

令和4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）
「食品媒介感染症被害実態の推計に基づく施策評価のための研究」
分担研究報告書

ノロウイルスの感染実態推計に向けた環境検体調査

研究分担者 上間 匡 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 部長
研究協力者 遠矢 真理 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 主任研究官
齋藤 博之 秋田県健康環境センター 保健衛生部 部長
秋野 和華子 秋田県健康環境センター 保健衛生部 ウイルス班

研究要旨

COVID-19 経過後、ノロウイルスを原因とする食中毒事件数および患者数は COVID-19 以前の状況に戻りつつある。ノロウイルスによる胃腸炎は食品を介する食中毒や食品を介さずにヒト-ヒト間の伝播による感染性胃腸炎として経験するが、食中毒としての報告は医療機関で食中毒として診断された場合に限られ、感染性胃腸炎は小児科定点からの報告数に限られているほか、不顕性感染者も存在するため、全年齢層をカバーするノロウイルスの感染実態は不明である。ヒトから排出されたノロウイルスは、下水や河川水中から検出されることから、本分担研究では、下水検体や河川に生息する二枚貝を検体としてノロウイルス遺伝子がどの程度検出されるかについて検証した。今後は環境検体からのウイルス検出から感染実態の推定方法について検討を行う。

A. 研究目的

ノロウイルスや A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスは、世界的に食品媒介性病原ウイルスとして認識されている。なかでもノロウイルスは、国内で毎年発生する食中毒において、食中毒患者の半数の原因物質として報告される重要なウイルスである。また、食品を介さないヒト-ヒトでの伝播による感染性胃腸炎の原因ウイルスとしても重要であり、小児科定点での監視が行われている。

現在の国内のノロウイルスによる健康被害の把握は食中毒統計および感染性胃腸炎の小児科定点からの報告により行われている。食中毒報告の場合は、胃腸炎発症者が医療機関を受診し、診察医師が食中毒と診断した場合に初めて食中毒として報告され

るため、医療機関を受診しない場合や、受診しても食中毒と診断されないなどの場合は、ノロウイルス関連食中毒としては把握されない。感染性胃腸炎の場合も同様に、ノロウイルスによる胃腸炎診断が保険適用となる小児や高齢者を除いて、一般成人の場合は胃腸炎に対処するのみで原因ウイルス等については診断されないと考えられるほか、ノロウイルスと診断しても保健所等への報告の必要がないので、小児科定点からの報告以外にはノロウイルスによる胃腸炎患者数は通常不明である。さらにノロウイルスに感染しても特に胃腸炎症状などを発症しない不顕性感染者の存在もあり、ノロウイルスの実際の感染者数を推定することは現時点では困難である。

COVID-19 パンデミックを機に、世界的に下水中の病原体検索により人口における病

原体の把握を行う下水疫学が大きく注目されるようになった。ヒトに胃腸炎を起こすノロウイルスは、基本的にヒトの体内でのみ増殖し、排出されるためヒトの排泄物が流入する下水にはノロウイルスが存在する。

また、カキをはじめとする二枚貝は成長過程で環境中に存在する微生物を取り込むことから、ノロウイルスや A 型肝炎等の食品媒介性ウイルスを蓄積することが知られ、河川に生息する二枚貝はウイルスを蓄積するフィルターとして機能し環境中のウイルスの探知が可能と考えられる。

本研究では、ノロウイルスの感染実態の把握に寄与する指標の一つとして、下水および河川に生息する二枚貝を定期的にサンプリングし、検体に含まれるノロウイルスの検出を実施した。

B. 研究方法

1. 下水検体

秋田県健康環境センターの協力を得て、A 下水処理場にて毎月第 4 週に流入下水を採取し、冷蔵にて国立医薬品食品衛生研究所へ送付した。検体到着後に、下水検体は 40mL ずつプラスチック遠心チューブに分け、冷蔵または冷凍にて保存した。

2. 河川生息二枚貝検体

二枚貝の採取地域として、人口が大きく、比較的採取が容易な多摩川河口域（川崎市側）を選定した。奇数月、午前中に大きく潮が引く日時を 1 日選定して、二枚貝を採取した。

二枚貝は採取当日にむき身の状態にして冷凍保存した。

3. 検体の処理

下水

40mL に対してポリエチレングリコール 3.2g、NaCl 3.2g を添加し、一晚低温室（4℃）で回転・溶解後に、12,000rpm、30 分、4℃にて遠心し沈渣を PBS にて懸濁し、RNA 抽出に供した。

二枚貝

ISO15216-1¹⁾の手順に従い、二枚貝 1 粒に対して水および proteinase K を加えて 37℃で 1 時間消化後に、60℃15 分の加熱後に 5,000rpm、10 分、4℃で遠心し、上清を RNA 抽出に供した。

4. ウイルス RNA 抽出法

ウイルス RNA の抽出は磁気ビーズ法 Maxwell RSC Virus Total Nucleic Acid Purification kit（Promega 社、機械自動抽出）を用いた。

5. 遺伝子検出

抽出 RNA を用いて、ノロウイルスの遺伝子検出を 1 Step RT-qPCR にて実施した。

1 Step RT-qPCR 試薬として TaqMan Fast virus 1-Step Master Mix（ThermoFisher Scientific）を使用した。

C. 研究結果

1. 下水からのノロウイルス検出

2023 年 4 月から 2024 年 2 月までの検出状況を表 1 に示した。ノロウイルス GI は 2023 年 4 月から 12 月までは不検出であった。一方で GII については、夏季の 7 月から 10 月までは不検出であったが、4 月から 6 月、11 月から 2 月まで検出された。

検出された場合のリアルタイム PCR の Ct 値は GI では、2024 年 1 月が 35.09、2 月が 32.09 となった。GII では 2023 年 4 月 26.43、5 月 29.84、6 月 31.0、11 月 28.68、12 月 27.96、1 月 29.87、2 月 28.75 となった。

ノロウイルス GI に比較して、GII の検出頻度の高さ、Ct 値も小さい傾向があった。

2. 河川生息二枚貝からのノロウイルス検出

多摩川河口域（川崎市側、キングスカイフロント地区河岸）にて奇数月に二枚貝を採取した。採取した二枚貝のうち、10 粒から RNA 抽出を行い、ノロウイルス遺伝子検索を実施した結果を表 2 に示した。

ノロウイルス GI は 2024 年 1 月と 3 月に 1 粒から検出された。GII は 2023 年 7 月に 1 粒、2024 年 1 月に 1 粒、3 月に 3 粒から検出された。

D. 考察

COVID-19 経過後、ノロウイルスによる食中毒事件数、患者数は COVID-19 以前の状況に戻りつつあり、食品総合システム（旧 NESFD）で共有される食中毒速報では、11 月から 4 月におけるノロウイルス関連速報が多く報告されている。本研究の下水および二枚貝でのノロウイルス検出状況は、夏季においてウイルス検出ができなかったが、下水では 4 月から 6 月、11 月から 2 月にかけてノロウイルスが検出されており、国内のノロウイルスの流行状況のある程度反映していると考えられた。

多摩川河口域の二枚貝でも、2024 年 1 月 3 月はノロウイルス GI、GII とともに検出されており、ある程度の流行状況を反映している

と思われるが、季節による二枚貝の採取数に変動が見られることから、下水を検体とした場合が安定して市中の感染実態を把握することができると考えられる。

ノロウイルスの感染実態の推計が可能かについて検討を進めていくために、引き続き下水検体中のノロウイルス遺伝子の検索を実施しつつ、食中毒速報などを元にした流行状況と、下水処理場の対応する人口規模、食品取扱者で実施されているノロウイルス便検査の情報等を収集していく必要があると考える。

E. 結論

ノロウイルス感染による健康被害情報が、食中毒報告、および小児科定点からの胃腸炎報告のみとなっている現状において、感染実態把握に向けて下水等の環境検体からのウイルス検出データの利用について検討を進めていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

I. 参考文献

- (1) International Organization for Standardization (ISO). 2017. IS015216-1:2017. Microbiology of food chain-horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR-Part1: method for quantification
<https://www.iso.org/standard/74263.html>

表 1. 下水中のノロウイルス遺伝子検出状況(2023 年 4 月ー2024 年 2 月) 数値は Ct 値

月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2
GI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	35.09	32.09
GII	26.43	29.84	31	ND	ND	ND	ND	28.68	27.96	29.87	28.75

ND; Not
detected

表 2. 河川二枚貝中のノロウイルス遺伝子
検出状況（陽性数/検査数）

月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
GI		0/10		0/10		0/10		0/10		1/10		1/10
GII		0/10		1/10		0/10		0/10		1/10		3/10