1	鹿屋	婦人会新年会	8	50.0	新年会の食事	下痢(100%) 嘔気(100%) 嘔吐(100%) 腹痛(100%) 発熱(0%)	1/2	1/1	
10	2002.2	名瀬	小中学校剣道大会	43	-	-	下痢(60%) 嘔気(40%) 嘔吐(60%) 腹痛(90%) 発熱(30%)	10/13		10/10

\* 発熱は38.0を計上

表3 検体中のNV量

事例	検体	陽性数	ウイルス量(copies/g)										遺伝子型	
			<10	10-10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>	>10 <sup>9</sup>		
1	糞便	2							1	1				DSV, Winchester
	貝	2			2									Chiba, Miami, Chitta, Hillingdon,
2	糞便	2					1					1		Hillingdon
3	糞便	2										2		Miami
4	糞便	4							1	1			2	MX
	吐物	2				1		1						MX
5	糞便	6									3	2	1	MX
6	糞便	5						1	1			1	2	Musgrove, Winchester と異なるもの, MX.
7	糞便	16					1	1	2	5	4	3		MX
	吐物	1					1							MX
8	糞便	5									2	1	2	MX
9	糞便	1								1				Southampton
10	糞便	10								1	2	2	5	Miami

として、水分の吸収障害から下痢が起きている可能性もあると推察されるが、今後さらに検討したい。

患者検体から検出されたNVのウイルス量は、検体により大きな差がみられたものの、糞便中に $3.5 \times 10^4 \sim 9.2 \times 10^9$  copies/gと多く含まれていた。吐物は、急性期の検体であり、糞便ほどではないにしても $6.4 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^5$  copies/gと多く含まれていた(表3)。NVの発症量は100個以下と言われていることから、吐物が飛び散った場合に多くのヒトを感染させる量であることが判明した。従って、吐物が不適切に処理されると、ヒトからヒトへの接触感染、またはエアロゾルによる空気感染を成立させることになり、感染が拡大し、長期化する危険性

があることから、吐物の適切な処理方法も含めた衛生教育が必要である。

食中毒などの集団発生の原因や汚染源を迅速かつ正確に特定することは、患者へ適切な治療方法を決定することに寄与できるばかりでなく、集団発生の拡大や二次感染の発生を未然に防止することが可能であり、食品衛生上のみならず、公衆衛生上も非常に重要である。本研究は、衛生教育、予防対策を講じる上でも有用なデータであり、今後も継続して研究していきたいと考えている。

なお、本研究費の一部は、厚生労働省厚生科学研究費補助金による生活安全総合研究の補助により行われた。

## 謝辞

患者情報収集等に協力していただいた生活衛生課及び指宿・川内・宮之城・出水・加治木・隼人・志布志・鹿屋・屋久島・名瀬・徳之島の各保健所職員の方々に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) 厚生労働省；食中毒事件発生状況 (2001)
- 2) 景山努, 他；蛍光プローブを用いたNorwalk virus (NV) の高感度検出法の開発, *Vita*, 18(1), 42-49 (2001)
- 3) P. J Marks, et al; Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurants, *Epidemiol. Infect.* 124, 481-487 (2001)