

高等学校剣道部合同合宿にて発生した食中毒事例

徳島県保健環境センター

嶋田 啓司・山本 保男・岡田 貴志

The Case of Food Poisoning in Joint Kendo Club's Training Camp of High Schools

Keiji SHIMADA, Yasuo YAMAMOTO and Takashi OKADA

Tokushima Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences

Abstract

In March 26, 2001, a case of food poisoning occurred at the Kendo club's training Camp of high schools. We detected Norwalk-like virus (NLV) from fecal specimens of patients. We suspect this may have contaminated the lunch boxes served on March 24 and 25. However, after investigate the cook and food ingredients, the source of food contamination could not be found.

RT-PCR method, Hybridization, electron microscope and EIA method, we used to identify the virus, but the results were not unanimous. We think that several methods must be used to ascertain the validity of the results.

Key words: ノーウォーク様ウイルス norwalk-like virus, RT-PCR 法 RT-PCR method, 食中毒 food poison

I はじめに

ノーウォーク様ウイルス (以下 NLV) は、主に冬期に多発する非細菌性食中毒の原因ウイルスとして重要な位置を占め、牡蠣など特に二枚貝の生食との関連が指摘されている¹⁾。また近年、二枚貝の生食とは関係のない学校・福祉施設などで、当該ウイルスによる集団胃腸炎事例も報告されるようになってきた^{2), 3)}。徳島県においても平成13年3月、高等学校にて発生した食中毒事例において、NLV が原因と考えられる事例を経験したので報告する。

II 事例概要

平成13年3月24日から26日まで、徳島県内外28校、303人(教員、保護者を含む)が参加した徳島県高等学校剣道部合同合宿にて、多くの参加者が食中毒症状を呈していると保健所に通報があった。管轄保健所による喫食及び疫学調査の結果、発症者の共通食は3月24、25日の両日、徳島県内の飲食店(仕出し料理)で調理配達された昼食弁当しかないことから、この料理店が原因施設と判断された(表-1)。原因食品喫食者275人中、発症者152人(発病率55.3%)、主な臨床症状は吐き気、腹痛、下痢、嘔吐、発熱などを訴え(表-2)、3

月24日深夜から29日まで長時間にわたり患者発生が見られた(図-1)。

III 検査対象

検査対象は、発症者から提供された糞便33検体、一部の調理従事者から提供された糞便2検体、食材については24日分の弁当は採取できず、25日分弁当惣菜等11検体とした。

表-1 事例概要

発生年月日	平成13年3月26日
発生場所	徳島県阿南市
原因施設	徳島県 飲食店「仕出し料理」
原因食	昼食弁当
喫食年月日	平成13年3月24日及び25日
喫食者数	275名 (3/24 242名, 3/25 268名)
有症者数	152名 (3/24 142名, 3/25 150名)
潜伏時間	9~113時間30分 (24日喫食) 1~89時間30分 (25日喫食)

表-2 臨床症状

症状	下痢	発熱	吐き気	嘔吐	腹痛	倦怠感
患者数(人)	95	83	147	61	96	100
率(%)	62.5	54.6	96.7	40.1	63.2	65.8

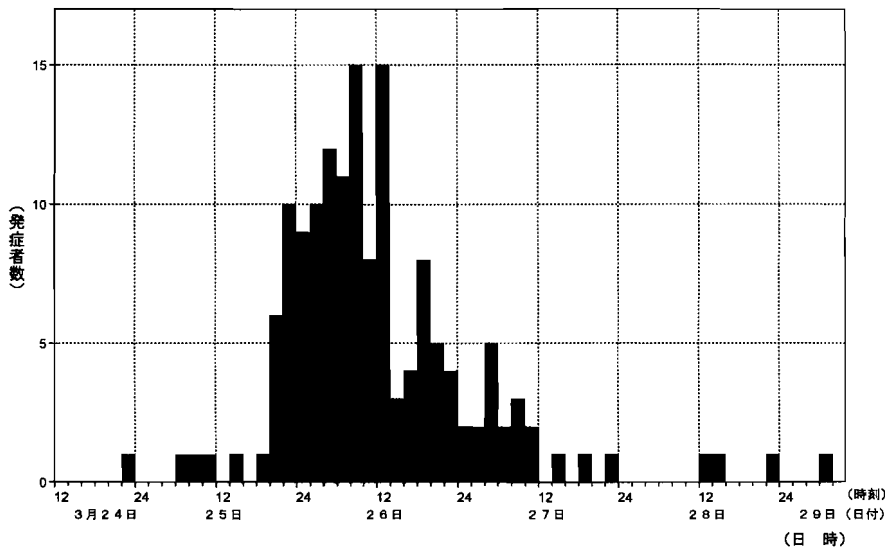


図-1 発症時刻の分布

IV 検査方法

NLVについてはまずRT-PCR法を実施し、陽性検体のみハイブリダイゼーション、電子顕微鏡検査（以下EM検査）による確認検査を行い、EIA法キット（国立感染症研究所より分与）も添付説明書に従い追試した。またロタウイルス、アデノウイルスの検出は、市販のラテックス凝集試薬（第一化学薬品）を使用し糞便検体のみ添付説明書に従い実施、同時に一般食中毒細菌検査も行った（図-2）。

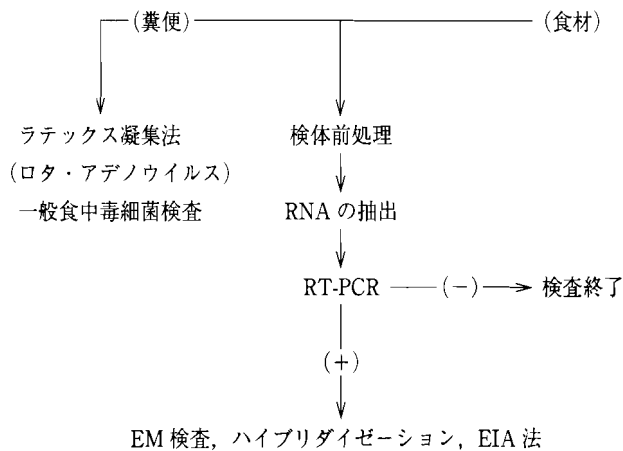


図-2 食中毒事例検査手順

検査対象からのRT-PCR法、EM検査によるNLVの検出は、既報⁴⁾に準じて行った。なお、RT-PCR法に用いたプライマーは、糞便検体についてはNV81/82, SM82, Yuri22F/R, SR33/48, 50, 52（以下SR1）、SR33/46（以下SR2）、4種のプライマーを用い1stPCRの系で実施、食材についてはNV35'/36, NV81/82, SM82のNested PCRの系で実施した。

またNV系プライマーを使用して得られたPCR産物についてはマイクロプローブハイブリダイゼーション（2000年度

公衆衛生院プローブ5種による）、SR系プライマーを使用して得られたPCR産物についてはドットハイブリダイゼーション（Ando⁵⁾らのプローブ6種による）を実施、遺伝子型別を確認した。

V 結果

発症者糞便33検体のうちRT-PCR法で19検体から特異バンドが認められ、プライマー別の陽性数はNV系13検体、SR1で12検体、SR2は4検体であり、プライマー毎に陽性となる検体は異なっていた。またYuri系は9検体につき検査したがすべて陰性で

あった。

PCR産物を用いたハイブリダイゼーションの結果、Genogroup I（以下GI）型が10検体、Genogroup II（以下GII）型が1検体確認された。複数の遺伝子型が確認されたもののGI型が大半を占め、8検体はプローブと反応しなかった。

次にRT-PCR法で陽性を示した糞便からのEM検査では、13検体中8検体からウイルス粒子が確認された。一方、EIA法では12検体のうち、GI・GII型両方陽性が1検体、GII型のみ陽性が4検体検出され、GII型が多く認められた。検出率はEM検査と比べ若干低く、同一検体でハイブリダイゼーションの結果と遺伝子型が異なる検体（検体番号2、4）もみられた（表-3）。

調理者糞便については、RT-PCR法で2検体のうちSR1で1検体特異バンドが認められたが、ハイブリダイゼーションで反応は見られず遺伝子型の確認は出来なかった。EM法でもウイルス粒子は認められず、EIA法も陰性であった。

次に収去できた弁当惣菜等11検体についてRT-PCR法を実施したが、全検体陰性であった。その他、ロタウイルス、アデノウイルスは糞便につき全検体検査したが陽性検体は認められず、一般食中毒細菌検査についても特定の細菌は検出できなかった。

VI 考察

今回の事例において、発症者糞便からNLVが検出され、ロタウイルス、アデノウイルスは陰性、一般食中毒細菌検査からも特定の細菌は検出されなかったこと、さらに発症者の臨床症状と考えあわせNLVが原因であると考えられた。次に喫食及び疫学調査の結果、2つの宿舎に宿泊したグループ、宿泊しなかったグループいずれも発症率に隔たりは見ら

表-3 NLV 検査結果

検体 番号	プライマー				ハイブリ	EM	EIA
	NV(*1)	Yuri(*2)	SR1(*3)	SR2(*4)			
5	+	-	-	-	GI	-	-
30	+	N.T	-	-	-	-	GII
36	+	N.T	-	-	GI	N.T	N.T
2	+	-	+	-	GI	+	GII
4	+	-	+	-	GI	+	GII
15	+	N.T	+	-	GI	+	-
20	+	N.T	+	-	GI	+	-
31	+	N.T	+	-	GI	+	-
33	+	N.T	+	-	GI	-	-
35	+	N.T	+	-	GI	N.T	N.T
37	+	N.T	+	-	-	N.T	N.T
38	+	N.T	+	-	GI	N.T	N.T
16	+	N.T	-	+	-	+	GI・II
10	-	-	+	-	-	N.T	N.T
19	-	N.T	+	-	-	-	N.T
34	-	N.T	+	-	-	+	-
6	-	-	-	+	-	+	GII
8	-	-	-	+	GII	N.T	N.T
23	-	N.T	-	+	-	-	-

* 1) NV81/82, SM82 * 2) Yuri22F/R * 3) SR33/48, 50, 52
* 4) SR33/46

れず、共通食は24及び25日の昼弁当しかなかった。またどちらか一日のみの喫食者からも発症者がみられたこと（25日のみ喫食者糞便からはNLVを検出）、長時間にわたり患者発生が見られたことから考え、24及び25両日の昼弁当が、原因食と推定された。なお、宿泊施設の使用水はいずれも上水であり、同時期に当該地域における集団胃腸炎の報告は他にみられていない。

NLVの一般的感染経路として、下水等から流れ出たウイルスに汚染された牡蠣などの二枚貝を、ヒトが生で食する経路が考えられる。また佐原ら⁶⁾は、牡蠣が直接関連しない経路として、ウイルスに汚染された食品が調理の課程で他の食品等を二次的に汚染する経路、ウイルスを保有する調理人等が直接食品を汚染する経路、介護人等から直接ヒトへ感染する経路などを推定している。今回の推定原因食のメニューは煮物・揚げ物・焼き物など加熱調理されたものが殆どであり、惣菜別の χ^2 乗検定でも有意差は見られなかった。しかし調理施設への立ち入り調査では、手洗い設備の不備、調理器具・食品等の衛生的保管庫の不足などを指摘された。また調理能力を超えた調理を行い、素手で盛りつけを行うなど、調理従事者にとって基本的な遵守事項についての認識不足もあった。さらに二日間にわたってNLVに汚染された食

品が提供されたことなどもふまえ、今回の事例は調理設備自体の汚染により、盛りつけの時点で二次的に食品へのウイルス汚染があったと推察された。

遺伝子解析の進展により、NLVの遺伝的多様性が報告されるようになった⁷⁾。今回、RT-PCR法に一般的な4種類のポリメラーゼ領域を増幅するプライマーを用いたが、プライマー毎に陽性となる検体は異なっており、うち1種類のプライマーは検査した検体全て陰性であったことから、種類の少ないプライマーでは検出率の低下が予想された。

RT-PCR産物を用いてのハイブリダイゼーションで、11検体からGI・GII両方の遺伝子型が確認されGI型が大半を占めた。しかしEIA法の結果と遺伝子型の異なる検体（検体番号2、4）や、EIA法が陽性を示しているにもかかわらず反応しなかった検体（検体番号6、16、30）もみられた。これら5検体のうち4検体はEM検査によりウイルス粒子が確認されており、このことは混在するウイルスの量的なことが原因と考えるより、ハイブリダイゼーションに用いた数種のプローブの反応性、もしくはRT-PCRに用いたプライマーの増幅効率が、本事例のGIIウイルスに対し若干低かったと推測される。一方、EIA法では12検体のうちGI・GII型計5検体が陽性を示したが、ハイブリダイゼーションの結果とは逆にGII型が多く検出された。EIA法のみGII型陽性の検体（検体番号30）も見られたが、EM検査にてウイルス粒子が認められ、ハイブリダイゼーションでGI型が確認されているにもかかわらず、EIA法陰性の検体（検体番号15、20、31、33）も見られた。以上の結果を踏まえ今回用いたEIAキットは、本事例のGII型ウイルスに対しては感度が良かったものの、GI型に対しては少し低かったように思われる。いずれにしても本事例のように遺伝子型の違う複数のウイルスが関与する食中毒発生時には、RT-PCRにはより多くのプライマーを選択し、時間的・費用面も考えながらEM検査、EIA法など遺伝子検査とは別な検査法も併用する必要があると考えられた。

現在、それら遺伝的に多様なNLVを高感度に検出できるプライマーや、短時間で容易にNLVを検出可能なEIAキットなどが研究、報告^{7),8)}されている。今後、当施設においてもより広範な遺伝子型の検出を目指し、増幅領域の違ったプライマーを追加するなど検討を加える予定である。

Ⅶ まとめ

平成13年3月26日、徳島県にて開催された高等学校剣道部合同合宿にて発生した食中毒事例発症者糞便から、RT-PCR法、ハイブリダイゼーション、EM検査にてNLVを検出した。さらに一般食中毒細菌検査結果、発症者の臨床症状等とも考えあわせNLVが原因であると考えられた。また保健所

による喫食調査の結果、発症者の共通食は昼食弁当のみであり、3月24、25日どちらか1日だけの喫食者からも発症していること、経時的発症時間からも24、25両日の昼弁当が推定原因食と考えられた。しかし一部調理従事者、食材からNLVは検出できず感染源、感染経路を特定することは出来なかった。

最後に、NLVの電子顕微鏡による形態観察に協力していただいた、徳島県食肉衛生検査所に深謝いたします。

参考文献

- 1) 食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生実態調査研究班編：
「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）
- 2) 斎藤博之，八柳 潤，佐藤宏康他：病原微生物検出情報月報，18，131-132（1997）
- 3) 入谷展弘，勢戸祥介，春木孝祐他：病原微生物検出情報月報，19，3（1998）
- 4) 嶋田啓司，山本保男，津島 明：徳島県保健環境センター年報，17，5-9，（1999）
- 5) Ando T, Monroe SS, Gentsch J et al: J Clin Microbiol, 33, 64-71（1995）
- 6) 佐原啓二，杉枝正明，長岡宏美他：平成11年度全国食品衛生監視員研修会研究発表抄録，35-38（1999）
- 7) 山崎謙治，大山 徹，宇田川悦子他：感染症学雑誌，74，470-475（2000）
- 8) 篠原美千代，内田和江，島田慎一他：衛生微生物技術協議会第22回研究会，67，（2001）