

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)  
「食中毒原因ウイルス等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした失活法の  
開発のための研究」  
分担研究報告書

## 食品等従事者における上気道飛沫中の ノロウイルスの調査

研究分担者	岡 智一郎	国立感染症研究所 ウイルス第二部
研究協力者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
	植木 洋	株式会社 日本環境衛生研究所
	高木 弘隆	国立感染症研究所 安全実験管理部
	八尋 俊輔	熊本県保健環境科学研究所

### 研究要旨

ノロウイルスによる食中毒発生要因としては調理従事者の糞便・嘔吐物由来の食品汚染が主と想定されてきた。しかし、近年の疫学解析によって胃腸炎症状の有無に関わらず口腔、鼻腔咽頭ぬぐい液や唾液からもノロウイルスが検出されることが明らかとなりつつある。そのため本研究では調理従事者・食品取扱者の上気道飛沫によるノロウイルス汚染の可能性について調査するため、唾液中のノロウイルス検査法を構築し、登録衛生検査所の協力のもと、調理従事者・食品取扱者を対象にノロウイルス検出状況の実態調査を行った。また地方衛生研究所において集団事例における糞便・唾液中のノロウイルス検出も実施した。

### A. 研究目的

ノロウイルスによる食中毒発生要因として、調理従事者の糞便・嘔吐物飛沫による食品汚染が主と想定されてきた。しかし、近年の疫学解析により、胃腸炎症状の有無に関わらず口腔、鼻腔咽頭スワブや唾液からもノロウイルス核酸が検出されることが明らかとなってきた(Dábilla N et al., J. Clin. Virol. 2017; 87:60-66., Anfruns-Estrada E et al., Viruses. 2020;12 :1369.)。さらに本研究

班が始まってから、ヒトノロウイルスが唾液腺細胞株に感染し増殖すること、*in vivo* 実験系で唾液を介したマウスノロウイルス感染も報告された(Ghosh S. et al., Nature. 2022; 607:345-350.)。

糞便以外の上気道粘液からノロウイルスが検出されれば、糞便・嘔吐物汚染以外のルートでもノロウイルスが感染伝播する可能性が示され、感染制御対策のための新たな知見となりうることから、本研究では我が国の調理従事者・

食品取扱者を介した食中毒発生の汚染源の可能性を探るため、糞便に加え、上気道粘液として医療関係者を介在せず非侵襲的に自己採取できる唾液を対象にノロウイルスが検出されるか検討することとした。

## B. 研究方法

### 1. 材料

#### 1) ノロウイルスをスパイクした唾液検体

ノロウイルス陰性の市販唾液（健常者の唾液を pool したもの）（991-05-P Lee BioSolutions, コスモ・バイオ取り扱い）にノロウイルス陽性糞便 GI.7 GII.4 を添加し、GI スパイク唾液：  $8.0 \times 10^7$  viral genomic copies/mL、GII スパイク唾液：  $4.9 \times 10^7$  viral genomic copies/mL を調製した。

#### 2) 調理従事者・食品取扱者の唾液検体

株式会社 日本環境衛生研究所において糞便中のノロウイルス検査を行う調理従事者・食品取扱者のうち、本研究への参加（糞便と同時に採取した唾液の提供）の同意が得られた方を解析対象とした。採取した唾液検体（匿名化済み）、合計 304 検体を国立感染症研究所に送付し、抽出核酸を用いた RT-リアルタイム PCR によるノロウイルスのスクリーニング検査を行った。検体採取日および数の内訳は

2022. 12. 7 (n=62)、2023. 1. 5 (n=62)、  
2023. 1. 26 (n=58)、2023. 2. 8 (n=64)、  
2023. 2. 13 (n=58)  
である。

### 2. ノロウイルスの検出

抽出操作は自動核酸抽出機 MagNaPure 96 (Roche) を使用し、MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (ロシユ 6543588001) で行った。200 $\mu$ L の唾液を使用し、50 $\mu$ L に溶出後、COG1 F/R プライマーと RING1-TPa, TPb プローブ、もしくは COG2-F/R プライマーと RING2-TP プローブを用いたリアルタイム RT-PCR、あるいは COG1 F/G1SKR もしくは G2SKF/SKR プライマーを用いた RT-PCR 法でノロウイルスの核酸検出を行った。

リアルタイム PCR 用のマスターミックスは cDNA を鋳型にする QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen 204343)、Luna universal probe qPCR Master Mix (New England Biolabs M3004)、抽出核酸をそのまま鋳型にする TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher Scientific 4444434) で行い、それぞれキットの指示通りの組成、温度条件で反応させ、7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) で検出した。

Conventional PCR 用のマスターミックスは KAPA 2G HotStart Ready Mix with dye (KAPA Biosystems KK5610) を用いた。1-step 系以外の核酸検出系については、Random 6 mer (タカラバイオ 3801) と RevTra Ace (東洋紡 TRT-101) を用いて cDNA 合成を行った。

(倫理面への配慮)

調理従事者・食品取扱者からの唾液検体採取に先立ち、国立感染症研究所において人を対象とする生命科学・医学系

研究に関する倫理審査を申請し、2022年7月に承認を得た（承認番号1405）。

### C. 研究結果

ノロウイルスGIもしくはGIIをスパイクした唾液を用いた検討により、使用したリアルタイム用マスターミックス、conventional PCR用マスターミックスはいずれも $5 \times 10^1$  viral genomic copies/ $\mu$ Lまで検出できた。

例年の検出動向から糞便からのノロウイルス陽性率が増加する12月より株式会社日本環境衛生研究所の協力のもと、胃腸炎症状のない調理従事者・食品取扱者から提供された唾液検体（304検体）を対象にノロウイルス核酸の抽出・検出を行った。今回は陽性コントロールとして用いたノロウイルスをスパイクした唾液の結果から、抽出核酸をそのまま使用することが可能で、より多くの抽出核酸を反応系に持ち込むことができ、同じノロウイルス濃度の検体の場合、より低いCt値でシグナルを検出できたTaqMan Fast Virus 1-Step Master Mixで行った。

今回の解析では調理従事者・食品取扱者唾液検体からのノロウイルス陽性例はなかった。なお、株式会社日本環境衛生研究所において解析対象となった協力者の糞便のノロウイルスを検出したところ、これらもすべて陰性であった。

また本研究期間中に、熊本県保健環境科学研究所において、高齢者施設における集団胃腸炎事例（1事例）の病原因子検索を目的として8名の糞便および唾液のノロウイルス検出を実施した。

糞便からはノロウイルス（GII、Ct値：17.6～34.8）を検出したが、唾液からはノロウイルスが検出されなかった。

### D. 考察

調理従事者・食品取扱者糞便におけるノロウイルス陽性率は例年、冬季は1%程度とのことであったが、今回の解析では糞便、唾液いずれからもノロウイルスが検出されなかったため、唾液における陰性結果は妥当と考えた。

国立感染症研究所の集計によると、今回解析対象とした2022.12～2023.2のノロウイルスの報告数は2020.2までと比較しても半数以下で推移していた（[https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/rapid/noro/230410/norolong\\_230410.gif](https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/rapid/noro/230410/norolong_230410.gif)）。このようなノロウイルスの低い検出状況も本研究班の目的である唾液からノロウイルス検出に影響した可能性がある。

また今回解析できた集団胃腸炎事例対象者の唾液からはノロウイルスが検出されなかった。従来の糞便での解析では発症後、経時的にウイルス排泄量が減少することが知られていることから、今回は糞便でノロウイルスが陽性となつてから、後日唾液の採取・調査を実施したことも影響した可能性が考えられた。

### E. 結論

当初の研究計画通り、初年度にノロウイルスをスパイクした唾液サンプルを用いて、唾液からのノロウイルス検出に適した核酸抽出、検出系を選定した。現時点では健常調理従事者・

食品取扱者ならびに有症胃腸炎集団事例の解析対象者の唾液からノロウイルスは検出されていないが、次年度以降も継続して取組む。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表：

- 1) Distribution of Human Sapovirus Strain Genotypes over the last four Decades in Japan: a Global Perspective. Doan YH, Yamashita Y, Shinomiya H, Motoya T, Sakon N, Suzuki R, Shimizu H, Shigemoto N, Harada S, Yahiro S, Tomioka K, Sakagami A, Ueki Y, Komagome R, Saka K, Okamoto-Nakagawa R, Shirabe K, Mizukoshi F, Arita Y, Haga K, Katayama K, Kimura H, Muramatsu M, **Oka T**. *Jpn J Infect Dis.* 2023 Mar 31. doi: 10.7883/yoken.JJID.2022.704. Online ahead of print.
- 2) Myeloid-associated differentiation marker is an essential host factor for human parechovirus PeV-A3 entry. Watanabe K, **Oka T**, Takagi H, Anisimov S, Yamashita SI, Katsuragi Y, Takahashi M, Higuchi M, Kanki T, Saitoh A, Fujii M. *Nat Commun.* 2023 Mar 31;14(1):1817. doi: 10.1038/s41467-023-37399-8.

3) Characterization of a Human Sapovirus Genotype GII.3 Strain Generated by a Reverse Genetics System: VP2 Is a Minor Structural Protein of the Virion. Li T-C, Kataoka M, Doan YH, Saito H, Takagi H, Muramatsu M, **Oka T**. *Viruses.* 2022 Jul 27;14(8):1649. doi: 10.3390/v14081649.

4) Atomic Structure of the Human Sapovirus Capsid Reveals a Unique Capsid Protein Conformation in Caliciviruses. Miyazaki N, Song C, **Oka T**, Miki M, Murakami K, Iwasaki K, Katayama K, Murata K. *J Virol.* 2022 May 11;96(9):e0029822. doi: 10.1128/jvi.00298-22.

5) A Human Intestinal Cell Line Suitable for the Propagation of Human Parechovirus Type 1 to 6 with a Clear Cytopathic Effect. Takagi H, **Oka T**, Ami Y, Suzaki Y, Saito H. *Jpn J Infect Dis.* 2022 May 24;75(3):318-321. doi: 10.7883/yoken.JJID.2021.534.

##### 2. 学会発表：

- 1) 非胃腸炎症例の咽頭拭い液からの下痢症ウイルス検出。岡智一郎、高木弘隆、斎藤博之。第63回日本臨床ウイルス学会 2022.6.

- 2) 汎用細胞増殖系を活用した下痢症ウイルスの浄水処理性の評価.

白崎伸隆, 胡秋晗, 白川大樹, 高木弘隆, 岡智一郎, 松下拓, 松井佳彦. ウイルス性下痢症研究会第33回学術集会, 2022. 11.

- 3) ヒトサポウイルス研究加速のための遺伝子型網羅的リソース確立に向けた取り組み. 岡智一郎, 李天成, 米満研三, 網康至, 須崎百合子, 中村(桶本)優子, 片岡紀代, 団海燕, 三田哲朗, 小林孝行, 斎藤博之, 八尋俊輔, 佐藤重紀, 柴田伸一郎, 塚田竜介, 高木弘隆. 第69回日本ウイルス学会, 2022. 11.

#### H. 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