

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)  
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」  
研究協力報告

ノロウイルスふき取り調査及び  
下水サンプルを用いた腸管感染ウイルスの流行解析

研究協力者	三好 龍也	堺市衛生研究所
研究協力者	中谷 誠宏	堺市衛生研究所
研究協力者	岡山 文香	堺市衛生研究所
研究協力者	福井 陽子	堺市衛生研究所
研究協力者	内野 清子	堺市衛生研究所
研究協力者	小林 和夫	堺市衛生研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

調理施設におけるノロウイルス (NoV) の汚染状況や不顕性感染も含めた調理従事者における NoV の感染実態を明らかにすること及びふき取り検査法の検討を行うため、調理施設のトイレ等のふき取り調査を行った。また、カキなどの二枚貝の重要な汚染源である下水中のウイルスについて調査を行い、腸管感染ウイルスの流行解析を行った。

ふき取り調査では、31 施設の 179 検体から NoV 遺伝子検出を試みたが、NoV 遺伝子は検出されなかった。模擬サンプルを用いたふき取り検査の NoV 遺伝子検出期間に関する検討では、汚染後 1 ヶ月以上検出されることが考えられた。

下水サーベイランスでは、NoV については、臨床サンプルと下水サンプルから得られた結果は、よく相関していた。その他のサポウイルス等については、臨床サンプルからの検出頻度は低かったが、下水サンプルからは高頻度に検出された。臨床と環境の両面からウイルス遺伝子を検出・解析することによって、腸管感染ウイルスの流行状況の全体像を把握することが可能と考える。

これらの解析結果は、NoV 等のウイルス性食中毒や感染症の予防対策を考える上で、有用な情報を与えると考えられる。

### A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) 食中毒は、調理従事者等による食品汚染を原因とした事例が多く、不顕性感染者が発端となること

も多くある。しかしながら感染経路等の詳細について不明な点が多い。また、NoV のふき取りについては、検査法や検出感度等の課題がある。

調理施設における NoV の汚染状況や不顕性感染も含めた調理従事者における NoV の感染実態を明らかにすること及びふき取り検査法の検討を行うため、調理施設のトイレ等のふき取り調査を行った。

一方、下水中に含まれるウイルスは、カキなどの二枚貝の重要な汚染源であり、それらを解析することは、カキなどの汚染源の調査やカキ等を原因とする食中毒の解析にも寄与すると考えられる。

食中毒対策の一助とするために、食中毒や感染性胃腸炎の散発・集団発生から得られた患者便等の臨床面と下水処理場の流入水の環境面の両面から NoV の流行状況を調査し、NoV 流行を解析した。

加えて、患者発生の頻度は低いが生食中毒の起因ウイルスとなり得る NoV 以外のウイルスの検出も実施し、汚染状況の解析も行った。

## B. 研究方法

### 1. ふき取り調査

#### 1-1 材料

5 名以上の調理従事者が在籍している調理施設の調理従事者用トイレ等（調理施設内の冷蔵庫の取っ手、物資搬入口のドアノブ、調理従事者専用トイレのドアノブ、照明スイッチ、手洗い蛇口栓、水洗レバー、便器（便座の裏側又は便器の内側））をふき取り対象とし、31 施設の 179 検体を調査材料とした。ふき取りは、2017 年 10 月～2018 年 1 月に実施した。

#### 1-2 方法

ワイプチェック TE-302（佐藤化成工業所）のリン酸緩衝生理食塩水 10mL を 1mL に減量したものをを用いてふき取り、

「ノロウイルス拭取り検査用試薬キット」（島津製作所）を用いて、添付文書に従い NoV 遺伝子検出を行った。

また、ふき取り検査の検出期間の検討を行うため、スライドガラスに NoV を塗布、風乾後 20°C で保管し、風乾直後、1 週間、2 週間、1 ヶ月後（n=3）に上記の方法で NoV 遺伝子検出を行った。

### 2. 下水サーベイランス

#### 2-1 材料

環境サンプルとして、2015 年 1 月から 2017 年 12 月までに堺市内の 3 つの下水処理場で毎月 1 回採水された流入水 108 検体を調査対象とした。臨床サンプルとして、同期間に発生した食中毒及び集団感染事例 8 事例、散発事例（感染症発生動向調査における感染性胃腸炎患者等）49 例を調査対象とした。

#### 2-2 下水サンプルの濃縮法

これまでの報告書に準じて行った。すなわち、流入水及び放流水を遠心後（3,400xg 30min、13,000xg 45min）、上清 1,000ml を分取し、最終濃度 0.05M の MgCl<sub>2</sub> を添加後、HCl で pH3.5 に調整した。調整済み液を HA フィルター（0.45 μm）でろ過し、ウイルスをフィルターに吸着させた。フィルターを細断し、pH10.5 グリシン buffer（流入水：5.0ml、放流水：2.0ml）で溶出後、HCl で pH6.5 に再調整し、11,000xg 20min 遠心した上清を RNA 抽出用のサンプルとした。

#### 2-3 ウイルス遺伝子検出法

臨床サンプルについては、RNA 抽出後、NoV、サポウイルス（SaV）、アストロウイルス（AsV）、アイチウイルス（AiV）については、ウイルス性下痢症診断マニュアル

ルに準じてそれぞれウイルス遺伝子検出を行い、A型肝炎ウイルス(HAV)については、nested RT-PCR (primers: JCT-2F/1R-A/2R)により遺伝子検出を行った。陽性例については、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、系統樹解析により遺伝子型を判定した。

下水サンプル(流入水)については、濃縮処理後、臨床サンプルと同様にウイルス遺伝子検出を行った。下痢症ウイルスについては、TAクローニングを行い、塩基配列を決定した。遺伝子型は系統樹解析により判定した。NoVの遺伝子型番号は、Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>)に従った。また、流入水を用いてNoVリアルタイムPCRを実施し、採取水1ml当たりのコピー数を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

## C. 研究結果

### 1. ふき取り調査結果

#### 1-1 トイレ等のふき取り調査結果

31施設から採取した179検体において、NoV遺伝子は検出されなかった。

#### 1-2 ふき取り検査の検出期間の検討

1週間、2週間、1ヶ月後のすべてのサンプルでNoV遺伝子が検出された。Ct値についても大きな変化はみられなかった(図1)。

### 2. 下水サーベイランス結果

#### 2-1 NoV遺伝子検出結果

2017年は、臨床サンプルからGIで4

種類(GI.1, 2, 3, 4)、GIIで4種類(GII.2, 4, 6, 17)計8遺伝子型のNoVが検出された(図2)。

下水サンプルでは、GIで6種類(GI.1, 2, 3, 4, 6, 7)、GIIで7種類(GII.2, 3, 4, 6, 13, 17, 21)計13遺伝子型が検出された。GII.2, GII.4型が多く検出された(表1)。

#### 2-2 下水中のNoV遺伝子定量測定結果

下水中の遺伝子量は、NoV GI、GIIとも12月、1月にピークがみられた。GIIの遺伝子量は、GIより約10倍多かった(図3)。2016/17シーズンは、堺市内の感染性胃腸炎の患者報告数が12月に定点あたり10を超え、過去5年間で最も多くなり、下水中のNoV遺伝子量(GII)も同様に1月に過去5年間で最も多くなった。(図4)。

#### 2-2 NoV以外のウイルス遺伝子検出結果

SaVについては、下水サンプルでは、2017年は年間を通じてほとんどの月で検出され(GI.1, 2, 3, 6, GII.2, 3)、GI.1とGI.2が多く検出された(表2)。

AsVについては、2017年は臨床サンプルからは検出されなかったが、下水サンプルでは、年間を通じてほとんどの月で検出された(表2)。AiVは、下水中から2017年6月までのほとんどの月で検出されてきたが、7月以降検出頻度が少なくなった。

HAVについては、2017年は臨床サンプル、下水サンプルともに検出されなかった。

## D. 考察

### 1. ふき取り調査

調理施設のふき取り調査では、NoVは検

出されなかった。聞き取り調査より、対象施設は、体調不良者もなく、トイレの清掃も行われており、衛生管理が良く行われている施設であった。また、調査期間には NoV の大きな流行がみられておらず、これらの要因により、検出されなかった可能性が考えられる。調査対象、期間の再考が必要である。

ふき取り検査出期間の検討では、1ヶ月後のサンプルでも NoV 遺伝子が検出された。1ヶ月以上前の汚染でも、ふき取り検査で陽性になる可能性があり、実際の事例において、ふき取り検査陽性の解釈に注意が必要と考えられる。

今回使用したキットは、3時間程度と、従来の PEG 沈法と比較して短時間で結果が得られ、ふき取り調査法として有用な方法と考えられる。

## 2. 下水サーベイランス

NoV による感染性胃腸炎や食中毒が多く発生する 12月～2月に下水中の NoV 遺伝子量が増加し、臨床サンプルから検出される遺伝子型は、すべて下水サンプルからも検出された。これらのことより、下水中の NoV 遺伝子を調査することにより、NoV 流行を解析することができると考えられる。

下水中の NoV 遺伝子量のピーク値が大きいシーズンは、その後の非流行期と考えられる時期にも遺伝子量が多くなり、多くの感染者の存在が示唆された。流行のピーク時の感染者を減少させることが、全体としての感染者を減少させ、NoV 食中毒や感染症を減少させることにつながると考えられる。

下水中のウイルス遺伝子検出では、SaV、

AsV、AiV など感染症発生動向調査などの統計上、顕在化しないウイルスについても広域的な感染状況は把握することができる。臨床と環境の両面からウイルス遺伝子を検出・解析することによって、下痢症ウイルスなどの腸管感染ウイルスの浸淫状況の全体像の把握ができると考える。これらの解析結果は、NoV 等のウイルス性食中毒や感染症の予防対策を考える上で、有用な情報を与えると考えられる。

## E. 結論

調理施設のトイレ等を対象としたふき取り調査を実施したが、NoV は検出されなかった。ふき取り検出期間に関する検討では、1ヶ月後のサンプルでも遺伝子が検出された。

下水流入水を用いて、下痢症ウイルス等の検出を行い、臨床サンプルから得られた結果と合わせて解析を行った。

これらの結果は、NoV 食中毒や感染症の予防に有用な情報を与える。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

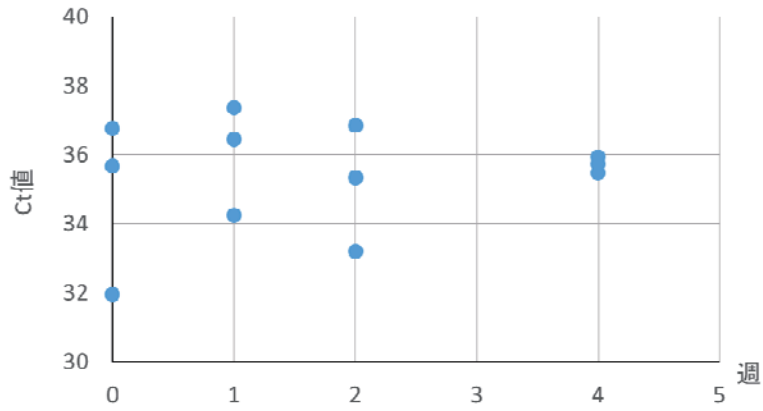


図1 ふき取り検査におけるNoV検出期間

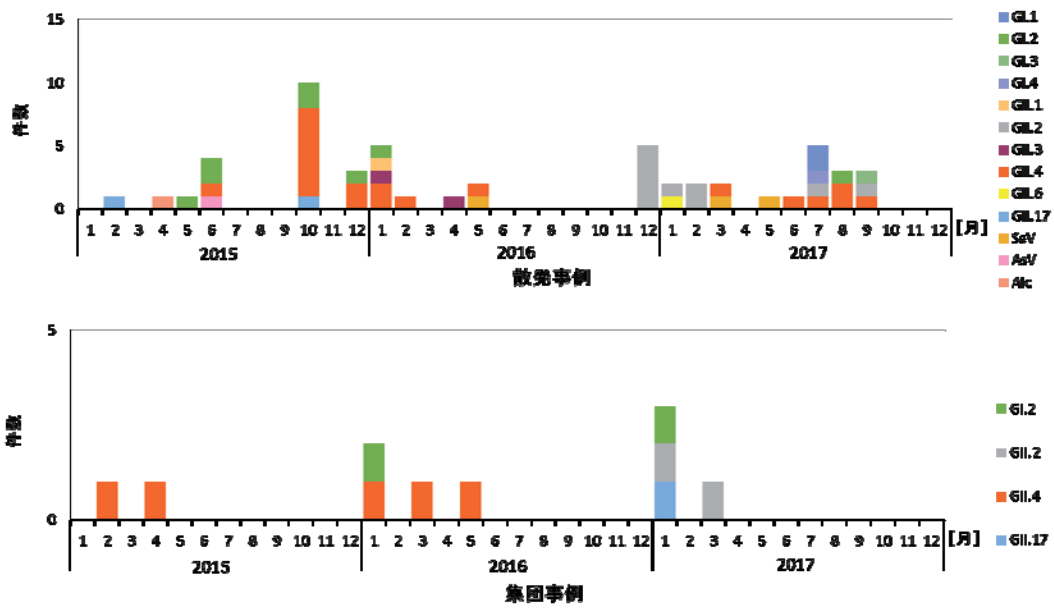
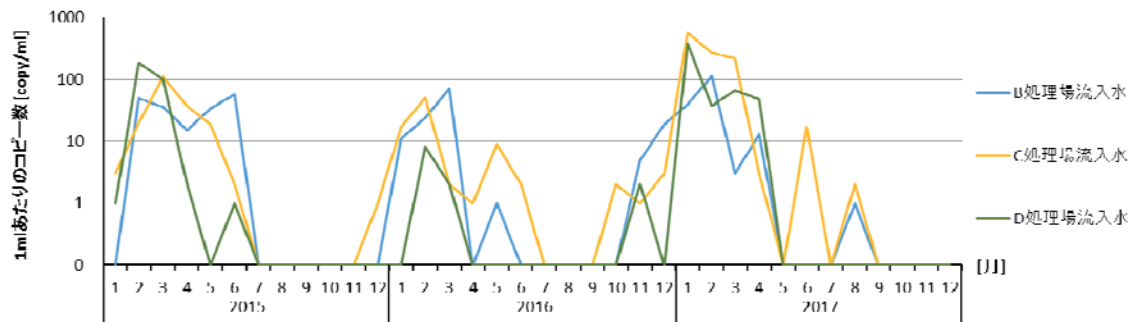


図2 臨床検体からの下痢症ウイルス検出状況

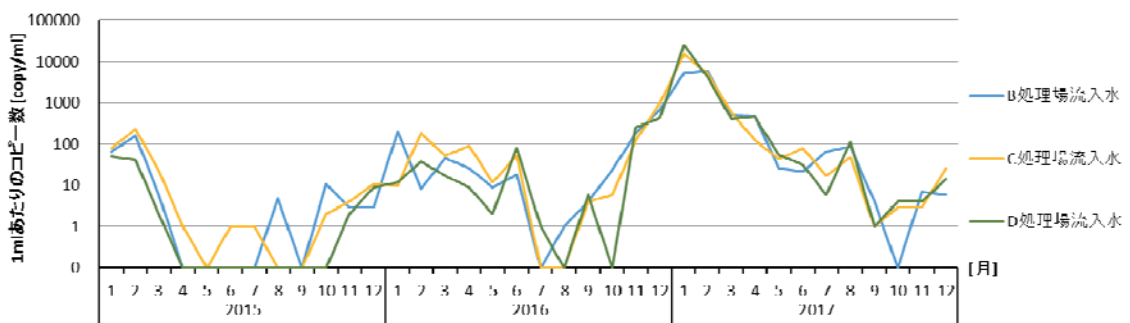
表1 下水中のNoV検出状況（B～D 定点流入水）

検出 virus			2015年												2016年												2017年														
			1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月			
NoV	GI.1	B																																							
		C																																							
		D																																							
	GI.2	B																																							
		C																																							
		D																																							
	GI.3	B																																							
		C																																							
		D																																							
	GI.4	B																																							
		C																																							
		D																																							
	GI.6	B																																							
C																																									
D																																									
GI.7	B																																								
	C																																								
	D																																								
GI.9	B																																								
	C																																								
	D																																								
GI.17	B																																								
	C																																								
	D																																								
GI.21	B																																								
	C																																								
	D																																								

型別実施中



NoV GIリアルタイムPCR測定結果



NoV GI IIリアルタイムPCR測定結果

図3 下水中のNoV 遺伝子定量結果

