

平成9年度の集団食中毒における 小型球形ウイルス(SRSV)の検出について

山上隆也 小澤 茂

Detection of Small Round Structured Virus (SRSV) in Case of Food Poisoning
during April, 1997 to March, 1998

Takaya YAMAGAMI and Shigeru OZAWA

小型球形ウイルス(SRSV)は特に冬季に多発する非細菌性急性胃腸炎の主要な原因ウイルスとして知られ、約7.6kbのプラス一本鎖RNAを遺伝子として持つ直径約30nmの小型の球形ウイルスで、遺伝学的解析から、ノーウォークウイルス群、スノーマウンテンウイルス群、サッポロウイルス群の3種類の遺伝子型に大きく分類されている。

ウイルスの検出はSRSVの培養増殖ができないことから、患者糞便中のウイルス粒子を電子顕微鏡により直接確認する方法(EM法)が標準法とされているが、特殊な機器や熟練した技術を必要とする。しかし近年、SRSVの数株については遺伝子の全塩基配列が解読され、RT-PCR法を用いた遺伝子検出が可能となり、EM法に比較して高感度で技術的に簡易であることから、盛んに行われるようになってきた。

しかし、PCR法によるSRSVの検出方法はいまだ確立されておらず、検体の処理方法や使用するプライマー等は各検査機関ごとの判断にまかされている。また、PCR法はその感度の良さのため、他試料の微量の汚染や非特異的増幅による偽陽性の可能性があり、サザンハイブリダイゼーション等による増幅遺伝子の確認検査が必要である。

そこで、当研究所においても以前から検出方法について検討をしていたところ、平成9年5月食品衛生法施行規則の一部が改正され、食中毒の病因物質の種別の欄にSRSVが加えられることとなった。これを受けて集団食中毒発生時に細菌学的検査と併せて患者糞便からRT-PCR法によるSRSV遺伝子の検出を実施したので、平成9年度の概要を報告するとともに若干の知見を得たので併せて報告する。

材料および方法

1. 被検材料

1997年4月から1998年3月の1年間に集団食中毒事例として県内の保健所より搬入された5事例の糞便49

検体を検査対象とした。糞便はウイルス検査用に採取された培地などの混入物の無いものを用いたが、一部のものについては細菌検査用キャリア培地に採取されたものを、培地の混入をできるかぎり最小限にして用いた。糞便が少量のものまたは培地で希釈され採取できないものについては検査対象としなかった。

2. 検査方法

糞便からのSRSVの検出はRT-PCR法で行い、SRSV遺伝子が検出されたものについてマイクロプレートを用いたハイブリダイゼーション法(HYB)^{1,2)}により、増幅遺伝子の確認検査を行った。

(1) 糞便からのRNA抽出

RNAの抽出はRNA抽出キットUltraspec™-3RNA(BIOTECX)を用いた。その方法を図1に示した。糞便

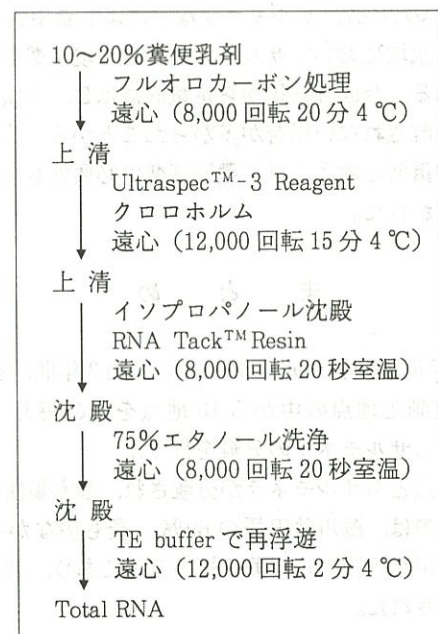


図1 糞便からのRNA抽出

はPBS(-)で10~20%乳剤にした後、等量のフルオロカーボンで処理し、その遠心上清100 μ lにUltraspec™-3 Reagentを1ml、クロロホルムを200 μ l加え、水中で5分間静置した後に遠心した。その遠心上清450 μ lに等量のイソプロパノールを加えて10分間静置した後にRNA Tack™ Resinを20 μ l加えて遠心した。沈殿を1mlの75%エタノールで2回洗浄し、その遠心沈殿物を20 μ lのTE bufferで再浮遊させた遠心上清をRNAとした。

(2) RT-PCR法

RTおよびPCRの方法は図2に示した。プライマーペアは表1のとおりノーワークウイルスゲノムのopen reading frame (ORF) 1中のRNAポリメラーゼ部位を増幅するプライマー³⁾を2つの組み合わせで用いた。

サンプルRNAは3.5単位AMV逆転写酵素(生化学工業)、1.67 μ M(-)プライマー、0.67mM dNTPs (Takara)、18単位RNA分解酵素阻害剤 (Takara)、6.7mM Dithiothreitolを含む逆転写反応液中で42°C、1時間の逆転写を行い、これに1.25単位Taq DNAポリメラーゼ (Takara)、0.71 μ M(+)プライマーを含むPCR反応液35 μ lを加えて、94°C 1分、50°C 1分、72°C 1分のPCRサイクルをサーマルサイクラー(PJ2000, Perkin-Elmer)で40回行った。2段階目のPCR(nested PCR)は行わずに1段階目のPCR(first PCR)で判定した。

得られたPCR産物を1%アガロースゲルで電気泳動(MUPID-2, COSMO-BIO)し、エチジウムブロマイド染色後、UV照射してサイズマーカーを指標に目的とする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

ハイブリダイゼーションは図3のとおり行った。PCR産物6 μ lを1%アガロースゲルで電気泳動してバンドを切り出し、NaIでゲルを溶解後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を使用法のとおり用いてPCR産物を精製、マイクロプレートに37°C、2時間固定化した後、ビオチン標識プローブと42°C、1晩ハイブリダイズし、これをペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで検出した。450nmで吸光度を測定し、プローブを入れていない対照と比較して吸光度が2倍以上でかつ0.2以上の差が認められたものを陽性とした。

SRSV 検出を実施した集団食中毒事例

1996年4月から1997年3月の1年間にウイルス性食中毒を疑われ、SRSVの検出を実施した集団食中毒5事例を表2に示し、以下にその概要を示した。

1. 事例 1

平成9年7月21日から26日の予定で合宿にきた県外の高校生とその引率者156名がY村の旅館に宿泊したが、

逆転写反応液(15 μ l)

| | |
|--------------------------|-------------|
| DDW | 4.0 μ l |
| 2.5mM dNTPs | 4.0 |
| 10 \times PCR 緩衝液 | 1.5 |
| 18U/ μ l RNA 分解酵素阻害剤 | 1.0 |
| 100mM Dithiothreitol | 1.0 |
| 3.5U/ μ l AMV 逆転写酵素 | 1.0 |
| 50 μ M (-) プライマー | 0.5 |
| Total RNA | 2.0 |

逆転写反応 42°C 1時間

PCR 反応液(35 μ l)

| | |
|-----------------------------|-------------|
| 10 \times PCR 緩衝液 | 3.5 μ l |
| 50 μ M (+) プライマー | 0.5 |
| 5 U/ μ l Taq DNA ポリメラーゼ | 0.25 |
| DDW | fill up |

PCR 94°C 3分 熱変性
94°C 1分 熱変性
50°C 1分 アニーリング } 40 サイクル
72°C 1分 伸長反応
72°C 15分 伸長反応

図2 RT-PCR法

うち60から70名が24日午前3時頃から嘔吐、下痢、発熱の症状を訴え医療機関を受診した。患者数は85名にのぼった。細菌検査の結果、患者糞便48検体中7検体から病原大腸菌が検出された。

2. 事例 2

平成9年12月21日から25日の予定で部活動にきていた県外のB高校合唱部員36名がY村にあるB高校直営の学校寮に宿泊したところ、23日午後8時頃から19名が嘔吐、下痢、発熱を訴え、10名が医療機関を受診した。共通食は学校寮の食事および外注弁当であったが、外注弁当は他からの苦情、発症がないことから、寮における集団食中毒が疑われた。細菌検査の結果、患者糞便8件中4件から病原大腸菌が検出された。

3. 事例 3

平成10年1月9日から13日の予定でN県に集中講義に出かけていた県内A大学の学生および教員61名中の18名が、11日から下痢、嘔吐、発熱等の症状を呈しているとの連絡が校医から入った。発症者数は合計31名にのぼった。1月9日の夕食から宿泊先の旅館で食事をしており、この食事が原因ではないかと疑われた。患者糞便から細菌検査の結果、患者糞便19件中2件から病原大腸菌O1が検出された。

4. 事例 4

平成10年1月31日、A村保健婦からの情報としてA村内の小学校で生徒約20名が下痢、発熱、腹痛の症状

表1 RT-PCR プライマーペア

| | プライマー | 極性 | 塩基配列 | フラグメント |
|---|-------|-----|-----------------------------|--------|
| 1 | NV35' | (-) | 5'-CTTGTGGTTGTTGAGGCCATA-3' | 470bp |
| | NV36 | (+) | 5'-ATAAAAAGTTGGCATGAACA--3' | |
| 2 | NV81 | (-) | 5'-ACAATCTCATCATCACCATA-3' | 330bp |
| | NV82 | (+) | 5'-TCATTTTGGATGCAGATTA---3' | |
| | SM82 | (+) | 5'-CCACTATGATGCAGATTA---3' | |

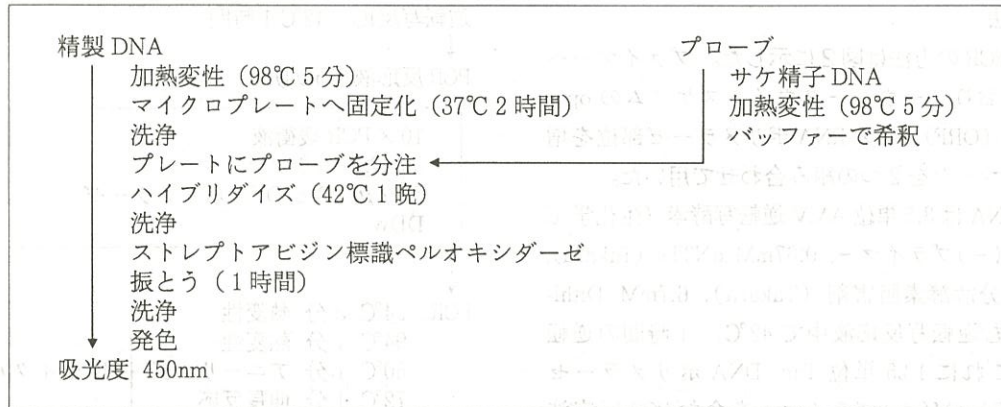


図3 マイクロプレートハイブリダイゼーション法

表2 SRSV の検出を実施した集団食中毒事例

()内は検出数

| 事例 | 発生日 | 検査日 | 発生場所 | 摂食者数 | 患者数 | 原因施設 | その他の検査結果 |
|----|----------|-------|------|------|-----|------|---|
| 1 | 97. 7.24 | 8. 7 | Y村 | 156 | 85 | 旅館 | 病原大腸菌 O1(4), 18(1), 26(1), 168(1) |
| 2 | 97.12.23 | 12.25 | Y村 | 36 | 19 | 学校寮 | 病原大腸菌 O1(2), 18(1), 126(1) |
| 3 | 98. 1.11 | 1.15 | N県 | 61 | 31 | 旅館 | 病原大腸菌 O1(2) |
| 4 | 98. 1.30 | 2. 3 | A村 | 不明 | 20 | 給食施設 | ヒスタミン(マグロ竜田揚げ 5 mg/100g、原材料 500mg/100g) |
| 5 | 98. 2.15 | 2.20 | K市 | 14 | 10 | 飲食店 | |

を呈しているとの連絡が保健所に入った。

A村では村内の中学校1校、小学校3校の給食を共同調理施設で調理しており、4校分で約350食を調理していた。発症者は1月30日に4校で約49名が出て以降みられなかった。喫食調査によると1月30日に給食のマグロの竜田揚げを食べた直後に口中に刺激を感じ、その2～4時間後には発赤、拍動亢進、嘔吐、下痢、発熱を呈したとのことから学校給食が原因と推定された。高速液体クロマトグラフ法によりヒスタミンがマグロ竜田揚げ(5 mg/100g)およびその原材料(500mg/100g)から検出された。

5. 事例 5

平成10年2月15日午後11ごろ、県内のI大学の教員14名が会食し、内10名が翌16日から下痢、腹痛、発熱、嘔吐を呈して発症した。7名は回復しており病院を受診して細菌検査を行っているとのことから、症状のある2名についてウイルス検査の依頼を受けた。

結果と考察

1. 集団食中毒における SRSV 遺伝子検出結果

RT-PCRを実施した集団食中毒5事例49検体のうち3事例17検体にSRSV遺伝子が検出され、マイクロプレートハイブリダイゼーションにより増幅遺伝子の確認検査を行い、2事例11検体が陽性と確認された(表3)。

SRSV遺伝子が検出された事例3において細菌学的検査の結果、患者糞便中から病原大腸菌O1が2件検出されているが、その検出率の低さ(約10.5%)から病原大腸菌O1とこの事例における食中毒との関連性は低いものと思われた。

2. SRSVによる集団食中毒事例の検討

(1) 発生時期

今回の検査対象とされた集団食中毒5事例は疫学的調

表3 集団食中毒における SRSV 遺伝子検出結果

| 事例 | 検体数 | | | PCR陽性数 (%) | | | HYB陽性数 (%) | PCR/HYB陽性数 (%) |
|----|-----|---------|----|------------|----------|-----------|------------|----------------|
| | 糞便 | キャリブレア. | 計 | 糞便 | キャリブレア. | 計 | | |
| 1 | — | 14 | 14 | — | 0 | 0 | — | 0 |
| 2 | — | 8 | 8 | — | 6 (75.0) | 6 (75.0) | 0 | 0 |
| 3 | 5 | 11 | 16 | 5 (100) | 5 (45.4) | 10 (62.5) | 10 (100) | 10 (62.5) |
| 4 | — | 10 | 10 | — | 0 | 0 | — | 0 |
| 5 | 1 | — | 1 | 1 (100) | — | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) |

*キャリブレアー培地に採取された糞便

査結果、細菌学的検査結果からウイルス性が疑われたものであるが、その発生時期を見ると12～2月の冬季に発生したものが4事例あった。また、SRSVが検出された2事例は1,2月に発生しており、ともに冬季であった。

(2) 臨床症状

SRSVが検出された事例5の発症者10名の主な臨床症状を図4に示した。最も多かったのは下痢、吐き気(80%)で、次いで悪感(60%)、腹痛(50%)、発熱(40%)、嘔吐、頭痛(30%)であった。SRSVによる胃腸炎の特徴である激しい嘔吐は比較的低い率であった。

(3) 原因食品の推定

SRSVが検出された事例3と5の喫食調査の結果、事例3では当該旅館で数日間にわたって食事をしていることから原因食品を特定することはできなかったが、事例5では特定の飲食店においてカキを生食していることが判明しており、生カキが原因食品と推測された。SRSVが検出されなかった事例では、原材料のカジキマグロとその食品からヒスタミンが検出された事例4を除き、事例1,2では原因食品を特定することはできなかった。

厚生省研究班の調査⁴⁾によると、非細菌性胃腸炎の集団発生事例のうち最も多い約35%がカキの生食に関連したものであるとされ、SRSVの感染源として生カキが重要であることを指摘している。また、我が国における

SRSVの流行が冬季に集中する⁵⁾のはカキの最盛期が冬であることに関係していると思われる。今回の検査対象である集団食中毒事例は冬季に集中しており、またSRSVが検出された2事例はともに冬季に発生していることから、上述の知見と一致する結果であった。

しかし、カキを含め食品中に含まれるウイルス量は糞便中のそれよりも極めて少なく、EM法の検出感度(10⁶粒子/g)では検出することはできない。また食品中から検出された株と患者糞便から検出された株の遺伝子型が異なる例や、同一事例で他の遺伝子型が検出される例⁶⁾があるなど、因果関係の証明は難しい点が多い。このことから現時点ではSRSVによる集団食中毒の原因食品は疫学的調査の結果から判断しているのが実状であり、SRSVの感染経路の究明を困難にしている一因であると思われる。

3. 糞便からの SRSV 検出方法の検討

(1) 糞便からの RNA 抽出

RT-PCRに用いるRNAの抽出方法はキットとして市販されているものを含めさまざまであるが、陽イオン性界面活性剤であるCTABを用いたCTAB法⁷⁾は検体中のPCR阻害物質の除去に有効であり、非常に不安定なSRSVの一本鎖RNAを取り扱ううえで特に重要であるRNA分解酵素も除去することができる方法とされている。平成9年5月30日付け厚生省生活衛生局「食品衛生法施行規則の一部改正等について」に別添された小型球形ウイルスの検査方法としても参考に示されている。しかしこの方法は検査に手間と時間を要するため、短時間で簡単にRNAを抽出できる方法が望まれている。今回、糞便からのRNA抽出はRNA抽出キットUltraspecTM-3RNAを使用した。これはフェノールとグアニジンを含む溶液UltraspecTM-3Reagentで検体中のタンパク質を取り除き、RNA TackTMResinでRNAを吸着させて抽出する方法である。このキットは短時間で簡単にRNAの抽出ができることから、集団食中毒発生時の緊急検査には適した方法であると思われるが、CTAB法を含めた他の抽出

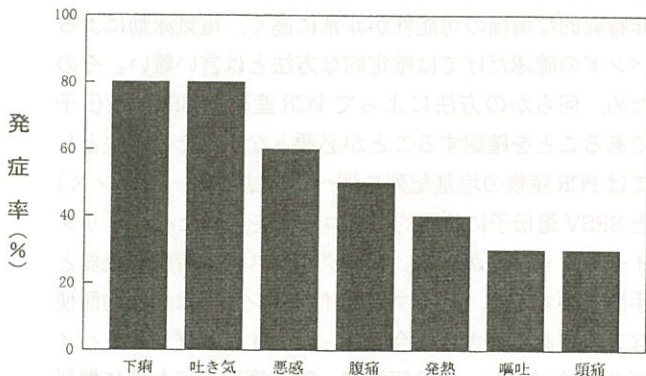


図4 事例5における発症者の臨床症状

方法と検出成績を比較検討することが今後の課題であると考えている。

(2) 糞便検体の採取について

SRSV の検出を行うための糞便の採取は細菌学的検査とは異なりキャリブレア培地には採取せずに、糞便のみを採取搬入することが望ましい。これはキャリブレア培地によって糞便が希釈されてしまうこと、培地中の成分がPCRを阻害する可能性があると考えられるためである。事例3において検出率を比較してみると、糞便のみの検体は全ての検体でSRSV 遺伝子が検出されているのに対して、キャリブレア培地に採取された検体では45%と半分以上に低下していた。この結果は今回使用したRNA抽出キットがキャリブレアに採取された糞便中のPCR阻害物質を除去できなかったと考えることもできるが、糞便のみの検体からは高率に検出されていることから、糞便の採取、搬入を適切に行うことによって本キットは有用であると思われる。今回、このような結果となったのは、検体が培地によって希釈されてしまい実質的な糞便量が少量になってしまったことが大きな要因であると考えられる。

(3) RT-PCR 法について

PCR 法は感度の良さ、検査の簡便さから普及している方法であるが、その反面、他試料の微量の汚染により偽陽性の結果を生じてしまう可能性がある。特にPCR産物はそのDNAのコピー数が多く、器具等に付着したものが混入すれば確実な汚染源となる。SRSV のPCR法による検出は、糞便中のウイルス量が少ないこと、非特異的増幅を排除することから一般にnested PCRが行われる。しかし、first PCRで検出することができないウイルス量では患者の発症との関連性が明確ではないこと、非特異的増幅に関しては複数のプライマーを用い、ハイブリダイゼーションで確認検査をすることから、検査過程での汚染による偽陽性の防止を第一に考えてnested PCRは行わなかった。

(4) プライマーについて

プライマーペアはノーウォークウイルスゲノムのORF1中のRNAポリメラーゼ部位の4475~4944を増幅するプライマーNV35', NV36, とさらにその内側である4673~4878を増幅するプライマーNV81, NV82, SM82を用いた。プライマーNV35'はNV35プライマーの3'末端のチミンを取って20merにしたものである。プライマー別の検出成績を表4に示した。

SRSVはその遺伝子型の種類が多く変異をしやすいこと、またその変異が大きいことから1ペアのプライマーを使用することでは検出されない可能性があり、他の領域を含めた複数のプライマーを用いることが必要である。今回は2ペアのうちのどちらか片方でも検出されたものを陽性とした。陽性の3事例は全例とも両ペアで検出さ

表4 プライマー別検出成績の比較

| 事例 | プライマー別陽性数 | | PCR 陽性数 |
|----|-----------|--------------|---------|
| | NV35'-36 | NV81-82/SM82 | |
| 2 | 6 | 6 | 6 |
| 3 | 10 | 9 | 10 |
| 5 | 1 | 1 | 1 |
| 合計 | 17 | 16 | 17 |

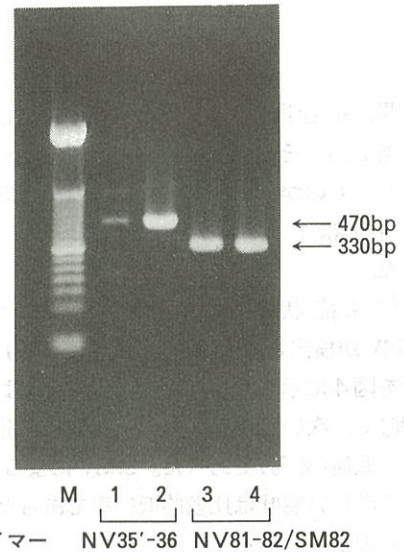


図5 プライマーによる検出成績の違い

- 1, 3: 事例2の1検体
- 2, 4: 陽性対照
- M : サイズマーカー

れたが、バンドの濃さに違いがみられたり(図5), 1つのプライマーペアでしか検出されない検体があるなど、株によってプライマーの特異性が異なること、同一事例でもプライマー特異性の異なる株が混在していることが示唆された。

(5) マイクロプレートハイブリダイゼーション法

SRSV のRT-PCRによる検出は糞便中のウイルス量が極めて少ないことに加えて交雑物が多いことなどにより、非特異的な増幅の可能性が非常に高く、電気泳動によるバンドの確認だけでは確定的な方法とは言い難い。そのため、何らかの方法によってPCR産物がSRSV 遺伝子であることを確認することが必要となる。その方法としてはPCR産物の塩基配列を調べる方法(シークエンス)とSRSV 遺伝子に特異的なプローブを用いたハイブリダイゼーションとがある。シークエンスには特殊な機器と手間を要するが、ハイブリダイゼーションは比較的簡便な方法である。さらに今回行ったマイクロプレートハイブリダイゼーションは恒温槽、吸光度計のほか特に機器を必要とせず、手技も簡便であることから集団食中毒発

生時の緊急的な確認検査には適した方法であると思われる。

しかし、SRSVは遺伝子型の種類が多く、またその変異が大きいことからPCRプライマーと同様に同一プローブが全てのSRSV遺伝子と特異的に結合するとは限らず、そのような場合には偽陰性となってしまいます。このことからハイブリダイゼーションを行う際はプローブの選択が重要となってくる。事例2ではPCRで両プライマーペアともに検出されているにも関わらずハイブリダイゼーションでは全て陰性になっている。これは上述のようにプローブとの特異性が低く、検出されなかったものであると推測されるが、PCRでの非特異的増幅の可能性も否定できないことから、シーケンスによる確認検査が必要であると思われる。また、当研究所には電子顕微鏡は設置されていないが、RT-PCR法とEM法を併せて行い、結果を比較検討することが必要であると思われる、今後検討したいと考えている。

ま と め

- 1) 平成9年度の1年間に発生した集団食中毒事例のうち5事例49検体についてSRSV検査を実施し、2事例11検体からRT-PCR法およびマイクロプレートハイブリダイゼーション法によりSRSVが検出され、そのうち1事例は生カキが原因食品と推定された。
- 2) キャリブレーション培地に採取された糞便からの検出率は糞便のみのものより低かった。
- 3) プライマーの種類によって検出成績に若干の相違が認められることから、複数のプライマーを用いることが必要であると思われる。
- 4) RT-PCR法が陽性にもかかわらずハイブリダイゼーション法で陰性となる事例があり、プローブの改善とシーケンスによるPCR産物の再確認が必要であると考えられた。

- 5) RT-PCR法による検出には限界があり、RT-PCR法とEM法を併せて実施することが必要であると考えられた。

SRSVの検出を実施した平成9年度の集団食中毒事例のうち、今回の報告とは異なるプライマーを用いた検出例については今回の報告対象には含めなかった。また、細菌学的検査については生物研究専門部細菌科で、化学的検査については衛生研究専門部食品・医薬品科で実施した。

謝 辞

集団食中毒発生時の疫学的調査にご協力いただきました各保健所の担当者の方々、衛生業務課の担当者の方々に深謝いたします。また、プローブを分与いただきました国立公衆衛生院の西尾 治博士に深謝いたします。

文 献

- 1) 西尾 治：病原微生物検出情報（国立感染症研究所編），19, 6（1998）
- 2) 西尾 治ら：第45回日本ウイルス学会総会抄録，204（1997）
- 3) Moe, C. L. et al. : J. Clin. Microbiol., 32, 642~648（1994）
- 4) 厚生省食品媒介性ウイルス性胃腸炎集団発生実態調査研究班：「最近5年間の食品媒介性胃腸炎集団発生全国実態調査」総合報告書，1~38（1995）
- 5) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，19, 1~2（1998）
- 6) 内山 康裕ら：第39回日本臨床ウイルス学会抄録，69（1998）
- 7) Jiang, X. et al. : J. Clin. Microbiol., 30, 2529~2534（1992）